

- [8] Z. Salamon, G. Tollin, *Biophys. J.* **1996**, *71*, 858–867.
 [9] I. T. Dorn, R. Eschrich, E. Seemüller, R. Guckenberger, R. Tampé, *J. Mol. Biol.* **1999**, *288*, 1027–1036.
 [10] a) C. R. MacKenzie, T. Hirama, K. K. Lee, E. Altman, N. M. Young, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 5533–5538; b) B. A. Harrison, C. R. MacKenzie, T. Hirama, K. K. Lee, E. Altman, *J. Immunol. Methods* **1998**, *212*, 29–39; c) M. J. Kaminisky, C. R. MacKenzie, M. J. Mooibroek, T. E. S. Dahms, T. Hirama, A. N. Houghton, P. B. Chapman, S. V. Evans, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 5597–5604.
 [11] O. Stachowiak, M. Dolder, T. Wallmann, *Biochemistry* **1996**, *35*, 15522–15528.
 [12] C. Lange, K.-W. Koch, *Biochemistry* **1997**, *36*, 12019–12026.
 [13] WWW-URL: <http://www.biacore.com/new/pioneer.html>.
 [14] S. Heyse, O. P. Ernst, Z. Dienes, K. P. Hofmann, H. Vogel, *Biochemistry* **1998**, *37*, 507–522.
 [15] a) S. Ohlson, M. Strandh, H. Nilshans, *J. Mol. Recognit.* **1997**, *10*, 135–138; b) M. Strandh, B. Persson, H. Roos, S. Ohlson, *J. Mol. Recognit.* **1998**, *11*, 188–190.
 [16] a) J. R. Krone, R. W. Nelson, D. Dogruel, P. Williams, R. Granzow, *Anal. Biochem.* **1997**, *244*, 124–132; b) R. W. Nelson, J. R. Krone, O. Jansson, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4363–4368; c) R. W. Nelson, J. R. Krone, O. Jansson, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4369–4374; d) R. W. Nelson, J. W. Jarvik, B. E. Taillon, K. A. Tubbs, *Anal. Chem.* **1997**, *71*, 2858–2865.
 [17] C. P. Sönksen, E. Nordhoff, Ö. Jansson, M. Malqvist, R. Roepstorff, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2731–2736.
 [18] a) WWW-URL: <http://www.ti.com/spreeta>; b) J. Melendez, R. Carr, D. U. Bartholomew, K. Kukanskis, J. Elkind, S. Yee, C. Furlong, R. Woodbury, *Sens. Actuators B* **1996**, *35*, 1–5.
 [19] J. L. Elkind, D. I. Stimpson, A. A. Strong, B. U. Bartholomew, J. L. Melendez, *Sens. Actuators B* **1999**, *54*, 182–190.

