



Strukturanalyse humaner
Milcholigosaccharide
in Abhängigkeit der Lewis-Blutgruppe

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades an den
naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dennis Blank

aus Frankenberg

Angefertigt am Institut für Organische Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen sowie am
Biochemischen Institut des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
unter Anleitung von Prof. W. Maison und Prof. R. Geyer

Gießen 2012

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen unter Anleitung von Prof. W. Maison sowie am Biochemischen Institut des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen unter Anleitung von Prof. R. Geyer durchgeführt.

Referent: Prof. Dr. Wolfgang Maison
Institut für Organische Chemie
Justus-Liebig-Universität Gießen

Korreferent: Prof. Dr. Rudolf Geyer
Biochemisches Institut
Fachbereich Medizin
Justus-Liebig-Universität Gießen

Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen:

Dennis Blank, Viktoria Dotz, Rudolf Geyer, Clemens Kunz; *Human milk oligosaccharides and Lewis blood group - Individual high-throughput sample profiling to enhance conclusions from functional studies*; Adv Nutr, 2012; in press.

Dennis Blank, Hildegard Geyer, Kai Maass, Katsuko Yamashita, Rudolf Geyer; *Elucidation of a novel lacto-N-decaose core structure in human milk using nonlinear analytical technique combinations*; Anal Biochem, 2012;421:680-690.

Dennis Blank, Sabine Gebhardt, Kai Maass, Günter Lochnit, Viktoria Dotz, Jennifer Blank, Rudolf Geyer, Clemens Kunz; *High-throughput mass finger printing and Lewis blood group assignment of human milk oligosaccharides*; Anal Bioanal Chem, 2011, 401:2495–2510.

Claus-Wilhelm von der Lieth, Ana Ardá Freire, **Dennis Blank**, Matthew P Campbell, Alessio Ceroni, David R Damerell, Anne Dell, Raymond A Dwek, Beat Ernst, Rasmus Fogh, Martin Frank, Hildegard Geyer, Rudolf Geyer, Mathew J Harrison, Kim Henrick, Stefan Herget, William E Hull, John Ionides, Hiren J Joshi, Johannis P Kamerling, Bas R Leeflang, Thomas Lütke, Magnus Lundborg, Kai Maass, Anthony Merry, René Ranzinger, Jimmy Rosen, Louise Royle, Pauline M Rudd, Siegfried Schloissnig, Roland Stenutz, Wim F Vranken, Göran Widmalm, Stuart M Haslam; *EUROCarbDB: An open-access platform for glycoinformatics*; Glycobiology, 2010, 21:493-502.

Sine A Johannesen, Sophie R Beeren, **Dennis Blank**, Byung Y Yang, Rudolf Geyer, Ole Hindsgaul; *Glycan analysis via derivatization with a fluorogenic pyrylium dye*; Carb Res, 2012; DOI:10.1016/j.carres.2012.02.016, in press.

Konferenzen und Workshops

Vorträge

- Nov/2011 22nd Joint Glycobiology Meeting, Lille, F
High-throughput mass finger printing and Lewis blood group assignment of human milk oligosaccharides.
- Mai/2011 Glycobiology of Human Milk Oligosaccharides, Kopenhagen, DK
Lewis Blood group detection from human milk oligosaccharide mass finger prints.
- Sep/2010 3rd Annual GGL conference, Giessen
Blood group identification by MS screening of human milk.
- Nov/2009 Japanese Giessen Meeting Glycosciences, Giessen
Human milk oligosaccharides.
- Nov/2009 Eurocarb DB Meeting, Dublin, IRL
The MS software tools GlycoWorkbench and Glyco-Peakfinder.

Posterpräsentationen

- Sep/2011 Molecular Life Sciences 2011, International Symposium of the German Society for Biochemistry and Molecular Biology (GBM), Frankfurt
- Mär/2011 5th Glycan Forum 2011, Berlin
- Nov/2009 20th Joint Glycobiology Meeting 2009, Köln
- Aug/2009 GDCh Wissenschaftsforum 2009, Frankfurt
- Seit 2009 1st, 2nd, 4th annual conferences of the Giessen Graduate School for the Life Sciences (GGL), Giessen
- Dez/2008 19th Joint Glycobiology Meeting, Wageningen, NL

Workshops

- Sep/2011 Proteomics-Workshop of the ISAS-Institute, Dortmund
- Jun/2008 Summer Course Glycosciences in Wageningen, NL

Abkürzungen

2AB	2-Aminobenzamid	HPL	humanes Plazentalaktogen
2'FL	2-Fucosyllaktose ([Fuc α 1-2]Gal β 1-4Glc)	HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i>
3-FL	3-Fucosyllaktose (Gal β 1-4[Fuc α 1-3]Glc)	HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
ACN	Acetonitril	Ig	Immunglobulin
APTS	1-Aminopyren-3,6,8-trisulfonsäure	LacNAc	<i>N</i> -acetyllactosamin
ATT	6-Aza-2-thiothymin	Le	Lewis
CGE-LIF	<i>capillary gel electrophoresis laser induced fluorescence</i>	Le ^a	Lewis-a (Gal β 1-3[Fuc α 1-4]GlcNAc)
CID	<i>collision induced dissociation</i>	Le ^b	Lewis-b (Fuc α 1-2Gal β 1-3[Fuc α 1-4]GlcNAc)
Da	Dalton	Le ^x	Lewis-x (Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc)
dFL	Difucosyllaktose	Le ^y	Lewis-y (Fuc α 1-2Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc)
dFLND	difucosyl Lacto- <i>N</i> -Decaose	LID	<i>laser-induced dissociation</i>
dFLNH	difucosyl Lacto- <i>N</i> -Hexaose	LNFP	Lacto- <i>N</i> -fuco-Pentaose (fucosyl Lacto- <i>N</i> -tetraose)
dFLNO	difucosyl Lacto- <i>N</i> -Octaose	LNH	Lacto- <i>N</i> -Hexaose
dFLNT	difucosyl Lacto- <i>N</i> -Tetraose	LNO	Lacto- <i>N</i> -Octaose
DMB	2-diamino-4,5-methylen-dioxybenzen	LNT	Lacto- <i>N</i> -Tetraose (Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)
EI	<i>electron-impact</i>	LNnT	Lacto- <i>N</i> - <i>neo</i> -Tetraose (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)
ESI	Elektrospray-Ionisation	MALDI	<i>matrix assisted laser desorption ionization</i>
EIC	<i>extracted ion chromatogram</i>	MS	Massenspektrometrie
FL	Fucosyllaktose	MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
FLND	fuco Lacto- <i>N</i> -Decaose	np	<i>normal phase</i>
FLNH	fuco Lacto- <i>N</i> -Hexaose	PGC	<i>porous graphitic carbon</i>
FLNO	fuco Lacto- <i>N</i> -Octaose	RBC	<i>red blood cells</i>
Fuc	Fucose	rp	<i>reversed phase</i>
FucT	Fucosyltransferase	RT	Raumtemperatur
Gal	Galactose	Se	Secretor
GalT	Galactosyltransferase	slg	secretorisches Immunglobulin
GC	Gaschromatographie	Sia	Sialinsäure
GC/MS	Gaschromatographie / Massenspektrometrie	SPE	<i>solid phase extraction</i>
Glc	Glucose	tetra-FLNO	tetrafucosyl Lacto- <i>N</i> -Octaose
GlcNAc	2-Acetamido-2-deoxy-D-glucose (<i>N</i> -Acetylglucosamin)	TFA	Trifluoressigsäure
GlcNAcT	<i>N</i> -acetylglucosaminyltransferase	tFLND	trifucosyl Lacto- <i>N</i> -Decaose
HCCA	<i>α-cyano-4-hydroxycinnamic acid</i>	tFLNH	trifucosyl Lacto- <i>N</i> -Hexaose
Hex	Hexose	tFLNO	trifucosyl Lacto- <i>N</i> -Octaose
HexNAc	<i>N</i> -acetylhexosamin	TOF	<i>time-of-flight</i> (Flugzeit-Massenanalysator)
HF	Flusssäure		
HMO	Humanmilch-Oligosaccharide		
HPAEC	<i>high-pH anion exchange chromatography</i>		

Inhalt

Kapitel 1	Literaturübersicht	1
	Einleitung	2
	1 Sekretion der Frauenmilch	3
	2 Inhaltsstoffe der Frauenmilch	4
	3 Laktationszeitbedingte Veränderungen in der Zusammensetzung der Frauenmilch	5
	4 Bioaktive Komponenten der Frauenmilch	6
	5 Strukturen der Humanmilch-Oligosaccharide	7
	6 Laktationszeitbedingte Veränderungen in der HMO-Expression	13
	7 Lewis-blutgruppenspezifische Unterschiede der Humanmilch-Oligosaccharide	16
	8 Moderne Methoden zur Analyse humaner Milch-Oligosaccharide	17
	Projektbeschreibung	21
Kapitel 2	High-throughput mass finger Printing and Lewis blood group assignment of human milk oligosaccharides	23
	Zusammenfassung	23
	Abstract	24
	Introduction	24
	Materials and methods	27
	Results and discussion	30
	Conclusions	45
	Acknowledgements	46
	References	47
	Electronic supplementary material	50
	Ergänzende Untersuchungen zu Kapitel 2	54
	1 Optimierung der Aufarbeitungsbedingungen	54
	2 Bestimmung des optimalen Probenvolumens	56
	3 Saure HMOs	57
	4 Verifizierung der berechneten Monosaccharid-Zusammensetzungen	59
	5 HMO-Quantifizierung nach automatisierter PGC Aufarbeitung	60
	6 Überprüfung der selektiven Isolierung der HMOs	63
	7 Ausweitung der Methodik auf die Aufarbeitung auf Stuhlproben	64
	8 Abschließende Diskussion	65
Kapitel 3	Human milk oligosaccharides and Lewis blood group - Individual high-throughput sample profiling to enhance conclusions from functional studies -	67

Zusammenfassung.....	67
Abstract	68
Introduction	68
The biosynthesis of Lewis and Secretor gene-related oligosaccharides in milk.....	69
Functional aspects of Lewis blood group related HMO	72
Identification of Lewis blood group-related compounds	75
Variation of the HMO pattern	77
Conclusion	81
Acknowledgements	81
References.....	82
Ergänzende Anmerkungen zu Kapitel 3	86
Kapitel 4 Elucidation of a novel lacto-<i>N</i>-decaose core structure in human milk using nonlinear analytical technique combinations	87
Zusammenfassung.....	87
Abstract	88
Introduction	88
Materials and methods.....	91
Results and discussion	94
Conclusion	104
Acknowledgments	105
References.....	106
Ergänzende Untersuchungen zu Kapitel 4	109
1 Analyse der Ausgangsfractionen.....	110
2 Zusätzliche Informationen zu Fraktion F3.....	112
2.1 MALDI-MS/MS Analyse der Subfraktion F3.6	112
2.2 ESI MS ² Analyse der permethylierten Subfraktion F3.6	113
2.3 GC/MS Linkage-Analyse der Subfraktion F3.6.....	114
2 Abschließende Diskussion.....	116
Kapitel 5 Fazit und Ausblick	119
1 Ergebnisse des Forschungsprojektes.....	120
2 Einordnung der Ergebnisse in den aktuellen Forschungsstand.....	121
3 Ausblick	122
Zusammenfassung.....	125
Zusammenfassung des Forschungsprojektes.....	126
Summary of the project.....	127
Abbildungsverzeichnis	128
Tabellenverzeichnis	129

Literaturverzeichnis.....	130
Danksagung.....	135
Eidesstattliche Erklärung.....	136

Kapitel 1

Literaturübersicht

Einleitung

Frauenmilch gilt als beste Möglichkeit der Kinderernährung in den ersten Lebensmonaten. Hierbei liefert diese nicht nur fast alle lebensnotwendigen Nährstoffe für das neugeborene Kind, sondern beinhaltet weiterhin viele Bestandteile, die die Entwicklung des Neugeborenen maßgeblich fördern können. Aufgrund dieser zahlreichen, natürlichen Inhaltsstoffe steht Frauenmilch schon seit dem Ende des 19. Jahrhunderts im wissenschaftlichen Fokus von Ernährungswissenschaftlern, Medizinern und Analytikern. Motiviert durch das ebenfalls große wirtschaftliche Interesse, künstliche Säuglingsnahrung nach dem Vorbild der Frauenmilch herzustellen, konnten Forscher in zahlreichen Studien immer wieder neue Erkenntnisse im Bereich der Milchforschung gewinnen. Die Bioaktivität einzelner Komponenten oder ganzer Stoffgruppen lässt auf einen positiven Effekt bei der Entwicklung des Kindes schließen [Schack-Nielsen *et al.* 2006]¹. Qualitative und quantitative analytische Fragestellungen beschäftigten sich detailliert mit den strukturellen Eigenschaften und Expressionsmengen einzelner Komponenten [Thurl *et al.* 2010; Wu *et al.* 2010]. Mit der enormen Verbesserung der analytischen Methoden sanken auch die Nachweisgrenzen der einzelnen Substanzklassen. Die detektierbare Komplexität der humanen Frauenmilch wurde und wird somit schrittweise erweitert. Es ist anzunehmen, dass in den nächsten Jahren das Wissen über die exprimierten Inhaltsstoffe der Frauenmilch noch deutlich ansteigen wird. Die erzielten wissenschaftlichen Ergebnisse werden in der Zukunft maßgeblich dafür sorgen, dass künstliche Säuglingsnahrung dem Vorbild der Frauenmilch immer ähnlicher wird. Die große Komplexität und Variabilität der Frauenmilchkomponenten in Kombination mit den sozialen Faktoren des Stillvorgangs lassen vermuten, dass Babyformelnahrung sich zukünftig zwar deutlich verbessern wird, und so Müttern, die aus den verschiedensten Gründen nicht selbst stillen können, eine Alternative bietet, aber das natürliche Stillen keinesfalls ersetzt werden kann.

Die folgenden Kapitel sollen einen allgemeinen Überblick über die Expression und die in Frauenmilch enthaltenen Inhaltsstoffe geben. Ausgehend von der Milchsekretion werden anschließend die allgemeinen Bestandteile der Frauenmilch und deren Variation über die Laktationsperiode hinweg besprochen. Eine kurze Vorstellung der Bioaktivität von Frauenmilch leitet zum Hauptthema der vorgelegten Arbeit, den Humanmilch-Oligosacchariden (HMO) über. Hier soll ein detaillierter Überblick über die publizierten Strukturen sowie die HMO-Konzentrationen im Verlauf der Laktation gegeben werden. Auf die Einführung in Lewis- (Le-) Blutgruppenabhängigkeit der exprimierten HMO folgen abschließend die möglichen Analysemethoden dieser mit den verbundenen Vor- und Nachteilen.

¹ Literaturangaben des allgemeinen Textes finden sich im Literaturverzeichnis zum Text am Ende der Dissertationsschrift

1 Sekretion der Frauenmilch

Durch die Hormone Prolaktin und HPL (humanes Plazentalaktogen) wird während der Schwangerschaft die Laktogenese in der Brustdrüse durch Reifung der milchproduzierenden Alveolarzellen induziert [Welsch 2003]. Während der Schwangerschaft sorgt das von der Plazenta sezernierte Progesteron dafür, dass die eigentliche Milchproduktion noch weitestgehend ausbleibt. Erst nach der Geburt sinkt der Progesteronspiegel deutlich, was das Einsetzen der Laktation zur Folge hat. Die produzierte Milch sammelt sich in den Lumina von Alveolen und Ausführungsgängen und kann so über die Brustwarze sezerniert werden. Über die Stillzeit hinweg verursacht das Saugen des Kindes die Ausschüttung von Prolaktin und Oxytocin. Das Hormon Oxytocin sorgt durch seine selektive muskelrelaxierende Wirkung dafür, dass die Alveolargänge sich weiten und somit ein Milchfluss ermöglicht wird.

Die hauptsächlich für die Milchproduktion verantwortlichen Brustdrüsen-Epithelzellen kleiden die Innenseite der Alveolen aus, in denen sich die sezernierte Milch sammelt, sowie die Drüsengänge, die diese zur Brustdrüse führen. Diese dichte Epithelschicht ist durch eine Basalmembran vom strukturgebenden Stroma getrennt. Diese besteht hauptsächlich aus Fibroblasten, Adipozyten, Plasmazellen und Blutgefäßen, die den Hauptteil der extrazellulären Submatrix bilden. Fibroblasten sowie Adipozyten dienen als Quelle verschiedener Wachstumsfaktoren. Weiterhin finden sich gegen Ende der Schwangerschaft besonders viele Immunglobulin-sezernierende Plasmazellen, welche zur passiven Immunisierung des gestillten Kindes beitragen [Hanson *et al.* 1985]. Ein deutlich gesteigerter Blutfluss während der Schwangerschaft und der Stillzeit gewährleistet die adäquate Versorgung der an der Milchproduktion beteiligten Zellen.

Bei der Sekretion der Einzelkomponenten werden fünf verschiedene Mechanismen herangezogen.

I. Exozytische Sekretion: Die Sekretion erfolgt durch das Verschmelzen von Vesikeln (aus dem Golgi Apparat) mit der apikalen Seite des Brustdrüsenepithels. Hauptsächlich Proteine, Laktose und zweiwertige Metallionen werden auf diesem Wege sezerniert. Die in dieser Arbeit besonders im Vordergrund stehenden HMOs werden ebenfalls durch diesen Mechanismus freigesetzt.

II. Lipidsynthese und Sekretion: Die im Cytosol gebildeten Triacylglycerine verschmelzen zu größeren Tropfen, welche zur apikalen Plasmamembran wandern, von dieser umschlossen werden und schließlich als plasmamembranhüllte Vesikel in das Alveolar-Lumen abgegeben werden.

- III. Apikaler Transport: Kalium-, Natrium- und Chloridionen sowie verschiedene Monosaccharide können direkt durch die Plasmamembran transportiert werden.
- IV. Parazelluläre Sekretion: Die im Stroma gebildeten Inhaltsstoffe der Muttermilch passieren das Epithel indem sie zwischen den Zellen hindurch diffundieren. Dies ist nur während der Schwangerschaft möglich. Später verschließen *tight junctions* diese Durchgänge. Immunglobuline und Wachstumsfaktoren werden so vermehrt im Kolostrum (die Milch der ersten Tage nach der Geburt) sezerniert.
- V. Transzytose: Transzytose beschreibt den vesikulären Transport verschiedener Makromoleküle wie Immunglobuline oder Wachstumsfaktoren von der basolateralen zur apikalen Epithelseite durch das Zelllumen.

2 Inhaltsstoffe der Frauenmilch

Unter normalen Umständen bildet Humanmilch die beste Art der Ernährung des Säuglings in den der ersten Monaten nach der Geburt. Die vier Hauptbestandteile Laktose (74 g/L), Fett (31 g/L), Proteine (20 g/L) und mit bis zu 20 g/L komplexe Oligosaccharide versorgen das neugeborene Kind mit den notwendigen Makro-Nährstoffen und liefern damit einen Energiebetrag von ca. 677 kcal/L [Saarela *et al.* 2005; Urashima *et al.* 2011].

Das als Milchzucker bekannte Disaccharid Laktose (Gal β 1-4Glc) bildet den Hauptbestandteil der Frauenmilch. Durch das im Zottenepithel lokalisierte, *single-pass* Type I membrangebundene Enzym Laktase kann Laktose in Galactose und Glucose gespalten und so durch die Dünndarmschleimhaut aufgenommen werden.

Die in der Humanmilch zu findenden Hauptlipide liegen als Triacylglycerine vor und beinhalten hauptsächlich die Fettsäuren Ölsäure (C18:1; 37% des ges. Fetts), Palmitinsäure (C16:0; 23% des ges. Fetts), Linolsäure (C18:2; 14% des ges. Fetts) und Stearinsäure (C18:0; 8% des ges. Fetts) [Lemons *et al.* 1982; Jensen *et al.* 1995]. Diese bilden 82% des gesamten Lipidgehalts und liefern ca. 236 kcal und somit 35% des Gesamtenergiegehalts der Humanmilch. Da die exprimierten Lipide in der Milch von einer Phospholipiddoppelschicht umgeben sezerniert werden, kann diese auch vom Säugling zum einen zur Versorgung mit Phospholipiden, zum anderen als Quelle für Cholesterin genutzt werden.

Über die Hälfte der exprimierten Proteinmenge bildet die Gruppe der Caseine (β - und κ -Casein) [Liao *et al.* 2011]. Diese, sich im Magen zu Mizellen zusammenlagernden Proteine weisen teilweise eine Mikroheterogenität auf, welche sich aus verschiedenen posttranslationalen Modifikationen ergibt [Urashima *et al.* 2011]. Hauptsächlich

O-Glykane machen bis zu 60% des Molekulargewichtes von κ -Casein aus [Lönnerdal *et al.* 1995]. Mit einer Menge von bis zu 2-3 g/L ist α -Laktalbumin neben Laktose-Synthase A (β 1-4-Gal-transferase; ein Protein des Laktose Synthase-Komplexes) in der Milch zu finden. Das eisenbindende Glykoprotein Lactoferrin (1 g/L) liegt als dritthäufigstes Protein in der Milch vor [Lönnerdal *et al.* 1995; Roseanu *et al.* 2006]. Eine zur Bioaktivität der Humanmilch maßgeblich beitragende Gruppe bilden die Immunglobuline [Slade *et al.* 1987]. Die Konzentration von sekretorischem Immunglobulin A (sIgA) beträgt im Kolostrum bis zu 12 g/L [Van de Perre 2003]. In Mengen zwischen 0,03–0,1 g/L werden Immunglobulin M (IgM) bzw. Immunglobulin G (IgG) in die Milch sezerniert [Lönnerdal *et al.* 1976].

Den vierthäufigsten Bestandteil der Frauenmilch bilden die HMOs. Dieses, auf Laktose basierende, komplexe Strukturgemisch an Oligosacchariden steht in engem genetischen Zusammenhang zum Lewis-Blutgruppensystem und weist zahlreiche fucosylierte sowie sialylierte Glykane auf. Eine detaillierte Betrachtung der strukturellen Eigenschaften wird im Unterpunkt *Strukturen der Humanmilch-Oligosaccharide* gesondert besprochen und die starke Lewis-Blutgruppenabhängigkeit im Unterpunkt *Lewis-blutgruppenspezifische Unterschiede der Humanmilch-Oligosaccharide* gesondert vorgestellt. Donor sowie laktationszeitabhängig zeigen sich zum Teil starke Variationen in der Zusammensetzung der Milch. Die HMO spezifischen Veränderungen werden im Abschnitt *Laktationszeitbedingte Veränderungen in der HMO-Expression* näher betrachtet.

3 Laktationszeitbedingte Veränderungen in der Zusammensetzung der Frauenmilch

Während der Laktationszeit, besonders im Vergleich von Kolostralmilch zu reifer Milch, zeigen sich deutliche Veränderungen aller exprimierten Inhaltsstoffe [Saarela *et al.* 2005; Castellote *et al.* 2011].

Auf die starke Abnahme von sIgA durch den Verschluss der *tight junctions* des Epitheliums wurde schon im Abschnitt *Sekretion der Frauenmilch* eingegangen. Die exprimierte Menge verringert sich von 12 g/L auf < 1 g/L in reifer Milch [Lönnerdal *et al.* 1976; Goldman *et al.* 1989; Van de Perre 2003].

Die Produktion von Lipiden und Laktose hingegen wird schon einige Stunden nach der Geburt deutlich gesteigert [Neville *et al.* 1991]. Beobachtet man die Konzentrationen der Bestandteile humaner Milch über einen längeren Zeitraum, kann man feststellen, dass die Gesamtkonzentration an Proteinen sowie Natrium- und Kaliumionen zwischen dem ersten und sechsten (bzw. 12.) Monat um ca. 25% abnimmt, wohingegen der Gehalt an Laktose, Calciumionen und Glukose um ca. 10% ansteigt [Allen *et al.* 1991]. Je nach Probenentnahme können sich diese Variationswerte deutlich unterscheiden. Die beobachteten Veränderungen im Fett-, Protein- und Laktose-Gehalt bewegen sich in einem messbaren aber geringen Rahmen, beschreiben allerdings den gleichen Trend

[Mitoulas *et al.* 2002]. Auf die Variation der exprimierten HMOs wird gesondert im Abschnitt *Laktationszeitbedingte Veränderungen in der HMO-Expression* eingegangen.

4 Bioaktive Komponenten der Frauenmilch

Die bioaktive Wirkung von einzelnen Komponenten der Frauenmilch, sowie komplexen Mischungen derselben, wird in der Literatur kontrovers diskutiert [German *et al.* 2002; Bode 2009]. Die beschriebenen Effekte reichen von antimikrobiellen bis hin zu immunmodulatorischen Wirkungen [Hanson 1998]. Bereits Anfang der 60er Jahre berichtete Hanson *et al.*, dass der größte Teil der protektiven Wirkung der Frauenmilch auf sIgA zurückzuführen sei [Hanson 1961]. Zusammen mit IgM und IgG machen diese bis zu 94% der in der Milch enthaltenen Immunglobuline aus [Van de Perre 2003]. Mütterliches IgG kann mittels Transzytose durch das Darmepithel des Kindes aufgenommen werden. SIgA hingegen erfüllt zwei protektive Wirkungen direkt im Darm des Kindes: (i) intrazelluläre Neutralisation (Binden von Viruspartikeln im Zellinneren, anschließende Exkretion in das Darmlumen; z.B. HIV oder Masern-Virus) [Bomse *et al.* 1998; Yan *et al.* 2002], (ii) Adhäsions-Inhibierung (selektive Blockierung der Bindungsstellen von Pathogenen; z.B. *Haemophilus influenzae*) [Van de Perre 2003].

Die Bioaktivität von Proteinen, die hauptsächlich als Makronährstoffe dienen und somit alle essentiellen Aminosäuren liefern, konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden. Viele dieser Daten werden in der Literatur kontrovers diskutiert, da sie ausschließlich auf *in vitro* Ergebnissen beruhen [Rudloff *et al.* 1997; Kunz *et al.* 1999]. Das im Kolostrum mit einer Konzentration von bis zu 7 g/L vorkommende Lactoferrin zeigt in einzelnen Studien deutliche antimikrobielle Effekte [Roseanu *et al.* 2006]. Diese Effekte könnten auf die starke Eisenbindung zurückzuführen sein, welche den im Darmlumen vorhandenen Bakterien das benötigte Eisen entzieht [Orsi 2004]. Eine mögliche selektive Kolonialisierung des Darmtraktes könnte unter anderem auf diese Eigenschaft zurückgeführt werden [Sánchez *et al.* 1992]. Eine weitere bemerkenswerte Eigenschaft von Lactoferrin ist, dass nicht nur das intakte Protein, sondern viel mehr das durch Pepsin hydrolysierte Peptid Lactoferricin biologisch antimikrobiell wirkt (insbesondere gegen *Escherichia coli*) [Yen *et al.* 2011]. Weitere bioaktive Peptide können zum Beispiel durch den Verdau der Caseine der Humanmilch entstehen [Phelan *et al.* 2009].

In besonderem Maße werden die HMOs zu den bioaktiven Substanzen der Frauenmilch gezählt. Mit einer Konzentration von bis zu 20 g/L nimmt jeder Säugling eine erhebliche Menge dieser unverdaulichen komplexen Glykanmischung bei jedem Stillvorgang auf. Die gesundheitsfördernden Effekte dieser HMOs werden derzeit in zahlreichen Studien untersucht und die Ergebnisse kontrovers diskutiert. So werden HMOs als mögliche lösliche Rezeptoren gesehen, welche Pathogene an der Bindung an das Darmepithel hindern können. Weiterhin konnte eine bifidogene Wirkung in zahlreichen Studien beobachtet werden und auch die immunmodulatorische Wirkung von HMOs wurde

bereits beschrieben [Bode 2009; Hong *et al.* 2009; Chichlowski *et al.* 2011; Sela *et al.* 2011; Yu *et al.* 2011]. Diese Daten basieren allerdings ausschließlich auf *in vitro* Ergebnissen wobei die Übertragung von *in vitro* auf *in vivo* Eigenschaften sowie die Aufklärung der genauen Funktionen und Wirkmechanismen einzelner HMOs oft schwierig sind. Die Basis dieser Studien muss daher immer eine detaillierte, gesicherte Strukturanalyse der, in den Studien eingesetzten, Milch-Oligosaccharide bilden. Die in der Literatur beschriebenen Strukturdaten werden im folgenden Unterpunkt *Strukturen der Humanmilch-Oligosaccharide* vorgestellt.

5 Strukturen der Humanmilch-Oligosaccharide

Das reduzierende Ende der komplexen Oligosaccharide der Frauenmilch wird von Laktose gebildet (Gal β 1-4Glc). Dieses Disaccharid wird im terminalen Golgi-Apparat der Brustdrüsen-Epithelzellen durch den Proteinkomplex Laktose-Synthase, bestehend aus der membrangebundenen β 1-4-Gal-Transferase und dem in Golgilumen vorliegenden α -Laktalbumin, synthetisiert [Brew *et al.* 1975; Kuhn *et al.* 1975]. Durch die hohe osmotische Aktivität der Laktose wird zusätzliches Wasser in das Golgilumen aufgenommen, was zu einem Anschwellen des Golgi-Apparates aber auch zu einer vermehrten Vesikelbildung führt. Diese Vesikel sind für den Transport der Laktose sowie der ebenfalls gebildeten komplexen HMOs zur apikalen Seite des Epithels verantwortlich (vgl. Unterpunkt *Sekretion der Frauenmilch*).

Die Bildung der komplexen HMOs wird durch die enzymatische Addition von *N*-Acetyl-Lactosamin- (LacNAc) Einheiten (Gal β 1-3/4GlcNAc) erreicht. Diese Addition geschieht schrittweise durch das Zusammenspiel von β 1-3/6-GlcNAc-Transferasen und anschließende Gal Übertragung durch eine der beiden β 1-3/4-Gal-Transferasen (vgl. Kapitel 3). Man unterscheidet zwischen Typ I (Gal β 1-3GlcNAc) und Typ II Einheiten (Gal β 1-4GlcNAc). Die systematische Nomenklatur berücksichtigt dies mit der Vorsilbe *iso* für Strukturen, welche ausschließlich mit Typ I Einheiten enden und *neo* für Strukturen welche terminale Typ II Einheiten aufweisen.

Des Weiteren werden lineare Strukturen von verzweigten unterschieden. In der Nomenklatur wird eine lineare HMO-Kette mit der Vorsilbe *para* gekennzeichnet. Die erste mögliche Verzweigung befindet sich immer am C6 der Galactose (Gal) des Laktose-Cores. Alle bisher beschriebenen Core-Strukturen zeigen die Besonderheit, dass eine Verlängerung der Oligosaccharidkette nur an einer Typ II LacNAc-Einheit erfolgt. Vierzehn Grundstrukturen wurden bereits in der Literatur beschrieben und sollten von allen Donoren exprimiert werden [Haeuw-Fievre *et al.* 1993; Urashima *et al.* 2011] (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1 HMO-Core-Strukturen. Gelbe Kreise, Galactose; blaue Kreise, Glucose; blaue Quadrate, N-Acetylglucosamin. Die letztgenannte Core-Struktur wurde im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt [Blank *et al.* 2011].

Name	Struktur
Laktose	
Lacto-N-Tetraose	
Lacto-N-neo-Tetraose	
Lacto-N-Hexaose	
Lacto-N-neo-Hexaose	
para-Lacto-N-Hexaose	
para-Lacto-N-neo-Hexaose	
Lacto-N-Octaose	
Lacto-N-neo-Octaose	
iso-Lacto-N-Octaose	
para-Lacto-N-Octaose	
Lacto-N-Decaose	
Lacto-N-neo-Decaose	
inverse-lacto-N-neo-Decaose	

Die weitere Funktionalisierung der HMOs wird durch die enzymatische Anbindung von Fucose (Fuc) erreicht. Die so aufgebauten, neutralen HMOs können α 1-2-glycosidisch gebundene Fucosen an terminalen Gal aufweisen. Eine α 1-3-gebundene Fuc kann sowohl an Glucose (Glc) als auch an jedem N-Acetylglucosamin (GlcNAc) angebunden werden, wohingegen eine α 1-4-glycosidische Bindung von Fuc ausschließlich an GlcNAc gefunden wird. Drei verschiedene Fucosyltransferasen, welche eng mit dem Lewis-Blutgruppenstatus des Donors verbunden sind, sind hauptsächlich für die Fucosylierung der Core-Strukturen verantwortlich. Die Milch verschiedener Donoren lässt sich somit in

drei Klassen einteilen, welche der jeweiligen Lewis-Blutgruppe des Donors entspricht. Die Lewis-Gen codierte Fuc-Transferase III (FucTIII) überträgt Fucosen auf die α 1-3/4-Position des GlcNAc-Restes sowohl einer Typ I als auch Typ II LacNAc-Einheit. Donoren mit mindestens einem aktiven Gen-Locus für diese FucTIII werden serologisch als Le(a+b-) typisiert und weisen Le^{a/x}-Epitope in ihren HMOs auf. Eine aktive FucTII überträgt Fucosen auf die α 1-2-Position einer terminalen Gal. Das so gebildete H-Antigen wird besonders von Donoren mit aktivem Sekretor-Gen exprimiert. Diese Donoren werden als Le(a-b-) typisiert. Die letzte wichtige Gruppe wird von Donoren gebildet welche beide Fucosyltransferasen exprimierten (FucTII und FucTIII). Die HMOs dieser Donoren zeigen besonders viele Le^{b/y}-Epitope. Donoren dieser Gruppe werden Le(a-b+) typisiert. Eine Übersicht über die genaueren Zusammenhänge der Lewis-Blutgruppe und der resultierenden HMOs wird in Kapitel 3 gegeben.

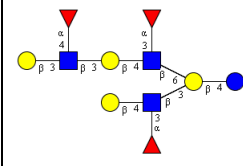
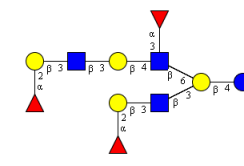
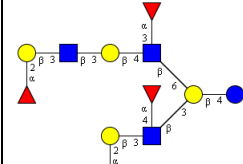
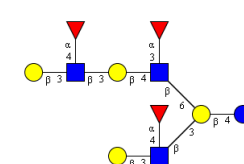
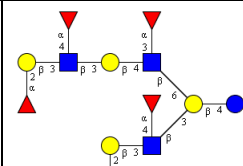
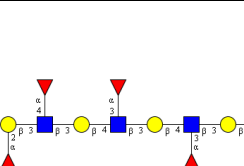
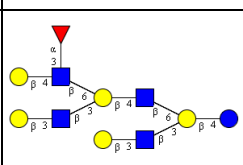
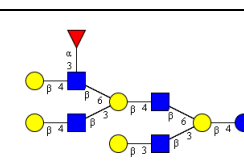
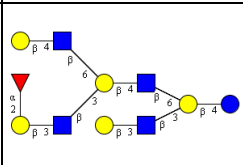
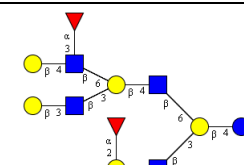
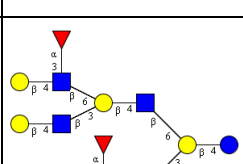
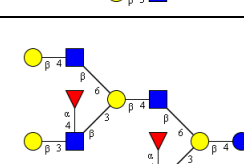
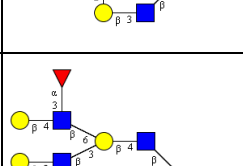
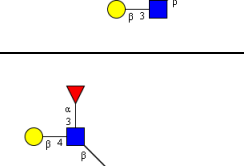
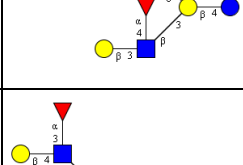
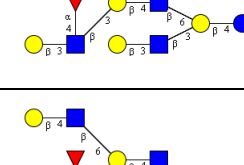
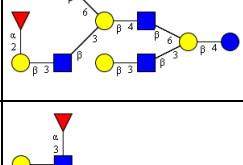
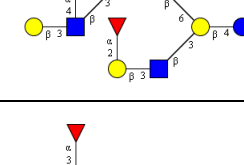
Eine detaillierte Zusammenstellung der bisher publizierten neutralen HMO-Strukturen ist in Tabelle 2 dargestellt [Wu *et al.* 2010; Urashima *et al.* 2011].

Tabelle 2 Neutrale HMO-Strukturen.

Gelbe Kreise, Galactose; blaue Kreise, Glucose; blaue Quadrate, N-Acetylglucosamin; rote Dreiecke, Fucose.

Name	Struktur		Name	Struktur	
2'FL		[Kuhn <i>et al.</i> 1956]	3-FL		[Montreuil 1956]
dFL		[Kuhn <i>et al.</i> 1958]	LNT		[Kuhn <i>et al.</i> 1956]
LNnT		[Kuhn <i>et al.</i> 1962]	LNFP I		[Kuhn <i>et al.</i> 1956]
LNFP II		[Kuhn <i>et al.</i> 1958]	LNFP III		[Kobata <i>et al.</i> 1969]
LNFP V		[Ginsburg <i>et al.</i> 1976]	dFLNT I		[Kuhn <i>et al.</i> 1958]
dFLNT II		[Kuhn <i>et al.</i> 1960]	dFLNnT I		[Donald <i>et al.</i> 1988]
LNH		[Kobata <i>et al.</i> 1972]	LNnH		[Kobata <i>et al.</i> 1972]
para-LNH		[Kobata <i>et al.</i> 1972]	FLNH I		[Yamashita <i>et al.</i> 1977]
FLNH II		[Dua <i>et al.</i> 1985]	FLNnH		[Kobata <i>et al.</i> 1972]

F- <i>para</i> -LNH I		[Sabharwal <i>et al.</i> 1988]	F- <i>para</i> -LNH II		[Bruntz <i>et al.</i> 1988]
dFLNH I		[Yamashita <i>et al.</i> 1977]	dFLNH II		[Dua <i>et al.</i> 1985]
dF- <i>para</i> -LNH		[Yamashita <i>et al.</i> 1977]	dFLNnH		[Haeuw-Fievre <i>et al.</i> 1993]
dF- <i>para</i> -LNnH		[Yamashita <i>et al.</i> 1977]	tFLNH		[Sabharwal <i>et al.</i> 1988]
tF- <i>para</i> -LNH I		[Strecker <i>et al.</i> 1988]	tF- <i>para</i> -LNH II		[Bruntz <i>et al.</i> 1988]
tF- <i>para</i> -LNnH		[Bruntz <i>et al.</i> 1988]	FLNO		[Yamashita <i>et al.</i> 1976]
F-LNnO		[Yamashita <i>et al.</i> 1976]	F- <i>iso</i> -LNO		[Kogelberg <i>et al.</i> 2004]
dFLNO I		[Tachibana <i>et al.</i> 1978]	dFLNO II		[Tachibana <i>et al.</i> 1978]
dFLNO III		[Tachibana <i>et al.</i> 1978]	dFLNnO I		[Tachibana <i>et al.</i> 1978]
dFLNnO II		[Tachibana <i>et al.</i> 1978]	dF- <i>iso</i> -LNO I		[Strecker <i>et al.</i> 1989]
dF- <i>iso</i> -LNO II		[Strecker <i>et al.</i> 1989]	tFLNO		[Tachibana <i>et al.</i> 1978]

tFLNnO		[Tachibana <i>et al.</i> 1978]	tF-iso-LNO I		[Strecker <i>et al.</i> 1992]
tetra-F-iso-LNO		[Haeuw-Fievre <i>et al.</i> 1993]	tF-iso-LNO II		[Kogelberg <i>et al.</i> 2004]
penta-F-iso-LNO		[Haeuw-Fievre <i>et al.</i> 1993]	tetra-F-para-LNO		[Haeuw-Fievre <i>et al.</i> 1993]
FLND I		[Amano <i>et al.</i> 2009]	FLND II		[Amano <i>et al.</i> 2009]
FLND III		[Amano <i>et al.</i> 2009]	dFLND I		[Amano <i>et al.</i> 2009]
dFLND II		[Amano <i>et al.</i> 2009]	dFLND III		[Amano <i>et al.</i> 2009]
dFLND IV		[Amano <i>et al.</i> 2009]	dFLND V		[Amano <i>et al.</i> 2009]
dFLND VI		[Amano <i>et al.</i> 2009]	dFLND VII		[Amano <i>et al.</i> 2009]
tFLND I		[Amano <i>et al.</i> 2009]	tFLND II		[Amano <i>et al.</i> 2009]

tFLND III		[Amano <i>et al.</i> 2009]	tFLND IV		[Amano <i>et al.</i> 2009]
inverse-LNnD		[Blank <i>et al.</i> 2011]	tetra-FLND I		[Amano <i>et al.</i> 2009]
tetra-FLND II		[Amano <i>et al.</i> 2009]	tetra-FLND III		[Amano <i>et al.</i> 2009]

Aus dieser Strukturdatenbank lassen sich neben den postulierten Regeln der Biosynthese noch weitere Regelmäßigkeiten ableiten [Stahl *et al.* 1994; Pfenninger *et al.* 2002; Pfenninger *et al.* 2002; Kobata 2003; Amano *et al.* 2009; Kobata 2010]:

- Eine Verlängerung der Glykankette erfolgt ausschließlich an einer Typ II Kette.
- Eine Verzweigung an C6 der internen Gal tritt immer nur dann auf, wenn C3 dieser Gal bereits besetzt ist.
- Der erste Verzweigungspunkt ist die Gal der Laktose-Einheit.
- Es treten keine internen α 1-2Fuc-Reste auf.
- Die erste LacNAc-Einheit am C6 der Verzweigungsgalactose ist immer Typ II.

Diese Einschränkungen führen zu einer deutlichen Reduktion der theoretisch möglichen HMO-Strukturisomere. Keinesfalls können diese Regeln aber eine detaillierte Analytik neuer Strukturen ersetzen. Besonders die Struktur der in dieser Arbeit beschriebenen *inverse-Lacto-N-neo-Decaose* (inverse-LNnD) zeigt die Notwendigkeit einer kompletten *de novo* Strukturanalyse. Anders als bei allen vorher publizierten Strukturen ist hier die längere Glykanantenne an C3 der Galactose des Laktose-Cores lokalisiert und nicht in Position C6. Nur durch eine vollständige Sequenzierung war diese Auffälligkeit detektierbar. Besonders im hochmolekularen Bereich sind deshalb weitere Strukturisomere zu erwarten, welche möglicherweise einige der postulierten Regeln widerlegen könnten (vgl. Kapitel 4).

Diese strukturellen Besonderheiten können derzeit nicht durch *high-throughput* Screening-Ansätze aufgeklärt werden, da hier oft nur eine analytische Technik verwendet

wird. Nur eine Kombination verschiedener Verfahren bietet die Möglichkeit eine Struktur vollständig, inklusive der Komposition sowie aller Bindungspositionen, zu bestimmen (siehe Kapitel 4).

Saure HMOs können neben Fucosen auch *N*-Acetylneuraminsäuren tragen (Neu5Ac). Diese werden in α 2-3- oder α 2-6-Position an Gal, GlcNAc oder Glc gebunden [Wu *et al.* 2011].

Wie schon für die übrigen Bestandteile der Frauenmilch im Unterpunkt *Laktationszeitbedingte Veränderungen in der Zusammensetzung der Frauenmilch* vorgestellt, variiert auch die exprimierte Menge der HMOs mit der Laktationszeit. Dies wird im Folgenden beschrieben.

6 Laktationszeitbedingte Veränderungen in der HMO-Expression

Wie für die Milchkomponenten Laktose, Fett und Proteine beschrieben, variiert auch die Expression der HMOs im Verlauf der Laktation. Die Gesamtkonzentration der HMOs beträgt hierbei im Kolostrum ca. 22-24 g/L und nimmt im Laufe der Laktation auf 12-13 g/L in reifer Milch ab [Urashima *et al.* 2011]. Die Quantifizierung einzelner Bestandteile der Frauenmilch kann auf verschiedene Weisen erreicht werden (siehe Unterpunkt *Moderne Methoden zur Analyse humaner Milch-Oligosaccharide*). Eine Zusammenfassung der Konzentrationen 11 neutraler Oligosaccharide aus sechs verschiedenen Studien stellte Urashima *et al.* in seinem Review-Artikel zusammen (Tabelle 3; [Urashima *et al.* 2011]).

Durch die Unterschiede im Lewis-Status sind die Messungen der einzelnen Studien untereinander nicht vergleichbar, liefern aber dennoch interessante Anhaltspunkte über die Konzentrationen der einzelnen Oligosaccharide. So verdeutlicht Tabelle 3 die sehr stark donorabhängige sowie in den verschiedenen Aufarbeitungs- und Bestimmungsmethoden begründete Variation der exprimierten HMOs. Die zum Teil hohen Standardabweichungen unterstreichen diese Variabilität. Ein Vergleich der von Coppa *et al.* gemessenen Daten von Le(a-b+) Donoren an Tag 4 postpartum mit denen an Tag 60 verdeutlicht, dass die beschriebene Abnahme der Gesamtmenge an HMOs während der Laktationszeit nicht aus einer generellen Abnahme aller Oligosaccharide resultiert, sondern dass einige Einzelkomponenten in ihrer Konzentration abnehmen (siehe 2'FL, LNnT und LNFP I in Tabelle 3), wohingegen andere (siehe 3-FL, LNT, dFLNT I und LNH in Tabelle 3) in ihrer Konzentration zunehmen. Der Vergleich der Studien untereinander verdeutlicht, dass, obwohl sowohl Coppa *et al.* als auch Asakuma *et al.* Spenderinnen der Lewis-Blutgruppe Le(a-b+) innerhalb der ersten 4 Tage nach der Geburt untersucht haben, sich dennoch gravierende Unterschiede in den bestimmten HMO-Konzentrationen ergeben (siehe z.B. 3-FL, LNFP II, dFLNT II und LNH in Tabelle 3).

Tabelle 3 Konzentrationsbestimmung verschiedener HMOs.

Ergebnisse der chromatographischen Konzentrationsbestimmung 11 verschiedener Oligosaccharid (OS)-Strukturen aus neun verschiedenen Studien. Der Lewis-Status ist für die Studien angegeben, in denen ausschließlich Milchproben typisierter Donoren verwendet wurden. Alle Milchproben waren Kolostralmilch, anderenfalls ist der Laktationszeitpunkt in Klammern angegeben; n.d. nicht detektiert.

OS	Konzentration [g/L±SD]					
	[Kunz <i>et al.</i> 1999]	Le(a-b+) [Chaturvedi <i>et al.</i> 2001]	[Thurl <i>et al.</i> 1996]	Le(a-b+) [Coppa <i>et al.</i> 1999] (Tag 4)	Le(a-b+) [Coppa <i>et al.</i> 1999] (Tag 60)	Le(a-b+) [Asakuma <i>et al.</i> 2008] (Tag 2)
2'FL	0,45 ± 0,43	2,43 ± 0,26	1,84	3,93 ± 1,11	1,84 ± 0,39	2,01 ± 1,07
3-FL	0,07 ± 0,08	0,86 ± 0,1	0,46	0,34 ± 0,06	0,71 ± 0,07	0,28 ± 0,26
dFL	n.d.	0,43 ± 0,04	0,17	n.d.	n.d.	0,28 ± 0,3
LNT	1,09 ± 0,47	0,55 ± 0,08	0,86	0,84 ± 0,29	1,56 ± 0,57	1,44 ± 0,7
LNnT	Spuren	0,17 ± 0,03	0,11	2,04 ± 0,55	0,95 ± 0,83	0,54 ± 0,14
LNFP I	1,26 ± 1,11	1,14 ± 0,18	0,67	1,36 ± 0,18	0,97 ± 0,61	2,08 ± 1,67
LNFP II	n.d.	n.d.	0,2	0,29 ± 0,22	0,29 ± 0,16	n.d.
LNFP III	n.d.	n.d.	0,28	n.d.	n.d.	n.d.
dFLNT I	n.d.	0,50 ± 0,06	0,58	0,79 ± 0,25	1,18 ± 0,22	1,87 ± 1,55
dFLNT II	0,16 ± 0,11	0,09 ± 0,01	0,25	n.d.	n.d.	0,02 ± 0,03
LNH	n.d.	n.d.	0,13	0,07 ± 0,07	0,09 ± 0,02	n.d.

Der Vergleich dieser Studien verdeutlicht die Notwendigkeit standardisierter Aufarbeitungsmethoden sowie die akkurate Bestimmung des Lewis-Status, was unerlässlich ist um eine Vergleichbarkeit zwischen Donoren zu gewährleisten.

Thurl *et al.* beobachtete die Konzentrationen 10 verschiedener HMO-Strukturen bei verschiedenen Donoren der Lewis-Blutgruppe Le(a-b+) über einen Zeitraum von 90 Tagen mit nur einer Aufarbeitungsmethode [Thurl *et al.* 2010]. Diese Studie zeigt die tatsächlichen Veränderungen, die sich im Laufe der Stillzeit für diese Auswahl an Oligosacchariden ergeben (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4 HMO-Konzentrationen [g/L] in Abhängigkeit des Laktationszeitpunktes.

10 verschiedener HMO-Strukturen wurden zu sieben Zeitpunkten postpartum bestimmt [Thurl *et al.* 2010].

Tag	2'FL	3-FL	dFL	LNT	LNnT	LNFP I	LNFP II	LNFP III	dFLNT I	dFLNT II
3	4,13	0,24	0,49	0,55	0,35	2,00	0,14	0,34	1,12	0,10
8	3,37	0,26	0,33	1,10	0,40	2,25	0,23	0,34	1,30	0,17
15	3,04	0,38	0,48	1,07	0,20	1,64	0,29	0,37	1,46	0,23
22	3,02	0,44	0,36	1,12	0,23	1,72	0,30	0,37	1,55	0,26
30	2,96	0,42	0,39	1,00	0,16	1,48	0,24	0,37	1,36	0,2
60	2,82	0,56	0,38	0,71	0,16	1,06	0,18	0,40	1,02	0,19
90	2,59	0,67	0,48	0,61	0,14	0,96	0,17	0,44	1,05	0,17

Die grafische Darstellung (Abbildung 1) verdeutlicht die Abnahme von 2'FL im Laufe der Laktation. Die Konzentrationen von LNFP I, dFLNO II sowie dFLNT I stiegen in den ersten Tagen an, um anschließend wieder zu sinken. Lediglich die Konzentrationen von 3-FL, DFL und LNFP III zeigten einen geringen Anstieg in der späten Laktationsphase. Die Konzentrationen von LNFP II, LNnT und dFLNT II blieb auf einem konstant niedrigen Niveau von unter 0,5 g/L.

