

**Auswirkungen der Kulturbedingungen
auf die Produktion, Glykosylierung und
Funktion des monoklonalen
Maus-Antikörpers R₂₄**

Von der Technischen Fakultät
der Universität Bielefeld
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Dissertation

vorgelegt von
Dipl.-Chem. Sven Eric Kemminer
aus Bünde

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 1998 bis Oktober 2000 am Lehrstuhl für Zellkulturtechnik der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld (Leitung Herr Prof. Dr.-Ing. J. Lehmann) unter der Anleitung von Herrn Hochschuldozent Dr. J. Müthing angefertigt.

Herrn Prof. Dr.-Ing. J. Lehmann danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Lehrstuhl durchführen zu können, seine Unterstützung und die sehr guten Arbeitsbedingungen in der Abteilung.

Herrn HD Dr. J. Müthing danke ich für die intensive Betreuung, ständige Diskussionsbereitschaft und seine konstruktive Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit. Auch für sein Engagement bei der Erstellung von Veröffentlichungen möchte ich mich bedanken.

Diese Promotion wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des Graduiertenkollegs „Zelluläre Grundlagen biotechnischer Prozesse“ (Sprecher Prof. Dr. R. Eichenlaub) an der Universität Bielefeld ermöglicht. Der DFG danke ich für die Bewilligung meines Stipendiums.

Herrn Prof. em. Dr. H. Egge vom Physiologisch Chemischen Institut der Universität Bonn danke ich für die Bereitschaft, das Zweitgutachten zu erstellen.

Herrn Dr. H. S. Conradt (AG Proteinglykosylierung) und Herrn Dr. M. Nimtz (AG Molekulare Strukturanalyse) danke ich für die Oligosaccharidanalytik an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig.

Frau D. Šagi und Frau Prof. Dr. J. Peter-Katalinić danke ich für die massenspektrometrischen Untersuchungen am Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Universität Münster.

Mein Dank gilt auch Frau A. E. Hildebrand, Frau B. Fasselt, Frau R. Lümen und Herrn A. Werner für die Durchsicht und Korrektur des Manuskriptes.

Allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik danke ich für die gute Zusammenarbeit, die anregenden fachlichen Diskussionen und das freundliche Arbeitsklima.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Biotechnologie und Zellkultivierung	1
1.2	Antikörper	2
1.2.1	Monoklonale Antikörper	5
1.2.2	Der R24 Antikörper	6
1.3	Glykosphingolipide (GSL)	7
1.3.1	Struktur und Biosynthese der GSL	7
1.3.1.1	Struktur	7
1.3.1.2	Biosynthese	9
1.3.2	Vorkommen und Bedeutung von GSL	12
1.4	Glykosylierung sekretorischer Proteine	13
1.4.1	Natürlich vorkommende N- und O-Glykane	14
1.4.2	Funktion von Oligosacchariden in Proteinen	14
1.4.2.1	Biosynthese von Proteinglykanen	15
1.4.3	Glykosylierung von IgG Antikörpern	19
1.5	Einfluß der Kulturbedingungen auf Antikörper Produktion und Glykosylierung	20
1.6	Arbeitsziel	22
2	Material und Methoden	24
2.1	Zellkultivierung	24
2.1.1	Zelllinie	24
2.1.2	Medien	24
2.1.2.1	Serumhaltiges Medium	25
2.1.2.2	Serumfreies Medium	25

2.1.3	Kryokonservierung und Stammhaltung	25
2.1.3.1	Einfrieren der Zellen	25
2.1.3.2	Auftauen der Zellen	26
2.2	Bioreaktorsysteme	26
2.2.1	Spinner	27
2.2.2	SuperSpinner	27
2.2.3	2-Liter-Bioreaktor	28
2.2.3.1	Prozeßführung	30
2.3	Analytik zur Zellkultur	30
2.3.1	Prozeßanalytik zur Zellkultivierung	30
2.3.1.1	Zellzahlbestimmung nach der Trypanblau-Aus-	
	schlußmethode	30
2.3.1.2	Zellzahl und Zellgrößenbestimmung mit dem CASY 1	30
2.3.1.3	Glukose- und Laktatbestimmung	31
2.3.1.4	Ammoniumbestimmung	32
2.3.1.5	LDH-Aktivitätsmessung	32
2.3.1.6	Aminosäurebestimmung	34
2.3.1.7	Bestimmung von Mykoplasmenkontaminationen . . .	35
2.4	Berechnung zellspezifischer Parameter	36
2.4.1	Rechnergestützte Ermittlung zellspezifischer Parameter	38
2.5	Produktaufreinigung	39
2.5.1	Abzentrifugieren der Zellen	39
2.5.2	Protein A Affinitätschromatographie	40
2.5.2.1	Chromatographieanlagen	40
2.5.3	Test auf proteolytischen Abbau und Stabilität des R24 Anti-	
	körpers im Kulturmedium	42
2.5.4	Test auf Sialidaseaktivität	43
2.6	Produktanalytik	44
2.6.1	Bestimmung der Antikörperkonzentrationen	44
2.6.1.1	Bestimmung der Proteingesamtkonzentration mit-	
	tels BCA Test	44
2.6.1.2	Bestimmung der Konzentration von Maus IgG mit-	
	tels Sandwich ELISA (IgG _S)	45

2.6.1.3	Bestimmung der Konzentration an G_{D3} -bindendem R24 Antikörper (Ig G_{GD3}) mittels G_{D3} -Bindungs-ELISA	48
2.6.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	50
2.6.2.1	PhastSystem SDS-Page	50
2.6.2.2	Novex SDS-Page	51
2.6.3	Färben der Polyacrylamid-Gele	51
2.6.3.1	Silberfärbung nach Heukeshoven	51
2.6.3.2	Coomassie-Färbung	53
2.6.4	Western-Blot	53
2.6.5	Nachweis von Protein-gebundenen Oligosacchariden mit Lektinen	54
2.6.6	Isoelektrische Fokussierung (IEF)	56
2.6.7	Gelchromatographie	57
2.6.8	Photometrische Bestimmung des Neutralzuckergehaltes	58
2.6.9	Bestimmung des proteingebundenen Sialinsäuregehaltes mittels HPLC	58
2.6.10	Bestimmung der N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharidstrukturen mittels HPAEC-PAD	59
2.6.11	Deglykosylierung des R24 Antikörpers	60
2.6.11.1	Chemische Deglykosylierung durch Hydrazinolyse	60
2.6.11.2	Enzymatische Deglykosylierung mit PNGase F	62
2.6.12	Massenspektrometrische Strukturaufklärung der N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharide	62
2.6.12.1	Massenspektrometrie mittels MALDI-TOF MS	63
2.6.12.2	Massenspektrometrie mittels Nano ESI-QTOF-MS	63
2.6.13	Biosensor Bindungstests mittels Surface Plasmon Resonance (SPR)	64
2.6.13.1	Aufbau und Funktion des BIAcore 2000	65
2.6.13.2	Physikalische Grundlagen der SPR	66
2.6.13.3	Lösungen und Reagenzien	67
2.6.13.4	Durchführung	67
2.6.13.5	Kinetische Analyse der Bindungsstudien	68
2.7	Isolierung, Aufreinigung und Charakterisierung des Gangliosids G_{D3}	70