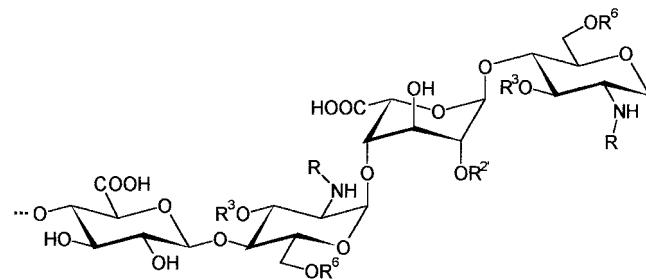
Sequenzierung von Polysacchariden

Petra Mischnick*

Chemische Verbindungen, deren Namen mit der Vorsilbe „Oligo“ oder „Poly“ beginnen, erweitern die Fragen nach der Struktur immer noch um den Aspekt der Sequenz. Naturstoffe, die als Gerüstsubstanzen oder Energiedepots dienen, erfordern auf der konstitutionellen Ebene meist nur einfach gestrickte Baupläne, mit denen z.B. die Anforderungen nach mechanischer Festigkeit oder osmotischer Inaktivität erfüllt werden können. Beispiele hierfür sind die allein aus Glucose aufgebauten Polysaccharide Cellulose und Stärke. Anders sieht es aus, wenn Phänomene wie molekulare Erkennung und Informationsspeicherung ins Spiel kommen. Hier dienen die verschiedenen Monomere als Alphabet, mit dem durch unerschöpfliche Kombination der Buchstaben exakte Anweisungen geschrieben werden können, oder als Baukasten für differenzierte makromolekulare Strukturen, die mit hoher Spezifität Rezeptoren oder Substrate erkennen. Paradebeispiele hierfür sind die Nucleinsäuren und die Proteine, deren Sequenzierung längst etabliert ist. Dagegen erregt der Titel „Sequencing Complex Polysaccharides“ einer jüngst von Sasisekharan und Mitarbeitern in *Science* publizierten Arbeit^[1] Aufmerksamkeit. Dies hat verschiedene Gründe: Zum einen erlaubt die Polyfunktionalität der Kohlenhydrate vielfältigere Verknüpfungsmöglichkeiten als bei Nucleotiden und Aminosäuren und schließt Verzweigungen wie zusätzliche Substitutionen ein. Zum anderen hat man die biologische Bedeutung von Kohlenhydraten z.B. für die Zellerkennung und -adhäsion, Entzündungsprozesse oder die Regulation von enzymatischen Reaktionen und damit auch

die analytische Herausforderung vergleichsweise spät erkannt.

Was macht nun die Sequenzanalyse von Oligo- und Polysacchariden so schwierig? Zunächst einmal ist man fast immer mit einer strukturellen Vielfalt konfrontiert. N- und O-Glycane von Glycoproteinen unterscheiden sich je nach Spezies, Gewebe, Zelltyp und Protein. Bei der Biosynthese der Glycosaminoglycane Heparin und Heparansulfat kommt es durch polymeranaloge enzymatische Modifizierung von (*D*-GlcA β 1,4-*D*-GlcNAc1,4-)_n zur teilweisen Isomerisierung der Wiederholungseinheiten zu (*L*-IdoA α 1,4-*D*-GlcNAc1,4-)_n, zu N-Desacytylierung/N-Sulfatierung sowie zu unterschiedlichen O-Sulfatierungsmustern (Abbildung 1), was die Situation kompliziert.^[2] Einem schrittweisen chemischen Abbau von einem Kettenende, wie dem Edman-Abbau von Peptiden, steht die Polyfunktionalität der Kohlenhydrate ebenfalls im Wege. Auch eine Amplifizierung bestimmter Strukturen,



$R^2, R^3, R^6 = H, SO_3^- \quad R = Ac, SO_3^-$

Abbildung 1. Möglicher Ausschnitt aus einem Heparin- oder einem Heparansulfatmolekül (*D*-GlcA β 1,4-*D*-GlcNHR α 1,4-*L*-IdoA α 1,4-*D*-GlcNHR α 1,4-). GlcA = Glucuronsäure, GlcNH₂ = 2-Amino-2-desoxyglucose, IdoA = Iduronsäure.

[*] Prof. Dr. P. Mischnick

Technische Universität Braunschweig

Institut für Lebensmittelchemie

Schleinitzstraße 20, 38106 Braunschweig (Deutschland)

Fax: (+49) 531-391-7230

E-mail: p.mischnick@tu-bs.de

wie sie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für Nucleinsäuren ermöglicht, ist bei Polysacchariden nicht durchführbar.

Erste Fortschritte brachte die Entwicklung „weicher“ Ionisationsmethoden in der Massenspektrometrie, zuerst der FAB-, dann der MALDI- und ESI-MS (FAB = fast atom bombardment, MALDI = matrix-assisted laser desorption/ionization, ESI = electrospray ionization). Sie erlauben prinzipiell die Bestimmung der Molekülmasse sowie der Abfolge der Zuckerbausteine, die sich durch sukzessive Spaltung von Glycosidbindungen zu erkennen gibt.^[3] Aufgrund der Vielzahl der möglichen Stereoisomere kann jedoch nicht entschieden werden, um welche Hexose, um welchen Desoxy- oder Aminozucker es sich handelt, sofern die Baustein Zusammensetzung hier keine eindeutigen Vorgaben macht. Durch Hochenergie-Stoßaktivierung entstehen darüber hinaus verzweigungsspezifische Fragment-Ionen, die weitere Strukturinformationen liefern.^[4] Bei allen diesen Ionisationsmethoden bilden die Kohlenhydrate das Schlusslicht, da sie mit deutlich schlechterer Ausbeute ionisiert werden als die Peptide und Oligonucleotide. Grundlegend für die erfolgreiche Sequenzierungsstrategie von Sasisekharan et al.^[1] war daher auch das Verfahren von Juhasz und Biemann,^[5] bei dem durch Komplexierung der hoch sulfatierten heparinartigen Oligosaccharide mit basischen Proteinen definiter Molekülmasse eine Empfindlichkeitssteigerung für die MALDI-TOF-MS in den 100-fmol-Bereich hinein erzielt und Sulfatverlust vermieden werden konnte.

