


LC|GC's **CHROM**academy

powered by crawford scientific



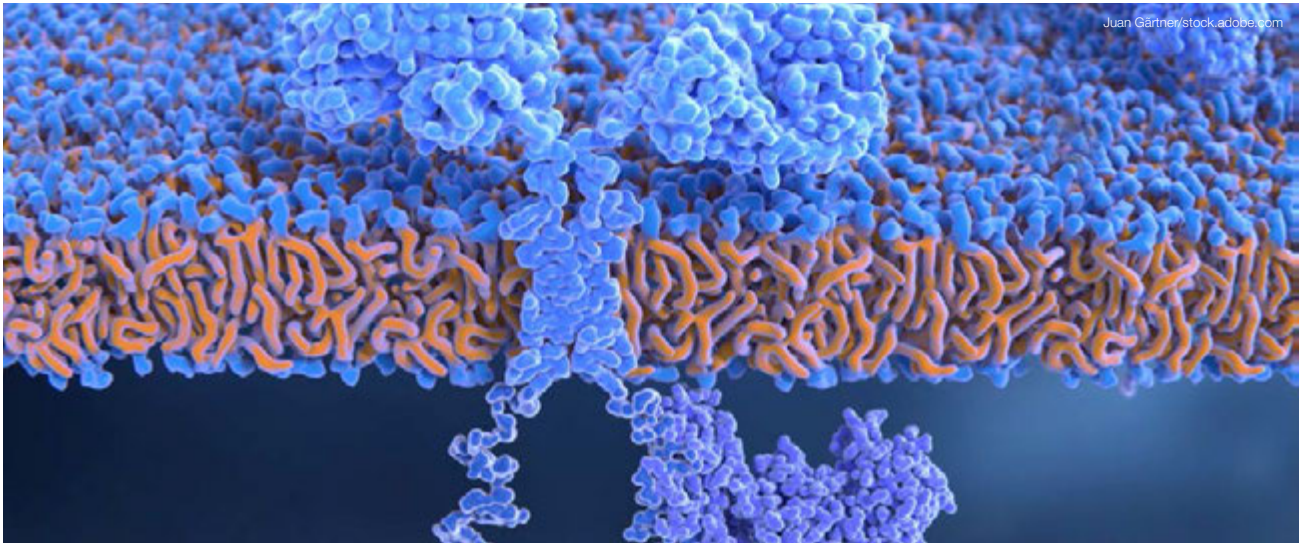
Neuartige Lösungen zur Trennung, Identifizierung und Quantifizierung von Biomolekülen

Glykosylierungs- und
Sialinsäureanalyse
biotherapeutischer
Glycoproteine

Zweidimensionale
Flüssigchromatographie
für die Trennung von
Biomolekülen

Identifizierung, Mapping
und Quantifizierung
von SARS-CoV-2-Spike-
Glykopeptiden

Dieses individuell zusammengestellte eBook ist von Agilent gesponsert
und wird in Partnerschaft mit *CHROMAcademy* präsentiert.



Glykosylierungs- und Sialinsäureanalyse biotherapeutischer Glycoproteine

John Yan

Ansätze zur Identifizierung verschiedener sialylierter N-Glykan-Spezies und zur Quantifizierung des Sialinsäuregehalts biotherapeutischer Glycoproteine unter Verwendung von plattenbasierten und LC/FLD/MS-Methoden.

Einleitung

Sialinsäure spielt eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung der Wirksamkeit rekombinanter therapeutischer Glycoproteine. Das Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein von Sialinsäure am nicht-reduzierenden Ende von Glykanen kann nicht nur die Pharmakokinetik des Protein-Biotherapeutikums, sondern auch seine Immunogenität beeinflussen. Daher ist es erforderlich, die Sialylierung während der Herstellung zu überwachen und zu kontrollieren. Dieser Artikel präsentiert einen Ansatz zur Identifizierung verschiedener sialylierter N-Glykan-Spezies und zur Quantifizierung des Sialinsäuregehalts biotherapeutischer Glycoproteine unter Verwendung von plattenbasierter Chromatographie und Flüssigchromatographie (LC) und Detektionsmethoden auf der Basis von Fluoreszenz (FL) und Massenspektrometrie (MS). Ebenfalls erörtert werden die Vorteile von Fluoreszenzfarbstoffen für die N-Glykan-Analyse, die Verbesserung der Sialinsäurequantifizierung und die Analyse-Workflows sowie chromatographische Trennoptionen, bei denen sowohl Fluoreszenz- als auch Massenspektrometrie (MS)-Detektion zum Einsatz kommt.

GLYKOSYLIERUNGS- UND SIALINSÄUREANALYSE BIOTHERAPEUTISCHER GLYCOPROTEINE

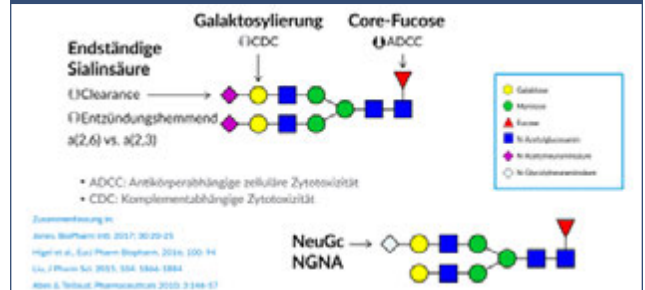
Glykosylierte Biotherapeutika

Obwohl ein Fünftel aller Proteine in der SwissProt-Datenbank glykosyliert sind, kam der Glykomik bisher nicht die gleiche Aufmerksamkeit wie der Genomik und Proteomik zu. Glykosylierung kann die Faltung, Stabilität und Funktion eines Proteins beeinflussen und basierend auf Unterschieden in Bezug auf die Glykosylierungsstelle, Glykanzusammensetzung, Glykanlänge und -struktur Diversität verleihen. Mehr als 60 % der im Handel erhältlichen Biotherapeutika sind glykosyliert. Die Glykosylierung kann ein kritisches Qualitätsmerkmal sein und/oder als Produktqualitätsmerkmal überwacht werden. Die beiden Hauptformen der Glykosylierung sind die Addition von O-verknüpften Glykanen und N-verknüpften Glykanen. In Biotherapeutika ist jedoch die N-verknüpfte Glykosylierung, bei der Glykane an den Amidstickstoff von Asparaginresten innerhalb einer definierten Konsensussequenz gebunden werden, die am häufigsten vorkommende Glykosylierungsart.

Im Jahr 2010 war Epogen das einzige Biologikum unter den 10 meistverkauften Arzneimitteln, das glykosyliert ist. Im Jahr 2018 waren bereits sieben der zehn meistverkauften pharmazeutischen Produkte glykosylierte Biologika, mit Humira an der Spitze, was den allgemeinen Trend in der Pharmaindustrie hin zu Biopharmazeutika verdeutlicht.

Biopharmazeutika sind aus Sicht der analytischen Charakterisierung deutlich komplexer als niedermolekulare Verbindungen. Aspirin, ein niedermolekularer Arzneistoff, hat beispielsweise eine Molekülmasse von nur ungefähr 180 Da. Im Vergleich dazu haben biopharmazeutische Arzneimittel auf der Basis von Immunglobulin G (IgG) eine Molekülmasse von ca. 150.000 Da und weisen eine Vielzahl von posttranslationalen Modifikationen (einschließlich Glykosylierung) auf, die die Wirkung des Arzneimittels

ABB. 1: Auswirkung der N-Glykan-Struktur auf Biotherapeutika.



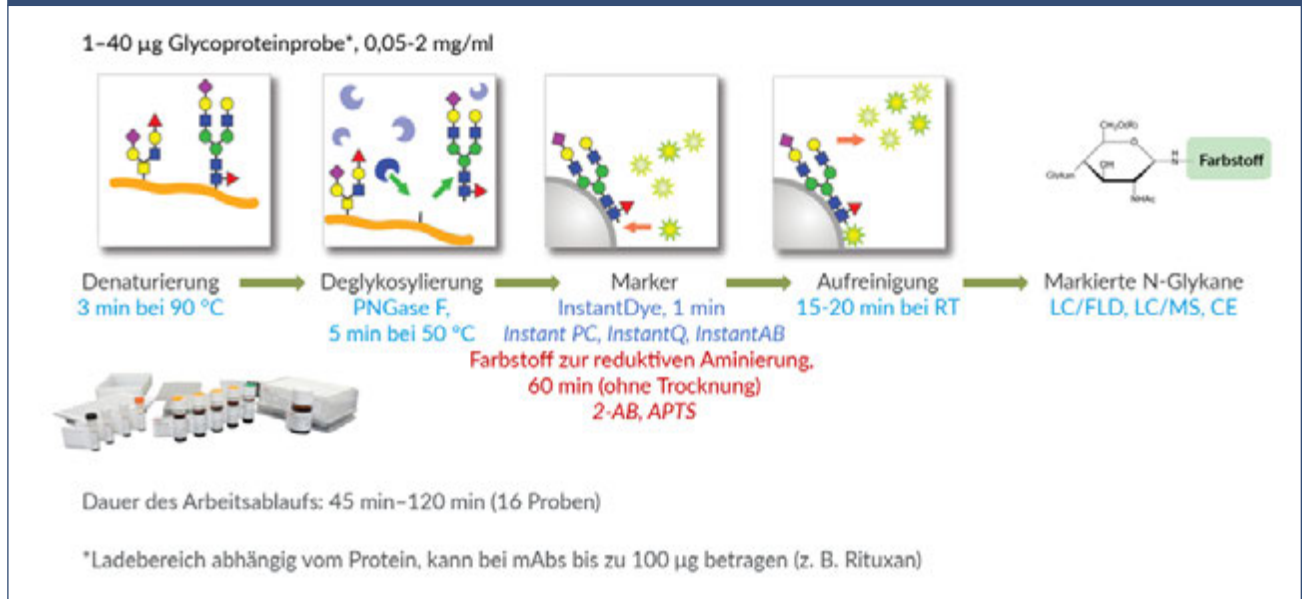
beeinflussen können. Glykane bestehen aus mehreren Monosaccharid-Einheiten wie Fucose, Mannose, Galactose, N-Acetylglucosamin und verschiedenen Sialinsäuren (siehe ABB. 1). Das Vorhandensein von Core-Fucose reduziert die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC), was bei Krebstherapeutika wichtig ist. Aus diesem Grund versuchen Unternehmen, die Biotherapeutika entwickeln, die Menge an Core-Fucose zu reduzieren, um die ADCC-Aktivität zu maximieren. In der Literatur wurde auch gezeigt, dass Galaktosylierung die komplementabhängige Zytotoxizität (CDC) verstärken kann, während das Vorhandensein einer terminalen Sialinsäure die Clearance-Geschwindigkeit verringern kann, wodurch sich wiederum die Verweildauer des Therapeutikums im Körper verlängert.

N-Glykan-Analytik

Für die N-Glykan-Analytik stehen viele verschiedene Techniken zur Verfügung. Auf der Ebene des intakten Proteins können Auftrennungen durch LC in Kombination mit hochauflösender präziser Massenspektrometrie verwendet werden, um Aufschluss über die Art der vorhandenen Glykane zu erhalten. Eine andere Möglichkeit besteht darin, eine Protease zu verwenden, um das Glycoprotein zu Peptiden zu verdauen, die dann durch LC getrennt und durch Datenbank-gestützte Tandem-MS analysiert werden können, um positionsspezifische Informationen über die Glykosylierung zu erhalten. Ein weiterer Ansatz beinhaltet die

GLYKOSYLIERUNGS- UND SIALINSÄUREANALYSE BIOTHERAPEUTISCHER GLYCOPROTEINE

ABB. 2: Gly-X-Technologie zur Vorbereitung von N-Glykan-Proben



Analyse der enzymatischen Freisetzung von N-Glykanen aus dem Glycoprotein unter Verwendung von Enzymen wie PNGase F. Die freigesetzten Glykane können so, wie sie sind, analysiert werden oder werden üblicherweise mit einem fluoreszierenden Tag markiert, um LC- oder Kapillarelektrophorese(CE)-Trenntechniken mit Fluoreszenzdetektion zu ermöglichen. Die erhaltenen Daten werden im Allgemeinen als relative % Flächen der verschiedenen Glykanspezies angegeben.

Glykane können auch auf der Ebene des einzelnen Monosaccharids nach Säurehydrolyse entweder direkt oder nach Markierung mit einem fluoreszierenden Tag überwacht werden.

N-Glykan-Probenvorbereitung

Die herkömmliche N-Glykan-Probenvorbereitung kann ein sehr zeitaufwändiger Prozess sein, der einen Tag bis mehrere Tage dauert und Deglykosylierungs- und Markierungsschritte über Nacht beinhaltet. Vor einigen Jahren wurde ein All-in-One-Workflow mit Verwendung herkömmlicher Fluorophore wie 2-Aminobenzamid (2-AB)

und Aminopyrentrisulfonat zur reduktiven Aminierung eingeführt, mit dem sich die Probenvorbereitungszeit auf 5 Stunden verkürzte. Weitere Verbesserungen wurden mit einem schnellen Glykosylamin-reaktiven Farbstoff erzielt, wodurch sich die Vorbereitungszeit auf 3 bis 4 Stunden verkürzte. Vor kurzem wurde die AdvanceBio Gly-X Probenvorbereitungsplattform eingeführt. Diese neue Plattform verkürzt die Vorbereitungszeit für die reduktive Aminierung (2-AB, APTS) auf 2 Stunden und bei Verwendung von Glykosylamin-reaktiven Instantfarbstoffen (InstantPC) auf unter 1 Stunde.

