

Untersuchung und Validierung der humanen Protein-glycosylierung hinsichtlich der Eignung als Biomarker anhand der Proteine *β_2 -Glycoprotein I* und *Prolactin-inducible Protein*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

Fachbereich Chemie

Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Universität Hamburg

vorgelegt von

Jan-Mirco Rusche geb. Schulz

aus Hamburg

Hamburg 2019

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Oktober 2014 bis Dezember 2018 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Bernd Meyer am Institut für Organische Chemie, Fachbereich Chemie, angefertigt (Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Christian B. W. Stark).

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Meyer
2. Gutachter: Prof. Dr. Christian B. W. Stark

Datum der Disputation: 18. Oktober 2019

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Glycosylierung von Proteinen	1
1.2 Glycoproteine in der Medizin	4
1.2.1 β_2 -Glycoprotein I	6
1.2.2 Prolactin-inducible Protein	10
1.3 Analytik von Glykokonjugaten und Glycanen	13
2 Zielsetzung	15
3 Material und Methoden	17
3.1 Material	17
3.1.1 Geräte/Materialien	17
3.1.2 Software	18
3.1.3 Enzyme	18
3.2 Isolierung von (Glyco-)Proteinen	18
3.2.1 Probenahme von humanem Speichel	19
3.2.2 Isolierung von PIP aus humanem Speichel	21
3.2.3 Isolierung von B2GPI aus humanem Blutplasma	21
3.3 Enzymatische Spaltungen	23
3.3.1 Enzymatische Spaltung mit Trypsin	23
3.3.2 Enzymatische Spaltung mit Thermolysin	24
3.3.3 Enzymatische Spaltung mit der Endoproteinase GluC	24
3.4 LC-MS-Messungen	25
3.4.1 Messung der intakten Proteine	26
3.4.2 Messung der enzymatischen Spaltungen	27
3.5 Auswertung der Spektren	29
3.5.1 Matlab-unterstützte Analyse der intakten Glycoproteine	30
3.5.2 Auswertung der enzymatischen Spaltungen von B2GPI	31
4 Ergebnisse und Diskussion	34
4.1 Analyse der Glycosylierung von erworbenen B2GPI	35
4.1.1 Matlab-unterstützte Analyse des intakten B2GPI	35
4.1.2 Analyse von B2GPI durch enzymatische Spaltungen	41
4.2 Analyse von isoliertem B2GPI gesunder Probanden	46
4.3 Evaluation und Validierung von PIP als Biomarker	59

Inhaltsverzeichnis

4.3.1	Einfluss der Glycosylierung auf das Elutionsverhalten.....	59
4.3.2	Belastbarkeit der computergestützten Analyse.....	69
4.3.3	Reproduzierbarkeit der Daten	73
4.3.4	Einfluss des Zeitpunktes der Probenahme	78
4.3.5	Einfluss der Speichelproduktion auf die Glycosylierung.....	84
4.3.6	Einfluss der Probenlagerung auf die Glycosylierung.....	86
5	Zusammenfassung.....	110
6	Summary.....	113
7	Sicherheit.....	115
7.1	Arbeiten mit biologischem Probenmaterial	117
8	Literatur.....	118
9	Anhang.....	129
10	Danksagung	169
11	Eidesstattliche Erklärung	170

Abkürzungsverzeichnis

APA	Antiphospholipid-Antikörper
APC	aktiviertes Protein C
APS	Antiphospholipidsyndrom
B2GPI	<i>β_2-Glycoprotein I</i>
BioStoffV	Biostoffverordnung
CCP	<i>Complement Control Protein</i>
CDG	<i>Congenital Disorders of Glycosylation</i>
CID	<i>Collision-induced Dissociation</i>
DNA	Desoxyribonucleinsäure
emPAI	<i>Exponentially Modified Protein Abundance Index</i>
EPO	Erythropoetin
ER	endoplasmatisches Retikulum
EIC	<i>Extracted Ion Chromatogram</i>
ESI	<i>Electrospray-Ionization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GCDFP-15	<i>Gross Cystic Disease Fluid Protein-15</i>
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
(U)HPLC	<i>(Ultra) High Performance Liquid Chromatography</i>
ISCID	<i>In Source Collision-induced Dissociation</i>
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
LID	<i>Laser-induced Dissociation</i>
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MaxEnt	<i>Maximum Entropy</i>
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption-Ionization</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PEG	Polyethylenglycol
pl	isoelektrischer Punkt
PIP	<i>Prolactin-inducible Protein</i>
PTM	posttranslationale Modifikation
RNA	Ribonucleinsäure
rcf	<i>Relative Centrifugal Force</i> , entspricht g
SABP	<i>Secretory Actin Binding Protein</i>

Abkürzungsverzeichnis

SCR	<i>Short Consensus Repeats</i>
S/N	Signal-zu-Rausch
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SOP	<i>Standard Operating Procedure</i>
TIC	<i>Total Ion Current</i>
TOF	<i>Time of Flight</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Aminosäure	Dreibuchstaben-Code	Einbuchstaben-Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Abkürzungsverzeichnis

Zucker	Abkürzung	Einbuchstaben-Code*	Symbol
D- <i>N</i> -Acetylglucosamin	GlcNAc (HexNAc)	N	
D- <i>N</i> -Acetylgalactosamin	GalNAc (HexNAc)	N	
D-Mannose	Man (Hex)	H	
D-Galactose	Gal (Hex)	H	
L-Fucose	Fuc (dHex)	F	
D- <i>N</i> -Acetylneuraminsäure	NeuAc	S	
D- <i>N</i> -Glycolylneuraminsäure	NeuGc	G	

*Der Einbuchstaben-Code der Zucker und Aminosäuren überschneidet sich und lässt sich nur aus dem Kontext richtig deuten.

1 Einleitung

Biochemische Prozesse bilden das Grundgerüst jeglichen Lebens. Die hohe Komplexität lebender Organismen zeigt die Notwendigkeit einer großen Anzahl verschiedenster biochemischer Mechanismen.^[1] Entsprechend des zentralen Dogmas der Molekularbiologie, welches letztendlich den Fluss der genetischen Information von der DNA zu den Proteinen darstellt, gelten die Proteine als funktionelle Darstellung unseres genetischen Codes, was sie für jegliche biologischen Prozesse unerlässlich macht.^[1-2] Durch co- und posttranslationale Modifikationen (PTMs) von Proteinen wird deren Vielfalt und somit auch die Anzahl möglicher Funktionen signifikant erhöht, sodass modifizierte Proteine sicherlich zu den komplexesten Naturstoffen zählen. Es wurden bisher über 200 PTMs beschrieben wie beispielsweise die Phosphorylierung, die Acetylierung und die Glycosylierung.^[1, 3-5] Aufgrund der vielen biologischen Prozesse, an denen modifizierte Proteine teilhaben, ist deren Erforschung für das tiefere Verständnis der Vorgänge im menschlichen Körper unerlässlich.

1.1 Glycosylierung von Proteinen

Eine der wichtigsten und komplexesten Modifikation von Proteinen stellt die Glycosylierung dar, wobei Oligosaccharide kovalent an verschiedene Aminosäuren geknüpft sein können.^[6-7] Diese Oligosaccharide werden dann als Glycan bezeichnet, während die Gesamtheit aller Glycane, in Analogie zum Genom oder Proteom, als Glycom bekannt ist.^[8-9] Durch statistische Betrachtungen der SWISS-PROT Datenbank zeigte sich, dass etwa 2/3 aller Proteine glycosyliert vorliegen.^[10]

Die weitreichende Verbreitung der Glycane im menschlichen Körper deutet auf ihre enorme Wichtigkeit für viele biologische Prozesse hin. Die Erforschung der Glycosylierung kann somit zu einem deutlichen Informationsgewinn bezüglich dieser Prozesse führen, was insbesondere im Bereich der Medizin im Hinblick auf verschiedenste Erkrankungen von großem Interesse ist. Glycane erfüllen viele komplexe und lebensnotwendige Funktionen.^[6, 11] So wird beispielsweise die Proteinfaltung sowie deren Qualitätskontrolle im endoplasmatischen Retikulum von Glycanen stark beeinflusst. Außerdem weisen sie schützende und stabilisierende Eigenschaften auf. Glycane sind auf nahezu allen Zelloberflächen finden, wo sie unter anderem an der Zelladhäsion, der Aktivierung von Rezeptoren und an Erkennungsprozessen von Pathogenen beteiligt sind.^[6-8, 11-13]

Die Anzahl der unterschiedlichen biologischen Prozesse, die von Glycanen beeinflusst werden, lässt bereits auf das größte Problem der Glycomik (Erforschung des Glycoms) schließen - die sehr hohe Vielfalt und Komplexität der Glycane bzw. Glycoproteine.^[7, 14] Neben

der möglichen α - und β -Konfiguration der Bindung zweier Monosaccharide besteht außerdem die Möglichkeit, dass die Verknüpfung über unterschiedliche Hydroxylgruppen stattfindet (chemische Vielfalt), wobei die Anzahl und Art der Verzweigungen ebenfalls variieren kann.^[7, 15] Unter Berücksichtigung dieser Variationsmöglichkeiten ergeben sich beispielsweise für ein Hexamer mit zehn potentiellen Monosaccharidbausteinen 193 Milliarden Kombinationen.^[16] Da die Glycane nur indirekt über die Glycosyltransferasen durch das Genom codiert werden, kann jedes Protein mehrere Glycoformen aufweisen.^[6-7, 15] Dieses Phänomen wird als Mikroheterogenität bezeichnet.^[16] Des Weiteren weisen einige Proteine mehrere potentielle Glycosylierungsstellen auf, sodass auch mehrfache Glycosylierungen vorkommen.

Die dominanten Glycane können bei Glycoproteinen in zwei Gruppen eingeteilt werden: *N*-Glycane und *O*-Glycane.^[9] Als weitere Gruppe werden häufig die sogenannten Glycosaminoglycane erwähnt. Hierbei handelt es sich um Polysaccharidketten von Proteoglycanen, welche einen Anteil von bis zu 95% des entsprechenden Glycoproteins aufweisen können.^[1]

Bei den *O*-Glycanen ist das Oligosaccharid *O*-glycosidisch an die Aminosäuren Serin und Threonin, seltener an Tyrosin, Hydroxylysin und Hydroxyprolin gebunden, wobei eine Vielzahl verschiedener Peptidmotive bekannt sind, die glycosyliert werden. Bei den Kohlenhydraten sind acht unterschiedliche *core*-Strukturen bekannt.^[6-7, 17-18] Die Verknüpfung an das Protein findet hierbei meist über ein *N*-Acetylgalactosamin statt. Es konnten aber auch Bindungen über Galactose, Glucose, Mannose oder Fucose beobachtet werden.^[19] Die Biosynthese der *O*-Glycane findet posttranslational im Golgi-Apparat statt. Dabei wird das Oligosaccharid schrittweise durch verschiedene Glycosyltransferasen aufgebaut.^[6-7]

Als *N*-Glycane werden Oligosaccharide bezeichnet, welche *N*-glycosidisch mit der Aminosäure Asparagin der Sequenz Asn-X-Ser/Thr verknüpft sind, wobei X jede beliebige Aminosäure außer Prolin darstellt.^[7, 9, 17] Neben dem einheitlichen Peptidmotiv weisen alle *N*-Glycane einen Pentasaccharid-*core* aus drei Mannosen und zwei *N*-Acetylglucosaminen auf. Die für die Bindung erforderliche Kondensationsreaktion findet zwischen dem anomeren Zentrum des ersten *N*-Acetylglucosamins (GlcNAc) und der Amidfunktion des Asparagins statt (**Abb. 1**). Es wird geschätzt, dass etwa 90% aller potentiellen *N*-Glycosylierungsstellen besetzt sind.^[20]

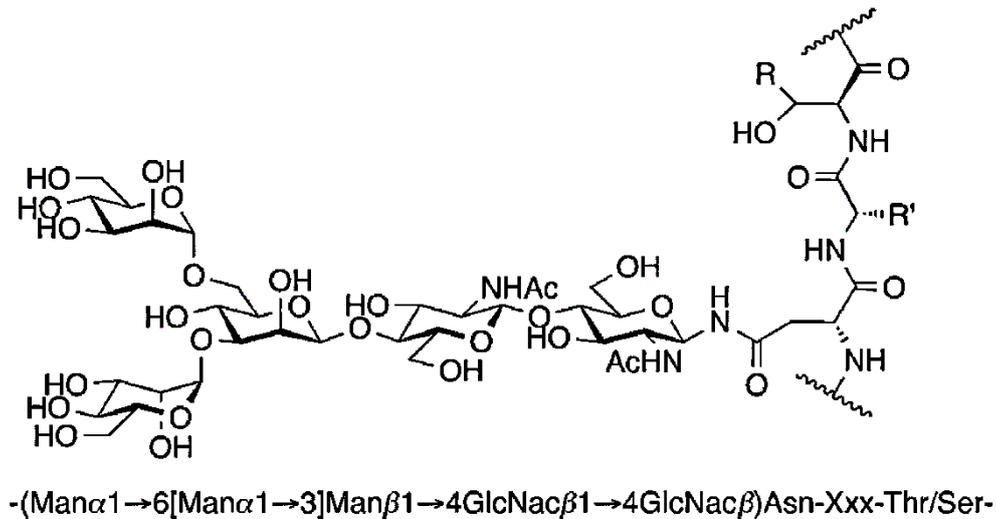


Abb. 1: N-glycosidische Bindung von Oligosacchariden mit Proteinen.^[17] Bei *N*-Glycanen ist ein GlcNAc mit einem Asparaginrest der Sequenz Asn-X-Ser/Thr (X: jede beliebige Aminosäure außer Prolin) verknüpft. Das gezeigte Saccharid ist der für *N*-Glycane typische *core* Man₃GlcNAc₂. Der *core* weist einen Man- α 1→3- und einen Man- α 1→6-Arm auf.

Die Biosynthese der *N*-Glycane findet co-translational im endoplasmatischen Retikulum (ER) und posttranslational im Golgi-Apparat statt. Das von den Ribosomen synthetisierte Protein wird bei einer entsprechenden Signalsequenz in das Lumen des ER transportiert. Bei der Lokalisation ins ER findet zunächst eine durch Oligosaccharyltransferasen katalysierte Übertragung eines Vorläufer-Oligosaccharids der Komposition Glc₃Man₉GlcNAc₂ auf das Asparagin statt. Anschließend werden die Glucosen und eine Mannose durch Glycosidasen abgespalten. Das korrekt gefaltete Protein wird dann zum Golgi-Apparat transportiert, wo die restlichen nicht zum *core* gehörenden Zucker abgespalten werden. Verschiedene komplexere Glycane werden durch die terminale Verknüpfung aktivierter Monosaccharide durch Glycosyltransferasen synthetisiert. Vom Golgi-Apparat werden die Glycoproteine entsprechend ihrer Funktion weiterverteilt.^[1, 20-21] Es wird im Allgemeinen bei *N*-Glycanen je nach Struktur zwischen *high-mannose*-, *hybrid*- und *complex*-Typen unterschieden (**Abb. 2**).

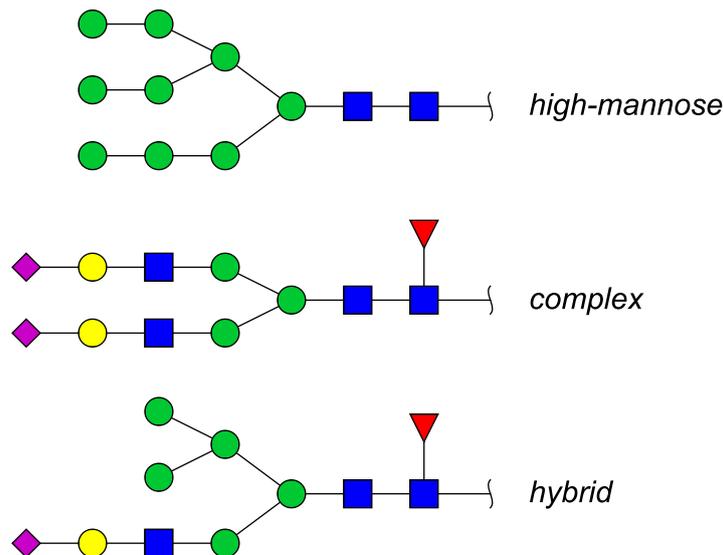


Abb. 2: Unterschiedliche Typen von N-Glycanen. Bei dem *high-mannose*-Typ sind an beide Arme des *core* weitere Mannosen geknüpft, während bei dem *complex*-Typ die Arme durch Bindung von N-Acetylglucosaminen an die terminalen Mannosen des *core* verlängert werden. Der *hybrid*-Typ kann als Kombination der anderen beiden angesehen werden. Hier ist der Man- α 1 \rightarrow 6-Arm mit Mannosen verknüpft und der Man- α 1 \rightarrow 3-Arm weist eine oder mehrere *complex*-Typ-Antennen auf.

1.2 Glycoproteine in der Medizin

Aufgrund der enormen Bedeutung von Glycanen bei einer Vielzahl biologischer Prozesse spielt die Glycosylierung auch in der Medizin eine wichtige Rolle. Es zeigte sich, dass anormale Glycosylierungen mit verschiedenen Beschwerden und Krankheiten assoziiert sind, wobei oft nicht abschließend geklärt ist, ob die abweichenden Glycanstrukturen nur symptomatisch oder kausal für die Krankheiten sind.^[9, 11, 22-23] Es sind beispielweise etwa 100 sogenannte *Congenital Disorders of Glycosylation* (CDG; Stand: 2017) bekannt, bei denen eine fehlerhafte Glycosylierung kausal für teilweise schwerwiegende Erkrankungen ist.^[24] Durch die Untersuchung des Glycoms könnte somit das Verständnis vieler biologischer Prozesse und Krankheiten gesteigert werden. Des Weiteren dienen Glycoproteine als potentielle biologische Marker für verschiedene Krankheiten und als Therapeutika bzw. *targets* für solche.^[8-9, 25]

Die Korrelation zwischen abweichenden Glycosylierungsmustern und Krankheiten weisen Glycoproteine als potentielle Biomarker aus.^[9, 26] Für Krebs beispielsweise sind 18 Proteine von der *Food and Drug Administration* (FDA; Stand: 2013) als Biomarker zugelassen, wobei nahezu alle eine Glycosylierung aufweisen.^[27] Leider zeigt sich, dass die Zahl der pro Jahr zugelassenen Biomarker deutlich gesunken ist, was unter anderem an den hohen Standards der auf Medikamente ausgelegten Zulassungskriterien der FDA liegt. Um dem Sonderfall des Biomarkers gerecht zu werden, wurde das *Biomarker Qualification Program* entwickelt.^[28] Dennoch konnten in den letzten fünf Jahren nur drei Biomarker in die *List of Qualified*

Biomarkers aufgenommen werden.^[29] Biomarker für Krebs haben häufig den Nachteil der geringen Sensitivität und vor allem Spezifität. Die Erklärung hierfür ist, dass meist nur die Konzentration des entsprechenden Proteins in Geweben oder Körperflüssigkeiten bestimmt wird, wobei diese auch bei gutartigen Neubildungen oder bei inflammatorischen Krankheiten erhöht sein kann.^[25] Es wird vermutet, dass abweichende Oligosaccharidstrukturen eine deutlich höhere Spezifität aufweisen, sodass Glycoproteine hervorragende Biomarker darstellen können.^[9] In **Abb. 3** ist der Prozess der zellulären Karzinogenese und der damit verbundenen Änderung der Proteinglycosylierung gezeigt. Bei Krebs wurden verschiedene abweichende Glycosylierungsmuster beobachtet, die sowohl diagnostische als auch prognostische Möglichkeiten bieten. Neben dem vermehrten Auftreten von T-, Tn- und STn-Antigenen bei O-Glycanen sind auch der Anstieg von Lewis-Strukturen sowie die Erhöhung des Verzweigungsgrades zu beobachten.^[26] Als Grund für die Veränderung der Glycosylierung ist eine veränderte Expressionsrate der entsprechenden Glycosyltransferasen in den entarteten Zellen zu nennen.^[22-23, 25]

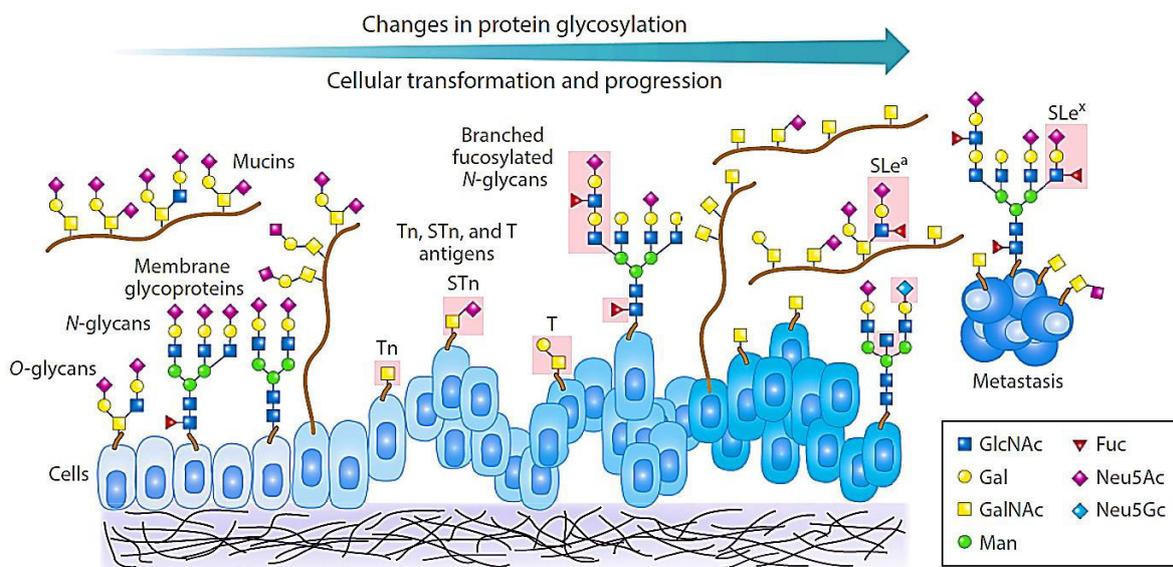


Abb. 3: Veränderung der Glycosylierung bei einer Krebserkrankung.^[26] In verschiedenen Studien konnte eine Korrelation zwischen abweichenden Glycanstrukturen und Krebserkrankungen beobachtet werden. Hier ist die Veränderung der Glycane mit fortschreitender Tumorentwicklung schematisch gezeigt. Neben dem vermehrten Auftreten von T-, Tn- und STn-Antigenen bei O-Glycanen sind auch der Anstieg von Lewis-Strukturen sowie die Erhöhung des Verzweigungsgrades zu beobachten.

Da die abweichenden Glycanstrukturen häufig an der Oberfläche der betroffenen Zellen zu finden sind, scheinen Glycoproteine bzw. Glycoprotein-assoziierte Moleküle potentielle *targets* für Therapeutika und Antibiotika darzustellen.^[8-9] Des Weiteren können Glycoproteine auch selbst als Therapeutika dienen. EPO, welches zur Behandlung von Anämie eingesetzt wird,

ist beispielsweise eines der am meisten gentechnisch hergestellten Medikamente.^[9] Bei dieser Substanz ist die Glycosylierung entscheidend für die Funktion und die Verweildauer des Glycoproteins im Körper. Ein weiterer Fokus der Forschung liegt im Bereich der Entwicklung eines Impfstoffes gegen Krebs auf Basis von Glycoproteinen.^[25]

In den folgenden Kapiteln werden zwei Glycoproteine näher beschrieben, das β_2 -*Glycoprotein I* und das *Prolactin-inducible Protein*. Beide Proteine wurden im Rahmen dieser Arbeit analysiert, wobei das Hauptaugenmerk auf der Glycosylierung lag. In beiden Fällen zeigten vorangegangene Experimente das Potential als Biomarker.

1.2.1 β_2 -Glycoprotein I

Das β_2 -*Glycoprotein I* (B2GPI), welches auch als Apolipoprotein H bekannt ist, ist ein etwa 50 kDa schweres, hoch glycosyliertes Plasmaprotein.^[30] Es wurde erstmals 1961 aus humanem Blutserum isoliert.^[31] B2GPI besteht aus einer 345 Aminosäuren langen Polypeptidkette mit mehreren Domänen, wobei ein Signalpeptid mit 19 Aminosäuren vorhanden ist, sodass die aktive Form 326 Aminosäuren besitzt (**Abb. 4**).^[32-33] Es wird vorwiegend von den Hepatozyten synthetisiert und wird anschließend in den Blutstrom sekretiert, wo es an verschiedene negativ geladene Stoffe wie Heparin, DNA oder Phospholipide von Zellmembranen binden kann.^[30, 34-35] Die reine Polypeptidkette weist eine Summenformel von $C_{1621}H_{2479}N_{419}O_{474}S_{26}$ und eine monoisotopische Masse von 36208 Da auf. B2GPI besitzt vier *N*-Glycosylierungsstellen an den Positionen 162 (¹⁶²**N**NS¹⁶⁴), 183 (¹⁸³**N**DT¹⁸⁵), 193 (¹⁹³**N**WT¹⁹⁵) und 253 (²⁵³**N**WS²⁵⁵). Des Weiteren wird am Thr-149 ein *O*-Glycan vermutet.^[36] B2GPI weist verschiedene Isoformen auf, die sich in ihrem pI-Wert unterscheiden. Die unterschiedlichen Isoformen können neben genetischen Varianten vor allem durch die Anwesenheit verschiedener Glycane erklärt werden, die sich in der Anzahl der Antennen und der Zuckerzusammensetzung unterscheiden.^[37] Die Glycane haben aufgrund ihrer sauren Eigenschaften, welche vor allem durch die Sialinsäuren (NeuAc und NeuGc) und die Sulfatierung bzw. gegebenenfalls Phosphorylierung hervorgerufen werden, einen großen Einfluss auf den pI-Wert des entsprechenden Glycoproteins.

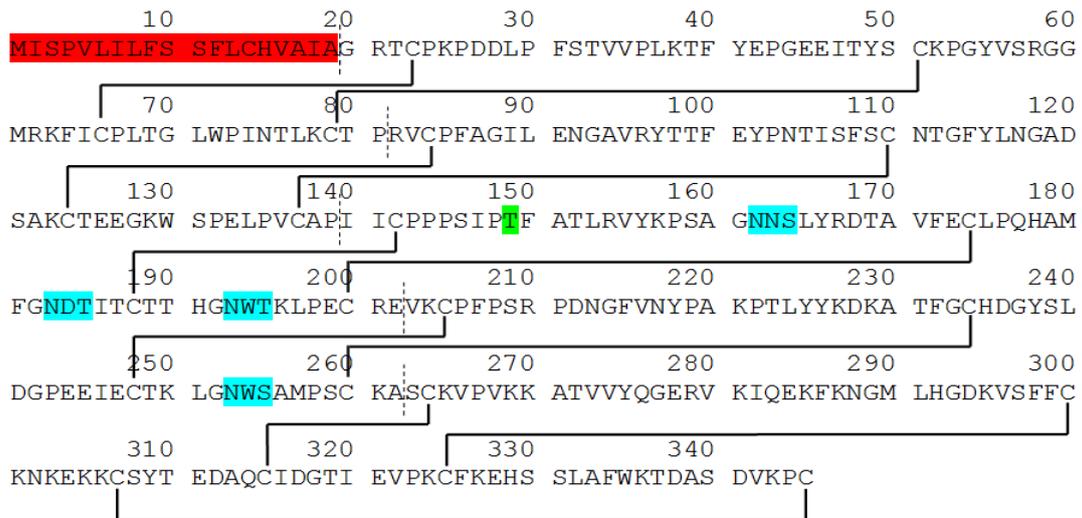


Abb. 4: Primärstruktur von B2GPI.^[38] B2GPI besteht aus 345 Aminosäuren und weist ein Signalpeptid (rot) auf. Die einzelnen Domänen sind durch gestrichelte Linien voneinander getrennt. Innerhalb der Domänen treten zwei (Domäne 1-4) bzw. drei (Domäne 5) Disulfidbrücken auf. An den Positionen 162, 183, 193 und 253 hat B2GPI jeweils eine *N*-Glycosylierungsstelle und an der Position 149 eine *O*-Glycosylierungsstelle.

B2GPI gehört zur CCP-Superfamilie (*Complement Control Protein*), die sich durch wiederholende Einheiten aus etwa 60 Aminosäuren zusammensetzt, wobei etwa 16 dieser Aminosäuren sowie zwei Disulfidbrücken stark konserviert vorliegen.^[33, 36] Diese sich wiederholenden Einheiten werden als *Short Consensus Repeats* (SCR) bezeichnet. B2GPI weist fünf Domänen auf, die als Sushi 1-4 und als Sushi-like-Domäne bezeichnet werden (**Abb. 5**). Während die ersten vier Domänen von B2GPI reguläre SCR darstellen, weist die fünfte Domäne zusätzliche Aminosäuren und Disulfidbrücken auf und unterscheidet sich daher stark von den anderen. Die ersten vier Domänen sind aus mehreren β -Faltblättern aufgebaut, welche über Schleifen miteinander verbunden sind. Die fünfte Domäne hingegen weist eine zentrale β -Spirale und zwei kleine α -Helices auf.^[36] B2GPI scheint in der Lage zu sein, verschiedene Tertiärstrukturen auszubilden. In Lösung wurden zwei verschiedene Strukturen beobachtet. Mittels Röntgenkleinwinkelstreuung wurde eine S-förmige Struktur identifiziert, bei der die Glycane die erste Domäne abschirmen.^[39] Elektronenmikroskopische Untersuchungen hingegen zeigten, dass B2GPI in Lösung eine zirkuläre Struktur einnimmt, wobei die erste und fünfte Domäne miteinander wechselwirken.^[40] Bei Bindung von B2GPI an Phospholipide kommt es zu einer Konformationsänderung und die erste Domäne wird zugänglich. Die Glycane sind nach außen orientiert und schirmen die Domänen 3 und 4 ab. Diese Domänen scheinen also nicht direkt an der Wechselwirkung zwischen B2GPI und anderen Molekülen beteiligt zu sein, sondern dienen eher als Verbrückung zwischen den wechselwirkenden Domänen.^[36] Die Bindung von B2GPI an Phospholipide findet über die fünfte Domäne statt. Die Bindungstasche besteht hierbei aus einem positiv geladenen Bereich, der aus 12 Lysin,

einem Arginin und einem Histidin aufgebaut ist, sowie einer flexiblen, hydrophoben Schleife (³¹¹S - ³¹⁷L), die mit der Lipidschicht wechselwirkt.^[36, 41-43] Die N-terminalen Domänen 1 und 2 werden somit bei entsprechender Bindung der fünften Domäne an die Zellmembran nach außen ausgerichtet.^[36]

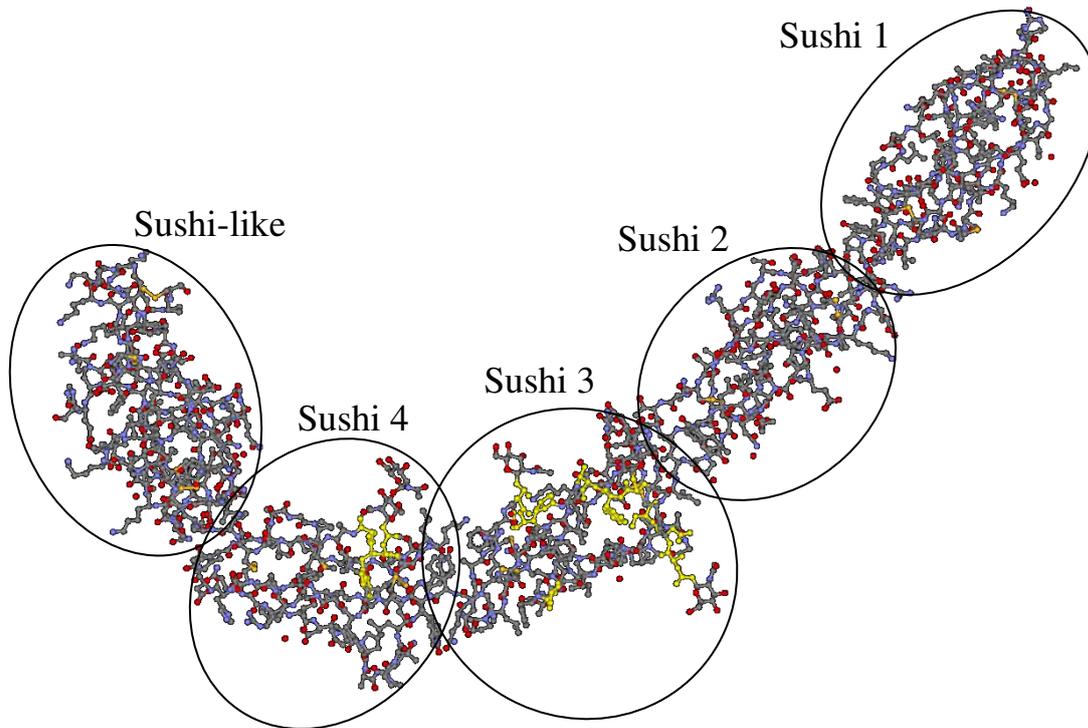


Abb. 5: Kristallstruktur von B2GPI.^[36] B2GPI besitzt fünf Domänen, die als Sushi 1-4 und als Sushi-like bezeichnet werden. Die ersten vier Domänen sind aus etwa 60 Aminosäuren aufgebaut, welche aus etwa 16 konservierten AS und zwei stark konservierten Disulfidbrücken bestehen. Die fünfte Domäne weist zusätzliche Aminosäuren und Disulfidbrücken auf und unterscheidet sich daher von den anderen. B2GPI ist ein hoch glycosyliertes Protein. Die potentiellen Glycosylierungsstellen sind gelb eingefärbt.

B2GPI scheint bei vielen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle zu spielen. Es gilt beispielsweise als Co-Faktor für die Bindung von Antiphospholipid-Antikörpern (APA) an Phospholipide, wobei vermutet wird, dass ein B2GPI-Phospholipid-Komplex als Antigen fungiert.^[41-42, 44-45] Die APA-B2GPI-Bindung ist einer der Kernprozesse beim Antiphospholipidsyndrom (APS). APS ist eine Krankheit, die zu venösen und arteriellen Thrombosen, Thrombozytopenie und Fehlgeburten führt.

Des Weiteren scheint B2GPI einige wichtige Funktionen in der Blutkoagulationskaskade zu besitzen. Es kann hierbei sowohl pro- als auch antikoagulatorische Eigenschaften aufweisen.^[46-49] Durch Bindung und Inhibition der Aktivierung des Koagulationsfaktors XI durch Thrombin und FXIIa wird beispielsweise die Bildung von Thrombin und somit die Fibrinbildung

verringert.^[46, 48] Andererseits ist es in der Lage, APC (aktiviertes Protein C) zu inhibieren, welches Koagulationsfaktoren wie beispielsweise FVa und FVIIIa inaktiviert.^[46] Aufgrund der vielen möglichen Funktionen von B2GPI innerhalb der Koagulationskaskade scheint es eine wichtige Rolle bei dessen Regulation zu spielen.

Ebenso scheint B2GPI an der Pathogenese von Hepatitis C (HCV) beteiligt zu sein, wobei es dessen Verbreitung limitiert. Des Weiteren zeigt B2GPI gute Eigenschaften als prädiktiver Biomarker für die SVR (*Sustained Virological Response*) bei Verwendung einer HCV-Therapie basierend auf NS3-Proteaseinhibitoren.^[50] Neben den bereits angesprochenen biologischen Funktionen deuten Experimente auf antioxidative und antibakterielle Eigenschaften von B2GPI hin.^[30, 51]

B2GPI ist vorwiegend im Blut zu finden. Beim Menschen liegt die Plasmakonzentration durchschnittlich bei etwa 200 µg/mL, wobei es zu starken Variationen zwischen einzelnen Individuen kommen kann. Die Variationen des Plasmalevels werden durch zwei mögliche autosomal-kodominante Allele (B2GPI*N = *normal*; B2GPI*D = *deficient*) hervorgerufen, wodurch drei Phänotypen erreicht werden (NN, ND, DD). Die Plasmakonzentration liegt bei entsprechender Ausprägung bei 150-350 mg/L (NN), 60-150 mg/L (ND) und unter 60 mg/L (DD).^[52-53] Es wird vermutet, dass sich die beiden Allele durch ein SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) der Form -32C>A im Bereich des Promotors unterscheiden, sodass die Transkription und somit die gesamte Biosynthese von B2GPI beeinflusst werden kann.^[30] Die Biosynthese von B2GPI wird letztendlich von drei Allelen, bei Menschen mit afrikanischer Abstammung vier (APOH*1-4), kontrolliert. Neben dem oben beschriebenen SNP wurden noch weitere SNPs mit daraus resultierenden Aminosäureaustauschen beobachtet wie beispielsweise S107N, R154H und V266L.^[54]

B2GPI wird in einigen Publikationen als möglicher Bestandteil der Tumorgenese und als potentieller Biomarker für verschiedene Krebsarten genannt.^[55-58] Es wird beispielweise von humanen Leberkrebszelllinien sekretiert.^[57] Des Weiteren scheint B2GPI im Gewebe von Pankreaskarzinomen hochreguliert zu sein, wohingegen es im Blutplasma herunterreguliert ist.^[55-56] In Metastasen von Leberkarzinomen ist ebenfalls eine erhöhte Sekretion zu beobachten.^[58] Da jedoch die Plasmakonzentration auch mit unterschiedlichen Krebsarten und mit anderen Erkrankungen korreliert, ist bei B2GPI keine hohe Spezifität zu erwarten. Durch Analyse der möglicherweise veränderten Glycosylierungen könnte eine deutlich erhöhte Spezifität detektiert werden. Die Glycosylierung von B2GPI wurde bei gesunden Individuen untersucht. Hierfür wurde B2GPI aus Blut mittels Affinitätschromatographien und Elektrophoresen gereinigt und die Glycane mithilfe von Lectinbindungsstudien sowie enzymatischen Spaltungen mit anschließender *Reversed-phase*- oder *Hydrophilic-interaction-*

Chromatographie und massenspektrometrischer Analyse untersucht. Hierbei gelang jedoch keine positionsspezifische Analyse aller vier Glycosylierungsstellen. Bei den Glycanen handelt es sich um fucosylierte und unfucosylierte bi- und triantennäre *complex*-Typ-Glycane, welche einen variierenden Gehalt an terminalen Sialinsäuren aufweisen.^[59-60]

1.2.2 Prolactin-inducible Protein

Das *Prolactin-inducible Protein* (PIP), auch bekannt als *Gross Cystic Disease Fluid Protein-15* (GCDFP-15) oder *Secretory Actin Binding Protein* (SABP), ist ein Glycoprotein, welches vor allem in den Sekreten exokriner Drüsen wie beispielsweise Speichel, Samenflüssigkeit oder Tränen vorkommt.^[61-64] Es ist aber auch als niedrig konzentrierte Komponente im Blut zu finden. Die Konzentration von PIP variiert je nach Körperflüssigkeit stark. Zum Beispiel liegt die Konzentration in der Samenflüssigkeit gesunder Männer bei durchschnittlich 3.4 mg/mL, wohingegen die Plasmakonzentration von gesunden Frauen nur 22 ng/mL beträgt.^[65-66]

PIP besteht aus einer 146 Aminosäure langen Polypeptidkette, welche ein Signalpeptid aus 28 Aminosäuren aufweist, sodass die aktive Form 118 Aminosäuren besitzt (**Abb. 6**). Neben zwei Disulfidbrücken ($^{65}\text{C} \rightarrow ^{92}\text{C}$, $^{89}\text{C} \rightarrow ^{123}\text{C}$) ist an der Position 105 ($^{105}\text{NRT}^{107}$) eine *N*-Glycosylierungsstelle zu finden.^[64, 67] Unter Berücksichtigung einer Pyroglutamatbildung am *N*-terminalen Glutamin beträgt die Summenformel der reinen Primärsequenz $\text{C}_{612}\text{H}_{966}\text{N}_{154}\text{O}_{179}\text{S}_5$, was einer monoisotopischen Masse von 13501 Da entspricht.^[68] In der Literatur sind verschiedene Formen von PIP mit unterschiedlichen Massen von 14 kDa, 16 kDa, 17 kDa und 20 kDa beschrieben worden.^[65, 68-69] Diese Formen lassen sich auf die Glycosylierung zurückführen, was auf eine hohe Variabilität der Glycane schließen lässt. Genauere Betrachtungen der Glycoformen von PIP aus humanem Speichel zeigten, dass es sich bei den Glycanen um bi-, tri- und tetraantennäre *N*-Glycane mit sehr hohen Sialylierungs- und Fucosylierungsgraden handelt.^[70] Es konnte beispielsweise eine triantennäre Struktur mit bis zu sieben Fucosen identifiziert werden. Dieses ungewöhnliche Glycosylierungsmuster ist ein starker Hinweis auf das Vorhandensein von Lewis-Antigenen, deren Vorkommen mit Krebserkrankungen in Verbindung gebracht wird. Wiegandt *et al.* gelang es durch NMR-spektroskopische Untersuchungen der freien Glycane von PIP, die Anwesenheit von Le^y-Strukturen nachzuweisen.^[71]

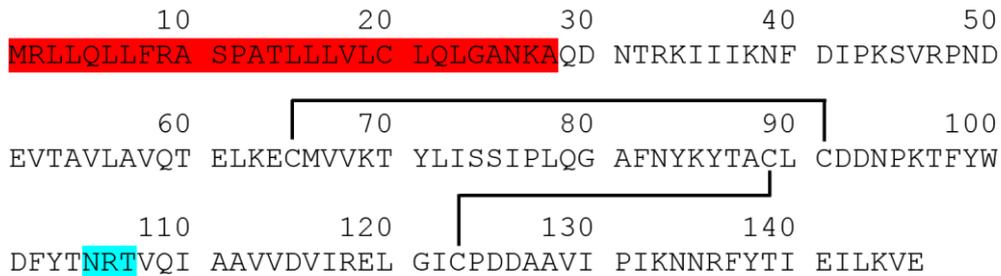


Abb. 6: Primärstruktur von PIP.^[68] PIP besteht aus 146 Aminosäuren und weist ein Signalpeptid (rot) auf. An der Position 105 liegt bei PIP eine N-Glycosylierungsstelle vor. Des Weiteren sind die beiden auftretenden Disulfidbrücken eingezeichnet.

Die Sekundärstruktur von PIP besteht aus sieben β -Strängen ($\beta 1$: ⁹Ile – ¹⁸Val, $\beta 2$: ²⁴Val – ³²Thr, $\beta 3$: ³⁸Met – ⁴⁶Ser, $\beta 4$: ⁵⁷Lys – ⁶²Leu, $\beta 5$: ⁶⁸Lys – ⁷⁴Phe, $\beta 6$: ⁸⁰Val – ⁸⁸Val, $\beta 7$: ¹¹²Ile – ¹¹⁷Val) und sieben verbrückenden Schleifen (L1: ¹Gln – ⁸Ile, L2: ¹⁹Arg – ²³Glu, L3: ³³Glu – ³⁷Cys, L4: ⁴⁷Ser – ⁵⁶Tyr, L5: ⁶³Cys – ⁶⁷Pro, L6: ⁷⁵Tyr – ⁷⁹Thr, L7: ⁸⁹Ile – ¹¹¹Thr). Die β -Stränge bilden zwei β -Faltblätter, welche in einer Sandwich-Struktur mit einem inneren Cluster aus hydrophoben Resten angeordnet sind (**Abb. 7**). In der dargestellten Kristallstruktur sind außerdem die zwei GlcNAc sowie zwei Man der *core*-Struktur gezeigt, wobei das Kohlenhydrat nach außen gerichtet ist. Es zeigt sich, dass die kovalente Bindung zum Asn-105 sowie die Wasserstoffbrückenbindungen zum Asn-49 und Gln-79 zu einer parallelen Anordnung der Schleifen L2, L4 und L6 und somit zur Stabilisierung der β -Strukturen führen.^[72]

PIP wird bei vielen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle zugesprochen. Hierzu zählen Funktionen bei der Regulation des Immunsystems, bei der Abwehr von Pathogenen (insbesondere Bakterien) und bei der sexuellen Reproduktion.^[61-62] Schenkels *et al.* zeigten beispielsweise, dass PIP in der Lage ist, verschiedene Bakterienstämme wie *Streptococci*, *Staphylococci* und *Gemella*, welche von der Haut, aus dem Gehörgang sowie aus dem Mundraum isoliert wurden, zu binden und deren Wachstum zu inhibieren.^[73-74] Unterschiedliche Studien zeigten außerdem die Interaktion von PIP mit einer großen Anzahl immunrelevanter Moleküle.^[61-62] PIP bindet unter anderem CD4 auf T-Zellen. CD4 ist einer der primären Rezeptoren bei der viralen Infektion mit HIV.^[75] Autiero *et al.* konnten beobachten, dass eine PIP/CD4-Interaktion zur Unterbrechung der Virusbindung an CD4 führt.^[76] Außerdem wird vermutet, dass PIP bei der Inhibition der erzwungenen Apoptose von T-Zellen beteiligt ist und somit zur adaptiven Immunantwort beiträgt.^[77] Die regulatorische Funktion von PIP bei der Immunität konnte auch durch Studien mit PIP-*knockout*-Mäusen bestätigt werden.^[78] Caputo *et al.* konnten außerdem erstmals zeigen, dass PIP als Aspartatprotease fungieren kann, wobei es zum Beispiel in der Lage ist, Fibronectin zu spalten.^[79] Aufgrund der zentralen Rolle von Fibronectin bei der Zelladhäsion könnte PIP auch im Bereich der multizellulären Kommunikation eine Rolle spielen.^[61]

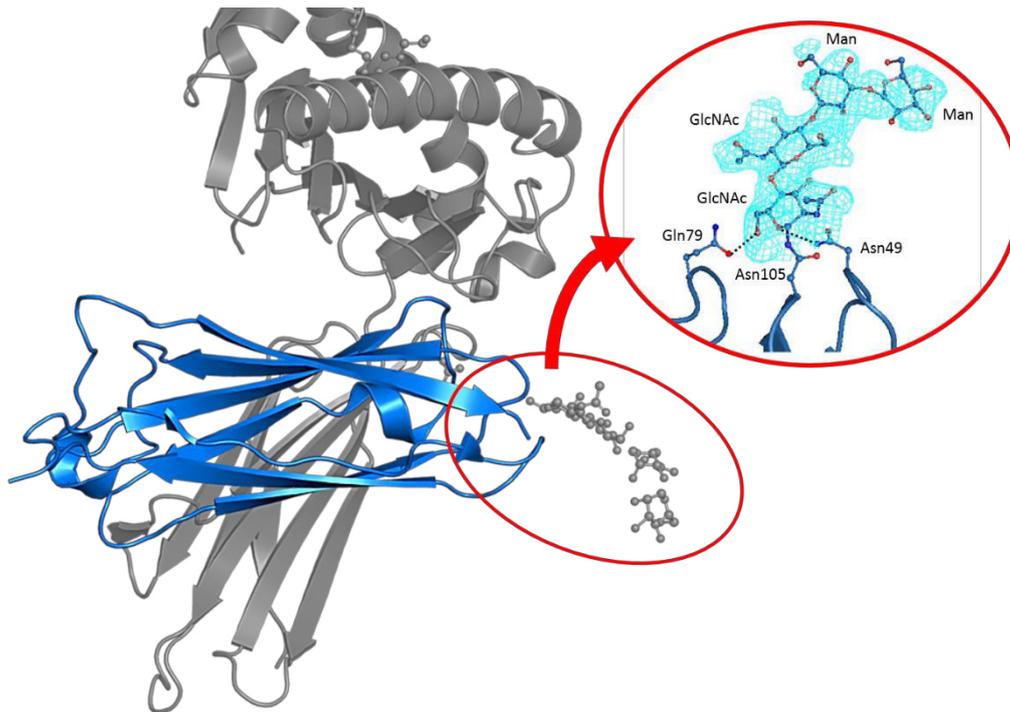


Abb. 7: Kristallstruktur von PIP.^[72] Es ist die Kristallstruktur eines Komplexes aus PIP und ZAG (Zink- α 2-Glycoprotein) dargestellt, wobei PIP blau hervorgehoben ist. Es ist zu erkennen, dass PIP aus sieben β -Strängen und sieben verbrückenden Schleifen besteht, welche zusammen zu zwei β -Faltblättern angeordnet sind. Die β -Faltblätter bilden eine Sandwich-Struktur mit einem inneren Cluster aus hydrophoben Resten aus. Des Weiteren sind in der Kristallstruktur zwei GlcNAc und zwei Man des Glycan-core zu sehen (rot markiert). Das Glycan ist nach außen gerichtet und führt durch Wasserstoffbrückenbindungen und der daraus resultierenden parallelen Anordnung von drei Schleifen zur Stabilisierung der β -Strukturen.

Im Bereich der Medizin ist PIP im Hinblick auf seine durch mehrere Studien gezeigte Beteiligung bei der Tumorentstehung und der Metastasierung verschiedener Krebsarten von großem Interesse.^[60, 76, 80-89] So konnte bereits 1985 durch Shiu *et al.* die Rolle von PIP bei der Entstehung von Brustkrebs gezeigt werden.^[69] Später wurde die Überexpression von PIP in verschiedenen Krebszelllinien wie der T47D-Zelllinie für Brustkrebs beobachtet.^[90-91] Hierbei wird vermutet, dass PIP durch seine Proteaseaktivität sowie der starken Bindungseigenschaften zu CD4⁺-T-Zellen einen signifikanten Einfluss auf die Tumorentwicklung hat.^[76, 79] PIP wird daher als diagnostischer Biomarker für Brustkrebs angesehen, wobei vor allem auf dem Level der mRNA vielversprechende Ergebnisse erzielt wurden.^[92-95] Neben Brustkrebs wird PIP auch bei anderen Krebsarten ein Einsatz als prognostischer Biomarker zugesprochen. Hier sind vor allem Prostata-, Ovarial- und Darmkrebs sowie Adenokarzinome des Gehirns und der Lunge zu nennen.^[96-102]

Wie bereits erwähnt, zeigt PIP ein ungewöhnliches Glycosylierungsmuster mit der Anwesenheit von Le^y-Strukturen auf. Diese Beobachtung im Zusammenhang mit der vermuteten Beteiligung von PIP an der Tumorentstehung von Brustkrebs könnte PIP als Glyco-basierten Biomarker auszeichnen.^[71, 103]

1.3 Analytik von Glykokonjugaten und Glycanen

Um die weitreichenden Funktionen und die Bedeutung von Glycoproteinen in Organismen und vor allem bei Krankheitsprozessen vollständig zu verstehen, ist eine schnelle und leistungsfähige Analytik sehr wichtig. Aufgrund der enormen Vielfalt der Glycane ist die Analytik von Glycoproteinen eine der größten Herausforderungen der Glycomik.^[14, 104-106] Des Weiteren gibt es, anders als bei der DNA, keine Möglichkeit der Replikation und der damit verbundenen Erhöhung der Analytenmenge, sodass aufgrund der Mikroheterogenität die einzelnen Glycoformen aus biologischen Quellen sehr gering konzentriert vorliegen können.^[14, 107]

Für die Analyse von Glycoproteinen stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, wobei bisher noch keine Standardprozedur entwickelt wurde. Nach erfolgreicher Isolierung des Glycoproteins aus der entsprechenden biologischen Quelle wie beispielsweise Blut, Urin oder Gewebe kann dieses in nativer Form analysiert werden oder es wird eine enzymatische Spaltung durchgeführt, die zur Fragmentierung des Proteinrückgrats oder einer Abspaltung des Glycans führt.^[104-106] Zur Erhöhung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses wird vor der Analyse häufig eine Derivatisierung der Glycane durchgeführt.^[14, 108-109] Als analytische Methoden werden meist Flüssigchromatographien (LC), Lectinbindungsassays, die Massenspektrometrie (MS) und die NMR-Spektroskopie (NMR, *Nuclear Magnetic Resonance*) verwendet.^[14, 110-112] Um die Vorteile verschiedener Methoden zu vereinen, sind auch Kombinationen wie beispielsweise die Kombination aus LC, MS und NMR bekannt.^[111-112]

Die enzymatische Glycanabspaltung ist eine häufig eingesetzte Methode zur Analyse von *N*-Glycanen, da die Komplexität der Spektren verringert und somit die Analyse vereinfacht wird. Als großer Nachteil dieser Methode ist jedoch die aufwendige Probenpräparation und der Verlust der Information über die Glycosylierungsstelle zu nennen.^[106] Des Weiteren sind keine Enzyme bekannt, die alle *O*-Glycane selektiv vom Protein abspalten. Für eine vollständige Abspaltung der *O*-Glycane müssen chemische Methoden wie beispielsweise die basische β -Eliminierung herangezogen werden, was einen hohen Aufwand erfordert.^[113] Um diese Probleme zu umgehen, kann die enzymatische Spaltung des Proteinrückgrats in Peptide und Glycopeptide durch Proteasen (z. B. Trypsin) durchgeführt werden. Diese Methode wird als *bottom-up* bezeichnet und kann neben der Glycankomposition auch Sequenzinformationen

der Glycosylierungsstelle liefern. Jedoch ist auch hierbei oft eine aufwendige Probenaufarbeitung nötig.^[14, 114] Eine weitere Methode, welche sich vor allem durch ihre geringe Probenpräparation auszeichnet, ist die Analyse von intakten Glycoproteinen. Die Intaktanalyse bietet einen schnellen und ganzheitlichen Überblick über die Primärstruktur und die Modifikationen von Proteinen. Die Notwendigkeit einer sehr hohen Auflösung der Massenspektrometer ist hierbei aber ein großes Problem.^[115-117] Des Weiteren weisen viele Proteine mehrfache Glycosylierungen auf, was zu hoch komplexen Spektren führt. Durch computergestützte Spektreninterpretation können aber auch bei mehrfach glycosylierten Proteinen Tendenzen hinsichtlich der Glycantypen ermittelt werden.^[117] Bei Proteinen, die hohe Molekulargewichte aufweisen wie beispielsweise Antikörpern, ist aufgrund der benötigten Auflösung eine enzymatische Spaltung häufig unerlässlich. Hierbei werden vermehrt Enzyme eingesetzt, die das Protein in mehrere große Fragmente spalten (*middle-down*), sodass viele Vorteile der Intaktanalyse erhalten bleiben.^[114-115]

2 Zielsetzung

Die frühzeitige Diagnose vieler Krebserkrankungen stellt eine große Herausforderung dar. Häufig sind nur invasive Methoden für eine sichere Diagnose möglich. Die Entwicklung neuer Methoden zur Früherkennung von Krebs ist daher von größtem medizinischem und gesellschaftlichem Interesse.

Statistisch wird etwa die Hälfte aller Menschen in ihrem Leben an Krebs erkranken (Stand: Daten bis 2014). In Deutschland wurden etwa 480 000 Neuerkrankungen im Jahr 2014 registriert, wobei die relative 5-Jahres-Überlebensrate bei 59% (Männer) bzw. 65% (Frauen) lag. Insgesamt wurde in den letzten 15 Jahren eine geringe Abnahme der allgemeinen Sterberate beobachtet. Die genaue Betrachtung der Daten zeigt aber auch, dass die Sterberaten einzelner Krebsarten stark angestiegen sind.^[118] Der wichtigste Faktor zur Erhöhung der Überlebenswahrscheinlichkeit ist eine frühe Diagnose. Außerdem ist die Verfolgung des Therapieerfolgs von großem Interesse, um die Behandlung optimal anpassen zu können. Hierzu sind einfache und schnelle diagnostische Methoden nötig. Häufig stehen nur invasive Methoden wie Biopsien zur Verfügung. Die Suche nach nicht- oder minimalinvasiven, diagnostischen und therapeutischen Biomarkern ist daher in den Fokus der medizinischen Forschung gerückt. In diesem Zusammenhang sind beispielsweise das *Prostate Specific Antigen* für Prostatakrebs oder das *Carbohydrate Antigen 19-9* für Pankreaskrebs zu nennen. Es zeigt sich jedoch, dass viele Biomarker eine geringe Sensitivität und Spezifität aufweisen. Die meisten Biomarker basieren auf einer Konzentrationsveränderung bestimmter Substanzen/Proteine in Körperflüssigkeiten wie Blutplasma, Urin oder Speichel. Die Konzentration dieser Stoffe ist aber häufig auch von anderen Faktoren wie beispielsweise gutartigen Veränderungen der Organe, Entzündungsprozessen oder dem Alter abhängig.

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die Glycosylierung bestimmter Proteine bei einer Krebserkrankung verändert vorliegt. Die Analyse dieser Veränderungen kann zu einer höheren Sensitivität und Spezifität führen. Im Rahmen dieser Arbeit sollen daher die beiden Glycoproteine β_2 -*Glycoprotein I* (B2GPI) und *Prolactin-inducible Protein* (PIP) im Hinblick auf ihre Anwendbarkeit als Glyco-basierte Biomarker untersucht werden. Beide Proteine zeigten in vorangegangenen Arbeiten großes Potential.

Da insbesondere über die positionsspezifische Glycosylierung von B2GPI nur wenig bekannt ist, soll zunächst die allgemeine Glycosylierung anhand einer erworbenen Probe analysiert sowie Referenzdaten erhalten werden. Hierzu wurde zum einen die Analyse auf Ebene des intakten Glycoproteins angestrebt, zum anderen sollen enzymatische Spaltungen durchgeführt werden, um erstmals die positionsspezifische Analyse der Glycosylierung zu

erreichen. Anschließend sollen Proben von verschiedenen gesunden Probanden untersucht werden, um die natürliche Varianz des Glycosylierungsmusters abschätzen zu können. Außerdem sollen genetische Varianten oder Isoformen von B2GPI identifiziert und analysiert werden.

Die Glycosylierung von PIP wurde von Wiegandt *et al.* sehr genau untersucht, wobei mithilfe NMR-spektroskopischer Methoden die Identifikation von Le^y-Epitopen gelang. Diese Beobachtung im Zusammenhang mit der vermuteten Beteiligung von PIP an der Tumorentstehung von Brustkrebs könnte PIP als Glyco-basierten Biomarker auszeichnen. Für den potentiellen Einsatz von PIP in einer klinischen Studie soll daher die Analyse von PIP evaluiert und validiert werden. Hierbei stehen unter anderem die Reproduzierbarkeit, die Belastbarkeit des verwendeten *Matlab*-Skriptes sowie der Einfluss verschiedener Faktoren der Probenvorbereitung auf die Glycosylierung im Fokus: Bei der Reproduzierbarkeit sollen vor allem messtechnische Einflüsse sowie Einflüsse der Probenhandhabung untersucht werden. Aufgrund der hohen Komplexität der Spektren durch sich überlagernde Glycoformen wird bei der Analyse von PIP eine computergestützte Methode verwendet. Hierbei soll die Frage beantwortet werden, ob das entsprechende *Matlab*-Skript in der Lage ist, die Überlagerungen korrekt zu identifizieren. Die Untersuchung der Einflüsse verschiedener Faktoren der Probenvorbereitung soll unter anderem die natürliche Varianz der Glycosylierung innerhalb einer Woche und innerhalb eines Tages darstellen. Der bei diesen Analysen identifizierte Glycanabbau, der bei unzureichender Kühlung der Proben zu beobachten ist, stellt ein großes Problem für die Anwendbarkeit von PIP als Biomarker dar. Es soll daher nach einer Lösung gesucht werden. Hierzu wird eine chemische oder thermische Inaktivierung der Enzyme im Speichel angestrebt.

3 Material und Methoden

Einige Teile dieses Abschnitts wurden bereits im Rahmen meiner selbstständig erarbeiteten und angefertigten Masterarbeit getätigt, weshalb die Durchführungen identisch sind. Die Masterarbeit ist nicht veröffentlicht.

Alle verwendeten Chemikalien waren für analytische Zwecke geeignet. Wenn nicht anders vermerkt, wurde mit bidestilliertem Wasser gearbeitet.

3.1 Material

3.1.1 Geräte/Materialien

Tab. 1: Verwendete Geräte/Materialien

Geräte / Materialien	Firma
Amicon® Centrifugal Filters, 3K, Cellulose	Merck KGaA
Analysenwaage Mettler AE 240	Mettler-Toledo Inc.
Aeris WIDEPORÉ XB-C8, 250x2.1 mm	Phenomenex
Aeris WIDEPORÉ XB-C18	Phenomenex
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf AG
Costar® Spin-X Centrifuge Tube Filter, 0.22 µm, Celluloseacetat	Corning Inc.
ESI-q/TOF (maXis)	Bruker Daltonik GmbH
Heparin-Säule, HiTrap™ Heparin HP, 1 mL	GE Healthcare
Kinetex 1.7µm C18 100A (C ₁₈ -Säule)	Phenomenex
Lyophilisator, Alpha 1-2	CHRIST®
Nanodrop 2000c Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific Inc.
pH-Meter pH 3110	WTW GmbH
Reinstwasseranlage Ultra Clear UV 18.2 MΩ	SGwater
SEC-Säule „Superdex 75“, 10x300 mm	GE Healthcare
Thermomixer comfort	Eppendorf AG
Vortex Mixer, REAX top	Heidolph

3.1.2 Software

Tab. 2: Verwendete Software.

Software	Hersteller
Bio Tools 3.2 SequenceEditor	Bruker Daltonik GmbH
DataAnalysis 4.2	Bruker Daltonik GmbH
GlycoWorkbench 2.1	A. Ceroni, K. Maass, D. Damerell ^[119]
Matlab R2017a	MathWorks Inc.
Microsoft Office 2016 Excel	Microsoft Corporation
OriginPro 2016G	OriginLab Corporation

3.1.3 Enzyme

Tab. 3: Verwendete Enzyme.^[120]

Enzym	Beschreibung
Endoproteinase Glu-C	Endoproteinase Glu-C (aus <i>Staphylococcus aureus</i> V8) ist eine Serinprotease, die im Ammoniumcarbonat-Puffer bevorzugt nach Glutaminsäure und im Phosphatpuffer bevorzugt nach Asparagin- und Glutaminsäure spaltet.
Thermolysin	Thermolysin (aus <i>Geobacillus staerothermophilus</i>) ist eine thermostabile Metalloendopeptidase, welche bevorzugt vor Leu, Phe, Ile, Val, Met und Ala schneidet, bei denen kein Prolin direkt folgt.
Trypsin	Trypsin ist eine Serinprotease, die bevorzugt nach Arginin und Lysin spaltet, wenn kein Prolin direkt folgt.

3.2 Isolierung von (Glyco-)Proteinen

Bei der Analyse von Glycoproteinen aus humanem Probenmaterial wie beispielsweise Blut oder Speichel kann es aufgrund der komplexen Matrix zu Problemen kommen. Gerade in den Körperflüssigkeiten tritt eine große Anzahl verschiedener Proteine auf, welche in ihrer Konzentration stark variieren. Es ist daher im Bereich der Massenspektrometrie aufgrund von Effekten wie der Signalüberlagerung oder der Ionensuppression notwendig, die Proteine zu isoliert. Hierfür stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung, wobei sich vor allem Fällungs- und Chromatographiemethoden als effizient erwiesen haben.

3.2.1 Probenahme von humanem Speichel

Die Probenahme der Speichelproben wurde von den Probanden eigenverantwortlich durchgeführt. Die Probanden wurden darauf hingewiesen, dass mindestens 15 min vor der Probengabe sowie währenddessen keine Nahrung zu sich genommen werden darf. Die Aufnahme von Wasser war gestattet. Das Sammelgefäß wurde während der Probengabe mit Eis gekühlt und anschließend direkt bei -80 °C eingefroren und gelagert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Experimente durchgeführt, welche eine besondere Behandlung der Speichelproben erforderten. Im Folgenden wird in separaten Kapiteln die Durchführung dieser Probenahmen erläutert.

3.2.1.1 Experimente zur Reproduzierbarkeit

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Glycosylierung von PIP innerhalb eines Probanden wurden unterschiedliche Experimente durchgeführt. Zunächst wurde die Reproduzierbarkeit der massenspektrometrischen Analyse betrachtet. Hierfür wurde eine Speichelprobe (etwa 20 mL) eines Probanden (männlich, 29 Jahre) entsprechend **Kap. 3.2.2** aufgearbeitet und anschließend dreimal für eine LC-MS-Messung injiziert.

Des Weiteren wurde der Einfluss der Probenhandhabung auf die Reproduzierbarkeit analysiert. Hierfür wurde von einem Probanden (männlich, 29 Jahre) eine Speichelprobe (etwa 25 mL) entnommen und auf einem *Vortex Mixer* homogenisiert. Anschließend wurde drei Aliquote erstellt, welche parallel entsprechend **Kap. 3.2.2** aufgearbeitet wurden.

3.2.1.2 Experimente zum Einfluss der Probenahme

Um den Einfluss der Zeit bzw. des Zeitpunktes der Probenahme auf die Glycosylierung von PIP innerhalb eines Probanden zu untersuchen, wurden unterschiedliche Experimente durchgeführt. Zunächst wurde die Glycosylierung hinsichtlich ihrer Varianz über fünf Tage analysiert. Hierfür wurde von einem Probanden (männlich, 28 Jahre) zur gleichen Tageszeit an fünf aufeinander folgenden Tagen eine Speichelprobe (etwa 8 mL) entnommen. Die Proben wurden direkt mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Anschließend erfolgte eine parallele Aufarbeitung entsprechend **Kap. 3.2.2**.

Des Weiteren wurde die Glycosylierung hinsichtlich ihrer Varianz im Laufe eines Tages analysiert. Hierfür wurde von einem Probanden (männlich, 30 Jahre) an drei Zeitpunkten eines Tages (9:00 Uhr, 12:45 Uhr und 16:50 Uhr) eine Speichelprobe (etwa 10 mL) entnommen. Die

Proben wurden direkt mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Anschließend erfolgte eine parallele Aufarbeitung entsprechend **Kap. 3.2.2**.

Ein weiteres Experiment diente zur Analyse des Einflusses der schnellen Probengabe und der damit verbundenen erzwungenen Speichelproduktion auf die Glycosylierung. Hierfür wurden von einem Probanden (männlich, 30 Jahre) drei Speichelproben mit jeweils nur 10 Minuten Pause entnommen. Die Proben wurden direkt mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Anschließend erfolgte eine parallele Aufarbeitung entsprechend **Kap. 3.2.2**.

3.2.1.3 Experimente zum Glycanabbau

Die Analyse des Glycanabbaus wurde anhand verschiedener Messreihen bei variierender Inkubationstemperatur durchgeführt. Für jede Messreihe wurden zunächst 40 mL Speichel gesammelt (Proband: männlich, 29 Jahre) und auf einem *Vortex Mixer* homogenisiert. Anschließend wurden fünf Aliquote mit je 8 mL erstellt und für eine bestimmte Zeit bei 4 °C, 21 °C und 37 °C inkubiert. Die entsprechenden Inkubationszeiten sind in **Tab. 4** aufgeführt. Die Proben jeder Messreihe wurden nach der Zeit mit flüssigem Stickstoff eingefroren und dann parallel entsprechend **Kap. 3.2.2** aufgearbeitet.

Tab. 4: Inkubationstemperatur und Inkubationszeiten der Messreihen zur Analyse des enzymatischen Glycanabbaus.

Inkubationstemperatur	Inkubationszeit
4 °C	0 h (direkt eingefroren), 1 h, 9 h, 23 h
21 °C	0 h (direkt eingefroren), 1 h, 4 h, 9 h, 23 h
37 °C	0 min (direkt eingefroren), 30 min, 60 min, 90 min, 150 min

3.2.1.4 Experimente zur Inhibition des Glycanabbaus

Um eine mögliche Inhibition des identifizierten, enzymatischen Glycanabbaus zu untersuchen, wurde eine Messreihe durchgeführt, bei der ein Teil der Speichelprobe jeweils chemisch bzw. thermisch behandelt wurde. Hierfür wurden zunächst etwa 35 mL Speichel (Proband: männlich, 29 Jahre) entnommen und auf einem *Vortex Mixer* homogenisiert. Anschließend wurden vier Aliquote mit je 8 mL erstellt. Zwei Aliquote dienten als Positiv- bzw. Negativkontrolle und wurden ohne weitere Behandlung direkt bzw. nach einer Inkubation von 23 Stunden bei 21 °C eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Die anderen beiden Aliquote wurden hinsichtlich zwei möglicher Inhibitionsmechanismen für den enzymatischen Glycanabbau getestet: Denaturierung durch chaotrope Reagenzien und Denaturierung durch thermische Energie. Dafür wurde das eine Aliquot mit Harnstoff versetzt (Endkonzentration:

6 M) und das andere Aliquot für 17 Minuten bei 96 °C (Temperatur des Wasserbades) erhitzt. Anschließend erfolge ebenfalls eine Inkubation für 23 Stunden bei 21 °C mit anschließender Einfrierung und Lagerung bei -80 °C. Alle Proben wurden dann parallel entsprechend **Kap. 3.2.2** aufgearbeitet.

3.2.2 Isolierung von PIP aus humanem Speichel

Für die Isolierung von PIP werden vor allem chromatographische Methoden wie der Größenausschluss- und der Anionenaustauschchromatographie sowie die Kombination dieser beiden Methoden eingesetzt.^[106] Im Rahmen dieser Arbeit wurde PIP ausschließlich über eine Größenausschlusschromatographie gereinigt.

Aufgrund der hohen Viskosität von humanem Speichel war eine direkte Analyse des Probenmaterials nicht möglich. Der Speichel musste deshalb vor der chromatographischen Reinigung aufgearbeitet werden. Hierfür wurden die Speichelproben, welche nach der Probenahme bei -80 °C gelagert wurden, zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend 30 Minuten zentrifugiert (5000 g, 4 °C). Der erhaltene Überstand wurde in 1 mL-Fractionen aliquotiert und mithilfe der SpeedVac lyophilisiert. Die Lyophilisate wurden in je 50 µL einer 1 M Harnstofflösung gelöst, vereinigt und erneut zentrifugiert (20000 g, 4 °C, 15 min). Abschließend wurde der Überstand durch einen Zentrifugenfilter (*Spin-X Centrifuge Tube Filter*, 0.22 µm, Celluloseacetat) filtriert (10000 g, 4 °C). Das Filtrat wurde nun chromatographisch gereinigt.

