

# Ionenmobilitätsmassenspektrometrie zur Strukturaufklärung von Milchzuckern

Entwicklung und Anwendung moderner Charakterisierungsmethoden

Christian Manz | Prof. Dr. Kevin Pagel

Milchzucker sind essentiell für die Ausbildung der Mikrobiota von Säuglingen und zeichnen sich durch eine hohe strukturelle Komplexität aus. Es existieren über hundert Variationen mit einer Vielzahl von unterschiedlichen Isomeren, die in wechselnden Verhältnissen in Muttermilch vorkommen. Für die schnelle Charakterisierung dieser komplexen Moleküle kann die Ionenmobilitätspektrometrie in Kombination mit Massenspektrometrie eine zentrale Rolle einnehmen.

Kohlenhydrate umgeben uns im täglichen Leben, ihre biologische Rolle in lebenden Organismen wird jedoch häufig unterschätzt. Die biologische Funktion ist ähnlich wie bei Proteinen von der zugrundeliegenden Struktur abhängig. Zucker kommen beispielsweise als kovalent gebundene Spezies an Proteinen und Lipiden vor und spielen dort eine wichtige Rolle als Sensoren für die Kommunikation zwischen Zellen. Darüber hinaus findet man Zucker auch in freier Form zum Beispiel als Gerüststoffe in Zellulose oder als Energiequelle in Form von Stärke. Der überwiegende Teil dieser Moleküle sind Polysaccharide die aus repetitiven Einheiten bestehen und eine begrenzte strukturelle Vielfalt aufweisen. Die biologische Funktion und die Komplexität von kleineren, weniger regelmäßigen freien Zuckern kann jedoch viel weiter gehen. Ein besonderes Beispiel hierfür sind menschliche Milchzucker (human milk oligosaccharides, HMO's). Lactose, der häufigste Zucker in Milch, ist ein relativ simples Disaccharid. Die wesentlichen Funktionen werden jedoch von deutlich komplexeren Strukturen übernommen. Diese bestehen aus mehreren Lactose bzw. N-Acetyllactosaminkernen, die unterschiedlich verknüpft und durch Fucose oder Sialinsäure funktionalisiert sein können. Über hundert verschiedene Varianten, die sich in ihrer chemischen Struktur unterscheiden, sind bekannt [1]. Viele dieser Milchzucker kommen in unterschiedlichen Verhältnissen in Muttermilch vor und wirken dort präbiotisch.

## Aufbau von komplexen Zuckern

Die Grundbausteine komplexer Zucker sind Monosaccharide, Polyhydroxyaldehyde und Polyhydroxyketone, die sich oft lediglich in der stereochemi-

schen Orientierung einzelner Hydroxygruppen unterscheiden (z.B. Glucose vs. Galactose). Zwei solcher Monosaccharide können potentiell an jeder Hydroxygruppe miteinander verknüpft werden, wodurch theoretisch eine Vielzahl von Konnektivitätsisomeren möglich ist. Zusätzlich entsteht bei jeder Verknüpfung ein neues Stereozentrum, sodass zwei unterschiedliche Konfigurationsisomere gebildet werden können. Die Kombination dieser drei Strukturmerkmale (Komposition, Konnektivität und Konfiguration) führt zu einer immensen strukturellen Vielfalt mit einer Vielzahl unterschiedlicher biologischer Funktionen [2]. Aufgrund des isomeren Charakters lassen sich komplexe Kohlenhydrate nur schwer durch ein Messen der Molekülmasse mittels Massenspektrometrie (MS) unterscheiden. Auch alternative Methoden wie die Hochleistungsflüssigchromatographie (high performance liquid chromatography, HPLC) stoßen bei Zuckern aufgrund ihrer hohen Polarität oft an ihre Grenzen. Dieser Mangel an geeigneten analytischen Techniken ist einer der Gründe dafür, dass Zucker im Vergleich zu DNA und Proteinen bisher nur unzureichend verstanden sind.