ABB. 2 enthält eine schematische Darstellung der AdvanceBio Gly-X Plattform für die N-Glykan-Probenvorbereitung. Das Glycoprotein wird zunächst mit einem proprietären Reagenz für 3 min bei 90 °C denaturiert und dadurch für die Deglykosylierung durch PNGase F über 5 min bei 50 °C geöffnet. Als nächstes werden freigesetzte Glykane mit einem Fluorophor wie dem Glykosylamin-reaktiven Farbstoff InstantPC in ca. 1 Minute oder einem reduktiven Aminierungsfarbstoff wie 2-AB in

GLYKOSYLIERUNGS- UND SIALINSÄUREANALYSE BIOTHERAPEUTISCHER GLYCOPROTEINE

60 Minuten markiert. Nach der Markierung werden die markierten Glykane aufgereinigt, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen, und sind dann für die Analyse bereit.

Trennung von InstantPC-markierten N-Glykanen

Eine häufig verwendete Methode zur Trennung und Analyse von fluoreszenzmarkierten Glykanen ist die hydrophile Interaktions-LC (HILIC) mit Fluoreszenzdetektion. Auch die Inline-MS-Detektion ist eine Option zur besseren Identifizierung verschiedener Glykanspezies. **ABB. 3** zeigt eine 60-minütige HILIC-Gradientenmethode für die Trennung und Analyse von InstantPC-markierten Glykanen aus Rituximab, einem IgG-Therapeutikum.

Es wird außerdem MS-Detektion verwendet. **ABB. 4** zeigt das Totalionen-Chromatogramm markierter N-Glykane von Enbrel. Das MS-Totalionen-Chromatogramm der InstantPC-markierten Probe spiegelt die Fluoreszenzreaktion nahezu wider, was bei der Identifizierung von Glykanspezies mit geringem Vorkommen hilfreich sein kann. Darüber hinaus gibt es eine Vielzahl von markierten N-Glykan-Standards, die die Identifizierung erleichtern können, wenn keine MS verfügbar ist. Dazu gehören individuelle Glykanstandards, wie gängige biantennäre N-Glykane, die wahrscheinlich auf IgG-Molekülen vorhanden sind, die in Eierstockzellen des Chinesischen Hamsters exprimiert werden, oder auch Bibliotheken bereits markierter Glykane wie Human-IgG und sowohl alpha-(2,6)- als auch alpha-(2,3)-sialylierte Bibliotheken.

2-AB-Arbeitsabläufe

2-AB ist ein gängiger Farbstoff für die Analyse von freigesetztem Glykan. Herkömmliche Arbeitsabläufe mit 2-AB können zeitaufwändig sein, aber wenn für die 2-AB-Markierung ein

aktualisierter und effizienter Arbeitsablauf verwendet wird, kann sie eine praktikable Lösung für all jene sein, die die Vorteile eines schnellen Arbeitsablaufs nutzen möchten und zugleich in der Lage sein müssen, neue Daten mit historischen Daten in Bezug zu setzen. In **ABB. 2** ist ein Express-Workflow mit der AdvanceBio Gly-X-Technologie dargestellt. Es werden bekannte Denaturierungs- und Deglykosylierungsschritte in Lösung mit reduktiver Aminierung der Matrix in einer 96-Well-Aufreinigungsplatte durchgeführt, wodurch ein zusätzlicher Trocknungsschritt vermieden wird. Nach dem Markieren werden die Glykane gereinigt, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Anschließend sind sie für die Analyse bereit. Die Vorbereitung dauert ungefähr 2 Stunden; ältere Methoden können im Vergleich viel mehr Zeit in Anspruch nehmen. **ABB. 5** zeigt ein Beispiel für die Trennung und Analyse von Glykanen aus Rituximab; gezeigt sind hauptsächlich die biantennären neutralen 2-AB-markierten Glykane G0F, G1F und G2F mit niedrigen % VKs für alle wichtigen Glykanspezies.

Quantifizierung von Sialinsäure

Sialinsäure spielt eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung der Wirksamkeit therapeutischer Glycoproteine. Das Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein von Sialinsäure am nicht-reduzierenden Ende von Glykanen kann nicht nur die Pharmakokinetik des Proteins, sondern auch seine Immunogenität beeinflussen. Daher ist es wichtig, dass der Sialinsäuregehalt von Proteintherapeutika erhalten bleibt und kontrolliert wird. Das AdvanceBio Kit zur Quantifizierung des Sialinsäure-Gesamtgehalts stellt einen empfindlichen Hochdurchsatz-Ansatz zur Quantifizierung des Sialinsäure-Gesamtgehalts dar. Die Assays mit 96-Wellplates basieren auf Enzymreaktionen, die mit der Umwandlung der von Sialidase-A freigesetzten Sialinsäure in Wasserstoffperoxid beginnen, das dann eins zu eins mit einem Fluoreszenzfarbstoff reagiert und ein intensives Fluoreszenz- oder Extinktionssignal

GLYKOSYLIERUNGS- UND SIALINSÄUREANALYSE BIOTHERAPEUTISCHER GLYCOPROTEINE

ABB. 3: InstantPC-Glykane von Rituximab.

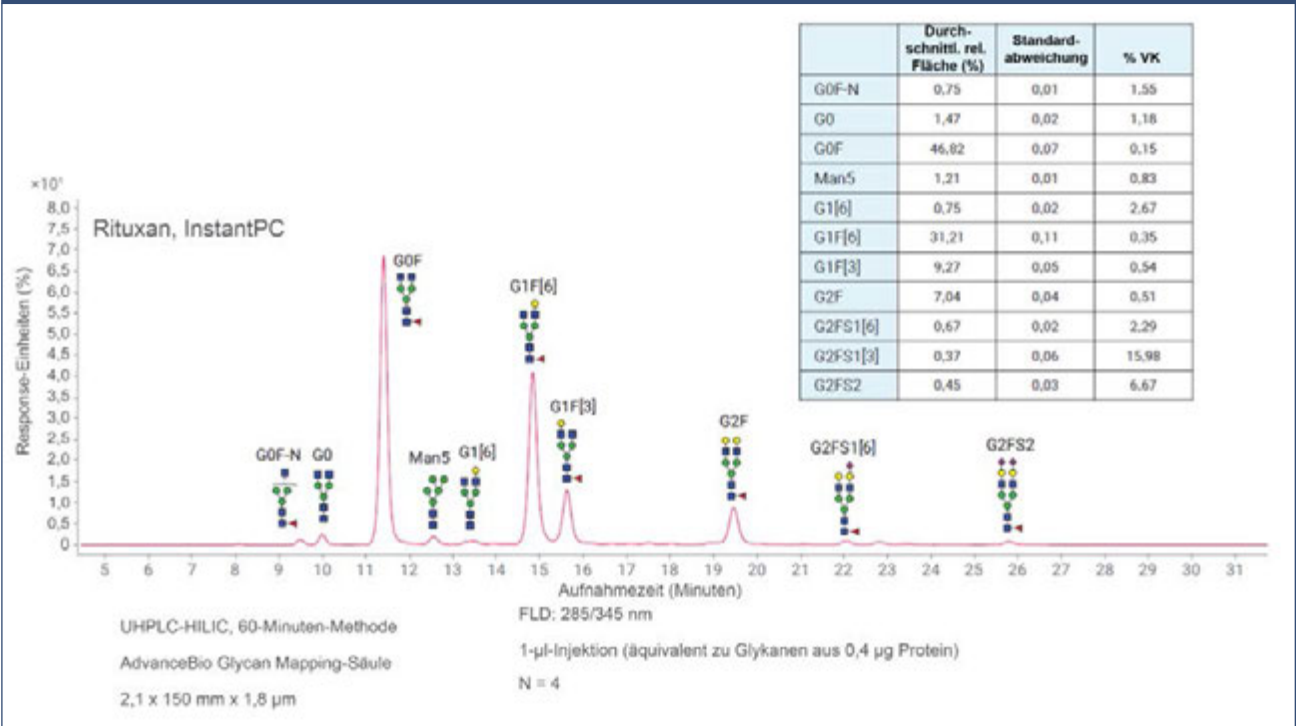
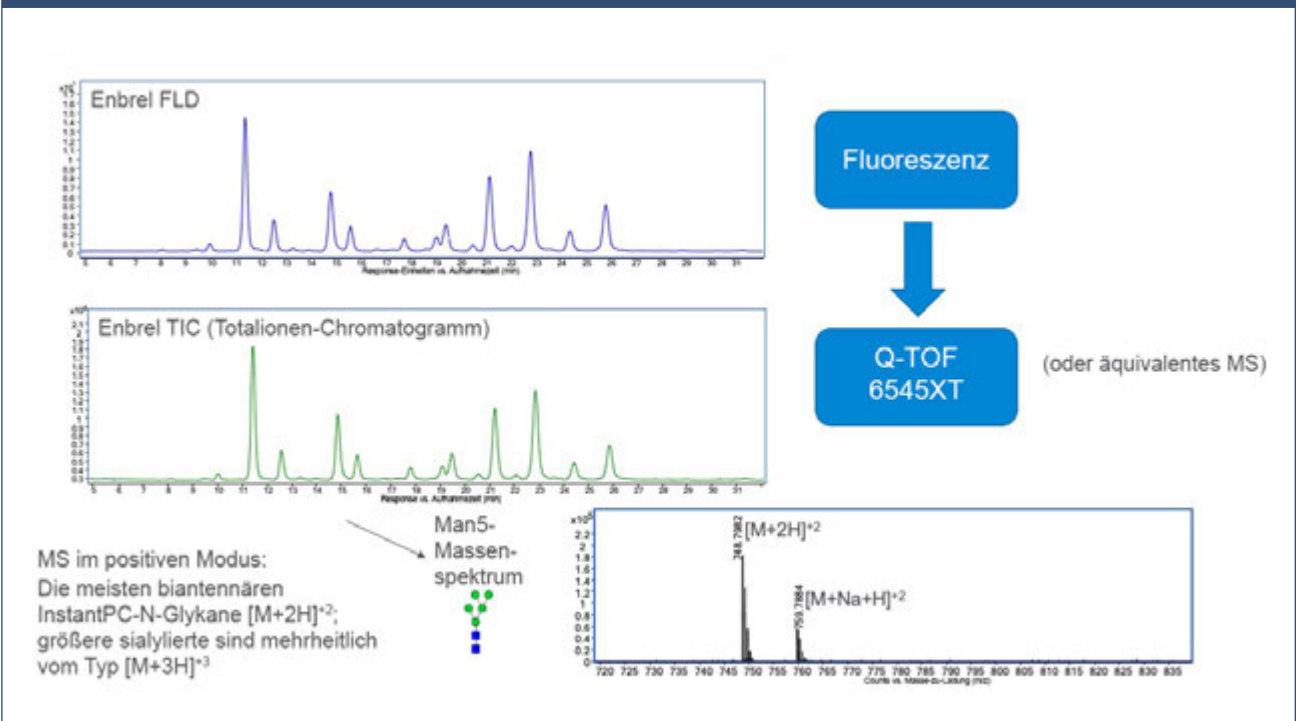
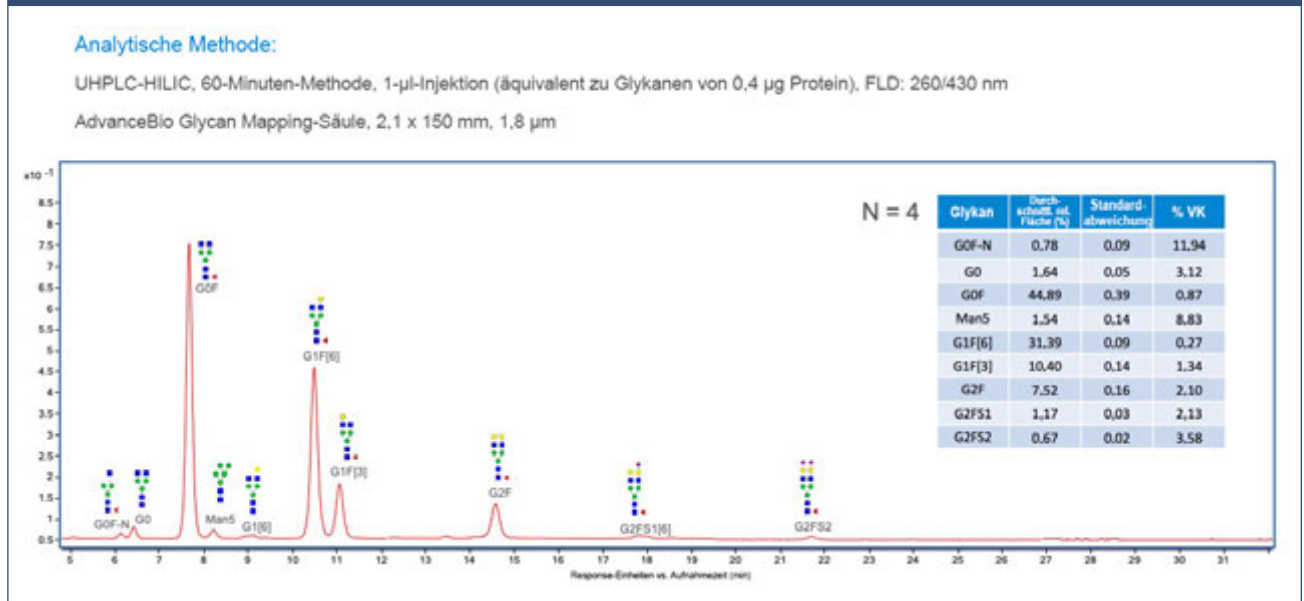


ABB. 4: MS-Totalionen-Chromatogramm von InstantPC-N-Glykanen von Enbrel.