Für die Größenausschlusschromatographie wurde eine Superdex 75-Säule der Fa. GE Healthcare und eine HPLC-Anlage der Fa. Merck Hitachi (LaChrom-Serie L-7xxx) verwendet. Als Laufmittel diente ein 10 mM Tris-Puffer (inkl. 100 mM NaCl, pH 8.0), wobei jeder Lauf isokratisch mit einer Flussrate von 150 µL/min durchgeführt wurde. Das Eluat wurde mit 300 µL pro Fraktion fraktioniert. Anschließend wurden die Fraktionen mittels MALDI auf die Anwesenheit von PIP untersucht. Alle PIP enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert.

3.2.3 Isolierung von B2GPI aus humanem Blutplasma

Die Blutplasmaproben (Plasma E - Plasma AD; ohne I, U, V, X, Y, AB) wurden vom Zentralinstitut für Transfusionsmedizin GmbH erhalten. Die Blutgruppe sowie Alter und Geschlecht der Spender sind in **Tab. 5** aufgeführt. Alle Plasmaproben wurden in 1.5 mL- oder 2 mL-Aliquoten bei -80 °C gelagert.

Tab. 5: Probenbezeichnung und Informationen zu den Blutplasma-Proben.

Probenbezeichnung	Geschlecht	Alter	Blutgruppe
Plasma E	M	26	B
Plasma F	M	19	nicht bekannt
Plasma G	M	58	A
Plasma H	M	60	A
Plasma J	W	21	0
Plasma K	W	48	A
Plasma L	W	51	AB
Plasma M	M	45	B
Plasma N	M	21	0
Plasma O	M	54	A
Plasma P	W	28	A
Plasma Q	M	24	B
Plasma R	M	55	B
Plasma S	M	46	A
Plasma T	M	47	B
Plasma W	M	22	A
Plasma Z	M	38	A
Plasma AA	M	27	0
Plasma AC	M	66	A
Plasma AD	M	46	A

Die Isolierung von B2GPI aus humanem Blutplasma erfolgte mithilfe einer Fällung mittels Polyethylenglycol (PEG) und anschließender Heparin-Affinitätschromatographie. Zunächst wurden 1.5 mL Blutplasma mit 6 mL Phosphat-Puffer (10 mM, pH 6.8) versetzt und danach tropfenweise 4.5 mL einer PEG4000-Lösung (40%, w/v) hinzugegeben. Der Fällungsansatz wurde während der Zugabe in einem Eisbad gekühlt. Nach der vollständigen Zugabe der PEG-Lösung wurde der Ansatz für 30 Minuten bei 4 °C gelagert und anschließend zentrifugiert (7000 g, 4 °C, 30 min). Der entstandene Feststoff wurde einmal mit einer PEG4000-Lösung (15% in Phosphat-Puffer) gewaschen und in 1.5 mL Tris-Puffer (20 mM, pH 8.0) aufgenommen. Der Ansatz wurde in zwei Aliquote mit je 750 µL aufgeteilt und bei -80 °C gelagert.

Für die anschließende chromatographische Reinigung wurde ein Aliquot der PEG-Fällung aufgetaut und zentrifugiert (20000 g, 4 °C, 15 min). Der Überstand wurde dann für die

Chromatographie verwendet, bei der eine Heparin-Säule der Fa. GE Healthcare und eine HPLC-Anlage der Fa. Merck Hitachi (LaChrom-Serie L-7xxx) eingesetzt wurde. Als Laufmittel A diente ein Tris-Puffer (20 mM, pH 8.0) und als Laufmittel B wurde ein Natriumchlorid-haltiger Tris-Puffer (20 mM, 700 mM NaCl, pH 8.0) verwendet. Die Flussrate betrug 600 $\mu\text{L}/\text{min}$ und es wurde folgender Gradient verwendet: 0 min, 0% B; 5 min, 0% B; 35 min, 20% B; 85 min, 50% B; 90 min, 75% B; 93 min, 75% B; 95 min, 0% B; 100 min, 0% B. Das Eluat wurde mit 400 μL pro Fraktion fraktioniert. Die B2GPI-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert.

Um eventuelle auftretende Störungen bei der Ionisierung oder bei späteren, enzymatischen Spaltungen aufgrund der hohen Salzkonzentration zu verhindern, wurde das Lyophilisat mithilfe von Zentrifugenfiltern (Amicon® *Centrifugal Filters*, 3K, Cellulose) gegen bidestilliertes Wasser dialysiert. Das Dialysat wurde erneut lyophilisiert.

Es wurde zunächst eine bereits gereinigte B2GPI-Probe von der Fa. Merck erworben und analysiert, um nähere Informationen bezüglich der Glycosylierung von B2GPI und Referenzen hinsichtlich der physikalisch-chemischen Eigenschaften wie beispielsweise das Elutionsverhalten zu erhalten. Für diese Probe war keine Reinigung nötig.

3.3 Enzymatische Spaltungen

Um die Glycosylierung sowie die durch SNPs verursachten Veränderungen der Aminosäuresequenz näher zu untersuchen wurden während dieser Arbeit verschiedene Experimente mit enzymatischen Spaltungen durchgeführt. Die experimentelle Durchführung der enzymatischen Spaltungen wird im Folgenden separat beschrieben.

3.3.1 Enzymatische Spaltung mit Trypsin

Zur näheren Analyse des von der Fa. Merck KGaA erworbenen B2GPI wurde ein tryptischer Verdau durchgeführt. Hierfür wurden 50 μL Proteinlösung ($c = 0.2 \text{ mg}/\text{mL}$, 222 pmol) lyophilisiert und anschließend in 20 μL einer 6 M Harnstofflösung gelöst. Zur Denaturierung und Reduktion der Disulfidbrücken wurden 2 μL 100 mM Dithiothreitol-Lösung hinzugegeben und 10 Minuten bei 60 °C inkubiert. Um eine erneute Oxidation der Thiolgruppen zu verhindern, wurden diese mit Iodacetamid geschützt. Hierzu wurde die Reaktionslösung mit 2 μL 300 mM Iodacetamid-Lösung versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss reagieren lassen. Nach der Zugabe von 140 μL eines 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffers (pH 8.3) wurde die Lösung mit 1 μL Trypsin-Lösung ($c = 0.25 \text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 9.4 pmol) versetzt und 17 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Für die LC-MS/MS-Messung wurden 66 μL der Reaktionslösung abgenommen und mit 4 μL Ameisensäure (2%) versetzt.

Zur näheren Analyse von auftretenden Veränderungen der Aminosäuresequenz wurden ebenfalls tryptische Verdau von aus Blutplasma isoliertem B2GPI durchgeführt. Hierfür wurde das nach **Kap. 3.2.3** erhaltene Lyophilisat in 330 μL Wasser gelöst. Ein Drittel dieser Lösung wurde für die LC-MS-Messung des intakten Proteins verwendet. Die restlichen zwei Drittel wurden erneut lyophilisiert. Die Durchführung des tryptischen Verdau ist oben bereits beschrieben, wobei abweichend 40 μL 6 M Harnstofflösung und 280 μL 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer verwendet wurden. Es wurden 100 μL des Verdau für die LC-MS/MS-Messung eingesetzt.

3.3.2 Enzymatische Spaltung mit Thermolysin

Zwischen den Glycosylierungsstellen Asn-183 und Asn-193 ist keine Schnittstelle für Trypsin vorhanden, weshalb nur Peptide erhalten werden, welche zwei Glycane tragen. Um dennoch eine hinsichtlich der Glycosylierungsstellen positionsspezifische Analyse zu ermöglichen, wurde für eine weitere enzymatische Spaltung die Protease Thermolysin verwendet. Der Thermolysin-Verdau wurde ausschließlich mit dem erworbenen B2GPI (Fa. Merck) durchgeführt. Hierfür wurden 50 μL B2GPI-Lösung ($c = 0.2 \text{ mg/mL}$, 222 pmol) lyophilisiert und anschließend in 20 μL 6 M Harnstofflösung gelöst. Die Denaturierung des Proteins, die Reduktion der Disulfidbrücken und die Alkylierung wurden analog zum tryptischen Verdau (**Kap. 3.3.1**) vorgenommen. Die nachfolgenden Schritte wurden mit 12 μL der Reaktionslösung durchgeführt. Nach der Zugabe von 150 μL eines 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffers (pH 7.5, 5 mM CaCl_2) wurde die Probe mit 2 μL Thermolysin-Lösung ($c = 0.1 \text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 5.5 pmol) versetzt und 16 Stunden bei 65 °C inkubiert.

Für die LC-MS/MS-Messung wurde die gesamte Lösung lyophilisiert und der Rückstand in 100 μL 0.1% Ameisensäure aufgenommen.

3.3.3 Enzymatische Spaltung mit der Endoproteinase GluC

Zur Verifizierung möglicher Aminosäureaustausche des isolierten B2GPI wurde eine enzymatische Spaltung mit der Endoproteinase GluC (GluC-Verdau) durchgeführt. Für den GluC-Verdau wurde das nach **Kap. 3.2.3** erhaltene Lyophilisat in 330 μL Wasser gelöst. Ein Drittel dieser Lösung wurde für die LC-MS-Messung des intakten Proteins verwendet. Die restlichen zwei Drittel wurden erneut lyophilisiert. Anschließend erfolgte eine analog zu **Kap. 3.3.1** durchgeführte Denaturierung des Proteins (40 μL Harnstofflösung), Reduktion der Disulfidbrücken und Alkylierung. Nach der Zugabe von 300 μL PBS-Puffer (pH 7.4) wurde der

Ansatz mit 20 μL GluC-Lösung ($c = 0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) versetzt und für 22 Stunden bei 37 °C inkubiert. Es wurden 100 μL des Verdaus für die LC-MS/MS-Messung eingesetzt.

3.4 LC-MS-Messungen

Die LC-MS-Messungen wurden mit einem ESI-Quadrupol/*Time-of-Flight*-Massenspektrometer (ESI-q/TOF-MS, maXis) der Fa. Bruker Daltonik mit einer vorgeschalteten UHPLC (Ultimate 3000) der Fa. Dionex durchgeführt. Als Säulen wurden C₈- und C₁₈-Umkehrphasensäulen verwendet (**Kap. 3.1.1**).

Vor den Messungen wurde das Massenspektrometer über die direkte Injektion eines *Tuning Mix* (ES-TOF *Tuning Mix*, Fa. Agilent Technologies) kalibriert. Diese Kalibrier-Lösung enthält Phosphazine unterschiedlicher Massen (**Tab. 6**). Es wurde eine *Enhanced-Quadratic*-Kalibrierung durchgeführt. Des Weiteren wurde eine *Lock-mass*-Kalibrierung als Einpunktkorrektur vorgenommen. Hierzu diffundierte während der Messung der *Lock-mass*-Kalibrant (622.029 Da) kontinuierlich in die Ionenquelle. Für eine nachträgliche interne Kalibrierung der Spektren wurde am Anfang jeder Messung ein Kalibriersegment geschaltet, bei dem eine geringe Menge des *Tuning Mix* direkt injiziert wurde.

Tab. 6: Phosphazine der Kalibrierlösung ES-TOF *Tuning Mix*.

Summenformel	Masse [Da]
C ₆ H ₁₉ N ₃ O ₆ P ₃	322.048
C ₁₂ H ₁₉ F ₁₂ N ₃ O ₆ P ₃	622.029
C ₁₈ H ₁₉ F ₂₄ N ₃ O ₆ P ₃	922.010
C ₂₄ H ₁₉ F ₃₆ N ₃ O ₆ P ₃	1221.991
C ₃₀ H ₁₉ F ₄₈ N ₃ O ₆ P ₃	1521.972
C ₃₆ H ₁₉ F ₆₀ N ₃ O ₆ P ₃	1821.952
C ₄₂ H ₁₉ F ₇₂ N ₃ O ₆ P ₃	2121.933
C ₄₈ H ₁₉ F ₈₄ N ₃ O ₆ P ₃	2421.914

Um ein besseres S/N-Verhältnis zu erhalten, wurden die Spektren über den Retentionszeitbereich der entsprechenden Proteine summiert. Bei der Messung intakter Proteine wurde außerdem das erhaltene Spektrum mit einem MaxEnt-Algorithmus (*Maximum Entropy* von Bruker Daltonik) dekonvolviert.

Für die unterschiedlichen Glycoproteine wurden verschiedene LC- und MS-Methoden verwendet. Außerdem mussten für das gleiche Glycoprotein teilweise die Methoden geändert werden, da das verwendete ESI-q/TOF-Spektrometer ein *Hardware*- und *Software*-Update erhalten hat. In den folgenden Kapiteln werden daher die Methodenparameter der

unterschiedlichen Intaktmessungen sowie der LC-MS/MS-Messungen der enzymatischen Verdaue separat aufgeführt.

3.4.1 Messung der intakten Proteine

3.4.1.1 Messung des erworbenen B2GPI

Für die LC-MS-Messung des intakten Proteins wurden 15 µL einer B2GPI-Lösung ($c = 0.2 \text{ mg/mL}$) mit 45 µL 0.15% Ameisensäure versetzt. Von dieser Lösung wurden 40 µL für die LC-MS-Analyse verwendet.

Die chromatographische Trennung erfolgte auf einer C₈-Umkehrphasensäule (Aeris WIDEPORÉ XB-C8) der Fa. Phenomenex mit einer Flussrate von 250 µL/min und einer Temperatur von 60 °C. Als Laufmittel A wurde Wasser mit 0.1% Ameisensäure und als Laufmittel B Acetonitril mit 0.1% Ameisensäure verwendet. Die Trennung wurde mit folgendem Gradienten durchgeführt: 0 min, 8% B; 33 min, 60% B; 35 min, 95% B; 37 min, 95% B; 38 min, 2% B; 40 min, 2% B.

Für die LC-MS-Analyse wurden folgende Parameter verwendet: *Spectra Rate*: 0.8 Hz; *Ion Polarity*: positive; *Range*: 500-4498 (m/z); *Dry Gas*: 7.0 L/min; *Dry Heater*: 200 °C; *Nebulizer*: 4.0 bar; *Capillary*: 4500 V; *ISCID*: 120 eV.

3.4.1.2 Messung des aus Blut isolierten B2GPI

Für die LC-MS-Messung wurde das nach **Kap. 3.2.3** erhaltene Lyophilisat in 330 µL Wasser gelöst. Das Injektionsvolumen betrug 100 µL.

Die chromatographische Trennung erfolgte auf einer C₈-Umkehrphasensäule (Aeris WIDEPORÉ XB-C8) der Fa. Phenomenex mit einer Flussrate von 250 µL/min und einer Temperatur von 60 °C. Als Laufmittel A wurde Wasser mit 0.1% Ameisensäure und als Laufmittel B Acetonitril mit 0.1% Ameisensäure verwendet. Die Trennung wurde mit folgendem Gradienten durchgeführt: 0 min, 8% B; 33 min, 60% B; 35 min, 95% B; 37 min, 95% B; 38 min, 2% B; 40 min, 2% B.

Für die LC-MS-Analyse wurden folgende Parameter verwendet: *Spectra Rate*: 0.5 Hz; *Ion Polarity*: positive; *Range*: 800-5000 (m/z); *Dry Gas*: 9.0 L/min; *Dry Heater*: 200 °C; *Nebulizer*: 4.0 bar; *Capillary*: 4500 V; *ISCID*: 120 eV.

3.4.1.3 Messung des aus Speichel isolierten PIP

Für die LC-MS-Messung wurde das nach **Kap. 3.2.2** erhaltene Lyophilisat in 110 µL Wasser gelöst, wovon 100 µL injiziert wurden.

Die chromatographische Trennung erfolgte auf einer C₈-Umkehrphasensäule (Aeris WIDEPORÉ XB-C8) der Fa. Phenomenex mit einer Flussrate von 250 µL/min und einer Temperatur von 60 °C. Als Laufmittel A wurde Wasser mit 0.1% Ameisensäure und als Laufmittel B Acetonitril mit 0.1% Ameisensäure verwendet. Die Trennung wurde mit folgendem Gradienten durchgeführt: 0 min, 5% B; 5 min, 5% B; 34 min, 60% B; 35 min, 95% B; 37 min, 95% B; 38 min, 5% B; 40 min, 5% B.

Für die LC-MS-Analyse wurden folgende Parameter verwendet: *Spectra Rate*: 0.5 Hz; *Ion Polarity*: positive; *Range*: 800-5000 (*m/z*); *Dry Gas*: 9.0 L/min; *Dry Heater*: 200 °C; *Nebulizer*: 4.0 bar; *Capillary*: 4500 V; *ISCID*: 120 eV.

3.4.2 Messung der enzymatischen Spaltungen

3.4.2.1 Messung der tryptischen Verdauung des erworbenen B2GPI

Für die Analyse der tryptischen Peptide des erworbenen B2GPI wurden zwei LC-MS-Messungen durchgeführt, wobei die erste Messung lediglich zur Identifizierung der (Glyco-)Peptide diente, während die zweite zur Verifizierung der Glycopeptide mittels MS/MS-Daten herangezogen wurde.

Für die LC-MS(/MS)-Messungen wurden 66 µL des tryptischen Verdaus (**Kap. 3.3.1**) mit 4 µL 2% Ameisensäure versetzt und injiziert.

Die chromatographische Trennung der LC-MS-Messung (ohne MS/MS) erfolgte auf einer C₁₈-Umkehrphasensäule (Kinetex) der Fa. Phenomenex mit einer Flussrate von 250 µL/min und einer Temperatur von 50 °C. Als Laufmittel A wurde Wasser mit 0.1% Ameisensäure und als Laufmittel B Acetonitril mit 0.1% Ameisensäure verwendet. Die Trennung wurde mit folgendem Gradienten durchgeführt: 0 min, 2% B; 60 min, 40% B; 63 min, 90% B; 65 min, 90% B; 67 min, 2% B; 70 min, 2% B.

Für die LC-MS-Analyse (ohne MS/MS-Daten) wurden folgende Parameter verwendet: *Spectra Rate*: 1.0 Hz; *Ion Polarity*: positive; *Range*: 50-2500 (*m/z*); *Dry Gas*: 9.0 L/min; *Dry Heater*: 200 °C; *Nebulizer*: 3.5 bar; *Capillary*: 5000 V.

Die chromatographische Trennung der LC-MS/MS-Messung erfolgte auf einer C₁₈-Umkehrphasensäule (Kinetex) der Fa. Phenomenex mit einer Flussrate von 300 µL/min und einer Temperatur von 40 °C. Als Laufmittel A wurde Wasser mit 0.1% Ameisensäure und als Laufmittel B Acetonitril mit 0.1% Ameisensäure verwendet. Die Trennung wurde mit folgendem Gradienten durchgeführt: 0 min, 2% B; 5 min, 2% B; 25 min, 10% B; 33 min, 15% B; 40 min, 100% B; 45 min, 100% B; 48 Minuten, 2% B; 60 Minuten, 2% B.

Für die LC-MS-Analyse mit MS/MS-Daten wurden folgende Parameter verwendet: *Spectra Rate*: 1.0 Hz; *Ion Polarity*: positive; *Range*: 100-2970 (m/z); *Dry Gas*: 9.0 L/min; *Dry Heater*: 200 °C; *Nebulizer*: 3.5 bar; *Capillary*: 5000 V; *Number of Precursors*: 3; *Exclude Mass List*: <500, 621-624; *Exclusion Activation*: 5 *Spectra*; *Collision Energy*: max. 50 eV; *Absolute Threshold*: 1000 cts; Precursorladung: 2+, 3+, 4+.

3.4.2.2 Messung der tryptischen Verdauung des isolierten B2GPI

Für die LC-MS/MS-Messungen des tryptischen Verdauens des isolierten B2GPI (**Kap. 3.3.1**) wurden 100 µL des Ansatzes injiziert.

Die chromatographische Trennung erfolgte auf einer C₁₈-Umkehrphasensäule (Aeris WIDEPORÉ XB-C18) der Fa. Phenomenex mit einer Flussrate von 250 µL/min und einer Temperatur von 60 °C. Als Laufmittel A wurde Wasser mit 0.1% Ameisensäure und als Laufmittel B Acetonitril mit 0.1% Ameisensäure verwendet. Die Trennung wurde mit folgendem Gradienten durchgeführt: 0 min, 5% B; 5 min, 5% B; 50 min, 55% B; 51 min, 95% B; 56 min, 95% B; 57 min, 5% B; 60 Minuten, 5% B.

Für die LC-MS/MS-Analyse wurden folgende Parameter verwendet: *Spectra Rate*: 1.0 Hz; *Ion Polarity*: positive; *Range*: 100-2500 (m/z); *Dry Gas*: 9.0 L/min; *Dry Heater*: 200 °C; *Nebulizer*: 4.0 bar; *Capillary*: 4500 V; *Number of Precursors*: 3; *Exclude Mass List*: <500, 621-624; *Exclusion Activation*: 5 *Spectra*; *Collision Energy*: max. 50 eV; *Absolute Threshold*: 500 cts; Precursorladung: 2+, 3+, 4+.

3.4.2.3 Messung der Thermolysin-Spaltung des erworbenen B2GPI

Für die LC-MS/MS-Messung der enzymatischen Spaltung des erworbenen B2GPI mit Thermolysin wurde der durchgeführte Verdau (**Kap. 3.3.2**) lyophilisiert, anschließend in 100 µL 0.1% Ameisensäure aufgenommen und vollständig injiziert.

Die chromatographische Trennung erfolgte auf einer C₁₈-Umkehrphasensäule (Kinetex) der Fa. Phenomenex mit einer Flussrate von 300 µL/min und einer Temperatur von 40 °C. Als Laufmittel A wurde Wasser mit 0.1% Ameisensäure und als Laufmittel B Acetonitril mit 0.1% Ameisensäure verwendet. Die Trennung wurde mit folgendem Gradienten durchgeführt: 0 min, 2% B; 5 min, 2% B; 30 min, 10% B; 45 min, 35% B; 47 min, 100% B; 50 min, 100% B; 52 min, 2% B; 60 min, 2% B

Für die LC-MS-Analyse wurden folgende Parameter verwendet: *Spectra Rate*: 1.0 Hz; *Ion Polarity*: positive; *Range*: 100-2970 (*m/z*); *Dry Gas*: 9.0 L/min; *Dry Heater*: 200 °C; *Nebulizer*: 3.5 bar; *Capillary*: 5000 V; *Number of Precursors*: 3; *Exclude Mass List*: <500, 621-624; *Exclusion Activation*: 5 *Spectra*; *Collision Energy*: max. 50 eV; *Absolute Threshold*: 1000 cts; Precursorkladung: 2+, 3+, 4+.

3.4.2.4 Messung der GluC-Verdaue des isolierten B2GPI

Für die LC-MS/MS-Messungen des GluC-Verdaus des isolierten B2GPI (**Kap. 3.3.3**) wurden 100 µL des Ansatzes injiziert.

Die chromatographische Trennung erfolgte auf einer C₁₈-Umkehrphasensäule (Aeris WIDEPORÉ XB-C18) der Fa. Phenomenex mit einer Flussrate von 250 µL/min und einer Temperatur von 60 °C. Als Laufmittel A wurde Wasser mit 0.1% Ameisensäure und als Laufmittel B Acetonitril mit 0.1% Ameisensäure verwendet. Die Trennung wurde mit folgendem Gradienten durchgeführt: 0 min, 5% B; 5 min, 5% B; 50 min, 55% B; 51 min, 95% B; 56 min, 95% B; 57 min, 5% B; 60 Minuten, 5% B.

Für die LC-MS/MS-Analyse wurden folgende Parameter verwendet: *Spectra Rate*: 1.0 Hz; *Ion Polarity*: positive; *Range*: 150-2500 (*m/z*); *Dry Gas*: 9.0 L/min; *Dry Heater*: 200 °C; *Nebulizer*: 4.0 bar; *Capillary*: 4500 V; *Number of Precursors*: 3; *Exclude Mass List*: <500, 621-624; *Exclusion Activation*: 3 *Spectra*; *Collision Energy*: max. 50 eV; *Absolute Threshold*: 500 cts; Precursorkladung: 2+, 3+, 4+.

3.5 Auswertung der Spektren

Aufgrund der vier vorhandenen Glycosylierungsstellen bei B2GPI sowie der Überlagerungen mehrerer Glycoformen bei PIP weisen die Massenspektren der intakten Proteine eine hohe Komplexität auf, sodass eine manuelle Auswertung sehr schwierig ist. Die genaue Auswertung wurde mithilfe der Software *Matlab* vorgenommen. Die enzymatischen Verdaue wurden manuell ausgewertet.

3.5.1 Matlab-unterstützte Analyse der intakten Glycoproteine

Das verwendete Matlab-Skript wurde auf Grundlage eines von Prof. Dr. Bernd Meyer verfassten Skriptes für einfach glycosylierte Proteine von Dr. Alena Wiegandt für die Anwendung auf vierfach glycosylierte Antikörper erweitert (Universität Hamburg, IOCh, 2013).

Das Matlab-Skript ist in der Lage, ein durch einen *least-square*-Algorithmus an die experimentellen Daten angeglichenes theoretisches Spektrum zu generieren und die Differenz dieser beiden zu bilden. Das Skript ist für Glycoproteine mit einer, zwei oder vier Glycosylierungsstellen ausgelegt. Das theoretische Spektrum wird durch die Angabe der genauen Summenformel des Proteins, der Information der chemischen Zusammensetzung des Glycans und der in Matlab hinterlegten Isotopenverteilung der Elemente berechnet. Für jede Glycoform ergibt sich somit ein spezifisches Isotopenmuster bzw. ein Spektrum mit nur einem isotopenaufgelösten Signal. Durch die gewichtete Linearkombination dieser einzelnen Spektren ergibt sich ein theoretisches Massenspektrum, welches dem experimentellen Spektrum angepasst wird. Hierbei wird das Prinzip der kleinsten Abweichungsquadrate (*least square*) benutzt. Die Koeffizienten, welche zur Gewichtung bei der Linearkombination verwendet werden, dienen als Maß der Quantität der einzelnen Glycoformen.

Das Skript benötigt als *Input*-Dateien eine txt-Datei mit den xy-Daten des experimentellen Spektrums und eine xls-Datei, welche eine Liste der Glycane beinhaltet, die das Skript für die mathematische Anpassung berücksichtigen soll. Des Weiteren muss innerhalb des Skripts die Proteinsequenz definiert werden. Es können hier auch mehrere Sequenzen eingegeben werden, sodass eventuelle Modifikationen des Proteins wie beispielsweise SNPs erfasst werden können. Mit der Eingabe *Reduce=True/False* wird bestimmt, ob das Protein eine oder mehrere Glycosylierungsstellen aufweist. Bei mehreren Glycosylierungsstellen werden alle möglichen Kombinationen der vorgegebenen Zucker berechnet. Mit den Einstellungen *cons_neutral_ox*, *cons_na* und *cons_k* können auch mögliche Oxidationen und Natrium- bzw. Kalium-Addukte berücksichtigt werden. Weitere Einstellungsmöglichkeiten sind die Anzahl der Disulfidbrücken (*Disulfides=n*) und die Angabe eines *Lower-bound*-Wertes (*lb_value*), welcher den Minimalwert der Koeffizienten darstellt. Neben den konstanten Parametern müssen der *Shift* und die Linienbreite der Signale bei jeder Anpassung manuell optimiert werden. Diese Optimierung wird durch die visuelle Betrachtung der Übereinstimmung zwischen dem theoretischen und dem experimentellen Spektrum erreicht. Bei den Analysen von intaktem B2GPI konnten aufgrund der hohen Masse des Glycoproteins und der daraus resultierenden geringen Auflösung der Spektren der *Shift* und Linienbreite konstant gehalten werden.

Die für die Anpassung mithilfe von *Matlab* verwendeten Parameter für die Glycoproteine B2GPI und PIP sind in **Tab. 7** dargestellt. Die Verwendung mehrerer Summenformeln wurde nur bei Spektren vorgenommen, bei denen eine partielle Veränderung der Sequenz durch beispielsweise Aminosäureaustausche vorlag.

Tab. 7: Verwendete Parameter für die *Matlab*-unterstützte Analyse von PIP und B2GPI. Da beide Proteine verschiedene Veränderungen ihrer Primärsequenz durch Aminosäureaustausche aufweisen, wurden die Anpassung teilweise mit mehreren Summenformeln durchgeführt. Die Angaben in Klammern zeigen hierbei den berücksichtigten Austausch an. Für ein sehr gutes Ergebnis bei der mathematischen Anpassung ist eine manuelle Optimierung des *Shift* und der Linienbreite nötig. Der jeweils verwendete Bereich, in welchem diese Parameter zu finden waren, ist in Klammern angegeben. Aufgrund der geringen Auflösung der Intaktspektren von B2GPI konnten der *Shift* und die Linienbreite hier konstant gehalten werden.

	B2GPI	PIP
Summenformel	C ₁₆₂₁ H ₂₄₇₉ N ₄₁₉ O ₄₇₄ S ₂₆	C ₆₁₂ H ₉₆₆ N ₁₅₄ O ₁₇₉ S ₅
	C ₁₆₂₂ H ₂₄₈₁ N ₄₁₉ O ₄₇₄ S ₂₆ (V266L)	C ₆₁₃ H ₉₆₅ N ₁₅₅ O ₁₇₈ S ₅ (Q79H)
	C ₁₆₂₂ H ₂₄₈₀ N ₄₂₀ O ₄₇₄ S ₂₆ (S107N)	
Anzahl der Glycosylierungsstellen	4	1
Disulfides	11	2
lb_value	0	0
Shift	0	Variabel (± 0.1)
Linienbreite	0.5 (isoliert) 1.0 (erworben)	Variabel (0.135 - 0.255)

Für die Berechnung wurden bei B2GPI alle Glycane verwendet, welche mithilfe der enzymatische Verdaue des erworbenen Proteins identifiziert werden konnten (**Tab. 9** in **Kap. 4.1.2**). Die bei PIP berücksichtigten Glycane sind im Anhang in **Tab. 16** dargestellt.

3.5.2 Auswertung der enzymatischen Spaltungen von B2GPI

Die enzymatischen Spaltungen mit Trypsin des erworbenen B2GPI wurde manuell ausgewertet, wobei alle Signale mit einer absoluten Intensität von 1000 cts oder höher berücksichtigt wurden. Die Spektren wurden durch Summierung über bestimmte Retentionszeitbereiche des TICs erhalten. Die Peptidmassen für die einfach bis fünffach geladenen Zustände wurden mithilfe des *SequenceEditor* generiert. Hierbei wurde die Möglichkeit von bis zu 5 *Partial* (Auslassen potentieller Schnittstellen) und die Carbamidomethylierung berücksichtigt. Die Glycopeptide wurden mithilfe der *GlycoWorkbench* zugeordnet. Hierfür wurden von den entsprechenden Massen aus dem Spektrum die bekannten Peptidmassen unter Berücksichtigung einer Kondensationsreaktion abgezogen, sodass die Masse des freien Glycans erhalten wurde. Mit der *GlycoWorkbench*

wurden die Datenbanken *CFG (Consortium for Functional Glycomics)*, *CarbBank*, *GlycomeDB* und *Glycosciences* nach Strukturen mit den errechneten Massen durchsucht (**Abb. 8**). Da in den Massenspektren keine signifikanten Addukt-Ionen mit Natrium oder Kalium beobachtet werden konnten, wurden diese für die Suche ausgeschlossen. Bei dem tryptischen Verdau von B2GPI entstand ein Glycopeptid, welches zwei Glycosylierungsstellen aufwies. Nach analoger Berechnung der Glycanmasse, wobei es sich hierbei um eine Glycankombination aus zwei Oligosacchariden handelt, wurden mithilfe der *GlycoWorkbench* mögliche Glycankompositionen bestimmt (**Abb. 9**).

Abb. 8: Einstellung der Struktursuche mithilfe der *GlycoWorkbench*.

		Min	Max		Min	Max
Pentose	Pen	0	0	Hexuronic Acid	HexA	0
Hexose	Hex	6	15	Dehydro Hexuronic Acid	dHexA	0
Heptose	Hep	0	0	N-Glycolyl Neuraminic Acid	Neu5Gc	0
Hexosamine	HexN	0	0	N-Acetyl Neuraminic acid	Neu5Ac	8
N-Acetyl Hexosamine	HexNAc	4	15	Lactonized Neu5Gc	Neu5Gc-Lac	0
Deoxy-Pentose	dPen	0	0	Lactonized Neu5Ac	Neu5Ac-Lac	0
Deoxy-Hexose	dHex	0	2	KDO	KDO	0
DiDeoxy-Hexose	ddHex	0	0	KDN	KDN	0
Methyl-Hexose	MeHex	0	0	Muramic Acid	Mur	0
Other residue	Or1	0	0	Solphate	S	0
Other residue	Or2	0	0	Phosphate	P	0
Other residue	Or3	0	0	Acetate	Ac	0
Or1 name	Or1	mass	0.0	Pyruvate	Pyr	0
Or2 name	Or2	mass	0.0	Phosphocholine	PC	0
Or3 name	Or3	mass	0.0			

Abb. 9: Einstellung der Kompositionssuche mithilfe der *GlycoWorkbench*.

Neben der Zuordnung der Signale aus dem Spektrum wurde ebenfalls nach Glycopeptiden bekannter Zucker gesucht. Hierzu wurden die EICs der Glycopeptide mit den Glycankompositionen $\text{Hex}_{3-7}\text{HexNAc}_{3-6}\text{dHex}_{0-1}\text{NeuAc}_{0-4}$ generiert, sodass nahezu alle fucosylierten und unfucosylierten bi-, tri- und tetraantennären Glycane mit einem variierenden Gehalt an terminalen Sialinsäuren und der Möglichkeit einer Trunkierung berücksichtigt wurden. Des Weiteren wurden die erhaltenen MS/MS-Spektren nach typischen Fragmentmassen für Oligosaccharide durchsucht (**Tab. 8**).

Tab. 8: Fragmentmassen und Massenabstände der Fragmentierung von Oligosacchariden.

Fragmentmasse [Da]	Massenabstände [Da]	Komposition
147.0657	146.0579	dHex
163.0606	162.0528	Hex
204.0872	203.0794	HexNAc
292.1032	291.0954	NeuAc
325.1134	324.1056	Hex ₂
366.1400	365.1322	HexHexNAc
407.1668	406.1590	HexNAc ₂
487.1663	486.1585	Hex ₃
528.1928	527.1850	Hex ₂ HexNAc
657.2354	656.2276	NeuAcHexHexNAc
690.2456	689.2378	Hex ₃ HexNAc

Die manuelle Analyse der LC-MS-Messung der enzymatischen Spaltung mit Thermolysin wurde analog zur Auswertung des tryptischen Verdaus durchgeführt.

Die tryptischen Verdaue sowie die enzymatischen Spaltungen mit der Endoproteinase-GluC vom isolierten B2GPI dienten im Rahmen dieser Arbeit nicht zur näheren Analyse des Glycosylierungsmusters. Die Experimente wurden insbesondere zur Identifikation verschiedener Proteinspezies durchgeführt, die unter anderem durch von SNPs verursachte Aminosäureaustausche hervorgerufen werden. Es wurden daher zur Analyse verschiedene EICs bestimmter m/z-Verhältnisse generiert und zwischen den Proben mit unterschiedlichen genetischen Varianten verglichen. In den entsprechenden Abschnitten des Ergebnisse- und Diskussionsteils wird auf die EICs und deren Bedeutung jeweils näher eingegangen.

4 Ergebnisse und Diskussion

Die Suche nach Biomarkern für Krebs und andere schwerwiegende Krankheiten ist ein wichtiges Forschungsgebiet im Bereich der Medizin. Bis zum Jahr 2013 waren von der FDA nur 18 Biomarker für die Krebsdiagnostik zugelassen, und auch die Bildung des *Biomarker Qualification Program*, welches dem Sonderfall des Biomarkers in einem auf Medikamente ausgelegtem System gerecht werden soll, führte in den letzten fünf Jahren nur zu drei neuen Biomarkern auf der *List of Qualified Biomarkers*. Es ist demnach eine schnelle und effiziente Analytik nötig, um potentielle Biomarker besser identifizieren und verifizieren zu können.^[27] Die meisten klinisch eingesetzten Biomarker weisen häufig eine geringe Sensitivität und Spezifität auf. Meist wird nur die Konzentration des entsprechenden Proteins in Geweben oder Körperflüssigkeiten bestimmt, wobei diese auch bei gutartigen Neubildungen oder bei inflammatorischen Krankheiten erhöht sein kann. Es wird vermutet, dass eine abweichende Proteinglycosylierung, welche eine der häufigsten und komplexesten Modifikationen von Proteinen darstellt, mit Krebs korreliert, sodass durch die Analyse der Glycane Biomarker mit erhöhter Spezifität entdeckt werden könnten.

Während dieser Arbeit wurden daher die beiden Glycoproteine *Prolactin-inducible Protein* (PIP) und β_2 -*Glycoprotein I* (B2GPI) hinsichtlich ihres potentiellen Einsatzes als Glyco-basierte Biomarker untersucht. In vorangegangenen Studien konnte bei beiden Proteinen eine erhöhte Konzentration im Falle einer Krebserkrankung festgestellt werden. Aufgrund der geringen Informationen bezüglich der Glycosylierung - insbesondere der Positionsspezifität - von B2GPI wurde zunächst eine positionsspezifische Analyse der Glycosylierungsstellen angestrebt. Nach der Entwicklung einer geeigneten Isolierungsmethode aus humanem Blutplasma wurden diese Ergebnisse zur massenspektrometrischen Analyse des intakten B2GPI von gesunden Probanden verwendet.

Bei PIP aus Speichel konnten Wiegandt *et al.* zeigen, dass die Glycosylierung von gesunden Individuen einen ungewöhnlich hohen Fucosylierungsgrad aufweist.^[71] Es konnten bi-, tri- und tetraantennäre Strukturen mit bis zu maximaler Besetzung von Fucosen identifiziert werden. Mithilfe von NMR-spektroskopischen Analysen gelang die Zuordnung der Fucose-Verknüpfungen zum Lewis^y-Epitop (Le^y). Dieses Epitop kann in den meisten Organen erst bei einer Tumorerkrankung festgestellt werden. Aufgrund dieser Beobachtungen ist PIP im Hinblick auf eine Korrelation des Glycosylierungsmusters mit verschiedenen Erkrankungen von großem Interesse.

4.1 Analyse der Glycosylierung von erworbenen B2GPI

Da über die genaue Glycosylierung von B2GPI vor allem hinsichtlich der Positionsspezifität wenig bekannt ist, wurde zunächst die genaue und positionsspezifische Analyse der Glycane von erworbenen B2GPI angestrebt. Hierbei weist die Analyse intakter Proteine einige Vorteile gegenüber der enzymatischer Spaltungen auf. Neben der einfachen Probenpräparation ist vor allem die Möglichkeit eines schnellen und ganzheitlichen Überblicks über die Modifikation eines Proteins zu nennen. Die massenspektrometrische Analyse intakter Proteine stellt aufgrund der hohen Massen einen großen technischen Aufwand dar. Es ist eine hohe Auflösung nötig, um verschiedene Proteinspezies oder das Isotopenmuster zu erkennen. Treten mehrere Modifikationen gleichzeitig auf, kann das Spektrum eines intakten Proteins sehr komplex werden.

Das während dieser Arbeit untersuchte 45 kDa-schwere B2GPI besitzt vier Glycosylierungsstellen und ist somit ein Beispiel für ein mehrfach modifiziertes Protein, das zusätzlich ein hohes Molekulargewicht aufweist. Die LC-MS-Messungen wurden auf einem ESI-q/TOF-Massenspektrometer durchgeführt, auf dem wegen der hohen Auflösung auch Intaktspektren generiert werden konnten. Eine manuelle Analyse dieser Spektren ist aufgrund der sehr großen Anzahl verschiedener Glycankombinationen nahezu unmöglich. Durch die Anwendung eines *Matlab*-Skriptes konnte dennoch eine Auswertung der Intaktspektren vorgenommen werden. Zur positionsspezifischen Analyse der Glycosylierung wurden außerdem enzymatische Spaltungen mit den Proteasen Trypsin und Thermolysin durchgeführt und die erhaltenen (Glyco-)Peptide analysiert.

4.1.1 Matlab-unterstützte Analyse des intakten B2GPI

Die beiden folgenden Kapitel sind teilweise im Rahmen der von mir selbständig verfassten und nicht veröffentlichten Masterarbeit (Universität Hamburg, IOCh, 2014) entstanden.

Das verwendete Matlab-Skript wurde auf Grundlage eines von Prof. Dr. Bernd Meyer verfassten Skriptes für einfach glycosylierte Proteine von Dr. Alena Wiegandt für die Anwendung auf vierfach glycosylierte Antikörper erweitert (Universität Hamburg, IOCh, 2013).

Für den Erhalt eines Referenzspektrums für spätere Analysen des aus Blutplasma isolierten B2GPI und zur ersten groben Analyse der Glycosylierung wurde zunächst eine LC-MS-Messung des intakten Glycoproteins durchgeführt. In **Abb. 10** ist das erhaltene, summierte (Retentionszeitbereich: 15.9-16.4 Minuten) Massenspektrum sowie das daraus generierte dekonvolvierte Spektrum gezeigt. Die Ladungszustände des Proteins erstrecken sich hierbei von 24+ bis 12+, wobei der 19-fach geladene Zustand die höchste Intensität aufweist. Im

dekonvolierten Spektrum sind viele charakteristischen Massendifferenzen ($\Delta m/z = 146$, dHex; $\Delta m/z = 291$, NeuAc; $\Delta m/z = 656$, HexHexNAcNeuAc) zu erkennen, was auf eine große Anzahl unterschiedlicher Glycoformen schließen lässt. Hierbei fällt vor allem die große Anzahl von Fucose- und Sialinsäureabständen sowie die hohe Regelmäßigkeit innerhalb des Spektrums auf, sodass insbesondere ein stark variierender Fucosylierungs- und Sialylierungsgrad zu erwarten ist. Das Spektrum kann letztendlich in verschiedene Bereiche eingeteilt werden, welche identische Glycosylierungsmuster aufweisen. Von den entsprechend intensivsten Signalen in den Bereichen (m/z 45051, m/z 45707 und m/z 46363) sind jeweils die (negativen) Massendifferenzen von einer bzw. zwei Sialinsäuren zu finden. Außerdem sind die zusätzlich fucosylierten Varianten zu beobachten. Der Massenabstand der Bereiche ($\Delta m/z = 656$) deutet auf die Anwesenheit von hochantennären Strukturen hin. Aufgrund der vier Glycosylierungsstellen von B2GPI weist das Massenspektrum eine hohe Komplexität auf, sodass aus dem Intaktspektrum lediglich die Gesamtkomposition der vier Glycane ermittelt werden kann. Hinzu kommt, dass der Massenunterschied zwischen einer Sialinsäure und zwei Fucosen nur etwa 1 Da beträgt. Es treten demnach vermutlich für ein Signal Überlagerungen mehrerer Glycoformen auf. Das intensivste Signal bei m/z 45051 beispielsweise lässt sich unter der Annahme, dass die Glycane nur einfach fucosyliert vorliegen, durch die Gesamtkompositionen $H_{20}N_{16}S_8$, $H_{20}N_{16}F_2S_7$ oder $H_{20}N_{16}F_4S_6$ (H: Hexose, N: *N*-Acetylhexosamin, F: Fucose, S: Sialinsäure = *N*-Acetylneuraminsäure) erklären.

Weiterhin fällt auf, dass jedes Signal eine Schulter aufweist, die durch eine Überlagerung des Hauptpeaks mit geringfügig schwereren Proteinspezies hervorgerufen werden kann. Bei diesen Proteinspezies kann es sich um Oxidationen des Glycans oder des Proteins handeln. Außerdem besteht die Möglichkeit eines *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) auf dem für B2GPI codierenden Gen, welcher den Aminosäureaustausch V266L (rs4581^[121]) zur Folge hat. Dies führt zu einer Erhöhung der Masse um 14.01 Da. Die Allelfrequenz dieses SNP variiert stark zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen und wird in der Literatur mit 23-75% angegeben.^[121] Die hohe Wahrscheinlichkeit des SNP erklärt daher die hohe Intensität der Schulter.

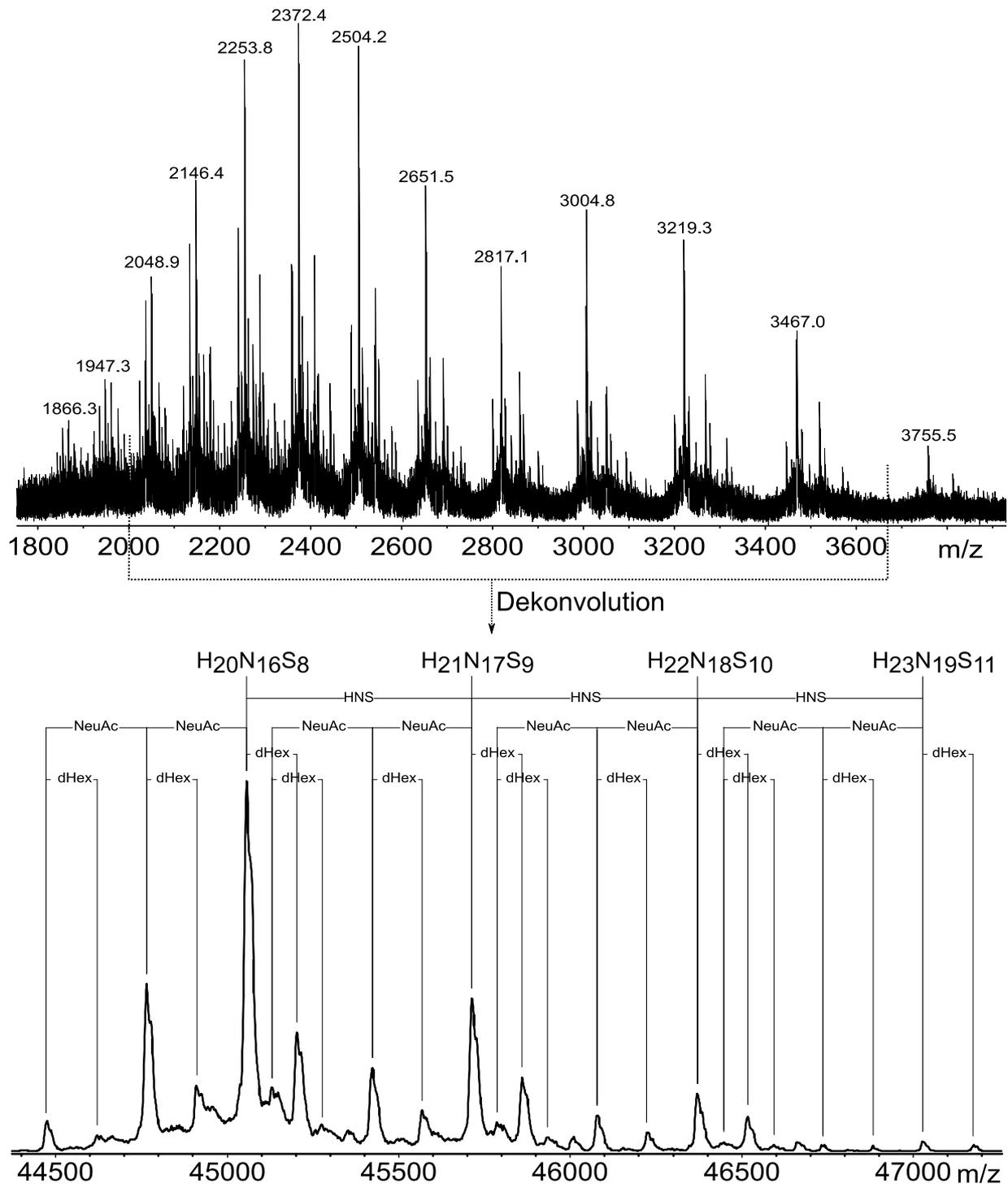


Abb. 10: Verteilung der Ladungszustände im Massenspektrum des intakten B2GPI und das hieraus generierte dekonvolvierte Spektrum. Das oben dargestellte Spektrum wurde durch Summierung der Spektren im Retentionszeitbereich von 15.9-16.4 Minuten erhalten. Die Dekonvolution wurde mithilfe eines MaxEnt-Algorithmus (*DataAnalysis*, Bruker Daltonik) durchgeführt. Als intensivster Ladungszustand wurde +19 identifiziert. Im dekonvolvierten Spektrum treten viele Massendifferenzen von Saccarideinheiten auf, die eine hohe Regelmäßigkeit aufweisen. Hieraus kann auf eine Fucosenanzahl-, Sialinsäureanzahl- und Antennenanzahl-basierte Variation der Glycoformen geschlossen werden. Bei den angegebenen Gesamtkompositionen handelt es sich jeweils um eine der möglichen Kompositionen.

Die hohe Spektrenkomplexität führt dazu, dass eine manuelle Analyse sehr kompliziert ist. Es wurde daher eine *Matlab*-unterstützte Dateninterpretation durchgeführt. Unter Berücksichtigung von 11 Disulfidbrücken ergibt sich für B2GPI eine Summenformel von $C_{1621}H_{2479}N_{419}O_{474}S_{26}$. Hierbei handelt es sich ausschließlich um den Proteinteil. Die Summenformel variiert mit dem oben erwähnten Aminosäureaustausch um eine CH_2 -Gruppe. Zur Anpassung wurden dem Skript alle Glycane als *Input* gegeben, welche bei der Auswertung der enzymatischen Spaltung mit Trypsin identifiziert wurden (**Kap. 4.1.2**). Das Ergebnis der Anpassung ist in **Abb. 11** dargestellt. Die sehr gute Übereinstimmung des experimentellen und des theoretischen Spektrums ist an der geringen Intensität der Differenz zu erkennen. Mit den 1273 vom Skript berechneten Kombinationen konnten alle Signale zugeordnet werden, wobei letztendlich 889 Glycankombinationen für die Anpassung verwendet wurden. Die verwendeten Koeffizienten zeigten hierbei eine Variation um sechs Größenordnungen. Die Zuordnung eines Signals zu einer bestimmten Kombination ist aufgrund der hohen Anzahl isobarer Kombinationen nicht möglich. Dennoch ermöglicht die hier gezeigte Methode eine Signalbasierte Analyse der Spektren. Dieser Signalbasierte Ansatz kann für den medizinischen Bereich ebenfalls von großem Interesse sein, da jede messbare Größe einen Biomarker darstellen kann. Hierbei ist die genaue Kenntnis der Glycane irrelevant. Der Vorteil dieser Methode ist die einfache und schnelle Probenvorbereitung, welche keine arbeits- und zeitintensiven, enzymatischen Spaltungen verwendet. Der Arbeitsablauf inklusive Datenauswertung lässt sich daher nahezu vollständig automatisieren und eignet sich somit gut für die medizinische Routinediagnostik.

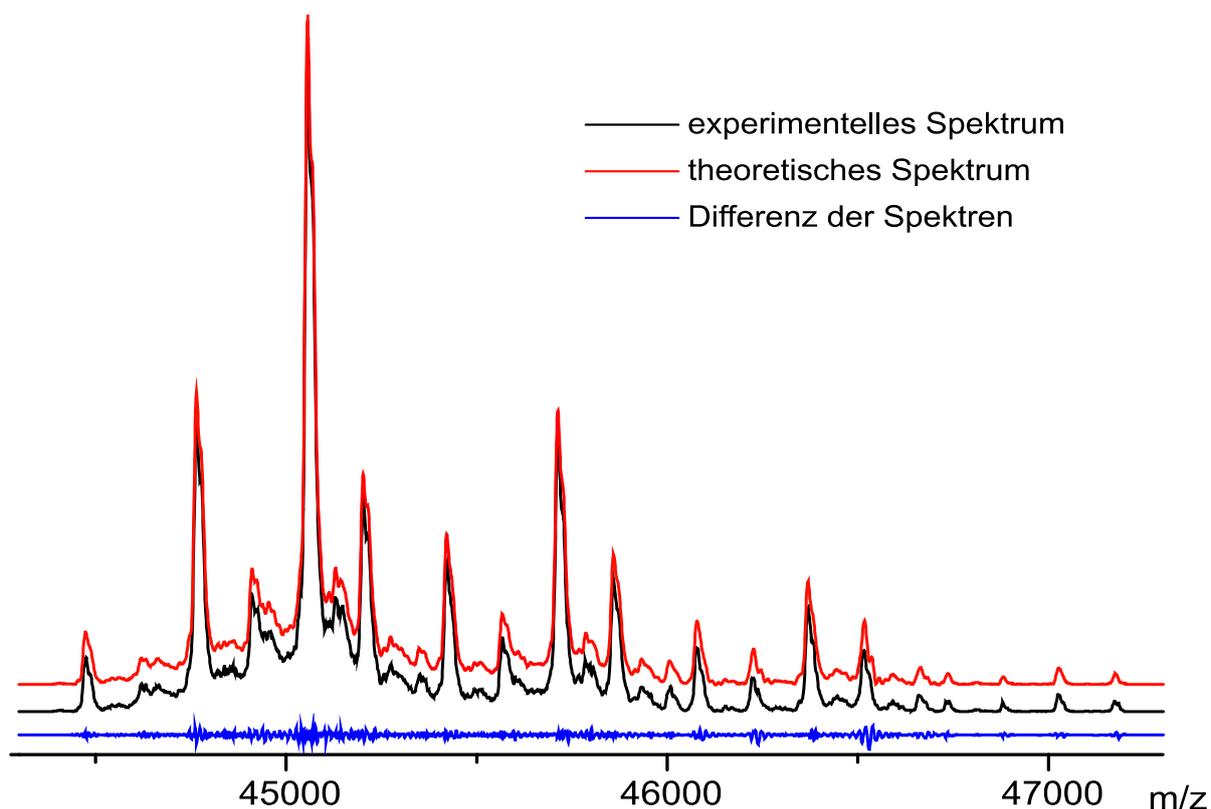


Abb. 11: Matlab-unterstützte Analyse des intakten B2GPI. Das *Matlab*-Skript generiert ein an die experimentellen Daten (schwarz) angepasstes theoretisches Spektrum (rot). Die Differenz dieser beiden Spektren ist blau dargestellt. Als Glycan-*Input* wurden alle Glycane verwendet, die durch enzymatische Spaltungen identifiziert werden konnten. Die hohe Übereinstimmung der experimentellen mit den theoretischen Daten bestätigt die Vollständigkeit der Glycananalyse durch die enzymatischen Spaltungen.

Zur Validierung und Quantifizierung des potentiellen Aminosäureaustausches (V266L) wurde ebenfalls eine *Matlab*-unterstützte Anpassung durchgeführt. Als *Input* dienten hierbei: 1. die Aminosäuresequenz ohne Austausch, 2. die Aminosäuresequenz mit dem Austausch V266L und 3. beide Aminosäuresequenzen gleichzeitig. Bei der Anpassung wurde nur das laut Analyse des tryptischen Verdaus abundanteste Glycan $H_5N_4S_2$ berücksichtigt, sodass eine eventuell falsche Zuordnung der Schultern durch die enorme Anzahl unterschiedlicher Kombinationen ausgeschlossen werden konnte. Unter Berücksichtigung mehrerer Glycane zeigte sich, dass eine partielle Kompensation der fehlenden Sequenz (mit Austausch) durch Oxidationen oder entsprechenden Glycankombinationen ermöglicht wurde. In **Abb. 12** sind die Anpassungen des *Matlab*-Skripts mit den unterschiedlichen *Input*-Vorgaben gezeigt. Bei Verwendung nur einer der beiden Sequenzen werden nur schlechte Anpassungen erreicht. Unter Verwendung beider Sequenzen ist die Anpassung deutlich besser. Die geringfügigen Abweichungen lassen sich durch Überlagerung mit Signalen weiterer Proteinspezies wie beispielsweise oxidierter Varianten erklären. Die auf diese Weise bestimmte Allelfrequenz beträgt 75%. Dieser Wert stimmt gut mit den in der Literatur angegebenen Werten überein.^[121]

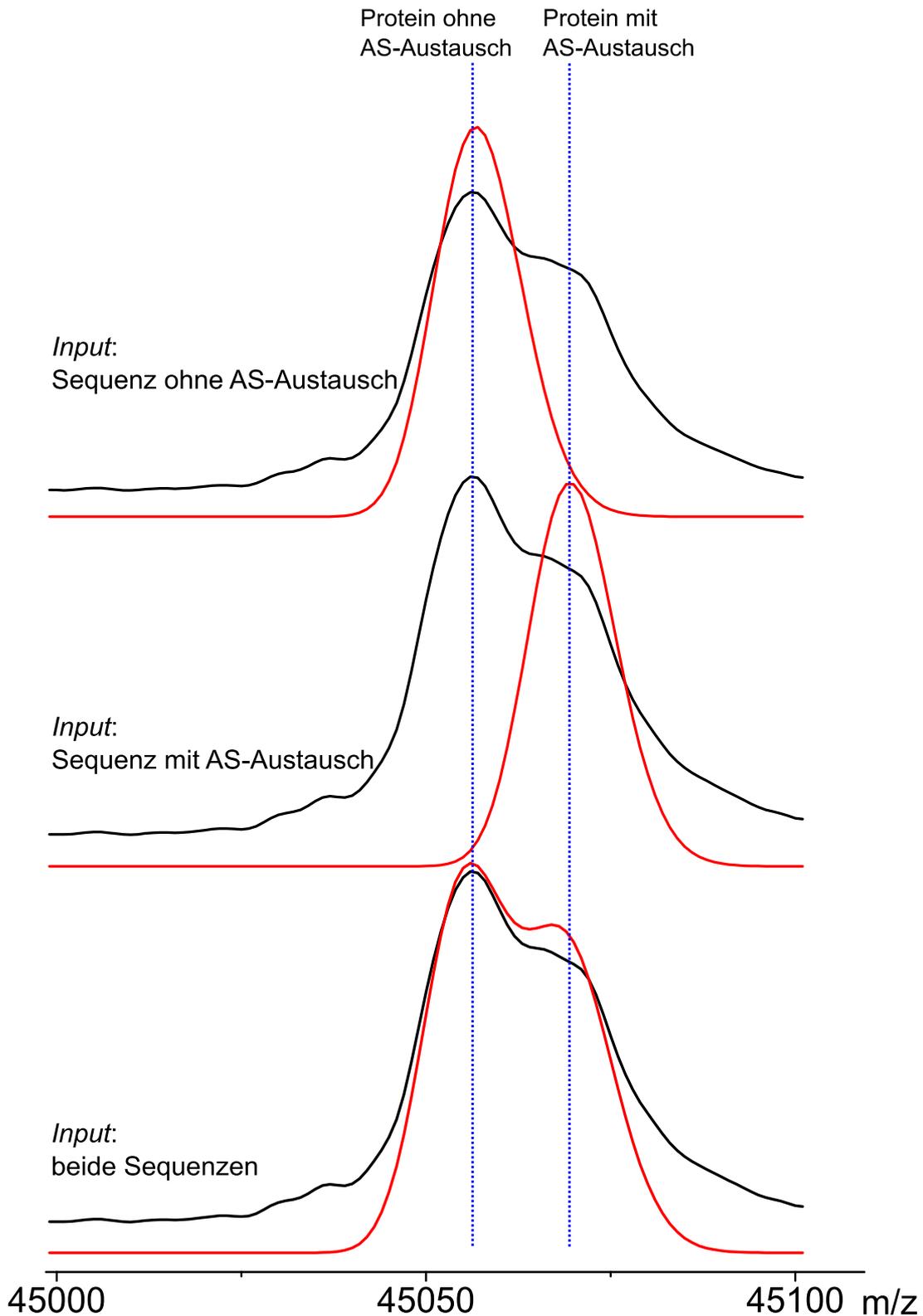


Abb. 12: Analyse des potentiellen Aminosäureaustausches V266L durch eine *Matlab*-unterstützte Anpassung der Signale. Bei der Verwendung nur einer Sequenz sind deutliche Abweichung der experimentelle und der theoretische Daten zu erkennen. Durch Verwendung beider Sequenzen wird eine gute Anpassung des Signals erreicht, was für das Vorhandensein eines Aminosäureaustausches spricht. Die geringen Abweichungen bei der Verwendung beider Sequenzen lassen sich durch weitere Überlagerungen mit Signalen anderer Glycoformen sowie mit Signalen von Oxidationsprodukten erklären.

Trotz der hohen Komplexität des Intaktspektrums zeigt die *Matlab*-unterstützte Analyse großes Potential. Neben der Verifizierung der durch den tryptischen Verdau zugeordneten Glycane und der Identifikation und Quantifizierung eines SNP ist die Möglichkeit eines Signal-basierten Ansatzes zur Anwendung als Biomarker vielversprechend.

4.1.2 Analyse von B2GPI durch enzymatische Spaltungen

Anhand des intakten Proteins kann nur die Gesamtkomposition aller vier Glycosylierungsstellen von B2GPI bestimmt werden. Um eine detailliertere und vor allem positionsspezifische Identifizierung der Glycane zu ermöglichen, wurde zunächst eine enzymatische Spaltung mit der Protease Trypsin (Schnittspezifität: nach K oder R) durchgeführt. Aufgrund einer fehlenden Schnittstelle zwischen den Glycosylierungsstellen Asn-183 und Asn-193 konnte mithilfe des tryptischen Verdau keine vollständige, positionsspezifische Analyse erfolgen. Daher wurde als weitere Protease Thermolysin (Schnittspezifität: vor L, F, I, V, M und A) verwendet. Die enzymatischen Spaltungen wurden mittels LC-MS/MS-Messungen analysiert. Die Massen der zu erwartenden Peptide und Glycopeptide sind im Anhang in den **Tab. 17** und **Tab. 18** aufgeführt.

In **Abb. 13** ist beispielhaft ein Massenspektrum des tryptischen Verdau dargestellt, welches durch die Summierung der Spektren im Retentionszeitbereich von 15.8-17.4 Minuten erhalten wurde. Bei den zugeordneten Glycanen handelt es sich um die Oligosaccharide der Glycosylierungsstelle Asn-162 (Peptid: ¹⁵⁵VYKPSAGNNSLYR¹⁶⁷). Neben den Signalen dieser Glycopeptide konnten außerdem Addukt-Signale (Natrium und Kalium), Signale von oxidierten Glycopeptiden der Glycosylierungsstelle Asn-253 sowie Signale von Carbamidomethylierungen des *N*-Terminus beobachtet werden. Die Glycopeptide der Glycosylierungsstellen Asn-253 (nicht oxidierte Glycopeptide) und Asn-183/Asn-193 eluieren zu einem späteren Zeitpunkt. Alle identifizierten Glycane der zwei bzw. vier Glycopeptide der beiden enzymatischen Spaltungen sind in **Tab. 9** (**Tab. 19** und **Tab. 20** im Anhang mit detaillierten Angaben) mit der Angabe des relativen Anteils des entsprechenden Peptids dargestellt. Die Massenabweichungen liegen bei allen Glycopeptiden unter 5 ppm, was einer sehr hohen Massengenauigkeit entspricht. Eine detaillierte Zuordnung der Glycane ist im Anhang zu finden. In dieser Arbeit wurde erstmals eine positionsspezifische Analyse aller vier Glycosylierungsstellen durchgeführt. Es konnten 20 verschiedene Glycane zugeordnet wurde, dabei handelt es sich um bi-, tri- und tetraantennäre Glycane, die sich vor allem in ihrem Fucosylierungs- und Sialylierungsgrad unterscheiden. Es wurden aber auch verschiedene Trunkierungsgrade beobachtet. Es fällt weiterhin auf, dass teilweise deutliche Unterschiede zwischen den Verdauen mit Trypsin und Thermolysin vorliegen. Die Glycane H₄N₃ oder H₅N₄ konnten beispielsweise nur mit dem tryptischen Verdau identifiziert werden, während das

Glycan H₇N₆FS₄ nur unter Verwendung von Thermolysin beobachtet wurde. Dieses Phänomen deutet auf eine unterschiedliche Spaltungsspezifität von Trypsin und Thermolysin hinsichtlich der Schnittstelle und des nahegelegenen Glycans hin.

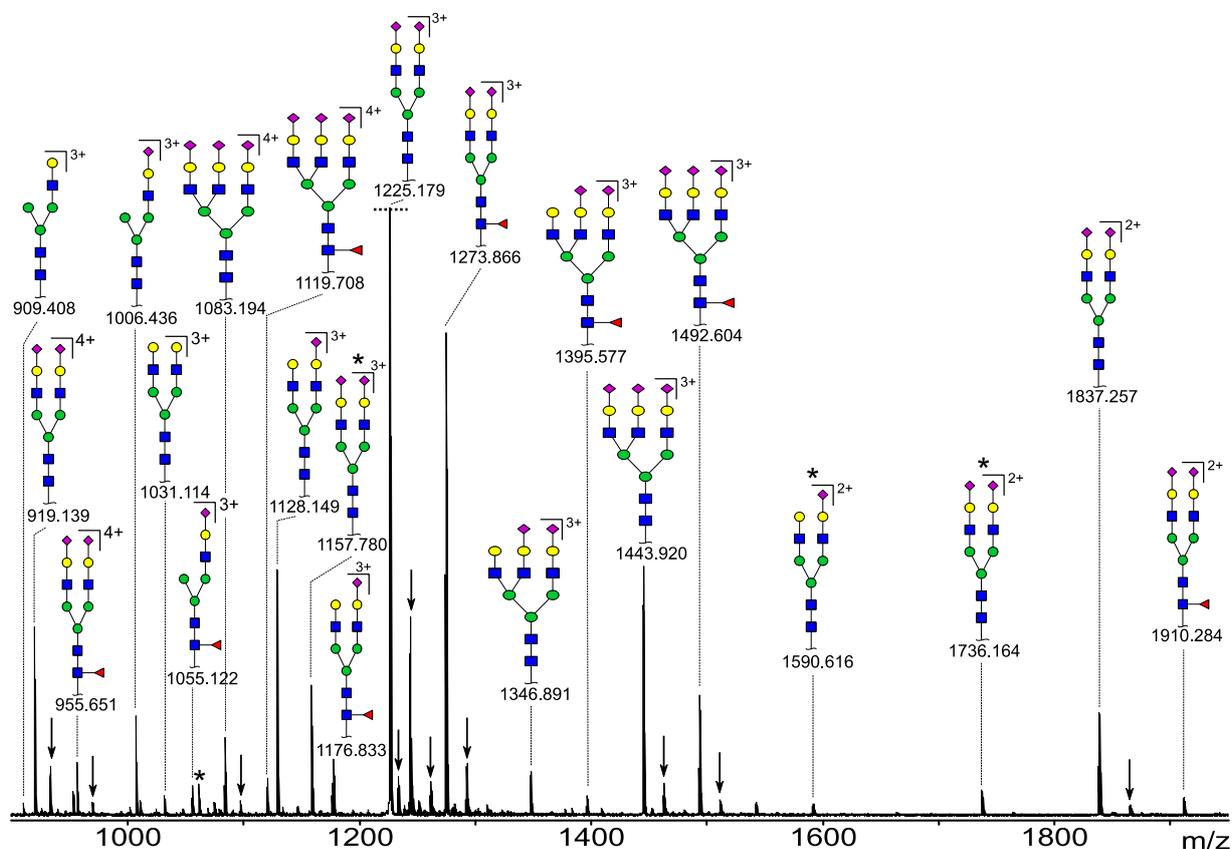


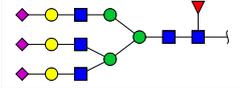
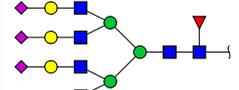
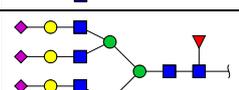
Abb. 13: MS-Spektrum des tryptischen Verdauens von B2GPI mit den identifizierten Glycoformen. Hierfür wurden die Spektren im Retentionszeitbereich von 15.8-17.4 Minuten summiert. Das intensivste Signal (m/z 1225.179) ist nicht vollständig dargestellt. Bei den gezeigten Oligosacchariden handelt es sich um die Glycane der Glycosylierungsstelle am Asparagin-162 (Peptid: ¹⁵⁵VYKPSAGNNSLYR¹⁶⁷). Die mit einem Stern gekennzeichneten Signale werden durch Glycopeptide mit der Glycosylierungsstelle am Asparagin-253 (Peptid: ²⁵¹LGNNWSAMPSC²⁶¹) verursacht, bei denen eine Oxidation stattgefunden hat. Durch die resultierende Veränderung der Retentionszeit aufgrund der erhöhten Hydrophilie eluieren die markierten Glycopeptide bereits im gezeigten Retentionszeitbereich. Die Pfeile deuten auf Addukt-Signale (Natrium oder Kalium) hin. Die Ladung des jeweiligen Signals ist oben rechts am entsprechenden Glycan angegeben.

Zur Verifizierung der identifizierten Glycane wurden MS/MS-Daten aufgenommen. Die Anwesenheit typischer Fragmentmassen wie beispielsweise m/z 366 (HexHexNAc) oder m/z 657 (HexHexNAcNeuAc) weist auf das MS/MS-Spektrum eines Glycopeptids hin. Es konnten somit 16 Glycopeptide bestätigt werden. In **Abb. 14** ist beispielhaft das MS/MS-Spektrum des Peptids ²⁵¹LGNNWS²⁵⁵ (Glycopeptid des Thermolysin-Verdauens) mit dem Glycan der Komposition H₅N₄S₂ dargestellt.

