



**Charakterisierung des Glykosylierungsmusters des murinen,
neuralen Zelladhäsionsmoleküles CD24**

Kumulativdissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
im Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Christina Bleckmann
Diplom-Lebensmittelchemikern
aus Leipzig

Gießen, 2009

Die vorliegende Dissertation wurde im Zeitraum von Mai 2005 bis Dezember 2008 am Biochemischen Institut des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rudolf Geyer erstellt. Ein Teil der Experimente wurden im November/Dezember 2007 im Labor von Prof. Dr. Vernon Reinhold an der Universität New Hampshire (Durham, USA) durchgeführt.

Dekan: Prof. Dr. Volkmar Wolters
1. Gutachter: Prof. Dr. Bernhard Spengler
2. Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Geyer

Tag der Disputation: 09.Juli 2009

Veröffentlichungen aus dieser Arbeit

Kongressbeiträge (Poster / Vorträge)

C. Bleckmann, H. Geyer, A. Lieberoth, R. Kleene, M. Schachner, R. Geyer (2006). Characterization of N-glycans from murine neural glycoprotein CD24. 17th Joint Meeting of the „Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie“, the „Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie“, the „Groupe Lillois de Glycobiologie“ and the “Belgian Working Group for Glycosciences”, 05.-07. November 2006, Brügge, Belgien.

C. Bleckmann, H. Geyer, A. Lieberoth, R. Kleene, M. Schachner, R. Geyer (2007). Glycosylation pattern of murine neural glycoprotein CD24. Glyco 19 - XIX International Symposium on Glycoconjugates, 15.-20.Juli 2007, Cairns, Australien.

C. Bleckmann, H. Geyer, A. Lieberoth, R. Kleene, M. Schachner, V. Reinhold, R. Geyer (2008). Glycosylation of murine neural glycoprotein CD24. 41. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), 02.-05. März 2008, Giessen.

C. Bleckmann, H. Geyer, A. Lieberoth, R. Kleene, M. Schachner, V. Reinhold, R. Geyer (2008). N- and O-Glycosylation of murine neural glycoprotein CD24. 4rd Glycan Forum, 23.+24. Mai 2008, Berlin.

C. Bleckmann, H. Geyer, A. Lieberoth, R. Kleene, M. Schachner, V. Reinhold, R. Geyer (2008). N- and O-Glycosylation of murine neural glycoprotein CD24. 10th Summer School Glycosciences, 09.-12.Juni 2008, VLAG, Wageningen, Niederlande.

C. Bleckmann, H. Geyer, A. Lieberoth, R. Kleene, M. Schachner, V. Reinhold, R. Geyer (2008). N- and O-Glycosylation of murine neural glycoprotein CD24. 17th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis, 26.-29.August 2008, Sapporo, Japan.

C. Bleckmann, H. Geyer, R. Kleene, M. Schachner, V. Reinhold, R. Geyer (2008). Glycomic analysis of the murine cell adhesion molecule CD24. 19th Joint Meeting of the „Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie“, the „Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie“ and the „Groupe Lillois de Glycobiologie“, 30.November-02. Dezember 2008, Wageningen, Niederlande.

Veröffentlichungen

C. Bleckmann, H. Geyer, Vernon Reinhold, A. Lieberoth, M. Schachner, R. Kleene, R. Geyer, *Glycomic analysis of N-linked carbohydrate epitopes from CD24 of mouse brain*. Journal of Proteome Research, 2009. **8**(2): p. 567-582.

C. Bleckmann, H. Geyer, A. Lieberoth, F. Splittstoesser, Y. Liu, T. Feizi, M. Schachner, R. Kleene, V. Reinhold, R. Geyer, *O-glycosylation pattern of CD24 from mouse brain*. Biological Chemistry, 2009. **390**: p. 627-645.

Abkürzungen

ACN	Acetonitril
AQ	3-Aminoquinolin
ATT	6-Aza-2-thiothymine
CDG	<i>Congenital Disorders of Glycosylation</i>
CE	Kapillarelektrophorese
CID	kollisionsinduzierte Dissoziation
Da	Dalton
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
dHex	Deoxyhexose
DRG	Hinterwurzelganglien
EAE	Experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis
endo H	endo- <i>N</i> -Acetylglucosaminidase H
endo F1	endo- <i>N</i> -Acetylglucosaminidase F1
endo F2	endo- <i>N</i> -Acetylglucosaminidase F2
endo F3	endo- <i>N</i> -Acetylglucosaminidase F3
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
ETD	Elektronen Transfer Dissoziation
Fuc	L-Fucose
FAB	<i>Fast Atom Bombardment</i>
Gal	D-Galaktose
GalNAc	2-Acetamido-2-deoxy-D-galaktose (<i>N</i> -Acetylgalaktosamin)
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Gaschromatographie in Kombination mit Massenspektrometrie
Glc	Glucose
GlcA	Glucuronsäure
GlcNAc	2-Acetamido-2-deoxy-D-glucose (<i>N</i> -Acetylglucosamin)
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HCCA	α -Cyano-4-hydroxymethylsäure
H, Hex	Hexose
HexNAc	<i>N</i> -Acetylhexosamin
HNK-1	<i>Human Natural Killer Cell</i> Epitop (SO ₄ -3GlcA β 1-3Gal β 1-4GlcNAc)
HPAEC	Hochdruckanionenaustauscherchromatographie

HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HSA	<i>Heat Stable Antigen</i>
IT	<i>Ion Trap</i>
ISD	<i>In Source Decay</i>
kDa	Kilodalton
Le ^x	Lewis ^x (Galβ1-4[Fucα1-3]GlcNAc)
LID	Laser-induzierte Dissoziation
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i>
Man	D-Mannose
MEB	<i>Muscle Eye Brain Disease</i>
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
NeuAc	Neuraminsäure
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
HexNAc	N-Acetylhexosamin
PA	2-Aminopyridin; Pyridylamin
PNGaseA	N-Glykosidase A
PNGaseF	N-Glykosidase F
PSD	<i>Post Source Decay</i>
RGC	Retinale Ganglienzellen
RP	<i>Reversed Phase</i>
Siglec	<i>Sialic-Acid-Binding Immunoglobulin-like Lectin</i>
THAP	2,4,6-Trihydroxyacetophenon
UV	Ultraviolett
WB	Western Blot
WWS	Walker-Warburg Syndrom
Xyl	Xylose

INHALTSVERZEICHNIS

	VERÖFFENTLICHUNGEN AUS DIESER ARBEIT	I
	ABKÜRZUNGEN.....	III
1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Zelladhäsionsmolekül CD24.....	1
1.1.1	Expression	1
1.1.2	Struktur.....	2
1.1.3	Funktionen und Interaktionspartner	3
1.1.4	Die Rolle von CD24 im Nervensystem	6
1.2	Glykosylierung	8
1.2.1	Struktur und Biosynthese von proteingebundenen Glykanen	8
1.2.2	Funktionen von Glykanen	11
1.3	Analytische Methoden zur Charakterisierung von Glykoproteinen und Glykanen	13
1.3.1	Strategien zur Strukturanalyse von Glykoproteinen	13
1.3.2	Massenspektrometrische Analyse	16
1.3.2.1	MALDI-TOF-MS/(MS)	17
1.3.2.2	ESI-IT-MS ⁿ	20
1.3.2.3	Fragmentierungsverhalten von Glykanen.....	23
1.3.2.4	Verknüpfungsanalyse	24
2	ZIELSETZUNG	26
3	PUBLIKATIONEN	27
4	DISKUSSION	63
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	72
6	SUMMARY	74
7	LITERATUR	76
	DANKSAGUNGEN.....	85
	CURRICULUM VITAE	86
	ERKLÄRUNG	87

1 Einleitung

1.1 Das Zelladhäsionsmolekül CD24

Das Zelladhäsionsmolekül CD24 wurde zuerst von Springer und Mitarbeitern im Jahr 1978 beschrieben [1]. Sie entdeckten in der Maus ein hydrophobes Glykoprotein. Aufgrund seiner Hitzebeständigkeit wurde es als *Heat Stable Antigen* (HSA) bzw. nach seinem Antikörper als J11d/M1.69 bezeichnet. Wegen seiner starken Glykosylierung wurde es auch Nectradrin genannt [2], bevor sich später als Benennung CD24 nach der *Cluster of Differentiation* Nomenklatur durchsetzte.

1.1.1 Expression

Die Expression von CD24 ist in Zellen und Geweben breit gefächert. Zuerst wurde es in verschiedenen haematopoetischen Zellsubpopulationen, wie B- und T-Lymphozyten, entdeckt [3] und konnte auch auf Erythrozyten, Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen [2, 4] nachgewiesen werden. Neben dem Blutzellsystem wird CD24 in einer Reihe von weiteren Geweben exprimiert. So konnte es in Haarfollikeln, der Haut, den Speicheldrüsen und Epithelzellen sowie im Muskel-, Lungen- und Nervengewebe detektiert werden [5, 6]. Die Expression von CD24 während der Entwicklung des Nervensystems ist streng reguliert. Während der Embryogenese ist es stark auf der Oberfläche von sich differenzierenden und wandernden Neuronen sowie Astrozyten und Oligodendrozyten vorhanden [2, 7]. Das Expressionsniveau sinkt dann bis eine Woche postnatal ab [7]. Danach wird CD24 hauptsächlich in Zonen sekundärer Neurogenese, wie im Gyrus dentatus des Hippocampus, der subventrikulären Zone sowie im rostralen migratorischem Strom und Riechkolben exprimiert [5-7]. Eine besondere Bedeutung hat CD24 auch in der Tumorbilogie; es wird in einer Vielzahl von haematopoetischen und soliden Tumoren ausgeschüttet [8-11]. CD24 wird daher für unterschiedliche Differenzierungsstudien in der Haemato- und Onkogenese als Marker eingesetzt [12].

1.1.2 Struktur

Das Zelladhäsionsmolekül CD24 ist ein hochglykosyliertes Protein, das über einen Glykosylphosphatidylinositol(GPI)-Anker in die sogenannten *Lipid Rafts* der äußeren Plasmamembran der Zelle integriert ist. Das Proteinrückgrat von CD24 ist je nach Spezies aus ca. 30 Aminosäuren aufgebaut, was einem Molekulargewicht von ungefähr 3 kDa entsprechen würde. Das apparente Molekulargewicht variiert jedoch je nach Zelltyp und Entwicklungsstadium zwischen 25 und 70 kDa [13-15]. Ein sehr großer Anteil des Moleküls wird demnach von posttranslationalen Modifikationen bestimmt, im Fall von CD24, von der Glykosylierung des Proteins. Murines CD24 besteht aus 27 Aminosäuren; etwa 30% der Sequenz spiegeln dabei potentielle Glykosylierungsstellen wider. Wie in Abb.1 dargestellt, existieren 3 potentielle N- und 7 potentielle O-Glykosylierungspositionen [16]. Das Glykanmuster von CD24 ist je nach Zelltyp und Entwicklungsstadium variabel; über die genauen Glykanstrukturen ist jedoch wenig bekannt. Die bisher erlangten Erkenntnisse stützten sich bisher hauptsächlich auf Immun- und Lektinfärbemethoden. Es konnten so auf CD24 in verschiedenen Zelllinien oligomannosidische und komplexe N-Glykane nachgewiesen werden. Außerdem konnten auf diesem Wege terminal gebundene α -2,3 Sialinsäure sowie das Lewis^x (Le^x)- und das *Human Natural Killer Cell* (HNK-1)-Epitop detektiert werden [15, 17, 18].

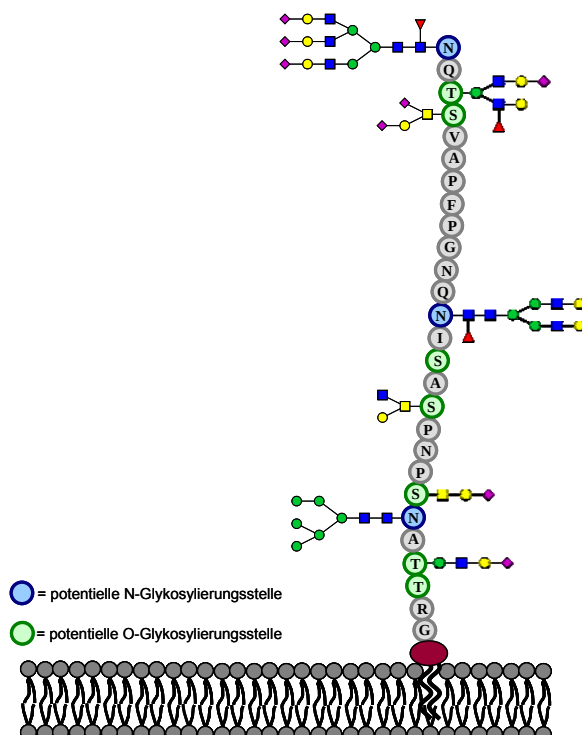


Abb.1: Schematische Darstellung von murinem CD24 mit farblich gekennzeichneten potentiellen Glykosylierungsstellen, die beispielhafte Glykanstrukturen tragen

1.1.3 Funktionen und Interaktionspartner

CD24 hat, abhängig von Expressionsort und -zeitpunkt, mannigfache Funktionen, die hauptsächlich, wenn nicht sogar ausschließlich, über seine unterschiedlichen Glykosylierungsmuster vermittelt werden.

Im Immunsystem wird CD24 auf unterschiedlichen lymphatischen und myeloiden Zellen exprimiert und ist an ihrer Entwicklung und Proliferation beteiligt [19]. CD24-defiziente Mäuse sind überlebensfähig und zeigen keinen auffälligen Phänotyp; bei ihrer Untersuchung konnte jedoch eine verminderte Anzahl von Knochenmarkvorläuferzellen detektiert werden, was darauf schließen lässt, dass CD24 an der Reifung der Lymphozyten beteiligt ist [20]. Die Anzahl der differenzierten B- und T-Zellen in der Peripherie ist jedoch in den Knock-out Mäusen vergleichbar mit denen in den Wildtyp-Mäusen, so dass auch bei den CD24 defizienten Tieren eine normale Immunantwort zu beobachten ist [3, 21]. Die Proliferation der T-Zellen ist in den CD24-defizienten Mäusen jedoch durch frühere und schnellere Zellteilung erhöht [22].

In einer aktuellen Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass nach Applikation, einer für gesunde Tiere ungefährlichen Dosis, des entzündungsauslösenden Agens Acetaminophen, CD24 defiziente Mäuse innerhalb von 20 Stunden sterben. CD24 scheint in Interaktion mit Siglec-G bzw. Siglec-10, ein Mitglied der *Sialic-Acid-Binding Immunoglobulin-like Lectins* (Siglecs) Familie, auf dendritischen Zellen eine wichtige regulatorische Funktion bei Entzündungsprozessen zu haben. Durch Bindung intrazellulärer Proteine wird die Immunantwort abgeschwächt [23].

Die Erythrozyten von CD24 Knock-out Mäusen weisen ebenfalls Veränderungen auf; sie haben eine geringere Halbwertszeit, eine höhere Aggregationstendenz und sind anfälliger gegenüber hypertotonischer Lyse [11]. Auch hier sind jedoch keine Unterschiede der Hämatokrit- und Hämoglobinwerte zwischen Wildtyp- und Knock-out Mäusen zu verzeichnen [3]. Die Versuche mit CD24-defizienten Mäusen zeigen zudem, dass CD24 regulatorische Funktionen bei der homeostatischen Proliferation von Lymphozyten hat und so ein Gleichgewicht in der Anzahl an Immunzellen gehalten wird [22].

Bei Autoimmunerkrankungen kommt es durch eine Hyperaktivierung des Immunsystems zu einer Reaktion gegen das eigene, gesunde Gewebe; es liegt demnach eine Störung der homeostatischen Proliferation der Lymphozyten vor. Multiple Sklerose ist eine solche Autoimmunerkrankung, bei der es durch chronische Entzündungsprozesse zu einer Entmarkung im zentralen Nervensystem kommt [24].

Bei experimentellen Untersuchungen an CD24-defizienten Mäusen konnte im Mausmodell dieser Erkrankung, der Experimentellen Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE), eine Resistenz gegen diese Krankheit beobachtet werden [25]. Des Weiteren wurde bei Mutationen im menschlichen CD24-Gen, die auf Einzelnukleotid-Polymorphismen und damit auf den Austausch einzelner Aminosäuren beruhen, eine Überexpression von CD24 auf der Zelloberfläche nachgewiesen. Menschen mit dieser Genmutation neigen zu einem erhöhten Risiko, an Multipler Sklerose zu erkranken, und bei Ausbruch von Multipler Sklerose zu einem beschleunigten Krankheitsverlauf [4, 26, 27]. CD24 hat durch seine regulatorischen Funktionen in der Homeostase vermutlich Einfluss auf das Auftreten von Autoimmunerkrankungen.

CD24 ist auch im Zusammenhang mit Krebs von Interesse. Es wird in einer Vielzahl von haematopoetischen und soliden Tumoren exprimiert und ist an deren Zelladhäsion und Metastatisierung beteiligt [11, 28]. CD24 wird als prognostischer Tumormarker eingesetzt; in den meisten Fällen ist eine hohe CD24-Expression mit einem aggressivem Verlauf der Krankheit und damit schlechteren Überlebenschancen des Patienten assoziiert [12]. In *in vitro* Experimenten konnten durch CD24 Transfektion erhöhte Zellteilung, Tumorwachstum, Invasivität, Metastatisierung und Bindung an extrazelluläre Matrixmoleküle beobachtet werden [8]. Durch Verringerung der CD24 Expression *in vitro* konnten das Tumorzellwachstum und die Zellmigration verringert werden [29]. Dies eröffnet neue diagnostische Möglichkeiten und unterstreicht die Bedeutung von CD24 als therapeutisches Ziel bei der Bekämpfung von Krebs. Durch *in vivo*-Applikation von α -CD24 Antikörpern und *in vitro*-Einsatz von siRNA gegen das CD24-Gen konnte die Tumorgenität von Krebszellen bereits herabgesetzt werden [30]. Als Interaktionspartner von CD24 auf Tumorzellen und auch auf unterschiedlichen Lymphozyten konnte P-Selektin identifiziert werden (siehe Tab.1) [31]. P-Selektin kommt in Endothelzellen und Blutplättchen vor; durch Stimulation mit entzündungsfördernden Agenzien wird es innerhalb kürzester Zeit an die Zelloberfläche transportiert [32]. Dort kann es an CD24 exprimierende Tumorzellen binden. CD24 interagiert über ein Sialyl-Le^x-Motiv mit P-Selektin; es kommt so zu einer Bindung der Tumorzellen an die Blutgefäße, was zum physikalischen Schutz der Tumorzellen, zur Ausbreitung des Tumorgewebes und Metastatisierung führen kann. In Verbindung mit Tumor- und Blutzellen ist außerdem interessant, dass CD24 als GPI-verankertes Molekül mit verschiedenen Src-Kinasen assoziieren kann, die über Aktivierung von Integrinen an der Signaltransduktionskapazität von CD24 beteiligt sind [8, 17, 33, 34].

Tab.1: Interaktionspartner von CD24

Interaktions-partner	Eigenschaften	Rezeptor für	Referenz
P-Selektin	• Zelladhäsionsmolekül • wird in Endothelzellen und aktivierten Blutplättchen exprimiert • Interaktion ist abhängig von der Ca^{2+}- und der Salzkonzentration	• Sialylierte Epitope, wie Sialyl-Le^x • Sulfatierte Glykane, wie HNK-1	[17, 31]
L1	• Zelladhäsionsmolekül der L1 Ig Superfamilie • wird in neuronalen und lymphoiden Zellen exprimiert • ist aufgebaut aus einem hoch-konserviertem zytoplasmatischen Teil, einer Transmembrandomäne, 6-Ig-ähnlichen Domänen und 5 FNIII-Repeats	• α-2,3 Sialinsäure	[15, 35, 36]
Siglec-G bzw. Siglec-10	• Mitglied der Siglec-Familie • wird auf Immunzellen exprimiert • liegt als Transmembranprotein mit 4-Ig-ähnlichen Domänen, einer Transmembranregion und einem cytoplasmatischem Schwanz vor	• α-2,6 Sialinsäure an N-Acetyllactosamin-einheit	[23, 37, 38]
TAG-1/F3	• Zelladhäsionsmoleküle der Contactin Ig Superfamilie • liegen frei oder über einen GPI-Anker mit der Zellmembran verknüpft vor • sind aufgebaut aus 6-Ig-ähnlichen Domänen und 4 FNIII-Repeats	• Le^x-Epitop	[39]
Src-Kinasen	• Proteinkinasen, die eine Phosphorylierung von Proteinen und dadurch eine Regulation der Signaltransduktion bewirken • liegen frei im Zytoplasma oder als Transmembranproteine vor	• nicht bekannt	[40]

1.1.4 Die Rolle von CD24 im Nervensystem

Im Nervensystem wird CD24 je nach Entwicklungsstadium in unterschiedlichen Arealen exprimiert und ist während der Embryogenese und der sekundären Neurogenese des Gehirns in eine Reihe von Prozessen involviert. So hat CD24 Funktionen bei der Adhäsion und der Migration von Neuronen [2, 7]. Es spielt außerdem beim Neuritenwachstum eine tragende Rolle; in retinalen Ganglienzellen (RGC) und Hinterwurzelganglienneuronen (DRG) inhibiert es das Wachstum, während es das von Kleinhirnneuronen fördert [15, 36]. Das Nervensystem CD24-defizienter Mäuse weist im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nur geringfügige Abweichungen auf. Zum einen wurden im Embryonalstadium, zum anderen postnatal in der subventrikulären Zone erhöhte Zellzahlen nachgewiesen [5, 6]. Neben homophilen CD24-Interaktionen sind im Nervensystem weitere Zelladhäsionsmoleküle als heterophile Bindungspartner von CD24 bekannt. Die wohl am Besten untersuchte Interaktion ist die mit L1 (Tab.1). CD24 und auch L1 vermitteln Zelladhäsion und lösen Calciumsignale aus [35]. CD24 scheint hierbei die Signaltransduktion von L1 zu verstärken. Dabei scheint zudem eine gewisse Hierarchie vorzuherrschen; L1 ist an der Aggregation von schnell wachsenden Zellen beteiligt, während CD24 langsamer wachsende Zellen aggregieren lässt [35]. Diese Interaktion von CD24 mit L1 ist kohlenhydratabhängig, da L1 an endständige α -2,3 gebundene Sialinsäuren von CD24 bindet. Der Sialinsäurerezeptor konnte in der ersten Fibronektindomäne von L1 lokalisiert werden [15, 36]. Da auch nach De-N-Glykosylierung mit N-Glykosidase F (PNGase F) eine Interaktion mit L1 nicht vermindert wird [41], ist davon auszugehen, dass die Bindung durch sialylierte O-Glykane auf CD24 vermittelt wird. Bei der Bindung von CD24 an L1 handelt es sich um eine *trans*-Interaktion. Die von CD24 vermittelte Förderung bzw. Inhibition des Neuritenwachstums ist abhängig von der *trans*-Interaktion dieser beiden Moleküle [15].

Neben L1 wird das CD24-vermittelte Neuritenwachstum auch durch Interaktion mit zwei weiteren Zelladhäsionsmolekülen beeinflusst. Bei den beiden Rezeptoren TAG-1 und F3 (Tab.1) handelt es sich um Mitglieder der Contactin Ig Superfamilie. Diese interagieren ebenfalls zuckerabhängig in *trans* mit Le^X-Kohlenhydratepitopen von CD24 [39]. Die drei beschriebenen Interaktionspartner bilden mit CD24 in Kleinhirnneuronen einen Komplex, der möglicherweise durch Wechselwirkung mit weiteren Proteinen Signaltransduktionskaskaden auslöst, die das Neuritenwachstum fördern.

Im Gegensatz dazu interagiert CD24 in DRG-Neuronen mit zwei verschiedenen Komplexen bestehend aus L1, TAG-1 und Caspr2 bzw. L1, F3 und Caspr. Die Beteiligung der beiden Korezeptoren Caspr2 und Caspr führt jedoch zu einer Signaltransduktion, die das Neuritenwachstum in den DRG-Neuronen inhibiert [39]. In Abb.2 ist schematisch ein Modell zur möglichen Interaktion von CD24 mit seinen Rezeptoren dargestellt.

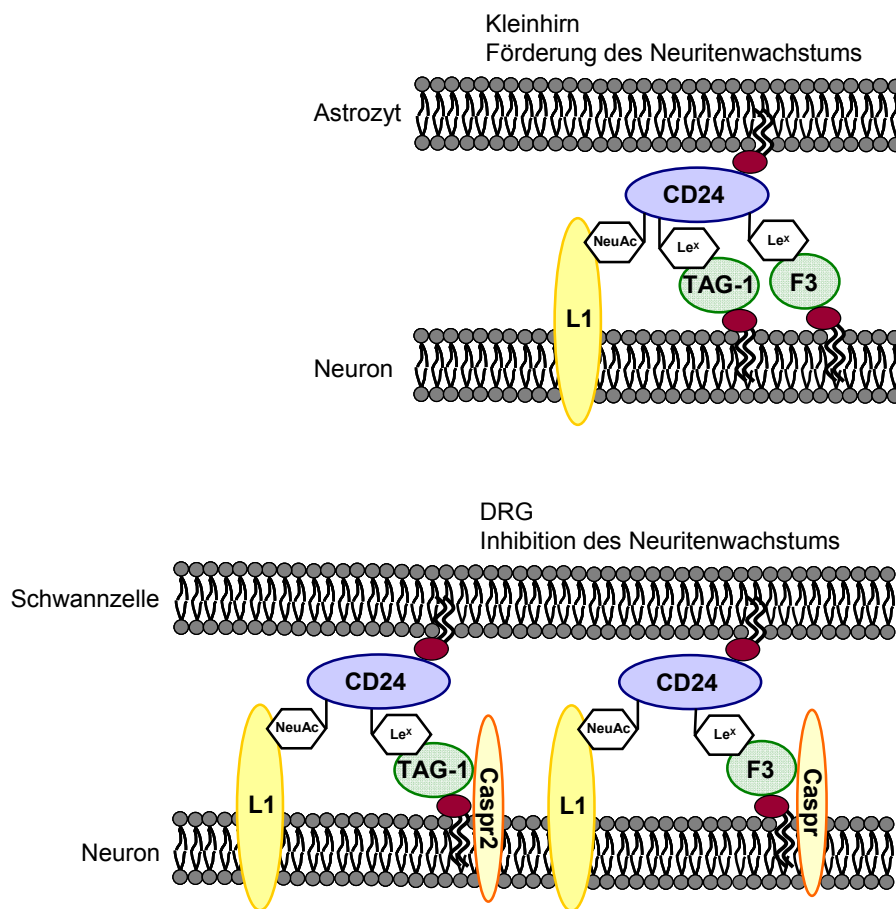


Abb.2: Modell zur trans-Interaktion von CD24 mit den Zelladhäsionsmolekülen L1, TAG-1 und F3 und deren Zusammenwirken bei der Förderung bzw. Hemmung des Neuritenwachstums nach Lieberoth [39]

1.2 Glykosylierung

Die vier essentiellen Bausteine einer Zelle sind Proteine, Nukleinsäuren, Lipide und Glykane. Glykane in Säugern können aus verschiedenen Monosacchariden (Glucose (Glc), Galaktose (Gal), Mannose (Man), *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc), *N*-Acetylgalaktosamin (GalNAc), Fucose (Fuc), Neuraminsäure (NeuAc), Glucuronsäure (GlcA), und Xylose (Xyl)) aufgebaut sein, die meist an Proteine oder Lipide gebunden vorliegen und als Glykokonjugate einen signifikanten Anteil an der Biomasse und der strukturellen Vielfalt in biologischen Systemen darstellen [42]. Die Präsenz der Glykokonjugate an der Zelloberfläche und im Extrazellulärraum erlaubt die Interaktion mit den dort vorliegenden Molekülen und erklärt die Beteiligung der Glykane an immunologischen und zellulären Kommunikationsprozessen, Entzündungsreaktionen sowie an Proliferation, Adhäsion, Migration, Apoptose und Onkogenese [43-45]. Die Glykosylierung von Proteinen ist wohl die komplexeste Form aller postrationalen Modifikationen und tritt bei mehr als 50% aller Proteine auf [46]. In den nächsten Unterkapiteln soll die Struktur und Biosynthese von diesen Molekülen und schließlich deren Funktion kurz beschrieben werden.

1.2.1 Struktur und Biosynthese von proteingebundenen Glykanen

Glykoproteine sind Moleküle, in denen Proteine kovalent mit einem Oligosaccharidanteil verknüpft sind. Der Kohlenhydratanteil kann dabei 20-90% des Molekulargewichtes ausmachen. Die beiden häufigsten Formen der Proteinglykosylierung sind die *N*- und *O*-Glykosylierung [47].

Bei *N*-glykosylierten Proteinen ist das Oligosaccharid β -glykosidisch mit der γ -Amidogruppe eines Asparaginrestes verknüpft. Das Glykan kann allerdings nur an einen Asparaginrest gebunden werden, wenn er Teil der Asn-X-Thr/Ser Konsensussequenz ist, wobei X für jede beliebige Aminosäure bis auf Prolin steht [48]. Ob eine potentielle Glykosylierungsstelle glykosyliert ist, hängt vom Zelltyp, dem Entwicklungsstadium und der Proteinstruktur ab. In der Regel sind *N*-Glykane aus einer Pentasaccharidkernstruktur, bestehend aus drei Mannose- und zwei *N*-Acetylglucosamineinheiten, aufgebaut.

Diese Kernstruktur bildet die Grundlage für eine große Vielfalt an unterschiedlich stark verzweigten N-Glykanen, die nach ihrer Zusammensetzung in die drei Untergruppen, oligomannosidische N-Glykane, hybride N-Glykane und komplexe N-Glykane, eingeteilt werden können (Abb.3) [49].

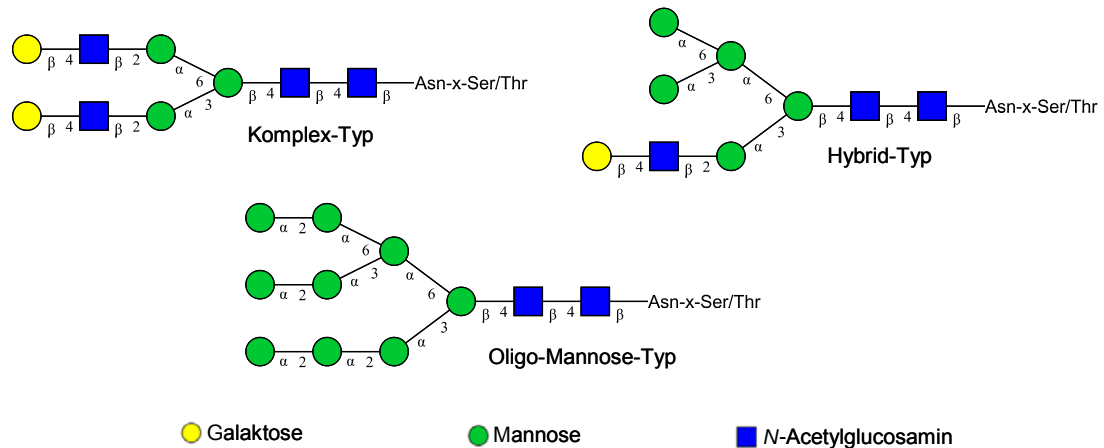


Abb.3: Verschiedene Typen der Protein-N-Glykosylierung

Bei O-glykosylierten Proteinen ist das O-Glykan in den meisten Fällen α -glykosidisch mit der Hydroxylgruppe von einem Serin- bzw. Threoninrest verknüpft. O-Glykane zeigen ebenfalls einen hohen Grad an Strukturvariationen; sie können über Glucose, Fucose, N-Acetylglucosamin, Xylose, Mannose oder N-Acetylgalaktosamin mit dem Proteinerückgrat verbunden vorliegen [50]. Der am Besten untersuchte Typ von O-Glykanen ist der O-GalNAc- oder Mucin-Typ. Es konnten acht verschiedene Kernstrukturen für Mucin-Typ-O-Glykane beschrieben werden (Abb.4), die wahlweise mit verschiedenen Monosaccharideinheiten verlängert sein können [51]. Ein weiterer, in höheren Eukaryonten, erst in jüngerer Zeit beschriebener Typ an O-Glykosylierung ist der O-Man-Typ. Die Mehrzahl der O-Mannosyl-Glykane ist aus dem Disaccharid GlcNAc β 1-2Man aufgebaut, wobei die Mannose α -glykosidisch mit Serin bzw. Threonin verknüpft ist. Dieses Disaccharid kann mit weiteren Monosaccharidbausteinen verlängert und dann auch verzweigt vorliegen (Abb.4) [52-54]. Für Mucin-Typ- und O-Man-Glykane ist keine definierte Konsensussequenz bekannt. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass diese Formen der O-Glykosylierungen vermehrt in serin-, threonin- und prolinreichen Segmenten des Proteins auftreten [55-57].

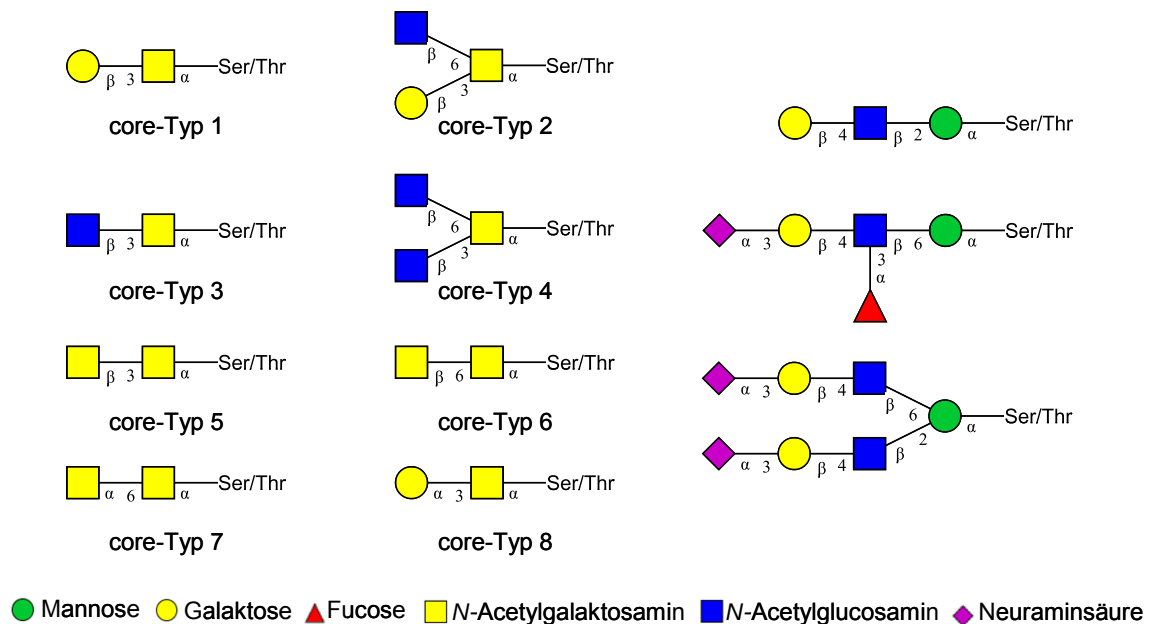


Abb.4: Kernstrukturen der Mucin-Typ-O-Glykosylierung und Beispiele für O-Mannosyl-Glykane

Die Biosynthese von Glykanen ist nicht matrizenabhängig, sondern wird durch viele aufeinanderfolgende enzymatische Reaktionen katalysiert. Durch das Zusammenspiel einer großen Zahl verschiedener Glykosyltransferasen und Glykosidasen, die zell-, gewebe- und entwicklungsspezifisch exprimiert und reguliert werden, ergibt sich die Glykosylierung des Gesamtsystems, die in Analogie zum Proteom zunehmend als Glykom des Systems bezeichnet wird. Die N-Glykosylierung von Proteinen findet in der Zelle an den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und im Golgi Apparat statt. Zuerst werden nukleotidaktivierte Monosaccharide an ein Lipidträgermolekül, das sogenannte Dolicholphosphat, gebunden [58]. Dieses liegt in der Membran des ER vor und sorgt so für die Verankerung des wachsenden Glykans. Nach Bindung einer Anzahl von Monosaccharideinheiten auf der cytosolischen Seite des ER erfolgen nach *Flip-Flop* des Moleküls auf die luminale Seite der ER-Membran weitere Glykosylierungsschritte. Hier wird nun die zuvor lipidgebundene Oligosaccharidstruktur enzymatisch auf die wachsende Polypeptidkette transferiert [59]. Die nachfolgenden *Trimming*-Reaktionen, also die Entfernung einzelner Zuckerbausteine des Glykoproteins, beginnen zunächst im ER laufen dann aber hauptsächlich im Golgi-Apparat ab. Im medialen und trans Golgi wird die Biosynthese durch Anheftung peripherer Saccharidreste abgeschlossen [49, 60, 61].

Auch die Biosynthese von O-mannosylierten Proteinen beginnt im ER durch Übertragung von aktivierter Mannose auf Serin bzw. Threonin. Danach findet die schrittweise Verlängerung der O-Mannosyl-Glykane im Golgi-Apparat statt [62]. Die Biosynthese der Mucin-Typ-O-Glykane erfolgt dagegen ausschließlich posttranslational in den Zisternen des Golgi-Apparates [63, 64]. Die nukleotidaktivierten Monosaccharide werden mit Hilfe spezifischer Glykosyltransferasen zunächst auf Serin bzw. Threonin im Proteinrückgrat und dann auf die wachsende Glykankette übertragen [63]. Abschließend werden die Glykoproteine vesikulär zur Plasmamembran transportiert, wo sie verankert oder freigesetzt werden.

1.2.2 Funktionen von Glykanen

Die Glykosylierung hat von der Embryogenese bis hin zur Pathogenese einen großen Einfluß auf alle lebenden Organismen. Das verwundert nicht, da die Oberflächen aller Zellen von Vertebraten, Invertebraten, Viren und auch Bakterien mit einem dichten Netzwerk an Kohlenhydratstrukturen, auch Glykokalyx genannt, bedeckt sind [42, 65]. Neben strukturbildenden und schützenden Aufgaben fungiert diese hohe Dichte an Zuckerepitopen als biologisches Informationstransfersystem, das für die Modulation und Vermittlung zellulärer Funktionen elementar ist. Die Glykosylierung kann je nach Lokalisierung und Entwicklungszeitpunkt unterschiedliche Aufgaben übernehmen [65]. Glykane spielen bei der Expression und Prozessierung von Proteinen eine wichtige Rolle und haben einen Einfluss auf ihre räumliche Struktur, beispielsweise die Ausbildung von α -Helices in der Sekundärstruktur, von hydrophoben Wechselwirkungen in der Tertiärstruktur oder die Oligomerisierung in der Quartärstruktur. Durch diese strukturbildenden Funktionen von Glykanen können Eigenschaften von Proteinen, wie Stabilität, Hitzeresistenz, Hydrophilität und die Resistenz gegenüber Proteasen, gelenkt werden [66]. Des Weiteren beeinflussen Glykane immunologische Prozesse und haben Effekte auf die Bioaktivität von Signalmolekülen, wie Enzyme, Hormone und Cytokine. Durch die Bindung an Rezeptoren und Lektine haben Glykane Funktionen bei Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktionen, beim Zellwachstum, bei der Endozytose und der Apoptose. Da Glykane in eine Vielzahl biochemischer Prozesse involviert sind, führen Störungen in ihrer Biosynthese zu Abnormalitäten der Zellfunktion und somit zu verschiedenen Erkrankungen. Die angeborenen Funktionsstörungen von Glykosylierungen

(*Congenital Disorders of Glycosylation* (CDG)) sind multisystemische Erkrankungen, die nach ihrer Lokalisierung im N-Glykan-Biosyntheseweg in zwei Unterklassen eingeteilt werden [67-69]. Durch CDG-I werden Defekte des frühen Biosynthesestadiums im ER bis zur Übertragung des Glykans auf das Protein beschrieben. Durch fehlende Enzyme liegen Hypoglykosylierungen vor, die bei der Entwicklung meist zu Beeinträchtigungen des zentralen Nervensystems führen. CDG-II betrifft die N-Glykosylierung auf Glykoproteinen und kommt daher vornehmlich im Golgi-Apparat vor. Hier treten nun fehlerhafte Prozessierungsschritte der Oligosaccharide auf, die unterschiedlichste Phänotypen zur Folge haben. Die CDG Klassifizierung beinhaltet meist nicht Defekte der O-Glykosylierung von Proteinen. Hier werden für die verschiedenen Erkrankungen Trivial- oder biochemische Namen verwendet [43]. Da an der Biosynthese der verschiedenen O-Glykantypen ebenfalls eine große Anzahl an Enzymen beteiligt ist, kommt es auch hier zur Ausbildung unterschiedlicher Phänotypen. Als Beispiel sollen Defekte der O-Mannosylierung näher beschrieben werden. Die Coexpression der beiden Gene POMT1 und POMT2 ist für die enzymatische Aktivität der Mannosyltransferase, die die Übertragung eines Mannoserests auf Serin bzw. Threonin katalysiert, unerlässlich [52, 62]. Kommt es zu Mutationen in den POMT1 und POMT2 Genen treten unterschiedliche Erkrankungen, wie das Walker-Warburg Syndrom (WWS) oder die *Muscle Eye Brain Disease* (MEB) auf, bei denen Mißbildungen der Muskeln, Augen und des Gehirns zu beobachten sind. Die Lebenserwartung liegt bei WWS-Patienten bei einem Jahr und bei MEB-Patienten bei ungefähr 10-30 Jahren [70, 71]. Die durch Glykosylierungsdefekte beschriebenen Erkrankungen spiegeln die Wichtigkeit der Glykane vor allem auch bei der Entwicklung des Nervensystems wider. Gerade hier übernehmen Kohlenhydratstrukturen wichtige Aufgaben während der Zelladhäsion, der Zellmigration, der Synapsenbildung, dem Neuritenwachstum, der Myelinisierung und der Axonbündelung [72, 73].

1.3 Analytische Methoden zur Charakterisierung von Glykoproteinen und Glykanen

Glykokonjugate sind in eine Vielzahl biologischer Prozesse, wie Zell-Zellinteraktionen, Zelladhäsion und Zellmigration involviert. Genauere Aussagen zur Rolle der Glykane in diesen Prozessen setzen jedoch eine detaillierte Kenntnis ihrer Struktur voraus, da sich Kohlenhydrate durch einen vielfach höheren Informationsgehalt gegenüber anderen Makromolekülen, wie z.B. Proteinen und Nukleinsäuren auszeichnen [74]. Wie bereits zuvor aufgeführt, sind Glykane aus unterschiedlichen Monosaccharideinheiten aufgebaut, die über glykosidische Bindungen miteinander verknüpft sind; je nach Verknüpfung dieser Bausteine liegen die Glykane dabei linear oder unterschiedlich stark verzweigt vor. Durch das Vorhandensein des anomeren Zentrums in der Ringstruktur der Monosaccharide richten sich diese in α - bzw. β -Konfiguration aus [75]. Die strukturelle Komplexität der Glykane wird außerdem durch weitere Substituenten, wie beispielsweise Sulfat- oder Phosphatgruppen, erhöht. Des Weiteren gibt es unterschiedliche Formen der Verknüpfung von Kohlenhydrat und Protein und auch die Position der Glykosylierung innerhalb des Peptidrückgrats spielt bei der Charakterisierung eines Glykoproteins eine wichtige Rolle [46]. Die Strukturaufklärung von Glykoproteinen bzw. von deren Glykanen stellt daher eine große analytische Herausforderung dar, die in diesem Kapitel näher dargestellt werden soll. Methoden, die dabei für die Ergebnisse dieser Arbeit von besonderem Interesse sind, werden detailliert besprochen.