GLYKOSYLIERUNGS- UND SIALINSÄUREANALYSE BIOTHERAPEUTISCHER GLYCOPROTEINE

ABB. 5: Gly-X 2-AB Express N-Glykane von Rituximab.



erzeugt. Verschiedene Glycoproteine können einen unterschiedlichen Grad an Glykosylierung und damit auch einen unterschiedlichen Grad an Sialylierung aufweisen. Daher ist es wichtig, mit einer Proteinmenge zu beginnen, die ein gutes Signal erzeugt. MabThera hat beispielsweise einen geringen Sialinsäuregehalt, sodass eine größere Proteinmenge erforderlich ist, während Fetuin oder Enbrel einen höheren Sialinsäuregehalt aufweisen und daher weniger Protein erforderlich machen.

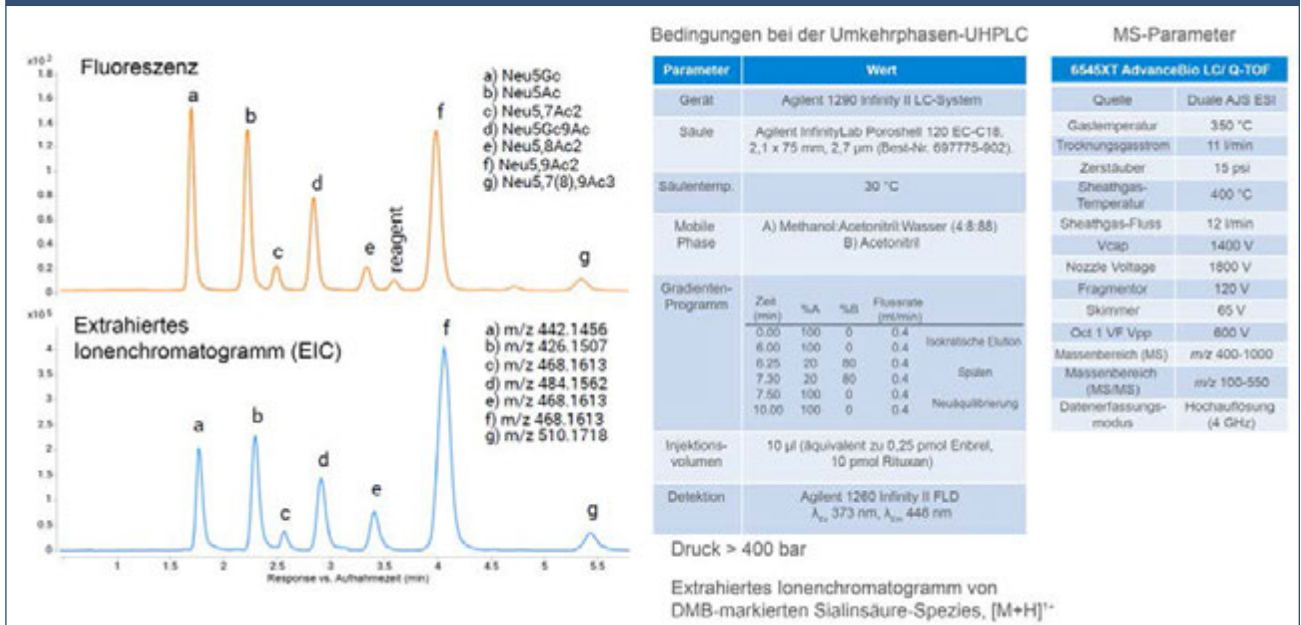
N-Acetylneuraminsäure (NANA) und N-Glycolylneuraminsäure (NGNA) sind Sialinsäure-Arten mit ähnlicher Struktur, die sich nur durch eine zusätzliche Hydroxylgruppe (NGNA) unterscheiden. Dieser kleine Unterschied reicht aus, um NGNA für den Menschen potentiell immunogen zu machen. Eine häufig verwendete Methode zur Unterscheidung zwischen diesen beiden Sialinsäure-Arten besteht darin, die Sialinsäure aus dem Glykan freizusetzen und sie mit dem Farbstoff 1,2-Diamino-4,5-methylendioxybenzol-2HCl (DMB) zu markieren. Dieses Verfahren wird im AdvanceBio Kit zur

Sialinsäure-Profilherstellung und -Quantifizierung verwendet, das auch quantitative NANA- und NGNA-Standards enthält. An die Markierung schließen sich die LC-Trennung und die Detektion durch Fluoreszenz und/oder MS an. In **ABB. 6** ist ein Beispiel für die Analyse eines Sialinsäure-Referenzpanels, einer Mischung verschiedener, mit DMB markierter Sialinsäure-Arten, unter Verwendung von LC und anschließender Fluoreszenz- und MS-Detektion gezeigt. Bei den ersten beiden Peaks im Chromatogramm handelt es sich um NGNA bzw. NANA, bei den restlichen Peaks um verschiedene Versionen von Sialinsäure, die in der Natur vorkommen.

„Das Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein von Sialinsäure am nicht-reduzierenden Ende von Glykanen kann nicht nur die Pharmakokinetik des Proteins, sondern auch seine Immunogenität beeinflussen.“

GLYKOSYLIERUNGS- UND SIALINSÄUREANALYSE BIOTHERAPEUTISCHER GLYCOPROTEINE

ABB. 6: DMB-markiertes Sialinsäure-Referenzpanel (SARP).

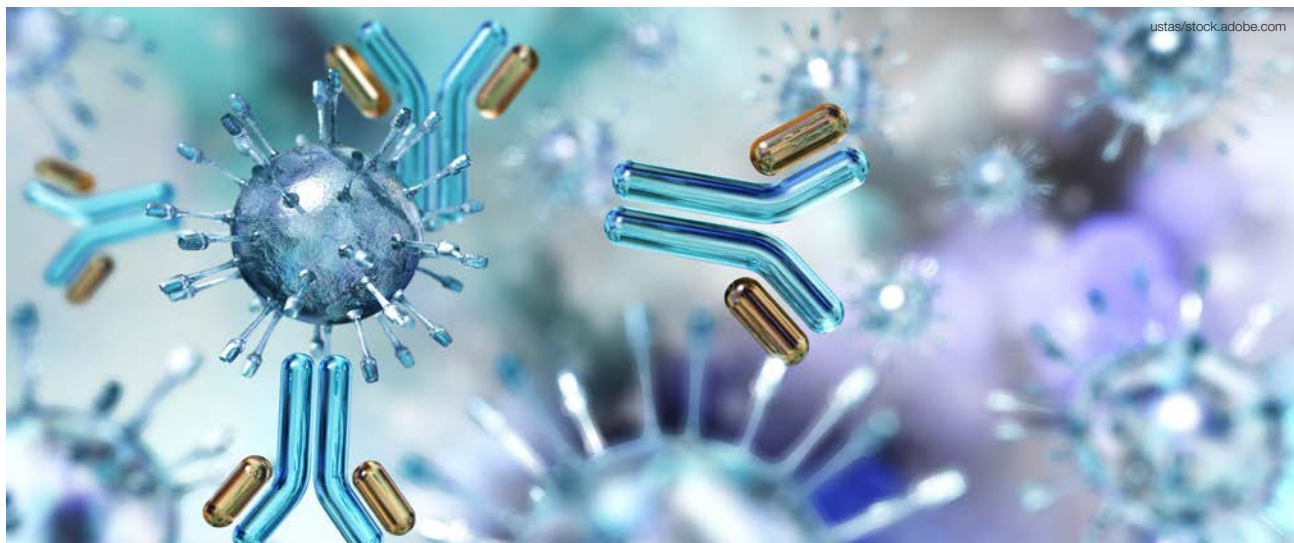
**Abschließende Bemerkungen**

Es stehen viele verschiedene Werkzeuge zur Verfügung, um N-Glykane eines typischen biotherapeutischen Glycoproteins herzustellen, zu trennen, zu detektieren und zu identifizieren. Moderne Arbeitsabläufe wie das AdvanceBio Gly-X-Probenvorbereitungskit verwenden Techniken zur schnellen Freisetzung, Markierung und Trennung von Glykanen für die Quantifizierung durch Fluoreszenzdetektion. Zusätzlich zu diesen neuen und schnellen Arbeitsabläufen zur Probenvorbereitung erlaubt die hohe Ionisierungseffizienz neuer Farbstoffe wie InstantPC eine robuste Charakterisierung freigesetzter Glykane durch MS. Diese neuen Arbeitsabläufe sind auch mit herkömmlichen Glykan-Markierungsfarbstoffen wie 2-AB möglich, was eine praktische und schnelle Option zur Probenvorbereitung für all jene darstellt, die neue Daten mit historischen Daten in Bezug setzen möchten. Neben der Analyse freigesetzter Glykane bietet Agilent Produkte zur Sialinsäure-Quantifizierung und -Profilierung an, die ein robustes

Toolkit-Angebot für die Analyse glykosylierter Biotherapeutika abrunden.

John Yan

John Yan, Ph.D., ist Applikationsspezialist bei Agilent.



Einführung in die zweidimensionale Flüssigchromatographie für die Trennung von Biomolekülen

Dwight R. Stoll

*Grundlagen
der 2D-Flüssig-
chromatographie
und moderne
Anwendungen in
der Bioanalytik.*

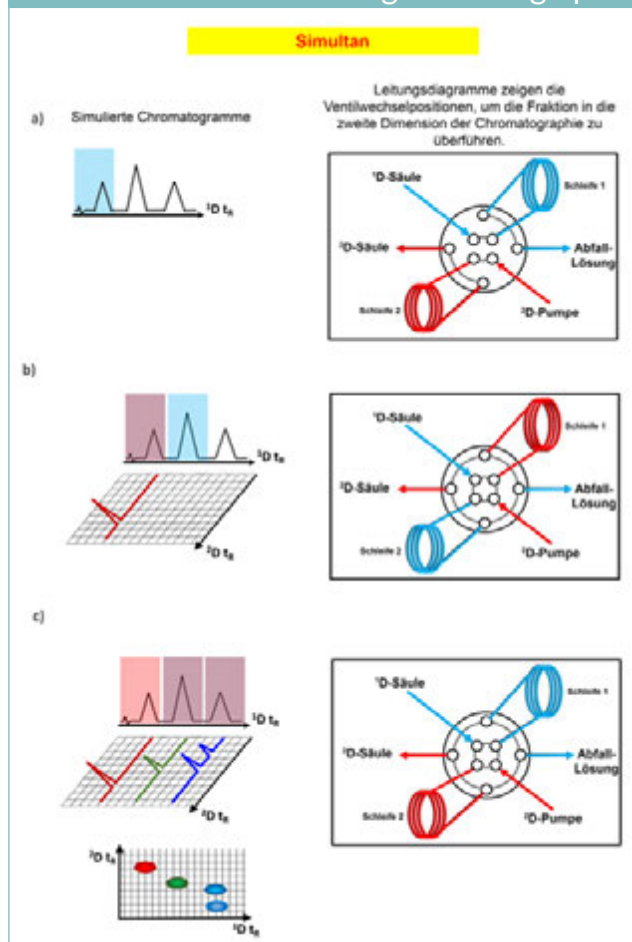
Einleitung

Die konventionelle eindimensionale Flüssigchromatographie (1D-LC) ist nach wie vor ein wertvolles Instrument in der Bioanalytik. Dennoch kann eine weitere Dimension bei der chromatographischen Trennung Vorteile bringen. Analytische Trennungen mit zwei Säulen im Tandem bzw. die zweidimensionale Flüssigchromatographie (2D-LC) können die Analytauflösung deutlich verbessern, ohne dass sich die Dauer der Trennung zu sehr verlängert. Die analytische Ausbeute der 2D-LC lässt sich durch Anpassung der Parameter der Trennung an die jeweiligen Mischungsbedingungen und Zielanalyten maximieren. Diese Zusammenfassung enthält eine Einführung in das Konzept der Trennungen durch 2D-Flüssigchromatographie, behandelt einige wichtige Betriebsmodi und -prinzipien bei der 2D-LC und nennt Beispiele für die greifbaren Vorteile der 2D-LC in der Bioanalytik.