2.7.1	Isolierung von Gangliosiden aus Buttermilch	70
2.7.2	Präparative HPLC	71
2.7.2.1	TMAE-Fractogel Anionenaustauschchromatographie	71
2.7.2.2	Entsalzung	72
2.7.2.3	Nucleosil Adsorptionschromatographie	73
2.8	Glykosphingolipidanalytik	73
2.8.1	Analytische Trennung durch Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (HPTLC)	73
2.8.1.1	Chromatographieplatten	74
2.8.1.2	Auftragung der Proben auf die Platten	74
2.8.1.3	Entwicklung der Chromatogramme (Laufmittel)	74
2.8.2	Analytische Detektion mittels Orcin- und Resorcin-Färbung	75
2.8.3	Immunologischer Nachweis von G_{D3} mittels Overlay-Technik	75
2.8.4	Photometrische Bestimmung des lipidgebundenen Sialinsäuregehaltes	77
3	Ergebnisse und Diskussion	78
3.1	Kultivierung der Zelllinie HB-8445	78
3.1.1	Adaption an serumfreie Bedingungen	78
3.1.1.1	Kultivierung in serumhaltigem Kulturmedium	78
3.1.1.2	Kultivierung im serumreduzierten und serumfreien Kulturmedium	79
3.1.1.3	Zusammenfassung und Diskussion	80
3.1.2	Kultivierung der HB-8445 Zelllinie im SuperSpinner-System unter serumfreien Bedingungen	80
3.1.2.1	Einfluß der HSA-Konzentration und eines erhöhten CO_2 -Anteils in der Begasungsluft auf die zellspezifischen Parameter	81
3.1.2.2	Langzeitkultivierung	85
3.1.2.3	Erstellung einer Produktionszellbank	85
3.1.2.4	Zusammenfassung und Diskussion	86
3.2	Reindarstellung des Gangliosids G_{D3}	87
3.2.1	Trennung durch Anionenaustausch-HPLC mit TMAE-Fractogel	87

3.2.2	Trennung durch Adsorptions-HPLC mit Nucleosil	88
3.2.3	G _{D3} -Detektion mittels Overlay-Technik	89
3.2.4	Quantitative und qualitative Bestimmung des Sialinsäuregehaltes	90
3.2.4.1	Zusammenfassung	90
3.2.5	Kultivierung der HB-8445 Zelllinie unter serumfreien Bedingungen in unterschiedlichen Kultursystemen	91
3.2.5.1	Kultivierung bei einem pH-Wert von 7,4	92
3.2.5.2	Kultivierung bei einem pH-Wert von 7,2	96
3.2.5.3	Kultivierung bei einem pH-Wert von 6,9	101
3.2.5.4	Kultivierung unter Verwendung eines HEPES-Puffersystems	105
3.2.5.5	Kultivierung im 1-l-SuperSpinner	109
3.2.5.6	Vergleich der Wachstums-, Verbrauchs- und der Produktionsraten von HB-8445 unter verschiedenen Kulturbedingungen	113
3.2.5.7	Untersuchung der Stabilität von R24 Antikörpern in verschiedenen Kulturmedien	118
3.2.5.8	Zusammenfassung	119
3.3	Aufreinigung des R24 Antikörpers	120
3.3.1	Affinitätsreinigung mittels Protein A-Säulenchromatographie	120
3.3.1.1	Zusammenfassung	123
3.4	Molekulare Charakterisierung des R24 Antikörpers	124
3.4.1	Überprüfung des Molekulargewichts und der Reinheit der aufgearbeiteten R24 Antikörper	124
3.4.1.1	SDS-Gelelektrophorese	125
3.4.1.2	Gelchromatographie	126
3.4.1.3	Isoelektrische Fokussierung (IEF)	128
3.4.1.4	Zusammenfassung	130
3.4.2	Untersuchungen zur Glykosylierung des R24 Antikörpers	130
3.4.2.1	Detektion von proteingebundenen Oligosacchariden mittels Lektinen	130
3.4.2.2	Bestimmung des Neutralzuckergehaltes des R24 Antikörpers	132

3.4.2.3	Qualitative und quantitative Bestimmung des Sialinsäuregehaltes mittels HPLC	133
3.4.2.4	Strukturelle Charakterisierung und Quantifizierung der Asialo-Oligosaccharide mittels HPAEC-PAD . . .	135
3.4.2.5	Molmassenbestimmung der Asialo-Oligosaccharide mittels MALDI-TOF-MS	140
3.4.2.6	Molmassenbestimmung der Oligosaccharide mittels Nano ESI-QTOF-MS	142
3.4.2.7	Sialidaseaktivität der Hybridomzelllinie HB-8445 . . .	146
3.4.2.8	Zusammenfassung	147
3.4.3	Messung der molekularen Interaktion des R24 Antikörpers mit immobilisiertem G_{D3} (Biomolecular Interaction Analysis) . . .	149
3.4.3.1	Zusammenfassung	154
4	Zusammenfassung	155
4.1	Fazit und Ausblick	161
5	Abkürzungen	163

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Biotechnologie und Zellkultivierung

Historisch gesehen ist die Biotechnologie eine jahrtausende alte Technik, die ihren Ursprung in der Nahrungs- und Genußmittelproduktion bei der Herstellung von Milchprodukten wie Käse und Joghurt (Milchsäuregärung) und alkoholischen Getränken (alkoholische Gärung) hat. In der jüngeren Vergangenheit erlebte sie ab den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts eine starke Weiterentwicklung, als es gelang, Mikroorganismen zur gezielten Produktion z.B. von Antibiotika und Aminosäuren einzusetzen.

Waren es in der frühen Phase Bakterien, Pilze und Hefen, die als Mikroorganismen in der Biotechnologie zur Anwendung kamen, traten später auch zunehmend tierische Zelllinien und mit ihnen die Zellkulturtechnik in das Interessensfeld der Biotechnologen.

Ein Meilenstein in der Entwicklung der Biotechnologie ist das 1975 vorgestellte Verfahren von Köhler und Milstein [81] zur Erzeugung somatischer, antikörperproduzierender Zellhybridome. Durch die Fusion von Knochenmarkstumorzellen mit B-Lymphozyten entstehen immortalisierte Zellhybride, die nach der Selektion eines einzelnen Klons in der Lage sind, einheitliche, monoklonale Antikörper mit einer definierten Spezifität zu sezernieren.

Ein weiterer wichtiger Schritt in der Biotechnik war die Entwicklung, durch selektive Amplifizierung definierte Gensequenzen mittels PCR (Polymerase Chain Reaction) zu vervielfältigen [125]. Im Zusammenspiel mit dem Wissen über die Funktionalität der Gene und durch gerichtete Veränderungen der DNS konnte die Expression von Produkten in biologischen Systemen gezielt beeinflusst werden. Die molekulare Biotechnologie stellt unter Nutzung solcher Werkzeuge eine der großen Chancen der Wissenschaft im Kampf gegen viele Krankheiten und Leiden dar. So werden bereits heute wichtige humantherapeutische Wirkstoffe wie z.B. Faktor VIII und Erythropoietin (EPO) mit rekombinanten Zelllinien produziert.

Einhergehend mit der Konstruktion von Organismen mit nutzbringenden Eigenschaften, ermöglichten große Fortschritte in der Steriltechnik und biotechnischen Verfahrenstechnik, Produkte mit empfindlichen Organismen wie tierischen Zellkulturen *in vitro* im industriellen Maßstab herzustellen [157], und sie somit einer wirtschaftlichen Nutzung zuzuführen.