Tab. 9: Übersicht über alle durch Spaltungen mittels Trypsin und Thermolysin identifizierte und quantifizierte Glycane. Die in der zweiten Spalte dargestellte Struktur ist nur eine Möglichkeit für eine bestimmte Glycankomposition. Bei den Prozentangaben handelt es sich um die relativen Anteile der entsprechenden Glycoform an der jeweiligen Glycosylierungsstelle. Auf die Quantifizierung wird im späteren Verlauf des Kapitels näher eingegangen. Die Striche (-) bedeuten, dass das entsprechende Glycopeptid in den Daten nicht zu beobachten war. rot: MS/MS-Spektrum vorhanden; H: Hexose, N: *N*-Acetylhexosamin, F: Fucose, S: *N*-Acetylneuraminsäure.

Glycan-komp.	Struktur	Trypsin [%]		Thermolysin [%]			
		Asn-162	Asn-253	Asn-162	Asn-183	Asn-193	Asn-253
H ₄ N ₃		0.7	3.0	-	-	-	-
H ₃ N ₃ S		0.6	3.0	4.4	-	-	1.8
H ₄ N ₃ S		3.5	4.7	5.0	6.9	6.0	3.6
H ₅ N ₄		0.8	0.8	-	-	-	-
H ₄ N ₃ FS		1.0	0.4	-	-	-	-
H ₄ N ₄ S		0.5	0.7	-	-	-	1.0
H ₅ N ₄ S		8.3	14.0	5.6	9.6	5.9	13.8
H ₅ N ₄ FS		2.2	1.0	-	-	-	1.60
H ₅ N ₄ S ₂		54.7	62.5	41.5	74.3	37.4	58.0
H ₆ N ₅ S		0.3	0.8	-	-	-	1.4
H ₅ N ₄ FS ₂		13.9	2.7	14.0	5.3	5.7	2.5
H ₅ N ₅ S ₂		-	-	6.1	-	-	1.0
H ₆ N ₅ S ₂		1.4	1.9	-	-	5.2	3.1
H ₆ N ₅ FS ₂		0.8	0.5	1.6	-	-	-
H ₆ N ₆ S ₂		-	-	-	-	-	1.0
H ₆ N ₅ S ₃		7.6	3.0	13.2	3.9	16.0	3.2
H ₇ N ₆ S ₂		-	0.2	-	-	-	-

Tab. 9: Fortsetzung.

Glycan-komp.	Struktur	Trypsin [%]		Thermolysin [%]			
		Asn-162	Asn-253	Asn-162	Asn-183	Asn-193	Asn-253
H ₆ N ₅ FS ₃		3.8	0.8	8.7	-	13.9	6.8
H ₆ N ₆ FS ₃		-	-	-	-	9.9	-
H ₇ N ₆ FS ₄		-	-	-	-	-	1.2

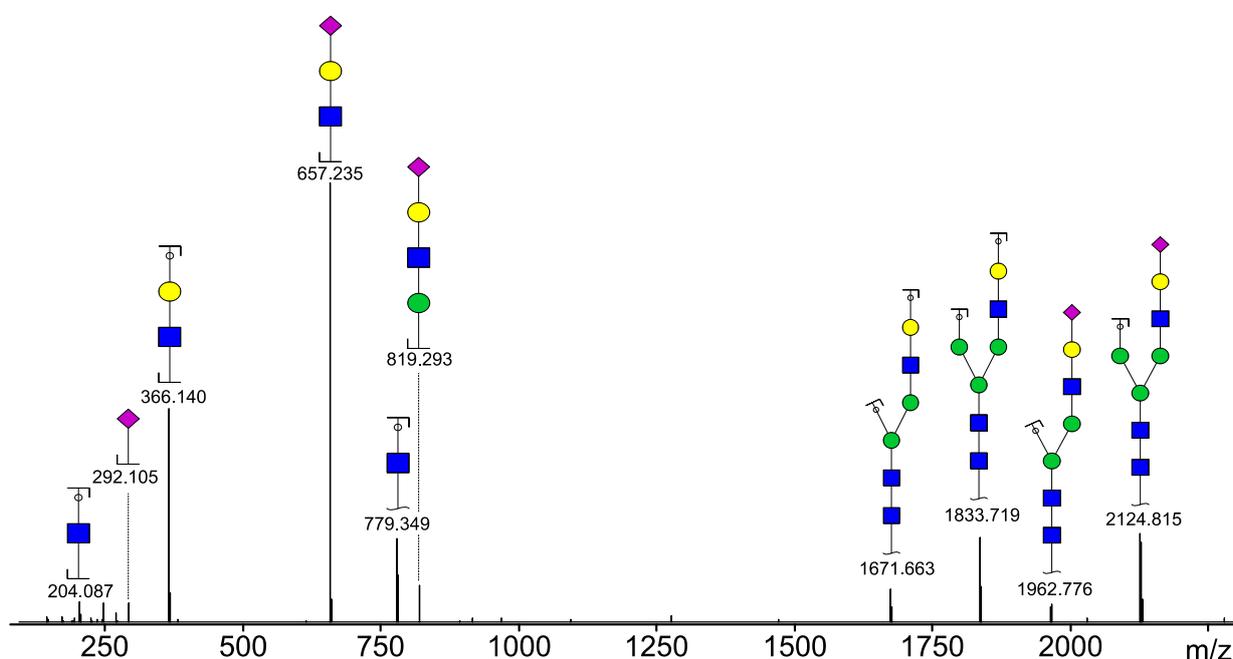


Abb. 14: MS/MS-Spektrum des Glycopeptids ²⁵¹LGNWS²⁵⁵ mit dem Glycan der Komposition H₅N₄S₂ (*m/z* 1391.028) aus dem Thermolysin-Verdau von B2GPI. Den Signalen wurden mögliche Fragmente zugeordnet, wobei die gewellte Linie auf ein Glycopeptidfragment hindeutet.

Neben der Identifikation der Glycane ist die Quantifizierung der einzelnen Glycoformen von großem Interesse, da sich Unterschiede zwischen gesunden und erkrankten Probanden vermutlich nur in der Veränderung der Konzentration bestimmter Motive äußern. Als Maß für die Quantität dient die Intensität der einzelnen Glycopeptide. Hierzu wurden die EICs des zweifach, dreifach und vierfach geladenen Zustandes summiert. Bezüglich des Einflusses des Peptidteils auf die Ionisierbarkeit wird angenommen, dass dieser bei allen Glycoformen identisch ausfällt, sodass die Glycopeptide einer Glycosylierungsstelle untereinander vergleichbar sind. Aufgrund der möglichen starken Variationen der Schnittspezifität und

Schnittquantität der Proteasen ist die Quantifizierung trotzdem kritisch zu betrachten. Die errechneten Anteile der einzelnen Glycoformen sind in **Tab. 9** aufgeführt sowie in **Abb. 15** und **Abb. 16** (**Tab. 21** und **Tab. 22** im Anhang) dargestellt. Es zeigt sich, dass das Glycan mit der Komposition $H_5N_4S_2$ unabhängig von der verwendeten Protease an allen Glycosylierungsstellen die größte Häufigkeit aufweist. Bei der Verteilung der anderen Glycane treten jedoch teilweise große Unterschiede auf. Die enzymatische Spaltung mit Trypsin zeigt beispielsweise, dass die Glycoform $H_5N_4FS_2$ eine starke Präferenz zur Glycosylierungsstelle Asn-162 aufweist, während die Glycane H_3N_3S und H_4N_3 vorwiegend an Asn-253 vorkommen. Auch beim Thermolysin-Verdau zeigen sich Unterschiede zwischen den Glycosylierungsstellen wie beispielsweise das vermehrte Auftreten von hochantennären Strukturen ($H_6N_5S_3$, $H_6N_5FS_3$, $H_6N_6FS_3$) an der Position Asn-193.

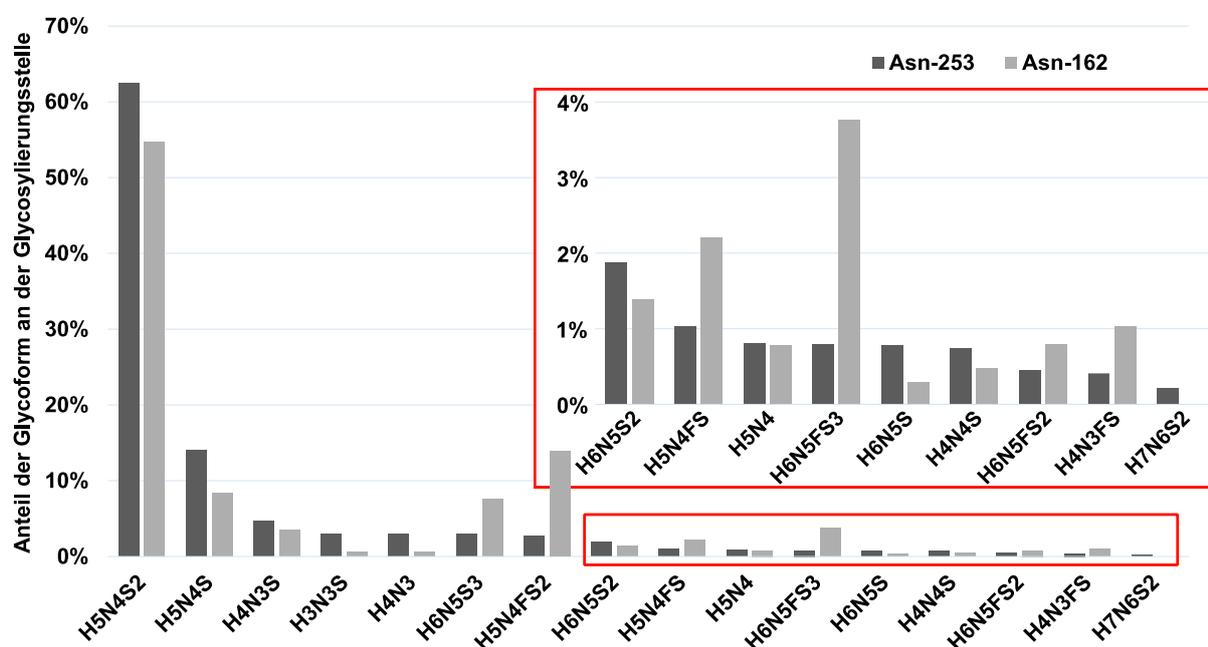


Abb. 15: Relative Häufigkeit der Glycoformen der monoglycosylierten Peptide des tryptischen Verdau (Werte in Tab. 21 im Anhang). Zur Quantifizierung wurden die Intensitäten der jeweiligen EICs der Glycopeptide im zwei-, drei- und vierfach geladenen Zustand addiert. Zwischen den beiden Glycosylierungsstellen treten große Unterschiede hinsichtlich der Anteile der Glycoformen auf. Während beide Glycosylierungsstellen dominant das Glycan $H_5N_4S_2$ tragen, zeigen beispielsweise die Glycoformen $H_5N_4FS_2$ bzw. H_3N_3S und H_4N_3 eine starke Präferenz zur Glycosylierungsstelle Asn-162 bzw. Asn-253.

Neben den quantitativen Variationen zwischen den Glycosylierungsstellen innerhalb eines Verdau lassen sich auch deutliche Unterschiede bezüglich der Verwendung der Proteasen feststellen. So ist die Präferenz der Glycane H_3N_3S und H_4N_3S hinsichtlich einer Glycosylierungsstelle beispielsweise bei den beiden Verdauen genau gegensätzlich. Diese Beobachtung deutet ebenfalls auf die oben bereits angesprochene, unterschiedliche, teilweise sogar orthogonale Spaltungsspezifität der Proteasen hin. Bei einem Datenvergleich von

enzymatischen Spaltungen eines Glycoproteins aus unterschiedlichen Quellen ist daher auf eine Verwendung der gleichen Protease zu achten.

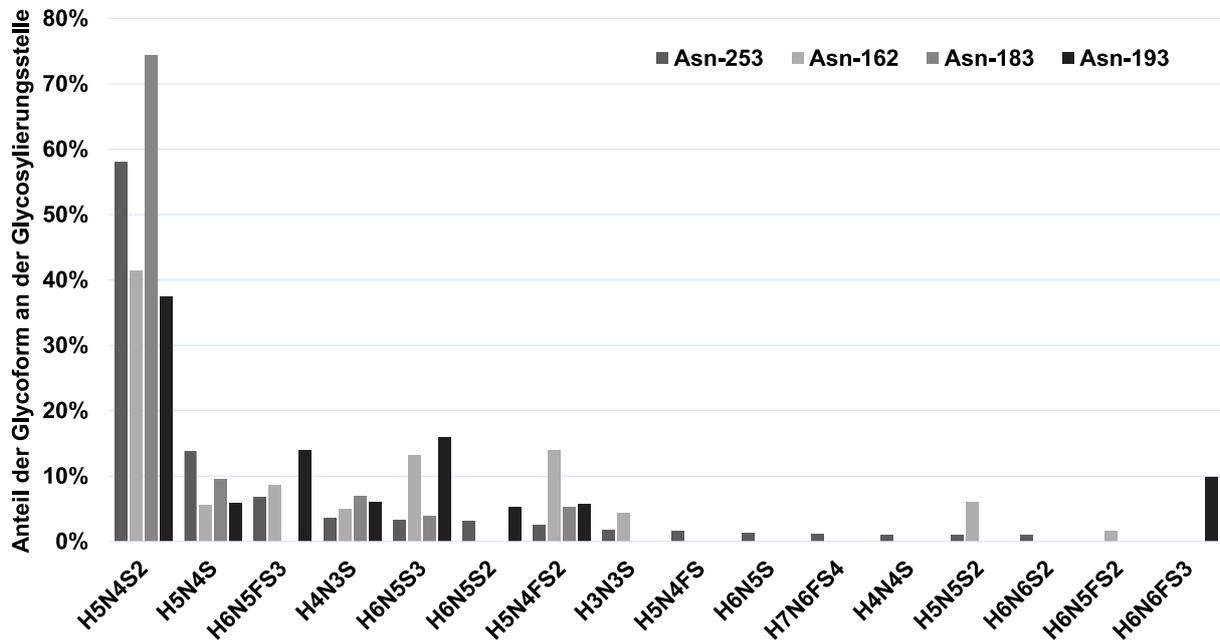


Abb. 16: Relative Häufigkeiten der Glycoformen der vier möglichen Glycopeptide des Thermolysin-Verdaus (Werte in Tab. 22 im Anhang). Zur Quantifizierung wurden die Intensitäten der jeweiligen EICs der Glycopeptide im zwei-, drei- und vierfach geladenen Zustand addiert. Zwischen den vier Glycosylierungsstellen treten große Unterschiede hinsichtlich der relativen Anteile ihrer Glycoformen auf. Während alle Glycosylierungsstellen dominant das Glycan H₅N₄S₂ tragen, zeigt beispielsweise die Position Asn-193 ein vermehrtes Auftreten von hochantennären Strukturen (H₆N₅S₃, H₆N₅FS₃, H₆N₆FS₃).

Mithilfe der enzymatischen Spaltungen wurden zusammenfassend 20 unterschiedliche Glycane identifiziert und quantifiziert, wobei alle vier Glycosylierungsstellen erstmals positionsspezifisch analysiert werden konnten. Hierbei zeigten sich bezüglich der Glycosylierungsstellen einige Unterschiede. Bei der Verwendung der gleichen Protease lassen sich somit die Glycane von B2GPI aus verschiedenen Probanden vergleichen, um eventuelle Unterschiede festzustellen, was insbesondere im Bereich der Biomarker von großem Interesse ist.

4.2 Analyse von isoliertem B2GPI gesunder Probanden

Die mithilfe des erworbenen B2GPI entwickelten Methoden wurden bei insgesamt 20 Plasmaproben entsprechend **Kap. 3.2.3** eingesetzt. Da analytische Methoden für Biomarker insbesondere für eine einfache, schnelle und kostengünstige Durchführung optimiert werden müssen, wurde eine einfache chromatographische Trennung mit einer anschließenden Analyse des intakten Proteins angestrebt. Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln erwähnt wurde, ist eine genaue Untersuchung vor allem im Hinblick auf die Positionsspezifität

der Glycosylierungsstelle mit einer Intaktanalyse nicht zu gewährleisten. Dennoch ist eine Identifikation von Unterschieden zwischen gesunden und erkrankten Probanden mithilfe eines Signal-basierten Ansatzes sehr schnell und einfach durchzuführen. Dieser Ansatz basiert einzig auf dem Vorhandensein und der Quantität eines Signals, wobei die Proteinspezies, welche durch dieses Signal beschrieben wird, irrelevant ist. Liefert dieser Ansatz positive Ergebnisse, kann eine genauere Analyse erfolgen, da die Art der Variation einer Proteinspezies in Folge einer Erkrankung Rückschlüsse auf die biologischen Prozesse sowie ein besseres Verständnis der Krankheitspathologie bieten kann.

Die Isolierung von B2GPI aus humanem Blutplasma wird durch eine Fällung mit Polyethylenglycol (PEG) und anschließender chromatographischer Trennung an einer Heparin-Säule erreicht. B2GPI ist dafür bekannt an verschiedene negativ geladene Stoffe zu binden. Hierzu zählt auch das Polysaccharid Heparin.^[30] Nach der Elution des Glycoproteins mit einem Salzgradienten und einer Dialyse gegen Wasser folgt die LC-MS-Messung (Säule: *Reversed Phase*, C8). Die hierbei erhaltenen Chromatogramme (*Total Ion Current*, TIC) von drei Plasmaproben verschiedener Spender sind in **Abb. 17** dargestellt. B2GPI eluiert im Retentionszeitbereich zwischen 19 und 20 Minuten. Es ist zu erkennen, dass das B2GPI-Signal stets die höchste Intensität im Chromatogramm aufweist, was die erfolgreiche Reduktion der abundanten Plasmaproteine wie Fibrinogen, Albumin oder Immunglobuline zeigt. Die angestrebte Reinigung aus humanem Blutplasma war demnach erfolgreich. Zur Verifizierung wurde ein tryptischer Verdau des isolierten B2GPI durchgeführt und mittels LC-MS/MS analysiert. Die erhaltenen Daten wurden einer *Mascot*-Suche^[122] unterzogen (**Tab. 23** im Anhang). Hierbei gehörte B2GPI stets zu den Proteinen, die mit dem höchsten *Score* identifiziert wurden, wobei dieser keinerlei Aussagen zur Quantität erlaubt. Einen Anhaltspunkt bezüglich der Quantität der identifizierten Proteine liefert der emPAI (*Exponentially Modified Protein Abundance Index*), welcher über den Quotienten der beobachteten zu den möglichen Peptiden errechnet wird.^[123] Der emPAI von B2GPI wies in den meisten Fällen ebenfalls den höchsten Wert auf. Zu den anderen Proteinen, die mit hohem *Score* bzw. emPAI identifiziert wurden, gehören vor allem das Apolipoprotein B-100, das *Complement Component C8* und das *Histidine-rich Glycoprotein*.

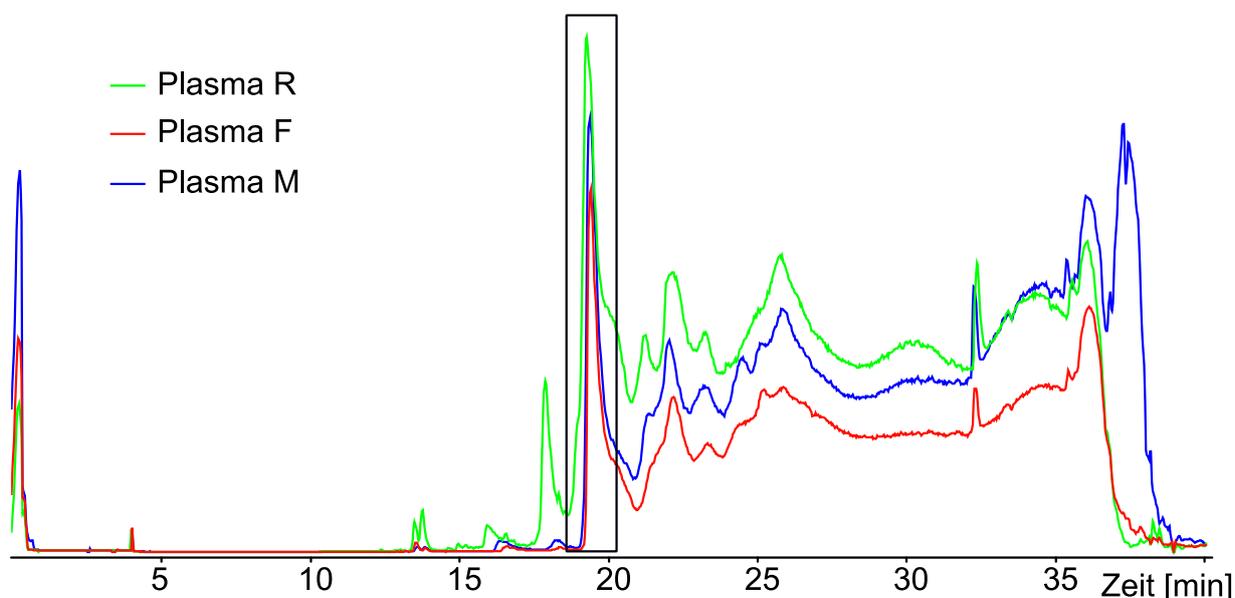


Abb. 17: TICs der LC-MS-Messungen von drei aus Blutplasma von gesunden Probanden isolierten B2GPI-Proben. Der Retentionszeitbereich von B2GPI ist mit einem schwarzen Kasten gekennzeichnet und liegt bei 19-20 Minuten. Aufgrund der hohen Intensität des B2GPI-Signals im Chromatogramm kann auf eine gute Trennung des Glycoproteins von anderen hochkonzentrierten Stoffen geschlossen werden. Insbesondere die im Blutplasma sehr abundanten Proteine Fibrinogen, Antikörper und Albumin konnten nicht beobachtet werden.

Durch Summierung des entsprechenden Retentionszeitbereiches mit anschließender Dekonvolution mithilfe eines MaxEnt-Algorithmus wurden die Intaktspektren von B2GPI erhalten. Die Intaktspektren des isolierten B2GPI acht verschiedener Plasmaproben sind in **Abb. 18** gezeigt. Wie bereits in **Abb. 10** dargestellt sind in den Spektren die Signale verschiedener Glycoformen zu erkennen. Die Schulter, welche durch das Auftreten der Proteinspezies mit dem Aminosäureaustausch V266L in der Probe aus gepooltem B2GPI hervorgerufen wurde, fällt in den Proben einzelner Individuen deutlich kleiner aus. Ein Großteil der Spektren weist ein sehr ähnliches Signalmuster auf, wobei das Signal bei m/z 45056 die höchste Intensität aufweist. Dieses Signal kann durch eine Glycoform mit der Glycankomposition $H_{20}N_{16}S_8$ erklärt werden. Dies stimmt mit den Ergebnissen der Glycananalyse mittels tryptischem Verdau (**Kap. 4.1.2**) überein, bei der das Glycan mit der Komposition $H_5N_4S_2$ den größten Anteil hat. Sind alle vier Glycosylierungsstelle mit diesem Glycan besetzt, ergibt sich für das intakte Glycoprotein eine Glycankomposition von $H_{20}N_{16}S_8$ und eine Masse von 45056 Da. Trotz der hohen Übereinstimmung der Glycosylierungsmuster verschiedener Probanden fällt auf, dass das B2GPI aus der Plasmaprobe P ein anderes Muster aufweist, wobei die Signale bei höheren m/z -Verhältnissen ($m/z > 46000$) deutlich intensiver sind. Das intensivste Signal mit m/z 46369 kann durch die Glycankomposition $H_{22}N_{18}S_{10}$ erklärt werden, was auf eine hohe Quantität von tri- oder tetraantennären Strukturen hindeutet. Unter der Annahme einer gleichmäßigen Antennenverteilung kann das Signal bei

m/z 47026 beispielsweise durch eine Glycoform mit drei triantennären Glycanen und einem biantennären Glycan (z.B. $H_6N_5S_3$ und $H_5N_4S_2$) erklärt werden.

Die Gründe für die zum Teil großen Unterschiede im Glycosylierungsmuster von B2GPI zwischen verschiedenen Individuen können aufgrund von wenig Informationen über die Spender nicht genauer untersucht werden. Hierfür wäre eine genaue Anamnese hinsichtlich der allgemeinen Lebensweise und des Gesundheitszustandes zum Zeitpunkt der Plasmagabe nötig. Die Glycosylierung wird auch durch andere entzündliche Prozesse beeinflusst, welche bei der Entnahme eventuell noch nicht bekannt waren oder als geringfügig angesehen wurden. Die Beobachtung zeigt, dass für eine potentielle Biomarkeranwendung eine große Anzahl gesunder Probanden untersucht werden muss, um alle Variationen statistisch zu erfassen. Letztendlich kann nur so eine statistisch robuste Methode für die Unterscheidung von gesunden und erkrankten Individuen entwickelt werden.

Aufgrund der hohen relativen Allelfrequenz des in **Kap. 4.1.1** identifizierten SNP ($rs4581^{[121]}$, Allelfrequenz: 23-75% je nach ethnischer Herkunft) kann bei einer Anzahl von 20 analysierten Proben von einem häufigen Auftreten des Aminosäureaustausches (V266L) ausgegangen werden. Diese Annahme wurde durch die massenspektrometrische Analyse bestätigt, wobei sowohl hetero- als auch homozygote Ausprägungen des SNP beobachtet werden. In **Abb. 19** ist der Ausschnitt eines Massenspektrums vom intakten B2GPI von drei Proben gezeigt, die je eine der drei möglichen Ausprägungen aufweisen. Der Abstand der beiden auftretenden Signale entspricht mit 14 Da genau der Massendifferenz der Aminosäuren Valin und Leucin. Bei der heterozygoten Ausprägung zeigt sich, dass das Signal mit dem Aminosäureaustausch eine geringfügig höhere Intensität aufweist. In der Regel treten die Phänotypen im gleichen Maße auf. Durch den Basen- bzw. Aminosäureaustausch kann es jedoch zu Phänotyp-spezifischen Variationen bei der Transkription, Translation oder der Proteinbiosynthese kommen.^[30] Eine andere Erklärung für die erhöhte Intensität ist die Überlagerung mit Signalen anderer Proteinspezies wie beispielsweise oxidierter Varianten.

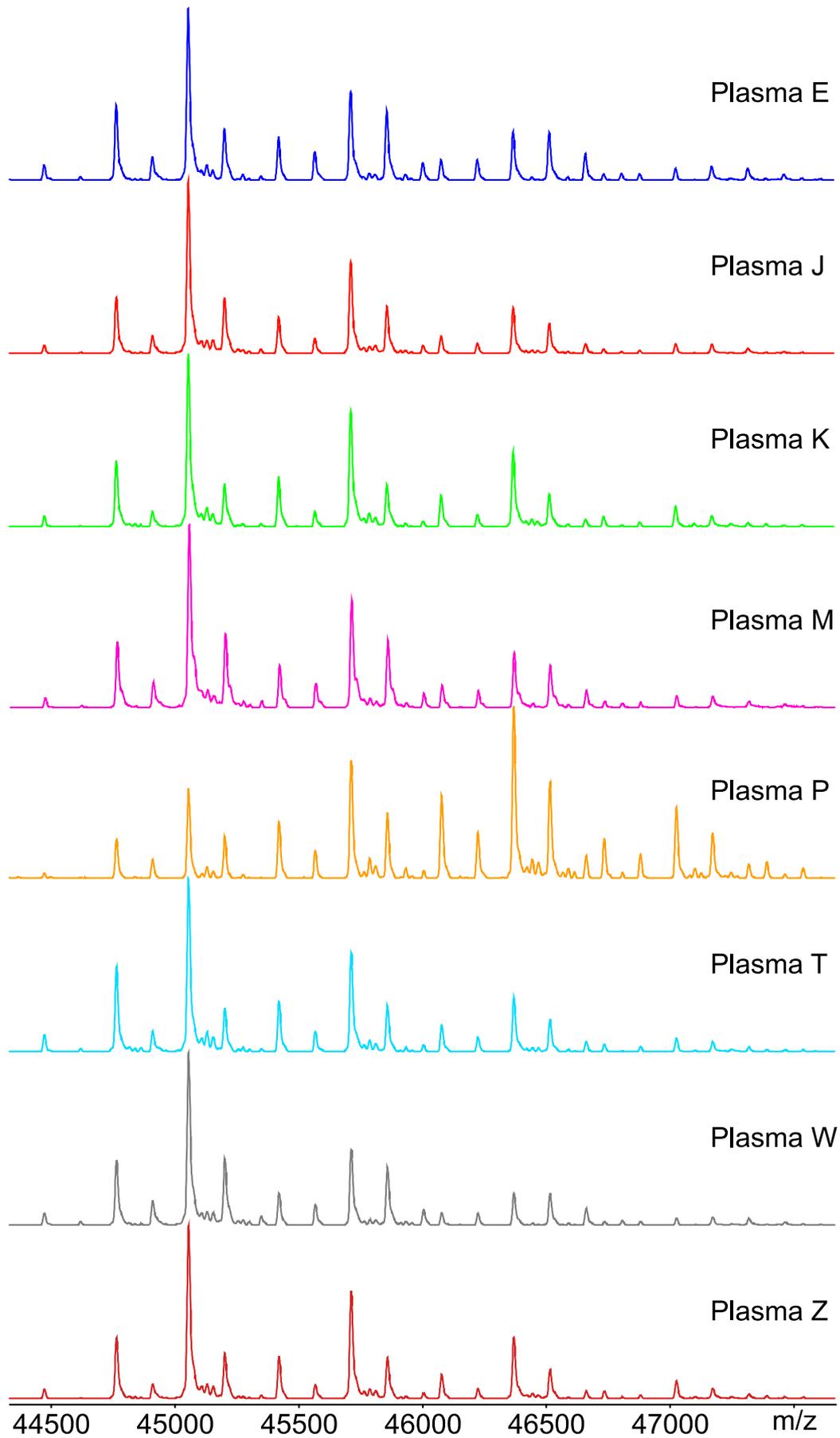


Abb. 18: Abbildungsunterschrift auf der nächsten Seite.

Abb. 18: Dekonvolvierte Massenspektren von intaktem B2GPI aus Blutplasma von acht gesunden Probanden. Die große Anzahl an Signalen wird durch verschiedene Glycoformen von B2GPI hervorgerufen. Die Glycosylierungsmuster der meisten Spektren zeigen eine hohe Vergleichbarkeit, wobei das Signal des Glycoproteins mit der möglichen Glycankomposition $H_{20}N_{16}S_8$ die höchste Intensität aufweist, was aufgrund der Daten des tryptischen Verdaus aus **Kap. 4.1.2** realistisch ist. Das Spektrum von Plasma P zeigt jedoch ein signifikant abweichendes Muster. Hier ist vor allem ein Intensitätsanstieg der Signale im höheren m/z -Bereich ($m/z > 46000$) zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass sich die Glycosylierung in diesem Fall zu höherantennären Strukturen verschoben hat.

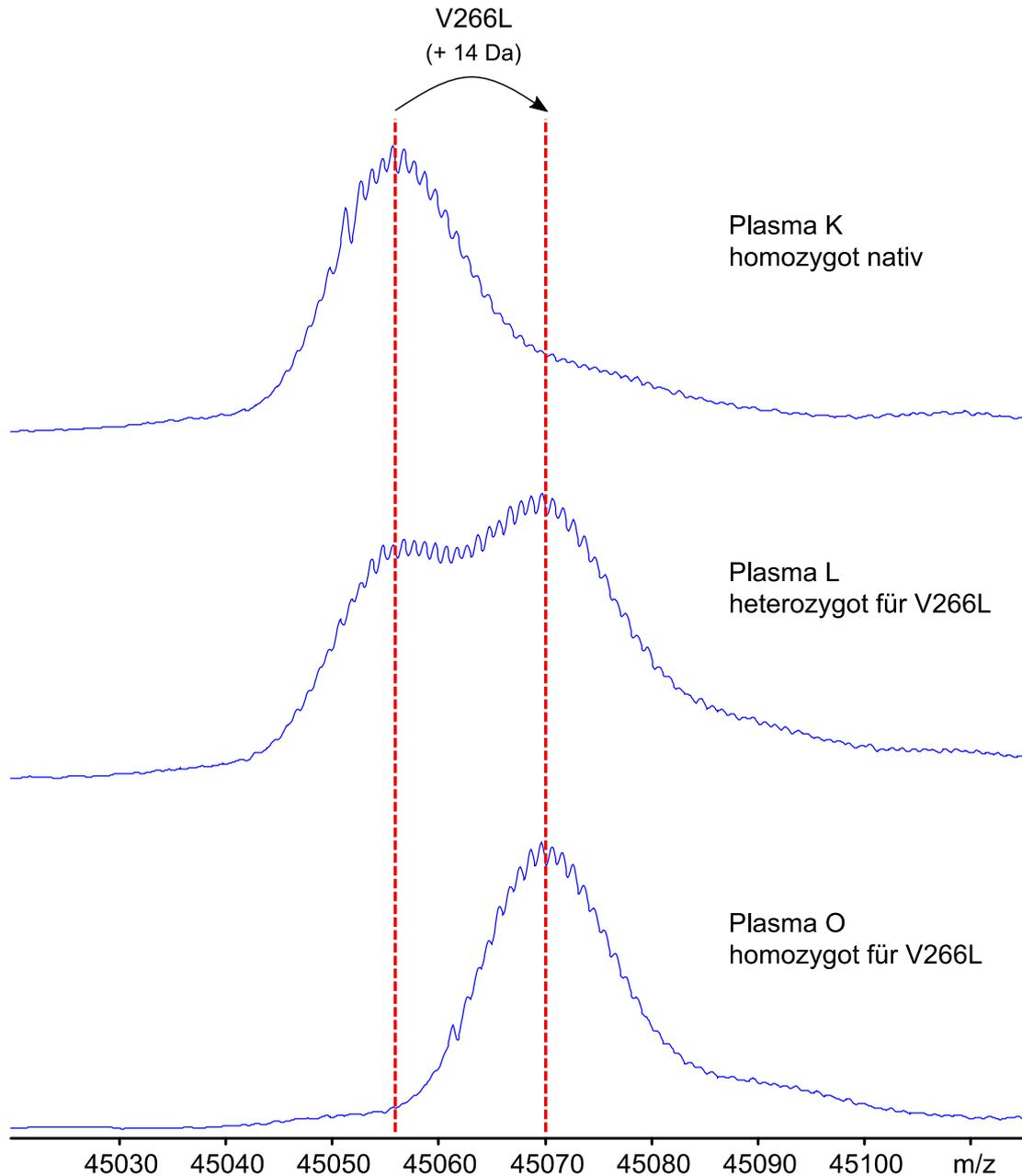


Abb. 19: Ausschnitte aus den dekonvolvierten Massenspektren von B2GPI dreier Probanden mit unterschiedlichen Ausprägungen hinsichtlich des SNP (V266L). Es sind hier sowohl die beiden möglichen homozygoten Ausprägungen sowie die heterozygote Ausprägung des SNP zu erkennen. Der vom SNP verursachte Aminosäureaustausch führt zu einer Massendifferenz von 14 Da, was genau dem Abstand der beiden auftretenden Signale entspricht. Die geringfügigen Intensitätsunterschiede im heterozygoten Fall können durch Phänotyp-spezifische Variationen bei der Biosynthese, aber auch durch Überlagerungen mit Signalen von anderen Proteinspezies erklärt werden.

Aufgrund der hohen Komplexität der Massenspektren von intaktem B2GPI ist es möglich, dass das Signal mit der Massendifferenz von +14 Da nicht durch den Aminosäureaustausch V226L, sondern durch andere Proteinspezies hervorgerufen wird. Um die Identifikation des SNP zu bestätigen, wurde eine Analyse auf Peptidebene durchgeführt. Der Vorteil hierbei liegt in der sehr hohen Massengenauigkeit sowie in der besseren Separation der Signale bei niedrigen Massen, sodass die unterschiedlichen Proteinspezies deutlich voneinander zu unterscheiden sind. Für die Analyse wurde eine enzymatische Spaltung mit der Endoproteinase GluC durchgeführt. Die bereits für B2GPI verwendeten Proteasen Trypsin und Thermolysin eigneten sich aufgrund ihrer Schnittspezifität und der daraus resultierenden sehr kleinen Peptide nicht zur Analyse des Aminosäureaustausches. Die erhaltenen Peptide mit bzw. ohne Aminosäureaustausch wurden durch die Extraktion der EICs ermittelt und durch die Massenspektren bestätigt. Bei dem analysierten Peptid handelte es sich um ein Glycopeptid mit der Sequenz $^{248}\text{CTKLG NWSAMP SCKASCK (V/L) PVKKATVVYQGE}^{278}$ und dem Glycan $\text{H}_5\text{N}_4\text{S}_2$, welches im vierfach positiv geladenen Zustand ein m/z-Verhältnis von 1423.129 bzw. 1426.633 besitzt. In **Abb. 20** sind die Chromatogramme dreier hinsichtlich des Phänotyps unterschiedlicher Proben gezeigt. Es ist zu sehen, dass jedes EIC zwei Signale aufweist, von denen das erste Signal dem korrekten m/z-Verhältnis entspricht. Das zweite Signal besitzt eine Massendifferenz von -1 Da, sodass der erste Isotopenpeak vom EIC erfasst wird. Eine Massenabweichung von -1 Da kann beispielsweise durch eine Amidierung des C-Terminus erklärt werden. Außerdem wurde ein Peptid mit einer Massendifferenz von -17 Da beobachtet. Hierbei handelt es sich um ein Peptid, aus dem durch Cyclisierung des am N-Terminus auftretenden S-Carbamoylmethylcystein Ammoniak abgespalten wurde.^[124] Die Verteilung der Signale in den Chromatogrammen bestätigt eindeutig den vermuteten Aminosäureaustausch, da im Fall der Homozygotie nur jeweils ein Signalsatz des Peptids mit bzw. ohne den Austausch zu sehen ist, wohingegen bei Proband L, welcher heterozygot in Bezug auf den SNP ist, beide Signalsätze auftreten. Insgesamt konnte der Aminosäureaustausch in sechs Spektren identifiziert werden, wobei einmal eine homozygote Ausprägung auftrat. Von den 40 Allelen (20 Proben unter Berücksichtigung des diploiden Chromosomensatzes) weisen somit sieben den SNP auf. Es ergibt sich eine Allelfrequenz von 17.5%. In der Literatur sind für die Allelfrequenz aufgrund der ethnischen Variabilität sehr unterschiedliche Werte angegeben. Sie variiert hierbei von 75% bei einer ostasiatischen Population bis 23% bei einer europäischen Population.^[121] Da die Plasmaproben von Blutspenden aus Hamburg stammen, ist mit einem vorwiegend europäischen Anteil zu rechnen, sodass die bestimmte Allelfrequenz unter Berücksichtigung der geringen Probenmenge mit den Literaturdaten vergleichbar ist.

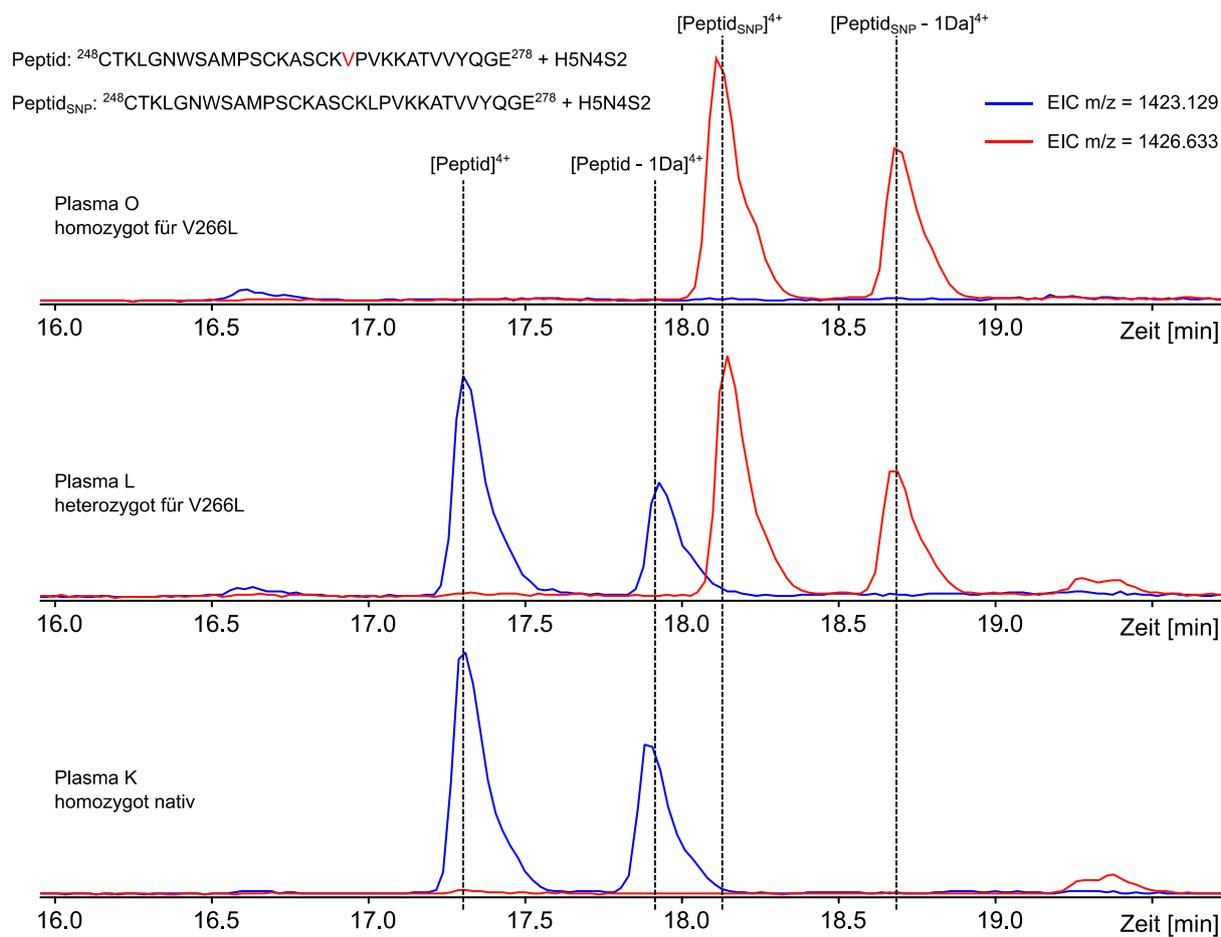


Abb. 20: EICs des Glycopeptids eines GluC-Verdau von B2GPI dreier Probanden mit unterschiedlichen Ausprägungen hinsichtlich des SNP (V266L). Bei dem Peptid handelt es sich um ein Glycopeptid, dessen Sequenz und Glycankomposition oben links dargestellt ist. Das m/z -Verhältnis der beiden Peptide im vierfach positiv geladenen Zustand beträgt m/z 1423.129 bzw. m/z 1426.633. Die jeweiligen Chromatogramme weisen zwei Signale auf, welche durch das richtige Peptidsignal sowie ein Signal mit einer Massendifferenz von -1 Da hervorgerufen werden. Die Verteilung der Signale bestätigt die Vermutung, die aufgrund der Massenspektren des intakten B2GPI getroffen wurde. Im Fall der Homozygotie tritt nur jeweils ein Signalsatz des Peptids mit oder ohne den Aminosäureaustausch auf (Plasma O bzw. K), wohingegen bei Heterozygotie beide Signalsätze auftreten (Plasma L).

In drei Massenspektren des intakten B2GPI konnte ein weiteres Phänomen beobachtet werden. Hierbei treten zusätzliche Signale im höheren m/z -Bereich auf, die nicht durch eine Glycoform des nativen B2GPI erklärt werden können. Außerdem weist jedes bekannte Signal ein um etwa 26 Da schwereres Nachbarsignal auf, wohingegen die zusätzlichen Signale dieses Nachbarsignal nicht zeigen. In **Abb. 21** ist eines dieser Spektren dargestellt. Auch dieses Phänomen kann durch einen SNP mit daraus resultierendem Aminosäureaustausch erklärt werden, wobei es sich um einen Austausch von Serin zu Asparagin an der Position 107 handelt (S107N, rs1801692^[125], Allelfrequenz: 3.9%). Dieser SNP ist auch als Allel ApoH*1 bekannt.^[54] Der Austausch führt zur lokalen Sequenz ¹⁰⁷NFS¹⁰⁹ und somit zu einer neuen potentiellen Glycosylierungsstelle. Die Massendifferenz der beiden Proteinspezies ohne Berücksichtigung der möglichen Glycosylierung beträgt 27.03 Da. Demnach werden die

Nachbarsignale vom an Position 107 unglycosylierten Protein mit Aminosäureaustausch verursacht. Die Signale im hohen m/z -Bereich (>46700 Da) lassen sich nun durch eine zusätzliche Glycosylierung erklären. Der sehr intensive Peak bei m/z 47289 beispielsweise wird durch das fünffach glycosylierte B2GPI mit der Komposition $H_{25}N_{20}S_{10}$ ($H_5N_4S_2$ an allen fünf Glycosylierungsstellen) hervorgerufen. Die Analyse zeigt demnach, dass die entstandene Glycosylierungsstelle im Gegensatz zu den nativen nicht vollständig glycosyliert vorliegt. Diese Annahme konnte zusätzlich durch eine enzymatische Spaltung mit Trypsin bestätigt werden. Dabei wurde unter anderem das unglycosylierte Peptid mit der Sequenz $^{97}YTTFEYPNT\underline{I}NFSCNTGFYLNAGADSAK^{123}$ beobachtet, welches nur in der Probe F mit der neuen Glycosylierungsstelle auftritt (**Abb. 53** im Anhang). Aufgrund der schlechteren Ionisierbarkeit von Glycopeptiden und der geringen Intensität des unglycosylierten Peptids konnten keine glycosylierten Varianten dieses Peptids identifiziert werden.

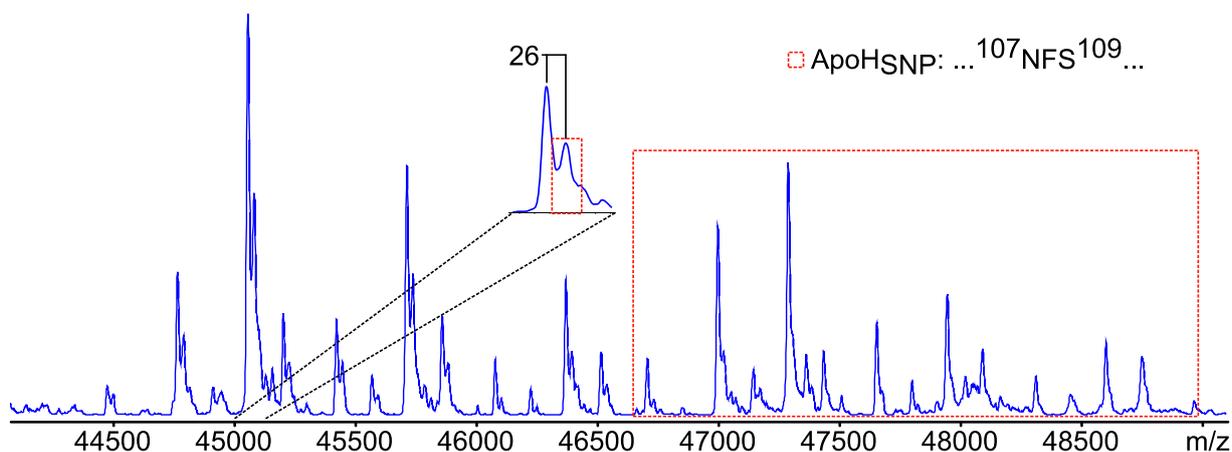


Abb. 21: Massenspektrum von intaktem B2GPI eines Probanden (Plasma S) mit einem SNP und dem resultierenden Aminosäureaustausch (S107N). Der Aminosäureaustausch von Serin zu Asparagin führt an der Position 107 zur Entstehung einer neuen potentiellen Glycosylierungsstelle. Die zu den bekannten Signalen des nativen Glycoproteins um etwa 26 Da schwereren Nachbarsignale lassen sich somit durch den Aminosäureaustausch ohne weiteres Glycan erklären. Kommt es an der Position 107 zu einer Glycosylierung, treten die zu beobachtenden zusätzlichen Signale im höheren m/z -Bereich (>46700 Da) auf. Die durch den Aminosäureaustausch hervorgerufenen Signale sind mit einem roten Kasten gekennzeichnet.

Im vorangegangenen Absatz wurde gezeigt, dass die neu entstandene Glycosylierungsstelle nicht vollständig glycosyliert vorliegt. Um den Glycosylierungsgrad der Position Asn-107 zu bestimmen, wurde eine *Matlab*-unterstützte Analyse durchgeführt. Als *Input* dienten hierbei beide Sequenzen der genetischen Varianten (mit Austausch: $C_{1622}H_{2480}N_{420}O_{474}S_{26}$, ohne Austausch: $C_{1621}H_{2479}N_{419}O_{474}S_{26}$). Durch eine *Matlab*-Analyse wurden die Koeffizienten für die Signale beider genetischer Ausprägungen erhalten. Anschließend wurden folgende Summen der Koeffizienten berechnet: 1. Summe der Koeffizienten aller nativen Glycoformen (S_n), 2. Summe der Koeffizienten aller Signale der glycosylierten Variante mit Aminosäureaustausch (S_g) und 3. Summe der Koeffizienten aller Signale der unglycosylierten

Variante mit Aminosäureaustausch (S_u). Unter der Annahme, dass die beiden genetischen Ausprägungen ein 1:1-Verhältnis aufweisen ($S_n = S_g + S_u$), gibt der Quotient der errechneten Summen (S_g/S_n bzw. S_u/S_n) den prozentualen Glycosylierungsgrad an. In **Tab. 10** sind die unabhängig voneinander bestimmten Anteile der an der Position 107 unglycosylierten und glycosylierten Proteinspezies mit Aminosäureaustausch gezeigt. Theoretisch müsste die Summe der beiden Anteile 100% ergeben, aber unter Berücksichtigung der hohen Komplexität des Intaktspektrums, der aufgrund der hohen Proteinmasse geringen Massenauflösung sowie der Fehlertoleranz des *Matlab*-Skripts sind die Abweichungen im Rahmen der methodischen Ungenauigkeit. Allgemein scheint die Glycosylierungsstelle in etwa zu gleichen Anteilen glycosyliert wie unglycosyliert vorzuliegen. Der SNP konnte in drei Spektren in einer heterozygoten Ausprägung beobachtet werden, was einer Allelfrequenz von 7.5% entspricht.

Tab. 10: Durch eine *Matlab*-Analyse berechnete Anteile der glycosylierten und unglycosylierten Ausprägung von B2GPI (hinsichtlich Asn-107) mit Aminosäureaustausch (S107N). Durch eine *Matlab*-Analyse wurden die Koeffizienten für die Signale beider genetischer Ausprägungen erhalten. Anschließend wurde die Summe der Koeffizienten aller nativen Glycoformen (S_n) sowie jeweils die Summe der Koeffizienten aller Signale gebildet, welche aus der glycosylierten (S_g) bzw. unglycosylierten (S_u) Variante der Ausprägung mit Aminosäureaustausch resultieren. Der Quotient der errechneten Summen (S_g/S_n bzw. S_u/S_n) gibt den Anteil der glycosylierten bzw. unglycosylierten Form hinsichtlich der Position Asn-107 an. Unter Berücksichtigung der hohen Komplexität des Intaktspektrums, der aufgrund der hohen Proteinmasse geringen Massenauflösung sowie der Fehlertoleranz des *Matlab*-Skripts sind die Abweichungen von den in Summe theoretischen 100% im Rahmen der methodischen Ungenauigkeit. Als Tendenz zeigt sich, dass die Glycosylierungsstelle in etwa zu gleichen Anteilen glycosyliert wie unglycosyliert vorliegt.

	Plasma F	Plasma G	Plasma S
Anteil der unglycosylierten Form	46.5%	43.4%	42.7%
Anteil der glycosylierten Form	65.4%	53.2%	53.9%

Die Auswertung aller Spektren von intaktem B2GPI von gesunden Probanden ergab, dass die Glycosylierung von B2GPI der Plasmaprobe H ein abweichendes Muster bezüglich der Massen aufweist. Des Weiteren tritt in den Spektren der Plasmaproben AC und AD sowohl dieses abweichende Glycosylierungsmuster als auch das native Muster auf (**Abb. 54** im Anhang). Es zeigt sich hierbei, dass die Retentionszeiten der beiden Muster leicht unterschiedlich sind. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass es sich um eine weitere genetische Variante von B2GPI handelt, welche bei den Probanden AC und AD heterozygot sowie bei Proband H homozygot auftritt. In **Abb. 22** sind die Massenspektren des intakten B2GPI beider auftretender Glycosylierungsmuster der Plasmaprobe AC sowie die EICs des jeweils intensivsten Signals im Ladungszustand 15+ gezeigt. Die Glycoformen der abweichenden Signale eluieren im Bereich von 19.0-19.5 min, während das native Protein

eine Retentionszeit ab 19.3 min aufweist. Durch den hypothetischen Aminosäureaustausch kommt es zu einer Verringerung der Retentionszeit. Unter der Annahme, dass die Proteinspezies der jeweils intensivsten Signale genetische Varianten voneinander sind, ergibt sich eine Massendifferenz von -130 Da. Diese Massendifferenz lässt sich durch keinen einzelnen Aminosäureaustausch erklären, da selbst der Austausch von der schwersten Aminosäure Tryptophan zu der leichtesten Aminosäure Glycin nur eine Abweichung von -129 Da ergeben würde. Durch den Vergleich der GluC-Verdaue von Plasma K (native Ausprägung) und Plasma H (homozygot) konnten die Peptide 134 LPVCAPIICPPPSIPTFATL RVYKPSAGNNSLYRD¹⁶⁸ und 329 HSSLAFWKTD³³⁸ als potentielle Bereiche für den Aminosäureaustausch identifiziert werden (**Abb. 55** und **Abb. 56** im Anhang). Mithilfe einer Datenbankrecherche bei dbSNP wurden die Aminosäureaustausche I141T (rs52797880^[126], Allelfrequenz: 6.4%), R154H (rs8178847^[127], Allelfrequenz: 6.4%) und W335S (rs1801690^[128], Allelfrequenz: 4.8%) mit einer Gesamtabweichung von -130 Da ermittelt. Diese wurden ebenfalls durch den GluC-Verdau bestätigt (**Abb. 55** und **Abb. 56** im Anhang). Aufgrund der eindeutigen Homo- und Heterozygotie dieser SNPs kann darauf geschlossen werden, dass sie größtenteils in Kombination miteinander auftreten. In der Literatur ist das Auftreten der drei Aminosäureaustausche als seltene Variante des Allels ApoH*3 bekannt und wird als ApoH*3^W bezeichnet.^[54] Die SNPs konnten in drei Spektren beobachtet werden, wobei einmal eine homozygote Ausprägung auftrat. Es ergibt sich somit in diesem Probensatz eine Allelfrequenz von 10%.

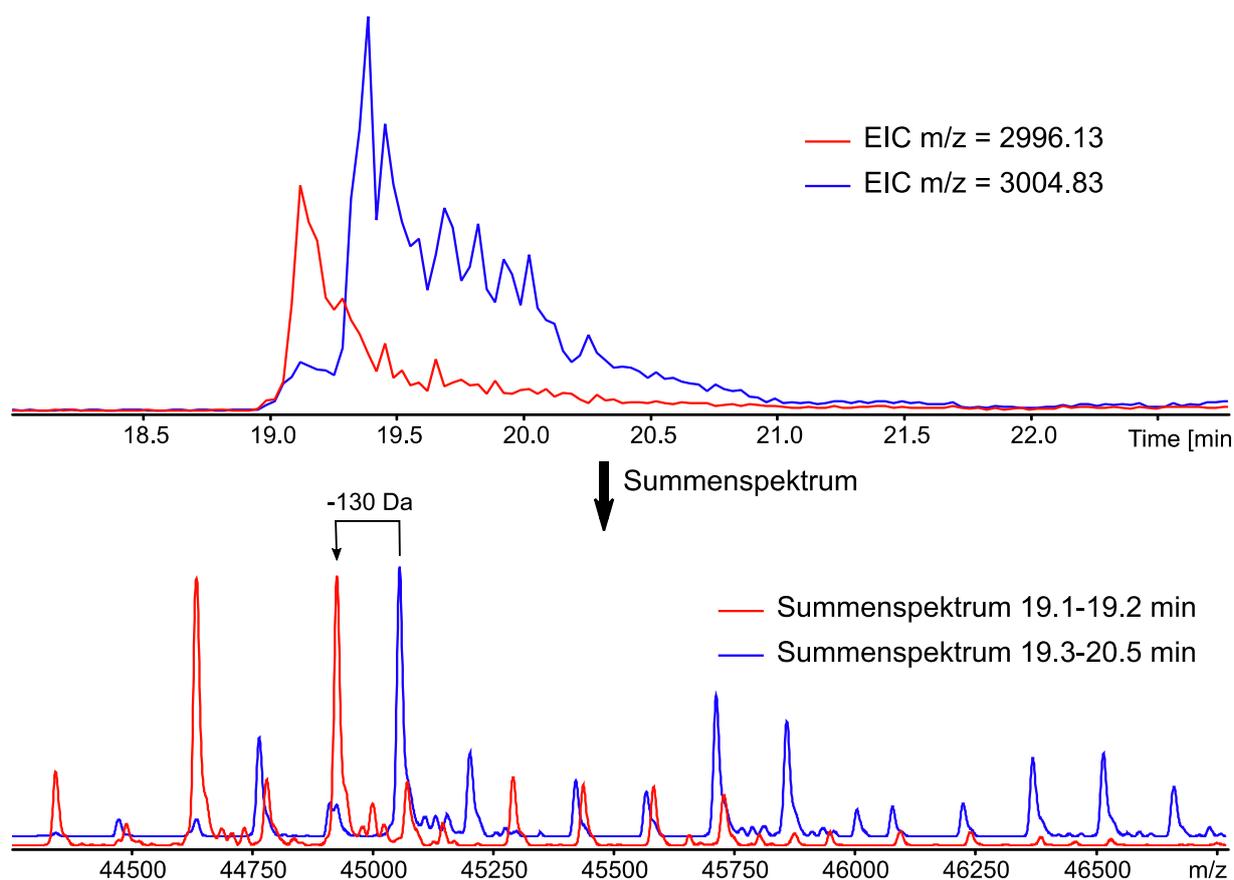


Abb. 22: Dekonvolvierte Massenspektren des intakten B2GPI der Plasmaprobe AC bei unterschiedlichen Retentionszeiten sowie EICs der jeweils intensivsten Signale im Ladungszustand 15+. Die Plasmaprobe AC zeigt zwei unterschiedliche Glycosylierungsmuster, welche zu unterschiedlichen Zeiten eluieren. Das in Blau dargestellte Spektrum entspricht der nativen Variante von B2GPI. Das in Gelb dargestellte Spektrum zeigt die genetische Variante eines SNP und einen daraus resultierenden Aminosäureaustausch, wobei die Massendifferenz etwa -130 Da beträgt. Die Massendifferenz kann durch drei gleichzeitig auftretende Aminosäureaustausche (I141T, R154H, W335S) erklärt werden. Bei Vergleich der beiden genetischen Varianten fällt auf, dass die Glycosylierungsmuster sich nicht nur in ihrer Masse unterscheiden, sondern auch Unterschiede hinsichtlich der Häufigkeit bestimmter Glycoformen aufweisen.

Die beiden auftretenden Proteinspezies unterscheiden sich jedoch nicht nur in ihren Massen, sondern weisen auch unterschiedliche Glycosylierungsmuster auf. Während in der nativen Variante die Signale der Glycankompositionen $H_{20}N_{16}S_7$ (m/z 44765) und $H_{20}N_{16}S_8$ (m/z 45056) deutlich unterschiedliche Intensitäten haben, ist die Quantität der entsprechenden Signale (m/z 44635 und m/z 44926) in der Variante mit den Aminosäureaustauschen nahezu gleich. Der Wechsel bestimmter Aminosäuren in der Primärstruktur scheint demnach einen Einfluss auf die Glycosylierung zu haben.

Tab. 11: Zusammenfassung der identifizierten, durch einen SNP hervorgerufenen Aminosäureaustausche bei B2GPI aus humanem Blutplasma. Hierfür wurde B2GPI aus Blutplasma von 20 gesunden Probanden (entspricht 40 Allelen) isoliert und analysiert. Insgesamt konnten neben der nativen Variante drei weitere Phänotypen beobachtet werden. Hierbei handelt es sich um die Aminosäureaustausche S107N (ApoH*1), V266L (ApoH*2) sowie das gleichzeitige Auftreten von I141T, R154H und W335S (ApoH*3^W). * Massendifferenz der unglycosylierten Variante.

Allel	Pos-107	Pos-141	Pos-154	Pos-266	Pos-335	Allelfrequenz (exp)	Allelfrequenz (dbSNP)	Massendifferenz
nativ	Ser	Ile	Arg	Val	Trp	65.0%	-	-
ApoH*1	Asn	Ile	Arg	Val	Trp	7.5%	3.9%	+27 Da*
ApoH*2	Ser	Ile	Arg	Leu	Trp	17.5%	23-75%	+14 Da
ApoH*3 ^W	Ser	Thr	His	Val	Ser	10.0%	4.8/6.4%	-130 Da

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Isolierung und Analyse von B2GPI aus Blutplasma von 20 gesunden Probanden eine gute Grundlage für weitere Studien gelegt wurde, die sich beispielsweise auf eine Anwendung von B2GPI als Glyco-basierten Biomarker fokussieren. Neben Aussagen zur natürlichen Variation im Glycosylierungsmuster von B2GPI konnten drei genetische Varianten identifiziert und Referenzspektren erhalten werden. Die identifizierten Aminosäureaustausche sind in **Tab. 11** noch einmal zusammengefasst. Diese Arbeit beschreibt einen schnellen und einfachen Signal-basierten Ansatz für den Vergleich von B2GPI aus gesunden und erkrankten Probanden, was einen großen Schritt für die potentielle Anwendung von B2GPI als Biomarker darstellt.

4.3 Evaluation und Validierung von PIP als Biomarker

Die bereits erwähnte ungewöhnliche Glycosylierung von *Prolactin-inducible Protein* (PIP) könnte hinsichtlich der Verwendung als Biomarker für beispielsweise Brustkrebs von großem Interesse sein. Für die Verwendung von PIP in einer großen klinischen Studie muss zunächst die Methodik vor allem hinsichtlich der Probenhandhabung und der computergestützten Analyse evaluiert und validiert werden. Diese Evaluation und Validierung stellt den zweiten Teil meiner Dissertation dar und wird in den folgenden Kapiteln detailliert diskutiert.

4.3.1 Einfluss der Glycosylierung auf das Elutionsverhalten

Eine große Problematik der Analyse des Glycosylierungsmusters von PIP liegt in der hohen Komplexität des Massenspektrums des intakten Glycoproteins. In **Abb. 23** ist beispielhaft ein solches Spektrum gezeigt, wobei die möglichen Strukturen der entsprechenden Glycoformen aller signifikanter Signale dargestellt sind. Dieses Spektrum soll als Einführung in die Glycosylierung von PIP dienen. Obwohl PIP nur eine *N*-Glycosylierungsstelle aufweist, kommt es durch den Umstand, dass sich die Glycane vor allem im Sialylierungs- und Fucosylierungsgrad unterscheiden, zu weitreichenden Signalüberlagerungen der einzelnen Glycoformen. Dies hängt mit der Tatsache zusammen, dass die Masse einer Sialinsäure sich nur um etwa 1 Da von der Masse von zwei Fucosen unterscheidet, sodass ein Signal teilweise durch die Überlagerung von bis zu fünf verschiedenen Glycoformen hervorgerufen wird (**Abb. 57** im Anhang, Beispiel mit vier Glycoformen). So kann beispielsweise das Signal m/z 17021 durch die Glycane $H_7N_6F_8$, $H_7N_6F_6S$, $H_7N_6F_4S_2$, $H_7N_6F_2S_3$ und $H_7N_6S_4$ (H: Hexose, N: *N*-Acetylhexosamin, F: Fucose, S: Sialinsäure = *N*-Acetylneuraminsäure) beschrieben werden. Durch eine manuelle Analyse ist es nicht möglich, die Gewichtung der einzelnen Glycoformen zu bestimmen. Außerdem fällt auf, dass unabhängig von der Antennenzahl die maximale Fucosylierung nicht das schwerste Glycan verursacht. Es treten demnach Signale auf, welche ausschließlich durch Glycoformen erklärt werden können, die mindestens eine Sialinsäure tragen. Auf diese Signale wird im Rahmen dieser Arbeit sehr häufig eingegangen, wobei hier von sialylierten Strukturen gesprochen wird. Diese Bezeichnung bedeutet jedoch nicht, dass bei den leichteren Glycoformen keine Glycane mit Sialinsäuren vorkommen. Da in den folgenden Kapiteln oft nur alle Glycoformen eines Signals gleichzeitig diskutiert werden, wurde jedem Signal eine Massenbezeichnung gegeben. Diese leitet sich aus der *average*-Masse der leichtesten Glycoform (Protein+Glycan) des entsprechenden Signals ab und ist unter anderem der **Tab. 16** im Anhang zu entnehmen. Ein Großteil der folgenden Experimente wurde mit dem Speichel eines Probanden durchgeführt. Es zeigte sich, dass dieser Proband eine besonders hohe Sialylierung aufweist, sodass Veränderung im Sialylierungsprofil gut zu erkennen sind.

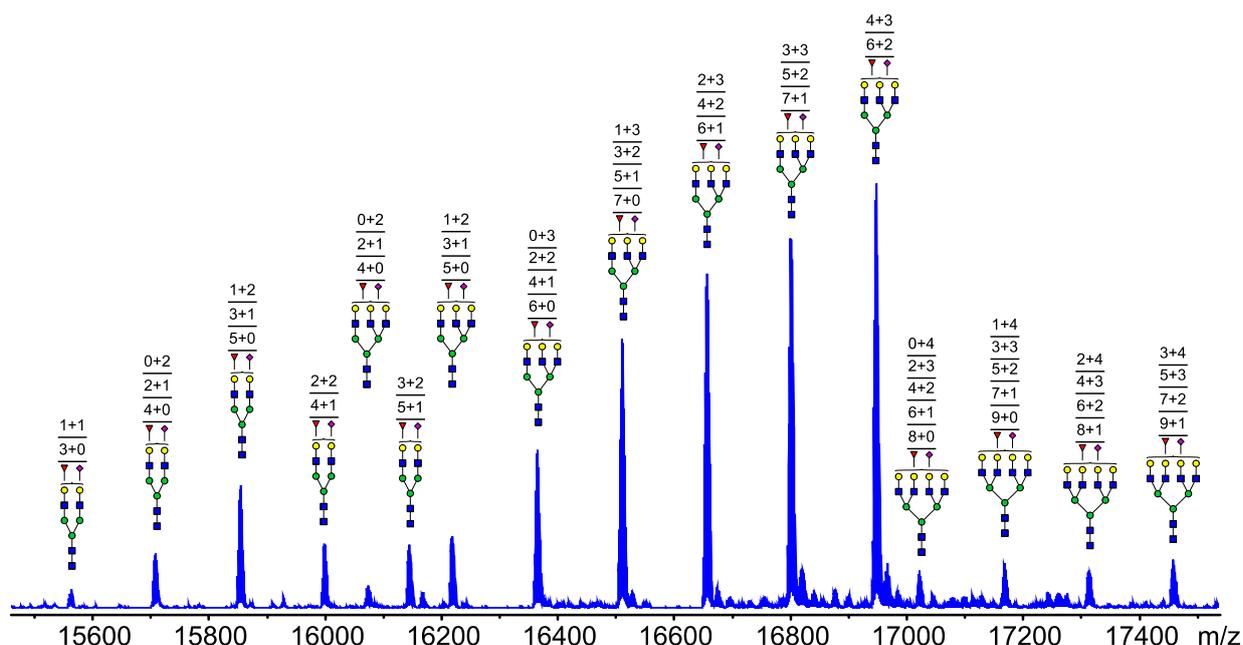


Abb. 23: Dekonvoliertes Massenspektrum von intaktem PIP. Die Glycosylierung von PIP weist vor allem bi-, tri- und tetraantennäre Glycane mit unterschiedlichen Fucosylierungs- und Sialylierungsgraden auf. Da die Masse einer Sialinsäure sich nur um etwa 1 Da von der Masse zweier Fucosen unterscheidet, kommt es zu Überlagerungen mehrerer Glycoformen zu einem Signal. Über den Signalen sind die entsprechenden möglichen Glycane dargestellt, wobei die Zahlen den Gehalt an Fucosen (linke Zahl) und Sialinsäuren (rechte Zahl) angeben. Hierbei fällt auf, dass mit dem Signal m/z 16510 bereits die maximale Fucosylierung (sieben Fucosen) der Triantennen erreicht ist. Dennoch treten noch Signale mit höheren m/z -Verhältnissen auf. Diese Signale lassen sich ausschließlich durch Glycoformen erklären, welche mindestens eine Sialinsäure tragen. Auf diese Signale wird im Rahmen dieser Arbeit sehr häufig eingegangen, wobei hier von sialylierten Strukturen gesprochen wird. Auch bei den Bi- und Tetraantennen ist dieses Phänomen zu beobachten.