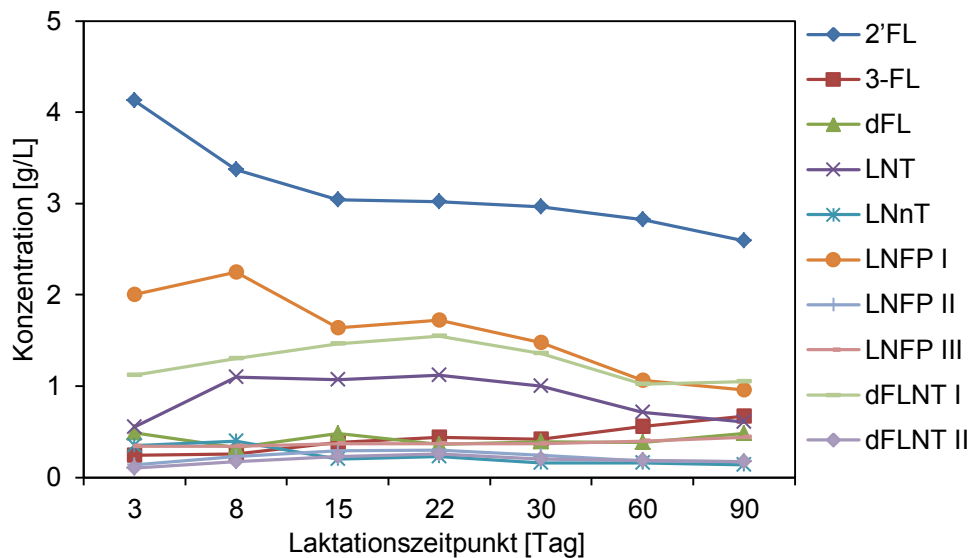


Abbildung 1 HMO-Konzentrationen in Abhängigkeit des Laktationszeitpunktes [Thurl *et al.* 2010]. 10 verschiedene HMO-Strukturen wurden zu sieben Zeitpunkten postpartum bestimmt.

Weiterhin zeigt sich in Abbildung 1 das für Humanmilch spezifische Charakteristikum, dass neben den fucosylierten Laktosestrukturen 2'FL sowie dFL die Typ I Strukturen LNFP II und LNT besonders stark exprimiert werden [Urashima *et al.* 2011]. Bemerkenswert erscheint in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass im Stuhl von Neugeborenen die Oligosaccharide $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-6\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$ und $\text{Gal}\beta 1-4[\text{Fuc}\alpha 1-3]\text{GlcNAc}\beta 1-6\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$ gefunden wurden. Diese in der Milch nicht vorhandenen Strukturen deuten auf die Möglichkeit hin, dass selektiv Typ I Strukturen von Darmbakterien verdaut werden können, weshalb es evolutionär sinnvoll erscheint, dass diese Strukturkandidaten favorisiert exprimiert werden [Urashima *et al.* 2011]. Neben der zeitlichen Variation der HMO-Konzentration ergeben sich Unterschiede in Bezug auf die Lewis-Blutgruppe der Spenderin. Diese sollen im nächsten Abschnitt näher vorgestellt werden.

7 Lewis-blutgruppenspezifische Unterschiede der Humanmilch-Oligosaccharide

In Abhängigkeit des Lewis-Blutgruppenstatus der Donoren sind Unterschiede in den exprimierten Oligosaccharidmengen zu erkennen. In reifer Milch beträgt die mittlere Konzentration der neutralen HMOs für eine Le(a-b+) Donorin ca. 9,5 g/L, für eine Le(a+b-) Donorin ca. 5,6 g/L und für eine Le(a-b-) Donorin ca. 10,5 g/L [Thurl *et al.* 2010]. Die in der Biosynthese begründete individuelle Expression der einzelnen HMO (vergleiche Kapitel 3) wurde von Thurl *et al.* beschrieben [Thurl *et al.* 2010]. Die grafische Darstellung dieser Ergebnisse findet sich in Abbildung 2.

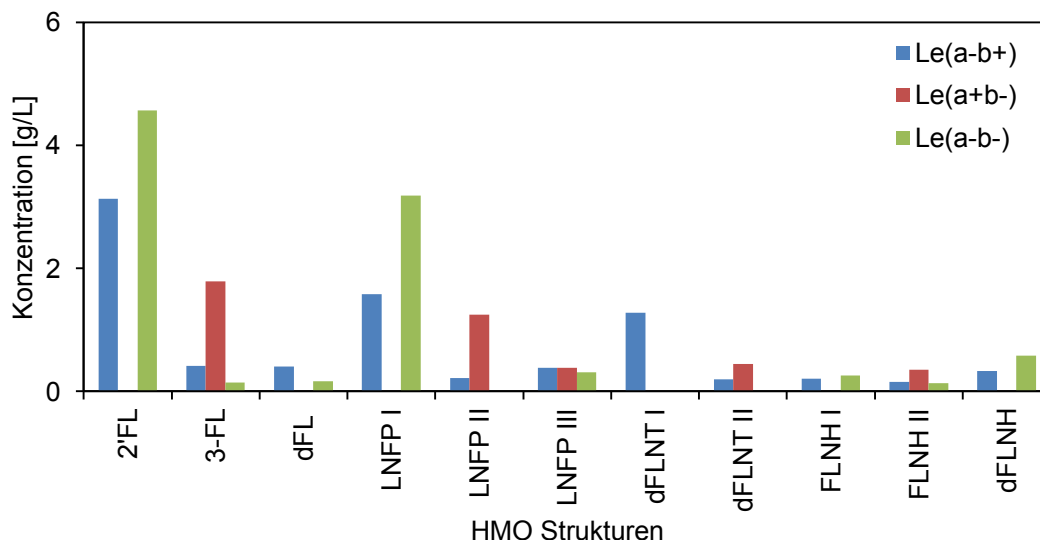


Abbildung 2 Konzentrationen 11 verschiedener HMOs in Bezug auf die Lewis-Blutgruppe der Spenderin [Thurl *et al.* 2010].

Im Besonderen fällt auf, dass eine Le(a+b-)-Probe eine geringere Strukturvielfalt an neutralen Oligosacchariden aufweist als Le(a-b+)- und Le(a-b-)-Proben. Dieser Unterschied zeigt sich insbesondere im Fehlen der Strukturen 2'FL, dFL, LNFP I, dFLNT I, FLNH I und dFLNH, welche ohne Ausnahme eine α 1-2-Fucose aufweisen. Der Grund hierfür ist, dass Le(a+b-) Donoren die sekretorgen-codierte Fucosyltransferase FucTII fehlt, wodurch diese Strukturelemente von Le(a+b-) Individuen nicht synthetisiert werden können. Besondere Unterschiede zwischen Le(a-b+) und Le(a-b-) liegen in der Lewis-Gen abhängigen Expression von α 1-4-Fucosen, welche ausschließlich in Le-positiven (Le(a+b-) bzw. Le(a-b+)) Donoren zu finden ist. Dieser Unterschied wird besonders in den Konzentrationen der Strukturen von LNFP II, dFLNH I und II deutlich. Ein Vergleich des Gesamt-Fucosylierungsgrades von Milchproben zeigt die aus der Biosynthese erwarteten Auffälligkeiten (siehe Abbildung 3).

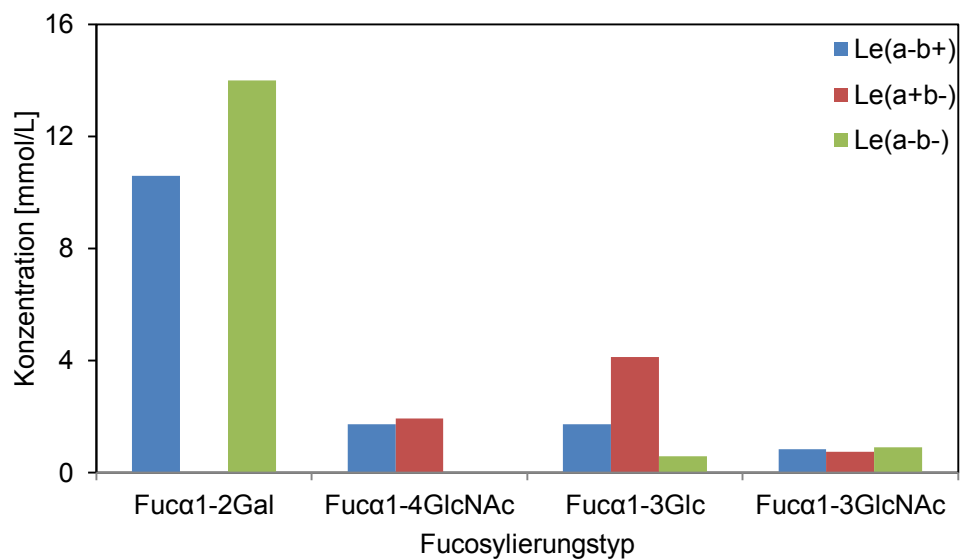


Abbildung 3 Fucosylierungsgrad in Abhängigkeit der Lewis-Blutgruppe
 Fuca1-2Gal, α 1-2-fucosylierte terminale Galaktosen; Fuca1-4GlcNAc, α 1-4-fucosyliertes subterminales *N*-Acetylglucosamin; Fuca1-3Glc, α 1-3-fucosylierte reduzierende Glukose; Fuca1-3GlcNAc, α 1-3-fucosyliertes subterminales *N*-Acetylglucosamin [Thurl *et al.* 2010].

Deutlich zeigt sich der Lewis-blutgruppenspezifische Unterschied erneut in der Konzentration der α 1-2-fucosylierten Strukturen. Da Le(a+b-) Donoren die Sekretorgencodierte FucTII fehlt, werden α 1-2-fucosylierte Strukturen in der Milch nicht exprimiert, wohingegen die Konzentration der α 1-2-gebundenen Fucosen bei Sekretoren (Le(a-b+) und Le(a-b-)) besonders hoch ist. Der umgekehrte Fall ist in der Konzentration von α 1-4-fucosylierten subterminalen *N*-Acetylglucosaminen zu erkennen. Le(a-b-) Donoren, welchen die Lewis-spezifische Fucosyltransferase FucTIII fehlt, weisen diese Strukturen in ihrer Milch nicht auf. Im Gegensatz dazu kann die Fucosylierung in α 1-3-Position sowohl der Glukose des reduzierenden Endes als auch der *N*-Acetylglucosamineinheiten bei jedem Donor beobachtet werden.

Diese Quantifizierungsdaten bestärken zum einen den vorgeschlagenen Biosyntheseweg (siehe Kapitel 3), zum anderen wird die Möglichkeit der Lewis-Blutgruppenzuordnung mittels der spezifischen Oligosaccharidmuster der Frauenmilch hierbei deutlich.

8 Moderne Methoden zur Analyse humaner Milch-Oligosaccharide

Die Analytik von HMOs stellt seit der Mitte des 20. Jahrhunderts eine herausfordernde Aufgabe dar. Die komplexe Matrix aus Proteinen, Lipiden und Laktose setzt aufwändige Trenn- und Aufreinigungsverfahren vor der eigentlichen Strukturanalytik voraus. Die Verwendung von Papier- und Dünnschichtchromatographie wurde schrittweise von *normal phase-* (np), *reversed phase-* (rp), *porous graphitized carbon-* (PGC) oder *hydrophilic interaction-* (HILIC) *high performance liquid chromatography* (HPLC) Methoden abgelöst [Kobata *et al.* 1972; Ruhaak *et al.* 2009; Kobata 2010; Mariño *et al.*

2011]. Eine Detektion des Analyten kann beispielsweise durch ein Fluorophor am reduzierenden Ende des Glykans erfolgen, welches in einem Fluoreszenzdetektor gemessen wird. Verschiedene Marker können meist durch reduktive Aminierung an das reduzierende Ende eines Oligosaccharids angefügt werden [Pabst *et al.* 2008]. Der Vorteil dieser Methode ist der breite dynamische Detektionsbereich von ca. 10 pmol bis 100 nmol. Die *high-pH anion-exchange chromatography* (HPAEC) bietet die Möglichkeit auf eine Fluoreszenzmarkierung des Glykans zu verzichten. Diese, auf ionische Wechselwirkungen des Analyten mit der stationären Phase basierende Chromatographie nutzt oft eine gepulste amperometrische Detektion (PAD) der Oligosaccharide [Kunz *et al.* 1996]. Die Kapillar-Gel-elektrophoretische Trennung von meist mit 1-Aminopyren-3,6,8-trisulfonsäure (APTS) markierten HMOs ist die neueste, auf Analytmigration basierende Entwicklung, welche zur HMO-Analytik eingesetzt wird [Schwarzer *et al.* 2008; Albrecht *et al.* 2010; Ruhaak *et al.* 2010].

Chromatographische Strukturaufklärung von einzelnen HMOs setzt meist die Verwendung von Glykanstandardsubstanzen zum Retentionszeitvergleich voraus, welche besonders für hochmolekulare Strukturen oft nicht zugänglich sind. Dieser Nachteil kann durch eine direkte Kopplung von Chromatographie und Massenspektrometrie umgangen werden. Online-Systeme bieten die Möglichkeit eluierende Glykane direkt massenspektrometrisch zu erfassen und somit detaillierte Strukturinformationen zu gewinnen [Broberg 2007]. Eine deutlich verbesserte Spraystabilität in Elektrospray-Massenspektrometern (ESI) ermöglicht es, diese Methode immer mehr auch zum *high-throughput* Screening von Glykanen zu nutzen [Selman *et al.* 2011]. Die Verwendung von *ultra high performance liquid chromatography* Systemen (UPLC) sowie die Erhöhung der Messgeschwindigkeit in z.B. Ionenfallen-Massenspektrometern ermöglichen die Analyse einer Vielzahl von Einzelkomponenten in einer sehr kurzen Messzeit von weniger als 20 Minuten [Bones *et al.* 2010].

Im Bereich der offline-Methoden bieten die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) eine sehr exakte Möglichkeit der HMO-Analytik. Die neuesten, zum Teil mehrdimensionalen NMR-Techniken weisen eine deutlich verbesserte Sensitivität auf und ermöglichen, dank Datenbankanalysen und Softwareentwicklungen, eine Strukturaufklärung einzelner HMOs. Trotz der erzielten Verbesserungen hinsichtlich der benötigten Probenmenge und Proben-Reinheit bleiben diese Methoden für komplexe hochmolekulare HMOs zurzeit nur bedingt geeignet.

Ein deutlich sensitiveres, robusteres und breiteres Methodenspektrum zur Oligosaccharidanalytik liefern die verschiedenen Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation Massenspektrometrie (MALDI-MS(/MS))-Techniken [Amano *et al.* 2009; Rohmer *et al.* 2010; Rohmer *et al.* 2011; Yang *et al.* 2011]. Die Vielzahl von Variationsmöglichkeiten innerhalb dieser Analysenmethode, beispielsweise durch Veränderungen der Trägermatrix oder Einstellungen des Massenanalysators sowie durch

zahlreiche Möglichkeiten von chemischen und biologischen Modifikationen, unterstreichen das Anwendungspotential. Für isolierte Isomere können besonders Fragmentierungsmusterbestimmungen einen guten Ansatzpunkt zur Strukturaufklärung einzelner HMO liefern. Eine *de novo* Strukturaufklärung von hochmolekularen HMOs bleibt allerdings aufgrund der geringen Ringfragmentierung und der großen Isomerenvielfalt eine anspruchsvolle Aufgabe. Aktuelle Untersuchungen konnten zwar eine Erhöhung der Sensitivität sowie der Fragmentierung durch das Verwenden von 3-Aminoquinoline sowohl als Matrix als auch als *on target*-Derivatisierungsreagenz zeigen [Rohmer *et al.* 2010; Rohmer *et al.* 2011]. Die Anwendbarkeit bleibt jedoch trotzdem beschränkt und die Informationen aus Ring-Fragmenten können selbst bei Standardsubstanzen nur wenige Bindungspositionen aufklären. Die Entwicklung von hochenergetischen Kollisionsexperimenten zur Erhöhung der *cross-ring*-Fragmentausbeute durch *collision-induced dissociation* (CID) kombiniert mit *infrared multiphoton dissociation* (IRMPD) konnte ebenfalls nur zu geringen Verbesserungen führen, wie die Resultate aus einem Screening von Milch-Gangliosiden zeigten [Lee *et al.* 2011].

Für die *de novo* Strukturanalytik von HMOs hat sich eine Kombination verschiedener Analysemethoden bewährt. Nach der oft mehrdimensionalen chromatographischen Isolierung einzelner Strukturen kann durch die Verknüpfung chemischer Modifikationen mit selektivem enzymatischen Verdau nach einer massenspektrometrischen Analyse ein Rückschluss auf Bindungspositionen und Anomerie der enthaltenen Monosaccharide gezogen werden [Geyer *et al.* 1999]. Der Einsatz von gaschromatographischen Analysen mit *electron-impact-ionisation mass spectrometry* (GC-EI-MS) kann, nach Permethylierung, Hydrolyse und Acetylierung, ebenfalls Aussagen über die Bindungspositionen der Monosaccharide im Gesamtglykan liefern [Björndal *et al.* 1970; Stellner *et al.* 1973; Geyer *et al.* 1994]. In Kapitel 4 wird eine flexibel kombinierbare Analysestrategie beschrieben, welche zur gezielten *de novo* Strukturanalytik isolierter HMOs eingesetzt werden kann.

Trotz der beschriebenen enormen Verbesserungen der Analytik bleibt die HMO-Strukturanalyse eine zeitintensive Aufgabe. Viele *in vitro* aber vor allem *in vivo* Studien, besonders zur Untersuchung der Funktionen und Metabolisierung von HMOs, liefern oft sehr große Probensätze von mehreren Hundert einzelnen Milchproben. Um diese große Anzahl von individuellen Proben adäquat zu analysieren, müssen *high-throughput* Verfahren zum schnellen Screening von Milchproben entwickelt werden, welche fokussiert das Oligosaccharidmuster einzelner Donoren bestimmen können. Solche Verfahren setzen allerdings neben der eigentlichen Analytik auch eine schnelle, verlässliche Probenaufarbeitung voraus. Die Kombination von automatisierter Festphasenextraktion mit anschließender MALDI-MS Messung bietet die Möglichkeit des

schnellen Screening von bis zu 96 Proben innerhalb weniger Stunden (siehe Kapitel 2). Eine detaillierte Strukturinformation kann zwar so nicht generiert werden, aber kompositionell determinierte, in der Studie eingesetzte Proben können einen deutlichen Erkenntnisgewinn in der Korrelation von biologischen Funktionen und donorspezifischen HMO-Unterschieden liefern.

Die Weiterentwicklung analytischer und biochemischer Methoden wird immer tiefere Einblicke in die Komplexität von Frauenmilchkomponenten zulassen. Die Zusammenarbeit von Analytik und klinischer sowie biologischer Forschung wird zukünftig die Möglichkeit eröffnen, einzelne Strukturkomponenten bestimmten Funktionen der Frauenmilch zuzuordnen [Jantscher-Krenn *et al.* 2011]. Die so gewonnenen Erkenntnisse können einen weiteren Schritt zum Verständnis der natürlichen Kindesernährung beitragen und den biologischen Nutzen für gestillte Kinder weiterführend beschreiben.

Projektbeschreibung

In der vorgelegten Arbeit soll die Zusammensetzung der exprimierten Oligosaccharide einzelner Frauenmilchproben detailliert untersucht werden.

Zwei Fragestellungen stehen hierbei im Vordergrund:

1. Können individuelle Korrelationen der exprimierten Oligosaccharide mit der jeweiligen Lewis-Blutgruppe einzelner Mütter massenspektrometrisch detektiert werden?
2. In welcher Weise können individuelle Wege zur *de novo* Strukturanalyse hochmolekularer Milchligosaccharide etabliert werden?

Zur Beantwortung dieser Leitfragen war das Ziel, ein automatisiertes und standardisiertes *high-throughput* Verfahren zur Probenaufarbeitung zu entwickeln. So gewonnene Humanmilch-Oligosaccharidproben sollten massenspektrometrisch erfasst werden und anschließend statistisch auf ihre Lewis-Blutgruppen-Korrelation untersucht werden. Publierte chromatographische Daten zeigten bereits die Möglichkeit einer aufwändigen individuellen Charakterisierung [Kobata *et al.* 1969; Thurl *et al.* 2010]. Auf dieser Basis sollte eine Methode entwickelt werden, welche nach weniger als zwei Tagen nahezu 100 individuelle Oligosaccharidprofile einzelner Donoren automatisiert erstellen kann. Abschließend sollte die Methode validiert und standardisiert werden.

Weiterhin sollten Strategien zur detaillierten Strukturanalytik isolierter hochmolekularer Oligosaccharide ausgearbeitet werden. Hierzu sollte eine flexibel kombinierbare Methode entwickelt werden, welche mit Hilfe etablierter Analyseverfahren eine komplette *de novo* Strukturanalyse von HMOs ermöglichte. Eine nicht-lineare Vorgehensweise sollte es ermöglichen, erzielte Ergebnisse auf alternativen Analyserouten zu validieren und so verlässliche Strukturdaten zu generieren. Die Notwendigkeit einer vollständigen Strukturcharakterisierung, besonders im hochmolekularen Bereich, sollte durch die Analyse von mehrfach fucosylierten Octaosen und Decaosen demonstriert werden.

Kapitel 2

High-throughput mass finger Printing and Lewis blood group assignment of human milk oligosaccharides

Dennis Blank, Sabine Gebhardt, Kai Maass, Günter Lochnit, Viktoria Dotz,
Jennifer Blank, Rudolf Geyer, Clemens Kunz
[Anal Bioanal Chem 401 \(2011\) 2495-2510](#)

Zusammenfassung

Jede Humanmilchprobe zeigt in Abhängigkeit des Lewis-Blutgruppenstatus des Donors ein spezifisches Oligosaccharidmuster. Ich habe in der vorliegenden Publikation eine Methode entwickelt um diese Oligosaccharidmuster massenspektrometrisch zu erfassen. Weiterhin habe ich die Aufarbeitungsmethodik so optimiert, dass das Verfahren weitestgehend automatisiert werden konnte. Als Probenset standen 40 Milchproben mit bekanntem Lewis-Blutgruppenstatus der Donoren zur Verfügung, welche ich automatisiert aufgearbeitet, gemessen und annotiert habe. Basierend auf diesen Daten konnte eine Statistik angefertigt werden, welche die Möglichkeit der Zuordnung des Lewis-Blutgruppenstatus anhand massenspektrometrischer HMO-Daten verdeutlicht.

Weiterhin habe ich mittels Quantifizierungsanalysen gezeigt, dass nach dem durchgeführten Screening-Prozess mindestens 150 µg aufgereinigte Oligosaccharide für weitere Analysen zur Verfügung stehen.

High-throughput mass finger printing and Lewis blood group assignment of human milk oligosaccharides

Dennis Blank · Sabine Gebhardt · Kai Maass ·
Günter Lochnit · Viktoria Dotz · Jennifer Blank ·
Rudolf Geyer · Clemens Kunz

Received: 9 June 2011 / Revised: 17 August 2011 / Accepted: 17 August 2011 / Published online: 4 September 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract

The structural diversity of human milk oligosaccharides (HMOs) strongly depends on the Lewis (Le) blood group status of the donor which allows a classification of these glycans into three different groups. Starting from fifty microliters of human milk a new high-throughput, standardized and widely automated mass spectrometric approach has been established which can be used for correlation of HMO structures with the respective Lewis blood groups on the basis of mass profiles of the entire mixture of glycans together with selected fragment ion spectra. For this purpose, the relative abundance of diagnostically relevant compositional species, such as Hex₂Fuc₂ and Hex₃HexNAc₁Fuc₂ as well as the relative intensities of characteristic fragment ions obtained thereof are of key importance. For each Lewis blood group, i.e., Le(a-b+), Le(a+b-) and Le(a-b-), specific mass profile and fragment ion patterns could be thus verified. The described statistically proven

classification of the derived glycan patterns may be a valuable tool for analysis and comparison of large sets of milk samples in metabolic studies. Furthermore, the outlined protocol may be used for rapid screening in clinical studies and quality control of milk samples donated to milk banks.

Introduction

Human milk is considered to be the nutritional gold standard for term infants [1]. In addition to lactose, proteins and fat, it contains complex lactose-based oligosaccharides in high concentrations varying between 10 and 20 g/L [2, 3]. These human milk oligosaccharides (HMOs) are thought to be beneficial for human milk fed infants because of their anti-inflammatory, anti-infective and immune stimulating properties [2, 4, 5]. Moreover, there is increasing evidence for local effects within the gastrointestinal tract as well as for systemic functions [6-9]. HMOs are considered to act as

substrates for bifidobacteria and, hence, to influence the composition of the intestinal microbiota [10-12]. They may also function as receptor analogues, preventing bacterial adhesion to epithelial cell surfaces [2, 5]. Fucosylated compounds, for example, represent binding sites for pathogenic bacteria such as *Campylobacter jejuni* which would explain the anti-adhesive effect of (α 1-2)-fucosylated HMOs [13]. Similar carbohydrate specificity is also known for *Helicobacter pylori* [14]. Likewise, the expression of distinct structural features is required with regard to systemic effects of HMOs. Since some oligosaccharides can be absorbed and reach blood circulation [15], they may competitively inhibit leukocyte adhesion due to their structural similarities to selectin ligands, thus expressing an anti-inflammatory potential [7]. Corresponding *in vitro* data indicated that structural epitopes related to the tetrasaccharide sialyl-Lewis X might play a key role in this context [16].

So far, more than 130 unique structures of HMOs were characterized [17, 18] and experimental evidence for the existence of a minimum of 100 additional species has been reported [19-21]. As already shown in the pioneering studies of the group of Victor Ginsburg [22-26], the overall structural features of HMOs are strongly affected by the gene-regulated expression of specific glycosyltransferases in the mammary gland depending on the mother's Lewis blood group and secretor status (Table 1) [27-29, 37].

Nearly all examined compounds are built up by single or multiple elongations of lactose with two different types of *N*-acetyllactosamine (LacNAc) units, i.e., the dominant type I chains (Gal(β 1-3)GlcNAc) or type II units (Gal(β 1-4)GlcNAc) [30-32], thus forming either linear or branched structures, which can be further modified by three different types of Lewis-dependent fucosyltransferases [4]. Fucosyltransferase II (FucT II, α 1-2 FucT) transfers fucose in (α 1-2)-linkage to terminal galactose, fucosyltransferase III (FucT III, α 1-4 FucT) catalyzes the transfer of fucose in (α 1-4)-linkage to subterminal *N*-acetylglucosamine and various fucosyltransferases catalyzing α 1-3 fucosylation (α 1-3 FucTs), which are active in all Lewis blood group donors and attach fucose in (α 1-3)-position either to *N*-acetylglucosamine or to the glucose residue at the reducing end of the glycan [33]. Respective modifications of the core structures lead to the formation of Lewis epitopes, H-antigens or the glucose analogue of a Lewis X epitope [29, 34-39]. The appearance of the Lewis blood groups varies in different regions of the world; data for the distribution amongst Caucasian population are given in Table 1.

Acidic glycans are additionally decorated with sialic acid (Sia), which can be attached either in (α 2-3)- or (α 2-6)-linkage to terminal galactose residues or in (α 2-6)-position to subterminal GlcNAc. However, reviewing the completely characterized structures supports the

hypothesis that, in particular, Lewis blood group related epitopes play a key role in bioactivity [13, 29, 40].

Recent studies have shown that not only the absence or presence of individual oligosaccharides but also their relative abundance varies in accordance with the Lewis blood group of the donor [41]. This distinct difference with regard to the total number of neutral HMOs and their specific monosaccharide linkages has most likely an effect on specific functions

which have not been investigated so far [40]. One might speculate, however, that infants which are breast-fed by mothers of a distinct Lewis blood group and/or secretor type are better protected against certain infections than others. Moreover, it has been recently suggested that the secretor genotype and phenotype of the child may provide strong predictive biomarkers of adverse outcomes in premature infants [42].

Table 1 Lewis blood group specific characteristics

Lewis blood group ^a	Expressed enzyme ^b	Involved gene	Percentage of population	Carbohydrate epitope ^c
Lewis (a-b+)	α 1-2 FucT α 1-4 FucT	Se/- ; Le/-	69	
Lewis (a+b-)	α 1-4 FucT	se/se ; Le/-	20	
Lewis (a-b-)	α 1-2 FucT	Se/- ; le/le	5-10	
Lewis (a-b-c+d-)	-	se/se ; le/le	1	

^a Active fucosyltransferases (FucTs) and corresponding genes are listed for each Lewis blood group together with their relative occurrence within the Caucasian population (modified according to [2, 27, 37]).

^b α 1-3 FucT is active in all Lewis blood group donors.

^c Expressed glycan epitopes are shown using GlycoWorkbench [46]. Yellow circle, galactose; blue square, *N*-acetylglucosamine; red triangle, fucose.

Being able to directly correlate HMO profiles with the Lewis blood group of a donor would be a great benefit with regard to a simplification of future functional and metabolic studies. Furthermore, existing data sets could be correlated to Lewis blood group-

dependent diversities by re-analyzing stored milk samples. Here, we report a new widely automated and standardized screening method to determine the Lewis blood group of the donor from mass finger prints of the neutral HMOs by using only 50 μ L of milk.

Materials and methods

Sample collection and blood group determination

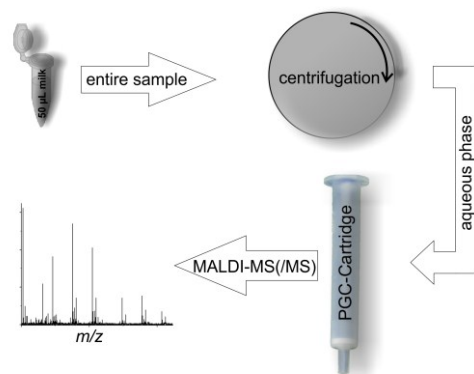
Human milk and blood samples of 34 individual donors were collected within the first week of lactation by the Institute of Nutritional Science in collaboration with Dr. P. Gilbert (St. Josefs Hospital, Giessen). All procedures involving human subjects were approved by written consent of the donors. Samples were taken within the first week of lactation and stored at -20°C . Immunological determination of the respective Lewis blood groups was kindly performed by the laboratory of Professor G. Bein (Institute of Immunology and Transfusion Medicine, University Hospital Giessen-Marburg, Germany). In addition, 6 samples of mature milk from other donors with known Lewis status were analyzed. In total, milk samples from 27 secretor mothers with Lewis blood group Le(a-b+), 6 non-secretor mothers with Lewis blood group Le(a+b-) and 7 secretor mothers with Lewis blood group Le(a-b-) were analyzed.

Manual isolation of human milk oligosaccharides

The sample work-up protocol is illustrated in Scheme 1. In brief, 50 μL aliquots of human milk obtained from individual donors were diluted by addition of 450 μL of Milli-Q water. After centrifugation ($14,000\times g$) for 20 min at room temperature 300 μL of the aqueous phase were taken using a syringe and

loaded on porous graphitic carbon (PGC) cartridges (25 mg; Thermo Scientific, Bellefonte PA, USA) for solid phase extraction (SPE) [43, 44]. Prior to use, cartridges were equilibrated by consecutive washing twice with 1 mL of 40/60 (v/v) acetonitrile (ACN)/water containing 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) and 1 mL of 20/80 (v/v) ACN/water containing 0.1% (v/v) TFA and five times with 1 mL of 0.1% (v/v) TFA. Using the VacMaster sample processing manifold (VacMaster-10, Biotage, Uppsala, Sweden) reduced pressure of 800 mbar was applied to speed up washing and isolation procedures. After loading the samples, cartridges were washed five times with 1 mL of 0.1% (v/v) TFA. Bound oligosaccharides were eluted with two times 400 μL of 40/60 (v/v) ACN/water containing 0.1% (v/v) TFA. With the exception of sialyllactose, oligosaccharides comprising less than four monosaccharide units were not bound by the PGC material and, thus, could be removed during the washing step. Alternatively, neutral and acidic HMOs could be fractionated by applying consecutively 400 μL of 40/60 (v/v) ACN/water prior to 400 μL of 40/60 (v/v) ACN/water containing 0.1% (v/v) TFA. As the quality of the resulting spectra was not improved by stepwise elution, this approach was not included in the routine protocol in order to speed up the whole sample preparation procedure. The obtained oligosaccharides were dried in a vacuum centrifuge and brought to a volume of 100 μL with Milli-Q water. The

entire sample work-up procedure for a maximum of ten samples took about 2-5 hours.



Scheme 1 Sample work-up procedure for rapid HMO profiling. Milk samples (50 μL) were diluted tenfold with water. After centrifugation the aqueous phase was subjected to solid phase extraction using a porous graphitic carbon cartridge. Oligosaccharides were eluted with acetonitrile / water containing 0.1% trifluoro-acetic acid and analyzed by MALDI-TOF-mass spectrometry.

Automated isolation of human milk oligosaccharides

To quicken the procedure and to achieve maximum standardization and reproducibility, the whole sample work-up procedure was adapted to a Hamilton Microlab Starlet (Hamilton Robotics, Reno, NV, USA) liquid handling system which was operated by Vector 4.0 software. After the centrifugation step all samples were pipetted into a standard 96-well plate and transferred into the workstation. For solid phase extraction PGC-well plate columns were used (25 mg; 1 mL; Thermo Scientific, Bellefonte, PA, USA). Equilibration, washing and elution steps were identical to the manual procedure. The eluates were collected in a 96-deep-well plate (Thermo Scientific) and dried in a

vacuum centrifuge overnight. Thereafter, re-suspension with 100 μL of water and spotting onto a MALDI target were carried out automatically. Likewise, MALDI-TOF-MS was performed automatically using identical parameters as for manual measurements (see below). Parallel processing of 96 samples took about four hours before and after the overnight drying step, respectively. Hence, a complete HMO screening including spectra recording and annotation could be finished within two days. Each sample was automatically worked up three times in two robotic runs, resulting in 120 individual samples.

Oligosaccharide screening by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS)

MALDI-TOF-MS spectra were recorded with an Ultraflex I instrument (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), equipped with a nitrogen laser which emits at 337 nm. Profile spectra were recorded automatically, using an optimized autoXecute method of the flexAnalysis software (Bruker). Hundred single laser pulse spectra were summed up for each mass spectrum. The instrument was operated in the positive-ion or negative-ion reflector mode, using an acceleration voltage of 25 kV and a reflector voltage of 26.3 kV. Oligosaccharide profiles were recorded in the mass range of m/z 500-4000. Tandem mass (MS/MS) spectra were acquired in the laser-induced

dissociation (LID) mode. In this case, the voltage of the ion source was set to 8 kV and fragments formed by decomposition of the selected precursor ions were accelerated by applying a voltage of 19 kV. In all experiments 6-aza-2-thiothymine (ATT) was used as matrix (35 mM ATT (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) in 25 mM aqueous NH_4HCO_3). A volume of 0.5 μL of matrix solution was deposited on an Anchorchip 600 target (Bruker) and mixed with 0.5 μL of the HMO sample. Samples were dried under a stream of cold air. Recorded data were processed and analyzed using flexAnalysis (Bruker) as well as Glyco-Peakfinder [45] and GlycoWorkbench [46] software tools which have been developed as part of the EUROCarbDB project [47].

Quantification of monosaccharides

The total amount of carbohydrates was ascertained for 40 individual samples of colostrum and mature milk by reversed-phase HPLC monosaccharide analysis with fluorescence detection. The hydrolyzed neutral monosaccharides were labeled with anthranilic acid for detection (method described elsewhere [48, 49]). Sialic acid was labeled with DMB prior to analysis [50, 51].

Statistical evaluation of data

The statistical analysis was based on 40 milk samples, each of which was analyzed in triplicate (i.e., 120 single acquisitions). Seven measurements (5.8%) were filtered to increase the

Gaussian distribution. Outliers were localized in Q-Q-Plots and traced back to the MALDI measurement itself. Thereby, for statistical calculation data obtained for 40 milk samples (33 samples measured in triplicate, 7 samples measured in duplicate resulting in 113 individual measurements) were incorporated. Each recorded spectrum was normalized to the sum of peak areas of the nine HMO signals registered in the mass range of m/z 650-1550. The observed values (average relative peak areas with standard errors) were referred to the descriptive statistic. Because of the determining influence of the multiple measurements on the statistical results, the test of significance was based on the estimated marginal means. The method Mixed Models was used in which the sample number was given as variable of subject because of correlating residuum values. Due to the size of test specimens, REML (Restricted Maximum Likelihood) was applied as method of estimation and Sidak was used for correction. To classify the samples a discriminant analysis was performed. The A-priori-probabilities were calculated on the basis of the group size. The syntax of all calculations used is given in the Supplement (see Electronic Supplementary Material). IBM SPSS Statistics 19 (IBM, Somers, NY, USA) was used as statistical software tool.

Results and discussion

Optimization, standardization, and miniaturization of the sample work-up procedure

To optimize the work-up protocol for isolation of the HMOs and to simultaneously improve the quality of the resulting mass spectra, the amount of human milk being employed was stepwise reduced from 500 to 25 μL . Optimal signal intensities and resolution were achieved for both MS as well as MS/MS spectra starting from 50 μL of milk. To ease sample handling during centrifugation and SPE, it became necessary, however, to adjust the starting sample volume to 500 μL with water. In order to achieve maximum reproducibility, all further steps were automated using a Microlab workstation as outlined in the experimental section.

Quantification of monosaccharides

The amounts of total carbohydrates as well as recovered HMOs were ascertained by HPLC monosaccharide analysis. Dependent on the Lewis blood group, different average values for the carbohydrate content of the respective milk samples could be identified: 18 g/L for Le(a-b+), 10 g/L for Le(a+b-) and 9 g/L for Le(a-b-) individuals. The total amount of HMOs isolated from a 50 μL sample ranged between 150 to 390 μg , only 0.5%, i.e., 0.5-2 μg of which were transferred to the MALDI-MS target, thus allowing further analyses of the residual glycans. The recovery of HMOs after the

automated work-up procedure was determined by HPLC quantification of *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) before and after SPE, as the amount of this monosaccharide constituent is not influenced by the potential presence of residual lactose. Tenfold measurement of the same milk sample revealed that about 85% of the total amount of GlcNAc was recovered on average in each case. Monosaccharide constituent analyses of the 40 individual samples under study further demonstrated that the level of fucosylation per LacNAc unit and lactose core amounted 1.42 (\pm 0.43) for Lewis (a-b+), 0.36 (\pm 0.14) for Le(a+b-) and 0.74 (\pm 0.39) for Le(a-b-) underlining again a strong dependence on the respective Lewis blood group. In contrast, the average amounts of sialic acid in Le(a-b+), Le(a+b-) and Le(a-b-) samples were 3.6 g/L (\pm 1.6), 3,6 g/L (\pm 0.3) and 4.7 g/L (\pm 2.1), respectively, thus ruling out a correlation of the total amount of sialic acid with the donors' Lewis blood group in agreement with literature data [41]. Values in brackets show standard deviations.

Reproducibility of the outlined approach

In order to examine the reproducibility of the entire work-up procedure, one Le(a-b+) human milk sample was automatically worked up 10 times in parallel. Each of the resulting 10 HMO samples were spotted three times onto the MALDI-MS target and MALDI-TOF-MS profile as well as MS/MS(LID) spectra were recorded in triplicate from

each spot, resulting in 90 profile spectra as well as 90 LID spectra of the signals at m/z 656/657 and m/z 1022, respectively. Relative peak areas were calculated for each spectrum on the basis of the sum of total peak areas of all considered signals. The obtained data demonstrated only small deviations between the 90 individual measurements (see Electronic Supplementary Material Fig. S1). Diagrams aI, bI and cI, showing a comparison of the profile and LID spectra recorded from one spot only, displayed the lowest degree of divergence, which increased slightly when spectra of three independently spotted aliquots of the same sample preparation were compared (see diagrams aII, bII and cII in Fig. S1). The largest deviations, however, were registered in the case of spectra obtained for the ten independently worked-up samples (diagrams aIII, bIII and cIII in Fig. S1). Nevertheless, the maximum divergence of the relative peak areas was usually less than 3% for profile spectra and less than 9% for MS/MS data, which illustrates the high reproducibility of the outlined approach. Within the calculated margins of error between individual MS and MS/MS measurements no statistically relevant inter-day variations have been observed.

MALDI-TOF-MS profiling of HMOs

It is known already for a long time that the pattern of neutral HMOs depends on the mother's Lewis blood group and secretor status [22-28, 38]. In agreement with these earlier findings, Thurl et al. [41] recently reported that milk samples of individual donors exhibit significant qualitative and quantitative differences in their neutral HMO profiles in relation to the Lewis blood group status of the mother. In this study, the authors performed a comparison of the respective oligosaccharide profiles mainly by high-pH anion-exchange chromatography, applying 1 mL of human milk and a time-consuming preparative gel permeation chromatography purification step, mainly to remove lactose. Due to the enormous developmental progress in the field of mass spectrometry [52], however, it is now possible to investigate such aspects also by MS technology. In this context, the high-performance nanoflow liquid chromatography mass spectrometry (HPLC-Chip/TOF-MS) approach introduced by Lebrilla and co-workers [20, 21, 44, 52] is of key importance as it provides a sensitive and quantitative method for HMO profiling. A major drawback of this method is, however, that both sample work-up and nanoLC separation are time-consuming and cannot be implemented in an automated work-flow.

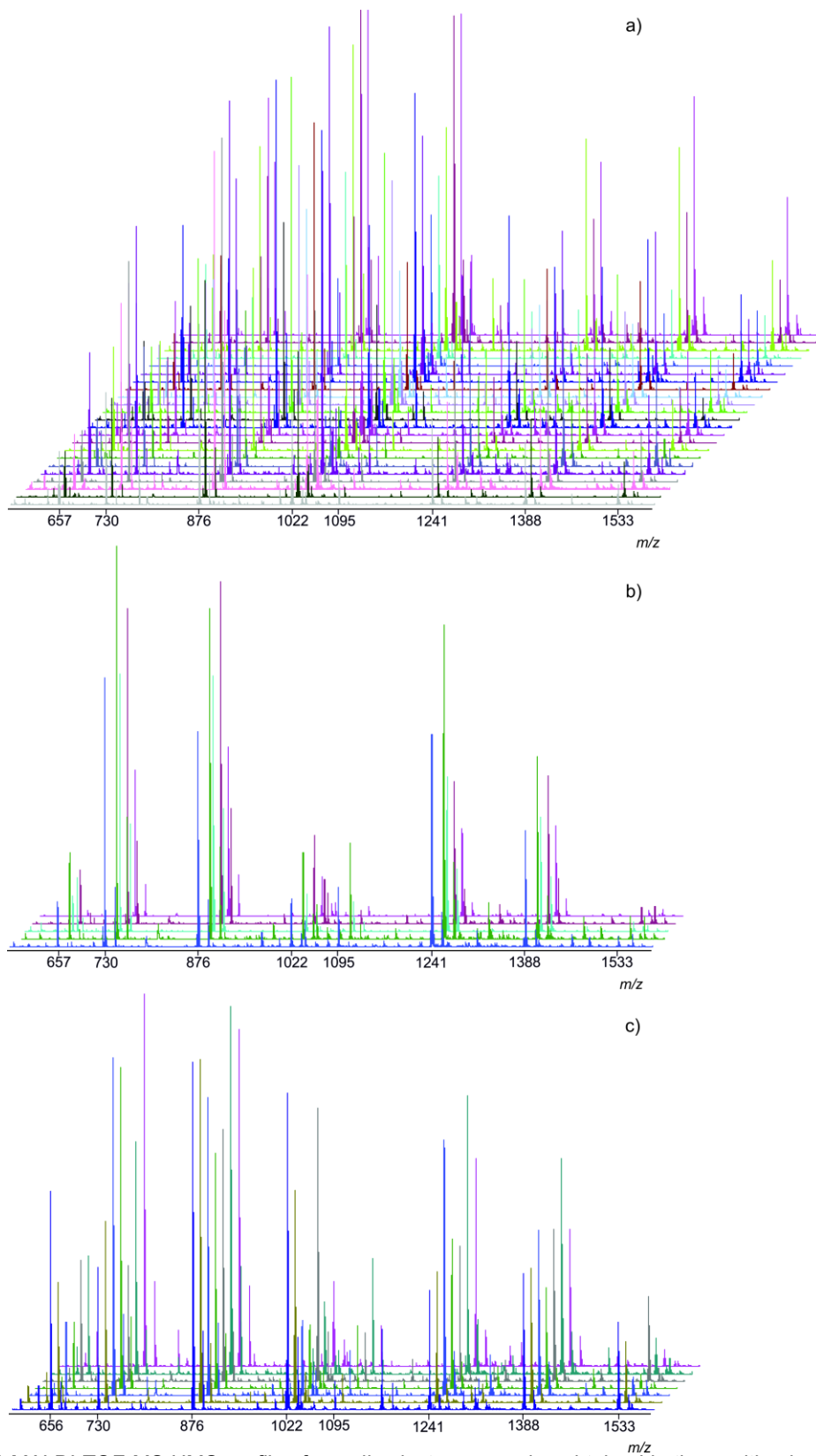


Fig. 1 MALDI-TOF-MS HMO profiles from all colostrum samples obtained in the positive-ion mode. Glycan fractions of milk from Le(a-b+) (a), Le(a+b-) (b) and Le(a-b-) (c) blood group donors were analyzed in parallel.

In order to establish Lewis blood group-dependent differences in HMO expression, we have, therefore, established an alternative high-throughput approach by comparing oligosaccharide profiles in milk samples from mothers with a defined Lewis blood group directly by MALDI-TOF-MS and MALDI-TOF-MS/MS in the LID mode. Diagnostically relevant signals were identified in MS as well as MS/MS spectra and corresponding peak areas were evaluated.

Oligosaccharides from different types of donors were analyzed in the positive-ion and negative-ion mode. Figure 1 gives an overview of raw spectra from all recorded colostrum samples in the positive-ion mode in accordance to the serologically detected Lewis blood group of the donor. The result demonstrates the reproducibility and close similarity of the received data within each group. In the positive-ion mode, neutral oligosaccharides and sialyllactose (Hex_2Sia_1) were detected as sodium ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) or potassium ($[\text{M}+\text{K}]^+$) adducts, whereas acidic glycans, with the exception of sialyllactose, were monitored as $[\text{M}-\text{H}]^-$ or $[\text{M}-2\text{H}+\text{Na}]^-$ quasimolecular ions of monosialylated or disialylated species in the negative ion mode (Fig. 2). The comparison of HMO mass spectra obtained from Le(a-b+), Le(a+b-) and Le(a-b-) donors revealed that spectra recorded in negative-ion

mode did not allow a discrimination between the different Lewis blood groups, though completing the oligosaccharide profiling of each sample. Multi-fucosylated, sialylated glycans were not further analyzed due to their low abundance. In contrast, careful inspection of the MALDI-TOF-MS spectra obtained in the positive-ion mode demonstrated differences for the sodiated oligosaccharide species at m/z 656 (Hex_2Sia_1), m/z 657 (Hex_2Fuc_2), m/z 730 ($\text{Hex}_3\text{HexNAC}_1$), m/z 876 ($\text{Hex}_3\text{HexNAC}_1\text{Fuc}_1$), m/z 1022 ($\text{Hex}_3\text{-HexNAC}_1\text{Fuc}_2$), m/z 1095 ($\text{Hex}_4\text{-HexNAC}_2$), m/z 1241 ($\text{Hex}_4\text{HexNAC}_2\text{-Fuc}_1$), m/z 1387 ($\text{Hex}_4\text{HexNAC}_2\text{Fuc}_2$) and m/z 1533 ($\text{Hex}_4\text{HexNAC}_2\text{Fuc}_3$) (cf. signals marked in red in Fig. 2a-c).

Sialyllactose (Hex_2Sia_1 , m/z 656) could be detected in the HMO spectrum of each type of Lewis blood group donor, whereas spectra obtained in the case of Le(a-b+) and Le(a-b-) donors exhibited, in addition, a clear signal at m/z 657 being indicative for the presence of difucosyllactose (Hex_2Fuc_2) glycan species. The faint signal detectable in the case of milk samples from non-secretor mothers with Lewis blood group Le(a+b-) could be traced back to the isotopic pattern of the signal of sialyllactose (m/z 656) as evidenced by analysis in the negative-ion mode (Fig. 3).

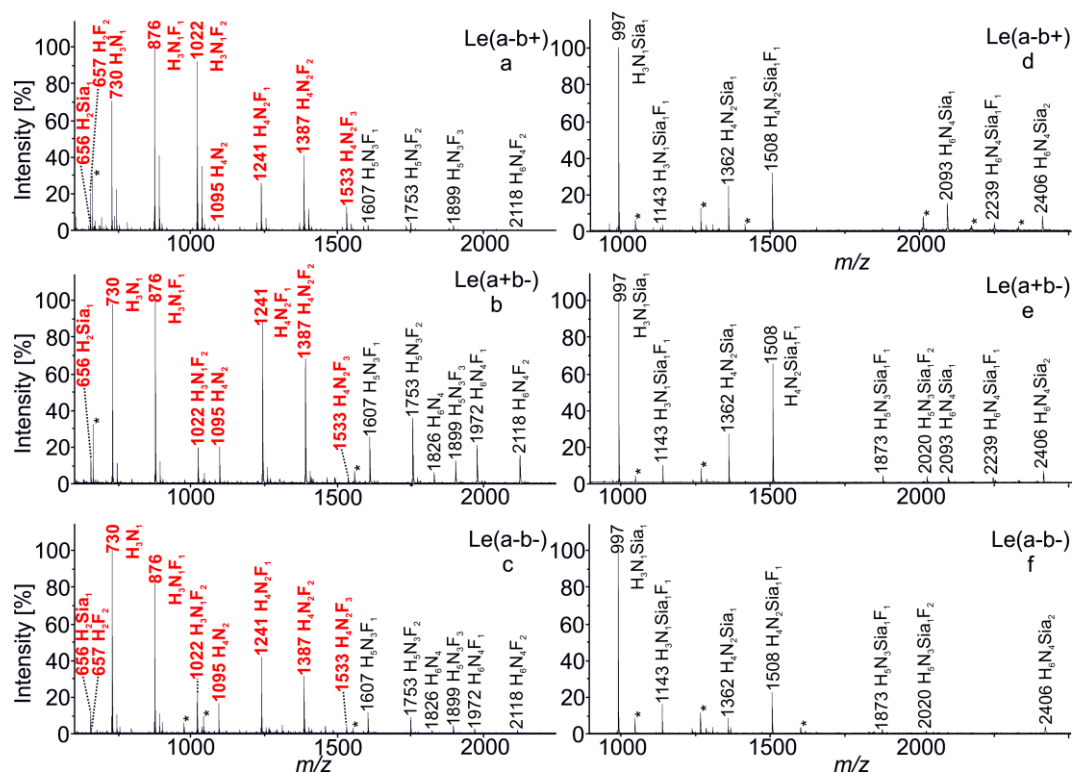


Fig. 2 Representative MALDI-TOF-MS spectra of HMOs from Le(a-b+) (**a** and **d**), Le(a+b-) (**b** and **e**) and Le(a-b-) (**c** and **f**) blood group donors obtained in the positive-ion (**a-c**) and negative-ion (**d-f**) mode. $[M+Na]^+$ and $[M+K]^+$ or $[M-H]^-$ and $[M-2H+Na]^-$ quasimolecular ions were registered, respectively. Glycan signals which were used for statistical validation are highlighted in red. Signals referring to non-carbohydrate contaminants are marked by *asterisks*. H, hexose; N, *N*-acetylhexosamine; F, deoxyhexose (fucose); and Sia, sialic acid.