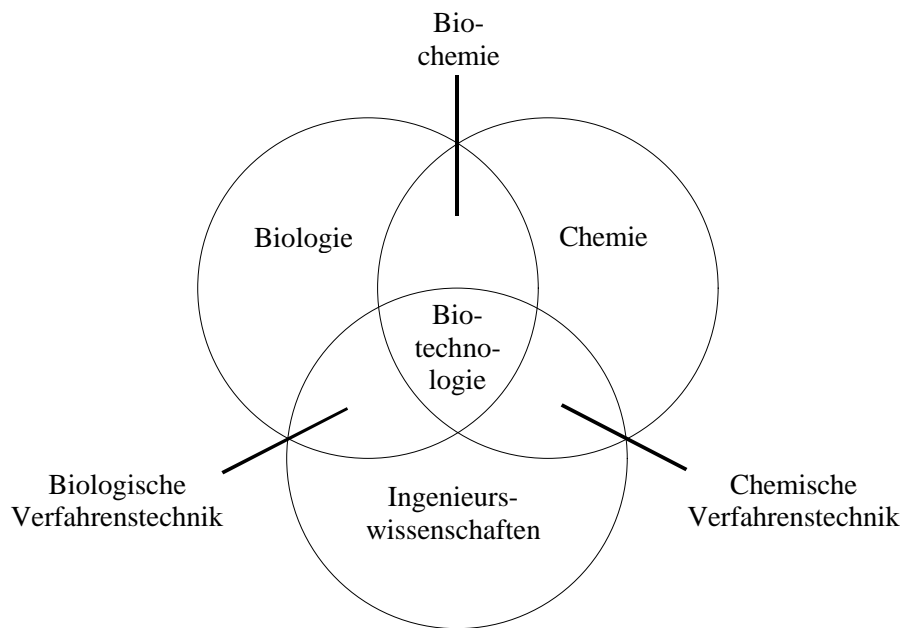


Abbildung 1.1: Die Biotechnologie als interdisziplinäre Wissenschaft [21].

Die Biotechnologie hat sich in ihrer Geschichte zu einem stark interdisziplinär geprägten Wissenschaftszweig entwickelt. Nur in einem fächerübergreifenden Zusammenspiel der klassischen Disziplinen Biologie, Chemie und der Ingenieurwissenschaften lassen sich biotechnologische Prozesse gezielt und effizient entwickeln und führen.

Die Biotechnologie oder Biotechnik gilt als eine der wirtschaftlichen und wissenschaftlichen Schlüsseltechnologien der Zukunft, deren Entwicklungspotential und Konsequenzen heutzutage nur zu erahnen sind.

Eines der wichtigsten, biotechnologisch hergestellten Proteine sind Antikörper, die dank ihrer hohen Antigen-Spezifität erfolgreich in der medizinischen Diagnostik und Therapie eingesetzt werden.

1.2 Antikörper

Antikörper oder synonym auch Immunglobuline (Ig) sind Proteine, die *in vivo* von ausdifferenzierten B-Lymphozyten (Plasmazellen) gebildet werden und spezifisch an ein Antigen binden. Sie markieren, beispielsweise nach einer bakteriellen Infektion,

erkannte Krankheitserreger für die Immunzellen (Killerzellen, Makrophagen) und bestimmte Abwehrstoffe (Komplementsystem) und sind somit zentraler Bestandteil der humoralen Immunantwort.

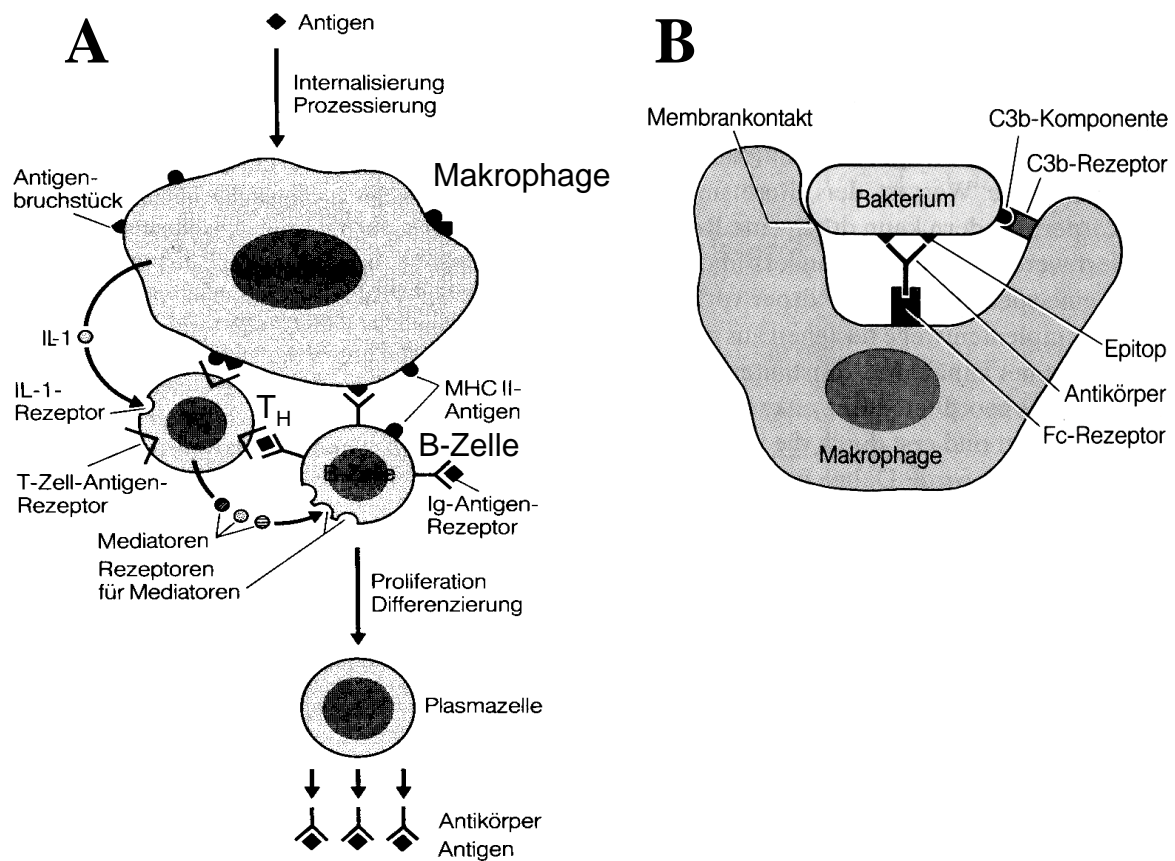


Abbildung 1.2: (A) Die einzelnen Phasen der humoralen Immunantwort, beginnend mit der Antigenaufnahme und Antigenprozessierung durch Makrophagen bis zur Synthese der Antikörper durch Plasmazellen. T_H: Helfer-T-Zelle, IL-1: Interleukin 1. (B) Erkennung eines partikulären Antigens durch einen Makrophagen durch direkte Fremderkennung, Erkennung des F_c-Teils eines gebundenen Antikörpers oder Erkennung der zellgebundenen Komplementkomponente C3b (nach Czihak, 1990 [24]).

Antikörper sind aus zwei gleichen schweren Ketten (H-Ketten) mit einem Molekulargewicht von jeweils 50 kDa und zwei gleichen leichten Ketten (L-Ketten) von jeweils 25 kDa aufgebaut, die durch intra- und intermolekulare Disulfidbrücken zusammengehalten werden.

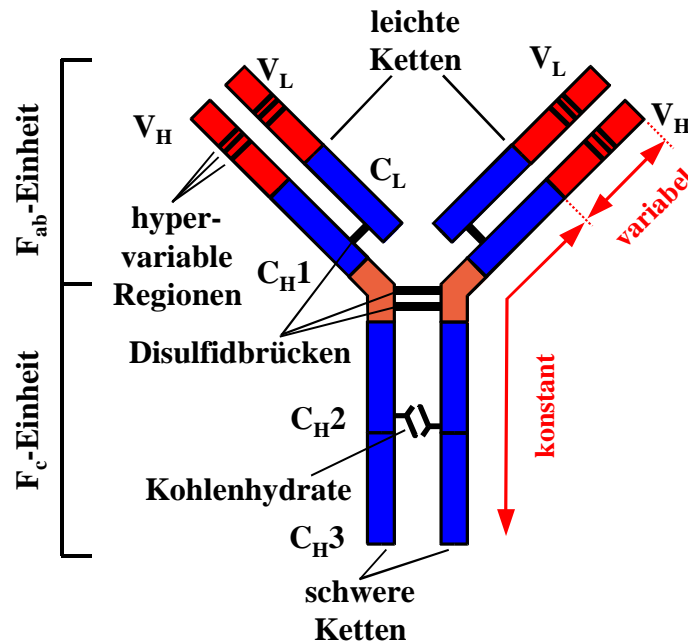


Abbildung 1.3: Schematischer Aufbau eines IgG Antikörpers (nach Czihak, 1990 [24]).