Grundlagen der Trennung durch 2D-LC

Bei der biomolekularen Analyse können selbst scheinbar einfache Proben sehr oft so komplex sein, dass bei der chromatographischen Trennung nicht-aufgelöste Peaks auftreten. Infolgedessen ist eine

EINFÜHRUNG IN DIE ZWEIDIMENSIONALE FLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE FÜR DIE TRENNUNG VON BIOMOLEKÜLEN

ABB. 1: Funktionsweise der zweidimensionalen Flüssigchromatographie

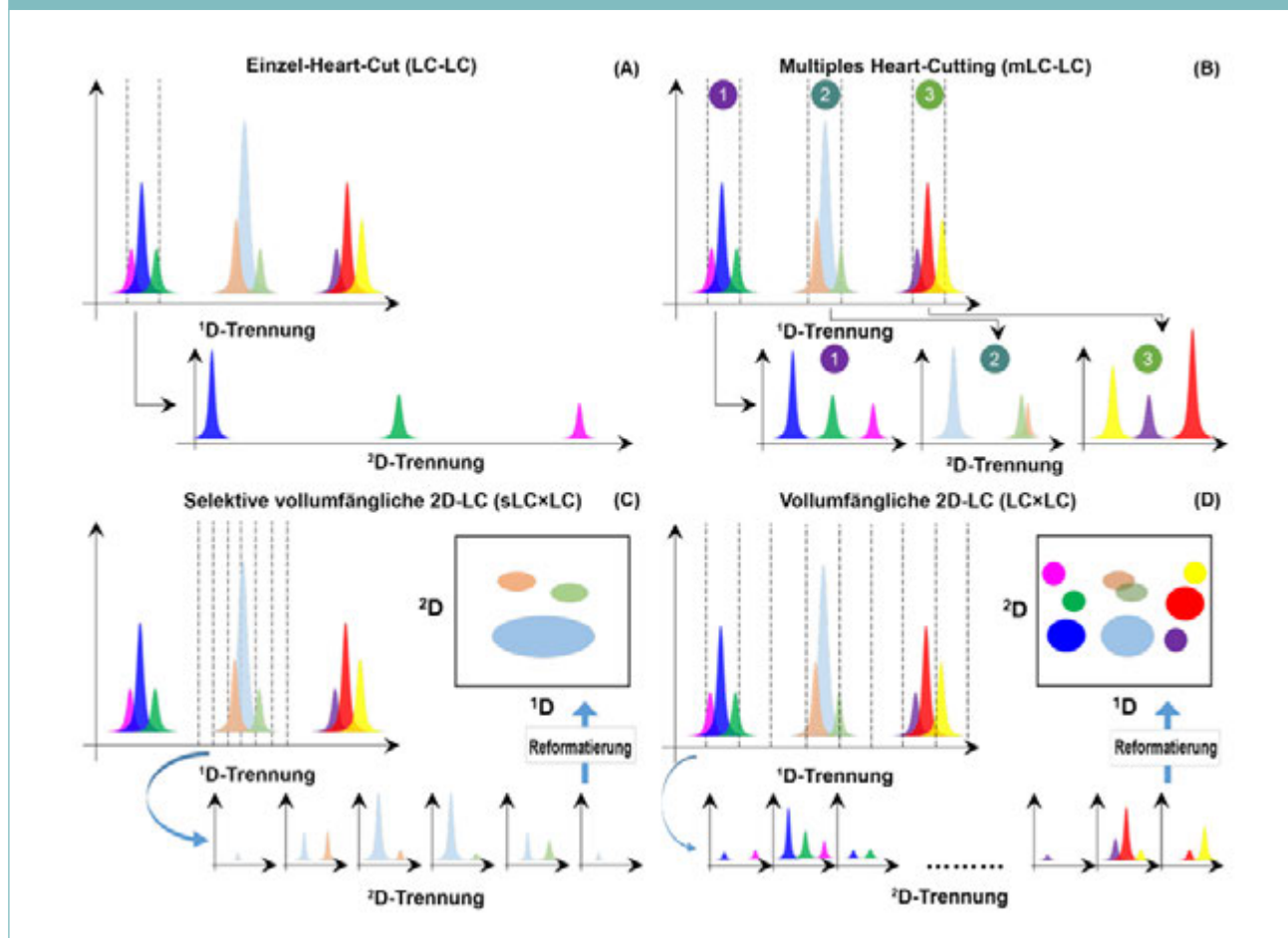
einstufige Flüssigchromatographie oftmals nicht ausreichend, um Spezies in einer Mischung zu trennen. Dies gilt vor allem für Analyten mit sehr ähnlicher Struktur, beispielsweise bei Isomerenmischungen, oder bei unbekanntem Spezies, die eine Analytidentifizierung erfordern. Die simulierten Chromatogramme in **ABB. 1A** sind zwar idealisiert dargestellt, zeigen aber, warum die Verwendung von zwei LC-Dimensionen von Nutzen ist. In Situationen, in denen Trennungen nach keiner bestimmten Eigenschaft wie Größe oder Ladung eine akzeptable Analytauflösung ergeben, kann die Trennung der Analyten nach beiden Eigenschaften zu einer vollständigen Auflösung der Spezies führen.

Als Methode zur Quantifizierung der mit 2D-LC beobachteten Verbesserung der Trennung kann die häufig verwendete Metrik der Peakkapazität eine numerische Erklärung dafür liefern, inwiefern eine zweite LC-Dimension analytisch wertvoller ist als eine einfache Verlängerung der Säule für die 1D-LC. Für jede Dimension der Chromatographie werden die analytischen Messungen im Wesentlichen nach der Effektivität der Trennung und dem Tastgrad der Response des Geräts in Klassen („Bins“) eingeteilt. Dadurch entsteht ein linearer Satz von Bins mit der Geräte-Response im Zeitverlauf. Durch Hinzufügen einer zweiten Dimension wird die Peakkapazität multipliziert, um einen 2D-Satz von Mess-Bins zu erzeugen. Bei sorgfältiger Auswahl komplementärer Säulen und Trennbedingungen ist es möglich, diesen Trennungsraum zu nutzen, um bislang nicht aufgelöste Analyten zu differenzieren. Darüber hinaus kann die zweite Dimension bei einer bestimmten Analyse bei Bedarf ergänzt werden – 2D-LC-Betriebsmodi erlauben die gezielte Anwendung einer Trennungsstufe in der zweiten Dimension (2D).

Wie bei der 1D-LC weisen die für die 2D-LC erforderlichen Geräte ein Schaltventil auf, jedoch mit einigen zusätzlichen Komponenten zum Timing von Probenaufgaben. Ein geeignetes Timing der Ventilschaltung und des Beladens der beiden Probenschleifen ermöglicht, dass die Trennung auf beiden Säulen gleichzeitig stattfindet (**ABB. 1B**). Ein Teil des Eluats aus der 1D-Säule wird zu einer Probenschleife mit bekanntem Volumen umgeleitet, und sobald diese gefüllt ist, wird die Lösung innerhalb der Probenschleife auf die 2D-Säule injiziert. Somit werden Segmente der Trennung aus der ersten Dimension (1D) effektiv gepoolt, bevor sie auf die zweite Säule injiziert werden. Die chromatographischen Daten der 2D-LC zeigen, wie der Analyt von jedem der 1D-Peaks dann entsprechend den

EINFÜHRUNG IN DIE ZWEIDIMENSIONALE FLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE FÜR DIE TRENNUNG VON BIOMOLEKÜLEN

ABB. 2: 2D-Trennungsmodi (6).



2D-Bedingungen weiter getrennt wird. Jede nachfolgende Trennung von Komponenten, die in 2D über die in 1D hinaus auftreten kann, ist in Form zusätzlicher Peaks im 2D-Chromatogramm zu sehen.

Gezielter Einsatz von 2D-LC-Betriebsmodi je nach Anwendung

Innerhalb der Grenzen der 2D-LC gibt es zwei primäre Betriebsmodi sowie zwei Modi, die im Grunde Hybriden der primären Betriebsmodi sind. Alle vier Modi sind in **ABB. 2** dargestellt.

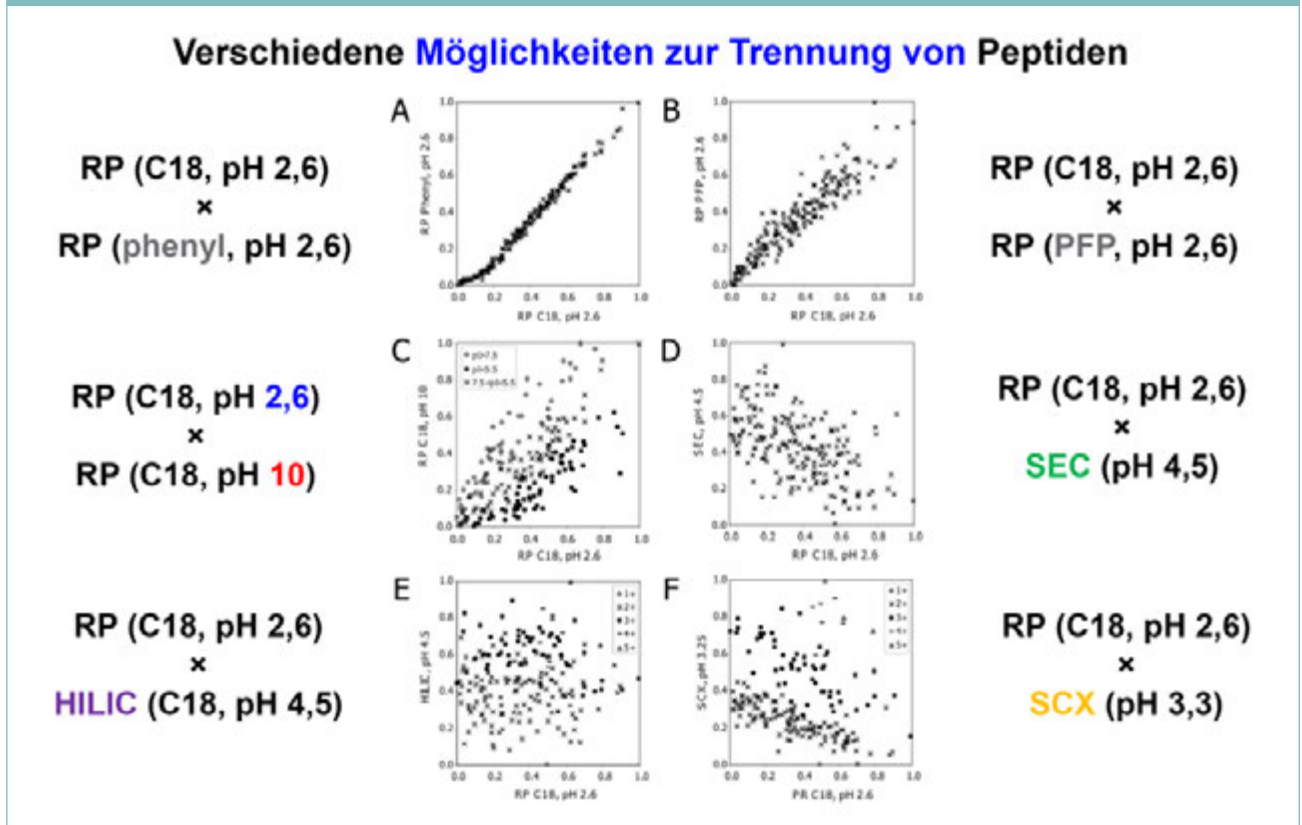
Die erste der primären Betriebsmodi wird als Einzel-Heart-Cut bezeichnet, abgekürzt LC-LC (**ABB. 2A**). Bei der Einzel-Heart-Cut 2D-LC wird

das Eluat aus einem einzelnen Zeitsegment aus dem 1D-Chromatogramm, wie z. B. ein einzelner Peak oder ein Peak-Cluster, auf der 2D-Säule getrennt. Die LC-LC eignet sich am besten, um eine bestimmte Region von Interesse, die in der 1D identifiziert wurde, weiter zu charakterisieren.

Für den zweiten primären Betriebsmodus in der 2D-LC wird das gesamte Eluat aus der 1D zur Trennung in Fraktionen zur 2D geleitet. Dies wird als vollumfängliche 2D-LC, abgekürzt LCxLC, bezeichnet (**ABB. 2D**). Die LCxLC liefert den umfassendsten Datensatz zu den Komponenten in einer Zielmischung. Dieser Modus eignet sich am

EINFÜHRUNG IN DIE ZWEIDIMENSIONALE FLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE FÜR DIE TRENnung VON BIOMOLEKÜLEN

ABB. 3: Optimierung der Nutzung des 2D-Raums für die Trennung (10).



besten für hochkomplexe Proben, die mehrere unaufgelöste und überlappende Spezies aufweisen können, oder für die vollständige Analyse einer unbekanntes Mischung.