Aufgrund ihrer vielfältigen biologischen Funktionen bei hoher struktureller Diversifikation sind die O- und N-Glycane sowie Heparin/Heparansulfat am häufigsten Gegenstand und Motiv für eine leistungsfähige, empfindliche und praktikable Kohlenhydratanalytik. Glycane aus Glycoproteinen sind über ihr Fragmentierungsverhalten unter CID-Bedingungen (CID = collision-induced decomposition) mittels MALDI-MS sequenziert worden^[6] sowie durch Nutzung metastabiler Ionen (Post-Source Decay, PSD-MALDI-MS)^[7,8] oder nach schrittweisem enzymatischem Abbau mit Exoglycosidasen.^[9–11] Auch über die Komplexität von Sacchariden aus Humanmilch konnten durch diese Strategie neue Erkenntnisse gewonnen werden.^[12]

Welches sind nun die Schlüsselschritte bei der oben genannten neuen Sequenzierungsstrategie? Die Autoren

haben Hexa- bis Decasaccharide heparinartiger Strukturen untersucht. Ausgangspunkt ihrer Überlegungen sind die möglichen Sequenzen, die sich aus den Disaccharidbausteinen (Abbildung 1), bestehend aus einer Uronsäure und einem Hexosamin, konstruieren lassen. Unter Berücksichtigung der möglichen Sulfatierungs- und N-Acetylierungsmuster ergeben sich 32 Bausteine, die für Rechenoperationen codiert werden. Dies ist zwingend nötig, da bereits für ein aus diesen Einheiten aufgebautes Octasaccharid theoretisch mehr als eine Million Strukturen möglich sind (32⁴). Ein erschöpfender Abbau mit Heparinasen liefert die Bausteine, deren Zusammensetzung mittels Kapillarelektrophorese (CE) und Vergleich mit Standardsubstanzen analysiert werden kann. Die MALDI-MS-Analyse gibt durch Bestimmung der Molekülmasse Aufschluss über die möglichen Kombinationen aus den codierten Disaccharideinheiten. Aufgrund der Variation der Massen in Abhängigkeit vom Sulfatierungs- und Acetylierungsgrad und mit den Erkenntnissen der Bausteinanalyse ist bereits eine deutliche Eingrenzung möglich. Durch selektiven chemischen oder enzymatischen Partialabbau werden nun jeweils neue Bruchstücke erhalten, deren Molekülmassen ebenfalls durch MALDI-MS bestimmt werden. Damit werden die Möglichkeiten passender Vorstufen schrittweise eingeschränkt. Um auch die Konfiguration der Uronsäure am nichtreduzierenden Ende zu identifizieren, werden kommerziell erhältliche Exoenzyme eingesetzt. In Tabelle 1 ist das Vorgehen der Autoren am Beispiel eines Octasaccharids aufgeführt. Die für 2-Amino-2-desoxyzucker übliche ketten-spaltende Desaminierung nach Diazotierung und Ringverengung zur 2,5-Anhydromannose erlaubt die Lokalisierung von N-Sulfat- und N-Acetylgruppen im Hexosamin. Eine Markierung des reduzierenden Endes ermöglicht dessen Unterscheidung von den inneren Bausteinen. Durch Auswahl der geeigneten Abbaumethoden und massenspektrometrische Analyse mit rechnerischer Überprüfung, welche der codierten Disaccharidstrukturen in Übereinstimmung mit dem Messergebnis stehen, gelingt die Aufklärung der gesamten Sequenz.