Bei den leichten Ketten handelt es sich entweder um Kappa-(κ)- oder Lambda-(λ)-Ketten. Die schweren Ketten, die auch die Immunglobulinklasse bestimmen, werden durch die griechischen Buchstaben γ beim IgG, α beim IgA, μ beim IgM, δ beim IgD und ϵ beim IgE gekennzeichnet. Innerhalb der Klasse IgG gibt es beim Menschen vier Subklassen, IgG₁ bis IgG₄, die sich unter anderem in ihrer biologischen Halbwertszeit, Anzahl der Disulfidbrücken zwischen den H-Ketten und hinsichtlich ihrer Komplementaktivierung unterscheiden [24]. Bei der Maus werden die IgG-Subklassen IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} und IgG₃ voneinander unterschieden [150].

Alle Immunglobuline sind Glykoproteine mit einem prozentualen Kohlenhydratanteil von 3 bis 13 % [24].

Innerhalb jeder Kette gibt es bezüglich der Aminosäuresequenz variable (V) und konstante (C) Molekülregionen. Die variablen Bereiche im Ig-Molekül sind für die Antigen-spezifität verantwortlich. Die L-Kette besitzt nur eine C-Region (C_L), die H-Kette drei konstante Regionen (Domänen C_{H1} bis C_{H3}).

Der variable Bereich des Ig-Moleküls ist für die Bindung des Antigens bzw. Epitops zuständig. Dem konstanten Bereich kommen eine Reihe wichtiger biologischer Funktionen zu, unter anderem die Aktivierung des Komplementsystems, die Bindung an Makrophagen im Rahmen der Opsonisierung und Eliminierung des Antigens und die Bindung an K-Zellen. Die Verweildauer der Antikörper im Organismus, auch als biologische Halbwertszeit bezeichnet, wird zudem vom konstanten Bereich des Moleküls beeinflusst.

Durch proteolytische Spaltung des IgG-Moleküls mit Papain, das zwischen den

C_{H1} - und C_{H2} -Domänen der schweren Kette spaltet, bekommt man zwei F_{ab} -Fragmente, die die variablen Bereiche des Moleküls enthalten. Zusätzlich ergibt die Spaltung ein F_c -Fragment, das die biologischen Wirkungen der konstanten Bereiche des IgG-Moleküls vermitteln kann.

1.2.1 Monoklonale Antikörper

Antikörper mit gemeinsamer Spezifität innerhalb eines Organismus sind normalerweise heterogen (polyklonale Antikörper), weil sie von vielen verschiedenen antikörperproduzierenden Zellen erzeugt werden. Dagegen sind Antikörper, die von einer Zelle produziert werden, homogen (monoklonale Antikörper).

C. Milstein und G. Köhler entwickelten 1975 eine Methode, homologe Antikörper fast jeder beliebigen Spezifität herzustellen [81, 150]. Dazu wird eine Maus zunächst mit einem Antigen immunisiert. Ein Gemisch von Lymphozyten und Plasmazellen aus der Milz wird *in vitro* mit Myelomzellen fusioniert, denen die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase fehlt. Im sogenannten HAT-Kulturmedium, einem Selektionsmedium, welches Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält, sterben nicht fusionierte Myelomzellen ab, da sie kein Hypoxanthin verwerten können. Die Milzzellen sterben in dem Zellkulturmedium ebenfalls ab, da sie *in vitro* nicht proliferieren können. Nur die Hybridzellen überleben unter diesen Bedingungen, die dann als Hybridomzellen bezeichnet werden. In anschließenden Selektionsverfahren werden die einzelnen Zellklone isoliert, die die gewünschte Spezifität aufweisen. Diese Hybridomzellen können dann zur *in vitro* Produktion großer Mengen eines Antikörpers mit genau definierter Spezifität in großvolumigen Zellkulturen genutzt werden.

Monoklonale Antikörper stellen ein wichtiges Hilfsmittel in der medizinischen Diagnostik und Therapie dar [165, 195]. So wird eine Vielzahl von Antikörpern mit genau definierter Spezifität in der Tumordiagnostik und Tumorthherapie angewendet [9, 142]. In der Humantherapie werden bevorzugt Antikörper eingesetzt, die dem menschlichen weitestgehend ähneln, um keine oder nur eine geringe Immunantwort gegen sie hervorzurufen. Um das immunogene Potential von Antikörpern in der Humantherapie herabzusetzen, werden verschiedene Methoden angewandt, um Antikörper zu „humanisieren“. So bestehen chimäre Antikörper aus der variablen Region eines Antikörpers einer beliebigen Spezies (häufig Maus) mit der gewünschten Antigenspezifität, und der konstanten Region eines humanen Antikörpers.

Ein Beispiel hierfür ist der chimäre monoklonale Antikörper „Infliximab“, der bei der Behandlung der Crohn-Erkrankung, einer Entzündungskrankheit des Verdauungstraktes, zum Einsatz kommt. Er ist gegen TNF (Tumor Necrosis Factor) gerichtet [8]. Einen Schritt weiter geht man bei den humanisierten Antikörpern, bei denen nur noch die hypervariablen Domänen aus Maus-Antikörpern stammen. Vielversprechend sind auch gentechnisch erzeugte Knockout-Mauslinien, bei denen die eigenen Antikörperegene durch humane ersetzt wurden. Man hofft aus diesen Mäusen Hybridome gewinnen zu können, die humane Antikörper produzieren [66].

1.2.2 Der R24 Antikörper

Bei dem monoklonalen Mausantikörper R24 handelt es sich um einen potentiellen Kandidaten für den therapeutischen Einsatz beim Menschen zur Behandlung von malignen Melanomen. Er ist gegen ein Zelloberflächenantigen von humanen Melanomzellen gerichtet [27]. Genauere Untersuchungen ergaben, daß es sich bei dem Antigen des R24 Antikörpers um das Gangliosid G_{D3} handelt [186]. Die Spezifität des Antikörpers wird im Kapitel 1.3 genauer erörtert.

In vitro Untersuchungen zeigten das starke Vermögen des R24 Antikörpers zur Komplementsystem vermittelten Cytotoxizität (CDC, Complement-Dependent Cytotoxicity) und Antikörper abhängigen zellulären Cytotoxizität (ADCC, Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity) im humanen System [52, 196]. Daneben konnte im Tiermodell gezeigt werden, daß der R24 Antikörper in der Lage ist, das Wachstum von Melanomen zu blockieren [139].

Auf Grund seines therapeutischen Potentials sind seit 1984 [65] an weit über 100 Patienten im Rahmen von klinischen Phase 1 und 1b Studien Untersuchungen zur Wirksamkeit bei der Behandlung von metastasierenden Melanomen unternommen worden [65, 78, 107, 119, 120, 137]. Dabei wurde der Antikörper sowohl als einzelnes Agens als auch in Kombination mit Interleukin 2 und α -Interferon in Dosierungen von bis zu 50 mg pro m^2 Körperoberfläche und Tag verabreicht [3].