1.3.1 Strategien zur Strukturanalyse von Glykoproteinen

Nach Isolation und Aufreinigung von Glykoproteinen können mit Hilfe verschiedener Methoden schon erste Anhaltspunkte bezüglich der Kohlenhydratzusammensetzung gesammelt werden. Nach Hydrolyse des Glykoproteins und Derivatisierung der entstandenen Monosaccharide können nach Trennung über Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)- und/oder Gaschromatographie (GC)-Systeme qualitative und quantitative Aussagen über vorkommende Zuckerbausteine getroffen werden [76-78]. Außerdem ist es möglich, nach Durchführung einer SDS-PAGE, mittels Western Blot (WB) Experimenten oder Microarraytechniken mit verschiedenen Lektinen und/oder Antikörpern anzufärben [79-81]. So können erste Rückschlüsse auf das

Vorhandensein verschiedener Glykantypen und spezieller Kohlenhydratepitope gezogen werden. Über den sequentiellen Edman-Abbau des Proteinrückgrats ist es bei ausreichender Probenmenge außerdem möglich erste Hinweise zu möglichen Glykosylierungspositionen zu erhalten [82]. Nach diesen Vorversuchen ist nach Reduktion und Alkylierung des zu untersuchenden Glykoproteins ein proteolytischer Verdau der nächste Schritt bei der Strukturanalyse des Moleküls. Die erhaltenen Glykopeptide können chromatographisch und/oder elektrophoretisch getrennt, fraktioniert und massenspektrometrisch untersucht werden [74]. Über Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) Experimente können bei Detektion charakteristischer Fragmentationen Glykosylierungsstellen zugeordnet werden [83]. Anschließend folgt die Freisetzung der Glykane. Bei N-Glykanen bietet sich aufgrund der breiten Substratspezifität der käuflich zu erwerbenden Glykosidasen die enzymatische Abspaltung an. So gelingt es beispielsweise durch Einsatz der Enzyme endo-*N*-Acetylglucosaminidase H (endo H) bzw. endo-*N*-Acetylglucosaminidase F1 (endo F1) oligomannosidische und hybride N-Glykane, durch endo-*N*-Acetylglucosaminidase F2 (endo F2) und endo-*N*-Acetylglucosaminidase F3 (endo F3) komplexe N-Glykane freizusetzen. Die Verwendung der Amidasen PNGase F und N-Glykosidase A (PNGase A) erlaubt eine komplette Abspaltung der N-Glykane mit freiem reduzierenden Ende unter Konvertierung des Asparagins in Aspartat, was bei Analyse des intakt bleibenden Peptidrückgrats zur massenspektrometrischen Bestimmung der Glykosylierungsposition von Interesse ist [84]. Nach Abtrennung der N-Glykane von den verbleibenden O-Glykopeptiden mittels Festphasenextraktion, erfolgt die Freisetzung der O-Glykane. Diese ist wegen der hohen Spezifität der erhältlichen Enzyme auf enzymatischem Weg nur eingeschränkt möglich [50]. Um die große Vielfalt an vorhandenen O-Glykanen vom Peptidrückgrat abzuspalten, werden daher chemische Methoden angewendet. Hierzu werden vor allem drei unterschiedliche Versuchstechniken eingesetzt. Reduzierende O-Glykane werden durch die Hydrazinolyse, die unter modifizierten Bedingungen auch die Abspaltung der N-Glykane erlaubt, oder durch die β -Eliminierung gewonnen [85-87]. Durch die Reaktionsbedingungen kann es insbesondere bei der letztgenannten Methode zu sogenannten *Peeling*-Reaktionen kommen, bei denen durch fortlaufende β -Eliminierung ein sequentieller Abbau des Glykans vom reduzierenden Ende her die Folge ist [88, 89]. Außerdem wird eine Zerstörung von nicht Kohlenhydratsubstituenten beobachtet [90]. Um diese Problematik zu umgehen, wird die chemische Freisetzung der O-Glykane häufig unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt; man spricht von

der reduktiven β -Eliminierung [87]. Hier wird der endständige Monosaccharidbaustein zum Alditol reduziert. Das Peptidrückgrat wird bei der chemischen Abspaltung der Glykane teilweise oder ganz zerstört und kann daher nur in seltenen Fällen zur Charakterisierung der Glykosylierungspositionen herangezogen werden. Nach Freisetzung und Aufreinigung der N- und O-Glykane können diese nun einer weiteren Strukturaufklärung zugeführt werden. Um die Heterogenität zu mindern, über die Retentionszeiten strukturelle Zuordnungen zu treffen und/oder Änderungen im Glykanprofil aufzuzeigen, existieren eine Reihe von etablierten Trennmethoden, wie die Größenfraktionierung und die HPLC mit Fluoreszenzdetektion, meist angewendet in mehreren Dimensionen mit unterschiedlichen Packungsmaterialien der stationären Phase, die Hochdruckanionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit elektrochemischer Detektion, die Kapillarelektrophorese (CE) oder die Lektin- bzw. Immunaффinitätschromatographie [91, 92]. Zur Fluoreszenzdetektion können Glykane an ihrem freien reduzierenden Ende durch reduktive Aminierung markiert werden. Bei dieser Reaktion sind vor allem die Derivatisierungsreagenzien 2-Aminopyridin und 2-Aminobenzamid gebräuchlich [93]. Neben der so ermöglichten Fluoreszenzdetektion der markierten Oligosaccharide bestehen für die Massenspektrometrie weitere Vorteile durch die vereinfachte Auswertung von Fragmentspektren, die effizientere Ionisierbarkeit der Glykane und damit die Steigerung der Sensitivität. Eine weitere Derivatisierungstechnik, die vor allem bei der massenspektrometrischen Strukturanalyse von Interesse ist, ist die Permethylierung nach Ciucanu und Kerek [94]. Hier wird nicht nur am reduzierenden Ende des Oligosaccharides markiert, sondern es findet nach basenkatalysierter Ionisierung aller Hydroxylgruppen im Molekül eine Umsetzung mit einem Methylierungsreagenz statt. Auch nach Permethylierung von Glykanen kommt es zu einer Steigerung der Ionisierungseffizienz und damit der Sensitivität bei massenspektrometrischer Detektion. Außerdem wird die Ionisierbarkeit der Glykane in einem Gemisch angeglichen, so dass mit Hilfe eines internen Standards auch quantitative Aussagen getroffen werden können. Bei der Durchführung von MS/MS-Experimenten gelingt es zudem, anhand des Methylsubstitutionsmusters der Glykane bei Auswertung der Spektren weitergehende Strukturaussagen zu treffen [95]. So können nach Freisetzung, Trennung, Derivatisierung und massenspektrometrischer Analyse bereits eine Reihe von Strukturinformationen, wie Profil eines Glykangemisches, sequentieller Aufbau der Einzelkomponenten, Verzweigung und Verknüpfung der Monosaccharidbestandteile in einem Glykan und das Vorkommen von Strukturisomeren, gesammelt werden.

Die Frage nach beteiligten Monosacchariden lässt sich mit Hilfe der Verknüpfungsanalyse klären [96, 97]. Die anomere Konfiguration der einzelnen Monosaccharid-Bausteine kann durch sequentiellen Abbau mit spezifischen Exoglykosidasen und anschließender chromatographischer und/oder massenspektrometrischer Detektion untersucht werden [98]. Ist ausreichend Material von Glykaneinzelkomponenten verfügbar, lässt sich die Strukturanalyse mittels *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) abrunden.

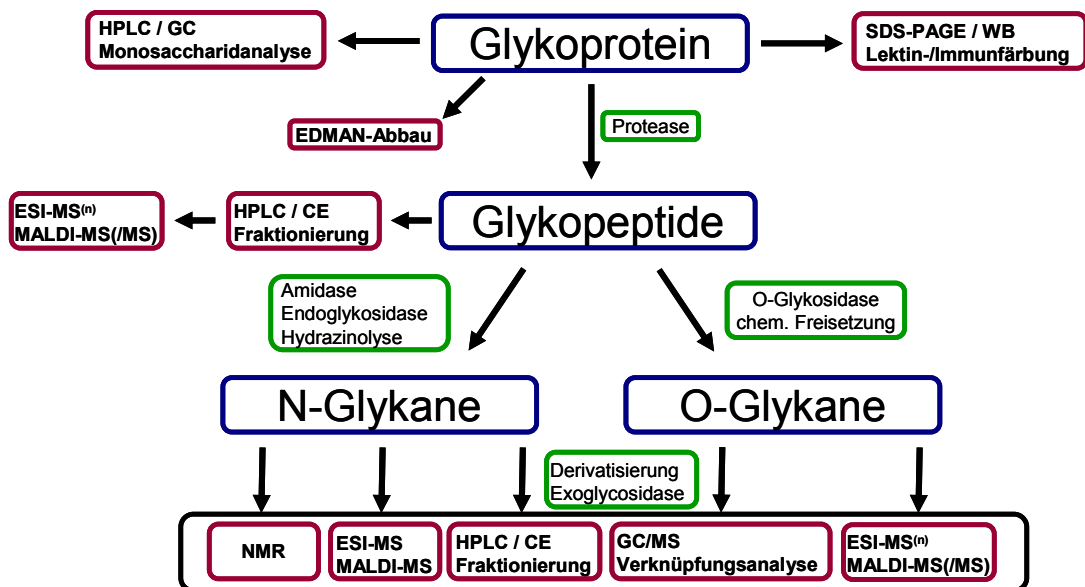


Abb.5: Strategie zur Strukturanalyse von Glykoproteinen

1.3.2 Massenspektrometrische Analyse

Die Massenspektrometrie ist eine Schlüsseltechnologie für die Strukturanalyse von Glykoproteinen und Glykanen [99]. Selbst wenn nicht alle Fragestellungen, wie Anomerität oder Stereoisomerie, geklärt werden können, überwiegen aufgrund der Schnelligkeit, Sensitivität und der Möglichkeit, auch aus Substanzgemischen die Strukturen einzelner Komponenten zu charakterisieren, die Vorteile dieser Methodik. Von besonderem Interesse bei der massenspektrometrischen Untersuchung von Glykoproteinen ist die Identifizierung des Moleküls, die Zuordnung der Glykosylierungspositionen und die Strukturanalyse der Glykane, mit Aussagen über die Monosaccharidsequenz, die Verknüpfung der Einzelbausteine und mögliche

Verzweigungen innerhalb der Kohlenhydratkette [75, 100, 101]. Zur Behandlung nicht nur dieser Fragen gab es im Bereich der Massenspektrometrie in den letzten Jahren eine Vielzahl von Entwicklungen, wobei im Zusammenhang mit dieser Arbeit in den nächsten Unterkapiteln auf die *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight* (MALDI-TOF) und auf die *Electrospray – Ion Trap* (ESI-IT) Massenspektrometrie näher eingegangen werden soll.

1.3.2.1 MALDI-TOF-MS/(MS)

Die MALDI-technik wurde 1985 von Hillenkamp und Karas entwickelt [102] und ist in den letzten Jahren zu einer empfindlichen Methode zur Detektion großer, nicht flüchtiger und labiler Moleküle gereift. MALDI als Ionisierungseinheit kann je nach analytischer Fragestellung mit einer Vielzahl verschiedener Massenanalysatoren kombiniert werden. Bei der massenspektrometrischen Analyse von Glykopeptiden und Glykanen via MALDI dominiert die Kopplung mit einem Flugzeitanalysator (TOF).

MALDI gehört in der Massenspektrometrie zu den milden Ionisierungstechniken. Während des Ionisierungsprozesses werden hauptsächlich einfach geladene Pseudomolekülonen generiert. Dies macht MALDI zu einer idealen Technik zur Aufnahme von Massenprofilspektren von Glykopeptid- bzw. Glykangemischen. Die Einfachheit des Geräteaufbaus, die Robustheit, die schnelle Durchführbarkeit der Analysen und der breite Massenbereich bieten weitere Vorteile von MALDI-TOF-Instrumenten [90].

Die Probenpräparation zur MALDI-MS-Messung erfolgt durch Mischen einer im Überschuß vorhandenen, bei entsprechender Laserwellenlänge absorbierenden Matrixsubstanz. Als Matrices eignen sich niedermolekulare, im UV-Bereich absorbierende Verbindungen, die den Einbau der Probenmoleküle in ihr Kristallgitter erlauben. Bei der Analyse von Glykopeptiden und Glykanen sind unterschiedliche Matrixsubstanzen, wie 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB), 6-Aza-2-thiothymin (ATT), 2,4,6 Trihydroxy-acetophenon (THAP), α -Cyano-4-hydroxymizsäure (HCCA) oder 3-Aminoquinolin (AQ), in verschiedenen Konzentrationen, Mischungsverhältnissen und mit unterschiedlichen Zusätzen gebräuchlich [100, 103, 104].

Das Analyt-/Matrixgemisch wird auf einen metallischen Probenhalter aufgetragen. Nach Verdunstung des Lösungsmittels kommt es zu einer Kokristallisation der Matrix- und der Analytmoleküle.

Im Hochvakuum der Ionenquelle des Massenspektrometers werden die Kristalle Impulsen kurzwelliger Laserstrahlung ausgesetzt. Für UV-MALDI wird dabei meist ein Stickstofflaser mit einer Emissionswellenlänge von 337nm eingesetzt. Die Matrix dient zunächst zur Absorption dieser Laserenergie. Es kommt zu einem Übergang von Matrixmolekülen in die Gasphase; neben den Matrixmolekülen desorbieren schließlich auch die in das Kristallgitter eingebetteten Analytmoleküle. Bei diesen Desorptions- und Ionisierungsprozessen kann es in der Ionisierungsquelle zur Bildung von metastabilen Ionen kommen; man spricht in diesem Fall von *In Source Decay* (ISD), so kann beispielsweise der Verlust von Sialinsäuren bei sialylierten Glykanen und Glykopeptiden als Folge von ISD beobachtet werden. Dies ist bei der Messung von Gemischen insofern problematisch, als diese in der Quelle gebildeten Fragmentionen nicht mehr von intakten Molekülionen unterschieden werden können [100, 105].

Gegenüber dem metallischen Probenhalter befindet sich eine Elektrode; je nach angelegter Polarität dieser Elektrode werden positive oder negative Analytionen durch das vorliegende elektrostatische Feld in Richtung Analysator beschleunigt. Die Ionen erreichen eine bestimmte kinetische Energie und treten in den Flugzeitanalysator ein. Hier durchlaufen sie eine feldfreie Driftstrecke mit gleicher kinetischer Energie; sie unterscheiden sich jedoch je nach Masse in ihren Geschwindigkeiten. Je leichter ein Ion ist, desto schneller wird der Detektor erreicht. Auch in der TOF-Einheit können durch metastabilen Zerfall Fragmentionen erzeugt werden. Diese Form der Pseudo-MS/MS Fragmentierung nennt man *Post Source Decay* (PSD) [105].

Bei Messungen im linearen Modus sollten alle Ionen mit identischem m/z -Verhältnis zur gleichen Zeit auf den Detektor treffen. Das Signal wäre in diesem Fall sehr schmal. In der Praxis treten jedoch Energie-, Orts-, und Zeitunschärfen auf, was zur Verbreiterung der detektierten Signale führt. Eine Verbesserung der Massenauflösung wird durch einen Reflektor erreicht. Im Reflektormodus wird ein elektrisches Gegenfeld erzeugt, das sich der Driftstrecke anschließt. Sobald die Ionen in den Reflektor eindringen, erfahren sie eine entgegengesetzte Beschleunigung. Ionen gleicher Masse, aber höherer Startenergie dringen tiefer in das Gegenfeld ein und legen somit eine größere Strecke im Reflektor zurück, als Ionen mit geringerer Startenergie. Ionen höherer Startenergie drehen im Reflektormodus, also erst später um und erreichen den Detektor zur selben Zeit wie die Ionen geringerer Startenergie. So kommt es zu einer Fokussierung und somit zur Steigerung der Auflösung [105].

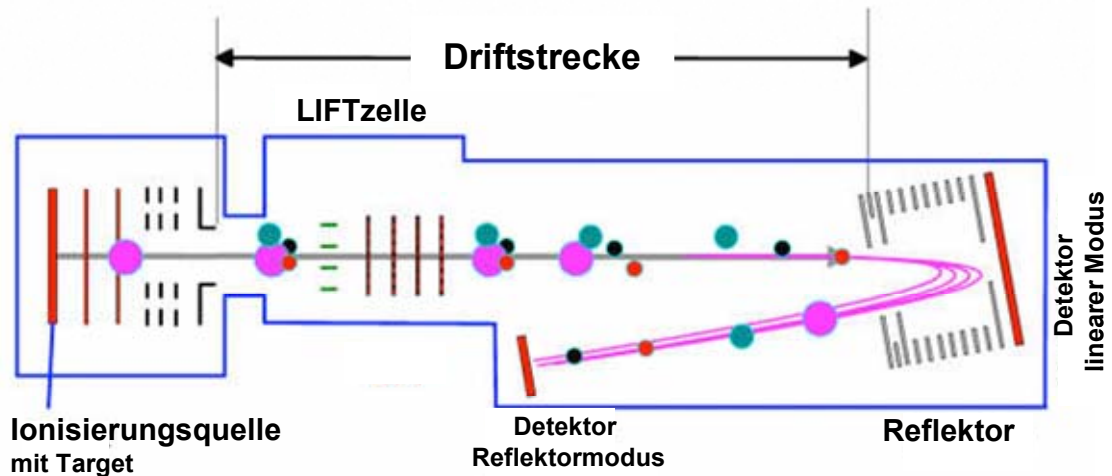


Abb.6: Schematischer Aufbau eines MALDI-TOF Massenspektrometers mit LIFT-Einheit

Neben metastabiler Fragmentierung durch ISD und PSD besteht in Geräten, die zusätzlich mit einer LIFT-Zelle ausgestattet sind, die Möglichkeit der Durchführung von Tandem MS/MS Experimenten. Neben der Aufnahme von Profilspektren können hier Fragmentspektren generiert werden, die es erlauben Strukturinformationen von definierten Vorläuferionen zu sammeln. Nach Wahl des Mutterions wird nach Anlegen einer Potentialdifferenz dieses in einem zeitlich begrenzten Ionenfenster selektiert und alle weiteren Ionen an Deflektoren abgelenkt. Nach Zerfall der Vorläuferionen werden diese in der LIFT-Zelle beschleunigt und treffen als Fragmentationen auf den Detektor. Neben der beschriebenen Laser induzierten Dissoziation (LID) ist es ebenfalls möglich eine Fragmentierungsanalyse durch kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) durchzuführen. Zu diesem Zweck wird die Kollisionszelle mit einem Kollisionsgas, meist Argon, geflutet. Bei der LID-MS/MS-Analyse von Glykanen sind hauptsächlich Brüche glykosidischer Bindungen zu beobachten, die Aufschluß über die Monosaccharidsequenz eines Glykans liefern können. In CID Experimenten können darüber hinaus auch Ringbrüche detektiert werden [75, 90]. Diese liefern zusätzlich Informationen über Verzweigung und Verknüpfung der Zuckerbausteine. Der Gehalt an Strukturinformationen und die Ionisierungseffizienz kann durch Derivatisierung freier Glykane gesteigert werden. Die MALDI-MS/MS Untersuchung von Glykopeptiden liefert Strukturinformationen über Glykan- und Peptidrest. Bei der Fragmentierung des Peptides werden hauptsächlich Fragmentationen der y- und b-Serie detektiert.

Da glykosylierte Aminosäuren noch Glykanreste tragen, kann so die Glykosylierungsposition bestimmt werden. Aus der Fragmentierung des Kohlenhydratanteils können schließlich Rückschlüsse auf die Monosaccharidsequenz gezogen werden. In Abb.7 sind für N-glykosylierte Peptide charakteristische Brüche des Kohlenhydratanteils aufgezeigt [106].

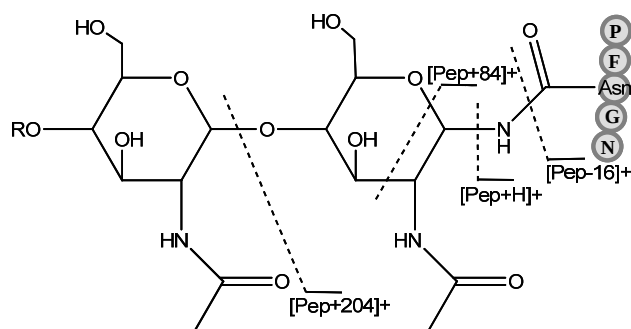


Abb.7: Charakteristische Fragmente bei der Untersuchung von N-Glykopeptiden via MALDI-MS/MS nach *Wuhrer et al.*[106]

1.3.2.2 ESI-IT-MSⁿ

Die *Electrospray Ionization* (ESI) Ionsierungstechnik wurde 1968 von Dole und seinen Mitarbeitern erdacht und von Fenn und Yamashita 15 Jahre später durch Kopplung mit Sektorfeld- bzw. Quadrupolanalysatoren in die Praxis umgesetzt [107]. ESI kann ebenfalls mit weiteren Typen von Analysatoren betrieben werden, wobei in diesem Kapitel der Fokus auf dem Analysatortyp der Ionenfalle (IT) liegen soll.

ESI gehört wie MALDI zu den milden Ionisierungstechniken. Beim Ionisierungsprozess werden kaum Fragmentenionen gebildet. Die ionisierten Moleküle werden als einfach oder mehrfach geladene Ionen detektiert, wobei die Ladungsverteilung innerhalb der Moleküle proportional zur Anzahl der ionisierbaren Gruppen ist [108].

Die zu analysierende Probe wird in gelöster Form entweder im *Offline* Modus über eine Nadel oder eine Carbonspitze in die Ionisierungsquelle eingebracht oder *Online* durch Kopplung mit einem nano-Flüssigkeitschromatographie (LC) System in die ESI-Quelle injiziert. Als Lösungsmittel sind je nach Glykopeptid- bzw. Glykanprobe unterschiedliche Zusammensetzungen von Acetonitril/Wasser oder Methanol/Wasser mit Zusatz von Säuren bzw. Basen zur Verbesserung der Ionisierungseffizienz gebräuchlich.

Der Prozess der Ionisierung erfolgt bei atmosphärischem Druck durch Anlegen einer Potentialdifferenz zwischen der die Probenlösung versprühenden leitfähigen Kapillar- bzw. Nadelspitze und einer gegenüberliegenden Elektrode, dem sogenannten *Sprayshield*. Je nach Polung der Elektrode werden positiv oder negativ geladene Probenmoleküle in Richtung Massenspektrometer gelenkt. Es kommt unter Bildung von geladenen Tröpfchen zu einem „Zerfall“ der Lösung. Durch Verdampfung des Lösungsmittels, welche durch entgegenströmenden Stickstoff als Trockengas unterstützt wird, verkleinert sich bei konstanter Ladung der Radius dieser Tröpfchen. Daraus resultiert ein Ladungsüberschuss, der zur Abstossung und damit zur „Explosion“ in Mikrotröpfchen führt [107]. Dieser Vorgang wiederholt sich bis schließlich desolvatisierte Molekülionen entstehen, die über ein *Interface*, einem trichterförmigen *Skimmer*, in das Hochvakuum des Massenspektrometers transferiert werden. Nach Fokussierung über Oktopoleinheiten gelangen die Ionen in die Ionenfalle, dem Analysator, des Massenspektrometers. Dort liegt an zwei gegenüberliegenden Endkappen und einer Ringelektrode eine phasenversetzte hochfrequente Wechselspannung an, durch welche die Analytationen auf stabilen Kreisbahnen gehalten werden. Ein Trägergas (*Cooling Gas*) in der Falle verhindert Kollisionen der Analytmoleküle; es wird dadurch eine Stabilisierung der Kreisbahnbewegung der Ionen erreicht. Durch Modulierung der Amplitude werden die Ionen nach ihrem Masse- zu Ladungsverhältnis von ihrer Kreisbahn abgelenkt, aus der Falle entlassen und schließlich detektiert [90, 100].

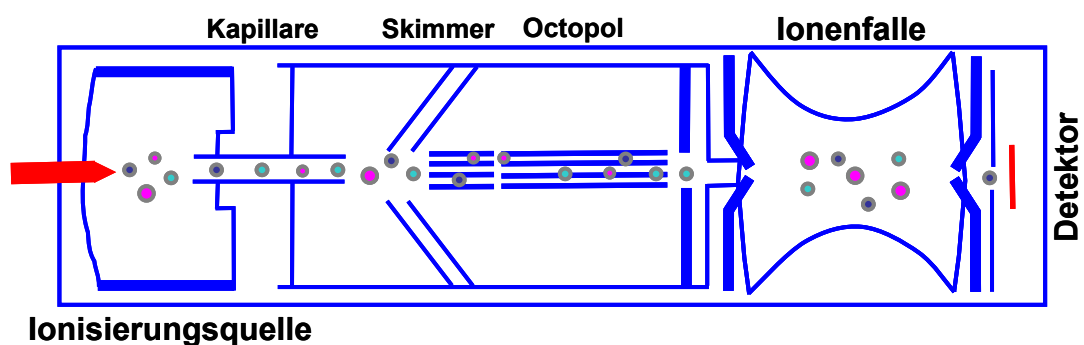


Abb.8: Schematischer Aufbau eines ESI-IT-Massenspektrometers

Neben der Durchführung von MS-Experimenten zur Aufnahme von Glykopeptid- bzw. Glykanprofilspektren ist es mit der ESI-IT-Instrumentierung ebenfalls möglich, Fragmentspektren spezifischer Molekülionen aufzunehmen. Nach Selektion eines Vorläuferions in der Ionenfalle wird der angelegte Ringstrom erhöht. Es kommt zu einer Beschleunigung der Ionen, die zu energiereicheren Zusammenstößen von Analytationen und Trägergasmolekülen und schließlich zur Fragmentierung des Vorläuferions führen. Das Trägergas fungiert hier nun als Kollisionsgas. Daher spricht man in diesem Zusammenhang abermals von CID. Durch wiederholte Isolations- und Fragmentierungszyklen ist es in Ionenfallen möglich gebildete Fragmente weiter zu fragmentieren, was die Durchführung von MS^n -Experimenten gestattet. Die Untersuchung von Glykanen mittels ESI-IT- MS^n liefert Informationen über den sequentiellen Aufbau des Moleküls sowie Verzweigungs- und Verknüpfungspositionen innerhalb des Glykanmoleküls. Auch hier gilt wieder, dass der Gehalt an Strukturinformationen und die Ionisierungseffizienz durch Derivatisierung freier Glykane gesteigert werden kann [95, 99, 109].

Bei der Analyse von Glykopeptiden mittels ESI-IT- MS^n können in den verschiedenen Fragmentierungszyklen Strukturinformationen über den Glykananteil des Moleküls, die Peptidsequenz und über Glykosylierungspositionen gesammelt werden. Im CID-MS/MS Modus dominieren Brüche der glykosidischen Bindungen des Kohlenhydratanteils. Danach kann das Peptid mit einem Zuckerbaustein für einen weiteren Isolations- und Fragmentierungszyklus selektiert werden, was zur Generierung von Peptidfragmenten führt, die eine Strukturzuordnung des Peptidanteils und die Bestimmung der Glykosylierungspositionen erlauben [95].

In Geräten neuerer Generation ist es außerdem möglich, im Elektronen Transfer Dissoziation (ETD) Modus zu arbeiten. Hier werden einfach geladene Anionen, wie Fluoranthren, in die Falle geschleust und als Elektronenlieferanten genutzt. Es kommt zu einer Reaktion zwischen den Glykopeptidmolekülkationen und den Anionen. Durch diese Gasphasentransferreaktion wird bevorzugt eine Peptidfragmentierung unter Bildung von Ionen der c-/z-Serie erzielt, während die posttranslationale Modifikation weitestgehend intakt bleibt. Wird das Gerät im alternierenden CID-/ETD-Modus betrieben, erhält man so Informationen über die Glykanstruktur, Peptidaufbau und Glykosylierungsposition [106].

1.3.2.3 Fragmentierungsverhalten von Glykanen

Moderne Massenspektrometer sind je nach eingestelltem Modus in der Lage Spektren von Gesamtkohlenhydratmolekülen (Molekülionen) und auch von fragmentierten Glykanen zu generieren (Fragmentionen). Die Auswertung von Profilspektren (Gesamtkohlenhydratmoleküle) liefert dabei mögliche Monosaccharidzusammensetzungen der einzelnen Kohlenhydratbestandteile in einem Probengemisch [110]. Zusammen mit den bekannten Biosynthesewegen von Glykanen können so Strukturzuordnungen zu den einzelnen Molekülionen getroffen werden. Durch die Aufnahme von Fragmentspektren einer Vorläuferkohlenhydratstruktur können eine Reihe von weiteren Daten zur Strukturaufklärung gesammelt werden. Je nach eingesetzter massenspektrometrischer Technik erhält man so Informationen zum sequentiellen Aufbau des Glykans, Informationen über Verzweigungen im Molekül, über Verknüpfungspositionen der Einzelbausteine im Glykan und über das Vorhandensein möglicher Strukturisomere [90, 110]. Um die dabei detektierten Fragmentationen benennen zu können, wird hauptsächlich die von Domon und Costello im Jahre 1988 ausgearbeitete und in Abb.9 graphisch dargestellte Nomenklatur verwendet [111].

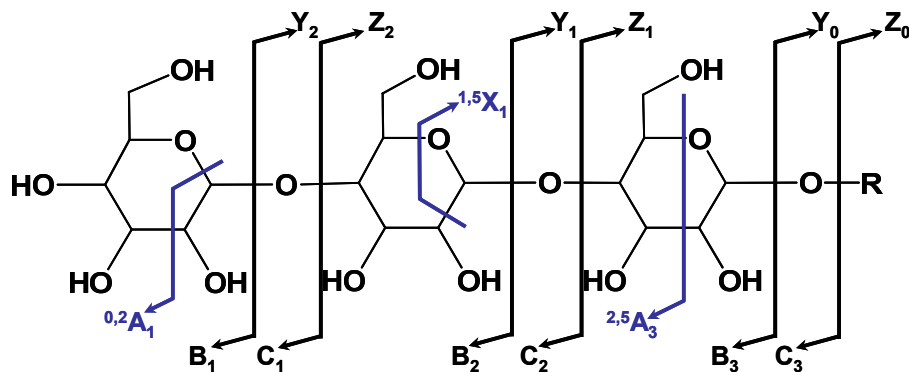


Abb.9: Nomenklatur der bei der massenspektrometrischen Analyse generierten Fragmente nach *Domon und Costello* [111]

Der am häufigsten auftretende Fragmentierungstyp von Glykanen bei der massenspektrometrischen Analyse geht mit dem Bruch von glykosidischen Bindungen einher.

Verbleibt die Ladung dabei auf Seiten des nicht-reduzierenden Endes, spricht man von B- bzw. C-Ionen; verbleibt sie am reduzierenden Ende, liegen Y- bzw. Z-Ionen vor (Abb.9). Bevorzugte Spaltungen von glykosidischen Bindungen treten dabei am reduzierenden Ende in Nachbarschaft eines *N*-Acetylhexosaminbausteines auf [99]. Sie werden meist von Sekundärfragmentationen begleitet, die durch β -Eliminierung eines Substituenten in Position 3 generiert werden. Spaltprodukte glykosidischer Brüche liefern Informationen über die Monosaccharidsequenz des vorliegenden Glykans. Im Falle von permethylierten Kohlenhydraten können zusätzlich Anhaltspunkte über mögliche Verzweigungen gewonnen werden. Im hochenergetischen Fragmentierungsmodus eines Massenspektrometers können zusätzlich Ringbrüche induziert werden. Liegt hier die Ladung am nicht-reduzierenden Ende vor, werden A-Ionen detektiert; liegt sie am reduzierenden Ende vor, kommt es zur Detektion von X-Fragmentationen (Abb.9) [111]. Die bei der Messung generierten Ringfragmente erlauben Rückschlüsse auf Verzweigungen innerhalb des Zuckermoleküls und auf die Verknüfungspositionen der Monosaccharidkomponenten untereinander. Auch hier ist eine Permethylierung der Glykane zur Erhöhung des Informationsgehaltes der Messungen hilfreich.

1.3.2.4 Verknüpfungsanalyse

Die Verknüpfungsanalyse ist eine weitere Möglichkeit zur strukturellen Charakterisierung von Glykanen. Sie wurde 1964 von Lindberg und Hakomori etabliert und findet auch noch heute Anwendung [96, 97]. Die Methode umfasst die erschöpfende Methylveretherung freier Hydroxylgruppen von Kohlenhydratverbindungen. Es folgt eine Hydrolyse der Glykane und somit die Spaltung in ihre Monosaccharideinheiten. Nach Reduktion werden die dabei freigesetzten Hydroxylgruppen peracetyliert (Abb.10).

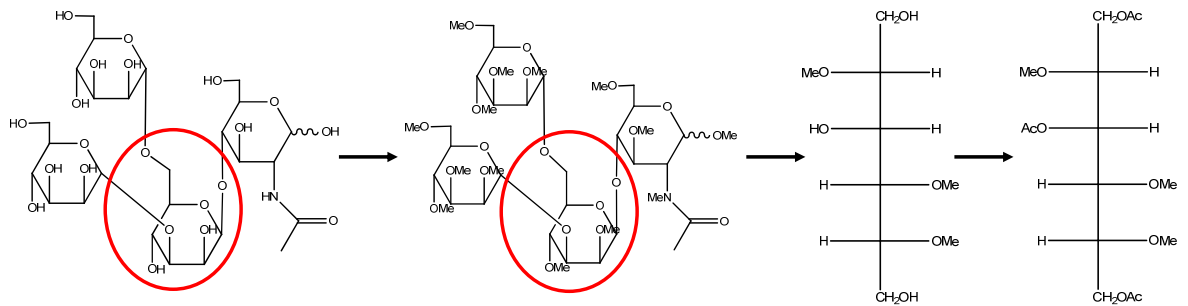


Abb.10: Teilreaktionen der Verknüpfungsanalyse von Glykanen (Methylierung, Hydrolyse, Reduktion und Peracetylierung) am Beispiel einer N-Glykan Kernmannose

Daraus ergibt sich ein bestimmtes Substitutionsmuster an Acetyl- und Methylgruppen für jedes Monosaccharid. Diese partiell methylierten Alditolacetate werden gaschromatographisch getrennt und massenspektrometrisch detektiert [84]. Durch Vergleich der Retentionszeiten und erhaltenen Massenspektren mit Standardsubstanzen lassen sich Aussagen über die Position und Verknüpfung des Monosaccharides innerhalb einer Kohlenhydratstruktur treffen. Nachteile der Methodik liegen neben dem Zeitaufwand in der Beanspruchung größerer Probenmengen. Die Proben müssen zudem rein und salzfrei vorliegen, um Nebenreaktionen und unvollständige Methylierungen zu vermeiden.

2 Zielsetzung

CD24, ein hochglykosyliertes Protein, spielt bei der Entwicklung des Zentralnervensystems, im Immunsystem, in der Tumorbilogie und bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle. Seine unterschiedlichen Funktionen scheinen dabei, abhängig vom Zelltyp, durch die vorliegende Glykosylierung des Moleküls vermittelt zu werden. Strukturelle Untersuchungen des Glykosylierungsmusters von CD24 wurden bisher hauptsächlich auf der Basis von Immun- bzw. Lektinfärbungen durchgeführt. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte nun eine detaillierte Glykomstudie an murinem CD24 des Hirns durchgeführt werden (Abb. 11). Nach Isolierung und Aufreinigung von CD24 aus Hirnen von 1-10 Tage alten Mäusen mittels Immunaффinitätschromatographie wurden die vorliegenden Oligosaccharide nach Proteaseverdau enzymatisch bzw. chemisch freigesetzt. Die dabei erhaltenen freien N- und O-Glykane wurden anschließend im nativen Zustand und/oder nach Derivatisierung einer massenspektrometrischen Charakterisierung unterzogen. Dabei kamen verschiedene Techniken der Massenspektrometrie, wie MALDI-TOF-MS(/MS), ESI-IT-MS⁽ⁿ⁾ und GC-MS, zum Einsatz. Die durchgeführte Strukturanalyse der Glykane von CD24 legte so den Grundstein für zukünftige funktionelle Untersuchungen und das Auffinden von weiteren Interaktionspartnern.

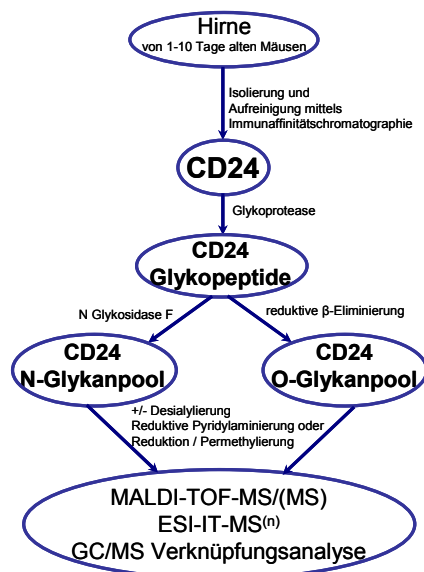


Abb.11: Arbeitsplan zur Charakterisierung der Glykosylierung von murinem CD24

3 Publikationen

A)

Journal of
research articles **proteome**
research

Glycomic Analysis of N-Linked Carbohydrate Epitopes from CD24 of Mouse Brain

Christina Bleckmann,[†] Hildegard Geyer,[†] Vernon Reinhold,[§] Annika Lieberoth,[‡]
Melitta Schachner,[‡] Ralf Kleene,[‡] and Rudolf Geyer^{*,†}

Institute of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Giessen, Friedrichstrasse 24, D-35392 Giessen, Germany, Center of Molecular Neurobiology, University of Hamburg, Martinistrasse 52, D-20246 Hamburg, Germany, and Division of Molecular, Cellular, & Biomedical Sciences, University of New Hampshire, Gregg Hall, 32 Colovos Road, Durham, New Hampshire 03824

Received September 7, 2008

Murine CD24 is an abundantly glycosylated glycoprotein that plays important roles in the central nervous system and the immune system. It has been proposed that the functions of CD24 are primarily mediated by its N- and/or O-linked glycans. Applying a highly sensitive glycomics approach which included matrix-assisted laser-desorption ionization and electrospray ionization ion trap mass spectrometry, we have performed a detailed analysis of the N-linked glycans of CD24. Our data revealed a highly heterogeneous pattern of mainly complex type glycans expressing distinct carbohydrate epitopes, like 3-linked sialic acid, Le^x or blood group H antigens, bisecting N-acetylglucosamine residues and N-acetylglucosamine repeats as well as high-mannose and hybrid type species.

Keywords: CD24 • glycomics • Lewis^x • mass spectrometry • N-glycans

B)

Biol. Chem., Vol. 390, pp. 627–645, July 2009 • Copyright © by Walter de Gruyter • Berlin • New York. DOI 10.1515/BC.2009.044

O-glycosylation pattern of CD24 from mouse brain

Christina Bleckmann¹, Hildegard Geyer¹,
Annika Lieberoth², Frauke Splittstoesser²,
Yan Liu³, Ten Feizi³, Melitta Schachner², Ralf
Kleene², Vernon Reinhold⁴ and Rudolf Geyer^{1,*}

¹Institute of Biochemistry, Faculty of Medicine,
University of Giessen, Friedrichstrasse 24, D-35392
Giessen, Germany

²Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg,
University of Hamburg, Martinistrasse 52, D-20246
Hamburg, Germany

³Imperial College, The Glycosciences Laboratory,
Northwick Park Institute for Medical Research, Watford
Road, Harrow, Middlesex, HA1 3UJ, UK

⁴Division of Molecular, Cellular and Biomedical
Sciences, University of New Hampshire, Gregg Hall,
32 Colovos Road, Durham, NH 03824, USA

* Corresponding author

e-mail: rudolf.geyer@biochemie.med.uni-giessen.de

is abundantly expressed on a variety of cell types, including hematopoietic and neural cells. In the immune system, CD24 plays important functional roles and has recently been the focus of considerable attention due to its implications in autoimmune diseases: CD24 is of key importance in the pathogenesis of multiple sclerosis (Liu and Zheng, 2007) and in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (Baxter, 2007), which is an animal model for multiple sclerosis. CD24 polymorphisms are associated with the risk and progression of autoimmune diseases, in particular multiple sclerosis (Zhou et al., 2003; Goris et al., 2006; Otaegui et al., 2006; Wang et al., 2007). In addition, CD24 is expressed by various types of tumors. During carcinogenesis it is involved in cell adhesion as well as metastatic tumor spread and is considered as a diagnostic marker. In nearly all tumor patients high expression of CD24 is associated with shorter patient survival times (Kristiansen et al., 2004).

A)

Glycomic Analysis of N-Linked Carbohydrate Epitopes from CD24 of Mouse Brain

Christina Bleckmann,[†] Hildegard Geyer,[†] Vernon Reinhold,[§] Annika Lieberoth,[‡]
Melitta Schachner,[‡] Ralf Kleene,[‡] and Rudolf Geyer^{*,†}

*Institute of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Giessen, Friedrichstrasse 24, D-35392 Giessen, Germany,
Center of Molecular Neurobiology, University of Hamburg, Martinistrasse 52, D-20246 Hamburg, Germany, and
Division of Molecular, Cellular, & Biomedical Sciences, University of New Hampshire, Gregg Hall, 32 Colovos Road,
Durham, New Hampshire 03824*

Received September 7, 2008

Murine CD24 is an abundantly glycosylated glycoprotein that plays important roles in the central nervous system and the immune system. It has been proposed that the functions of CD24 are primarily mediated by its N- and/or O-linked glycans. Applying a highly sensitive glycomics approach which included matrix-assisted laser-desorption ionization and electrospray ionization ion trap mass spectrometry, we have performed a detailed analysis of the N-linked glycans of CD24. Our data revealed a highly heterogeneous pattern of mainly complex type glycans expressing distinct carbohydrate epitopes, like 3-linked sialic acid, Le^x or blood group H antigens, bisecting *N*-acetylglucosamine residues and *N*-acetyllactosamine repeats as well as high-mannose and hybrid type species.

Keywords: CD24 • glycomics • Lewis^x • mass spectrometry • N-glycans

Introduction

The glycosylphosphatidylinositol-anchored cell adhesion molecule CD24 is a highly glycosylated glycoprotein that plays important roles in the central nervous system (CNS) and the immune system. In the developing CNS, CD24 is expressed on neurons,^{1–3} astrocytes^{2,4} and microglia,⁴ while its expression in the adult CNS is restricted to ciliated ependymal cells and immature neurons located mainly in two regions of ongoing neurogenesis, namely, the subventricular zone of the lateral ventricles and the dentate gyrus of the hippocampus.¹ In these areas, CD24 inhibits proliferation of immature neurons.⁵ In the immune system, CD24 is expressed by hematopoietic cells, for example, T- and B- lymphocytes,^{6–8} cytotoxic T-lymphocytes⁹ and antigen presenting cells, like epidermal Langerhans' cells and dendritic cells.¹⁰ CD24 is of key importance in the pathogenesis of multiple sclerosis¹¹ and in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE;¹²) which is an animal model for multiple sclerosis. CD24 is also required for expansion and persistence of autoreactive T-cells in the CNS,¹³ and an increase in CD24 expression in activated astrocytes correlates with the efficiency of stimulation of T-cell proliferation by astrocytes.⁴

The short protein cores of mouse or human CD24 comprise only 27 or 32 amino acids, respectively,^{14,15} and do not show pronounced conservation among species. Hence, it has been

proposed that the functions of CD24 are primarily mediated by its N- and/or O-glycosidically linked glycans. Carbohydrates have been shown to be important players in mediating cell–cell interactions and modulating cell–cell communication in the nervous system (for a recent review, see ref 16). In this context, distinct carbohydrate entities like polysialic acid, the human natural killer cell glycan epitope HNK-1, oligomannosidic glycans and Le^x units have been shown to affect important processes that depend on cell recognition, such as cell migration, neurite outgrowth and fasciculation, synapse formation and stabilization, and modulation of synaptic efficacy, learning and memory, myelination and regeneration after injury.¹⁶ The importance of glycans is further highlighted by congenital glycosylation diseases which result in various dysfunctions of the nervous system.¹⁷

In a previous study, we have already shown that the interaction between CD24 and the cell adhesion molecule L1 depends on α 2,3-linked sialic acid residues presented by CD24.¹⁸ This carbohydrate-dependent interaction leads to a promotion or inhibition of neurite outgrowth of cultured cerebellar and dorsal root ganglion neurons, respectively. Considering the outstanding role of CD24, it is very likely that certain carbohydrate epitopes on CD24 may not only mediate cellular interaction between neural cells, but are also crucial in modulating the interplay between immune cells as well as between immune cells and neural cells. Therefore, we have initiated a detailed analysis of the carbohydrate moieties of CD24 isolated from mouse brain. Since mass spectrometry (MS) has been widely shown to represent a valuable tool for the analysis of carbohydrate molecules, a highly sensitive glycomics approach has been applied including matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) and

* To whom correspondence should be addressed. Prof. Dr. Rudolf Geyer. Institute of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Giessen, Friedrichstrasse 24, D-35392 Giessen, Germany. Phone +49 641 9947400. Fax: +49 641 9947409. E-mail: rudolf.geyer@biochemie.med.uni-giessen.de.

[†] University of Giessen.

[§] University of New Hampshire.