Zusätzlich zu den beiden primären Betriebsmodi für 2D-LC gibt es die beiden Hybridmodi multiples Heart-Cutting (mLC-LC) und selektive vollumfängliche 2D-LC (sLCxLC). Bei der multiplen Heart-Cutting-Technik macht man sich ähnliche Funktionsprinzipien wie beim Einzel-Heart-Cut zu Nutze. Auch hier wird ein bestimmter Teil des Eluats aus der 1D zur Trennung auf 2D injiziert, allerdings werden mehrere Heart-Cut-Proben pro Chromatographielauf verwendet (ABB. 2B). Die mLC-LC-Technik ist nützlich, wenn eine verbesserte Charakterisierung von mehr als einer Region des Chromatogramms

erforderlich ist, jedoch nicht in dem bei der LCxLC möglichen Umfang. Bei der selektiven vollumfänglichen 2D-LC wird das LCxLC-Konzept des Samplings für mehrere Zeitsegmente über ein bestimmtes Zeitfenster hinweg, jedoch nicht für die gesamte Dauer der Analyse, angewendet (ABB. 2C). Der sLCxLC-Betriebsmodus ist ideal für die gründliche Analyse einer bestimmten Zielspezies, zum Beispiel für die tiefgehende Proteincharakterisierung, wenn nur ein Teil des Chromatographielaufs einer ausführlicheren analytischen Prüfung bedarf.

Erzielen einer optimalen Auflösung mit Säulenorthogonalität

Die multiplikative Erhöhung der Peakkapazität, die sich durch die 2D-LC ergeben kann, hängt

EINFÜHRUNG IN DIE ZWEIDIMENSIONALE FLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE FÜR DIE TRENNUNG VON BIOMOLEKÜLEN

weitgehend von der Verwendung entsprechend komplementärer oder orthogonaler stationärer Phasen auf den 1D- und 2D-Säulen ab.

„Wie bei der traditionellen 1D-LC erfordert die Durchführung von 2D-LC eine sorgfältige Abstimmung der Trennungsbedingungen auf die Empfindlichkeit des verwendeten Detektors.“

2D-LC-Trennungen mit zwei Säulen mit im Wesentlichen den gleichen Bedingungen in Bezug auf die stationäre Phase und die mobile Phase bewirken keine produktive Verbesserung der Trennung als Ergebnis der zusätzlichen Verwendung der zweiten Dimension. Vielmehr sollte es eine Form der Differenzierung zwischen den Dimensionen geben, um eine Verbesserung der Trennung im 2D-Raum zu ermöglichen. Wie in dem Beispiel in Abbildung 3a ergibt die Kombination einer stationären C18-Phase und einer stationären Phenyl-Phase bei gleichem pH-Wert der mobilen Phase im Wesentlichen keine Zunahme von Analytpeaks in Bereichen des Trennungsraums außerhalb einer Linie mit einer Korrelation von ungefähr 1:1 für die Analytelution zwischen den Säulen. Durch einfaches Ersetzen der 2D-Säule durch eine fluorierte stationäre Phenylphase (ABB. 3B) wurde jedoch eine zusätzliche Unterscheidung zwischen den Analyten in jeder Trennstufe erzielt. Selbst wenn für 1D und 2D derselbe Säulentyp verwendet wird (ABB. 3C), führt die Änderung des pH-Werts der mobilen Phasen in den beiden Dimensionen zu einem ausreichend großen Unterschied zwischen den Trennungsbedingungen und zu einer deutlich verbesserten Peakauflösung im gesamten

Analyseraum. Ebenso kann durch Verwendung von Säulen, die sich noch deutlicher voneinander unterscheiden, eine Verbesserung der Auflösung erzielt werden (siehe ABB. 3D-F).

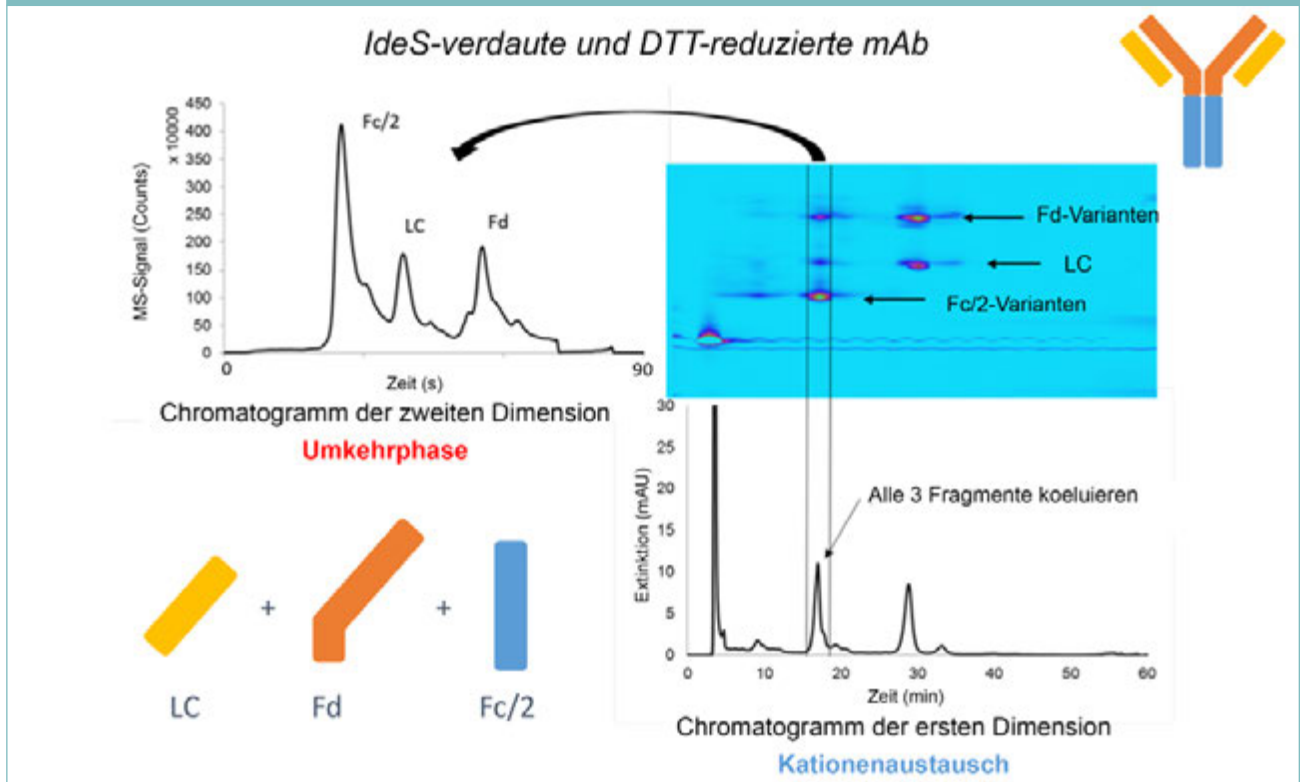
Optimierung der 2D-Sampling-Geschwindigkeit zur Vermeidung von Undersampling

Ein wichtiger Punkt bei der 2D-LC-Trennung ist es, zu vermeiden, dass ein zu kleiner Teil des Eluats aus der 1D-Säule für die 2D-Trennung verwendet wird, was als Undersampling oder Re-Mixing-Problem bezeichnet wird. Wenn zu wenige Proben eines 1D-Peaks verwendet werden, ist der erzeugte Nettoeffekt im Wesentlichen eine Mittelung bzw. ein Re-Mixing, aller Spezies, die in 1D getrennt wurden, was den Wert der ersten Trennungsstufe schmälert. Der Murphy-Schure-Foley-Theorie zufolge (1) sollten nicht weniger als vier Proben aus 1D über den Bereich eines chromatographischen Peaks erfasst werden, um die Auswirkungen eines Undersampling zu minimieren. Darüber hinaus ist es notwendig, die Sampling-Geschwindigkeit zu optimieren, um die Geschwindigkeiten sowohl in 1D als auch in 2D so abzustimmen, dass für das System insgesamt eine optimale Netto-Spitzenkapazität erzielt wird.

Wie bei der traditionellen 1D-LC erfordert die Durchführung von 2D-LC eine sorgfältige Abstimmung der Trennungsbedingungen auf die Empfindlichkeit des verwendeten Detektors. In jeder Chromatographiestufe (1D und 2D) sind die Analytkonzentrationen im Eluat niedriger als bei der anfänglichen Injektion auf jede Säule. Folglich gibt es ein minimales Injektionsvolumen und eine minimale Sampling-Zeit, um sicherzustellen, dass genügend Analyt vorhanden ist.

EINFÜHRUNG IN DIE ZWEIDIMENSIONALE FLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE FÜR DIE TRENNUNG VON BIOMOLEKÜLEN

ABB. 4: 2D-LC-MS von mAbs auf der Ebene der Untereinheiten durch LCxLC (7).



Anpassung der mobilen Phasen in den beiden Dimensionen

Bei der 2D-LC ist es nicht nur wichtig, ein Undersampling zu vermeiden, sondern auch, negative Auswirkungen durch suboptimale Abstimmung der mobilen Phasen in den beiden Säulen zu verhindern. Dieses Problem entsteht dadurch, dass die mobile Phase, die mit dem Analyten aus 1D eluiert, zum Injektionslösemittel für 2D wird. Daher müssen die beiden mobilen Phasen kompatibel sein. Bei einigen Kombinationen von Säulen und mobilen Phasen sind die Auswirkungen minimal, bei anderen jedoch von erheblicher Bedeutung. Beispielsweise hat die mobile Phase bei einer Ionenaustauschtrennung typischerweise einen wässrigen Anteil und ist daher im Allgemeinen mit der primär wässrigen mobilen Phase zu

Beginn einer Umkehrphasentrennung kompatibel. Im Gegensatz dazu würde die stark organische mobile Phase, wie sie bei der Normalphasenchromatographie verwendet wird, Herausforderungen bei der Kopplung einer Normalphase für die 1D mit einer Umkehrphase (RP) für die 2D darstellen und zu Fronting oder sonstigen Einbußen bei der Analyttrennung führen.

Die Inkompatibilität mobiler Phasen kann jedoch mit der Technologie der aktiven Lösemittelmodulation (ASM) umgangen werden. In Zusammenarbeit mit Agilent wurden 2D-LC-Systeme entwickelt, um die Lösemittelzusammensetzung der Probe, die auf die 2D-Säule injiziert wird, im Hinblick auf eine verbesserte Kompatibilität anzupassen. Durch die Einführung einer parallelen Probenschleife, die das gesammelte Eluat

EINFÜHRUNG IN DIE ZWEIDIMENSIONALE FLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE FÜR DIE TRENNUNG VON BIOMOLEKÜLEN

aus der ersten Dimension verdünnt, bevor die Probe die 2D-Säule erreicht, wird die Stärke des 2D-Injektionslösemittels reduziert. Trotz der Probenverdünnung verbessert die ASM die 2D-Auflösung, da die verringerte Lösemittelstärke den Analytdurchbruch, der sonst aufgrund der zu hohen Analytlöslichkeit in der mobilen Phase zu Beginn der Trennung entstehen würde, verhindert.

Nutzung der 2D-LC für 2-in-1-Analysen

Die 2D-LC wäre ein idealer Ansatz, wenn zwei oder mehr separate Experimente erforderlich wären, um die Ergebnisse einer einzelnen 2D-LC-Analyse zu erzielen. Dies lässt sich beispielhaft an der Charakterisierung eines unbekanntes Peaks in einem Chromatogramm unter Massenspektrometrie(MS)-inkompatiblen Bedingungen veranschaulichen, was von Luo et al (2) untersucht wurde. Anstatt eine zusätzliche Trennung unter MS-kompatiblen Trennungsbedingungen zu entwickeln, ergänzten Luo et al. die erste Stufe der LC durch eine zweite Dimension, die MS-kompatibel war und die einfache Identifizierung unbekannter Peaks ermöglichte. In Karongo et al. ergab die auf die Charakterisierung von Verunreinigungen in therapeutischen Peptiden angewendete sLCxLC das Vorhandensein von drei Verunreinigungen, die mit dem Peptid von Interesse koeluieren und bei der 1D-LC übersehen worden wären (3). Durch Kombination einer achiralen RP-Säule in der 1D und einer chiralen WAX-Säule in der 2D konnten Woiwode et al. die enantioselektive Trennung aller Aminosäuren in einer einzigen Analyse durch sLCxLC zeigen (4). In Muller et al. spielte die LCxLC bei der Charakterisierung von pflanzlichen Extrakten, zum Beispiel aus Tee oder Wein, eine entscheidende Rolle bei der Identifizierung phenolischer Spezies (5).