This result is in agreement with literature data reporting that biosynthesis of difucosyllactose does not occur in non-secretor type Le(a+b-) donors [41]. In order to estimate the correct peak area of the signal corresponding to Hex_2Fuc_2 (m/z 657), Bruker SNAP algorithm (flexAnalysis 3.0) was, therefore, used which takes into account the isotopic pattern of sialyllactose.

Intriguingly, the relative intensities of the signals at m/z 730 ($Hex_3HexNAc_1$) reflecting the presence of lacto-*N*-tetraose and/or lacto-*N*-neotetraose (LNT or LNnT) also differed between the three donor groups. Whereas the signal

intensity was significantly lower in the case of Le(a-b+) donors in comparison to Le(a+b-) and Le(a-b-) donors, the opposite was true for the signal at m/z 1022 ($Hex_3HexNAc_1Fuc_2$) representing a difucosylated variant of the tetrasaccharide precursor. This finding is also in agreement with our earlier studies demonstrating large differences in concentrations of LNT and its monofucosylated derivatives LNFP I and LNFP II in milk of four mothers during the first weeks of lactation (cf. Table 2 in [53]; no Lewis status reported).

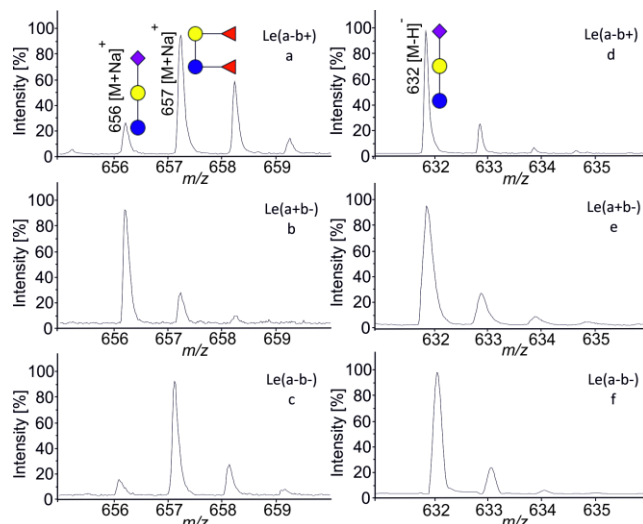


Fig. 3 Zoomed low mass regions of the MALDI-TOF-MS profiles obtained in positive-ion (a-c) and negative-ion (d-f) reflector mode for HMOs from Le(a-b+) (a, d), Le(a+b-) (b, e) and Le(a-b-) (c, f) blood group donors. Signals obtained at m/z 657 in the positive-ion mode represented either exclusively the isotopic signal of sialyllactose (m/z 656) (b) or the summed signals of difucosyllactose (m/z 657) plus the isotopic signal of sialyllactose (a, c) as evidenced by the corresponding spectra recorded in the negative-ion mode.

Likewise, the high signal intensity of the trifucosylated hexaose derivative at m/z 1533 ($\text{Hex}_4\text{HexNAc}_2\text{Fuc}_3$) in milk from Le(a-b+) donors compared to one of Le(a+b-) mothers emphasized this characteristic difference between a Le(a-b+)/Le(a-b-)-correlated and a Le(a+b-)-correlated type of HMO profile. Due to the fact that Le(a-b+) donors express (α 1-2)-, (α 1-3)- and (α 1-4)-fucosyltransferases, corresponding oligosaccharide patterns are obviously shifted to a higher fucosylated status as compared to those of Le(a+b-) donors, who are lacking an active (α 1-2)-fucosyltransferase which is in agreement with the estimated number of fucose residues per LacNAc unit (see above).

Statistical evaluation of the recorded HMO profile spectra

Recorded HMO profile spectra displayed exclusively measured signal intensities

versus respective m/z values. For statistical analysis, however, all spectra were normalized to the summarized peak areas of the nine signals taken into consideration from the profile spectra (Fig. 2a-c). Likewise, eight signals were selected from MS/MS spectra (see below). The necessity for the transformation of the acquired data is illustrated in the Electronic Supplementary Material (Fig. S2), demonstrating that visual inspection of the recorded signal intensities (diagrams aI, all, aIII) or relative signal intensities based on the signal at m/z 876 set to 100% (diagrams bI, bII and bIII) did not fully correlate with the results obtained by estimation of the respective peak areas (diagrams cI, cII and cIII) and normalization to the sum of peak areas (diagrams dI, dII and dIII). Only the latter mode of data evaluation mirrors adequately the relative abundance of the

individual HMO compositional species. Therefore, statistical conclusions are based on this type of calculation throughout.

For statistical validation of the series of MS profile measurements, the average values of the relative peak areas were calculated together with their confidence intervals for each relevant signal (Table 2).

The deduced Lewis blood group and signal specific values defined the range within which 95% of the averaged peak area values of all samples are found. To this end, each sample was measured three times and respective peak areas were normalized to the entire peak areas of the above mentioned signals.

Table 2 Relative abundance of selected HMO compositional species monitored by MALDI-TOF-MS

Molecular ion <i>m/z</i> [M+Na] ⁺	Confidence interval (95%) for each Lewis blood group ^a		
	Le (a-b+)	Le (a+b-)	Le (a-b-)
656 Hex ₂ Sia ₁	1.4 - 1.7	1.2 - 2.2	1.3 - 1.8
657 Hex ₂ Fuc ₂	3.4 - 4.6	0.4 - 1.2	3.2 - 5.4
730 Hex ₃ HexNAc ₁	9.1 - 10.7	17.9 - 20.5	7.7 - 13.9
876 Hex ₃ HexNAc ₁ Fuc ₁	22.0 - 24.5	20.9 - 25.4	20.9 - 25.4
1022 Hex ₃ HexNAc ₁ Fuc ₂	16.6 - 19.2	3.2 - 4.8	11.0 - 19.7
1095 Hex ₄ HexNAc ₂	3.0 - 3.6	2.4 - 4.5	3.0 - 5.3
1241 Hex ₄ HexNAc ₂ Fuc ₁	14.0 - 15.8	21.1 - 26.8	13.3 - 19.2
1387 Hex ₄ HexNAc ₂ Fuc ₂	16.3 - 18.1	20.3 - 23.8	16.2 - 19.2
1533 Hex ₄ HexNAc ₂ Fuc ₃	7.1 - 8.6	1.1 - 2.2	5.0 - 9.1

^a Observed Lewis blood group specific confidence interval values of normalized peak areas (normalized to sum) are given for each selected MS profile signal. Ninety five percent of the averaged datasets fit into the individual confidence interval.

Moreover, the significance levels of the variations observed between the averaged relative peak area values in Le(a-b+)-, Le(a+b-)- and Le(a-b-)- associated HMO spectra were calculated for each signal. Significant differences between Le(a-b+) and Le(a+b-) donors as well as Le(a+b-) and Le(a-b-) donors could be thus identified simply by profile mass measurement. As shown in Figure 4a, highly significant differences ($p=0.000$) in the relative peak areas of m/z 730, m/z 1022, m/z 1241 and m/z 1533 as well as significant differences ($p<0.05$) with regard to the remaining signals allowed an unambiguous discrimination between human milk samples of Le(a-b+) and Le(a+b-) donors. Likewise, significant differences ($p<0.05$) were also observed for HMOs from Le(a+b-) and Le(a-b-) donors. Hence, the described rapid profiling of these glycans by MALDI-TOF-MS allowed a reliable distinction between Le(a-b+)/Le(a-b-) and Le(a+b-) types of donors. A clear discrimination between Le(a-b+) and Le(a-b-) donors was not possible on the basis of these profile spectra.

Analysis of diagnostically relevant glycan species by tandem mass spectrometry

To verify the Lewis blood group assignments achieved by HMO profiling and to provide the possibility to

discriminate Le(a-b+) from Le(a-b-) donors, selected glycan species were further characterized by MALDI-TOF-MS/MS in the LID mode. As a minimum number of two fucose residues is required for a structure to generate fragment ions which are diagnostically relevant in this context, MS/MS spectra of Hex₂Fuc₂ (m/z 657 [M+Na]⁺) and Hex₃HexNAC₁Fuc₂ (m/z 1022 [M+Na]⁺) were recorded. Additional analysis of Hex₄HexNAC₂Fuc₃ species (m/z 1533 [M+Na]⁺) provided no further information as these glycans occurred only in low abundance in individual HMO samples. Due to technical limitations of the used Ultraflex I instrument, only mixed fragment ion spectra could be obtained from Hex₂Sia₁ (m/z 656 [M+Na]⁺) and Hex₂Fuc₂ (m/z 657 [M+Na]⁺) glycans (Fig. 5). HMO samples from the different donors yielded diagnostic fragment ions at m/z 314, m/z 365 and m/z 611 (cf. Table 3). In this context, the ion at m/z 314 was of particular relevance as it represents the B₁ fragment of sialyllactose (for designation of fragment ions see Table 3).

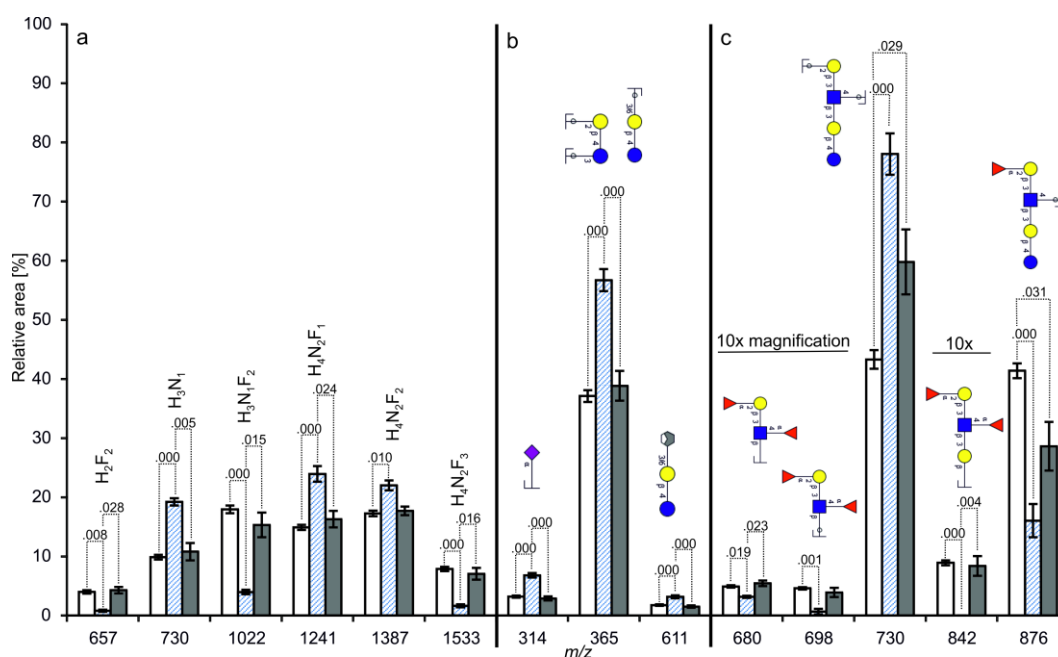


Fig. 4 Mean relative peak areas of selected ions obtained by MALDI-TOF-MS (a) as well as MALDI-TOF-MS/MS(LID) of m/z 656/657 (b) and m/z 1022 (c) of HMOs from 27 Le(a-b+), 6 Le(a-b-) and 7 Le(a-b-) donors. Signals were normalized to the sum of peak areas for each measurement. Bars indicate the standard error. Significance values are based on estimated marginal means. Significant differences are indicated by p-values for each tested pair. Tenfold magnification is indicated by horizontal lines. Only signal groups exhibiting at least one significant difference ($p < 0.05$) amongst each other are displayed. White columns represent Le(a-b+), striated columns Le(a-b-) and grey columns Le(a-b-) donors. Glycan fragments were assigned according to the recommendations of the Consortium of Functional Glycomics using the GlycoWorkbench software tool [46]. Partially shaded hexagonal rings denote cross-ring fragmentation. Yellow circle, galactose; blue circle, glucose; blue square, *N*-acetylglucosamine; red triangle, fucose; H, hexose; N, *N*-acetylhexosamine; F, deoxyhexose (fucose).

Its relative abundance varied significantly between Le(a-b-) and Le(a-b+)/Le(a-b-) donors (Fig. 4b). Main fragment ions were detected at m/z 365 for all donor types, corresponding to Y_2 cleavage of sialyllactose in the case of Le(a-b-) donors and/or a double cleavage of difucosyllactose ($Y_{1\beta}Y_{2\alpha}$) in the case of Le(a-b+) and Le(a-b-) donors. The lability of the sialic acid bond might be the reason for the high intensity of this signal in particular in MS/MS spectra of HMO samples from Le(a-b-) donors (cf. Figs. 4b and 5b). Furthermore, cross-ring cleavage of

sialyllactose led to a $^{1,3}X_2$ fragment at m/z 611 which is again most prevalent in MS/MS spectra of HMOs from Le(a-b-) individuals. Hence, the observed fragment ions reflected the characteristic fragmentation pattern of sialyllactose.

In contrast to HMO samples from Le(a-b+) and Le(a-b-) donors (Fig. 5a, c), MS/MS spectra of glycans from non-secretor Le(a-b-) individuals were devoid of fragment ions at m/z 511 (Fig. 5b), thus ruling out again the presence of a difucosyllactose (Hex_2Fuc_2) unit in these HMO preparations.

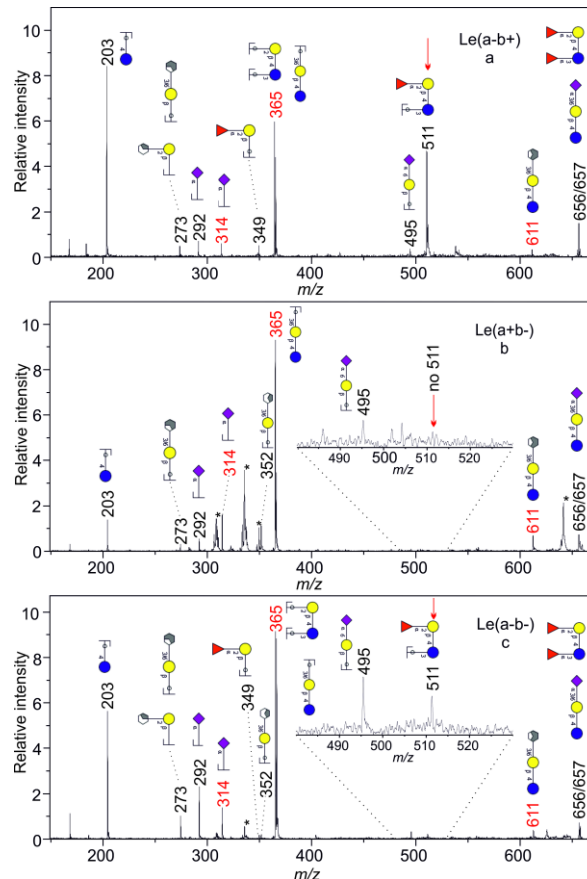



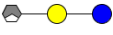


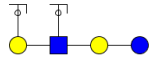
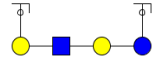
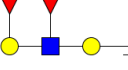
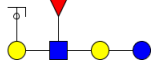
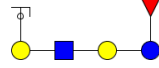


Fig. 5 Positive-ion MALDI-TOF-MS/MS(LID) spectra of Hex₂Sia (m/z 656) and/or Hex₂ Fuc₂ (m/z 657) species from Le(a-b+) (a), Le(a+b-) (b) and Le(a-b-) (c) donors. Signals referring to non-carbohydrate contaminants are marked by *asterisks*. The obtained fragments were assigned according to the recommendations of the Consortium of Functional Glycomics using the GlycoWorkbench software tool [46]. In some cases fragments may be formed by different fragmentation pathways, only one of which is illustrated. With the exception of the signal at m/z 292, representing a proton adduct, the shown fragment ions are sodium adducts. Partially shaded hexagonal rings denote cross-ring fragmentation. Statistically relevant fragment ions are highlighted in red. Red arrows mark visual differences between the spectra which, however, could not be used for statistical purposes due to the strong variation of the relative peak areas. Yellow circle, galactose; blue circle, glucose; red triangle, fucose; purple diamond, *N*-acetylneuraminic acid.

Although monofucosylated fragment ions at m/z 511 were usually detected with high or weak intensity in the MS/MS spectra of HMOs from secretor-type Le(a-b+) or Le(a-b-) donors, respectively, mathematically distinguishing significance values could not be calculated for the three Lewis blood groups due to the strong variation of the relative peak areas observed for different Le(a-b+) and Le(a-b-) samples. A high signal at m/z 511 in MS/MS analysis of

the precursor ions at m/z 656/657, however, could be usually rated as a strong indication ruling out a Le(a+b-) type of HMO profile (Fig. 5b). All remaining fragment ions were in agreement with the proposed glycan structures, but were of no diagnostic relevance. Hence, MS/MS analysis of m/z 656/657 precursor ions supports the discrimination between Le(a-b+)/Le(a-b-) vs. Le(a+b-) types of donors based on MALDI-TOF-MS profile

Table 3 Characteristic fragment ions identified by tandem mass spectrometry of Hex₂Fuc₂ (*m/z* 657) and Hex₃HexNAC₁Fuc₂ (*m/z* 1022) glycans.

Precursor ion <i>m/z</i> [M+Na] ⁺	Relevant fragment ions ^a <i>m/z</i> [M+Na] ⁺	Confidence interval (95%) for each Lewis blood group ^b				
		Le (a-b+)	Le (a+b-)	Le (a-b-)		
<i>m/z</i> 657	 B ₁ -Ion 314	2.85 -	6.01 -	2.15 -		
		3.55	7.62	3.63		
<i>m/z</i> 657	 Y ₂ -Ion 365		 Y _{1β} Y _{2α} -Ion 365	35.11 -	53.79 -	33.55 -
		39.13	60.65	44.15		
<i>m/z</i> 657	 ^{1,3} X ₂ 611	1.51 -	2.63 -	1.07 -		
		2.03	3.73	1.96		
<i>m/z</i> 1022	 B ₃ -Ion 680	0.45 -	0.28 -	0.45 -		
		0.53	0.36	0.64		
<i>m/z</i> 1022	 C ₃ -Ion 698	0.42 -	0 -	-		
		0.5	0.17			
<i>m/z</i> 1022	 Y _{3β} Y _{4α} -Ion 730		 Y _{1β} Y _{4α} -Ion 730	40.15 -	70.61 -	48.26 -
		46.46	85.46	71.33		
<i>m/z</i> 1022	 B ₄ -Ion 842	0.81 -	-	0.49 -		
		0.97		1.19		
<i>m/z</i> 1022	 Y _{4α} -Ion 876		 Y _{4α} -Ion 876	38.9 -	10.09 -	19.96 -
		43.9	21.9	37.31		

^a Fragment ions are assigned according to Domon and Costello [57] using GlycoWorkbench [46]. Yellow circle, galactose; blue circle, glucose; blue square, *N*-acetylglucosamine; red triangle, fucose.

^b Confidence interval for each fragment ion.

spectra, but still does not allow a clear distinction between Le(a-b+)- and Le(a-b-)-based HMO patterns.

Fragment ion spectra of Hex₃HexNAC₁Fuc₂ (m/z 1022 [M+Na]⁺) compositional species were similarly recorded by MALDI-TOF-MS/MS(LID) and revealed clear differences in accordance with the Lewis blood group of the donors. Theoretically, HMOs with such a monosaccharide composition may form six isomeric structures (isomers I-VI in Table 4), differing in linkage positions of fucosyl residues and the presence of type I (Galβ1-3GlcNAc) or type II (Galβ1-4GlcNAc) LacNAc units. Only isomers I, III and IV have been reported in the literature so far [54-56]. Whereas all of them might be synthesized by Le(a-b+) donors, only a selected set of isomers can be expected in the case of Le(a+b-) and Le(a-b-) donors. For the sake of completeness, however, all possible isomers were taken into account in this study.

The MS/MS spectra obtained for difucohexaoses from Le(a-b+) and/or Le(a-b-) donors (Fig. 6a, c), revealed a number of fucosylated fragment ions, including B₃, C₃ and B₄ ions at m/z 680, 698 and 842 (cf. Table 3), respectively, which clearly demonstrated the presence of a difucosylated LacNAc unit in agreement with isomers I and/or II (Table 4). Whereas the signal at m/z 842 was detectable in all MS/MS spectra of Hex₃HexNAC₁Fuc₂ species from Le(a-b+) donors, its intensity was subject to strong variations in the case of HMOs

from Le(a-b-) donors. Nevertheless, the appearance of these fragment ions was of statistical relevance allowing again a clear distinction between secretor and non-secretor donors (Fig. 4c).

Intriguingly, a statistically significant discrimination between Le(a-b+) and Le(a-b-) donors was feasible on the basis of the relative peak areas of the main fragment ions at m/z 730 (Y_{3β}Y_{4α} or Y_{1β}Y_{4α}) and m/z 876 (Y_{4α}). Whereas the relative peak area of the signal at m/z 730 was significantly lower in fragment ion spectra of Hex₃HexNAC₁Fuc₂ species from Le(a-b+) donors compared to Le(a-b-) donors (cf. Figs. 4b and Fig. 6a, c), the opposite was true for the fragment ion at m/z 876.

Remaining fragment ions were in agreement with the corresponding precursor structures given in Table 4, but did not disclose significant differences. The reason for this observation might reside in the low intensity of the respective signal intensities which were often close to the detection threshold. Nonetheless, visual inspection of the obtained spectra, taking into account also these low abundant signals, gave further hints with regard to blood group identification. For instance, MS/MS spectra of Hex₃HexNAC₁Fuc₂ species from Le(a+b-) donors (Fig. 6b) displayed solely monofucosylated fragment ions, verifying the presence of both fucosylated HexNAc (m/z 390) and lactose units (m/z 511) in agreement with isomers III and/or IV (Table 4).

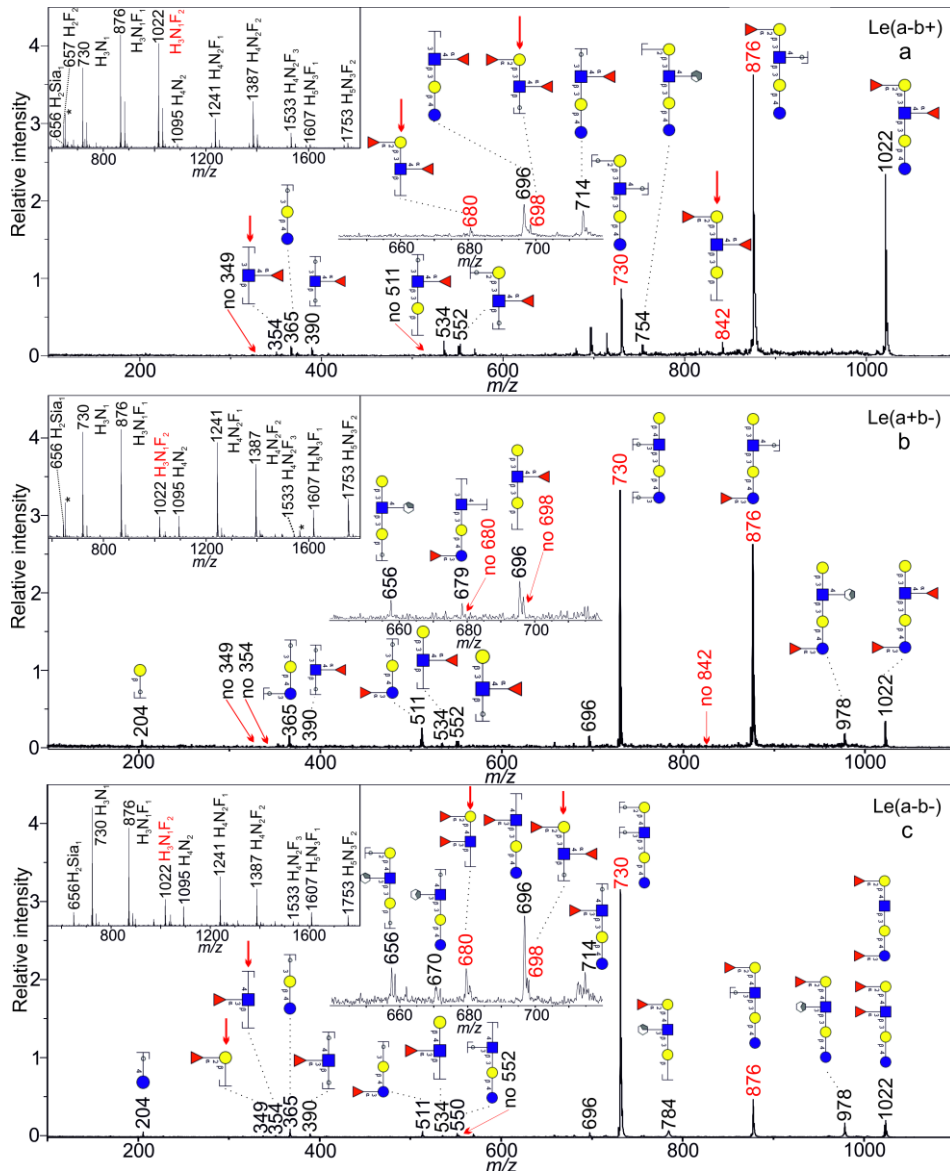


Fig. 6 Positive-ion MALDI-TOF-MS/MS(LID) spectra of Hex₃HexNAc₁Fuc₂ species (m/z 1022) recorded by MALDI-TOF-MS analysis (insets) in HMO samples from Le(a-b+) (a), Le(a+b-) (b) and Le(a-b-) (c) donors. Signals referring to non-carbohydrate contaminants are marked by asterisks. The obtained fragment ions were assigned according to the recommendations of the Consortium of Functional Glycomics using GlycoWorkbench [46]. In some cases fragments may be formed by different fragmentation pathways, only one of which is illustrated. All fragment ions represent sodium adducts. Partially shaded hexagonal rings denote cross-ring fragmentation. Statistically relevant fragment ions are highlighted in red. Red arrows mark visual differences between the spectra. Yellow circle, galactose; blue circle, glucose; blue square, *N*-acetylglucosamine; red triangle, fucose.

In this context, it is interesting to note that the fragment ion at m/z 511 is absent in the corresponding MS/MS spectra obtained in the case of Le(a-b+) donors (Fig. 6a). Moreover, Hex₃HexNAc₁Fuc₂ species from Le(a-b-) donors (Fig. 6c) yielded apart from the significant

fragment ions of a difucosylated LacNAc unit (m/z 680 and m/z 698) also ions demonstrating the presence of fucosylated internal HexNAc (m/z 354 and 390), a fucosylated Hex unit (m/z 349) as well as a fucosylated lactose moiety (m/z 511).

Table 4 Possible isomeric structures of difucosylated variants of lacto-*N*-tetraose and lacto-*N*-neotetraose

Isomer	Structure ^a	Reference	Compatible Lewis blood group ^b		
I		[55]	Le(a-b+)	–	–
II		-	Le(a-b+)	–	Le(a-b-)
III		[56]	Le(a-b+)	Le(a+b-)	–
IV		[54]	Le(a-b+)	Le(a+b-)	Le(a-b-)
V		-	Le(a-b+)	–	Le(a-b-)
VI		-	Le(a-b+)	–	Le(a-b-)

^a Expressed glycan structures are shown using GlycoWorkbench [46]. Yellow circle, galactose; blue circle, glucose; blue square, *N*-acetylglucosamine; red triangle, fucose.

^b The compatibility of each isoform with Lewis blood groups is indicated.

Hence, our data demonstrated for the first time the expression of difucohexaose isomer II (Table 4) in milk of Le(a-b-) mothers in addition to structural isomers in which Fuc is linked to the Glc residue of the lactose unit. The latter glycans might, therefore, represent isomers V and/or VI. Depending on their provenance, each group of difucohexaoses exhibited a different

pattern of diagnostically relevant fragment ions, allowing a discrimination between the different types of glycans and, hence, an identification of the respective Lewis blood group of the donors.

Statistical classification

The performed discriminant analysis provided probability values which show if

a milk sample matches to a defined Lewis blood group. According to the three given group variables Le(a-b+), Le(a+b-) and Le(a-b-), the discriminant analysis provided two discriminant functions, which described how it was possible to separate the sample set into three groups. Function 1 contributed a large amount to clarification with a variance of 88.6%, as compared to function 2 (11.4%). The values of canonical correlation (concerning Wilks' Lambda) amounted to 0.920 (very high) for function 1 and 0.645 (high) for function 2. With p-values of 0.000 both correlation coefficients were highly significant, thus allowing a classification of the data into three different groups.

Figure 7 visualizes the results of the discriminant analysis. Overall, 93.8% of all measurements could be accurately

assigned, implying that only seven out of 113 single measurements could not be matched correctly. The delimitation of the measurements of Lewis blood group Le(a+b-) samples depicted in red showed a 100% matching of this group. Likewise, the matching of milk samples of Lewis blood group Le(a-b+) depicted in blue was satisfactory as 76 out of 77 measurements (98.7%) could be allocated properly. In the case of Lewis blood group Le(a-b-) samples depicted in green, however, only 13 (68.4%) out of 19 measurements were matched correctly. In particular a discrimination between Le(a-b-) and Le(a-b+) samples was not possible in each case. Therefore, each individual milk sample was worked-up three times in parallel.

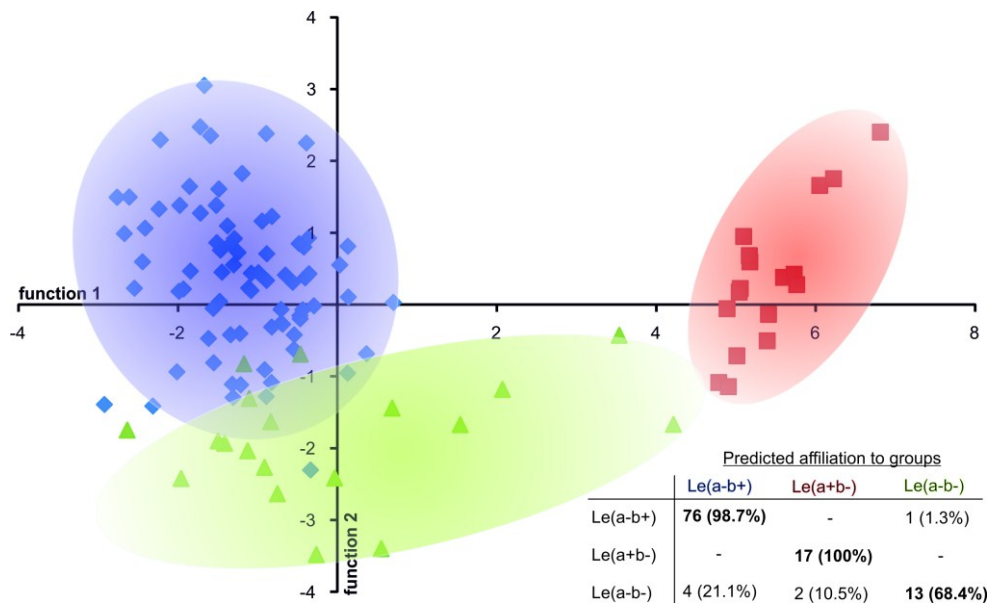


Fig. 7 Discriminant analysis. The results obtained for 113 single MALDI-TOF-MS and MALDI-TOF-MS/MS measurements were subjected to discriminant analysis. Discriminant function 1 is plotted on the x-axis, discriminant function 2 on the y-axis. Blue diamonds, red squares and green triangles represent HMO samples from Le(a-b+), Le(a+b-) and Le(a-b-) donors, respectively. The distribution of each group is indicated by colored clouds. *Inset:* Matrix indicating fitting and mismatching values for each Lewis blood group.

Based on these results, 29 out of 40 milk samples (72.5%) could be assigned to the correct Lewis blood group by all three measurements. In addition, nine samples (22.5%) allowed a correct matching to the corresponding Lewis blood group on the basis of two of the three measurements. Only for three of the latter samples one measurement was actually mismatched, whereas the set of data on the remaining six milk samples included one missing outlier, meaning that they could be determined only by two measurements. In summary, 38 of the 40 milk samples (95%) could be assigned correctly by at least two of three measurements, whereas one milk sample (2.5%) was defined just by one of three measurements. Only one milk sample (2.5%) could not be assigned because of one measurement as missing outlier and two incorrectly matched measurements.

Hence, using all relevant information given by the threefold MS and MS/MS analyses of a milk sample, an impartial assignment to the corresponding Lewis blood group was feasible in nearly all cases. Furthermore, no difference between colostrum milk samples and mature milk samples could be identified which could have led to mismatches with regard to this statistical evaluation. As shown in Table 2 and Fig. 4a, however, MALDI-TOF-MS profile spectra alone do not allow a discrimination between Le(a-b-) and Le(a-b+) samples. For that reason, all MS and MS/MS data of each sample are implemented in the

discriminant analysis. Especially the results of tandem mass spectrometry are responsible for a clear distinction between these two types of HMO populations (see, for example, signals at m/z 730 and 876 in Fig. 4c).

By the same line of evidence HMO patterns expressed by donors with the rare Le(a-b-c-d-) blood group status (Table I) should be easily detectable due to reduced expression of fucosylated glycan species [38].

Conclusions

Starting from small amounts of human milk, the described mass spectrometric approach allowed in a rapid high-throughput manner a detailed characterization of the HMO patterns of human milk samples and their simultaneous assignment to a defined Lewis blood group status. Moreover, the relative expression and ratios of individual glycan compositions can be directly assessed for each sample separately which might provide useful information when data on the biological activities of HMOs from donors with the same Lewis status are compared. Intriguingly, these analyses can be performed using solely a conventional MALDI-TOF-MS instrument. Statistical analyses further revealed that separation of individual oligosaccharide isomers is not required for the correlation of HMO patterns to the respective Lewis blood group. In order to achieve maximum standardization, an automated sample work-up procedure could be implemented

in the outlined protocol which is less time-consuming than conventional methods and permits a highly reproducible analysis of the milk samples. Hence, the established protocol enables a facile HMO screening of milk samples from milk banks, thus providing the basis for quality control of individual samples, the preparation of standardized human milk products with defined HMO patterns and also a retrospective assignment of biomedical activities of the HMOs from specific milk samples to a defined Lewis blood group status. The latter aspect may be of key importance, as the average degree in fucosylation of the individual glycans differs strongly in dependence on the Lewis blood group of the mother, which is also evidenced in this study by monosaccharide constituent analysis. As only small proportions of the obtained HMOs are needed for the screening process, the majority of the sample can be used for additional analyses including further structural investigations.

Acknowledgements

We thank Professor G. Bein and Professor H. Jomaa (Institute of Immunology and Transfusion Medicine, University Hospital Giessen-Marburg, Germany) for performing the Lewis blood group determination of blood samples as well as Dr. P. Gilbert (St. Josef's Hospital Giessen) for the collection of milk and blood samples.

References

1. Schack-Nielsen L, Michaelsen KF (2007) Advances in our understanding of the biology of human milk and its effects on the offspring. *J Nutr* 137:503S–510S
2. Kunz C, Rudloff S, Baier W, Klein N, Strobel S (2000) Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annu Rev Nutr* 20:699–722
3. Montreuil J, Mullet S (1960) Etude des variations des constituents glucidiques du lait de femme au cours de la lactation. *Bull Soc Chim Biol* 42:365–377
4. Newburg DS, Ruiz-Palacios GM, Altaye M, Chaturvedi P, Meinzen-Derr J, Guerrero Mde L, Morrow AL (2004) Innate protection conferred by fucosylated oligosaccharides of human milk against diarrhea in breastfed infants. *Glycobiology* 14:253–263
5. Sharon N, Ofek I (2000) Safe as mother's milk: carbohydrates as future anti-adhesion drugs for bacterial diseases. *Glycoconj J* 17:659–664
6. Angeloni S, Ridet JL, Kusy N, Gao H, Crevoisier F, Guincharde S, Kochhar S, Sigrist H, Sprenger N (2005) Glycoprofiling with microarrays of glycoconjugates and lectins. *Glycobiology* 15:31–41
7. Bode L (2009) Human milk oligosaccharides: prebiotics and beyond. *Nutr Rev* 67:S183–S191
8. Donovan SM (2009) Human milk oligosaccharides—the plot thickens. *Br J Nutr* 101:1267–1269
9. Kuntz S, Kunz C, Rudloff S (2009) Oligosaccharides from human milk induce growth arrest via G2/M by influencing growth-related cell cycle genes in intestinal epithelial cells. *Br J Nutr* 101:1306–1315
10. Fuhrer A, Sprenger N, Kurakevich E, Borsig L, Chassard C, Hennet T (2010) Milk sialyllactose influences colitis in mice through selective intestinal bacterial colonization. *J Exp Med* 207:2843–2854
11. Gyorgy P, Norris RF, Rose CS (1954) Bifidus factor. I. A variant of *Lactobacillus bifidus* requiring a special growth factor. *Arch Biochem Biophys* 48:193–201
12. Sela DA, Mills DA (2010) Nursing our microbiota: molecular linkages between bifidobacteria and milk oligosaccharides. *Trends Microbiol* 18:298–307
13. Ruiz-Palacios GM, Cervantes LE, Ramos P, Chavez-Munguia B, Newburg DS (2003) *Campylobacter jejuni* binds intestinal H(O) antigen (Fuc α 1, 2Gal β 1, 4GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. *J Biol Chem* 278:14112–14120
14. Falk PG, Bry L, Holgersson J, Gordon JI (1995) Expression of a human alpha-1,3/4-fucosyltransferase in the pit cell lineage of FVB/N mouse stomach results in production of Leb-containing glycoconjugates: a potential transgenic mouse model for studying *Helicobacter pylori* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1515–1519
15. Rudloff S, Pohlentz G, Diekmann L, Egge H, Kunz C (1996) Urinary excretion of lactose and oligosaccharides in preterm infants fed human milk or infant formula. *Acta Paediatr* 85:598–603
16. Bode L, Kunz C, Muhly-Reinholz M, Mayer K, Seeger W, Rudloff S (2004) Inhibition of monocyte, lymphocyte, and neutrophil adhesion to endothelial cells by human milk oligosaccharides. *Thromb Haemost* 92:1402–1410
17. Kobata A (2010) Structures and application of oligosaccharides in human milk. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 86:731–747
18. Urashima T, Fukuda K, Kitaoka M, Ohnishi M, Terabayashi T, Kobata A (2011) Milk Oligosaccharides. Noca Science Publishers, Inc., New York
19. Stahl B, Thurl S, Zeng J, Karas M, Hillenkamp F, Steup M, Sawatzki G (1994) Oligosaccharides from human milk as revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Biochem* 223:218–226
20. Wu S, Grimm R, German JB, Lebrilla CB (2010) Annotation and Structural Analysis of Sialylated Human Milk Oligosaccharides. *J Proteome Res* 10:856–868
21. Wu S, Tao N, German JB, Grimm R, Lebrilla CB (2010) The development of an annotated library of neutral human milk oligosaccharides. *J Proteome Res* 8:4138–4151
22. Grollman EF, Ginsburg V (1967) Correlation between secretor status and the occurrence of 2'-fucosyllactose in human milk. *Biochem Biophys Res Commun* 28:50–53
23. Grollman EF, Kobata A, Ginsburg V (1969) An enzymatic basis for Lewis blood types in man. *J Clin Invest* 48:1489–1494
24. Grollman EF, Kobata A, Ginsburg V (1970) Enzymatic basis of blood types in man. *Ann N Y Acad Sci* 169:153–160
25. Kobata A, Ginsburg V (1969) Oligosaccharides of human milk. II. Isolation and characterization of a new pentasaccharide, lacto-N-fucopentaose 3. *J Biol Chem* 244:5496–5502
26. Kobata A, Ginsburg V, Tsuda M (1969) Oligosaccharides of human milk. I. Isolation and characterization. *Arch Biochem Biophys* 130:509–513
27. Egge H (1993) The diversity of oligosaccharides in human milk. In: Renner B, Sawatzki G (eds) *New perspectives in infant nutrition*. Thieme, New York, pp 12–26
28. Kobata A (1977) Milk glycoproteins and oligosaccharides. In: Horowitz M, Pigman W

- (eds) The glycoconjugates. Academic, New York, pp 423–440
29. Le Pendu J (2004) Histo-blood group antigen and human milk oligosaccharides: genetic polymorphism and risk of infectious diseases. *Adv Exp Med Biol* 554:135–143
 30. Almeida R, Amado M, David L, Levery SB, Holmes EH, Merckx G, van Kessel AG, Rygaard E, Hassan H, Bennett E, Clausen H (1997) A family of human β -galactosyltransferases. Cloning and expression of two novel UDP-galactose: β -*N*-acetylglucosamine β 1,4-galactosyltransferases, β 4Gal-T2 and β 4Gal-T3. *J Biol Chem* 272:31979–31991
 31. Isshiki S, Togayachi A, Kudo T, Nishihara S, Watanabe M, Kubota T, Kitajima M, Shiraishi N, Sasaki K, Andoh T, Narimatsu H (1999) Cloning, expression, and characterization of a novel UDPgalactose: β -*N*-acetylglucosamine β 1,3-galactosyltransferase (β 3Gal-T5) responsible for synthesis of type 1 chain in colorectal and pancreatic epithelia and tumor cells derived therefrom. *J Biol Chem* 274:12499–12507
 32. Sasaki K, Kurata-Miura K, Ujita M, Angata K, Nakagawa S, Sekine S, Nishi T, Fukuda M (1997) Expression cloning of cDNA encoding a human β -1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase that is essential for poly-*N*-acetylglucosamine synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14294–14299
 33. Ma B, Simala-Grant JL, Taylor DE (2006) Fucosylation in prokaryotes and eukaryotes. *Glycobiology* 16:158R–184R
 34. Erney R, Hilty M, Pickering L, Ruiz-Palacios G, Prieto P (2001) Human milk oligosaccharides. A novel method provides insight into human genetics. *Adv Exp Med Biol* 501:285–297
 35. Johnson PH, Watkins WM (1992) Purification of the Lewis bloodgroup gene associated alpha-3/4-fucosyltransferase from human milk: an enzyme transferring fucose primarily to type 1 and lactose-based oligosaccharide chains. *Glycoconj J* 9:241–249
 36. Kobata A (2000) A journey to the world of glycobiology. *Glycoconj J* 17:443–464
 37. Oriol R, Le Pendu J, Mollicone R (1986) Genetics of ABO, H, Lewis, X and related antigens. *Vox Sang* 51:161–171
 38. Thurl S, Henker J, Siegel M, Tovar K, Sawatzki G (1997) Detection of four human milk groups with respect to Lewis blood group dependent oligosaccharides. *Glycoconj J* 14:795–799
 39. Viverge D, Grimmonprez L, Cassanas G, Bardet L, Solere M (1990) Discriminant carbohydrate components of human milk according to donor secretor types. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 11:365–370
 40. Kunz C, Bode L, Rudloff S (2003) Genetic variability of human milk oligosaccharides: are there biologic consequences? In: Bachmann C, Koletzko B (eds) Genetic expression and nutrition. Nestle Nutrition Workshop Series, Pediatric Program, Nestec Ltd, Vevey/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 137–152
 41. Thurl S, Munzert M, Henker J, Boehm G, Müller-Werner B, Jelinek J, Stahl B (2010) Variation of human milk oligosaccharides in relation to milk groups and lactational periods. *Br J Nutr* 104:1261–1271
 42. Morrow AL, Meinzen-Derr J, Huang P, Schibler KR, Cahill T, Keddache M, Kallapur SG, Newburg DS, Tabangin M, Warner BB, Jiang X, (2011) Fucosyltransferase 2 Non-Secretor and Low Secretor Status Predicts Severe Outcomes in Premature Infants. *J Pediatr* 158:745–751
 43. Albrecht S, Schols HA, van den Heuvel EG, Voragen AG, Gruppen H (2009) CE-LIF-MSⁿ profiling of oligosaccharides in human milk and feces of breast-fed babies. *Electrophoresis* 31:1264–1273
 44. Ninonuevo MR, Park Y, Yin H, Zhang J, Ward RE, Clowers BH, German JB, Freeman SL, Killeen K, Grimm R, Lebrilla CB (2006) A strategy for annotating the human milk glycome. *J Agric Food Chem* 54:7471–7480
 45. Maass K, Ranzinger R, Geyer H, Von der Lieth CW, Geyer R (2007) "Glyco-Peakfinder"—de novo composition analysis of glycoconjugates. *Proteomics* 7:4435–4444
 46. Ceroni A, Maass K, Geyer H, Geyer R, Dell A, Haslam SM (2008) GlycoWorkbench: a tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans. *J Proteome Res* 7:1650–1659
 47. von der Lieth CW, Freire AA, Blank D, Campbell MP, Ceroni A, Damerell DR, Dell A, Dwek RA, Ernst B, Fogh R, Frank M, Geyer H, Geyer R, Harrison MJ, Henrick K, Herget S, Hull WE, Ionides J, Joshi HJ, Kamerling JP, LeeFlang BR, Lütteke T, Lundborg M, Maass K, Merry A, Ranzinger R, Rosen J, Royle L, Rudd PM, Schloissnig S, Stenutz R, Vranken WF, Widmalm G, Haslam SM (2011) EUROCarbDB: an open-access platform for glycoinformatics. *Glycobiology* 21:493–502
 48. Anumula KR (1994) Quantitative determination of monosaccharides in glycoproteins by high-performance liquid chromatography with highly sensitive fluorescence detection. *Anal Biochem* 220:275–283
 49. Wuhler M, Dennis RD, Doenhoff MJ, Bickle Q, Lochnit G, Geyer R (1999) Immunochemical characterisation of *Schistosoma mansoni* glycolipid antigens. *Mol Biochem Parasitol* 103:155–169
 50. Galuska SP, Geyer H, Bleckmann C, Röhrich RC, Maass K, Bergfeld AK, Mühlenhoff M, Geyer R (2010) Mass spectrometric

- fragmentation analysis of oligosialic and polysialic acids. *Anal Chem* 82:2059–2066
51. Hara S, Takemori Y, Yamaguchi M, Nakamura M, Ohkura Y (1987) Fluorometric high-performance liquid chromatography of *N*-acetyl- and *N*-glycolylneuraminic acids and its application to their microdetermination in human and animal sera, glycoproteins, and glycolipids. *Anal Biochem* 164:138–145
 52. Tao N, Wu S, Kim J, An HJ, Hinde K, Power ML, Gagneux P, German JB, Lebrilla CB (2011) Evolutionary glycomics: characterization of milk oligosaccharides in primates. *J Proteome Res* 10:1548–1557
 53. Kunz C, Rudloff S, Schad W, Braun D (1999) Lactose-derived oligosaccharides in the milk of elephants: comparison with human milk. *Br J Nutr* 82:391–399
 54. Donald AS, Feeney J (1988) Separation of human milk oligosaccharides by recycling chromatography. First isolation of lacto-*N*-neo-difucohexaose II and 3'-galactosyllactose from this source. *Carbohydr Res* 178:79–91
 55. Kuhn R, Gauhe A (1958) Über die lacto-difuco-tetraose der Frauenmilch. *Justus Liebigs Ann Chem* 611:249–253
 56. Kuhn R, Gauhe A (1960) Über ein kristallisiertes, Le^a-aktives Hexasaccharid aus Frauenmilch. *Chem Ber* 93:647–651
 57. Domon B, Costello CE (1988) A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate J* 5:397–40

Electronic supplementary material**Materials and methods**

SPSS syntax for Gaussian distribution, descriptive statistics, mixed models and discriminant analysis. Variable "blood_group" means Le(a-b+), Le(a+b-) and Le(a-b-). The subject "samplenummer" describes the different number for each threefold measured milk sample.