[‡] University of Hamburg.

research articles

Bleckmann et al.

electrospray ionization (ESI)-MS. In particular, the tandem MS/MS facility of a MALDI-TOF/TOF instrument or multistage fragmentation by ESI ion-trap (IT) MSⁿ allowed the detection and characterization of minor carbohydrate components even within a complex nonseparated mixture. To reduce the structural heterogeneity and diversity of the glycans to be analyzed, this study has been exclusively focused on N-linked substituents of this glycoprotein which comprises 3 potential N-glycosylation sites. Our data revealed a highly heterogeneous pattern of small amounts of high-mannose and hybrid type glycans in addition to complex type species expressing distinct carbohydrate epitopes, like 3-linked sialic acid, Le^x units, blood group H antigens, bisecting *N*-acetylglucosamine residues and/or *N*-acetylglucosamine repeats.

Methods and Materials

Materials. CD24 was purified by immunoaffinity chromatography from brains of 1–10 day-old C57/Black 6 mice. Monoclonal antibodies to murine CD24 (mAb79) were used after affinity purification on protein G- and protein A-sepharose. Peptide *N*-glycosidase F (PNGase F) from *Flavobacterium meningosepticum* was obtained from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany) and *O*-sialoglycoprotein endopeptidase from *Mannheimia hemolytica* was purchased from Biozol (Eching, Germany).

Purification of CD24. For purification of CD24, frozen brain tissue was thawed on ice and homogenized with phosphate-buffered saline containing EDTA (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM NaH₂PO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, pH 7.4) using a Potter homogenizer. After centrifugation at 3000g for 20 min, the supernatant was centrifuged again at 100 000g for 60 min. The pellet was homogenized in 50 mL of Hepes-buffered saline (10 mM Hepes, pH 7.4, 10 mM NaCl, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM Aprotinin, 0.1 mM Leupeptin, 1% TritonX-100), incubated in a head-over-head mixer overnight at 37 °C and centrifuged again at 100 000g for 60 min. This procedure was repeated twice with incubation times of 180 min at 37 °C and of 30 min in a boiling water bath. The supernatants were collected and applied to an affinity column prepared by coupling mAb79 with CNBr-activated Sepharose B (GE Healthcare, Munich, Germany). The supernatant was circulated over the column for 2–3 days. Then, the column was washed with buffer A (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 2% TritonX-100, pH 7.4), followed by washing with buffer B (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0.1% TritonX-100, pH 7.4) and Hepes-buffered saline (10 mM Hepes, 10 mM NaCl, pH 7.4). Bound CD24 was eluted with buffer C (50 mM triethylamine, 150 mM NaCl, 0.2% CHAPS, pH 11.5). The eluate was neutralized by addition of 1 M Tris/HCl, pH 6.7, dialyzed for 48 h against 25 mM (NH₄)HCO₃ changing the buffer every 5 h and lyophilized. Coeluted mAb79 was removed from the CD24 preparation by digestion with trypsin after reduction and alkylation with iodoacetamide.¹⁹

SDS-PAGE/Western Blot Analysis. One-dimensional SDS-PAGE was performed according to Laemmli²⁰ using a Mini-Protein3 electrophoresis system (Bio-Rad, Munich, Germany). Gels (9 × 6 × 0.75 cm) were prepared containing 10% acrylamide. An aliquot of the freeze-dried CD24 sample was dissolved in sample-buffer (62.5 mM Tris/HCl, pH 6.8, 8.7% glycerol, 2% SDS, 1 mM EDTA, 0.00625% bromophenol blue) containing mercaptoethanol and boiled for 5 min. After electrophoresis, the gels were either stained with silver or transferred to a nitrocellulose membrane. Blots were stained with mAb79 and rabbit-anti-rat immunoglobulin (Ig) conjugated

with horseradish peroxidase (DAKO, Hamburg, Germany). Antibody staining was visualized by chemiluminescence (Pierce, Rockford, IL) and documented using 9 × 13 cm Kodak X-Omat AR Film (Sigma, Taufkirchen, Germany).

Proteolytic Digestion of CD24. Freeze-dried CD24 was dissolved in sodium phosphate buffer, pH 7.2 and incubated overnight at 37 °C with 1 mg of *O*-sialoglycoprotein endopeptidase. The obtained mixture was directly used for the release of N-glycans.

Release of N-Glycans. CD24 N-glycans were released by PNGase F treatment (30 units, Roche) at 37 °C for 4 h under shaking. After addition of the same amount of enzyme, incubation was continued overnight.²¹ The resulting mixture was applied to a reverse-phase cartridge (C18; Macherey and Nagel, Dueren, Germany). Released oligosaccharides were recovered in the flow-through and desalted on a porous graphitic-carbon cartridge (Thermo Scientific, Dreieich, Germany). The cartridges were washed with water and oligosaccharides were eluted with 25%, 40% and 60% (v/v) aqueous acetonitrile containing 0.1% trifluoroacetic acid (TFA).

Constituent and Linkage analysis. For constituent analyses, samples were hydrolyzed in 250 µL of 4 M aqueous TFA (100 °C, 4 h), and analyzed as alditol acetates by capillary gas–liquid chromatography (GC) or gas–liquid chromatography/mass spectrometry (GC/MS) as detailed elsewhere.²² For linkage analyses, N-glycans were permethylated using methyl iodide and hydrolyzed. Partially methylated alditol acetates obtained after sodium borohydride reduction and peracetylation were analyzed by capillary GC/MS using the instrumentation and microtechniques described elsewhere.^{23,24}

Desialylation. Aliquots of CD24 N-glycans were chemically desialylated by treatment with acetic acid (1 N, 0.5 h, 80 °C). Acetic acid was removed by successive evaporations with methanol. For desalting, glycans were applied to a porous graphitic-carbon cartridge as above and eluted with 25–60% (v/v) aqueous acetonitrile.

Pyridylation of N-Glycans. An aliquot of the desialylated N-glycans was pyridylated according to Kuraya et al.²⁵ Excess 2-aminopyridine (PA) and reaction byproduct were removed by gel filtration using a TSK-gel Toyopearl HW-40F column.²¹

Reduction and Permethylation of N-Glycans. Aliquots of sialylated or desialylated N-glycans were reduced using a solution of sodium borohydride (200 µL of 10 mg/mL NaBH₄ in 0.01 M NaOH) at room temperature overnight. The reduction was terminated by dropwise addition of 2 N acetic acid. Borate esters were removed by successive evaporations with methanol. Glycans were desalted on a porous graphitic-carbon cartridge. The dried samples were permethylated as described elsewhere.^{26,27} For mass spectrometric analysis, the samples were resuspended in an aqueous 75% (v/v) methanol solution.

MALDI-TOF-MS. MALDI-TOF-MS was performed on an Ultraflex mass spectrometer (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) equipped with a LIFT-MS/MS facility. In the positive ion mode, 6-aza-2-thiothymine (5 mg/mL) and/or 2,5-dihydroxybenzoic acid (10 mg/mL) was used as matrix. Fragment ion analyses by tandem mass spectrometry after laser-induced dissociation were performed as detailed earlier.^{21,28} External mass calibration was performed by using peptide calibration solution (1000–3000 Da; Bruker). Assignment of oligosaccharide and fragment ion compositions was performed using the software tools Glyco-Peakfinder²⁹ and GlycoWorkbench³⁰ (<http://www.eurocarbdb.org/applications/ms-tools>).

Glycomic Analysis of N-Linked Carbohydrate Epitopes

research articles

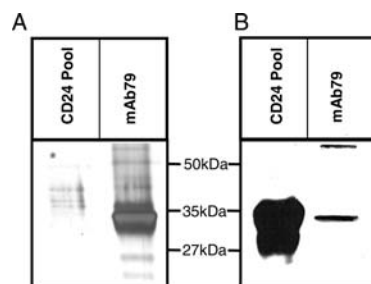


Figure 1. Characterization of the CD24 preparation obtained from homogenized mouse brain extracts by immunoaffinity chromatography. The CD24 pool was separated on a 10% SDS gel and stained by silver (A) or transferred to a nitrocellulose membrane and visualized using mAb79 and rabbit-anti-rat Ig conjugated with horseradish peroxidase (B). For comparison, mAb79 (5 μ g) was also applied. Molecular size calibration is given in kDa.

ESI-IT-MS. Mass spectra were obtained on a LTQ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) instrument in the positive ion mode. The instrument was equipped with a Triversa Nanomate automated nanoelectrospray ion source (Advion, Ithaca, NY). Signal averaging was accomplished by adjusting the number of microscans within each scan, generally ranging between 3 and 20 microscans. Collision parameters were left at default values with normalized collision energy set to 35%. Activation Q was set at 0.25, and activation time for 30 ms. Evaluation of the resulting spectra was again aided by Glyco-Peakfinder and GlycoWorkbench.^{29,30}

Results

Purification of CD24 from Mouse Brain. Mouse brains were homogenized, and CD24 was isolated by immunoaffinity chromatography using the anti-CD24 mAb79.^{18,31} To destroy contaminating antibodies which were present in the immunoaffinity eluate as evidenced by SDS-gel electrophoresis and silver staining (data not shown), the whole protein preparation was reduced, carbamidomethylated, digested with trypsin and dialyzed. Since CD24 exhibits only one potential tryptic cleavage site at its C-terminal end in direct proximity to the glycine residue carrying the glycosylphosphatidylinositol anchor,¹⁵ the remaining CD24 peptide was resistant to trypsin, whereas residual antibodies were cleaved. In agreement with previous studies,^{18,31} Western blot analyses of CD24 displayed a diffuse smear in the range of 27–35 kDa which is characteristic of highly glycosylated proteins (Figure 1). Although CD24 itself could not be visualized by silver staining due to its small protein core and its abundant glycosylation,³¹ the simultaneous presence of other contaminating proteins could be excluded by this approach.

Global Characterization of CD24 N-Glycans. To facilitate the quantitative release of N-glycans by PNGase F, purified CD24 was first treated with *O*-sialoglycoprotein endopeptidase which is known to cleave highly *O*-glycosylated sialylated glycoproteins.³¹ Neutral monosaccharide constituent analysis of the subsequently released N-glycans verified the presence of mannose (Man), galactose (Gal), *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) and fucose (Fuc) in molar ratios approaching 3.0:2.0:2.9:1.0, respectively. Starting from 350 mouse brains, in total, about 175 μ g of N-glycans was obtained. Linkage analyses of this pool of N-glycans by GC/MS before and after desialylation

Table 1. Linkage Analysis of CD24 N-Glycans^a

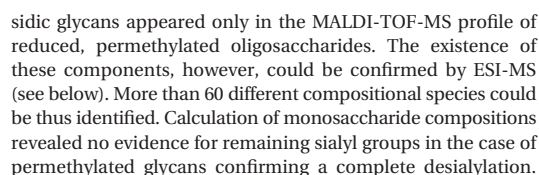
alditol acetate	N-glycan fraction	desialylated N-glycans	linkage
2,3,4-FucOH	+	+	Fuc(1-
2,3,4,6-GalOH	37%	78%	Gal(1-
2,4,6-GalOH	54%	16%	-3)Gal(1-
3,4,6-GalOH	$\leq 1\%$	$\leq 1\%$	-2)Gal(1-
2,3,4-GalOH	8%	5%	-6)Gal(1-
2,3,4,6-ManOH	+	+	Man(1-
3,4,6-ManOH	+	+	-2)Man(1-
2,4,6-ManOH	(+)	(+)	-3)Man(1-
3,6-ManOH	+	+	-2,4)Man(1-
3,4-ManOH	+	+	-2,6)Man(1-
2,4-ManOH	+	+	3,6)Man(1-
2-ManOH	+	+	-3,4,6)Man(1-
3,4,6-GlcN(Me)AcOH	(+)	(+)	GlcNAc(1-
3,6-GlcN(Me)AcOH	+	+	-4)GlcNAc(1-
4,6-GlcN(Me)AcOH	(+)	(+)	-3)GlcNAc(1-
6-GlcN(Me)AcOH	+	+	-3,4)GlcNAc(1-
3-GlcN(Me)AcOH	+	+	-4,6)GlcNAc(1-

^a Released N-glycans were permethylated and hydrolyzed. The partially methylated alditol acetates obtained after reduction and peracetylation were analyzed by capillary GC/MS. The presence of individual components is indicated by +; trace amounts by (+). In the case of partially methylated galactose derivatives, relative proportions of individual species are based on the sum of total peak areas set to 100%. 2,3,4-FucOH, 2,3,4-tri-*O*-methylfucitol, etc.

revealed the presence of a great variety of partially methylated alditol acetates, the pattern of which was nearly identical in both cases (Table 1). Solely the relative amounts of Gal derivatives had changed insofar as about 35% of Gal residues were unsubstituted within the pool of sialylated N-glycans, whereas approximately 40% were shown to be substituted by sialic acid preponderantly at C3 position (~93%) and only to small extend at C6 (~7%). After desialylation, about 25% of total galactose residues still carried substituents at C3, C6 or C2. Moreover, obtained linkage data of the studied N-glycans displayed a number of characteristic features including (1) terminal and 2-substituted Man, reflecting the presence of high mannose and/or hybrid type species; (2) 3,4- and 3,6-disubstituted Man, revealing the presence of tri- and tetraantennary complex type oligosaccharides; (3) the simultaneous appearance of terminal GlcNAc and 3,4,6-trisubstituted Man, suggesting the presence of bisecting GlcNAc; (4) terminal Fuc and 4,6-disubstituted GlcNAc in agreement with a fucosylated core GlcNAc; and (5) considerable amounts of 3,4-disubstituted GlcNAc indicating additional substituents at C3 of outer GlcNAc residues. In addition, trace amounts of 3-substituted Man and 3-substituted GlcNAc were detected.

For further analysis, N-glycans were either desialylated and labeled, in part, with 2-aminopyridin (PA) or reduced and permethylated prior to analysis by MALDI-TOF-MS profiling, MALDI-TOF-MS/MS sequencing and ESI-MSⁿ-fragmentation. The reason for including also pyridylaminated species in this study was the observation that incorporation of a secondary amino group resulted in an enhanced formation of proton adducts and an increase in sensitivity in MALDI-TOF-MS in many cases. Moreover, interpretation of fragment ion spectra was facilitated by the reducing end tag.

MALDI-TOF-MS Profiling of Neutral Glycans. MALDI-TOF-MS analysis of desialylated N-glycans was carried out on native, PA-labeled or reduced, permethylated glycans. Representative



Glycomic Analysis of N-Linked Carbohydrate Epitopes

research articles

Table 2. Compilation of N-Glycans Obtained from Murine Brain CD24^a

proposed composition	native glycans		PA-labeled glycans		reduced, permethylated glycans		sialylation
	observed mass [M + Na] ⁺	calculated mass [M + Na] ⁺	observed mass [M + H] ⁺	calculated mass [M + H] ⁺	observed mass [M + Na] ⁺	calculated mass [M + Na] ⁺	
Hex ₃ HexNAc ₂	932.7	933.3			1187.7	1187.6	
Hex ₃ HexNAc ₂ dHex	1078.9	1079.4	1135.7	1135.5	1361.8	1361.7	
Hex ₄ HexNAc ₂	1094.9	1095.4			1391.8	1391.7	
Hex ₃ HexNAc ₃	1136.4	1136.4			1432.8	1432.7	
Hex ₄ HexNAc ₂ dHex	1241.1	1241.4			1565.9	1565.8	
<i>Hex₅HexNAc₂</i>					<i>1596.0</i>	<i>1595.8</i>	
Hex ₃ HexNAc ₃ dHex			1337.6	1338.5	1606.9	1606.8	
Hex ₄ HexNAc ₃	1298.2	1298.4	1354.6	1354.5	1636.9	1636.8	+
Hex₆HexNAc₂					<i>1800.0</i>	<i>1799.9</i>	
Hex ₄ HexNAc ₃ dHex	1444.3	1444.5	1500.7	1500.6	1811.6	1810.9	+
Hex ₅ HexNAc ₃	1460.3	1460.5	1516.7	1516.6	1841.0	1840.9	
Hex ₃ HexNAc ₄ dHex	1485.3	1485.5	1541.8	1541.6	1852.0	1852.0	
Hex ₄ HexNAc ₄	1502.3	1501.5			1882.1	1882.0	+
Hex ₃ HexNAc ₅	1542.4	1542.6	1598.7	1598.6	1923.1	1923.0	
<i>Hex₇HexNAc₂</i>					<i>2004.0</i>	<i>2004.0</i>	
Hex₅HexNAc₄dHex	1606.4	1606.6	1662.7	1662.6	2015.2	2015.0	+
Hex ₄ HexNAc ₄ dHex	1647.5	1647.6	1703.7	1703.7	2056.1	2056.1	
Hex₅HexNAc₄	1663.5	1663.6	1719.8	1719.7	2086.1	2086.1	+
Hex ₃ HexNAc ₅ dHex	1688.5	1688.6	1744.8	1744.7	2097.1	2097.1	
Hex ₄ HexNAc ₅			1760.9	1760.7	2127.1	2127.1	+
<i>Hex₈HexNAc₂</i>					<i>2208.2</i>	<i>2208.1</i>	
Hex ₅ HexNAc ₅ dHex ₂			1808.7	1808.7	2188.8	2189.1	+
Hex ₆ HexNAc ₅ dHex	1768.5	1768.6	1824.8	1824.7	2219.8	2219.1	+
Hex₅HexNAc₆dHex	1809.6	1809.6	1865.9	1865.7	2260.2	2260.2	+
Hex ₆ HexNAc ₄	1825.6	1825.6			2290.3	2290.2	+
Hex ₃ HexNAc ₅ dHex ₂	1834.5	1834.7	1890.9	1890.7			
Hex ₄ HexNAc ₅ dHex	1850.7	1850.7	1906.9	1906.7	2301.2	2301.2	+
Hex₅HexNAc₅	1866.6	1866.7	1922.8	1922.7	2331.2	2331.2	
<i>Hex₉HexNAc₂</i>					<i>2412.4</i>	<i>2412.2</i>	
Hex ₅ HexNAc ₆ dHex ₂	1955.7	1955.7	2011.7	2011.8	2434.2	2434.2	+
Hex ₆ HexNAc ₆ dHex	1971.7	1971.7	2027.7	2027.8	2464.2	2464.3	+
Hex ₄ HexNAc ₅ dHex ₂	1996.8	1996.7	2052.8	2052.8	2475.3	2475.3	
Hex ₅ HexNAc ₅ dHex	2012.6	2012.7	2068.8	2068.8	2506.1	2505.3	+
Hex₅HexNAc₅	2028.7	2028.7	2084.8	2084.8	2535.3	2535.3	+
Hex ₄ HexNAc ₆ dHex	2053.7	2053.7	2110.2	2109.8			+
Hex ₅ HexNAc ₆	2070.1	2069.7	2125.7	2125.8			+
Hex ₆ HexNAc ₆ dHex ₂	2117.9	2117.8	2173.8	2173.8	2638.4	2638.3	+
Hex ₅ HexNAc ₆ dHex ₂	2158.2	2158.2	2214.9	2214.9			
Hex₆HexNAc₆dHex	2174.8	2174.8	2230.8	2230.8	2709.4	2709.4	+
Hex ₇ HexNAc ₅	2190.8	2190.8			2740.0	2739.4	+
Hex ₅ HexNAc ₆ dHex	2216.7	2215.8	2272.0	2271.9			+
Hex ₇ HexNAc ₆ dHex ₂			2335.3	2335.9	2842.5	2842.4	
Hex ₅ HexNAc ₆ dHex ₃	2304.0	2304.8	2360.9	2360.9	2854.6	2853.5	+
Hex₆HexNAc₆dHex₂	2320.9	2320.8	2376.9	2376.9	2883.4	2883.5	+
Hex ₅ HexNAc ₆ dHex ₂	2361.7	2361.9	2417.9	2417.9			+
Hex₆HexNAc₆dHex	2377.8	2377.9	2434.2	2433.9	2954.7	2954.5	+
Hex ₇ HexNAc ₆	2394.3	2393.8	2450.3	2449.9	2984.7	2984.5	
Hex ₆ HexNAc ₆ dHex ₃	2466.8	2466.9	2523.0	2523.0	3057.9	3057.6	
Hex ₆ HexNAc ₆ dHex ₂	2523.8	2523.9	2580.0	2580.0	3128.9	3128.6	
Hex₇HexNAc₆dHex	2539.9	2539.9	2596.2	2596.0	3158.7	3158.6	+
<i>Hex₅HexNAc₇dHex₂</i>	<i>2565.1</i>	<i>2564.9</i>					
Hex ₆ HexNAc ₇ dHex	2581.0	2580.9	2637.4	2637.0			+
Hex ₆ HexNAc ₆ dHex ₃	2669.7	2670.0	2726.2	2726.0	3302.9	3302.7	
Hex₇HexNAc₆dHex₂	2685.9	2686.0	2742.1	2742.0	3332.9	3332.7	+
Hex ₅ HexNAc ₇ dHex ₃	2711.7	2711.0	2767.4	2767.1			
Hex ₆ HexNAc ₇ dHex ₂	2727.0	2727.0			3374.3	3373.7	
Hex ₇ HexNAc ₆ dHex ₃	2832.1	2832.0	2888.2	2888.1	3506.8	3506.8	+
Hex₇HexNAc₆dHex₂	2889.8	2889.0	2947.6	2948.1	3577.8	3577.8	
Hex₈HexNAc₆dHex					<i>3607.4</i>	<i>3607.8</i>	
Hex ₇ HexNAc ₆ dHex ₄	2977.9	2978.1	3034.0	3034.2	3681.0	3680.9	
<i>Hex₁₀HexNAc₇</i>	<i>3083.2</i>	<i>3083.1</i>					
Hex ₈ HexNAc ₆ dHex	3107.6	3108.1	3164.6	3164.2			
Hex ₉ HexNAc ₈			3179.8	3180.2	3883.0	3883.0	+
Hex ₉ HexNAc ₈ dHex	3270.1	3270.2			4057.3	4057.1	+

^a Desialylated native and pyridylaminated glycans as well as reduced, permethylated species were analyzed by MALDI-TOF-MS in the positive ion mode. With a few exceptions (given in italics), only species detected in at least two mass profiles were listed. Species analysed in detail are marked in bold type. Potential sialylation pattern were extracted from MALDI- and ESI-MS profiles of reduced, permethylated glycans.

Since Fuc and GlcNAc were the only deoxyhexose and N-acetylhexosamine residues found in both composition and linkage analyses, dHex and HexNAc residues are designated in the following as Fuc and GlcNAc in the text throughout.

In all three mass profiles, the most abundant signals corresponded to complex type structures with two, three or four

LacNAc-antennae (Hex₅₋₇GlcNAc₄₋₆Fuc₀₋₂) with the dominant component Hex₆GlcNAc₅ (*m/z* 2028.7, 2084.8 and 2535.3 in Figure 2). Notable features of these complex type species were their substitution by additional fucose residues resulting in highly fucosylated glycans (see, for instance, Hex₇GlcNAc₆Fuc₀₋₄) or by N-acetylglucosamine repeats (e.g., Hex₉-

research articles

Bleckmann et al.

GlcNAc₆Fuc₀₋₁) (Figure 2C). Minor signals were consistent with hybrid type oligosaccharides (Hex₄₋₅GlcNAc₃Fuc₀₋₁) or truncated glycans (Hex₃₋₄GlcNAc₂₋₃Fuc₀₋₁) and small amounts of high-mannose type structures (Hex₅₋₉GlcNAc₂) (Table 2). The ratio of the different components slightly varied from batch to batch and might be influenced by the age of the animals. Complex type species, however, represented always major constituents. In parallel to MALDI-TOF-MS, desialylated, permethylated and reduced oligosaccharides were additionally analyzed by ESI-MS (see below).

MALDI-TOF-MS/MS Sequencing. Major PA-labeled desialylated glycans were subjected to MS/MS analyses. Fragmentation of signals at m/z 1719.8 and m/z 2084.8 corresponding to Hex₅GlcNAc₄PA and Hex₆GlcNAc₅PA confirmed the presence of two and three *N*-acetylglucosamine units attached to the respective pentasaccharide core. Assignment of key signals for the major compound Hex₆GlcNAc₅PA is given in Figure 3A as an example. Data derived after fragmentation of the protonated molecular ions of the corresponding fucosylated glycans Hex₆GlcNAc₅FucPA and Hex₆GlcNAc₅Fuc₂PA are shown in Figure 3B,C. Intriguingly, the MS/MS spectra of the fucosylated compounds were characterized by the presence of the diagnostic fragment ion GlcNAcFucPA at m/z 446.2 verifying core fucosylation. In contrast to the spectrum obtained for the monofucosylated compound, however, the fragment ion spectrum of the difucosylated species exhibited, in addition to the signal at m/z 446.1, a signal at m/z 512.1 indicating the presence of a HexGlcNAcFuc-unit, that is, a fucosylated LacNAc-antenna. The exact linkage position of the latter Fuc to a distinct LacNAc-antenna, however, could not be deduced from this spectrum. Likewise, the obtained data did not allow a discrimination between isomeric glycan species comprising either a 2,4- or a 2,6-branched mannose. Similar signals were obtained in the MS/MS spectra of Hex₅GlcNAc₄Fuc₁PA, Hex₇GlcNAc₆Fuc₁PA, Hex₇GlcNAc₆Fuc₂PA, and Hex₇GlcNAc₆Fuc₃PA revealing core fucosylation in the case of monofucosylated species and additional fucosylated LacNAc-antennae in the case of two or more Fuc residues (data not shown).

ESI-MSⁿ Fragmentation. Desialylated, permethylated and reduced oligosaccharides of monosaccharide compositions Hex₅GlcNAc₃Fuc, Hex₅GlcNAc₄, Hex₅GlcNAc₄Fuc, Hex₅GlcNAc₅, Hex₆GlcNAc₂, Hex₆GlcNAc₅, Hex₆GlcNAc₅Fuc, Hex₆GlcNAc₅Fuc₂, Hex₆GlcNAc₆Fuc, Hex₇GlcNAc₆Fuc₂, Hex₇GlcNAc₇Fuc₂ and Hex₈GlcNAc₇Fuc were selected for detailed structural analysis, and multiple cycles of MSⁿ fragmentation were performed in each case. Most of the selected glycan species represented mixtures of structural isomers with identical molecular compositions.

As an example, the ion at m/z 1279.2, corresponding to the doubly charged [M + 2Na]²⁺ ion of the major component Hex₆GlcNAc₅ was isolated and examined by MSⁿ (Figure 4). Annotation and assignments of signals were performed with GlycoWorkbench.³⁰ The MS² spectrum was dominated by the ions at m/z 1047.5, 1132.6 and 486.2 representing the loss of HexGlcNAc from an antenna, the loss of reducing GlcNAcol and the B₂-fragment HexGlcNAc, respectively (Figure 4A; designation of fragment ions according to Domon and Costello³²). Since cleavage at GlcNAc is a favored event, the monosaccharide sequences of the antennae may be postulated as Hex-GlcNAc in accordance with the biosynthetic route of mammalian N-glycans.³³ This could be corroborated by the MS³ spectrum of the B₂ fragment at m/z 486.2 (Figure 4B). Besides the ion indicating the loss of an acetyl group (m/z 444.2), the spectrum exhibited a strong signal at m/z 329.2

which could be interpreted as a ^{3,5}A₂ ring fragment of GlcNAc. The presence of this signal, together with the ion at m/z 412.1 (^{0,4}X_{GlcNAc} ring fragment of the B₂-ion) confirmed the linkage position of Hex at C4 of GlcNAc, thus, substantiating the presence of type 2-antennae. By the same line of reasoning, the exclusive presence of type-2 antennae could be also substantiated for the complex type glycans described below (data not shown). Intriguingly, the MS² spectrum of m/z 1279.2 (Figure 4A) displayed also a signal at m/z 463.2 which could not be deduced from the normal triantennary glycan shown, but represented a terminal Hex₂ B-ion. To verify the presence of a potential isomeric structure, the tiny signal of the B-fragment Hex₃GlcNAc₂ at m/z 1157.6 (Figure 4A) was isolated and further fragmented. Three different isomers are theoretically conceivable with this composition, that is, 2,6- or 2,4-branched antennae (isomers I in Figure 4C) and the branched structure II with a Hex-Hex unit. Apart from signals which were consistent with all isomers (for instance, m/z 939.5 or 1069.7), ions at m/z 486.3, 546.3, 694.4 and 1026.0 confirmed the presence of isomers I, whereas ions at m/z 445.2, 463.3, 519.1, 533.3 and 735.4 proved the presence of isomer II. This finding is in line with the data from linkage analysis (Table 1) revealing galactose residues substituted, in part, at C3 or C6 even after desialylation and small amounts of terminal GlcNAc. The isomeric, that is, 2,4- or 2,6-branched structure of these triantennary glycans was not determined.

The MS/MS spectrum of the corresponding monofucosylated structure Hex₆GlcNAc₅Fuc at m/z 1366.2 displayed predominantly the cleavage of glycosidic linkages of Hex and HexGlcNAc. The pronounced presence of the fragment ions at m/z 486.2 (HexGlcNAc) and 490.3 (FucGlcNAc_o) in the absence of the ions at m/z 316.2 (GlcNAc_o) and 660.3 (HexGlcNAcFuc) indicate that these glycans were predominantly fucosylated at their chitobiose core (data not shown).

The MS² spectrum of the doubly charged [M + 2Na]²⁺ ion of the difucosylated structure Hex₆GlcNAc₅Fuc₂ at m/z 1453.3 exhibited diagnostically relevant signals indicating that one fucose is bound to the reduced GlcNAc (m/z 490.3, 1219.6), whereas the second one is attached to one of the antennae (m/z 660.3, 988.0) (Figure 5A). This is in line with the MS³ spectrum of the fragment ion at m/z 1219.5 ([M + 2Na]²⁺-FucGlcNAc_o) still exhibiting strong signals at m/z 660.3 as well as at m/z 756.5 and 987.9 (Figure 5B). Interestingly, the fragment ion at m/z 871.9 in Figure 5A which resulted from the loss of 2 HexGlcNAc-antennae and 1 Hex, suggested fucosylation of the remaining outer GlcNAc residue in agreement with a Le^x unit. This assumption is supported by the presence of 3,4-disubstituted GlcNAc in linkage analyses (Table 1). It has to be pointed out, however, that the obtained data allowed neither an assignment of this Le^x unit to a distinct LacNAc-antenna nor an elucidation of the isomeric structure of these triantennary glycans. Further fragmentation of the B-ion at m/z 660.3 in Figure 5B, however, revealed the presence of 3 isomeric structures (Figure 5C). The most prominent ions in this MS⁴ spectrum at m/z 472.2, 586.3 and 618.4, however, were not suitable to distinguish between the different topologies, since they could arise from all 3 isomers. On the other hand, ions at m/z 241.1 and 259.1 were clearly indicative for an unsubstituted terminal Hex and could only result as B- and C-fragments from isomer I (Le^x structure). In addition, ions at m/z 424.2 (BZ-fragment of FucGlcNAc) and 236.1 (BYZ-fragment of disubstituted GlcNAc) proved the internal GlcNAc to be substituted with Fuc.

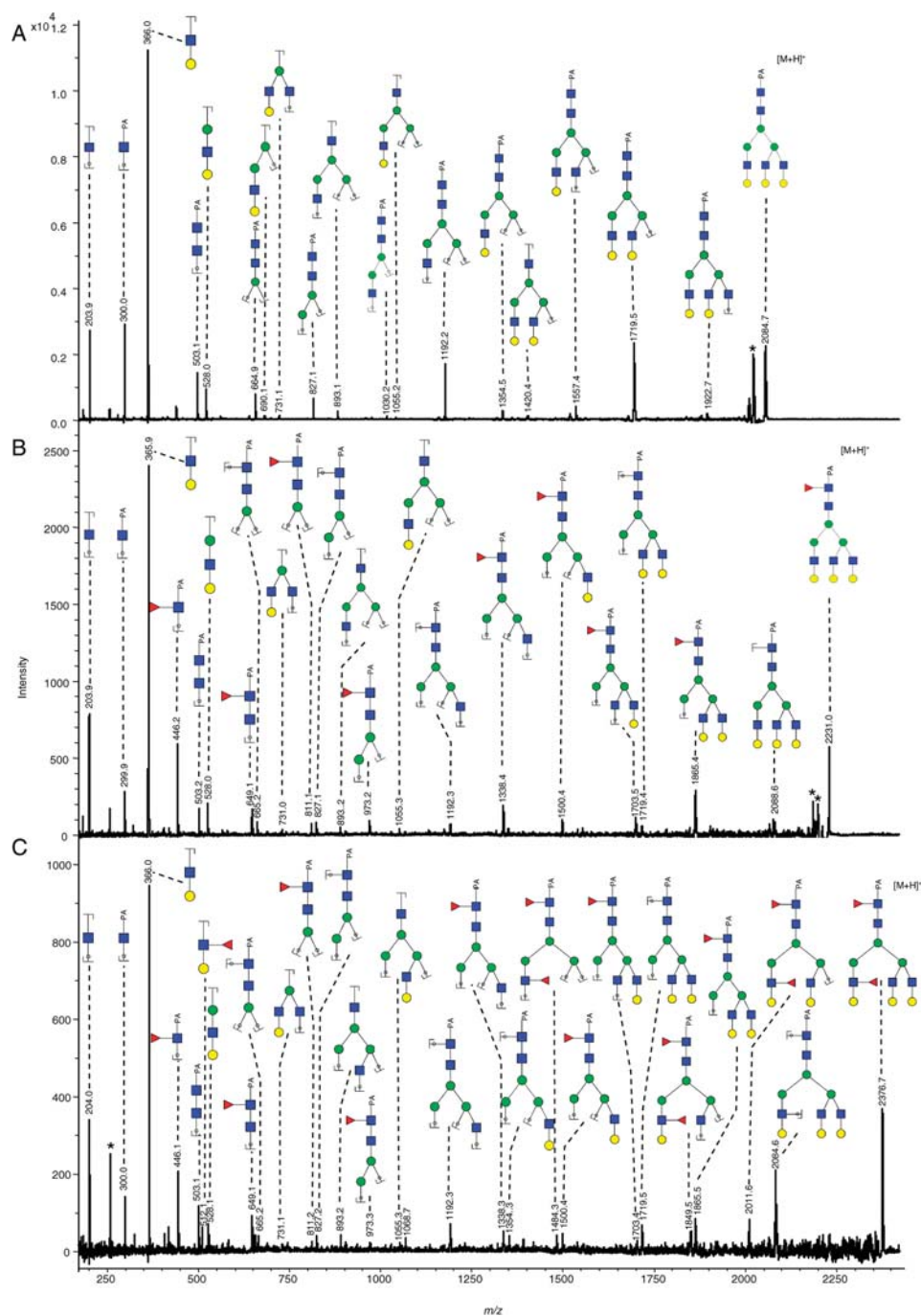
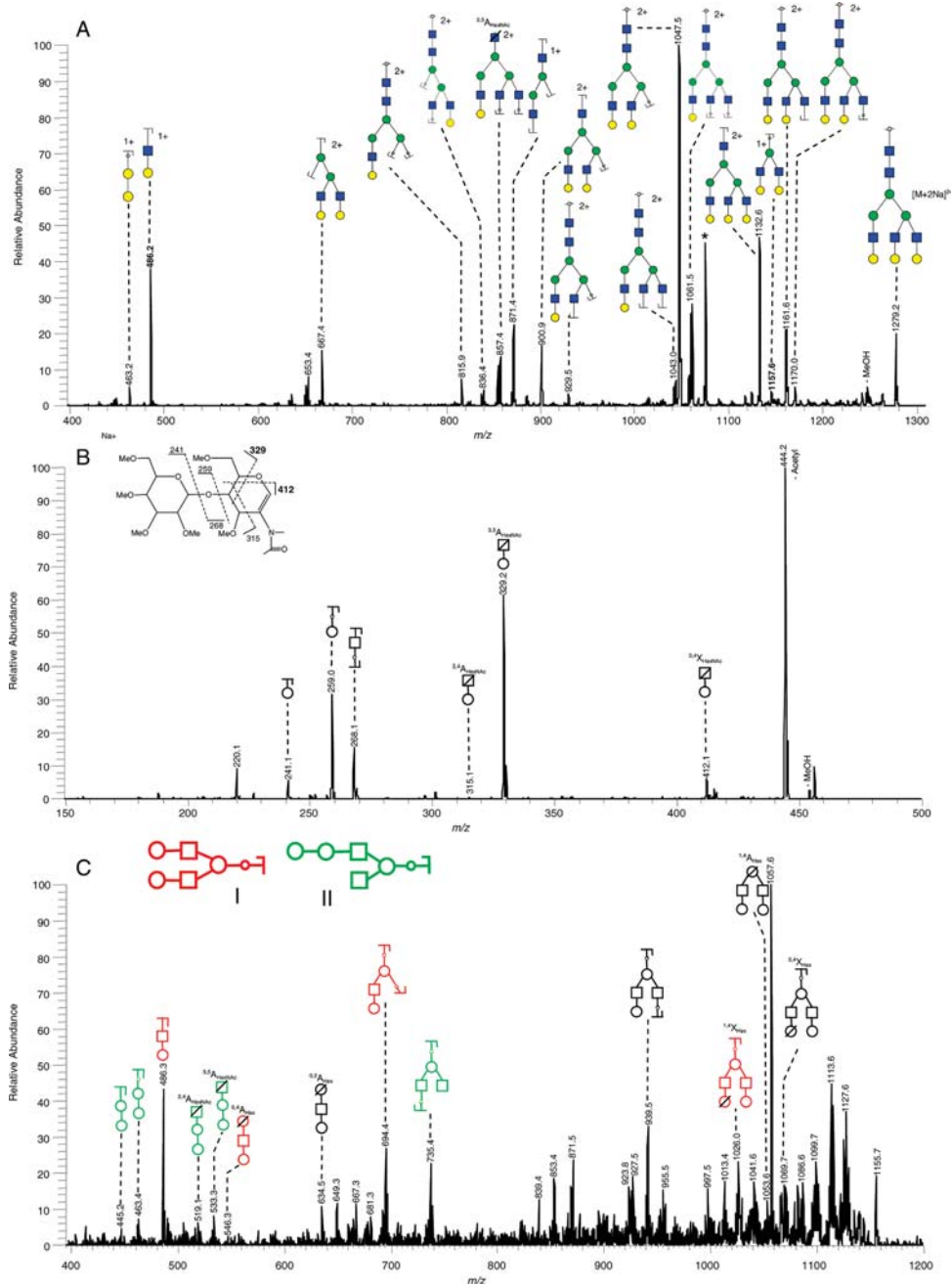


Figure 3. MALDI-TOF-MS/MS of CD24 PA-oligosaccharides. Protonated pseudomolecular ions $[M + H]^+$ of the PA-glycan species Hex₆GlcNAc₆PA (A), Hex₆GlcNAc₆Fuc₂PA (B), and Hex₆GlcNAc₆Fuc₂PA (C) were subjected to MALDI-TOF-MS/MS following laser-induced dissociation. Fragments are assigned according to the recommendations of the Consortium of Functional Glycomics using GlycoWorkbench.³⁰ The displayed structural cartoon implies neither a specific triantennary glycan isomer nor allocation of Fuc to a distinct antenna. Registered fragments may be formed by different fragmentation pathways, only one of which is illustrated in the figure. Yellow circle, galactose; green circle, mannose; blue square, N-acetylglucosamine; red triangle, fucose (deoxy hexose); *, not identified.



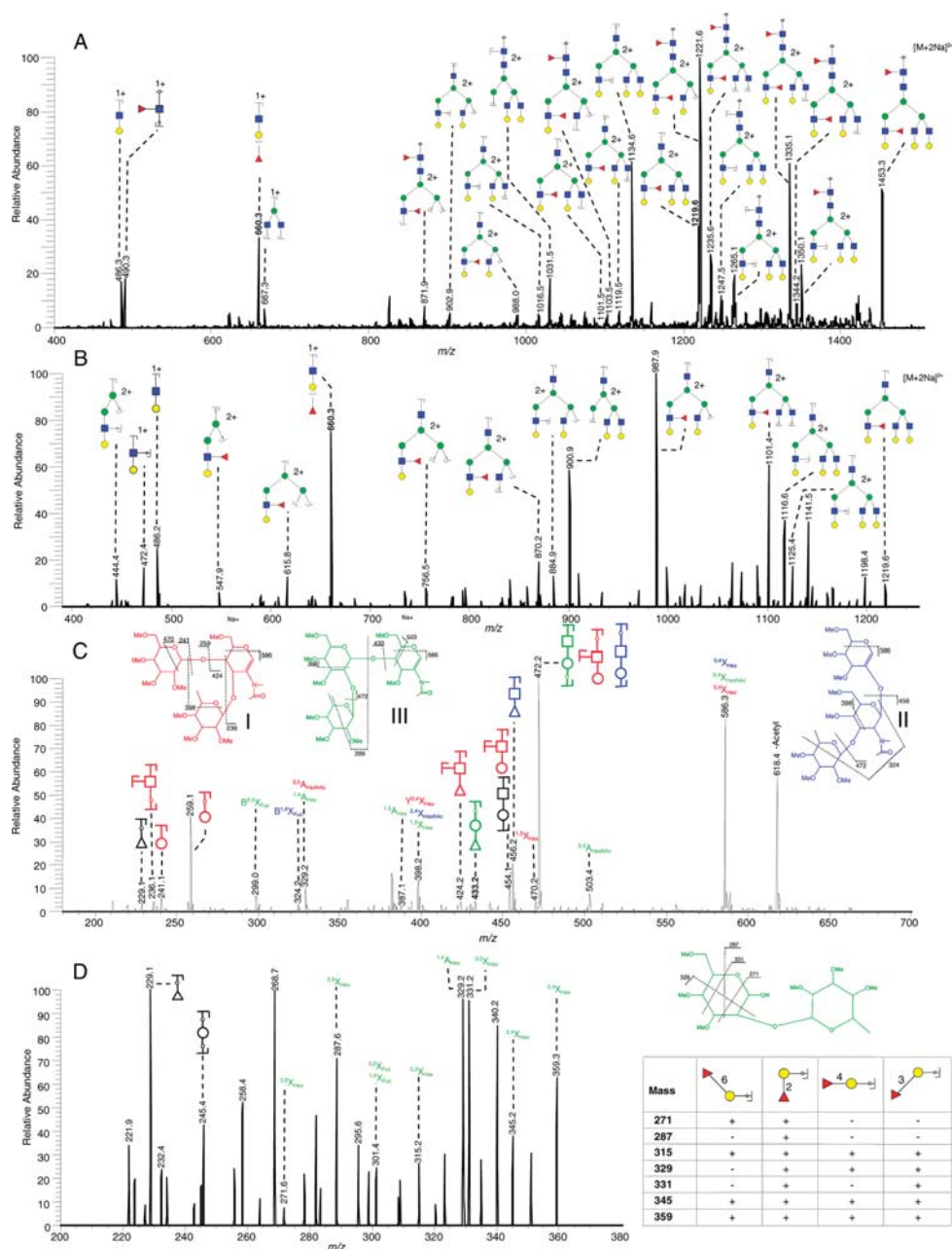


Figure 5. ESI-IT-MSⁿ fragmentation spectra of the permethylated, reduced glycan species Hex₆GlcNAc₅Fuc₂. (A) MS² spectrum of the doubly charged pseudomolecular ion [M + 2Na]²⁺ at *m/z* 1453.3. (B) MS³ spectrum of the Hex₆GlcNAc₄Fuc B-type ion at *m/z* 1219.6. (C) MS⁴ spectrum of the HexGlcNAcFuc B-type ion at *m/z* 660.3. Possible isomeric structures are given in different colors and key product ions derived thereof are denoted in the respective color. Nonspecific isomeric structures are labeled in black. (D) MS⁵ spectrum of the HexFuc C-type ion at *m/z* 433.2. The inset displays the proposed structure and the calculation of potential fragment ions. All fragments observed were sodium adducts. Fragments were assigned according to Domon and Costello³² and the recommendations of the Consortium of Functional Glycomics using GlycoWorkbench.³⁰ The displayed structural cartoon implies neither a specific triantennary glycan isomer nor assignment of Le^x to a distinct antenna. Registered fragments may be formed by different fragmentation pathways, only one of which is illustrated in the figure. Yellow circle, galactose; green circle, mannose; blue square, N-acetylglucosamine; red triangle, fucose.

research articles

Bleckmann et al.