Methoden zur tiefgehenden Proteincharakterisierung

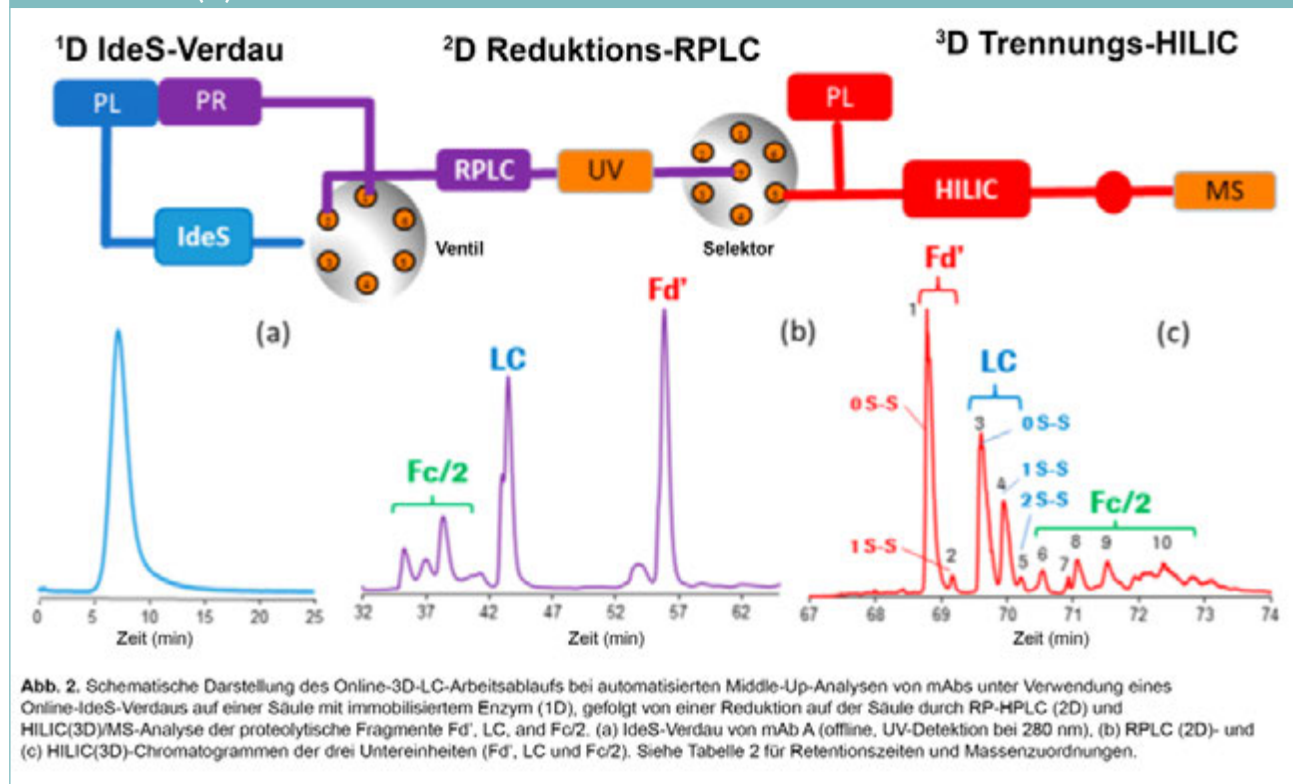
Eine weitere Art der Analyse, bei der 2D-LC besonders hilfreiche Erkenntnisse liefern würde, ist die tiefgreifende Charakterisierung von Proteinen. In Kombination mit einer anschließenden Massenspektrometrie können zweidimensionale Trennungen die Probenidentifikation erheblich effektiver machen. Durch entsprechende Probenbehandlung und 2D-LC gefolgt von MS-Detektion lässt sich eine gründliche Untersuchung der Struktur und Zusammensetzung monoklonaler Antikörper durchführen. Durch diese Art von mehrdimensionalem Ansatz sind Antikörper-Untereinheiten, leichte und schwere Ketten, gebundene Glykane und Komponentenpeptide identifizierbar (6). Darüber hinaus belegen die Ergebnisse von Sorensen et al. die Notwendigkeit einer zweistufigen LC-Trennung aufgrund der Koelution von verdauten Antikörperfragmenten in der ersten LC-Dimension (ABB. 4) (7).

Entwicklung von automatisierten 2D-LC-Analysen

Zu den Herausforderungen in der Bioanalytik, für welche die 2D-LC eine Lösung darstellen kann, gehören die zeitaufwändige Probenvorbereitung und die manuelle Auswahl von Peaks für die weitere Analyse. Anstatt jede Probenbehandlung wie Trypsinverdau oder Dithiothreitol(DTT)-Reduktion offline durchzuführen, können diese Schritte in die automatisierte 2D-LC integriert werden. In einem konkreten Beispiel mit Antikörpertrennung von Gstöttner et al. wurde ein Arbeitsablauf verwendet, bei dem die Proben zuerst auf einer Ionenaustauschersäule getrennt und online in Fraktionen gesammelt wurden. Diese wurden dann auf eine reduzierende Reaktorsäule aufgetragen, gefolgt von der 2D-RP-Trennung und MS-Detektion (8). Ähnlich entwickelten Camperi

EINFÜHRUNG IN DIE ZWEIDIMENSIONALE FLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE FÜR DIE TRENNUNG VON BIOMOLEKÜLEN

ABB. 5: Moderne Anwendungen—automatisierte Systeme zur Charakterisierung von mAbs (9).



et al. ein Verfahren zur Charakterisierung der Glykosylierungsvarianten von monoklonalen Antikörpern, wobei die Proben einem IdeS-Verdau, einer Reduktion und Trennung auf einer RP-Säule und einer LC-Trennung durch hydrophile Interaktion (HILIC) unterzogen wurden, bevor abschließend eine Detektion durch Massenspektrometrie stattfand (ABB. 5) (9). In Proof-of-Concept-Experimenten ergaben sich für das automatisierte Verfahren von Camperi et al. keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Offline-Probenbehandlung.

Abschließende Bemerkungen

Die Nachricht, dass mehrdimensionale Trennungen umfangreiche analytische Informationen über die 1D-LC hinaus liefern und dabei wenig zusätzlichen Aufwand erfordern, verbreitet sich immer schneller. Damit diese Technologie jedoch optimale Ergebnisse

liefert, sollten die traditionellen Prinzipien der chemischen Analyse nicht außer Acht gelassen werden. Wie bei anderen Analysegeräten erfordert die Methodenentwicklung für 2D-LC, dass der Betriebsmodus (LC-LC, mLC-LC, sLCxLC oder LCxLC) in Abstimmung auf den Probentyp und die von der Analyse erwarteten Informationen gewählt wird. Abgesehen von der Berücksichtigung des Betriebsmodus ist es wichtig, ausreichend orthogonale Trennungsbedingungen zu verwenden. Eine maximale Auflösung im 2D-Raum wird nicht nur durch komplementäre stationäre Phasen erzielt, sondern auch durch entsprechende Bedingungen in Bezug auf die mobilen Phasen, wie zum Beispiel den pH-Wert in Abhängigkeit von der Analytklasse. Die Berücksichtigung der molekularen Eigenschaften ist also von großer Bedeutung. Darüber hinaus sollte darauf geachtet werden, ein Undersampling

EINFÜHRUNG IN DIE ZWEIDIMENSIONALE FLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE FÜR DIE TRENNUNG VON BIOMOLEKÜLEN

aus der 1D-Stufe zu vermeiden, da die Trennungsergebnisse aus der ersten Dimension sonst möglicherweise verloren gehen. Dies muss jedoch auf die Empfindlichkeit des Detektors abgestimmt werden. Die Fraktionen für die Trennung in 2D sollten ein ausreichendes Volumen und daher auch eine ausreichende Menge an Analyt aufweisen, damit eine Detektion überhaupt möglich ist. Darüber hinaus sollte die Kompatibilität der mobilen Phasen in den beiden Dimensionen geprüft werden. Wenn eine Inkompatibilität der mobilen Phasen unvermeidbar ist, sollten geeignete Methoden und die ASM-Technologie verwendet werden, um dieses Problem zu umgehen.

Literaturhinweise

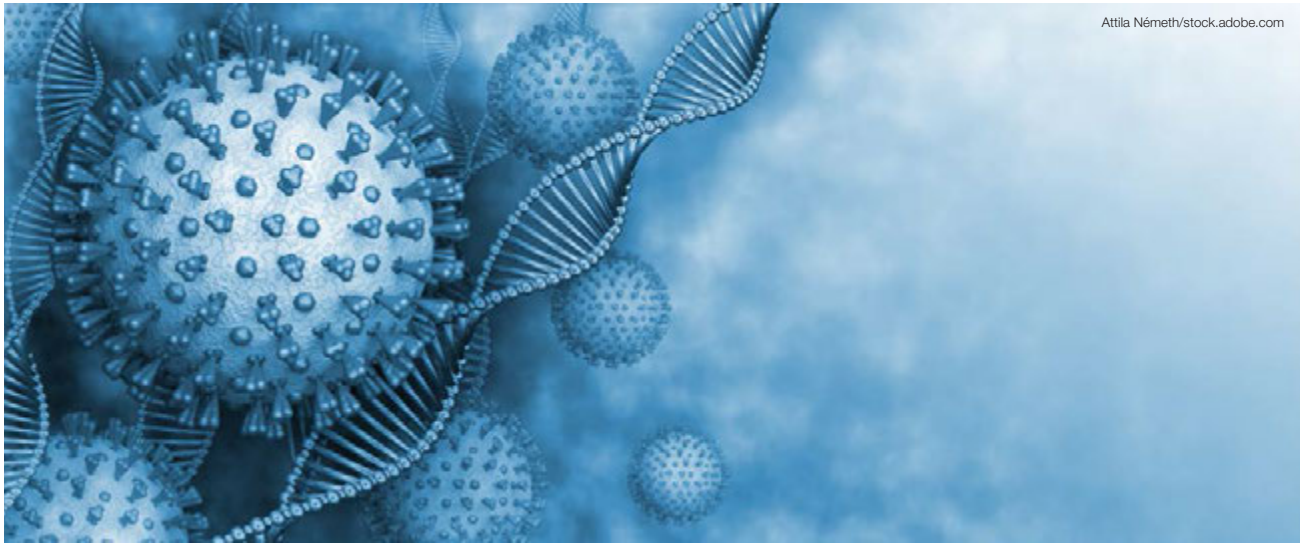
1. R. E. Murphy, et al., *Anal. Chem.* **70**(8), 1585-1594 (1998). DOI: 10.1021/ac971184b
2. H. Luo, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **137**, 139-145 (2017). DOI: 10.1016/j.jpba.2016.11.012
3. R. Karongo, et al., *J. Chrom. A*, **1627**, 461430 (2020). DOI: 10.1016/j.chroma.2020.461430
4. U. Woiwode, et al., *J. Chrom. A*, **1562**, 69-77 (2018). DOI: 10.1016/j.chroma.2018.05.062
5. M. Muller, et al., *Chromatographia*, **82**, 181-196 (2019). DOI: 10.1007/s10337-018-3662-6
6. D. R. Stoll, et al., in *Advances in Chromatography*, (CRC Press: Boca Raton, FL, 2018).
7. M. Sorensen, et al., *mAbs*, **8**(7), 1224-1234 (2016). DOI: 10.1080/19420862.2016.1203497
8. C. Gstöttner et al., *Anal. Chem.* **90**(3), 2119-2125 (2017). DOI: 10.1021/acs.analchem.7b04372
9. J. Camperi et al., *Anal. Chem.* **92**(6), 4357-4363 (2020). DOI: 10.1021/acs.analchem.9b05193
10. M. Gilar, et al., *Anal. Chem.* **77**(19), 6426-6434 (2005). DOI: 10.1021/ac050923i

Dwight R. Stoll, PhD

Professor
Gustavus Adolphus College



ustas/stock.adobe.com



Attila Németh/stock.adobe.com

Identifizierung, Mapping und relative Quantifizierung von SARS-CoV-2-Spike-Glykopeptiden durch Masse-Retentionszeit-Fingerprinting

Rod Chalk

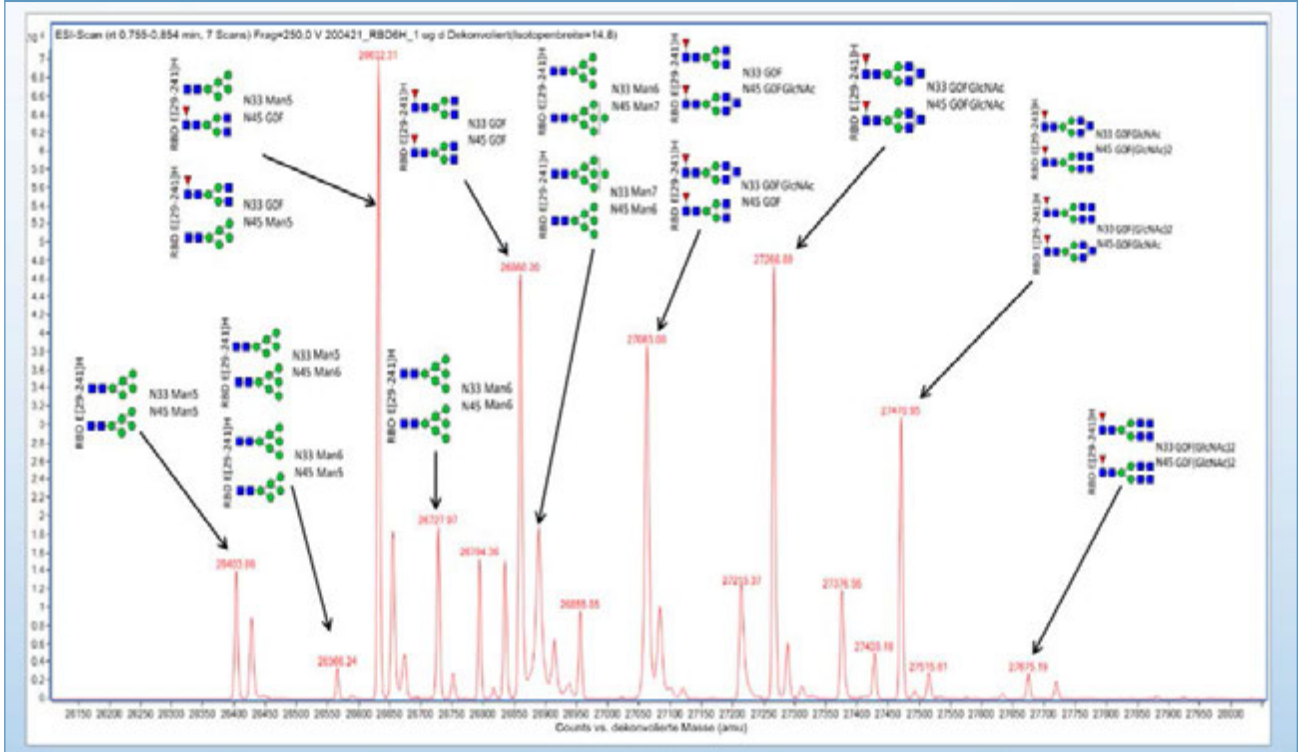
Eine Masterdatenbank für das Fingerprinting und das Mapping von Glykopeptiden auf dem Spike-Protein führt zu einer erheblichen Vereinfachung dieses anderenfalls komplexen und zeitaufwändigen Prozesses.