Eine reduzierte Spektrenkomplexität ist für eine schnelle und einfache Anwendung von PIP als Biomarker wünschenswert. Eine Möglichkeit ist die enzymatische Abspaltung bestimmter Zuckerbausteine wie der Sialinsäure, was eine Überlagerung aufgrund ähnlicher Massen verhindert. Diese Methode hat jedoch den Nachteil eines zusätzlichen und zeitintensiven Arbeitsschrittes, welcher insbesondere die Verwendung im klinischen Alltag erschweren würde. Außerdem muss eine quantitative Abspaltung erreicht werden, da es sonst eventuell hinsichtlich der Enzymaktivität bei den jeweiligen Glycosylierungsstellen zu Variationen zwischen den Proben kommt. In der Dissertation von A. Wiegandt wurde neben der allgemeinen Analyse der Glycosylierung ebenfalls der Einfluss der Glycane auf das Elutionsverhalten von PIP untersucht.^[71, 103] Hierbei wurde vor allem der Einfluss der Fucosylierung betrachtet. Es wurde aber auch auf die Erhöhung der Retentionszeit durch einen steigenden Sialylierungsgrad hingewiesen.^[103] Dieser Effekt soll im Weiteren detailliert analysiert werden, wobei die verwendete Methode einen zu A. Wiegandts Untersuchungen identischen Ansatz wählt. Zunächst wurden entlang des Retentionszeitbereiches (etwa 21.3-22.6 Minuten) immer drei benachbarte Spektren summiert. Der Retentionszeitbereich wurde

durch zwei EICs bestimmt, die den Ladungszustand 10+ der Signale bei m/z 16510 und m/z 16802 darstellen. Diese Signale weisen eine hohe Intensität auf und können im Falle des ersten Signals (m/z 16510) durch eine Überlagerung von vier Glycoformen ($H_6N_5F_7$, $H_6N_5F_5S$, $H_6N_5F_3S_2$ und $H_6N_5FS_3$) hervorgerufen werden, wobei sowohl sialylierte als auch unsialylierte Strukturen auftreten. Das zweite Signal (m/z 16802) hingegen lässt sich nur durch sialylierte Glycoformen ($H_6N_5F_7S$, $H_6N_5F_5S_2$ und $H_6N_5F_3S_3$) erklären. Es sollte demnach sowohl der Elutionsbereich der unsialylierten Strukturen als auch der sialylierten Strukturen abgedeckt sein. In **Abb. 24** sind die EICs sowie die Lage und Nummern der summierten Massenspektren innerhalb der Chromatogramme gezeigt. Bereits hier lässt sich die erwartete Verschiebung zu höheren Retentionszeiten durch die Sialylierung erkennen, da wie oben bereits erwähnt ausschließlich sialylierte Strukturen für das EIC m/z 1681 in Frage kommen. Außerdem weist das EIC von m/z 1652 zwei Maxima auf, was auf eine chromatographische Trennung massegleicher Proteinspezies hindeutet. Hierbei kann es sich zum Beispiel um unterschiedliche Glycoformen handeln, die aufgrund ihrer sehr ähnlichen Masse identische Isotopensignale aufweisen. Die durch die Summierung erhaltenen Spektren sind in **Abb. 25** dargestellt. Die Intensitäten und relativen Anteile der einzelnen Signale je Spektrum sind im Anhang in **Tab. 24** aufgeführt. Wie bereits von A. Wiegandt festgestellt, ist durch den Vergleich der einzelnen Spektren eine deutliche Korrelation der Retentionszeit mit der Anzahl der Antennen zu erkennen.^[103] Zu Beginn eluieren nur bi- und triantennäre Strukturen, wobei das Verhältnis dieser beiden mit der Zeit zu Gunsten der Triantennen steigt. Mit zunehmender Zeit ist die Intensität der Biantennen sehr gering. Die tetraantennären Strukturen sind zunächst durch zwei Signale (m/z 17021 und 17167) zu beobachten. Erst ab Spektrum 781 (ab Minute 22) tritt eine signifikante Elution schwererer Tetraantennen (z.B. m/z 17313) auf. Eine weitere Beobachtung ist die spätere Elution von Strukturen mit höherem Sialinsäuregehalt innerhalb des bi-, tri-, und tetraantennären Bereiches. Bei den Triantennen beispielsweise ist das Signal m/z 16656 erst ab Spektrum 766 und die Signale m/z 16802 und m/z 16949 erst ab Spektrum 781 zu sehen. Diese Signale werden alle von Glycoformen hervorgerufen, die terminale Sialinsäuren tragen und hinsichtlich ihres Sialylierungsgrades ansteigen. Es ist also bereits ohne Quantifizierung der einzelnen Glycoformen zu erkennen, dass eine steigende Sialylierung aufgrund des hydrophoben Charakters der Sialinsäure zu einer signifikanten Erhöhung der Retentionszeit führt.

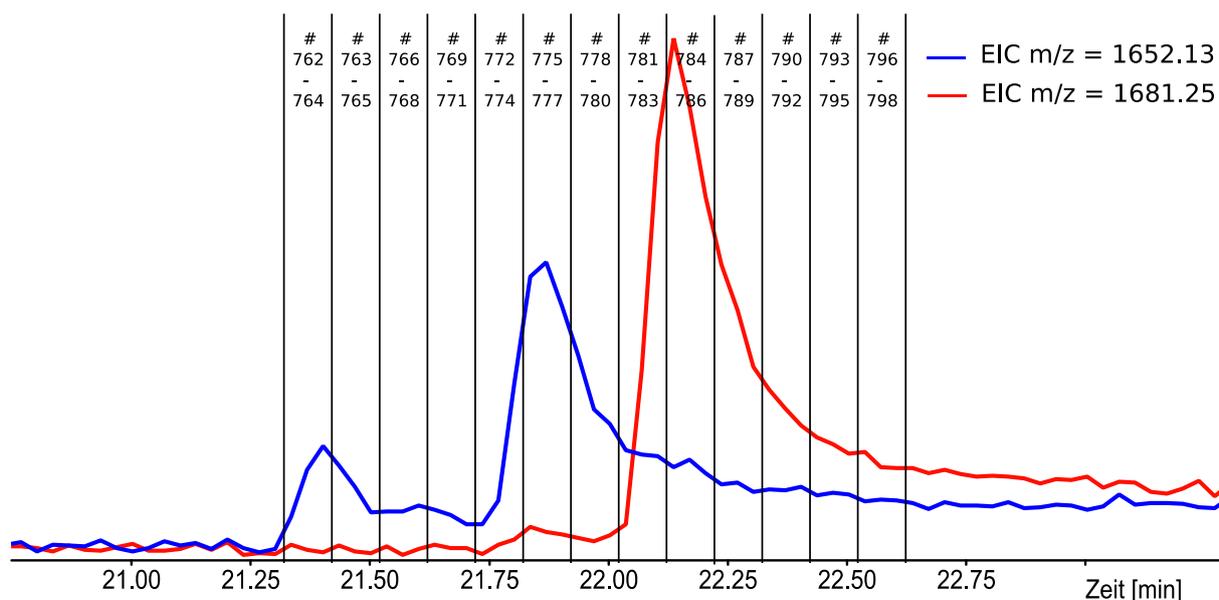


Abb. 24: Nummer der summierten Spektren und deren Lage im Chromatogramm. Die verwendeten EICs stellen den Verlauf des Ladungszustandes 10+ der Signale m/z 16510 ($H_6N_5F_7$, $H_6N_5F_5S$, $H_6N_5F_3S_2$ und $H_6N_5FS_3$) und m/z 16802 ($H_6N_5F_7S$, $H_6N_5F_5S_2$ und $H_6N_5F_3S_3$) dar. Die Spektrennummer bezieht sich auf die gesamte LC-MS-Messung. Aufgrund des Verlaufs der EICs und der Tatsache, dass das Signal bei m/z 16802 nur durch sialylierte Strukturen erklärt werden kann, ist bereits ohne Analyse der Massenspektren die zu erwartende Verschiebung zu höheren Retentionszeiten durch die Sialylierung zu erkennen. Außerdem weist das EIC von m/z 1652 zwei Maxima auf, was auf eine chromatographische Trennung unterschiedlicher Glycoformen hindeutet.

Durch die Erhöhung der Elutionszeiten mit ansteigendem Sialylierungsgrad könnte demnach die Möglichkeit bestehen, dass zu Beginn nur unsialylierte Glycoformen eluieren, was die Spektrenkomplexität zu diesem Zeitpunkt reduziert. Aufgrund der Massendifferenz von etwa 1 Da zwischen den sich überlagernden Glycoformen ist eine Verschiebung des Signalmaximums zu erwarten. In **Abb. 26** ist das Signal bei m/z 16510, welches aus der Überlagerung der vier potentiellen Glycoformen $H_6N_5F_7$, $H_6N_5F_5S$, $H_6N_5F_3S_2$ und $H_6N_5FS_3$ resultieren kann, zu unterschiedlichen Retentionszeiten (Angabe durch Spektrennummer) dargestellt. Die postulierte Verschiebung des Maximums ist hier deutlich zu erkennen, wobei mit steigender Retentionszeit ein *Shift* zu geringeren m/z -Verhältnissen zu erkennen ist. Jedoch zeigt sich auch, dass im späteren Retentionszeitbereich das Maß der Verschiebung abnimmt, was unter anderem an der Zunahme der Überlagerungen liegen kann.

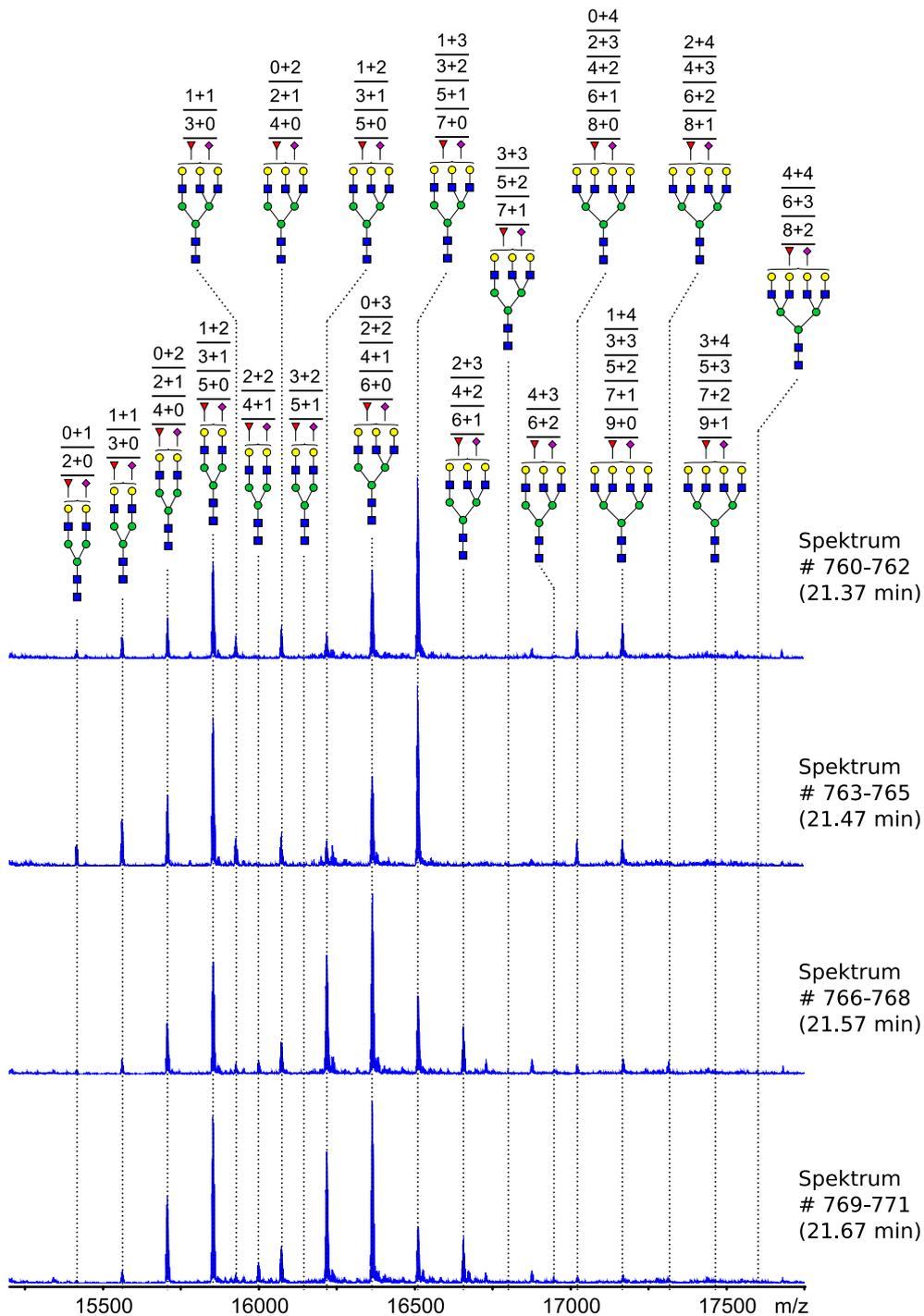


Abb. 25: Chronologische Darstellung der über den Elutionsbereich von PIP summierten Spektren (je drei benachbarte Spektren, Vgl. Abb. 24). Die Spektrennummern beziehen sich auf die gesamte LC-MS-Messung. Über den Signalen sind die möglichen Glycane dargestellt, wobei die Zahlen den Gehalt an Fucosen (linke Zahl) und Sialinsäuren (rechte Zahl) angeben. Die Betrachtung der Spektren zeigt bereits eine Korrelation der Retentionszeit mit der Anzahl der Antennen. Dies ist sowohl an der Veränderung des Verhältnisses von Bi- und Triantennen mit der Zeit als auch an der erst später auftretenden Elution der Tetraantennen (ab Spektrum 781) zu erkennen. Des Weiteren fällt auf, dass die höheren m/z-Verhältnisse innerhalb der Bi-, Tri- und Tetraantennen eine höhere Retentionszeit aufweisen. Bei den Triantennen beispielsweise ist das Signal m/z 16656 erst ab Spektrum 766 und die Signale m/z 16802 und m/z 16949 erst ab Spektrum 781 zu sehen. Diese Signale werden alle von Glycoformen hervorgerufen, die terminale Sialinsäuren tragen und hinsichtlich ihres Sialylierungsgrades ansteigen.

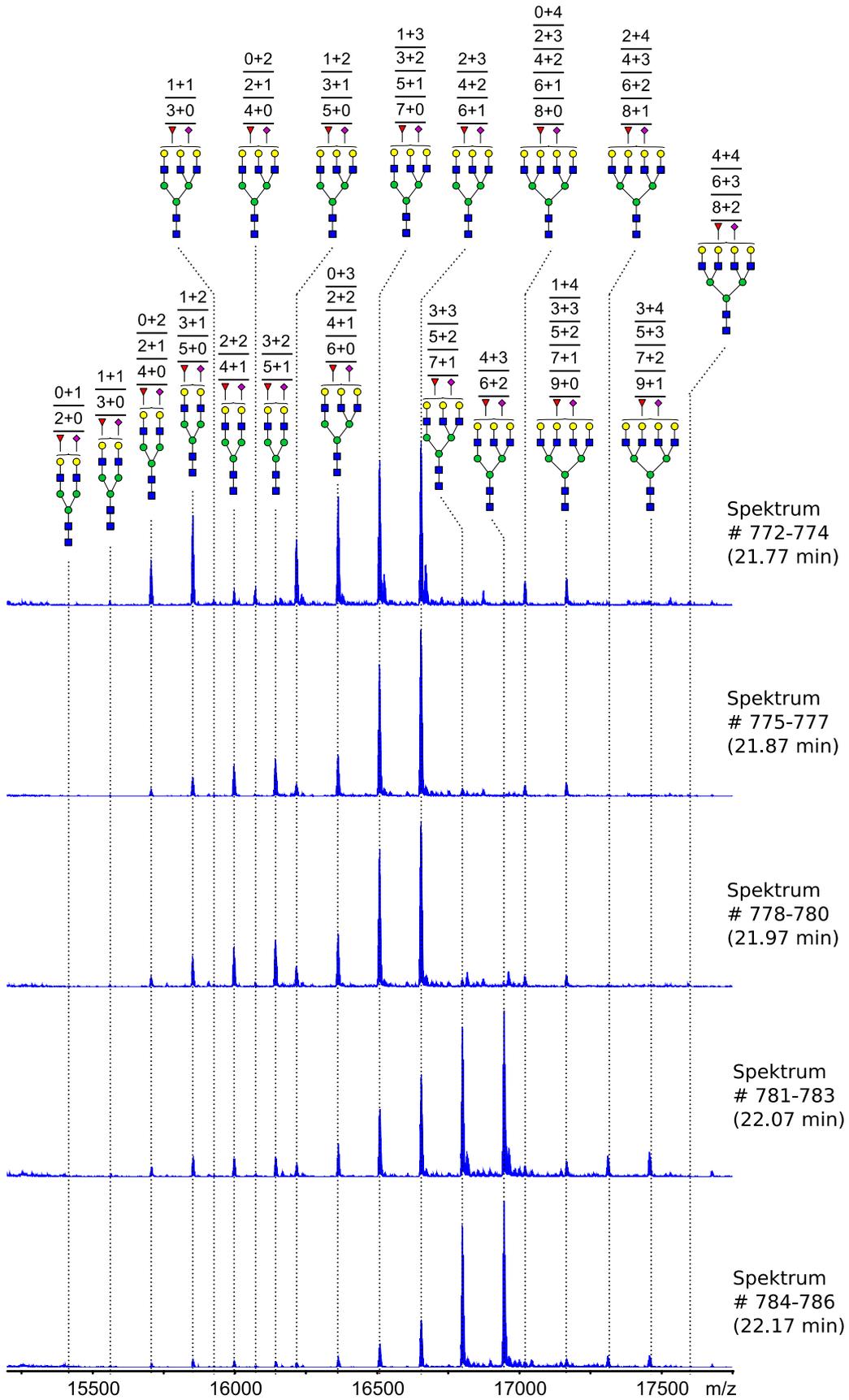


Abb. 25: Fortsetzung

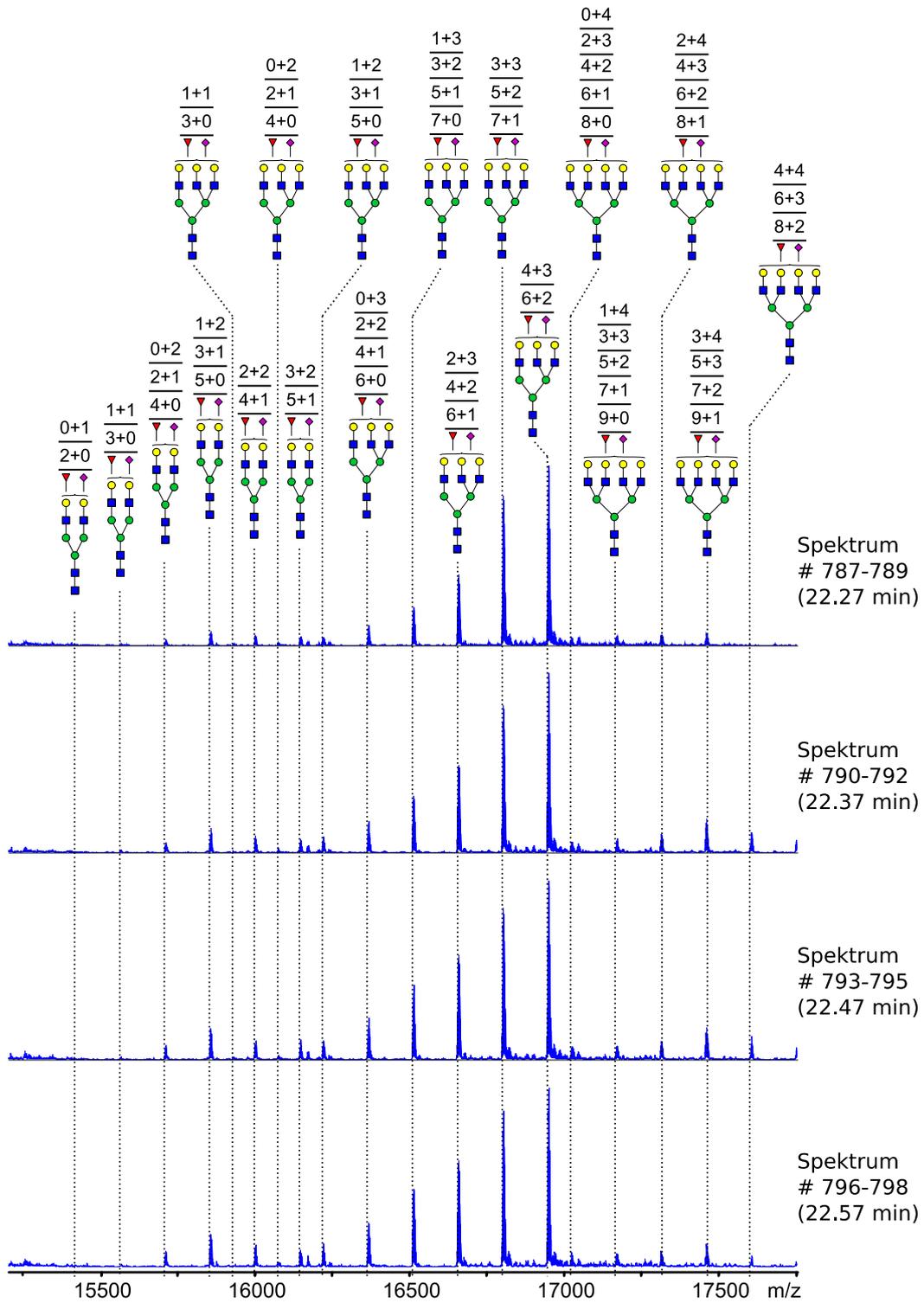


Abb. 25: Fortsetzung

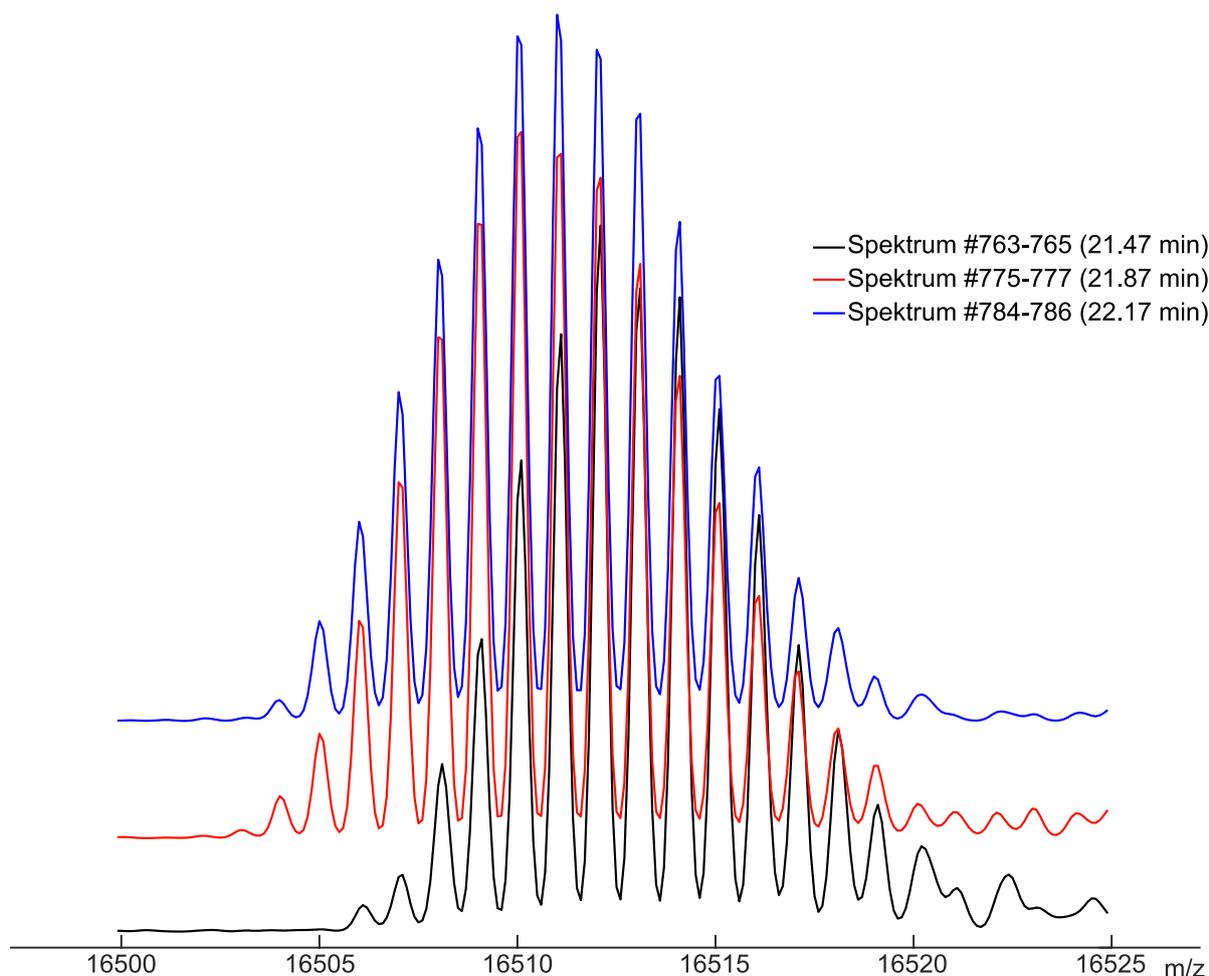


Abb. 26: Vergleich des Signals bei m/z 16510 zu unterschiedlichen Elutionszeiten. Die Elutionszeiten sind durch die Angabe der Spektrennummer charakterisiert. Die Signale wurden auf den intensivsten Isotopenpeak normiert. Es ist mit steigender Retentionszeit eine deutliche Verschiebung des Signalmaximums (schwarz zu blau/rot) zu geringeren m/z -Verhältnissen zu beobachten, was auf eine erhöhte Sialylierung hindeutet.

Für eine genauere Untersuchung wurde eine *Matlab*-unterstützte Analyse des Signals bei m/z 16510 durchgeführt. Die vom *Matlab*-Skript angepassten Glycane mit der berechneten Häufigkeit sind in **Tab. 12** dargestellt, wobei nur die relativen Anteile des einen Signals berücksichtigt wurden. Im frühen Retentionszeitbereich wird das Signal laut Skript zu 100% durch das unsialylierte Glycan $H_6N_5F_7$ hervorgerufen, wohingegen dessen Quantität mit der Zeit auf 0% sinkt und die sialylierten Glycane in der Häufigkeit ansteigen, was sehr gut mit den Erwartungen übereinstimmt. Dennoch ist zunächst ein Anstieg des zweifach sialylierten Glycans zu erkennen, während das einfach sialylierte erst ab einer Retentionszeit von 22 Minuten vom Skript berücksichtigt wird. Die Fragestellung nach der Belastbarkeit des *Matlab*-Skripts ist hier sehr interessant und wird ebenfalls untersucht. Die Tendenz und die Möglichkeit eines Signals ohne sialylierte Strukturen, also ohne Überlagerung verschiedener Glycoformen, sind deutlich zu beobachten, was aufgrund der dadurch erhaltenen Reduktion der Spektrenkomplexität von großem Interesse sein könnte.

Tab. 12: Matlab-unterstützte Quantifizierung der Glycoformen des Signals bei m/z 16510 zu unterschiedlichen Retentionszeiten. Die Retentionszeiten sind durch die Angabe der Spektrennummer charakterisiert. Im frühen Retentionszeitbereich wird das Signal zu 100% durch das unsialylierte Glycan $H_6N_5F_7$ hervorgerufen, wohingegen dessen Quantität mit der Zeit auf 0% sinkt und die sialylierten Glycane in der Häufigkeit ansteigen, was sehr gut mit den Erwartungen übereinstimmt. H: Hexose, N: N-Acetylhexosamin, F: Fucose, S: Sialinsäure.

	Glycane			
	$H_6N_5F_7$ ($m/z=16513$)	$H_6N_5F_5S$ ($m/z=16512$)	$H_6N_5F_3S_2$ ($m/z=16511$)	$H_6N_5FS_3$ ($m/z=16510$)
# 763-765	100%	0%	0%	0%
# 775-777	12%	0%	87%	1%
# 784-786	0%	35%	61%	4%

Für eine detaillierte Analyse des Elutionsverhaltens von PIP sollten alle Glycoformen betrachtet werden. Daher wurden die Koeffizienten aller Glycoformen der Bi-, Tri- und Tetraantennen mit identischem Sialylierungsgrad summiert und anschließend gegen die Retentionszeit aufgetragen. Für die Bi-, Tri- und Tetraantennen ist diese Auftragung in **Abb. 27**, **Abb. 28** und **Abb. 29** (Koeffizienten im Anhang, **Tab. 25**, **Tab. 26** und **Tab. 27**) dargestellt. Vor allem bei den Bi- und Triantennen ist eine sehr gute Korrelation zwischen Retentionszeit und Sialylierungsgrad zu erkennen, wobei die Elutionsmaxima der Glycoformen mit steigendem Gehalt der Sialinsäuren zu höheren Retentionszeiten verschoben sind. Bei den Biantennen beispielsweise liegt das Maximum für unsialylierte Strukturen bei 21.4 Minuten, für einfach sialylierte bei etwa 21.6 Minuten und für zweifach sialylierte bei etwa 21.9 Minuten. Pro Sialinsäure erhöht sich demnach die Retentionszeit um 0.2-0.3 Minuten, was auch durch Betrachtung der Triantennen und Tetraantennen verifiziert werden kann. Außerdem zeigt sich in den Abbildungen der Bi- und Triantennen, dass zu Beginn nur Strukturen ohne Sialinsäure eluieren. Wenn nur dieser Bereich für die Summierung der Spektren verwendet wird, ist ein Vergleich der Glycosylierung insbesondere des Fucosylierungsgrades von gesunden und erkrankten Probanden ohne Signalüberlagerungen möglich. An dieser Stelle sollte aber erwähnt werden, dass die fehlende Betrachtung der Sialylierung auch eine Reduktion des Informationsgehaltes bedeutet, da der Sialylierungsgrad in der Literatur häufig als potentieller Biomarker zur Erkennung von Krebserkrankungen beschrieben wird. Eine vollständige chromatographische Trennung der unterschiedlich sialylierten Glycoformen ist nicht gegeben. Der Überlappungsbereich der einzelnen Kurven ist recht groß, sodass reine Spektren mit Glycoformen eines bestimmten Sialinsäuregehaltes (außer unsialyliert) nicht erhalten werden können. Dennoch konnte gezeigt werden, dass eine Fucose-basierte Analyse auch ohne enzymatische Abspaltung der Sialinsäuren möglich ist - unter der Annahme, dass der von A. Wiegandt detailliert untersuchte Einfluss der Fucosylierung auf die Elution bei allen Probanden gleich ausfällt.^[103]

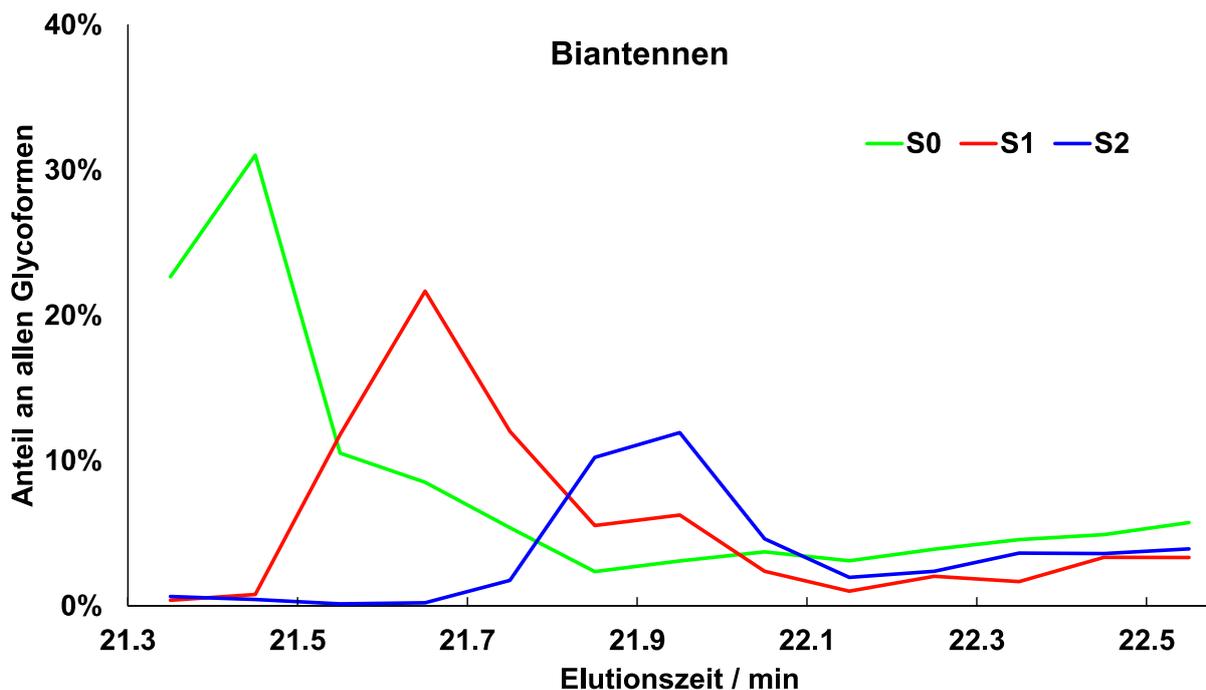


Abb. 27: Elutionsprofil unterschiedlich sialylierter, biantennärer Glycane von PIP. Hierfür wurden die Koeffizienten einer *Matlab*-unterstützten Analyse der entsprechend **Abb. 24** summierten Spektren hinsichtlich des Sialylierungsgrades der Glycoformen summiert, was ein Maß für den Anteil der biantennären Strukturen an allen Glycoformen darstellt. Es ist eine deutliche Korrelation zwischen der Elutionszeit und der Sialylierung zu erkennen, wobei das Elutionsmaximum der Glycoformen mit steigendem Sialinsäuregehalt zu späteren Zeiten verschoben wird.

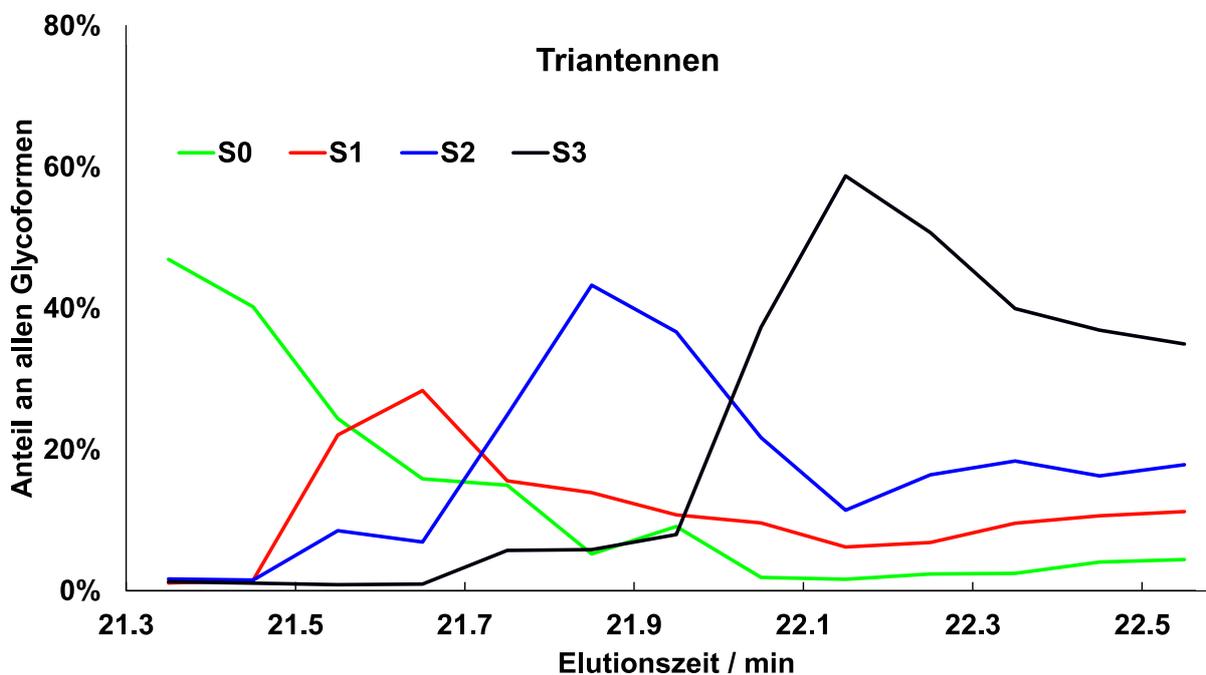


Abb. 28: Elutionsprofil unterschiedlich sialylierter, triantennärer Glycane von PIP. Hierfür wurden die Koeffizienten einer *Matlab*-unterstützten Analyse der entsprechend **Abb. 24** summierten Spektren hinsichtlich des Sialylierungsgrades der Glycoformen summiert, was ein Maß für den Anteil der triantennären Strukturen an allen Glycoformen darstellt. Wie bereits in **Abb. 27** besprochen ist auch hier eine deutliche Korrelation zu erkennen. Erneut nimmt die Elutionszeit mit steigendem Gehalt an Sialinsäuren kontinuierlich zu.

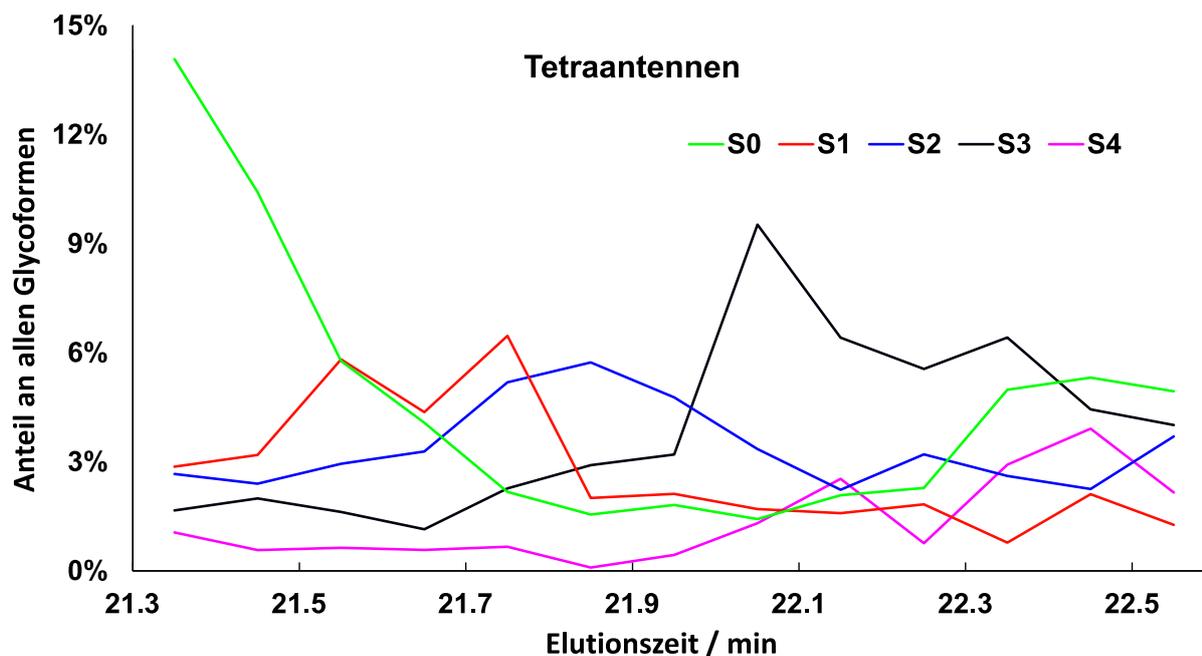


Abb. 29: Elutionsprofil unterschiedlich sialylierter, tetraantennärer Glycane von PIP. Hierfür wurden die Koeffizienten einer *Matlab*-unterstützten Analyse der entsprechend **Abb. 24** summierten Spektren hinsichtlich des Sialylierungsgrades der Glycoformen summiert, was ein Maß für den Anteil der triantennären Strukturen an allen Glycoformen darstellt. Wie bereits in **Abb. 27** und **Abb. 28** besprochen ist auch hier eine deutliche Korrelation zu erkennen. Erneut nimmt die Elutionszeit mit steigendem Gehalt an Sialinsäuren kontinuierlich zu. Dennoch ist zu erkennen, dass die Korrelation größerer Schwankungen aufweist. So weisen die Kurven zum Beispiel mehrere Maxima auf und die unsialylierten Strukturen scheinen ab einer Retentionszeit von etwa 22.4 Minuten erneut den höchsten Anteil zu haben. Hierfür kann die teilweise sehr geringe Intensität der Signale von tetraantennären Strukturen und das damit verbundene schlechte Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Signale als Erklärung genannt werden. Eine gute Anpassung dieser Signale durch *Matlab* ist somit erschwert, was zu Abweichungen führen kann.

4.3.2 Belastbarkeit der computergestützten Analyse

Ein sehr großer Teil der Analyse von PIP basiert auf computergestützten Methoden unter Verwendung eines *Matlab*-Skripts, welches eine mathematische Anpassung des experimentellen Spektrums unter Verwendung der Proteinsequenz und der potentiellen Glycane als *Input* durchführt. Das Skript eignet sich hervorragend für die Untersuchung von komplexen Intaktspektren, bei denen eine manuelle Analyse zu zeitaufwendig wäre. Dennoch muss diese *Matlab*-gestützte Analyse hinsichtlich des Einsatzes zur Quantifizierung überlagernder Glycoformen validiert werden. Hierbei steht vor allem die Frage der Belastbarkeit im Vordergrund. Aufgrund der starken Signalüberlagerungen bei PIP stellt sich beispielsweise die Frage, ob das Skript in der Lage ist die Überlagerung von vier Glycoformen korrekt anzupassen, die sich jeweils nur um etwa 1 Da unterscheiden. Hierbei sollte vor allem der Einfluss der manuellen Einstellung der Parameter *Shift* und *Linienbreite* im Fokus stehen, da es hier durchaus zu subjektiven Einschätzungen kommen kann. Hierfür wurde zunächst

mithilfe von *Matlab* ein Spektrum generiert, das durch die Summe der mit festen Koeffizienten gewichteten Vektoren der Isotopenmuster der Glycoformen $H_6N_5F_7$ (F7S0, Koeffizient: 0.58), $H_6N_5F_5S$ (F5S1, Koeffizient: 0.05), $H_6N_5F_3S_2$ (F3S2, Koeffizient: 0.10) und $H_6N_5FS_3$ (F1S3, Koeffizient: 0.27) errechnet wurde. Für die Berechnung dieses Spektrums musste eine Linienbreite, welche letztendlich ein Maß für die Breite eines Isotopenpeaks ist, und ein *Shift* der Masse angegeben werden. Für die Linienbreite wurde ein Wert von 0.190 gewählt, da die Anpassungen von Spektren des intakten PIP zeigten, dass die Linienbreiten bei den experimentellen Daten im Bereich von 0.135 und 0.255 lagen. Beim *Shift* wurde auf eine Massenverschiebung verzichtet, da die Analyse eben diese Verschiebung untersuchen soll. Es wurde also ein *Shift* von 0 Da verwendet, was bedeutet, dass die Masse des intakten Glycoproteins entsprechend der Summenformel und der Atommassen berechnet wurde. Diese beiden Werte stellen somit die nativen Parameter des Spektrums dar. Das so gewonnene Spektrum diente nun als *Input* für das *Matlab*-Skript und ist hiermit im Rahmen dieser Analyse das „experimentelle“ Spektrum. Für die Anpassung wurden nur die vier möglichen Glycoformen berücksichtigt. Durch Variation des *Shift* und der Linienbreite ist nun eine Einschätzung der Belastbarkeit des Skripts im Hinblick auf diese beiden manuell einzustellenden Parameter möglich. In **Tab. 13** und in **Abb. 30** sind die entsprechenden Ergebnisse dargestellt. Zunächst fällt auf, dass selbst bei Verwendung der nativen Parameter das Skript eine geringe Abweichung bei den abundanten Glycoformen zeigt. Durch eine optische Betrachtung der Anpassung ist dies nicht festzustellen, da erst bei einer sehr hohen Vergrößerung der optischen Darstellung die Differenz zwischen dem „experimentellen“ Spektrum und dem theoretischen Spektrum geringste Unterschiede zeigt. Bei realen, experimentellen Daten sind diese geringen Unterschiede allein aufgrund des technischen und chemischen Rauschens nicht zu erfassen, sodass sie in diesem Maße keine Rolle spielen. Die trotz unveränderter Parameter auftretende Abweichung lässt sich durch den iterativen Prozess erklären. Wenn das Skript bei aufeinanderfolgenden Iterationsschritten eine zu geringe Änderung der Abweichungsquadrate feststellt, wird die mathematische Anpassung beendet. Ab welchem Änderungswert dies geschieht, wird vorher im Skript angegeben. Durch die Verwendung eines kleineren Änderungswertes sind die beobachteten Abweichungen geringer. Es kommt jedoch zu einer signifikanten Erhöhung der Rechenzeit von 24 Sekunden auf etwa 120 Sekunden, wenn die Standardeinstellung der maximalen Iterationsschritte von 500000 ausgenutzt wird.

Wie zu erwarten war, führt eine Veränderung des *Shift* und/oder der Linienbreite zu erheblich größeren Abweichungen. Eine Erhöhung bzw. Reduktion der Linienbreite um etwa 2% bzw. 4% zeigt vor allem bei der am geringsten konzentrierten Glycoformen absolute Abweichungen von bis zu 5.8%, was einer relativen Abweichung von über 100% entspricht. Aber auch bei

den abundanten Glycoformen zeigen sich absolute Veränderungen von bis zu 3.2% (**Abb. 30**, oben rechts). Im Gegensatz zur Linienbreite treten bei der Variation des *Shift* noch größere Abweichungen auf. Ein *Shift* von +0.02 Da beispielsweise führt zu absoluten Abweichungen von 8.4% bei der abundantesten Glycoform (relativ: 14.5%) und 13.1% bei der Glycoform mit der geringsten Quantität (relativ: 262%). Zusätzlich wurde die Glycoform F3S2 gar nicht angepasst, was hinsichtlich der Bestimmung des Sialylierungsgrades einen erheblichen Einfluss hätte, da es bei realen Daten immerhin 10% eines sehr intensiven Signals sein können. Die verwendeten Variationen des *Shift* entsprechen einer Massengenauigkeit von 0.6 bzw. 1.2 ppm und befinden sich somit im Bereich der Messunsicherheit. Eine visuelle Betrachtung (**Abb. 30**, unten links) der Anpassung zeigt bei der Differenz deutlich Abweichungen von der idealen Gerade. Dennoch ist auch hier die Problematik bei experimentellen Daten nicht zu vernachlässigen. Durch starkes Rauschen oder weitreichende zusätzliche Überlagerungen können starke Abweichungen bei der Differenz eventuell nicht korrekt identifiziert werden. Das Verhältnis der maximalen Amplitude der Differenz zur Intensität des höchsten Isotopensignals kann hierbei als Maß für den Fehler des *Matlab*-Skripts dienen. In diesem Fall liegt der Fehlerbereich laut visueller Betrachtung bei bis zu 5.5%. Die tatsächlich auftretenden Fehler sind aber deutlich größer. Die visuelle Betrachtung unterschätzt demnach den Fehler des *Matlab*-Skripts. Auch die gleichzeitige Variation von *Shift* und Linienbreite, wobei jeweils die geringere Änderung verwendet wurde, bestätigt die diskutierten Beobachtungen und Schlussfolgerungen.

Es lässt sich also sagen, dass Abweichungen des *Shift* und der Linienbreite zu Fehlern bezüglich der Quantifizierung von Glycoformen führen, welche sich zu einem Signal überlagern. Insbesondere die gering konzentrierten Glycoformen können nicht korrekt quantifiziert werden, wenn die Linienbreite oder der *Shift* nicht ausreichend bestimmt wurde. Die Bestimmung dieser Parameter durch visuelle Betrachtung der Anpassung ist bei realen Spektren aufgrund des technischen und chemischen Rauschens sowie der zusätzlichen Überlagerungen durch weitere Proteinspezies sehr schwer. Aus diesem Grund wurde in den folgenden Experimenten eine Signal-basierte Analyse durchgeführt, bei der die Koeffizienten der Glycoformen eines Signals summiert wurden. Durch die Bildung der Summe weist jedes Signal nur einen allgemeinen Koeffizienten auf, sodass der durch die Überlagerung mehrerer Glycoformen hervorgerufene Fehler des Skripts aufgehoben wird - die Summe der Glycoformen unter einem Signal ist konstant.

Obwohl die Untersuchung der Belastbarkeit des *Matlab*-Skripts zeigte, dass es teilweise zu erheblichen Abweichungen bei der Quantifizierung kommt, bedeutet dies nicht, dass die computergestützte Analyse mit *Matlab* uninteressant ist. Es gibt viele unterschiedliche

Möglichkeiten diese Methode der Analyse dennoch einzusetzen. Zum einen bietet sich die oben bereits erläuterte Signal-basierte Analyse an. Diese Analyse lässt sich durch die Verwendung des *Matlab*-Skripts ebenfalls deutlich erleichtern, wobei vor allem die erhebliche Zeitersparnis zu nennen ist. Eine manuelle Analyse der Spektren wäre zwar möglich, aber aufgrund des extremen Aufwands nicht sinnvoll, sodass die computergestützte Analyse hier unerlässlich ist. Zum anderen gibt es verschiedene Möglichkeiten das Skript zu optimieren, sodass die Abweichungen bei der Quantifizierung geringer ausfallen. Hierbei ist vor allem die automatisierte Bestimmung der Parameter zu nennen, bei der das Skript seine Berechnung für verschiedene Parameterkombinationen durchführt und entsprechend der mathematisch bestimmten Abweichung der *least-square*-Anpassung (*resnorm*) den optimalen Parametersatz bestimmt. Des Weiteren könnten die durch Überlagerungen hervorgerufenen Signale der Massenspektren durch mathematische Operationen wie der Dekonvolution, der Fourier-Transformation oder der Betrachtung von Ableitungsfunktionen rechnerisch getrennt werden.

Tab. 13: Ergebnisse einer *Matlab*-Analyse unter Verwendung eines generierten Spektrums und Variation des *Shift* und der Linienbreite. Bei dem generierten Spektrum handelt es sich um ein Signal, das durch gewichtete Überlagerung der hier angegebenen Glycoformen hervorgerufen wird. Es zeigt sich, dass durch eine Veränderung des *Shift* und/oder der Linienbreite erhebliche Abweichungen zum realen Wert auftreten. Diese Abweichungen weisen absolute Werte von bis zu 8.4% bei der abundantesten Glycoform und bis zu 13.1% bei der Glycoform mit der geringsten Quantität auf.

		Glycane			
		F7S0 (58%)	F5S1 (5%)	F3S2 (10%)	F1S3 (27%)
Parameter	unverändert	57.8	5.0	10.0	27.2
	LB + 2.1%	56.3	8.0	8.7	27.0
	LB + 4.2%	54.8	10.8	7.6	26.8
	Shift + 0.01 Da	53.4	12.4	4.2	30.0
	Shift + 0.02 Da	49.6	18.1	0.0	32.3
	LB - 2.1%	59.6	1.8	11.2	27.4
	LB - 4.2%	60.8	0.0	11.0	28.2
	Shift - 0.01 Da	61.5	0.0	13.1	25.4
	Shift - 0.02 Da	63.5	0.0	11.1	25.4
	Shift + 0.01 Da, LB + 2.1%	52.0	15.0	3.4	29.7
	Shift - 0.01 Da, LB + 2.1%	60.7	0.6	14.2	24.4
	Shift + 0.01 Da, LB - 2.1%	54.9	9.6	5.2	30.4
	Shift - 0.01 Da, LB - 2.1%	62.1	0.0	11.2	26.7

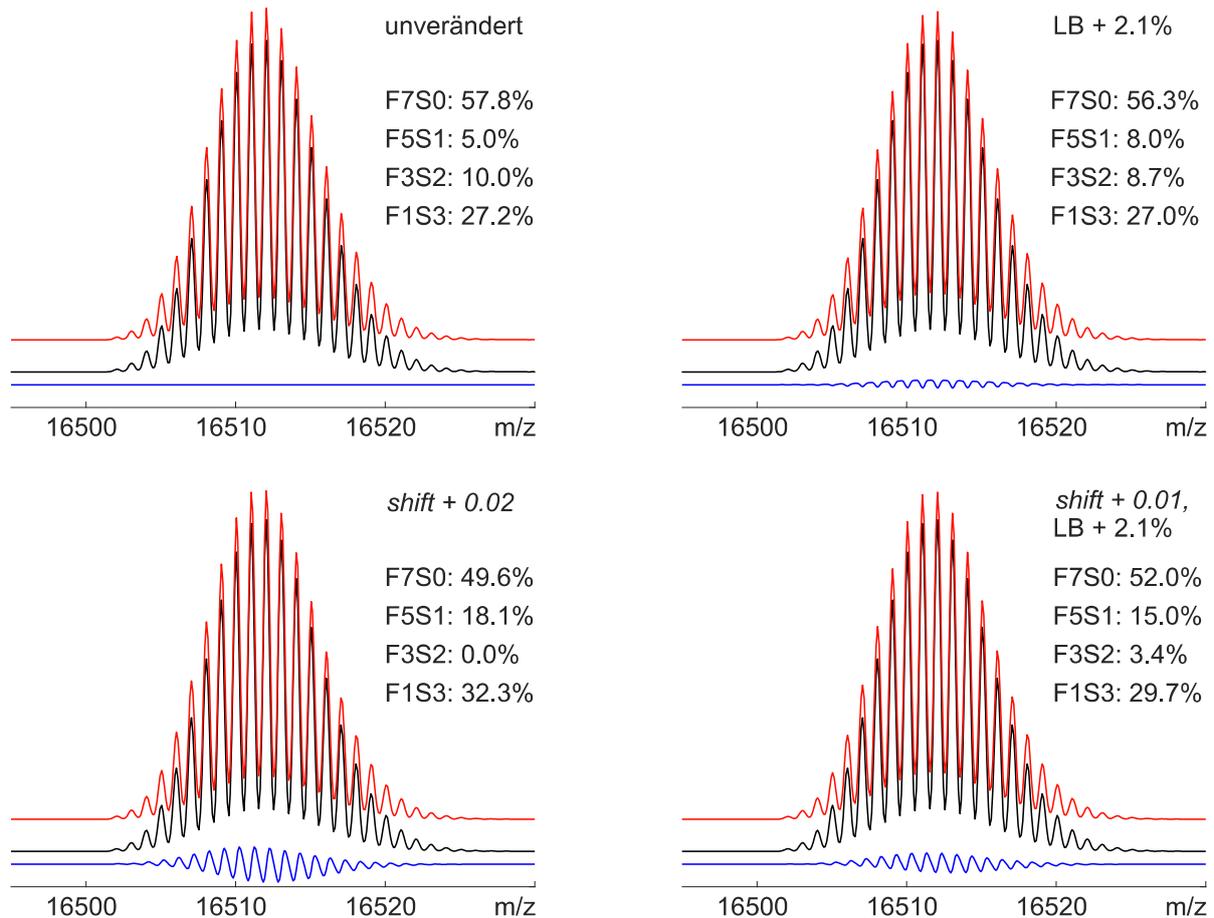


Abb. 30: Mathematische Anpassung eines errechneten theoretischen Spektrums durch das *Matlab*-Skript unter Variation des *Shift* und der *Linienbreite* (Auszug der Ergebnisse). Das *Matlab*-Skript generiert hierbei ein dem errechneten Spektrum (schwarz) durch einen *least-square*-Algorithmus angepasstes Spektrum (rot). Die Differenz ist in Blau gezeigt. Es fällt auf, dass die Anpassungen alle recht gut sind. Erst eine Betrachtung der Differenz zeigt teilweise sehr geringe Abweichungen an, wobei diese im Fall eines realen Spektrums aufgrund des Rauschens und der zusätzlichen Signalüberlagerung durch weitere Proteinspezies eventuell nicht zu identifizieren sind.

4.3.3 Reproduzierbarkeit der Daten

Ein sehr wichtiger Parameter für die Qualität einer analytischen Methode ist die Reproduzierbarkeit. Insbesondere für einen klinischen Einsatz von PIP als Biomarker würde die Reproduzierbarkeit eine sehr wichtige Rolle spielen, da diese bei einer diagnostischen Methode nur geringe Schwankungen unter Berücksichtigung einer einheitlichen Probenbearbeitung aufweisen sollte. Diese Schwankungen könnten im schlimmsten Fall zu falschen Diagnosen führen. Die verwendete Methode müsste also im Rahmen der Messunsicherheit vergleichbare Ergebnisse liefern, wenn die Probenvorbereitung und die Messung auf die gleiche Weise durchgeführt wurden. Um diese Reproduzierbarkeit zu testen, wurden zwei Experimente durchgeführt. Zum einen wurde eine vorbereitete Probe dreimal für eine LC-MS-Messung injiziert. Zum anderen wurde eine Speichelprobe vor der Aufarbeitung in drei Aliquote geteilt, welche dann parallel für die abschließende LC-MS-Messung vorbereitet

wurden. Hierbei wurde dementsprechend die Reproduzierbarkeit der verwendeten massenspektrometrischen Analyse sowie der Einfluss der Probenhandhabung untersucht. In **Abb. 31** ist das Signal m/z 16510 der Messungen gezeigt, bei der die identische Probe dreimal injiziert wurde. Das gesamte Spektrum wurde jeweils auf das intensivste Signal normiert. Es ist zu erkennen, dass insbesondere die Intensitätsverhältnisse zum intensivsten Signal bei den drei Messungen variieren. Es ist an dieser Stelle nicht auszuschließen, dass der MaxEnt-Algorithmus bei der Dekonvolution durch geringe Messungenauigkeiten eine größere Abweichung verursacht. Daher wurden ebenfalls die unprozessierten Massenspektren betrachtet, wobei ebenfalls die entsprechenden Unterschiede festzustellen waren (**Abb. 58** im Anhang). Des Weiteren sollte die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass der unterschiedlich lange Verbleib der Proben im Autosampler einen Einfluss haben kann, wobei ein kontinuierlicher Trend zu erwarten ist, der mit der Chronologie der Probenmessung korreliert. Dieser Trend konnte aber nicht beobachtet werden, sodass der Einfluss bei der Zeitspanne im Autosampler (max. 1-2 Stunden) als vernachlässigbar angesehen wird. Um die beobachteten Unterschiede zwischen den Spektren auch bewerten zu können, wurde eine quantitative Analyse der Spektren mithilfe des *Matlab*-Skriptes durchgeführt. Es soll an dieser Stelle noch einmal betont werden, dass aufgrund der in **Kap. 4.3.2** (siehe letzter Absatz) diskutierten Problematik des Skripts, aufgrund manueller Bestimmung gewisser Parameter zu Ungenauigkeiten bei der Quantifizierung zu führen, alle Koeffizienten unter einem Signal summiert wurden. Die Summe der Koeffizienten für ausgewählte Signale sind in **Abb. 32** (**Tab. 28** im Anhang) vergleichend dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass vor allem bei den intensiven Signalen Abweichungen auftreten. Beispielsweise zeigt die zweite Injektion beim Signal m/z 16510 eine geringere Koeffizientensumme und bei den Signalen m/z 16802 und m/z 16949 eine höhere. Die absoluten Abweichungen weisen Werte bis zu 0.7% auf, was beim intensivsten Signal einer relativen Abweichung von etwa 3.5% entspricht. Dieser relative Fehler muss also bereits von messtechnischer Seite berücksichtigt werden. Dies hat zur Folge, dass eine Variation hinsichtlich der Quantität der Glycoformen beim Vergleich von gesunden und erkrankten Probanden ein bestimmtes Maß aufweisen muss, da sonst ein Unterschied nicht korrekt erkannt werden kann. Wenn nur die messtechnische Abweichung berücksichtigt wird, sollten Unterschiede zwischen den Probanden von 10% durchaus zu bestimmen sein.

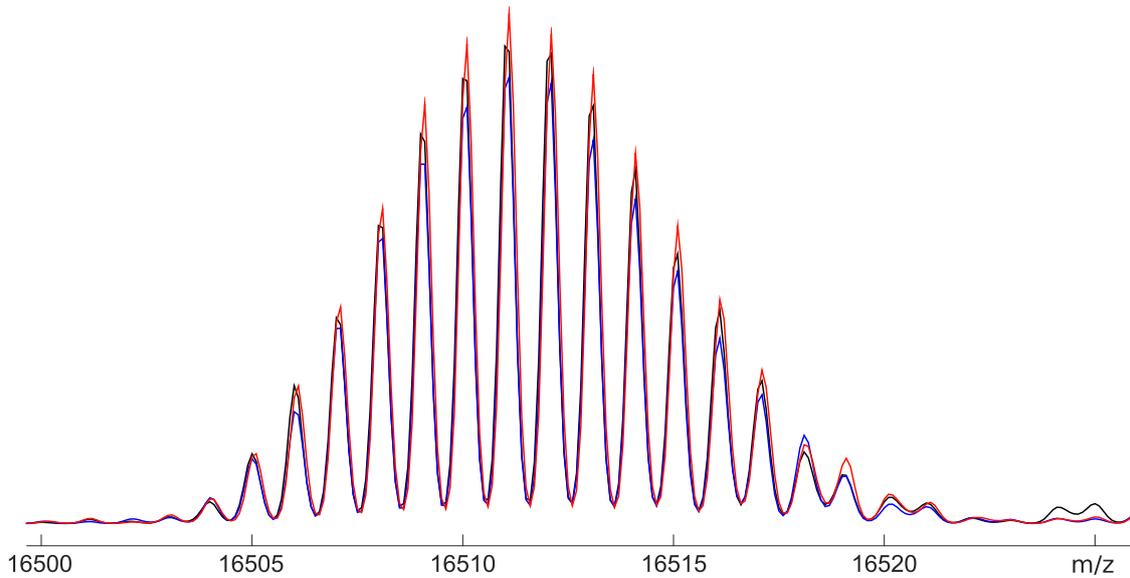


Abb. 31: Vergleich der dekonvolvierten Spektren von drei Messungen einer Probe. Hier ist nur das Signal bei m/z 16510 dargestellt. Die Spektren wurden jeweils auf das intensivste PIP-Signal im Gesamtspektrum normiert. Die Intensitäten der Signale zeigen geringe Unterschiede zueinander, was ebenfalls auf ein jeweils anderes Verhältnis des Signals zum intensivsten Signal hindeutet. Diese Unterschiede würde demnach bei einer computergestützten Quantifizierung zu geringfügig verschiedenen Häufigkeiten der Glycoformen führen.

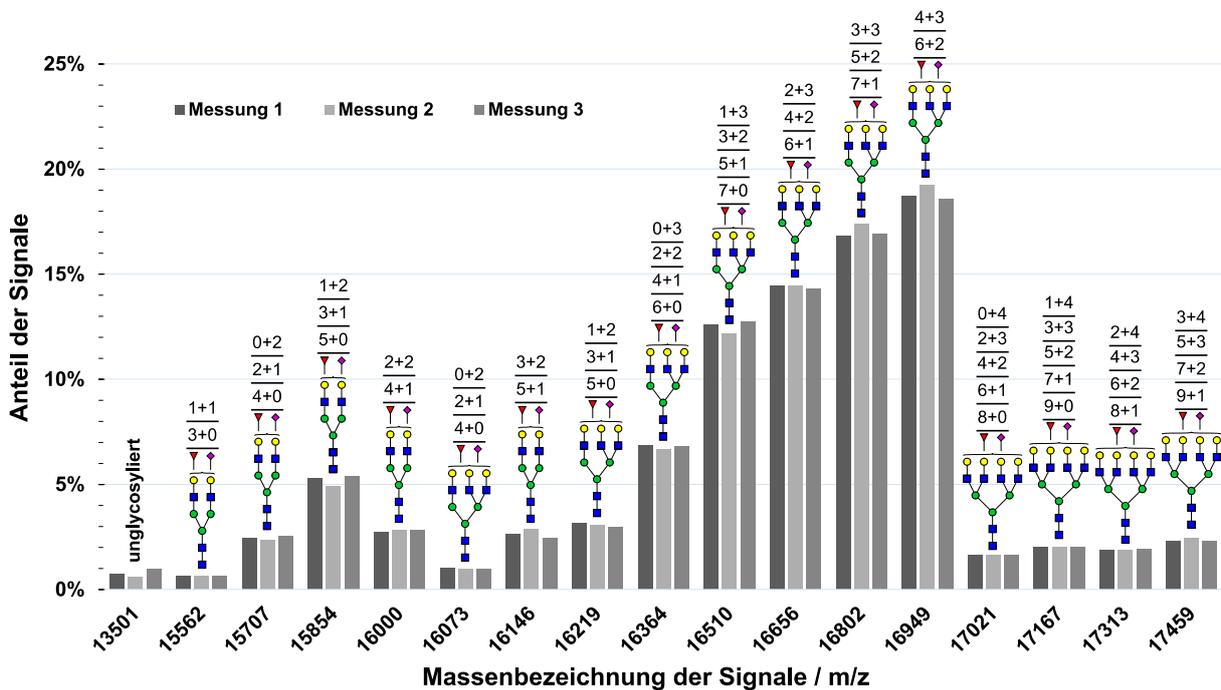


Abb. 32: Vergleich der Koeffizienten der Matlab-Analyse von drei LC-MS-Messungen einer Probe (Werte in Tab. 28 im Anhang). Bei den Koeffizienten handelt es sich um die Summe der Einzelkoeffizienten der unter einem Signal auftretenden Glycoformen. Die Zahlen über den Grundstrukturen der entsprechenden Glycoformen geben die möglichen Kombinationen der Fucose- und Sialinsäureanzahl an. Zwischen den Messungen sind Unterschiede zu erkennen, die absolute Abweichungen voneinander von bis zu 0.7% aufweisen. Für das intensivste Signal ergibt sich somit eine relative Abweichung von 3.5%.

Neben den messtechnischen Abweichungen ist die Frage nach der Ergebnisstabilität durch die Probenhandhabung sehr wichtig. In **Abb. 33** ist das Signal bei m/z 16510 der Messungen gezeigt, bei denen drei parallele Aufarbeitungen der gleichen Speichelprobe injiziert wurden. Aufgrund der parallelen Aufarbeitung können Unterschiede hinsichtlich der Einflüsse wie Umweltparameter (z.B. Temperatur) oder unterschiedliche Zeiten bei einzelnen Schritten nahezu ausgeschlossen werden. Einzig bei der durchgeführten chromatographischen Reinigung mittels HPLC war eine parallele Durchführung nicht möglich, da nur eine Probe zurzeit isoliert werden kann. Es wurde jedoch darauf geachtet, dass die verschiedenen Schritte (z.B. Auftauen der Probe, Injektion, Fraktionierungsdauer) zeitlich möglichst gleich waren. Die nicht verwendeten Proben wurden durchgehend bei -20 °C gelagert. Die potentiellen Abweichungen der Spektren voneinander, die über das Maß der messtechnischen Schwankung hinausgehen, werden also vor allem durch Unterschiede bei der Probenhandhabung verursacht. Es kann davon ausgegangen werden, dass nicht parallele Aufarbeitungen größere Unterschiede zeigen würden. Die Abbildung zeigt, dass vor allem eine Messung deutlich von den anderen beiden abweicht. Wie beim vorherigen Experiment wurde auch hier das gesamte Spektrum auf das intensivste Signal normiert, sodass die Unterschiede auf ein anderes Verhältnis zu diesem Signal hindeuten. Es ist zu erwarten, dass bezüglich der Quantifizierung ebenfalls deutliche Unterschiede auftreten. Die Summe der Koeffizienten für ausgewählte Signale sind in **Abb. 34 (Tab. 29 im Anhang)** vergleichend dargestellt. Es zeigen sich hier starke Abweichungen voneinander, obwohl die Verteilung der Glycoformen aufgrund der identischen Speichelprobe gleich sein müssen. Insbesondere die erste Probe weist beispielsweise bei den Signalen m/z 16656, m/z 16802 und m/z 16949 (ausschließlich sialylierte Strukturen) deutlich höhere und bei den Signalen m/z 16510 und m/z 16364 deutlich niedrigere Koeffizienten auf. Diese Probe zeigt außerdem einen geringeren Gehalt an biantennären Strukturen. Die absoluten Abweichungen weisen Werte bis zu 3% auf, was beim intensivsten Signal einer relativen Abweichung von etwa 16% entspricht. Die Beobachtungen ähneln stark dem in **Kap. 4.3.6** näher erläuterten Glycanabbau, der vor allem zu einer Abspaltung der Sialinsäuren führt. Es ist aber nicht ersichtlich, warum vor allem zwei der Proben von diesem enzymatischen Abbau betroffen sein sollen. Eine mögliche Erklärung wäre eine unzureichende Homogenisierung zu Beginn des Experiments, sodass die Konzentration der Glycosidasen in den Proben variierte.