Test of Gaussian distribution

```
EXAMINE VARIABLES=p_656 p_657 p_730 p_876 p_1022 p_1095 p_1241
p_1387 p_1533 LID_1_203 LID_1_273 LID_1_292 LID_1_314 LID_1_365
LID_1_511 LID_1_611 LID_1_657 LID_2_552 LID_2_680 LID_2_696
LID_2_698 LID_2_730 LID_2_842 LID_2_876 LID_2_1022
/PLOT BOXPLOT HISTOGRAM NPLOT
/COMPARE GROUPS
/STATISTICS DESCRIPTIVES
/CINTERVAL 95
/MISSING LISTWISE
/NOTOTAL.
```

Descriptive statistics

```
ONEWAY p_656 p_657 p_730 p_876 p_1022 p_1095 p_1241 p_1387 p_1533
BY blood_group
/STATISTICS DESCRIPTIVES
/PLOT MEANS
/MISSING ANALYSIS.
```

Mixed Models

```
MIXED p_656 BY blood_group
/CRITERIA=CIN(95) MXITER(100) MXSTEP(10) SCORING(1)
SINGULAR(0.000000000001) HCONVERGE(0, ABSOLUTE) LCONVERGE(0,
ABSOLUTE) PCONVERGE(0.000001, ABSOLUTE)
/FIXED=blood_group | SSTYPE(3)
/METHOD=REML
/PRINT=DESCRIPTIVES
/RANDOM=INTERCEPT | SUBJECT(samplenummer) COVTYPE(VC)
/EMMEANS=TABLES(blood_group) COMPARE ADJ(SIDAK).
```

Discriminant analysis

DISCRIMINANT

```
/GROUPS=blood_group(1 3)
/VARIABLES=p_656 p_657 p_730 p_876 p_1022 p_1095 p_1241 p_1387
p_1533 LID_1_203 LID_1_273 LID_1_292 LID_1_314 LID_1_365 LID_1_511
LID_1_611 LID_1_657 LID_2_552 LID_2_680 LID_2_696 LID_2_698
LID_2_730 LID_2_842 LID_2_876 LID_2_1022
/ANALYSIS ALL
/SAVE=CLASS SCORES PROBS
/PRIORS SIZE
/STATISTICS=MEAN STDDEV RAW CORR TABLE
/PLOT=COMBINED SEPARATE
/PLOT=CASES
/CLASSIFY=NONMISSING POOLED.
```

Supplementary figures

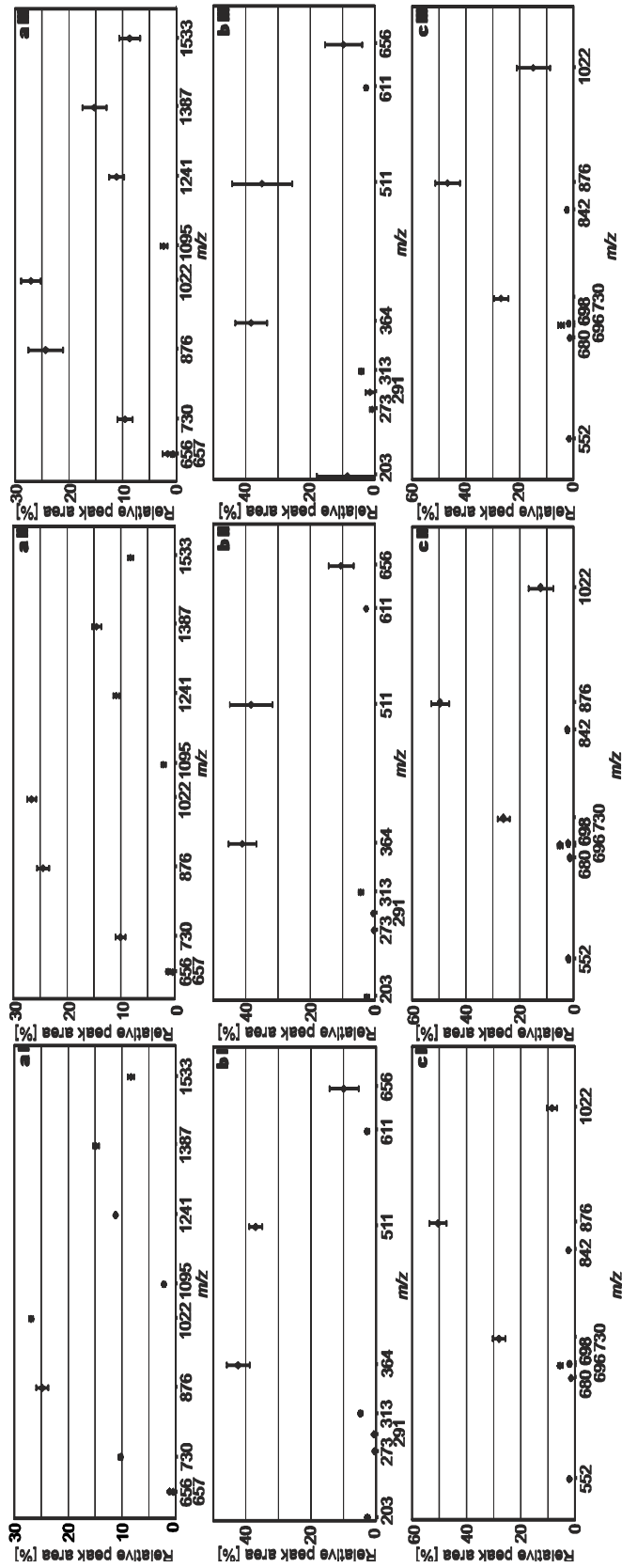


Figure S1 Reproducibility of the established automated sample work-up protocol. An individual milk sample of one Le(a-b+) donor was worked-up in automated fashion ten times in parallel for method validation. Each HMO preparation obtained was automatically deposited three times on the MALDI-target and each sample spot was analyzed three times by MALDI-TOF-MS resulting in 90 individual profile spectra. Likewise, MALDI-TOF-MS/MS(LID) spectra were recorded for the signals at m/z 656/657 and m/z 1022 yielding again 90 MS/MS spectra in each case. Averaged relative peak areas were calculated for each signal on the basis of the total peak areas of selected quasimolecular or fragment ions. Values obtained by threefold measurement of the same sample spot are given in diagrams aI (profile spectra), bI (fragment ions of m/z 656/657) and cI (fragment ions of m/z 1022). Data obtained after threefold spotting, i.e., ninefold measurement of the same HMO preparation are shown in diagrams aII, bII and cII, whereas data obtained for all 90 individual mass measurements are summarized in diagrams aIII, bIII and cIII. All error bars show the standard deviation of displayed values.

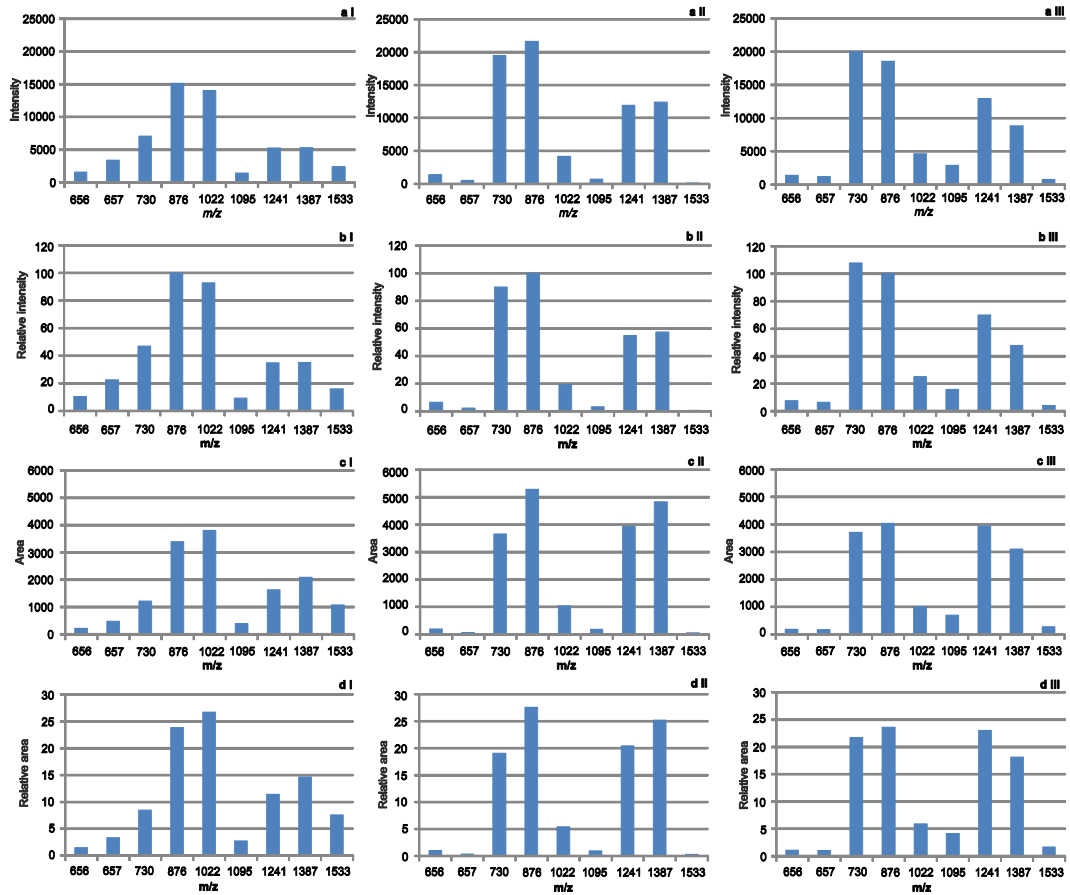


Figure S2 Comparison of different modes of interpretation of MALDI-TOF-MS profile spectra. Profile spectra obtained for HMO samples from Le(a-b+) (diagrams **aI-dI**), Le(a-b-) (diagrams **aII-dII**) and Le(a-b+) (diagrams **aIII-dIII**) blood group donors were evaluated on the basis of the measured signal intensities (**aI-aIII**), relative intensities based on the signal at m/z 876 set to 100% (**bI-bIII**), peak areas (**cI-cIII**) or relative peak areas of the selected signals based on the sum of peak areas of all selected ions (**dI-dIII**). Only the latter mode of data evaluation mirrors adequately the relative abundance of the individual HMO compositional species.

Ergänzende Untersuchungen zu Kapitel 2

Neben den in der Publikation „*High-throughput mass finger printing and Lewis blood group assignment of human milk oligosaccharides*“ [Blank *et al.* 2011] beschriebenen Ergebnissen, wurden weitere Versuche zur Optimierung der Methode unternommen. Ein besonderer Fokus wurde hierbei auf die Vereinfachung und Verbesserung der Reproduzierbarkeit gelegt.

1 Optimierung der Aufarbeitungsbedingungen

Um bestmögliche Spektren aus möglichst geringen Probenmengen zu generieren, wurden die Aufarbeitungsbedingungen für HMO-Proben variiert und optimiert.

Zur Entfettung der Proben wurden zwei Methoden miteinander verglichen; (i) Zentrifugation bei 14000 g; (ii) Extraktion mit Hexan. Die mittels Hexanextraktion entfetteten Proben zeigten kaum messbare Signale nach PGC-Aufarbeitung. Für die Trennung der Lipide von der wässrigen Phase eignete sich die besonders einfach durchzuführende Zentrifugation bei Raumtemperatur (RT) bei 14000 g. Ein Abkühlen der Proben vor und während der Zentrifugation führte zu einer schlechteren Phasentrennung und wurde daher nicht in die publizierte Routine einbezogen.

Um mögliche störende Proteine in den HMO-Proben abzureichern, wurde die wässrige Phase einer Probe nach der Zentrifugation auf eine C18-Kartusche (Cromabond, 1 mL, 50 mg, Macherey-Nagel, Düren, Germany) gegeben und mit 1 mL Wasser nachgewaschen. Der Durchlauf wurde direkt aufgefangen, getrocknet und auf eine PGC-Kartusche aufgegeben. Ein Vergleich der Spektren mit (Abbildung 4 A) und ohne C18-Aufreinigung (Abbildung 4 B) zeigt deutliche Unterschiede in den detektierbaren HMO-Signalen. Das stärkste, als Verunreinigung gekennzeichnete Signal m/z 1372.8 in Spektrum B liegt nach C18-Aufreinigung in einem Cluster von Verunreinigungssignalen, welches sich allerdings nicht mehr als störend erwies. Besonders der hochmolekulare Bereich zeigte nach C18-Aufreinigung deutlich detektierbare Signale bis zu m/z 2994.6 ($H_8N_6F_3$).

Diese Daten zeigten, dass die Proteinmenge, welche in einer aufgearbeiteten Probe enthalten war, einen Einfluss auf die Spektrenqualität hat. Um diese zu reduzieren ohne eine weitere Festphasenextraktion in die Aufarbeitungsroutine zu etablieren, wurde das für *N*-Glykane optimierte Protokoll der PGC-Aufarbeitung auf HMOs angepasst.

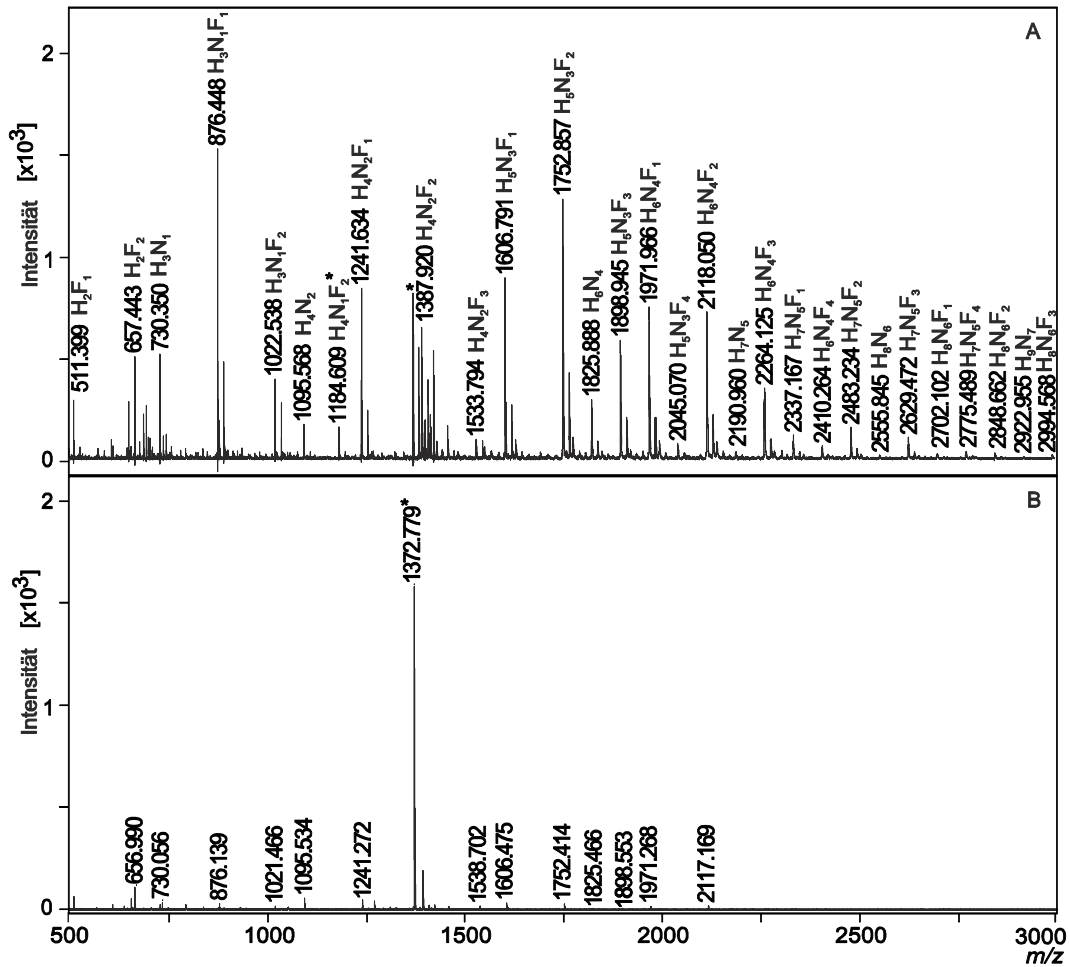


Abbildung 4 MALDI-MS Analyse von HMO-Proben nach kombinierter Aufarbeitung (C18 + PGC). Spektrum A zeigt das resultierende HMO Profilspektrum einer Probe mit unbekanntem Lewis Blutgruppenstatus nach kombinierter C18- und PGC-Aufarbeitung. Spektrum B zeigt die gleiche Probe nach konventioneller Aufarbeitung. H, Hexose; N, *N*-Acetylhexosamin; F, Desoxyhexose (Fucose); Signale, denen keine HMO-typische Monosaccharid-Zusammensetzung zugeordnet werden konnte, sind mit einem Stern markiert.

Hierzu wurde eine fraktionierte Elution durchgeführt (ACN/Wasser; 0/100 (v/v), 20/80 (v/v), 40/60 (v/v), 80/20 (v/v)) und die Kohlenhydratmengen der resultierenden Spektren der einzelnen Fraktionen miteinander verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Fraktion 0/100 keine detektierbare Glykanmenge enthielt, Fraktion 20/80 sowie 40/60 beinhalteten die erwarteten HMOs. Um eine Co-Elution der ebenfalls gebundenen Proteine zu vermeiden, wurde von einer Erhöhung des ACN Gehaltes über 40% abgesehen. Eine nahezu quantitative Elution konnte mit einer zweimaligen Elution mit 40% ACN erreicht werden. So konnte bei gleichbleibender Spektrenqualität auf die vorherige C18-Aufreinigung verzichtet werden.

Eine, an die Aufarbeitung anschließende, Fluoreszenzmarkierung mit 2-Aminobenzamid (2AB) zeigte die entsprechend markierten Produkte, führte allerdings zu keiner Verbesserung der Signalintensität und Spektrenqualität sowohl im Profile- als auch im

laser-induced dissociation- (LID)-Mode. Für die oben beschriebene *high-throughput* Routine wurde deshalb kein Fluoreszenzlabel verwendet.

2 Bestimmung des optimalen Probenvolumens

Um das ideale Probenvolumen zur Aufarbeitung der HMOs zu bestimmen, wurden verschiedene Volumina parallel aufgearbeitet und die resultierenden Spektren miteinander verglichen. Das Milchprobenvolumen wurde schrittweise von 200 auf 25 μL herabgesetzt. Die Proben von 50 sowie 25 μL Milch wurden mit Wasser auf 200 μL aufgefüllt. Als Probe wurde eine serologisch als Le(a-b+) typisierte Probe verwendet (vgl. Abbildung 5).

Alle aufgenommenen Spektren zeigten sehr wenig detektierbare Verunreinigungen. Optisch unterschied sich die Kristallisationen der Proben mit der ATT Matrix auf dem MALDI Target jedoch stark. Die Proben, in welchen 50 bzw. 25 μL Milch aufgearbeitet wurden, zeigten eine sehr homogene Kristallisation, wohingegen die von 100 bzw. 200 μL Milch ausgehenden Proben eher glasartige Spots ausbildeten. Abbildung 5 zeigt die fünf resultierenden Spektren der Einzelaufarbeitung. Die Spektren A-C zeigen die aus der Aufarbeitung unverdünnter Milchproben (200, 100 bzw. 50 μL Milch) resultierenden Spektren. Die Proben der Spektren D und E (50 bzw. 25 μL Milch) wurden mit Wasser auf 200 μL Gesamtvolumen aufgefüllt.

Deutliche Unterschiede ergaben sich in den Signalintensitäten, wobei die intensivsten Signale in Spektrum D messbar waren. Auffällig ist das Fehlen der Signalgruppe m/z 656/657 in den Spektren A-C, das Fehlen des Signals m/z 1533 in den Spektren A und B sowie das Fehlen des Signals m/z 1022 im Spektrum A. Der Vergleich von Spektrum D mit E zeigt eine Reduktion der Signalintensität oberhalb m/z 1022 in Spektrum E.

LID-Messungen der Massen m/z 656/657 sowie 1022 zeigten aufgrund der stärkeren Signalintensität der Precursor die deutlichsten Spektren für Aufarbeitung D.

Neben der Verbesserung der Spektrenqualität erwiesen sich die mit Wasser aufgefüllten Proben als deutlich leichter handhabbar. Besonders die Abnahme der wässrigen Phase nach der Zentrifugation wurde so erleichtert. Das Probenvolumen von 50 μL Milch aufgefüllt auf 200 μL erwies sich in diesem Test als ideal und wurde für die Etablierung der automatischen Aufarbeitung verwendet. Aus technischen Gründen wurde diese Methode etwas angepasst, sodass die automatisch gemessenen Proben jeweils auf 500 μL aufgefüllt wurden, von welchen 300 μL der wässrigen Phase entnommen werden konnten. Von diesen 300 μL pipettierte der Labor-Roboter ein Volumen von 200 μL in die *solide phase extraction-* (SPE)-Kartuschen.

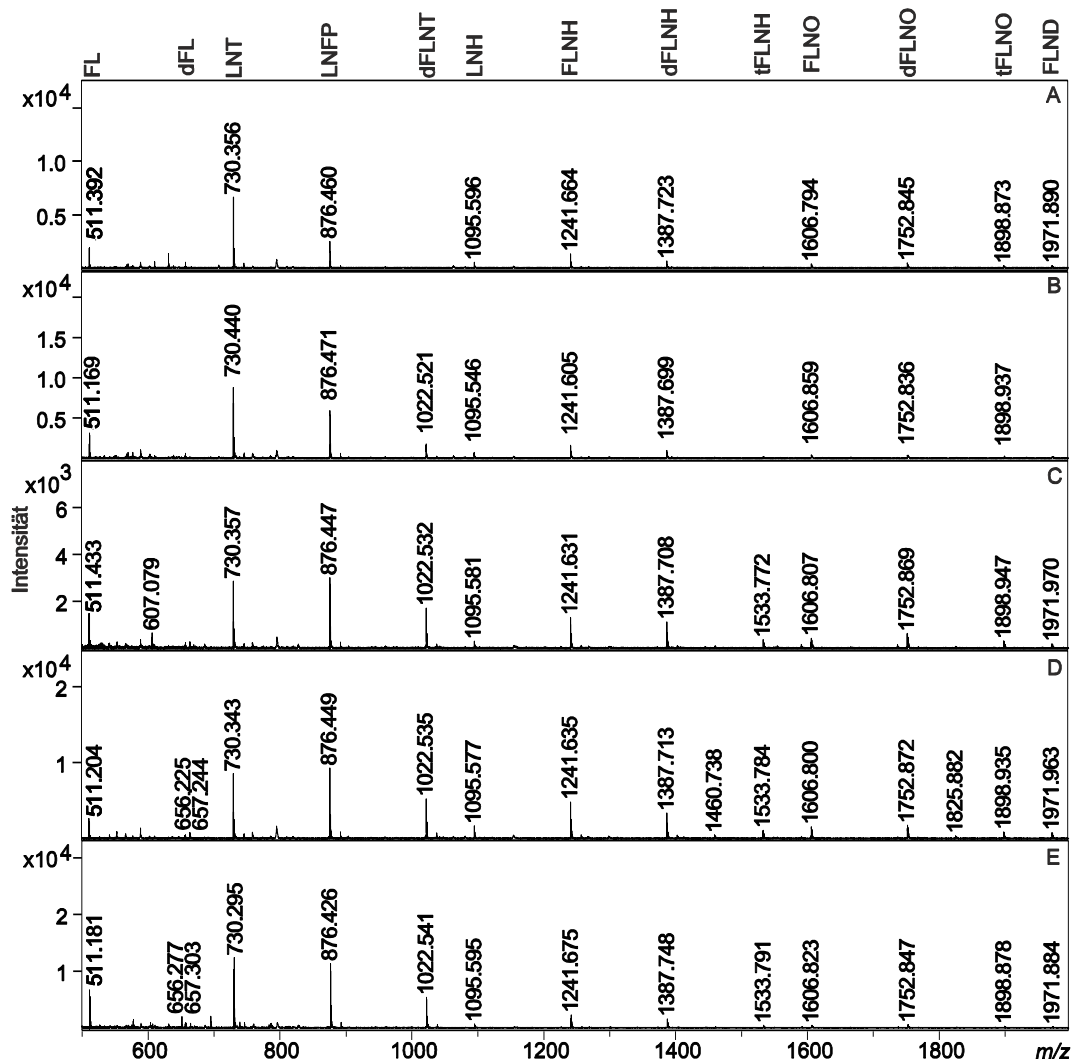


Abbildung 5 Optimierung des zur Probenaufarbeitung eingesetzten Milchvolumens. Manuelle PGC Aufarbeitung, gepoolte Elution (1 mL 20% ACN, 1 mL 60% ANC) einer serologisch als Le(a-b+) typisierten Probe. Alle Proben wurden nach der Aufarbeitung getrocknet und in 100 μ L Wasser resuspendiert. A, 200 μ L Milch; B, 100 μ L Milch, 50 μ L Milch; 50 μ L Milch auf 200 μ L mit Wasser aufgefüllt; 25 μ L Milch auf 200 μ L mit Wasser aufgefüllt. FL, Fucosyllaktose; dFL, Difucosyllaktose; LNT, Lacto-*N*-Tetraose; LNFP, Lacto-*N*-fuco-Pentaose (fucosyl Lacto-*N*-tetraose); dFLNT, difucosyl Lacto-*N*-Tetraose; LNH, Lacto-*N*-Hexaose; FLNH, fuco Lacto-*N*-Hexaose; dFLNH, difucosyl Lacto-*N*-Hexaose; tFLNH, trifucosyl Lacto-*N*-Hexaose; FLNO, fuco Lacto-*N*-Octaose; dFLNO, difucosyl Lacto-*N*-Octaose; tFLNO, trifucosyl Lacto-*N*-Octaose; FLND, fuco Lacto-*N*-Decaose.

3 Saure HMOs

Zur Optimierung der Elutionsbedingungen wurde einer serologisch als Le(a-b+) typisierten Probe zweimal parallel nach dem in Kapitel 2 beschriebenen Protokoll aufgearbeitet (vgl. Abbildung 6). Zur Elution wurde dem Laufmittel jedoch beim zweiten Mal ohne 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) zugesetzt. Die resultierenden Spektren sind in Abbildung 6 dargestellt.

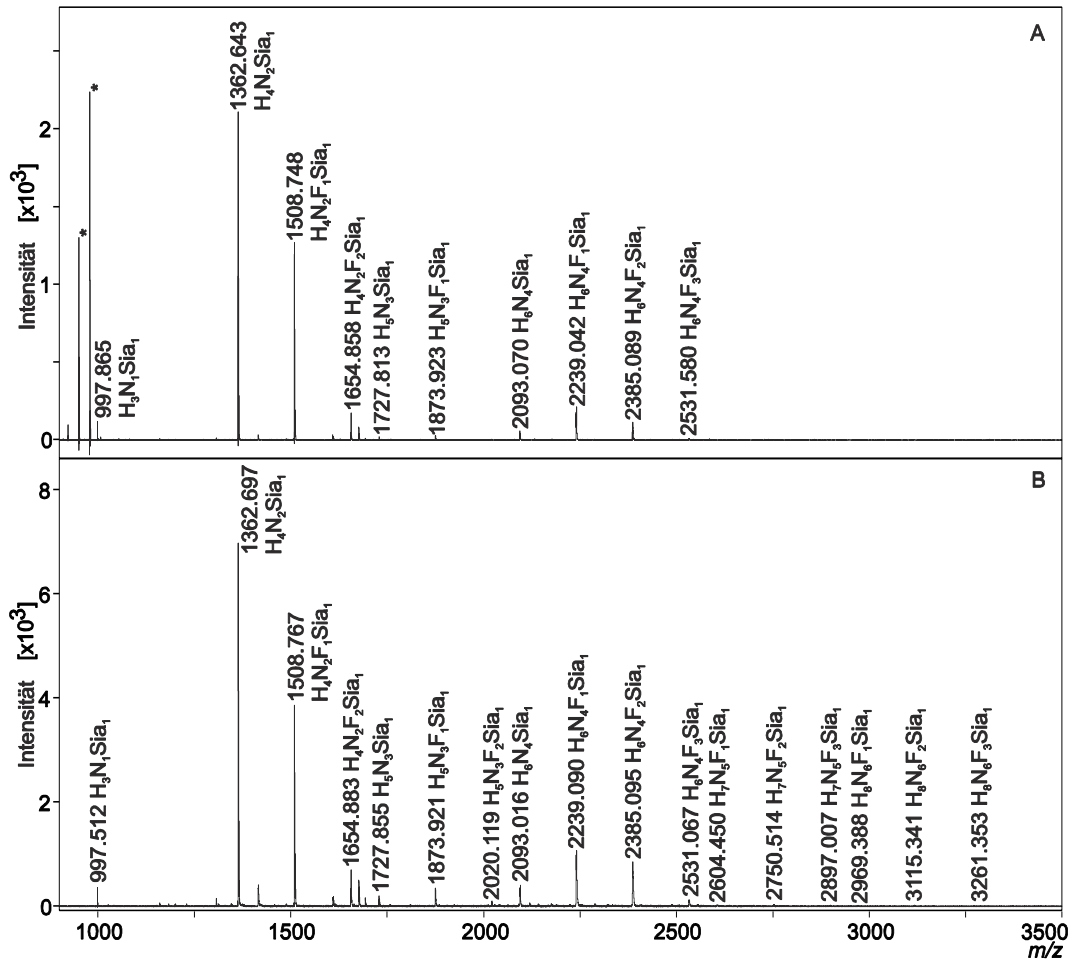


Abbildung 6 *Negativ-ion mode* MALDI-MS Spektrum von sauren HMOs in Abhängigkeit von den PGC-Elutionsbedingungen.

Spektrum A zeigt das HMO-Profil nach Elution ohne TFA, Spektrum B mit TFA. H, Hexose; N, *N*-Acetylhexosamin; F, Desoxyhexose (Fucose), Sia, Sialinsäure; Signale, denen keine HMO-typische Monosaccharid-Zusammensetzung zugeordnet werden konnte, sind mit einem Stern markiert.

Ein Vergleich der Elutionsbedingungen zeigte, dass ohne TFA Zusatz im Laufmittel (Abbildung 6 A) eine vierfach niedrigere Signalintensität der sialylierten, sauren HMOs im *negative-ion mode* MALDI-MS-Spektrum zu detektieren war. Die Verunreinigungen im niedermolekularen Massenbereich ($m/z < 997.5$) verringerten sich deutlich nach Zugabe von TFA. Besonders im hochmolekularen Bereich bis m/z 3261.4 (H₈N₆F₃Sia₁) waren saure HMOs nach Zusatz von TFA klar detektierbar. Glykane mit mehr als einer Sialinsäure wurden nicht detektiert. Hier wird vermutet, dass diese deutlich stärker mit dem PGC-Material wechselwirken und eine höhere ACN-Konzentration des Laufmittels zur Elution erfordern.

Der Zusatz von TFA zeigt keine Veränderung in den im *positive-ion mode* aufgenommenen Spektren. Um die Screening-Methode möglichst breit einsetzbar zu machen und auch die Möglichkeit zu bieten sialylierte HMOs zu messen, wurde in das in Kapitel 2 beschriebene Verfahren die Elution mit TFA Zusatz aufgenommen.

4 Verifizierung der berechneten Monosaccharid-Zusammensetzungen

Die Detektion eines Adduktsignals ($M+39$ Da) kann auf zwei Ursachen zurückzuführen sein: (i) das Kaliumaddukt des Molekülions oder (ii) das Natriumaddukt eines Molekülions in dem eine Fucose gegen eine Hexose ausgetauscht ist. Um diesen Austausch zu untersuchen, wurden die Proben mit Lithiumchlorid (LiCl) versetzt und anschließend massenspektrometrisch mittels MALDI-MS analysiert. Das resultierende Spektrum einer serologisch Le(a+b-) typisierten Probe wurde dann mit dem der nativen Probe verglichen (Abbildung 7).

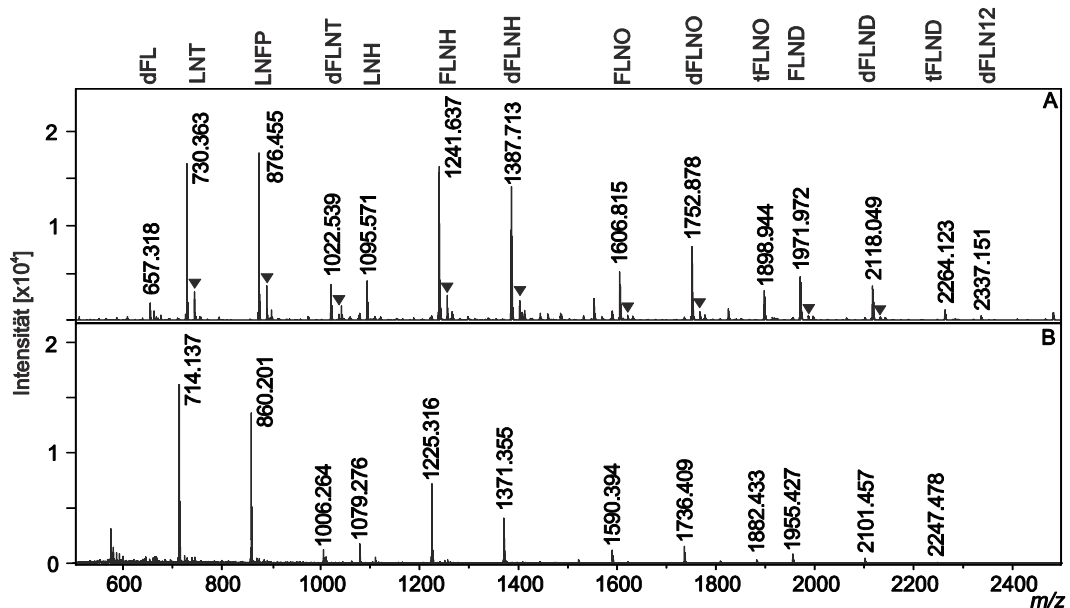


Abbildung 7 Verifizierung des Fucose-Hexose-Austauschs mittels LiCl.

A, Spektrum einer nativen, serologisch als Le(a+b-) typisierten Probe; B, Spektrum der Probe nach Zugabe von 0,1 μmol LiCl $[M+\text{Li}]^+$; annotierte Signale entsprechen den Natriumadduktionen $[M+\text{Na}]^+$; zugehörige Kaliumadduktionen $[M+\text{K}]^+$ sind mit \blacktriangledown markiert; dFL, Difucosyllactose; LNT, Lacto-N-Tetraose; LNFP, Lacto-N-fuco-Pentaose (fucosyl Lacto-N-tetraose); dFLNT, difucosyl Lacto-N-Tetraose; LNH, Lacto-N-Hexaose; FLNH, fuco Lacto-N-Hexaose; dFLNH, difucosyl Lacto-N-Hexaose; FLNO, fuco Lacto-N-Octaose; dFLNO, difucosyl Lacto-N-Octaose; tFLNO, trifucosyl Lacto-N-Octaose; FLND, fuco Lacto-N-Decaose; dFLND, difucosyl Lacto-N-Decaose; tFLND, trifucosyl Lacto-N-Decaose; dFLN12, difucosyl Lacto-N-Dodecaose;

Jede Signalgruppe ($[M+\text{Na}]^+$, $[M+\text{K}]^+$) des Spektrums der nativen Probe (A) fällt nach Zugabe von LiCl auf nur ein Signal zusammen (Spektrum B). Dieses Signal ist um 16 Da vom jeweiligen Hauptsignal der nativen Probe in den niedermolekularen Massenbereich verschoben. Wie aus der Biosynthese zu erwarten, fanden sich in den Übersichtsspektren der HMOs keine Signalgruppen, welche auf den Austausch von Fucose gegen Hexose hindeuten. Die Doppelsignale bei der nativen Probe wurden somit nur auf das Vorhandensein von Kaliumaddukten neben den Hauptsignalen der Natriumaddukte zurückgeführt.

5 HMO-Quantifizierung nach automatisierter PGC Aufarbeitung

Zur Quantifizierung der HMO-Menge wurde die Monosaccharid-Zusammensetzung aller in der in Kapitel 2 beschriebenen Statistik berücksichtigten Proben mittels HPLC bestimmt. Nach Hydrolyse und Fluoreszenzmarkierung konnte der Glykangehalt durch Vergleich mit einem Monosaccharid-Standard bekannter Menge ermittelt werden.

Deutliche Unterschiede wurden zwischen den Milchproben einzelner Donorgruppen festgestellt. So ergab sich eine mittlere Kohlenhydratmenge bei serologisch Le(a-b+) typisierten Donoren von 357,24 µg/200 µL, was einer Konzentration von 17,86 g/L entspricht (n=27). Die ermittelte Konzentration bei Le(a+b-) typisierten Donoren lag mit 201,51 µg/200 µL (10,98 g/L) deutlich darunter (n=6). Milchproben von Le(a-b-) typisierten Donoren zeigten nur eine mittlere Konzentration von 194,44 µg/200 µL (9,72 g/L; n=7)(Abbildung 8).

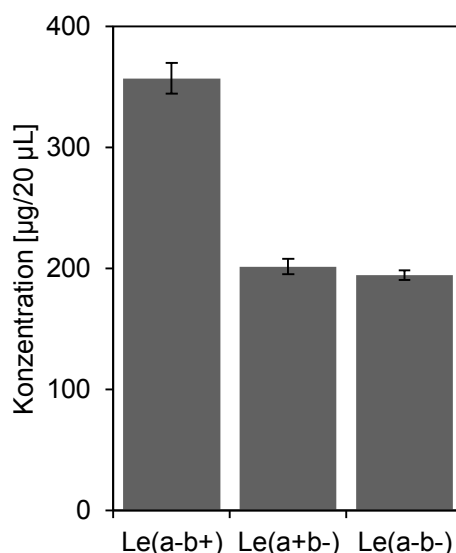


Abbildung 8 Donorspezifische HMO-Konzentration in der Frauenmilch. Mittelwert (mit Standardabweichung) für Milchproben von 27 Le(a-b+), 6 Le(a+b-) und 7 Le(a-b-) Donoren.

Im Mittel ließen sich aus einer automatisch aufgearbeiteten Milchprobe (es wurden nur 40% der Ausgangsprobe auf die Kartusche aufgegeben) 251,1 µg aufgereinigte Oligosaccharide isolieren. Dies entspricht einer mittleren HMO-Konzentration von 12,55 g/L. Hierbei ist zu beachten, dass alle Milchproben zwischen dem dritten und fünften Tage postpartum entnommen wurden. Die ermittelten Konzentrationen lagen, wie erwartet, zwischen den in Kapitel 1 *Laktationszeitbedingte Veränderungen in der HMO-Expression* beschriebenen Konzentrationen für Kolostrum (22-24 g/L) und reifer Milch (12-13 g/L) [Urashima *et al.* 2011].

Viele der beschriebenen Funktionen von HMOs werden auf fucosylierte Strukturen zurückgeführt. Da der Fucosylierungsgrad der HMOs einzelner Donoren und

Donorgruppen, wie in Kapitel 1 *Lewis-blutgruppenspezifische Unterschiede der Humanmilch-Oligosaccharide* beschrieben, stark variiert, wurde dieser für jede Probe bestimmt. Um eine Vergleichbarkeit der Proben zu erreichen, wurde der Absolutwert des Fucosegehalts auf die Gesamtmenge der detektierten Monosaccharide bezogen. Für HMO-Proben von Le(a-b+) typisierten Donoren ergab sich ein Mittelwert von 17,02% Fucose, für Le(a+b-) Donoren 7,43% Fucose und für Le(a-b-) typisierte Donoren ein Wert von 10,22% Fucose (Abbildung 9).

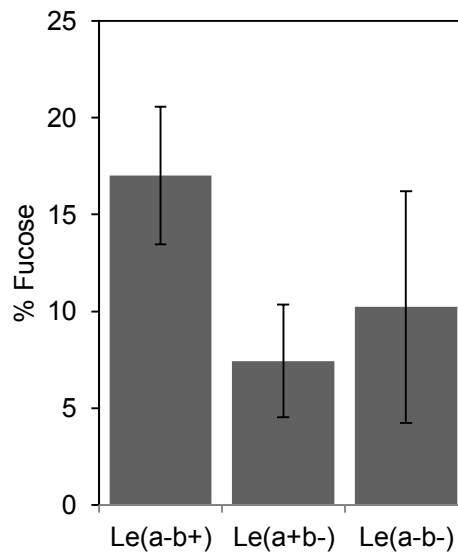


Abbildung 9 Relativer Fucosegehalt bezogen auf die HMO-Gesamtmenge. Mittelwert (mit Standardabweichung) für Milchproben von 27 Le(a-b+), 6 Le(a+b-) und 7 Le(a-b-) Donoren.

Wie aufgrund der Biosynthese zu erwarten war (vergleiche Kapitel 3), ergaben sich aus der unterschiedlichen Expression der verschiedenen Fucosyltransferasen unterschiedliche Fucosylierungsgrade für die HMOs der drei Donorgruppen. Die größte Menge an Fucose konnte in HMO-Proben von Le(a-b+) typisierten Donoren bestimmt werden. Ein drastischer Unterschied war zwischen HMOs von Le(a-b+) und Le(a+b-) typisierten Donoren zu erkennen, welche den niedrigsten Fucosylierungsgrad aufwiesen. Es wird vermutet, dass dies hauptsächlich auf das Fehlen der sekretorgenkodierte α 1-2-Fucosyltransferase (FucTII) zurückzuführen ist. Alle Proben Le(a-b-) typisierter Donoren zeigten eine wesentlich größere Variation in der exprimierten Fucosemenge. Biosynthetisch fehlt dieser Donorklasse die lewisgenkodierte α 1-3/4-Fucosyltransferase (FucTIII). In seltenen Fällen kann auch die sekretorgenkodierte α 1-2-Fucosyltransferase (FucTII) nicht vorhanden sein, was zu einer weiteren Reduktion der exprimierten Fucosemenge führen kann.

Vernachlässigt man die Core-Fucosylierung, lässt sich der Fucosylierungsgrad pro LacNAc-Einheit ausdrücken. Dieser Wert verdeutlicht die Unterschiede zwischen den

Donorgruppen in besonderem Maße (Abbildung 10), da für hochmolekulare HMO-Strukturen die Fucosylierung des Laktose-Cores nur eine untergeordnete Rolle spielen sollte. Die Auswertung ergab einen Fucosylierungsgrad pro LacNAc-Einheit von 1,42 Fuc/LacNAc für HMO-Proben von Le(a-b+) typisierten Donoren, 0,36 Fuc/LacNAc für Le(a+b-) typisierte Donoren und 0,74 Fuc/LacNAc für Le(a-b-) typisierte Donoren.

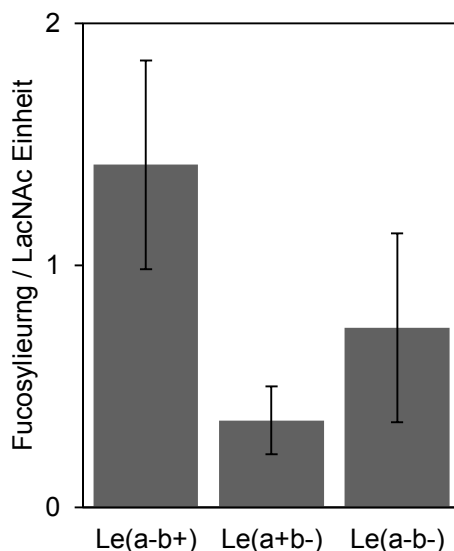


Abbildung 10 Fucosylierungsgrad der HMOs pro LacNAc Einheit. Mittelwert (mit Standardabweichung) für Milchproben von 27 Le(a-b+), 6 Le(a+b-) und 7 Le(a-b-) Donoren.

Diese Ergebnisse unterstreichen die massenspektrometrischen Daten, in welchen die Variationen des Fucosylierungsgrades in den Intensitätsunterschieden einzelner Signale deutlich wurden. Für die in Kapitel 3 beschriebenen, detektierbaren Besonderheiten einiger Proben, welche auf die Aktivitäten einzelner oder mehrerer Glykosyltransferasen zurückgeführt wurden, kann diese Methode eine quantitative Abschätzung dieser Variation, besonders im Bereich des Fucosegehaltes, liefern. Weiterhin verdeutlicht diese Analyse die Möglichkeiten, welche nach einem durchgeführten Screening inklusive massenspektrometrischer Bestimmung der HMO-Muster, mit den verbleibenden, aufgearbeiteten HMO-Proben möglich sind.

Neben den neutralen, fucosylierten HMOs werden insbesondere auch die zusätzlich sialylierten Strukturen als potentiell besonders bioaktiv beschrieben. Somit wurde neben der Menge an neutralen Monosacchariden auch der Gehalt an Sialinsäure bestimmt (siehe

Kapitel 2) [Bode *et al.* 2004]. Nach DMB-Derivatisierung konnte der Sialinsäuregehalt chromatographisch ermittelt werden [Hara *et al.* 1987]. Die Variation des Sialinsäuregehalts der HMO-Proben fiel zwischen den einzelnen Donorgruppen deutlich geringer aus als die Variation der Fucosemenge. Im Fall von Le(a-b+) typisierten Donoren ergab sich eine mittlere Sialinsäurekonzentration von 4,66 g/L, bei Le(a+b-) typisierten Donoren 3,64 g/L und bei Le(a-b-) typisierten Donoren 4,53 g/L (Abbildung 11).

Die in Abbildung 11 zu erkennenden Differenzen lassen eine Unterscheidung zwischen Le(a-b+) und Le(a+b-) zu. Eine besonders große Varianz ist erneut in den Le(a-b-) typisierten Proben zu erkennen. Die angegebenen Standardabweichungen beinhalten einen methodenbedingten Messfehler von ca. 5%.

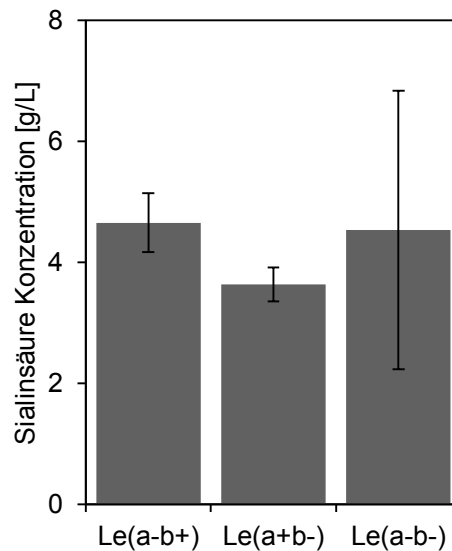


Abbildung 11 Sialinsäurekonzentration in den untersuchten Milchproben. Mittelwert für Milchproben von 27 Le(a-b+), 6 Le(a+b-) und 7 Le(a-b-) Donoren. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung inkl. 5% Messfehler.

Neben der massenspektrometrischen Charakterisierung der Milchproben kann eine vollständige Quantifizierung die Basis für weitere Untersuchungen im klinischen sowie biologischen Bereich sein. Nach einer zukünftigen Optimierung des Aufbereitungsverfahrens für saure HMOs werden die hier bestimmten Werte sicherlich deutlich verbessert und korrigiert werden können.

6 Überprüfung der selektiven Isolierung der HMOs

Um zu gewährleisten, dass unabhängig von Größe oder sterischen Eigenschaften alle HMOs gleich an das Kartuschenmaterial binden und auch wieder davon eluiert werden können, sollte mit Hilfe von *Standardspiking* die selektive Adsorption bestimmt werden. Als Standardsubstanzen dienten Fucosyllactose (2'FL), Lacto-N-Tetraose (LNT) und

fucosyl Lacto-*N*-Tetraose (LNFP II). Als Milchprobe wurde eine Le(a+b-) typisierte Probe verwendet. Es wurden 0,05 mg jeder einzelnen Standardsubstanz jeweils 50 mL Milchprobe zugesetzt und parallel dreifach automatisch aufgearbeitet. Weiterhin wurden jeweils 50 mL Milchprobe mit einer Mischung aus allen drei Standardsubstanzen versetzt, ebenfalls dreifach aufgearbeitet und gemessen. Auch die Wiederfindung der Oligosaccharid-Standards ohne Milchprobenzusatz wurde dreifach bestimmt. Die Ergebnisse zeigten eine Wiederfindung der Standardglykane von 100% (der Messfehler der Monosaccharidanalytik beträgt ~9%). Die Milchproben mit Zusatz des Standardgemisches zeigten eine Wiederfindung von 94%. Alle einzeln zugesetzten Standards wurden zu 95% wiedergefunden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass keine selektive Adsorption/Elution einzelner HMOs auf/von den PGC-Kartuschen zu erwarten ist. Die Beobachtung, dass Fucosyllaktose im MALDI-MS *positive-ion* Reflektormodus zuvor massenspektrometrisch nicht detektierbar war, konnte auf eine Unterdrückung der Ionen im Massenbereich unter 500 Da zurückgeführt werden. Dieser Effekt ließ sich durch das Messen im Linearmodus umgehen, wobei allerdings die Auflösung der Spektren deutlich abnahm. Aus diesem Grund wurde auf dieses Verfahren für die in Kapitel 2 beschriebene Routinemessung verzichtet.

7 Ausweitung der Methodik auf die Aufarbeitung auf Stuhlproben

Die für die Extraktion von HMOs aus Frauenmilch optimierte Aufarbeitungsmethode wurde auf die Möglichkeit getestet, HMOs auch aus Stuhlproben gestillter Kinder zu extrahieren und massenspektrometrisch zu erfassen.

1 g Fecesprobe eines gestillten Säuglings wurde 1 h bei RT in 20 mL milli-Q Wasser auf einem Schüttler inkubiert (1000 rpm). Anschließend wurden 500 µL der Probe entnommen und bei 14000 g 10 min zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde mit Hilfe eines Centricon-Mikrofilters (Amicon, 0,1 µm Porenweite, Millipore) filtriert. Der Durchlauf konnte direkt mittels der oben beschriebenen PGC-Aufarbeitung weiter verarbeitet und analysiert werden.

Das resultierende Spektrum (siehe Abbildung 12) zeigte im Massenbereich unter m/z 1000 starke, nicht annotierbare Matrixsignale. Fucosyllactose und Difucosyllactose (m/z 511 und 657) zeigten, anders als in Milchproben, die höchsten Signalintensitäten. Weiterhin war die unfucosylierte Octaose-Corestruktur (m/z 1461), welche in aufgearbeiteten Milchproben sehr selten zu detektieren war, als klares Signal zu erkennen. Das Spektrum zeigte auch im hohen Massenbereich noch starke Signalintensitäten. Die Oligosaccharide tetrafucosyl Lacto-*N*-Octaose (m/z 2045) und trifucosyl Lacto-*N*-Decaose (m/z 2264) waren klar zuzuordnen.