In contrast, the clearly detectable fragment ion at m/z 456.2 represented a terminal, fucosylated GlcNAc (B-fragment) which could not arise from a Le^X structure, but may indicate the presence of isomer II. An additional signal at m/z 324.2 could be interpreted as crossing fragment ($\text{B}^{0,2}\text{X}_{\text{Fuc}}$ or $\text{B}^{1,4}\text{X}_{\text{Fuc}}$) of m/z 456.2. The exact linkage position of fucose could not be allocated by MS, but methylation data revealed trace amounts of 3-substituted GlcNAc (Table 1) in good agreement with an incomplete Le^X unit. The question remains open, however, as to whether this epitope is formed by an auxiliary activity of the involved α 1,3/4 fucosyltransferase usually requiring intact LacNAc-units³⁴ or partial degradation by exoglycosidases during CD24 isolation. The presence of this type of structure would presume the complementary substitution of one of the other antennae of this glycan by an additional Hex leading to a HexHexGlcNAc-unit. Respective signals at m/z 690.3 or 708.3 (B- or C-fragments) could not be detected in Figure 5A, whereas the reciprocal signal at m/z 1119.5 representing the respective Y-fragment formed by loss of $\text{Hex}_2\text{GlcNAc}$ may substantiate the presence of isomer II. Attempts to verify the presence of Gal α 3Gal β 4GlcNAc β -units, which have been shown to be frequently expressed on murine cell-derived glycoprotein-N-glycans,^{35–37} by treatment of the entire mixture of native glycans with α -galactosidase prior to MALDI-MS failed, since the respective glycans represented only minor compounds and occurred mainly within isomeric glycan mixtures which were not susceptible to this enzyme.

Intriguingly, the signals at m/z 299.0, 433.2 and 503.4 in Figure 5C were neither consistent with proposed isomer I nor with isomer II, but indicated the presence of a terminal, fucosylated hexose as outlined for isomer III. Whereas the ions at m/z 433.2 and 299.0 represented a C-type FucHex fragment and a ring fragment derived thereof, respectively, the ion at m/z 503.4 resulted obviously from a $^{3,5}\text{A}$ -crossring cleavage of the GlcNAc in isomer III substantiating the linkage of Hex in position C4 of GlcNAc, that is, a type 2 antenna. The ion at m/z 433.2 was selected for further MS⁵ analysis (Figure 5D). In this spectrum, signals at m/z 359.3, 345.2, 331.2, 329.2, 315.2, 287.6 and 271.6 can be interpreted as various crossing fragments of the hexose ring. With the use of GlycoWorkbench,³⁰ all possible ring cleavages of such a FucHex C-type fragment were calculated and compared considering different linkage positions of fucose. The simultaneous presence of the signals mentioned above identified Fuc to be linked at C2 of the hexose (cf. Table in Figure 5D). Hence, in addition to glycans expressing Le^X -epitopes or variants comprising an incomplete fucosylated antenna plus an antenna being further elongated by an additional hexose unit, the studied compositional species include also isomers containing an H-type carbohydrate unit Fuc2Gal4GlcNAc. This assumption is corroborated by the detection of trace amounts of 2-substituted Gal in linkage analyses (Table 1). The relative abundance of the different fragment ions in Figure 5C indicated that the glycan with a Le^X antenna is the major constituent.

To estimate the potential presence of LacNAc-repeating units ($^{-3}\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta$ -), a tiny signal at m/z 1217.9 corresponding to the triply charged $[\text{M} + 3\text{Na}]^{3+}$ ion of $\text{Hex}_6\text{GlcNAc}_7\text{Fuc}$ was selected for MSⁿ. This compound was not detectable in the MALDI-MS profiles of native or pyridylaminated glycans, but could be registered only as methylated species (see Table 2). Signals at m/z 708.4, 935.5 and 953.5 (C-ion of terminal $\text{Hex}_2\text{GlcNAc}$, B-ion of terminal $\text{Hex}_2\text{GlcNAc}_2$ and C-ion of terminal $\text{Hex}_2\text{GlcNAc}_2$) found in the MS² spectrum (Figure 6A)

indicated the presence of, at least, one LacNAc-repeat. The ion at m/z 935.5 was selected for further decay (Figure 6B). Obtained fragment signals verified the presence of a LacNAc-repeating unit (see, for instance, signals at m/z 301.3, 444.1, 472.2, 618.2). In accordance with the exclusive presence of type-2 LacNAc-antennae in the complex-type glycans examined (see above), the ions at m/z 301.3 and 765.1 support again the linkage of the internal Hex to C4 of GlcNAc. In addition, the signal at m/z 370.3 provides strong evidence for a linkage of the subterminal GlcNAc residue to C3 of the internal hexose. Attempts to corroborate this assumption by treatment of native glycans with *endo*- β -galactosidase prior to reduction, permethylation and ESI-IT-MS were not successful, since this type of glycans represented only minor compounds of the entire glycan mixture.

When the same approach was used, possible isomers of the permethylated compound $\text{Hex}_6\text{GlcNAc}_6\text{Fuc}$ were determined. Assuming a triantennary type of structure with an additional GlcNAc residue, three different linkage positions of this GlcNAc could be considered: linkage to the central branched core Man yielding a so-called “bisecting GlcNAc”, presence of an incomplete antenna representing a truncated tetraantennary glycan or the presence of a terminal GlcNAc as part of an incomplete LacNAc-repeat. The doubly charged ion $[\text{M} + 2\text{Na}]^{2+}$ at m/z 1488.8 was selected for fragmentation resulting in a MS² spectrum with most intense signals at m/z 1257.4 and 1359.4 corresponding to the neutral loss of terminal HexGlcNAc and terminal GlcNAc, respectively (data not shown). To discriminate between potential isomers, the signal at m/z 1359.4 was further fragmented and the low mass region of the resulting MS³ spectrum was carefully inspected for sequence-specific fragment ions. Indeed, a small fragment ion at m/z 444.2 was detected which could only result from a trisubstituted, that is, formerly bisected core HexGlcNAc unit (YYYB fragment) in addition to a signal at m/z 458.3 confirming the normal disubstituted core HexGlcNAc YYB-ion.^{38,39} Together with the results of linkage analysis, the presence of bisected glycan species is thus confirmed.

Compound $\text{Hex}_5\text{GlcNAc}_3\text{Fuc}$ was assumed to represent a hybrid-type species. Signals in the MS² spectrum of the doubly charged $[\text{M} + 2\text{Na}]^{2+}$ ion at m/z 1019.0 revealed the loss of terminal Fuc (m/z 915.6), terminal Hex (m/z 901.0), terminal GlcNAc (m/z 889.5), terminal Hex_2 (m/z 799.0), terminal HexGlcNAc (m/z 787.4) and fucosylated GlcNAc_{ol} (m/z 785.3) (Figure 7A). In addition, signals at m/z 463.2, 486.2 and 490.3 substantiated the presence of Hex_2 , LacNAc and FucGlcNAc_{ol}. Predominantly two isomers with fucosylated core GlcNAc appeared to be present in this case. In accordance with known biosynthetic routes, signals at m/z 533.3, 537.7, 649.4, 667.5, 843.6 and 889.5 could solely originate from isomer I comprising three hexoses at C6 of the branching core mannose and an incomplete LacNAc-antenna at C3, whereas signals at m/z 577.8, 595.8, 635.4, 653.4 and 690.4 were indicative for isomer II. Theoretically, both isomers could give rise to signals at m/z 486.2 and 787.4. To define the sequence of the B-ion at m/z 486.2 in terms of Hex and GlcNAc, this ion was subjected to further fragmentation and the MS³ spectrum obtained displayed the same signals as shown in Figure 4B for the triantennary compound, thus, demonstrating the exclusive presence of a $\text{Hex}_4\text{GlcNAc}$ B-ion (data not shown). Since fragmentation at a GlcNAc residue is generally a favored event, fragmentation of the Man–3Man linkage in isomer A could be excluded. The MS³ spectrum of the Hex_3 C-ion of isomer I at

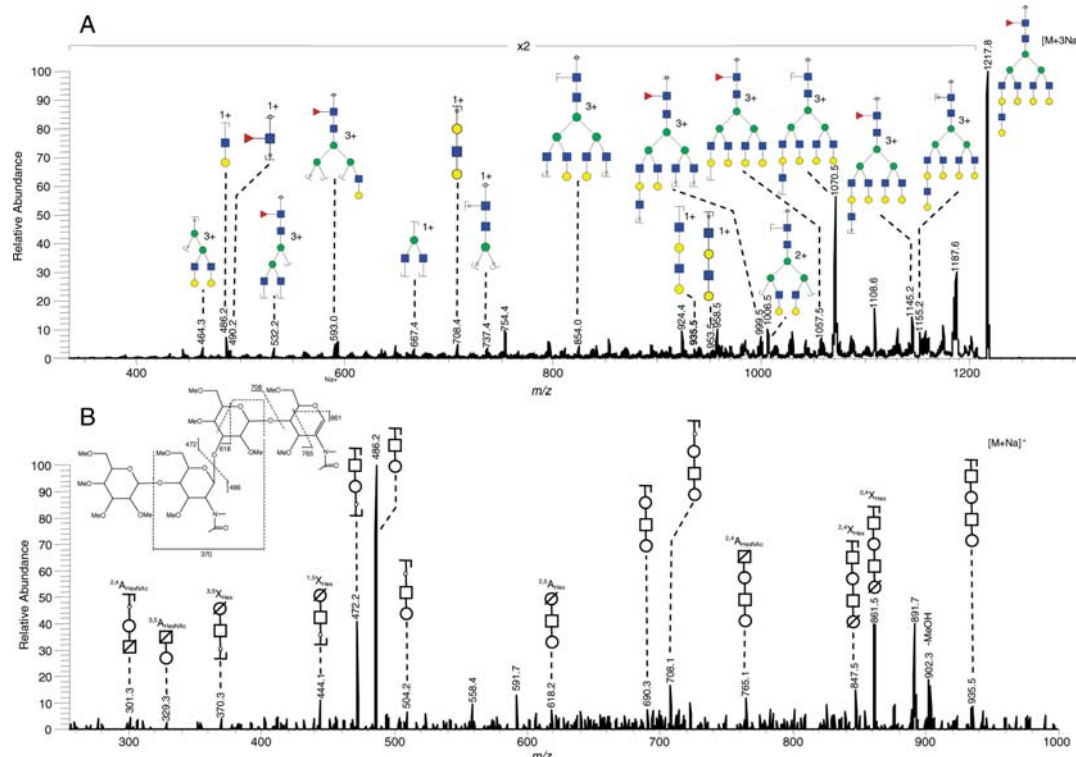


Figure 6. ESI-IT-MSⁿ fragmentation spectra of the permethylated, reduced glycan species Hex₆GlcNAc₇Fuc. (A) MS² spectrum of the triply charged pseudomolecular ion [M + 3Na]³⁺ at *m/z* 1217.9. (B) MS³ spectrum of the Hex₂GlcNAc₂ B₂-ion at *m/z* 935.5. The inset illustrates relevant fragment ions. All fragments observed are sodium adducts. Fragments are assigned according to Domon and Costello³² and the recommendations of the Consortium of Functional Glycomics using GlycoWorkbench.³⁰ Registered fragments may be formed by different fragmentation pathways, only one of which is illustrated in the figure. Assignment of the present LacNAc-repeat to a distinct *N*-acetylglucosamine antenna was not achieved. Yellow circle, galactose; green circle, mannose; blue square, *N*-acetylglucosamine; red triangle, fucose.

m/z 667.3 supported the predominant presence of a linear structure (Figure 7B), as the base peak at *m/z* 463.3 as well as signals at *m/z* 227.0, 272.9, 445.2, 533.3 and 563.3 could solely result from a linear Hex₃ arrangement. For comparison, the corresponding branched Hex₃-fragment of the high-mannose compound Hex₆GlcNAc₂ at *m/z* 1800.0 (Table 2) was similarly fragmented. The obtained spectrum displayed a completely different pattern of fragments with most intense signals at *m/z* 301.1, 375.2, 431.2 and 449.2 as base peak (Figure 7C). Clearly, distinct fragmentation pattern can be discerned for each structure. Assignment of the linkage positions within the linear Hex₃ chain, however, was not possible by this approach, since the observed fragments at *m/z* 533 and 563 may indicate both Man6Man and Man3Man disaccharide units. Linkage analyses, however, revealed the presence of trace amounts of 3-substituted, but not 6-substituted mannosyl residues (Table 1). Whereas high-mannose type glycans comprise always 3,6-disubstituted mannosyl residues at C6 of the central β -linked Man, the detection of 2-substituted and 3-substituted Man compounds suggests the presence of a linear Man2Man3Man sequence in the case of isomer I.

Analogous structural analyses of diantennary (Hex₅GlcNAc₄) and monofucosylated diantennary (Hex₅GlcNAc₄Fuc) glycans as well as difucosylated tetraantennary species led to similar

data as the corresponding triantennary compounds. Likewise, glycans with monosaccharide composition Hex₅GlcNAc₅ were again shown to comprise a bisecting GlcNAc residue.

Characterization of Sialylated Glycans. Profile spectra of sialylated reduced and permethylated glycans were recorded by MALDI- and ESI-MS (data not shown). Many of the major compounds identified above during analysis of the desialylated compounds were also detected in sialylated state comprising up to 4 sialic acids (Table 2). As an example, tetrasialylated tetraantennary species Hex₇GlcNAc₆FucNeuAc₄ were intensively analyzed by ESI-MSⁿ (Figure 8A). The characteristic B₃-ion NeuAcHexGlcNAc at *m/z* 847.5 was selected for MS³ fragmentation (Figure 8B) followed by individual MS⁴ fragmentation of the C-ion NeuAcHex at *m/z* 620.2 (Figure 8C) and the YB-ion HexGlcNAc at *m/z* 472.2 (Figure 8D). On the basis of the fragment ions shown in Figure 8B, it was not possible to differentiate between NeuAc linked to position C3 or C6 of the subterminal hexose. However, diagnostically relevant fragments were produced from cleavages of the hexose ring including *m/z* 398.3 (^{1,3}X_{Hex}, ^{0,4}X_{Hex} or ^{2,4}X_{Hex} of *m/z* 472.2) and *m/z* 354.2 (^{1,4}X_{Hex} or ^{0,3}X_{Hex} of *m/z* 472.2) (Figure 8D). The latter signal was also generated from *m/z* 620.2 and could be interpreted as a ^{1,4}A_{Hex} ^{0,4}X_{NeuAc} fragment (Figure 8C). In either case, these fragments could only originate from glycans con-

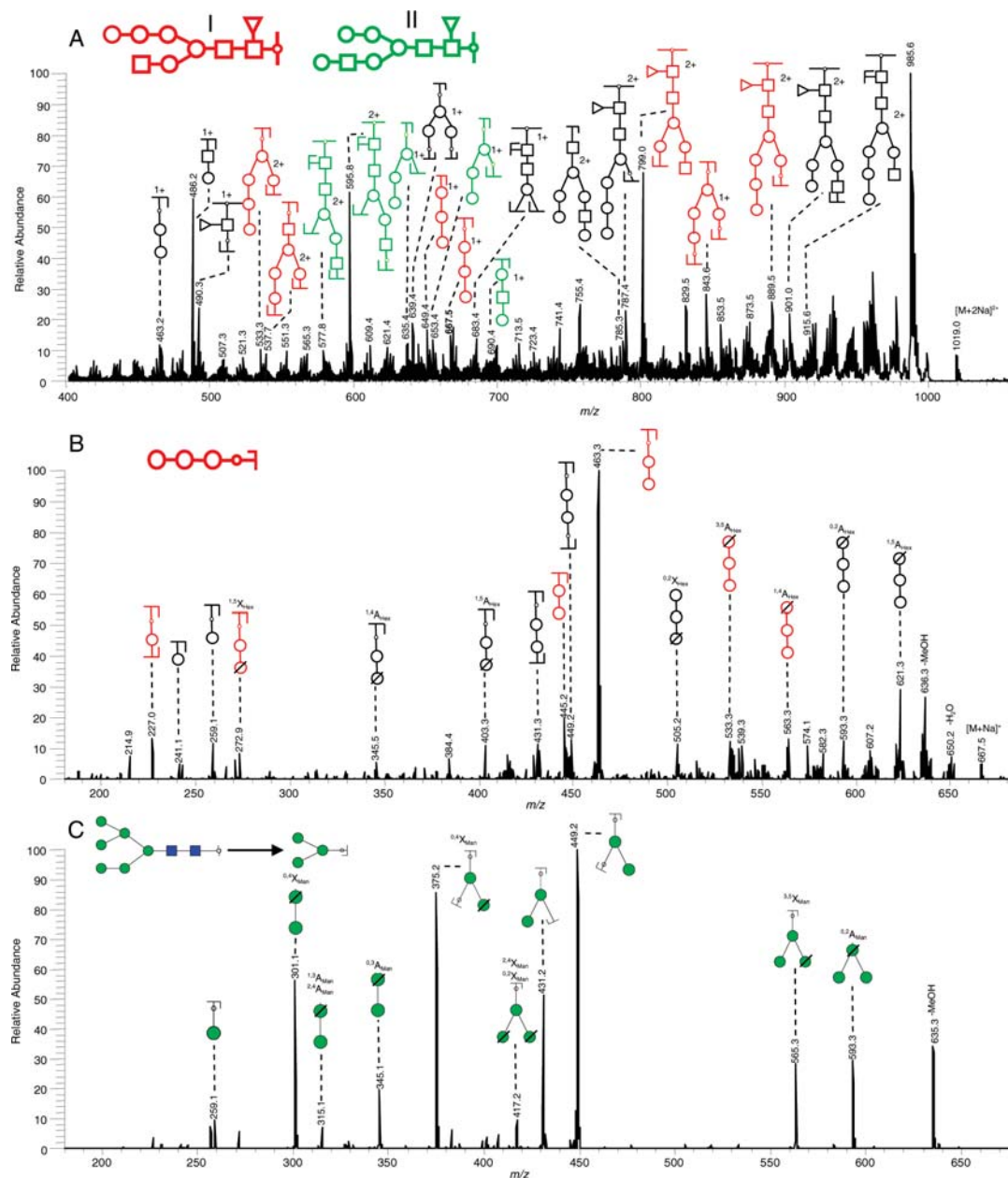


Figure 7. ESI-IT-MSⁿ fragmentation spectra of the permethylated, reduced glycan species Hex₅GlcNAc₃Fuc. (A) MS² spectrum of the doubly charged pseudomolecular ion [M + 2Na]²⁺ at m/z 1019.0. Possible isomeric structures are given in the inset in different colors and key product ions derived thereof are denoted in the respective color. Nonspecific product ions are labeled in black. (B) MS³ spectrum of the Hex₃ C₃-ion at m/z 667.5. (C) MS² spectrum of the respective Hex₃ C₂-ion at m/z 667.5 originating from the high-mannose compound Man₆GlcNAc₂. All fragments observed are sodium adducts. Fragments are assigned according to Domon and Costello³² and the recommendations of the Consortium of Functional Glycomics using GlycoWorkbench.³⁰ Fragments may be achieved by different fragmentation pathways, only one of which is illustrated in the figure. In (B) fragment ions specific for the linear Hex₃ arrangement are given in red, whereas fragment ions which can be in principle also produced from a branched structure as in (C) are given in black. Open circle, hexose; open square, N-acetylhexosamine; green circle, mannose; blue square, N-acetylglucosamine.

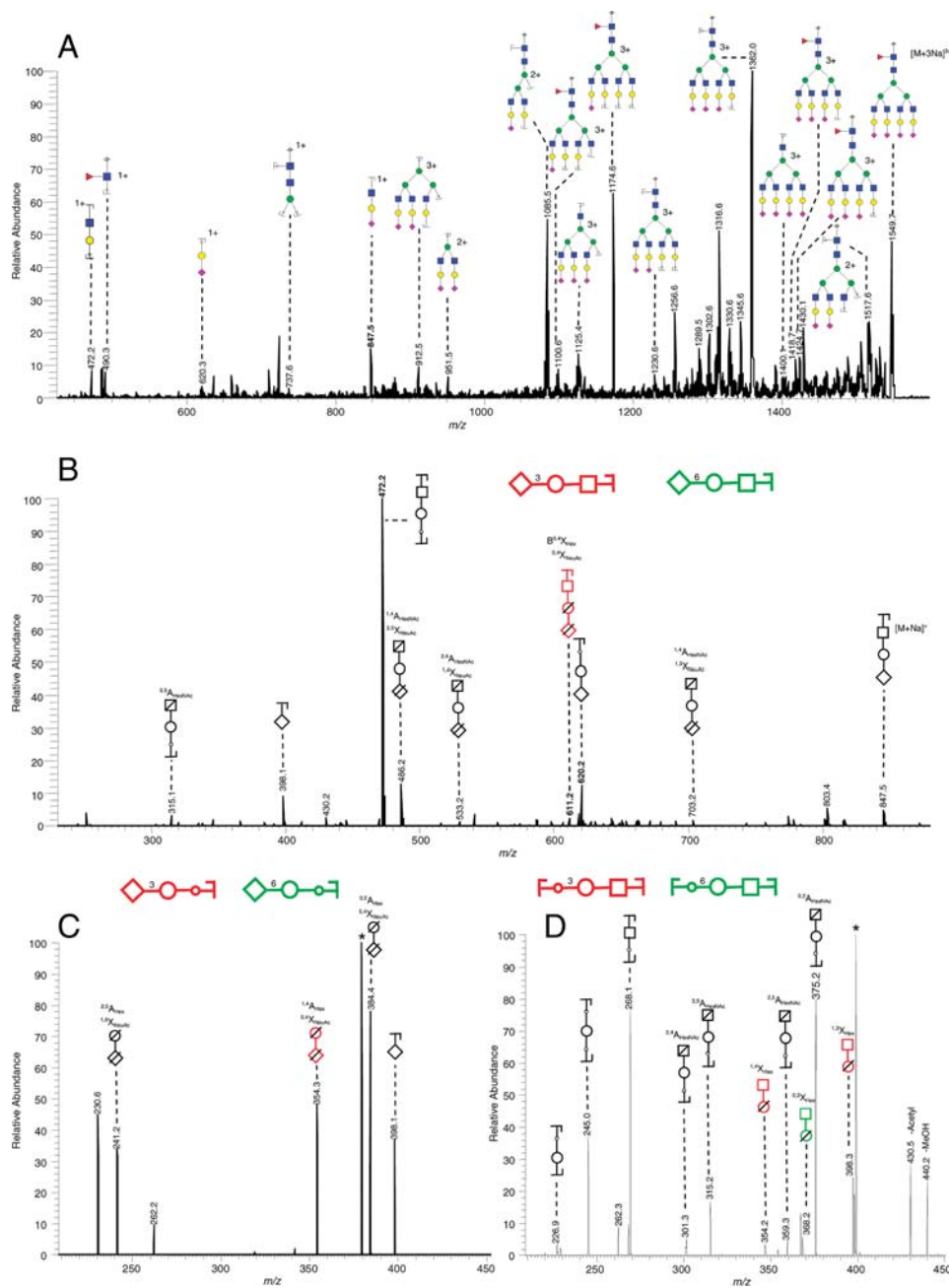


Figure 8. ESI-IT-MSⁿ fragmentation spectra of the permethylated, reduced glycan species Hex₇GlcNAc₆FucNeuAc₄. (A) MS² spectrum of the triply charged pseudomolecular ion [M + 3Na]³⁺ at *m/z* 1549.7. (B) MS³ spectrum of the NeuAcHexGlcNAc B₂-ion at *m/z* 847.5. (C) MS⁴ spectrum of the respective NeuAcHex C₂-ion at *m/z* 620.2. (D) MS⁴ spectrum of the respective HexGlcNAc YB-fragment ion at *m/z* 472.2. All fragments observed are sodium adducts. Fragments are assigned according to Domon and Costello³² and the recommendations of the Consortium of Functional Glycomics using GlycoWorkbench.³⁰ Fragments may be achieved by different fragmentation pathways, only one of which is illustrated in the figure. In A–D, possible isomeric structures comprising 3-linked or 6-linked NeuAc are given in different colors and key product ions derived thereof are denoted in the respective color. Nonspecific product ions are labeled in black. Symbols in (A): Yellow circle, galactose; blue square, *N*-acetylglucosamine; red triangle, fucose; purple diamond, sialic acid. Symbols in (B–D): Open circle, hexose; open square, *N*-acetylhexosamine; open diamond, sialic acid. Signals marked by asterisk (*) are not assigned.

research articles

Bleckmann et al.

taining sialic acid linked to the C3 position of hexose which is in line with linkage analysis data. On the other hand, the signal at m/z 368.2 in Figure 8D could not be associated with 3-linked NeuAc, but indicated the additional presence of NeuAc linked to C6 which is in agreement with linkage data demonstrating that a limited number of sialic acid residues was linked to C6 of subterminal Gal residues (Table 1).

Discussion

In this study, the major N-glycans associated with CD24 from mouse brain have been analyzed employing different mass spectrometric methodologies. Oligosaccharides were enzymatically released from immunopurified CD24, and the complete glycan pool was characterized in a glycomics type of approach without prior chromatographic separation of the respective oligosaccharides. Starting from brains of 1–10 day old mice, a highly diverse glycan repertoire had to be expected due to the progressive development during that time period. Furthermore, obtained CD24 has been expressed by different cell populations within the brain. Consequently, MALDI-TOF-MS profile spectra of native, reducing end-tagged or reduced, permethylated glycans consistently revealed the presence of a great variety of major N-glycans. With respect to minor components, however, variations in signal intensities and presence were clearly evident in the different profile spectra. Intriguingly, oligomannosidic species, for instance, were only detectable after reduction and permethylation, but not in their native or reducing end-tagged state. Hence, minor components may remain undetected when only one type of MS profile is employed. Because of the vast heterogeneity of the observed glycosylation pattern, assignment of glycan components to the three potential N-glycosylation sites predicted for murine CD24 was clearly beyond the scope of this study.

Combining sensitive glycomic approaches like MALDI-TOF-MS/MS of reducing end-tagged species and, in particular, ion trap methodology in conjunction with reduced, permethylated glycans, a large number of structural details and isomeric epitopes could be elucidated which were additionally supported by linkage analysis of the entire glycan mixture before and after desialylation. Our strategy of analyzing, in particular, permethylated glycans is in line with recent reports from several groups^{38–43} which demonstrated an efficient ionization and a superior sequence-specific fragmentation pattern of permethylated oligosaccharides, thus, allowing the determination of possible isomers. In this context, it is also interesting to note that recent improvements of the methylation reaction make this procedure also applicable to picomolar amounts and high-throughput glycomic studies.^{44,45} In accordance with earlier studies,⁴⁶ our results emphasize that the presence of isomers has to be considered in glycomic studies and that determination of isomer ratios might become essential for a comprehensive characterization of glycan pools.

Our analyses demonstrated that CD24 carried preponderantly diantennary, triantennary and tetraantennary complex-type N-glycans in addition to small amounts of high-mannose and hybrid-type species. Complex-type glycans comprised exclusively type-2 *N*-acetylglucosamine antennae and were, in part, multiply fucosylated carrying up to four fucosyl units in the case of tetraantennary species which were mainly found in a Le^x context. Intriguingly, the presence of N-linked glycans with Le^x motifs has not been described for CD24 so far. In addition, small amounts of blood group H antigen terminated glycan antennae have been detected which is again a novel

finding. The structural heterogeneity of complex-type CD24 N-glycans is further increased by species carrying *N*-acetylglucosamine repeats, bisecting GlcNAc residues or outer Hex-Hex-unit which are assumed to represent the Gal α 3Gal β 4-motif commonly occurring in murine glycoproteins. Moreover, mass spectrometric and linkage data of sialylated glycans revealed that sialic acid residues were predominantly linked to position 3 of subterminal Gal units, although (α 2–6)-linked sialic acid could be also detected in minor quantities.

So far, only limited structural information has been available in the case of murine brain-derived CD24 which was primarily based on monoclonal antibody recognition and lectin affinity blotting^{18,31} or MALDI-MS profiling of the glycans.⁴⁷ The results obtained in our study are in overall agreement with these data and confirm, for example, the presence of high-mannose type chains, incompletely processed hybrid-type species and, in part, highly fucosylated complex type glycans⁴⁷ as well as the presence of mainly (α 2–3)-linked sialic acid.¹⁸ In contrast to the published structural characteristics of CD24 glycans, however, our study provided an extended and much deeper, more detailed insight demonstrating, in addition, the presence of bisecting GlcNAc, *N*-acetylglucosamine repeats, and, in particular, Le^x motifs and blood group H determinants. The presence of Le^y structural motifs could be unambiguously excluded, since careful inspection of the relevant MSⁿ spectra revealed neither evidence for a fragment at m/z 834 which would be indicative for a sodiated ion with a composition of Hex₁HexNAc₁Fuc₂ nor for a fragment that would be obtained by loss of a Le^y antenna.⁴⁸

It is interesting to note that a number of these carbohydrate epitopes have been shown to exhibit functional activities in different biological context. High-mannose type glycans of cell adhesion molecules expressed at the cell surface, for example, are involved in neural cell interactions and regulate synaptic plasticity (for review, see ref 16). Likewise, the Le^x epitope which has been found on both O-linked and N-linked glycans in the nervous system^{49,50} is implicated in cell adhesion and migration.⁵¹ The expression of N-glycans with bisecting GlcNAc residues, on the other hand, has been associated with the suppression of natural killer (NK) cell-mediated responses.^{52,53} Furthermore, the CA125 mucin expressing large amounts of diantennary, bisected N-glycans was recently shown to inhibit NK cell cytotoxicity and to induce specific phenotypic shifts in this cell population that are associated with the induction of tolerance.^{54,55} Finally, the blood group H antigen has been shown to be functionally important in neurite outgrowth⁵⁶ and synaptic plasticity.^{57,58} So far, only a few proteins carrying glycans with Fuc(α 1–2)Gal moieties have been identified in rodent brain, mostly with the aid of antibodies against 2-fucosyltransferase.^{59,60} The question, as to whether the carbohydrate epitopes found on CD24 N-glycans might exhibit similar or related biological activities, awaits further studies.

Abbreviations: CNS, central nervous system; dHex, deoxyhexose; EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis; ESI-IT, electrospray ionization ion trap; Fuc, fucose; Gal, galactose; GC, gas–liquid chromatography; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine; Hex, hexose, HexNAc, *N*-acetylhexosamine; HNK-1, human natural killer cell glycan epitope 1; Ig, immunoglobulin, Le^x, Lewis^x; mAb, monoclonal antibody; MALDI, matrix-assisted laser-desorption ionization; Man, mannose; MS, mass spectrometry; MS/MS, tandem mass spectrometry; NeuAc, *N*-acetylneuraminic acid; NK, natural killer; PA, 2-aminopyri-

Glycomic Analysis of N-Linked Carbohydrate Epitopes

dine; PNGase F, peptide N-glycosidase F; TOF, time-of-flight; TFA, trifluoroacetic acid.

Acknowledgment. We gratefully acknowledge the expert technical assistance of Peter Kaese and Werner Mink and thank Dr. Kai Maass, Dr. Justin Prien, Dr. David Ashline and Hui Zhou for fruitful discussion. This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Ge 386/4-2 and SFB 535/Z1).

References

- (1) Calaora, V.; Chazal, G.; Nielsen, P. J.; Rougon, G.; Moreau, H. mCD24 expression in the developing mouse brain and in zones of secondary neurogenesis in the adult. *Neuroscience* **1996**, *73* (2), 581–94.
- (2) Ennas, M. G.; Cocchia, D.; Silvetti, E.; Sogos, V.; Riva, A.; Torelli, S.; Gremo, F. Immunocompetent cell markers in human fetal astrocytes and neurons in culture. *J. Neurosci. Res.* **1992**, *32* (3), 424–36.
- (3) Kadmon, G.; von Bohlen und Halbach, F.; Horstkorte, R.; Eckert, M.; Altevogt, P.; Schachner, M. Evidence for cis interaction and cooperative signalling by the heat-stable antigen nectadrin (murine CD24) and the cell adhesion molecule L1 in neurons. *Eur. J. Neurosci.* **1995**, *7* (5), 993–1004.
- (4) Bai, X. F.; Li, O.; Zhou, Q.; Zhang, H.; Joshi, P. S.; Zheng, X.; Liu, Y.; Wang, Y.; Zheng, P. CD24 controls expansion and persistence of autoreactive T cells in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* **2004**, *200* (4), 447–58.
- (5) Belvindrah, R.; Rougon, G.; Chazal, G. Increased neurogenesis in adult mCD24-deficient mice. *J. Neurosci.* **2002**, *22* (9), 3594–607.
- (6) Jackson, D.; Waibel, R.; Weber, E.; Bell, J.; Stahel, R. A. CD24, a signal-transducing molecule expressed on human B cells, is a major surface antigen on small cell lung carcinomas. *Cancer Res.* **1992**, *52* (19), 5264–70.
- (7) Liu, Y.; Jones, B.; Brady, W.; Janeway, C. A., Jr.; Linsley, P. S. Costimulation of murine CD4 T cell growth: cooperation between B7 and heat-stable antigen. *Eur. J. Immunol.* **1992**, *22* (11), 2855–9.
- (8) Nielsen, P. J.; Lorenz, B.; Muller, A. M.; Wenger, R. H.; Brombacher, F.; Simon, M.; von der Weid, T.; Langhorne, W. J.; Mossmann, H.; Kohler, G. Altered erythrocytes and a leaky block in B-cell development in CD24/HSA-deficient mice. *Blood* **1997**, *89* (3), 1058–67.
- (9) De Bruijn, M. L.; Peterson, P. A.; Jackson, M. R. Induction of heat-stable antigen expression by phagocytosis is involved in in vitro activation of unprimed CTL by macrophages. *J. Immunol.* **1996**, *156* (8), 2686–92.
- (10) Li, O.; Chang, X.; Zhang, H.; Kocak, E.; Ding, C.; Zheng, P.; Liu, Y. Massive and destructive T cell response to homeostatic cue in CD24-deficient lymphopenic hosts. *J. Exp. Med.* **2006**, *203* (7), 1713–20.
- (11) Liu, Y.; Zheng, P. CD24: a genetic checkpoint in T cell homeostasis and autoimmune diseases. *Trends Immunol.* **2007**, *28* (7), 315–20.
- (12) Baxter, A. G. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7* (11), 904–12.
- (13) Liu, J. Q.; Carl, J. W., Jr.; Joshi, P. S.; RayChaudhury, A.; Pu, X. A.; Shi, F. D.; Bai, X. F. CD24 on the resident cells of the central nervous system enhances experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* **2007**, *178* (10), 6227–35.
- (14) Kay, R.; Rosten, P. M.; Humphries, R. K. CD24, a signal transducer modulating B cell activation responses, is a very short peptide with a glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor. *J. Immunol.* **1991**, *147* (4), 1412–6.
- (15) Kay, R.; Takei, F.; Humphries, R. K. Expression cloning of a cDNA encoding M1/69-J11d heat-stable antigens. *J. Immunol.* **1990**, *145* (6), 1952–9.
- (16) Kleene, R.; Schachner, M. Glycans and neural cell interactions. *Nat. Rev. Neurosci.* **2004**, *5* (3), 195–208.
- (17) Marquardt, T.; Denecke, J. Congenital disorders of glycosylation: review of their molecular bases, clinical presentations and specific therapies. *Eur. J. Pediatr.* **2003**, *162* (6), 359–79.
- (18) Kleene, R.; Yang, H.; Kutsche, M.; Schachner, M. The neural recognition molecule L1 is a sialic acid-binding lectin for CD24, which induces promotion and inhibition of neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (24), 21656–63.

research articles

- (19) Galuska, S. P.; Geyer, R.; Gerardy-Schahn, R.; Muhlenhoff, M.; Geyer, H. Enzyme-dependent variations in the polysialylation of the neural cell adhesion molecule (NCAM) *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (1), 17–28.
- (20) Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227* (5259), 680–5.
- (21) Lehr, T.; Geyer, H.; Maass, K.; Doenhoff, M. J.; Geyer, R. Structural characterization of N-glycans from the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* cross-reacting with *Schistosoma mansoni* glycoconjugates. *Glycobiology* **2007**, *17* (1), 82–103.
- (22) Geyer, R.; Geyer, H.; Kühnhardt, S.; Mink, W.; Stirm, S. Capillary gas chromatography of methylhexitol acetates obtained upon methylation of N-glycosidically linked glycoprotein oligosaccharides. *Anal. Biochem.* **1982**, *121*, 263–274.
- (23) Geyer, R.; Geyer, H. Saccharide linkage analysis using methylation and other techniques. *Methods Enzymol.* **1994**, *230*, 86–108.
- (24) Geyer, R.; Geyer, H.; Kühnhardt, S.; Mink, W.; Stirm, S. 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.* **1983**, *133*, 197–207.
- (25) Kuraya, N.; Hase, S. Release of O-linked sugar chains from glycoproteins with anhydrous hydrazine and pyridylamination of the sugar chains with improved reaction conditions. *J. Biochem. (Tokyo, Jpn.)* **1992**, *112* (1), 122–6.
- (26) Ciucanu, I.; Costello, C. E. Elimination of oxidative degradation during the per-O-methylation of carbohydrates. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (52), 16213–9.
- (27) Jang-Lee, J.; North, S. J.; Sutton-Smith, M.; Goldberg, D.; Panico, M.; Morris, H.; Haslam, S.; Dell, A. Glycomic profiling of cells and tissues by mass spectrometry: fingerprinting and sequencing methodologies. *Methods Enzymol.* **2006**, *415*, 59–86.
- (28) Geyer, H.; Wührer, M.; Resemann, A.; Geyer, R. Identification and characterization of keyhole limpet hemocyanin N-glycans mediating cross-reactivity with *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (49), 40731–48.
- (29) Maass, K.; Ranzinger, R.; Geyer, H.; von der Lieth, C. W.; Geyer, R. “Glyco-peakfinder”—de novo composition analysis of glycoconjugates. *Proteomics* **2007**, *7* (24), 4435–44.
- (30) Ceroni, A.; Maass, K.; Geyer, H.; Geyer, R.; Dell, A.; Haslam, S. M. GlycoWorkbench: A tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans. *J. Proteome Res.* **2008**, *7* (4), 1650–9.
- (31) Sammar, M.; Aigner, S.; Altevogt, P. Heat-stable antigen (mouse CD24) in the brain: dual but distinct interaction with P-selectin and L1. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1337* (2), 287–94.
- (32) Domon, B.; Costello, C. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentation in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate J.* **1988**, *5*, 253–257.
- (33) Schachter, H. The joys of HexNAc. The synthesis and function of N- and O-glycan branches. *Glycoconjugate J.* **2000**, *17* (7–9), 465–83.
- (34) Ma, B.; Simala-Grant, J. L.; Taylor, D. E. Fucosylation in prokaryotes and eukaryotes. *Glycobiology* **2006**, *16* (12), 158R–84R.
- (35) Geyer, H.; Jacobi, I.; Linder, D.; Stirm, S.; Bialojan, S.; Strube, K. H.; Geyer, R. Glycosylation of recombinant ancrad from *Agkistrodon rhodostoma* after expression in mouse epithelial cells. *Eur. J. Biochem.* **1996**, *237* (1), 113–27.
- (36) Geyer, H.; Kempf, R.; Schott, H. H.; Geyer, R. Glycosylation of the envelope glycoprotein from a polytropic murine retrovirus in two different host cells. *Eur. J. Biochem.* **1990**, *193* (3), 855–62.
- (37) Pfeiffer, G.; Schmidt, M.; Strube, K.-H.; Geyer, R. Carbohydrate structure of recombinant human uterine tissue plasminogen activator expressed in mouse epithelial cells. *Eur. J. Biochem.* **1989**, *186*, 273–286.
- (38) Yu, S. Y.; Wu, S. W.; Khoo, K. H. Distinctive characteristics of MALDI-Q/TOF and TOF/TOF tandem mass spectrometry for sequencing of permethylated complex type N-glycans. *Glycoconjugate J.* **2006**, *23* (5–6), 355–69.
- (39) Ashline, D. J.; Lapadula, A. J.; Liu, Y. H.; Lin, M.; Grace, M.; Pramanik, B.; Reinhold, V. N. Carbohydrate structural isomers analyzed by sequential mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (10), 3830–42.
- (40) Costello, C. E.; Contado-Miller, J. M.; Cipollo, J. F. A glycomics platform for the analysis of permethylated oligosaccharide alditols. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18* (10), 1799–812.
- (41) Zhao, C.; Xie, B.; Chan, S. Y.; Costello, C. E.; O’Connor, P. B. Collisionally activated dissociation and electron capture dissociation provide complementary structural information for branched permethylated oligosaccharides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, *19* (1), 138–50.

research articles

Bleckmann et al.

- (42) Mechref, Y.; Kang, P.; Novotny, M. V. Differentiating structural isomers of sialylated glycans by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20* (8), 1381–9.
- (43) Wada, Y.; Azadi, P.; Costello, C. E.; Dell, A.; Dwek, R. A.; Geyer, H.; Geyer, R.; Kakehi, K.; Karlsson, N. G.; Kato, K.; Kawasaki, N.; Khoo, K. H.; Kim, S.; Kondo, A.; Lattova, E.; Mechref, Y.; Miyoshi, E.; Nakamura, K.; Narimatsu, H.; Novotny, M. V.; Packer, N. H.; Perreault, H.; Peter-Katalinic, J.; Pohlentz, G.; Reinhold, V. N.; Rudd, P. M.; Suzuki, A.; Taniguchi, N. Comparison of the methods for profiling glycoprotein glycans-HUPO human disease glycomics/proteome initiative multi-institutional study. *Glycobiology* **2007**, *17* (4), 411–22.
- (44) Kang, P.; Mechref, Y.; Klouckova, I.; Novotny, M. V. Solid-phase permethylation of glycans for mass spectrometric analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19* (23), 3421–8.
- (45) Kang, P.; Mechref, Y.; Novotny, M. V. High-throughput solid-phase permethylation of glycans prior to mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, *22* (5), 721–34.
- (46) Prien, J. M.; Huysentruyt, L. C.; Ashline, D. J.; Lapadula, A. J.; Seyfried, T. N.; Reinhold, V. N. Differentiating N-linked glycan structural isomers in metastatic and nonmetastatic tumor cells using sequential mass spectrometry. *Glycobiology* **2008**, *18* (5), 353–66.
- (47) Ohl, C.; Albach, C.; Altevogt, P.; Schmitz, B. N-glycosylation patterns of HSA/CD24 from different cell lines and brain homogenates: a comparison. *Biochimie* **2003**, *85* (6), 565–73.
- (48) Pang, P. C.; Tissot, B.; Drobnis, E. Z.; Sutovsky, P.; Morris, H. R.; Clark, G. F.; Dell, A. Expression of bisecting type and Lewis^x/Lewis^y terminated N-glycans on human sperm. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (50), 36593–602.
- (49) Chai, W.; Yuen, C. T.; Kogelberg, H.; Carruthers, R. A.; Margolis, R. U.; Feizi, T.; Lawson, A. M. High prevalence of 2-mono- and 2,6-di-substituted manol-terminating sequences among O-glycans released from brain glycopeptides by reductive alkaline hydrolysis. *Eur. J. Biochem.* **1999**, *263* (3), 879–88.
- (50) Chen, Y. J.; Wing, D. R.; Guile, G. R.; Dwek, R. A.; Harvey, D. J.; Zamze, S. Neutral N-glycans in adult rat brain tissue-complete characterisation reveals fucosylated hybrid and complex structures. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *251* (3), 691–703.
- (51) Sajdel-Sulkowska, E. M. Immunofluorescent detection of CD15-fucosylated glycoconjugates in primary cerebellar cultures and their function in glial-neuronal adhesion in the central nervous system. *Acta Biochim. Pol.* **1998**, *45* (3), 781–90.
- (52) el Ouagari, K.; Teissie, J.; Benoist, H. Glycophorin A protects K562 cells from natural killer cell attack. Role of oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (45), 26970–5.
- (53) Yoshimura, M.; Ihara, Y.; Ohnishi, A.; Ijuhin, N.; Nishiura, T.; Kanakura, Y.; Matsuzawa, Y.; Taniguchi, N. Bisecting N-acetylglucosamine on K562 cells suppresses natural killer cytotoxicity and promotes spleen colonization. *Cancer Res.* **1996**, *56* (2), 412–8.
- (54) Kui Wong, N.; Easton, R. L.; Panico, M.; Sutton-Smith, M.; Morrison, J. C.; Lattanzio, F. A.; Morris, H. R.; Clark, G. F.; Dell, A.; Patankar, M. S. Characterization of the oligosaccharides associated with the human ovarian tumor marker CA125. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (31), 28619–34.
- (55) Patankar, M. S.; Jing, Y.; Morrison, J. C.; Belisle, J. A.; Lattanzio, F. A.; Deng, Y.; Wong, N. K.; Morris, H. R.; Dell, A.; Clark, G. F. Potent suppression of natural killer cell response mediated by the ovarian tumor marker CA125. *Gynecol. Oncol.* **2005**, *99* (3), 704–13.
- (56) Kalovidouris, S. A.; Gama, C. I.; Lee, L. W.; Hsieh-Wilson, L. C. A role for fucose alpha(1–2) galactose carbohydrates in neuronal growth. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (5), 1340–1.
- (57) Krug, M.; Wagner, M.; Staak, S.; Smalla, K. H. Fucose and fucose-containing sugar epitopes enhance hippocampal long-term potentiation in the freely moving rat. *Brain Res.* **1994**, *643* (1–2), 130–5.
- (58) Matthies, H.; Staak, S.; Krug, M. Fucose and fucosyllactose enhance *in vitro* hippocampal long-term potentiation. *Brain Res.* **1996**, *725* (2), 276–80.
- (59) Murrey, H. E.; Gama, C. I.; Kalovidouris, S. A.; Luo, W. I.; Driggers, E. M.; Porton, B.; Hsieh-Wilson, L. C. Protein fucosylation regulates synapsin Ia/Ib expression and neuronal morphology in primary hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103* (1), 21–6.
- (60) Smalla, K. H.; Angenstein, F.; Richter, K.; Gundelfinger, E. D.; Staak, S. Identification of fucose alpha(1–2) galactose epitope-containing glycoproteins from rat hippocampus. *NeuroReport* **1998**, *9* (5), 813–7.