Neben dem Bindungsvermögen des R24 Antikörpers an sein Antigen über die hypervariablen Regionen, ist der Mechanismus des „homophilic binding“, das Vermögen eines R24 Antikörpermoleküls, an ein weiteres R24 Molekül zu binden, von besonderem Interesse. Röntgenstrukturanalysen und SPR (Surface Plasmon Resonance, BIACore) Untersuchungen ergaben, daß diese Antikörper-Antikörper Bindung durch die variablen Domänen der schweren Kette vermittelt werden. Kaminski et al. (1999) [74] zeigten, daß ein Maus-Mensch chimärer Antikörper (chR24), der das „homophilic binding“-Vermögen nicht besitzt, in Liposomen-Bindungstests signifikant schwächer als R24 an G_{D3} bindet. Auf Grund der ermittelten Bindungskinetik ist neben der Antigenbindung auch eine kooperative Interaktion der Antikörper untereinander wahrscheinlich, zu der die C_H2 -Regionen der schweren Ketten der Antikörper beitragen [74]. Daß das Vermögen des „homophilic binding“ des R24 Antikörpers über die C_H2 -Domäne vermittelt wird, konnte anhand der Kristallstruktur des F_{ab} Fragments mittels Röntgenstrukturanalyse gezeigt werden. Das Liposomenmodell liefert somit wertvolle Anhaltspunkte für die selektive Erkennung von Zellen mit einer Überexpression von G_{D3} (siehe Kapitel 1.3) durch den R24 Antikörper.

Dieser Kenntnisstand über die wichtige Funktion der C_H2 -Domäne des R24 Antikörpers läßt den N-Glykosylierungen des Antikörpers, die in der C_H2 -Domäne lokalisiert sind, ein besonderes Interesse zukommen. Zusätzlich kommt den N-Glykanen im R24 Antikörper aus der Rolle, die sie für die Proteinstruktur und damit für die Funktion des Antikörpers spielen, eine große Bedeutung zu [99, 188].

Im Zusammenhang mit dem Einsatz des R24 Antikörpers in der Humantherapie ist die Frage nach der Immunogenität des aus Maus stammenden Antikörpers wichtig.

Es wurde versucht mit gegen G_{D3} gerichteten chimären Antikörpern, wie dem monoklonalen Antikörper KM871 [52] oder mit Chimären des R24 Antikörpers (chR24) [74] möglichst verträgliche Therapeutika zu schaffen. Diese Antikörper zeigten aber alle nicht die tumorwachstumshemmende Wirkung des R24 Antikörpers. Neben der immunogenen Wirkung, die auf den Proteinanteil des Antikörpers zurückzuführen ist, ist die eventuell immunogene Wirkung [141] des Oligosaccharidteils noch unklar, die sich aus dem Vorhandensein der Sialinsäure Neu5Gc ergäbe. Sie ist im humanen System unter normalen Bedingungen nicht zu finden [160, 163].

1.3 Glykosphingolipide (GSL)

Der monoklonale R24 Antikörper besitzt als Antigen das Gangliosid G_{D3} , ein Glykosphingolipid (GSL), das als tumorassoziiertes Antigen auf Melanomzellen vorhanden ist. Neben dem G_{D3} werden auch andere Ganglioside, wie G_{M2} , G_{D2} und Fuc- G_{M1} als tumorassoziierte Antigene für Lymphome, Melanome und Lungenkarzinome diskutiert [25, 52, 50, 114, 89].

GSL sind Bestandteile vieler biologischer Membranen in Säugerzellen. Zusammen mit Phospholipiden und Cholesterol bilden sie unter physiologischen Bedingungen Lipiddoppelmembranen aus, in die membranständige Proteine integriert sind. Eine Vielzahl auf biologischen Lipiddoppelmembranen vorkommender Glykostrukturen sind Bestandteil von GSL oder Membranproteinen. Die Kohlenhydratketten sind nur auf der äußeren Seite von Plasmamembranen zu finden, was zu einem asymmetrischen Aufbau führt [24, 48].

1.3.1 Struktur und Biosynthese der GSL

Glykosphingolipide sind amphiphile Moleküle. Sie bestehen aus einem hydrophilen Saccharidanteil, meist in Form einer Oligosaccharidkette, und einem hydrophoben Lipidanteil, dem Ceramid (Cer). Das Molekül besitzt eine L-förmige Gestalt [48], wobei jeweils ein Schenkel vom hydrophilen bzw. hydrophoben Molekülanteil gebildet wird. Der Ceramidanteil bildet den membranständigen Teil der GSL in der Lipiddoppelmembran.

1.3.1.1 Struktur

Das Ceramid besteht aus dem zweiwertigen Aminoalkohol Sphingosin und einer Fettsäure, die über eine Amidbindung miteinander verbunden sind. In biologischen Membranen kommen Fettsäuren mit Kettenlängen von C_{14} bis C_{24} vor. Diese sind zum Teil ungesättigt und können cis-Doppelbindungen enthalten. Die am häufigsten vorkommenden Fettsäuren sind die C_{16} -, C_{18} - und die C_{24} -Fettsäuren.

Die Glykosphingolipide lassen sich in drei Hauptklassen einteilen: neutrale GSL,

Mäuse und die meisten bisher untersuchten Säugetiere besitzen Ganglioside mit den Sialinsäuren N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) und N-Glykolyneuraminsäure (Neu5Gc). Diese beiden Sialinsäuren unterscheiden sich voneinander nur in einer zusätzlichen Hydroxylgruppe am Kohlenstoff in Position 11 beim Neu5Gc (siehe Abbildung 1.5). Beim Menschen hingegen ist Neu5Gc nicht vorhanden [160, 163].

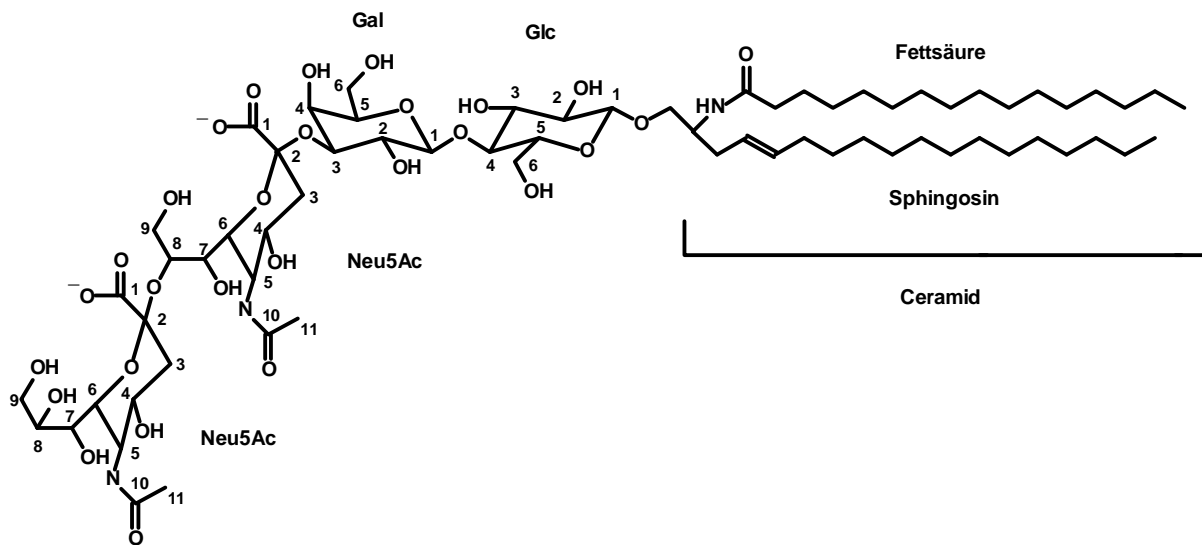


Abbildung 1.5: Schematische Zeichnung des G_{D3} -Moleküls $\text{Neu5Ac}\alpha 8\text{Neu5Ac}\alpha 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta 1\text{Cer}$ ($G_{D3}(\text{Neu5Ac}, \text{Neu5Ac})$).