## Strukturaufklärung mittels IM-MS

Im letzten Jahrzehnt hat sich mit der Ionenmobilitätspektrometrie (IMS) eine vielversprechende Methode zur schnellen und umfangreichen Strukturaufklärung von komplexen Oligosacchariden herauskristallisiert. Sie basiert auf der Trennung von Ionen in einer mit Gas gefüllten Zelle, durch die die Probenmoleküle mithilfe eines elektrischen Feldes geleitet werden (Abb. 1). Auf ihrem Weg durch die Driftzelle kollidieren die Ionen mit dem Puffergas und werden dabei gebremst. Die resultierende mittlere Geschwindigkeit,



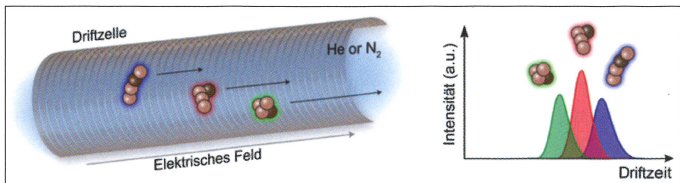


Abb. 1: Schematische Darstellung einer Trennung von Molekülen unterschiedlicher Größe und Form mittels Ionenmobilitätsmassenspektrometrie (IM-MS).

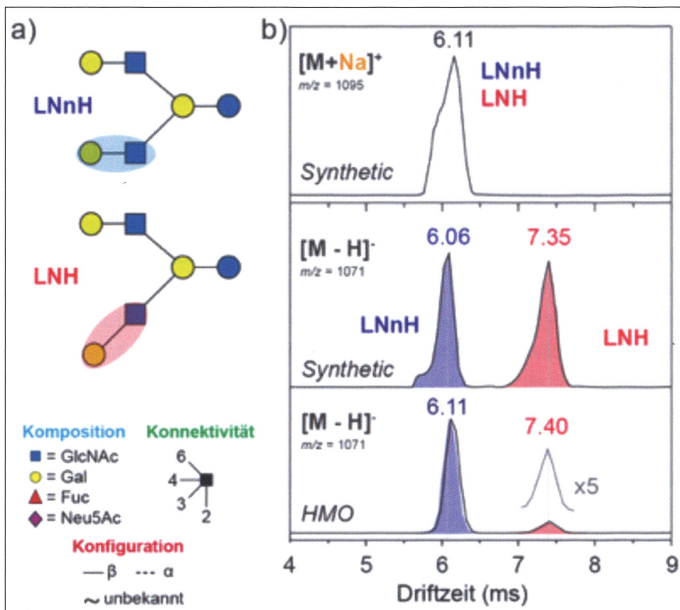


Abb. 2: a) Darstellung der Milchzucker Lacto-N-neohexaose (LNnH) und Lacto-N-hexaose (LNH) in der vereinfachten Symbolnomenklatur für Glycane (SNFG). b) Driftzeiten von LNnH und LNnH als Natriumaddukt (oberes Mobilogramm) und als deprotonierte Spezies (mittleres und unteres Mobilogramm).

die sogenannte Driftzeit, ist unter anderem abhängig von der Größe und Form der Ionen, was es in vielen Fällen möglich macht Isomere zu unterscheiden. Da die Trennung sehr schnell ist und meist nur einige Millisekunden dauert, lässt sich die IMS sehr gut mit Flugzeit-MS kombinieren, wodurch multidimensionale Daten erhalten werden.

Das Potential der Ionenmobilitätsmassenspektrometrie (IM-MS) zur Untersuchung von Milchzuckern konnte unter anderem am Beispiel der isomeren Milchzucker Lacto-N-hexaose (LNH) und Lacto-N-neohexaose (LNnH) gezeigt werden [3]. Beide Moleküle bestehen aus denselben Bausteinen und unterscheiden sich lediglich in der Konnektivität einer der terminalen Galactose. Solche kleinen Unterschiede sind mit traditionellen Analysemethoden kaum nachzuweisen. Die Driftzeiten beider Moleküle in der IMS unterscheiden sich jedoch mitunter deutlich, sodass die Isomere wie in Abbildung 2 gezeigt basislinienrein getrennt werden können. Ähnlich deutliche Unterschiede konnten auch für das Isomergemisch Lacto-N-triose (LNT) und Lacto-N-neotriose (LNnT) [3], sowie für eine Reihe von weiteren fucosylierten Milchzuckern beobachtet werden [4,5]. Von besonderer Bedeutung ist dabei jedoch die Art und Polarität der Ionen. Während Natriumaddukte im Falle von LNH und LNnH kaum zu unterscheiden sind, lassen sich deprotonierte Ionen sehr gut trennen. Durch eine systematische Variation der Adduktionen können so bestimmte Trennungen optimiert werden [6].