PR800729R

B)

Biol. Chem., Vol. 390, pp. 627–645, July 2009 • Copyright © by Walter de Gruyter • Berlin • New York. DOI 10.1515/BC.2009.044

O-glycosylation pattern of CD24 from mouse brain

**Christina Bleckmann¹, Hildegard Geyer¹,
Annika Lieberoth², Frauke Splittstoesser²,
Yan Liu³, Ten Feizi³, Melitta Schachner², Ralf
Kleene², Vernon Reinhold⁴ and Rudolf Geyer^{1,*}**

¹Institute of Biochemistry, Faculty of Medicine,
University of Giessen, Friedrichstrasse 24, D-35392
Giessen, Germany

²Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg,
University of Hamburg, Martinistrasse 52, D-20246
Hamburg, Germany

³Imperial College, The Glycosciences Laboratory,
Northwick Park Institute for Medical Research, Watford
Road, Harrow, Middlesex, HA1 3UJ, UK

⁴Division of Molecular, Cellular and Biomedical
Sciences, University of New Hampshire, Gregg Hall,
32 Colovos Road, Durham, NH 03824, USA

*Corresponding author

e-mail: rudolf.geyer@biochemie.med.uni-giessen.de

Abstract

The cell adhesion molecule CD24 is a highly glycosylated glycoprotein that plays important roles in the central nervous system, the immune system and in tumor biology. Since CD24 comprises only a short protein core of approximately 30 amino acids and low conservation among species, it has been proposed that the functions of CD24 are mediated by its glycosylation pattern. Our present study provides evidence that interaction of CD24 with the cell adhesion molecule L1 is mediated by O-linked glycans carrying α 2,3-linked sialic acid. Furthermore, de-N-glycosylated CD24 was shown to promote or inhibit neurite outgrowth of cerebellar neurons or dorsal root ganglion neurons, respectively, to the same extent as untreated CD24. Therefore, this study is focused on the structural elucidation of the chemically released, permethylated CD24 O-glycans by electrospray ionization ion trap mass spectrometry. Our analyses revealed the occurrence of a diverse mixture of mucin-type and O-mannosyl glycans carrying, in part, functionally relevant epitopes, such as 3-linked sialic acid, disialyl motifs, Le^x, sialyl-Le^x or HNK-1 units. Hence, our data provide the basis for further studies on the contribution of carbohydrate determinants to CD24-mediated biological activities.

Keywords: CD24; ESI-MS; HNK-1; mass spectrometry; mucin type O-glycans; O-mannosyl glycans.

Introduction

The cell adhesion molecule CD24, also called nectadrin or heat stable antigen, is anchored by glycosylphosphatidylinositol to lipid rafts within the cell membrane. CD24

is abundantly expressed on a variety of cell types, including hematopoietic and neural cells. In the immune system, CD24 plays important functional roles and has recently been the focus of considerable attention due to its implications in autoimmune diseases: CD24 is of key importance in the pathogenesis of multiple sclerosis (Liu and Zheng, 2007) and in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (Baxter, 2007), which is an animal model for multiple sclerosis. CD24 polymorphisms are associated with the risk and progression of autoimmune diseases, in particular multiple sclerosis (Zhou et al., 2003; Goris et al., 2006; Otaegui et al., 2006; Wang et al., 2007). In addition, CD24 is expressed by various types of tumors. During carcinogenesis it is involved in cell adhesion as well as metastatic tumor spread and is considered as a diagnostic marker. In nearly all tumor patients high expression of CD24 is associated with shorter patient survival times (Kristiansen et al., 2004).

In the developing central nervous system, where the expression of CD24 is at its maximum between embryonic day 17 and postnatal day 5, CD24 is expressed at the surface of neurons (Ennas et al., 1992; Kadmon et al., 1995; Calaora et al., 1996), astrocytes (Ennas et al., 1992; Bai et al., 2004) and microglia (Bai et al., 2004). CD24 mediates cell adhesion and neurite outgrowth (Kadmon et al., 1992; Shewan et al., 1996; Nielsen et al., 1997; Kleene et al., 2001). In the adult central nervous system, CD24 expression is restricted to ciliated ependymal cells and immature neurons located mainly in regions of secondary neurogenesis, namely the subventricular zone of the lateral ventricles and the dentate gyrus of the hippocampus and a zone extending between the striatum and the corpus callosum to the center of the olfactory bulb (Calaora et al., 1996). In these areas, CD24 inhibits proliferation of immature neurons (Belvindrah et al., 2002).

CD24 is a highly unusual molecule comprising a short peptide core of only 27–32 amino acids – depending on the species – and shows only little conservation among species and is always heavily decorated with N- and O-linked glycans (Sammar et al., 1997; Kleene et al., 2001). Depending on the cell types and their developmental stage, the apparent molecular mass of CD24 ranges between 27 and 70 kDa due to differences in glycosylation (Nedelec et al., 1992; Kadmon et al., 1995). Therefore, it has been proposed that functions of CD24 are mainly or exclusively mediated by its glycans.

Carbohydrates have been shown to be important players in mediating cell-cell interactions and modulating cell-cell communication in the nervous system (for a recent review, see Kleene and Schachner, 2004). In this context, distinct carbohydrate structures, such as polysialic acid, the human natural killer cell glycan epitope HNK-1, oligomannosidic glycans and Lewis X (Le^x) units, have been shown to affect important functions that

depend on cell recognition, such as cell migration, neurite outgrowth and fasciculation, synapse formation and stabilization, and modulation of synaptic efficacy, learning and memory, myelination and regeneration after injury (Kleene and Schachner, 2004).

In a recent report, we could demonstrate that CD24 from murine brain expresses an extremely heterogeneous pattern of mainly complex type N-glycans with distinct carbohydrate epitopes, such as 3-linked sialic acid, Le^x or blood group H antigens, bisecting *N*-acetylglucosamine residues and *N*-acetylglucosamine repeats as well as high-mannose and hybrid type species, although the peptide backbone comprises only three potential N-glycosylation sites (Bleckmann et al., 2009). In addition, the amino acid composition of murine neural CD24 is rich in serine and threonine residues featuring seven potential sites for O-linked glycans, as predicted by the published Net-O-Glyc software tool (Julenius et al., 2005).

The most abundant type of O-glycosylation in proteins is of the mucin-type, which is characterized by an α -glycosidically linked *N*-acetylglucosamine to serine or threonine (GalNAc α 1-O-Ser/Thr). Eight different core types, optionally containing galactose (Gal), *N*-acetylglucosamine (GlcNAc), and *N*-acetylglucosamine (GalNAc) have been described (Brockhausen et al., 1998), which may be further decorated by fucose (Fuc) and/or sialic acid (NeuAc). Therefore, mucin-linked O-glycans exhibit a high degree of structural variation. They typically decorate segments of membrane-associated or secreted polypeptides that are rich in serine, threonine and proline and have important biological functions in specific organ systems during development by influencing cell-cell and/or cell-matrix interactions (Hounsell et al., 1996; Fukuda, 2002; Haltiwanger and Lowe, 2004; Peter-Katalinic, 2005; Tian and Ten Hagen, 2009). Another very unusual type of O-glycosylation in mammals, the O-mannosylation, is present in a limited number of glycoproteins of brain, nerves and skeletal muscle only (Endo, 2004). The majority of these glycans represent variations of the disaccharide GlcNAc β 1-2Man α 1-O-Ser/Thr, which can be further elongated by Gal together with NeuAc or sulfated glucuronic acid. O-Mannosyl glycans can differ in length, fucose-content and potential branching (Chiba et al., 1997; Yuen et al., 1997; Smalheiser et al., 1998; Chai et al., 1999; Endo, 1999). The importance of O-mannosyl glycans is highlighted by congenital muscular dystrophies, which are often associated with brain abnormalities (Moore and Hewitt, 2009). Although 30% of the O-glycosylated brain proteins carry O-mannosyl glycans, only α -dystroglycan and Tenascin-R have so far been described in this context (Finne et al., 1979; Yuen et al., 1997; Chai et al., 1999; Endo, 1999, 2004; Willer et al., 2003; Lehle et al., 2006; Many et al., 2007).

The present study demonstrates a functional role of CD24 O-glycans in that the de-N-glycosylated glycoprotein was similarly able to interact with the cell adhesion molecule L1 via α 2,3-sialylated glycans and to influence neurite outgrowth as the mock-treated and untreated CD24. Therefore, we have initiated a detailed structural analysis of CD24 O-glycans isolated from mouse brain. O-glycans were released from CD24-derived glycopeptides after peptide N-glycosidase F (PNGaseF) treatment by reductive β -elimination. Resultant oligosaccharide

alditols were permethylated and analyzed by a highly sensitive glycomics approach employing matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) and multistage electrospray ionization ion-trap (ESI-IT) mass spectrometry (MS). The results revealed a heterogeneous mixture of mucin-type as well as O-mannosyl glycans exhibiting distinct carbohydrate epitopes, such as 3-linked sialic acid, disialyl structures, Le^x units, sialyl-Le^x, and HNK-1 determinants.

Results

CD24 O-glycans mediate the interaction with L1 and are functionally active in CD24-dependent effects on neurite outgrowth

In a previous study, we have shown that the binding of the cell adhesion molecule L1 to CD24 is sialic acid-dependent (Kleene et al., 2001). Furthermore, a putative binding domain for α 2,3-linked sialic acid was identified within the first FN III domain of L1. The sialic acid dependent interaction of L1 with substrate-coated CD24 from murine brain promoted neurite outgrowth of cultured cerebellar, while it inhibited neurite outgrowth of cultured dorsal root ganglion (DRG) neurons.

To investigate whether N-linked glycans of CD24 mediate the interaction with L1, we checked whether L1 would still bind to CD24 after N-deglycosylation of the glycoprotein. First, CD24 purified from mouse brain was mock-treated or treated with PNGase F to remove N-glycans and subsequently re-immunopurified. The molecular weight shift of CD24 seen in silver staining and Western blot analysis suggested that CD24 was completely de-N-glycosylated (Figure 1A). Next, we determined the binding of a L1 fragment comprising the first and second FN III domains and containing the sialic acid binding site to mock-treated or PNGase F-treated CD24 substrate coats by ELISA. The L1 fragment bound to PNGase F-treated CD24 as well as to mock-treated CD24 in a similar concentration-dependent and saturable manner (Figure 1B), indicating that O-glycans but not N-glycans mediate the binding of L1 to CD24.

To determine the specificity of the sialic acid binding, we performed an ELISA using mock-treated or PNGase F-treated CD24 and the L1 fragment comprising the first and second FN III domains in the presence of either 3'-sialyl-*N*-acetylglucosamine or 6'-sialyl-*N*-acetylglucosamine. Binding of the L1 fragment to mock-treated and PNGase F-treated CD24 substrate was similar in the absence of sialic acid carrying carbohydrates (Figure 1C). In the presence of 6'-sialyl-*N*-acetylglucosamine the binding of the L1 fragment to mock-treated and PNGase F-treated CD24 was not altered in comparison to its binding in the absence of these carbohydrates, whereas in the presence of 3'-sialyl-*N*-acetylglucosamine the binding to both mock-treated and PNGase F-treated CD24 was equally reduced by approximately 35% (Figure 1C). These results indicate that α 2,3-linked sialic acid present on O-glycans of CD24 is recognized by the sialic acid binding site present in L1.

To investigate whether O-linked but not N-linked glycans are functionally effective in CD24 mediated promotion or inhibition of neurite outgrowth, mock-treated

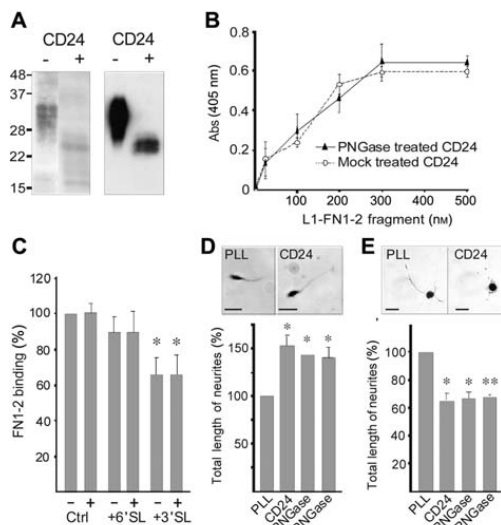


Figure 1 Importance of CD24 O-glycans for the binding to L1 and for the CD24-dependent effects on neurite outgrowth.

(A) CD24 purified from mouse brain was mock-treated (-) or treated with PNGase F (+), immunopurified and subjected to silver staining (left panel) and Western blot analysis using mAb79 against CD24 (right panel). (B) Mock-treated or PNGase F-treated CD24 was coated on microtiter plates and incubated with different amounts of the L1 fragment FN1-2. Binding was evaluated through ELISA using a polyclonal antibody against L1. Error bars indicate standard deviations from at least three independent experiments. (C) Mock-treated (-) or PNGase F-treated CD24 (+) were coated on microtiter plates and incubated with 50 μ g/ml of the L1 fragment FN1-2 pre-incubated in the absence or presence of 3'-sialyl-*N*-acetylglucosamine (3'SL) or 6'-sialyl-*N*-acetylglucosamine (6'SL). Binding was determined using a polyclonal antibody against L1. Error bars indicate SD from at least three independent experiments. (D, E) Cerebellar neurons (D) and DRG neurons (E) were plated as single cell suspensions onto coverslips without (PLL) or with (CD24) mock-treated CD24 (- PNGase) or de-N-glycosylated CD24 (+ PNGase). Cells were maintained for 24 h in culture, fixed and stained with toluidine blue. Typical cerebellar neurons (D; upper panel, bar=20 μ m) and DRG neurons (E; upper panel, bar=25 μ m) with neurites grown on PLL or CD24 are shown. Total lengths of neurites per cell were determined and are shown as percent of control (PLL). Error bars indicate SD from three independent experiments. Bars marked by asterisks ($p < 0.05$) and double asterisks ($p < 0.01$) are significantly different from the respective control.

or PNGase F-treated CD24 were used as substrate-coats in neurite outgrowth assays. As observed with untreated CD24 (Kleene et al., 2001), mock-treated CD24 as well as de-N-glycosylated CD24 promoted neurite outgrowth of cerebellar neurons (Figure 1D) and inhibited neurite outgrowth of DRG neurons relative to the control substrate poly-L-lysine (Figure 1E). These results indicate that O-glycans rather than N-glycans are responsible for the CD24-induced effects on neurite outgrowth.

Global characterization of CD24 O-glycans

The affinity-purified and tryptic digested CD24 preparation described earlier (Bleckmann et al., 2009) was treated with O-sialoglycoprotein endopeptidase and PNGase

F. Neutral monosaccharide constituent analysis of the resulting O-glycopeptides verified the presence of mannose (Man), galactose (Gal), *N*-acetylglucosamine (GlcNAc), *N*-acetylgalactosamine (GalNAc), and fucose (Fuc) in molar ratios approaching 1.1:4.5:4.1:1.0:1.1, respectively. An aliquot of the O-glycopeptides was desialylated and incubated with O-glycosidase. Peptide mass fingerprinting MALDI-TOF-MS revealed a mass shift of most of the higher molecular mass signals and, in part, their complete disappearance indicating the presence of Gal(β 1-3)GalNAc(α -) entities. Notably, some of the residual glycopeptides still displayed mass differences of 365, i.e., the mass increment of a hexose-*N*-acetylhexosamine (HexHexNAc) disaccharide (data not shown).

The total pool of O-linked glycans was released from the O-glycopeptides by reductive β -elimination and characterized by linkage analysis revealing the presence of terminal Fuc, terminal Gal and terminal GlcNAc in addition to primarily 3-substituted as well as trace amounts of 2- and 6-substituted galactosyl residues and 4-substituted as well as 3,4-disubstituted GlcNAc. As evidenced by mass chromatograms of diagnostically relevant primary fragment ions obtained upon electron impact ionization of the respective partially methylated alditol acetates, 3-substituted, 6-substituted or 3,6-disubstituted *N*-acetylglucosaminol derivatives were identified as reducing end compounds in agreement with known mucin-type O-glycan core structures (see Figure 2A). Intriguingly, 2-substituted and 2,6-disubstituted mannitol residues were additionally registered indicating O-mannosylation of CD24 (Figure 2B).

Mass spectrometric profiling of O-glycans

For mass spectrometric analysis, released O-glycans were permethylated and analyzed by MALDI-TOF-MS and ESI-IT-MS. The ESI-MS profile spectrum displayed three major and a variety of minor signals, 24 of which could be assigned to compositional glycan species in terms of Hex (H), HexNAc (N), deoxyhexose (dHex, F), *N*-acetyl/*N*-glycolylneuraminic acid (NeuAc/NeuGc) and hexuronic acid (HexA) as shown in Table 1 and Figure 3. Since Fuc was the only deoxyhexose found in both composition and linkage analyses, dHex residues are designated in the following as Fuc in the text throughout. The most abundant signals corresponded to glycans Hex₁HexNAc₂ at m/z 779.6, Hex₁HexNAc₁NeuAc₁ at m/z 895.6, and Hex₁HexNAc₁NeuAc₂ at m/z 1256.7 amounting to almost 60% of total O-glycans. All of the assigned signals were characterized by multiple fragmentation cycles (MS^n) in an ESI-ion trap instrument and, in part, by tandem MALDI-TOF-MS (MALDI-TOF-MS/MS). Annotation and assignment of signals was performed using the GlycoWorkbench software tool (Ceroni et al., 2008) and structural conclusions are summarized in Table 2.

Characterization of mucin-type glycan species

The MALDI-TOF-MS/MS spectrum of the most abundant signal at m/z 895.5 verified the presence of two structural mucin-type isomers with compositions of Hex₁HexNAc₁NeuAc₁ (Figure 4A). The most prominent

630 C. Bleckmann et al.

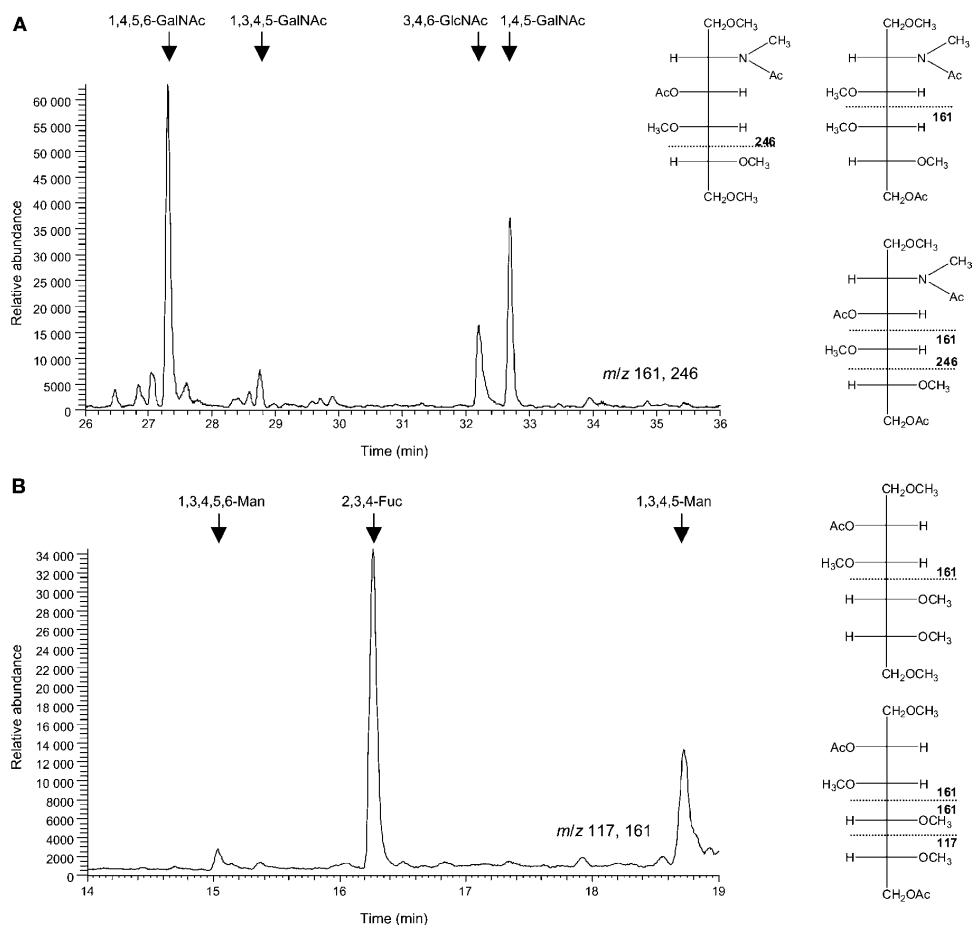


Figure 2 Linkage analysis of CD24 O-glycans.

As exemplified for reducing end monosaccharide constituents, partially methylated alditol acetates were detected by selected ion monitoring of key primary fragments obtained upon electron impact ionization as illustrated. (A) Detection of 3-substituted (1,4,5,6-GalNAc), 6-substituted (1,3,4,5-GalNAc), and 3,6-disubstituted (1,4,5-GalNAc) *N*-acetylgalactosaminol derivatives. (B) Detection of 2-substituted (1,3,4,5,6-Man) and 2,6-disubstituted (1,3,4,5-Man) mannitol derivatives. 1,4,5,6-GalNAc, 2-deoxy-2-(*N*-methyl)acetamido-3-*O*-acetyl-1,4,5,6-tetra-*O*-methyl-galactitol, etc.; 1,3,4,5,6-Man, 2-*O*-acetyl-1,3,4,5,6-penta-*O*-methyl-mannitol, etc.

signal at m/z 520.3 arose from the loss of a terminal NeuAc. The loss of terminal Hex (m/z 659.4) together with a corresponding C-ion of terminal Hex at m/z 259.1 as well as a clear signal at m/z 284.1 (YZ-ion of disubstituted HexNAc_{oi}) substantiated the existence of a branched mucin-type structure Hex(NeuAc)HexNAc_{oi}. A second isomer could be unambiguously detected by the fragment ions at m/z 227.1 (BY-ion of internal Hex), m/z 298.2 (Z-ion of monosubstituted HexNAc_{oi}), and m/z 620.3 (terminal HexNeuAc C-ion) supporting a linear mucin-type O-glycan. ESI-IT-MS sequencing of this major component provided comparable data and corroborated the presence of the two isomers. The exact linkage position of NeuAc, however, was not assigned by this approach. Based on these data the presence of linear and branched sialyl T-antigen can be proposed. By the same line of reasoning the structure of the second major component Hex₁HexNAc₂ at m/z 779.6 could be determined to rep-

resent a linear Hex₁HexNAc₂ trisaccharide (Figure 4B and Table 2).

The MS/MS spectrum of the disialylated major species Hex₁HexNAc₁NeuAc₂ at m/z 1256.7 (Figure 5A) demonstrated diagnostically relevant signals indicating that one NeuAc is bound to a HexNAc_{oi} unit (m/z 659.4), whereas the second NeuAc is linked to a central Hex (m/z 620.2). Fragment ions at m/z 881.5 and m/z 506.3 resulted from the loss of one or two NeuAc residues. The fragment ion at m/z 506.3 was subjected to further fragmentation (Figure 5B). The Z-ion at m/z 284.1 and the respective Y-ion at m/z 302.2 clearly demonstrated a disubstituted HexNAc_{oi}, whereas the pair of signals at m/z 227.1 and m/z 245.1 (B- and C-ions) verified a central Hex. The MS³-spectrum of the Z-ion at m/z 659.4 (sialylated HexNAc_{oi}) revealed dominant signals of glycosidic bond cleavages at m/z 284.1, m/z 398.2, and m/z 416.2 (Figure 5C). In addition, the pronounced signal at m/z 209.1

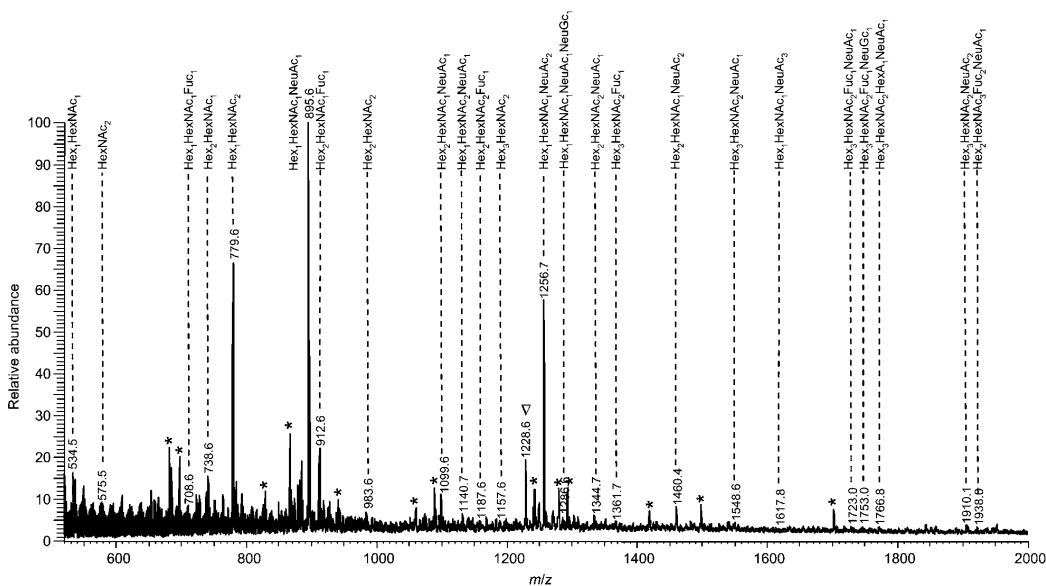
Table 1 Molecular compositions of O-glycans obtained from murine brain CD24 by reductive β -elimination.

Proposed composition	Observed mass [M+Na] ⁺	Calculated mass [M+Na] ⁺	% of total
Hex ₁ HexNAc ₁	534.5	534.3	4.3
HexNAc ₂	575.5	575.3	2.2
Hex ₁ HexNAc ₁ Fuc ₁	708.6	708.4	1.6
Hex ₂ HexNAc ₁	738.6	738.4	3.1
Hex ₁ HexNAc ₂	779.6	779.4	17.3
Hex ₁ HexNAc ₁ NeuAc ₁	895.6	895.5	26.2
Hex ₂ HexNAc ₁ Fuc ₁	912.5	912.5	5.8
Hex ₃ HexNAc ₂	983.6	983.5	1.8
Hex ₂ HexNAc ₁ NeuAc ₁	1099.6	1099.6	3.0
Hex ₁ HexNAc ₂ NeuAc ₁	1140.7	1140.6	1.4
Hex ₂ HexNAc ₂ Fuc ₁	1157.6	1157.6	1.3
Hex ₃ HexNAc ₂	1187.6	1187.6	1.0
Hex ₁ HexNAc ₁ NeuAc ₂	1256.7	1256.6	19.9
Hex ₁ HexNAc ₁ NeuAc ₁ NeuGc ₁	1286.6	1286.6	1.4
Hex ₂ HexNAc ₂ NeuAc ₁	1344.7	1344.7	1.1
Hex ₃ HexNAc ₂ Fuc ₁	1361.7	1361.7	1.0
Hex ₂ HexNAc ₁ NeuAc ₂	1460.2	1460.7	2.2
Hex ₃ HexNAc ₂ NeuAc ₁	1548.6	1548.8	1.0
Hex ₁ HexNAc ₁ NeuAc ₃	1617.8	1617.8	0.8
Hex ₃ HexNAc ₂ Fuc ₁ NeuAc ₁	1723.0	1722.9	0.8
Hex ₃ HexNAc ₂ Fuc ₁ NeuGc ₁	1753.0	1752.9	0.7
Hex ₃ HexNAc ₂ HexA ₁ NeuAc ₁	1766.8	1766.9	0.8
Hex ₃ HexNAc ₂ NeuAc ₂	1910.1	1910.0	0.7
Hex ₃ HexNAc ₂ Fuc ₁ NeuAc ₁	1938.0	1938.0	0.8

Permethylated, reduced species were analyzed by ESI-IT-MS in the positive ion mode. Relative amounts were calculated from the peak intensities of the obtained profile spectrum.

appears to result from cleavage of the C4–C5 bond of the HexNAc_{ol} unit, thus indicating a linkage of NeuAc in position C6. Examination of the NeuAcHex C-ion at m/z 620.2 confirmed terminal NeuAc by fragment ions at

m/z 398.2 and m/z 416.2 and the central Hex by m/z 245.1, the exact linkage position of NeuAc to Hex, however, could not be unambiguously assigned (data not shown). In principle, similar results were obtained by

**Figure 3** ESI-IT-MS profile spectrum of permethylated, reduced CD24 O-glycans.

Fuc, fucose; Hex, hexose; HexA, hexuronic acid; HexNAc, *N*-acetylhexosamine; NeuAc, *N*-acetylneuraminic acid; NeuGc, *N*-glycolylneuraminic acid. *, peptide and glucose oligomer contamination; ▽, incompletely methylated Hex₁HexNAc₁NeuAc₂-species.

Table 2 Compilation of O-glycan structures obtained from murine brain CD24 by reductive β -elimination.

Proposed compositions	Observed mass [M+Na] ⁺	Indicative fragment ions	Structural isomers	
Hex ₁ HexNAc ₁	534.5	I 259(C,tHex); 298(Z,HexNAc _o) II 275(Y,Hex _o); 282(B,tHexNAc)	I	II
HexNAc ₂	575.5	298/316(Z/Y,HexNAc _o); 300(C,tHexNAc)		
Hex ₁ HexNAc ₁ Fuc ₁	708.6	298(Z,HexNAc _o); 433(C,tHexFuc); 502/520(Z/Y,HexHexNAc _o)		
Hex ₂ HexNAc ₁	738.6	I 227(BY,iHex); 298/316(Z/Y,HexNAc _o); 445/463(B/C,tHex _o); II 275(Y,Hex _o); 486(B,tHexHexNAc)	I	II
Hex ₁ HexNAc ₂	779.6	250/268(BZ/BY,iHexNAc); 298/316(Z/Y,HexNAc _o); 486/504(B/C,tHexHexNAc)		
Hex ₁ HexNAc ₁ NeuAc ₁	895.6	II 298/316(Z/Y,HexNAc _o); 620(C,tNeuAcHex) I 259(C,tHex); 284(Z/Y,HexNAc _o); 659(Z,NeuAcHexNAc _o)	I	II
Hex ₂ HexNAc ₁ Fuc ₁	912.6	259(C,tHex); 424/442(BZ/BY,iHexNAcFuc); 660(B,tHexHexNAcFuc)		
Hex ₂ HexNAc ₂	983.6	I 259(C,tHex); 284/302(ZY/Y,HexNAc _o); 486(B,tHexHexNAc) II 259(C,tHex); 261(Y,Hex _o); 282(Z,tHexNAc); 486(B,tHexHexNAc); 724(Y,HexHexNAcHex _o)	I	II
Hex ₂ HexNAc ₁ NeuAc ₁	1099.6	I 284(ZY,HexNAc _o); 863(Z,NeuAcHexHexNAc _o) II 257/275(Z/Y,Hex _o); 472(BY,iHexHexNAc); 847(B,tNeuAcHexHexNAc)	I	II
Hex ₁ HexNAc ₂ NeuAc ₁	1140.7	I 486(B,tHexHexNAc); 529(YZ,HexNAcHexNAc _o); 677(Y,NeuAcHexNAc _o); 765(Y,HexHexNAcHexNAc _o) II 245(CY,iHex); 282(B,tHexNAc); 506(Y,HexHexNAc _o); 543/561(Z/Y,HexNAcHexNAc _o); 881(Y,NeuAcHexHexNAc _o)	I	II
Hex ₂ HexNAc ₂ Fuc ₁	1157.6	I 284(YZ,HexNAc _o); 479(ZZZ,HexNAcHexNAc _o); 660(B,tHexHexNAcFuc) II 243(YZ,Hex _o); 660(B,tHexHexNAcFuc); 692(YZ,HexHexNAcHex _o); 898(Y,HexHexNAcFucHex _o)	I	II
Hex ₃ HexNAc ₂	1187.6	261(Y,Hex _o); 486/504(B/C,tHexHexNAc); 724(Y,HexHexNAcHex _o); 951(Z,HexHexNAc ₂ Hex _o)		
Hex ₁ HexNAc ₁ NeuAc ₂	1256.7	227/245(BY/CY,iHex); 284/302(YZ/ZZ,HexNAc _o); 506(Y,HexHexNAc _o); 620(C,tNeuAcHex); 659(Y,NeuAcHexNAc _o)		

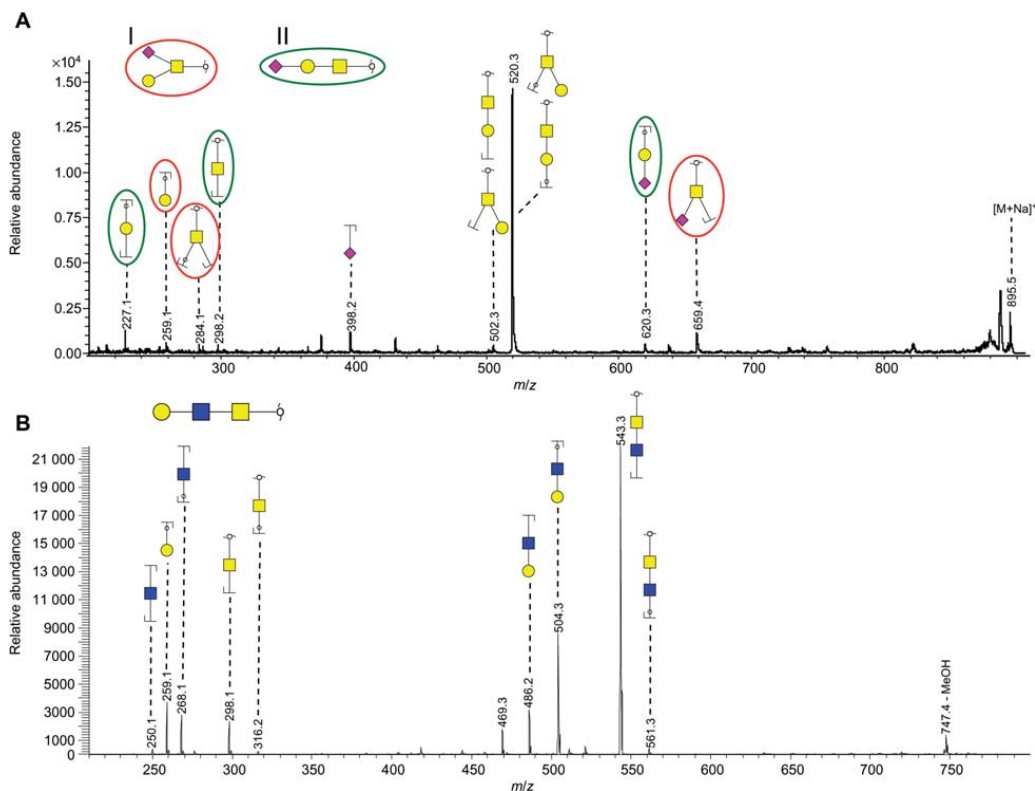
Table 2 (Continued)

Proposed compositions	Observed mass [M+Na] ⁺	Indicative fragment ions	Structural isomers
Hex ₁ HexNAc ₁ NeuAc ₁ NeuGc ₁	1286.6	I 650(C,tHexNeuGc); 659(Z,NeuAcHexNAc _{ol}) II 620(C,tNeuAcHex); 689(Z,NeuGcHexNAc _{ol})	I
Hex ₂ HexNAc ₂ NeuAc ₁	1344.7	I 284(YZ,HexNAc _{ol}); 486(B,tHexHexNAc); 529(YZ,HexNAcHexNAc _{ol}); 733(YZ,HexHexNAcHexNAc _{ol}); 881(Y,NeuAcHexHexNAc _{ol}); 1108(Z,NeuAcHexHexNAcHexNAc _{ol}) II 261(YY,Hex _{ol}); 282(B,tHexNAc); 472(BY,iHexHexNAc); 710(YY,HexHexNAcHex _{ol}); 847(B,tNeuAcHexHexNAc); 1085(Y,NeuAcHexHexNAcHex _{ol})	I II
Hex ₃ HexNAc ₂ Fuc ₁	1361.7	261(YY,Hex _{ol}); 424(BZ,iHexNAcFuc); 472(BY,iHexHexNAc); 486(B,tHexHexNAc); 692(YZ,HexHexNAcHex _{ol}); 724(Y,HexHexNAcHex _{ol}); 898(Y,HexHexNAcFucHex _{ol})	
Hex ₂ HexNAc ₁ NeuAc ₂	1460.2	I 449(CY,iHex _{ol}); 659(Z,NeuAcHexNAc _{ol}); 824(C,tHex _{ol} NeuAc) II 472(BY,iHexHexNAc); 637(Y,NeuAcHex _{ol}); 847(B,tHexHexNAcNeuAc)	I II O-mannosyl glycan branched structure (not assigned)
Hex ₃ HexNAc ₂ NeuAc ₁	1548.6	261(YY,Hex); 472(BY,iHexHexNAc); 486(B,tHexHexNAc); 733(YZ,HexNAc ₂ Hex); 847(B,tHexHexNAcNeuAc); 1085(Y,NeuAcHexHexNAcHex); 1173(Y,Hex ₂ HexNAc ₂ Hex)	
Hex ₁ HexNAc ₁ NeuAc ₃	1617.8	II 620(C,tHexNeuAc); 1020(Z,NeuAc ₂ HexNAc _{ol}) I 570(BY,iHexNeuAc); 981(C,tHexNeuAc ₂)	I II
Hex ₃ HexNAc ₂ Fuc ₁ NeuAc ₁	1723.0	I 660(B,tHexHexNAcFuc); 710(YY,HexHexNAcHex _{ol}); 847(B,tNeuAcHexHexNAc); 889(ZZ,HexNAc ₂ FucHex _{ol}); 1067/1085(Z/Y,NeuAcHexHexNAcHex _{ol}) II 646(BY,iHexHexNAcFuc); 833(BY,tNeuAcHexHexNAc); 889(ZZ,HexNAc ₂ FucHex _{ol})	I II
Hex ₃ HexNAc ₂ HexA ₁ NeuAc ₁	1766.8	620(C,tHexNeuAc); 704(B,tHexHexNAcHexA); 710(YY,HexHexNAcHex _{ol}); 733(YZ,HexNAc ₂ Hex _{ol}); 847(B,tHexHexNAcNeuAc) 1142(YZ,Hex ₂ HexNAc ₂ Hex _{ol})	

Table 2 (Continued)

Proposed compositions	Observed mass [M+Na] ⁺	Indicative fragment ions	Structural isomers
Hex ₃ HexNAc ₂ NeuAc ₂	1910.1	261(Y,Y,Hex _{ol}); 472(B,Y,iHexHexNAc); 620(C,tNeuAcHex); 710(Y,Y,HexHexNAcHex _{ol}); 847(B,tNeuAcHexHexNAc); 1160(Y,Y,Hex ₂ HexNAc ₂ Hex _{ol})	

Permethylated, reduced species were analyzed by multiple fragmentation cycles in ESI-IT-MS in the positive ion mode. Potential isomeric structures and corresponding indicative fragment ions are given. Due to limited data structural assignments were not possible in the case of Hex₃HexNAc₂Fuc,NeuGc₁ (*m/z* 1753.0) and Hex₃HexNAc₃Fuc,NeuAc₁ (*m/z* 1938.0). Fragment ions are assigned according to Domon and Costello (1988). t, terminal; i, internal; ol, reducing end sugar. All structural isomers observed are sodium adducts and were assigned according to the recommendations of the Consortium of Functional Glycomics using GlycoWorkbench (Ceroni et al., 2008). Yellow circle, galactose; green circle, mannose; yellow square, *N*-acetylgalactosamine; blue square, *N*-acetylglucosamine; red triangle, fucose; purple diamond, *N*-acetylneuraminic acid; white/blue diamond, glucuronic acid.

**Figure 4** Mass spectrometric analysis of permethylated, reduced mucin-type O-glycans.

(A) MALDI-TOF-MS/MS spectrum of Hex₃HexNAc₁NeuAc₁, [M+Na]⁺ at *m/z* 895.5. (B) ESI-IT-MS² spectrum of permethylated, reduced Hex₃HexNAc₂ species exhibiting sodiated pseudomolecular ions [M+Na]⁺ at *m/z* 779.6. Possible isomeric structures and the corresponding indicative fragments are revolved by circles in different colors. All fragment ions observed represent sodium adducts. Fragments were assigned according to the recommendations of the Consortium of Functional Glycomics using GlycoWorkbench (Ceroni et al., 2008). Yellow circle, galactose; green circle, mannose; yellow square, *N*-acetylgalactosamine; blue square, *N*-acetylglucosamine; red triangle, fucose; purple diamond, *N*-acetylneuraminic acid.

MALDI-TOF-MS/MS clearly indicating the presence of a disubstituted HexNAc_{ol} carrying a NeuAc and a Hex-NeuAc unit (data not shown). In agreement with linkage analyses the structure of glycan species at *m/z* 1256.7

can be therefore deduced as NeuAc2-3/6Gal1-3(NeuAc2-6)GalNAc_{ol}.

An interesting variant of this glycan species was detected at *m/z* 1286.7, exhibiting a mass difference of

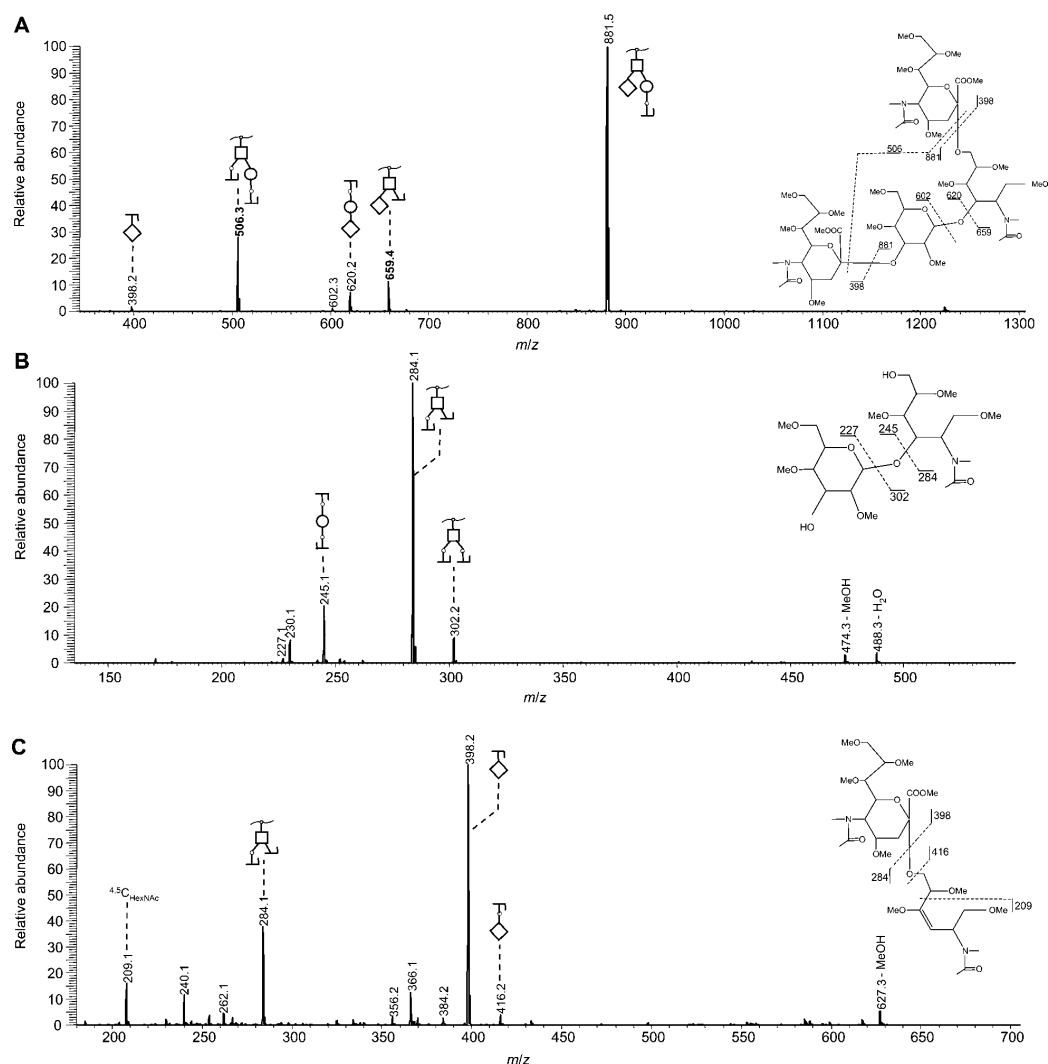


Figure 5 Mass spectrometric analysis of a disialylated mucin-type O-glycan.