Der R24 Antikörper bindet vorrangig an das Gangliosid G_{D3} . Wenn die terminale Sialinsäure ein Neu5Ac und die innenliegende Sialinsäure ein Neu5Gc ist, ist die Affinität des Antikörpers halb so hoch wie im Vergleich zu der G_{D3} Variante mit der Neu5Ac-Neu5Ac-Gruppierung. Bei terminalem Neu5Gc ist nur noch $\frac{1}{30}$ der Antigenaffinität zu detektieren. Leichte Kreuzreaktionen des Antikörpers konnten mit den Gangliosiden G_{T1a} und G_{Q1b} festgestellt werden (siehe Tab. 1.1) [186].

1.3.1.2 Biosynthese

Bei den Glykosphingolipiden handelt es sich um sekundäre Genprodukte. Das bedeutet, daß ihre Glykostrukturen nicht direkt in der DNA der Zelle verschlüsselt vorliegen [48]. Sie entstehen vielmehr durch eine schrittweise Verlängerung der Zuckerkette, die von membranständigen Enzymen, den Glykosyltransferasen, im ER und Golgi-Komplex katalysiert werden. Die Lokalisation und damit die Abfolge der Glykosyltransferasen bestimmt die Reihenfolge der Zucker, wie sie in der Kohlenhydratkette vorliegen soll. Die Glykosyltransferase erkennt das Zwischenprodukt und das entsprechende Zucker-Spender-Molekül, den Nukleotidphosphatzucker (= „ak-

tivierte Zucker“) wie UDP-Gal oder UDP-GlcNAc [190]. Die Information über die GSL-Struktur ist also indirekt in der DNA, die die Aminosäuresequenzen der Glykosyltransferasen codiert, gespeichert. Welches zellspezifische Muster an GSL von der Zelle synthetisiert wird, reguliert sich in erster Linie auf der transkriptionalen Ebene der Proteinsynthese. Hier wird festgelegt, welcher spezifische Satz an Glykosyltransferasen in der Zelle vorhanden ist. Zusätzlich kommt es durch die Regulation der Enzymaktivitäten der Glykosyltransferasen zu einer Steuerung der zellspezifischen GSL-Muster. Sialinsäuren wie z.B. Neu5Ac werden durch spezifische Sialyltransferasen von CMP-Neu5Ac auf die Zuckerkette der GSL übertragen, wodurch die Ganglioside gebildet werden.

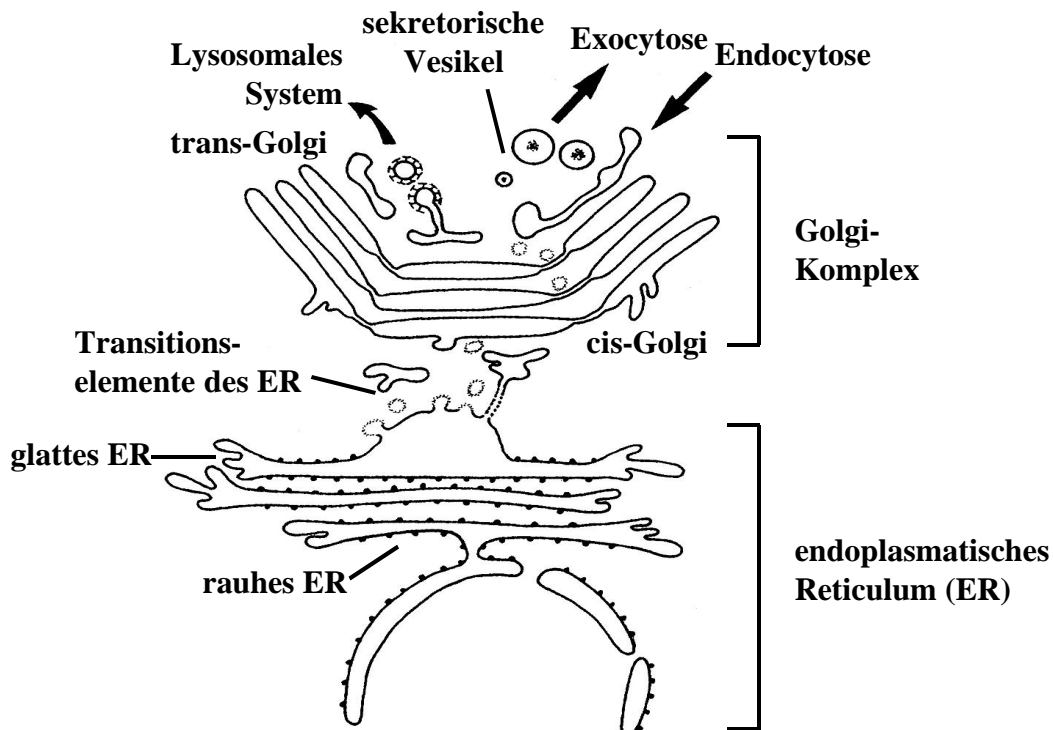


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Hauptorganellen der Glykosylierungsmaschinerie (nach Pavelka, 1997 [37]).

Die Biosynthese der GSL beginnt mit der Umsetzung von L-Serin und Palmitoyl-CoA zu Sphingosin. Durch anschließende Kopplung des Sphingosins mit einer langkettigen Fettsäure entsteht Ceramid. Diese Reaktionen erfolgen an der cytosolischen Seite der Lipiddoppelmembran des endoplasmatischen Retikulums (ER) oder des Golgi-Komplexes [192]. Die Initialglykosylierung des Ceramids durch spezielle Glykosyltransferasen führt mit den Nukleotid-Zuckern UDP-Glukose oder UDP-Galaktose als Zuckerdonor zu einem Monohexosylceramid oder auch Cerebrosid. Glukosylceramid ergibt die Grundstruktur vieler GSL, auf die im Folgenden weiter eingegangen werden soll. Die Addition weiterer Zuckerreste an das Glukosylceramid (GlcCer) geschieht im Lumen des ER und Golgi-Komplexes. Dazu muß das GlcCer zunächst mittels eines „flip“- Mechanismus auf die luminalen Seite der Lipiddop-

pelmembran gelangen [192]. Der nächste Biosyntheseschritt für das GlcCer, der im ER abläuft, ist immer die Addition einer Galaktose in β -1-4-Konfiguration, wobei Laktosylceramid entsteht.