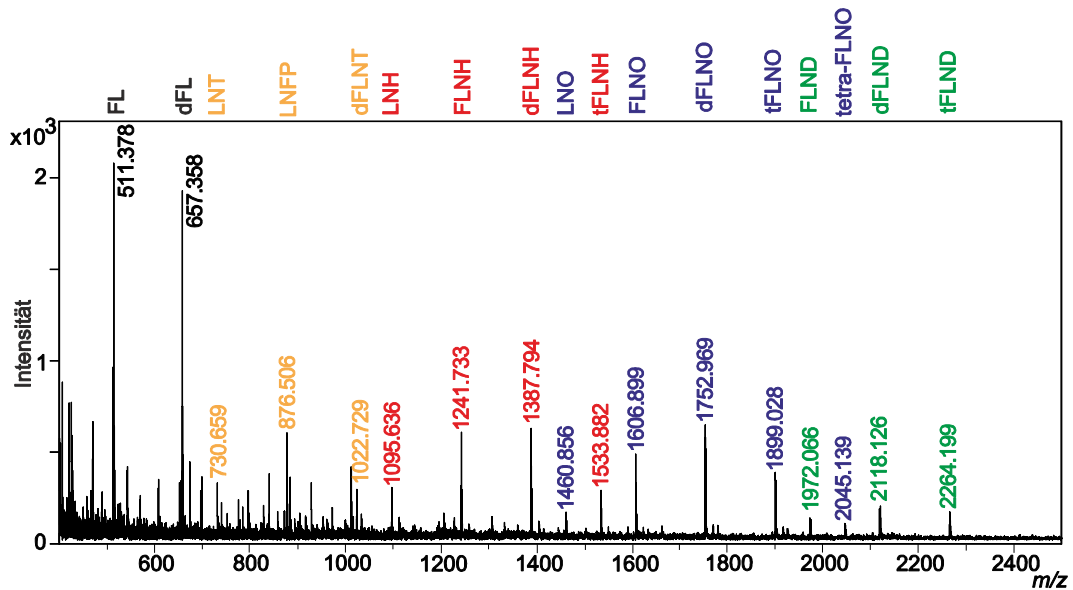


Abbildung 12 MALDI-MS Analyse von PGC-Aufarbeitung einer Fecesprobe. Die Probe (1 g Feces) wurde bei RT mit 20 mL Wasser extrahiert und anschließend mittels PGC-Aufarbeitungsprotokoll isoliert. FL, Fucosyllaktose (schwarz); dFL, Difucosyllaktose (schwarz); LNT, Lacto-*N*-Tetraose (gelb); LNFP, Lacto-*N*-fuco-Pentaose (fucosyl Lacto-*N*-tetraose, gelb); dFLNT, difucosyl Lacto-*N*-Tetraose (gelb); LNH, Lacto-*N*-Hexaose (rot); FLNH, fuco Lacto-*N*-Hexaose (rot); dFLNH, difucosyl Lacto-*N*-Hexaose (rot); tFLNH, trifucosyl Lacto-*N*-Hexaose (rot); LNO, Lacto-*N*-Octaose (blau); FLNO, fuco Lacto-*N*-Octaose (blau); dFLNO, difucosyl Lacto-*N*-Octaose (blau); tFLNO, trifucosyl Lacto-*N*-Octaose (blau); tetra-FLNO, tetrafucosyl Lacto-*N*-Octaose (blau); FLND, fuco Lacto-*N*-Decaose (grün); dFLND, difucosyl Lacto-*N*-Decaose (grün); tFLND, trifucosyl Lacto-*N*-Decaose (grün).

Der Test zeigt, dass es möglich ist, das vorgestellte Verfahren auch auf andere Matrices anzuwenden. Diese Möglichkeit bietet sich besonders für Metabolomstudien an, in welchen oft Milchproben mit zugehörigen Stuhl- und Urinproben des Kindes verglichen werden. Eine einheitliche Aufarbeitung minimiert den durch die Probenvorbereitung verursachten Fehler und ermöglicht verlässliche Rückschlüsse auf die HMO-Zusammensetzungen. Die automatisierte Aufarbeitung bietet weiterhin die Möglichkeit, eine Vielzahl von Proben in sehr kurzer Zeit parallel zu *screenen*, wodurch die Datenerfassung auch in großen Studien ermöglicht wird.

8 Abschließende Diskussion

Das vorgestellte Verfahren ermöglicht eine statistisch evaluierte Lewis-Blutgruppen-Zuordnung anhand von massenspektrometrisch aufgenommenen HMO-Mustern. Die Vorteile dieser automatisierten Methode im Vergleich zu früher publizierten Ansätzen liegt in der Möglichkeit der *high-throughput* Anwendung und der damit verbundenen Zeitersparnis sowie der standardisierten Minimierung des Messfehlers durch die parallele Aufarbeitung von bis zu 96 Proben. Neben der eigentlichen Lewis-Blutgruppen-Zuordnung resultieren individuell massenspektrometrisch analysierte Milchproben mit charakterisierten Oligosaccharid-Zusammensetzungen.

Funktions- und Metabolomics-Studien setzen Einzelproben mit bekannter Zusammensetzung voraus. Hier bietet das *high-throughput* Screening-Verfahren zum einen die Möglichkeit, auf die oft verwendete serologische Lewis-Blutgruppentypisierung zu verzichten und somit eine Blutentnahme der Donoren unnötig zu machen, zum anderen stehen nach der eigentlichen Typisierung und Charakterisierung bis zu 400 µg aufgereinigte HMOs zum direkten Einsatz für weitere chemische und biologische Untersuchungen zur Verfügung.

Der verwendete Probensatz zeigt allerdings neben den eindeutig zuzuordnenden Milchproben auch solche, welche scheinbar nicht in das vorhergesagte Muster passen. Eine genauere Charakterisierung dieser abweichenden Proben wird in Kapitel 3 vorgestellt und mit Besonderheiten, welche aus der vorgeschlagenen Biosynthese abgeleitet werden, in Verbindung gesetzt.

Kapitel 3

Human milk oligosaccharides and Lewis blood group - Individual high-throughput sample profiling to enhance conclusions from functional studies -

Dennis Blank, Viktoria Dotz, Rudolf Geyer, Clemens Kunz
Adv Nutr, 2012, in press.

Zusammenfassung

Die vorliegende Publikation stellt, ausgehend von der in Kapitel 2 beschriebenen Screening-Methode zur Lewis-Blutgruppenzuordnung anhand von massenspektrometrischer HMO-Musterbestimmung, den engen Zusammenhang zwischen der Biosynthese von HMOs und der serologisch bestimmbaren Lewis-Blutgruppe vor. Ein besonderer Schwerpunkt liegt auf den von mir massenspektrometrisch bestimmten donorspezifischen Abweichungen von den, aus der Biosynthese zu erwartenden, HMO-Mustern. Durch das vorgestellte Verfahren wird die Möglichkeit und Notwendigkeit des *high-throughput* Screening-Verfahrens in besonderer Weise deutlich.

Abstract

Human milk oligosaccharides (HMO) are discussed to play a crucial role in infants' development. Lewis blood group epitopes, in particular, seem to remarkably contribute to the beneficial effects of HMO. In this regard, large scale functional human studies could provide evidence for the variety of results from *in vitro* investigations, though increasing the amount and complexity of sample and data handling. Therefore, reliable screening approaches are needed. To predict the oligosaccharide pattern in milk the routine serological Lewis blood group typing of blood samples can be applied due to the close relation between the biosynthesis of HMO and the Lewis antigens on erythrocytes. However, the actual HMO profile of the individual samples does not necessarily correspond to the serological determinations.

This review will demonstrate the capabilities of merging the traditional serological Lewis blood group typing with the additional information provided by the comprehensive elucidation of individual HMO patterns by means of state-of-the-art analytics. Deduced from the association of the suggested HMO biosynthesis with the Lewis blood group, the MALDI-TOF-MS profiles of oligosaccharides in individual milk samples will exemplify the advantage and the limitations of sample assignment to distinct groups.

Introduction

Free lactose-derived oligosaccharides in human milk (HMO) are present at concentrations ranging approximately from 10 to 20 g/L; hence, several grams of these unique components pass through the breast-fed infant's gut daily (Urashima et al. this proceedings; 1,2). Various health protective actions have been deduced from *in vitro* investigations, i.e. prebiotic, anti-infective or immune effects (3,4), which might partially be associated with the presence of fucosylated oligosaccharide structures. Those are determined by the expression of the Secretor (Se) and Lewis (Le) genes in the mammary gland. Hence, distinct patterns of milk oligosaccharides according to the Lewis/Secretor types Le(a+b-) non-Secretor, Le(a-b+) Secretor and Le(a-b-) Secretor or non-Secretor have been described by several investigators (1,5,6). The prevalence in Caucasians averages 22%, 72% and 6% respectively (7), whereby 80% of the Europeans secrete ABH substances in saliva and other secretions; thus, they are typed as Secretors (8,9). Observational studies indicate that certain HMO from secretors are associated with various preventive effects, such as reducing diarrhea, promoting intestinal maturation in preterm neonates and others (10,11). The final evidence for the functionality of the Lewis-related HMO compounds in humans has to be confirmed by intervention studies with large numbers

of participants. Therefore, reliable high-throughput screening methods are needed to determine the oligosaccharide profiles in individual milk samples. Due to high inter- and intraindividual variations in HMO expression, the relationship between the serologically detectable Lewis blood group and the corresponding oligosaccharide pattern in milk can only be used for a crude milk classification, even though the serological detection as routine method is rapid and highly practicable. Nevertheless, detailed information on the HMO composition in milk samples provides a more accurate indication of the substances actually ingested by the infant. For this purpose, new developments in the field of Glycomics have great potential to facilitate handling of large sample and data sets from follow-up investigations on the correlation of Lewis-active components in infant's feeding and their health (12-14).

In this review we will (i) demonstrate the correlation of the serologically detected Lewis blood group and the expressed HMO pattern in the milk of the donors and (ii) show how this information can be enhanced by recent high-throughput HMO screening methods. On the basis of the suggested biosynthesis of HMO, specific variances in the HMO pattern are taken as examples to highlight the necessity of careful individual milk sample analysis.

The biosynthesis of Lewis and Secretor gene-related oligosaccharides in milk

During the last years the structures of the major human milk oligosaccharides have been thoroughly characterized (15,16). From these data some structural rules have been deduced and the biosynthetic pathways of the neutral HMO have been proposed (see Fig. 1). Unfortunately, experimental data on the biosynthesis of HMO are lacking to date. Since the reducing end of the unbound oligosaccharides from milk consistently comprises lactose, which is the major macronutrient in human milk, this disaccharide is assumed to be the initial substrate for HMO synthesis. Lactose is formed in the Golgi apparatus by the action of the lactose synthase complex containing α -lactalbumin and β 1-4-galactosyltransferase (β 1-4-GalT) (17). UDP-activated galactose is attached to Glc-I-P with high affinity due to the presence of α -lactalbumin, which is only expressed in the lactating mammary gland of mammals.

We speculate that analogously to the O-glycosylation of proteins in the Golgi of submaxillary and gastrointestinal secreting cells, the glycosyltransferases for HMO synthesis might occur as membrane-bound glycoproteins and process the oligosaccharide sequentially by the addition of a single monosaccharide from sugar nucleotides. Those are synthesised in the cytosol and conveyed to the Golgi lumen via specific membrane antiporters, e.g.

GLUT1 for monophosphorylated glucose (18-20).

Thus, elongation (a), branching (b) and fucosylation (c) of lactose and derived structures might be performed by the concerted action of (a) β 1-3-GlcNAcT², β 1-3- and β 1-4-GalT for type 1 and type 2 chains, respectively, and (b) β 1-6-GlcNAcT as depicted in Figure 1. Following the suggested rules of HMO synthesis no further elongation is observed for a terminal type 1 chain (indicated by a 'no entry' sign in Fig. 1) (6,21,22). The final fucosylation and Lewis antigen formation is achieved by the consecutive action of α 1-2-, α 1-3- or α 1-3/4-FucTs³ (c), as summarized in Table 1. The presence of at least one functional allele of the Lewis gene results in the expression of an α 1-3/4-FucT (FucTIII), which is able to attach GDP activated fucose in O-4 position to GlcNAc in type 1 (Gal β 1-3GlcNAc) chains, resulting in Lewis epitopes, as shown in Figure 1. The same enzyme forms O-3-fucose units at the GlcNAc residue of type 2 (Gal β 1-4GlcNAc) chains yielding Le^x and, in Secretors, Le^y epitopes, however, with lower specificity than for type 1 substrates due to steric aspects (23). The O-3-fucosylation of the reducing glucose residue is known to be accomplished by the Lewis-gene dependent FucTIII as well (24). Furthermore, the formation of Le^x and Le^y epitopes can also be

performed by different α 1-3-fucosyltransferases, i.e. FucTIII-VII and FucTIX (25). While secretory tissues and fluids have predominantly FucTII activity encoded by the Se-gene, i.e. milk (26-28), saliva or stomach tissue (29), in human serum both FucTII and the H-gene controlled FucTI are present (30). Both enzymes transfer GDP activated fucose in α 1-2-position to β -D-galactosides prior to the formation of Le^b and Le^y epitopes (Fig. 1).

The Lewis- and Secretor-gene encoded fucosyltransferases compete for the substrates so that in Secretors also Le^a structures are found in milk and other secretions, but not on erythrocytes or in plasma (28,31).

Individuals with mutations resulting in the non-functional fucosyltransferases FucTII and FucTIII are usually typed as non-Secretors (se) and Lewis negative or Le(a-b-), respectively (25,32) and therefore should not secrete α 1-2- and/or α 1-4-fucosylated structures into milk.

² GlcNAcT, N-acetylglucosaminyl-transferase

³ FucT, fucosyltransferase

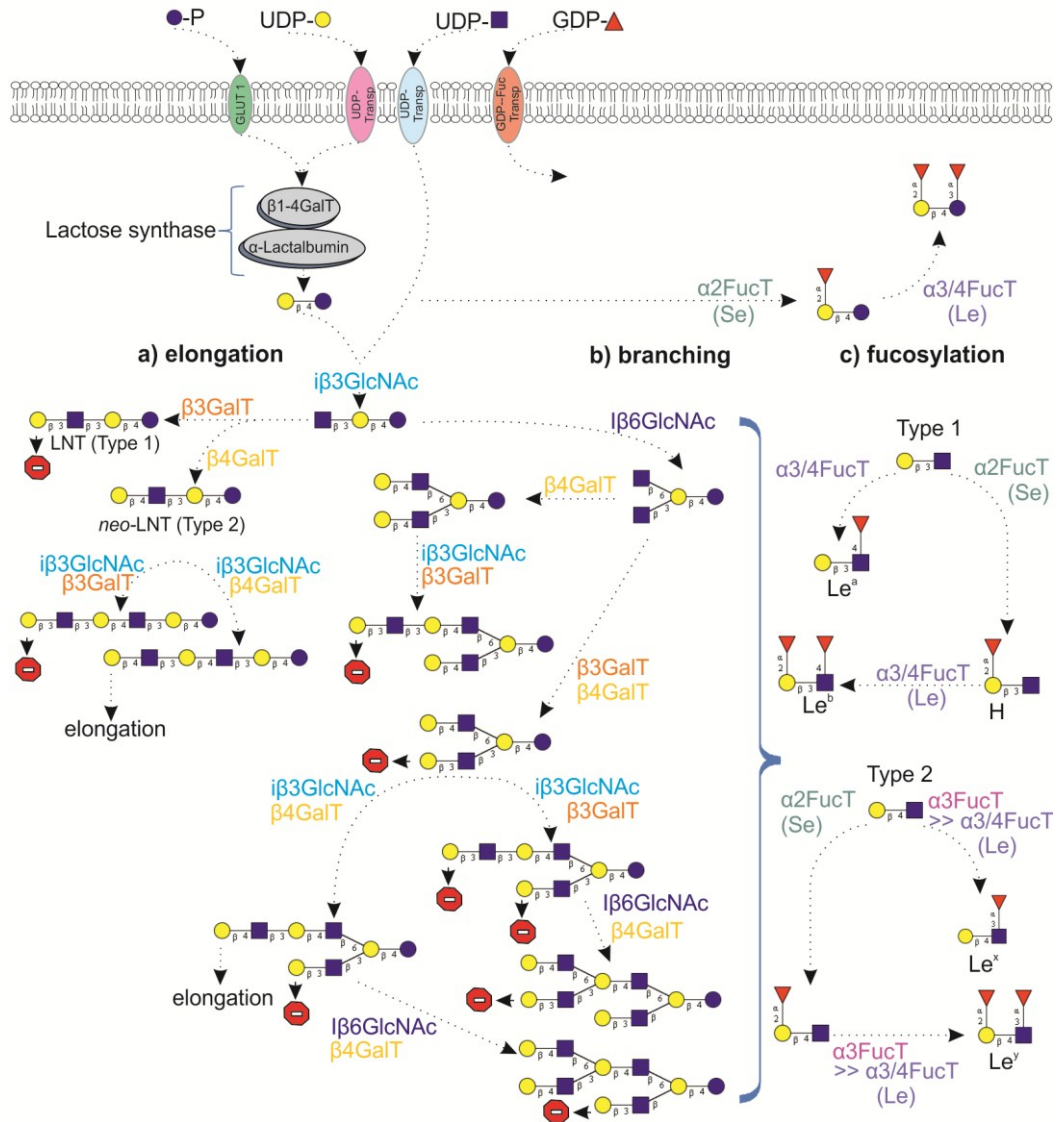
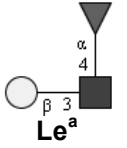
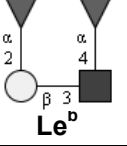
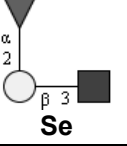
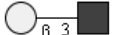


Figure 1 Biosynthesis of neutral complex human milk oligosaccharides (HMO). The assumed biosynthetic pathway starts from the activated monosaccharides and includes the most important enzymes only (N-acetylglucosaminyltransferases (GlcNAcT): iβ3GlcNAcT attaches GlcNAc in β1-3 position to terminal Gal; iβ6GlcNAcT attaches GlcNAc in β1-6 position to terminal Gal; Galactosyltransferases: β3GalT attaches Gal in β1-3 position to GlcNAc; β4GalT attaches Gal in β1-4 position to GlcNAc; Fucosyltransferases: α2FucT attaches Fuc in α1-2 position to terminal Gal, Secretor enzyme (Se); α3FucT attaches Fuc in α1-3 position to GlcNAc; α3/4FucT attaches Fuc in α1-3/4 position to GlcNAc and in α1-3 position to Glc of the lactose core, Lewis enzyme (Le). The 'no entry' signs mean that no further elongation takes place. Fucosylation is indicated exemplarily for terminal type 1 and type 2 chains. Glycan structures are depicted according to the recommendations of the Consortium of Functional Glycomics using the GlycoWorkbench software tool (93). Yellow circle, galactose; blue circle, glucose; blue square, N-acetylglucosamine; red triangle, fucose

Table 1 The Lewis- and Secretor-gene related glycan epitopes. The Lewis and Secretor epitopes, which are characteristic for the Lewis phenotype on red blood cells and in human milk, are synthesized by the listed fucosyltransferases (FucTs). The Lewis and Secretor genes code for the active FucTs in presence of at least one functional allele (heterozygous with LeLe or SeSe; homozygous with LeLe or SeSe). The prevalence of the Lewis phenotypes is conferred to Europeans (7). Glycan epitopes were assigned according to the recommendations of the Consortium of Functional Glycomics using the GlycoWorkbench software tool (93). Gray circle, galactose; black square, *N*-acetylglucosamine; black triangle, fucose.

Epitope	Lewis phenotype, prevalence	Active fucosyltransferase(s)	Genotype
 Le^a	Le(a+b-), 22%	α 1-3/4-FucT (FucTIII)	LeLe, sese or Lele, sese
 Le^b	Le(a-b+), 72%	α 1-3/4-FucT (FucTIII), α 1-2-FucT (FucTII)	LeLe, SeSe or Sese or Lele, SeSe or Sese
 Se	Le(a-b-), 6%	α 1-2-FucT (FucTII)	lele, SeSe or Sese
		-	lele, sese

Functional aspects of Lewis blood group related HMO

Despite the fact that the Lewis histo-blood group system was discovered over half a century ago, our knowledge about its biological functions is based mainly on speculations. In contrast, the role of the α 1-3-FucTs IV and VII, which synthesise Le^x and Le^y epitopes, seems to be proven, as their corresponding genes are highly conserved among mammals and contribute to the formation of selectin ligands (33).

Considering that the Lewis and Secretor genes are mainly expressed in secretory tissues, which are in contact with the environment and, therefore, with a large number of various microorganisms, the manifold carbohydrate antigens in secretions and epithelial cells might

provide protection against pathogens (31,33). Marionneau *et al.* suggested that providing different cell surface receptors for several pathogens, Le^a-antigens accomplish resistance against Le^b-binding pathogens and vice versa (33). Microbial lectins recognize host glycans in the gut which are presented by mucins and glycolipids, enclosing ABH and Lewis blood group recognition sites. This promotes colonization, which may have adverse health effects in case of pathogen adhesion (34). HMO bearing Lewis epitopes and other recognition sites attach to the pathogens and inhibit their adherence to intestinal cell surfaces. Subsequently, the pathogen-HMO complex can be excreted (35,36).

Table 2 Effects of Lewis and Secretor gene-related factors. *B.*, *Bifidobacterium*; *C.*, *Campylobacter*; *E.*, *Escherichia*; HMO, human milk oligosaccharides; α 1-2-Fuc, α 1-2-fucosylated

	Effect	Factor	Investigated in	Method	Reference
<i>in vitro</i>	Bifidogenic	Lewis a, type 1 H-trisaccharide	<i>B. longum ssp. infantis</i>	Genotyping; Glycan array	(36)
	Anti-adhesive	HMO, i.a. Lewis epitope bearing	<i>C. jejuni</i> , <i>E. coli</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> , HIV-1	Various	Reviewed in (4)
	Anti-adhesive vs. <i>C. jejuni</i>	α 1-2-Fuc-HMO	Carcinoma-derived human epithelial cells	Bacterial adherence assay	(37)
<i>ex vivo</i>	Anti-adhesive vs. <i>C. jejuni</i>	α 1-2-Fuc-Lac, neutral HMO	Fresh human intestinal mucosa	Bacterial adherence assay	(37)
<i>in vivo</i>	Colonization with <i>C. jejuni</i> reduced	α 1-2-Fuc-OS	Pups of transgenic mice	CFU counting after intestinal resection	(37)
	Preventive vs. diarrhea from <i>C. jejuni</i> , <i>Calicivirus</i>	α 1-2-Fuc-HMO	infants	Serological blood group classification; HPLC (HMO quantification)	(38)
	Preventive vs. diarrhea from <i>E. coli</i>	α 1-2-Fuc-HMO	infants	Serological blood group classification; HPLC (HMO quantification)	(11)
	Association with mortality, gram negative sepsis and necrotizing enterocolitis	Low or non-Secretor status	preterm infants	Genotyping; phenotyping (enzyme immunoassay in saliva)	(10)
	Association with Crohn's disease	Non-Secretor status	pediatric/adult individuals	Genotyping	(39)

Many attempts have been made to investigate the functions of HMO, inclusive of Le-specific structures; however, most of these studies were conducted *in vitro*; a brief overview is given in Table 2. HMO have

antiadhesive properties, possibly resulting in the reduction of infections with *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Shigella* or *Salmonella* species or in a decrease of HIV-1 mother-to-child transmission. The bifidogenic effect of HMO, which is

known for decades, might also be assisted by the interaction of *Bifidobacteria* with the Lewis epitopes, since *B. infantis* is able to both use and bind different glycans from human milk and intestinal cells *in vitro*, including Le-specific structures ((36); see also this proceedings).

Since the availability of HMO compounds adequate for interventional clinical trials is limited to date, *in vivo* functional studies are rare. Nevertheless, data from observational investigations give an insight into the possible associations between the Lewis or Secretor phenotypes and diseases. Alpha1-2-fucosylated HMO reduced infections from *Campylobacter jejuni* in mice *in vivo* (37) and significantly prevented diarrhea in breast-fed infants in a dose-dependent manner as referred to their amount in breast milk (11,38). Furthermore, low or non-Secretor status was strongly associated with adverse outcomes in preterm infants, e.g. mortality and necrotizing enterocolitis (10), and with Crohn's disease (39), giving further indication for the involvement of α 1-2-fucosylated structures in the immune-related processes of gut development and health.

Considering the potential important role of Lewis and Secretor epitopes in the infant's digestive tract, it is noteworthy that infants are typed Le(a-b-) in the first months of life, as discussed below. This could be due to a reduced Le and Se

antigen expression in the immature gut of neonates, since gastrointestinal epithelial cells are suggested as the main source for Lewis-specific glycolipids in blood after reabsorption (40,41). Nevertheless, strong Le^a-activity has been detected consistently in the fecal samples collected after birth (meconium) as well as in the 6 months follow-up. Le^b-reactivity, if present, was complementary hereto. Even though the investigation was not representative, it is striking that the feces of the formula-fed neonates exhibited slightly lower Lewis-reactivity than their exclusively breast-fed counterparts (42).

As several grams of HMO pass through the breast-fed infant's gut daily, they may compensate for the initial lack of Le and Se antigens in the neonate's intestine.

In addition to the lower production of Le and Se antigens in the newborn child, there are also observations of a diminished fucose content of fecal glycans in younger infants (43) and formula-fed infants as compared to older and breast-fed individuals, respectively (44). Complementary, fucosylated HMO in milk of Secretors but not in Le^a non-Secretors decrease steadily in the first three months of lactation (1), which might be due to an adaptation of the oligosaccharide composition in milk to the infant's gut maturity. Interestingly, HMO seem to be involved in the child's intestinal cell maturation themselves (45). In a recent study the mixed-fed

babies' fecal oligosaccharides resembled the breast milk oligosaccharide patterns with little modifications. In contrast, the fecal oligosaccharide profiles from exclusively breast-fed preterm babies were substantially different from those of their mothers' milk, showing an intense metabolism in the digestive tract. Interestingly, the authors report about the additional decoration of the HMO with ABH epitopes several weeks postpartum (46) – a phenomenon first described by Lundblad as well (47). Albrecht et al. explain these time-dependent variations with the infant's individual gastrointestinal adaptation to enteral food.

Le-specific HMO might also contribute to the protective effect of breast-feeding against urinary tract infections (48), since uropathogenic *E. Coli* have been found to attach to glycolipids in non-Secretor women, presumably causing more urinary tract infections than in Secretors, where the receptor is masked by the additional α 1-2-Fuc (49). Some of the Le- and Secretor-specific HMO structures have been detected in the urine of lactating women (50,51) and more recently, also in the urine of breast-fed infants. The data suggest that the intact compounds have reached circulation after the absorption in the infant's gut and might, therefore, display systemic and local effects within the infant organism (2,52).

Identification of Lewis blood group-related compounds

Traditionally, Lewis blood group determination is performed by serological methods, which can become a challenging task. Cross reactions of the commonly used antibodies are described as well as the presence of side products leading to misinterpretations (53). For example, healthy Le(a-b-) and Le(a+b-) individuals can show a slight expression of Le^b epitopes in plasma, which may be due to mutation with incomplete inactivation of FucTIII or FucTII, respectively (54-56). The saliva of Le^a non-Secretors can also contain Le^b antigens as a result of slight FucTI activity in salivary glands (57).

Red blood cells (RBC) do not synthesize Lewis antigens themselves, but acquire them secondarily from tissues (58,59). Therefore, the serological phenotyping of RBC does not necessarily describe the Lewis genotype of a donor as the Lewis epitope expression may differ in various tissues (60-62). Genetic factors and several conditions like diseases, infections, transfusions and bone marrow transplantations can lead to alterations in the Lewis phenotype, hence, leading to misinterpretation in the blood group determination (63-67).

In pregnancy, the prevalence of Le(a-b-)-typed women can rise by 25 percentage points, which is most likely due to an increased attachment of Le-active glycolipids to plasma lipoproteins with subsequent reduction of the antigen quantity on erythrocytes (62,68). In

these individuals discordant Lewis phenotypes can be detected on RBC and saliva.

A similar situation can be observed in neonates. Most of them are typed Le(a-b-) by serological detection on RBC, while in saliva Lewis and Secretor related epitopes are already expressed, according to the genotype of the infant (69). Several weeks after birth Le^a antigen can also be detected on erythrocytes, whereas Le^b antigens are fully present in blood only at the age of 6 years, due to a delayed activation of the Secretor gene controlled FucTII (70).

In consideration of the discrepancies and the numerous influencing factors of the Lewis phenotype determination in various tissues and body fluids, the data obtained from RBC phenotyping for Lewis blood group identification need to be regarded with suspicion (71). Nevertheless, as routine method in the clinical sector it is convenient for screening purposes. For the assignment of milk samples to the distinct Lewis groups, the serological RBC-based typing of the milk donors remains a valuable tool to roughly estimate the HMO pattern expressed in milk. The link between the Lewis blood group and the oligosaccharide profile in milk is explained by the correspondence between the biosynthesis of the Lewis-active glycans present on RBC and the formation of free fucosylated oligosaccharides in the mammary gland (see above). However, due to the

described variations in the serological phenotyping as well as individual and lactation time-specific alterations in HMO expression, serology, by itself, is not sufficient to predict the relative amount of single Lewis-type oligosaccharides in milk. Detailed information on the expressed oligosaccharide patterns might be a more appropriate basis for future research on HMO, especially for functional clinical studies and investigations on the metabolism and the biological activity of HMO.

The HMO monitoring of individual samples and sample mixtures is a prominent research topic where excellent studies were done in the past. Various methods starting from paper chromatography, HPLC and HPAEC over mass spectrometric methods (MS) to latest developments in HPLC-Chip-MS and CGE-LIF techniques have been applied (16,72-81). All these powerful methods provide detailed insights into the oligosaccharide pattern of individual milk samples, frequently paired with further information about the relative amount of single isomers. Some of these techniques require sophisticated and time consuming sample preparation procedures and/or high quantities of sample material which is a drawback for large sample sets. The combination of a simple, automated and standardized sample workup procedure combined with standard MALDI-TOF-MS analysis provides the analytical power needed for

a high-throughput glycomics approach for HMO profiling (73).

Variation of the HMO pattern

Automated MALDI-TOF-MS(/MS) as an HMO screening method enables the Lewis blood group correlation of a large milk sample set and delivers, at the same time, the distinct HMO pattern of each milk sample with high reliability (73).

Recent findings in the oligosaccharide pattern of single milk samples show the necessity of an individual sample monitoring. The discrepancy described above between the serologically detected blood group and the expression of Lewis antigens in other body fluids and tissues seems to be conferrable to Le-type oligosaccharides in human milk.

From the genetic point of view a more consistent oligosaccharide pattern might be expected within a distinct Lewis blood group (82). However, several studies showed that the proportion of distinct oligosaccharide structures can vary highly between individual milk samples, dependent on lactation period and/or Lewis status (1,3,73,74,80,83).

The results of the MALDI-TOF-MS(/MS) screening of 40 milk samples from mothers with serologically determined Lewis blood group underlined these findings. Figure 2 displays mass spectra from two Le(a-b-) and two Le(a-b+) donors, which differ markedly in their HMO pattern. The confidence intervals

(95%) calculated for each HMO composition within a Lewis blood group are indicated by gray and white bars. In case of coincidence between the measured signal intensity and the predicted interval, the bar is colored gray, and otherwise, the confidence interval is white. The HMO pattern of a serologically Le(a-b-)-typed woman is depicted in Figure 2 A. A strong overexpression of Lacto-*N*-(neo)tetraose (LN(n)T, m/z 730), as well as the monofucosylated Lacto-*N*-(neo)hexaose (m/z 1241) was apparent. The multiply fucosylated species, such as difucosyllactose (m/z 657), difucosylated LN(n)T (m/z 1022) and the trifucosylated LN(n)H (m/z 1533) were substantially lower than expected or even absent. All of these three structures should contain a remarkable amount of α 1-2-Fuc, while monofucosylated and difucosylated LN(n)H might contain mainly α 1-3/4 fucosylated compounds. This leads to the conclusion that the donor might have an inefficient α 1-2-FucT in the mammary gland, which is Secretor-gene dependent. Two explanations are possible for the anomaly in the depicted mass spectrum: (i) this donor might belong to the rare subgroup of Le(a-b-) non-Secretors; (ii) the donor's Lewis phenotype is actually Le(a+b-), since the HMO profile resembles the one of a Le(a+b-) pattern with regard to the calculated confidence intervals (data not shown).

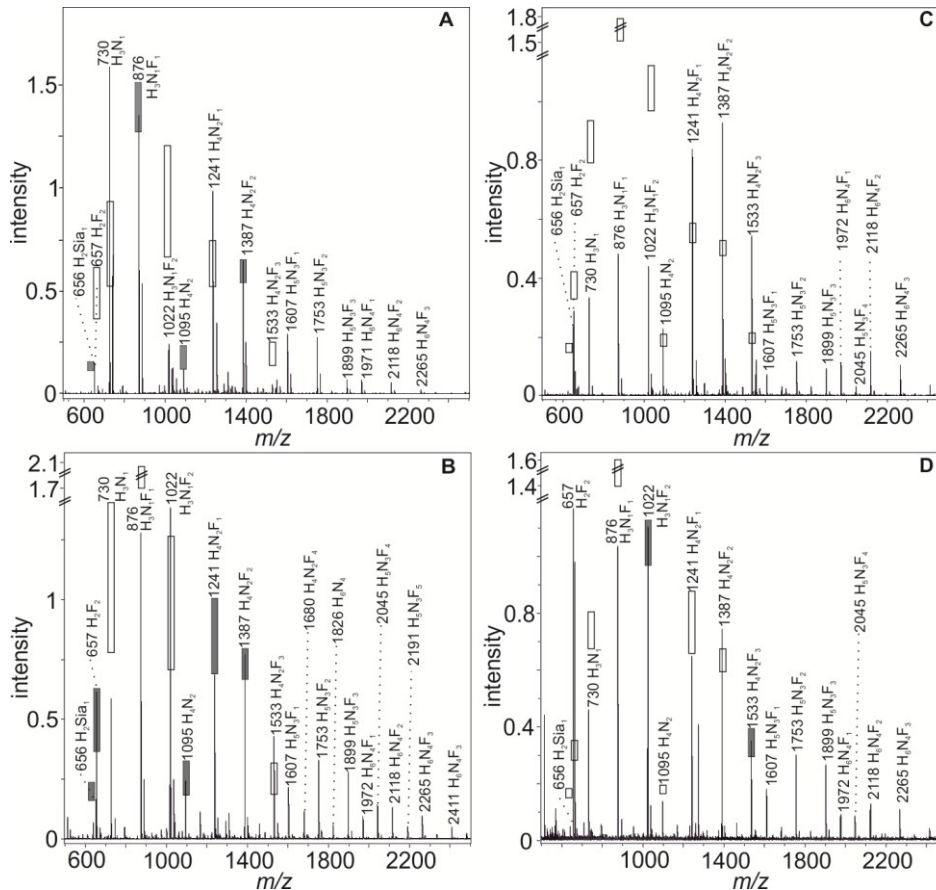


Figure 2 MALDI-TOF-MS profile spectra of four individual milk samples. Spectra displayed in A and B were obtained from two women serologically typed as Le(a-b-), in C and D as Le(a-b+), respectively. The signals represent sodium adducts. Calculated confidence intervals for each HMO composition based on data from 40 individual milk samples are illustrated by white bars if the measured signal intensity is not in the expected range and by gray bars if it is. Relative confidence intervals are described in (73) and are applied to the measured signal intensities. Due to high variance in the signal intensities of the high molecular weight HMO, confidence intervals were only calculated for signals up to m/z 1533. Compositions are calculated using Glyco-peakfinder software (94). H, hexose; N, *N*-acetylhexosamine; F, deoxyhexose (fucose).

The second Le(a-b-) sample showed the opposite phenomenon (Fig. 2 B). The non-fucosylated precursor for the complex HMO, LN(n)T (m/z 730) and its monofucosylated form FLN(n)T (m/z 876) were underexpressed, while the multiply fucosylated species difucosylated Lacto-*N*-(neo)tetraose (m/z 1022) and trifucosylated Lacto-*N*-(neo)hexaose (m/z 1533) were overexpressed. Moreover, unusually intensive signals up to a mass of 2500 Da were detected in high

abundance in this specific sample. This suggests that this donor expressed several highly efficient glycosyl- as well as fucosyltransferases forming a diverse HMO pattern also in the higher mass range, rather conforming to a Le(a-b+) HMO pattern than the expected Le(a-b-) -specific one. Since both Figure 2 A and B are atypical Le(a-b-) HMO spectra and resemble those characteristic for Le(a+b-) and Le(a-b+), respectively, the suspicion is raised that the milk HMO profiles may also reflect the partial

discordance of the serological RBC- and saliva-based Lewis phenotyping in pregnant women as discussed above.

Figure 2 C shows the HMO spectrum of a Le(a-b+) donor expressing an atypical HMO pattern, which cannot be assigned to any Lewis blood group. All signals from m/z 657 to 1022 were expressed in substantially lower intensity than expected, whereas the signals in the mass range from m/z 1095 to 1533 were overexpressed. Hence, a shift to high molecular weight HMO can be observed for this particular sample. As already discussed for Figure 2 B also in this example highly efficient glycosyl-transferases might be responsible for the observed variation.

Only slight deviations in the Le(a-b+) spectrum can be observed in Figure 2 D, except for the unexpectedly high proportion of difucosyllactose (m/z 657). The demonstrated variations in the MALDI-TOF-MS profile spectra confirm the conclusion of Thurl *et.al.* (1) that each lactating woman expresses an individual HMO pattern, even though an assignment of the HMO profiles to the distinct Lewis blood groups was applicable for the major part of the milk samples in our investigations (see below).

The importance of screening methods for detecting the individual oligosaccharide profile is emphasized furthermore by the MS/MS analysis of

the precursor m/z 1022 in a milk sample from a woman typed Le(a+b-) (Fig. 3).

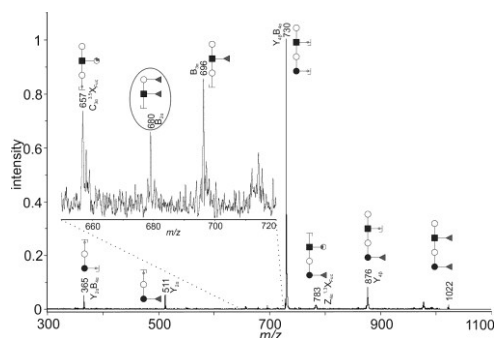


Figure 3 MALDI-TOF-MS/MS analysis of purified HMO of a Le(a+b-) donor. Inset shows range from m/z 650 to m/z 720 in 50 fold magnification. The obtained fragment ions were assigned according to the recommendations of the Consortium of Functional Glycomics using GlycoWorkbench (93). Fragment ions are designated in accordance to the nomenclature of Domon and Costello (84). In some cases fragments may be formed by different fragmentation pathways, only one of which is illustrated. All fragment ions represent sodium adducts. The unexpected signal is highlighted by an ellipse. Gray circle, galactose; black circle, glucose; black square, *N*-acetylglucosamine; black triangle, fucose.

As major isomer an LN(n)T core bearing one fucose at the reducing end and the Le^{a/x} epitope at the nonreducing end is expected in a milk sample from a Le(a+b-) donor. The most intensive fragment signals at m/z 730 ($Y_{4\beta}B_{4\alpha}$)⁴ and m/z 876 ($Y_{4\beta}$) result from the dissociation of one and two fucose residues, respectively (84). In addition, the signals m/z 696 ($B_{3\alpha}$), m/z 511 ($Y_{2\alpha}$) and m/z 365 ($Y_{2\alpha}B_{4\alpha}$) underline the presence of the likeliest precursor structure. Strikingly, an indication for the presence of a Le^{b/y} epitope is given by the signal m/z 680 ($B_{2\alpha}$), a difucosylated

⁴Fragment ions are designated in accordance to the nomenclature of Domon and Costello (84)

N-acetylglucosamine unit. The serologically detected Lewis blood group does not explain the presence of a Le^{b/y} epitope because of the lack of the Secretor-gene dependent fucosyltransferase FucTII in Le(a+b-) individuals. Nevertheless, the difucosylation of either a terminal type 1 or type 2 *N*-acetylglucosamine unit in this milk sample is an indication for α 1-2-fucosyltransferase activity. This finding confirms the unexpected presence of α 1-2-fucosyl-HMO in two serologically typed Le(a+b-) donors by Newburg et al. 2004 (11). Possibly, these findings may be explained by a slight activity of the H-gene controlled FucTI, which has been detected at least in the saliva of Le(a+b)-typed individuals (57).

The application of the fragmentation analysis of individual oligosaccharides for structural characterization is described for various mass spectrometric techniques (16,72,81,85-92). Hence, MS/MS analysis can deliver additional structural information for individual HMO compositions also in case of HMO screening.

The presented examples demonstrate the drawbacks of serological Lewis blood group classification and emphasize the necessity of individual sample mapping. Lewis phenotyping in human milk by MALDI-TOF-MS(/MS) analysis and subsequent statistical data evaluation provides the opportunity not only to assign the specimens to definite groups, but also to reveal unusual

tendencies for each individual milk sample, including its unique HMO profile (73).

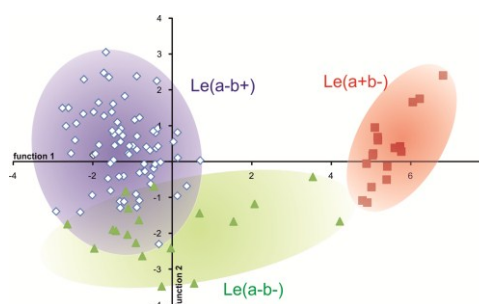


Figure 4 Discriminant analysis. The results obtained for 113 single MALDI-TOF-MS and MALDI-TOF-MS/MS measurements of 40 milk samples were subjected to discriminant analysis. Discriminant function 1 is plotted on the x-axis, discriminant function 2 on the y-axis. Unfilled diamonds, red squares and green triangles represent HMO samples from Le(a-b+), Le(a+b-) and Le(a-b-) donors, respectively. The distribution of each group is indicated by colored clouds. (With kind permission from Springer Science+Business Media: Analytical and Bioanalytical Chemistry, High-throughput mass fingerprinting and Lewis blood group assignment of human milk oligosaccharides, 401, 2011, 2495-2510, Blank D, Gebhardt S, Maass K, Lochnit G, Dotz V, Blank J, Geyer R, Kunz C, Figure 7).

Figure 4 visualizes the results from a discriminant analysis of 40 individual milk samples. By means of the new screening approach 94% of the samples were correctly assigned to the serologically detected Lewis phenotype in blood. Nevertheless, the partial inhomogeneity of the Lewis-specific HMO profiles described above is also evident from the wide distribution of the samples within the Lewis blood groups. The overlapping area of the Le(a-b+) and Le(a-b-) typed samples, in particular, displays the similarity of the oligosaccharide profiles in several specimens with a different Lewis phenotype, most likely resulting from

their Secretor gene activity. However, the fact that the major part of the milk samples was matched to the serologically detected Lewis blood group shows that a classification by both approaches can be useful, despite the variations in the expression level of single oligosaccharide compositions in milk. The location of each breakpoint in the coordinate plan therewith provides information about the Lewis phenotype tendency of a distinct milk sample and at the same time information about its actual oligosaccharide pattern. Consequentially, the new mass spectrometric screening approach provides a fast and material saving option for individual milk sample mapping with detailed information on the expression level of individual oligosaccharide compositions.

Conclusion

Serological Lewis blood group determination can only offer a first indication of the expressed oligosaccharide pattern in human milk. Modern high-throughput screening methods can support the traditional serological RBC analysis and provide detailed information on the relative abundance for each oligosaccharide composition, thus, enhancing or qualifying the conclusions of functional studies. The aspect of, in particular, individual glycan epitope recognition and its relationship to observable, biologically relevant effects will be of great benefit. Furthermore, reliable

Lewis phenotype screening, e.g. by the MALDI-TOF-MS approach presented here, can replace serological determination on erythrocytes, if no blood sample is available.

The variations between the serologically detected Lewis blood group and the Lewis phenotype in other body fluids and tissues, which are frequently reported in literature, were also detectable in human milk using the novel screening approach. Based on the determined individual HMO patterns some speculations about the activities of certain glycosyltransferases in the milk donors were deduced by taking into consideration the information from the suggested HMO biosynthetic pathway.

The combination of the traditional serological Lewis blood group detection supported by modern milk screening methods will lead to a solid glycan characterization as basis for future research on the effects of HMO from native milk.

Acknowledgements

We thank Professor G. Bein and Professor H. Jomaa (Institute of Immunology and Transfusion Medicine, University Hospital Giessen-Marburg, Germany) for performing the Lewis blood group determination of blood samples as well as Dr. P. Gilbert and his team (St. Josef's Hospital Giessen) for the collection of milk and blood samples.

References

- Thurl S, Munzert M, Henker J, Boehm G, Müller-Werner B, Jelinek J, Stahl B. Variation of human milk oligosaccharides in relation to milk groups and lactational periods. *Br J Nutr.* 2010;104:1261-71.
- Rudloff S, Pohlentz G, Borsch C, Lentze MJ, Kunz C. Urinary excretion of *in vivo* ¹³C-labelled milk oligosaccharides in breastfed infants. *Br J Nutr.* 2011.
- Kunz C, Rudloff S, Baier W, Klein N, Strobel S. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annu Rev Nutr.* 2000;20:699-722.
- Bode L. Human milk oligosaccharides: prebiotics and beyond. *Nutr Rev.* 2009;67 Suppl 2:S183-91.
- Erney R, Hilty M, Pickering L, Ruiz-Palacios G, Prieto P. Human milk oligosaccharides: a novel method provides insight into human genetics. *Adv Exp Med Biol.* 2001;501:285-97.
- Kobata A. Structures and application of oligosaccharides in human milk. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2010;86:731-47.
- Race RR, Sanger R. Blood groups in man. 6th ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1975. p. 585-8
- Grubb R. Correlation between Lewis blood group and secretor character in man. *Nature.* 1948;162:933.
- Schiff F, Sasaki H. Der Ausscheidungstypus, ein auf serologischem Wege nachweisbares mendelndes Merkmal. *Klin. Wochenschr.* 1932;11:1426-9.
- Morrow AL, Meinzen-Derr J, Huang P, Schibler KR, Cahill T, Keddache M, Kallapur SG, Newburg DS, Tabangin M, Warner BB, Jiang X. *Fucosyltransferase 2* non-secretor and low secretor status predicts severe outcomes in premature infants. *J Pediatr.* 2011;158:745-51.
- Newburg DS, Ruiz-Palacios GM, Altaye M, Chaturvedi P, Meinzen-Derr J, Guerrero Mde L, Morrow AL. Innate protection conferred by fucosylated oligosaccharides of human milk against diarrhea in breastfed infants. *Glycobiology.* 2004;14:253-63.
- Liu L, Telford JE, Knezevic A, Rudd PM. High-throughput glycoanalytical-technology for systems glycobiology. *Biochem Soc Trans.* 2010;38:1374-7.
- Rakus JF, Mahal LK. New technologies for glycomic analysis: toward a systematic understanding of the glycome. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif).* 2011;4:367-92.
- Ruhaak LR, Hennig R, Huhn C, Borowiak M, Dolhain RJ, Deelder AM, Rapp E, Wuhrer M. Optimized workflow for preparation of APTS-labeled N-glycans allowing high-throughput analysis of human plasma glycomes using 48-channel multiplexed CGE-LIF. *J Proteome Res.* 2010;9:6655-64.
- Urashima T, Fukuda K, Kitaoka M, Ohnishi M, Terabayashi T, Kobata A. *Milk Oligosaccharides.* New York: Nova Science Publishers, Inc.; 2011.
- Wu S, Tao N, German JB, Grimm R, Lebrilla CB. The development of an annotated library of neutral human milk oligosaccharides. *J Proteome Res.* 2010;9:1438-51.
- Brew K, Hill RL. Lactose biosynthesis. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1975;72:105-58.
- Brockhausen I. Biosynthesis. Biosynthesis of O-Glycans of the N-acetylglucosamine- α -Ser/Thr linkage type. In: *Glycoproteins.* Montreuil J, Vliegthart J and Schachter H. Amsterdam: Elsevier Ltd; 1995. p. 201-50.
- Roth J. Biosynthesis 4c. Compartmentation of Glycoprotein Biosynthesis. In: *Glycoproteins.* Montreuil J, Vliegthart J and Schachter H. Amsterdam: Elsevier Ltd; 1995. p. 287-312.
- McManaman JL, Neville MC. Mammary physiology and milk secretion. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;55:629-41.
- Almeida R, Amado M, David L, Lavery SB, Holmes EH, Merx G, van Kessel AG, Rygaard E, Hassan H, Bennett E, Clausen H. A family of human β 4-galactosyltransferases. Cloning and expression of two novel UDP-galactose: β -N-acetylglucosamine β 1, 4-galactosyltransferases, β 4Gal-T2 and β 4Gal-T3. *J Biol Chem.* 1997;272:31979-91.
- Sasaki K, Kurata-Miura K, Ujita M, Angata K, Nakagawa S, Sekine S, Nishi T, Fukuda M. Expression cloning of cDNA encoding a human β -1,3-N-acetylglucosaminyltransferase that is essential for poly-N-acetylglucosamine synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:14294-9.
- Khare DP, Ole H, Lemieux RU. The synthesis of monodeoxy derivatives of lacto-N-biose I and N-acetyl-lactosamine to serve as substrates for the differentiation of α -l-fucosyl transferases. *Carbohydrate Research.* 1985;136:285-308.
- Eppenberger-Castori S, Lötscher H, Finne J. Purification of the N-acetylglucosaminide α (1-3/4)fucosyltransferase of human milk. *Glycoconj J.* 1989;6:101-14.