(A) ESI-IT-MS² spectrum of permethylated, reduced Hex₁HexNAc₁NeuAc₂ species exhibiting sodiated pseudomolecular ions $[M+Na]^+$ at m/z 1256.7. Ions selected for further fragmentation are printed in bold font. (B) MS³-spectrum of the HexHexNAc YY-ion at m/z 506.3. (C) MS³-spectrum of the HexNAcNeuAc Z-type ion at m/z 659.4. In each case, relevant fragment ions are illustrated in an inset. All fragments observed were sodium adducts. Symbols: open circle, hexose; open square, *N*-acetylhexosamine; open diamond, *N*-acetylneuraminic acid.

30 Da. Using Glyco-Peakfinder (Maass et al., 2007), this signal can be assigned as sodium adduct of glycans with a composition of Hex₁HexNAc₁NeuAc₁NeuGc₁. The respective MS/MS spectrum was comparable with the one shown in Figure 5A for Hex₁HexNAc₁NeuAc₂, but exhibited additional specific signals indicating the existence of two isomers (Figure 6A). Besides the ions which were consistent with both isomers, ions at m/z 620.2 (C-ion of a terminal NeuAcHex) and m/z 689.4 (Z-ion of a NeuGcHexNAc_{ol}) provided evidence for an isomer in which NeuAc was bound to the central Hex, whereas NeuGc was attached to the disubstituted HexNAc_{ol} (isomer II). On the other hand, signals at m/z 650.3 (terminal

NeuGcHex C-ion) and m/z 659.4 (Z-ion of a NeuAc-HexNAc_{ol}) indicated the presence of a glycan structure bearing NeuGc at the central Hex and NeuAc at the disubstituted HexNAc_{ol} (isomer I).

In addition to disialylated mucin-type glycans small amounts of a trisialylated component Hex₁HexNAc₁NeuAc₃ were identified at m/z 1617.8 and analyzed by multiple cycles of MSⁿ fragmentation (Figure 6B, C). Obtained ions were consistent with two different isomers. In the MS² spectrum, loss of one terminal NeuAc provided the base peak at m/z 1242.5 and loss of a disialyl unit led to the Y-ion at m/z 881.5. These signals as well as the reciprocal B-ion at m/z 759.4 rule out that these com-

ponents bear three monosialyl units, but suggest instead the presence of one monosialyl and one disialyl motif which can be alternately bound to internal Hex or HexNAc_{oi} (isomers I and II in Figure 6B). Isomer I additionally evoked the internal HexNeuAc BZ-ion at m/z 570.2 and the C-ion of terminal HexNeuAc₂ at m/z 981.6, whereas the second isomer produced the terminal HexNeuAc C-ion at m/z 620.3 and the reciprocal Z-ion at m/z 1020.5. MS³ examination of the Y-ion at m/z 881.6 (Figure 6C) yielded similar results revealing a dis-

tinct HexNeuAc C-ion from isomer II at m/z 620.5 and NeuAcHexNAc_{oi} Y- and Z-ions at m/z 659.3 and 677.4 produced from isomer I, respectively. MS³ fragmentation of the disialyl B-ion at m/z 759.4 corroborated the presence of terminal and internal NeuAc residues due to fragments at m/z 416.3 or 398.1 (Y- or Z-ion of terminal NeuAc) and m/z 384.2 (BY-ion of internal NeuAc), but amounts were too small to unambiguously assign the attachment site of the external NeuAc to C8 or C9 of the internal NeuAc (data not shown).

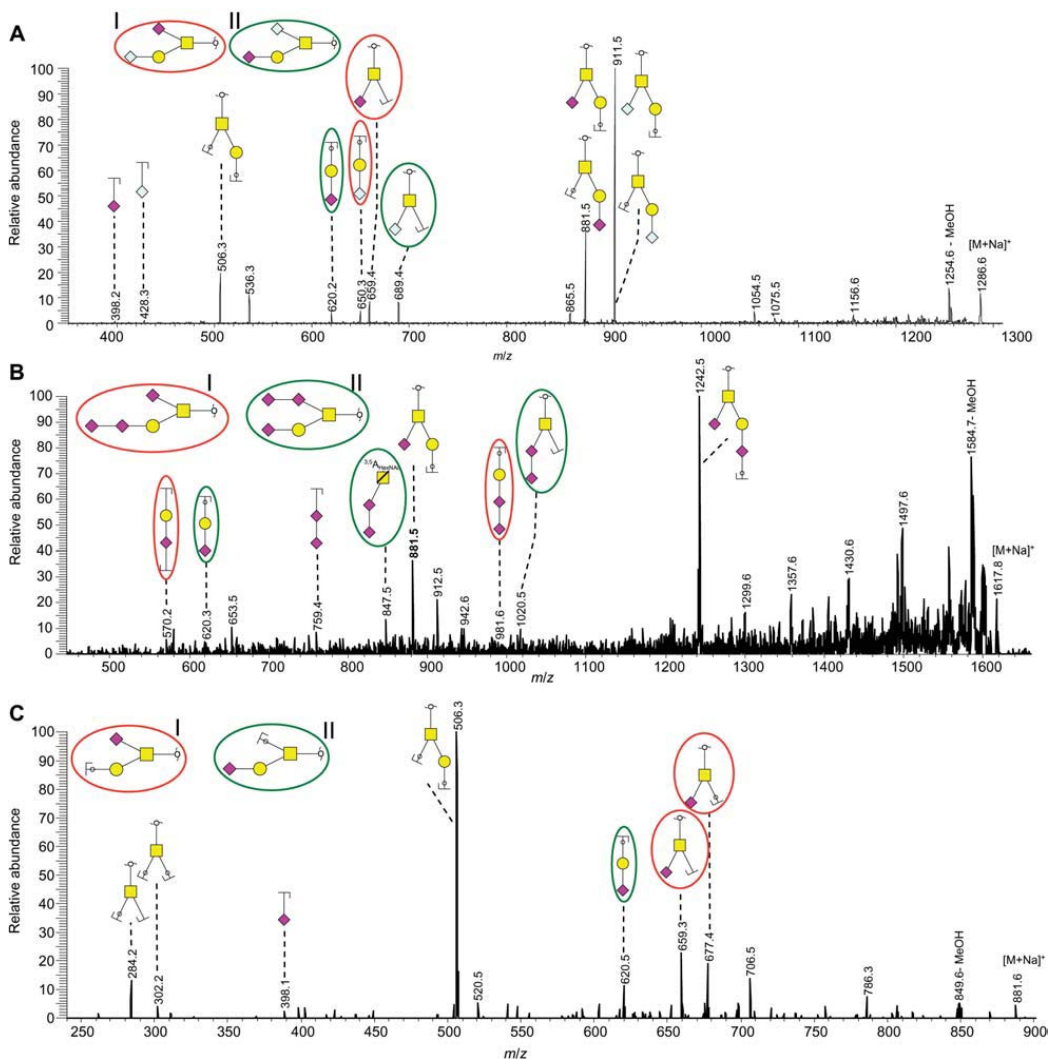


Figure 6 Mass spectrometric analysis of di- and trisialylated mucin-type O-glycans. (A) ESI-IT-MS² spectrum of sodium adducts [M+Na]⁺ of permethylated, reduced Hex, HexNAc, NeuAc, NeuGc, glycans at m/z 1286.6. (B) ESI-IT-MS²-spectrum of the sodiated pseudomolecular ion [M+Na]⁺ of permethylated, reduced glycan species Hex, HexNAc, NeuAc₃ at m/z 1617.8. (C) MS³-spectrum of the HexHexNAcNeuAc Y-type ion at m/z 881.5. Possible isomeric structures and the corresponding indicative fragments are revolved by circles in different colors. All fragments observed are sodium adducts. Fragments are assigned according to Domon and Costello (1988) and the recommendations of the Consortium of Functional Glycomics using GlycoWorkbench (Ceroni et al., 2008). Yellow circle, galactose; yellow square, N-acetylgalactosamine; purple diamond, N-acetylneuraminic acid; white diamond, N-glycolylneuraminic acid.

Characterization of O-mannosyl glycan species

The MS/MS spectrum of the monofucosylated structure Hex₂HexNAc₁Fuc₁ at m/z 912.5 (Figure 7A) displayed dominant signals resulting from cleavage of terminal Fuc at m/z 706.4 and of a hexitol at m/z 660.4. Besides the signal at m/z 660.4, fragment ions at m/z 454.2 (BZ-ion of a terminal HexHexNAc), m/z 472.2 (BY-ion of a terminal HexHexNAc), and m/z 506.3 (YY-ion of HexNAcHex_{oi}) strengthen the presence of a fucosylated O-mannosyl glycan. Signals at m/z 380.2, m/z 412.2, m/z 586.3, and m/z 632.4 can be interpreted as cross-ring fragmentations of terminal Fuc or Hex. The ion at m/z 259.1 represented a terminal Hex C-ion, thus directing the fucose residue to the internal HexNAc, suggesting the presence of a Le^x motif. In order to prove this assumption, the Hex₁HexNAc₁Fuc₁ B-ion at m/z 660.4 was further fragmented (Figure 7B). Dominant signals at m/z 618.4 (loss of an acetyl group), m/z 586.3 (B^{0,4}X_{Hex}), and m/z 472.2 (BY-ion of the HexHexNAc residue after loss of Fuc) confirmed the composition of this epitope, but provided no information about its exact structure. The strong signal at m/z 259.1 together with the respective B-ion at m/z 241.1, however, could only be explained by release of an unsubstituted terminal Hex, thus verifying the linkage of Fuc to the internal HexNAc in agreement with a Le^x unit. Further evidence for this assignment is provided by the signals at m/z 424.2 and m/z 442.2, representing BZ- and BY-ions, respectively, of a central fucosylated HexNAc. Additional fragment ions corresponding to cross-ring cleavages revealed the linkage positions of terminal Hex and Fuc. The signal at m/z 329.2 represented a ^{3,5}A_{HexNAc} cross-ring fragment indicating the attachment site of Fuc in position C3 of the internal HexNAc, whereas the linkage position of the terminal Hex could be allocated to C4 of the internal HexNAc in line with the Y^{2,4}A_{HexNAc} cross-ring fragment at m/z 301.1 (loss of Fuc). In conjunction with the small amounts of 3,4-disubstituted GlcNAc detected by linkage analysis, the occurrence of a Le^x motif in the tetrasaccharide Gal1-4(Fuc1-3)GlcNAc1-2Man_{oi} can thus be presumed.

Careful inspection of the ESI-MS profile spectrum revealed a tiny signal at m/z 1723.0 corresponding to a sialylated O-mannosyl structure with the composition Hex₃HexNAc₂Fuc₁NeuAc₁. Subsequent MS² fragmentation resulted predominantly in a loss of terminal NeuAc (m/z 1347.6) and, less pronounced, in a loss of terminal Fuc (m/z 1516.7, m/z 1534.7) or terminal Hex (m/z 1486.5, m/z 1504.7) (Figure 7C). In addition, fragment ions at m/z 710.3, m/z 737.5, m/z 1141.5, and m/z 1280.6 substantiated the presence of reduced Hex₂HexNAc₁, Hex₃HexNAc₂, Hex₃HexNAc₂, and Hex₂HexNAc₂NeuAc units, respectively. Fragment ions at m/z 660.3 (B-ion of a non-sialylated HexHexNAcFuc), m/z 847.5 (B-ion of HexHexNAcNeuAc), m/z 898.5 (Y-ion of a reduced Hex₂HexNAcFuc fragment), m/z 1067.4 (Z-ion of reduced Hex₂HexNAcNeuAc), and m/z 1085.4 (respective Y-ion) could only originate from isomer I comprising an O-mannosyl glycan with both Le^x and sialylated LacNAc motifs. However, low abundant fragment ions, such as the BY-

ion at m/z 646.3 reflecting an internal HexHexNAcFuc fragment, the signal at m/z 833.4 corresponding to a CZ-ion of a HexHexNAcNeuAc, and the signal at m/z 1259.7 resulting from a Y-ion of Hex₃HexNAcFucNeuAc, indicated the simultaneous presence of small amounts of isomer II carrying a sialyl-Le^x epitope. Taken together the obtained signals in the MS² spectrum are in agreement with the two isomeric O-mannosyl glycans shown, whereas no indications for mucin-type species were obtained. The exact linkage position of NeuAc to Hex, however, could not be assigned.

Characterization of mucin-type and O-mannosyl glycan mixtures

As an example, the signal at m/z 738.6 corresponding to the sodiated pseudomolecular ion of Hex₂HexNAc₁ species was selected and examined by MSⁿ (Figure 8). The ions at m/z 463.3 and m/z 486.2 of the MS² spectrum (Figure 8A) suggested the presence of two structural isomers. The signals at m/z 463.3, m/z 445.2, and m/z 316.1 represented terminal Hex₂ C- and B-ions or a HexNAc_{oi} Y-ion, respectively, originating from isomer I, i.e., a typical mucin-type O-glycan. The fragment ions at m/z 486.2 and m/z 275.1 demonstrated the occurrence of isomer II consisting of a terminal HexHexNAc unit linked to a hexitol residue. All other signals could originate from both isomers. The signal at m/z 649.4 resulting from the cleavage of the C4–C5 bond of the respective reduced sugars confirmed that neither isomer carried a substituent at C6 of the reduced monosaccharide.

Further fragmentation of the Y-ion at m/z 520, corresponding to a reduced HexHexNAc or HexNAcHex motif, corroborated the existence of both isomers (Figure 8B). Signals at m/z 227.1, m/z 245.1, m/z 298.1, and m/z 316.1 unambiguously indicated isomer I. In contrast, the Y-ion at m/z 275.1 and the BY_{HexNAc}-ion at m/z 268.1 could only result from a hexitol at the reducing end and therefore confirmed the existence of isomer II. In both cases, cleavage of the C4–C5 bond (m/z 431.2) excluded again any substituent at C6 of the reduced component. In accordance with linkage data and the known biosynthetic routes for mammalian mucin-type O-linked and O-mannosyl glycans, the simultaneous presence of Gal1-3GalNAc_{oi} and GlcNAc1-2Man_{oi} may thus be postulated.

In order to obtain additional information about the linkage position of the terminal Hex of isomer I, the terminal Hex₂ C-ion at m/z 463.3 (see Figure 8A) was subjected to further fragmentation. Apart from signals of glycosidic bond cleavages most of the observed cross-ring fragment ions did not allow an unambiguous assignment of a specific linkage position (Figure 8C). However, the combination of the cross-ring fragment ions at m/z 315.1 (^{2,4}A_{Hex} or ^{1,3}A_{Hex}), 345.2 (C^{0,3}X_{Hex}), and 359.2 (^{1,4}A_{Hex}) is only compatible with a linkage position of the outer Hex to C3 of the central hexose. In parallel, the small signal at m/z 329.2 (^{3,5}A_{Hex}) might indicate a C4 or C6 linkage of the terminal hexose. Since linkage analysis excluded the presence of 4-linked Gal, the respective mucin-type O-trisaccharides can be assumed to comprise predomi-

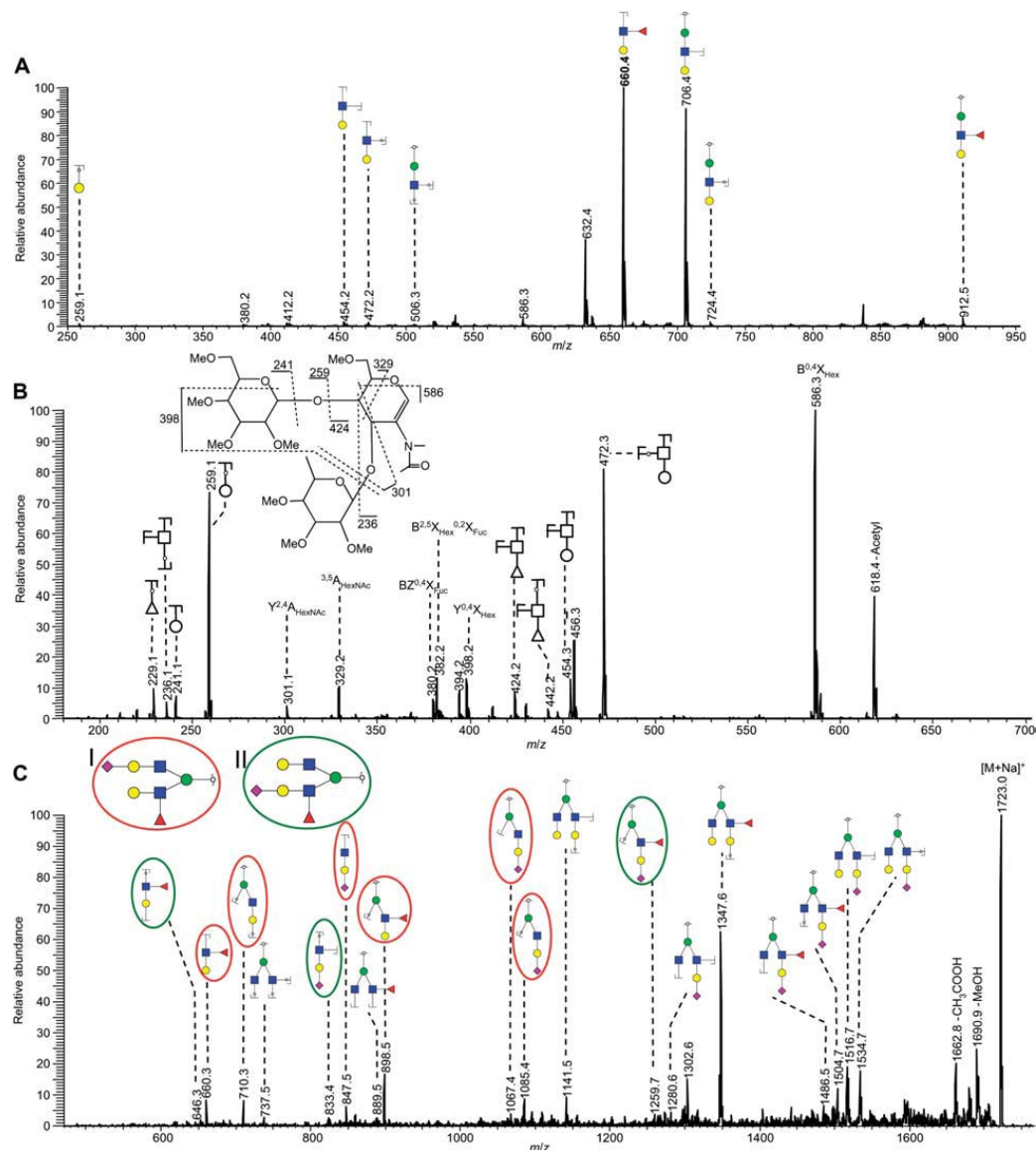


Figure 7 ESI-IT-MSⁿ fragmentation spectra of the permethylated, reduced O-mannosyl glycan species Hex₂HexNAc₁Fuc₁ and Hex₃HexNAc₂Fuc₁NeuAc₁.

(A) MS²-spectrum of the sodiated pseudomolecular ion $[M+Na]^+$ at m/z 912.5. (B) MS³-spectrum of the HexHexNAcFuc B-type ion at m/z 660.4. The inset illustrates relevant fragment ions. (C) ESI-IT-MS²-spectrum of sodium adducts $[M+Na]^+$ of the permethylated, reduced oligosaccharide species Hex₃HexNAc₂Fuc,NeuAc₁ at m/z 1723.0. Possible isomeric structures and the corresponding indicative fragments are circled by circles in different colors. All fragments observed were sodium adducts. Fragments were assigned according to Domon and Costello (1988) and the recommendations of the Consortium of Functional Glycomics using GlycoWorkbench (Ceroni et al., 2008). Fragments may be achieved by different fragmentation pathways, only one of which is illustrated in the Figure. Symbols in panels (A) and (C): yellow circle, galactose; green circle, mannose; blue square, N-acetylglucosamine; red triangle, fucose. Symbols in panel (B): open circle, hexose; open square, N-acetylhexosamine; open triangle, fucose.

nantly Gal1-3Gal-units besides small amounts of Gal1-6Gal-motifs.

MS³ examination of the Hex₁HexNAc₁ B-ion of isomer II at m/z 486.2 (see Figure 8A) showed the occurrence of

a terminal Hex (m/z 241.1 and m/z 259.1). The additional signals at m/z 329.1 and m/z 412.2 could be interpreted as cross-ring fragments ($^{3,5}A_{HexNAc}$ and $^{0,4}X_{HexNAc}$) and allocated the exact linkage position of the terminal Hex to

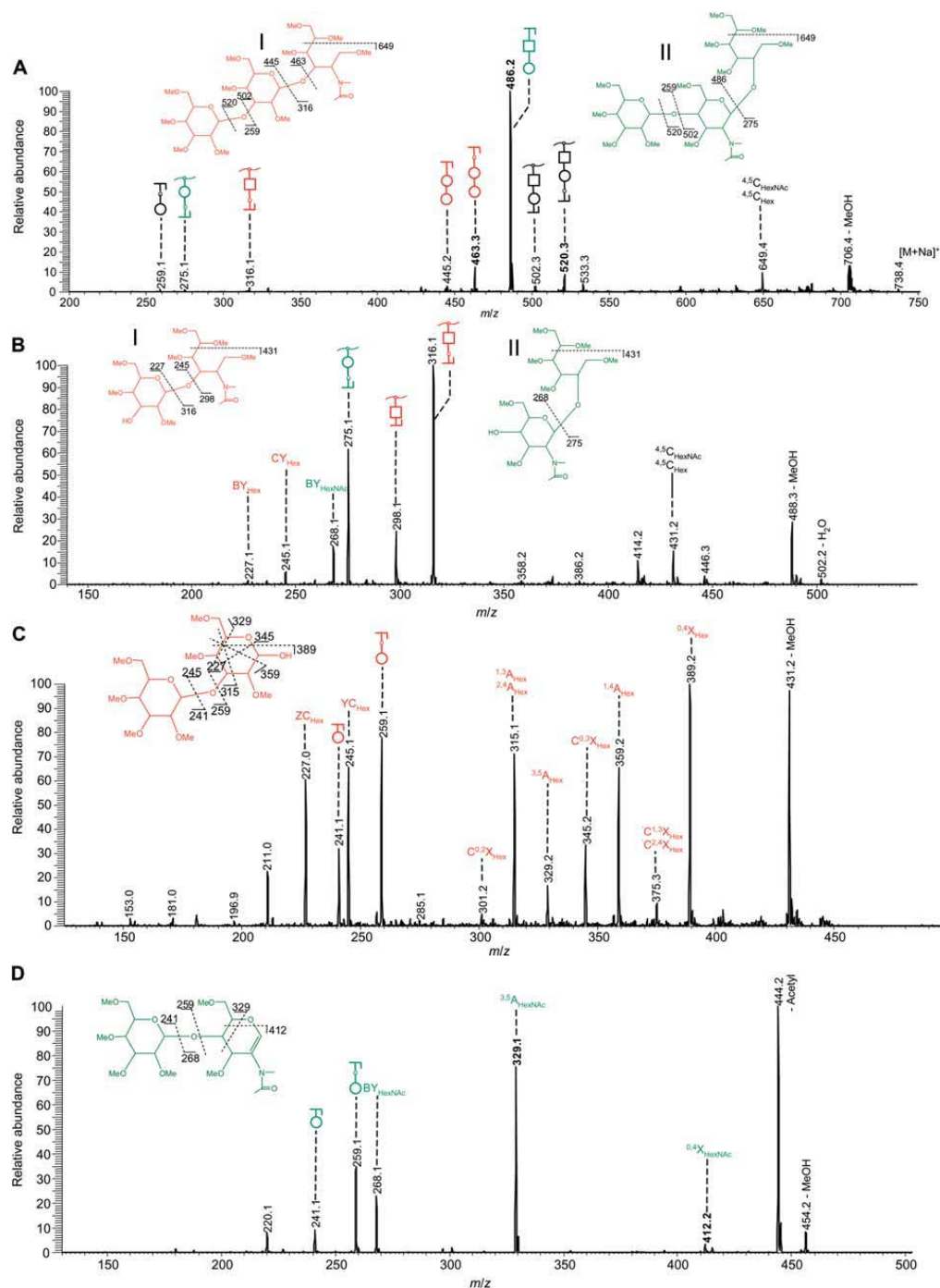


Figure 8 ESI-IT-MSⁿ fragmentation spectra of the permethylated, reduced glycan species Hex₂HexNAc₁. (A) MS²-spectrum of the sodiated pseudomolecular ion [M+Na]⁺ at m/z 738.4. Ions selected for further fragmentation are given in bold font. (B) MS³-spectrum of the HexHexNAc Y-ion at m/z 520.2. (C) MS³-spectrum of the HexHex C-type ion at m/z 463.3. (D) MS³-spectrum of the HexHexNAc B-ion at m/z 486.2. Diagnostically relevant fragment ions are illustrated in insets. Possible isomeric structures are given in different colors and key product ions derived thereof are denoted in the respective color. Non-specific product ions are labeled in black. All fragments observed are sodium adducts. Fragments were assigned according to Domon and Costello (1988). They may be achieved by different fragmentation pathways, only one of which is illustrated in the Figure. Open circle, hexose; open square, N-acetylhexosamine.

position C4 of the HexNAc (Figure 8D) in good agreement with the published Gal1-4GlcNAc1-2Man₆-trisaccharide structure (Smalheiser et al., 1998; Chai et al., 1999).

Characterization of O-glycans carrying a HNK-1 epitope

In order to assay CD24 for the presence of HNK-1 carbohydrate epitopes, a solution of the immunopurified native glycoprotein was sprayed onto a nitrocellulose membrane. In parallel, 3-sulfoglucuronyl-*neo*-lactotetraosylceramide as well as the non-sulfated glucuronyl-*neo*-lactotetraosylceramide were applied as positive and negative controls, respectively (Figure 9A). After incubation with a monoclonal anti-HNK-1 antibody, antibody binding was detected with biotinylated anti-mouse IgM, streptavidin-peroxidase and subsequent color development. The results revealed a weak but specific staining of CD24 indicating the presence of this carbohydrate epitope.

This finding could be corroborated at a structural level by the presence of the HexA-containing component at m/z 1766.8 which might reflect a precursor of the HNK-1 determinant. Glycans comprising the complete HNK-1 motif, however, could be neither detected in negative ion mode nor in positive ion mode ESI-IT-MS analyses of the permethylated O-glycan mixture. Since polar constituents may be easily lost during the extraction procedure after permethylation, an aliquot of reduced but native O-glycans was examined by ESI-IT-MS in the negative ion mode. Following this approach, tiny amounts of O-glycans carrying sulfated hexuronic acid could be detected and further fragmented (Table 3). Intriguingly, all fragment ion spectra displayed dominant signals resulting from the

loss of water, loss of an acetyl group and loss of sulfate. As an example, the MS² spectrum of the signal at m/z 802.4 corresponding to deprotonated Hex₂HexNAc₁HexA₁SO₄ species is shown in Figure 9B demonstrating the presence of diagnostically relevant signals at m/z 255.2 and 274.2 (B- or C-ion of HexASO₄) and C-ions of sulfated and desulfated HexHexA-units at m/z 435.2 and 355.1, respectively, which is in agreement with a galactose-bound HNK-1 unit. Based on the data obtained for compound Hex₃HexNAc₂HexA₁NeuAc₁ at m/z 1766.8 (Table 2), it may be further assumed that the HNK-1 epitope is attached to an O-mannosyl glycan in this case. Although mass spectrometric data (Table 3) also seemed to indicate the presence of two mucin-type glycans (Hex₁HexNAc₂HexA₁SO₄ and Hex₁HexNAc₃HexA₁SO₄) carrying this carbohydrate epitope, available amounts were too low to unambiguously confirm this assumption or to further define the structures of the components listed in Table 3.

Discussion

The murine cell adhesion molecule CD24 exhibits important biological functions during the development of the central nervous system which are attributed, at least in part, to its carbohydrate moieties. As pointed out in this and other studies, many of these activities, such as the interaction of CD24 with L1, TAG-1, Contactin or P-selectin, are not impaired by PNGase F digestion, indicating a functional role of CD24 O-glycans (Lieberoth et al., unpublished data). Until now, however, there has been only limited information on the O-glycosylation pat-

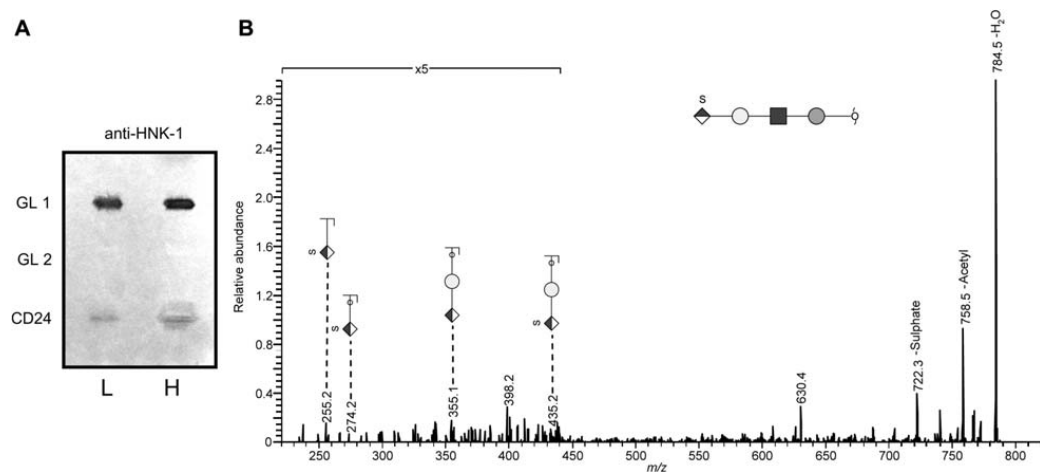


Figure 9 Verification of the HNK-1 carbohydrate epitope.

(A) Immunological detection of HNK-1 by anti-HNK-1 binding. Purified native CD24 was applied to a nitrocellulose membrane in different amounts (0.5 μ g or 2.5 μ g per band in lanes L and H, respectively) together with 2 pmol (lane L) and 10 pmol (lane H) of 3-sulfoglucuronyl-*neo*-lactotetraosylceramide (GL1) as positive control and non-sulfated glucuronyl-*neo*-lactotetraosylceramide (GL2) as negative control. Binding of anti-HNK-1 was detected with biotinylated anti-mouse IgM, streptavidin peroxidase and color development with FAST 3,3'-diaminobenzidine. (B) ESI-IT-MS² spectrum of deprotonated pseudomolecular ions [M-H]⁻ of reduced, native Hex₂HexNAc₁HexA₁SO₄ glycans at m/z 802.4 in the negative ion mode. All fragments represent deprotonated species and were assigned according to the recommendations of the Consortium of Functional Glycomics using GlycoWorkbench (Ceroni et al., 2008). White circle, galactose; grey circle, mannose; black square, N-acetylglucosamine; white/black diamond, glucuronic acid; S, sulfate.

Table 3 Identification of O-glycans from murine brain CD24 carrying an HNK-1 epitope.

Observed mass [M-H] ⁻	Calculated mass [M-H] ⁻	Proposed composition	Observed fragment ions
802.4	802.2	Hex ₂ HexNAc ₁ HexASO ₄	255.2/274.2 (B/C,tHexASO ₄); 355.1 (C,iHexAHex); 435.2 (C,tSO ₄ HexAHex); 722.3 (HexAHexHexNAcHex _{ol})
843.3	843.2	Hex ₁ HexNAc ₂ HexASO ₄	274.2 (C,tSO ₄ HexA); 638.2 (C,tSO ₄ HexAHexHexNAc); 763.4 (HexAHexHexNAcHexNAc _{ol})
948.3	948.3	Hex ₂ HexNAc ₁ Fuc ₁ HexASO ₄	355.0 (C,iHexAHex); 417.2/435.3 (B/C,tSO ₄ HexAHex); 522.3/558.4 (BZ/CY,iHexAHexHexNAc); 638.2 (CY,tSO ₄ HexAHexHexNAc); 704.5/722.1 (Z/Y,HexAHexHexNAcHex _{ol}); 784.5 (Z,SO ₄ HexAHexHexNAcHex _{ol}); 868.3 (HexAHexFucHexNAcHex _{ol})
1005.4	1005.3	Hex ₂ HexNAc ₂ HexASO ₄	417.1 (B,tSO ₄ HexAHex); 558.2 (C,iHexAHexHexNAc)
1046.3	1046.3	Hex ₁ HexNAc ₃ HexASO ₄	722.3 (Y,HexAHexHexNAcHex _{ol}); 925.4 (HexAHexHexNAc ₂ Hex _{ol})
			337.0/355.5 (B/C,iHexAHex); 638.4 (C,tSO ₄ HexAHexHexNAc); 843.3 (Y, SO ₄ HexAHexHexNAcHexNAc _{ol}); 966.4 (HexAHexHexNAc ₂ HexNAc _{ol})
1151.3	1151.3	Hex ₂ HexNAc ₂ Fuc ₁ HexASO ₄	355.1 (C,iHexAHex); 558.4 (CY,iHexAHexHexNAc); 620.3 (BY,tSO ₄ HexAHexHexNAc); 686.5 (B,iHexAHexFucHexNAc); 722.5 (YY,HexAHexHexNAcHex _{ol}); 802.1 (YY,SO ₄ HexAHexHexNAcHex _{ol}); 850.5 (Z,HexAHexFucHexNAcHex _{ol}); 907.2/925.5 (Z/Y,HexAHexHexNAc ₂ Hex _{ol}); 930.4/948.1 (Z/Y,SO ₄ HexAHexFucHexNAcHex _{ol}); 1005.5 (Y,SO ₄ HexAHexHexNAc ₂ Hex _{ol}); 1071.5 (HexAHexFucHexNAc ₂ Hex _{ol})
1167.3	1167.3	Hex ₃ HexNAc ₂ HexASO ₄	802.5 (Y,SO ₄ HexAHexHexNAcHex _{ol}); 907.3/925.4 (Z/Y,HexAHexHexNAc ₂ Hex _{ol}); 1087.4 (HexAHex ₂ HexNAc ₂ Hex _{ol})

Glycans released by reductive β-elimination were analyzed in their native state by ESI-IT-MS² in the negative ion mode. Assigned compositions and diagnostic fragment ions confirming the HNK-1 epitope are listed. In addition, most components typically displayed dominant signals corresponding to loss of water, loss of an acetyl group, and loss of sulfate. t, terminal; i, internal; ol, reducing end sugar.

tern of brain-derived CD24, which is primarily based on immunoblotting and lectin staining (Sammar et al., 1997; Kleene et al., 2001). In the present study, we have, therefore, performed a detailed analysis of the O-glycosylation pattern of neural CD24 by different mass spectrometric methodologies. Following treatment of the immunopurified glycoprotein with O-sialoglycoprotein endopeptidase and PNGaseF, remaining O-glycans were liberated by reductive β-elimination. The majority of the obtained O-glycan pool was permethylated and analyzed directly by ESI-IT-MSⁿ without further chromatographic separation, whereas a small aliquot was analyzed in its native state in parallel. The drawn structural conclusions were corroborated by gas-liquid chromatography (GC)/MS linkage data of the partially methylated alditol acetates. The results revealed a highly diverse pattern of O-glycans including mucin-type and O-mannosyl glycans carrying, in part, carbohydrate epitopes of functional relevance, such as Le^x- and sialyl-Le^x-determinants, NeuGc and disialyl units. Furthermore, the HNK-1 epitope could also be detected in minor quantities. The observed heterogeneity of CD24 O-glycan structures may be, at least in part, due to the expression of CD24 in different cells of the brain at different developmental stages and the existence of seven potential O-glycosylation sites.

The majority of CD24 O-glycans represent common mucin-type oligosaccharides among which core-type 1 [Galβ1–3GalNAcα1–O-Ser/Thr] and core-type 2 [Galβ1–3(GlcNAcβ1–6)GalNAcα1–O-Ser/Thr] structures could be unambiguously verified. These structures carry, in part,

chain terminating substituents, such as sialic acid, fucose or hexose residues. Mass spectrometric and linkage data demonstrated that sialic acid residues are linked to terminal Gal primarily in position C3, whereas the attachment site of sialic acid at the reduced GalNAc_{ol} is restricted to C6. This finding is relevant as both present and previous studies demonstrated that the interaction of CD24 with L1, a member of the immunoglobulin superfamily, depends on the presence of (α2–3)-linked sialic acid on CD24 O-glycans, thus influencing neurite outgrowth (Lieberoth et al., unpublished data). In addition to NeuAc, small amounts of NeuGc, similarly representing a major type of sialic acid in mammalian cells (Bardor et al., 2005), could be detected at the non-reducing end of murine CD24 mucin-type O-glycans. Another interesting feature is the presence of a disialyl unit linked to sialylated T-antigen. Such disialic acid residues could, for instance, also be detected on CD166/ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule; Sato et al., 2002), a cell adhesion molecule that is like CD24, discussed in the context of multiple sclerosis (Cayrol et al., 2008). Furthermore, fucosylated mucin-type glycans are found in which fucose is either detected on terminal Gal or on internal GlcNAc residues, thus providing evidence for Le^x determinants which have already been verified for CD24 N-glycans (Bleckmann et al., 2009).

Many functional roles have been attributed to such terminal structures. The Le^x epitope, for instance, has been shown to be implicated in cell adhesion, migration and neurite outgrowth (Sajdel-Sulkowska, 1998; Brito et al.,

2007) being a marker for neural stem cells (Yanagisawa and Yu, 2007). In addition to specific roles in cell recognition, however, mucin-type O-glycans have been proposed to exhibit a number of non-specific functions, such as, providing viscoelastic and hydrodynamic properties, as well as protease resistance to O-glycosylated proteins (Hounsell et al., 1996).

Intriguingly, in addition to mucin-type O-glycans CD24 also carries O-mannosyl glycans in which mannose is attached to the protein backbone. Based on the peak areas of the mass spectrum obtained for the entire O-glycans, O-mannosyl species amounted to approximately one-fifth of the total glycans. It should be pointed out, however, that several compositional species represented mixtures of both mucin-type and O-mannosyl glycans, thus preventing a more accurate calculation. Although CD24 does not contain peptide sequences shown to control O-mannosylation in the case of α -dystroglycan, the presence of a Pro residue in the vicinity of Ser and/or Thr residues might favor this type of post-translational modification (Manya et al., 2007; Breloy et al., 2008). Approximately 15 different O-mannosyl structures, including linear and branched species, could be detected by ESI-IT-MSⁿ analysis. In the linear glycans, the internal GlcNAc is linked to the reduced Man in position 2, whereas in branched structures the second GlcNAc is linked to C6 of mannitol. These findings were further corroborated by linkage analyses which verified the respective 2-substituted and 2,6-disubstituted mannitol derivatives. Terminal Gal residues of the antennae are attached to GlcNAc at C4 in agreement with the biosynthetic pathways of O-mannosyl glycans (Willer et al., 2003). Besides these O-mannosyl core types, additionally sialylated, fucosylated and glucuronidated glycan species were detected. Similar to mucin-type glycans, NeuAc is preponderantly linked to subterminal Gal in position C3. Fucose was exclusively attached to internal GlcNAc forming a Le^x motif. In lower abundance, a sialyl Le^x epitope was detectable as well.

As a striking feature, small amounts of the present O-mannosyl glycans carried in addition a hexuronic acid residue. This HexA residue could be assigned to subterminal Gal and may, therefore, provide a precursor of a HNK-1 determinant. Minor signals, obtained in the case of native glycan species, confirmed the presence of O-glycans carrying a complete HNK-1 epitope which is in line with the HNK-1 antibody binding data described in this study and a previous report of Sammar and co-workers who demonstrated by ELISA that CD24 carbohydrates are decorated, at least in part, with HNK-1 units (Sammar et al., 1997). In this context, it is interesting to note that the HNK-1 epitope is almost exclusively expressed on O-mannosyl glycans, which is in agreement with previous studies in which total brain O-glycans have been investigated (Yuen et al., 1997). Although our previous study of the CD24 N-glycans did not provide any evidence for HNK-1 determinants (Bleckmann et al., 2009), the presence of such carbohydrate epitopes may be of biological relevance, since they are associated with neural crest cell migration, neuron to glial cell adhesion and the outgrowth of astrocytic processes (Kruse et al., 1984, 1985; Kleene and Schachner, 2004; Morita et al., 2008).

In conclusion, we determined a number of different O-mannosyl glycans on murine neural CD24, carrying, in addition to a glycan core structure, (2–3)-linked NeuAc, Le^x, and sialyl Le^x units as well as HexA and HNK-1 determinants. These findings are of potential significance, since O-mannosylation is an unusual type of O-glycosylation which has so far only been described in mammals for α -dystroglycan and mouse Tenascin-R (Endo, 1999, 2004). O-Mannosyl glycans may play important roles in cell recognition processes during development, since defects in their biosynthesis are often associated with severe forms of dystrophies, including, for instance, the Walker-Warburg syndrome or the muscle-eye-brain disease (Haltiwanger and Lowe, 2004). In the context of CD24 functions, however, their role remains to be further investigated.

Materials and methods

Antibodies and reagents

Polyclonal antibodies to mouse L1 (Chen et al., 1999) and monoclonal antibodies to mouse CD24 (mAb79; Kadmon et al., 1992) were used. Carbohydrates were purchased from Dextra Laboratories (Reading, UK), N-glycosidase F (PNGase F) from Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Germany). Recombinant L1 protein fragments FN 1–2 were produced in *Escherichia coli* as described previously (Appel et al., 1993) and purified by using the Whole Gel Eluter from BioRad (München, Germany) according to the manufacturer's instructions. CD24 was purified from early postnatal mouse brain by immunoaffinity chromatography as described previously (Kleene et al., 2001; Bleckmann et al., 2009).

SDS-PAGE, Western blot analysis, and silver staining

SDS-PAGE was performed on 15% gels under reducing conditions. After separation proteins were transferred electrophoretically onto nitrocellulose membranes (BA 85, Schleicher & Schüll, Dassel, Germany). For antibody detection assays nitrocellulose membranes were incubated for 1 h at room temperature in blocking buffer PBST (PBS with 0.1% Tween-20) containing 4% skim milk powder and subsequently with primary antibodies diluted in blocking buffer at 4°C overnight. After washing four times with PBST, membranes were incubated for 1 h with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody diluted 1:10 000 in PBST and then washed four times with PBST. Bound antibodies were detected by enhanced chemiluminescence using Super signal (Pierce, Rockford, IL, USA). Silver staining was carried out according to Shevchenko et al. (1996).

Anti-HNK-1 binding experiments

CD24 was applied by jet spray with a sample applicator (Lino-mat IV; Camag, Muttenz, Switzerland) as 2 mm bands at two levels (0.5 and 2.5 μ g per band) onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK). Chemically synthesized glycolipids 1 3-sulfoglucuronyl-*neo*-lactotetraosylceramide (GL1) and the non-sulfated analog glucuronyl-*neo*-lactotetraosylceramide (GL2) (Isogai et al., 1996) were included as the positive and negative controls, respectively; each was applied at two levels (2 and 10 pmol per band). Antibody binding assays were performed essentially as described previously, using a 1:400 dilution of monoclonal antibody, anti-HNK-1 (the same preparation as in previous studies) overlaid at ambient temper-

ature for 90 min (Yuen et al., 1997; Fukui et al., 2002). Binding of anti-HNK-1 was detected with biotinylated anti-mouse IgM (Sigma, St. Louis, MO, USA), 1:200, followed by streptavidin-peroxidase (Sigma), 10 µg/ml, and finally by color development with FAST 3,3'-diaminobenzidine (DAB-FAST) reagent (Sigma). A control experiment was carried out with only biotinylated anti-mouse IgM.