Wie hoch aktuell und intensiv bearbeitet die detaillierte Strukturaufklärung von Heparin und Heparansulfaten ist, zeigen zwei weitere 1999 erschienene Arbeiten, die „Sequence analysis...“^[13] bzw. „A strategy for rapid sequencing...“^[14]

Tabelle 1. Sequenzierungsbeispiele aus Lit. [1]

Beispiel 1		$n^{[a]}$
a)	MALDI-MS: $M = 2230 \rightarrow$ Octasaccharid- $S_{11}Ac_0$	
b)	erschöpfender enzymatischer Abbau mit Heparinasen zu Disacchariden: CE $\rightarrow \Delta U_{2S}H_{NS,6S}, \Delta UH_{NS,6S}$ (3:1) ^[b]	32
c ₁)	Heparinase I: MALDI-MS \rightarrow Tetrasaccharid- S_5 , Disaccharid- S_3	4
c ₂)	Heparinase II: MALDI-MS \rightarrow Hexasaccharid- $S_9 \rightarrow \Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}GH_{NS,6S}$ ^[b]	1
Beispiel 2		
a)	MALDI-MS: \rightarrow Decasaccharid- $S_{13}Ac_1$	
b)	erschöpfender enzymatischer Abbau mit Heparinasen zu Disacchariden: CE $\rightarrow \Delta U_{2S}H_{NS,6S}, \Delta UH_{NAc,6S}, \Delta UH_{NS,3S,6S}$ (3:1:1)	320
c ₁)	Heparinase I („mild“): \rightarrow MALDI-MS	52
c ₂)	Heparinase I („erschöpfend“): \rightarrow MALDI-MS	28
d)	Markierung des Decasaccharids am reduzierenden Ende	
e ₁)	Heparinase II: \rightarrow MALDI-MS	6
e ₂)	erschöpfender Abbau durch Desaminierung: \rightarrow MALDI-MS—Lokalisierung von H_{NAc}	6
f)	Sukzessive Behandlung mit Exoenzymen $\rightarrow \Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$	1

[a] n =berechnete Zahl von Sequenzen, die mit den experimentellen Daten in Einklang stehen. [b] U = Uronsäure (I oder G), ΔU = 4,5-ungesättigte Uronsäure aus enzymatischer Spaltung, I = Iduronsäure, G = Glucuronsäure, H = Hexosamin, Index: 2S sulfatiert an O2, NS: sulfatiert an N usw.

in ihrem Titel ankündigen. Die chemischen (desaminierende Spaltung) und enzymatischen Methoden sind dieselben wie in der eingangs zitierten *Science*-Arbeit,^[1] aber die Analyse der Abbauprodukte erfolgt im ersten Fall^[13] durch Anionenaustauschchromatographie der Tritium-markierten Oligosaccharide, im zweiten Beispiel^[14] durch Gelektrophorese nach reduktiver Aminierung mit einem Fluorophor. Beide Arbeiten kommen ohne Massenspektrometrie aus.

Bei den vorgestellten Anwendungsbeispielen handelt es sich durchgehend um isolierte, chemisch einheitliche Hexabis Decasaccharide. Isolate von natürlichen Oligosacchariden sind häufig mikroheterogen und müssen üblicherweise erst sorgfältig gereinigt werden. Die Bausteinanalyse durch Kapillarelektronphorese ist auch bei Sasisekharan und Mitarbeitern essentiell für die Eingrenzung der möglichen Sequenzen. Worin liegt der Fortschritt dieser Strategie? Die MALDI-MS-Analyse erfordert nach Aussage der Autoren keine erneute Isolierung und Reinigung der Spaltprodukte nach den verschiedenen Manipulationen. Außerdem sehen sie für ihren Ansatz das Potential einer voll automatischen Sequenzierungsmethode, wenn erst mit besser untersuchten und spezifischeren Enzymen die Werkzeuge für einen definierten Partialabbau komplexer Polysaccharide zur Verfügung stehen und so ein verfeinerter und leistungsfähigerer Algorithmus entwickelt werden kann. Dies wird um so wichtiger sein, wenn es in Zukunft gelingen soll, größere Sequenzen sowie

Gemische von Oligosacchariden auf ähnliche Weise zu analysieren und so den Aufwand für Fraktionierung von biologischem Material zu reduzieren, eine Herausforderung, auf deren Bewältigung man gespannt sein kann.