25. Koda Y, Soejima M, Kimura H. The polymorphisms of fucosyltransferases. *Leg Med (Tokyo)*. 2001;3:2-14.
26. Betteridge A, Watkins WM. Variant forms of α -2-L-fucosyltransferase in human submaxillary glands from blood group ABH "Secretor" and "Non-secretor" Individuals. *Glycoconjugate J*. 1985;2:61-78.
27. Shen L, Grollman EF, Ginsburg V. An enzymatic basis for secretor status and blood group substance specificity in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1968;59:224-30.
28. Watkins WM. Molecular basis of antigenic specificity in the ABO, H and Lewis blood-group systems. In: *Glycoproteins*. Montreuil J, Vliegthart J and Schachter H. Amsterdam: Elsevier Science B.V.; 1995. p. 313-90.
29. Chester MA, Watkins WM. α -L-fucosyltransferases in human submaxillary gland and stomach tissues associated with the H, Le^a and Le^b blood-group characters and ABH secretor status. *Biochem Biophys Res Commun*. 1969;34:835-42.
30. Le Pendu J, Cartron JP, Lemieux RU, Oriol R. The presence of at least two different H-blood-group-related β -D-gal α -2-L-fucosyltransferases in human serum and the genetics of blood group H substances. *Am J Hum Genet*. 1985;37:749-60.
31. Daniels G. *Human Blood Groups*. 2nd ed. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2002. p. 7-98
32. Bhende YM, Deshpande CK, Bhatia HM, Sanger R, Race RR, Morgan WT, Watkins WM. A "new" blood group character related to the ABO system. *Lancet*. 1952;1:903-4.
33. Marionneau S, Cailleau-Thomas A, Rocher J, Le Moullac-Vaidye B, Ruvoën N, Clément M, Le Pendu J. ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie*. 2001;83:565-73.
34. Lane JA, Mehra RK, Carrington SD, Hickey RM. The food glycome: a source of protection against pathogen colonization in the gastrointestinal tract. *Int J Food Microbiol*. 2010;142:1-13.
35. Kunz C, Bode L, Rudloff S. Genetic variability of human milk oligosaccharides: Are there biological consequences? In: *Nestlé nutrition workshop series, Genetic expression and nutrition*. Bachmann C, and Koletzko B. Vevey: Les Presses de la Venoge; 2003. p 21-2.
36. Garrido D, Kim JH, German JB, Raybould HE, Mills DA. Oligosaccharide binding proteins from *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveal a preference for host glycans. *PLoS One*. 2011;6:e17315.
37. Ruiz-Palacios GM, Cervantes LE, Ramos P, Chavez-Munguia B, Newburg DS. *Campylobacter jejuni* binds intestinal H(O) antigen (Fu α 1, 2Gal β 1,4GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. *J Biol Chem*. 2003;278:14112-20.
38. Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Altaye M, Jiang X, Guerrero ML, Meinzen-Derr JK, Farkas T, Chaturvedi P, Pickering LK, Newburg DS. Human milk oligosaccharides are associated with protection against diarrhea in breast-fed infants. *J Pediatr*. 2004;145:297-303.
39. McGovern DP, Jones MR, Taylor KD, Marcianti K, Yan X, Dubinsky M, Ippoliti A, Vasilias E, Berel D, Derkowski C, Dutridge D, Fleshner P, Shih DQ, Melmed G, Mengesha E, King L, Pressman S, Haritunians T, Guo X, Targan SR, Rotter JI. *Fucosyltransferase 2 (FUT2)* non-secretor status is associated with Crohn's disease. *Hum Mol Genet*. 2010;19:3468-76.
40. Hanfland P, Graham HA. Immunochemistry of the Lewis-blood-group system: partial characterization of Le(a)-, Le(b)-, and H-type 1 (LedH)-blood-group active glycosphingolipids from human plasma. *Arch Biochem Biophys*. 1981;210:383-95.
41. Ramsey G, Sherman LA. Blood component recalls in the United States, 1998. *Transfusion*. 2000;40:253-4.
42. Larson G, Falk P, Hynsjö P, Midtvedt A, Midtvedt T. Faecal Excretion of Glycosphingolipids of Breast-fed and Formula-fed Infants. *Microb Ecol Health Dis*. 1990;3:305-19.
43. Pang KY, Bresson JL, Walker WA. Development of gastrointestinal surface. VIII. Lectin identification of carbohydrate differences. *Am J Physiol*. 1987;252:G685-91.
44. Albrecht S, Schols HA, van Zoeren D, van Lingen RA, Groot Jebbink LJ, van den Heuvel EG, Voragen AG, Gruppen H. Oligosaccharides in feces of breast- and formula-fed babies. *Carbohydr Res*. 2011;346:2173-81.
45. Kuntz S, Kunz C, Rudloff S. Oligosaccharides from human milk induce growth arrest via G2/M by influencing growth-related cell cycle genes in intestinal epithelial cells. *Br J Nutr*. 2009;101:1306-15.
46. Albrecht S, Schols HA, van den Heuvel EG, Voragen AG, Gruppen H. Occurrence of oligosaccharides in feces of breast-fed babies in their first six months of life and the corresponding breast milk. *Carbohydr Res*. 2011;346:2540-50.
47. Lundblad A. The persistence of milk oligosaccharides in the gastrointestinal

- tract of infants. In: New perspectives in infant nutrition. Renner B, and Sawatzki G. Stuttgart New York: Thieme; 1993. p. 66-73.
48. Marild S, Jodal U, Hanson LA. Breastfeeding and urinary-tract infection. *Lancet*. 1990;336:942.
 49. Stapleton A, Nudelman E, Clausen H, Hakomori S, Stamm WE. Binding of uropathogenic *Escherichia coli* R45 to glycolipids extracted from vaginal epithelial cells is dependent on histo-blood group secretor status. *J Clin Invest*. 1992;90:965-72.
 50. Lundblad A. Oligosaccharides from human urine. *Methods Enzymol*. 1978;50:226-35.
 51. Zopf DA, Ginsburg V, Hallgren P, Jonsson AC, Lindberg BS, Lundblad A. Determination of Le^b-active oligosaccharides in urine of pregnant and lactating women by radioimmunoassay. *Eur J Biochem*. 1979;93:431-5.
 52. Rudloff S, Pohlentz G, Diekmann L, Egge H, Kunz C. Urinary excretion of lactose and oligosaccharides in preterm infants fed human milk or infant formula. *Acta Paediatr*. 1996;85:598-603.
 53. Henry SM, Jovall PA, Ghardashkhani S, Gustavsson ML, Samuelsson BE. Structural and immunochemical identification of Le^b glycolipids in the plasma of a group O Le(a-b-) secretor. *Glycoconj J*. 1995;12:309-17.
 54. Björk S, Breimer ME, Hansson GC, Karlsson KA, Leffler H. Structures of blood group glycosphingolipids of human small intestine. A relation between the expression of fucolipids of epithelial cells and the ABO, Le and Se phenotype of the donor. *J Biol Chem*. 1987;262:6758-65.
 55. Henry SM, Oriol R, Samuelsson BE. Detection and characterization of Lewis antigens in plasma of Lewis-negative individuals. Evidence of chain extension as a result of reduced fucosyltransferase competition. *Vox Sang*. 1994;67:387-96.
 56. Miller EB, Rosenfield RE, Vogel P, Haber G, Gibbel N. The Lewis blood factors in American Negroes. *Am J Phys Anthropol*. 1954;12:427-43.
 57. Wang B, Akiyama K, Kimura H. Quantitative analysis of Le^a and Le^b antigens in human saliva. *Vox Sang*. 1994;66:280-6.
 58. Marcus DM, Cass LE. Glycosphingolipids with Lewis blood group activity: uptake by human erythrocytes. *Science*. 1969;164:553-5.
 59. Sneath JS, Sneath PH. Transformation of the Lewis groups of human red cells. *Nature*. 1955;176:172.
 60. Mollicone R, Reguigne I, Fletcher A, Aziz A, Rustam M, Weston BW, Kelly RJ, Lowe JB, Oriol R. Molecular basis for plasma $\alpha(1,3)$ -fucosyltransferase gene deficiency (FUT6). *J Biol Chem*. 1994;269:12662-71.
 61. Ørntoft TF, Holmes EH, Johnson P, Hakomori S, Clausen H. Differential tissue expression of the Lewis blood group antigens: enzymatic, immunohistologic, and immunochemical evidence for Lewis a and b antigen expression in Le(a-b-) individuals. *Blood*. 1991;77:1389-96.
 62. Yazawa S, Oh-kawara H, Nakajima T, Hosomi O, Akamatsu S, Kishi K. Histo-blood group Lewis genotyping from human hairs and blood. *Jpn J Hum Genet*. 1996;41:177-88.
 63. Hirano K, Kawa S, Oguchi H, Kobayashi T, Yonekura H, Ogata H, Homma T. Loss of Lewis antigen expression on erythrocytes in some cancer patients with high serum CA19-9 levels. *J Natl Cancer Inst*. 1987;79:1261-8.
 64. Langkilde NC, Wolf H, Ørntoft TF. Lewis negative phenotype and bladder cancer. *Lancet*. 1990;335:926.
 65. Makni S, Dalix AM, Caillard T, Compagnon B, Le Pendu J, Ayed K, Oriol R. Discordance between red cell and saliva Lewis phenotypes in patients with hydatid cysts. *Exp Clin Immunogenet*. 1987;4:136-43.
 66. Needs ME, McCarthy DM, Barrett J. ABH and Lewis antigen and antibody expression after bone marrow transplantation. *Acta Haematol*. 1987;78:13-6.
 67. Stigendal L, Olsson R, Rydberg L, Samuelsson BE. Blood group lewis phenotype on erythrocytes and in saliva in alcoholic pancreatitis and chronic liver disease. *J Clin Pathol*. 1984;37:778-82.
 68. Hammar L, Månsson S, Rohr T, Chester MA, Ginsburg V, Lundblad A, Zopf D. Lewis phenotype of erythrocytes and Le^b-active glycolipid in serum of pregnant women. *Vox Sang*. 1981;40:27-33.
 69. Lawler SD, Marshall R. Lewis and secretor characters in infancy. *Vox Sang*. 1961;6:541-54.
 70. Jordal K. The Lewis blood groups in children. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1956;39:399-406.
 71. Henry S, Oriol R, Samuelsson B. Lewis histo-blood group system and associated secretory phenotypes. *Vox Sang*. 1995;69:166-82.
 72. Albrecht S, Schols HA, van den Heuvel EG, Voragen AG, Gruppen H. CE-LIF-MSⁿ profiling of oligosaccharides in human milk and feces of breast-fed babies. *Electrophoresis*. 2010;31:1264-73.
 73. Blank D, Gebhardt S, Maass K, Lochnit G, Dotz V, Blank J, Geyer R, Kunz C. High-throughput mass finger printing and Lewis blood group assignment of human milk

- oligosaccharides. *Anal Bioanal Chem.* 2011;401:2495-510.
74. Kobata A, Ginsburg V, Tsuda M. Oligosaccharides of human milk. I. Isolation and characterization. *Arch Biochem Biophys.* 1969;130:509-13.
75. Kunz C, Rudloff S, Hintelmann A, Pohlentz G, Egge H. High-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection and molar response factors of human milk oligosaccharides. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1996;685:211-21.
76. Leo F, Asakuma S, Nakamura T, Fukuda K, Senda A, Urashima T. Improved determination of milk oligosaccharides using a single derivatization with anthranilic acid and separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2009;1216:1520-3.
77. Mariño K, Lane JA, Abrahams JL, Struwe W, Harvey DJ, Marotta M, Hickey RM, Rudd PM. Method for milk oligosaccharide profiling by 2-aminobenzamide labelling and hydrophilic interaction chromatography (HILIC). *Glycobiology.* 2011;21:1317-30.
78. Niñonuevo MR, Perkins PD, Francis J, Lamotte LM, LoCascio RG, Freeman SL, Mills DA, German JB, Grimm R, Lebrilla CB. Daily variations in oligosaccharides of human milk determined by microfluidic chips and mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 2008;56:618-26.
79. Thurl S, Henker J, Siegel M, Tovar K, Sawatzki G. Detection of four human milk groups with respect to Lewis blood group dependent oligosaccharides. *Glycoconj J.* 1997;14:795-9.
80. Viverge D, Grimmonprez L, Cassanas G, Bardet L, Solere M. Discriminant carbohydrate components of human milk according to donor secretor types. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1990;11:365-70.
81. Yang H, Yu Y, Song F, Liu S. Structural Characterization of Neutral Oligosaccharides by Laser-Enhanced In-Source Decay of MALDI-FTICR MS. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2011;22:845-55.
82. Mollicone R, Candelier JJ, Reguigne I, Couillin P, Fletcher A, Oriol R. Molecular genetics of α -L-fucosyltransferase genes (H, Se, Le, FUT4, FUT5 and FUT6). *Transfus Clin Biol.* 1994;1:91-7.
83. Stahl B, Thurl S, Henker J, Siegel M, Finke B, Sawatzki G. Detection of four human milk groups with respect to Lewis-blood-group-dependent oligosaccharides by serologic and chromatographic analysis. *Adv Exp Med Biol.* 2001;501:299-306.
84. Domon B, Costello CE. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate J.* 1988;5:397-409.
85. Amano J, Osanai M, Orita T, Sugahara D, Osumi K. Structural determination by negative-ion MALDI-QIT-TOFMSⁿ after pyrene derivatization of variously fucosylated oligosaccharides with branched decaose cores from human milk. *Glycobiology.* 2009;19:601-14.
86. Broberg A. High-performance liquid chromatography/electrospray ionization ion-trap mass spectrometry for analysis of oligosaccharides derivatized by reductive amination and N,N-dimethylation. *Carbohydr Res.* 2007;342:1462-69.
87. Ferreira JA, Domingues MR, Reis A, Monteiro MA, Coimbra MA. Differentiation of isomeric Lewis blood groups by positive ion electrospray tandem mass spectrometry. *Anal Biochem.* 2009;397:186-96.
88. Niñonuevo MR, Park Y, Yin H, Zhang J, Ward RE, Clowers BH, German JB, Freeman SL, Killeen K, Grimm R, Lebrilla CB. A strategy for annotating the human milk glycome. *J Agric Food Chem.* 2006;54:7471-80.
89. Pfenninger A, Karas M, Finke B, Stahl B. Structural analysis of underivatized neutral human milk oligosaccharides in the negative ion mode by nano-electrospray MSⁿ (part 1: methodology). *J Am Soc Mass Spectrom.* 2002a;13:1331-40.
90. Pfenninger A, Karas M, Finke B, Stahl B. Structural analysis of underivatized neutral human milk oligosaccharides in the negative ion mode by nano-electrospray MSⁿ (part 2: application to isomeric mixtures). *J Am Soc Mass Spectrom.* 2002;13:1341-8.
91. Wu S, Grimm R, German JB, Lebrilla CB. Annotation and structural analysis of sialylated human milk oligosaccharides. *J Proteome Res.* 2011;10:856-68.
92. Yamagaki T, Suzuki H, Tachibana K. A comparative study of the fragmentation of neutral lactooligosaccharides in negative-ion mode by UV-MALDI-TOF and UV-MALDI ion-trap/TOF mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2006;17:67-74.
93. Ceroni A, Maass K, Geyer H, Geyer R, Dell A, Haslam SM. GlycoWorkbench: a tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans. *J Proteome Res.* 2008;7:1650-9.
94. Maass K, Ranzinger R, Geyer H, von der Lieth CW, Geyer R. "Glyco-peakfinder"-*de novo* composition analysis of glycoconjugates. *Proteomics.* 2007;7:4435-44.

Ergänzende Anmerkungen zu Kapitel 3

Die in der Literatur beschriebenen Teile der vorgeschlagenen HMO-Biosynthese wurden mit den aus der Transfusionsmedizin bekannten Ergebnisse der Lewis Blutgruppen in direkte Verbindung gebracht. Ausgehend von diesen Daten konnten Besonderheiten in den HMO-Mustern einzelner Milchproben zugeordnet werden.

Die gezeigten Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit eines individuellen Milchproben-Screenings und zeigen die Grenzen einer Vorhersagemöglichkeit des Oligosaccharidmusters auf der Grundlage einer serologischen Blutgruppenbestimmung auf. Detektierte Besonderheiten konnten erstmals mit möglichen Enzymaktivitäten in Verbindung gebracht werden.

Die in diesem Kapitel beschriebene Anwendung des in Kapitel 2 vorgestellten Verfahrens kann die analytische Basis für zukünftige Funktions- und Metabolomstudien im Bereich der HMOs bilden.

Kapitel 4

Elucidation of a novel lacto-*N*- decaose core structure in human milk using nonlinear analytical technique combinations

D. Blank, H. Geyer, K. Maass, K. Yamashita, R. Geyer
Anal Biochem, 2012;421:680-690.

Zusammenfassung

In der vorgelegten Publikation wird die von mir entwickelte Strategie zur *de novo* Strukturaufklärung von hochmolekularen HMOs beschrieben. Beispielhaft habe ich zwei HMOs isoliert und anschließend vollständig charakterisiert. Die Kombination aus HPLC-Trennung, massenspektrometrischen Ansätzen kombiniert mit Gaschromatographie sowie chemischen und enzymatischen Abbauschritten ermöglichten mir die Strukturaufklärung einer neuen Core-Strukturklasse und eines zweifach-fucosylierten Vertreters dieser Klasse. Weiterhin konnte ich die Struktur einer difucosyl *iso*-Lacto-*N*-Octaose bestätigen.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Analytical Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yabio

Elucidation of a novel lacto-*N*-decaose core structure in human milk using nonlinear analytical technique combinations

Dennis Blank^a, Hildegard Geyer^a, Kai Maass^{a,1}, Katsuko Yamashita^b, Rudolf Geyer^{a,*}^a Institute of Biochemistry, Faculty of Medicine, Justus-Liebig-University Giessen, Friedrichstrasse 24, 35392 Giessen, Germany^b Innovative Research Initiatives, Tokyo Institute of Technology, Yokohama 226-85-1, Japan

Abstract

Detailed structural analysis of high molecular weight human milk oligosaccharides (HMOs) is still a challenging task. Here we present a modular strategy for a flexible *de novo* structural characterization of this class of molecules. The protocol combines established techniques such as separation by two-dimensional high-performance liquid chromatography with different types of mass spectrometry, exoglycosidase digestion, and linkage analysis in an individual glycan-based manner. As a proof of principle, this approach was applied to two distinct HMO isomers representing a difucosylated octaose core and a trifucosylated decaose core. Obtained data revealed the presence of one terminal Lewis A and one internal Lewis X epitope in the case of the octaose and led to the identification of this molecule as a difucosylated *iso*-lacto-*N*-octaose. The trifucosylated, doubly branched lacto-*N*-*neo*-decaose was shown to

represent a new type of HMO core structure in which the branched antenna is linked to carbon atom 3 of the innermost galactosyl residue. Hence, using this analytical protocol a novel HMO structure could be defined. Our results further demonstrate that a combination of different techniques may be required for *de novo* structural analysis of these molecules.

Introduction

Structural characterization of complex human milk oligosaccharides (HMOs) is still far away from lab routine. So far, more than 115 neutral and acidic HMOs have been described [1–4]. However, this may just represent the tip of the iceberg of expressed oligosaccharides as, in particular with increasing molecular weight and complexity as well as decreasing amounts, their analysis becomes more and more challenging. Due to the fact that accurate structural information is essential for further

research on biological functions, e.g., the interaction of HMOs with pathogens, their prebiotic as well as immunomodulatory functions and the ability of HMOs to act as soluble receptor analogs [5–10], highly sensitive methods are indispensable for precise structural elucidation of these high molecular weight oligosaccharides.

HMOs consist of five different monosaccharides: glucose (Glc), galactose (Gal), *N*-acetylglucosamine (GlcNAc), fucose (Fuc), and, in part, *N*-acetylneuraminic acid (sialic acid). The disaccharide lactose (Gal(β 1–4)Glc) always represents the reducing end of these glycans [11]. Chain elongation occurs by attachment of two different types of *N*-acetylglucosamine (LacNAc) units, which are distinguished in type I (Gal(β 1–3)GlcNAc) and type II (Gal(β 1–4)GlcNAc) LacNAc chains. These units can be either attached in (β 1–3) linkage to an internal galactose resulting in linear, so-called *para* type of structure or may be linked in both (β 1–3) and (β 1–6) position to an internal Gal leading to branched glycans. So far, 13 different core structures have been elucidated [1]. Core oligosaccharides are further decorated by three different types of fucosyl transferases which transfer fucose residues either in (α 1–2) position to terminal Gal residues, in (α 1–3) position to the Glc unit at the reducing end or in (α 1–3) or (α 1–4) position to GlcNAc moieties of type II or type I LacNAc units, respectively. Acidic HMOs may be formed by attachment of

N-acetylneuraminic acid in (α 2–3) position to terminal Gal residues of both type I LacNAc chains as well as free lactose. Moreover, the attachment of sialic acid in (α 2–6) linkage is found at the terminal Gal of type II structures, free lactose and subterminal GlcNAc units of type I chains [12].

Based on the published structural data, rules have been established delimiting the total number of possibly expressed HMOs. According to these rules, for example, only type II LacNAc chains are further elongated by additional LacNAc units. Based on published structure databases, it can be further predicted that attachment of LacNAc in (β 1–6) linkage only occurs when the (β 1–3) position of the respective Gal unit is already occupied. Moreover, the first branch point of the molecules appears to be always located at the galactose of the lactose unit and extended, branched antennae are linked to carbon 6 of this Gal residue. Finally, it has been predicted that HMOs do not comprise internal (α 1–2)-linked Fuc residues [13–15].

As HMOs are usually characterized by pronounced structural isomerism, multidimensional chromatographic separation of these compounds is often a prerequisite for subsequent structural analysis. Moreover, due to the fact that high molecular weight HMOs are only expressed in low abundance, analytical techniques must be as material saving as possible. Recently, several new and

highly sensitive methods have been published, introducing different types of mass spectrometric approaches, such as, offline nano-electrospray ionization (nano-ESI) mass spectrometry (MS) and tandem mass spectrometry (MS/MS) in the negative-ion mode [16,17], matrixassisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) after improved on-target derivatization of the glycans with 3-aminoquinoline [18,19], or HMO labeling with pyrene butanoic acid hydrazide [14,20] or 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone [21] as well as ESI-ion trap-MS/MS of permethylated HMOs using electron transfer dissociation [22]. Valuable structural information has been also achieved by hydrophilic interaction chromatography of 2-aminobenzamide-labeled glycans in conjunction with exoglycosidase digestion and offline negative-ion mode MS/MS [23] or online porous graphitic carbon-high-performance liquid chromatography (HPLC)-Chip/TOF-MS of reduced HMOs before and after exoglycosidase treatment [3,4].

All these techniques reveal important structural information, although a complete *de novo* structure elucidation of HMOs is still challenging. For HPLC-based approaches, for example, reference substances are usually needed for retention time comparison. If accessible, however, these techniques can be combined with exoglycosidase digestion and may deliver highly reproducible information about single

isomers [23]. The bottleneck of MS-based methods is that a prediction of the fragmentation pathways of complex HMO structures is often demanding and, therefore, standard substances may be again essential for correct annotation of the obtained fragment ions. Furthermore, MS/MS spectra of these glycans are widely characterized by a limited number of cross-ring cleavage products [14,16–18,20] which are needed for linkage assignment, thus increasing the risk of misinterpretation of data with respect to internal monosaccharide linkage positions. Though online MS techniques belong to the most powerful strategies for an accurate structural determination, drawbacks like the short time period, during which single isomers are accessible for further MS/MS analysis, make these methods still amendable. Most complete structural information including linkage positions and anomeric status of HMO monosaccharides can be achieved by NMR analysis [24–26]. However, though massive improvements have been made especially with regard to a reduction of the required amounts of sample, the development of 2D phase-sensitive techniques, and the development of powerful software tools enabling an annotation of even complex carbohydrate structures, NMR could not be applied in this particular case due to low amounts of material available.

Here we report on a strategy for the *de novo* structural characterization of complex HMOs using two-dimensional

preparative HPLC separation, MALDI-TOF-MS (MS) of native and permethylated glycans, and highly sensitive gas-liquid chromatography/mass spectrometry (GC/MS) linkage analyses in conjunction with exoglycosidase digestion. This combination of widely used analytical techniques enables both determination and structural affirmation in an individual manner. As exemplified for a distinct difucosylated HMO octaose isomer, the outlined panel of chemical, enzymatic, and mass spectrometric methods allowed the complete assignment of the HMO structure. Furthermore, using an individually adapted strategy a novel decaose core structure was characterized as a trifucosylated *inverse-lacto-N-neo-decaose*. Intriguingly, less than 3 nmol of each isomer was sufficient for these analyses.

Materials and methods

Reagents

2-Aminobenzamide (2AB), ammonium acetate, acetonitrile (ACN), and methanol were acquired from Merck (Darmstadt, Germany). 6-Aza-2-thiothymine (ATT) was purchased from Sigma Aldrich (Hamburg, Germany), α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) from Bruker Daltonics (Bremen, Germany), hydrofluoric acid (HF; 48%) from Carl Roth (Karlsruhe, Germany), and trifluoroacetic acid (TFA) from Promochem (Wesel, Germany). Water was filtered by a MilliQ system (Millipore,

Billerica, MA, USA). All other chemicals were ordered from Sigma Aldrich and used without further purification. (α 1-3,4)-Fucosidase from *Xanthomonas manihotis*, (β 1-4)-galactosidase from *Diplococcus pneumoniae*, (β 1-3,4)-galactosidase from bovine testis, and β -*N*-acetylhexosaminidase from jack beans were purchased from Sigma Aldrich.

Isolation of human milk oligosaccharides

Human milk was centrifuged at 2 °C. After solidified lipid was removed, ethanol was added to 68% at 0 °C. After removal of most lactose and proteins by centrifugation, the supernatant was used as crude human milk oligosaccharides [27].

Human milk oligosaccharides from a nonsecretor, Lewis (a+b-) individual were fractionated by Bio-Gel P-4 (<45 μ m) column chromatography (100 x 2 cm) at 55 °C with distilled water. The oligosaccharides were grouped into seven groups (1-7) as previously reported [28]. Groups 1, 3, 4, 5, 6, and 7 involved all sialylated oligosaccharides (group 1), (Fuc α)₀₋₄ decaoses (group 3), (Fuc α)₀₋₃ octaoses (group 4), (Fuc α)₀₋₂ hexaoses (group 5), (Fuc α)₀₋₂ tetraoses (group 6), and (Fuc α)₁₋₂ lactoses (group 7), since *N*-acetylglucosamine and (α 1-3,4) fucose residues behave as approximately 2 glucose units and 0.5 glucose units, respectively [28,29]. Group 4 was further separated by paper chromatography as described previously

[30,31]. In the present study, the difucosylated octaose fraction [30] was further separated by reversed-phase HPLC, whereas group 3 glycans were fractionated by normal-phase HPLC and sequential reversed-phase HPLC. The total amount of carbohydrate was determined by HPLC monosaccharide analysis [32]. About 1 mg of each HMO fraction was fluorescently tagged with 2AB according to the protocol described by Wuhrer et al. [33].

HPLC fractionation

Normal-phase HPLC separation was performed using a TSK gel Amide-80 column (4.6 x 250 mm; Tosoh Bioscience, Stuttgart, Germany) with fluorescence detection at 330/420 nm. ACN was used as solvent A and 0.5% ammonium acetate (pH 4.4) as solvent B. A stepwise gradient was applied from 38% B to 50% B within 28 min.

For separation of isomeric glycan mixtures, reversed-phase HPLC was performed using a LiChroCART RP-18 end-capped column (4 x 250 mm; Merck). Solvent A was 0.1% TFA; solvent B was methanol:ACN:water (4:4:92; v/v/v) including 0.1% TFA. A linear gradient from 20% to 45% solvent B was pumped in 23 min. Fluorescence was monitored at 330/420 nm.

Mass spectrometric analysis

MALDI-TOF-MS as well as MALDI-TOF-MS/MS analyses were performed using an Ultraflex I MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics)

equipped with a N₂ laser (337 nm). An acceleration voltage of 25 kV and a reflector voltage of 26.3 kV were selected, when the instrument was operated in the positive-ion mode. For MS/MS analysis, oligosaccharide fragments were generated in the laser-induced dissociation (LID) or collision-induced dissociation (CID) mode and analyzed using a precursor acceleration voltage of 8 kV and a fragment ion acceleration voltage of 19 kV. In the CID mode, argon was used as collision gas. Glycans (10–100 pmol) dissolved in 0.5 µl of water were placed on an Anchor Chip 600 target (Bruker), mixed with 0.5 µl ATT (5 mg/ml) or α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA; 13.5 mg/ml) solution, and dried down under a stream of cold air [34,35].

Selected oligosaccharide fractions were additionally analyzed after permethylation. To this end, 2AB-labeled glycans (500 pmol) were permethylated as described elsewhere [36,37]. For mass spectrometric analyses, samples were dissolved in 10 µl methanol:water (1:1; v/v) and similarly spotted on the MALDI target.

Recorded MS data were processed and analyzed using flex Analysis (Bruker) as well as Glyco-Peakfinder [38] and GlycoWorkbench [39] software tools which have been developed as part of the EUROCarbDB project [40].

Enzymatic and chemical fragmentation of glycan chains

Removal of fucose residues from individual compounds was either achieved by enzymatic digestion or HF treatment. For chemical defucosylation, 200 μ l 48% HF was added to the dried sample (500 pmol). The sample was incubated at 0 °C for 32 h and subsequently dried down under a stream of nitrogen. For complete removal of HF, the sample was twice redissolved in 200 μ l methanol and dried under nitrogen [41].

Enzymatic defucosylation was performed by treatment with α -fucosidase from *X. manihotis*. To this end, about 500 pmol of HMOs was dissolved in 15 μ l water. After addition of 4 μ l reaction buffer, supplied with the commercial defucosylation kit, and 1 μ l enzyme solution (100 μ U), samples were incubated at 37 °C for 1.5 h.

Selective removal of terminal (β 1–4)-linked Gal residues was achieved by incubation with 1 μ l β -galactosidase from *D. pneumoniae* (70 μ U) in 15 μ l 15 mM sodium acetate buffer, pH 6 at 37 °C for 1 h, whereas (β 1–3)- and/or (β 1–4)-linked galactosyl residues were released by treatment with β -galactosidase from bovine testis (900 μ U) in 15 μ l 50 mM sodium citrate buffer, pH 4.4, at 37 °C for 15 h. β -*N*-Acetylhexosaminidase from jack beans (63 mU) was applied in 15 μ l 20 mM sodium citrate buffer, pH 6, at 37 °C for 30 min to remove β -glycosidically linked GlcNAc residues.

Enzymatic on-target digestion of glycans

In order to minimize sample consumption, all enzymatic digestion steps could be also performed directly on the MALDI target as described previously [42]. To this end, enzymes (apart from α -fucosidase from *X. manihotis*) were dialyzed prior to use against 25 mM ammonium acetate buffer, adjusted to the pH values indicated above, using a floating membrane (0.025 μ m, white, VSWP; Millipore). One microliter of dialyzed enzyme solution was mixed with 1 μ l of sample solution (containing maximally 100 pmol of glycans) on the MALDI target. Incubation was carried out at 37 °C in a moist chamber for 1 h. Each spot was dried down under a stream of cold air prior to measurement. Using this approach, sequential degradation of the glycans could be achieved by stepwise digestion without intermediate sample purification.

GC/MS linkage analysis

For linkage analysis, 500 pmol of isolated HMOs was permethylated using methyl iodide after deprotonation with lithium methylsulfinyl carbanion [43] and hydrolyzed with 4 M aqueous TFA (100 °C, 4 h). Partially methylated alditol acetates were obtained after sodium borohydride reduction by peracetylation of remaining hydroxyl groups with acetic anhydride (100 μ l pyridine, 400 μ l acetic anhydride, 20 °C, 16 h). For the determination of linkage positions, resultant monosaccharide derivatives

were separated and identified by GC/MS on the basis of their retention times recorded either in the total ion chromatogram or extracted ion chromatogram (EIC) mode and their characteristic mass spectra obtained in the electron impact ionization mode. To this end, a Polaris Q instrument (Thermo Scientific, Dreieich, Germany) was used together with fused-silica bonded-phase capillary columns of different polarity (60 m VF5MS and 30 m VF200MS; Varian

Inc., Darmstadt, Germany) and helium as carrier gas as described elsewhere [44–46].

Results and discussion

Even today, *de novo* structural characterization of complex HMOs is still a challenging task. Here we describe a versatile protocol for this purpose which combines various established analytical techniques, such as two-dimensional HPLC fractionation of 2AB-labeled HMOs,

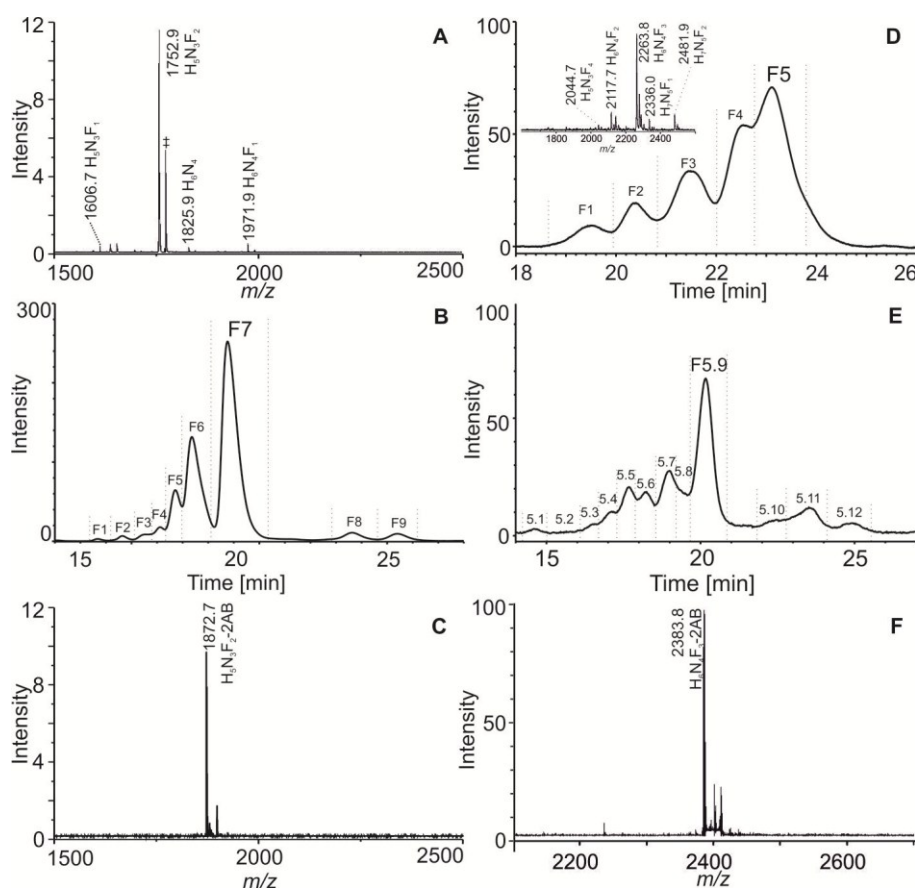


Fig.1. Isolation of individual HMO isomers. (A) MALDI-TOF-MS spectrum of the starting difucosylated octaose fraction; (B) preparative reversed-phase HPLC separation resulting in nine (F1–F9) oligosaccharide fractions; (C) MALDI-TOF-MS spectrum of purified fraction F7 glycans (compound I); (D); preparative normal-phase HPLC separation of the starting fucosylated decaoses fraction leading to five (F1–F5) oligosaccharide fractions, inset: MALDI-TOF-MS spectrum of the starting fucosylated decaoses fraction; (E) preparative reversed-phase HPLC subfractionation of fraction F5 glycans yielding 12 subfractions (5.1–5.12); (F) MALDI-TOF-MS spectrum of purified fraction F5.9 glycan (compound II). Monosaccharide compositions were calculated using Glyco-Peakfinder and GlycoWorkbench software [38,39]. Unidentified signals and potassium adducts are marked by (*) and (‡) in (A) and (F), respectively. H, hexose; N, *N*-acetylhexosamine; F, deoxyhexose (fucose).

MALDI-TOF-MS (MS) of individual native and permethylated glycans and linkage analysis of intact oligosaccharides and fragments produced thereof by exoglycosidase treatment. As a proof of principle, structures of two complex HMOs, representing a difucosylated *iso*-lacto-*N*-octaose [47] and a novel type of trifucosylated lacto-*N*-*neo*-decaose, were fully characterized by this strategy. Our study further demonstrates that structural elucidation of HMOs is still far away from high-throughput routine, requiring a selected set of complementary experiments and individual routes for each glycan.

Structure elucidation of a difucosylated iso-lacto-N-octaose isomer

HPLC purification of the glycan

MALDI-TOF-MS of the starting octaose fraction (Fig. 1A) revealed the presence of mainly Hex₅HexNAc₃Fuc₂, i.e., difucosylated octaose species. In order to separate potentially present isomers, reversed-phase HPLC fractionation was performed after 2AB labeling resulting in nine individual oligosaccharide fractions (F1–9; Fig. 1B), the major one of which (F7) was again analyzed by MALDI-TOF-MS to confirm its purity (Fig. 1C). In the following, this particular glycan fraction, designated compound I, was further analyzed in detail.

MALDI-TOF-MS analysis of compound I

First detailed structural information was obtained by MALDI-TOF-MS/MS of native, 2AB-labeled compound I glycans in the CID mode (Fig. 2A). In order to ease interpretation of the obtained mass spectrum, possible structural candidates (I–III) are additionally proposed (see insets in Fig. 2A) in agreement with linkage data obtained in parallel (see below) which excluded, for example, the presence of the linear para type of HMO structures. The resulting fragment ion spectrum revealed, in addition to the precursor ion at m/z 1872.8 (arrow), intense signals at m/z 1726.6 and 1580.6, indicating the loss of one or two fucose residues, respectively. Intriguingly, the weak signal at m/z 1045.4, reflecting a B_{4α} cleavage of the precursor ion, clearly showed that both fucose residues are located at the same antenna which is only fulfilled by isomer I. Evidence for a fucosylated lactose core or the presence of linear isomers was not obtained by this experiment. Apart from the signal at m/z 1045.4, however, remaining fragment ions were in agreement with all structural isomers proposed and did not provide any additional information of diagnostic relevance. In contrast, more detailed structural information was obtained by MALDI-TOF-MS/MS of permethylated compound I in the LID mode (Fig. 2B). In addition to the pseudomolecular ion ([M+Na]⁺) at m/z 2335.2 (arrow) and signals resulting from the liberation of small molecules

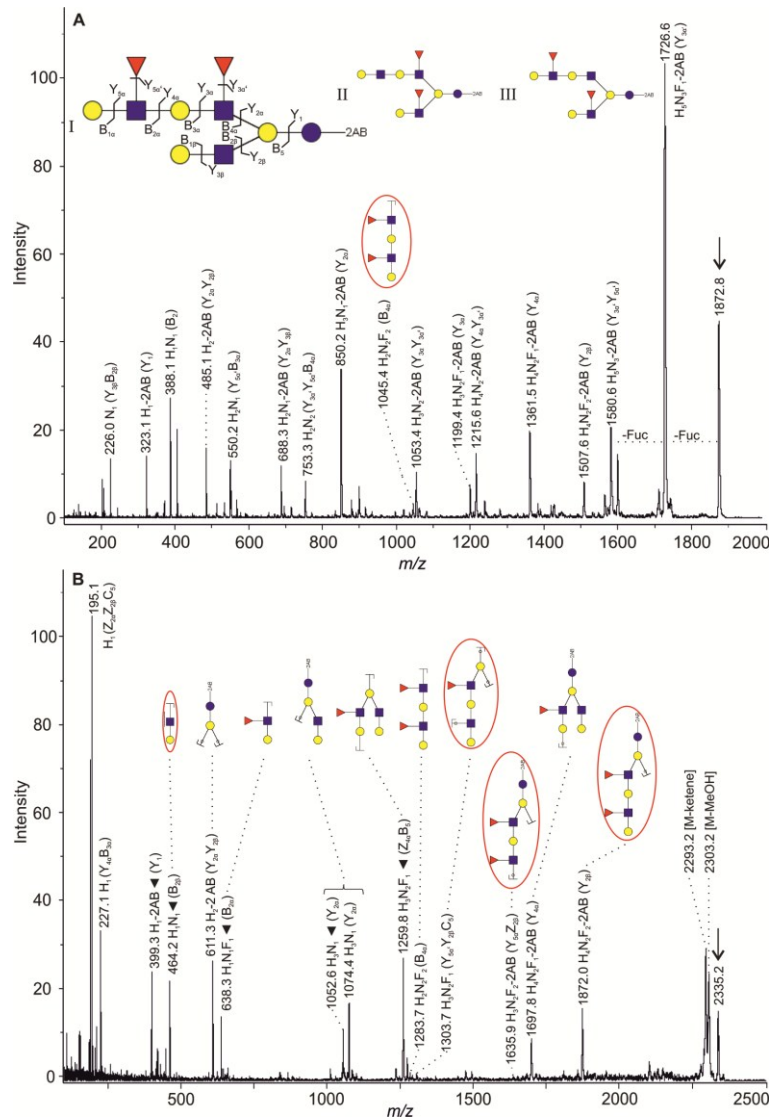


Fig.2. MALDI-TOF-MS/MS analysis of compound I. (A) MALDI-TOF-MS/MS (CID) analysis of the native, 2AB-labeled compound I. The precursor ion (m/z 1872.8) is marked by arrow. Possible structural candidates (I–III) are given as inset. (B) MALDI-TOF-MS/MS (LID) spectrum of the permethylated compound I. The precursor ion (m/z 2335.2) is marked by arrow. Monosaccharide compositions were calculated using Glyco-Peakfinder software [38]. Diagnostically relevant fragment ions are assigned using GlycoWorkbench [39]. Most important fragments are encircled. Fragment ions are designated in accordance to the nomenclature of Domon and Costello [48]. In some cases fragments may be formed by different fragmentation pathways, only one of which is illustrated. Proton adducts are marked by a black triangle (\blacktriangledown), remaining fragment ions represent sodium adducts. H, hexose; N, *N*-acetylhexosamine; F, deoxyhexose (fucose); yellow circle, galactose; blue circle, glucose; blue square, *N*-acetylglucosamine; red triangle, fucose.

like methanol (M-32) and ketene (M-42), the spectrum displayed a number of highly diagnostic fragment ions. The Y_1 ion at m/z 399.3, for example, clearly showed that the innermost Glc was not fucosylated. This assumption is corroborated by the complementary

difucosylated fragment ions at m/z 1283.7 ($H_2N_2F_2$, B_{4a}), 1635.9 ($H_3N_2F_2$ -2AB, $Y_{5\alpha}Z_{2\beta}$), and 1872.0 ($H_4N_2F_2$ -2AB, $Y_{2\beta}$), indicating that the two fucose residues were linked to a tetrasaccharide fragment consisting of two LacNAc units.

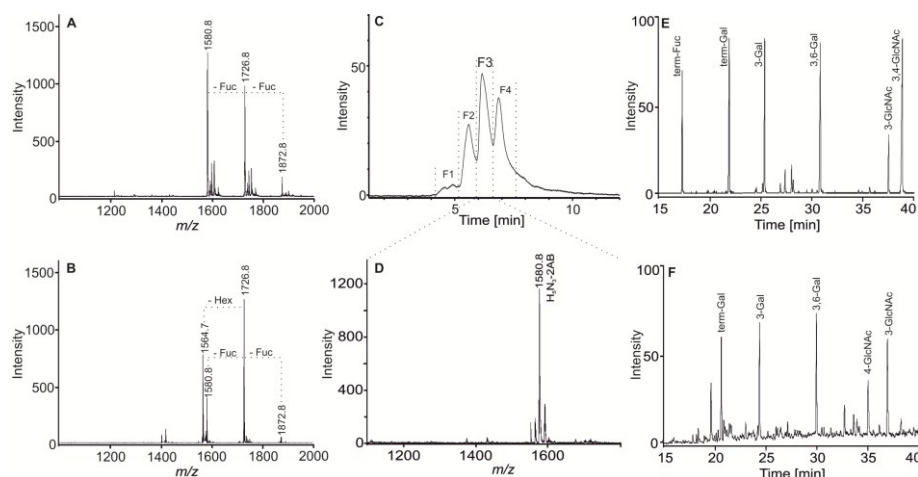


Fig.3. Analysis of compound I after defucosylation. (A) MALDI-TOF-MS spectrum of products obtained from compound I (Hex₅HexNAc₃Fuc₂-2AB, *m/z* 1872.8) after HF treatment. Mass differences reflecting the release of fucose are marked. (B) MALDI-TOF-MS spectrum of compound I-derived products after incubation with α -fucosidase from *X. manihotis*. (C) Preparative normal-phase HPLC separation of products formed by treatment of compound I with α -fucosidase yielding four oligosaccharide subfractions (F1–F4). (D) MALDI-TOF-MS spectrum of subfraction F3 representing fully defucosylated compound I glycans (Hex₅HexNAc₃-2AB, *m/z* 1580.8). (E) GC/MS linkage data of native, 2AB-labeled compound I glycans based on the EIC of *m/z* 115, 116, 129, 145, and 158. (F) GC/MS linkage data on defucosylated compound I (F3) derived from the EIC of *m/z* 129 and 158. The monosaccharide composition given in (D) was calculated using Glyco-Peakfinder software [38]. Ions registered in (A), (B), and (D) represent sodium adducts. Designation of monosaccharides as in Fig. 2.

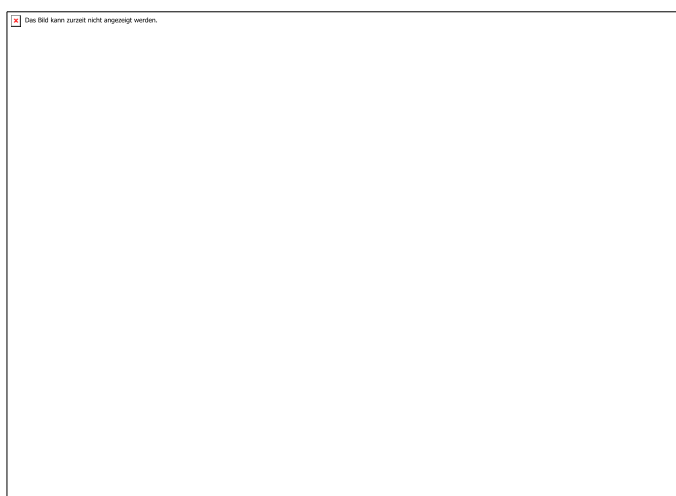


Fig.4. Allocation of the unsubstituted LacNAc antenna in compound I. (A) MALDI-TOF-MS spectrum of intact, 2AB-labeled compound I. Its proposed structure is given as inset together with a key for linkage assignment. (B) MALDI-TOF-MS spectrum of the product formed after preparative defucosylation and HPLC purification by treatment with (β 1–4)-galactosidase from *D. pneumoniae*. Signals at *m/z* 1558.8 and 1580.8 reflect proton (∇) and sodium adducts of Hex₅HexNAc₃-2AB glycans. (C) MALDI-TOF-MS spectrum of compound I after sequential degradation with β -galactosidase from bovine testis and β -*N*-acetylhexosaminidase from jack beans. The weak signal at *m/z* 1873.1 reflects remaining starting material. The proposed structure of the formed oligosaccharide fragment is shown as inset. (D) GC/MS linkage data on the product formed by treatment with β -galactosidase and β -*N*-acetylhexosaminidase based on the EIC of *m/z* 115, 116, 129, and 158. If not otherwise stated, all fragment ions represent sodium adducts. Signals referring to noncarbohydrate contaminants are marked by asterisks. Monosaccharide compositions were calculated using Glyco-Peakfinder software [38]; Graphical representations of glycan structures were assigned using GlycoWorkbench [39]. Designation of monosaccharides and color code as in Fig. 2.

Due to the fact that all unsubstituted hydroxyl groups had been converted into corresponding methyl ethers by permethylation, the degree of substitution of each monosaccharide was still detectable after the MALDI fragmentation process. Based on this line of evidence, the fragment ions at m/z 611.3 (H_2-2AB , $Y_{2\alpha}Y_{2\beta}$), 1303.7 ($H_3N_2F_1$, $Y_{5\alpha}Y_{2\beta}C_5$), and 1872.0 ($H_4N_2F_2-2AB$, $Y_{2\beta}$) clearly verified the presence of a branched structural isomer which was further supported by fragment ions at m/z 1259.8 ($H_3N_2F_1$, $Z_{4\alpha}B_5$) and m/z 1697.8 ($H_4N_2F_1-2AB$, $Y_{4\alpha}$). Finally, the fragments m/z 464.2 (H_1N_1 , $B_{2\beta}$ $[M+H]^+$), m/z 1052.6 (H_3N_1-2AB , $Y_{2\alpha}$ $[M+H]^+$), and m/z 1074.4 (H_3N_1-2AB , $Y_{2\alpha}$) indicated the presence of an unfucosylated, terminal LacNAc unit. None of the detected fragment ions provided evidence for the presence of isomers II and III. In conclusion, the obtained MS/MS data on permethylated compound I species provided important information on the overall architecture of the oligosaccharide in agreement with isomer I in Fig. 2A, but did not deliver any data concerning linkage positions.

Defucosylation and linkage analysis of compound I

For detailed structural and linkage analysis, defucosylation was performed using either HF or α -fucosidase from *X. manihotis*. As shown in Fig. 3A and B, both methods yielded only a partial release of fucosyl residues from the precursor molecule (m/z 1872.8) which

was even more pronounced after enzymatic digestion. Possibly, linkage of the second Fuc residue to an internal LacNAc unit might result in steric hindrance of the used enzyme. Moreover, enzymatic digestion resulted, in part, also in the release of one hexose unit (Fig. 2B). Products obtained after defucosylation were fractionated by normal-phase HPLC (Fig. 3C). MALDI-TOF-MS analysis of the obtained subfractions (F1–F4) revealed that only subfraction F3 contained completely defucosylated octaose glycans (Fig. 3D) which were used for subsequent analysis.

To assign the linkage positions of fucose residues, GC/MS linkage data of the intact compound I glycans (Fig. 3E) were compared with those obtained for fully defucosylated compound I-derived octaose species (Fig. 3F). The results obtained in the case of intact compound I revealed the presence of terminal Fuc, terminal Gal, 3-substituted and 3,6-disubstituted Gal in a ratio of about 1:1 as well as 3-substituted and 3,4-disubstituted GlcNAc in a ratio approaching 1:2, thus demonstrating the presence of two fucosylated LacNAc units in addition to one unsubstituted type I LacNAc chain. Furthermore, the presence of a 3,6-disubstituted Gal derivative confirmed the branched topology of these glycans (cf. Fig. 2A). Removal of fucose resulted in a loss of terminal Fuc and 3,4-disubstituted GlcNAc residues and the presence of 3-substituted and 4-substituted GlcNAc

in a ratio of 2:1 (Fig. 3F), thus supporting the assumption that original compound I glycans comprised one fucosylated type I and one fucosylated type II LacNAc unit. The substitution pattern of the detected galactosyl residues remained unchanged.

Exoglycosidase digestion of compound I

In order to achieve complete structural assignment, compound I glycans (Fig. 4A) were treated with (β 1-4)-galactosidase from *D. pneumoniae* after defucosylation and HPLC purification as outlined above. The resulting product was analyzed by MALDI-TOF-MS (Fig. 4B). The spectrum displayed only two major signals representing proton (m/z 1558.8) and sodium (m/z 1580.8) adducts of H₅N₃-2AB, demonstrating that both terminal LacNAc units represent type I chains which are resistant to this enzyme. Therefore, it can be postulated that the identified type II unit is located in a subterminal position.