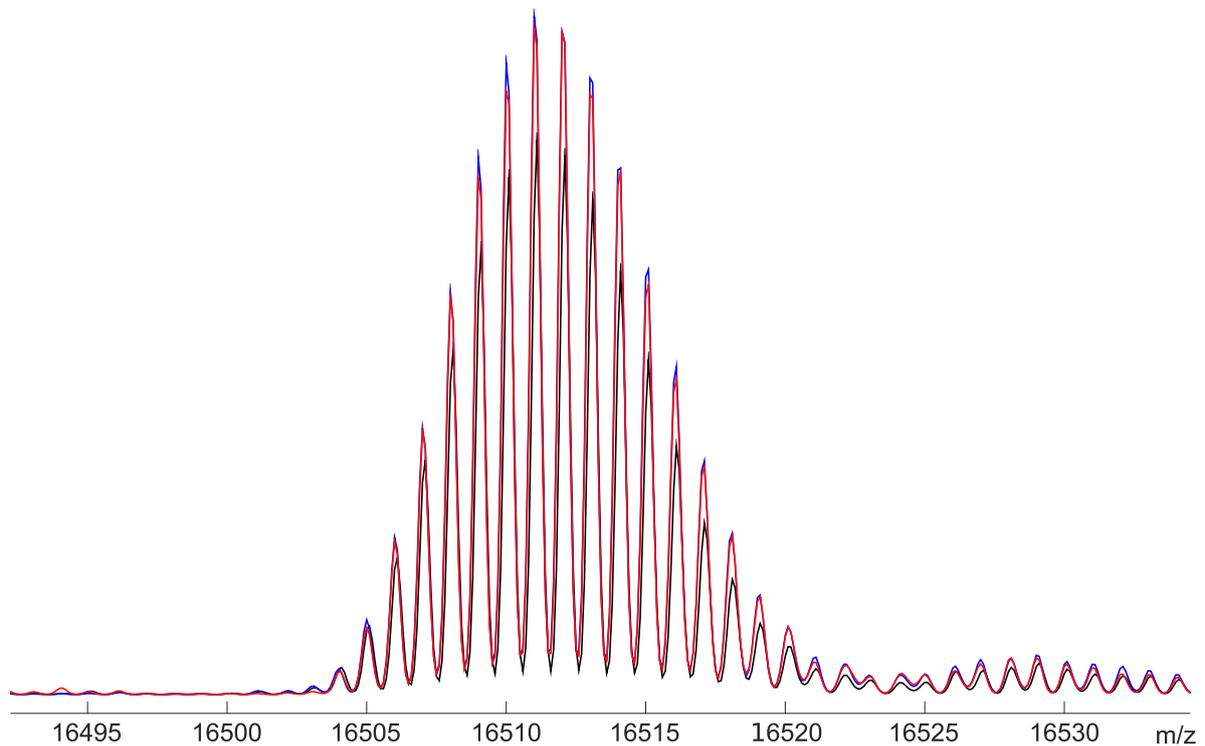


Abb. 33: Vergleich der dekonvolierten Spektren von drei parallel durchgeführten Aufarbeitungen der identischen Speichelprobe. Hier ist nur das Signal bei m/z 16510 dargestellt. Die Spektren wurden jeweils auf das intensivste PIP-Signal im Gesamtspektrum normiert. Im Gegensatz zum vorangegangenen Experiment (vgl. **Abb. 31**) weisen die Spektren hier deutlichere Unterschiede auf. Es kann daher angenommen werden, dass bezüglich der Quantifizierung ebenfalls deutliche Unterschiede auftreten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Reproduzierbarkeit der Analyse von PIP nicht optimal ist. Diese Beobachtung stellt die Notwendigkeit eines sehr genauen Standardprotokolls (SOP: *Standard Operating Procedure*) dar, sodass die Daten nur gering von der Handhabung beeinflusst werden. Je geringer die Abweichungen sind, die durch messtechnische Faktoren oder Faktoren bei der Probenhandhabung hervorgerufen werden, desto geringere Unterschiede hinsichtlich der pathologischen Varianz der Glycoformen können identifiziert werden.

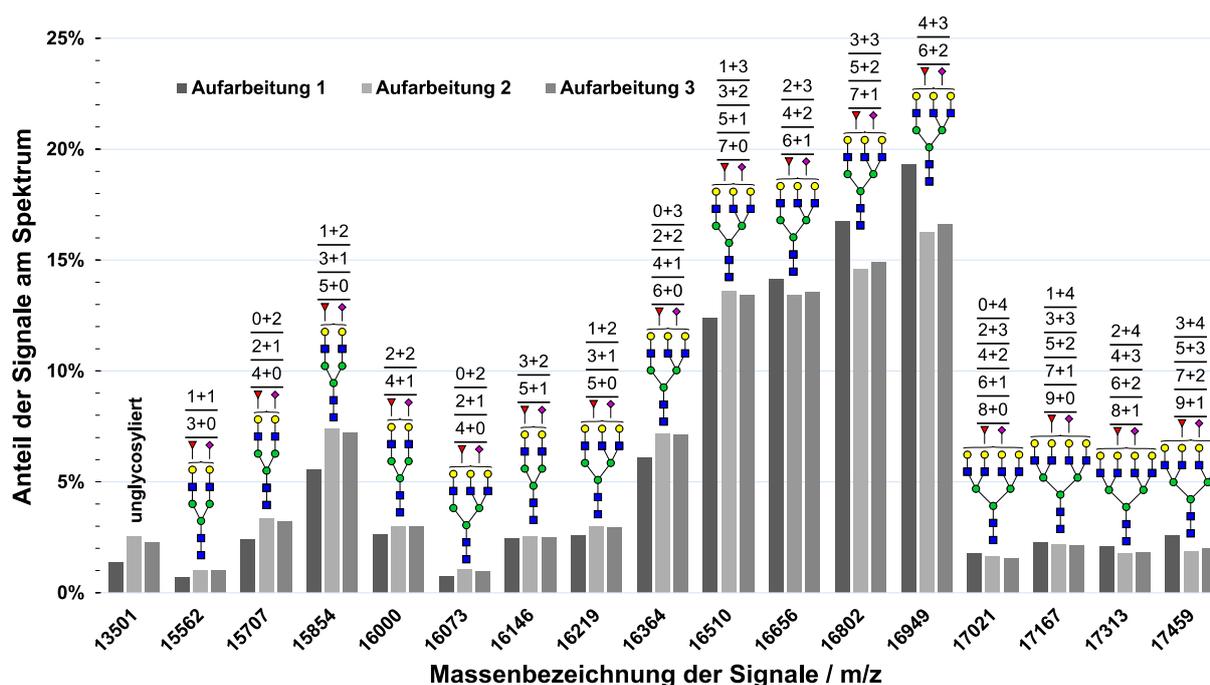


Abb. 34: Vergleich der Koeffizienten der *Matlab*-Analyse von Messungen dreier parallel aufgearbeiteter Ansätze der identischen Speichelprobe (Werte in Tab. 29 im Anhang). Bei den Koeffizienten handelt es sich um die Summe der Einzelkoeffizienten der unter einem Signal auftretenden Glycoformen. Die Zahlen über den Grundstrukturen der entsprechenden Glycoformen geben die möglichen Kombinationen der Fucose- und Sialinsäureanzahl an. Die Häufigkeit der Glycoformen der drei Proben weist starke Unterschiede auf, wobei die absolute Abweichung voneinander bis zu 2.8% beträgt. Dies entspricht beim intensivsten Signal einer relativen Abweichung von etwa 16%.

4.3.4 Einfluss des Zeitpunktes der Probenahme

Neben der Untersuchung der Reproduzierbarkeit hinsichtlich der Probenhandhabung sowie messtechnischer Schwankungen spielt die Stabilität der Glycosylierung eine wichtige Rolle. Die Glycosylierung von PIP eines Probanden sollte im Idealfall nur durch die entsprechende Krankheit beeinflusst werden, für die PIP als Biomarker eingesetzt wird. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass die Glycosylierung von Proteinen aufgrund anderer Faktoren variiert. Insbesondere bei Proteinen aus Speichel stellt sich die Frage, ob die kontinuierliche Speichelproduktion und die damit verbundene stetige Biosynthese der Glycoproteine im Hinblick auf die Glycosylierung eine zeitliche Stabilität ermöglicht. Zur Klärung dieser Frage wurde zunächst die Glycosylierung von PIP innerhalb einer Woche untersucht, wobei die Probenahme an jedem Tag zur gleichen Zeit stattfand. Außerdem wurden alle Proben parallel aufgearbeitet, sodass im Idealfall nur die in **Kap. 4.3.3** besprochenen relativen Abweichungen zu erwarten sind. In **Abb. 35 (Tab. 30 im Anhang)** ist die computergestützte Quantifizierung einiger Glycoformen gezeigt. Es soll an dieser Stelle erneut betont werden, dass aufgrund der in **Kap. 4.3.2** (siehe letzter Absatz) diskutierten Problematik des Skripts, aufgrund manueller Bestimmung gewisser Parameter zu Ungenauigkeiten bei der Quantifizierung zu führen, alle

Koeffizienten unter einem Signal summiert wurden. Bereits eine erste Betrachtung zeigt, dass bei bestimmten Signalen eine sehr hohe Streuung auftritt. Insbesondere die Probe vom Dienstag weicht im Bereich der triantennären Glycane stark von den anderen Proben ab. Während sie beispielsweise bei den Signalen m/z 16802 und m/z 16949 (ausschließlich sialylierte Strukturen) eine deutlich geringere Quantität aufweist, zeigen die Signale wie m/z 16219 oder m/z 16364 erhöhte Intensitäten. Eine mögliche Erklärung hierfür ist der im vorangegangenen Kapitel bereits angesprochene und in **Kap. 4.3.6** näher untersuchte Glycanabbau, da diese Probe nach der Entnahme im Gegensatz zu den anderen Proben nicht direkt eingefroren, sondern für mehrere Stunden bei 4 °C gelagert wurde. Es könnte daher zu enzymatische Abbauprozessen gekommen sein. Im vorangegangenen Kapitel wurde der Einfluss eines längeren Verbleibs im Autosampler (Temperatur: 4 °C) als vernachlässigbar diskutiert. An dieser Stelle muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Dienstags-Probe eine deutlich längere Zeitspanne (>10 Stunden) bei dieser Temperatur gelagert wurde und dass hier noch keine aufgearbeitete Probe betrachtet wird. Es ist anzunehmen, dass durch die Reinigung die Konzentration potentieller Glycosidasen erheblich reduziert wird. Neben der Probe vom Dienstag zeigen auch andere Proben Abweichungen. Hier sind beispielsweise die signifikante Reduktion der Montags-Probe bei nahezu allen Signalen der Biantennen oder die erhöhte Quantität der Donnerstags-Probe beim vollständig unglycosylierten PIP (m/z 13501) zu nennen. Die relativen Abweichungen vom Mittelwert (ohne Dienstags-Probe) betragen bei den intensivsten Signalen bis zu 20%. In **Abb. 36 (Tab. 30** im Anhang) sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Koeffizienten der Messungen gezeigt, wobei die Dienstags-Probe für die Berechnung ausgeschlossen wurde. Hier sind die bereits angesprochenen teilweise starken Schwankungen gut zu erkennen. Es fällt dennoch auf, dass bestimmte Signale geringe Abweichungen zwischen den Proben besitzen. Bei diesen Signalen handelt es sich vor allem um die leichteren tri- und tetraantennären Strukturen. Als Erklärung hierfür kann der hohe Fucosylierungs- und Sialylierungsgrad von PIP herangezogen werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass die beobachteten Abweichungen vor allem durch einen unterschiedlichen Gehalt an Fucosen und Sialinsäuren hervorgerufen wird, ist sehr hoch. Da die leichteren Strukturen aber einen geringeren Gehalt dieser beiden Monosaccharide aufweisen, sind mögliche Variationen unwahrscheinlicher, sodass die Streuung signifikant abnimmt.

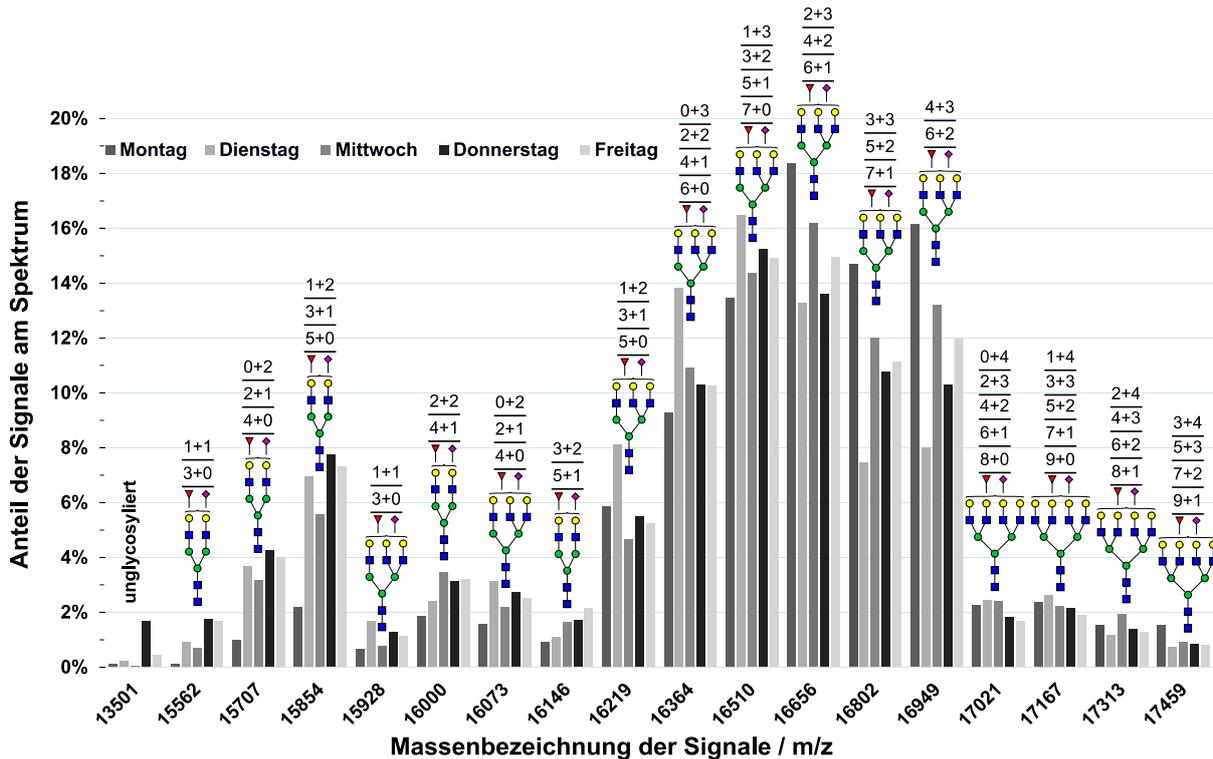


Abb. 35: Vergleich der Glycosylierung von PIP innerhalb eines Wochenzyklus (Werte in Tab. 30 im Anhang). Bei den Koeffizienten handelt es sich um die Summe der Einzelkoeffizienten der unter einem Signal auftretenden Glycoformen. Die Zahlen über den Grundstrukturen der entsprechenden Glycoformen geben die möglichen Kombinationen der Fucose- und Sialinsäureanzahl an. Es ist zu erkennen, dass bei vielen Signalen eine starke Streuung auftritt. Hier ist vor allem die Dienstags-Probe zu nennen, welche einen geringeren Anteil sialylierter Strukturen (z.B. m/z 16802 oder m/z 16949) und einen höheren Anteil der kleineren Triantennen aufweist. Eine mögliche Erklärung ist eine unzureichende Kühlung bei dieser Probe und ein damit begünstigter enzymatischer Glycanabbau (vgl. Kap. 4.3.6). Es treten aber auch bei anderen Proben deutliche Abweichungen zum Rest auf, was auf eine geringe Stabilität der Glycosylierung innerhalb einer Woche hindeutet.

Auch ohne jede Abweichung einzeln zu analysieren und zu bewerten, lässt sich also eine Schwankung der Quantität der Glycoformen beobachten, welche nicht nur durch messtechnische Einflüsse oder Unterschiede in der Handhabung zu erklären sind. Die Glycosylierung im Allgemeinen scheint demnach innerhalb einer Woche keine große Stabilität aufzuweisen. Die Quantität der Glycoformen variiert also stark. Dies war zu erwarten, da die Glycosylierung von den verschiedensten externen und internen Faktoren beeinflusst werden kann. Da die identifizierten Schwankungen keinem erkennbaren Trend folgen, kann davon ausgegangen werden, dass jeder Mensch andere Variationen innerhalb einer Woche hat. Wie oben bereits erwähnt, scheinen einige Signale nur sehr geringe Schwankungen aufzuweisen. Sollte sich diese Beobachtung auch bei nachfolgenden Experimenten mit einer größeren Probenanzahl bestätigen, könnte der Einsatz als Biomarker basierend auf den entsprechenden Glycoformen sinnvoll sein. Letztendlich gilt für den Einsatz als Biomarker, dass die experimentelle Varianz der Glycoformen, welche sich aus verschiedenen Faktoren wie messtechnische Abweichungen oder Variationen bei der Probenhandhabung ergibt,

geringer sein muss als die pathologische Varianz, die durch die Krankheit verursacht wird. Je geringer die experimentelle Varianz ist, desto geringere pathologische Varianzen können identifiziert werden.

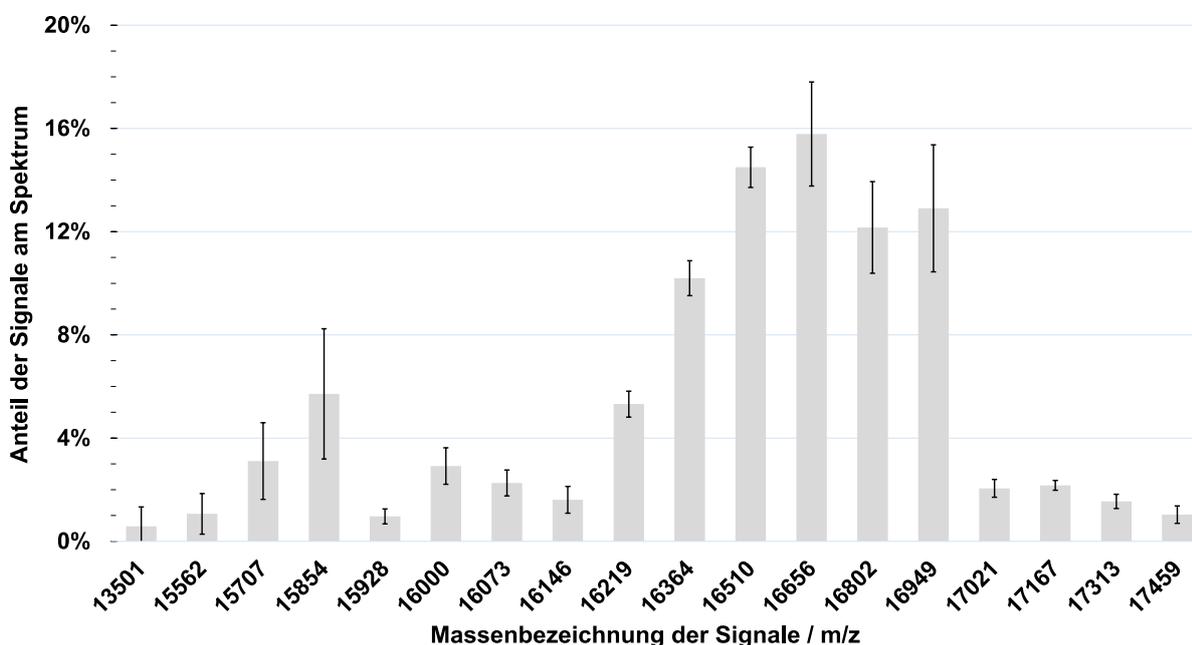


Abb. 36: Mittelwert und Standardabweichung der Koeffizienten des 5-Tage-Versuches. Bei der Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung wurde die Dienstags-Probe aufgrund der unterbrochenen Kühlkette nicht berücksichtigt. Die bereits in **Abb. 35** beobachteten, teilweise starken Schwankungen werden durch die Standardabweichung mathematisch bestätigt. Beim intensivsten Signalen tritt beispielsweise eine relative Standardabweichung von etwa 13% auf. Es fällt jedoch auch auf, dass einige Signale nur geringe Abweichungen zwischen den Proben aufweisen. Hier sind die leichteren tri- und tetraantennäre Strukturen zu nennen. Aufgrund der geringeren Anzahl terminaler Fucosen und/oder Sialinsäuren sind die möglichen Variationen eingeschränkt.

Neben der Frage, wie stabil sich die Glycosylierung innerhalb einer Woche verhält, ist der Einfluss des Zeitpunktes der Probenahme an einem Tag von großem Interesse, da die Möglichkeit der Variation der Glycoform während der Tages besteht. Im Laufe des Tages variiert die Speichelproduktion stark. Insbesondere bei der Nahrungsaufnahme kommt es zu einer erheblichen Erhöhung des Speichelflusses. Unter der Annahme, dass die Konzentration von PIP im Speichel konstant ist, muss auch die Biosynthese der Glycosylierung von PIP zunehmen. Es ist möglich, dass diese Zunahme zu unterschiedlichen Glycosylierungsmustern führt, da die zeitliche Limitierung der Biosynthese eventuell geringer fucosylierte und sialylierte Strukturen hervorruft. Zur Untersuchung dieses Einflusses wurde von einem Probanden an drei Zeitpunkten desselben Tages jeweils eine Probe abgegeben. Um andere Faktoren für die Häufigkeitsschwankungen von Glycoformen zu minimieren, wurden die Proben erneut parallel aufgearbeitet. In **Abb. 37** (**Tab. 31** im Anhang) ist die computergestützte Quantifizierung einiger Glycoformen gezeigt, wobei die Koeffizienten sich überlagernder Glycoformen summiert wurden. Es ist zu erkennen, dass nahezu alle Signale stetig in ihrer Intensität zu-

oder abnehmen. Während die Glycoformen mit höherem m/z -Verhältnissen in ihrer Quantität geringer werden, ist bei den leichteren Glycoformen ein entgegengesetzter Trend zu beobachten. Im Laufe des Tages scheint sich demnach die Biosynthese der Glycane zu verändern. Hierbei sind vor allem sialylierte Strukturen betroffen, wie die deutliche Abnahme der Intensitäten der Signale bei m/z 16656, m/z 16802 und m/z 16949 zeigt. Diese Signale können nur durch Strukturen mit einer oder mehr Sialinsäuren erklärt werden. Um diese Beobachtung genauer zu analysieren, wurden die Koeffizienten der Glycoformen mit einheitlichem Sialylierungsgrad und mit gleicher Antennenanzahl summiert. Hier wird also nicht die Koeffizientensumme der Glycoformen eines Signals gebildet. Diese Werte sind aufgrund der in **Kap. 4.3.2** angesprochenen Problematik des Skripts, aufgrund manueller Bestimmung gewisser Parameter zu Ungenauigkeiten bei der Quantifizierung zu führen, kritisch zu betrachten. Es wird hierfür angenommen, dass bei der Betrachtung des gesamten Spektrums und der Summierung von Glycoformen bestimmter struktureller Ähnlichkeit trotzdem eine Tendenz erhalten werden kann. Dennoch sollten für diese Art der Betrachtung möglichst große Veränderungen vorliegen. Die entsprechenden Werte sind in **Tab. 14** dargestellt. Demnach scheint der Sialylierungsgrad von PIP im Tagesverlauf abzunehmen. Während die bi-, tri- und tetrasialylierten Glycane in ihrer Quantität abnehmen, steigt der Anteil der unsialylierten Strukturen um 84% an. Des Weiteren fällt auf, dass der Anteil der biantennären Strukturen insbesondere von morgens bis mittags deutlich ansteigt. Bei den Glycoformen mit variierender Antennenanzahl kommt es ab mittags im weiteren Verlauf zu keinen großen Änderungen. Im Laufe des Tages scheint es also zunächst zu einer Abnahme der Antennenanzahl und des Sialylierungsgrades zu kommen, wobei mit fortlaufender Zeit die Antennenanzahl einen konstanten Wert annimmt. An dieser Stelle sollte darauf hingewiesen werden, dass die getätigten Vermutungen nicht nur durch die kritische, mathematische Betrachtung, sondern auch durch die Analyse der Koeffizientensummen (Summe der Koeffizienten aller Glycoformen eines Signals) gestützt werden. Ob die zeitliche Veränderung der Glycosylierung eine biologische Funktion hat oder ob es aufgrund der erhöhten Speichelproduktion im Tagesverlauf zu einer zeitlichen Limitierung der Biosynthese kommt, ist nicht ersichtlich.

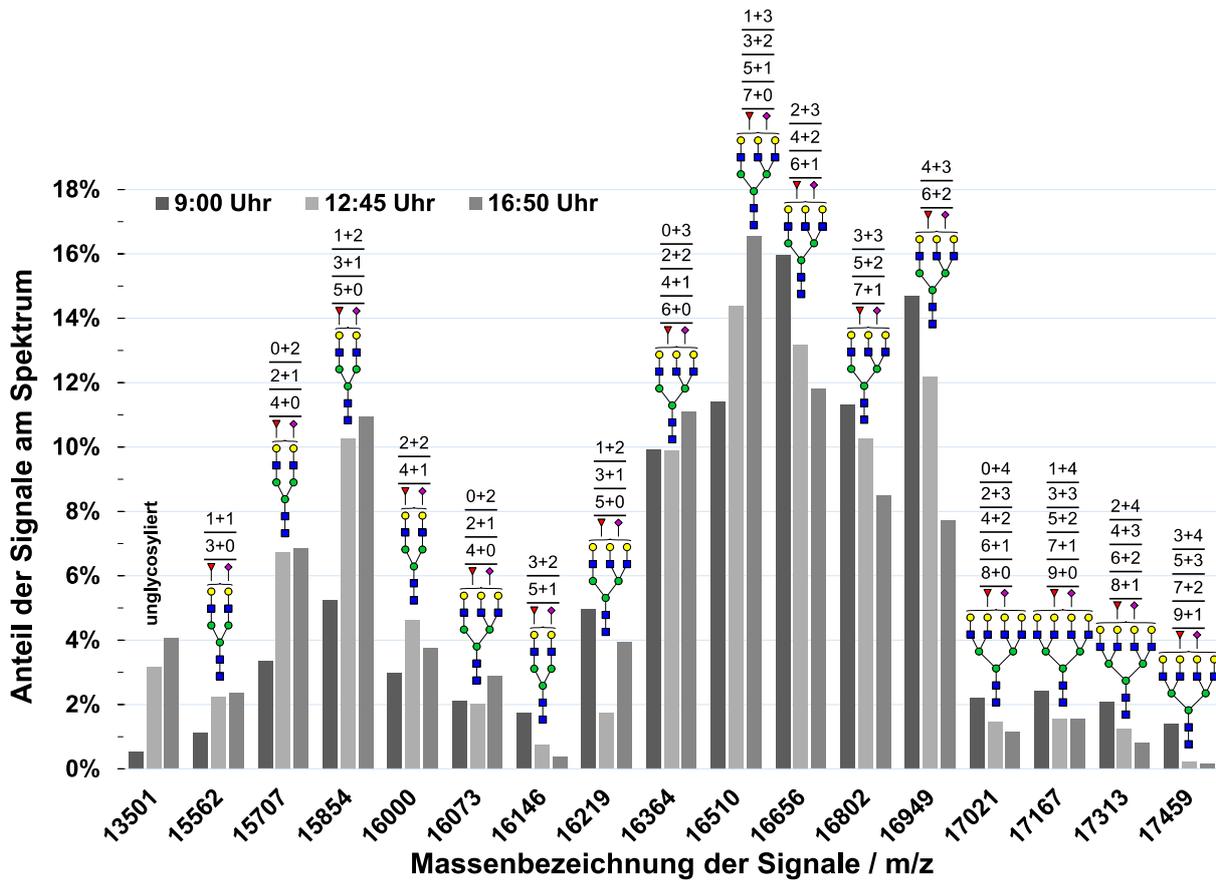


Abb. 37: Einfluss des Zeitpunktes (am selben Tag) der Probenahme auf die Glycosylierung von PIP (Werte in Tab. 31 im Anhang). Bei den Koeffizienten handelt es sich um die Summe der Einzelkoeffizienten der unter einem Signal auftretenden Glycoformen. Die Zahlen über den Grundstrukturen der entsprechenden Glycoformen geben die möglichen Kombinationen der Fucose- und Sialinsäureanzahl an. Es ist zu erkennen, dass nahezu alle Signale stetig in ihrer Intensität zu- oder abnehmen. Hierbei nimmt der Anteil der Glycoformen mit höheren m/z -Verhältnissen ab und der mit niedrigeren zu. Diese zeitliche Veränderung der Biosynthese ist vor allem bei sialylierten Strukturen zu beobachten, was beispielsweise an der Intensitätsabnahme der Signale m/z 16656, m/z 16802 und m/z 16949 festzumachen ist.

Tab. 14: Summe der Koeffizienten von Glycoformen mit gleichem Sialylierungsgrad oder gleicher Antennenanzahl. Es ist deutlich eine Reduktion des Sialylierungsgrades zu erkennen. Während der Anteil der bi-, tri- und tetrasialylierten Strukturen abnimmt, steigt die Quantität der unsialylierten Glycane erheblich an. Des Weiteren fällt auf, dass insbesondere in der Zeit von morgens bis mittags eine Zunahme des Anteils der Biantennen und eine Abnahme des Anteils der Tri- und Tetraantennen auftritt.

	9:00 Uhr	12:45 Uhr	16:50 Uhr
Biantennen	16.0%	27.5%	27.6%
Triantennen	73.3%	67.3%	67.9%
Tetraantennen	10.7%	5.1%	4.6%
Glycoformen S0	17.6%	28.5%	32.4%
Glycoformen S1	28.1%	28.4%	30.3%
Glycoformen S2	14.0%	5.0%	5.7%
Glycoformen S3	36.9%	29.6%	22.3%
Glycoformen S4	1.9%	0%	0%

Die oben gestellte Frage nach der zeitlichen Limitierung der Biosynthese von Glycoformen ist für die Probenahme von großem Interesse. Bei der Speichelentnahme kommt es bei einem Großteil der Probanden vermutlich zu einer induzierten Speichelproduktion, da der Speichel regelmäßig und schnell hintereinander aus dem Mund entfernt wird.

4.3.5 Einfluss der Speichelproduktion auf die Glycosylierung

Um den Einfluss der quasi erzwungenen Speichelproduktion bei der Probenahme auf die Glycosylierung zu untersuchen, wurden von einem Probanden drei Speichelproben mit einem Abstand von nur jeweils zehn Minuten entnommen. Bereits bei der Speichelgabe fiel auf, dass die Zeit, die der Proband für 10 mL Speichel benötigte, von 20 Minuten auf 25 Minuten und schließlich auf 30 Minuten anstieg. Die Probenentnahme erfolgte demnach vermutlich schneller als die normale Speichelproduktion liefern kann. Ebenso wie bei den vorangegangenen Experimenten wurde eine parallele Aufarbeitung durchgeführt. In **Abb. 38** (**Tab. 32** im Anhang) ist die computergestützte Quantifizierung einiger Glycoformen gezeigt, wobei die Koeffizienten sich überlagernder Glycoformen summiert wurden. Es ist zu erkennen, dass einige Signale eine stetige Zu- oder Abnahme der Intensität aufweisen. Hier sind beispielsweise die Signale m/z 16073 und m/z 16219 oder m/z 16510 und m/z 16802 zu nennen. Erneut scheint der Sialylierungsgrad geringer zu werden. Aufgrund der deutlich geringeren Veränderungen beim Vergleich mit dem vorher diskutierten Experiment wurde auf eine genaue *Matlab*-basierte Analyse verzichtet. An dieser Stelle ist es schwer zu beurteilen, ob die beobachtete Veränderung durch die erzwungene Speichelgabe oder durch die

fortschreitende Zeit hervorgerufen wird. Da jedoch der Einfluss der Zeit, wie oben gezeigt wurde, definitiv eine Rolle spielt, liegt die Vermutung nahe, dass die erzwungene Speichelgabe der geringere Faktor ist.

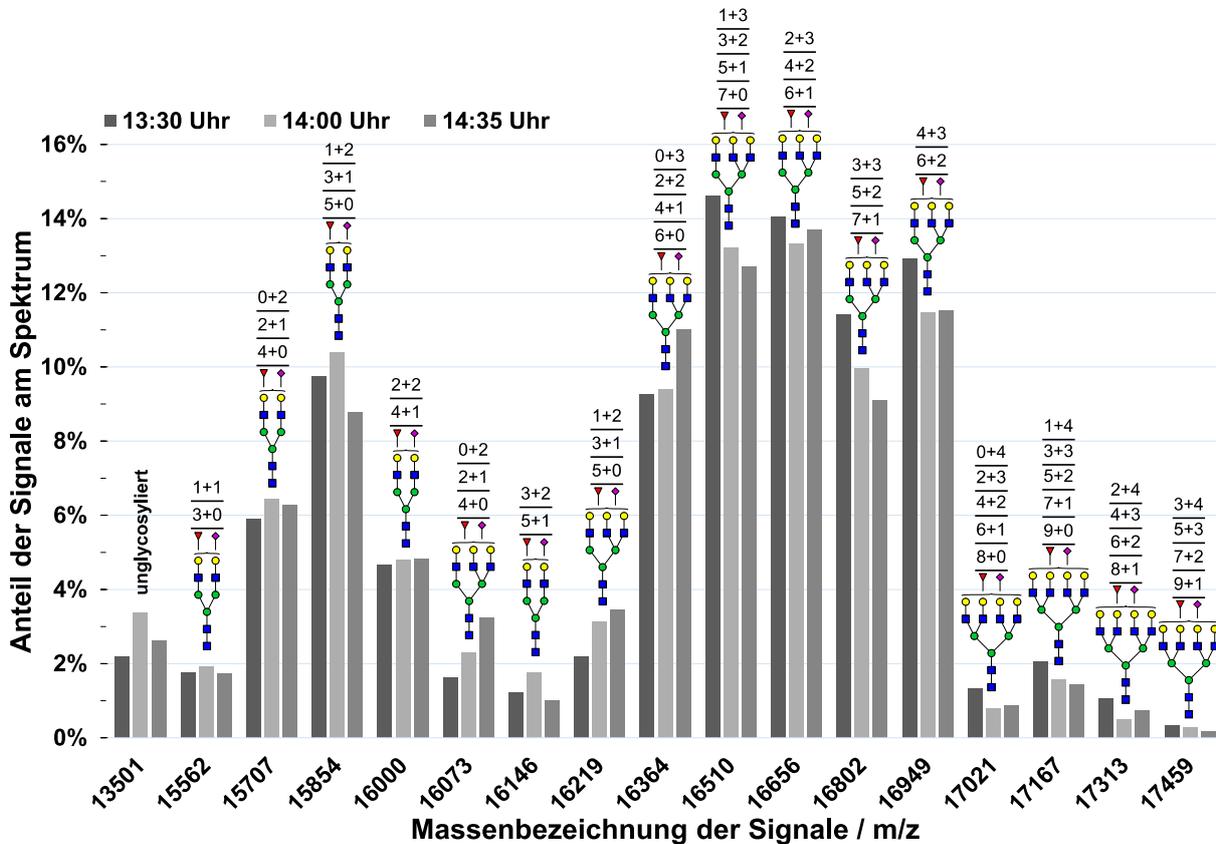


Abb. 38: Einfluss der erhöhten Speichelproduktion während der Probenahme auf die Glycosylierung von PIP (Werte in Tab. 32 im Anhang). Bei den Koeffizienten handelt es sich um die Summe der Einzelkoeffizienten der unter einem Signal auftretenden Glycoformen. Die Zahlen über den Grundstrukturen der entsprechenden Glycoformen geben die möglichen Kombinationen der Fucose- und Sialinsäureanzahl an. Es ist zu erkennen, dass einige Signale eine stetige Zu- oder Abnahme der Intensität aufweisen. Als Beispiel sind die Signale bei m/z 16219 oder m/z 16802 zu nennen. Da vor allem die Signale bei höheren m/z -Verhältnissen eine Reduktion der Intensität erfahren, kann auf einen geringeren Sialylierungsgrad geschlossen werden. Es ist jedoch schwer zu beurteilen, ob diese Veränderung durch die erzwungene Speichelgabe oder den zeitlichen Fortschritt hervorgerufen wird.

Die in den letzten beiden Kapiteln diskutierten Beobachtungen könnten für einen Einsatz von PIP als Biomarker problematisch sein, da sie einen statistischen Vergleich der Glycosylierung allein auf Grundlage der Erkrankung erschweren. Für eine erfolgreiche Anwendung müssen also andere Parameter wie beispielsweise der Zeitpunkt der Probenahme berücksichtigt werden. Erneut wird hiermit die Notwendigkeit einer sehr genauen SOP hervorgehoben. In dieser muss demnach ein exakter Zeitpunkt für die Probenahme genannt werden, wobei auch andere Faktoren wie zum Beispiel die Nüchternheit bei der Entnahme berücksichtigt werden sollten. An dieser Stelle sollte aber betont werden, dass dies nicht bedeutet, dass die untersuchte Methode für PIP als Biomarker nicht einsetzbar sei. Es gibt lediglich einige Punkte,

bei denen durchaus Optimierungsbedarf besteht. Die bisher während dieser Arbeit beobachteten Abweichungen und Faktoren, die eine exakte Quantifizierung erschweren, führen dazu, dass derzeit mit der untersuchten Methode nur eine hohe pathologische Varianz identifiziert werden kann.

4.3.6 Einfluss der Probenlagerung auf die Glycosylierung

Die in den vorangegangenen Kapiteln besprochenen Experimente befassten sich alle mit der praktischen Arbeit an der Speichelprobe oder dem bereits isolierten Protein. Hierbei wurden vor allem die Probenahme und die Reproduzierbarkeit bezüglich der Aufarbeitung betrachtet. Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Analyse von biologischen Materialien ist die Probenlagerung. Die Körperflüssigkeiten, aus denen die potentiellen Biomarker isoliert werden, sind hoch komplex und weisen zum Beispiel eine Vielzahl unterschiedlicher Enzyme auf. Speichel ist unter anderem dafür bekannt, Amylasen zu beinhalten, welche für die Spaltung verschiedener Polysaccharide der Nahrung zuständig sind. Es tritt aber auch eine Vielzahl anderer Glycosidasen auf. Hier sind unter anderem *N*-Acetylhexosaminidasen, Mannosidasen, Galactosidasen, Sialidasen und Fucosidasen zu nennen.^[129] Es stellt sich demnach die Frage, wie stabil die Glycosylierung von PIP unter diesen Bedingungen ist und welche Maßnahmen eventuell nötig bzw. möglich sind, um etwaige Abbauprozesse zu unterbinden.

Bei der Untersuchung von PIP-Proben verschiedener Probanden (**Abb. 59** im Anhang) fiel auf, dass ein Spektrum deutliche Unterschiede zeigte. Dieses ist in **Abb. 39** dargestellt. Das Spektrum weist Signale bei sehr geringen *m/z*-Verhältnissen ($m/z < 15300$) auf. Durch eine genaue Analyse der einzelnen Signale konnte festgestellt werden, dass es sich bei den geringen Massen um trunkierte Glycane handelt. Als Vergleich wurde ein PIP-Spektrum eines anderen Probanden herangezogen. Es fällt auf, dass beim Vergleichsspektrum die angesprochenen Signale bei zum Beispiel *m/z* 15051 nicht vorhanden sind. Hierbei handelt es sich um monoantennäre Glycane, deren Vorkommen durch eine normale Biosynthese eher unwahrscheinlich ist. Diese Glycane können dann beispielsweise durch einen schrittweisen Verlust einer Fucose (*m/z* 14906), einer Galactose (*m/z* 14744) und einem GlcNAc zur fucosylierten *core*-Struktur (*m/z* 14539) abgebaut werden. Es zeigen sich aber auch im höheren *m/z*-Bereich Unterschiede. Die Signale bei *m/z* 16656, *m/z* 16802 und *m/z* 16949 treten ebenfalls bei dem abweichenden Spektrum nicht auf. Diese Signale werden durch triantennäre Strukturen mit einem variierenden Gehalt an Sialinsäuren und Fucosen hervorgerufen, wobei jedes Glycan aufgrund der maximalen Besetzung der Fucosylierungsstellen mindestens eine Sialinsäure tragen muss. Auch hier ist der schrittweise Verlust von Sialinsäuren oder Fucosen die wahrscheinlichste Erklärung. Bei der

angesprochenen Probe ist also ein schrittweiser Abbau der Glycosylierung zu beobachten. Hierbei sind insbesondere die intensiven Signale bei m/z 13704 und m/z 13850 zu nennen, welche durch das PIP mit der proximalen GlcNAc-Einheit oder GlcNAcFuc-Einheit hervorgerufen werden. Der beobachtete Abbau führt demnach zu einer nahezu vollständigen Deglycosylierung. Bei der ebenfalls auftretenden unglycosylierten Variante von PIP ist jedoch unklar, ob diese ebenfalls durch Abbauprozesse entstanden ist oder ob sie nur natürlich auftritt. Da das unglycosylierte PIP auch in dem Vergleichsspektrum in geringem Maße zu sehen ist, wobei die Zwischenabbauprodukte nicht auftreten, kann davon ausgegangen werden, dass PIP im Speichel nicht zu 100% glycosyliert vorliegt. Aufgrund der Gleichmäßigkeit des beobachteten Abbaus wird eine enzymatische Abspaltung der jeweiligen Monosaccharide angenommen, wobei die entsprechenden Glycosidasen exo-Aktivitäten zeigen. Als Ausnahme hiervon ist die Spaltung des *core* zu nennen, welche durch den Abstand von m/z 14539 zu m/z 13850 ersichtlich wird. Hier konnten keine Signale zwischen diesen beiden Massen identifiziert werden, die durch trunke Varianten der *core*-Struktur erklärt werden können. Nach dem Abbau der Glycosylierung bis zum *core* findet anschließend eine endo-Spaltung zwischen den beiden proximalen Hexosaminen statt. Als Grund für diesen weitreichenden Glycanabbau konnte nach gründlicher Überprüfung der Probenvorgeschichte eine Unterbrechung der Kühlkette ermittelt werden. Die Glycosylierung von PIP scheint demnach stark von der Temperatur bei der Probenlagerung abhängig zu sein. Diese Temperaturabhängigkeit ist für viele Schritte der PIP-Analyse von großem Interesse, sodass das Maß der Kühlung sowie die Notwendigkeit der Einhaltung der Kühlkette untersucht werden muss. An dieser Stelle sollte außerdem auf die Möglichkeit der Enzyminhibition hingewiesen werden. In **Kap. 4.3.6.2** wurden erste Experimente zur Inhibition des Glycanabbaus gemacht. Es besteht zusätzlich die Möglichkeit, verschiedene spezifische Inhibitoren für die entsprechenden Glycosidasen zu erwerben und jeder Speichelprobe direkt zuzugeben. Als Beispiel kann das Siastatin B für Sialidasen genannt werden. Im Bereich der Proteomik ist dieses Vorgehen eine Standardmethode, sodass viele Proteaseinhibitor-Cocktails existieren. Es zeigt sich jedoch, dass Inhibitoren für Glycosidasen weniger verbreitet sind. Selbst große Konzerne wie die Fa. Merck bieten die entsprechenden Inhibitoren nur einzeln an, wobei die Kosten hierbei nicht unerheblich sind.^[130] Dennoch ist die Etablierung eines Glycosidaseinhibitor-Cocktails sehr vielversprechend, da die direkte Zugabe dieses Cocktails in Verbindung mit einem Proteaseinhibitor-Cocktails bei der Probenahme viele aufwendige Folgeschritte minimieren würde. Um die Notwendigkeit einer möglichen Enzyminhibition zu verifizieren, werden im Folgenden die Ergebnisse von Experimenten diskutiert, bei denen jeweils die identische Speichelprobe homogenisiert, geteilt und unterschiedlich lange bei verschiedenen Temperaturen inkubiert wurde.

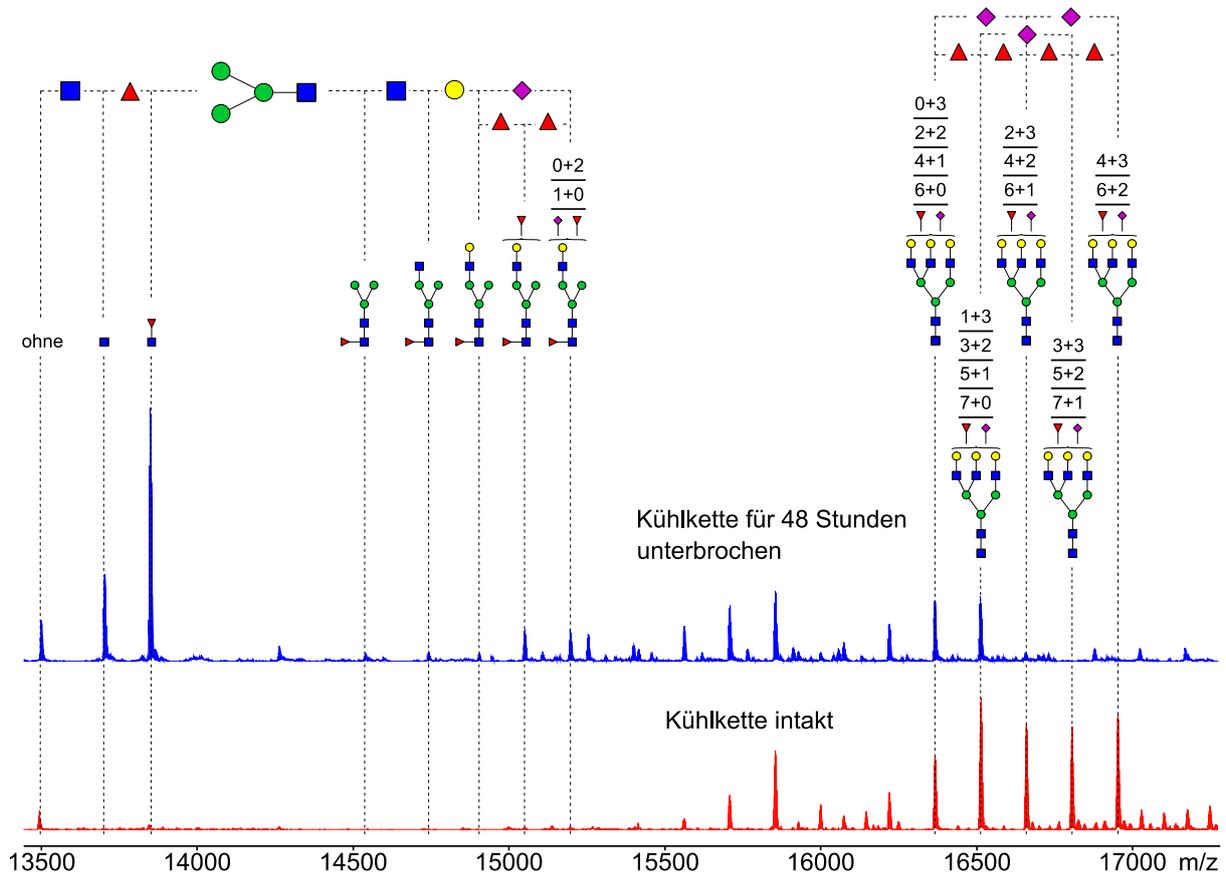


Abb. 39: Einfluss einer unzureichenden Kühlung auf die Glycosylierung von PIP. Bei der Lagerung der oben gezeigten Probe wurde die Kühlkette für etwa 48 Stunden unterbrochen. Im Spektrum sind im Gegensatz zu den anderen untersuchten Proben (Vergleichsspektrum ist von einem anderen Probanden) viele Signale bei sehr geringen m/z -Verhältnissen ($m/z < 15300$) zu beobachten. Diese Signale können durch einen schrittweisen, nahezu vollständigen Abbau der Glycosylierung von PIP erklärt werden, wobei insbesondere die Signale m/z 13704 und m/z 13850, welche durch die Glycoformen PIP+GlcNAc und PIP+GlcNAc-Fuc hervorgerufen werden, zu nennen sind. Aufgrund der Gleichmäßigkeit des Abbaus wird eine enzymatische Spaltung der jeweils terminalen Monosaccharide angenommen. Die einzige Ausnahme hiervon bildet die endo-Spaltung des *core*, bei der zwischen den beiden proximalen Hexosaminen gespalten wird. Aufgrund der Übersichtlichkeit wurden nicht alle möglichen Abbauprozesse dargestellt.

Da es aufwendig ist, die Proben nach der Entnahme direkt einzufrieren, wurde zunächst ein Transport auf Eis vorgesehen. Um diesen Prozess zu simulieren, betrug eine der Inkubationstemperaturen 4 °C. Eine Probe diente hierbei als Kontrolle und wurde direkt eingefroren (-80 °C). Die restlichen Proben inkubierten für 1, 9 und 23 Stunden bei 4 °C. Anschließend wurde eine parallele Aufarbeitung durchgeführt. In **Abb. 40** sind die dekonvolvierten Spektren der Proben dargestellt. Es zeigt sich, dass die Signale der sialylierten Strukturen (z.B. m/z 16656, m/z 16802 und m/z 16949) mit steigender Inkubationszeit stetig abnehmen. Die Rate der Abnahme scheint aber mit der Zeit zu sinken, sodass die größte Reduktion der Signalintensität in der ersten Stunde zu beobachten ist. Es kommt demnach zu einem Abbau der Sialinsäuren, der sich mit der Zeit deutlich verlangsamt. Unter der Annahme, dass die Enzyme größtenteils eine exo-Aktivität aufweisen, könnten ebenfalls Abspaltungen

der terminalen Fucosen zur Abnahme der eben angesprochenen Signale führen. Im Rahmen der Analyse der Abbauprozesse zeigte sich jedoch, dass Signale, welche sowohl durch sialylierte als auch durch nicht sialylierte Strukturen hervorgerufen werden (z.B. m/z 16510), mit zunehmender Inkubationszeit fast vollständig durch die nicht sialylierten Strukturen erklärt werden können (*Matlab*-Analyse, **Tab. 33** im Anhang). Da zu diesem Zeitpunkt nur noch eine Glycoform angepasst wird und keine Überlagerungen auftreten, ist der Fehler des *Matlab*-Skripts als gering anzusehen. Dieses Ergebnis zeigt, dass der Abbau der Fucosylierung eine deutlich geringere Geschwindigkeit aufweist, sodass im Folgenden angenommen wird, dass vor allem die Desialylierung zur anfänglichen Intensitätsabnahme führt. Neben der Desialylierung ist außerdem ein steigendes Verhältnis der Biantennen zu den Triantennen zu sehen, was ebenfalls auf Abbauprozesse hindeutet. Auch hier tritt die größte Veränderung innerhalb der ersten Stunde auf. Als Grund für die Verlangsamung des Glycanabbaus ist die Zeit zu nennen, die die Probe benötigt, um sich der äußeren Temperatur anzugleichen. Mit zunehmender Abkühlung der Probe verlangsamt sich also erwartungsgemäß auch die Abbaugeschwindigkeit.

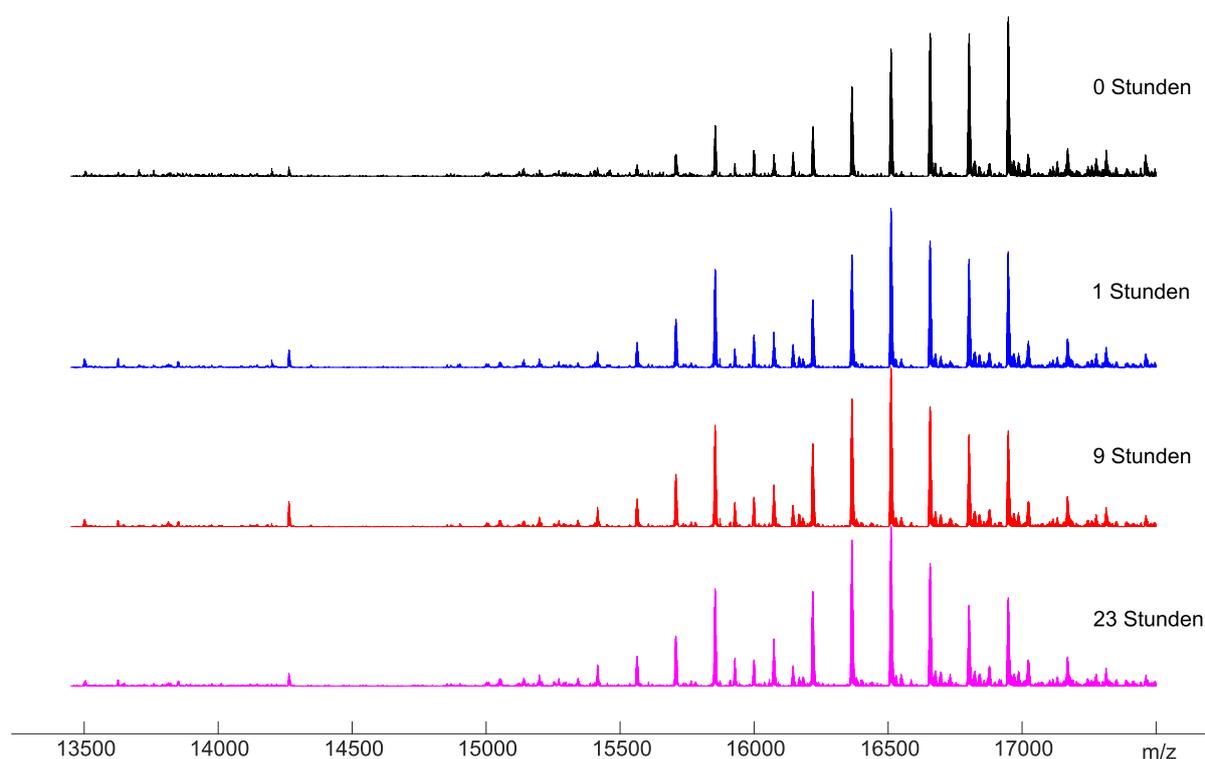


Abb. 40: Vergleich der dekonvolvierten Massenspektren nach der Inkubation bei 4 °C für 0, 1, 9 und 23 Stunden. Die Spektren wurden jeweils auf das intensivste Signal normiert. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Signale, welche ausschließlich durch sialylierte Strukturen erklärt werden können, mit steigender Inkubationszeit abnehmen. Hier sind unter anderem die Signale m/z 16656, m/z 16802 und m/z 16949 zu nennen. Des Weiteren fällt eine Reduktion des Verhältnisses von Biantennen zu Triantennen auf. Beide Beobachtungen deuten auf enzymatische Abbauprozesse hin, wobei die größte Änderung jeweils in der ersten Stunde auftritt. Diese Abnahme der Abbaugeschwindigkeit lässt sich durch die lange Zeit, in der sich die zunächst körperwarmer Probe der äußeren Temperatur angleicht, erklären.

Unter der Annahme, dass der Sialyierungsgrad sinkt, sollte bei Signalen, die durch Überlagerungen von sialylierten und unsialylierten Strukturen hervorgerufen werden, eine Verschiebung des Maximums zu höheren m/z -Verhältnissen zu beobachten sein. Da jedoch bei einer Inkubationstemperatur von 4 °C keine quantitative Desialylierung auftritt, ist keine große Verschiebung zu erwarten. In **Abb. 41** ist das Signal bei m/z 16510 nach einer Inkubationszeit von 0 und 23 Stunden dargestellt. Die theoretische Verschiebung des Maximums durch partielle Abbauprozesse konnte hiermit bestätigt werden. Es zeigt sich eine geringe Verschiebung des Signals um etwa 1 Da zu höheren m/z -Verhältnissen, was als weiterer Beleg für die Desialylierung gedeutet werden kann.

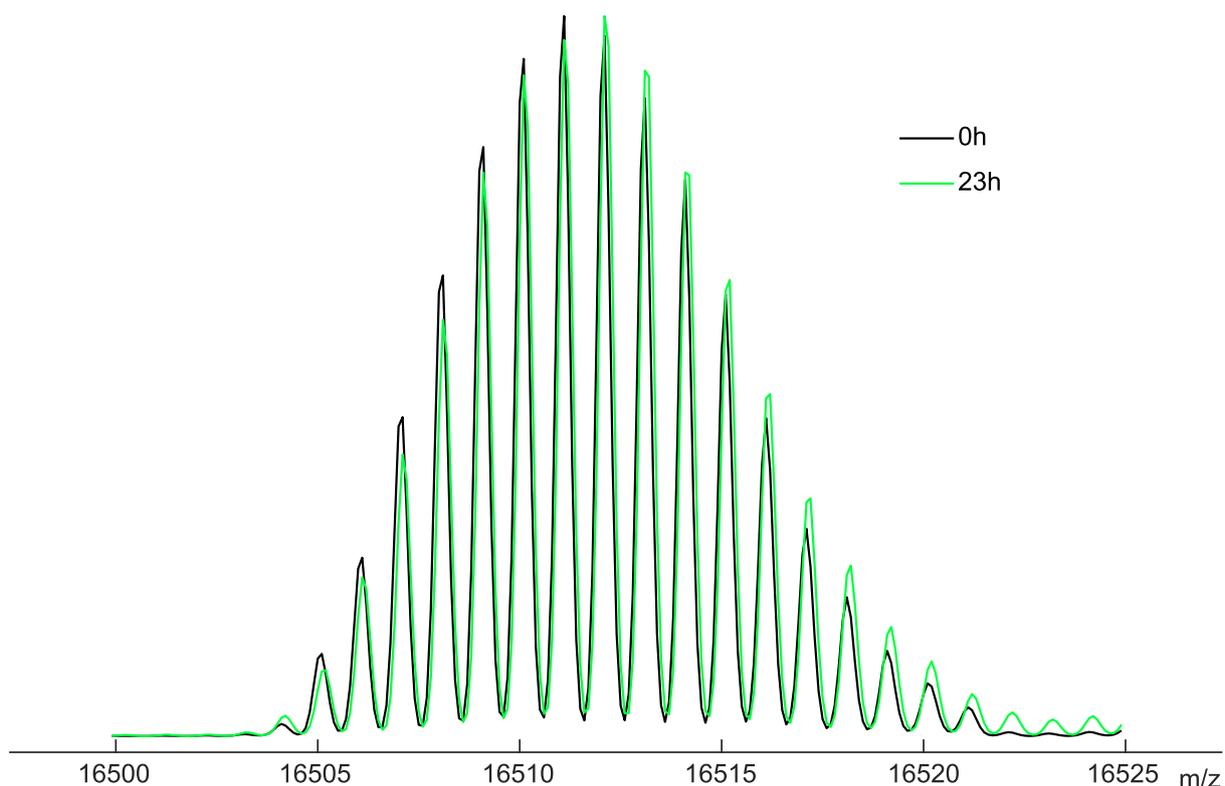


Abb. 41: Vergleich eines Signals der Massenspektren von intaktem PIP bei einer Inkubationsdauer von 0 und 23 Stunden bei 4 °C. Die Signale wurden jeweils auf den intensivsten Isotopenpeak normiert. Wie aufgrund der Annahme einer partiellen Desialylierung zu erwarten ist, zeigt sich mit steigender Inkubationszeit eine Verschiebung des Maximums zu höheren m/z -Verhältnissen. Da die Abspaltung der Sialinsäuren bei einer Temperatur von 4 °C und einer Zeit von 23 Stunden nicht quantitativ abgelaufen ist, fällt die Verschiebung mit etwa 1 Da gering aus.

Um das Maß der enzymatischen Abbauprozesse einschätzen zu können, wurden die einzelnen Spektren mithilfe des *Matlab*-Skripts analysiert, wobei die Koeffizienten aufgrund der Abweichungen des Skripts bei Überlagerungen mehrerer Glycoformen summiert wurden. Die Koeffizientensummen der jeweiligen Signale sind für alle vier Inkubationszeiten in **Abb. 42** (**Tab. 34** im Anhang) vergleichend dargestellt. Auch die mathematische Betrachtung bestätigt die Abnahme der Abbaugeschwindigkeit. Während beispielsweise das Signal bei m/z 16949

nach einer Stunde bereits um 4.4% (absolut) gesunken ist, tritt in den nächsten 22 Stunden nur noch eine Reduktion um 2.5% auf, was durchaus im Bereich der Varianz durch die Probenhandhabung (siehe **Kap. 4.3.3**) liegt. An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass bei der Betrachtung aller nachfolgenden Balkendiagramme die zunehmende Zeitdifferenz zwischen den benachbarten Balken berücksichtigt werden muss. Neben dem Beweis der stetigen Geschwindigkeitsabnahme kann außerdem die Zunahme von Signalen mit geringeren m/z -Verhältnissen beobachtet werden. Diese Zunahme tritt nicht nur bei der Gesamtheit der biantennären Strukturen auf, sondern ist auch innerhalb der Triantennen zu sehen. Durch den partiellen Abbau der Sialinsäure kommt es beispielsweise zu einer Abnahme der Konzentration von hochsialylierten, schweren Glycanen und zur gleichzeitigen Bildung leichter Glycoformen. Diese immer wieder diskutierten und im Folgenden noch öfter auftretenden Desialylierungsprozesse deuten auf eine geringe Stabilität terminaler Sialinsäuren in humanem Speichel hin. Um eine genauere Beschreibung der Desialylierung in Abhängigkeit der unterschiedlichen Temperaturen zu ermöglichen, wurden wie bereits in **Kap. 4.3.4** die Koeffizienten der Strukturen mit gleichem Sialinsäuregehalt summiert. Anschließend wurde die Summe der gewichteten Sialylierungsgrade errechnet, was als durchschnittlicher Sialylierungsgrad pro PIP-Molekül angenommen werden kann. Die entsprechenden Daten sind in **Abb. 43** gezeigt. Der Sialylierungsgrad zeigt demnach eine relative Abnahme um 35% nach 23 Stunden. Aufgrund der terminalen Position der Sialinsäuren und der exo-Aktivität der Glycosidasen kann davon ausgegangen werden, dass die Desialylierung den Großteil der beobachteten Abbauprozesse ausmacht. Dennoch zeigt der ebenfalls deutliche Anstieg der Anteile der Biantennen, dass auch eine Abspaltung der anderen Zuckerbausteine auftritt, wobei dieser Abbau ebenfalls unter den gegebenen Bedingungen nicht vollständig abläuft. Dies lässt sich an den Signalen m/z 13705 (PIP+GlcNAc) und m/z 13851 (PIP+GlcNAcFuc) erkennen, welche keinen Anstieg erfahren.

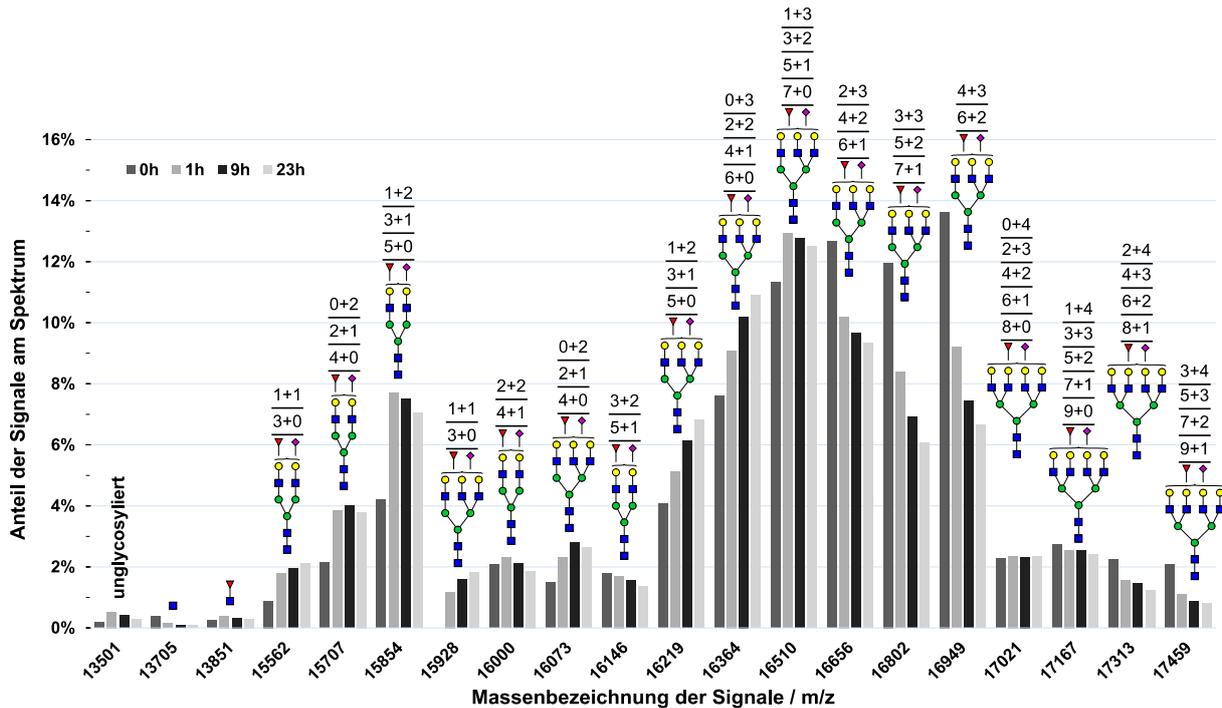


Abb. 42: Einfluss der Probenlagerung (insbesondere der Einhaltung der Kühlkette) auf die Glycosylierung von PIP (Inkubationstemperatur: 4 °C; Werte in Tab. 34 im Anhang). Bei den Koeffizienten handelt es sich um die Summe der Einzelkoeffizienten der unter einem Signal auftretenden Glycoformen. Die Zahlen über den Grundstrukturen der entsprechenden Glycoformen geben die möglichen Kombinationen der Fucose- und Sialinsäureanzahl an. Neben der Bestätigung des allgemeinen Abbauprozesses, der an der Abnahme der sialylierten Strukturen (z.B. *m/z* 16802) und der Zunahme des Verhältnisses von Bi- zu Triantennen zu erkennen ist, konnte auch die Reduktion der Abbaugeschwindigkeit bestätigt werden. Während beispielsweise das Signal bei *m/z* 16949 nach einer Stunde bereits um 4.4% (absolut) gesunken ist, tritt in den nächsten 22 Stunden nur noch eine Reduktion um 2.5% auf.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass bereits die Probennahme und Lagerung ein Problem darstellt, da eine einfache Eiskühlung nicht ausreichend ist, um die Abbauprozesse vollständig zu stoppen. Hierbei zeigte sich, dass vor allem eine schnelle Abkühlung notwendig ist. Wenn die Probe eine Temperatur von 4 °C aufweist, ist die Abspaltungsrate gering. Dennoch ist auch von einer längeren Lagerung (>30 min) bei 4 °C abzuraten und es sollte schnellstmöglich ein gefrorener Zustand der Probe hergestellt werden. Des Weiteren stellen die oben besprochenen Möglichkeiten der Enzyminhibition eine vielversprechende Alternative dar.

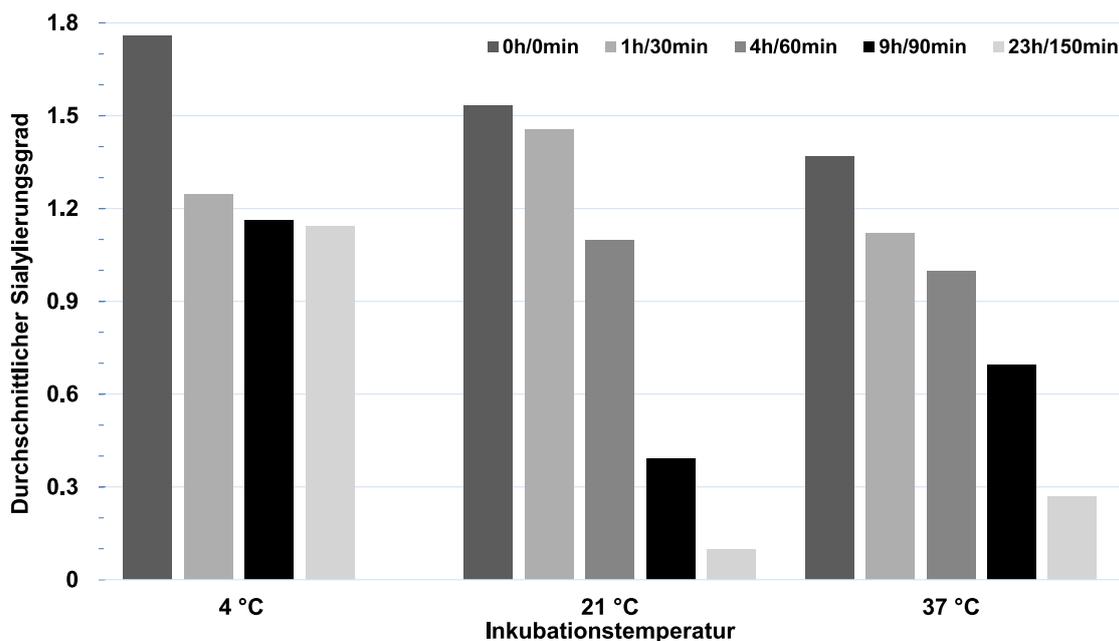


Abb. 43: Durchschnittlicher Sialyierungsgrad pro PIP-Molekül bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen und Zeiten. Es handelt es sich um die Summe der gewichteten Sialyierungsgrade. Es ist bei allen Temperaturen eine deutliche Reduktion des Sialyierungsgrades von PIP zu erkennen, wobei die relative Abnahme bei 4 °C etwa 35% beträgt, bei 21 °C bereits nach 9 Stunden etwa 75% und bei 37 °C nach 2.5 Stunden etwa 80%.