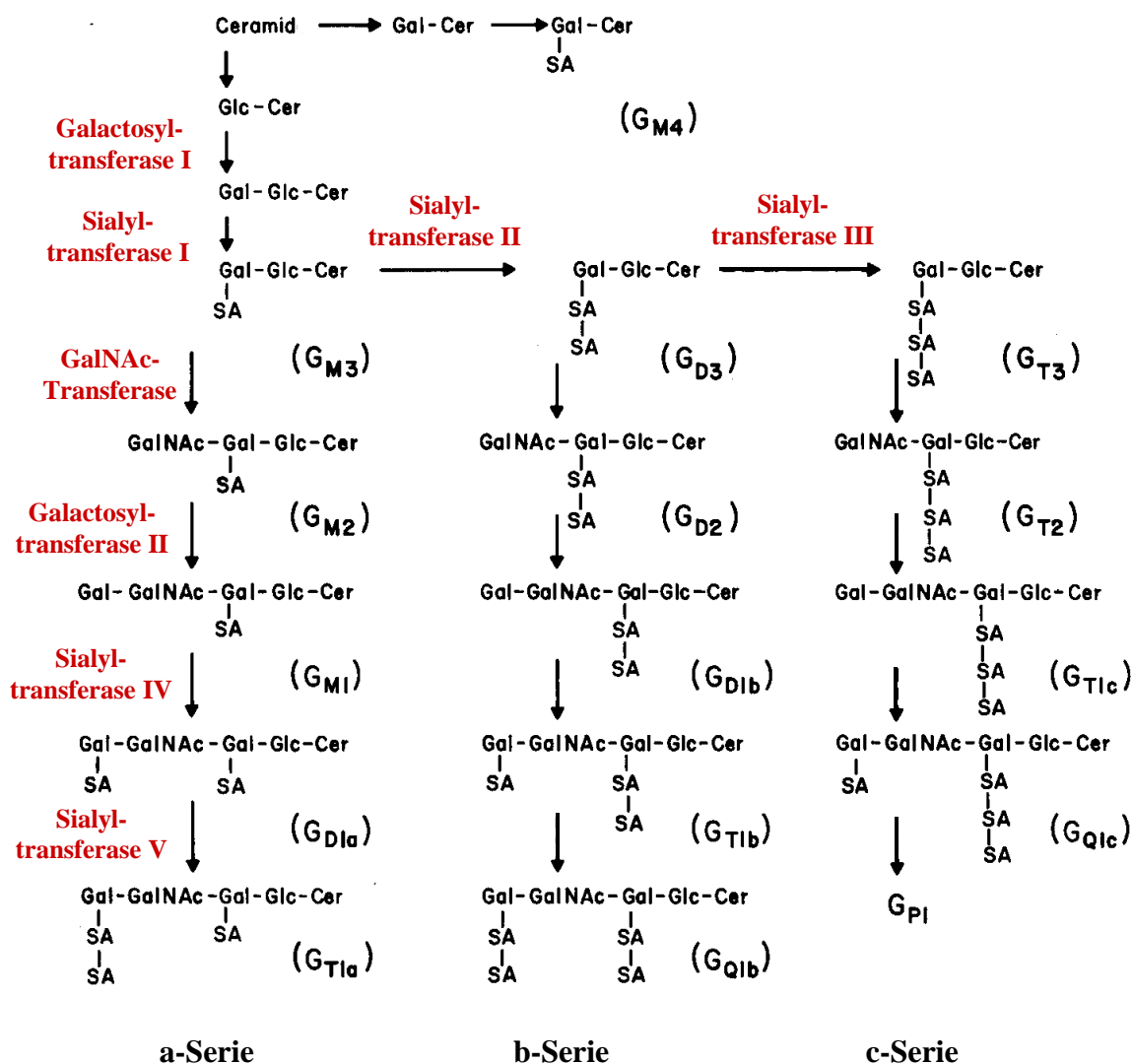


Abbildung 1.7: Vorschlag für den Biosyntheseweg der Ganglioside. Abkürzungen: Cer, Ceramid; Glc, Glukose; Gal, Galaktose; GalNAc, N-Acetylgalaktosamin und SA, Sialinsäure (nach Yu and Ando, 1980, und Pohlentz et al., 1988 [203, 154]).

Nomenklatur Da die in der Abbildung 1.4 verwendeten Strukturnamen der GSL für eine Nomenklatur viel zu lang sind, wurde durch die IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) Commission on Biochemical Nomenclature ein Regelwerk zur Benennung der GSL geschaffen [69]. Ein älteres Abkürzungssystem für Ganglioside beruht auf L. Svennerholm [185].

Tabelle 1.1: Strukturen und Bezeichnungen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Ganglioside.

Struktur ^a	Bezeichnung ^b
Neu5Ac α 3Gal β 4GlcCer	G _{M3}
Neu5Ac α 8Neu5Ac α 3Gal β 4GlcCer	G _{D3}
GalNAc β 4[Neu5Ac α 3]Gal β 4GlcCer	G _{M2}
Gal β 3GalNAc β 4[Neu5Ac α 3]Gal β 4GlcCer	G _{M1}
Neu5Ac α 3Gal β 3GalNAc β 4[Neu5Ac α 3]Gal β 4GlcCer	G _{D1a}
Gal β 3GalNAc β 4[Neu5Ac α 8Neu5Ac α 3]Gal β 4GlcCer	G _{D1b}
Neu5Ac α 8Neu5Ac α 3Gal β 3GalNAc β 4[Neu5Ac α 3]Gal β 4GlcCer	G _{T1a}
Neu5Ac α 3Gal β 3GalNAc β 4[Neu5Ac α 8Neu5Ac α 3]Gal β 4GlcCer	G _{T1b}
Neu5Ac α 8Neu5Ac α 3Gal β 3GalNAc β 4[Neu5Ac α 8Neu5Ac α 3]- -Gal β 4GlcCer	G _{Q1b}

^a nach der IUPAC-Nomenklatur (1997)

^b Abkürzungssystem nach Svennerholm (1963)

1.3.2 Vorkommen und Bedeutung von GSL

In allen Säugerzellen sind Glykosphingolipide vorzufinden. Sie wurden erstmals 1874 von J. L. W. Thudichum [159] beschrieben, der sie aus Hirngewebe isoliert hat, in dem sie in relativ großen Mengen vorkommen.

Sie sind Bestandteil der extrazellulären Seite der zellumhüllenden Plasmamembran [93]. Es sind aber auch GSL im Cytosol und in den Membranen von Zellorganellen beschrieben worden, wie z.B. in den cytoplasmatischen Granula von Makrophagen [49].

Aufgrund des amphiphilen Charakters der Glyko- und Phospholipide der Plasmamembran kommt es unter physiologischen Bedingungen zur Ausbildung einer Lipiddoppelschicht mit dynamisch fluiden Eigenschaften, in die die weiteren Bestandteile der Membran, wie z.B. membranständige Proteine, eingelagert sind [180]. Die GSL als Bestandteil der Membran sind in dieser nicht statistisch gleichverteilt, sondern können Inseln oder Flöße, sogenannte „Rafts“, ausbilden, in denen sie in hohen Konzentrationen vorkommen [54, 71, 179].

GSL treten in tierischem Gewebe in zelltypspezifischen Mustern auf [31, 46, 131], die je nach Spezies, Zustand und Alter des Gewebes auch variieren. Die GSL sind einem ständigen „turn over“ durch Biosynthese und anschließendem Abbau unterworfen [190]. Der fehlerfreie Auf- und Abbau der GSL ist von großer Wichtigkeit, da es bei Fehlfunktionen der hierzu notwendigen Enzyme zu Stoffwechselkrankheiten kommen kann. Diese Krankheiten nehmen einen meist tödlichen Verlauf, wie z.B. die Tay-Sachs-Krankheit [108].

Von den mehr als 250 verschiedenen bis heute strukturell aufgeklärten GSL [171], ist zur Zeit nur zum Teil deren genaue biologische Funktion bekannt. Dennoch gibt es ein weites Spektrum an bekannten biologischen Funktionen, bei denen GSL eine

entscheidende Rolle spielen. Da GSL vornehmlich auf der äußeren Membranseite der Plasmamembran vorkommen, sind sie in der Lage, vielfältige Wechselwirkungen mit ihrer Umgebung einzugehen [46].