Einleitung

Es wird angenommen, dass die komplexe Glykosylierung des Spikeproteins des SARS-CoV-2-Virus eine Rolle bei der Immunevasion spielt und das Virus eventuell pathogener macht. Viele Labors exprimieren Spikeprotein zu Forschungszwecken und benötigen zuverlässige analytische Arbeitsabläufe, um es vollständig zu charakterisieren. Das ist wichtig, da durch das Expressionssystem der verwendeten Wirtszelle und auch durch die Wachstumsbedingungen das Glykosylierungsmuster beeinflusst wird. Diese Bedingungen sind schwer genau zu kontrollieren und können zu Unterschieden zwischen verschiedenen Chargen des produzierten Spikeproteins führen. Die Komplexität dieser Glykosylierung stellt aus technischer Sicht in mehrfacher Hinsicht ein Problem für die vollständige Charakterisierung des Proteins dar. Da die große Anzahl möglicher Glykane an jeder der 22 Glykosylierungsstellen zu einer außergewöhnlich hohen Polydispersität und folglich zu einer Verdünnung des Signals führt, ist eine Massenanalyse der intakten Struktur durch Umkehrphasen-Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie (LC-MS) vermutlich nicht durchführbar, und selbst wenn, würde sie nicht die gewünschte

IDENTIFIZIERUNG, MAPPING UND RELATIVE QUANTIFIZIERUNG VON SARS-COV-2-SPIKE-GLYKOPEPTIDEN DURCH MASSE-RETENTIONSZEIT-FINGERPRINTING

ABB. 1: Die Spike-Rezeptor-Bindungsdomäne von SARS-CoV2 hat zwei Glykosylierungsstellen (N343, N331). Es können mehrere Glykane mit diesen Stellen assoziiert sein.



Information über die Position der Glykane liefern. Eine Analyse der freigesetzten Glykane wäre möglich, liefert aber wiederum keine Positionsinformationen.

Dieser Artikel befasst sich mit einem neuartigen Ansatz, der in einem ersten Schritt die Erstellung einer Datenbank zu Glykopeptid-Masse und -Retentionszeit unter Verwendung von LC-Q-TOF-MS/MS beinhaltet. Diese Datenbank, bei der es sich im Wesentlichen um eine Sammlung von Fingerprints der akkurate Masse/Retentionszeit jedes Glykopeptids handelt, kann dann in einen einfachen, leistungsstarken, schnellen und robusten Charakterisierungsworkflow integriert werden.

Besondere Herausforderungen durch das Spikeprotein

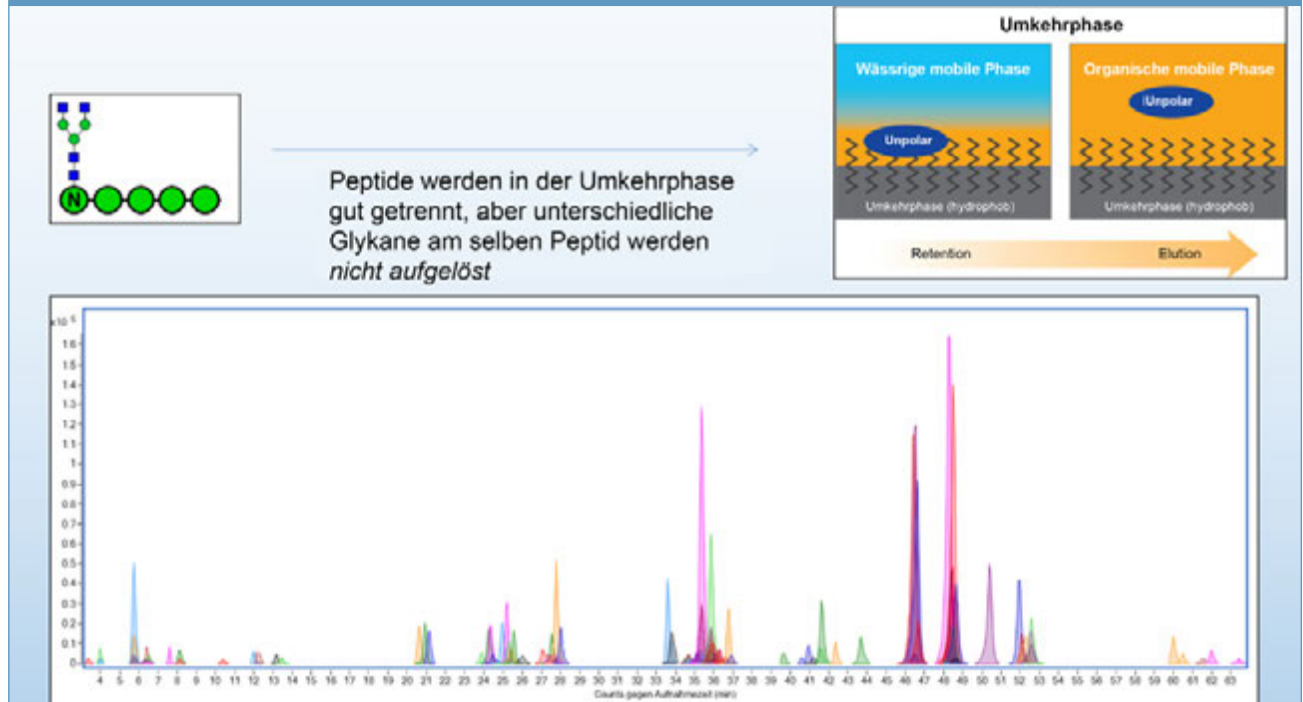
Das Spikeprotein in Volllänge liegt als Trimer vor. Der Abschnitt der

Rezeptorbindungsdomäne (RBD) des Spike-Monomers hat nur zwei Glykosylierungsstellen (N343 und N331), jeder davon aber mit mehreren möglichen Glykanen. Trotz der geringen Anzahl von Glykosylierungsstellen in der RBD ist das Glykosylierungsprofil komplex und von Probe zu Probe variabel, wie aus dem intakten Massenspektrum ersichtlich ist (ABB. 1). Aufgrund der beiden Glykosylierungsstellen gibt es in einigen Fällen zwei mögliche Strukturen für die jeweilige Masse, daher lässt sich nicht feststellen, welche dieser Strukturen die richtige ist, was eine vollständige Identifizierung ausschließt.

Beim Spikeprotein in Volllänge ist die Situation noch komplizierter, da es 22 Glykosylierungsstellen aufweist. Selbst wenn nur sechs Glykane pro Stelle angenommen werden, würde die Gesamtzahl der möglichen Glykoformen etwa 130 Milliarden betragen, was

IDENTIFIZIERUNG, MAPPING UND RELATIVE QUANTIFIZIERUNG VON SARS-COV-2-SPIKE-GLYKPEPTIDEN DURCH MASSE-RETENTIONSZEIT-FINGERPRINTING

ABB. 2: Glykopeptid-Trennung durch Umkehrphase.



eine Massenanalyse des intakten Spikeproteins unmöglich macht. Außerdem würde eine solche Analyse keine Positionsinformationen liefern.

Eine Alternative wäre die Glykopeptidanalyse. In diesem Fall müsste eine Glykosylierungsstelle pro Peptid erzeugt und jede Stelle gemappt werden. Trypsin allein kann nicht verwendet werden, weil es zwischen den beiden Glykosylierungsstellen innerhalb der RBD keine Trypsinspaltungsstellen gibt. Da die Massen der Vorstufen unbekannt sind, kann außerdem kein Vorstufen-Datenbankabgleich durchgeführt werden, weshalb eine MS/MS benötigt wird. Wiederum gibt es jedoch einige Punkte zu beachten: Das Glykopeptidmolekül ist ein Hybrid aus dem Peptidgerüst und einer Glykanstruktur mit jeweils unterschiedlichen optimalen Fragmentierungsbedingungen. Bei einer für das Glykan optimalen Fragmentierung bleibt das Peptid unfragmentiert, während eine optimale Peptidfragmentierung bedeutet, dass die Glykaninformationen verloren gehen.

Verbesserte Trennung und Detektion

Da die Verwendung mehrerer Enzyme mit weiteren Komplikationen verbunden wäre, entschieden sich Forscher vom Center for Medicines Discovery der Universität Oxford für ein einziges Enzym, Elastase, das häufiger schneidet als Trypsin und kürzere Peptide erzeugt. Noch wichtiger ist, dass Elastase ein einzelnes Peptid pro Glykosylierungsstelle erzeugt, was für ein eindeutiges Mapping unerlässlich ist. Da Glykane überwiegend polar sind, wird durch hydrophile Interaktions-Flüssigchromatographie (HILIC) eine gute Trennung erzielt, während die Peptide, die vergleichsweise unpolar sind, am besten durch Umkehrphasen(RP)-HPLC getrennt werden. Die kürzeren Peptide verstärken das Totalionen-Chromatogramm(TIC)-Signal bei der MS und werden durch RP-HPLC leichter aufgelöst. Die Trennung ergibt eine hervorragende Auflösung für Peptide. Die einzelnen Glykane werden jedoch nicht getrennt, sondern koeluiieren (ABB. 2), sodass mehrere überlagerte Peaks erscheinen.

IDENTIFIZIERUNG, MAPPING UND RELATIVE QUANTIFIZIERUNG VON SARS-COV-2-SPIKE-GLYKPEPTIDEN DURCH MASSE-RETENTIONSZEIT-FINGERPRINTING

ABB. 3: Arbeitsablauf zur Glykopeptid-Identifizierung.