L1 binding assays

ELISA based binding tests were performed as described previously (Kleene et al., 2001). Protein concentrations of 5 µg/ml were used for substrate-coating. The L1 protein fragment was diluted in buffer A (TBS, 1% BSA, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂) containing 0.05% Tween-20. In competition assays, the recombinant L1 fragment was diluted in buffer A and pre-incubated for 2 h with the carbohydrates. Polyclonal L1 and HRP-coupled secondary antibodies (Dianova, Hamburg, Germany) or HRP-coupled streptavidin (Sigma) in buffer A with 0.05% Tween-20 were used for detection.

Enzymatic digestion of CD24

Purified CD24 was incubated overnight with 2 U PNGase F at 37°C in 20 mM sodium phosphate, pH 7.2, containing 0.5% CHAPS for 4 h at 37°C. After addition of SDS sample buffer, products were analyzed by SDS-PAGE and Western blot analysis. For binding assays and primary cultures, PNGase F-treated CD24 was purified on a CD24 antibody column.

Primary cell culture

Cerebellar and DRG neurons were prepared from 6- to 8-day-old C57BL/6J mice as described previously (Kleene et al., 2001). For neurite outgrowth assays, dissociated cerebellar neurons (1–2 × 10⁵ cells/ml) and DRG neurons (1000 cells/ml) were seeded onto glass coverslips pre-coated with 0.1 mg/ml poly-L-lysine (PLL) and then with 5 µg/ml CD24 or PNGase F-treated CD24. 100 µM 3'-sialyl-N-acetyllactosamine or 6'-sialyl-N-acetyllactosamine were added 1 h after seeding the cells. After 20–24 h, cells were fixed by adding glutaraldehyde to a final concentration of 2.5% and stained with 1% toluidine blue, 1% methylene blue in 1% borax. Neurite outgrowth was quantitated by measuring total neurite length of 100 cerebellar neurons or 50 DRG neurons using an IBAS image analysis system (Kontron, Zeiss, Germany). Data from at least three independent experiments were analyzed applying the Student *t*-test.

Preparation of O-glycopeptides

Freeze-dried CD24 was dissolved in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2 and incubated overnight at 37°C with 1 mg of O-sialoglycoprotein endopeptidase from *Mannheimia haemolytica* (Biozol, Eching, Germany). Resulting CD24 glycopeptides were treated with PNGase F (30 units, Roche) at 37°C for 4 h under shaking. After addition of the same amount of enzyme, incubation was continued overnight. O-Glycopeptides were recovered from a reverse-phase cartridge (C18; Macherey und Nagel, Düren, Germany) by elution with 20%, 40%, 60% and 80% (v/v) aqueous acetonitrile containing 0.1% trifluoroacetic acid (TFA).

Desialylation of O-glycopeptides

Aliquots of O-glycopeptides were chemically desialylated by treatment with acetic acid (1 M, 0.5 h, 80°C). Acetic acid was removed by successive evaporations with methanol.

O-Glycosidase digestion

An aliquot of desialylated CD24 O-glycopeptides was dissolved in 25 mM Tris/HCl buffer, pH 7.4 and incubated with 5 mU O-glycosidase from *Diplococcus pneumoniae* (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) overnight at 37°C. For desalting, glycopeptides were applied to a reverse-phase cartridge as above.

Release of O-glycans

CD24 O-glycans were liberated by reductive β-elimination. Dried O-glycopeptides were incubated in 400 µl 1 M sodium borohydride, 50 mM sodium hydroxide solution at 45°C for 16 h. The reaction was terminated by adding glacial acetic acid dropwise until the fizzing stops. After removing borate esters by successive evaporations with methanol, the oligosaccharides were applied to a reverse-phase cartridge. Released oligosaccharides were recovered in the flow-through and desalted on a porous graphitic-carbon cartridge (Thermo Scientific, Dreieich, Germany). The cartridges were washed with water and oligosaccharides were eluted with 25%, 40%, and 60% (v/v) aqueous acetonitrile containing 0.1% TFA.

Constituent and linkage analyses

For constituent analyses, samples were hydrolyzed in 400 µl 4 M aqueous TFA (100°C, 4 h) and analyzed as alditol acetates by capillary GC or GC/MS as detailed elsewhere (Geyer et al., 1982). For linkage analyses, O-glycans were permethylated using methyl iodide and hydrolyzed. Partially methylated alditol acetates obtained after sodium borohydride reduction and peracetylation were analyzed by capillary GC-MS using the instrumentation and microtechniques described elsewhere (Geyer et al., 1983; Geyer and Geyer, 1994).

Reduction and permethylation of O-glycans

Aliquots of O-glycans were permethylated as described elsewhere (Ciucanu and Costello, 2003; Jang-Lee et al., 2006). For mass spectrometric analysis, the samples were resuspended in an aqueous 75% (v/v) methanol solution.

MALDI-TOF-MS

MALDI-TOF-MS was performed on an Ultraflex mass spectrometer (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) equipped with a LIFT-MS/MS facility. In the positive ion mode, 6-aza-2-thiothymine (5 mg/ml) or 2,5 dihydroxybenzoic acid (10 mg/ml) were used as matrices. Fragment ion analyses by tandem mass spectrometry after laser-induced dissociation were performed as detailed earlier (Geyer et al., 2005; Lehr et al., 2007). In the negative ion mode, 6-aza-2-thiothymine (2.5 mg/ml in 20 mM ammonium citrate/ethanol 1:1) was used. External mass calibration was performed using peptide calibration solution (1–3 kDa; Bruker Daltonics GmbH). Assignment of oligosaccharide and fragment ion compositions was performed using the software tools GlycoPeakfinder (Maass et al., 2007) and GlycoWorkbench (Ceroni et al., 2008) (<http://www.eurocarbdb.org/applications/ms-tools>).

ESI-IT-MS

Mass spectra were obtained on an LTQ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) instrument in the positive and negative ion mode. The instrument was equipped with a Triversa Nanomate automated nanoelectrospray ion source (Advion, Ithaca, NY, USA). Signal averaging was accomplished by adjusting the number of microscans within each scan, generally ranging between 3 and 20 microscans. Collision parameters were left at

default values with normalized collision energy set to 35%. Activation Q was set at 0.25, and activation time for 30 ms. Evaluation of the resulting spectra was again aided by GlycoPeakfinder and GlycoWorkbench (Maass et al., 2007; Ceroni et al., 2008).

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the expert technical assistance of Peter Kaese, Siegfried Kuehnhardt and Werner Mink, and Professor Makoto Kiso and the late Akira Hasegawa for the chemically synthesized glycolipids. We thank Dr. Kai Maass, Dr. Justin Prien, Dr. David Ashline, and Hui Zhou for fruitful discussion. This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Ge 386/4-2 and SFB 535/Z1) and the U.K. Research Councils Basic Technology Grant (GR/S79268, 'Glycoarrays').

References

- Appel, F., Holm, J., Conscience, J.F., and Schachner, M. (1993). Several extracellular domains of the neural cell adhesion molecule L1 are involved in neurite outgrowth and cell body adhesion. *J. Neurosci.* 13, 4764–4775.
- Bai, X.F., Li, O., Zhou, Q., Zhang, H., Joshi, P.S., Zheng, X., Liu, Y., Wang, Y., and Zheng, P. (2004). CD24 controls expansion and persistence of autoreactive T cells in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 200, 447–458.
- Bardor, M., Nguyen, D.H., Diaz, S., and Varki, A. (2005). Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid into human cells. *J. Biol. Chem.* 280, 4228–4237.
- Baxter, A.G. (2007). The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 904–912.
- Belvindrah, R., Rougon, G., and Chazal, G. (2002). Increased neurogenesis in adult mCD24-deficient mice. *J. Neurosci.* 22, 3594–3607.
- Bleckmann, C., Geyer, H., Reinhold, V., Lieberoth, A., Schachner, M., Kleene, R., and Geyer, R. (2009). Glycomic analysis of N-linked carbohydrate epitopes from CD24 of mouse brain. *J. Proteome Res.* 8, 567–582.
- Brelvi, I., Schwientek, T., Gries, B., Razawi, H., Macht, M., Albers, C., and Hanisch, F.G. (2008). Initiation of mammalian O-mannosylation *in vivo* is independent of a consensus sequence and controlled by peptide regions within and upstream of the alpha-dystroglycan mucin domain. *J. Biol. Chem.* 283, 18832–18840.
- Brito, C., Escrevente, C., Reis, C.A., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., and Costa, J. (2007). Increased levels of fucosyltransferase IX and carbohydrate Lewis^x adhesion determinant in human NT2N neurons. *J. Neurosci.* 27, 1260–1270.
- Brockhausen, I., Schutzbach, J., and Kuhns, W. (1998). Glycoproteins and their relationship to human disease. *Acta Anat.* 161, 36–78.
- Calaora, V., Chazal, G., Nielsen, P.J., Rougon, G., and Moreau, H. (1996). mCD24 expression in the developing mouse brain and in zones of secondary neurogenesis in the adult. *Neuroscience* 73, 581–594.
- Cayrol, R., Wosik, K., Berard, J.L., Dodelet-Devillers, A., Ifergan, I., Kebir, H., Haqqani, A.S., Kreymborg, K., Krug, S., Moumdjian, R., et al. (2008). Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nat. Immunol.* 9, 137–145.
- Ceroni, A., Maass, K., Geyer, H., Geyer, R., Dell, A., and Haslam, S.M. (2008). GlycoWorkbench: a tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans. *J. Proteome Res.* 7, 1650–1659.
- Chai, W., Yuen, C.T., Kogelberg, H., Carruthers, R.A., Margolis, R.U., Feizi, T., and Lawson, A.M. (1999). High prevalence of 2-mono- and 2,6-di-substituted manol-terminating sequences among O-glycans released from brain glycopeptides by reductive alkaline hydrolysis. *Eur. J. Biochem.* 263, 879–888.
- Chen, S., Mantei, N., Dong, L., and Schachner, M. (1999). Prevention of neuronal cell death by neural adhesion molecules L1 and CHL1. *J. Neurobiol.* 38, 428–439.
- Chiba, A., Matsumura, K., Yamada, H., Inazu, T., Shimizu, T., Kusunoki, S., Kanazawa, I., Kobata, A., and Endo, T. (1997). Structures of sialylated O-linked oligosaccharides of bovine peripheral nerve α -dystroglycan. The role of a novel O-mannosyl-type oligosaccharide in the binding of alpha-dystroglycan with laminin. *J. Biol. Chem.* 272, 2156–2162.
- Ciucanu, I. and Costello, C.E. (2003). Elimination of oxidative degradation during the per-O-methylation of carbohydrates. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 16213–16219.
- Domon, B. and Costello, C. (1988). A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentation in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconj. J.* 5, 397–409.
- Endo, T. (1999). O-Mannosyl glycans in mammals. *Biochim. Biophys. Acta* 1473, 237–246.
- Endo, T. (2004). Structure, function and pathology of O-mannosyl glycans. *Glycoconj. J.* 21, 3–7.
- Ennas, M.G., Cocchia, D., Silvetti, E., Sogos, V., Riva, A., Torelli, S., and Gremo, F. (1992). Immunocompetent cell markers in human fetal astrocytes and neurons in culture. *J. Neurosci. Res.* 32, 424–436.
- Finne, J., Krusius, T., Margolis, R.K., and Margolis, R.U. (1979). Novel mannitol-containing oligosaccharides obtained by mild alkaline borohydride treatment of a chondroitin sulfate proteoglycan from brain. *J. Biol. Chem.* 254, 10295–10300.
- Fukuda, M. (2002). Roles of mucin-type O-glycans in cell adhesion. *Biochim. Biophys. Acta* 1573, 394–405.
- Fukui, S., Feizi, T., Galustian, C., Lawson, A.M., and Chai, W. (2002). Oligosaccharide microarrays for high-throughput detection and specificity assignments of carbohydrate-protein interactions. *Nat. Biotechnol.* 20, 1011–1017.
- Geyer, R. and Geyer, H. (1994). Saccharide linkage analysis using methylation and other techniques. *Methods Enzymol.* 230, 86–108.
- Geyer, R., Geyer, H., Kühnhardt, S., Mink, W., and Stirr, S. (1982). Capillary gas chromatography of methylhexitol acetates obtained upon methylation of N-glycosidically linked glycoprotein oligosaccharides. *Anal. Biochem.* 121, 263–274.
- Geyer, R., Geyer, H., Kühnhardt, S., Mink, W., and Stirr, S. (1983). Methylation analysis of complex carbohydrates in small amounts: capillary gas chromatography-mass fragmentation of methylalditol acetates obtained from N-glycosidically linked glycoprotein oligosaccharides. *Anal. Biochem.* 133, 197–207.
- Geyer, H., Wührer, M., Resemann, A., and Geyer, R. (2005). Identification and characterization of keyhole limpet hemocyanin N-glycans mediating cross-reactivity with *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* 280, 40731–40748.
- Goris, A., Maranian, M., Walton, A., Yeo, T.W., Ban, M., Gray, J., Dubois, B., Compston, A., and Sawcer, S. (2006). CD24 Ala/Val polymorphism and multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 175, 200–202.
- Haltiwanger, R.S. and Lowe, J.B. (2004). Role of glycosylation in development. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 491–537.
- Hounsell, E.F., Davies, M.J., and Renouf, D.V. (1996). O-linked protein glycosylation structure and function. *Glycoconj. J.* 13, 19–26.
- Isogai, Y., Kawase, T., Ishida, H., Kiso, M., and Hasegawa, A. (1996). Total synthesis of sulfated glucuronyl paraglobosides. *J. Carbohydr. Chem.* 15, 1001–1023.
- Jang-Lee, J., North, S.J., Sutton-Smith, M., Goldberg, D., Panico, M., Morris, H., Haslam, S., and Dell, A. (2006). Glycomic profiling of cells and tissues by mass spectrometry: finger-

- printing and sequencing methodologies. *Methods Enzymol.* 415, 59–86.
- Julenius, K., Molgaard, A., Gupta, R., and Brunak, S. (2005). Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology* 15, 153–164.
- Kadmon, G., Eckert, M., Sammar, M., Schachner, M., and Altevogt, P. (1992). Nectadrin, the heat-stable antigen, is a cell adhesion molecule. *J. Cell Biol.* 118, 1245–1258.
- Kadmon, G., von Bohlen und Halbach, F., Horstkorte, R., Eckert, M., Altevogt, P., and Schachner, M. (1995). Evidence for cis interaction and cooperative signalling by the heat-stable antigen nectadrin (murine CD24) and the cell adhesion molecule L1 in neurons. *Eur. J. Neurosci.* 7, 993–1004.
- Kleene, R. and Schachner, M. (2004). Glycans and neural cell interactions. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 195–208.
- Kleene, R., Yang, H., Kutsche, M., and Schachner, M. (2001). The neural recognition molecule L1 is a sialic acid-binding lectin for CD24, which induces promotion and inhibition of neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 276, 21656–21663.
- Kristiansen, G., Sammar, M., and Altevogt, P. (2004). Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule. *J. Mol. Histol.* 35, 255–262.
- Kruse, J., Mailhammer, R., Wernecke, H., Faissner, A., Sommer, I., Goridis, C., and Schachner, M. (1984). Neural cell adhesion molecules and myelin-associated glycoprotein share a common carbohydrate moiety recognized by monoclonal antibodies L2 and HNK-1. *Nature* 311, 153–155.
- Kruse, J., Keilhauer, G., Faissner, A., Timpl, R., and Schachner, M. (1985). The J1 glycoprotein – a novel nervous system cell adhesion molecule of the L2/HNK-1 family. *Nature* 316, 146–148.
- Lehle, L., Strahl, S., and Tanner, W. (2006). Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases. *Angew. Chem. Int. Ed.* 45, 6802–6818.
- Lehr, T., Geyer, H., Maass, K., Doenhoff, M.J., and Geyer, R. (2007). Structural characterization of N-glycans from the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* cross-reacting with *Schistosoma mansoni* glycoconjugates. *Glycobiology* 17, 82–103.
- Liu, Y. and Zheng, P. (2007). CD24: a genetic checkpoint in T cell homeostasis and autoimmune diseases. *Trends Immunol.* 28, 315–320.
- Maass, K., Ranzinger, R., Geyer, H., von der Lieth, C.W., and Geyer, R. (2007). ‘Glyco-peakfinder’ – *de novo* composition analysis of glycoconjugates. *Proteomics* 7, 4435–4444.
- Manya, H., Suzuki, T., Akasaka-Manya, K., Ishida, H.K., Mizuno, M., Suzuki, Y., Inazu, T., Dohmae, N., and Endo, T. (2007). Regulation of mammalian protein O-mannosylation: preferential amino acid sequence for O-mannose modification. *J. Biol. Chem.* 282, 20200–20206.
- Moore, C.J. and Hewitt, J.E. (2009). Dystroglycan glycosylation and muscular dystrophy. *Glycoconj. J.* 26, 349–357.
- Morita, I., Kizuka, Y., Kakuda, S., and Oka, S. (2008). Expression and function of the HNK-1 carbohydrate. *J. Biochem.* 143, 719–724.
- Nedelec, J., Pierres, M., Moreau, H., Barbet, J., Naquet, P., Faivre-Sarrailh, C., and Rougon, G. (1992). Isolation and characterization of a novel glycosyl-phosphatidylinositol-anchored glycoconjugate expressed by developing neurons. *Eur. J. Biochem.* 203, 433–442.
- Nielsen, P.J., Lorenz, B., Muller, A.M., Wenger, R.H., Brombacher, F., Simon, M., von der Weid, T., Langhorne, W.J., Mossman, H., and Kohler, G. (1997). Altered erythrocytes and a leaky block in B-cell development in CD24/HSA-deficient mice. *Blood* 89, 1058–1067.
- Otaegui, D., Saenz, A., Camano, P., Blazquez, L., Goicoechea, M., Ruiz-Martinez, J., Olaskoaga, J., Emparanza, J.A., and Lopez de Munain, A. (2006). CD24 V/V is an allele associated with the risk of developing multiple sclerosis in the Spanish population. *Mult. Scler.* 12, 511–514.
- Peter-Katalinic, J. (2005). Methods in enzymology: O-glycosylation of proteins. *Methods Enzymol.* 405, 139–171.
- Sajdel-Sulkowska, E.M. (1998). Immunofluorescent detection of CD15-fucosylated glycoconjugates in primary cerebellar cultures and their function in glial-neuronal adhesion in the central nervous system. *Acta Biochim. Pol.* 45, 781–790.
- Sammar, M., Aigner, S., and Altevogt, P. (1997). Heat-stable antigen (mouse CD24) in the brain: dual but distinct interaction with P-selectin and L1. *Biochim. Biophys. Acta* 1337, 287–294.
- Sato, C., Matsuda, T., and Kitajima, K. (2002). Neuronal differentiation-dependent expression of the disialic acid epitope on CD166 and its involvement in neurite formation in Neuro2A cells. *J. Biol. Chem.* 277, 45299–45305.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850–858.
- Shewan, D., Calaora, V., Nielsen, P., Cohen, J., Rougon, G., and Moreau, H. (1996). mCD24, a glycoprotein transiently expressed by neurons, is an inhibitor of neurite outgrowth. *J. Neurosci.* 16, 2624–2634.
- Smalheiser, N.R., Haslam, S.M., Sutton-Smith, M., Morris, H.R., and Dell, A. (1998). Structural analysis of sequences O-linked to mannose reveals a novel Lewis X structure in cranin (dystroglycan) purified from sheep brain. *J. Biol. Chem.* 273, 23698–23703.
- Tian, E. and Ten Hagen, K.G. (2009). Recent insights into the biological roles of mucin-type O-glycosylation. *Glycoconj. J.* 26, 325–334.
- Wang, L., Lin, S., Rammohan, K.W., Liu, Z., Liu, J.Q., Liu, R.H., Guinther, N., Lima, J., Zhou, Q., Wang, T., et al. (2007). A dinucleotide deletion in CD24 confers protection against autoimmune diseases. *PLoS Genet.* 3, e49.
- Willer, T., Valero, M.C., Tanner, W., Cruces, J., and Strahl, S. (2003). O-Mannosyl glycans: from yeast to novel associations with human disease. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13, 621–630.
- Yanagisawa, M. and Yu, R.K. (2007). The expression and functions of glycoconjugates in neural stem cells. *Glycobiology* 17, 57R–74R.
- Yuen, C.T., Chai, W., Loveless, R.W., Lawson, A.M., Margolis, R.U., and Feizi, T. (1997). Brain contains HNK-1 immunoreactive O-glycans of the sulfoglucuronyl lactosamine series that terminate in 2-linked or 2,6-linked hexose (mannose). *J. Biol. Chem.* 272, 8924–8931.
- Zhou, Q., Rammohan, K., Lin, S., Robinson, N., Li, O., Liu, X., Bai, X.F., Yin, L., Scarberry, B., Du, P., et al. (2003). CD24 is a genetic modifier for risk and progression of multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 15041–15046.

Received December 18, 2008; accepted February 5, 2009

4 Diskussion

Das Zelladhäsionsmolekül CD24 hat wichtige biologische Funktionen im Immunsystem, während der Onkogenese und Metastatisierung, bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen und bei der Entwicklung des Zentralnervensystems. Diese Aufgaben werden wahrscheinlich durch die zell- und entwicklungsabhängigen Glykosylierungsmuster des Moleküls vermittelt [2, 12, 15, 19, 25].

In der vorliegenden Arbeit wurde daher eine Glykomanalyse von murinem CD24 des Hirns durchgeführt, um die Basis für das Verständnis der Wirkungsmechanismen und das Auffinden weiterer Interaktionspartner von CD24 im Nervengewebe zu schaffen.

Die N- und O-Glykane von CD24 wurden dabei mit Hilfe unterschiedlicher massenspektrometrischer Methoden strukturell charakterisiert. CD24 wurde aus Hirnen von 1-10 Tage alten Mäusen, das Zeitfenster erhöhter CD24-Expression im Nervengewebe [7], mittels Immunaффinitätschromatographie isoliert und aufgereinigt. Nach proteolytischem Verdau mit O-Sialoglykoprotein Endopeptidase wurden die N-Glykane enzymatisch mit PNGase F abgespalten und von den verbleibenden Glykopeptiden durch Festphasenextraktion abgetrennt. Die O-Glykane wurden von diesen Glykopeptiden chemisch durch reduktive β -Eliminierung [87] freigesetzt.

Analyse der CD24 N-Glykane

Die massenspektrometrische Analyse der enzymatisch freigesetzten N-Glykane erfolgte hauptsächlich nach Desialylierung durch milde Säurehydrolyse. Dabei wurde sowohl von nativen, pyridylaminierten [112] als auch reduzierten, permethylierten [94] Oligosacchariden ausgegangen. Die Messungen wurden mittels MALDI-TOF und ESI-IT Massenspektrometrie, ohne chromatographische Vortrennung direkt aus den einzelnen Glykanmischungen, durchgeführt. Die dabei gewonnenen Ergebnisse wurden durch GC-MS Verknüpfungsanalysen [96, 97] des nativen Gesamtglykangemisches vor und nach Desialylierung bestätigt. Es konnte auf diesem Wege ein heterogenes Gemisch von ca. 60 verschiedenen Molekülionenspezies der N-Glykane erfasst werden, die sich jeweils in ihren Monosaccharid-Zusammensetzungen unterschieden und teilweise in mehreren Strukturisomervariationen vorkamen. Als Hauptkomponenten wurden di-, tri- und tetraantennäre Komplex-Typ-N-Glykane detektiert, die partiell bis zu vier Fucosen,

N-Acetyllactosamin-Wiederholungseinheiten, *Bisecting N*-Acetylglucosamin, terminale Hex-Hex-Einheiten und Sialinsäuren in unterschiedlicher Verknüpfung tragen. Als NebenkompONENTEN wurden oligomannosidische und hybride N-Glykane nachgewiesen.

Zum Teil konnten bestimmte Glykanstrukturen nur durch eine der drei angewendeten Methoden detektiert werden. So ließen sich die oligomannosidischen N-Glykane lediglich in ihrer reduzierten, permethylierten Form nachweisen, was durch folgende Vorteile der eingesetzten Derivatisierungstechniken zu erklären ist: Durch Erhöhung der Ionisierungseffizienz wurde eine Sensitivitätssteigerung während der massenspektrometrischen Messung erreicht, die es erlaubt, Glykomanalysen im picomolaren Bereich durchzuführen [113, 114]. Außerdem wurde die Auswertung der Massenspektren, insbesondere der MS/MS- oder MSⁿ-Daten, durch Einführung eines Fluoreszenzmarkers am reduzierenden Ende der Oligosaccharide bzw. durch Permethylierung der Hydroxylgruppen in den Molekülen vereinfacht, da so leichter Zuordnungen der Fragmente in den Glykanmolekülstrukturen und Aussagen über das Vorkommen von Strukturisomeren und Verknüfungspositionen bei den jeweiligen Kohlenhydratspezies getroffen werden konnten. Gerade das Arbeiten mit reduzierten, permethylierten Glykanen zur massenspektrometrischen Strukturcharakterisierung hat sich auch bei Glykomanalysen anderer Arbeitsgruppen bewährt [115-119].

Die Zuordnung der einzelnen detektierten Kohlenhydratspezies zu einer der drei potentiellen N-Glykosylierungspositionen im CD24-Proteinrückgrat war aufgrund mangelnder Proteasespaltstellen und der strukturellen Vielfalt an N-Glykanen nicht durchführbar. Da ein enzymatischer Verdau mit handelsüblichen Proteasen aufgrund der Proteinsequenz von CD24 unmöglich war, wurde das Molekül mit O-Sialoglykoprotein Endopeptidase behandelt. Dieses Enzym arbeitet jedoch nicht aminosäure- oder sequenzspezifisch, sondern spaltet das Proteinrückgrat in Nachbarschaft von negativ geladenen O-Glykanen [120]. Die Schnittstellen des Enzyms sind daher nicht bekannt, was eine Zuordnung der N-Glykane auf Glykopeptidbasis erschwerte. Außerdem wurde für die Isolation von CD24 bzw. den CD24-Glykanen Gesamthirne von 1-10 Tage alten Mäusen verwendet. Während dieser Periode kommt es zur progressiven Entwicklung und, damit einhergehend, wahrscheinlich auch zu unterschiedlicher Prozessierung der Glykane in den unterschiedlichen Arealen des Gehirns. Dies könnte die große Heterogenität an detektierten N-Glykanen und die zusätzliche Schwierigkeit der Festlegung einzelner Glykosylierungspositionen erklären.

Die bisher durchgeführten strukturellen Untersuchungen zur Glykosylierung von CD24 sind rar und stützen sich vor allem auf Lektin- und Antikörperfärbemethoden [15, 17, 41], sowie auf ein massenspektrometrisches *Profiling* der CD24 N-Glykane [18]. Der Einsatz von Lektinassays zeigte das Vorkommen von komplexen N-Glykanen, Mucin-Typ-O-Glykanen und α -2,3 verknüpfter Sialinsäuren [15]. Durch Immunfärbung mit Antikörpern, die an spezifische Kohlenhydratepitope binden, konnten zusätzlich Le^x und HNK-1-Determinanten detektiert werden [17, 41]. Ob diese terminalen Oligosaccharidspezies an N- oder O-Glykanen gebunden vorliegen, blieb dabei jedoch ungeklärt. Ein erstes MALDI-MS-*Profiling* der CD24 N-Glykane von Schmitz und Mitarbeitern erlaubte den Nachweis verschiedener Kohlenhydratkompositionen, die zu oligomannosidischen, inkomplett prozessierten hybriden und bis zu dreifach fucosylierten Komplex-Typ N-Glykanen passen könnten [18]. Da bei diesem *Profiling* der N-Glykane jedoch keine weiterführenden MS/MS-Studien durchgeführt wurden, konnte die Frage nach dem Aufbau der Glykane sowie das Vorhandensein verschiedener Strukturisomere nicht abschließend geklärt werden. In der hier vorgestellten CD24 Glykomstudie gelang erstmals durch den Einsatz verschiedener massenspektrometrischer Techniken, wie MS-*Profiling*, MS/MS-, MSⁿ-Experimenten und Verknüpfungsanalysen mit MALDI-TOF-, ESI-IT- und GC-MS-Geräten, eine detaillierte Analyse der verschieden substituierten CD24 N-Glykane. Es konnte auf diesem Wege eindeutig das Vorkommen von oligomannosidischen, hybriden und komplexen N-Glykanen, die teilweise *Bisecting* N-Acetylglucosamin, N-Acetylactosamin-*Repeats*, terminale Hex-Hex-Einheiten, α -2,3 sowie α -2,6 verknüpfte Sialinsäure, Le^x- und Blutgruppen H-Antigene tragen, demonstriert werden.

Analyse der CD24 O-Glykane

In Studien von Kleene und Mitarbeitern [15] konnte gezeigt werden, dass neurales CD24 über α -2,3 verknüpfte Sialinsäuren an seinen Interaktionspartner L1 bindet. Die Effekte auf das Neuritenwachstum, sprich die Inhibition bzw. die Förderung des Neuritenwachstums, die nicht nur über L1 sondern auch durch TAG-1, F3, Caspr2 und Caspr vermittelt werden, wurden durch die enzymatische Abspaltung der N-Glykane jedoch nicht beeinflusst [39, 41]. Dies unterstreicht die Relevanz der CD24 O-Glykane im Zusammenspiel mit den bereits identifizierten Rezeptoren bzw. Korezeptoren im Nervengewebe.

Die enzymatische Freisetzung der O-Glykane von den verbliebenen Glykopeptiden gestaltete sich aufgrund der hohen Substratspezifität der käuflich zu erwerbenden Glykosidasen als schwierig [74]. Der Einsatz von O-Glykosidase, welche spezifisch Gal β 1-3GalNAc α 1-Glykane vom Peptidrückgrat abspaltet, gab nach massenspektrometrischer Untersuchung durch Detektion der Massendifferenzen vor und nach enzymatischer Behandlung der desialylierten Glykopeptide erste Hinweise auf das Vorkommen dieser Mucin-Typ-O-Glykane. Eine komplette Freisetzung der O-Glykane wurde jedoch erst chemisch durch reduktive β -Eliminierung erreicht. Auch wenn das nun reduzierte Ende der O-Glykane nicht mehr zur Fluoreszenzmarkierung zur Verfügung stand, wurde dieser Ansatz gewählt, um eine Degradation der Glykane zu umgehen, wie sie bei der nicht-reduktiven β -Eliminierung und Hydrazinolyse auftreten und somit zur Bildung von Artefakten führen kann [88, 89]. Die so gewonnenen reduzierten CD24 O-Glykane wurden nativ und nach Permethylierung [94] ohne chromatographische Vortrennung mittels MALDI-TOF-MS und ESI-IT-MS⁽ⁿ⁾ strukturell charakterisiert. Auch hier zeigten sich wieder die Vorteile des Arbeitens mit permethylierten Glykanen. Neben der Sensitivitätssteigerung, der Messung sialylierter Glykane im positiven Ionenmodus und der vereinfachten Auswertung der generierten Spektren war außerdem die Erhöhung des Molekulargewichtes der relativ „kleinen“ O-Glykane vor allem für die MALDI-TOF-MS Messung von Nutzen, da sie so aus dem Bereich von Matrixsignalen hervortraten. Trotz allem wurden auch die nativen O-Glykane für die Strukturanalyse herangezogen, da bei der Aufreinigung permethylierter Glykane durch Extraktion polare Bestandteile, wie beispielsweise sulfatierte O-Glykane, verloren gehen können. Die nativen O-Glykane wurden im positiven und negativen Ionenmodus mittels ESI-IT-MS⁽ⁿ⁾ untersucht. Die erhaltenen Resultate wurden erneut durch GC-MS Verknüpfungsanalysen der CD24 O-Glykane untermauert.

Die durchgeführten Untersuchungen führten hier zum Nachweis von ungefähr 30 unterschiedlichen Molekülionenspezies mit divergierenden Monosaccharidzusammensetzungen, die teilweise in mehreren Strukturisomervariationen vorkamen. Neben der bereits beschriebenen core Typ 1 Struktur konnten weitere Mucin-Typ-O-Glykane detektiert werden, die teilweise Fucosen, *N*-Acetylneuraminsäuren, Disialyl-Einheiten und *N*-Glycolylneuraminsäuren tragen. Außerdem konnte ein weiterer Typ an O-Glykanen auf CD24, die sogenannten O-Mannosyl-Glykane, nachgewiesen werden. Dieser Befund ist insofern interessant, als in Säugern bisher nur zwei O-mannosylierte Proteine, α -Dystroglykan und Tenascin-R [62, 121], charakterisiert wurden,

obwohl ungefähr 30% der O-glykosylierten Proteine im Gehirn O-mannosyliert vorliegen [47, 54]. Die Mehrheit der O-Mannosyl-Glykane sind aus Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man-Ser/Thr Ketten aufgebaut. Zusätzlich wurden 2,6 verzweigte O-Mannosyl-Glykane detektiert [52, 62, 70, 122]. Die auf CD24 gefundenen O-Mannosyl-Glykane lagen linear und verzweigt vor und traten neben diesen Kernstrukturen in fucosylierter, sialylierter und glucuronylierter Form auf. Das glucuronylierte Oligosaccharid lieferte erste Hinweise auf das Vorliegen von HNK-1-modifizierten O-Mannosyl-Glykanen. Es wurden daher zusätzlich ESI-IT-MS⁽ⁿ⁾-Messungen der nativen O-Glykane im negativen Ionenmodus durchgeführt. Auf diesem Wege konnte das Vorkommen von geringen Mengen an HNK-1 Determinanten auf O-mannosidisch verknüpften O-Glykanen aufgedeckt werden. Dieses Resultat bestätigt die Arbeiten von Sammar und Mitarbeitern [17], die mittels Immunfärbung HNK-1 auf CD24 nachgewiesen haben. Auch in weiteren Glykomstudien des Säugerhirns konnte HNK-1 beschrieben werden; hier zeigte sich, dass HNK-1 tragende Glykane mit 0,1% aller freigesetzten Oligosaccharide nur in äußerst geringer Menge vorhanden sind. Interessanterweise konnte bisher das HNK-1 Antigen bei O-glykosidisch verknüpften Glykanen nur auf O-Mannosyl- und nicht auf Mucin-Typ Glykanen detektiert werden [54, 123].

Die Aminosäuresequenz von CD24 beinhaltet 7 potentielle O-Glykosylierungsstellen. Die Zuordnung der analysierten O-Glykane zu den verschiedenen Serin- bzw Threoninresten war auch hier, aufgrund der eingesetzten Protease mit nicht bekannten Spaltstellen und der großen Heterogenität der Kohlenhydratspezies, nicht möglich. In dieser Arbeit wurden erstmals die O-Glykane des neuralen Zelladhäsionsmoleküls CD24 der Maus strukturell mittels verschiedener massenspektrometrischer Techniken untersucht. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse stehen im Einklang mit den ersten in der Literatur beschriebenen Resultaten, in denen durch Lektin- und Immunfärbung das Vorkommen von Mucin-Typ O-Glykanen, α -2,3 verknüpfter Sialinsäure [15], Le^x- [41] und HNK-1-Determinanten [17] gezeigt werden konnte. Darüber hinaus konnten hier O-Mannosyl-Glykane, N-Glycolylneuraminsäure, terminale Disialyl-Einheiten und in geringer Konzentration α -2,6 verknüpfte N-Acetylneuraminsäure nachgewiesen werden.

Strukturell interessante Kohlenhydratepitope von CD24 und deren mögliche Funktion im Nervengewebe

Die durchgeführte CD24 Glykomstudie zeigt ein heterogenes Muster an unterschiedlichen Kohlenhydratstrukturen, wobei neben oligomannosidischen und hybriden, hauptsächlich komplexe N-Glykane detektiert wurden, die teilweise *Bisecting* N-Acetylglucosamin, N-Acetylactosamineinheiten, terminale Hex-Hex Motive, Le^x und Blutgruppen H-Antigene sowie α -2,3 und in geringer Menge α -2,6 verknüpfte N-Acetylneuraminsäure trugen. Bei der Analyse der O-Glykane konnten Mucin-Typ und O-mannosidische Oligosaccharide nachgewiesen werden. Auch diese waren mit strukturell interessanten Determinanten, wie α -2,3 gebundener N-Acetylneuraminsäure, N-Glycolylneuraminsäure, Disialyl-Einheiten, Le^x und Sialyl-Le^x Epitopen sowie HNK-1 Antigenen, substituiert.

Auch wenn über die biologische Funktion von CD24 während der Entwicklung des Nervengewebes und das Zusammenspiel mit Interaktionspartnern in Signaltransduktionskaskaden wenig bekannt ist, werden derartige terminalen Zuckerepitope, die auch auf anderen Glykoproteinen des zentralen Nervensystems vorliegen, im Zusammenhang mit folgenden Aufgaben diskutiert:

- Die vorherrschende N-Glykosylierung der Proteine im Hirn ist die Ausstattung mit **komplexen Kohlenhydratstrukturen**, die häufig verknüpft mit ***Bisecting* N-Acetylglucosamin** vorliegen. Man spricht hier auch von der hirnspezifischen N-Glykosylierung [124]. Diese Zuckerspezies werden entwicklungsabhängig prozessiert und haben wichtige Funktionen bei der Zelladhäsion und Migration [125]. Gerade N-Glykane mit *Bisecting* N-Acetylglucosamin werden auch in Zusammenhang mit der Tumورprogression diskutiert [126, 127].
- **Oligomannosidische N-Glykane** können auf einer Vielzahl von neuronalen Glykoproteinen detektiert werden. Sie liegen im adulten Hirn konzentriert in den Synapsen vor und vermitteln Interaktionen von neuronalen Zellen. So ist die *cis*-Assoziation der Zelladhäsionsmoleküle NCAM und L1, die für das Neuritenwachstum von Bedeutung ist, abhängig von oligomannosidischen Glykanen [72, 128].

- **N-Acetylactosamin Wiederholungseinheiten** kommen auf einer Fülle von Hirnglykanen vor. Eine präzise Rolle bezüglich ihrer biologischen Funktion kann diesen terminalen Zuckerepitopen bisher nicht zugesprochen werden [129]. Wahrscheinlich dienen diese *Repeat*-Strukturen als Rückgrat für weitere Modifizierungen, wie beispielsweise für das Le^x-Antigen [130].
- Bei den ebenfalls nachgewiesenen terminalen **Hex-Hex-Einheiten** handelt es sich wahrscheinlich um Gal α 1-3Gal β 1-Epitope, wie sie häufig in murinem Gewebe vorzufinden sind. Sie werden auch in anderen Säugergeweben synthetisiert, jedoch nicht im Menschen und bei Menschenaffen [131, 132]. Ihre Funktion im Gehirn ist nicht geklärt.
- **Blutgruppen H-Antigene** konnten bisher nur auf wenigen Glykanen im Nervengewebe identifiziert werden. Sie sind im Neuritenwachstum und bei der synaptischen Plastizität von funktioneller Relevanz [133-135].
- Das **Lewis^x**- sowie das **Sialyl-Lewis^x-Epitop** kann auf N- und O-Glykoproteinen des Nervensystems nachgewiesen werden. Es kommt hauptsächlich während der embryonalen Entwicklung und in Zonen verlängerter Neurogenese vor und hat Funktionen bei der Zelladhäsion, Zellmigration [136, 137] sowie bei der Interaktion von CD24 mit TAG-1 bzw. F3 beim Neuritenwachstum [39]. Zudem wird es als Marker für neuronale Stammzellen eingesetzt [138].
- **α -2,3 gebundene N-Acetylneuraminsäure** bildet den terminalen Kohlenhydratbaustein vieler Glykane im Nervensystem und übernimmt daher unterschiedliche Aufgaben [72]. Auf Gangliosiden sind α -2,3 verknüpfte Sialinsäuren beispielsweise an der Bildung und Aufrechterhaltung der Myelinisierung beteiligt [139]. Sialylierte O-Glykane von CD24 interagieren mit dem Zelladhäsionsmolekül L1 und nehmen so Einfluss auf das Neuritenwachstum [15].
- **Disialyl-Motive** sind aus zwei N-Acetylneuraminsäuren aufgebaut, die α -2,8 verknüpft vorliegen. Disialinsäuren wurden hauptsächlich auf Gangliosiden detektiert und übernehmen dort Funktionen in der Signaltransduktion, Differenzierung und Zelladhäsion [140]. Sie können auch auf N- und O-Glykanen von Säugerproteinen vorkommen; bislang wurden allerdings wenige Glykoproteine beschrieben, die solche Disialyl-Motive aufweisen. Im Hirn sind sie an der Differenzierung und Neuritenbildung beteiligt [141].

Disialyl-Determinanten wurden beispielsweise beim Zelladäsionsmolekül CD166, ein Mitglied der Ig Superfamilie, gefunden. Sie sind dort in homo- und heterophile Interaktionen während der Neurogenese involviert [141]. CD166 scheint, wie auch CD24, eine Rolle bei der Entstehung der Autoimmunerkrankung Multiple Sklerose zu spielen [142].

- **N-Glycolyneuraminsäure** kann als terminaler Baustein in einer Vielzahl von Säugerglykanen nachgewiesen werden. Im Hirn von neugeborenen Mäusen stellen sie jedoch eine seltene Form der Sialylierung dar; nur 0,02% der an Protein gebundenen Sialinsäuren sind hier N-Glycolyneuraminsäuren [143]. Falls sie von funktioneller Relevanz bei der Entwicklung des Nervensystems sein sollten, spielt dies im menschlichen Gewebe keine Rolle, da N-Glycolyneuraminsäure hier nicht synthetisiert wird [144, 145].
- Das **HNK-1 Epitop**, eine Kohlenhydratstruktur hoher funktioneller Relevanz, kann auf N- und O- Glykoproteinen vorliegen. Im Nervensystem nimmt HNK-1 an der Vermittlung verschiedener Prozesse teil, wie beispielsweise der synaptischen Plastizität, der Wegfindung von Neuronen oder während der Entwicklung zur Innervierung neugebildeter Axone [72, 146-148].
- Die am Häufigsten vorkommenden O-Glykane sind die sogenannten **Mucin-Typ O-Glykane**. Dementsprechend vielfältig sind ihre Funktionen [51, 64, 149]. Sie sind in verschiedenste Erkennungsprozesse involviert und beeinflussen die Signaltransduktion. Außerdem spielen sie eine Rolle bei der Prozessierung und Expression von Glykoproteinen und modulieren die Aktivität von Enzymen und Signalmolekülen, wie Hormonen oder Cytokinen [64]. Bei Defekten in der Mucin-Typ O-Glykosylierung sind daher meist mehrere Organe betroffen [43].
- Ungefähr 30% der Glykoproteine im Hirn sind O-mannosyliert [47, 54]. Diese **O-Mannosyl-Glykane** können unterschiedliche terminale Epitope tragen. Auch wenn bisher nur zwei O-mannosylierte Proteine, α -Dystroglykan und Tenascin-R [62, 121], beschrieben wurden, scheinen sie wichtige Funktionen bei der Entwicklung des Nervengewebes zu haben. Denn eine fehlende O-Mannosylierung geht mit unterschiedlichen Erkrankungen, wie beispielsweise dem Walker-Warburg Syndrom (WWS) oder der *Muscle-Eye-Brain Disease* (MEB) einher, bei denen Mißbildungen der Muskeln, Augen und des Gehirns zu beobachten sind [70, 71].

Welche Funktionen die beschriebenen Kohlenhydratdeterminanten in Bezug auf die Interaktion und Wirkung von CD24 während der Entwicklung und Differenzierung des Nervengewebes haben, bedarf weiterer Untersuchungen.

Die heterogene Glykosylierung von CD24 legt jedoch nahe, dass Glykanstrukturen neurale Zellinteraktionen modulieren und eine wichtige Rolle in Wachstum, Entwicklung und Differenzierung von neuronalen Zellen und bei der Bildung und Aufrechterhaltung von neuronalen Strukturen spielen können. Die Aufklärung glykanabhängiger Interaktionen von Zelladhäsionsmolekülen bzw. von Nervenzellen und die Charakterisierung der beteiligten Zuckerstrukturen und ihrer Rezeptoren ist nicht nur ein wichtiger Beitrag zum besseren Verständnis von zentralen Vorgängen während der Entwicklung und Regeneration von neuronalen Strukturen, sondern trägt auch zum Verständnis der funktionellen Feinregulation des Nervensystems bei. Die gewonnenen Erkenntnisse zur Bedeutung von Glykostrukturen für die Feinregulation von Prozessen im Nervensystem könnten in Zukunft neue Strategien zur Behandlung von neuronalen Erkrankungen sowie Infektionskrankheiten und Autoimmunerkrankungen eröffnen.