Neben dem Transport der Probe ist die Probenvorbereitung ein weiterer wichtiger Schritt für die Analyse der Glycosylierung von PIP. Es sollte daher mit einem zweiten Experiment bei einer Inkubationstemperatur von 21 °C die Notwendigkeit einer durchgehenden Kühlung (z.B. Handhabung in einem Kühlraum) eingeschätzt werden. Erneut diene eine Probe als Negativkontrolle und wurde direkt eingefroren. Die restlichen Proben inkubierten für 1, 4, 9 und 23 Stunden. Analog zum bereits diskutierten Experiment sind in **Abb. 44** die dekonvolvierten Spektren dargestellt und in **Abb. 45 (Tab. 35 im Anhang)** die Daten der mathematischen Analyse mithilfe des *Matlab*-Skripts gezeigt. Bei der Betrachtung der Spektren fällt umgehend das hohe Maß der Abbauprozesse auf. Während bei einer Temperatur von 4 °C nach 23 Stunden noch ein deutliches PIP-Spektrum mit allen Signalen zu erkennen ist, treten bei Raumtemperatur im Spektrum nach 23 Stunden nur zwei Signale mit nennenswerten Intensitäten auf. Hierbei handelt es sich um PIP mit dem proximalen GlcNAc (m/z 13705) oder mit dem proximalen GlcNAcFuc (m/z 13851). Es findet bei Raumtemperatur also eine nahezu vollständige Deglycosylierung statt, was eine deutlich höhere Abbaugeschwindigkeit voraussetzt. Wie zu erwarten war, zeigen die Spektren zunächst eine deutliche Desialylierung. Hier dient erneut das Signal bei m/z 16949 als Beispiel. Dieses sinkt stetig in seiner Intensität, bis es nach etwa 9 Stunden kaum noch vorhanden ist. Interessanterweise fällt die Reduktion nach einer Stunde (absolut: 1.1%) bei 21 °C deutlich geringer aus als bei einer Inkubationstemperatur von 4 °C. Nach 4 Stunden hingegen ist das Signal unter den bei 4 °C

geringsten Wert gesunken. Diese Beobachtung deutet ebenfalls darauf hin, dass beim vorangegangenen Experiment zu Beginn eine Equilibrierung der Temperatur in der Probe stattfindet, da die Enzymaktivität bei 4 °C sicherlich nicht höher als bei Raumtemperatur ausfällt. Warum die anfängliche Reduktion bei den beiden Experimenten so unterschiedliche ausfällt, ist schwer zu beurteilen und hängt von vielen Faktoren wie beispielsweise der Regelmäßigkeit der manuellen Durchmischung, der Enzymkonzentration im Speichel als auch von eventuellen Fehlern bei der Probenhandhabung ab. Außerdem muss an dieser Stelle auf die in **Kap. 4.3.3** besprochene Varianz hingedeutet werden, welche bereits durch die Probenhandhabung entsteht. Der errechnete durchschnittliche Sialyierungsgrad pro PIP-Molekül ist in **Abb. 43** gezeigt. Bereits nach 9 Stunden beträgt die relative Abnahme des Sialyierungsgrades etwa 75% und nach 23 Stunden kann unter Beachtung des Fehlerbereiches des verwendeten Skripts von einer vollständigen Desialylierung gesprochen werden. Neben der Desialylierung ist ebenfalls die Abspaltung anderer Monosaccharide erkennbar, da erneut ein Anstieg des Verhältnisses von Bi- zu Triantennen zu beobachten ist. Nach etwa 9 Stunden ist außerdem ein deutlicher Anstieg trunkierter Glycoformen wie beispielsweise das Signal bei m/z 15051 zu sehen, welches durch PIP mit dem Glycan $H_4N_3F_2$ erklärt werden kann.

Aufgrund des starken Glycanabbaus zeigen die beiden Signale von PIP+GlcNAc und PIP+GlcNAcFuc einen signifikanten Intensitätszuwachs. Dies konnte bei dem Signal m/z 13501 nicht beobachtet werden. Hierbei handelt es sich um das vollständig deglycosylierte PIP, sodass angenommen werden kann, dass keine enzymatische Abspaltung des proximalen GlcNAc auftritt. Es scheint demnach keine Glycosidase in humanem Speichel zu existieren, welche als Amidase fungieren kann.

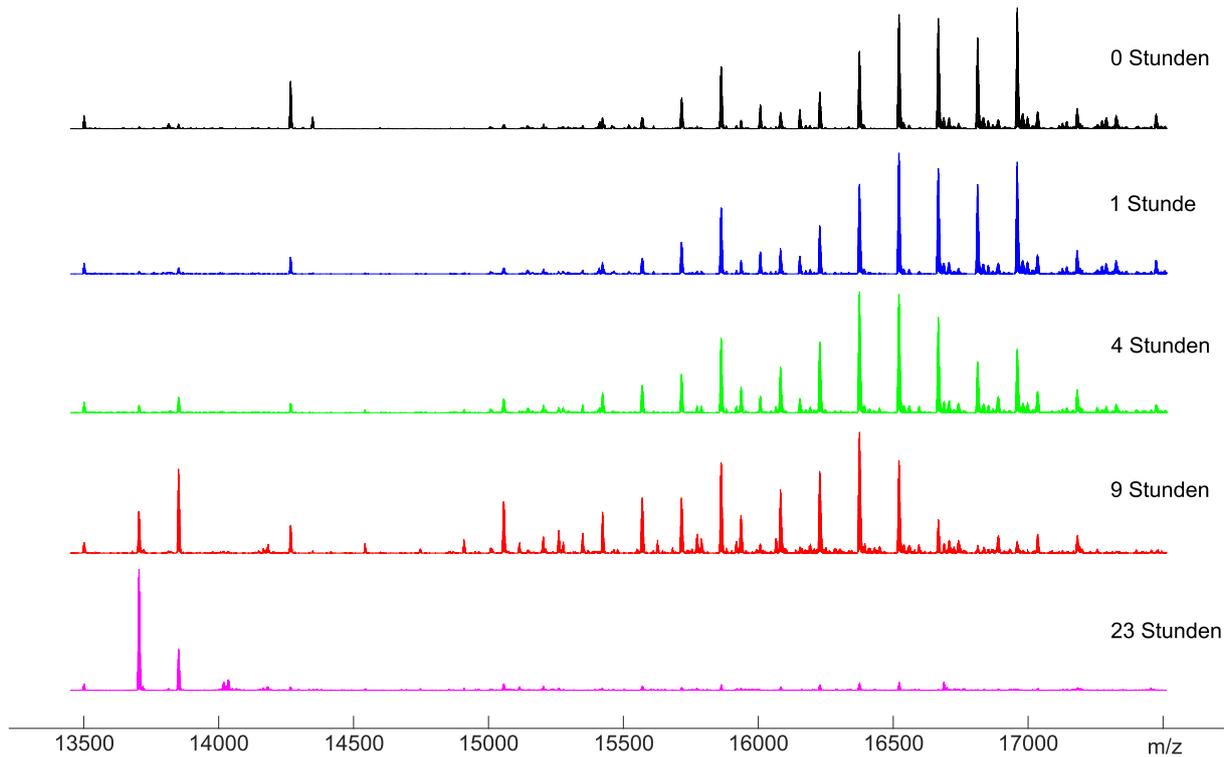


Abb. 44: Vergleich der Massenspektren nach der Inkubation bei 21 °C für 0, 1, 4, 9 und 23 Stunden. Die Spektren wurden jeweils auf das intensivste Signal normiert. Wie zu erwarten war, treten signifikanten Abbauprozesse auf, wobei zunächst vor allem die Reduktion der Signale auffällt, welche ausschließlich durch sialylierte Strukturen zu erklären sind (z.B. $m/z=16802$ oder $m/z=16949$). Nach etwa 9 Stunden sind diese Signale kaum noch vorhanden, es treten aber vermehrt trunkierte Glycoformen (z.B. m/z 15051, PIP+H₄N₃F₂) oder das fast vollständig deglycosylierte PIP auf. Nach 23 Stunden ist dann eine nahezu vollständige Deglycosylierung zu beobachten, wobei nur noch die Signale m/z 13705 (PIP+GlcNAc) und m/z 13851 (PIP+GlcNAcFuc) nennenswerte Intensitäten aufweisen.

Die Beobachtungen zeigen, dass eine korrekte und möglichst wenig beeinflussende Handhabung der Speichelproben sehr wichtig ist. Aufgrund des deutlich schnelleren Glycanabbaus bei Raumtemperatur sollten die Proben während der Aufarbeitung stets auf Eis gelagert werden und so viele Schritte wie möglich sind bei geringen Temperaturen durchzuführen. Hier sind beispielsweise Zentrifugationsschritte zu nennen, bei denen auf alle Fälle eine Kältezentrifuge verwendet werden sollte. Dennoch zeigt das Experiment mit einer Inkubationstemperatur von 4 °C, dass auch geringe Temperaturen zu Abbauprozessen führen, sodass eine Inhibition der Enzyme angestrebt werden sollte.

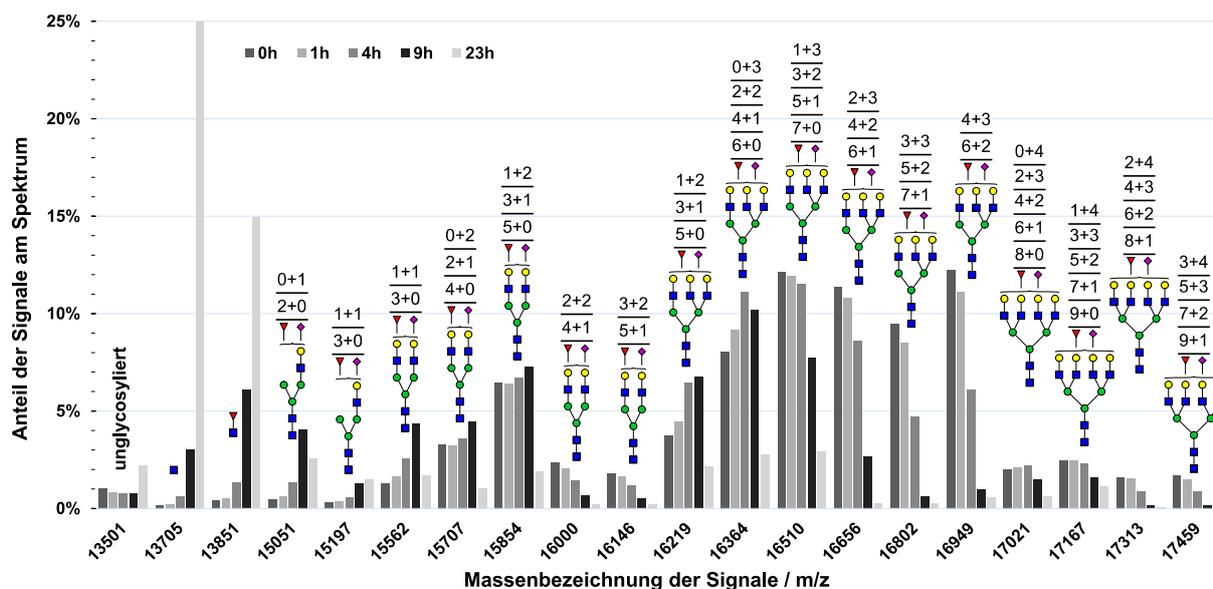


Abb. 45: Einfluss der Probenlagerung (insbesondere der Einhaltung der Kühlkette) auf die Glycosylierung von PIP (Inkubationstemperatur: 21 °C; Werte in Tab. 35 im Anhang). Bei den Koeffizienten handelt es sich um die Summe der Einzelkoeffizienten der unter einem Signal auftretenden Glycoformen. Die Zahlen über den Grundstrukturen der entsprechenden Glycoformen geben die möglichen Kombinationen der Fucose- und Sialinsäureanzahl an. Es fällt hierbei auf, dass keine erkennbare Reduktion der Abbaugeschwindigkeit auftritt. Nach 23 Stunden weisen nur noch zwei Signale relative Anteile über 3% auf. Hierbei handelt es sich um die Signale bei m/z 13704 (PIP+GlcNAc) und m/z 13851 (PIP+GlcNAcFuc), welche durch eine nahezu vollständige Deglycosylierung hervorgerufen werden. Der Balken bei m/z 13705 und 23 Stunden wurde zur besseren Sichtbarkeit der anderen Balken bei 25% (Wert: 41%) abgeschnitten.

Die beiden vorangegangenen Experimente zeigten deutlich, dass die Glycosidase-Aktivität in humanem Speichel sehr hoch ist. Da die entsprechenden Enzyme im menschlichen Körper aktiv sind, kann davon ausgegangen werden, dass ihr Aktivitätsoptimum im Bereich der Körperkerntemperatur liegt. Um die maximale Aktivität der Glycosidasen einzuschätzen, wurde ein Experiment mit einer Inkubationstemperatur von 37 °C durchgeführt. Als Kontrolle diente wieder eine direkt eingefrorene Probe (-80 °C). Die Inkubationszeit der restlichen Proben wurde im Vergleich mit den anderen beiden Experimenten verkürzt, da aufgrund der erhöhten Temperatur auch eine höhere Abbaurrate zu erwarten ist. Es wurden daher Inkubationszeiten von 30, 60, 90 und 150 Minuten gewählt. Analog zu den vorangegangenen Experimenten sind in **Abb. 46** die dekonvolvierten Spektren dargestellt und in **Abb. 47 (Tab. 36** im Anhang) die Daten der mathematischen Analyse mithilfe des *Matlab*-Skripts gezeigt. Es zeigt sich erwartungsgemäß, dass die Abbaugeschwindigkeit sehr hoch ist. Die bekannten, nur durch sialylierte Strukturen hervorgerufenen Signale (z.B. m/z 16802 und m/z 16949) sinken stetig in ihrer Intensität und weisen bereits nach einer Stunde eine absolute Abnahme von etwa 6% auf. Nach 2.5 Stunden sind die Signale nur noch bei relativen Anteilen von etwa 1% am gesamten Spektrum. Des Weiteren zeigt sich schon nach einer halben Stunde ein deutlicher Anstieg des Signals bei m/z 13851, welches das nahezu vollständig deglycosylierte

PIP (PIP+GlcNAcFuc) beschreibt. Bei einer Inkubationszeit von 21 °C konnte dieses Signal erst nach 4 Stunden mit nennenswerten Intensitäten beobachtet werden. Der errechnete durchschnittliche Sialylierungsgrad pro PIP-Molekül ist in **Abb. 43** gezeigt. Hier ist die sehr schnelle Desialylierung deutlich zu erkennen, wobei nach 2.5 Stunden die relative Abnahme des Sialylierungsgrades etwa 80% beträgt.

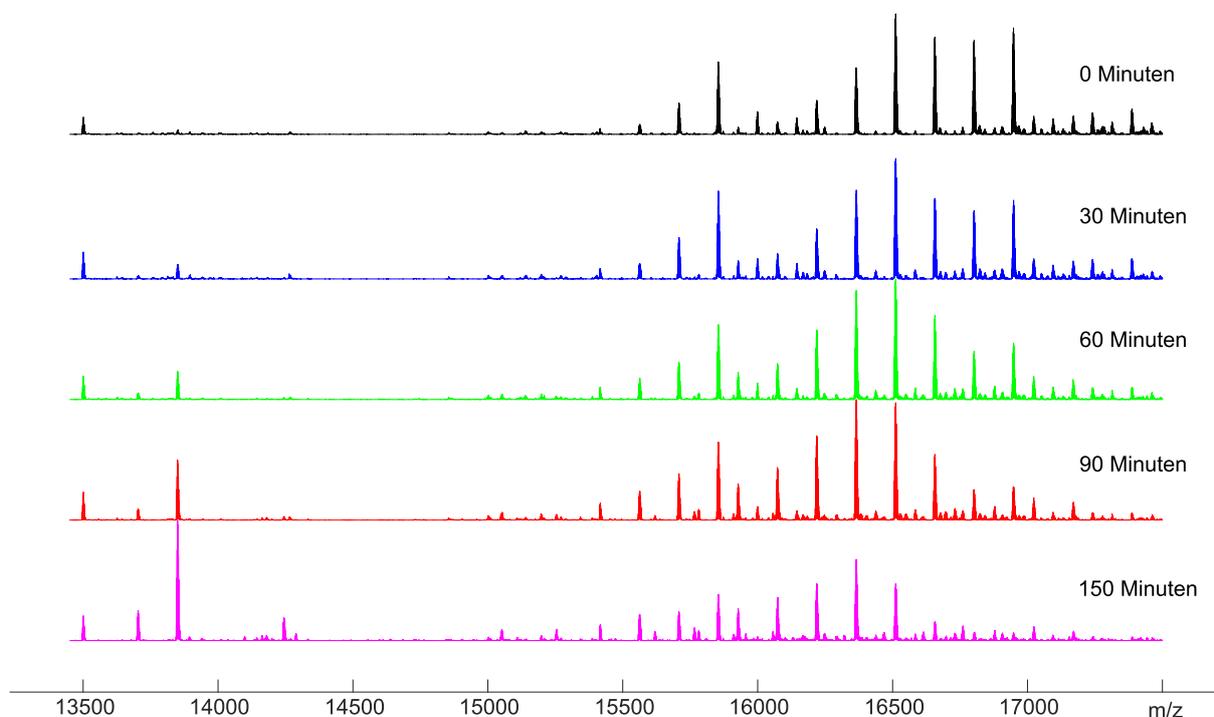


Abb. 46: Vergleich der Massenspektren nach der Inkubation bei 37 °C für 0, 30, 60, 90 und 150 Minuten. Die Spektren wurden jeweils auf das intensivste Signal normiert. Analog zu den Experimenten bei 4 °C und 21 °C sind die üblichen Abbauprozesse zu beobachten, wobei die Geschwindigkeit erwartungsgemäß sehr hoch ist. Bereits nach 2.5 Stunden weisen beispielsweise die durch sialylierte Strukturen hervorgerufenen Signale bei m/z 16802 und m/z 16949 keine nennenswerte Intensität mehr auf. Es zeigt sich aber auch, dass die Inkubationszeit für eine vollständige Deglycosylierung nicht ausreichte.

Trotz der hohen Abbaugeschwindigkeit ist eine vollständige Deglycosylierung nach 2.5 Stunden noch nicht erreicht, was am noch auftretenden deutlichen Anteil an bi- und triantennären Strukturen zu erkennen ist. Außerdem weist das Signal des PIP, bei dem das proximale GlcNAc fucosyliert vorliegt, die höchste Intensität auf. Dies ändert sich mit zunehmender Trunkierung, sodass das durch die natürlichen Speichelenzyme maximal trunkierte PIP (PIP+GlcNAc) den größten Anteil besitzt. Dennoch zeigt die hohe Geschwindigkeit des Glycanabbaus bei Temperaturen nahe der Körperkerntemperatur erneut die Notwendigkeit einer schnellen Abkühlung der Speichelprobe oder der Inhibition der enzymatischen Aktivität.

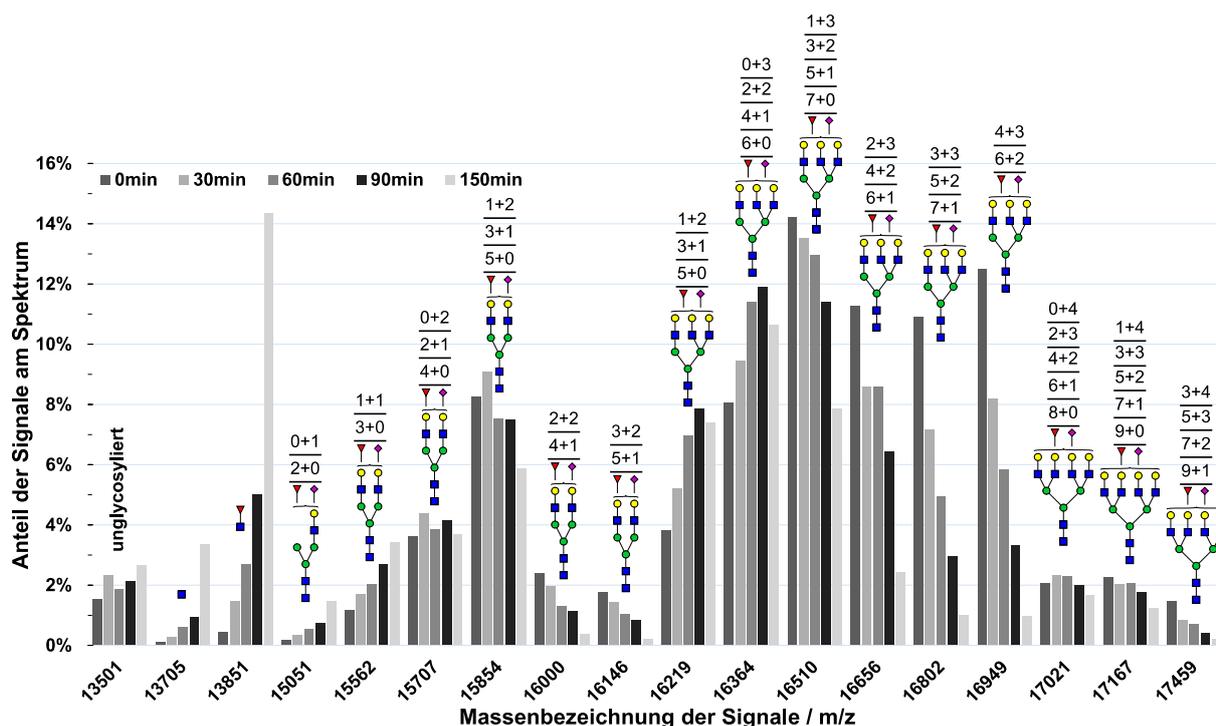
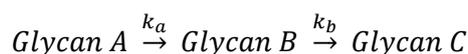


Abb. 47: Einfluss der Probenlagerung (insbesondere der Einhaltung der Kühlkette) auf die Glycosylierung von PIP (Inkubationstemperatur: 37 °C; Werte in Tab. 36 im Anhang). Bei den Koeffizienten handelt es sich um die Summe der Einzelkoeffizienten der unter einem Signal auftretenden Glycoformen. Die Zahlen über den Grundstrukturen der entsprechenden Glycoformen geben die möglichen Kombinationen der Fucose- und Sialinsäureanzahl an. Es zeigt sich insbesondere die Desialylierung eine sehr hohe Geschwindigkeit aufweist. Das Signal bei m/z 16949 beispielsweise sinkt bereits nach einer Stunde um über 50% und ist nach 2.5 Stunden kaum noch vorhanden (<1%). Aber auch die anderen Abbauprozesse zeigen eine hohe Rate, was vor allem an den Signalen des nahezu vollständig deglycosylierten PIP (m/z 13705 und m/z 13851) zu erkennen ist.

4.3.6.1 Kinetische Betrachtung des Glycanabbaus

Viele Enzyme besitzen ein Aktivitätsoptimum bei 37 °C, was aufgrund ihrer lebenswichtigen Funktionen innerhalb des humanen Organismus zu erwarten ist. Die durchschnittliche Körperkerntemperatur eines Menschen liegt bei etwa 37 °C.^[131] Es kann daher davon ausgegangen werden, dass bei einer entsprechenden Inkubationstemperatur die Abbaugeschwindigkeit der Glycosylierung maximal ist. Im Folgenden wird daher die Kinetik des Glycanabbaus näher untersucht. Die Auftragungen der Koeffizientensummen gegen die Zeit sind in **Abb. 48** dargestellt. Hierbei fällt auf, dass die Signale letztendlich in drei Gruppen eingeteilt werden können: Signale mit Intensitätszunahme, Signale mit Intensitätsabnahme und Signale, welche ein Intensitätsmaximum durchlaufen. Da es sich bei dem Glycanabbau um einen enzymatischen Prozess handelt, wäre die Anwendung der Michaelis-Menten-Kinetik naheliegend. Für den praktischen Einsatz von PIP als Biomarker sind genaue Aussagen über die Enzymgeschwindigkeiten jedoch uninteressant. Außerdem ist eine Dateninterpretation entsprechend der Michaelis-Menten-Kinetik nur möglich, wenn die Konzentration des

Substrats bekannt ist. Im vorliegenden Fall wäre die Anfangskonzentration ausreichend, da über die relativen Anteile die restlichen Datenpunkte berechnet werden können. Anschließend könnte eine Progresskurvenanalyse zur Bestimmung der maximalen Geschwindigkeit und der Michaelis-Menten-Konstante durchgeführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit besteht größeres Interesse an der allgemeinen Abbaugeschwindigkeit der Glycosylierung. Diese ist natürlich von der enzymatischen Aktivität und der Enzymkonzentration abhängig, kann aber auch in erster Näherung durch das Prinzip der aufeinanderfolgenden Elementarreaktionen beschrieben werden.^[132]



Jedes Signal bzw. jede Glycoform kann in eine der drei Stadien einsortiert werden. Das Glycan $\text{H}_6\text{N}_5\text{F}_2\text{S}_3$ (m/z 16656) beispielsweise trägt bereits die maximale Anzahl an Sialinsäuren und kann daher nicht durch Desialylierungsprozesse gebildet werden (entspricht Glycan A). Es kann aber durch eine enzymatische Abspaltung einer Sialinsäure zu $\text{H}_6\text{N}_5\text{F}_2\text{S}_2$ (m/z 16364) abgebaut werden. Bei dieser Glycoform ist ebenfalls eine Desialylierung möglich, sodass sie durch enzymatische Prozesse sowohl auf- als auch abgebaut wird (entspricht Glycan B). Als Glycan C treten die Glycoformen auf, bei denen ein weiterer Abbau nicht möglich ist oder bei denen der Abbau im Gegensatz zur Bildung deutlich langsamer ist. Hier sind unter anderem die nahezu vollständig deglycosylierten Varianten PIP+GlcNAc (m/z 13705) und PIP+GlcNAcFuc (m/z 13851) zu nennen. Allgemein kann die Aussage getroffen werden, dass innerhalb der Bereiche mit gleicher Antennenanzahl die hoch- bzw. niedrigglycosylierten Spezies eine Intensitätsabnahme bzw. -zunahme erfahren. Die Varianten, welche bezüglich der Masse zwischen diesen beiden Spezies platziert sind, durchlaufen hingegen ein Intensitätsmaximum. Die einzige Ausnahme bilden die Glycoformen mit einem m/z -Verhältnis von etwa 15707. Hier kommt es zwar zu geringen Schwankungen, aber die Werte zeigen keinen erkennbaren Trend und bleiben eher konstant. Als Erklärung könnte das Prinzip des quasistationären Zustandes dienen, bei dem ein Zwischenprodukt im gleichen Maße entsteht, wie es abgebaut wird und somit eine konstante Konzentration aufweist. An dieser Stelle sollte außerdem darauf hingewiesen werden, dass bis auf das unglycosylierte PIP und das PIP mit dem proximalen GlcNAc alle Glycoformen letztendlich vollständig abgebaut werden. Beispielsweise zeigen die Glycane $\text{H}_4\text{N}_3\text{F}_2$ bzw. $\text{H}_4\text{N}_3\text{S}$ im Rahmen des durchgeführten Experiments einen kontinuierlichen exponentiellen Anstieg. Durch enzymatische Prozesse werden aber auch diese Glycoformen mit der Zeit trunkiert, sodass deren Signal (m/z 15051) ebenfalls ein Intensitätsmaximum durchläuft.

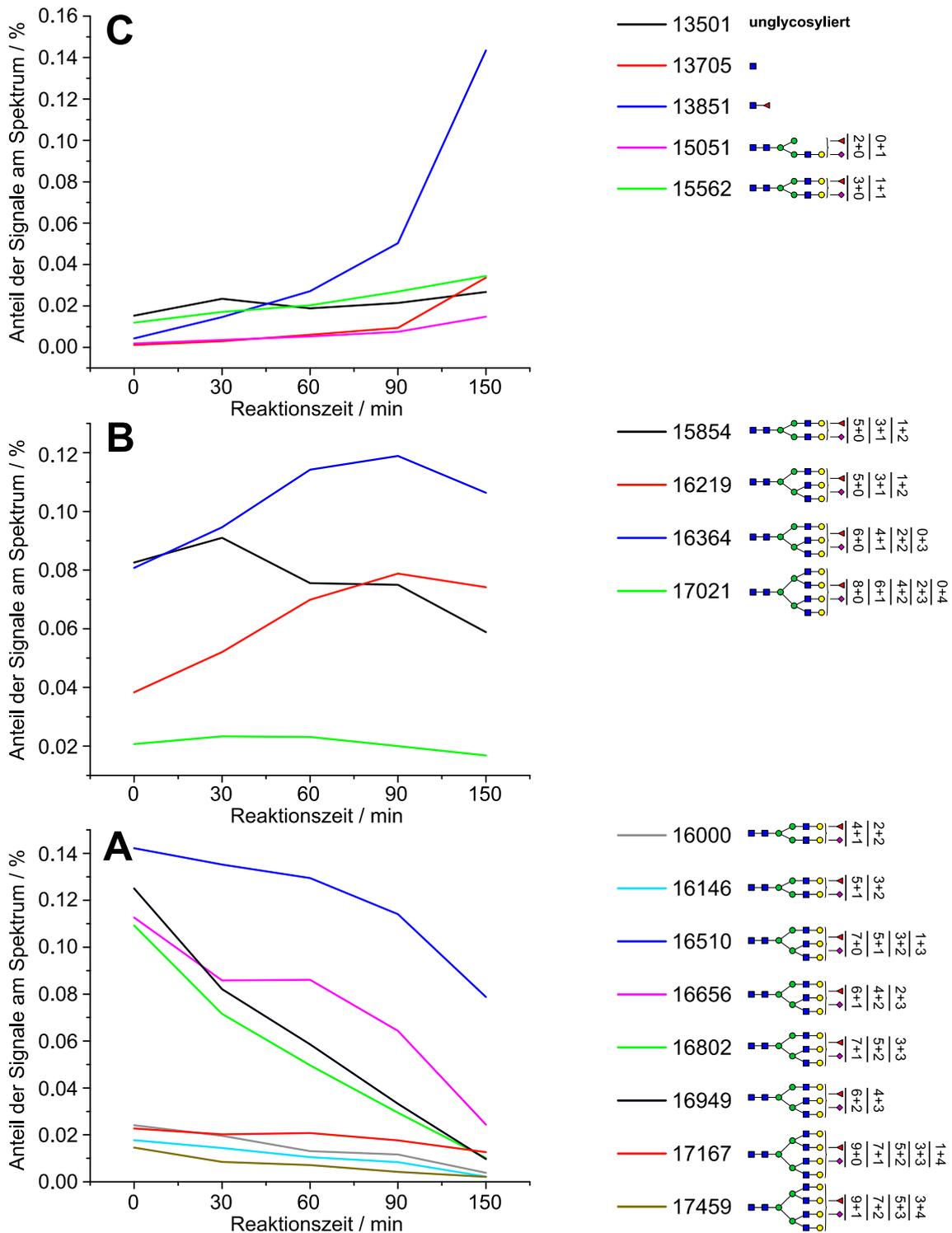


Abb. 48: Verlauf des Signalanteils am Spektrum der Glycoformen von PIP im Laufe der Inkubation bei 37 °C. Bei den Koeffizienten handelt es sich um die Summe der Einzelkoeffizienten der unter einem Signal auftretenden Glycoformen. Die Zahlen neben den Grundstrukturen der entsprechenden Glycoformen geben die möglichen Kombinationen der Fucose- und Sialinsäureanzahl an. Die Signale können in drei Gruppen eingeteilt werden: Signale mit Intensitätszunahme (C), Signale mit Intensitätsabnahme (A) und Signale, die ein Intensitätsmaximum durchlaufen (B). Die Verläufe lassen sich nach dem Prinzip der aufeinanderfolgenden Elementarreaktionen beschreiben. Innerhalb der Glycoformen mit identischer Antennenzahl scheinen die hochglycosylierten Varianten (hohe m/z-Verhältnisse) eine Intensitätsabnahme und die niedrigglycosylierten (geringere m/z-Verhältnisse) eine Intensitätszunahme zu erfahren, während die restlichen Varianten ein Intensitätsmaximum durchlaufen.

Die Geschwindigkeitsgesetze bzw. die Konzentrationen für Glycan A, B und C werden durch folgende Formeln beschrieben^[132]:

$$[A] = [A_0]e^{-k_a t} \quad \text{Gleichung (1)}$$

$$[B] = \frac{k_a}{k_b - k_a} (e^{-k_a t} - e^{-k_b t}) [A_0] \quad \text{Gleichung (2)}$$

$$[C] = \left(1 + \frac{k_a e^{-k_b t} - k_b e^{-k_a t}}{k_b - k_a} \right) [A_0] \quad \text{Gleichung (3)}$$

mit der Anfangskonzentration des Glycans A $[A_0]$, den Geschwindigkeitskonstanten k_b und k_a , und der Zeit t .

Die Gleichungen und deren Konzentrationsverlauf sind in **Abb. 49** dargestellt. Es ist zu sehen, dass der Abbau von Glycan A einem exponentiellen Zerfall entspricht. Analog hierzu ist die Konzentrationszunahme von Glycan C zu Beginn ebenfalls exponentieller Natur, bis es aufgrund fehlender Edukte zu einer Sättigung kommt. Unter der Annahme, dass k_b sehr klein ist, weisen auch die Zwischenprodukte (Glycan B) einen exponentiellen Zuwachs auf. Es lassen sich somit die drei angesprochenen Gruppen erklären. Bei genauerer Betrachtung sind jedoch bei einigen Signalen Abweichungen vom Idealverlauf zu beobachten. Das Signal der möglichen Glycoformen $H_6N_5F_7$, $H_6N_5F_5S$, $H_6N_5F_3S_2$ und $H_6N_5FS_3$ (m/z 16510) beispielsweise zeigt keinen exponentiellen Abfall, sondern eher den Verlauf nach einem Intensitätsmaximum. Da drei der vier möglichen Glycane sowohl Auf- als auch Abbauprozessen unterliegen, sollte dieses Signal theoretisch der Gruppe der Zwischenprodukte zugeordnet werden. Es stellt sich somit die Frage, warum der Verlauf kein Maximum aufweist. Als Erklärung hierfür können die Näherungen, welche für die Gleichungen (1) - (3) verwendet wurden, herangezogen werden. Wie in **Abb. 49** zu sehen, wird hierbei davon ausgegangen, dass die Anfangskonzentrationen von Glycan B und C null sind. Beim untersuchten Glycanabbau ist dies aber nicht der Fall, da viele Glycoformen natürlich vorkommen und somit bereits eine Anfangskonzentration aufweisen, was letztlich zu einer Verschiebung entlang des Graphen führt, sodass die angesprochenen Glycoformen bereits hinter dem theoretischen Maximum liegen. Es kommt somit zur Überlagerung mehrerer Prozesse, da die unterschiedlichen Glycoformen eines Signals sowohl als Glycan A als auch als Glycan B fungieren können.

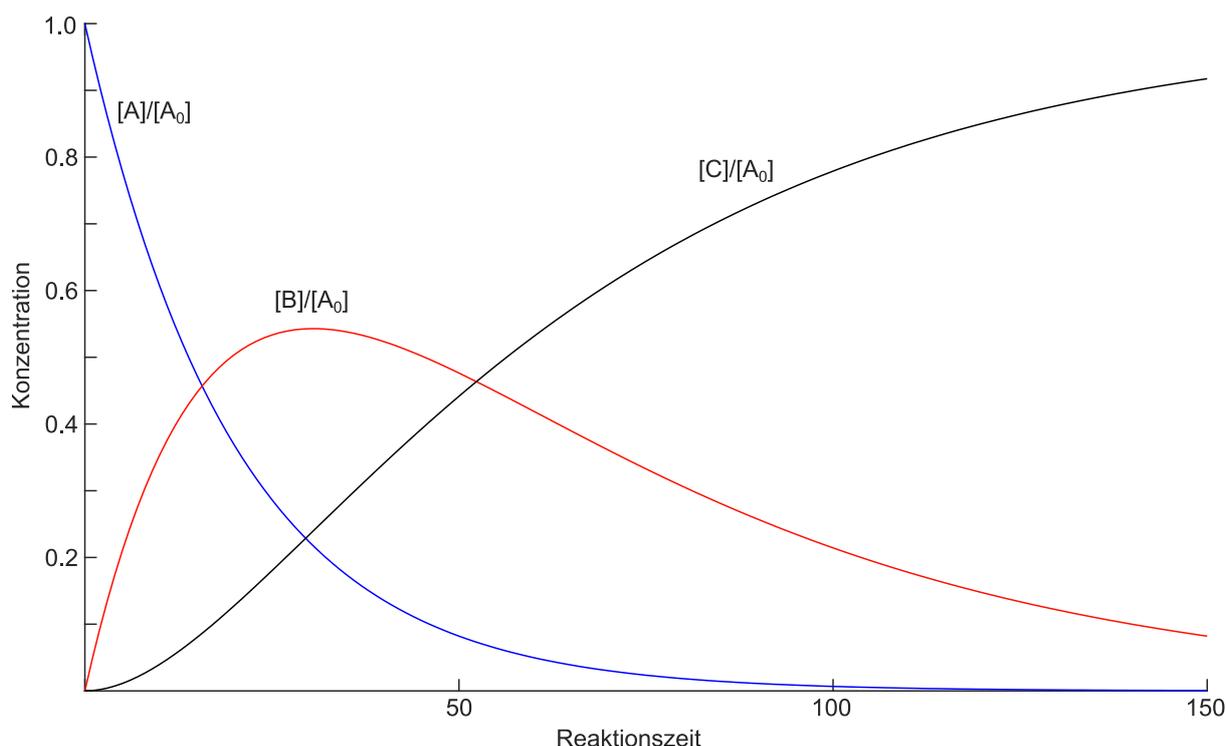


Abb. 49: Konzentrationsverlauf der drei Stadien (Glycan A, Glycan B und Glycan C) bei einer aufeinanderfolgenden Elementarreaktion. Die dargestellten Kurven wurden mithilfe der Gleichungen (1) - (3) mit $k_a=2.5k_b$ berechnet. Durch Vergleich dieser theoretischen Darstellung mit den experimentellen Verläufen (**Abb. 48**) lassen sich die drei Gruppen erkennen und erklären. Es ist zu sehen, dass der Abbau von Glycan A einem exponentiellen Zerfall entspricht. Analog hierzu ist die Konzentrationszunahme von Glycan C zu Beginn ebenfalls exponentieller Natur, bis es aufgrund fehlender Edukte zu einer Sättigung kommt. Die teilweise auftretenden Abweichungen der Signalverläufe von theoretischen Kurven lassen sich durch die Näherungen zur Herleitung der Gleichungen (1) - (3) erklären. Es wird davon ausgegangen, dass die Anfangskonzentration von Glycan B und Glycan C null ist. Aufgrund des natürlichen Vorkommens vieler Glycoformen trifft diese Annahme nicht auf den untersuchten Glycanabbau zu. Letztendlich kommt es also zur Überlagerung mehrerer Prozesse, da die unterschiedlichen Glycoformen eines Signals sowohl als Glycan A als auch als Glycan B fungieren kann.

Aufgrund der stark vereinfachten Näherungen und der hohen Komplexität der Abbauprozesse, ist eine realistische Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten aller enzymatischen Aktivitäten nicht möglich. Es werden daher im Folgenden nur die Desialylierungsprozesse der Bi- und Triantennen sowie die Entstehung der nahezu vollständig deglycosylierten Varianten näher untersucht, da nur bei diesen Signalen ein eindeutiger exponentieller Zusammenhang beobachtet werden konnte. Hierfür wurden die Daten der entsprechenden Signale durch einen exponentiellen Fit angepasst. Die Anpassung und die errechneten Parameter sind in **Abb. 50** und **Tab. 15** dargestellt. Durch die sehr gute Anpassung (siehe R-Quadrat) wird bestätigt, dass alle untersuchten Signale tatsächlich einer Exponentialfunktion folgen. Die Tatsache, dass im Falle des Glycanabbaus ausschließlich Glycoformen mit mindestens einer Sialinsäure dem Glycan A oder dem Sonderfall von Glycan B entsprechen ($k_b \ll k_a$), lässt auf eine geringe Abbaugeschwindigkeit von zumindest einer Glycoform bei den anderen Signalen schließen.

Diese Beobachtung bestätigt somit die Wichtigkeit der Desialylierung. Es kann außerdem angenommen werden, dass der Abbau der terminalen Sialinsäuren die höchste Geschwindigkeit aufweist. Bei Reaktionen erster Ordnung kann mithilfe der Beziehung $\ln 2/k$ die Halbwertszeit berechnet werden (**Tab. 15**). Da das verwendete Modell für die Anpassung eine Exponentialfunktion mit einem zusätzlichen additiven Term verwendet, ändert sich der Ausdruck für die Halbwertszeit wie folgt:

$$t_{1/2} = \frac{\ln\left(\frac{1-y_0}{2-2A}\right)}{k} \quad \text{Gleichung (4)}$$

Die Verdopplungszeit des exponentiellen Wachstums lässt sich analog herleiten und wird durch folgende Formel beschrieben:

$$t_V = \frac{\ln\left(\frac{y_0}{A}+2\right)}{k} \quad \text{Gleichung (5)}$$

Die errechneten Halbwertszeiten bestätigen die hohe Geschwindigkeit der Sialidasen, wobei sich diese bei den Bi- und Triantennen stark unterscheidet. Die Konzentration einer sialylierten Glycoform der Triantennen nimmt bereits nach 52 min um 50% ab, während der gleiche Effekt bei den Biantennen nach etwa 81 min zu beobachten ist. Es sollte an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass nicht von einer Reduktion des Gesamtgehalts der Sialinsäuren um 50% (innerhalb der Glycoformen mit gleicher Antennenanzahl) gesprochen werden kann, da viele sialylierte Glycoformen durch die Sialidase-Aktivität nur zu einer geringer sialylierten Variante werden. Die Unterschiede zwischen Bi- und Triantennen können durch den geringeren, absoluten Gehalt an Sialinsäure bei Biantennen erklärt werden. Ohne Berücksichtigung der Gewichtung innerhalb der Signale weisen beispielsweise die potentiellen Glycoformen bei m/z 16146 ($H_5N_4F_3S_2$ und $H_5N_4F_5S$) insgesamt drei Sialinsäuren auf, welche durch eine Sialidase abgespalten werden können. Beim analogen Signal im triantennären Bereich (m/z 16802; $H_6N_5FS_3$, $H_6N_5F_5S_2$ und $H_6N_5F_7S$) finden sich hingegen sechs Sialinsäuren. Durch die Tatsache, dass jede Abspaltung einer Sialinsäure zu einer Reduktion des Signals führt, wird der Unterschied bei den Abbaugeschwindigkeiten deutlich.

Um Aussagen über die Bildungsgeschwindigkeit der nahezu vollständig deglycosylierten Varianten tätigen (m/z 13705 und m/z 13851) zu können, werden im Folgenden einige Annahmen gemacht. Zum einen wird davon ausgegangen, dass diese Strukturen nur durch eine abschließende endo-Spaltung des *core* zwischen den beiden proximalen GlcNAc entstehen, zum anderen wird angenommen, dass diese entsprechende *core*-Struktur aufgrund des hohen Fucosylierungsgrades immer fucosyliert vorliegt. Gestützt werden diese Annahmen durch das Abbaumuster, welches keine unfucosylierte und keine trunkierte *core*-Struktur zeigt.

Diese Annahmen führen dazu, dass die Variante PIP+GlcNAc nur durch eine Defucosylierung von PIP+GlcNAcFuc entsteht. Die geringe Verdopplungszeit von nur 18 min sowie der eindeutige exponentielle Anstieg von PIP+GlcNAcFuc (m/z 13851), welches letztendlich als Zwischenprodukt (Glycan B) angesehen werden muss, führen zu zwei Postulaten. Die endo-Spaltung weist eine hohe Geschwindigkeit auf und die Defucosylierung ist deutlich langsamer ($k_b \ll k_a$), sodass der Sonderfall eines Zwischenprodukts mit einem beginnenden exponentiellen Anstieg eintritt. Dennoch ist zu erkennen, dass auch der Defucosylierungsprozess in signifikantem Maße abläuft (Verdopplungszeit = 33 min). Mit längerer Inkubationszeit würde aufgrund des vollständigen Abbaus der größeren Glycane auch bei PIP+GlcNAcFuc eine Abflachung der Kurve und letztendlich eine Abnahme zu beobachten sein.

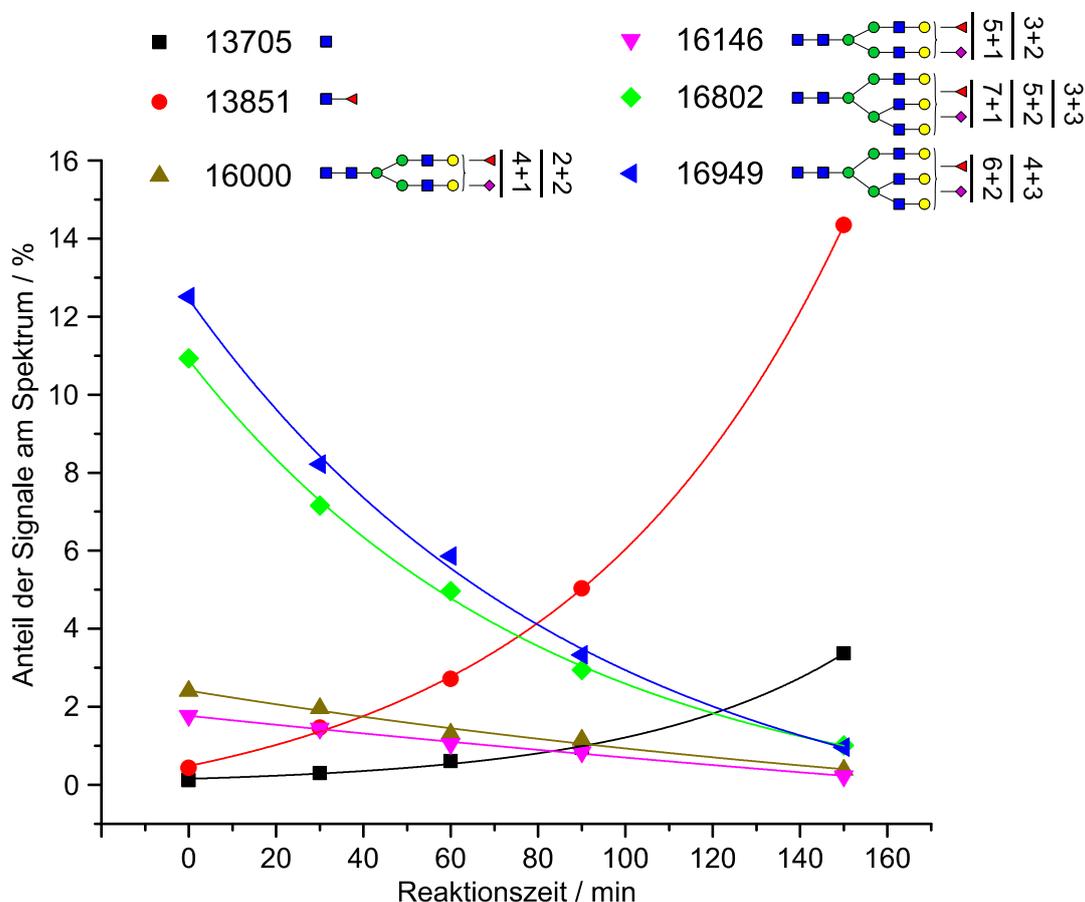


Abb. 50: Mathematische Anpassung des Abbauprozesses der Glycane bei 37 °C. Bei den Koeffizienten handelt es sich um die Summe der Einzelkoeffizienten der unter einem Signal auftretenden Glycoformen. Die Zahlen neben den Grundstrukturen der entsprechenden Glycoformen geben die möglichen Kombinationen der Fucose- und Sialinsäureanzahl an. Für die Anpassung wurde ein exponentielles Modell gewählt. Es ist zu erkennen, dass der mathematische Fit sehr gut mit den experimentellen Daten übereinstimmt, was darauf hindeutet, dass die Auf- und Abbauprozesse der angepassten Glycoformen tatsächlich einer Exponentialfunktion folgen. Hierbei handelte sich im Falle des Abbaus ausschließlich um Glycoformen, die mindestens eine Sialinsäure tragen. Bei den anderen Spezies, die vorwiegend als Zwischenprodukt vorliegen, scheint demnach mindestens eine der Glycoformen eine geringe Abbaugeschwindigkeit aufzuweisen. Diese Beobachtung bestätigt somit, dass die Desialylierung vermutlich die größte Geschwindigkeit aufweist.

Tab. 15: Parameter der mathematischen Anpassung des Glycanabbaus bei 37 °C. $t_{1/2}$: Halbwertszeit; t_V : Verdopplungszeit.

Modell	Exponentialfunktion					
Gleichung	$y = y_0 + A \cdot \exp(k \cdot t)$					
Signal bei $m/z =$	13705	13851	16000	16146	16802	16949
y_0	-6.0 E-5 ± 9.9E-4	-0.010 ± 0.0018	-0.018 ± 0.026	-0.046 ± 0.053	-0.0090 ± 0.0050	-0.017 ± 0.0098
A	0.0016 ± 5.1E-4	0.015 ± 0.0012	0.042 ± 0.026	0.064 ± 0.053	0.12 ± 0.0048	0.14 ± 0.0092
k (min ⁻¹)	0.020 ± 0.0020	0.016 ± 4.8E-4	-0.0043 ± 0.0036	-0.0018 ± 0.0018	-0.012 ± 0.0011	-0.011 ± 0.0015
$t_{1/2}/t_V$ (min)	33	18	78	84	51	52
R-Quadrat (COD)	0.9986	0.9998	0.9853	0.9965	0.9990	0.9978

Die hohe Geschwindigkeit des Glycanabbaus bei Temperaturen nahe der Körperkern-temperatur zeigt erneut die Notwendigkeit einer schnellen Abkühlung der Speichelprobe. An dieser Stelle sollte auch der Zeitraum, in dem der Speichel im Mundraum akkumuliert wird, beachtet werden. Bei der Probenahme konnte beobachtet werden, dass viele Probanden eine längere Akkumulation des Speichels im Mundraum dem häufigen Spucken in das Probengefäß vorziehen. Die Dauer der Akkumulation variiert hierbei sicherlich und kann bis zu 3-4 Minuten betragen. Durch die in **Tab. 15** dargestellte Gleichung der Intensitätsabnahme des Signals bei m/z 16949 kann die relative Abnahme der Sialylierung triantennärer Strukturen auf 5% bestimmt werden. Zusammen mit den anderen messtechnischen Variationen und möglichen Fehlerquellen kann diese geringe Abnahme zu Fehlinterpretationen der Daten führen. Es ist daher nötig, die Akkumulationszeit des Speichels im Mund für jeden Probanden festzulegen, wobei sie möglichst gering gehalten werden sollte, um den Einfluss anderer Faktoren wie beispielsweise eine variierende Enzymkonzentration zu minimieren.

4.3.6.2 Untersuchung zur Inhibition des Glycanabbaus

Die in diesem Kapitel (**Kap. 4.3.6**) diskutierten Experimente zeigen alle ein Problem der Analyse der Glycosylierung von PIP. Aufgrund der weitreichenden Abbauprozesse ist insbesondere eine korrekte Quantifizierung schwer zu erreichen, da eine strikte Einhaltung der Kühlkette notwendig ist. Bereits eine Probenhandhabung bei 4 °C zeigt geringen enzymatischen Abbau. Mit steigender Temperatur steigt die Abbaugeschwindigkeit deutlich an und es finden signifikante Trunkierungen der Glycane bereits nach einer Stunde statt. Die Notwendigkeit einer sehr detaillierten SOP ist demnach unumstritten, wobei die Temperatur sowie die Dauer jedes Schrittes exakt angegeben werden müssen. Die Einhaltung dieser Angaben ist für jede zu vergleichende Probe unerlässlich. Durch geringe Abweichungen vom Protokoll kann es zu einem unterschiedlichen Maß an Abbauprozessen in den verschiedenen Proben kommen, sodass eine Vergleichbarkeit zum Beispiel aufgrund von Krankheiten nicht mehr gegeben ist. Es wäre daher von großem Nutzen, wenn die Enzymaktivität im Speichel direkt bei der Probenahme reduziert wird oder im Idealfall die Enzyme vollständig inaktiviert werden. Hier besteht die Möglichkeit der Verwendung spezifischer Glycosidaseinhibitoren, welche jedoch im Gegensatz zu den Proteasehemmern noch nicht sehr weit verbreitet sind und daher nicht unerhebliche Kosten verursachen. Eine einfache, alternative Methode zur Inaktivierung von Enzymen ist die chemische oder thermische Denaturierung. Für die chemische Denaturierung kommen chaotrope Reagenzien wie zum Beispiel Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid in Frage. Um das Potential der chemischen und thermischen Behandlung zur Inhibition der enzymatischen Aktivität zu überprüfen, wurde je ein Aliquot der identischen Speichelprobe mit Harnstoff (Endkonzentration: 6 M) versetzt oder für 17 min bei 96 °C erhitzt und anschließend für 23 Stunden bei 21 °C inkubiert. Zwei weitere Aliquote dienten bezüglich der Inhibition als Positiv- bzw. Negativkontrolle und wurden daher ohne jegliche Behandlung direkt bzw. nach einer Inkubation für 23 Stunden bei -21 °C eingefroren. Die durch die anschließende massenspektrometrische Analyse erhaltenen Spektren sind in **Abb. 51** dargestellt. Die *Matlab*-gestützte Quantifizierung der Glycoformen (Summe der Koeffizienten) ist in **Abb. 52 (Tab. 37** im Anhang) zu sehen. Es fällt auf, dass von den Proben, die für 23 Stunden bei 21 °C inkubierten, nur die Negativkontrolle eine nahezu vollständige Deglycosylierung aufweist, wobei vor allem das Signal bei m/z 13705 eine nennenswerte Intensität hat. Beim Vergleich der chemisch und thermisch behandelten Proben zeigen sich deutliche Unterschiede. Während bei der Vorbehandlung mit Harnstoff eine Reduktion der sialylierten Strukturen um etwa 25% (z.B. m/z 16802 und m/z 16949) auftritt (bezogen auf die Positivkontrolle), ist bei der thermisch behandelten Probe ein erhöhter Wert festzustellen. Die Reduktion des Sialylierungsgrades sowie die signifikante Intensitätssteigerung der Signale von PIP+GlcNAc (m/z 13705) und PIP+GlcNAcFuc (m/z 13851) bedeutet, dass keine komplette

Inaktivierung der Enzyme durch die chemische Behandlung gelungen ist. Dennoch ist auch nach 23 Stunden ein intensives PIP-Spektrum zu sehen, was im Vergleich mit der Negativkontrolle einen erheblichen Fortschritt bedeutet. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Enzymaktivität erheblich herabgesetzt wurde.

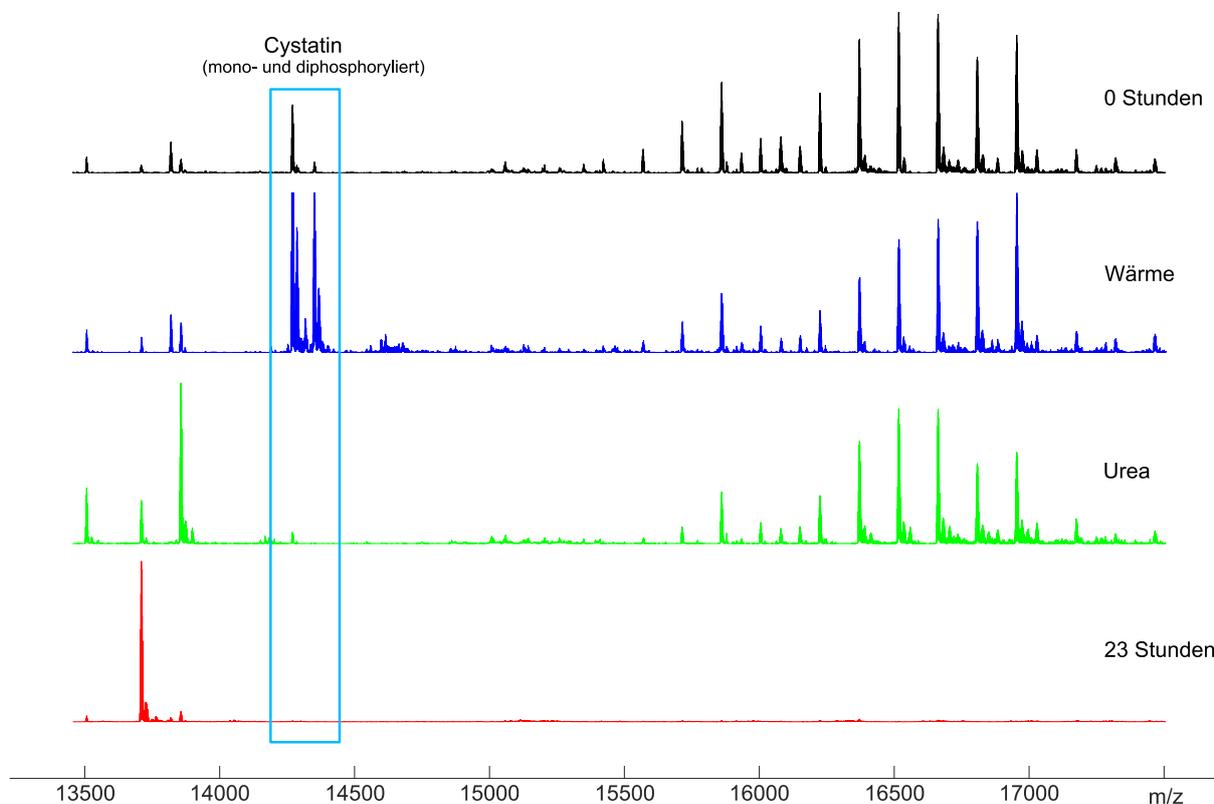


Abb. 51: Vergleich der Massenspektren des Versuchs zur chemischen oder thermischen Inhibition des Glycanabbaus. Die Spektren wurden jeweils auf das intensivste PIP-Signal normiert. Die intensiven Signale, die dem mono- und diphosphoryliertem Cystatin-S zugeordnet werden können (blauer Kasten), sind im Spektrum der thermischen Behandlung abgeschnitten. Von oben nach unten sind folgende Spektren von intaktem PIP dargestellt: 1) Spektrum von PIP einer unbehandelten und direkt eingefrorenen Probe, 2) Spektrum von PIP einer mit Wärme (17 Minuten bei 96 °C) behandelten und anschließend für 23 Stunden bei 21 °C inkubierten Probe, 3) Spektrum von PIP einer mit Harnstoff (Endkonzentration: 6 M) behandelten und anschließend für 23 Stunden bei 21 °C inkubierten Probe, 4) Spektrum von PIP einer unbehandelten und anschließend für 23 Stunden bei 21 °C inkubierten Probe. Es zeigt sich, dass nur bei der Negativkontrolle eine nahezu vollständige Deglycosylierung auftritt, was auf eine erfolgreiche Inhibition der Enzyme hindeutet. Durch den Vergleich der Positivkontrolle mit den Spektren der chemisch und thermisch behandelten Probe ist ein deutlicher Unterschied zu sehen. Bei dem Versuch der chemischen Inaktivierung sind weiterhin Abbauprozesse zu beobachten, was beispielsweise an der Reduktion der Signale bei m/z 16802 oder m/z 16949 zu erkennen ist. Die thermisch behandelte Probe hingegen weist einen höheren Sialyierungsgrad als die Positivkontrolle auf. Durch eine vollständige Inaktivierung der Enzyme lässt sich diese Beobachtung erklären, da es bei der Positivkontrolle auch im Laufe der Probenvorbereitung zu einem Glycanabbau kommt.

Einige Signale, welche nur durch sialylierte Strukturen erklärt werden können (z.B. m/z 16802 und m/z 16949), weisen bei der thermisch behandelten Probe im Vergleich mit der Positivkontrolle eine höhere Intensität auf. Als Erklärung kann eine quantitative, thermische Inaktivierung aller Glycosidasen im Speichel herangezogen werden. Während bei der

unbehandelten Probe durch die noch vorhandene Aktivität der Enzyme Abbauprozesse im Laufe der Probenvorbereitung passieren, tritt bei der thermisch behandelten Probe keinerlei Deglycosylierung auf. Diese Beobachtung bestätigt ebenfalls die oben erwähnte Vermutung, dass auch bei der Probenvorbereitung Abbauprozesse auftreten können, sodass ohne SOP und gleicher Behandlung aller Proben keine Vergleichbarkeit gegeben ist. Jedoch scheint die vollständige Inaktivierung durch thermische Energie eine Lösung für das Problem des Glycanabbaus darzustellen. Nach oder im Idealfall während der Probenahme muss der Probenbehälter für mehrere Minuten erhitzt werden, was auch unter Berücksichtigung des Klinikalltags möglich ist.

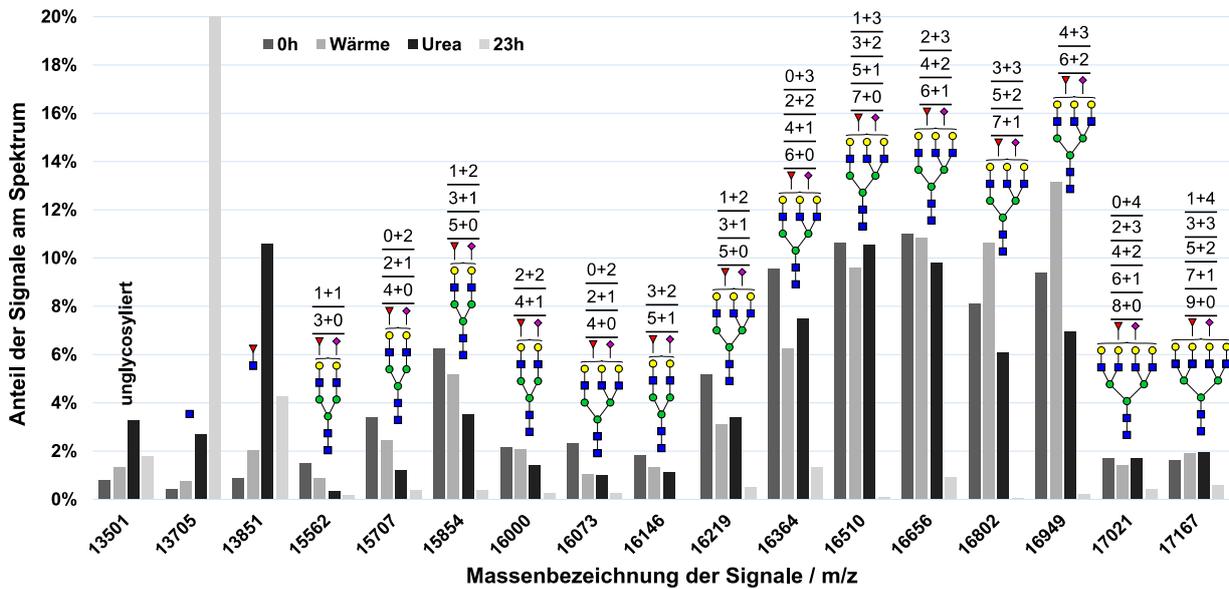


Abb. 52: Versuch zur möglichen Inhibition des Glycanabbaus durch Behandlung mit thermischer Energie oder chaotropen Reagenzien (Werte in Tab. 37 im Anhang). Bei den Koeffizienten handelt es sich um die Summe der Einzelkoeffizienten der unter einem Signal auftretenden Glycoformen. Die Zahlen über den Grundstrukturen der entsprechenden Glycoformen geben die möglichen Kombinationen der Fucose- und Sialinsäureanzahl an. Von links nach rechts sind jeweils folgende Daten dargestellt: 1) PIP einer unbehandelten und direkt eingefrorenen Probe, 2) PIP einer mit Wärme (17 Minuten bei 96 °C) behandelten und anschließend für 23 Stunden bei 21 °C inkubierten Probe, 3) PIP einer mit Harnstoff (Endkonzentration: 6 M) behandelten und anschließend für 23 Stunden bei 21 °C inkubierten Probe, 4) PIP einer unbehandelten und anschließend für 23 Stunden bei 21 °C inkubierten Probe. Durch die mathematische Betrachtung der Spektren zeigt sich, dass durch die chemische Behandlung der Probe keine vollständige Inaktivierung der Enzyme gelungen ist. Im Vergleich mit der Positivkontrolle kommt es beispielsweise trotzdem zu Abspaltungen von Sialinsäuren, was durch die Reduktion des Signals bei m/z 16949 um etwa 25% zu erkennen ist. Dennoch ist die Enzymaktivität im Gegensatz zur Negativkontrolle deutlich herabgesetzt worden. Die thermische Behandlung der Probe zeigt eine vermutlich quantitative Inaktivierung der Enzyme, sodass bei der Probenvorbereitung keine Abbauprozesse auftreten können. Der Balken bei m/z 13705 und 23 Stunden wurde zur besseren Sichtbarkeit der anderen Balken bei 20% (Wert: 64%) abgeschnitten.

Der variierende Anteil der Cystatin-S-Signale am Spektrum sollte an dieser Stelle ebenfalls kurz diskutiert werden. Die chemischen oder thermischen Vorbehandlungen scheinen demnach einen gewissen Einfluss auf die spätere Aufreinigung zu haben. Es stellt sich hierbei

die Frage, ob dieser Einfluss nur auf das Cystatin-S zutrifft oder ob PIP ebenfalls nach der Isolierung in unterschiedlichen Konzentrationen vorliegt. Die absolute Intensität der PIP-Signale im Massenspektrum sowie das Signal-zu-Rausch-Verhältnis, das mithilfe der *MS-Software DataAnalysis* bestimmt werden kann, deuten nicht darauf hin, dass PIP signifikante Konzentrationsänderungen durch die Vorbehandlung aufweist. Der genaue Grund für den unterschiedlichen Cystatin-S-Gehalt in den Proben konnte nicht abschließend geklärt werden. Als mögliche Erklärung kann der Einfluss der Denaturierung auf chemische und physikalische Parameter des Cystatin-S dienen, sodass dessen Trennung von PIP je nach Vorbehandlung variiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der bereits bei geringen Temperaturen auftretende Glycanabbau ein großes Problem für die Verwendung von PIP als Biomarker darstellt, da ohne eine exakte Einhaltung einer SOP bei allen Proben keine Vergleichbarkeit gegeben ist. In diesem Protokoll müssen detaillierte Vorgaben zur Probenahme (z.B. Dauer der Speichelakkumulation im Mund), zum Transport und zur Probenhandhabung (z.B. Länge und Temperatur der Zentrifugationen, Dauer der Lyophilisation) aufgeführt werden, sodass jede Person bei der gleichen Probe reproduzierbare Daten erhalten kann. Diese Beobachtungen zeigen deutlich, dass eine Enzyminhibition von großem Nutzen ist. Neben der Möglichkeit, spezifische, aber teure Glycosidaseinhibitoren zu verwenden, konnte während dieser Arbeit eine alternative Lösung für das Problem des Glycanabbaus erarbeitet werden. Durch eine einfache und schnelle thermische Behandlung der Probe ist eine vollständige Inaktivierung der Enzyme im Speichel möglich, sodass hinsichtlich der Deglycosylierung nur noch die Prozedur der Probenahme hoch standardisiert sein muss. Der Einsatz von PIP als Biomarker ist also nach wie vor möglich.

Der erfolgreiche Einsatz von PIP als Biomarker benötigt zunächst die Erstellung einer SOP, wobei im Idealfall eine schnellstmögliche thermische Inaktivierung im Fokus stehen sollte. Durch die Validierung und Evaluation der PIP-Analyse sowie der Identifikation und Darstellung von Lösungsmöglichkeiten einiger großer Probleme dient diese Arbeit als hervorragende Grundlage, um die nächsten vielversprechenden Schritte auf dem Weg zur Etablierung von PIP als Biomarker für Brustkrebs zu absolvieren.

5 Zusammenfassung

Trotz der großen Anzahl an Publikationen mit potentiellen Biomarkern für Krebs ist deren Einsatz im klinischen Alltag gering. Als Grund hierfür sind verschiedene (prä-)analytische Faktoren wie beispielsweise eine fehlerhafte Probenahme oder Probenhandhabung sowie eine unkritische Betrachtung der Datenauswertung zu nennen.^[27] Durch genaue Evaluations- und Validierungsprozesse lassen sich diese Probleme beheben. Eine weitere Herausforderung beim klinischen Einsatz von Biomarkern ist die geringe Spezifität. Es wird angenommen, dass die Analyse abweichender Glycosylierungsmuster zu einer erhöhten Spezifität führen kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei potentielle Biomarker mittels massenspektrometrischer Methoden untersucht: β_2 -Glycoprotein 1 (B2GPI) aus Blut und *Prolactin-inducible Protein* (PIP) aus Speichel.

Zur Untersuchung der Glycosylierung von B2GPI wurde zunächst eine von der Fa. Merck erworbene Probe auf Ebene des intakten Proteins und auf Peptidebene analysiert. Hierbei gelang die positionsspezifische Analyse der Glycosylierung aller vier Glycosylierungsstellen sowie die Identifikation und Quantifizierung eines Aminosäureaustausches (V266L, rs4581, Allelfrequenz: 75%). Trotz der hohen Komplexität des Massenspektrums des intakten Proteins zeigt eine *Matlab*-unterstützte Analyse großes Potential.

Zur Validierung der einfachen Analyse des intakten Proteins und des Signal-basierten Ansatzes sowie zur Generierung von Referenzdaten wurde B2GPI aus dem Blutplasma von 20 Probanden isoliert und analysiert. Der Vergleich der erhaltenen Spektren zeigt überwiegend sehr ähnliche Glycosylierungsmuster. Dennoch konnten auch Probanden mit deutlichen Abweichungen hinsichtlich der Quantität einzelner Glycoformen beobachtet werden. Neben verschiedenen Glycoformen wurden drei genetische Varianten identifiziert: S107N ApoH*1 / V266L ApoH*2 / I141T, R154H und W335S ApoH*3^W.

Die Isolierung und Analyse von B2GPI aus Blutplasma von 20 gesunden Probanden legt eine gute Grundlage für weitere Studien, die sich beispielsweise auf eine Anwendung von B2GPI als Glyco-basierten Biomarker fokussieren. Es wurde ein schneller und einfacher Signal-basierter Ansatz für den Vergleich von B2GPI aus gesunden und erkrankten Probanden beschrieben, was einen großen Schritt für die potentielle Anwendung von B2GPI als Biomarker darstellt.

Bei der Untersuchung von PIP wurden verschiedenste Faktoren evaluiert: Elutionsverhalten, Belastbarkeit der computergestützten Analyse, Reproduzierbarkeit, Zeitpunkt der Probenahme und Probenlagerung. Durch die Untersuchung des Elutionsverhaltens konnte festgestellt werden, dass sowohl bei den Bi- als auch bei den Triantennen zu Beginn der Elution keine sialylierten Strukturen zu beobachten sind, was eine erhebliche Reduktion der

Spektralkomplexität bedeutet. Es ist damit also möglich, eine Analyse basierend auf der Fucosylierung durchzuführen.