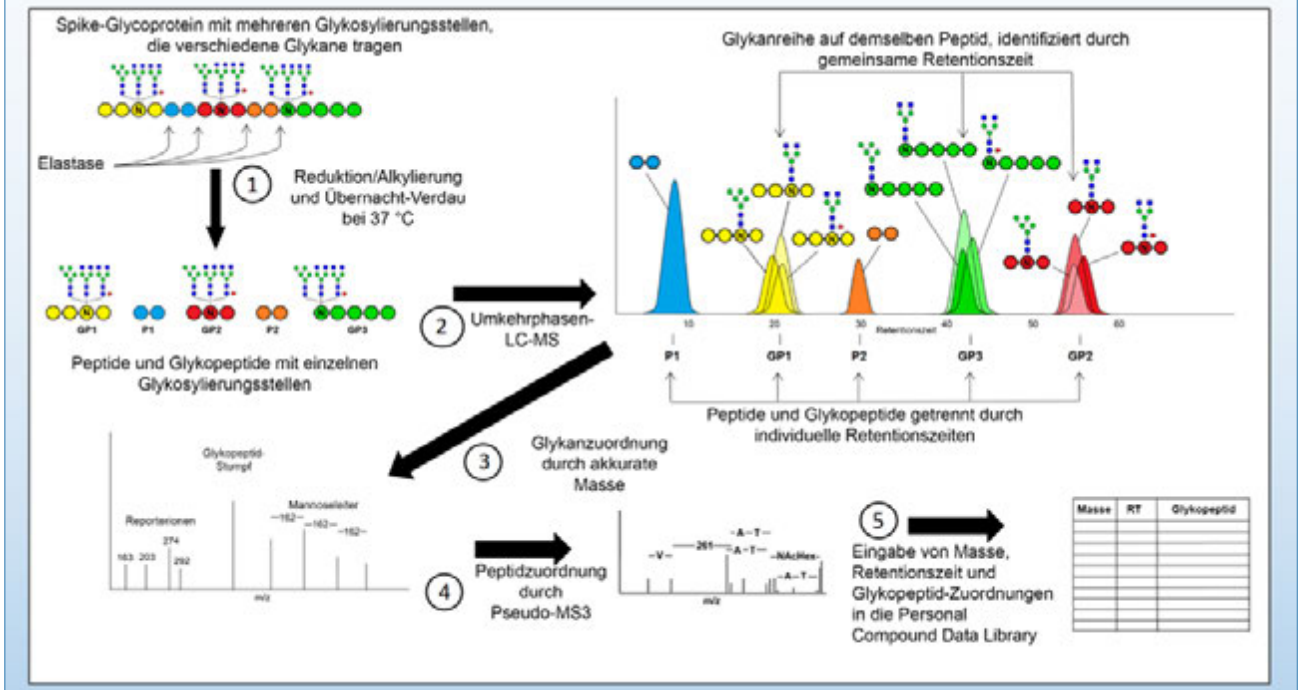
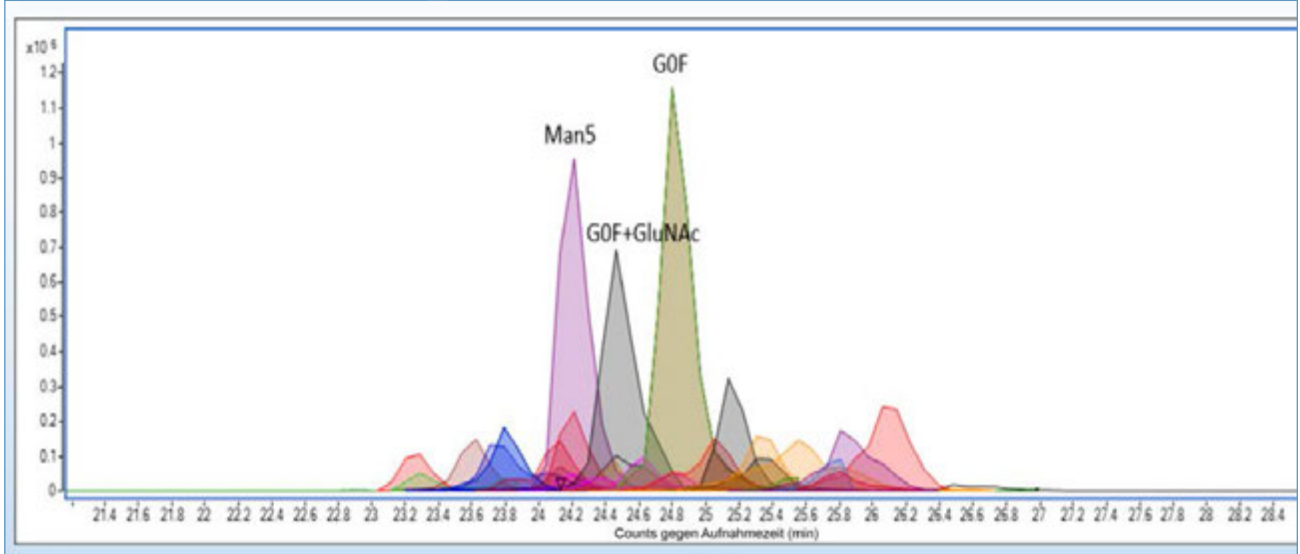
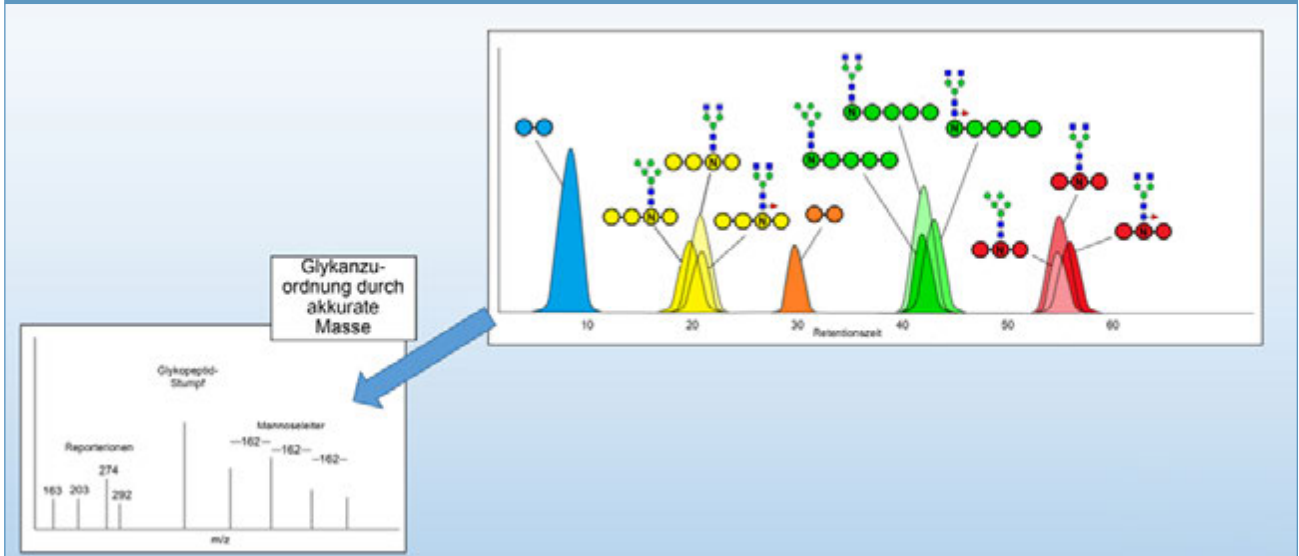


ABB. 4: 27 GEVFNAT-Man5-Glykopeptide eluieren alle in einem Retentionszeitfenster von +2 Minuten.



IDENTIFIZIERUNG, MAPPING UND RELATIVE QUANTIFIZIERUNG VON SARS-COV-2-SPIKE-GLYKOPEPTIDEN DURCH MASSE-RETENTIONSZEIT-FINGERPRINTING

ABB. 5: Eine Mannoseleiter ist das Strukturmerkmal eines mannosehaltigen Glykans.



Diese Eigenschaft könnte zwar ein Problem darstellen, wurde aber genutzt, um eine neue Methode zur Identifizierung und Kartierung dieser Glykopeptide zu entwickeln. Mit einer AdvanceBio Peptid-Mapping-Säule von Agilent führte das Team eine Trennung der Peptide durch und stellte fest, dass dieselben Peptide ungeachtet der Glykane daran gleichzeitig eluieren. Somit konnten Glykane mit der gleichen Retentionszeit auf das gleiche Peptid gemappt werden. Da Glykane aus dem gleichen Peptid die gleiche Retentionszeit aufweisen und ihre genaue Masse bekannt ist, ergibt die Kombination aus akkurater Masse und Retentionszeit einen Fingerabdruck, der eine vollständige Glykopeptididentifizierung ermöglicht.

Aufbau der Datenbank

Arbeitsablauf zur Glykopeptid-Identifizierung. Der Arbeitsablauf (ABB. 3) beginnt mit einem Elastase-Verdau über Nacht, aus dem eine Mischung aus Peptiden und Glykopeptiden hervorgeht. Als nächstes wird eine RP-HPLC durchgeführt, bei der Glykane aus dem gleichen Peptid koeluieren und durch ihre Retentionszeit identifiziert werden können. Von dem Peptid GEVFNAT- gibt es

beispielsweise 27 verschiedene Glykoformen, und das erweiterte Ionenchromatogramm in ABB. 4 zeigt, dass alle davon innerhalb eines Retentionszeitfensters von vier Minuten eluieren. Der nächste Schritt besteht darin, die Glykane anhand der akkuraten Masse zu identifizieren. Es gibt viele Spezies in dem LC-MS/MS-Lauf. Glykopeptide sind durch spezifische Reporterionen gekennzeichnet, die die freien Zuckern, den Peptidstumpf sowie eine Mannoseleiter (ein Strukturmerkmal eines mannosehaltigen Glykans) darstellen (siehe schematische Darstellung in ABB. 5). Das dekonvolvierte Massenspektrum zeigt die vollständige Sequenz des Glykans mit den einzelnen Zuckern mit einer Massengenauigkeit von 10 ppm.

In der zweiten Phase des Arbeitsablaufs findet die Peptididentifikation statt. Dies geschieht durch Pseudo-MS3, ein Verfahren, bei dem eine hohe Fragmentorspannung am MS-Gerät verwendet wird, um eine In-source-Fragmentierung des Glykopeptids mit Verlust der Glykane durchzuführen. Die Auswahl des Peptidstumpfs als Zielmasse im Quadrupol und die Durchführung einer stoßinduzierten

IDENTIFIZIERUNG, MAPPING UND RELATIVE QUANTIFIZIERUNG VON SARS-COV-2-SPIKE-GLYKPEPTIDEN DURCH MASSE-RETENTIONSZEIT-FINGERPRINTING

In diesem Fall ist keine MS/MS erforderlich, da nun die Datenbank unter Verwendung der Masse-Retentionszeiten aus dem LC-MS-Lauf abgefragt werden kann, um die Glykopeptidstrukturen relativ zuverlässig zuzuordnen. Dies kann automatisch mit Agilent MassHunter Qualitative Analysis Version B.07 und dem Molecular Feature Extraction Tool (ABB. 6) erfolgen. Ein weiterer Vorteil dieses Arbeitsablaufs besteht darin, dass keine speziellen Kenntnisse der Glykananalyse erforderlich sind.

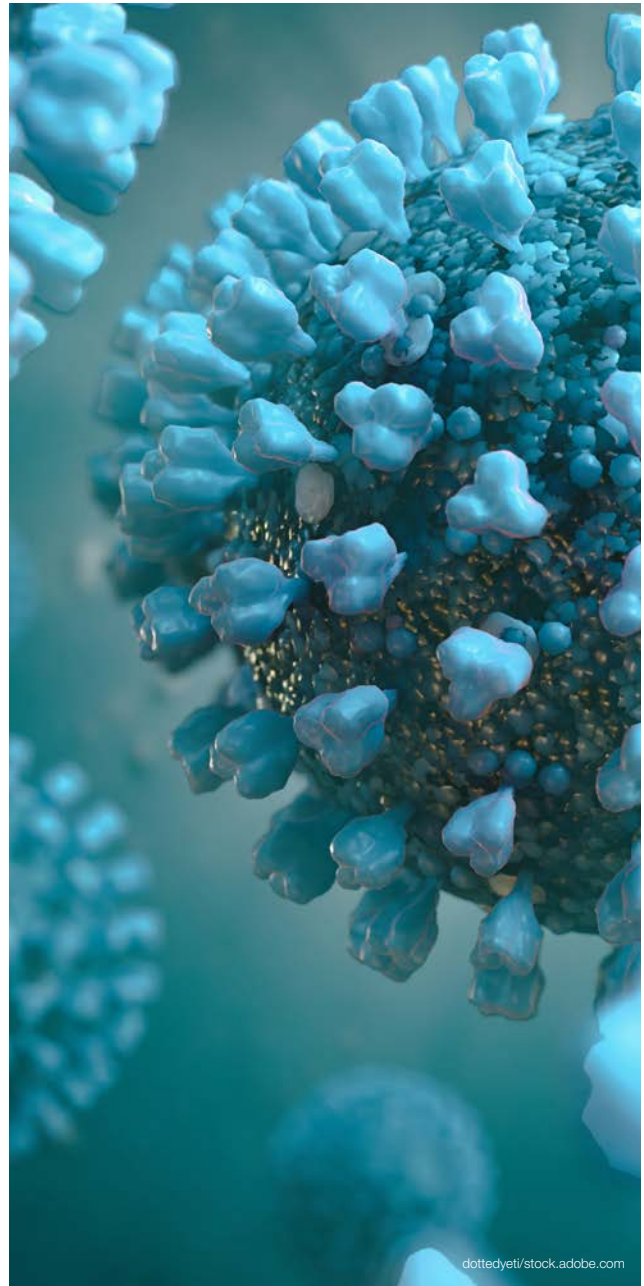
Abschließende Bemerkungen

Die Masse-Retentionszeit-Datenbank, die aus einer detaillierten Analyse zur Peptididentifizierung hervorging, vereinfacht das Mapping von SARS-CoV-2-Spike-Glykopeptiden erheblich und macht eine komplexe MS/MS-Analyse überflüssig. Sie ermöglicht die Identifizierung von Glykopeptidstrukturen lediglich anhand ihrer LC-Retentionszeiten und akkuraten Masse. Dieser einfache Arbeitsablauf ist auf eine Vielzahl von HPLC-MS-Geräten und -Konfigurationen übertragbar. Die detaillierte Methode wird kostenlos zur Verfügung gestellt (Chalk, R., Greenland, W. et al. „Identification, Mapping and Relative Quantitation of SARS-CoV-2 Spike Glycopeptides by Mass-Retention Time Fingerprinting“, in Druck) und die Datenbank ist online erhältlich (Chalk, R., Greenland, W. et al., (2020). SARS-COV2 Spike Glycopeptide Mass-Retention Time PCDL Datenbank (Version 1) [Datensatz]. Zenodo. <http://doi.org/10.5281/zenodo.3958218>).

Ausschließlich zu Forschungszwecken. Nicht für Diagnoseverfahren geeignet. Die Produkte von Agilent sind NICHT für Tests auf oder die Diagnose, Behandlung oder Linderung von COVID-19 autorisiert. Agilent hat kein Produkt zum Nachweis des neuartigen Coronavirus validiert.

Rod Chalk, Ph.D.

Head of Mass Spectrometry,
Centre for Medicines Discovery
Oxford University



dottedyeti/stock.adobe.com