- [1] G. Venkataraman, Z. Shriven, R. Raman, R. Sasisekharan, *Science* **1999**, 286, 537–542.
- [2] M. Maccarana, Y. Sakura, A. Tawada, K. Yoshida, U. Lindahl, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 17804–17810.
- [3] H. Egge, J. Peter-Katalinic, *Mass Spectrom. Rev.* **1987**, 6, 331–393.
- [4] V. N. Reinhold, B. B. Reinhold, C. E. Costello, *Anal. Chem.* **1995**, 67, 1772–1784.
- [5] P. Juhasz, K. Biemann, *Carbohydr. Res.* **1995**, 270, 131–147.
- [6] Y. Mechref, A. G. Baker, M. V. Novotny, *Carbohydr. Res.* **1998**, 313, 145–155.
- [7] J. Lemoine, F. Chirat, B. Domon, *J. Mass Spectrom.* **1996**, 31, 908–912.
- [8] N. Viseux, C. E. Costello, B. Domon, *J. Mass Spectrom.* **1999**, 34, 364–376.
- [9] C. W. Sutton, J. A. O'Neill, J. S. Cottrell, *Anal. Biochem.* **1994**, 218, 34–46.
- [10] B. Küster, T. J. P. Naven, D. J. Harvey, *J. Mass Spectrom.* **1996**, 31, 1131–1140.
- [11] Y. Mechref, M. V. Novotny, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 455–463.
- [12] B. Finke, B. Stahl, A. Pfenninger, M. Karas, H. Daniel, G. Sawatzki, *Anal. Chem.* **1999**, 71, 3755–3762.
- [13] R. R. Vivès, D. A. Pye, M. Salmivirta, J. J. Hopwood, U. Lindahl, J. T. Gallagher, *Biochem. J.* **1999**, 339, 767–773.
- [14] J. E. Turnbull, J. J. Hopwood, J. T. Gallagher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 2698–2703.

Direkter Nachweis von H-Brücken in Biopolymeren durch NMR-Spektroskopie

Gerd Gemmecker*

Professor Horst Kessler zum 60. Geburtstag gewidmet

Das Wissen um Existenz und Bedeutung von Wasserstoffbrückenbindungen ist heute in der Chemie Allgemeingut. Das Konzept der Wasserstoffbrücken spielt eine wichtige Rolle bei der Erklärung der physikochemischen Eigenschaften von Wasser, anorganischen und organischen Säuren sowie säure- und basenkatalysierten Reaktionen. Wasserstoffbrücken beeinflussen konformative Präferenzen und die Reaktivität vieler Klassen von organischen Verbindungen.

In der Biochemie sind Wasserstoffbrücken verantwortlich für die Selektivität der Basenpaarungen in Nucleinsäuren – die Grundlage der Speicherung und Vererbung genetischer Information. Weiterhin spielen Wasserstoffbrücken eine ent-

scheidende Rolle bei der räumlichen Faltung von Proteinen: Ihre wichtigsten Strukturelemente – helicale Bereiche und β -Faltblätter – werden durch ihr spezifisches Wasserstoffbrückenmuster definiert und stabilisiert.

Schließlich tragen Wasserstoffbrücken zur Affinität und Selektivität bei der molekularen Erkennung bei, von einfachen Wirt-Gast-Systemen bis hin zu den Multikomponentenkomplexen aus Proteinen, Nucleinsäuren etc., die die Grundlage vieler biologischer Funktionen bilden.

Bei der experimentellen Strukturaufklärung durch Röntgenbeugung oder NMR-Spektroskopie konnte bisher allerdings immer nur sehr indirekt auf die Anwesenheit von Wasserstoffbrücken geschlossen werden, indem man in der fertigen hochaufgelösten Struktur nach entsprechend zueinander angeordneten Wasserstoffbrückendonor- und -acceptorgruppen suchte. Gerade in der NMR-Spektroskopie wurden viele Verfahren entwickelt, um indirekt aus Parametern wie Protonenaustauschgeschwindigkeiten, isotropen und anisotropen chemischen Verschiebungen, Deuterium-Quadrupol-

[*] Priv.-Doz. Dr. G. Gemmecker
Institut für Organische Chemie und Biochemie
TU München
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)
Fax: (+49)89-289-13210
E-mail: Gerd.Gemmecker@ch.tum.de