Die Belastbarkeit des verwendeten *Matlab*-Skripts ist für die Analyse von PIP von sehr großem Interesse, da die Quantifizierung aufgrund der hohen Komplexität durch die Überlagerung mehrerer Glycoformen zu einem Signal nur durch computergestützte Methoden möglich ist. Es wurde überprüft, welchen Einfluss die manuell einzustellenden Parameter *Shift* und Linienbreite haben. Es konnte gezeigt werden, dass vor allem die gering konzentrierten Glycoformen bei minimalen Abweichungen dieser Parameter nicht korrekt quantifiziert werden. Für eine Glycan-spezifische Anwendung von PIP als Biomarker ist demnach die Implementierung einer automatisierten Bestimmung der Parameter in das Skript sinnvoll. Das Skript bietet jedoch bereits jetzt die Möglichkeit einer Signal-basierten Analyse (Summe der Koeffizienten eines Signals), welche ebenfalls zur Identifikation von Glycan-spezifischen Unterschieden zwischen gesunden und erkrankten Probanden führen kann. Die computergestützte Analyse ist also auch weiterhin insbesondere nach den angesprochenen Optimierungen für den medizinischen Bereich von großem Interesse.

Die Betrachtung der Reproduzierbarkeit der Daten sollte insbesondere Einschätzungen bezüglich messtechnischer Variationen sowie Unterschiede durch die Handhabung ermöglichen. Neben messtechnischen Schwankungen von etwa 3.5% (relativ) konnten bei den parallel bearbeiteten Proben deutliche Unterschiede hinsichtlich der Quantität der Glycoformen von bis zu 16% identifiziert werden. Diese Beobachtung stellt die Notwendigkeit eines sehr genauen Standardprotokolls (SOP, *Standard Operating Procedure*) dar, wenn die Methode insbesondere auch kleine, pathologisch bedingte Varianzen identifizieren soll.

Die Probenahme ist ebenfalls ein sehr wichtiger Schritt auf dem Weg zur Anwendung von PIP als Biomarker. Es stellt sich die Frage, ob die kontinuierliche Speichelproduktion und die damit verbundene stetige Biosynthese der Glycoproteine im Hinblick auf die Glycosylierung eine zeitliche Stabilität ermöglicht. Es konnte gezeigt werden, dass der Zeitpunkt der Probenahme einen sehr wichtigen Parameter darstellt, da es innerhalb eines Tages zu einer Zu- und Abnahme bestimmter Glycoformen kommt. Hier sind vor allem die sialylierten Strukturen zu nennen, deren Gehalt im Laufe eines Tages sehr stark abnimmt.

Zuletzt wurde der Einfluss der Probelagerung auf die Glycosylierung untersucht, wobei ein besonderes Augenmerk auf die Einhaltung der Kühlkette gelegt wurde. Hierfür wurden Speichelproben für verschiedene Zeiten bei 4, 21 und 37 °C inkubiert. Bei allen Temperaturen zeigen sich erhebliche Abbauprozesse, welche zunächst insbesondere einer Desialylierung entsprechen. Wie zu erwarten war, konnte die höchste Abbaugeschwindigkeit bei 37 °C festgestellt werden. Durch kinetische Untersuchungen des Abbauprozesses bei 37 °C konnten die Halbwertszeiten sialylierter Strukturen (81 min bei Biantennen bzw. 52 min bei Tri-

antennen) bestimmt werden. Um die Problematik des Glycanabbaus zu umgehen, wurden Experimente zur Inaktivierung der Enzyme im Speichel durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine thermische Behandlung der Probe zur vollständigen Inaktivierung der Enzyme führt. Diese Entdeckung ist sehr wichtig, da die Prozedur der Probenahme hoch standardisiert werden muss.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Methode der Analyse von PIP evaluiert wurde, wobei erfolgreich die kritischen Punkte herausgearbeitet werden konnten. Es sollte betont werden, dass die untersuchte Methode für PIP als Biomarker trotz dieser Punkte von sehr großem Interesse ist. Die bisher während dieser Arbeit beobachteten Probleme, die eine exakte Quantifizierung erschweren, führen dazu, dass bisher mit der Standardmethode nur eine große pathologische Varianz identifiziert werden kann. Wenn die in den einzelnen Kapiteln angesprochenen Optimierungen vorgenommen werden, kann die gewünschte Reduktion der experimentellen Varianz erreicht werden. Somit ist dann auch die Identifikation von sehr geringen, pathologischen Varianzen möglich.

6 Summary

Although there are numerous publications dealing with potential biomarkers for cancer, their use in the clinic is limited. The reasons range from (pre-)analytical factors like incorrect sample handling to inappropriate data analysis.^[27] These problems can be solved by accurate evaluation and validation. Another great challenge for the use of biomarkers is their poor specificity. Many studies show that the analysis of protein glycosylation is a promising approach to increase the specificity of biomarker.

This thesis deals with the analysis of two potential biomarkers with mass spectrometry: β_2 -*Glycoprotein I* (B2GPI) from blood plasma and *Prolactin-inducible Protein* (PIP) from saliva.

A pooled sample from Merck was analyzed using MS-data from intact B2GPI and MS/MS-data from enzymatic digestions to study the glycosylation of B2GPI. A site-specific analysis of all glycosylation sites was successful for the first time. Furthermore, an amino acid exchange could be identified and quantified (V266L, rs4581, allele frequency: 75%). A very promising approach to a signal-based analysis for biomarkers with highly complex datasets using *Matlab* could be established.

In order to validate the signal-based approach and to generate reference data, B2GPI from blood plasma of 20 healthy subjects was isolated and analyzed. The spectra of the intact B2GPI show a high similarity. However, some significant differences in the quantity of some glycoforms between different subjects were observed. In addition to many glycoforms, three genetic variants of B2GPI were identified: S107N ApoH*1 / V266L ApoH*2 / I141T, R154H and W335S ApoH*3^W.

The isolation and analysis of B2GPI from 20 healthy subjects is a good basis for future studies concerning the suitability of B2GPI as a glyco-based biomarker. The fast and easy signal-based approach for the comparison of B2GPI from healthy and diseased subjects could be a great step towards the use of B2GPI as biomarker.

During the analysis of PIP, many different factors were evaluated and validated: elution profile, capability of the computer-based analysis, reproducibility, time of sampling and sample storage. The analysis of the elution profile shows, that no structures with sialic acid occur at the beginning of the elution. Therefore, it is possible to perform a fucose-based analysis.

The study of the capability of the used *Matlab* script is of great interest, because the overlap of several glycoforms results in a high spectrum complexity and requires a computer-based approach for quantification. Here, the influence of the manually set parameters shift and line width was reviewed. Already small deviations of shift and line width lead to a false quantification of glycoforms, especially for low concentrated glycans. Therefore, a glyco-based

application of PIP as biomarker needs an automatic determination of these parameters. However, the *Matlab* script already allows the possibility of a signal-based analysis (sum of coefficients of one signal). This analysis can also lead to an identification of glyco-specific differences between healthy and diseased subjects. The computer-based method remains of great interest for medical use, especially after the mentioned optimization.

The examination of the reproducibility of the data allows an estimate of variations due to sample handling and measurement techniques. In addition to technical-based deviations (up to 3.5%, relative), the analysis of three parallel handled samples shows significant differences in terms of glycan quantity (up to 16%, relative). This observation proves the necessity of a SOP (Standard Operating Procedure) if the method should identify low pathological variances in particular.

The sampling is an important step if PIP were to be used as biomarker. It is necessary to know, if continuous saliva production and steady biosynthesis of the glycoproteins affect the stability of the glycan structures. It was shown, that the time of sampling is an important parameter. Over one day some glycoforms decrease and some others increase in concentration. Especially glycoforms with sialic acids show a reduction.

Finally, the influence of sample storage on glycosylation was investigated, with particular attention being paid to maintaining an uninterrupted cooling chain. Aliquots of identical saliva were incubated at 4, 21 and 37 °C for different times. There are significant degradation processes at all temperatures, which initially correspond to a desialylation. With further progress in time, the glycans are degraded stepwise and almost completely. As expected, the highest degradation rate could be observed at 37 °C. The half-lives of sialylated structures were determined by kinetic analysis (81 min for biantenna and 52 min for triantenna) of the degradation process at 37 °C. Experiments for chemical and thermal inactivation of saliva enzymes were performed. These experiments show, that even during sample preparation degradation processes are already occurring. Furthermore, thermal treatment of the sample leads to a complete inactivation of the degrading enzymes. This observation is very important because with regard to the deglycosylation only the procedure of sampling has to be identical.

In summary, the analysis method of PIP was evaluated and validated resulting in a successful identification of all critical points. It should be noted that the used method for PIP as a biomarker still is of great interest. The problems observed in this thesis, which complicate an exact quantification, lead to the fact that at the moment only a high pathological variance can be identified. If all mentioned optimizations are carried out and the desired reduction of the experimental variance is achieved, the identification of very low pathological variances is also possible.

7 Sicherheit

Substanz	Gefahrenpiktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Acetonitril (HiPerSolv CHROMANORM)	 	225, 302, 312, 319, 332	210, 305+338+351, 403+235
Ameisensäure (99-100%)	  	226, 302, 314, 331	260, 280, 301+330+331, 305+338+351, 309+310
2-Aminoethanol	 	302, 312, 332, 314, 335, 412	261, 273, 301+312, 330, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338
Ammoniak (25%)	  	290, 314, 335, 400	260, 273, 280, 301+330+331, 304+340, 305+338+351, 309+310
Ammoniumhydrogen-carbonat		302	301+312
anti-BRST-2 Antibody		kein gefährlicher Stoff*	
Calciumchlorid		319	305+338+351
Dinatriumhydrogen-phosphat		kein gefährlicher Stoff*	
1,4-D/L-Dithiothreitol		302, 315, 319	302+352, 305+338+351
Endoproteinase GluC		kein gefährlicher Stoff*	
Essigsäure (96%)	 	226, 290, 314	280, 301+330+331, 305+338+351, 307+310
Ethanol	 	225	210
Glycin		kein gefährlicher Stoff*	
Harnstoff		kein gefährlicher Stoff*	
2-Iodacetamid	 	301, 317, 334, 413	261, 280, 301+310, 311+342

Substanz	Gefahrenpiktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Kaliumchlorid		kein gefährlicher Stoff*	
Kaliumdihydrogenphosphat		kein gefährlicher Stoff*	
Natriumazid		300+310, 373, 410, EUH032	273, 280, 301+310+330, 302+352+310, 391, 501
Natriumacetat		kein gefährlicher Stoff*	
Natriumchlorid		kein gefährlicher Stoff*	
Natriumdihydrogenphosphat		kein gefährlicher Stoff*	
Natriumhydrogencarbonat		kein gefährlicher Stoff*	
Neuraminidase		kein gefährlicher Stoff*	
NHS-activated magnetic beads		312, 331, 360Fd	302+352, 304+340, 201, 261, 312, 280
PNGase F		kein gefährlicher Stoff*	
Polyethylenglycol 4000		kein gefährlicher Stoff*	
Salzsäure (37%)		290, 314, 335	261, 280, 305+338+351, 310
Thermolysin		315, 317, 319, 334, 335	261, 280, 305+338+351, 311+342
Tris(hydroxymethyl)aminomethan		kein gefährlicher Stoff*	
Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid		kein gefährlicher Stoff*	
Trypsin		315, 319, 334, 335	261, 280, 305+338+351, 311+342
Tuning Mix ES-TOF		225, 302+332, 319	210, 305+338+351

* Dieser Stoff ist nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 nicht als gefährlich eingestuft.

Es wurden keine KMR-Stoffe der Kategorie 1a oder 1b (GHS-Verordnung) verwendet.

7.1 Arbeiten mit biologischem Probenmaterial

Das Arbeiten mit biologischen Stoffen und Probenmaterialien ist in Deutschland durch die EU-Richtlinie 2000/54/EG und die Biostoffverordnung (BioStoffV) geregelt.

Bei nicht gezielten Tätigkeiten mit Biostoffen aus humanen Körperflüssigkeiten wie Blut oder Speichel werden vier Risikogruppen und entsprechend vier Schutzstufen unterschieden. Die Einstufung erfolgt hierbei durch verschiedene Faktoren wie die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Risikostoffs oder die Art und Dauer der Tätigkeit. Die TRBA100 (Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe) empfehlen bei humanen Probenmaterialien, deren Infektionsstatus unbekannt ist, die Tätigkeiten unter den Bedingungen der Schutzstufe 2 durchzuführen. Sind die Proben jedoch HIV-, HBV- und HCV-negativ, reichen die Bedingungen der Schutzstufe 1. Es wurde daher alle Proben unter den Bedingungen der Schutzstufe 1 behandelt.

8 Literatur

- [1] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemie*, 6 ed., Elsevier GmbH, München, **2007**.
- [2] F. Crick, Central Dogma of Molecular Biology. *Nature* **1970**, *227*, 561-563.
- [3] C. T. Lu, K. Y. Huang, M. G. Su, T. Y. Lee, N. A. Bretana, W. C. Chang, Y. J. Chen, H. D. Huang, DbPTM 3.0: an informative resource for investigating substrate site specificity and functional association of protein post-translational modifications. *Nucleic Acids Res* **2013**, *41*, D295-305.
- [4] S. Shi, L. Wang, M. Cao, G. Chen, J. Yu, Proteomic analysis and prediction of amino acid variations that influence protein posttranslational modifications. *Briefings in Bioinformatics* **2018**, bby036-bby036.
- [5] List of PTMs (ptmlist.txt), zu finden unter www.uniprot.org, **05/2018**.
- [6] E. b. A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, A. G. Darvill, T. Kinoshita, N. H. Packer, J. H. Prestegard, R. L. Schnaar, P. H. Seeberger, *Essentials of Glycobiology*, 3 ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), **2017**.
- [7] M. E. Taylor, K. Drickamer, *Introduction to Glycobiology*, 3 ed., Oxford University Press Inc., New York, **2011**.
- [8] K. Ohtsubo, J. D. Marth, Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* **2006**, *126*, 855-867.
- [9] N. H. Packer, C. W. von der Lieth, K. F. Aoki-Kinoshita, C. B. Lebrilla, J. C. Paulson, R. Raman, P. Rudd, R. Sasisekharan, N. Taniguchi, W. S. York, Frontiers in glycomics: bioinformatics and biomarkers in disease. An NIH white paper prepared from discussions by the focus groups at a workshop on the NIH campus, Bethesda MD (September 11-13, 2006). *Proteomics* **2008**, *8*, 8-20.
- [10] R. Apweiler, H. Hermjakob, N. Sharon, On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Bba-Gen Subjects* **1999**, *1473*, 4-8.
- [11] A. Varki, Biological roles of glycans. *Glycobiology* **2017**, *27*, 3-49.
- [12] P. M. Rudd, T. Elliott, P. Cresswell, I. A. Wilson, R. A. Dwek, Glycosylation and the immune system. *Science* **2001**, *291*, 2370-2376.
- [13] C. C. Xu, D. T. W. Ng, Glycosylation-directed quality control of protein folding. *Nat Rev Mol Cell Bio* **2015**, *16*, 742-752.
- [14] M. Wührer, A. M. Deelder, C. H. Hokke, Protein glycosylation analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2005**, *825*, 124-133.

- [15] H. Lis, N. Sharon, Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *Eur J Biochem* **1993**, *218*, 1-27.
- [16] D. B. Werz, R. Ranzinger, S. Herget, A. Adibekian, C. W. von der Lieth, P. H. Seeberger, Exploring the structural diversity of mammalian carbohydrates ("glycospace") by statistical databank analysis. *ACS Chem Biol* **2007**, *2*, 685-691.
- [17] O. Seitz, Glycopeptide synthesis and the effects of glycosylation on protein structure and activity. *Chembiochem* **2000**, *1*, 214-246.
- [18] A. Dell, Structures of glycoprotein glycans. *Australian Journal of Chemistry* **2002**, *55*, 27-37.
- [19] R. G. Spiro, Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* **2002**, *12*, 43R-56R.
- [20] A. Helenius, M. Aebi, Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **2001**, *291*, 2364-2369.
- [21] M. Aebi, R. Bernasconi, S. Clerc, M. Molinari, N-glycan structures: recognition and processing in the ER. *Trends Biochem Sci* **2010**, *35*, 74-82.
- [22] S. Hakomori, Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism. *Cancer Res* **1996**, *56*, 5309-5318.
- [23] S. Hakomori, Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99*, 10231-10233.
- [24] H. H. Freeze, E. A. Eklund, B. G. Ng, M. C. Patterson, Neurology of inherited glycosylation disorders. *Lancet Neurol* **2012**, *11*, 453-466.
- [25] D. H. Dube, C. R. Bertozzi, Glycans in cancer and inflammation--potential for therapeutics and diagnostics. *Nat Rev Drug Discov* **2005**, *4*, 477-488.
- [26] S. R. Stowell, T. Z. Ju, R. D. Cummings, Protein Glycosylation in Cancer. *Annu Rev Pathol-Mech* **2015**, *10*, 473-510.
- [27] M. P. Pavlou, E. P. Diamandis, I. M. Blasutig, The long journey of cancer biomarkers from the bench to the clinic. *Clin Chem* **2013**, *59*, 147-157.
- [28] CDER Biomarker Qualification Program, zu finden unter www.fda.gov, **04/2018**.
- [29] List of Qualified Biomarkers, Biomarker Qualification Program, zu finden unter www.fda.gov, **04/2018**.
- [30] P. G. de Groot, J. C. Meijers, beta(2) -Glycoprotein I: evolution, structure and function. *J Thromb Haemost* **2011**, *9*, 1275-1284.
- [31] H. E. Schultze, K. Heide, H. Haupt, Über ein bisher unbekanntes niedermolekulares Beta2-Globulin des Humanserums. *Naturwissenschaften* **1961**, *48*, 719.
- [32] J. Lozier, N. Takahashi, F. W. Putnam, Complete amino acid sequence of human plasma beta 2-glycoprotein I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1984**, *81*, 3640-3644.

- [33] A. Steinkasserer, C. Estaller, E. H. Weiss, R. B. Sim, A. J. Day, Complete nucleotide and deduced amino acid sequence of human beta 2-glycoprotein I. *Biochem J* **1991**, *277 (Pt 2)*, 387-391.
- [34] I. Schousboe, beta 2-Glycoprotein I: a plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway. *Blood* **1985**, *66*, 1086-1091.
- [35] D. A. Kandiah, S. A. Krilis, Beta2-Glycoprotein-I. *Lupus* **1994**, *3*, 207-212.
- [36] B. Bouma, P. G. de Groot, J. M. van den Elsen, R. B. Ravelli, A. Schouten, M. J. Simmelink, R. H. Derksen, J. Kroon, P. Gros, Adhesion mechanism of human beta(2)-glycoprotein I to phospholipids based on its crystal structure. *EMBO J* **1999**, *18*, 5166-5174.
- [37] R. Gambino, G. Ruiu, G. Pagano, M. Cassader, Characterization of the carbohydrate structures of apolipoprotein H through concanavalin A affinity chromatography. *Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling* **1997**, *16*, 11-21.
- [38] Beta-2-glycoprotein 1, zu finden unter www.uniprot.org, **08/2014**.
- [39] M. Hammel, M. Kriechbaum, A. Gries, G. M. Kostner, P. Laggner, R. Prassl, Solution structure of human and bovine beta(2)-glycoprotein I revealed by small-angle X-ray scattering. *J Mol Biol* **2002**, *321*, 85-97.
- [40] C. Agar, G. M. A. van Os, M. Morgelin, R. R. Sprenger, J. A. Marquart, R. T. Urbanus, R. H. W. M. Derksen, J. C. M. Meijers, P. G. de Groot, beta(2)-Glycoprotein I can exist in 2 conformations: implications for our understanding of the antiphospholipid syndrome. *Blood* **2010**, *116*, 1336-1343.
- [41] D. K. Sanghera, D. R. Wagenknecht, J. A. McIntyre, M. I. Kamboh, Identification of structural mutations in the fifth domain of apolipoprotein H(beta 2-glycoprotein I) which affect phospholipid binding. *Human Molecular Genetics* **1997**, *6*, 311-316.
- [42] D. K. Sanghera, T. Kristensen, R. F. Hamman, M. I. Kamboh, Molecular basis of the apolipoprotein H (beta 2-glycoprotein I) protein polymorphism. *Hum Genet* **1997**, *100*, 57-62.
- [43] Y. H. Sheng, A. Sali, H. Herzog, J. Lahnstein, S. A. Krilis, Site-directed mutagenesis of recombinant human beta(2)-glycoprotein I identifies a cluster of lysine residues that are critical for phospholipid binding and anti-cardiolipin antibody activity. *Journal of Immunology* **1996**, *157*, 3744-3751.
- [44] H. P. Mcneil, R. J. Simpson, C. N. Chesterman, S. A. Krilis, Antiphospholipid Antibodies Are Directed against a Complex Antigen That Includes a Lipid-Binding Inhibitor of Coagulation - Beta-2-Glycoprotein-I (Apolipoprotein-H). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1990**, *87*, 4120-4124.

- [45] G. M. Iverson, S. Reddel, E. J. Victoria, K. A. Cockerill, Y. X. Wang, M. A. Marti-Renom, A. Sali, D. M. Marquis, S. A. Krilis, M. D. Linnik, Use of single point mutations in domain I of beta 2-glycoprotein I to determine fine antigenic specificity of antiphospholipid autoantibodies. *J Immunol* **2002**, *169*, 7097-7103.
- [46] M. Ieko, K. Ichikawa, D. A. Triplett, E. Matsuura, T. Atsumi, K. Sawada, T. Koike, beta(2)-glycoprotein I is necessary to inhibit protein C activity by monoclonal anticardiolipin antibodies. *Arthritis and rheumatism* **1999**, *42*, 167-174.
- [47] S. Yasuda, T. Atsumi, M. Ieko, E. Matsuura, K. Kobayashi, J. Inagaki, H. Kato, H. Tanaka, M. Yamakado, M. Akino, H. Saitou, Y. Amasaki, S. Jodo, O. Amengual, T. Koike, Nicked beta2-glycoprotein I: a marker of cerebral infarct and a novel role in the negative feedback pathway of extrinsic fibrinolysis. *Blood* **2004**, *103*, 3766-3772.
- [48] T. Shi, G. M. Iverson, J. C. Qi, K. A. Cockerill, M. D. Linnik, P. Konecny, S. A. Krilis, beta(2)-Glycoprotein I binds factor XI and inhibits its activation by thrombin and factor XIIa: Loss of inhibition by clipped beta(2)-glycoprotein I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 3939-3944.
- [49] S. Rahgozar, B. Giannakopoulos, X. Yan, J. Wei, J. Cheng Qi, R. Gemmell, S. A. Krilis, Beta2-glycoprotein I protects thrombin from inhibition by heparin cofactor II: potentiation of this effect in the presence of anti-beta2-glycoprotein I autoantibodies. *Arthritis Rheum* **2008**, *58*, 1146-1155.
- [50] P. Sultanik, V. Mallet, S. Lagaye, A. Casrouge, C. Dorival, Y. Barthe, H. Fontaine, C. Hezode, E. Mottez, J. P. Bronowicki, F. Carrat, I. Theodorou, L. Abel, E. Gayat, A. Fontanet, S. Pol, M. L. Albert, A. Co20-Cupic, Plasma apolipoprotein H limits HCV replication and associates with response to NS3 protease inhibitors-based therapy. *Liver Int* **2015**, *35*, 1833-1844.
- [51] K. Y. Lin, J. P. Pan, D. L. Yang, K. T. Huang, M. S. Chang, P. Y. Ding, A. N. Chiang, Evidence for inhibition of low density lipoprotein oxidation and cholesterol accumulation by apolipoprotein H (beta2-glycoprotein I). *Life Sci* **2001**, *69*, 707-719.
- [52] D. N. Prokert, The relation of sex, smoking status, birth rank, and parental age to beta2-glycoprotein I levels and phenotypes in a sample of Australian Caucasian adults. *Hum Genet* **1978**, *43*, 281-288.
- [53] H. Mehdi, S. Manzi, P. Desai, Q. Chen, C. Nestlerode, F. Bontempo, S. C. Strom, R. Zarnegar, M. I. Kamboh, A functional polymorphism at the transcriptional initiation site in beta(2)-glycoprotein I (apolipoprotein H) associated with reduced gene expression and lower plasma levels of beta(2)-glycoprotein I. *European Journal of Biochemistry* **2003**, *270*, 230-238.

- [54] M. S. Leduc, L. C. Shimmin, K. L. Klos, C. Hanis, E. Boerwinkle, J. E. Hixson, Comprehensive evaluation of apolipoprotein H gene (APOH) variation identifies novel associations with measures of lipid metabolism in GENOA. *J Lipid Res* **2008**, *49*, 2648-2656.
- [55] K. H. Yu, A. K. Rustgi, I. A. Blair, Characterization of proteins in human pancreatic cancer serum using differential gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. *Journal of Proteome Research* **2005**, *4*, 1742-1751.
- [56] R. Chen, E. C. Yi, S. Donohoe, S. Pan, J. Eng, K. Cooke, D. A. Crispin, Z. L. Lane, D. R. Goodlett, M. P. Bronner, R. Aebersold, T. A. Brentnall, Pancreatic cancer proteome: The proteins that underlie invasion, metastasis, and immunologic escape. *Gastroenterology* **2005**, *129*, 1187-1197.
- [57] R. Yamashita, Y. Fujiwara, K. Ikari, K. Hamada, A. Otomo, K. Yasuda, M. Noda, Y. Kaburagi, Extracellular proteome of human hepatoma cell, HepG2 analyzed using two-dimensional liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Molecular and Cellular Biochemistry* **2007**, *298*, 83-92.
- [58] B. Borgia, C. Roesli, T. Fugmann, C. Schliemann, M. Cesca, D. Neri, R. Giavazzi, A proteomic approach for the identification of vascular markers of liver metastasis. *Cancer Res* **2010**, *70*, 309-318.
- [59] R. Gambino, G. Ruiu, G. Pagano, M. Cassader, Study of the glycosylation of apolipoprotein H. *Chem Phys Lipids* **1999**, *103*, 161-174.
- [60] A. Kondo, M. Thaysen-Andersen, K. Hjerno, O. N. Jensen, Characterization of sialylated and fucosylated glycopeptides of beta2-glycoprotein I by a combination of HILIC LC and MALDI MS/MS. *J Sep Sci* **2010**, *33*, 891-902.
- [61] V. Umadat, O. Ihedioha, R. Shiu, J. Uzonna, Y. Myal, The prolactin-inducible-protein (PIP): A regulatory molecule in adaptive and innate immunity. *Open Journal of Immunology* **2013**, *3*.
- [62] M. I. Hassan, A. Waheed, S. Yadav, T. P. Singh, F. Ahmad, Prolactin inducible protein in cancer, fertility and immunoregulation: structure, function and its clinical implications. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2009**, *66*, 447-459.
- [63] Y. Myal, D. B. Robinson, B. Iwasiow, D. Tsuyuki, P. Wong, R. P. Shiu, The prolactin-inducible protein (PIP/GCDFP-15) gene: cloning, structure and regulation. *Mol Cell Endocrinol* **1991**, *80*, 165-175.
- [64] J. Schaller, K. Akiyama, H. Kimura, D. Hess, M. Affolter, E. E. Rickli, Primary Structure of a New Actin-Binding Protein from Human Seminal Plasma. *European Journal of Biochemistry* **1991**, *196*, 743-750.

- [65] W. W. C. Chiu, L. W. Chamley, Human seminal plasma prolactin-inducible protein is an immunoglobulin G-binding protein. *Journal of Reproductive Immunology* **2003**, *60*, 97-111.
- [66] D. E. Haagensen, Jr., W. G. Dilley, G. Mazoujian, S. A. Wells, Jr., Review of GCDFP-15. An apocrine marker protein. *Ann N Y Acad Sci* **1990**, *586*, 161-173.
- [67] L. C. Murphy, D. Tsuyuki, Y. Myal, R. P. Shiu, Isolation and sequencing of a cDNA clone for a prolactin-inducible protein (PIP). Regulation of PIP gene expression in the human breast cancer cell line, T-47D. *J Biol Chem* **1987**, *262*, 15236-15241.
- [68] Prolactin inducible protein, zu finden unter www.uniprot.org, **03/2016**.
- [69] R. P. Shiu, B. M. Iwaszow, Prolactin-inducible proteins in human breast cancer cells. *J Biol Chem* **1985**, *260*, 11307-11313.
- [70] E. Caputo, A. Camarca, R. Moharram, P. Tornatore, B. Thatcher, J. Guardiola, B. M. Martin, Structural study of GCDFP-15/gp17 in disease versus physiological conditions using a proteomic approach. *Biochemistry* **2003**, *42*, 6169-6178.
- [71] A. Wiegandt, H. N. Behnken, B. Meyer, Unusual N-type glycosylation of salivary prolactin-inducible protein (PIP): multiple Lewis(Y) epitopes generate highly-fucosylated glycan structures. *Glycoconjugate Journal* **2018**, *35*, 323-332.
- [72] M. I. Hassan, S. Bilgrami, V. Kumar, N. Singh, S. Yadav, P. Kaur, T. P. Singh, Crystal Structure of the Novel Complex Formed between Zinc alpha 2-Glycoprotein (ZAG) and Prolactin-Inducible Protein (PIP) from Human Seminal Plasma. *Journal of Molecular Biology* **2008**, *384*, 663-672.
- [73] L. C. P. M. Schenkels, E. C. I. Veerman, A. V. N. Amerongen, Ep-Gp and the Lipocalin Vegh 2 Different Human Salivary 20-Kda Proteins. *J Dent Res* **1995**, *74*, 1543-1550.
- [74] L. C. P. M. Schenkels, E. WalgreenWeterings, L. C. J. M. Oomen, J. G. M. Bolscher, E. C. I. Veerman, A. V. N. Amerongen, In vivo binding of the salivary glycoprotein EP-GP (identical to GCDFP-15) to oral and non-oral bacteria detection and identification of EP-GP binding species. *Biological Chemistry* **1997**, *378*, 83-88.
- [75] D. Klatzmann, E. Champagne, S. Chamaret, J. Gruest, D. Guetard, T. Hercend, J. C. Gluckman, L. Montagnier, Lymphocyte-T T4 Molecule Behaves as the Receptor for Human Retrovirus Lav. *Nature* **1984**, *312*, 767-768.
- [76] M. Autiero, M. Gaubin, J. C. Mani, C. Castejon, M. Martin, S. el Marhomy, J. Guardiola, D. Piatier-Tonneau, Surface plasmon resonance analysis of gp17, a natural CD4 ligand from human seminal plasma inhibiting human immunodeficiency virus type-1 gp120-mediated syncytium formation. *Eur J Biochem* **1997**, *245*, 208-213.

- [77] M. Gaubin, M. Autiero, S. Basmaciogullari, D. Metivier, Z. Mis hal, R. Culerrier, A. Oudin, J. Guardiola, D. Piatier-Tonneau, Potent inhibition of CD4/TCR-mediated T cell apoptosis by a CD4-binding glycoprotein secreted from breast tumor and seminal vesicle cells. *J Immunol* **1999**, *162*, 2631-2638.
- [78] A. Blanchard, A. Nistor, F. E. Castaneda, D. Martin, G. G. Hicks, F. Amara, R. P. C. Shiu, Y. Myal, Generation and initial characterization of the prolactin-inducible protein (PIP) null mouse: accompanying global changes in gene expression in the submandibular gland. *Can J Physiol Pharm* **2009**, *87*, 859-872.
- [79] E. Caputo, G. Manco, L. Mandrich, J. Guardiola, A novel aspartyl proteinase from apocrine epithelia and breast tumors. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 7935-7941.
- [80] C. Lopez-Otin, E. P. Diamandis, Breast and prostate cancer: An analysis of common epidemiological, genetic, and biochemical features. *Endocr Rev* **1998**, *19*, 365-396.
- [81] R. Hahnel, E. Hahnel, Expression of the PIP/GCDFP-15 gene and survival in breast cancer. *Virchows Archiv-an International Journal of Pathology* **1996**, *429*, 365-369.
- [82] R. P. C. Shiu, L. C. Murphy, D. Tsuyuki, Y. Myal, M. Leewing, B. Iwaslow, Biological Actions of Prolactin in Human-Breast Cancer. *Recent Prog Horm Res* **1987**, *43*, 277-303.
- [83] S. Loos, K. D. Schulz, R. Hackenberg, Regulation of GCDFP-15 expression in human mammary cancer cells. *Int J Mol Med* **1999**, *4*, 135-140.
- [84] D. E. Haagensen, P. Stewart, W. G. Dilley, S. A. Wells, Secretion of Breast Gross Cystic-Disease Fluid Proteins by T47d Breast-Cancer Cells in Culture - Modulation by Steroid-Hormones. *Breast Cancer Res Tr* **1992**, *23*, 77-86.
- [85] Y. Takeda, K. Tsuta, Y. Shibuki, T. Hoshino, N. Tochigi, A. M. Maeshima, H. Asamura, Y. Sasajima, T. Ito, Y. Matsuno, Analysis of expression patterns of breast cancer-specific markers (mammaglobin and gross cystic disease fluid protein 15) in lung and pleural tumors. *Arch Pathol Lab Med* **2008**, *132*, 239-243.
- [86] F. R. Fritzsche, A. Thomas, K. J. Winzer, B. Beyer, A. Dankof, J. Bellach, E. Dahl, M. Dietel, G. Kristiansen, Co-expression and prognostic value of gross cystic disease fluid protein 15 and mammaglobin in primary breast cancer. *Histol Histopathol* **2007**, *22*, 1221-1230.
- [87] Y. Nonami, S. Hisa, A. Yamamoto, S. Sasaguri, H. Kiyoku, H. Kurumaya, Immunohistochemical study with antibody to glycoprotein GCDFP-15 for metastatic lung cancer from breast cancer. *J Cardiovasc Surg* **2001**, *42*, 561-564.
- [88] W. R. Miller, A. A. Shivas, P. Franchimont, D. E. Haagensen, Breast Gross Cystic-Disease Protein-15 in Human-Breast Cancer in Culture. *Eur J Cancer Clin On* **1988**, *24*, 223-228.

- [89] M. Vanneste, A. Naderi, Prolactin-Induced Protein regulates cell adhesion in breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2015**, *468*, 850-856.
- [90] L. M. Sanchez, F. Vizoso, I. Diezitz, C. Lopezotin, Identification of the Major Protein-Components in Breast Secretions from Women with Benign and Malignant Breast Diseases. *Cancer Research* **1992**, *52*, 95-100.
- [91] D. Chalbos, D. Haagensen, T. Parish, H. Rochefort, Identification and androgen regulation of two proteins released by T47D human breast cancer cells. *Cancer Res* **1987**, *47*, 2787-2792.
- [92] J. W. Clark, L. Snell, R. P. Shiu, F. W. Orr, N. Maitre, C. P. Vary, D. J. Cole, P. H. Watson, The potential role for prolactin-inducible protein (PIP) as a marker of human breast cancer micrometastasis. *Br J Cancer* **1999**, *81*, 1002-1008.
- [93] S. Darb-Esfahani, G. von Minckwitz, C. Denkert, B. Ataseven, B. Hogel, K. Mehta, G. Kaltenecker, T. Rudiger, B. Pfitzner, K. Kittel, B. Fiedler, K. Baumann, R. Moll, M. Dietel, H. Eidtmann, C. Thomssen, S. Loibl, Gross cystic disease fluid protein 15 (GCDFP-15) expression in breast cancer subtypes. *Bmc Cancer* **2014**, *14*.
- [94] A. Naderi, M. Vanneste, Prolactin-Induced Protein Is Required for Cell Cycle Progression in Breast Cancer. *Neoplasia* **2014**, *16*, 329-342.
- [95] A. Gangadharan, T. Nyirenda, K. Patel, N. Jaimes-Delgadillo, D. Coletta, T. Tanaka, A. C. Walland, Z. Jameel, S. Vedantam, S. Tang, C. Mannion, G. Y. Lee, A. Goy, A. Pecora, K. S. Suh, Prolactin Induced Protein (PIP) is a potential biomarker for early stage and malignant breast cancer. *Breast* **2018**, *39*, 101-109.
- [96] M. Autiero, R. Culerrier, C. Bouchier, S. Basmaciogullari, M. Gaubin, S. El Marhomy, P. Blanchet, V. Paradis, A. Jardin, J. Guardiola, D. Piatier-Tonneau, Abnormal restriction pattern of PIP gene associated with human primary prostate cancers. *DNA Cell Biol* **1999**, *18*, 481-487.
- [97] W. Tian, M. Osawa, H. Horiuchi, Y. Tomita, Expression of the prolactin-inducible protein (PIP/GCDFP15) gene in benign epithelium and adenocarcinoma of the prostate. *Cancer Sci* **2004**, *95*, 491-495.
- [98] J. H. Lagendijk, H. Mullink, P. J. van Diest, G. A. Meijer, C. J. L. M. Meijer, Immunohistochemical differentiation between primary adenocarcinomas of the ovary and ovarian metastases of colonic and breast origin. Comparison between a statistical and an intuitive approach. *Journal of Clinical Pathology* **1999**, *52*, 283-290.
- [99] A. Perry, J. E. Parisi, P. J. Kurtin, Metastatic adenocarcinoma to the brain: An immunohistochemical approach. *Hum Pathol* **1997**, *28*, 938-943.
- [100] J. Kracht, A. Sapino, G. Bussolati, Malignant phyllodes tumor of breast with lung metastases mimicking the primary. *Am J Surg Pathol* **1998**, *22*, 1284-1290.

- [101] C. Y. Castro, C. A. Moran, D. G. Flieder, S. Suster, Primary signet ring cell adenocarcinomas of the lung: a clinicopathological study of 15 cases. *Histopathology* **2001**, *39*, 397-401.
- [102] J. M. Striebel, S. Dacic, S. A. Yousem, Gross cystic disease fluid protein - (GCDFP-15) expression in primary lung adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* **2008**, *32*, 426-432.
- [103] A. Wiegandt, New Methods for Characterization of N-type Glycosylation of Proteins by Integration of LC-MS/MS and NMR, *Dissertation*, University of Hamburg (Hamburg), **2016**.
- [104] H. Jiang, H. Desaire, V. Y. Butnev, G. R. Bousfield, Glycoprotein profiling by electrospray mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* **2004**, *15*, 750-758.
- [105] L. R. Ruhaak, A. M. Deelder, M. Wührer, Oligosaccharide analysis by graphitized carbon liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **2009**, *394*, 163-174.
- [106] D. S. Dalpathado, H. Desaire, Glycopeptide analysis by mass spectrometry. *Analyst* **2008**, *133*, 731-738.
- [107] M. Wührer, M. I. Catalina, A. M. Deelder, C. H. Hokke, Glycoproteomics based on tandem mass spectrometry of glycopeptides. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2007**, *849*, 115-128.
- [108] H. Kwon, J. Kim, Determination of monosaccharides in glycoproteins by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* **1993**, *215*, 243-252.
- [109] K. R. Anumula, Quantitative determination of monosaccharides in glycoproteins by high-performance liquid chromatography with highly sensitive fluorescence detection. *Anal Biochem* **1994**, *220*, 275-283.
- [110] Z. Dai, J. Zhou, S. J. Qiu, Y. K. Liu, J. Fan, Lectin-based glycoproteomics to explore and analyze hepatocellular carcinoma-related glycoprotein markers. *Electrophoresis* **2009**, *30*, 2957-2966.
- [111] A. Wiegandt, B. Meyer, Unambiguous characterization of N-glycans of monoclonal antibody cetuximab by integration of LC-MS/MS and (1)H NMR spectroscopy. *Anal Chem* **2014**, *86*, 4807-4814.
- [112] H. N. Behnken, M. Fellenberg, M. P. Koetzler, R. Jirmann, T. Nagel, B. Meyer, Resolving the problem of chromatographic overlap by 3D cross correlation (3DCC) processing of LC, MS and NMR data for characterization of complex glycan mixtures. *Anal Bioanal Chem* **2012**, *404*, 1427-1437.
- [113] J. A. Goetz, M. V. Novotny, Y. Mechref, Enzymatic/Chemical Release of O-Glycans Allowing MS Analysis at High Sensitivity. *Analytical Chemistry* **2009**, *81*, 9546-9552.

- [114] A. Beck, E. Wagner-Rousset, D. Ayoub, A. Van Dorsselaer, S. Sanglier-Cianferani, Characterization of therapeutic antibodies and related products. *Anal Chem* **2013**, *85*, 715-736.
- [115] Z. Zhang, H. Pan, X. Chen, Mass spectrometry for structural characterization of therapeutic antibodies. *Mass Spectrom Rev* **2009**, *28*, 147-176.
- [116] J. F. Kellie, J. C. Tran, J. E. Lee, D. R. Ahlf, H. M. Thomas, I. Ntai, A. D. Catherman, K. R. Durbin, L. Zamdborg, A. Vellaichamy, P. M. Thomas, N. L. Kelleher, The emerging process of Top Down mass spectrometry for protein analysis: biomarkers, protein-therapeutics, and achieving high throughput. *Mol Biosyst* **2010**, *6*, 1532-1539.
- [117] H. N. Behnken, A. Ruthenbeck, J. M. Schulz, B. Meyer, Glycan analysis of Prostate Specific Antigen (PSA) directly from the intact glycoprotein by HR-ESI/TOF-MS. *J Proteome Res* **2014**, *13*, 997-1001.
- [118] Zentrum für Krebsregisterdaten, zu finden unter www.krebsdaten.de, **10/2018**.
- [119] A. Ceroni, K. Maass, H. Geyer, R. Geyer, A. Dell, S. M. Haslam, GlycoWorkbench: a tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans. *J Proteome Res* **2008**, *7*, 1650-1659.
- [120] Produktbeschreibung, zu finden unter www.sigmaaldrich.com, **09/2014**.
- [121] Reference SNP Cluster Report: rs4581, zu finden unter www.ncbi.nlm.nih.gov/project/SNP/, **10/2018**.
- [122] Mascot Database Search, MASCOT MS/MS Ion Search, zu finden unter www.matrixscience.com, **04/2018**.
- [123] Quantitation: emPAI protocol, zu finden unter www.matrixscience.com, **10/2018**.
- [124] K. F. Geoghegan, L. R. Hoth, D. H. Tan, K. A. Borzilleri, J. M. Withka, J. G. Boyd, Cyclization of N-terminal S-carbamoylmethylcysteine causing loss of 17 Da from peptides and extra peaks in peptide maps. *J Proteome Res* **2002**, *1*, 181-187.
- [125] Reference SNP Cluster Report: rs1801692, zu finden unter www.ncbi.nlm.nih.gov/project/SNP/, **10/2018**.
- [126] Reference SNP Cluster Report: rs52797880, zu finden unter www.ncbi.nlm.nih.gov/project/SNP/, **10/2018**.
- [127] Reference SNP Cluster Report: rs8178847, zu finden unter www.ncbi.nlm.nih.gov/project/SNP/, **10/2018**.
- [128] Reference SNP Cluster Report: rs1801690, zu finden unter www.ncbi.nlm.nih.gov/project/SNP/, **10/2018**.
- [129] M. Bierc, L. Minarowski, L. Wozniak, S. Chojnowska, M. Knas, S. Szajda, K. Zwierz, The activity of selected glycosidases in salivary gland tumors. *Folia Histochem Cyto* **2010**, *48*, 471-474.
- [130] Glycobiology, Inhibitors, zu finden unter www.sigmaaldrich.com, **11/2018**.

- [131] G. J. Tortora, B. H. Derrickson, *Anatomie und Physiologie*, 1 ed., WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2006**.
- [132] P. W. Atkins, *Physikalische Chemie*, 3 ed., WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, **2001**.

9 Anhang

Tab. 16: Für die *Matlab*-Analyse des intakten PIP verwendete Glycane. Während dieser Arbeit wurde aufgrund des teilweise großen Fehlers der *Matlab*-gestützten Analyse häufig ein Signal-basierter Ansatz gewählt, sodass die Glycoformen unter einem Signal zusammengefasst wurden. Hierfür wurde jedes Signal nur durch eine Massenbezeichnung charakterisiert, was zu identischen Bezeichnungen bei verschiedenen Glycanen führt. In dieser Tabelle sind nur die Glycane aufgeführt, die bei einer durchgeführten Anpassung der Spektren von intaktem PIP verwendet wurden. Es sind jeweils nur die Glycankomposition den entsprechenden Signalen zugeordnet. Weitere analytische Daten wie beispielsweise die Quantifizierung sind in den jeweiligen Kapiteln der Arbeit oder im Anhang zu finden.

Bezeichnung des MS-Signals	Hex	HexNAc	dHex	NeuAc	NeuGc	Sulfat	Phosphat
13501	0	0	0	0	0	0	0
13705	0	1	0	0	0	0	0
13851	0	1	1	0	0	0	0
15125	5	4	0	0	0	0	0
15271	5	4	1	0	0	0	0
15416	5	4	0	1	0	0	0
15416	5	4	2	0	0	0	0
15490	6	5	0	0	0	0	0
15562	5	4	1	1	0	0	0
15562	5	4	3	0	0	0	0
15636	6	5	1	0	0	0	0
15707	5	4	0	2	0	0	0
15707	5	4	2	1	0	0	0
15707	5	4	4	0	0	0	0
15781	6	5	0	1	0	0	0
15781	6	5	2	0	0	0	0
15854	5	4	1	2	0	0	0
15854	5	4	3	1	0	0	0
15854	5	4	5	0	0	0	0
15928	6	5	1	1	0	0	0
15928	6	5	3	0	0	0	0
16000	5	4	2	2	0	0	0
16000	5	4	4	1	0	0	0
16073	6	5	0	2	0	0	0
16073	6	5	2	1	0	0	0
16073	6	5	4	0	0	0	0

Tab. 16: Fortsetzung

Bezeichnung des MS-Signals	Hex	HexNAc	dHex	NeuAc	NeuGc	Sulfat	Phosphat
16146	5	4	3	2	0	0	0
16146	5	4	5	1	0	0	0
16219	6	5	1	2	0	0	0
16219	6	5	3	1	0	0	0
16219	6	5	5	0	0	0	0
16292	5	4	4	2	0	0	0
16364	6	5	0	3	0	0	0
16364	6	5	2	2	0	0	0
16364	6	5	4	1	0	0	0
16364	6	5	6	0	0	0	0
16438	5	4	5	2	0	0	0
16510	6	5	1	3	0	0	0
16510	6	5	3	2	0	0	0
16510	6	5	5	1	0	0	0
16510	6	5	7	0	0	0	0
16584	7	6	1	2	0	0	0
16584	7	6	3	1	0	0	0
16584	7	6	5	0	0	0	0
16656	6	5	2	3	0	0	0
16656	6	5	4	2	0	0	0
16656	6	5	6	1	0	0	0
16729	7	6	0	3	0	0	0
16729	7	6	2	2	0	0	0
16729	7	6	4	1	0	0	0
16729	7	6	6	0	0	0	0
16802	6	5	3	3	0	0	0
16802	6	5	5	2	0	0	0
16802	6	5	7	1	0	0	0

Tab. 16: Fortsetzung

Bezeichnung des MS-Signals	Hex	HexNAc	dHex	NeuAc	NeuGc	Sulfat	Phosphat
16875	7	6	1	3	0	0	0
16875	7	6	3	2	0	0	0
16875	7	6	5	1	0	0	0
16875	7	6	7	0	0	0	0
16949	6	5	4	3	0	0	0
16949	6	5	6	2	0	0	0
17021	7	6	0	4	0	0	0
17021	7	6	2	3	0	0	0
17021	7	6	4	2	0	0	0
17021	7	6	6	1	0	0	0
17095	6	5	5	3	0	0	0
17095	6	5	7	2	0	0	0
17167	7	6	1	4	0	0	0
17167	7	6	3	3	0	0	0
17167	7	6	5	2	0	0	0
17167	7	6	7	1	0	0	0
17167	7	6	9	0	0	0	0
17241	6	5	6	3	0	0	0
17313	7	6	2	4	0	0	0
17313	7	6	4	3	0	0	0
17313	7	6	6	2	0	0	0
17313	7	6	8	1	0	0	0
17387	6	5	7	3	0	0	0
17459	7	6	3	4	0	0	0
17459	7	6	5	3	0	0	0
17459	7	6	7	2	0	0	0
17459	7	6	9	1	0	0	0
17605	7	6	4	4	0	0	0
17605	7	6	6	3	0	0	0
17605	7	6	8	2	0	0	0

Tab. 16: Fortsetzung

Bezeichnung des MS-Signals	Hex	HexNAc	dHex	NeuAc	NeuGc	Sulfat	Phosphat
17751	7	6	5	4	0	0	0
17751	7	6	7	3	0	0	0
17751	7	6	9	2	0	0	0
17897	7	6	6	4	0	0	0
17897	7	6	8	3	0	0	0
18044	7	6	7	4	0	0	0
18044	7	6	9	3	0	0	0
18190	7	6	8	4	0	0	0
18336	7	6	9	4	0	0	0

Tab. 17: Masse und Sequenz der zu erwartenden Peptide bei einer enzymatischen Spaltung von B2GPI mit Trypsin bzw. Thermolysin. Hierbei handelt es sich um die carbamidomethylierten und einfach geladenen Peptide des B2GPI (ohne Signalpeptid). Bei den Peptiden, welche eine Glycosylierungsstelle tragen, wurde nur die Massen der unglycosylierten Varianten aufgeführt.

Erwartete Peptide (Trypsin)	
Sequenz	Masse (z=1) [Da]
²⁰ GR ²¹	232.14
²² TCPKPDDLFPSTVVPLK ³⁸	1914.00
³⁹ TFYEPGEEITYSCKPGYVSR ⁵⁸	2383.09
⁵⁹ GGMR ⁶²	420.20
⁶³ K	147.11
⁶⁴ FICPLTGLWPINTLK ⁷⁸	1772.98
⁷⁹ CTPR ⁸²	553.25
⁸³ VCPFAGILENGAVR ⁹⁶	1502.78
⁹⁷ YTTFEYPNTISFSCNTGFYLNADSAK ¹²³	3068.36
¹²⁴ CTEEGK ¹²⁹	723.30
¹³⁰ WSELPVCAPIICPPPSIPTFATLR ¹⁵⁴	2819.46
¹⁵⁵ VYKPSAGNNSLYR ¹⁶⁷	1468.62
¹⁶⁸ DTAVFECLPQHAFMGNDTITCTTHGNWTK ¹⁹⁶	3352.48
¹⁹⁷ LPECR ²⁰¹	674.33
²⁰² EVK ²⁰⁴	375.22
²⁰⁵ CPFPSRPDNGFVNYPKPTLYYK ²²⁷	2731.33
²²⁸ DK ²²⁹	262.14
²³⁰ ATFGCHDGYSLDGPEEIECTK ²⁵⁰	2385.00
²⁵¹ LGNWSAMPSCK ²⁶¹	1250.57
²⁶² ASCK ²⁶⁵	465.21
²⁶⁶ VPVK ²⁶⁹	442.30
²⁷⁰ K	147.11
²⁷¹ ATVVYQGER ²⁷⁹	1022.53
²⁸⁰ VK ²⁸¹	246.18
²⁸² IQEK ²⁸⁵	517.30
²⁸⁶ FK ²⁸⁷	294.18
²⁸⁸ NGMLHGDK ²⁹⁵	871.41
²⁹⁶ VSFFCK ³⁰¹	787.38
³⁰² NK ³⁰³	261.16
³⁰⁴ EK ³⁰⁵	276.16
³⁰⁶ K	147.11
³⁰⁷ CSYTEDAQCIDGTIEVPK ³²⁴	2085.91
³²⁵ CFK ³²⁷	454.21
³²⁸ EHSSLAFWK ³³⁶	1104.54
³³⁷ TDASDVKPC ³⁴⁵	992.44

Tab. 17: Fortsetzung

Erwartete Peptide (Thermolysin)	
Sequenz	Masse (z=1) [Da]
20GRTCPKPDD ²⁸	1045.47
29LP ³⁰	229.16
31FST ³³	354.17
34V	118.09
35VP ³⁶	215.14
37LKT ³⁹	361.25
40FYEPGEE ⁴⁶	870.35
47ITYSCKPGY ⁵⁵	1088.51
56VSRGG ⁶⁰	475.26
61MRK ⁶³	434.25
64FICP ⁶⁷	536.25
68LTG ⁷⁰	290.17
71LWP ⁷³	415.23
74INT ⁷⁶	347.19
77LKCTPRVCP ⁸⁵	1130.58
86FAG ⁸⁸	294.15
89I	132.10
90LENG ⁹³	432.21
94A	90.06
95VRYTT ⁹⁹	639.35
100FEYPNT ¹⁰⁵	770.34
106IS ¹⁰⁷	219.13
108FSCNTG ¹¹³	685.26
114FY ¹¹⁵	329.15
116LNG ¹¹⁸	303.17
119ADS ¹²¹	291.11
122AKCTEEGKWSPE ¹³³	1421.64
134LPVC ¹³⁷	488.25
138AP ¹³⁹	187.11
140IICPPPS ¹⁴⁶	783.41
147IPT ¹⁴⁹	330.20
150F	166.09
151AT ¹⁵²	191.10
153LR ¹⁵⁴	288.20
155VYKPS ¹⁵⁹	593.33
160AGNNS ¹⁶⁴	462.19
165LYRDT ¹⁶⁹	667.34
170A	90.06
171V	118.09
172FEC ¹⁷⁴	455.16
175LPQH ¹⁷⁸	494.27
179A	90.06
180M	150.06
181FGNDT ¹⁸⁵	553.23
186ITCTTHGNWTK ¹⁹⁶	1318.62

Tab. 17: Fortsetzung

Erwartete Peptide (Thermolysin)	
Sequenz	Masse (z=1) [Da]
197LPECRE ²⁰²	803.37
203VKCP ²⁰⁶	503.27
207FPSRPDNG ²¹⁴	889.42
215F	166.09
216VNYP ²¹⁹	492.25
220AKPT ²²³	416.25
224LYYKDK ²²⁹	829.45
230AT ²³¹	191.10
232FGCHDGYS ²³⁹	942.34
240LDGPEE ²⁴⁵	659.29
246IECTK ²⁵⁰	650.32
251LGNWS ²⁵⁵	576.28
256AMPSCK ²⁶¹	693.31
262ASCK ²⁶⁵	465.21
266VP ²⁶⁷	215.14
268VKK ²⁷⁰	374.28
271AT ²⁷²	191.10
273V	118.09
274VYQGER ²⁷⁹	751.37
280VK ²⁸¹	246.18
282IQEK ²⁸⁵	517.30
286FKNG ²⁸⁹	465.25
290M	150.06
291LHGDK ²⁹⁵	569.30
296VS ²⁹⁷	205.12
298F	166.09
299FCKNKEKKCSYTED ³¹²	1836.83
313AQC ³¹⁵	378.14
316IDGT ³¹⁹	405.20
320IEVPKC ³²⁵	745.39
326FKEHSS ³³¹	734.35
332L	132.10
333A	90.06
334FWKTD ³³⁸	696.34
339ASD ³⁴¹	292.11
342VKPC ³⁴⁵	503.27

Tab. 18: Massen der möglichen Glycopeptide eines enzymatischen Verdaus von B2GPI mit Trypsin und Thermolysin. Es handelt sich hierbei um die carbamidomethylierten Glycopeptide. Die entsprechende Ladung ist dem Exponenten des Peptids zu entnehmen. H: Hexose, N: *N*-Acetylhexosamin, F: Fucose, S: *N*-Acetylneuraminsäure.

Massen der möglichen Glycopeptide (Trypsin, z=3) [Da]			
Glycan	Peptid ³⁺ : ¹⁵⁵ VYKPSAG <u>N</u> NSLYR ¹⁶⁷	Peptid ³⁺ : ²⁵¹ LGN <u>N</u> WSAMPSCK ²⁶¹	
N	557.95	485.22	
NF	606.64	533.91	
H ₃ N ₂	787.70	714.97	
H ₃ N ₂ F	836.38	763.65	
H ₃ N ₃	855.39	782.66	
H ₃ N ₃ F	904.07	831.34	
H ₄ N ₃	909.41	836.68	
H ₃ N ₄	923.08	850.35	
H ₄ N ₃ F	958.09	885.36	
H ₃ N ₄ F	971.77	899.04	
H ₄ N ₄	977.10	904.37	
H ₃ N ₅	990.77	918.04	
H ₄ N ₃ S	1006.44	933.71	
H ₄ N ₄ F	1025.79	953.06	
H ₅ N ₄	1031.12	958.39	
H ₃ N ₅ F	1039.46	966.73	
H ₄ N ₅	1044.79	972.06	
H ₄ N ₃ FS	1055.12	982.39	
H ₃ N ₆	1058.47	985.74	
H ₄ N ₄ S	1074.13	1001.40	
H ₅ N ₄ F	1079.80	1007.07	
H ₄ N ₅ F	1093.48	1020.75	
H ₅ N ₅	1098.81	1026.08	
H ₃ N ₆ F	1107.15	1034.42	
H ₄ N ₆	1112.49	1039.76	
H ₄ N ₄ FS	1122.82	1050.09	
H ₅ N ₄ S	1128.15	1055.42	
H ₄ N ₅ S	1141.82	1069.09	
H ₅ N ₅ F	1147.50	1074.77	
H ₆ N ₅	1152.83	1080.10	
H ₄ N ₆ F	1161.17	1088.44	
H ₅ N ₆	1166.50	1093.77	
H ₅ N ₄ FS	1176.83	1104.10	
H ₄ N ₅ FS	1190.51	1117.78	
H ₅ N ₅ S	1195.84	1123.11	

Tab. 18: Fortsetzung

Massen der möglichen Glycopeptide (Trypsin, z=3) [Da]		
Glycan	Peptid ³⁺ : ¹⁵⁵ VYKPSAG <u>N</u> NSLYR ¹⁶⁷	Peptid ³⁺ : ²⁵¹ LGN <u>N</u> WSAMPSCK ²⁶¹
H ₆ N ₅ F	1201.51	1128.78
H ₄ N ₆ S	1209.52	1136.79
H ₅ N ₆ F	1215.19	1142.46
H ₆ N ₆	1220.52	1147.79
H ₅ N ₄ S ₂	1225.18	1152.45
H ₅ N ₅ FS	1244.53	1171.80
H ₆ N ₅ S	1249.86	1177.13
H ₄ N ₆ FS	1258.20	1185.47
H ₅ N ₆ S	1263.53	1190.81
H ₆ N ₆ F	1269.21	1196.48
H ₅ N ₄ FS ₂	1273.87	1201.14
H ₇ N ₆	1274.54	1201.81
H ₅ N ₅ S ₂	1292.87	1220.14
H ₆ N ₅ FS	1298.55	1225.82
H ₅ N ₆ FS	1312.22	1239.49
H ₆ N ₆ S	1317.55	1244.82
H ₇ N ₆ F	1323.22	1250.49
H ₅ N ₅ FS ₂	1341.56	1268.83
H ₆ N ₅ S ₂	1346.89	1274.16
H ₅ N ₆ S ₂	1360.57	1287.84
H ₆ N ₆ FS	1366.24	1293.51
H ₇ N ₆ S	1371.57	1298.84
H ₆ N ₅ FS ₂	1395.58	1322.85
H ₅ N ₆ FS ₂	1409.25	1336.52
H ₆ N ₆ S ₂	1414.58	1341.85
H ₇ N ₆ FS	1420.26	1347.53
H ₆ N ₅ S ₃	1443.92	1371.19
H ₆ N ₆ FS ₂	1463.27	1390.54
H ₇ N ₆ S ₂	1468.60	1395.87
H ₆ N ₅ FS ₃	1492.61	1419.88
H ₆ N ₆ S ₃	1511.62	1438.89
H ₇ N ₆ FS ₂	1517.29	1444.56
H ₆ N ₆ FS ₃	1560.30	1487.57
H ₇ N ₆ S ₃	1565.63	1492.90
H ₇ N ₆ FS ₃	1614.32	1541.59
H ₇ N ₆ S ₄	1662.67	1589.94
H ₇ N ₆ FS ₄	1711.35	1638.62

Tab. 18: Fortsetzung

Massen der möglichen Glycopeptide (Thermolysin, z=2, z=3) [Da]				
Glycan	Peptid ³⁺ : 155VYKPSAG <u>N</u> NS164	Peptid ²⁺ : 181FG <u>N</u> DT185	Peptid ³⁺ : 186ITCTTHG <u>N</u> WTKLPECRE202	Peptid ²⁺ : 251L <u>G</u> NWS255
N	413.87	378.66	769.36	390.18
NF	462.55	451.68	818.04	463.21
H ₃ N ₂	643.61	723.27	999.10	734.80
H ₃ N ₂ F	692.30	796.30	1047.79	807.83
H ₃ N ₃	711.30	824.81	1066.80	836.34
H ₃ N ₃ F	759.99	897.84	1115.48	909.37
H ₄ N ₃	765.32	905.84	1120.81	917.37
H ₃ N ₄	779.00	926.35	1134.49	937.88
H ₄ N ₃ F	814.01	978.87	1169.50	990.40
H ₃ N ₄ F	827.68	999.38	1183.17	1010.91
H ₄ N ₄	833.02	1007.38	1188.51	1018.91
H ₃ N ₅	846.69	1027.89	1202.18	1039.42
H ₄ N ₃ S	862.35	1051.39	1217.84	1062.91
H ₄ N ₄ F	881.70	1080.41	1237.19	1091.94
H ₅ N ₄	887.03	1088.41	1242.52	1099.93
H ₃ N ₅ F	895.38	1100.92	1250.87	1112.45
H ₄ N ₅	900.71	1108.92	1256.20	1120.45
H ₄ N ₃ FS	911.04	1124.42	1266.53	1135.94
H ₃ N ₆	914.38	1129.43	1269.87	1140.96
H ₄ N ₄ S	930.05	1152.93	1285.54	1164.45
H ₅ N ₄ F	935.72	1161.44	1291.21	1172.96
H ₄ N ₅ F	949.39	1181.95	1304.88	1193.48
H ₅ N ₅	954.73	1189.95	1310.22	1201.47
H ₃ N ₆ F	963.07	1202.46	1318.56	1213.99
H ₄ N ₆	968.40	1210.46	1323.89	1221.99
H ₄ N ₄ FS	978.73	1225.96	1334.22	1237.48
H ₅ N ₄ S	984.06	1233.95	1339.56	1245.48
H ₄ N ₅ S	997.74	1254.47	1353.23	1265.99
H ₅ N ₅ F	1003.41	1262.98	1358.90	1274.50
H ₆ N ₅	1008.74	1270.97	1364.23	1282.50
H ₄ N ₆ F	1017.09	1283.49	1372.58	1295.01
H ₅ N ₆	1022.42	1291.49	1377.91	1303.01
H ₅ N ₄ FS	1032.75	1306.98	1388.24	1318.51
H ₄ N ₅ FS	1046.43	1327.50	1401.92	1339.02
H ₅ N ₅ S	1051.76	1335.49	1407.25	1347.02
H ₆ N ₅ F	1057.43	1344.00	1412.92	1355.53

Tab. 18: Fortsetzung

Massen der möglichen Glycopeptide (Thermolysin, z=2, z=3) [Da]				
Glycan	Peptid ³⁺ : 155VYKPSAG <u>N</u> NS ¹⁶⁴	Peptid ²⁺ : 181FG <u>N</u> DT ¹⁸⁵	Peptid ³⁺ : 186ITCTTHG <u>N</u> WTKLPECRE ²⁰²	Peptid ²⁺ : 251L <u>G</u> NWS ²⁵⁵
H ₄ N ₆ S	1065.43	1356.01	1420.92	1367.53
H ₅ N ₆ F	1071.10	1364.52	1426.60	1376.04
H ₆ N ₆	1076.44	1372.51	1431.93	1384.04
H ₅ N ₄ S ₂	1081.10	1379.50	1436.59	1391.03
H ₅ N ₅ FS	1100.44	1408.52	1455.93	1420.05
H ₆ N ₅ S	1105.78	1416.52	1461.27	1428.05
H ₄ N ₆ FS	1114.12	1429.04	1469.61	1440.56
H ₅ N ₆ S	1119.45	1437.03	1474.94	1448.56
H ₆ N ₆ F	1125.12	1445.54	1480.61	1457.07
H ₅ N ₄ FS ₂	1129.78	1452.53	1485.27	1464.06
H ₇ N ₆	1130.45	1453.54	1485.94	1465.07
H ₅ N ₅ S ₂	1148.79	1481.04	1504.28	1492.57
H ₆ N ₅ FS	1154.46	1489.55	1509.95	1501.08
H ₅ N ₆ FS	1168.14	1510.06	1523.63	1521.59
H ₆ N ₆ S	1173.47	1518.06	1528.96	1529.59
H ₇ N ₆ F	1179.14	1526.57	1534.63	1538.09
H ₅ N ₅ FS ₂	1197.48	1554.07	1552.97	1565.60
H ₆ N ₅ S ₂	1202.81	1562.07	1558.30	1573.59
H ₅ N ₆ S ₂	1216.48	1582.58	1571.97	1594.11
H ₆ N ₆ FS	1222.15	1591.09	1577.65	1602.62
H ₇ N ₆ S	1227.49	1599.09	1582.98	1610.61
H ₆ N ₅ FS ₂	1251.49	1635.10	1606.98	1646.62
H ₅ N ₆ FS ₂	1265.17	1655.61	1620.66	1667.14
H ₆ N ₆ S ₂	1270.50	1663.61	1625.99	1675.13
H ₇ N ₆ FS	1276.17	1672.12	1631.66	1683.64
H ₆ N ₅ S ₃	1299.84	1707.62	1655.33	1719.14
H ₆ N ₆ FS ₂	1319.19	1736.64	1674.68	1748.16
H ₇ N ₆ S ₂	1324.52	1744.63	1680.01	1756.16
H ₆ N ₅ FS ₃	1348.52	1780.65	1704.02	1792.17
H ₆ N ₆ S ₃	1367.53	1809.16	1723.02	1820.68
H ₇ N ₆ FS ₂	1373.20	1817.66	1728.69	1829.19
H ₆ N ₆ FS ₃	1416.22	1882.18	1771.71	1893.71
H ₇ N ₆ S ₃	1421.55	1890.18	1777.04	1901.71
H ₇ N ₆ FS ₃	1470.24	1963.21	1825.73	1974.74
H ₇ N ₆ S ₄	1518.58	2035.73	1874.07	2047.26
H ₇ N ₆ FS ₄	1567.27	2108.76	1922.76	2120.28

Tab. 19: Identifizierte Glycopeptide des tryptischen Verdaus von B2GPI. Addukt-Signale und Signale, die durch Oxidationen oder andere Modifikationen erklärbar werden können, wurden nicht separat aufgeführt. Bei den einfach glycosylierten Peptiden wurden nur die dreifach geladenen Zustände aufgelistet und bei den zweifach glycosylierten Peptiden nur die fünfmal geladenen. Die angegebene Glycankombination bei dem zweifach glycosylierten Peptid ist nur eine der vielen Kombinationsmöglichkeiten. In der letzten Spalte ist nur eine der möglichen Strukturen mit der entsprechenden Glycankomposition aufgeführt. *MS/MS Spektrum vorhanden; H: Hexose, N: *N*-Acetylhexosamin, F: Fucose, S: *N*-Acetylneuraminsäure.