### Erkennung von Strukturmotiven in Zuckern

Nicht immer lassen sich vergleichsweise große Moleküle wie das gezeigte Hexasaccharid derart gut mittels IM-MS auflösen. Die Trennbarkeit von Isomeren nimmt mit zunehmender Größe ab und kleinere Tri-, Tetra-, und Pentasaccharide sind oft am besten trennbar. Viele Milchzucker sind jedoch deutlich größer und komplexer und müssen deshalb vorher mittels Tandem-Massenspektrometrie, beispielsweise durch kollisionsinduzierte Dissoziation, in kleinere Fragmente zerlegt werden. Durch eine Fragmentanalyse

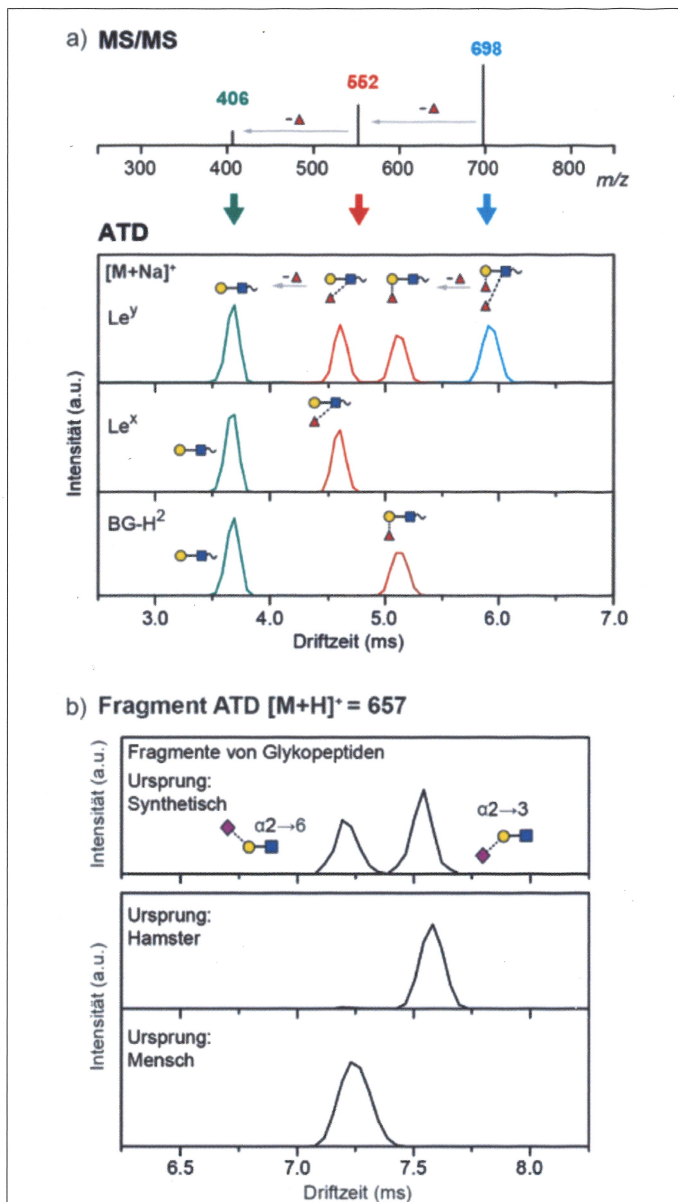



# TOSOH THE ART OF SEPA RATION

**NEW! - BIOPHARMACEUTICAL APPLICATION NOTEBOOK**

Discover the best methods for the (UH)PLC analysis of biomolecules! Request a copy of the application notebook now at <http://bit.ly/UHPLC-ApplicationBook>

**TOSOH BIOSCIENCE**



**Abb. 3:** Erkennung charakteristischer Struktur motive in Zuckern mittels IM-MS. **a)** Tandem-MS-Spektrum des Blutgruppen Epitops Le<sup>y</sup> und der Vergleich der Fragmentdriftzeiten mit den Driftzeiten der intakten Trisaccharide Le<sup>x</sup> und Blutgruppe H<sup>2</sup>.

**b)** Mobilogramme von sialylier-ten Trisaccharidfragmenten, die im Massenspektrometer von Glycopeptiden unterschiedlichen Ursprungs (oben: synthetisch, Mitte: Hamster, unten: Mensch) abgespalten wurden.

ist es zum Beispiel sehr leicht möglich, verzweigte und lineare Milchzuckerisomeren voneinander zu unterscheiden [7]. Noch leistungsfähiger ist die IMS, wenn nicht die gesamte Struktur des Milchzuckers, sondern nur bestimmte Strukturelemente charakterisiert werden sollen [8]. Diese Features sind meist an den Extremitäten größerer Glykokonjugate zu finden, dienen dort als Sensoren bzw. Epitope und bestimmen so zum Beispiel die Blutgruppenzugehörigkeit. Die beiden wichtigsten Vertreter sind das Fucosylierungs- und das Sialylierungsmuster die exemplarisch in Abb. 3 gezeigt sind.