5 Zusammenfassung

Das Zelladhäsionsmolekül CD24, das auch Nectadrin oder *Heat Stable Antigen* (HSA) genannt wird, ist über Glycosylphosphatidylinositol (GPI) in den Mikrodomänen der Zellmembran verankert. Es wird auf haematopoetischen, neuronalen und Tumorzellen exprimiert und hat wichtige Funktionen im Immunsystem, im Nervengewebe und bei der Onkogenese bzw. Metastatisierung. Außerdem scheint es bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen, wie Multipler Sklerose, eine Rolle zu spielen. Die murine Form von CD24 ist aus nur 27 Aminosäuren aufgebaut; wovon nahezu die Hälfte Serin, Threonin und Asparagin-Reste sind, die potentielle N- und O-Glykosylierungspositionen darstellen. Abhängig vom Zelltyp und seinem Entwicklungsstadium variiert das Molekulargewicht von CD24 von 27-70 kDa, was auf Unterschiede in der Glykosylierung zurückzuführen ist. Die mannigfaltigen Funktionen von CD24 scheinen daher hauptsächlich, wenn nicht gar vollständig, von den Glykanen vermittelt zu werden.

Das Ziel der vorliegenden Studie war die Anfertigung einer detaillierten Strukturanalyse der N- und O-Glykane von CD24. Zur Charakterisierung der unterschiedlichen Kohlenhydratspezies wurde CD24 aus Hirnen von 1-10 Tage alten Mäusen mittels Immunaффinitätschromatographie isoliert und aufgereinigt. Nach Proteasebehandlung mit dem Enzym O-Sialoglykoprotein Endopeptidase wurden die N-Glykane des Moleküls enzymatisch mit N-Glykosidase F (PNGaseF) freigesetzt. Die O-Glykane auf den verbleibenden Peptiden wurden chemisch durch reduktive β -Eliminierung erhalten. Es folgte die Analyse der nativen, pyridylaminierten und/oder reduzierten, permethylierten N- bzw. O-Glykangemische mittels *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight* Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS/MS) und *Electrospray – Ion Trap* Massenspektrometrie (ESI-IT-MSⁿ). Die dabei gewonnenen Strukturinformationen wurden durch Durchführung einer Gaschromatographie /Massenspektrometrie (GC/MS) unterstützten Verknüpfungsanalyse anhand partiell methylierter Alditolacetate untermauert.

Die Glykomanalyse von neuralem CD24 der Maus zeigte eine große Heterogenität an Glykanstrukturen. Bei den N-Glykanen konnten ca. 60 verschiedene Kohlenhydratkompositionen, vor allem Oligosaccharide vom komplexen Typ, nachgewiesen werden, die zum Teil Kernfucosen, Lewis^x Epitope, Blutgruppen H-Antigene, *Bisecting* N-Acetylglucosamin und N-Acetylglucosamin-Wiederholungseinheiten tragen.

In geringerer Konzentration konnten zudem oligomannosidische und hybride N-Glykane detektiert werden. Bei den O-Glykanen konnten mit ungefähr 30 verschiedenen Monosaccharidzusammensetzungen eine große Vielfalt an Mucin-Typ- und O-Mannosyl-Glykanen charakterisiert werden, die teilweise funktionell relevante Kohlenhydratepitope, wie α -2,3 verknüpfte Sialinsäure, Lewis^X und Sialyl-Lewis^X, Disialyleinheiten, *N*-Glycolylneuraminsäure und in geringen Konzentrationen auch das HNK-1 Epitop tragen.

Die gewonnenen Strukturinformationen zur Glykosylierung des neuronalen CD24 der Maus bilden nun die Grundlage für das Auffinden weiterer Interaktionspartner und das Verstehen der biologischen Funktionen des Moleküls im Nervengewebe.

6 Summary

The cell adhesion molecule CD24, also called nectadrin or heat stable antigen (HSA), is anchored by glycosylphosphatidylinositol (GPI) to lipid rafts within the cell membrane. CD24 is abundantly expressed on a variety of cell types including haematopoietic, neural and tumour cells and plays therefore important roles in the central nervous system, the immune system, in the development of cancer. Recently, it has attracted considerable attention due to its implications in autoimmune diseases, such as multiple sclerosis. The murine neural form of CD24 has a peptide core of only 27 amino acids. Nearly half of the amino acids represent Serin, Threonin and Asparagine residues that are potential sites for O- and N-glycosylation. Depending on the cell type and the developmental stage CD24 has an apparent molecular weight ranging between 27 and 70 kDa due to differences in glycosylation. Therefore, it has been proposed that functions of CD24 are mainly or exclusively mediated by its glycans.

The aim of the present study was a detailed structural analysis of the N- and O-linked glycans. To characterize the carbohydrate structures we have purified CD24 from 1-10 day old mouse brains by immunoaffinity chromatography. After treatment with O-sialoglycoprotein endopeptidase N-glycans were released by N-Glycosidase F (PNGaseF). O-glycans were liberated from the remaining peptide cores by reductive β -elimination. Resulting carbohydrate species were analyzed by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS/MS) and Electrospray – Ion Trap mass spectrometry (ESI-IT-MSⁿ) in their native, pyridylaminated and/or reduced, permethylated form without prior chromatographic separation. The drawn structural conclusions were corroborated by gas-liquid chromatography (GC)/MS linkage data of the partially methylated alditol acetates.

The results of this glycomics approach revealed a heterogeneous pattern of approximately 60 different N-glycan compositions, primarily complex-type N-glycans carrying, in part, core-linked fucose, Lewis^X-determinants, blood group H-antigen, bisecting *N*-acetylglucosamine and *N*-acetyllactosamine repeating units in addition to small amounts of high-mannose-type and hybrid-type N-glycans. The corresponding O-glycans are similary characterized by a high diversity about 30 different monosaccharide compositions. We could detect several mucin-type- and O-mannosyl-glycans, carrying, in part, carbohydrate epitopes of functional relevance like

α -2,3-linked sialic acid, Lewis^X and sialyl-Lewis^X, *N*-glycolyl-neuraminic acid and disialyl units. Furthermore, the HNK-1 epitope could be also detected in minor quantities.

The obtained structural data of the CD24 glycans may provide the basis for identification of new interaction partners of CD24 and a better understanding of the functional roles of this molecule in the nervous system.

7 Literatur

1. Springer, T., G. Galfre, D.S. Secher, and C. Milstein, *Monoclonal xenogeneic antibodies to murine cell surface antigens: identification of novel leukocyte differentiation antigens*. Eur J Immunol, 1978. **8**(8): p. 539-51.
2. Kadmon, G., M. Eckert, M. Sammar, M. Schachner, and P. Altevogt, *Nectadrin, the heat-stable antigen, is a cell adhesion molecule*. J Cell Biol, 1992. **118**(5): p. 1245-58.
3. Nielsen, P.J., B. Lorenz, A.M. Muller, R.H. Wenger, F. Brombacher, M. Simon, T. von der Weid, W.J. Langhorne, H. Mossmann, and G. Kohler, *Altered erythrocytes and a leaky block in B-cell development in CD24/HSA-deficient mice*. Blood, 1997. **89**(3): p. 1058-67.
4. Liu, Y. and P. Zheng, *CD24: a genetic checkpoint in T cell homeostasis and autoimmune diseases*. Trends Immunol, 2007. **28**(7): p. 315-20.
5. Belvindrah, R., G. Rougon, and G. Chazal, *Increased neurogenesis in adult mCD24-deficient mice*. J Neurosci, 2002. **22**(9): p. 3594-607.
6. Nieoullon, V., R. Belvindrah, G. Rougon, and G. Chazal, *Mouse CD24 is required for homeostatic cell renewal*. Cell Tissue Res, 2007. **329**(3): p. 457-67.
7. Calaora, V., G. Chazal, P.J. Nielsen, G. Rougon, and H. Moreau, *mCD24 expression in the developing mouse brain and in zones of secondary neurogenesis in the adult*. Neuroscience, 1996. **73**(2): p. 581-94.
8. Baumann, P., N. Cremers, F. Kroese, G. Orend, R. Chiquet-Ehrismann, T. Uede, H. Yagita, and J.P. Sleeman, *CD24 expression causes the acquisition of multiple cellular properties associated with tumor growth and metastasis*. Cancer Res, 2005. **65**(23): p. 10783-93.
9. Friederichs, J., Y. Zeller, A. Hafezi-Moghadam, H.J. Grone, K. Ley, and P. Altevogt, *The CD24/P-selectin binding pathway initiates lung arrest of human A125 adenocarcinoma cells*. Cancer Res, 2000. **60**(23): p. 6714-22.
10. Kwon, G.Y., H. Ha, G. Ahn, S.Y. Park, S.J. Huh, and W. Park, *Role of CD24 Protein in Predicting Metastatic Potential of Uterine Cervical Squamous Cell Carcinoma in Patients Treated with Radiotherapy*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2007.
11. Lim, S.C., *CD24 and human carcinoma: tumor biological aspects*. Biomed Pharmacother, 2005. **59 Suppl 2**: p. S351-4.
12. Kristiansen, G., C. Pilarsky, J. Pervan, B. Sturzebecher, C. Stephan, K. Jung, S. Loening, A. Rosenthal, and M. Dietel, *CD24 expression is a significant predictor of PSA relapse and poor prognosis in low grade or organ confined prostate cancer*. Prostate, 2004. **58**(2): p. 183-92.
13. Kay, R., F. Takei, and R.K. Humphries, *Expression cloning of a cDNA encoding M1/69-J11d heat-stable antigens*. J Immunol, 1990. **145**(6): p. 1952-9.
14. Kay, R., P.M. Rosten, and R.K. Humphries, *CD24, a signal transducer modulating B cell activation responses, is a very short peptide with a glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor*. J Immunol, 1991. **147**(4): p. 1412-6.
15. Kleene, R., H. Yang, M. Kutsche, and M. Schachner, *The neural recognition molecule L1 is a sialic acid-binding lectin for CD24, which induces promotion and inhibition of neurite outgrowth*. J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 21656-63.
16. Julenius, K., A. Molgaard, R. Gupta, and S. Brunak, *Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites*. Glycobiology, 2005. **15**(2): p. 153-64.

17. Sammar, M., S. Aigner, and P. Altevogt, *Heat-stable antigen (mouse CD24) in the brain: dual but distinct interaction with P-selectin and L1*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1337**(2): p. 287-94.
18. Ohl, C., C. Albach, P. Altevogt, and B. Schmitz, *N-glycosylation patterns of HSA/CD24 from different cell lines and brain homogenates: a comparison*. Biochimie, 2003. **85**(6): p. 565-73.
19. Bai, X.F., O. Li, Q. Zhou, H. Zhang, P.S. Joshi, X. Zheng, Y. Liu, Y. Wang, and P. Zheng, *CD24 controls expansion and persistence of autoreactive T cells in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Exp Med, 2004. **200**(4): p. 447-58.
20. Schabath, H., S. Runz, S. Joumaa, and P. Altevogt, *CD24 affects CXCR4 function in pre-B lymphocytes and breast carcinoma cells*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 2): p. 314-25.
21. Wenger, R.H., M. Kopf, L. Nitschke, M.C. Lamers, G. Kohler, and P.J. Nielsen, *B-cell maturation in chimaeric mice deficient for the heat stable antigen (HSA/mouse CD24)*. Transgenic Res, 1995. **4**(3): p. 173-83.
22. Li, O., X. Chang, H. Zhang, E. Kocak, C. Ding, P. Zheng, and Y. Liu, *Massive and destructive T cell response to homeostatic cue in CD24-deficient lymphopenic hosts*. J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1713-20.
23. Chen, G.Y., J. Tang, P. Zheng, and Y. Liu, *CD24 and Siglec-10 selectively repress tissue damage-induced immune responses*. Science, 2009. **323**(5922): p. 1722-5.
24. Hauw, J.J., P. Delaere, D. Seilhean, and P. Cornu, *Morphology of demyelination in the human central nervous system*. J Neuroimmunol, 1992. **40**(2-3): p. 139-52.
25. Bai, X.F., J.Q. Liu, X. Liu, Y. Guo, K. Cox, J. Wen, P. Zheng, and Y. Liu, *The heat-stable antigen determines pathogenicity of self-reactive T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Clin Invest, 2000. **105**(9): p. 1227-32.
26. Zhou, Q., K. Rammohan, S. Lin, N. Robinson, O. Li, X. Liu, X.F. Bai, L. Yin, B. Scarberry, P. Du, M. You, K. Guan, P. Zheng, and Y. Liu, *CD24 is a genetic modifier for risk and progression of multiple sclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(25): p. 15041-6.
27. Goris, A., M. Maranian, A. Walton, T.W. Yeo, M. Ban, J. Gray, B. Dubois, A. Compston, and S. Sawcer, *CD24 Ala/Val polymorphism and multiple sclerosis*. J Neuroimmunol, 2006. **175**(1-2): p. 200-2.
28. Sagiv, E. and N. Arber, *The novel oncogene CD24 and its arising role in the carcinogenesis of the GI tract: from research to therapy*. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2008. **2**(1): p. 125-33.
29. Smith, S.C., G. Oxford, Z. Wu, M.D. Nitz, M. Conaway, H.F. Frierson, G. Hampton, and D. Theodorescu, *The metastasis-associated gene CD24 is regulated by Ral GTPase and is a mediator of cell proliferation and survival in human cancer*. Cancer Res, 2006. **66**(4): p. 1917-22.
30. Sagiv, E., A. Starr, U. Rozovski, R. Khosravi, P. Altevogt, T. Wang, and N. Arber, *Targeting CD24 for treatment of colorectal and pancreatic cancer by monoclonal antibodies or small interfering RNA*. Cancer Res, 2008. **68**(8): p. 2803-12.
31. Aigner, S., Z.M. Sthoeger, M. Fogel, E. Weber, J. Zarn, M. Ruppert, Y. Zeller, D. Vestweber, R. Stahel, M. Sammar, and P. Altevogt, *CD24, a mucin-type glycoprotein, is a ligand for P-selectin on human tumor cells*. Blood, 1997. **89**(9): p. 3385-95.
32. Lowe, J.B., *Glycan-dependent leukocyte adhesion and recruitment in inflammation*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(5): p. 531-8.

33. Hahne, M., R.H. Wenger, D. Vestweber, and P.J. Nielsen, *The heat-stable antigen can alter very late antigen 4-mediated adhesion*. J Exp Med, 1994. **179**(4): p. 1391-5.
34. Runz, S., C.T. Mierke, S. Joumaa, J. Behrens, B. Fabry, and P. Altevogt, *CD24 induces localization of beta1 integrin to lipid raft domains*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **365**(1): p. 35-41.
35. Kadmon, G., F. von Bohlen und Halbach, R. Horstkorte, M. Eckert, P. Altevogt, and M. Schachner, *Evidence for cis interaction and cooperative signalling by the heat-stable antigen nectadrin (murine CD24) and the cell adhesion molecule L1 in neurons*. Eur J Neurosci, 1995. **7**(5): p. 993-1004.
36. Shewan, D., V. Calaora, P. Nielsen, J. Cohen, G. Rougon, and H. Moreau, *mCD24, a glycoprotein transiently expressed by neurons, is an inhibitor of neurite outgrowth*. J Neurosci, 1996. **16**(8): p. 2624-34.
37. O'Reilly, M.K. and J.C. Paulson, *Siglecs as targets for therapy in immune-cell-mediated disease*. Trends Pharmacol Sci, 2009.
38. Li, N., W. Zhang, T. Wan, J. Zhang, T. Chen, Y. Yu, J. Wang, and X. Cao, *Cloning and characterization of Siglec-10, a novel sialic acid binding member of the Ig superfamily, from human dendritic cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(30): p. 28106-12.
39. Lieberoth, A., *Funktionelle Charakterisierung des LewisX-Glykans auf dem Zelladhäsionsmolekül CD24 im Nervensystem der Maus*. 2008, Universität Hamburg: Hamburg.
40. Zarn, J.A., S.M. Zimmermann, M.K. Pass, R. Waibel, and R.A. Stahel, *Association of CD24 with the kinase c-fgr in a small cell lung cancer cell line and with the kinase lyn in an erythroleukemia cell line*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **225**(2): p. 384-91.
41. Brendel, F., *Untersuchungen zu der zuckerabhängigen Interaktion der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle L1 und CD24 und ihrer funktionellen Bedeutung im Nervensystem der Maus*. 2005, Universität Hamburg: Hamburg.
42. Kottgen, E., W. Reutter, and R. Tauber, *[Human lectins and their correspondent glycans in cell biology and clinical medicine]*. Med Klin (Munich), 2003. **98**(12): p. 717-38.
43. Wopereis, S., D.J. Lefeber, E. Morava, and R.A. Wevers, *Mechanisms in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: a review*. Clin Chem, 2006. **52**(4): p. 574-600.
44. Varki, A., *Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct*. Glycobiology, 1993. **3**(2): p. 97-130.
45. Zhao, Y.Y., M. Takahashi, J.G. Gu, E. Miyoshi, A. Matsumoto, S. Kitazume, and N. Taniguchi, *Functional roles of N-glycans in cell signaling and cell adhesion in cancer*. Cancer Sci, 2008. **99**(7): p. 1304-10.
46. Raman, R., S. Raguram, G. Venkataraman, J.C. Paulson, and R. Sasisekharan, *Glycomics: an integrated systems approach to structure-function relationships of glycans*. Nat Methods, 2005. **2**(11): p. 817-24.
47. Lehle, L., S. Strahl, and W. Tanner, *Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases*. Angew Chem Int Ed Engl, 2006. **45**(41): p. 6802-18.
48. Gavel, Y. and G. von Heijne, *Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering*. Protein Eng, 1990. **3**(5): p. 433-42.
49. Lowe, J.B. and J.D. Marth, *A genetic approach to Mammalian glycan function*. Annu Rev Biochem, 2003. **72**: p. 643-91.
50. Peter-Katalinic, J., *Methods in enzymology: O-glycosylation of proteins*. Methods Enzymol, 2005. **405**: p. 139-71.

51. Hounsell, E.F., M.J. Davies, and D.V. Renouf, *O-linked protein glycosylation structure and function*. Glycoconj J, 1996. **13**(1): p. 19-26.
52. Endo, T., *Structure, function and pathology of O-mannosyl glycans*. Glycoconj J, 2004. **21**(1-2): p. 3-7.
53. Chiba, A., K. Matsumura, H. Yamada, T. Inazu, T. Shimizu, S. Kusunoki, I. Kanazawa, A. Kobata, and T. Endo, *Structures of sialylated O-linked oligosaccharides of bovine peripheral nerve alpha-dystroglycan. The role of a novel O-mannosyl-type oligosaccharide in the binding of alpha-dystroglycan with laminin*. J Biol Chem, 1997. **272**(4): p. 2156-62.
54. Chai, W., C.T. Yuen, H. Kogelberg, R.A. Carruthers, R.U. Margolis, T. Feizi, and A.M. Lawson, *High prevalence of 2-mono- and 2,6-di-substituted manol-terminating sequences among O-glycans released from brain glycopeptides by reductive alkaline hydrolysis*. Eur J Biochem, 1999. **263**(3): p. 879-88.
55. Many, H., T. Suzuki, K. Akasaka-Many, H.K. Ishida, M. Mizuno, Y. Suzuki, T. Inazu, N. Dohmae, and T. Endo, *Regulation of mammalian protein O-mannosylation: preferential amino acid sequence for O-mannose modification*. J Biol Chem, 2007. **282**(28): p. 20200-6.
56. Xia, B., J.A. Royall, G. Damera, G.P. Sachdev, and R.D. Cummings, *Altered O-glycosylation and sulfation of airway mucins associated with cystic fibrosis*. Glycobiology, 2005. **15**(8): p. 747-75.
57. Breloy, I., T. Schwientek, B. Gries, H. Razawi, M. Macht, C. Albers, and F.G. Hanisch, *Initiation of mammalian O-mannosylation in vivo is independent of a consensus sequence and controlled by peptide regions within and upstream of the alpha-dystroglycan mucin domain*. J Biol Chem, 2008. **283**(27): p. 18832-40.
58. Burda, P. and M. Aebi, *The dolichol pathway of N-linked glycosylation*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1426**(2): p. 239-57.
59. Molinari, M., *N-glycan structure dictates extension of protein folding or onset of disposal*. Nat Chem Biol, 2007. **3**(6): p. 313-20.
60. Drickamer, K. and M.E. Taylor, *Evolving views of protein glycosylation*. Trends Biochem Sci, 1998. **23**(9): p. 321-4.
61. Freeze, H.H. and M. Aebi, *Altered glycan structures: the molecular basis of congenital disorders of glycosylation*. Curr Opin Struct Biol, 2005. **15**(5): p. 490-8.
62. Willer, T., M.C. Valero, W. Tanner, J. Cruces, and S. Strahl, *O-mannosyl glycans: from yeast to novel associations with human disease*. Curr Opin Struct Biol, 2003. **13**(5): p. 621-30.
63. Brockhausen, I., ed. *Biosynthesis of O-glycans of the N-acetylgalactosamine-alpha-Ser/Thr linkage type*. Glycoproteins. , ed. S.H. Montreuil J, Vliegenthart. 1995, JFG. Amsterdam: Elsevier Science BV 201-260.
64. Van den Steen, P., P.M. Rudd, R.A. Dwek, and G. Opdenakker, *Concepts and principles of O-linked glycosylation*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1998. **33**(3): p. 151-208.
65. Alavi, A. and J.S. Axford, *Sweet and sour: the impact of sugars on disease*. Rheumatology (Oxford), 2008. **47**(6): p. 760-70.
66. Spiro, R.G., *Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds*. Glycobiology, 2002. **12**(4): p. 43R-56R.
67. Marquardt, T. and J. Denecke, *Congenital disorders of glycosylation: review of their molecular bases, clinical presentations and specific therapies*. Eur J Pediatr, 2003. **162**(6): p. 359-79.

68. Freeze, H.H., *Congenital Disorders of Glycosylation: CDG-I, CDG-II, and beyond*. Curr Mol Med, 2007. **7**(4): p. 389-96.
69. Leroy, J.G., *Congenital disorders of N-glycosylation including diseases associated with O- as well as N-glycosylation defects*. Pediatr Res, 2006. **60**(6): p. 643-56.
70. Lengeler, K.B., D. Tielker, and J.F. Ernst, *Protein-O-mannosyltransferases in virulence and development*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(4): p. 528-44.
71. Moore, C.J. and J.E. Hewitt, *Dystroglycan glycosylation and muscular dystrophy*. Glycoconj J, 2009. **26**(3): p. 349-57.
72. Kleene, R. and M. Schachner, *Glycans and neural cell interactions*. Nat Rev Neurosci, 2004. **5**(3): p. 195-208.
73. Jessell, T.M., M.A. Hynes, and J. Dodd, *Carbohydrates and carbohydrate-binding proteins in the nervous system*. Annu Rev Neurosci, 1990. **13**: p. 227-55.
74. Geyer, H. and R. Geyer, *Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1764**(12): p. 1853-69.
75. Ceroni, A., 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, 2008. **7**(4): p. 1650-9.
76. Anumula, K.R., *Quantitative determination of monosaccharides in glycoproteins by high-performance liquid chromatography with highly sensitive fluorescence detection*. Anal Biochem, 1994. **220**(2): p. 275-83.
77. Geyer, R., H. Geyer, S. Kuhnhardt, W. Mink, and S. Stirm, *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, 1983. **133**(1): p. 197-207.
78. Geyer, R. and H. Geyer, *Saccharide linkage analysis using methylation and other techniques*. Methods Enzymol, 1994. **230**: p. 86-108.
79. Haselbeck, A. and W. Hosel, *Immunological detection of glycoproteins on blots based on labeling with digoxigenin*. Methods Mol Biol, 1993. **14**: p. 161-73.
80. Cummings, R.D., *Use of lectins in analysis of glycoconjugates*. Methods Enzymol, 1994. **230**: p. 66-86.
81. Feizi, T. and W. Chai, *Oligosaccharide microarrays to decipher the glyco code*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(7): p. 582-8.
82. Hanisch, F.G., B.N. Green, R. Bateman, and J. Peter-Katalinic, *Localization of O-glycosylation sites of MUC1 tandem repeats by QTOF ESI mass spectrometry*. J Mass Spectrom, 1998. **33**(4): p. 358-62.
83. Wuhrer, M., C.H. Hokke, and A.M. Deelder, *Glycopeptide analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight mass spectrometry reveals novel features of horseradish peroxidase glycosylation*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2004. **18**(15): p. 1741-8.
84. Geyer, H. and R. Geyer, *Strategies for glycoconjugate analysis*. Acta Anat (Basel), 1998. **161**(1-4): p. 18-35.
85. Huang, Y., Y. Mechref, and M.V. Novotny, *Microscale nonreductive release of O-linked glycans for subsequent analysis through MALDI mass spectrometry and capillary electrophoresis*. Anal Chem, 2001. **73**(24): p. 6063-9.
86. Natsuka, S., M. Ishida, A. Ichikawa, K. Ikura, and S. Hase, *Comparative biochemical study of N-linked glycans from skin of a squid, Todarodes pacificus*. J Biochem, 2006. **140**(1): p. 87-93.
87. Parry, S., N.K. Wong, R.L. Easton, M. Panico, S.M. Haslam, H.R. Morris, P. Anderson, K.L. Klotz, J.C. Herr, A.B. Diekman, and A. Dell, *The sperm agglutination antigen-1 (SAGA-1) glycoforms of CD52 are O-glycosylated*. Glycobiology, 2007. **17**(10): p. 1120-6.

88. Merry, A.H., D.C. Neville, L. Royle, B. Matthews, D.J. Harvey, R.A. Dwek, and P.M. Rudd, *Recovery of intact 2-aminobenzamide-labeled O-glycans released from glycoproteins by hydrazinolysis*. Anal Biochem, 2002. **304**(1): p. 91-9.
89. Chai, W., T. Feizi, C.T. Yuen, and A.M. Lawson, *Nonreductive release of O-linked oligosaccharides from mucin glycoproteins for structure/function assignments as neoglycolipids: application in the detection of novel ligands for E-selectin*. Glycobiology, 1997. **7**(6): p. 861-72.
90. Dell, A., Chalabi, S., Hitchen, P.G., Jang-Lee J., Ledger, V., North, S.J., Pang, P.-C., Parry, S., Sutton-Smith, M., Tissot, B., Morris, H.R., Panico, M., Haslam, S.M., *Mass Spectrometry of Glycoprotein Glycans: Glycomics and Glycoproteomics*, in *Comprehensive Glycoscience from Chemistry to Systems Biology*. 2007, Elsevier. p. 69-93.
91. Mechref, Y. and M.V. Novotny, *Structural investigations of glycoconjugates at high sensitivity*. Chem Rev, 2002. **102**(2): p. 321-69.
92. Wuhrer, M., C.A. Koeleman, A.M. Deelder, and C.H. Hokke, *Normal-phase nanoscale liquid chromatography-mass spectrometry of underivatized oligosaccharides at low-femtomole sensitivity*. Anal Chem, 2004. **76**(3): p. 833-8.
93. Kuraya, N. and S. Hase, *Analysis of pyridylaminated O-linked sugar chains by two-dimensional sugar mapping*. Anal Biochem, 1996. **233**(2): p. 205-11.
94. Ciucanu, K., *A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates*. Carbohydrate Research, 1984. **131**: p. 209-217.
95. Ashline, D.J., A.J. Lapadula, Y.H. Liu, M. Lin, M. Grace, B. Pramanik, and V.N. Reinhold, *Carbohydrate structural isomers analyzed by sequential mass spectrometry*. Anal Chem, 2007. **79**(10): p. 3830-42.
96. Björndal, H., Lindberg, B., Svensson, S., Carbohydrate Research, 1967. **5**.
97. Hakomori, S., *A Rapid Permethylation of Glycolipid, and Polysaccharide Catalyzed by Methylsulfinyl Carbanion in Dimethyl Sulfoxide*. J Biochem (Tokyo), 1964. **55**: p. 205-8.
98. Geyer, H., S. Schmitt, M. Wuhrer, and R. Geyer, *Structural analysis of glycoconjugates by on-target enzymatic digestion and MALDI-TOF-MS*. Anal Chem, 1999. **71**(2): p. 476-82.
99. Morelle, W. and J.C. Michalski, *Glycomics and mass spectrometry*. Curr Pharm Des, 2005. **11**(20): p. 2615-45.
100. Zaia, J., *Mass spectrometry of oligosaccharides*. Mass Spectrom Rev, 2004. **23**(3): p. 161-227.
101. Spengler, B. and R.J. Cotter, *Ultraviolet laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins above 100,000 daltons by pulsed ion extraction time-of-flight analysis*. Anal Chem, 1990. **62**(8): p. 793-6.
102. Hillenkamp, F. and M. Karas, *Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization*. Methods Enzymol, 1990. **193**: p. 280-95.
103. Pfenninger, A., M. Karas, B. Finke, B. Stahl, and G. Sawatzki, *Matrix optimization for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of oligosaccharides from human milk*. J Mass Spectrom, 1999. **34**(2): p. 98-104.
104. Sagi, D., Peter-Katalinic, J., *MALDI-MS of Glycans*, in *MALDI MS A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Application*, F. Hillenkamp, Peter-Katalinic, J., Editor. 2007, Wiley-VCH. p. 181-214.
105. O'Connor, P.B., Hillenkamp, F., *MALDI Mass Spectrometry Instrumentation*, in *MALDI MS - A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications*, F. Hillenkamp, Peter-Katalinic, J., Editor. 2007, Wiley-VCH. p. 29-82.

106. Wuhrer, M., M.I. Catalina, A.M. Deelder, and C.H. Hokke, *Glycoproteomics based on tandem mass spectrometry of glycopeptides*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007. **849**(1-2): p. 115-28.
107. Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., *Electrospray ionization-Principles and practice*. Mass Spectrometry Reviews, 1990. **9**: p. 37-70.
108. Kawasaki, N., Itoh, S. Harazono, A., Hashii, N., Masuishi, Y., Hayakawa, T., Kawanishi, T., *Mass Spectrometry of Glycoproteins*. Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 2005. **17**: p. 193-203.
109. Harvey, D.J., *Collision-induced fragmentation of underivatized N-linked carbohydrates ionized by electrospray*. J Mass Spectrom, 2000. **35**(10): p. 1178-90.
110. Maass, K., R. Ranzinger, H. Geyer, C.W. von der Lieth, and R. Geyer, "Glyco-peakfinder"--de novo composition analysis of glycoconjugates. Proteomics, 2007. **7**(24): p. 4435-44.
111. Domon, B. and C.E. Costello, *Structure elucidation of glycosphingolipids and gangliosides using high-performance tandem mass spectrometry*. Biochemistry, 1988. **27**(5): p. 1534-43.
112. Hase, S., *High-performance liquid chromatography of pyridylaminated saccharides*. Methods Enzymol, 1994. **230**: p. 225-37.
113. Kang, P., Y. Mechref, I. Klouckova, and M.V. Novotny, *Solid-phase permethylation of glycans for mass spectrometric analysis*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2005. **19**(23): p. 3421-8.
114. Kang, P., Y. Mechref, and M.V. Novotny, *High-throughput solid-phase permethylation of glycans prior to mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2008. **22**(5): p. 721-34.
115. Prien, J.M., D.J. Ashline, A.J. Lapadula, H. Zhang, and V.N. Reinhold, *The High Mannose Glycans from Bovine Ribonuclease B Isomer Characterization by Ion Trap MS*. J Am Soc Mass Spectrom, 2008.
116. Wada, Y., P. Azadi, C.E. Costello, A. Dell, R.A. Dwek, H. Geyer, R. Geyer, K. Takeuchi, N.G. Karlsson, K. Kato, N. Kawasaki, K.H. Khoo, S. Kim, A. Kondo, E. Lattova, Y. Mechref, E. Miyoshi, K. Nakamura, H. Narimatsu, M.V. Novotny, N.H. Packer, H. Perreault, J. Peter-Katalinic, G. Pohlentz, V.N. Reinhold, P.M. Rudd, A. Suzuki, and N. Taniguchi, *Comparison of the methods for profiling glycoprotein glycans--HUPO Human Disease Glycomics/Proteome Initiative multi-institutional study*. Glycobiology, 2007. **17**(4): p. 411-22.
117. Costello, C.E., J.M. Contado-Miller, and J.F. Cipollo, *A glycomics platform for the analysis of permethylated oligosaccharide alditols*. J Am Soc Mass Spectrom, 2007. **18**(10): p. 1799-812.
118. Yu, S.Y., S.W. Wu, and K.H. Khoo, *Distinctive characteristics of MALDI-Q/TOF and TOF/TOF tandem mass spectrometry for sequencing of permethylated complex type N-glycans*. Glycoconj J, 2006. **23**(5-6): p. 355-69.
119. Mechref, Y., P. Kang, and M.V. Novotny, *Differentiating structural isomers of sialylated glycans by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight tandem mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2006. **20**(8): p. 1381-9.
120. Tabatabai, L.B., *Fetuin is a substrate for Pasteurella haemolytica O-sialoglycoprotease*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **212**(3): p. 981-7.
121. Strahl-Bolsinger, S., M. Gentzsch, and W. Tanner, *Protein O-mannosylation*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1426**(2): p. 297-307.
122. Endo, T., *O-mannosyl glycans in mammals*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1473**(1): p. 237-46.

123. Yuen, C.T., W. Chai, R.W. Loveless, A.M. Lawson, R.U. Margolis, and T. Feizi, *Brain contains HNK-1 immunoreactive O-glycans of the sulfoglucuronyl lactosamine series that terminate in 2-linked or 2,6-linked hexose (mannose)*. J Biol Chem, 1997. **272**(14): p. 8924-31.
124. Hoffmann, A., M. Nimtz, U. Wurster, and H.S. Conradt, *Carbohydrate structures of beta-trace protein from human cerebrospinal fluid: evidence for "brain-type" N-glycosylation*. J Neurochem, 1994. **63**(6): p. 2185-96.
125. Yamamoto, H., J. Swoger, S. Greene, T. Saito, J. Hurh, C. Sweeley, J. Leestma, E. Mkrdichian, L. Cerullo, A. Nishikawa, Y. Ihara, N. Taniguchi, and J.R. Moskal, *Beta1,6-N-acetylglucosamine-bearing N-glycans in human gliomas: implications for a role in regulating invasivity*. Cancer Res, 2000. **60**(1): p. 134-42.
126. Rebbaa, A., P.M. Chou, I. Vucic, B.L. Mirkin, T. Tomita, and E.G. Bremer, *Expression of bisecting GlcNAc in pediatric brain tumors and its association with tumor cell response to vinblastine*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(11): p. 3661-8.
127. Bhattacharyya, R., M. Bhaumik, T.S. Raju, and P. Stanley, *Truncated, inactive N-acetylglucosaminyltransferase III (GlcNAc-TIII) induces neurological and other traits absent in mice that lack GlcNAc-TIII*. J Biol Chem, 2002. **277**(29): p. 26300-9.
128. Heiland, P.C., L.S. Griffith, R. Lange, M. Schachner, B. Hertlein, O. Traub, and B. Schmitz, *Tyrosine and serine phosphorylation of the neural cell adhesion molecule L1 is implicated in its oligomannosidic glycan dependent association with NCAM and neurite outgrowth*. Eur J Cell Biol, 1998. **75**(2): p. 97-106.
129. Cointe, D., R. Beliard, S. Jorieux, Y. Leroy, A. Glacet, A. Verbert, D. Bourel, and F. Chirat, *Unusual N-glycosylation of a recombinant human erythropoietin expressed in a human lymphoblastoid cell line does not alter its biological properties*. Glycobiology, 2000. **10**(5): p. 511-9.
130. Lowe, J.B., L.M. Stoolman, R.P. Nair, R.D. Larsen, T.L. Berhend, and R.M. Marks, *ELAM-1--dependent cell adhesion to vascular endothelium determined by a transfected human fucosyltransferase cDNA*. Cell, 1990. **63**(3): p. 475-84.
131. Wittig, O., P. Taylor, R. Montano, J. Alonso, and E. Romano, *Production of human monoclonal antibodies against Galalpha(1-3)Gal*. Xenotransplantation, 2002. **9**(3): p. 164-8.
132. Kim, Y.G., G.C. Gil, D.J. Harvey, and B.G. Kim, *Structural analysis of alpha-Gal and new non-Gal carbohydrate epitopes from specific pathogen-free miniature pig kidney*. Proteomics, 2008. **8**(13): p. 2596-610.
133. Kalovidouris, S.A., C.I. Gama, L.W. Lee, and L.C. Hsieh-Wilson, *A role for fucose alpha(1-2) galactose carbohydrates in neuronal growth*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(5): p. 1340-1.
134. Krug, M., M. Wagner, S. Staak, and K.H. Smalla, *Fucose and fucose-containing sugar epitopes enhance hippocampal long-term potentiation in the freely moving rat*. Brain Res, 1994. **643**(1-2): p. 130-5.
135. Smalla, K.H., F. Angenstein, K. Richter, E.D. Gundelfinger, and S. Staak, *Identification of fucose alpha(1-2) galactose epitope-containing glycoproteins from rat hippocampus*. Neuroreport, 1998. **9**(5): p. 813-7.
136. Brito, C., C. Escrevente, C.A. Reis, V.M. Lee, J.Q. Trojanowski, and J. Costa, *Increased levels of fucosyltransferase IX and carbohydrate Lewis(x) adhesion determinant in human NT2N neurons*. J Neurosci Res, 2007. **85**(6): p. 1260-70.
137. Sajdel-Sulkowska, E.M., *Immunofluorescent detection of CD15-fucosylated glycoconjugates in primary cerebellar cultures and their function in glial-neuronal adhesion in the central nervous system*. Acta Biochim Pol, 1998. **45**(3): p. 781-90.

138. Yanagisawa, M. and R.K. Yu, *The expression and functions of glycoconjugates in neural stem cells*. Glycobiology, 2007. **17**(7): p. 57R-74R.
139. Vyas, A.A. and R.L. Schnaar, *Brain gangliosides: functional ligands for myelin stability and the control of nerve regeneration*. Biochimie, 2001. **83**(7): p. 677-82.
140. Teinturier-Lelievre, M., S. Julien, S. Juliant, Y. Guerardel, M. Duonor-Cerutti, P. Delannoy, and A. Harduin-Lepers, *Molecular cloning and expression of a human hST8Sia VI (alpha2,8-sialyltransferase) responsible for the synthesis of the diSia motif on O-glycosylproteins*. Biochem J, 2005. **392**(Pt 3): p. 665-74.
141. Sato, C., T. Matsuda, and K. Kitajima, *Neuronal differentiation-dependent expression of the disialic acid epitope on CD166 and its involvement in neurite formation in Neuro2A cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(47): p. 45299-305.
142. Cayrol, R., K. Wosik, J.L. Berard, A. Dodelet-Devillers, I. Ifergan, H. Kebir, A.S. Haqqani, K. Kreymborg, S. Krug, R. Moumdjian, A. Bouthillier, B. Becher, N. Arbour, S. David, D. Stanimirovic, and A. Prat, *Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system*. Nat Immunol, 2008. **9**(2): p. 137-45.
143. Rinninger, A., C. Richet, A. Pons, G. Kohla, R. Schauer, H.C. Bauer, J.P. Zanetta, and R. Vlasak, *Localisation and distribution of O-acetylated N-acetylneuraminic acids, the endogenous substrates of the hemagglutinin-esterases of murine coronaviruses, in mouse tissue*. Glycoconj J, 2006. **23**(1-2): p. 73-84.
144. Varki, A., *Multiple changes in sialic acid biology during human evolution*. Glycoconj J, 2009. **26**(3): p. 231-45.
145. Schauer, R., *Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man*. Zoology (Jena), 2004. **107**(1): p. 49-64.
146. Morita, I., Y. Kizuka, S. Kakuda, and S. Oka, *Expression and function of the HNK-1 carbohydrate*. J Biochem, 2008. **143**(6): p. 719-24.
147. Kruse, J., G. Keilhauer, A. Faissner, R. Timpl, and M. Schachner, *The J1 glycoprotein--a novel nervous system cell adhesion molecule of the L2/HNK-1 family*. Nature, 1985. **316**(6024): p. 146-8.
148. Kruse, J., R. Mailhammer, H. Wernecke, A. Faissner, I. Sommer, C. Goriadis, and M. Schachner, *Neural cell adhesion molecules and myelin-associated glycoprotein share a common carbohydrate moiety recognized by monoclonal antibodies L2 and HNK-1*. Nature, 1984. **311**(5982): p. 153-5.
149. Tian, E. and K.G. Ten Hagen, *Recent insights into the biological roles of mucin-type O-glycosylation*. Glycoconj J, 2009. **26**(3): p. 325-34.

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei all` denen bedanken, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben:

An erster Stelle gilt mein Dank Prof. Dr. Rudolf Geyer für die freundliche Aufnahme in seinem Glykolabor, die interessante Themenstellung sowie die Möglichkeit die Ergebnisse des Projektes auf einer Vielzahl von Konferenzen vorzustellen und Auslandserfahrung in einem Kooperationslabor zu sammeln. Ihm und Frau Dr. Hildegard Geyer danke ich herzlich für die Betreuung der Arbeit, hilfreiche Diskussionen, Anregungen und viele, geopferte freie Stunden zur Fertigstellung der Publikationen. An dieser Stelle noch einmal ein Extra-Dankeschön an Dr. Hildegard Geyer zum einen für die Einarbeitung in die Glykolaborpraxis und zum anderen für die große Unterstützung und Geduld bei der Durchsicht der unzähligen Spektren für die Veröffentlichung der Daten.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Spengler danke ich für seine Bereitschaft, diese Arbeit seitens des Fachbereiches 08 zu betreuen.

Besonderer Dank gebührt unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. Melitta Schachner, Dr. habil. Ralf Kleene und Dr. Annika Lieberoth vom Zentrum für Molekulare Neurobiologie der Universität Hamburg für eine angenehme und erfolgreiche Zusammenarbeit, für die Bereitstellung von Hirnen und Antikörpern und schließlich für das Kennenlernen der Methoden zur Isolation und Aufreinigung von CD24.

Bei Prof. Dr. Vernon Reinhold und seiner Laborcrew, insbesondere Dr. Justin Prien, Hui Zhou und Dr. David Ashline, bedanke ich mich herzlich für die Aufnahme im Glycomics Center an der Universität New Hampshire in Durham und die Möglichkeit während meines zweimonatigen Aufenthalts neue Methoden zu erlernen und viele wichtige Messungen für dieses Projekt durchzuführen.

Prof. Dr. Ten Feizi und Dr. Yan Liu vom Imperial College London danke ich für die erfolgreiche Durchführung der Immunoblottingassays.

Dr. Michael Ginz möchte ich für den Schubs in diese richtige Richtung bzw. dieses Giessener Labor danken. Hier durfte ich mit vielen tollen Menschen zusammenarbeiten, von denen ich nicht nur fachlich viel lernen konnte. Danke für offene Ohren, zahlreiche Hilfestellungen, Motivation, schöne Stunden und Spaß an: Dr. Sebastian Galuska, Dr. Julia Grabitzki, Dr. Tobias Lehr, Dr. Kai Maaß, Dr. Sandra Meyer, Martin Schmidt, PD Dr. Günter Lochnit, PD Dr. Roger Dennis, Michael Gillmann, Alice Vohmann, Moritz Kaup, Benedikt Schäfer, Dennis Blank, Sandra Frank, René Röhrich, Christina Ulm und Sandra Müller. Ein zusätzlicher Dank gebührt den „Kellerkindern“ Peter Kaese, Siegfried Kühnhardt und Werner Mink für die Durchführung der ein oder anderen Bausteinanalyse, ESI-MS-Messungen und den herausfordernden Methylierungsanalysen.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern Burgi & Hans-Peter Bleckmann und meiner Schwester Juliane Bleckmann, und all` denen, die mir wichtig sind. Ohne Eure Unterstützung und Euren Zuspruch wäre diese Arbeit wohl nur unter erschwerten Bedingungen möglich gewesen. Danke, dass Ihr mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden habt, für mich da gewesen seid und mich durch eine nicht immer einfache aber durch Euch immer schöne Zeit begleitet habt. Huuuuii, es ist geschafft!

DANKE!

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

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.

Gießen, den 29. April 2009 _____

(Christina Bleckmann)