To allocate the unsubstituted type I LacNAc unit, compound I glycans were sequentially digested on-target with β -galactosidase from bovine testis and β -*N*-acetylhexosaminidase from jack beans. Products were analyzed by MALDI-TOF-MS (Fig. 4C) which revealed a pseudomolecular product ion ($[M+Na]^+$) at m/z 1507.6 verifying the removal of one Hex and one HexNAc residue. In order to assign the exact linkage position of the remaining antenna, resulting H₄N₂F₂-2AB glycans

were preparatively digested with these two enzymes prior to linkage analysis. Subsequently obtained linkage data revealed the presence of terminal Fuc, terminal Gal, 3-substituted and 6-substituted Gal, as well as the exclusive occurrence of 3,4-disubstituted GlcNAc (Fig. 4D). The conversion of 3,6-disubstituted Gal into 6-substituted Gal unambiguously demonstrated that the free type I LacNAc unit was linked to C3 of the branching galactosyl residue, whereas the difucosylated antenna is linked to C6. Taking all pieces of information together, the structure of compound I could be thus determined as a difucosylated *iso*-lacto-*N*-octaose isomer [47].

*Structure elucidation of a novel trifucosylated lacto-*N*-neo-decaose isomer*

HPLC purification of the glycan

In order to prove the general applicability of the designed analytical strategy, the outlined protocol was applied to a second HMO fraction comprising primarily fucosylated decaose species. The MALDI-TOF-MS spectrum of the starting glycan fraction demonstrated the presence of five different compositional species, the main compound of which represented Hex₆HexNAc₄Fuc₃-2AB glycans (see inset in Fig. 1D). Minor components were identified as glycans with compositions of Hex₅HexNAc₃Fuc₄-2AB, Hex₆HexNAc₄Fuc₂-2AB, Hex₇HexNAc₅Fuc₁-2AB, and

Hex₇HexNAc₅Fuc₂-2AB. Due to the presence of both different compositional gain individual trifucosylated lacto-*N*-decaose isomers. Therefore, the glycan mixture was first subjected to size fractionation by normal-phase HPLC resulting in 5 fractions (F1–F5; Fig. 1D). Major fraction F5 was further subfractionated by reversed-phase HPLC yielding in total 12 subfractions (F5.1–F5.12; Fig. 1E). Intriguingly, all glycans obtained in subfractions F5.1–F5.9 exhibited the same composition (Hex₆HexNAc₄Fuc₃-2AB) and represented obviously structural isomers. Fraction F5.9 glycans (Fig. 1F), representing the main trifucosylated lacto-*N*-decaose isomer, were further analyzed as compound II.

MALDI-TOF-MS analysis of compound II

In order to obtain first information on the overall architecture of the glycan, oligosaccharides were again analyzed by MALDI-TOFMS/MS (CID) (Fig. 5A) and MALDI-TOF-MS/MS (LID) (Fig. 5B) in native and permethylated states, respectively. Based on linkage data described below, three doubly branched structures with different fucosylation patterns were taken into account as most likely structural candidates (see isomers I–III in Fig. 5B). Similar to compound I described above, however, the MS/MS spectrum of native glycans revealed only limited structural information, though top-down annotation clearly indicated the underlying monosaccharide sequence ending with

and isomeric species, one-dimensional HPLC separation was not sufficient to the sodium adduct of a B-type ion of LacNAc (m/z 388.1).

In contrast, tandem mass spectrometry of permethylated glycans resulted in fragment ions of high diagnostic value (Fig. 5B). The fragment ion at m/z 611.3 (Hex₂-2AB; Y_{2 α} Y_{2 β}), for example, underlined the assumption that the lactose core was not fucosylated and demonstrated a twofold substitution of the penultimate hexose, whereas the signal at m/z 638.3 (Hex₁HexNAc₁Fuc₁; [M+H]⁺ B₂) substantiated the presence of at least one terminal Le^{ax} epitope. The twofold branching and the fucosylation of both terminal LacNAc units of this antenna were verified by the signals at m/z 1505.7 (Hex₃HexNAc₂Fuc₂; C_{3 α}), m/z 1710.8 and 1732.8 (Hex₃HexNAc₃Fuc₂; B_{4 α}), and m/z 2320.9 (Hex₅HexNAc₃Fuc₂-2AB; Y_{2 β}). Moreover, fucosylation of the internal LacNAc unit could be thus excluded ruling out the presence of isomers II and III. The weak fragment ions at m/z 1085.5 (Hex₂HexNAc₂-2AB; Y_{3 α} Y_{3 β} Y_{3 β '}) and m/z 1493.8 (Hex₃HexNAc₂Fuc₁-2AB; Y_{3 α}) further indicated that one fucosyl residue is linked to the terminal LacNAc unit representing the shorter antenna of this structural isomer. As indicated in Fig. 5 by dotted lines, fragment ions with similar monosaccharide compositions were also observed in the MS/MS spectrum of native glycans. It must be kept in mind, however,

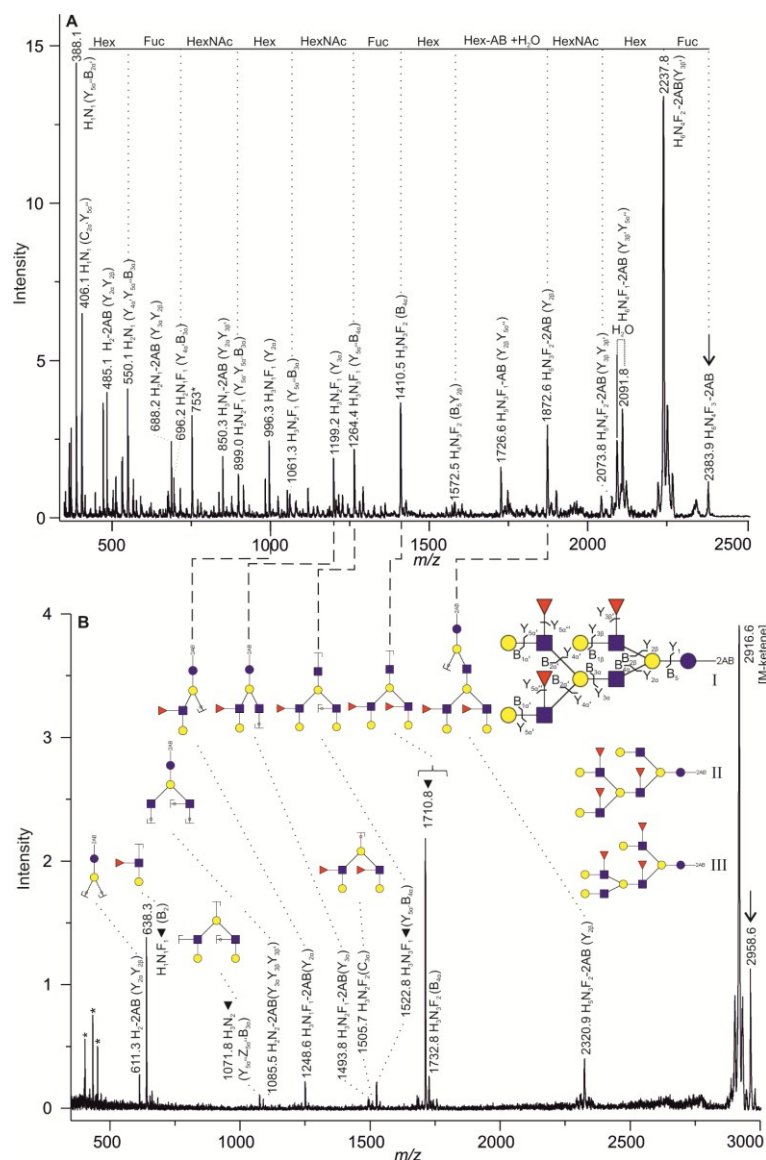


Fig.5. MALDI-TOF-MS/MS analysis of compound II. (A) MALDI-TOF-MS/MS (CID) analysis of native, 2AB-labeled compound II. The precursor ion (m/z 2383.9) is marked by arrow and a top down annotation is displayed. (B) MALDI-TOF-MS/MS (LID) spectrum of compound II after permethylation. Possible structural candidates (I–III) are given as inset. The precursor ion (m/z 2958.6) is marked by arrow. Monosaccharide compositions were calculated using GlycoPeakfinder software [38]. Fragment ions were assigned using GlycoWorkbench [39] and designated in accordance to the nomenclature of Domon and Costello [48]. In some cases fragments may be formed by different fragmentation pathways, only one of which is illustrated. Proton adducts are marked by a black triangle (\blacktriangledown); the remaining fragment ions represent sodium adducts. Fragments occurring in both spectra are specified by dashed lines. Signals referring to noncarbohydrate contaminants are marked by asterisks. Designation of monosaccharides and color code as in Fig. 2.

that due to the incapability of distinguishing between substituted and nonsubstituted monosaccharide units in this case, observed ions might have been formed by different ways of

fragmentation. Nonetheless, MALDI-TOF-MS/MS of the intact glycan provided important information on its overall structure and confirmed isomer I as the most likely structural candidate,

though precise monosaccharide linkage positions were not defined this way.

Exoglycosidase digestion and linkage analysis of compound II

Starting from intact compound II glycans, a multistep digestion route was developed to determine both monosaccharide linkage positions and anomeric configurations in combination with GC/MS, chemical derivatization, and MALDI-TOF-MS(/MS) analysis.

As evidenced by MALDI-TOF-MS (see Fig. 6A and B), treatment of compound II oligosaccharides with β -galactosidase from bovine testis failed to release any hexose units in agreement with our previous finding that all terminal LacNAc units were fucosylated. GC/MS linkage analysis showed the presence of terminal Fuc, terminal Gal, and 3,6-disubstituted Gal as well as 4-substituted and 3,4-disubstituted GlcNAc in a ratio of 1:3 (see inset in Fig. 6A), thus verifying the occurrence of one nonsubstituted type II LacNAc unit as well as three Le^{ax} epitopes.

In contrast to the data on compound I described above, however, enzymatic defucosylation could be easily achieved with α -fucosidase from *X. manihotis* in this case leading to a main product with m/z 1945.7 ($[M+Na]^+$) and a composition of H₆N₄-2AB, in addition to small amounts of glycans still carrying one (m/z 2091.7) or two (m/z 2237.8) Fuc residues (Fig. 6C). In agreement with

the data described above, it might be, therefore, speculated that fucose residues linked to terminal LacNAc units are more easily accessible to cleavage by this enzyme than internal Le^{ax} determinants. GC/MS linkage analysis of an aliquot of these glycans verified terminal and 3,6-disubstituted Gal residues as well as 3-substituted and 4-substituted GlcNAc in a 1:1 ratio, thus demonstrating the occurrence of two type I and two type II LacNAc units (see inset in Fig. 6C). As one type II chain has been found to be nonfucosylated and located in internal position (see above), this result further demonstrated the presence of one Le^x and two Le^a epitopes in terminal positions in the original molecule.

To assign the exact linkage position of the second type II LacNAc unit, the defucosylated sample was treated with (β 1–4)-galactosidase from *D. pneumoniae* which resulted mainly in the removal of one galactosyl residue as evidenced by MALDI-TOF-MS (Fig. 6D). In addition, minor signals were detectable reflecting small amounts of remaining starting material or products lacking an additional hexose residue. The question as to whether the latter signal is due to the presence of small amounts of a second isomer has not been investigated. To gain further structural information, an aliquot of the formed product was permethylated and analyzed by MALDI-TOF-MS/MS (LID).

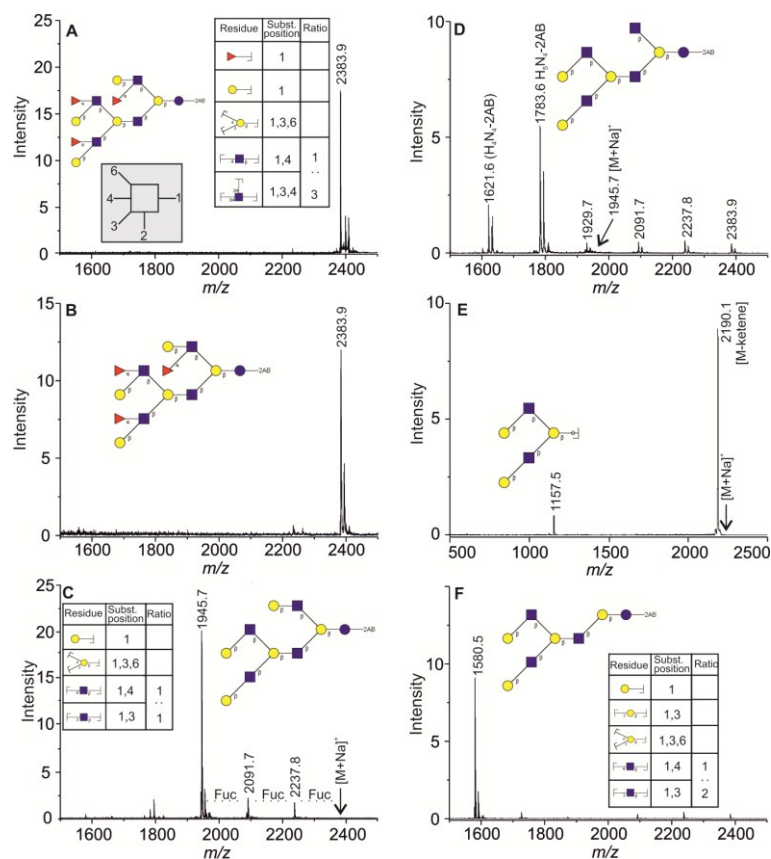


Fig.6. Structural analysis of compound II. (A) MALDI-TOF-MS spectrum and linkage data of intact, 2AB-labeled compound II. Its proposed structure is given as inset together with a key for linkage assignment. The given table summarizes linkage data including substitution positions and peak ratios of GlcNAc derivatives. (B) MALDI-TOF-MS spectrum obtained after treatment with β -galactosidase from bovine testis. (C) MALDI-TOF-MS spectrum and linkage data of the defucosylated products obtained by treatment of compound II with α -fucosidase. The given table displays deduced monosaccharide substitution positions and peak ratios of GlcNAc derivatives. (D) MALDI-TOFMS spectrum of products obtained by consecutive treatment of compound II with α -fucosidase and (β 1–4)-galactosidase from *D. pneumoniae*. (E) MALDI-TOF-MS/MS (LID) spectrum of permethylated products obtained from compound II by treatment with α -fucosidase and (β 1–4)-galactosidase. (F) MALDI-TOF-MS spectrum and linkage data of the product obtained after treatment of compound II with α -fucosidase, (β 1–4)-galactosidase, and β -*N*-acetylhexosaminidase. The given table displays deduced monosaccharide substitution positions and peak ratios of GlcNAc derivatives. Monosaccharide compositions were calculated using Glyco-Peakfinder software [38] and fragment ions were assigned using GlycoWorkbench [39]. Labeled ions represent sodium adducts; precursor ions are marked by arrows in (C), (D), and (E). Designation of monosaccharides and color code as in Fig. 2.

The spectrum revealed a significant fragment ion at m/z 1157.5 (H_3N_2 ; $C_{3\alpha}$) which verified that the Gal residue released by (β 1–4)-galactosidase was not derived from the branched antenna (Fig. 6E).

To finally allocate the second type II LacNAc unit at the core galactose, the product formed by treatment of compound II glycans with α -fucosidase

and (β 1–4)-galactosidase (cf. Fig. 6D) was further incubated with β -*N*-acetylhexosaminidase from jack beans to fully digest the type II antenna. The MALDI-TOF-MS spectrum of the obtained product (Fig. 6F) confirmed a complete removal of this antenna as evidence by a pseudomolecular ion ($[M+Na]^+$) at m/z 1580.5 (H_5N_3 -2AB).

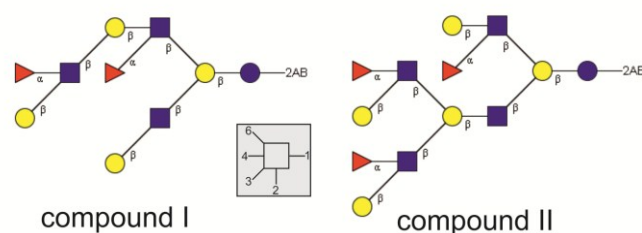


Fig.7. Proposed structures of compound I and compound II. A schematic diagram illustrating the different linkage positions is added as inset. Yellow circle, galactose; blue circle, glucose; blue square, *N*-acetylglucosamine; red triangle, fucose.

Subsequent GC/MS linkage analysis revealed the presence of terminal, 3-substituted and 3,6-disubstituted Gal as well as 3-substituted and 4-substituted GlcNAc approaching a ratio of 2:1 (see inset in Fig. 6F). Hence, the conversion of one 3,6-disubstituted Gal into 3-substituted Gal upon removal of the monomeric LacNAc unit clearly demonstrated that the short antenna was linked to C6 of the core galactose, whereas the extended, branched antenna was bound to C3. Taken together, the described results confirm that the outlined analytical strategy allows a complete *de novo* structural elucidation of this class of molecules.

Conclusion

In this study, a nonlinear combination of sensitive methods has been designed for the *de novo* structural determination of highly complex human milk oligosaccharides which takes into account the specific structural features of the individual glycans. Starting HMO mixtures were first labeled with 2-aminobenzamide and then fractionated by one- or two-dimensional HPLC. Using this approach, even heterogeneous mixtures of high

molecular weight structural isomers of HMOs could be successfully separated. Subsequently, established analytical techniques, such as MALDI-TOF-MS (/MS) of native or permethylated glycans and GC/MS-linkage analysis, were stepwise combined with a targeted chemical or enzymatic degradation of these molecules, thus allowing the structural elucidation of two HMO species (Fig. 7). It must be pointed out, however, that the sequence of analytical steps must be carefully optimized for each individual glycan. This is evidenced, for example, by the finding that defucosylation of the studied decaose (compound II) could easily be achieved by incubation with α -fucosidase from *X. manihotis*, whereas fucose residues of compound I were, at least in part, more resistant to this enzyme.

The most striking result of the performed carbohydrate structure analysis was the identification of a novel decaose core structure which clearly differed from the 13 core structures described so far [1]. The most remarkable feature of this structure is the position of the extended, branched antenna which is glycosidically linked to the hydroxyl group at carbon

atom three of the innermost Gal, whereas so far published structures exhibit the longer antenna in position six of the innermost Gal. For this reason this core structure is proposed to be named *inverse-lacto-N-neo-decaose* (inverse-LNnD). This finding clearly illustrates the necessity of linkage analyses in each case and further indicates that the heterogeneity of HMO structures may be even greater than expected, in particular in the case of larger glycan species.

Acknowledgments

This work was financially supported by the Sixth Research Framework Program of the European Union within the EUROCarbDB project (<http://www.eurocarbdb.org>, Design Studies Related to the Development of Distributed, Web-based European Carbohydrate Databases; RIDS Contract Number 011952). We thank Professor Clemens Kunz, Institute of Nutritional Science, Justus-Liebig-University Giessen, for fruitful discussions and helpful advice. Moreover, the technical support given by Werner Mink and Peter Kaese is gratefully acknowledged.

References

1. T. Urashima, K. Fukuda, M. Kitaoka, M. Ohnishi, T. Terabayashi, and A. Kobata, *Milk Oligosaccharides*, Nova Science Publishers, Inc., New York, 2011.
2. B. Stahl, S. Thurl, J. Zeng, M. Karas, F. Hillenkamp, M. Steup, and G. Sawatzki, Oligosaccharides from human milk as revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 223 (1994) 218-226.
3. S. Wu, R. Grimm, J.B. German, and C.B. Lebrilla, Annotation and structural analysis of sialylated human milk oligosaccharides, *J. Proteome Res.* 10 (2011) 856-868.
4. S. Wu, N. Tao, J.B. German, R. Grimm, and C.B. Lebrilla, The development of an annotated library of neutral human milk oligosaccharides, *J. Proteome Res.* 9 (2010) 4138-4151.
5. L. Bode, Human milk oligosaccharides: prebiotics and beyond, *Nutr. Rev.* 67 Suppl 2 (2009) S183-191.
6. D.S. Newburg, G.M. Ruiz-Palacios, M. Altaye, P. Chaturvedi, J. Meinzen-Derr, L. Guerrero Mde, and A.L. Morrow, Innate protection conferred by fucosylated oligosaccharides of human milk against diarrhea in breastfed infants, *Glycobiology* 14 (2004) 253-263.
7. G.M. Ruiz-Palacios, L.E. Cervantes, P. Ramos, B. Chavez-Munguia, and D.S. Newburg, *Campylobacter jejuni* binds intestinal H(O) antigen (Fucd1, 2Gal β 1, 4GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 14112-14120.
8. P. Hong, M.R. Ninonuevo, B. Lee, C. Lebrilla, and L. Bode, Human milk oligosaccharides reduce HIV-1-gp120 binding to dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (DC-SIGN), *Br. J. Nutr.* 101 (2009) 482-486.
9. A.P. Vos, M. Haarman, A. Bucu, M. Govers, J. Knol, J. Garssen, B. Stahl, G. Boehm, and L. M'Rabet, A specific prebiotic oligosaccharide mixture stimulates delayed-type hypersensitivity in a murine influenza vaccination model, *Int. Immunopharmacol.* 6 (2006) 1277-1286.
10. A. El-Hawiet, E.N. Kitova, P. Kitov, L. Eugenio, K.K. Ng, G.L. Mulvey, T.C. Dingle, A. Szpacenko, G.D. Armstrong, and J.S. Klassen, Binding of clostridium difficile toxins to human milk oligosaccharides, *Glycobiology* 21 (2011) 1217-1227.
11. S. Thurl, M. Munzert, J. Henker, G. Boehm, B. Müller-Werner, J. Jelinek, and B. Stahl, Variation of human milk oligosaccharides in relation to milk groups and lactational periods, *Br. J. Nutr.* 104 (2010) 1261-1271.
12. C. Kunz, S. Rudloff, W. Baier, N. Klein, and S. Strobel, Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects, *Annu. Rev. Nutr.* 20 (2000) 699-722.
13. A. Kobata, Structures and application of oligosaccharides in human milk, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 86 (2010) 731-747.
14. J. Amano, M. Osanai, T. Orita, D. Sugahara, and K. Osumi, Structural determination by negative-ion MALDI-QIT-TOFMSⁿ after pyrene derivatization of variously fucosylated oligosaccharides with branched decaose cores from human milk, *Glycobiology* 19 (2009) 601-614.
15. A. Kobata, Possible application of milk oligosaccharides for drug development, *Chang Gung Med. J.* 26 (2003) 621-636.
16. A. Pfenninger, M. Karas, B. Finke, and B. Stahl, Structural analysis of underivatized neutral human milk oligosaccharides in the negative ion mode by nano-electrospray MS⁽ⁿ⁾ (part 2: application to isomeric mixtures), *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 13 (2002) 1341-1348.
17. A. Pfenninger, M. Karas, B. Finke, and B. Stahl, Structural analysis of underivatized neutral human milk oligosaccharides in the negative ion mode by nano-electrospray MS⁽ⁿ⁾ (part 1: methodology), *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 13 (2002) 1331-1340.
18. M. Rohmer, B. Meyer, M. Mank, B. Stahl, U. Bahr, and M. Karas, 3-Aminoquinoline acting as matrix and derivatizing agent for MALDI MS analysis of oligosaccharides, *Anal. Chem.* 82 (2010) 3719-3726.
19. M. Rohmer, D. Baeumlisberger, B. Stahl, U. Bahr, and M. Karas, Fragmentation of neutral oligosaccharides using the MALDI LTQ Orbitrap, *Int. J. Mass Spectrom.* 305 (2011) 199-208.
20. J. Amano, D. Sugahara, K. Osumi, and K. Tanaka, Negative-ion MALDI-QIT-TOFMSⁿ for structural determination of fucosylated and sialylated oligosaccharides labeled with a pyrene derivative, *Glycobiology* 19 (2009) 592-600.
21. P. Zhang, Y. Zhang, X. Xue, C. Wang, Z. Wang, and L. Huang, Relative quantitation of glycans using stable isotopic labels 1-(d0/d5) phenyl-3-methyl-5-pyrazolone by mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 418 (2011) 1-9.

22. L. Han, and C.E. Costello, Investigation of structures and fragmentation pathways by electron transfer dissociation of permethylated milk sugars, *Glycobiology* 20 (2010) 1514-1515.
23. K. Mariño, J.A. Lane, J.L. Abrahams, W.B. Struwe, D.J. Harvey, M. Marotta, R.M. Hickey, and P.M. Rudd, Method for milk oligosaccharide profiling by 2-aminobenzamide labeling and hydrophilic interaction chromatography, *Glycobiology* 21 (2011) 1317-1330.
24. H. Kogelberg, V.E. Piskarev, Y. Zhang, A.M. Lawson, and W. Chai, Determination by electrospray mass spectrometry and ¹H-NMR spectroscopy of primary structures of variously fucosylated neutral oligosaccharides based on the iso-lacto-*N*-octaose core, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 1172-1186.
25. K. Goto, K. Fukuda, A. Senda, T. Saito, K. Kimura, K.E. Glander, K. Hinde, W. Dittus, L.A. Milligan, M.L. Power, O.T. Oftedal, and T. Urashima, Chemical characterization of oligosaccharides in the milk of six species of New and Old world monkeys, *Glycoconj. J.* 27 (2010) 703-715.
26. W. Chai, V.E. Piskarev, Y. Zhang, A.M. Lawson, and H. Kogelberg, Structural determination of novel lacto-*N*-decaose and its monofucosylated analogue from human milk by electrospray tandem mass spectrometry and ¹H NMR spectroscopy, *Arch. Biochem. Biophys.* 434 (2005) 116-127.
27. A. Kobata, Isolation of oligosaccharides from human milk, *Methods Enzymol.* 28 (1972) 262-271.
28. A. Kobata, K. Yamashita, and Y. Tachibana, Oligosaccharides from human milk, *Methods Enzymol.* 50 (1978) 216-220.
29. K. Yamashita, T. Mizuochi, and A. Kobata, Analysis of oligosaccharides by gel filtration, *Methods Enzymol.* 83 (1982) 105-126.
30. Y. Tachibana, K. Yamashita, and A. Kobata, Oligosaccharides of human milk: structural studies of di- and trifucosyl derivatives of lacto-*N*-octaose and lacto-*N*-neoctaose, *Arch. Biochem. Biophys.* 188 (1978) 83-89.
31. K. Yamashita, Y. Tachibana, and A. Kobata, Oligosaccharides of human milk: isolation and characterization of two new nonasaccharides, monofucosyllacto-*N*-octaose and monofucosyllacto-*N*-neoctaose, *Biochemistry* 15 (1976) 3950-3955.
32. K.R. Anumula, Quantitative determination of monosaccharides in glycoproteins by high-performance liquid chromatography with highly sensitive fluorescence detection, *Anal. Biochem.* 220 (1994) 275-283.
33. M. Wuhrer, C.A. Koeleman, and A.M. Deelder, Two-dimensional HPLC separation with reverse-phase-nano-LC-MS/MS for the characterization of glycan pools after labeling with 2-aminobenzamide, *Methods Mol. Biol.* 534 (2009) 79-91.
34. H. Geyer, M. Wuhrer, A. Resemann, and R. Geyer, Identification and characterization of keyhole limpet hemocyanin *N*-glycans mediating cross-reactivity with *Schistosoma mansoni*, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 40731-40748.
35. M. Wuhrer, M.L. Robijn, C.A. Koeleman, C.I. Balog, R. Geyer, A.M. Deelder, and C.H. Hokke, A novel Gal(β1-4)Gal(β1-4)Fuc(α1-6)-core modification attached to the proximal *N*-acetylglucosamine of keyhole limpet haemocyanin (KLH) *N*-glycans, *Biochem. J.* 378 (2004) 625-632.
36. I. Ciucanu, and C.E. Costello, Elimination of oxidative degradation during the per-O-methylation of carbohydrates, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 16213-16219.
37. J. Jang-Lee, S.J. North, M. Sutton-Smith, D. Goldberg, M. Panico, H. Morris, S. Haslam, and A. Dell, Glycomic profiling of cells and tissues by mass spectrometry: fingerprinting and sequencing methodologies, *Methods Enzymol.* 415 (2006) 59-86.
38. K. Maass, R. Ranzinger, H. Geyer, C.W. Von der Lieth, and R. Geyer, "Glyco-Peakfinder" - *de novo* composition analysis of glycoconjugates, *Proteomics* 7 (2007) 4435-4444.
39. A. Ceroni, K. Maass, H. Geyer, R. Geyer, A. Dell, and S.M. Haslam, GlycoWorkbench: A tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans, *J. Proteome Res.* 7 (2008) 1650-1659.
40. C.W. von der Lieth, A.A. Freire, D. Blank, M.P. Campbell, A. Ceroni, D.R. Damerell, A. Dell, R.A. Dwek, B. Ernst, R. Fogh, M. Frank, H. Geyer, R. Geyer, M.J. Harrison, K. Henrick, S. Herget, W.E. Hull, J. Ionides, H.J. Joshi, J.P. Kamerling, B.R. Leeflang, T. Lütteke, M. Lundborg, K. Maass, A. Merry, R. Ranzinger, J. Rosen, L. Royle, P.M. Rudd, S. Schloissnig, R. Stenutz, W.F. Vranken, G. Widmalm, and S.M. Haslam, EUROCarbDB: An open-access platform for glycoinformatics, *Glycobiology* 21 (2011) 493-502.
41. S.M. Haslam, G.C. Coles, H.R. Morris, and A. Dell, Structural characterization of the *N*-glycans of *Dictyocaulus viviparus*: discovery of the Lewis^(x) structure in a nematode, *Glycobiology* 10 (2000) 223-229.

42. H. Geyer, S. Schmitt, M. Wuhrer, and R. Geyer, Structural analysis of glycoconjugates by on-target enzymatic digestion and MALDI-TOF-MS, *Anal. Chem.* 71 (1999) 476-482.
43. J.P. Parente, P. Cardon, Y. Leroy, J. Montreuil, B. Fournet, and G. Ricart, A convenient method for methylation of glycoprotein glycans in small amounts by using lithium methylsulfinyl carbanion, *Carbohydr. Res.* 141 (1985) 41-47.
44. R. Geyer, and H. Geyer, Saccharide linkage analysis using methylation and other techniques, *Methods Enzymol.* 230 (1994) 86-108.
45. R. Geyer, H. Geyer, S. Kühnhardt, W. Mink, and S. Stirn, Capillary gas chromatography of methylhexitol acetates obtained upon methylation of *N*-glycosidically linked glycoprotein oligosaccharides, *Anal. Biochem.* 121 (1982) 263-274.
46. R. Geyer, H. Geyer, S. Kühnhardt, W. Mink, and S. Stirn, Methylation analysis of complex carbohydrates in small amounts: capillary gas chromatography-mass fragmentography of methylalditol acetates obtained from *N*-glycosidically linked glycoprotein oligosaccharides, *Anal. Biochem.* 133 (1983) 197-207.
47. G. Strecker, J.M. Wieruszkeski, J.C. Michalski, and J. Montreuil, Primary structure of human milk nona- and decasaccharides determined by a combination of fast atom bombardment mass spectrometry and $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -nuclear magnetic resonance spectroscopy. Evidence for a new core structure, *iso*-lacto-*N*-octaose, *Glycoconjugate J.* 6 (1989) 169-182.
48. B. Domon, and C.E. Costello, A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates, *Glycoconjugate J.* 5 (1988) 397-409.

Ergänzende Untersuchungen zu Kapitel 4

Eine flexibel kombinierbare Messroutine wurde für die *de novo* Strukturanalytik hochmolekularer HMOs vorgeschlagen. Neben den in der vorliegenden Publikation verwendeten und vorgestellten HMO-Fractionen wurden noch weitere Fractionen strukturell charakterisiert. Die Analyse der Ausgangsmaterialien und der nach ein- bzw. mehrdimensionaler Trennung resultierenden Subfractionen soll im Folgenden diskutiert werden.

1 Analyse der Ausgangsfractionen Wie in der vorliegenden Publikation beschrieben, wurden die Ausgangsproben bereits mittels chromatographischer Verfahren aufgereinigt, vorfraktioniert und dann von Prof. Dr. K. Yamashita (Yokohama, Japan) zur Verfügung gestellt. Zur Analyse der jeweiligen Oligosaccharid-Zusammensetzungen wurden MALDI-MS Profilspektren jeder einzelnen Fraktion aufgenommen und mittels der Software GlycoWorkbench ausgewertet (Abbildung 13) [Ceroni *et al.* 2008]. Die gewonnenen Resultate sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

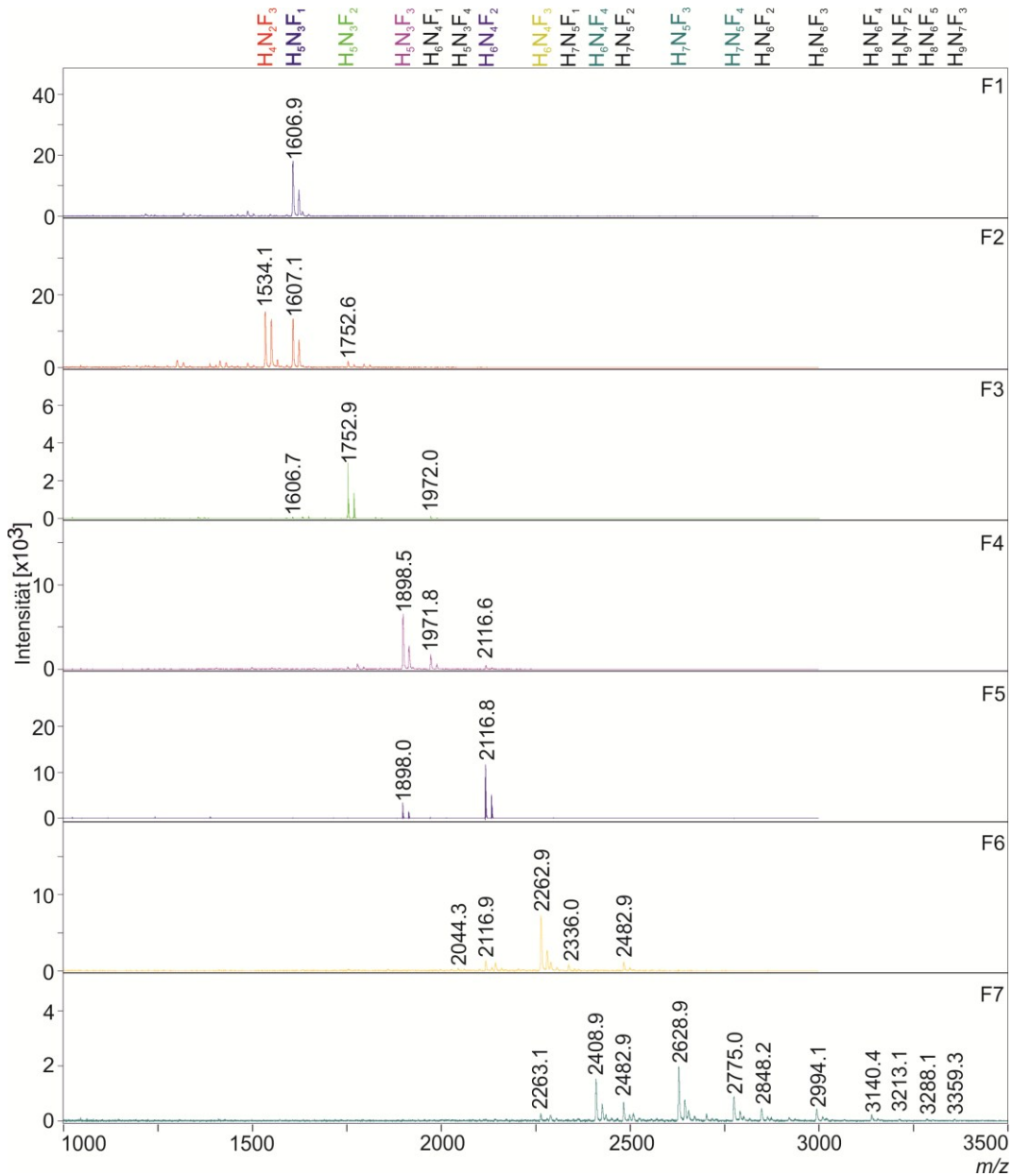


Abbildung 13 MALDI-MS Übersichtsspektren der vorfraktionierten HMOs. H, Hexose; N, *N*-Acetylhexosamin; F, Desoxyhexose (Fucose).

Die Quantifizierung des Ausgangsmaterials wurde mittels HPLC-Monosaccharidanalyse durchgeführt.

Aufgrund der homogenen Zusammensetzung von Fraktion F3 wurde diese zur Methodvalidierung ausgewählt. Die in dieser Fraktion vorhandenen difucosylierten Octaosen wurden bereits von Kobata sowie Kogelberg *et al.* ausführlich beschrieben [Tachibana *et al.* 1978; Kogelberg *et al.* 2004].

Tabelle 5 Oligosaccharid-Zusammensetzung der vorfraktionierten HMO-Proben. H, Hexose; N, *N*-Acetylhexosamin; F, Desoxyhexose (Fucose). Die Hauptkomponenten der jeweiligen Fraktion sind fett dargestellt.

Fraktion	<i>m/z</i>	Monosaccharid-Zusammensetzung	Gesamtmenge
F1	1606.9	H₅N₃F₁	1,9 mg
F2	1534.1	H₄N₂F₃	6,6 mg
	1607.1	H ₅ N ₃ F ₁	
F3	1752.6	H ₅ N ₃ F ₂	3,1 mg
	1606.7	H ₅ N ₃ F ₁	
F4	1752.9	H₅N₃F₂	2,14 mg
	1972.0	H ₆ N ₄ F ₁	
F5	1898.5	H₅N₃F₃	3,2 mg
	1971.8	H ₆ N ₄ F ₁	
F6	2116.6	H ₆ N ₄ F ₂	1,9 mg
	1898.0	H ₅ N ₃ F ₃	
F7	2116.8	H₆N₄F₂	3,6 mg
	2044.3	H ₅ N ₃ F ₄	
	2116.9	H ₆ N ₄ F ₂	
	2336.0	H ₇ N ₅ F ₁	
F7	2482.9	H ₇ N ₅ F ₂	3,6 mg
	2628.6	H₆N₄F₃	
	2775.0	H₇N₅F₃	
	2848.2	H ₇ N ₅ F ₄	
	2994.1	H ₈ N ₆ F ₂	
	3140.4	H ₈ N ₆ F ₃	
	3213.1	H ₈ N ₆ F ₄	
	3288.1	H ₉ N ₇ F ₂	
	3359.3	H ₈ N ₆ F ₅	
	H ₉ N ₇ F ₃		

Ein Vergleich mit den in Kapitel 1 *Strukturen der Humanmilch-Oligosaccharide* aufgeführten, bereits publizierten Strukturen zeigte, dass potentiell neue HMOs im Bereich der trifucosylierten Decaose-Strukturen zu erwarten waren. Die von Lebrilla *et al.* vorgeschlagenen mehrfach fucosylierten Decaose-Strukturen wurden nur unzureichend analysiert und gelten daher nur als postulierte Strukturvorschläge [Wu *et al.* 2010].

Fraktion F6 wurde daher zur Anwendung der zuvor entwickelten *de novo* Strukturaufklärungsstrategie verwendet.

2 Zusätzliche Informationen zu Fraktion F3

Neben der in der vorgelegten Publikation analysierten Subfraktion F3.7 der difucosyl Octaosen wurden vier weitere HMO Subfraktionen (F3.3-F3.7) der Zusammensetzung $H_5N_3F_2$ isoliert. Die Monosaccharidanalyse (nach mehrfacher gepoolter Fraktionierung) ergaben die in Tabelle 6 aufgelistete Gesamtmenge an Oligosacchariden.

Tabelle 6 Quantifizierung der $H_5N_3F_2$ Subfraktionen nach rp-HPLC.

Subfraktion	Menge
F3.3	1,28 µg
F3.4	2,13 µg
F3.5	3,24 µg
F3.6	14,6 µg
F3.7	36,5 µg

Nur die fettgedruckten Subfraktionen (F3.6 und F3.7) wurden aus Mengengründen zur weiteren Analyse verwendet.

2.1 MALDI-MS/MS Analyse der Subfraktion F3.6

Die MALDI-MS/MS Analyse der nativen, fluoreszenzmarkierten Subfraktion F3.6 lieferte erste Strukturinformationen für das hier vorliegende $H_5N_3F_2$ Isomer.

Die in Abbildung 14 dargestellten Strukturvorschläge I-III zeigen die angenommenen Strukturkandidaten zur Spektrenanalyse. Die Hauptfragmente m/z 1727.0 und 1580.5 resultierten aus der Abspaltung von ein bzw. zwei Fucoseeinheiten. Wie schon für die Subfraktion F3.7 beschrieben [Blank *et al.* 2011], lieferten die MALDI-MS/MS Analysen nur begrenzte Strukturinformationen. Durch die in Abbildung 14 detektierten, rot markierten diagnostischen Fragmente (m/z 1207.3 B_5Y_{4a} ; 1411.0 C_5Z_{5a} ; 1572.4 B_5) ließ sich jedoch eine lineare Struktur sowie eine Core-Fucosylierung ausschließen [Domon *et al.* 1988]. Damit blieben als mögliche Strukturvorschläge nur I und II übrig.

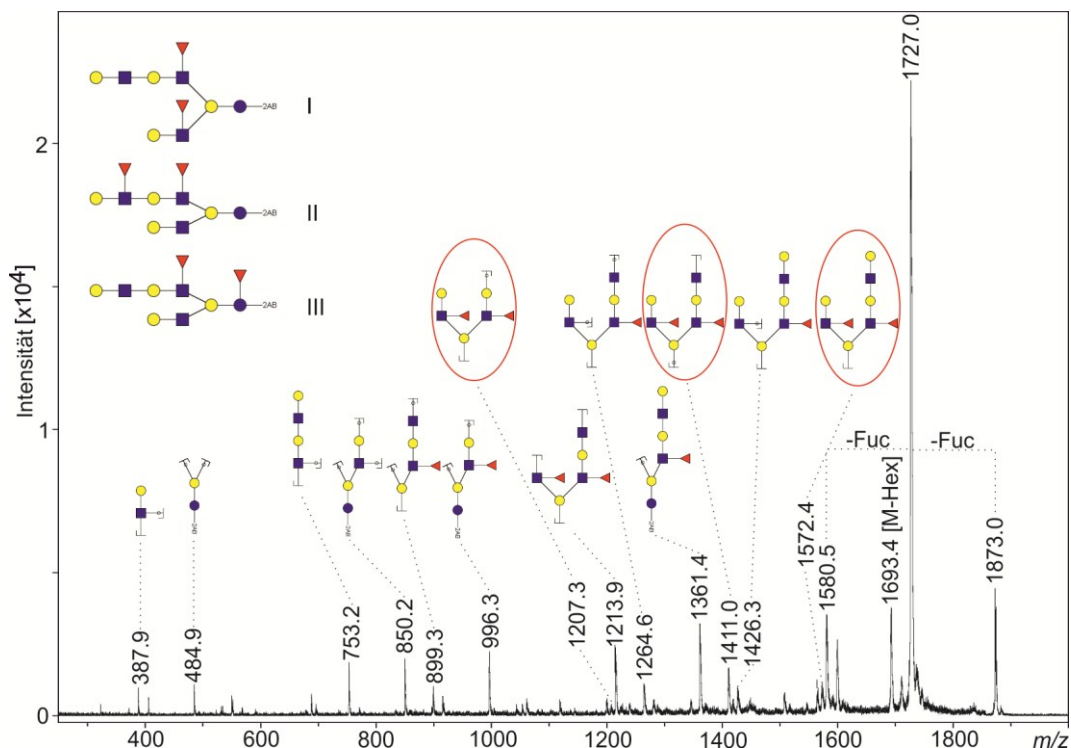


Abbildung 14 MALDI-MS/MS, Precursor m/z 1873 Subfraktion F3.6.

Gelbe Kreise, Galactose; blaue Kreise, Glucose; blaue Quadrate, *N*-Acetylglucosamin; rote Dreiecke, Fucose.

2.2 ESI MS² Analyse der permethylierten Subfraktion F3.6

Um den Informationsgehalt der Fragmentationsspektren zu erhöhen, wurde die Subfraktion F3.6 permethyliert und anschließend im ESI-offline Modus analysiert. Abbildung 15 zeigt das resultierende MS²-Spektrum des doppelt geladenen Vorläuferions m/z 1157.0 $[M+2H]^{2+}$. Alle Fragmente wurden als einfach geladene $[M+H]^+$ -Ionen detektiert.

Das Hauptfragment m/z 1020.7 ($Y_{3\beta}Z_{2\alpha}$) resultierte aus der Abspaltung zweier LacNAc Einheiten, wovon eine fucosyliert war, sowie aus der Abspaltung einer weiteren Fucose. Diese Fragmentierung schloss Strukturvorschlag II aus. Die weiteren Hauptfragmente m/z 1041.5 ($B_5Y_{2\beta}Z_{5\alpha}$) und 884.8 ($Z_{2\beta}Z_{3\alpha}^{1,3}X_{Fuc}$) konnten nicht eindeutig einem Strukturkandidat zugeordnet werden. Die Signale m/z 1118.7 ($C_5^{2,5}X_{Gal\beta}Y_{3\alpha}$) und 1675.6 ($Y_{2\beta}$) wiesen auf Isomer I als Hauptkomponente der Subfraktion F3.6 hin.

Eine MS³ Analyse verschiedener Precursor brachte keine weiteren Strukturhinweise.

Massenspektrometrisch ließ sich somit Strukturvorschlag I als das wahrscheinlichste Hauptisomer der Subfraktion F3.6 bestimmen.

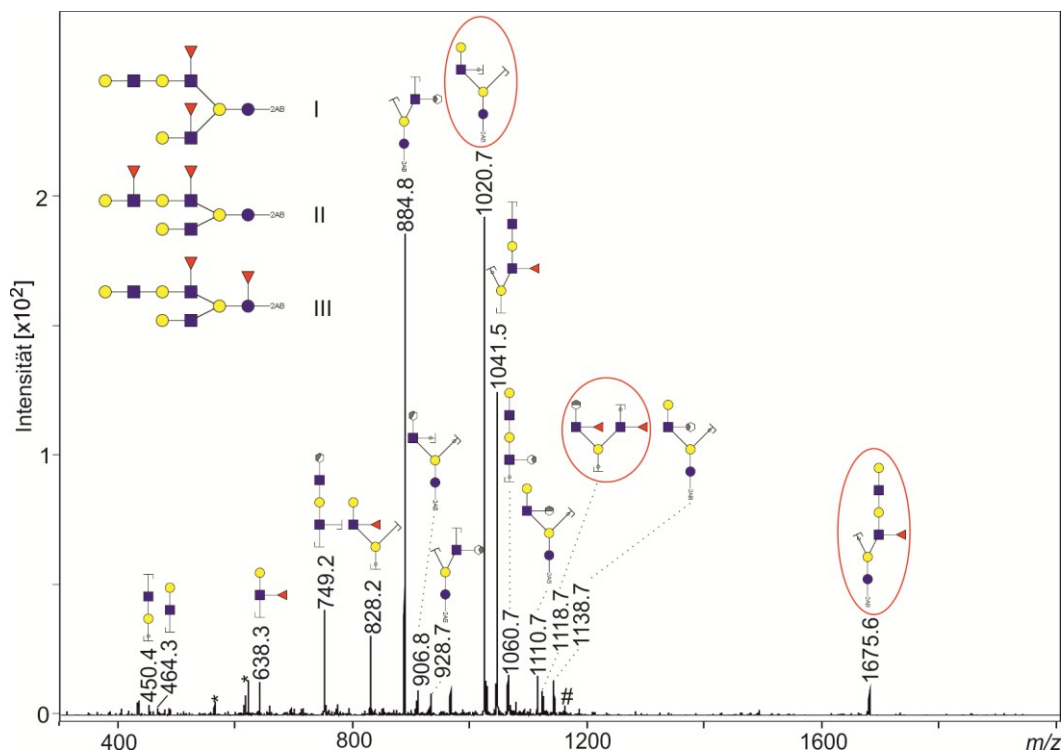


Abbildung 15 ESI-MS² (m/z 1157.0) der Subfraktion F3.6. Das Vorläuferion wurde mit # markiert. Gelbe Kreise, Galactose; blaue Kreise, Glucose; blaue Quadrate, *N*-Acetylglucosamin; rote Dreiecke, Fucose.




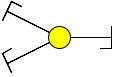
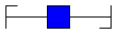
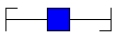
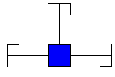
2.3 GC/MS Linkage-Analyse der Subfraktion F3.6

Um die Bindungspositionen der massenspektrometrisch bestimmten Grundstruktur zu bestimmen, wurden Linkage-Analysen der nativen sowie der defucosylierten Subfraktion durchgeführt. Die Defucosylierung wurde, wie in Kapitel 4 für Fraktion F7 beschrieben, mittels HF durchgeführt. Die Produkte wurden anschließend über rp-HPLC gereinigt. Die Linkage-Analysen zeigten deutlich die in Tabelle 7 dargestellten Monosaccharide und Verknüpfungspositionen.

Terminale Fucosen und Galactosen konnten neben der LacNAc-Einheiten verbrückenden, 1,3-gebunden Galactose detektiert werden. Wie aus der Biosynthese zu erwarten, bilden die Positionen 3 sowie 6 die Verzweigungen der am Laktose-Core lokalisierten Galactose. Die Detektion von zwei unterschiedlichen, disubstituierten *N*-Acetylglucosamin-Einheiten im Verhältnis 1:1 zeigte das Vorhandensein eines Isomergemischs bezüglich der terminalen, unfucosylierten LacNAc-Einheit. Die Fucoseposition der dreifach substituierten *N*-Acetylglucosamineinheiten konnte aus der nativen Fraktion nicht bestimmt werden.

Nach Defucosylierung wurde keine Fucose und keine dreifach substituierten *N*-Acetylglucosamineinheiten detektiert. Das bedeutendste Ergebnis dieser Analyse ist das Verhältnis von 1,3- zu 1,4-disubstituiertem *N*-Acetylglucosamin. Dies bleibt wie bei der Analyse der nativen Glykane 1:1. Hieraus lässt sich schließen, dass eine fucosylierte LacNAc Einheit eine Typ I- und die andere eine Typ II-Struktur beschreibt.

Tabelle 7 GC/MS Linkage-Analysen der nativen sowie defucosylierten Subfraktion F3.6.