Typische Fucosylierungsmuster wurden in unserer Arbeitsgruppe anhand von Blutgruppenepitopen untersucht [9]. Dabei handelte es sich um isomere Tri- und Tetrasaccharide, welche denselben Disaccharidkern teilen und sich nur in der Art der Verknüpfung der Fucoseinheiten unterscheiden (siehe Abb. 3a). Diese Strukturen lassen sich von größeren Glycanen direkt im Massenspektrometer als Fragmente abspalten und können anschließend mittels IMS getrennt und zugeordnet werden. Auf diese Weise ist es zum Beispiel möglich die typischen, auch in Milch relevanten, fucosylierten

Epitope Le<sup>y</sup>, Le<sup>x</sup> und Blutgruppe H Typ 2 schnell und einfach nachzuweisen. Ein ähnliches Prinzip kann auch zur Analyse des Sialylierungsmusters verwendet werden. Abbildung 3b zeigt Trisaccharidfragmente verschiedener Glycopeptide, die ursprünglich aus Hamsterzellen und humanem Plasma stammen [10]. Eine Fragmentation und anschließende IMS-Analyse ermöglicht eine einfache Unterscheidung zwischen einer α2-3 und einer α2-6-Sialylierung.

### Zusammenfassung und Ausblick

IM-MS ist eine vielversprechende Technik zur Strukturaufklärung von Zuckern und Glykokonjugaten. Schon jetzt können neben allgemeinen Aussagen zum Aufbau eines Moleküls auch Informationen zu charakteristischen Motiven wie der Sialylierung und Fucosylierung erlangt werden. Darüber hinaus kann IM-MS relativ einfach mit orthogonalen Methoden wie der HPLC gekoppelt werden. Bereits vorhandene LC-MS Methoden können so ohne wesentliche Einschränkungen um die IMS-Dimension ergänzt werden. Auch eine Nutzung der IMS als Methode zur Isolation und Selektion von Ionen für weitere Gasphasenuntersuchungen wurden bereits demonstriert. Diese Beispiele zeigen die vielfältigen Möglichkeiten der Ionenmobilitätsspektrometrie als orthogonale Mess- und Trenntechnik, die in Zukunft nicht nur als Analysemethode für Zucker, sondern generell im omics-Bereich Anwendung finden wird.

- [1] V. Mantovani, F. Galeotti, F. Maccari, N. Volpi, *Electrophoresis* 2016, 37, 1514-1524.
- [2] A. Varki ET AL., *Glycobiology* 2015, 25, 1323-1324.
- [3] W. B. Struwe, C. Baldauf, J. Hofmann, P. M. Rudd, K. Pagel, *Chem. Commun.* 2016, 52, 12353-12356.
- [4] Y. Huang, E. D. Dodds, *Anal. Chem.* 2015, 87, 5664-5668.
- [5] M. Zhu, B. Bendiak, B. Clowers, H. H. Hill, *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, 394, 1853-1867.
- [6] Y. Huang, E. D. Dodds, *Anal. Chem.* 2013, 85, 9728-9735.
- [7] J. Hofmann, H. S. Hahm, P. H. Seeberger, K. Pagel, *Nature* 2015, 526, 241-244.
- [8] C. Manz, K. Pagel, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2017, 42, 16-24.
- [9] J. Hofmann, A. Stuckmann, M. Crispin, D. J. Harvey, K. Pagel, W. B. Struwe, *Anal. Chem.* 2017, 89, 2318-2325.
- [10] H. Hinneburg, J. Hofmann, W. B. Struwe, A. Thader, F. Altmann, D. Varon Silva, P. H. Seeberger, K. Pagel, D. Kolarich, *Chem. Commun.* 2016, 52, 4381-4384.



### Autoren | Kontakt

**Christian Manz | Prof. Dr. Kevin Pagel**

Freie Universität Berlin | Institut für Chemie und Biochemie  
Takustr. 3 | 14195 Berlin

[www.bcp.fu-berlin.de/en/chemie/chemie/forschung/OrgChem](http://www.bcp.fu-berlin.de/en/chemie/chemie/forschung/OrgChem)