Peptid: ¹⁵⁵ VYKPSAG <u>N</u> NSLYR ¹⁶⁷					
[M+3H] ³⁺ exp. [Da]	[M+3H] ³⁺ theo. [Da]	Abweichung [Da] ([ppm])	Retentions- zeit [min]	Glycan- komposition	Struktur
909.406	909.408	0.002 (2.21)	15.9	H ₄ N ₃	
952.420	952.418	-0.002 (2.29)	16.4	H ₃ N ₃ S	
1006.438	1006.436	-0.002 (1.78)	16.0	H ₄ N ₃ S	
1031.117	1031.114	-0.003 (2.64)	15.9	H ₅ N ₄	
1055.124	1055.122	-0.002 (1.67)	16.0	H ₄ N ₃ FS	
1074.131	1074.130	-0.001 (0.85)	15.9	H ₄ N ₄ S	
1128.149	1128.149	0.000 (0.42)	15.9	H ₅ N ₄ S*	
1176.834	1176.833	-0.001 (1.27)	16.0	H ₅ N ₄ FS	
1225.180	1225.179	-0.001 (1.09)	15.9	H ₅ N ₄ S ₂ *	
1249.859	1249.859	0.000 (0.21)	16.4	H ₆ N ₅ S	
1273.866	1273.866	0.000 (0.24)	16.0	H ₅ N ₄ FS ₂ *	
1346.891	1346.891	0.000 (0.05)	16.4	H ₆ N ₅ S ₂	
1395.577	1395.577	0.000 (0.02)	16.3	H ₆ N ₅ FS ₂	
1443.923	1443.920	-0.003 (1.99)	16.4	H ₆ N ₅ S ₃ *	
1492.609	1492.604	-0.005 (3.24)	16.4	H ₆ N ₅ FS ₃ *	

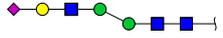
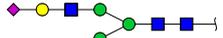
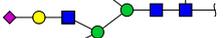
Tab. 19: Fortsetzung

Peptid: ²⁵¹ LGNWSAMPSCK ²⁶¹					
[M+3H] ³⁺ exp. [Da]	[M+3H] ³⁺ theo. [Da]	Abweichung [Da] ([ppm])	Retentions- zeit [min]	Glycan- komposition	Struktur
836.674	836.676	-0.002 (2.77)	22.0	H ₄ N ₃	
879.691	879.693	0.002 (2.82)	22.0	H ₃ N ₃ S	
933.708	933.708	0.000 (0.14)	21.9	H ₄ N ₃ S	
958.390	958.387	0.003 (3.07)	21.7	H ₅ N ₄	
982.394	982.396	0.002 (1.94)	22.0	H ₄ N ₃ FS	
1001.401	1001.400	-0.001 (1.25)	21.9	H ₄ N ₄ S	
1055.419	1055.419	0.000 (0.13)	21.3	H ₅ N ₄ S*	
1104.105	1104.105	0.000 (0.16)	21.1	H ₅ N ₄ FS	
1152.451	1152.451	0.000 (0.29)	22.0	H ₅ N ₄ S ₂ *	
1177.133	1177.130	0.003 (2.90)	20.9	H ₆ N ₅ S	
1201.136	1201.137	-0.001 (0.53)	21.9	H ₅ N ₄ FS ₂	
1274.160	1274.161	-0.001 (1.09)	21.7	H ₆ N ₅ S ₂ *	
1322.851	1322.847	0.004 (2.75)	21.7	H ₆ N ₅ FS ₂	
1371.191	1371.193	-0.002 (1.61)	22.1	H ₆ N ₅ S ₃ *	
1395.877	1395.872	0.005 (3.49)	21.4	H ₇ N ₆ S ₂	
1419.875	1419.879	-0.004 (2.94)	22.0	H ₆ N ₅ FS ₃	

Tab. 19: Fortsetzung

Peptid: ¹⁶⁸ DTAVFECLPQHAMFG <u>N</u> DTITCTTHG <u>N</u> WTK ¹⁹⁶				
[M+5H] ⁵⁺ exp. [Da]	[M+5H] ⁵⁺ theo. [Da]	Abweichung [Da] ([ppm])	Retentions- zeit [min]	Glycankombination
1421.966	1421.966	0.000 (0.23)	33.1	H ₅ N ₄ S ₂ / H ₄ N ₃ S
1494.987	1494.992	-0.005 (3.42)	33.0	H ₅ N ₄ S ₂ /H ₅ N ₄ S
1553.214	1553.211	0.003 (1.80)	33.2	H ₅ N ₄ S ₂ /H ₅ N ₄ S ₂ *
1582.422	1582.423	-0.001 (0.49)	33.1	H ₅ N ₄ FS ₂ /H ₅ N ₄ S ₂ *
1626.440	1626.442	-0.002 (1.06)	33.0	H ₅ N ₄ S/H ₆ N ₅ FS ₂
1684.458	1684.457	0.001 (0.76)	33.2	H ₆ N ₅ S ₃ /H ₅ N ₄ S ₂ *
1713.665	1713.668	-0.003 (1.93)	33.1	H ₆ N ₅ FS ₃ /H ₅ N ₄ S ₂

Tab. 20: Identifizierte Glycopeptide des Thermolysin-Verdau von B2GPI. Addukt-Signale und Signale, die durch Oxidationen oder andere Modifikationen erklärt werden können, wurde nicht separat aufgeführt. Da das Auftreten einiger Glycoformen im Spektrum stark vom Ladungszustand abhing, wurden die Signale des jeweils intensivsten Ladungszustands aufgeführt. In der letzten Spalte ist nur eine der möglichen Strukturen der entsprechenden Glycankomposition aufgeführt. z: Ladung; * MS/MS Spektrum vorhanden; H: Hexose, N: N-Acetylhexosamin, F: Fucose, S: N-Acetylneuraminsäure.

Peptid: ¹⁵⁵ VYKPSAG <u>N</u> NNS ¹⁶⁴						
[M+zH] ^{z+} exp. [Da]	[M+zH] ^{z+} theo. [Da]	Abweichung [Da] ([ppm])	z	Retentions- zeit [min]	Glycan- komposition	Struktur
1212.003	1212.004	0.001 (1.12)	2+	16.3	H ₃ N ₃ S	
1293.029	1293.033	0.004 (3.05)	2+	16.3	H ₄ N ₃ S	
984.066	984.070	0.004 (4.21)	3+	16.3	H ₅ N ₄ S	
1081.098	1081.095	-0.003 (2.46)	3+	16.3	H ₅ N ₄ S ₂ *	
1129.784	1129.787	0.003 (2.98)	3+	16.8	H ₅ N ₄ FS ₂ *	
1148.791	1148.786	-0.005 (4.08)	3+	17.3	H ₅ N ₅ S ₂	
1251.494	1251.496	0.002 (1.31)	3+	17.5	H ₆ N ₅ FS ₂	
1299.840	1299.839	-0.001 (0.92)	3+	16.9	H ₆ N ₅ S ₃ *	
1348.526	1338.521	-0.005 (3.83)	3+	17.5	H ₆ N ₅ FS ₃	

Tab. 20: Fortsetzung

Peptid: ¹⁸¹ FGNDT ¹⁸⁵						
[M+zH] ^{z+} exp. [Da]	[M+zH] ^{z+} theo. [Da]	Abweichung [Da] ([ppm])	z	Retentions- zeit [min]	Glycan- komposition	Struktur
1051.389	1051.389	0.000 (0.43)	2+	13.5	H ₄ N ₃ S	
1233.955	1233.956	0.001 (1.09)	2+	13.4	H ₅ N ₄ S	
1379.502	1379.503	0.001 (0.47)	2+	13.4	H ₅ N ₄ S ₂ *	
1452.531	1452.528	-0.003 (2.28)	2+	14.3	H ₅ N ₄ FS ₂	
1707.616	1707.611	-0.005 (3.02)	2+	14.5	H ₆ N ₅ S ₃	
Peptid: ¹⁸⁶ ITCTTHGNWTKLPECRE ²⁰²						
[M+zH] ^{z+} exp. [Da]	[M+zH] ^{z+} theo. [Da]	Abweichung [Da] ([ppm])	z	Retentions- zeit [min]	Glycan- komposition	Struktur
1217.844	1217.837	-0.007 (5.80)	3+	34.8	H ₄ N ₃ S	
1339.555	1339.561	0.006 (4.34)	3+	34.4	H ₅ N ₄ S	
1436.587	1436.587	0.000 (0.00)	3+	34.8	H ₅ N ₄ S ₂ *	
1485.273	1485.267	-0.006 (4.02)	3+	34.6	H ₅ N ₄ FS ₂	
1558.298	1558.293	-0.005 (3.04)	3+	34.8	H ₆ N ₅ S ₂	
1655.330	1655.332	0.002 (1.49)	3+	35.1	H ₆ N ₅ S ₃	
1704.016	1704.024	0.008 (4.99)	3+	35.0	H ₆ N ₅ FS ₃	
1771.709	1771.699	-0.010 (5.43)	3+	33.9	H ₆ N ₆ FS ₃ *	

Tab. 20: Fortsetzung

Peptid: ²⁵¹ LGNWS ²⁵⁵						
[M+zH] ^{z+} exp. [Da]	[M+zH] ^{z+} theo. [Da]	Abweichung [Da] ([ppm])	z	Retentions- zeit [min]	Glycan- komposition	Struktur
981.888	981.889	0.001 (0.88)	2+	27.5	H ₃ N ₃ S	
1062.915	1062.915	0.000 (0.42)	2+	27.5	H ₄ N ₃ S	
1164.454	1164.456	0.002 (1.51)	2+	27.6	H ₄ N ₄ S	
1245.481	1245.481	0.000 (0.28)	2+	27.2	H ₅ N ₄ S*	
1318.510	1318.509	-0.001 (0.69)	2+	26.4	H ₅ N ₄ FS	
1391.028	1391.029	0.001 (0.46)	2+	27.5	H ₅ N ₄ S ₂ *	
1428.047	1428.050	0.003 (2.28)	2+	26.0	H ₆ N ₅ S	
1464.057	1464.056	-0.001 (0.90)	2+	27.6	H ₅ N ₄ FS ₂	
1492.568	1492.559	-0.009 (6.06)	2+	28.5	H ₅ N ₅ S ₂	
1573.594	1573.588	-0.006 (4.10)	2+	27.3	H ₆ N ₅ S ₂	
1675.134	1675.142	0.008 (4.69)	2+	28.6	H ₆ N ₆ S ₂	
1146.431	1146.435	0.004 (3.89)	3+	27.1	H ₆ N ₅ S ₃	
1195.117	1195.137	0.020 (16.9)	3+	29.7	H ₆ N ₅ FS ₃	
1413.859	1413.883	0.024 (16.9)	3+	30.6	H ₇ N ₆ FS ₄	

Tab. 21: Quantifizierung der Glycoformen der enzymatischen Spaltung mit Trypsin. Als Maß für die relative Häufigkeit einer Glycoform wurden die Intensitäten der EICs der signifikanten Ladungszustände (+2 bis +4) summiert.

Glycan	Asn-253	Asn-162
	Relative Häufigkeit [%]	Relative Häufigkeit [%]
H ₅ N ₄ S ₂	62.5	54.7
H ₅ N ₄ S	14.0	8.34
H ₄ N ₃ S	4.69	3.49
H ₃ N ₃ S	3.01	0.57
H ₄ N ₃	2.97	0.65
H ₆ N ₅ S ₃	2.96	7.59
H ₅ N ₄ FS ₂	2.69	13.9
H ₆ N ₅ S ₂	1.88	1.39
H ₅ N ₄ FS	1.04	2.21
H ₅ N ₄	0.81	0.79
H ₆ N ₅ FS ₃	0.80	3.77
H ₆ N ₅ S	0.78	0.30
H ₄ N ₄ S	0.74	0.48
H ₆ N ₅ FS ₂	0.45	0.80
H ₄ N ₃ FS	0.41	1.03
H ₇ N ₆ S ₂	0.22	-

Tab. 22: Quantifizierung der Glycoformen der enzymatischen Spaltung mit Thermolysin. Als Maß für die relative Häufigkeit einer Glycoform wurden die Intensitäten der EICs der signifikanten Ladungszustände (+2 bis +4) summiert.

Glycan	Asn-253	Asn-162	Asn-183	Asn-193
	Relative Häufigkeit [%]	Relative Häufigkeit [%]	Relative Häufigkeit [%]	Relative Häufigkeit [%]
H ₅ N ₄ S ₂	58.02	41.46	74.32	37.41
H ₅ N ₄ S	13.84	5.62	9.59	5.93
H ₆ N ₅ FS ₃	6.79	8.65	-	13.94
H ₄ N ₃ S	3.63	4.99	6.90	5.97
H ₆ N ₅ S ₃	3.20	13.21	3.89	15.99
H ₆ N ₅ S ₂	3.13	-	-	5.23
H ₅ N ₄ FS ₂	2.52	13.97	5.30	5.68
H ₃ N ₃ S	1.81	4.40	-	-
H ₅ N ₄ FS	1.60	-	-	-
H ₆ N ₅ S	1.36	-	-	-
H ₇ N ₆ FS ₄	1.18	-	-	-
H ₄ N ₄ S	0.99	-	-	-
H ₅ N ₅ S ₂	0.97	6.06	-	-
H ₆ N ₆ S ₂	0.96	-	-	-
H ₆ N ₅ FS ₂	-	1.63	-	-
H ₆ N ₆ FS ₃	-	-	-	9.85

Tab. 23: Ergebnisse der Mascot-Suche des tryptischen Verdaus von drei B2GPI-Proben. Es wurden jeweils die ersten fünf Proteine (sortiert nach emPAI) aufgeführt. Es zeigt sich, dass B2GPI beim Score und emPAI immer sehr hohe Werte aufweist, was auf eine hohe Quantität in der untersuchten Probe hindeutet. Neben dem prozesstechnisch auftretenden Trypsin wird vor allem das Apolipoprotein B-100 in hohem Maße identifiziert. Des Weiteren treten die Proteine *Complement C8* und *Histidine-rich Glycoprotein* auf. emPAI: *Exponentially Modified Protein Abundance Index*.

Plasma F			
Protein	Organismus	Score	emPAI
<i>β₂-Glycoprotein I</i>	<i>Homo sapiens</i>	705	1.54
Trypsin	<i>Bos taurus</i>	836	1.45
Apolipoprotein B-100	<i>Homo sapiens</i>	3084	0.78
<i>Complement C8 (γ-Kette)</i>	<i>Homo sapiens</i>	118	0.34
<i>Histidine-rich Glycoprotein</i>	<i>Homo sapiens</i>	273	0.32
Plasma M			
Protein	Organismus	Score	emPAI
Trypsin	<i>Bos taurus</i>	381	2.15
Apolipoprotein B-100	<i>Homo sapiens</i>	5121	1.94
<i>β₂-Glycoprotein I</i>	<i>Homo sapiens</i>	694	1.66
<i>Complement C8 (γ-Kette)</i>	<i>Homo sapiens</i>	92	0.77
<i>Histidine-rich Glycoprotein</i>	<i>Homo sapiens</i>	191	0.33
Plasma R			
Protein	Organismus	Score	emPAI
<i>β₂-Glycoprotein I</i>	<i>Homo sapiens</i>	1596	2.43
Apolipoprotein B-100	<i>Homo sapiens</i>	10571	2.19
Trypsin	<i>Bos taurus</i>	619	1.36
<i>Histidine-rich Glycoprotein</i>	<i>Homo sapiens</i>	290	0.45
<i>Complement C8 (α-Kette)</i>	<i>Homo sapiens</i>	320	0.40

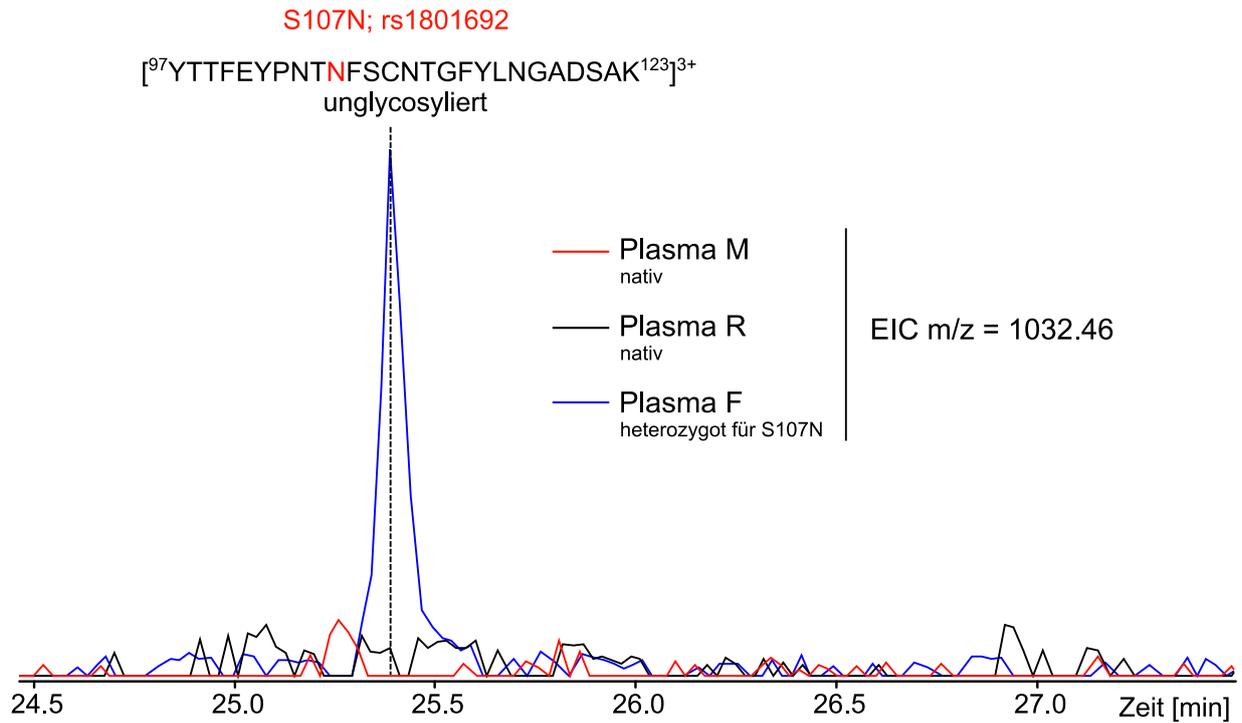


Abb. 53: EICs des durch einen tryptischen Verdau erhaltenen, unglycosylierten Peptids mit Aminosäureaustausch von B2GPI (Plasmaproben M, R und F). Es ist zu erkennen, dass das unglycosylierte Peptid mit dem Aminosäureaustausch nur bei der Plasmaprobe F zu beobachten ist.

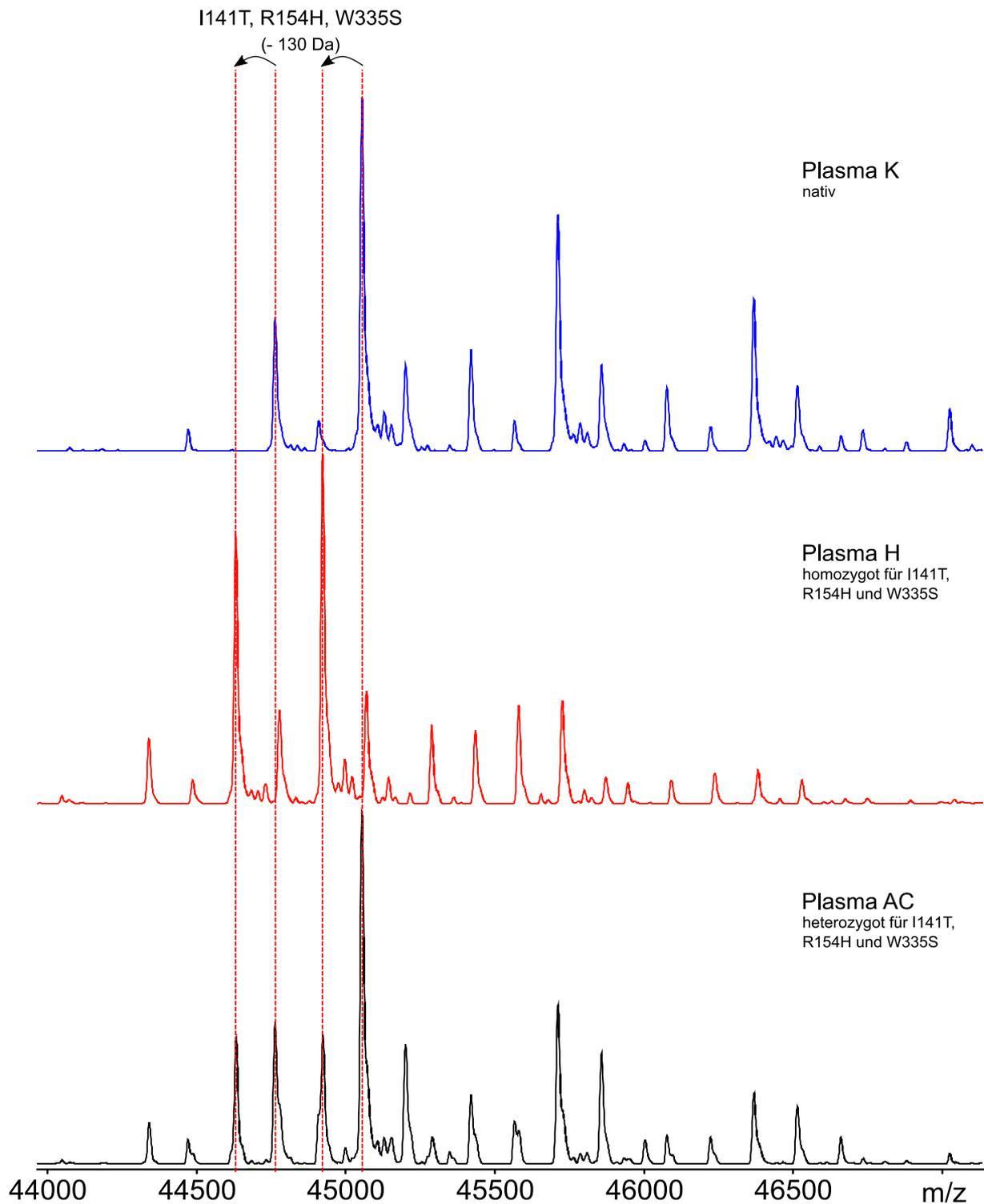


Abb. 54: Dekonvolvierte Massenspektren des intakten B2GPI von drei Probanden mit unterschiedlicher Ausprägung hinsichtlich dreier gleichzeitig auftretender Aminosäureaustausche (I141T, R154H und W335S). Es zeigt sich, dass bei Plasma H (homozygot) die Signale im Vergleich zur nativen Form alle um -130 Da verschoben sind. Bei Plasma AC (heterozygot) sind sowohl die Signale der nativen als auch der genetisch veränderten Variante zu sehen. Da sich die Massen des Aminosäureaustausches und einer einfachen (De-)Fucosylierung nur um 16 Da unterscheiden, treten in der Darstellung Signale auf, die mit ihrem Maximum jeweils leicht neben der Linie liegen. Diese Signale gehören demnach auch nicht zu der durch die Linie angedeutete Variante.

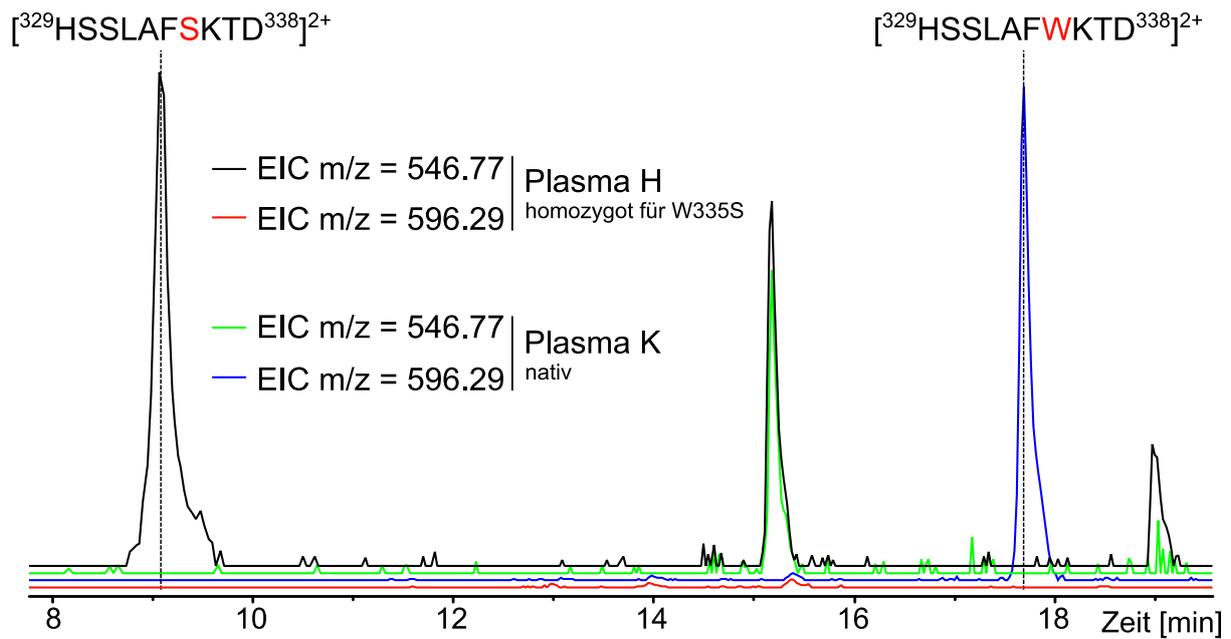


Abb. 55: EICs der durch einen GluC-Verdau erhaltenen Peptide mit und ohne Aminosäureaustausch von B2GPI (Plasmaproben K und H). Es ist zu erkennen, dass das native Peptid (EIC m/z 596.26) nur in der Plasmaprobe K auftritt, während der Aminosäureaustausch (EIC m/z 546.77) nur bei der Probe H zu beobachten ist. Die Signale bei einer Retentionszeit von etwa 15 min und 19 min können nicht dem B2GPI zugeordnet werden und sind daher vernachlässigbar.

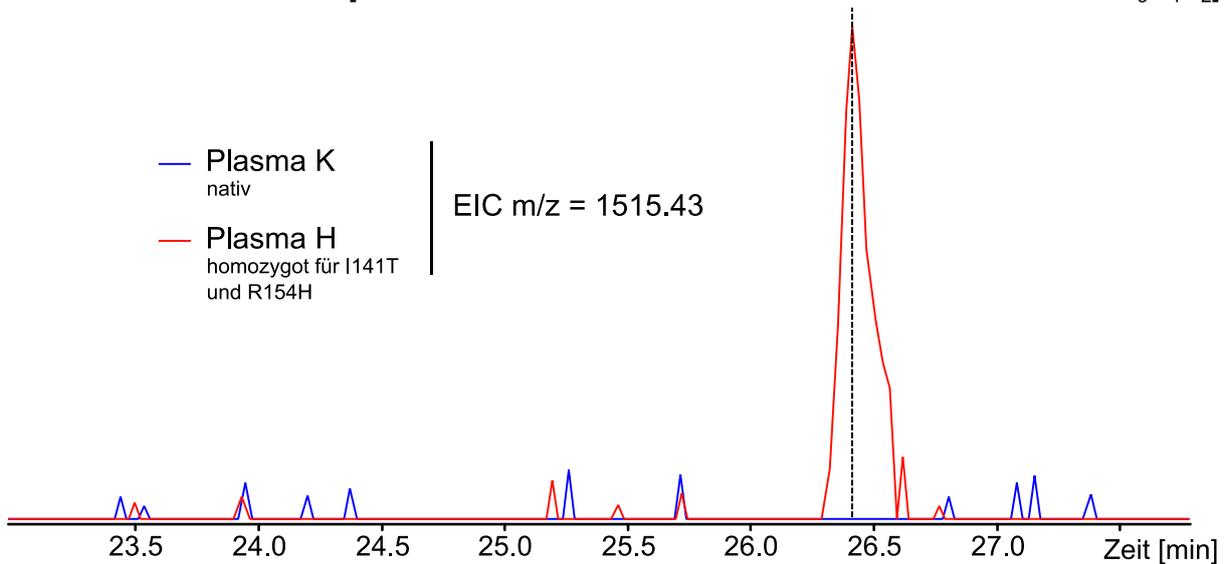
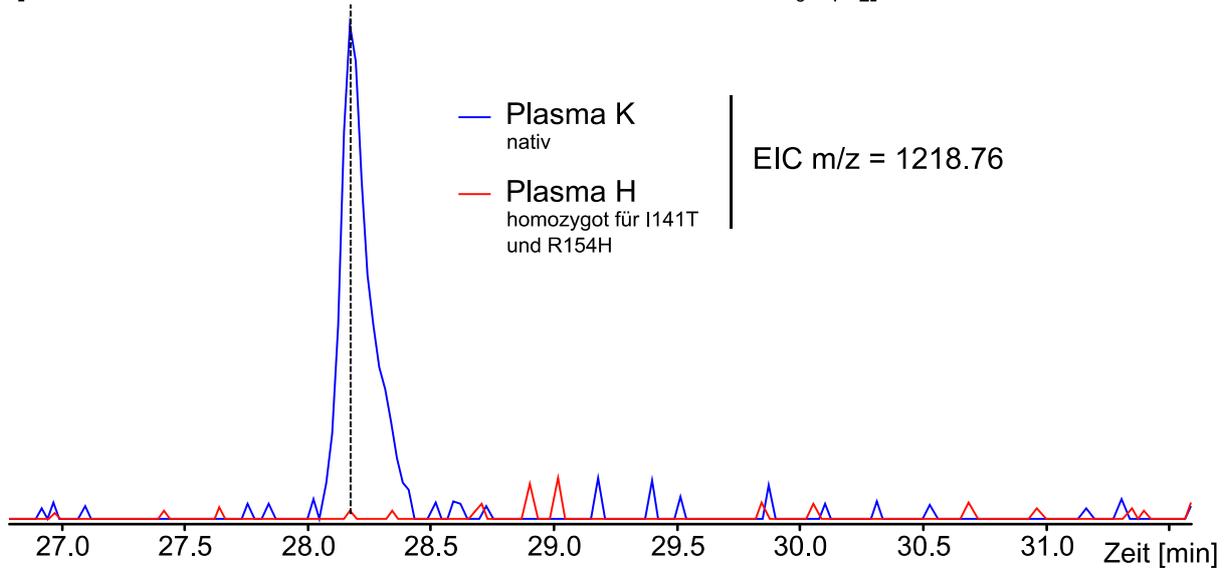


Abb. 56: EICs der durch einen GluC-Verdau erhaltenen Peptide mit und ohne Aminosäureaustausche von B2GPI (Plasmaproben K und H). Aufgrund einer Überlappung durch ein weiteres Signal im EIC von $m/z=1515.43$, welches nicht B2GPI zugeordnet werden kann, wurden die EICs separat dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Aminosäureaustausche nur bei Plasma H auftreten. Durch das nicht vorhandene native Peptid im Plasma H wiederum lässt sich die Homozygotie bestätigen.

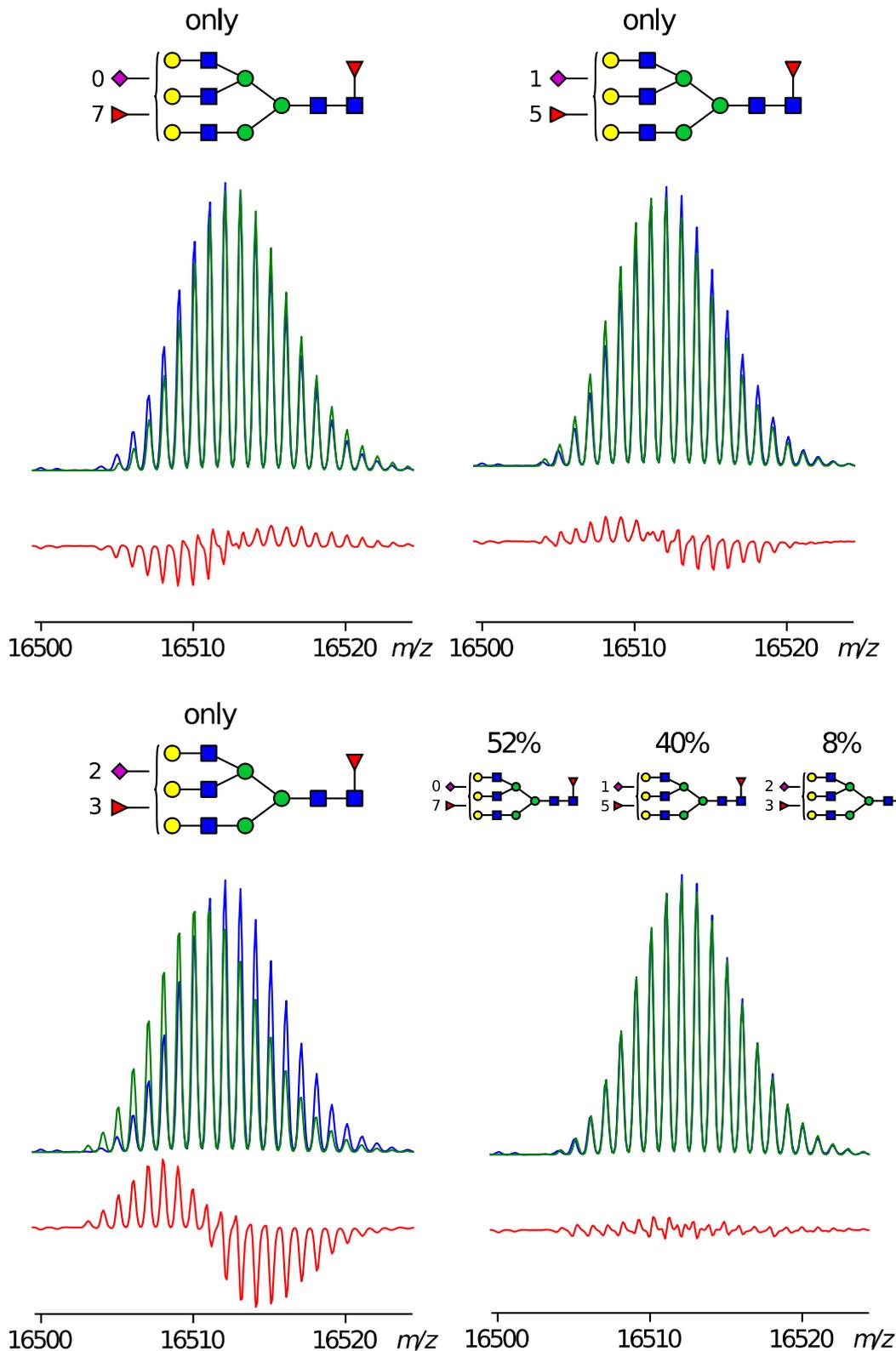


Abb. 57: Überlagerung mehrerer Glycoformen bei PIP (nach Wiegandt *et al.*^[72]). Da der Massenunterschied einer Sialinsäure zu zwei Fucosen nur etwa 1 Da beträgt, kommt es bei dem Großteil der PIP-Signale zu einer Überlagerung mehrerer Glycoformen. Zur Bestätigung wurde eine *Matlab*-Analyse durchgeführt. Das experimentelle Spektrum ist in Blau, das theoretische in Grün und die Differenz beider Spektren in Rot dargestellt. Es zeigt sich beispielsweise, dass das Signal m/z 16510 durch die Anpassung nur einer Glycoform ($H_6N_5F_7$, $H_6N_5F_5S$ oder $H_6N_5F_3S_2$) nicht ausreichend beschrieben wird. Erst eine Kombination aller Glycoformen führt zu einer sehr guten Übereinstimmung.

Anhang

Tab. 24: Intensität und relativer Anteil der Signale je summiertes Spektrum. Die Spektrenummer bezieht sich auf die gesamte LC-MS-Messung.

Intensität (x10³) der Signale im entsprechenden Spektrum [cnts]													
Signale	#760- 762	#763- 765	#766- 768	#769- 771	#772- 774	#775- 777	#778- 780	#781- 783	#784- 786	#787- 789	#790- 792	#793- 795	#796- 798
15416	0.6	1.3	0.2	0.3	0.1	0.0	0.1	0.2	0.4	0.3	0.1	0.2	0.2
15562	1.5	2.8	1.2	1.3	0.3	0.3	0.3	0.6	0.6	0.5	0.4	0.4	0.2
15707	2.8	4.2	4.3	8.2	3.9	2.3	1.8	2.1	1.6	1.6	1.5	1.6	1.4
15854	6.7	8.8	9.4	15.7	7.7	6.5	5.5	4.4	3.8	3.5	3.5	3.3	2.9
15928	1.6	1.7	1.0	0.9	0.5	0.6	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	0.3	0.2
16000	0.1	0.1	1.2	2.0	1.5	10.5	7.2	3.9	3.1	2.6	2.4	2.0	1.9
16073	2.3	2.0	2.7	3.5	1.6	0.6	0.7	0.8	0.6	0.7	0.8	0.5	0.4
16146	0.1	0.1	0.1	0.1	0.8	12.5	8.3	4.1	3.0	2.2	1.9	2.2	1.5
16219	1.8	1.5	10.0	12.4	5.6	4.2	3.6	2.8	2.4	2.1	2.3	2.0	2.0
16364	6.1	5.4	15.1	17.1	9.3	13.9	9.4	7.1	5.2	5.1	4.5	4.5	3.8
16510	12.5	10.8	6.5	5.2	12.4	43.6	24.4	14.5	11.7	9.4	8.2	8.0	6.8
16656	0.1	0.2	4.0	4.3	14.0	55.0	29.4	21.9	23.9	17.5	12.6	11.1	9.3
16802	0.2	0.2	0.2	0.2	0.6	2.5	1.3	31.8	71.7	37.0	21.2	16.2	13.6
16875	0.7	0.4	1.3	1.1	1.3	2.2	1.4	1.4	1.5	0.8	0.8	0.6	0.6
16949	0.2	0.2	0.4	0.6	0.4	0.5	0.6	35.4	83.7	44.4	25.8	19.1	15.6
17021	2.0	1.6	0.7	0.5	1.9	3.7	1.8	2.2	2.7	2.0	1.5	1.4	1.3
17167	2.4	1.5	1.3	0.8	2.2	4.2	1.9	3.4	4.1	2.4	2.0	1.5	1.1
17313	0.3	0.4	1.0	0.4	0.3	0.5	0.3	4.5	5.9	2.6	2.7	2.0	1.4
17459	0.5	0.4	0.4	0.4	0.3	0.3	0.3	5.3	5.9	3.2	4.8	3.5	2.0
Relativer Anteil der Signale am entsprechenden Spektrum [%]													
Signale	#760- 762	#763- 765	#766- 768	#769- 771	#772- 774	#775- 777	#778- 780	#781- 783	#784- 786	#787- 789	#790- 792	#793- 795	#796- 798
15416	1.4	2.9	0.4	0.4	0.1	0.0	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3
15562	3.5	6.4	2.0	1.7	0.5	0.2	0.3	0.4	0.2	0.3	0.4	0.4	0.4
15707	6.7	9.7	7.0	10.9	6.0	1.4	1.9	1.4	0.7	1.1	1.5	2.0	2.1
15854	15.9	20.3	15.4	20.9	11.9	4.0	5.6	3.0	1.6	2.5	3.6	4.1	4.3
15928	3.7	3.8	1.6	1.2	0.8	0.4	0.3	0.2	0.1	0.3	0.4	0.4	0.4
16000	0.3	0.3	1.9	2.6	2.3	6.4	7.3	2.6	1.3	1.9	2.5	2.6	2.9
16073	5.3	4.6	4.4	4.6	2.5	0.4	0.7	0.5	0.3	0.5	0.8	0.7	0.6
16146	0.2	0.2	0.1	0.2	1.3	7.6	8.4	2.8	1.3	1.6	2.0	2.7	2.3
16219	4.2	3.4	16.4	16.6	8.7	2.6	3.7	1.9	1.0	1.5	2.4	2.5	3.1
16364	14.3	12.3	24.8	22.8	14.4	8.5	9.6	4.9	2.3	3.7	4.6	5.6	5.8
16510	29.4	24.7	10.7	7.0	19.1	26.6	24.7	9.9	5.1	6.8	8.4	9.9	10.2
16656	0.2	0.5	6.6	5.7	21.7	33.6	29.8	14.9	10.3	12.7	12.9	13.9	14.0
16802	0.5	0.5	0.4	0.3	0.9	1.5	1.3	21.7	30.9	26.8	21.7	20.2	20.5
16875	1.7	0.9	2.1	1.5	2.0	1.4	1.5	1.0	0.7	0.6	0.9	0.8	0.9
16949	0.5	0.6	0.7	0.8	0.6	0.3	0.6	24.2	36.0	32.1	26.4	23.8	23.5
17021	4.6	3.6	1.2	0.7	3.0	2.2	1.8	1.5	1.2	1.5	1.6	1.7	1.9
17167	5.6	3.5	2.1	1.0	3.4	2.6	1.9	2.3	1.7	1.7	2.1	1.8	1.7
17313	0.6	0.8	1.7	0.5	0.4	0.3	0.3	3.1	2.6	1.9	2.7	2.5	2.1
17459	1.2	0.9	0.7	0.5	0.5	0.2	0.3	3.6	2.6	2.3	5.0	4.3	3.0

Tab. 25: Quantitative Analyse des Sialylierungsgrades der Biantennen mithilfe von *Matlab* über den Elutionsbereich von PIP. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um die Summe der Koeffizienten der biantennären Glycoformen mit gleicher Anzahl terminaler Sialinsäuren. Die Spektrennummer bezieht sich auf die gesamte LC-MS-Messung. Die für die jeweils drei summierten Spektren gemittelten Retentionszeiten sind in Klammern angegeben.

Spektrennummer (Retentionszeit)	Biantennen mit S0	Biantennen mit S1	Biantennen mit S2
#760-762 (21.37 min)	22.67%	0.39%	0.65%
#763-765 (21.47 min)	31.04%	0.78%	0.44%
#766-768 (21.57 min)	10.53%	11.80%	0.14%
#769-771 (21.67 min)	8.52%	21.67%	0.22%
#772-774 (21.77 min)	5.38%	12.02%	1.76%
#775-777 (21.87 min)	2.36%	5.53%	10.22%
#778-780 (21.97 min)	3.09%	6.26%	11.93%
#781-783 (22.07 min)	3.72%	2.39%	4.62%
#784-786 (22.17 min)	3.11%	1.01%	1.97%
#787-789 (22.27 min)	3.90%	2.04%	2.39%
#790-792 (22.37 min)	4.56%	1.67%	3.63%
#793-795 (22.47 min)	4.90%	3.35%	3.60%
#796-798 (22.57 min)	5.74%	3.33%	3.94%

Tab. 26: Quantitative Analyse des Sialylierungsgrades der Triantennen mithilfe von *Matlab* über den Elutionsbereich von PIP. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um die Summe der Koeffizienten der triantennären Glycoformen mit gleicher Anzahl terminaler Sialinsäuren. Die Spektrennummer bezieht sich auf die gesamte LC-MS-Messung. Die für die jeweils drei summierten Spektren gemittelten Retentionszeiten sind in Klammern angegeben.

Spektrennummer (Retentionszeit)	Triantennen mit S0	Triantennen mit S1	Triantennen mit S2	Triantennen mit S3
#760-762 (21.37 min)	46.92%	1.10%	1.67%	1.29%
#763-765 (21.47 min)	40.20%	1.52%	1.52%	1.07%
#766-768 (21.57 min)	24.38%	22.06%	8.53%	0.87%
#769-771 (21.67 min)	15.84%	28.36%	6.90%	0.95%
#772-774 (21.77 min)	14.95%	15.55%	24.89%	5.71%
#775-777 (21.87 min)	5.23%	13.90%	43.26%	5.84%
#778-780 (21.97 min)	9.09%	10.75%	36.65%	7.98%
#781-783 (22.07 min)	1.89%	9.61%	21.70%	37.32%
#784-786 (22.17 min)	1.63%	6.20%	11.42%	58.74%
#787-789 (22.27 min)	2.38%	6.85%	16.41%	50.71%
#790-792 (22.37 min)	2.48%	9.56%	18.37%	39.94%
#793-795 (22.47 min)	4.07%	10.63%	16.27%	36.88%
#796-798 (22.57 min)	4.42%	11.21%	17.84%	34.95%

Tab. 27: Quantitative Analyse des Sialylierungsgrades der Tetraantennen mithilfe von *Matlab* über den Elutionsbereich von PIP. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um die Summe der Koeffizienten der tetraantennären Glycoformen mit gleicher Anzahl terminaler Sialinsäuren. Die Spektrennummer bezieht sich auf die gesamte LC-MS-Messung. Die für die jeweils drei summierten Spektren gemittelten Retentionszeiten sind in Klammern angegeben.

Spektrennummer (Retentionszeit)	Triantennen mit S0	Triantennen mit S1	Triantennen mit S2	Triantennen mit S3	Triantennen mit S4
#760-762 (21.37 min)	14.08%	2.87%	2.67%	1.66%	1.06%
#763-765 (21.47 min)	10.42%	3.19%	2.40%	2.00%	0.57%
#766-768 (21.57 min)	5.77%	5.82%	2.94%	1.62%	0.63%
#769-771 (21.67 min)	4.08%	4.36%	3.29%	1.15%	0.57%
#772-774 (21.77 min)	2.17%	6.47%	5.19%	2.27%	0.66%
#775-777 (21.87 min)	1.55%	2.01%	5.74%	2.91%	0.09%
#778-780 (21.97 min)	1.81%	2.12%	4.78%	3.20%	0.44%
#781-783 (22.07 min)	1.42%	1.71%	3.35%	9.53%	1.31%
#784-786 (22.17 min)	2.08%	1.58%	2.23%	6.42%	2.53%
#787-789 (22.27 min)	2.28%	1.83%	3.21%	5.56%	0.76%
#790-792 (22.37 min)	4.98%	0.78%	2.62%	6.42%	2.92%
#793-795 (22.47 min)	5.32%	2.11%	2.25%	4.44%	3.91%
#796-798 (22.57 min)	4.94%	1.27%	3.70%	4.01%	2.15%

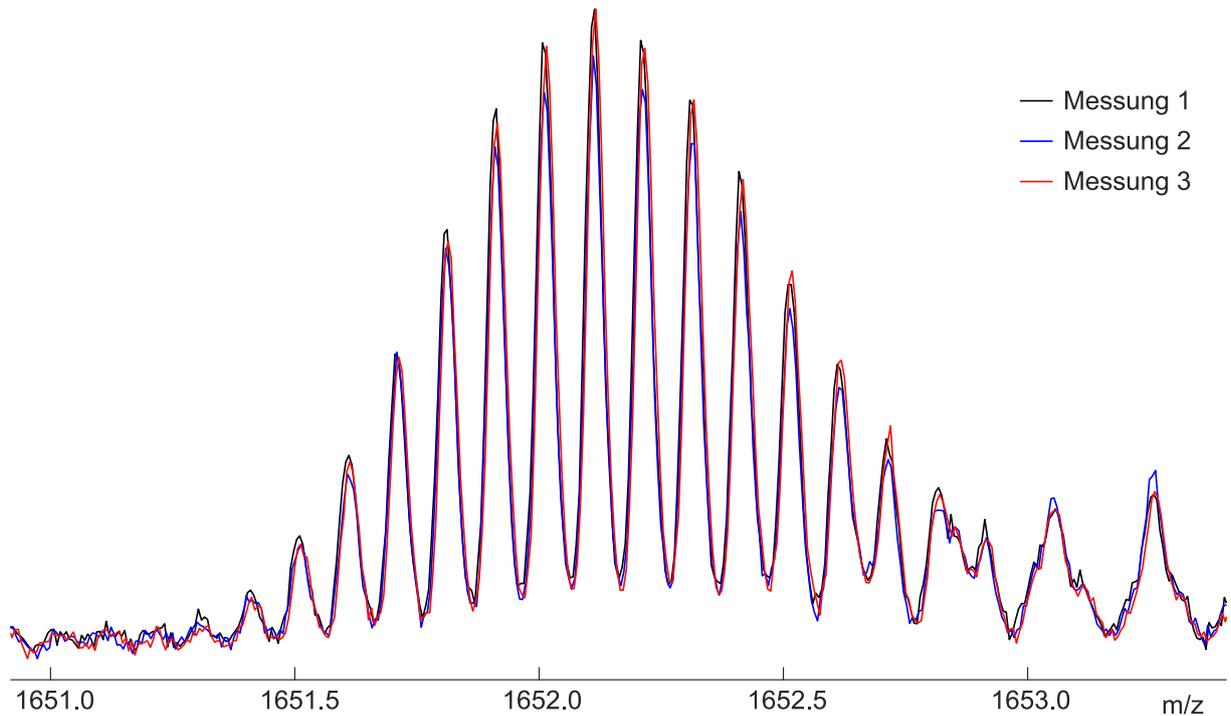


Abb. 58: Vergleich der nicht dekonvolierten Spektren von drei Messungen der identischen PIP-Probe. Hier ist nur das Signal bei m/z 1652 dargestellt. Die Spektren wurden jeweils auf das intensivste PIP-Signal des Gesamtspektrums normiert. Die Intensitäten der Signale zeigen geringe Unterschiede zueinander, was auf ein jeweils anderes Verhältnis des Signals zum intensivsten Signal hindeutet. Es zeigt sich demnach, dass die Unterschiede nicht durch den MaxEnt-Algorithmus hervorgerufen werden.

Tab. 28: Koeffizienten sowie Mittelwert und Standardabweichung der in Abb. 32 (Kap. 4.3.3) dargestellten Quantifizierung. Bei den Koeffizienten handelt es sich um die Summe der Einzelkoeffizienten der unter einem Signal auftretenden Glycoformen. Die Signale sind durch eine Massenbezeichnung charakterisiert.

Signal	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Mittelwert	Standardabweichung
13501	0.76%	0.61%	0.97%	0.78%	0.18%
15562	0.66%	0.63%	0.66%	0.65%	0.02%
15707	2.47%	2.36%	2.55%	2.49%	0.09%
15854	5.28%	4.90%	5.37%	5.19%	0.25%
16000	2.73%	2.84%	2.82%	2.80%	0.05%
16073	1.02%	0.98%	0.99%	1.00%	0.02%
16146	2.66%	2.85%	2.44%	2.65%	0.21%
16219	3.17%	3.07%	2.96%	3.07%	0.11%
16364	6.85%	6.65%	6.79%	6.76%	0.11%
16510	12.62%	12.15%	12.74%	12.50%	0.31%
16656	14.43%	14.45%	14.33%	14.40%	0.07%
16802	16.82%	17.38%	16.91%	17.04%	0.30%
16949	18.70%	19.23%	18.59%	18.84%	0.34%
17021	1.63%	1.62%	1.63%	1.63%	<0.01%
17167	2.01%	2.00%	2.00%	2.00%	0.01%
17313	1.86%	1.88%	1.94%	1.89%	0.04%
17459	2.33%	2.47%	2.29%	2.36%	0.09%

Tab. 29: Koeffizienten sowie Mittelwert und Standardabweichung der in Abb. 34 (Kap. 4.3.3) dargestellten Quantifizierung. Bei den Koeffizienten handelt es sich um die Summe der Einzelkoeffizienten der unter einem Signal auftretenden Glycoformen. Die Signale sind durch eine Massenbezeichnung charakterisiert.

Signal	Aufarbeitung 1	Aufarbeitung 2	Aufarbeitung 3	Mittelwert	Standardabweichung
13501	1.37%	2.52%	2.28%	2.06%	0.60%
15562	0.69%	1.00%	1.00%	0.90%	0.18%
15707	2.41%	3.37%	3.23%	3.00%	0.52%
15854	5.54%	7.42%	7.23%	6.73%	1.03%
16000	2.64%	3.00%	3.00%	2.88%	0.21%
16073	0.74%	1.03%	0.97%	0.92%	0.16%
16146	2.46%	2.53%	2.50%	2.50%	0.04%
16219	2.58%	3.00%	2.94%	2.84%	0.23%
16364	6.08%	7.18%	7.12%	6.79%	0.62%
16510	12.37%	13.59%	13.43%	13.13%	0.66%
16656	14.13%	13.44%	13.56%	13.71%	0.37%
16802	16.76%	14.59%	14.93%	15.43%	1.17%
16949	19.32%	16.24%	16.63%	17.40%	1.68%
17021	1.77%	1.63%	1.56%	1.65%	0.11%
17167	2.25%	2.20%	2.12%	2.19%	0.06%
17313	2.09%	1.77%	1.82%	1.89%	0.17%
17459	2.61%	1.88%	2.01%	2.16%	0.39%

Tab. 30: Koeffizienten sowie Mittelwert und Standardabweichung der in Abb. 35 und Abb. 36 (Kap. 4.3.4) dargestellten Quantifizierung. Bei den Koeffizienten handelt es sich um die Summe der Einzelkoeffizienten der unter einem Signal auftretenden Glycoformen. Die Signale sind durch eine Massenbezeichnung charakterisiert. Die Berechnung des Mittelwerts und der Standardabweichung erfolgte ohne die Dienstags-Probe, da diese unzureichend gekühlt wurde und somit Abweichungen auftreten können.

Signal	Mo.	Di.	Mi.	Do.	Fr.	Mittelwert	Standardabweichung
13501	0.13%	0.22%	0.06%	1.68%	0.45%	0.58%	0.75%
15562	0.14%	0.93%	0.69%	1.74%	1.69%	1.07%	0.79%
15707	1.00%	3.68%	3.17%	4.26%	4.02%	3.11%	1.49%
15854	2.19%	6.94%	5.59%	7.74%	7.32%	5.71%	2.52%
15928	0.68%	1.67%	0.78%	1.30%	1.12%	0.97%	0.29%
16000	1.88%	2.42%	3.45%	3.13%	3.21%	2.92%	0.71%
16073	1.58%	3.16%	2.20%	2.73%	2.54%	2.26%	0.50%
16146	0.91%	1.09%	1.66%	1.70%	2.16%	1.61%	0.52%
16219	5.86%	8.13%	4.67%	5.51%	5.23%	5.32%	0.50%
16364	9.29%	13.82%	10.93%	10.31%	10.25%	10.20%	0.68%
16510	13.46%	16.49%	14.36%	15.25%	14.91%	14.50%	0.78%
16656	18.36%	13.27%	16.21%	13.61%	14.96%	15.78%	2.02%
16802	14.71%	7.46%	12.01%	10.79%	11.13%	12.16%	1.78%
16949	16.14%	8.03%	13.19%	10.30%	11.98%	12.90%	2.46%
17021	2.28%	2.44%	2.41%	1.83%	1.70%	2.05%	0.34%
17167	2.38%	2.63%	2.24%	2.14%	1.92%	2.17%	0.19%
17313	1.55%	1.18%	1.93%	1.41%	1.29%	1.55%	0.28%
17459	1.53%	0.75%	0.94%	0.86%	0.81%	1.03%	0.34%

Tab. 31: Koeffizienten der in Abb. 37 (Kap. 4.3.4) dargestellten Quantifizierung. Bei den Koeffizienten handelt es sich um die Summe der Einzelkoeffizienten der unter einem Signal auftretenden Glycoformen. Die Signale sind durch eine Massenbezeichnung charakterisiert. Auf eine Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung wurde aufgrund der großen Schwankungen verzichtet, die auf eine Veränderung des Glycosylierungsmusters im Laufe des Tages hindeuten.

Signal	9:00 Uhr	12:45 Uhr	16:50 Uhr
13501	0.54%	3.18%	4.06%
15562	1.13%	2.23%	2.37%
15707	3.35%	6.75%	6.84%
15854	5.25%	10.27%	10.96%
16000	2.99%	4.62%	3.75%
16073	2.11%	2.02%	2.89%
16146	1.73%	0.75%	0.38%
16219	4.96%	1.74%	3.95%
16364	9.93%	9.88%	11.10%
16510	11.43%	14.40%	16.56%
16656	15.96%	13.19%	11.80%
16802	11.31%	10.26%	8.50%
16949	14.70%	12.18%	7.73%
17021	2.21%	1.46%	1.17%
17167	2.44%	1.57%	1.56%
17313	2.07%	1.24%	0.81%
17459	1.41%	0.21%	0.15%

Tab. 32: Koeffizienten der in Abb. 38 (Kap. 4.3.4) dargestellten Quantifizierung. Bei den Koeffizienten handelt es sich um die Summe der Einzelkoeffizienten der unter einem Signal auftretenden Glycoformen. Die Signale sind durch eine Massenbezeichnung charakterisiert. Auf eine Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung wurde aufgrund der Veränderung des Glycosylierungsmusters im Laufe des Tages verzichtet.

Signal	13:30 Uhr	14:00 Uhr	14:35 Uhr
13501	2.19%	3.37%	2.63%
15562	1.76%	1.92%	1.73%
15707	5.90%	6.43%	6.27%
15854	9.74%	10.40%	8.77%
16000	4.67%	4.81%	4.83%
16073	1.62%	2.30%	3.25%
16146	1.23%	1.76%	1.01%
16219	2.20%	3.13%	3.46%
16364	9.26%	9.40%	11.01%
16510	14.61%	13.21%	12.70%
16656	14.06%	13.33%	13.71%
16802	11.42%	9.96%	9.11%
16949	12.93%	11.46%	11.53%
17021	1.34%	0.79%	0.88%
17167	2.05%	1.58%	1.44%
17313	1.06%	0.50%	0.75%
17459	0.33%	0.27%	0.18%

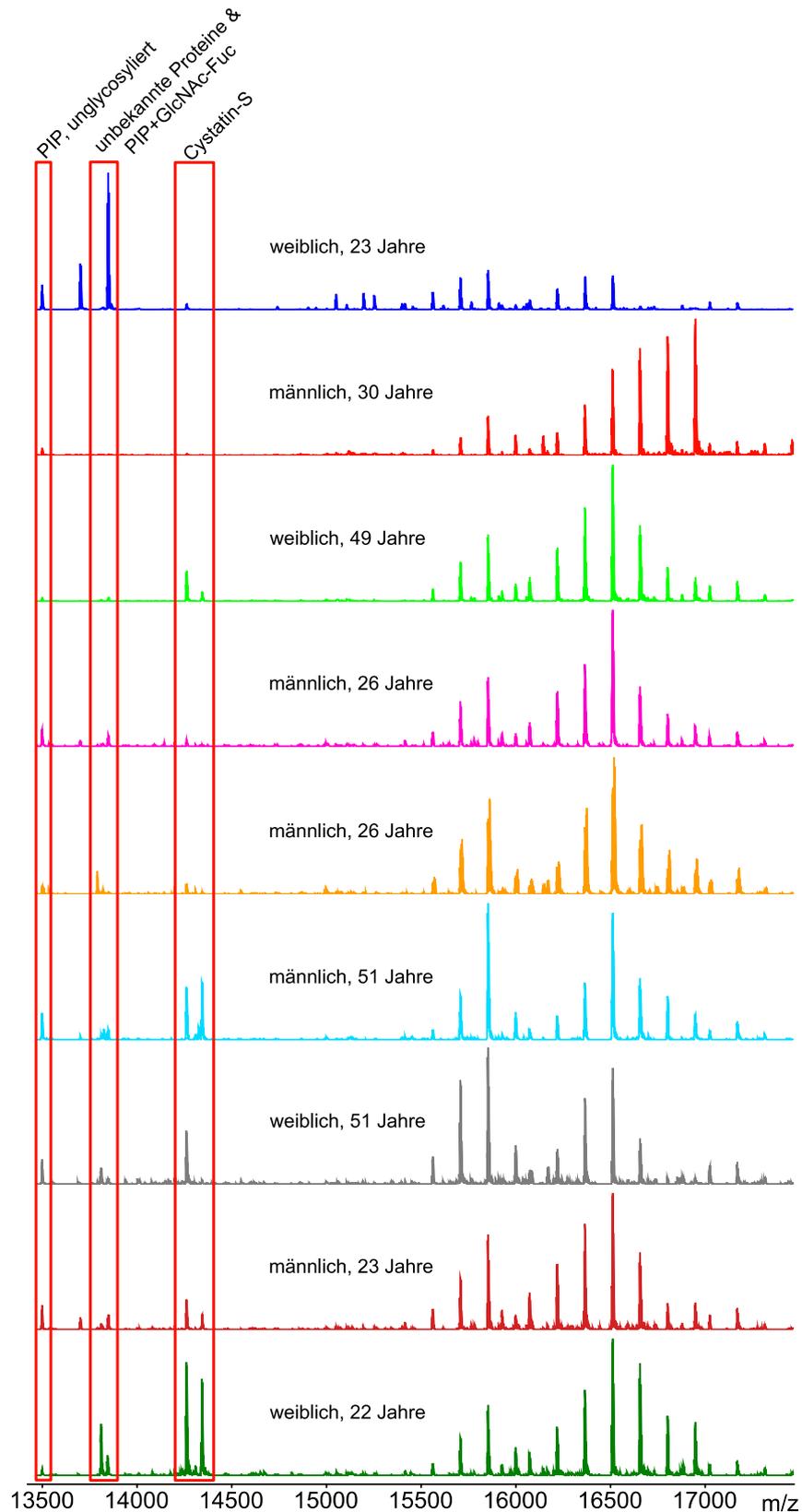


Abb. 59: Dekonvolvierte Massenspektren von intaktem PIP aus Speichel von neun gesunden Probanden. Die Speichelgabe wurde von den Probanden eigenverantwortlich durchgeführt. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Proben während der Probenahme nicht gekühlt wurden. Diese Abbildung soll daher nur als Veranschaulichung einiger im Rahmen dieser Arbeit getätigter Aussagen dienen. Die allgemeinen Unterschiede zwischen den Spektren werden daher nicht diskutiert. Einzige Ausnahme stellt das erste Spektrum dar, welches in **Kap. 4.3.6** näher erläutert wird.

Tab. 33: *Matlab*-Analyse des Signals m/z 16510 von drei unterschiedlich lang inkubierten Proben bei 21 °C. Bei den Werten handelt es sich um den Anteil der entsprechenden Glycoform am Signal m/z 16510. Die erhaltenen Werte müssen kritisch betrachtet werden, da das *Matlab*-Skript bei der Überlagerung mehrerer Glycoformen einen großen Fehlerbereich hat. Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass die Abnahme der sialylierten Strukturen durchaus realistisch ist, da mit zunehmender Inkubationszeit insbesondere eine Glycoform angepasst wird. Mit der Zeit nimmt außerdem die Intensität des Signals stetig ab, was zunächst durch die Desialylierung erklärt wird. Aufgrund der sehr geringen Intensität des Signals bei der Inkubationszeit von 23 Stunden zeigt sich dennoch, dass auch eine Defucosylierung stattfindet.

Glycane				
	H₆N₅F₇ ($m/z=16513$)	H₆N₅F₅S ($m/z=16512$)	H₆N₅F₃S₂ ($m/z=16511$)	H₆N₅FS₃ ($m/z=16510$)
0 h bei 21 °C	43.8%	0.0%	53.4%	2.8%
9 h bei 21 °C	71.3%	4.3%	24.4%	0.0%
23 h bei 21 °C	98.5%	0.0%	0.0%	1.5%

Tab. 34: Koeffizienten der in Abb. 42 (Kap. 4.3.6) dargestellten Quantifizierung. Bei den Koeffizienten handelt es sich um die Summe der Einzelkoeffizienten der unter einem Signal auftretenden Glycoformen. Die Signale sind durch eine Massenbezeichnung charakterisiert. Auf eine Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung wurde aufgrund der großen Zu- und Abnahmen durch die Abbauprozesse verzichtet.

Signal	0 h	1 h	9 h	23 h
13501	0.19%	0.52%	0.41%	0.28%
13705	0.40%	0.15%	0.09%	0.07%
13851	0.26%	0.39%	0.33%	0.30%
15562	0.89%	1.78%	1.96%	2.11%
15707	2.16%	3.84%	4.01%	3.80%
15854	4.21%	7.69%	7.51%	7.06%
15928	0.00%	1.18%	1.60%	1.81%
16000	2.07%	2.32%	2.10%	1.86%
16073	1.49%	2.31%	2.78%	2.62%
16146	1.79%	1.70%	1.57%	1.36%
16219	4.07%	5.13%	6.13%	6.83%
16364	7.59%	9.09%	10.20%	10.90%
16510	11.33%	12.93%	12.76%	12.51%
16656	12.67%	10.20%	9.66%	9.32%
16802	11.96%	8.39%	6.92%	6.07%
16949	13.64%	9.19%	7.45%	6.66%
17021	2.27%	2.35%	2.33%	2.34%
17167	2.74%	2.55%	2.53%	2.40%
17313	2.25%	1.56%	1.45%	1.24%
17459	2.09%	1.10%	0.86%	0.80%

Tab. 35: Koeffizienten der in Abb. 45 (Kap. 4.3.6) dargestellten Quantifizierung. Bei den Koeffizienten handelt es sich um die Summe der Einzelkoeffizienten der unter einem Signal auftretenden Glycoformen. Die Signale sind durch eine Massenbezeichnung charakterisiert. Auf eine Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung wurde aufgrund der großen Zu- und Abnahmen durch die Abbauprozesse verzichtet.

Signal	0 h	1 h	4 h	9 h	23 h
13501	1.03%	0.82%	0.76%	0.75%	2.20%
13705	0.16%	0.23%	0.62%	3.04%	41.16%
13851	0.41%	0.54%	1.35%	6.08%	14.94%
15051	0.45%	0.63%	1.32%	4.06%	2.55%
15197	0.34%	0.36%	0.57%	1.27%	1.48%
15562	1.30%	1.63%	2.58%	4.37%	1.69%
15707	3.30%	3.23%	3.58%	4.45%	1.03%
15854	6.47%	6.41%	6.69%	7.27%	1.88%
16000	2.34%	2.05%	1.42%	0.68%	0.23%
16146	1.78%	1.65%	1.21%	0.51%	0.21%
16219	3.74%	4.48%	6.44%	6.74%	2.14%
16364	8.05%	9.18%	11.13%	10.21%	2.76%
16510	12.14%	11.96%	11.50%	7.75%	2.91%
16656	11.38%	10.81%	8.62%	2.69%	0.26%
16802	9.46%	8.48%	4.70%	0.62%	0.24%
16875	1.02%	1.16%	1.63%	1.54%	0.53%
16949	12.26%	11.12%	6.11%	0.99%	0.56%
17021	2.02%	2.13%	2.18%	1.51%	0.63%
17167	2.45%	2.49%	2.34%	1.58%	1.14%
17313	1.60%	1.53%	0.89%	0.14%	0.08%
17459	1.69%	1.50%	0.86%	0.16%	0.15%

Tab. 36: Koeffizienten der in Abb. 47 (Kap. 4.3.6) dargestellten Quantifizierung. Bei den Koeffizienten handelt es sich um die Summe der Einzelkoeffizienten der unter einem Signal auftretenden Glycoformen. Die Signale sind durch eine Massenbezeichnung charakterisiert. Auf eine Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung wurde aufgrund der großen Zu- und Abnahmen durch die Abbauprozesse verzichtet.

Signal	0 min	30 min	60 min	90 min	150 min
13501	1.53%	2.35%	1.88%	2.14%	2.68%
13705	0.12%	0.30%	0.61%	0.94%	3.37%
13851	0.44%	1.46%	2.71%	5.03%	14.35%
15051	0.18%	0.35%	0.53%	0.75%	1.49%
15562	1.19%	1.71%	2.03%	2.70%	3.44%
15707	3.64%	4.38%	3.86%	4.17%	3.71%
15854	8.26%	9.10%	7.55%	7.50%	5.88%
16000	2.41%	1.96%	1.31%	1.16%	0.38%
16146	1.77%	1.44%	1.05%	0.84%	0.22%
16219	3.83%	5.20%	6.99%	7.88%	7.42%
16364	8.07%	9.46%	11.43%	11.89%	10.64%
16510	14.22%	13.52%	12.95%	11.41%	7.88%
16656	11.26%	8.58%	8.61%	6.43%	2.44%
16802	10.93%	7.16%	4.96%	2.95%	1.01%
16875	0.73%	1.00%	1.34%	1.30%	1.18%
16949	12.50%	8.12%	5.86%	3.33%	0.97%
17021	2.07%	2.33%	2.31%	2.00%	1.68%
17167	2.28%	2.02%	2.08%	1.77%	1.26%
17459	1.46%	0.85%	0.71%	0.42%	0.21%

Tab. 37: Koeffizienten der in Abb. 52 (Kap. 4.3.6.2) dargestellten Quantifizierung. Bei den Koeffizienten handelt es sich um die Summe der Einzelkoeffizienten der unter einem Signal auftretenden Glycoformen. Die Signale sind durch eine Massenbezeichnung charakterisiert. Auf eine Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung wurde aufgrund der großen Zu- und Abnahmen durch die Abbauprozesse verzichtet.

Signal	0 h (unbehandelt)	Wärme	Urea	23 h (unbehandelt)
13501	0.80%	1.32%	3.29%	1.82%
13705	0.44%	0.78%	2.69%	63.54%
13851	0.88%	2.06%	6.08%	4.26%
15562	1.50%	0.90%	0.34%	0.18%
15707	3.39%	2.44%	1.20%	0.38%
15854	6.27%	5.18%	3.55%	0.39%
16000	2.18%	2.06%	1.42%	0.27%
16073	2.33%	1.03%	1.03%	0.25%
16146	1.86%	1.34%	1.14%	0.01%
16219	5.19%	3.12%	3.42%	0.50%
16364	9.58%	6.26%	7.48%	1.34%
16510	10.65%	9.60%	10.55%	0.11%
16656	11.01%	10.84%	9.80%	0.94%
16802	8.13%	10.65%	6.09%	0.08%
16949	9.42%	13.18%	6.97%	0.24%
17021	1.70%	1.42%	1.73%	0.42%
17167	1.64%	1.91%	1.95%	0.59%

10 Danksagung

Ich danke...

...**Prof. Dr. Bernd Meyer** für die interessante Aufgabenstellung und für die sehr wertvolle Unterstützung bei dieser Doktorarbeit.

...**Prof. Dr. Christian B. W. Stark** für die Übernahme des Zweitgutachtens.

...**Alena und Tim** für die tolle und lustige Zeit im GUTEN Computerraum. Was hätte ich nur ohne die KaKa-Pausen, Darts-Spiele und den ganzen anderen Unsinn gemacht? Wahrscheinlich nicht diese Doktorarbeit!

...allen **Analytikern** für die tolle Unterstützung und die vielen beratenden Gespräche.

...meinen Bachelor-Studenten/Praktikanten, **Marcel, Jonas, Katharina** und **Anton**. Ihr habt alle eine tolle Arbeit gemacht und habt einen wichtigen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet.

...dem **Arbeitskreis** für die freundliche Aufnahme und die lustigen Pausen, Ausflüge und Dänemark-Reisen.

...**Henning** für die Einführung in das interessante Gebiet der Glycane und der Massenspektrometrie.

...**Dr. Maria Riedner** und der Abteilung für Massenspektrometrie für die tolle Unterstützung bei dem kleinen (manchmal auch großen) Sorgenkind, dem „maXis“.

...**Alena, Tim, Moritz** und **Nele** für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

...meiner **Familie**, insbesondere meinen Eltern **Norbert** und **Katrin**, für die Unterstützung, ohne die dieses Studium und die Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre. Ihr habt mir sehr geholfen und mich während der Zeit entlastet. Es ist immer schön zu wissen, dass es Menschen gibt, die einen lieben und auf die man sich voll und ganz verlassen kann. Danke, dass ihr meine teilweise schlechte Laune ausgehalten habt.

...meiner **Frau, Nele**, für die Unterstützung und die Stärke, die sie mir gegeben hat. Du warst immer für mich da, hast mir zugehört und mich aufgemuntert. Von Anfang an hast du alle Höhen und Tiefen meines Studiums und meiner Promotion mit mir erlebt und hattest dabei sicherlich nicht immer eine leichte Zeit. Trotzdem konnte ich mir deiner Hilfe immer sicher sein und dafür liebe ich dich.

11 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig verfasst wurde und ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die Dissertation wurde von mir vorher nicht in einem anderen Promotionsverfahren eingereicht. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium.

Hamburg, den 07.08.2019



Jan-Mirco Rusche geb. Schulz