Monosaccharid	Substitutionsposition	Nativ vorhanden	Verhältnis nativ	Defucosyliert vorhanden	Verhältnis defucosyliert
	1	Ja		Nein	
	1	Ja		Ja	
	1,3	Ja		Ja	
	1,3,6	Ja		Ja	
	1,4	Ja	1:1	Ja	1:1
	1,3	Ja		Ja	
	1,3,4	Ja		Nein	

Aus der in Kapitel 3 vorgeschlagenen Biosynthese lassen sich für das Isomergemisch der Subfraktion F3.6 zwei Strukturvorschläge formulieren (Abbildung 16).

Wie beschrieben konnte die GC/MS-Analyse der nativen Subfraktion die 1,3/4-Bindung der terminalen LacNAc Einheit (Gemisch aus Typ I und Typ II), sowie die Bindungsposition der beide LacNAc Einheiten verbrückenden Galactose bestätigen. Die Fucosepositionen ließen sich aus der Kombination der von Kobata *et al.* [Kobata 2010] vorgeschlagenen Regel, dass nur Typ II LacNAc Einheiten verlängert werden können, und der Defucosylierung der Subfraktion F3.6 bestimmen. Somit wurde die interne, fucosylierte LacNAc-Einheit der längeren Glykanantenne als Typ II (Le^x) annotiert, die terminale als Typ I (Le^a). Die Lokalisation dieses Le^a-Epitop am Laktose-Core ließ sich allerdings aus Mangel an Material nicht durch enzymatischen Verdau eindeutig bestimmen. Sie wird aber an C3 der Galactose vermutet, da die meisten publizierten Strukturen die kürzere Glykankette an dieser Position tragen.

Strukturvorschlag I (difucosyl *iso*-Lacto-*N*-Octaose) zeigt eine zweifach fucosylierte *iso*-Lacto-*N*-Octaose Struktur welche noch nicht in der Literatur beschrieben wurde.

Strukturvorschlag II zeigt die von Tachibana *et al.* beschriebene difucosyl Lacto-*N*-Octaose II [Tachibana *et al.* 1978].

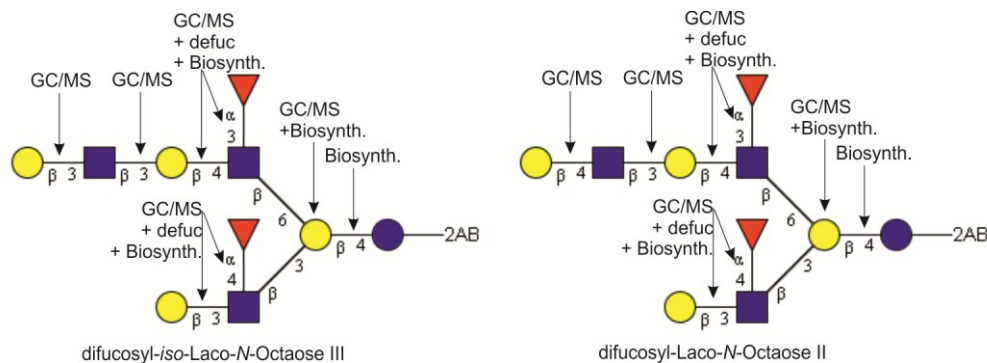


Abbildung 16 Strukturvorschläge für Subfraktion F3.6.

Gelbe Kreise, Galactose; blaue Kreise, Glucose; blaue Quadrate, *N*-Acetylglucosamin; rote Dreiecke, Fucose. GC/MS, Bindungsposition mittels GC/MS bestimmt; defuc, Bindungsposition nach Defucosylierung mittel GC/MS bestimmt; Biosynth., Bindungsposition wurde aus der vorgeschlagenen Biosynthese abgeleitet.

2 Abschließende Diskussion

Die vorgestellte Analysenstrategie zeigt die Möglichkeiten aber auch die Grenzen einer *de novo* Strukturanalytik von HMOs. Die als größte limitierenden Faktoren erkannten Probleme bei der Einzelstrukturanalytik waren zum einen die Materialmenge, die strukturabhängige Aktivität der verschiedenen Enzyme, aber vor allem die Isomerenreinheit der isolierten Fraktionen und Subfraktionen.

Diese Limitationen werden besonders in der difucosylierten Octaose Subfraktion F3.6 deutlich. Zum einen erschwert hier das Vorhandensein eines Isomergemischs die Analyse, zum anderen ist die begrenzte Materialmenge nach der rp-HPLC Trennung ein Problem welches keinen schrittweise durchgeführten Verdau der Subfraktion zuließ. Des Weiteren macht die, wie auch schon bei der Subfraktion F7 beobachtet, durch sterische Behinderung eingeschränkte Enzymaktivität der Fucosidase eine aufwändige Fraktionierung der Verdauprodukte notwendig. Dies zeigt allerdings auch die Vorteile der entwickelten nichtlinearen Analysenstrategie, welche die Verwendung alternativer Routen erst ermöglicht.

Das Vertrauen auf die nur unzureichend beschriebene Biosynthese der HMOs zur Annotation vermeidlich bekannter Linkage- oder Substitutionspositionen innerhalb eines Isomers birgt, wie das Beispiel der trifucosylierten Decaosestruktur F5.9 deutlich macht, die Gefahr der Fehlannotation. Ausgehend von der publizierten Strukturdatenbank wäre nicht zu erwarten, dass die längere Glykanantenne in Position C3 des Laktose-Cores zu finden ist. Nur eine wirklich vollständige *de novo* Analyse kann solche Besonderheiten aufklären und zu richtigen Strukturvorschlägen führen [Wu *et al.* 2010; Urashima *et al.* 2011].

Die erzielten Ergebnisse verdeutlichen allerdings die Möglichkeiten, die sich durch die Entwicklungen neuester Analysemethoden zur HMO-Analytik ergeben. In den nächsten Jahren ist sicherlich mit einer Erweiterung der strukturellen Kenntnis hochmolekularer HMO-Strukturen zu rechnen. Diese Ergebnisse werden allerdings sicher nie auf nur eine Analysemethode zurückzuführen sein, sondern sich immer einer Kombination verschiedener Techniken bedienen. Die vorgestellte Strategie zeigt daher eine flexible Methodik in welche weitere bzw. neuere Analyseverfahren problemlos integriert werden können.

Kapitel 5

Fazit und Ausblick

1 Ergebnisse des Forschungsprojektes

Die ganzheitliche Charakterisierung von Humanmilchproben stellte die Basis des vorgelegten Forschungsprojektes dar. Die in der Literatur beschriebenen Methoden wurden als Grundlage für die Entwicklung eines neuen *high-throughput* Screening-Prozesses verwendet, wobei der Fokus nicht nur auf die reine Analytik der Oligosaccharid-Zusammensetzungen, sondern auch auf den Zusammenhang zwischen den exprimierten Oligosacchariden der Frauenmilch und der Lewis-Blutgruppe der Mütter gelegt wurde. Das vorgestellte Verfahren macht eine individuelle Milchprobenanalytik möglich und kann somit zukünftige Studien im Funktions- sowie Metabolombereich deutlich unterstützen. Die Möglichkeit der Lewis-Blutgruppenklassifizierung direkt aus der Muttermilch liefert hierzu verlässlichere Ergebnisse als die klassische serologische Lewis-Blutgruppenbestimmung. Die zusätzlichen Informationen über die verschiedenen Expressionsniveaus einzelner HMOs, welche durch die individuell detektierten HMO-Muster erhalten werden, bieten die Möglichkeit Besonderheiten in diesen Mustern zu erkennen und mit weiterführenden Ergebnissen zu korrelieren.

Es wurde gezeigt, dass die sehr schnelle Aufarbeitungsmethodik neben der auf chromatographische Verfahren verzichtenden Charakterisierung jeder einzelnen Probe, mehr als 150 µg aufgereinigte HMOs zur weiteren Analyse liefert. Diese Tatsache erweitert das Anwendungsspektrum von der reinen Analytik auf die gezielte Isolierung der Oligosaccharide, welche für klinische sowie biologische Analysen unverzichtbar ist.

Die Möglichkeit der parallelen Aufarbeitung von bis zu 96 Proben kann besonders im Bereich der Metabolomstudien von großem Nutzen sein, da besonders hier viele Proben einzelner Probanden zu verschiedenen Zeitpunkten miteinander verglichen werden. Eine einheitliche Aufarbeitung ist hierbei die Voraussetzung der Vergleichbarkeit einzelner Proben, vor allem zwischen verschiedenen Spenderinnen.

Die prinzipielle Möglichkeit, diese Analytik und Aufarbeitungstechnik auf andere Matrices wie Stuhlproben zu übertragen, ist ebenfalls von großem Interesse im Metabolombereich. Ein einziges Verfahren zur Aufarbeitung sowie Analytik verschiedener Probenarten lässt auch hier eine maximale inter- sowie intraindividuelle Vergleichbarkeit der Messungen zu. Die Analyse sowie Minimierung potentieller Fehlerquellen durch umfangreiche Validierungen und größtmögliche Automatisierung liefert eine standardisierte Methodik zum individuellen HMO-Screening.

Die auf der Ebene der HMO-Zusammensetzung untersuchten donorspezifischen Besonderheiten bieten allerdings nur einen mehr oder weniger oberflächlichen Einblick in die exprimierten Strukturen der Frauenmilch. Für einige Anwendungen, besonders im Bereich der Funktionsstudien, ist eine individuelle Strukturaufklärung der HMOs notwendig. Nur so können biologische Effekte einzelnen HMO-Spezies zugeordnet und aus strukturellen Eigenschaften eine potentielle Bioaktivität abgeleitet werden. Um eine

Möglichkeit zu bieten, diese mit steigendem Molekulargewicht der HMOs immer komplexer werdende Aufgabe zu bewältigen, wurde eine Analysenstrategie entwickelt, welche auf die strukturspezifischen Eigenschaften jedes einzelnen HMO-Isomers angepasst werden kann. Die aufeinander aufbauenden analytischen Verfahren zur Strukturaufklärung wurden so materialschonend wie möglich gewählt und optimiert. Alternative Routen zur Defucosylierung sowie die Kombinationsmöglichkeit von enzymatischem Verdau mit anschließender MALDI-MS/MS Analyse der nativen oder/und permethylierten Degradationsprodukte wurde detailliert beschrieben. Die in dieser Arbeit aufgeklärten Strukturisomere belegen die Anwendbarkeit des vorgeschlagenen Analysewegs. Des Weiteren verdeutlicht die neu gefundene Core-Struktur, *inverse-lacto-N-neo-Decaose*, welche eine strukturelle Besonderheit aufweist, die nicht aus der Biosynthese vorhersagbar war, die dringende Notwendigkeit eines vollständigen Strukturaufklärungsverfahrens.

2 Einordnung der Ergebnisse in den aktuellen Forschungsstand

Die erzielten Ergebnisse im Bereich der Lewis-Blutgruppenzuordnung anhand der Oligosaccharidmuster von Frauenmilch knüpfen direkt an die Ergebnisse von Kobata *et al.*, Thurl *et al.*, Stahl *et al.* und Gabrielli *et al.* an [Kobata *et al.* 1969; Thurl *et al.* 1997; Stahl *et al.* 2001; Gabrielli *et al.* 2011]. Die beschriebenen chromatographisch detektierten Unterschiede wurden in der neu etablierten Methodik durch eine *high-throughput* fähige massenspektrometrische Analyse ersetzt. Maßgebliche Unterschiede bestehen ebenfalls in der Substitution der aufwendigen Aufarbeitungsschritte zur Entfettung, Proteinfällung und Abtrennung der Laktose durch das automatisierte *high-throughput solid phase extraction* Verfahren.

Anders als bei den in der Literatur beschriebenen Methoden wurde die Lewis-Blutgruppenanalyse nicht auf einzelne HMO-Isomere gestützt sondern eine Zuordnung über die relative Quantifizierung ausgewählter HMO-Vertreter getroffen.

Ein weiterer großer Vorteil der massenspektrometrischen Methodik liegt in der Identifizierbarkeit hochmolekularer HMO-Spezies ohne einen Standard als Retentionszeitvergleich einsetzen zu müssen.

Die von Henry *et al.* auf Erythrozyten beschriebene Variation der Lewis-Blutgruppe während der Schwangerschaft konnte auch auf HMO-Ebene nachgewiesen werden [Henry *et al.* 1995]. Die Detektierbarkeit individueller Glykanprofile ermöglichte nicht nur Rückschlüsse auf die Lewis-Blutgruppenzugehörigkeit, sondern lieferte auch die Möglichkeit die Aktivität einzelner Glycosyltransferasen zu erkennen und zu interpretieren.

Im Bereich der Strukturanalytik konnten in den letzten Jahren deutliche Fortschritte erzielt werden. Neuste Verfahren wie Chip-HPLC MS Techniken ermöglichten es, sehr schnell

eine Vielzahl von Glykanstrukturen zu bestimmen [Wu *et al.* 2010]. Der Nachteil dieser Verfahren besteht allerdings darin, dass nur eine sehr kurze Analysenzeit zur Verfügung steht. Zum Teil werden Standardsubstanzen zum Retentionszeit- und Fragmentationsvergleich eingesetzt. Diese stehen allerdings bei hochmolekularen HMOs oft nicht zur Verfügung. Eine mehrdimensionale HPLC-basierte Isomerentrennung, wie sie in dieser Arbeit beschrieben wurde, ist somit die einzige Möglichkeit einer *de novo* Strukturanalyse.

Die Kombination von verschiedenen, etablierten Verfahren wurde als flexible Möglichkeit der Strukturaufklärung vorgestellt. Die Notwendigkeit einer vollständigen, validierten Strukturanalytik wird in der Detektion einer neuen Decaose Core-Struktur sichtbar. Die aus den Strukturdatenbanken von Kobata sowie Wu *et al.* zu vermutende Regel, dass die längere Glykankette immer an C6 des Laktose-Cores lokalisiert ist, konnte hiermit widerlegt werden [Kobata 2010; Wu *et al.* 2010]. Die sonstigen aufgestellten Regeln zur vorgeschlagenen Biosynthese von HMOs konnten mit den weiterhin detektierten Strukturen bestätigt werden [Urashima *et al.* 2011].

Die publizierte Strukturdatenbank konnte um eine neue Core-Struktur mit dem entsprechenden trifucosylierten Vertreter erweitert werden. Des Weiteren konnte eine neue difucosylierte Octaose Struktur in der von Kobata zusammengefassten Strukturserie vorgeschlagen werden [Kobata 2010].

3 Ausblick

Um das vorgestellte HMO-Screening-Verfahren noch flexibler und damit breiter einsetzbar zu machen, könnten verschiedene Fragestellungen weiterführend behandelt werden.

Die Adaption des für neutrale HMOs optimierten Verfahrens auf saure (Sialinsäure tragende) HMOs würde den Einsatzbereich, besonders auf dem Gebiet der Funktionsstudien, deutlich erweitern. Durch eine Variation des pH-Wertes der zur Elution verwendeten Lösungsmittel sowie der ausgewählten Lösungsmittel selbst könnten hier maßgebliche Verbesserungen erzielt werden. Durch die Verwendung anderer Säulenmaterialien, wie z.B. starker Ionenaustauscher, könnte die Isolierung auch mehrfach sialylierter HMOs möglich werden.

Die Anwendung der Methode auf andere Matrices wie Stuhl- und Urinproben wurde bereits gezeigt. Allerdings bedarf diese Analytik noch weiterer Tests zur endgültigen Validierung.

Die Verwendung von isotoopenmarkierten HMOs als interne Standardsubstanzen könnte zur Quantifizierung von Einzelkompositionen interessant sein. Zu beachten bleibt hier allerdings das Vorhandensein mehrerer Isomere unter einem Signal. Daher müssten hier auch die entsprechenden isotoopenmarkierten Isomeregemische vorgelegt werden.

Die Korrelation zwischen donorspezifischen Enzymaktivitäten und dem exprimierten HMO-Muster kann in weiterführenden Studien noch genauer bestimmt werden. Besonders laktationszeitbedingte Abhängigkeiten und intraindividuelle Variationen können hier von besonderem Interesse sein. Das Einbinden von GC/MS basierten Analysemethoden zur Bestimmung und Quantifizierung der Fucosylierungspositionen in Gesamtproben könnte dabei von besonderem Nutzen sein.

Die Variation der serologisch bestimmten Lewis-Blutgruppe und der Expression der individuellen HMO-Muster kann durch eine genotypische Lewis-Blutgruppen Typisierung weiterführend untersucht werden. Auch die Nachbestimmung (2-3 Wochen nach der Geburt) der Lewis-Blutgruppe von Donoren, welche während der Schwangerschaft serologisch als Le(a-b-) klassifiziert wurden, deren Milch sich allerdings einer anderen Lewis-Blutgruppe zuordnen lässt, würde interessante Ergebnisse über die Variation der Lewis-Blutgruppe in der Schwangerschaft liefern. Die Ursprünge dieses, nur wenig beschriebenen Phänomens ließen sich so näher bestimmen.

Die Einzelstrukturanalytik kann zukünftig hauptsächlich von den Entwicklungen im Bereich der analytischen Verfahren profitieren. Der nächste Schritt könnte die Verwendung eines UPLC-Systems zur reversed phase Trennung der vorfraktionierten Oligosaccharide sein. Die mit diesem System deutlich erhöhte Trennschärfe zwischen einzelnen Isomeren bietet die Möglichkeit, hochmolekulare Oligosaccharide sehr ähnlicher Struktur voneinander zu trennen und anschließend zu charakterisieren. Auch die Entwicklung von neuen Analysemethoden wie z.B. chip-HPLC kombiniert mit leistungsstarken sehr schnellen Ionenfallen-Massenspektrometern würden die Analyse von Nebenkomponenten auch im hochmolekularen Bereich ermöglichen.

Die Weiterentwicklung der chemischen Synthese immer komplexerer HMO-Standards kann zukünftig die Möglichkeit bieten mittels chromatographischer Verfahren und entsprechendem Retentionszeitvergleich neue Oligosaccharidstrukturen in der Frauenmilch zu bestimmen. Hier sind besonders die Entwicklungen im Bereich der *capillary gel electrophoresis laser induced fluorescence*- (CGE-LIF) Methoden interessant [Ruhaak *et al.* 2010].

Die in dieser Arbeit vorgestellten Analyseverfahren und Strategien tragen einen weiteren Schritt zur ganzheitlichen Charakterisierung der Frauenmilch bei. Die zukünftigen Entwicklungen und Erkenntnisse werden es der Lebensmittelindustrie ermöglichen, die angebotenen Babyformula schrittweise zu verbessern und dem Vorbild der Frauenmilch immer ähnlicher werden zu lassen. Jedes Kind, auch wenn es nicht gestillt werden kann, würde so zukünftig mehr und mehr von den natürlichen Eigenschaften der Frauenmilch profitieren können.

Zusammenfassung

Zusammenfassung des Forschungsprojektes

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte *high-throughput* Screening-Verfahren zur Analyse humaner Milch-Oligosaccharide ermöglicht die statistisch validierte, massenspektrometrische Lewis-Blutgruppenzuordnung durch automatisierte Messroutinen der entsprechenden Milchproben. Ausgehend von einem sehr geringen Milchvolumen liefert die Methodik mehrere hundert Mikrogramm aufgereinigter, massenspektrometrisch charakterisierter sowie klassifizierter HMOs für weitere Analysen. Die Einsatzmöglichkeiten im klinischen, ernährungswissenschaftlichen sowie industriellen Bereich wurden anhand verschiedener Anwendungsbeispiele aufgezeigt (**Kapitel 2**).

Sonderfälle, in denen das massenspektrometrische HMO-Muster nicht der serologisch bestimmten Lewis-Blutgruppe zuzuordnen war, erlaubten interessante Rückschlüsse auf die Biosynthese von HMOs. Die besonders bei Schwangeren bereits beschriebene Diskrepanz zwischen dem serologischen Lewis-Blutgruppenstatus und der in anderen Körperflüssigkeiten, wie Speichel und Geweben detektierbaren Lewis-Blutgruppenzugehörigkeit konnte auch in Milch beobachtet werden. Die direkte Korrelation der individuellen HMO-Muster mit genetischen und biosynthetischen Merkmalen wurde in einem Übersichtsartikel zusammengefasst (**Kapitel 3**).

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde eine neue, nichtlineare Methodik zur *de novo* Strukturanalytik isolierter hochmolekularer HMOs vorgestellt. Die Kombination aus massenspektrometrischen Ansätzen, zusammen mit gezielter Degradation sowie GC/MS basierte Linkage-Analysen einzelner Subfraktionen lieferte detaillierte Strukturinformationen über die zuvor isolierten Oligosaccharide. Die Methodik wurde am Beispiel der bekannten Struktur difucosyl *iso*-Lacto-*N*-Octaose etabliert. Anschließend wurde so die neue, hochkomplexe Struktur einer trifucosylierten *inverse*-Lacto-*N*-*neo*-Decaose mittels des neu aufgestellten Analysewegs bestimmt. Hierbei konnte eine neue Core-Struktur-Subgruppe der HMOs aufgezeigt werden, welche die bislang nicht beschriebene Besonderheit aufwies, die längere Glykanantenne nicht an C6 der Laktose zu tragen sondern an Position C3.

Darüber hinaus konnten in dieser Arbeit Strukturvorschläge für zwei weitere difucosylierte Lacto-*N*-Octaose Isomere gemacht werden. Neben der bereits publizierten Struktur einer difucosyl Laco-*N*-Octaose II konnte in einem Isomerengemisch eine neue difucosyl *iso*-Lacto-*N*-Octaose III vorgeschlagen werden (**Kapitel 4**).

Die vorgelegte Arbeit beschreibt zwei unabhängige Herangehensweisen zur individuellen Charakterisierung der in humaner Milch exprimierten Oligosaccharide. Die gewonnenen Daten und etablierten Methoden können die analytische Basis für vielfältige, zukünftige Untersuchungen der gesundheitsfördernden Wirkung von HMOs bilden.

Summary of the project

The high-throughput screening method, developed within the scope of this project enables a statistically validated Lewis blood group determination by automatized mass spectrometric measurement routines of human milk samples. Starting with a nominal volume of milk, the workup procedure delivers several hundred micrograms of purified, mass spectrometrically characterized and classified human milk oligosaccharides for further analysis. Application examples are given for the clinical, nutritional as well as industrial areas (**Chapter 2**).

Special cases in which mass spectrometrically detected HMO pattern do not meet the expectations of the serologically determined Lewis blood group status were able to deliver interesting insights of the biosynthesis of HMOs. The described discrepancy between the serological Lewis blood group status and the Lewis status in other body fluids, like saliva but also in tissues, particularly of pregnant women, could also be detected in human milk. The direct correlation between the HMO-pattern and the genetic and biosynthetic characteristics could be summarized in a review article (**chapter 3**).

In the second part of this work a novel, nonlinear *de novo* analysis strategy for structure elucidation of isolated high molecular weight HMOs was established. A combination of mass spectrometry with targeted structural degradation combined with GC/MS based linkage analysis of single sub-fractions delivered the detailed structural information of the previously isolated oligosaccharide. The method was established using isolated difucosyl *iso*-lacto-*N*-Octaose. Subsequently the analysis of a novel, highly complex trifucosylated *inverse*-lacto-*N*-*neo*-decaose was performed. A novel core structural sub-group for human milk oligosaccharides could be described, which exhibits the so far unknown feature that the longest glycan antenna is not located at position C6 of the lactose core galactose residue but rather is attached to position C3 of that.

Furthermore, the structure of two additional difucosylated lacto-*N*-octaoses could be suggested. Besides the published difucosyl lacto-*N*-octaose II a novel difucosyl lacto-*N*-octaose III could be supposed in an isomeric mixture (**Chapter 4**).

The work in hand comprises two independent approaches for the individual characterization of human milk oligosaccharides. The gained data and the developed methods can build the analytical basis for divers future research fields about the health effects of human milk oligosaccharides.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	HMO-Konzentrationen in Abhängigkeit des Laktationszeitpunktes [Thurl <i>et al.</i> 2010].	15
Abbildung 2	Konzentrationen 11 verschiedener HMOs in Bezug auf die Lewis-Blutgruppe der Spenderin [Thurl <i>et al.</i> 2010].	16
Abbildung 3	Fucosylierungsgrad in Abhängigkeit der Lewis-Blutgruppe.	17
Abbildung 4	MALDI-MS Analyse von HMO-Proben nach kombinierter Aufarbeitung (C18 + PGC).	55
Abbildung 5	Optimierung des zur Probenaufarbeitung eingesetzten Milchvolumens.	57
Abbildung 6	<i>Negativ-ion mode</i> MALDI-MS Spektrum von sauren HMOs in Abhängigkeit von den PGC-Elutionsbedingungen.	58
Abbildung 7	Verifizierung des Fucose-Hexose-Austauschs mittels LiCl.	59
Abbildung 8	Donorspezifische HMO-Konzentration in der Frauenmilch.	60
Abbildung 9	Relativer Fucosegehalt bezogen auf die HMO-Gesamtmenge.	61
Abbildung 10	Fucosylierungsgrad der HMOs pro LacNAc Einheit.	62
Abbildung 11	Sialinsäurekonzentration in den untersuchten Milchproben.	63
Abbildung 12	MALDI-MS Analyse von PGC-Aufarbeitung einer Fecesprobe.	65
Abbildung 13	MALDI-MS Übersichtsspektren der vorfraktionierten HMOs.	110
Abbildung 14	MALDI-MS/MS, Precursor m/z 1873 Subfraktion F3.6.	113
Abbildung 15	ESI-MS ² (m/z 1157.0) der Subfraktion F3.6.	114
Abbildung 16	Strukturvorschläge für Subfraktion F3.6.	116

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	HMO-Core-Strukturen. Gelbe Kreise, Galactose; blaue Kreise, Glucose; blaue Quadrate, <i>N</i> -Acetylglucosamin; rote Dreiecke, Fucose. Die letztgenannte Core-Struktur wurde im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt [Blank <i>et al.</i> 2011].	8
Tabelle 2	Neutrale HMO-Strukturen.	9
Tabelle 3	Konzentrationsbestimmung verschiedener HMOs.	14
Tabelle 4	HMO-Konzentrationen [g/L] in Abhängigkeit des Laktationszeitpunktes.	14
Tabelle 5	Oligosaccharid-Zusammensetzung der vorfraktionierten HMO-Proben.	111
Tabelle 6	Quantifizierung der H ₅ N ₃ F ₂ Subfraktionen nach rp-HPLC.	112
Tabelle 7	GC/MS Linkage-Analysen der nativen sowie defucosylierten Subfraktion F3.6.	115

Literaturverzeichnis

- Albrecht, S., H. A. Schols, *et al.* (2010). "CE-LIF-MSⁿ profiling of oligosaccharides in human milk and feces of breast-fed babies." *Electrophoresis* **31**: 1264-1273.
- Allen, J. C., R. P. Keller, *et al.* (1991). "Studies in human lactation: milk composition and daily secretion rates of macronutrients in the first year of lactation." *Am J Clin Nutr* **54**: 69-80.
- Amano, J., M. Osanai, *et al.* (2009). "Structural determination by negative-ion MALDI-QIT-TOFMSⁿ after pyrene derivatization of variously fucosylated oligosaccharides with branched decaose cores from human milk." *Glycobiology* **19**: 601-614.
- Asakuma, S., T. Urashima, *et al.* (2008). "Variation of major neutral oligosaccharides levels in human colostrum." *Eur J Clin Nutr* **62**: 488-494.
- Björndal, H., C. G. Hellerqvist, *et al.* (1970). "Gas-liquid chromatography and mass spectrometry in methylation analysis of polysaccharides." *Angew Chem Internat Edit* **9**: 610-619.
- Blank, D., S. Gebhardt, *et al.* (2011). "High-throughput mass finger printing and Lewis blood group assignment of human milk oligosaccharides." *Anal Bioanal Chem* **401**: 2495-510.
- Blank, D., H. Geyer, *et al.* (2011). "Elucidation of a novel lacto-*N*-decaose core structure in human milk using nonlinear combinations of analytical techniques." *Anal Biochem*.
- Bode, L. (2009). "Human milk oligosaccharides: prebiotics and beyond." *Nutr Rev* **67 Suppl 2**: S183-191.
- Bode, L., C. Kunz, *et al.* (2004). "Inhibition of monocyte, lymphocyte, and neutrophil adhesion to endothelial cells by human milk oligosaccharides." *Thromb Haemost* **92**: 1402-1410.
- Bomsel, M., M. Heyman, *et al.* (1998). "Intracellular neutralization of HIV transcytosis across tight epithelial barriers by anti-HIV envelope protein dIgA or IgM." *Immunity* **9**: 277-287.
- Bones, J., S. Mittermayr, *et al.* (2010). "Ultra performance liquid chromatographic profiling of serum *N*-glycans for fast and efficient identification of cancer associated alterations in glycosylation." *Anal Chem* **82**: 10208-10215.
- Brew, K. and R. L. Hill (1975). "Lactose biosynthesis." *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **72**: 105-158.
- Broberg, A. (2007). "High-performance liquid chromatography/electrospray ionization ion-trap mass spectrometry for analysis of oligosaccharides derivatized by reductive amination and *N,N*-dimethylation." *Carbohydr Res* **342**: 1462-1469.
- Bruntz, R., U. Dabrowski, *et al.* (1988). "Fucose-containing oligosaccharides from human milk from a donor of blood group 0 Le^a nonsecretor." *Biol Chem Hoppe Seyler* **369**: 257-273.
- Castellote, C., R. Casillas, *et al.* (2011). "Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk." *J Nutr* **141**: 1181-1187.
- Ceroni, A., K. Maass, *et al.* (2008). "GlycoWorkbench: A Tool for the Computer-Assisted Annotation of Mass Spectra of Glycans." *J Proteome Res* **7**: 1650-1659.
- Chaturvedi, P., C. D. Warren, *et al.* (2001). "Fucosylated human milk oligosaccharides vary between individuals and over the course of lactation." *Glycobiology* **11**: 365-372.
- Chichlowski, M., J. B. German, *et al.* (2011). "The influence of milk oligosaccharides on microbiota of infants: opportunities for formulas." *Annu Rev Food Sci Technol* **2**: 331-351.
- Coppa, G. V., P. Pierani, *et al.* (1999). "Oligosaccharides in human milk during different phases of lactation." *Acta Paediatr Suppl* **88**: 89-94.

- Domon, B. and C. E. Costello (1988). "A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates." Glycoconjugate J **5**: 397-409.
- Donald, A. S. R. and J. Feeney (1988). "Separation of human milk oligosaccharides by recycling chromatography. First isolation of lacto-*N*-neo-difucohexaose II and 3'-Galactosyllactose from this source." Carbohydr Res **178**: 79-91.
- Dua, V. K., K. Goso, *et al.* (1985). "Characterization of lacto-*N*-hexaose and two fucosylated derivatives from human milk by high-performance liquid chromatography and proton NMR spectroscopy." J Chromatogr **328**: 259-269.
- Gabrielli, O., L. Zampini, *et al.* (2011). "Preterm milk oligosaccharides during the first month of lactation." Pediatrics **128**: e1520-1531.
- German, J. B., C. J. Dillard, *et al.* (2002). "Bioactive components in milk." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **5**: 653-658.
- Geyer, H., S. Schmitt, *et al.* (1999). "Structural analysis of glycoconjugates by on-target enzymatic digestion and MALDI-TOF-MS." Anal Chem **71**: 476-482.
- Geyer, R. and H. Geyer (1994). "Saccharide linkage analysis using methylation and other techniques." Methods Enzymol **230**: 86-108.
- Ginsburg, V., D. A. Zopf, *et al.* (1976). "Oligosaccharides of human milk. Isolation of a new pentasaccharide, lacto-*N*-fucopentaose V." Arch Biochem Biophys **175**: 565-568.
- Goldman, A. S. and R. M. Goldblum (1989). Immunoglobulins in human milk. Protein and non-protein nitrogen in human milk. S. A. Atkinson and B. Lönnerdal. Boca Raton, FL, CRC Press: 43-51.
- Haeuw-Fievre, S., J. M. Wieruszkeski, *et al.* (1993). "Primary structure of human milk octa-, dodeca- and tridecasaccharides determined by a combination of ¹H-NMR spectroscopy and fast-atom-bombardment mass spectrometry. Evidence for a new core structure, the *para*-lacto-*N*-octaose." Eur J Biochem **215**: 361-371.
- Hanson, L. A. (1998). "Breastfeeding provides passive and likely long-lasting active immunity." Ann Allergy Asthma Immunol **81**: 523-533.
- Hanson, L. Å. (1961). "Comparative immunological studies of the immune globulins of human milk and of blood serum." Int Arch Allergy Appl Immunol **18**: 241-267.
- Hanson, L. Å., S. Ahlstedt, *et al.* (1985). "Protective factors in milk and the development of the immune system." Pediatrics **75**: 172-176.
- Hara, S., Y. Takemori, *et al.* (1987). "Fluorometric high-performance liquid chromatography of *N*-acetyl- and *N*-glycolylneuraminic acids and its application to their microdetermination in human and animal sera, glycoproteins, and glycolipids." Anal Biochem **164**: 138-145.
- Henry, S. M., P. Å. Jovall, *et al.* (1995). "Structural and immunochemical identification of Le^b glycolipids in the plasma of a group O Le(a-b-) secretor." Glycoconj J **12**: 309-317.
- Hong, P., M. R. Ninonuevo, *et al.* (2009). "Human milk oligosaccharides reduce HIV-1-gp120 binding to dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)." Br J Nutr **101**: 482-486.
- Jantscher-Krenn, E., M. Zherebtsov, *et al.* (2011). "The human milk oligosaccharide disialyllacto-*N*-tetraose prevents necrotising enterocolitis in neonatal rats." Gut.
- Jensen, R. G., J. Bitman, *et al.* (1995). Milk lipids. Handbook of milk composition. R. G. Jensen. San Diego, Academic Press, Inc.: 495-542.
- Kobata, A. (2003). "Possible application of milk oligosaccharides for drug development." Chang Gung Med J **26**: 621-636.
- Kobata, A. (2010). "Structures and application of oligosaccharides in human milk." Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci **86**: 731-747.
- Kobata, A. and V. Ginsburg (1969). "Oligosaccharides of human milk. II. Isolation and characterization of a new pentasaccharide, lacto-*N*-fucopentaose III." J Biol Chem **244**: 5496-5502.
- Kobata, A. and V. Ginsburg (1972). "Oligosaccharides of human milk. III. Isolation and characterization of a new hexasaccharide, lacto-*N*-hexaose." J Biol Chem **247**: 1525-1529.

- Kobata, A. and V. Ginsburg (1972). "Oligosaccharides of human milk. IV. Isolation and characterization of a new hexasaccharide, lacto-*N*-neoheptaose." Arch Biochem Biophys **150**: 273-281.
- Kobata, A., V. Ginsburg, *et al.* (1969). "Oligosaccharides of human milk. I. Isolation and characterization." Arch Biochem Biophys **130**: 509-513.
- Kogelberg, H., V. E. Piskarev, *et al.* (2004). "Determination by electrospray mass spectrometry and ¹H-NMR spectroscopy of primary structures of variously fucosylated neutral oligosaccharides based on the *iso*-lacto-*N*-octaose core." Eur J Biochem **271**: 1172-1186.
- Kuhn, N. J. and A. White (1975). "The topography of lactose synthesis." Biochem J **148**: 77-84.
- Kuhn, R. and H. H. Baer (1962). "Die Konstitution der Lacto-*N*-neo-tetraose." Chem Ber **95**: 518-522.
- Kuhn, R., H. H. Baer, *et al.* (1956). "Kristallisation und Konstitutionsermittlung der Lacto-*N*-fucopentaose." Chem Ber **89**: 2514-2523.
- Kuhn, R., H. H. Baer, *et al.* (1956). "Kristallisation und Konstitutionsermittlung der Lacto-*N*-fucopentaose I." Chem Ber **89**: 2514-2523.
- Kuhn, R., H. H. Baer, *et al.* (1956). "Kristallisierte Fucosido-lactose." Chem Ber **89**: 2513.
- Kuhn, R., H. H. Baer, *et al.* (1958). "Die Konstitution der Lacto-*N*-fucopentaose II. Ein Beitrag zur Spezifität der Blutgruppensubstanz Le^a." Chem Ber **91**: 364-374.
- Kuhn, R. and A. Gauhe (1958). "Über die Lacto-Difuco-Tetraose der Frauenmilch. Ein Beitrag zur Strukturspezifität der Blutgruppensubstanz Le." Justus Liebigs Anal Chem **611**: 249-253.
- Kuhn, R. and A. Gauhe (1960). "Über ein kristallisiertes, Le^a-aktives Hexasaccharid aus Frauenmilch." Chem Ber **93**: 647-651.
- Kunz, C., M. Rodriguez-Palmero, *et al.* (1999). "Nutritional and biochemical properties of human milk, Part I: General aspects, proteins, and carbohydrates." Clin Perinatol **26**: 307-333.
- Kunz, C., S. Rudloff, *et al.* (1996). "High-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection and molar response factors of human milk oligosaccharides." J Chromatogr B Biomed Appl **685**: 211-221.
- Kunz, C., S. Rudloff, *et al.* (1999). "Lactose-derived oligosaccharides in the milk of elephants: comparison with human milk." Br J Nutr **82**: 391-399.
- Lee, H., H. J. An, *et al.* (2011). "Rapid profiling of bovine and human milk gangliosides by matrix-assisted laser desorption/ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry." Int J Mass Spectrom **305**: 138-150.
- Lemons, J. A., L. Moye, *et al.* (1982). "Differences in the composition of preterm and term human milk during early lactation." Pediatr Res **16**: 113-117.
- Liao, Y., R. Alvarado, *et al.* (2011). "Proteomic characterization of specific minor proteins in the human milk casein fraction." J Proteome Res **10**: 5409-5415.
- Lønnerdal, B. and S. Atkinson (1995). Nitrogenous components of milk. Handbook of milk composition. R. G. Jensen. San Diego, Academic Press, Inc.: 351-368.
- Lønnerdal, B., E. Forsum, *et al.* (1976). "A longitudinal study of the protein, nitrogen, and lactose contents of human milk from Swedish well-nourished mothers." Am J Clin Nutr **29**: 1127-1133.
- Mariño, K., J. A. Lane, *et al.* (2011). "Method for milk oligosaccharide profiling by 2-aminobenzamide labelling and hydrophilic interaction chromatography." Glycobiology **21**: 1317-1330.
- Mitoulas, L. R., J. C. Kent, *et al.* (2002). "Variation in fat, lactose and protein in human milk over 24h and throughout the first year of lactation." Br J Nutr **88**: 29-37.
- Montreuil, J. (1956). "Structure of two triholosides isolated from human milk." C R Hebd Seances Acad Sci **242**: 192-193.
- Neville, M. C., J. C. Allen, *et al.* (1991). "Studies in human lactation: milk volume and nutrient composition during weaning and lactogenesis." Am J Clin Nutr **54**: 81-92.
- Orsi, N. (2004). "The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives." Biometals **17**: 189-196.

- Pabst, M., D. Kolarich, *et al.* (2008). "Comparison of fluorescent labels for oligosaccharides and introduction of a new postlabeling purification method." *Anal Biochem* **384**: 263-273.
- Pfenninger, A., M. Karas, *et al.* (2002). "Structural analysis of underivatized neutral human milk oligosaccharides in the negative ion mode by nano-electrospray MSⁿ (part 1: methodology)." *J Am Soc Mass Spectrom* **13**: 1331-1340.
- Pfenninger, A., M. Karas, *et al.* (2002). "Structural analysis of underivatized neutral human milk oligosaccharides in the negative ion mode by nano-electrospray MSⁿ (part 2: application to isomeric mixtures)." *J Am Soc Mass Spectrom* **13**: 1341-1348.
- Phelan, M., A. Aherne, *et al.* (2009). "Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status." *Int Dairy J* **19**: 643-654.
- Rohmer, M., D. Baeumlisberger, *et al.* (2011). "Fragmentation of neutral oligosaccharides using the MALDI LTQ Orbitrap." *Int J Mass Spectrom* **305**: 199-208.
- Rohmer, M., B. Meyer, *et al.* (2010). "3-Aminoquinoline acting as matrix and derivatizing agent for MALDI MS analysis of oligosaccharides." *Anal Chem* **82**: 3719-3726.
- Roseanu, A. and J. H. Brock (2006). "What are the structure and the biological function of lactoferrin in human breast milk?" *IUBMB Life* **58**: 235-237.
- Rudloff, S. and C. Kunz (1997). "Protein and nonprotein nitrogen components in human milk, bovine milk, and infant formula: quantitative and qualitative aspects in infant nutrition." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **24**: 328-344.
- Ruhaak, L. R., A. M. Deelder, *et al.* (2009). "Oligosaccharide analysis by graphitized carbon liquid chromatography-mass spectrometry." *Anal Bioanal Chem* **394**: 163-174.
- Ruhaak, L. R., R. Hennig, *et al.* (2010). "Optimized workflow for preparation of APTS-labeled N-glycans allowing high-throughput analysis of human plasma glycomes using 48-channel multiplexed CGE-LIF." *J Proteome Res* **9**: 6655-6664.
- Saarela, T., J. Kokkonen, *et al.* (2005). "Macronutrient and energy contents of human milk fractions during the first six months of lactation." *Acta Paediatr* **94**: 1176-1181.
- Sabharwal, H., B. Nilsson, *et al.* (1988). "Oligosaccharides from feces of preterm infants fed on breast milk." *Arch Biochem Biophys* **265**: 390-406.
- Sánchez, L., M. Calvo, *et al.* (1992). "Biological role of lactoferrin." *Arch Dis Child* **67**: 657-661.
- Schack-Nielsen, L. and K. F. Michaelsen (2006). "Breast feeding and future health." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **9**: 289-296.
- Schwarzer, J., E. Rapp, *et al.* (2008). "N-glycan analysis by CGE-LIF: profiling influenza A virus hemagglutinin N-glycosylation during vaccine production." *Electrophoresis* **29**: 4203-4214.
- Sela, D. A., D. Garrido, *et al.* (2011). "*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC15697 α -fucosidases are active on fucosylated human milk oligosaccharides." *Appl Environ Microbiol*.
- Selman, M. H. J., R. J. E. Derks, *et al.* (2011). "Fc specific IgG glycosylation profiling by robust nano-reverse phase HPLC-MS using a sheath-flow ESI sprayer interface." *J Proteomics*.
- Slade, H. B. and S. A. Schwartz (1987). "Mucosal immunity: the immunology of breast milk." *J Allergy Clin Immunol* **80**: 348-358.
- Stahl, B., S. Thurl, *et al.* (2001). "Detection of four human milk groups with respect to Lewis-blood-group-dependent oligosaccharides by serologic and chromatographic analysis." *Adv Exp Med Biol* **501**: 299-306.
- Stahl, B., S. Thurl, *et al.* (1994). "Oligosaccharides from human milk as revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry." *Anal Biochem* **223**: 218-226.
- Stellner, K., H. Saito, *et al.* (1973). "Determination of aminosugar linkages in glycolipids by methylation. Aminosugar linkages of ceramide pentasaccharides of rabbit erythrocytes and of Forssman antigen." *Arch Biochem Biophys* **155**: 464-472.

- Strecker, G., S. Fièvre, *et al.* (1992). "Primary structure of four human milk octa-, nona-, and undeca-saccharides established by ^1H - and ^{13}C -nuclear magnetic resonance spectroscopy." *Carbohydr Res* **226**: 1-14.
- Strecker, G., J. Wieruszkeski, *et al.* (1988). "Structure of a new nonasaccharide isolated from human milk: VI²Fuc,V⁴Fuc,III³Fuc-*p*-lacto-*N*-hexaose." *Glycoconj J* **5**: 385-396.
- Strecker, G., J. M. Wieruszkeski, *et al.* (1989). "Primary structure of human milk nona- and decasaccharides determined by a combination of fast atom bombardment mass spectrometry and ^1H -/ ^{13}C -nuclear magnetic resonance spectroscopy. Evidence for a new core structure, *iso*-lacto-*N*-octaose." *Glycoconj J* **6**: 169-182.
- Tachibana, Y., K. Yamashita, *et al.* (1978). "Oligosaccharides of human milk: structural studies of di- and trifucosyl derivatives of lacto-*N*-octaose and lacto-*N*-neooctaose." *Arch Biochem Biophys* **188**: 83-89.
- Thurl, S., J. Henker, *et al.* (1997). "Detection of four human milk groups with respect to Lewis blood group dependent oligosaccharides." *Glycoconj J* **14**: 795-799.
- Thurl, S., B. Müller-Werner, *et al.* (1996). "Quantification of individual oligosaccharide compounds from human milk using high-pH anion-exchange chromatography." *Anal Biochem* **235**: 202-206.
- Thurl, S., M. Munzert, *et al.* (2010). "Variation of human milk oligosaccharides in relation to milk groups and lactational periods." *Br J Nutr* **104**: 1261-1271.
- Urashima, T., S. Asakuma, *et al.* (2011). "Possible significance of the predominance of type I oligosaccharides, a feature specific to human breast milk." *Adv Nut.*
- Urashima, T., K. Fukuda, *et al.* (2011). *Milk Oligosaccharides*. New York, Nova Science Publishers, Inc.
- Van de Perre, P. (2003). "Transfer of antibody via mother's milk." *Vaccine* **21**: 3374-3376.
- Welsch, U. (2003). Weibliche Brust und Brustdrüse. *Lehrbuch Histologie*. U. Welsch. München, Elsevier GmbH. **1**: 477-486.
- Wu, S., R. Grimm, *et al.* (2011). "Annotation and structural analysis of sialylated human milk oligosaccharides." *J Proteome Res* **10**: 856-868.
- Wu, S., N. Tao, *et al.* (2010). "The development of an annotated library of neutral human milk oligosaccharides." *J Proteome Res* **9**: 4138-4151.
- Yamashita, K., Y. Tachibana, *et al.* (1976). "Oligosaccharides of human milk: isolation and characterization of two new nonasaccharides, monofucosyllacto-*N*-octaose and monofucosyllacto-*N*-neooctaose." *Biochemistry* **15**: 3950-3955.
- Yamashita, K., Y. Tachibana, *et al.* (1977). "Oligosaccharides of human milk. Structural studies of two new octasaccharides, difucosyl derivatives of para-lacto-*N*-hexaose and para-lacto-*N*-neohexaose." *J Biol Chem* **252**: 5408-5411.
- Yamashita, K., Y. Tachibana, *et al.* (1977). "Oligosaccharides of human milk: structures of three lacto-*N*-hexaose derivatives with H-haptenic structure." *Arch Biochem Biophys* **182**: 546-555.
- Yan, H., M. E. Lamm, *et al.* (2002). "Multiple functions of immunoglobulin A in mucosal defense against viruses: an in vitro measles virus model." *J Virol* **76**: 10972-10979.
- Yang, H., Y. Yu, *et al.* (2011). "Structural characterization of neutral oligosaccharides by laser-enhanced in-source decay of MALDI-FTICR MS." *J Am Soc Mass Spectrom* **22**: 845-855.
- Yen, C. C., C. J. Shen, *et al.* (2011). "Lactoferrin: an iron-binding antimicrobial protein against *Escherichia coli* infection." *Biometals* **24**: 585-594.
- Yu, Z., C. Chen, *et al.* (2011). "Human milk oligosaccharides affect growth of infant fecal microbiota *in vitro*." *Glycobiology* **21**: 1461.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Möglichkeit nutzen mich bei allen Wegbegleitern, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben zu bedanken.

Mein größter Dank gilt Prof. Rudolf Geyer, der das Anfertigen meiner Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe ermöglicht hat. Nicht nur die hervorragende fachliche Unterstützung seinerseits, sondern auch sein „offene Ohr“ für verschiedenste Belange, sein Engagement sowie seine Zuverlässigkeit haben grundlegend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich möchte auch für die finanzielle Unterstützung sowie für die zahlreichen Möglichkeiten an nationalen und internationalen Konferenzen teilzunehmen, danken.

Mein Dank gilt weiterhin Prof. Wolfgang Maison, der diese Arbeit offiziell im Fachbereich 08 betreut hat. Er hat mich offen in seine Arbeitsgruppe aufgenommen und gab mir immer das Gefühl einen zuverlässigen Ansprechpartner im Fachbereich Chemie zu haben.

Prof. Clemens Kunz ermöglichte nicht nur den Zugang zu Milchproben, vielmehr hatte er immer interessante Anregungen und Vorschläge, die bestätigten, dass die erzielten Ergebnisse gewürdigt und geschätzt werden.

Sofortige Hilfe, besonders bei bioanalytischen Fragen, war mir immer von Hille und Sebastian sicher.

Ein besonderer Dank geht an Sandra und Tina die nicht nur als Kolleginnen immer helfend zur Seite standen, sondern auch den Laboralltag als Freunde bereichert haben. Ihr wart die beste Begleitung die man sich wünschen konnte.

Auch Kai möchte ich für seine vielen Anregungen und Ideen danken, mit denen er zu dieser Arbeit beigetragen hat. Prof. Günter Lochnit konnte immer mit fachkundiger Hilfe in Sachen MALDI und Lab-Roboter zur Seite stehen. Sören, Ben und Moriz sowie Olli, Nils und Peter haben den Laboralltag deutlich aufgelockert. Auch dafür möchte ich euch danken.

Verlass war immer auf die kompetente Unterstützung von Werner, Siggie und Peter. Egal ob analytische, technische oder organisatorische Fragen, alle standen mir immer hilfreich zur Seite.

Ich möchte auch Viktoria, Sabine und Jule danken, die ebenfalls in besonderem Maße zu dieser Arbeit beigetragen haben. Ergebnisse, Korrekturen und etliche Versuche wären ohne euch wohl nicht so rund geworden.

Elli, Faiza und Alex möchte ich für die Begleitung durch das ganze Studium und die zahlreichen schönen Stunden außerhalb der Uni danken.

Meinen Eltern danke ich für ihre andauernde Unterstützung, die mich durch mein ganzes Studium bis hierher begleitet hat. Es ist schön zu wissen, dass ihr immer darauf vertraut habt, dass ich das Richtige tue.

Zuletzt gilt mein größter Dank meiner Frau Jenny. Deine Unterstützung, besonders in den stressigen Tagen dieser Arbeit sowie das Wissen, dass ich nach Hause kommen kann wo jemand da ist, der mich versteht, meine Freuden aber auch Sorgen teilt, hat mir die Kraft gegeben diese Arbeit fertig zu stellen.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Dennis Blank