GSL besitzen eine große Bedeutung für eine Vielzahl von Erkennungsprozessen. So fungieren sie z.B. bei Zell-Zell-Wechselwirkungen als Signalmoleküle [76, 101]. Sie werden als Differenzierungsmarker verschiedener Zellen wie Erythrozyten, Lymphozyten, frühe embryonale Zellen, etc. beschrieben [161, 174]. Das bekannteste Beispiel hierfür dürfte das Auftreten als Blutgruppenantigene auf Erythrozyten sein, die die Differenzierung in verschiedene Blutgruppen des ABO-Systems manifestieren [34, 48]. GSL besitzen immunmodulatorische Fähigkeiten [110], wie z.B. eine inhibitorische Wirkung auf T-Lymphocyten [90]. Sie interagieren mit biologisch aktiven Substanzen, wie z.B. Glykoproteinhormonen, Serotonin, Interferon, Interleukin, etc. [22, 48, 128]. Sie beeinflussen die Aktivität von membranständigen Proteinkinasen wie dem EGF-Rezeptor (Epidermal Growth Factor)[116]. Hierdurch wirken sie bei der Signaltransduktion mit [67]. Ein weiteres Beispiel für die Signaltransduktion ist die Wechselwirkung von exogen dargebotenem Gangliosid G_{M3} mit einer Tyrosinkinase, was das Zellwachstum inhibiert [49].

Bedingt durch ihre Exponierung auf der Zelloberfläche „nutzen“ verschiedene Viren, Bakterien und ihre Toxine die Oligosaccharidstrukturen von GSL als Rezeptoren [128].

Ein weiteres interessantes Anwendungsgebiet von GSL beruht auf ihrer Funktion als Zelladhäsionsmoleküle bei Entzündungsreaktionen. Im Prozeß der Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen spielen GSL mit Sialyl- Le^x -Struktur als Rezeptoren für das E-Selektin offenbar eine bisher unterschätzte, wenn nicht gar entscheidende Rolle [12]. Es wäre denkbar, die Inhibierung solcher Wechselwirkungen zur Milderung von chronischen Entzündungsreaktionen oder Unterdrückung von Tumormetastasierungen auszunutzen.

Die Bedeutung der GSL als Tumor-assoziierte Antigene für die Immuntherapie ist vor ca. zwei Jahrzehnten sicherlich überschätzt worden [47, 52, 134]. Es gibt jedoch einige Beispiele, wie Tumor-assoziierte Ganglioside zur gezielten Erkennung und Bekämpfung von Tumoren benutzt wurden. So sind monoklonale Antikörper gegen die Ganglioside G_{M2} , G_{D2} und G_{D3} , die als melanomassoziierte Antigene gelten, bereits erfolgreich bei der Behandlung von malignen Melanomen eingesetzt worden [3] und zeigten gute Heilungsansätze [52, 142]. Eine weiterer vielversprechender Immuntherapieansatz ist die Behandlung von Lungenkarzinomen mit Antikörpern gegen das Gangliosid Fuc- G_{M1} [25].

1.4 Glykosylierung sekretorischer Proteine

Viele Proteine werden ko- und posttranslational modifiziert, was die Wirksamkeit der Biomoleküle unter Umständen entscheidend beeinflussen kann. Zu den für Eukaryonten gehörenden typischen Modifizierungen wie Glykosylierung, Phosphory-

lierung und Acetylierung sind Prokaryonten nur teilweise oder gar nicht fähig [2]. Aus diesem Grund werden häufig Zellen tierischen Ursprungs zur Produktion komplexer Proteine verwendet, obwohl sie langsamer wachsen, geringere Produktkonzentrationen liefern und höhere Ansprüche an den Kultivierungsprozeß stellen als Mikroorganismen.

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit bestand in der Untersuchung der Glykosylierung der produzierten Antikörper.

1.4.1 Natürlich vorkommende N- und O-Glykane

In der Natur kommen Glykoproteine intra- und extrazellulär sowie als Membranbestandteile vor. Die verschiedenen Verknüpfungsmöglichkeiten von Monosaccharideinheiten zu Oligosacchariden (2 bis ca. 20 Monomere) erlauben eine extrem hohe Anzahl an verschiedenen theoretisch möglichen Varianten. Bei einem Oligosaccharid, bestehend aus nur 5 natürlich vorkommenden Monomeren, sind über 1 Milliarde Formen denkbar. Diese Vielfalt ergibt sich aus den verschiedenen Möglichkeiten der Verknüpfung der Zucker untereinander (z.B. 1-3, 1-4 u.a.), der Anomerie der Bindung (α - oder β -Konfiguration), möglichen Substitutionen (Sulfat-, Phosphat-, Acetyl-Reste, usw.), linearen oder verzweigten Strukturen usw..

Im Vergleich dazu sind es bei einem Polypeptid mit gleicher Zahl an Monomeren nur 15625 verschiedene Strukturen. Aus dem riesigen Fundus an theoretisch möglicher Heterogenität der Oligosaccharidstrukturen ist in der Natur aber nur ein relativ geringer Bruchteil in Glykoproteinen zu finden.

1.4.2 Funktion von Oligosacchariden in Proteinen

Oligosaccharidketten in Glykoproteinen sind in eine Vielzahl von Wechselwirkungen sowohl innerhalb des Proteins als auch des Proteins mit seiner Umwelt involviert [36, 102, 191].

Die Funktionen der Glykane von Glykoproteinen können dabei in zwei Kategorien untergliedert werden, basierend auf den physikochemischen und den biologischen Eigenschaften. Bei der physikochemischen Rolle der Glykane handelt es sich um den Einfluß der Zuckerketten im Protein auf dessen Struktur und Verhalten in Lösungen. Die biologischen Funktionen sind Wechselwirkungen der Glykane mit den sie umgebenden biologischen Systemen mit ihren komplexen Regulationsmechanismen.

Tabelle 1.2: Beispiele für Funktionen von Glykanen in Glykoproteinen [99].

Typ	Funktion eines Glykans
Physiko- chemisch	<ul style="list-style-type: none"> - Modifiziert die Löslichkeit, elektrische Ladung, Masse, Größe und Viskosität in Lösungen - Beeinflußt die Proteinfaltung - Stabilisiert die Proteinkonformation - Verleiht thermische Stabilität
Biologisch	<ul style="list-style-type: none"> - Bestimmt den intrazellulären Weg und die Lokalisation eines Glykoproteins - Determiniert die biologische Halbwertszeit im Organismus - Modifiziert immunologische Eigenschaften - Moduliert die Aktivität von Enzymen und Hormonen - Agiert als Oberflächenrezeptor von Zellen für Lektine, Antikörper, Toxine, usw. - Nimmt teil an Zell-Zell Interaktionen - Schützt gegen proteolytischen Abbau

Die speziellen Formen und Funktionen, die die Oligosaccharide in Antikörpern innehaben, werden in Abschnitt 1.4.3 genauer erläutert.

1.4.2.1 Biosynthese von Proteinglykanen

Grundsätzlich kann zwischen N- und O-glykosidisch gebundenen Oligosacchariden unterschieden werden. Bei allen Eukaryonten erfolgt bei der Biosynthese der N-Glykane die Kopplung eines Dolicholphosphat-Oligosaccharids, einem mannose- und glukosereichen Vorläuferkomplex, lumenseitig im Endoplasmatischen Retikulum (ER) *en bloc* an ein durch die Konsensussequenz Asn-X-Ser(Thr) markiertes Asparagin. Nicht alle potentiellen Bindungsstellen werden auch N-glykosidisch besetzt. Unter anderem sinkt die Wahrscheinlichkeit der Glykosylierung mit fortschreitender Verlängerung der Polypeptidkette während der Proteinbiosynthese, wofür sterische Behinderungen der beteiligten Oligosaccharyltransferasen verantwortlich gemacht werden [82].

Die Oligosaccharidkette wird N-glykosidisch an die NH₂-Gruppe des Asparagins gebunden. Diese konservative *en bloc* Prozessierung einschließlich der folgenden Glukoseabspaltungen sind wichtiger Bestandteil des Proteinfaltungsprozesses [51]. Insgesamt stellt die Glykosylierung von Proteinen ein wichtiges strukturbeeinflussendes Element dar, was sich auch in der Funktionalität der Proteine niederschlägt [14, 99].

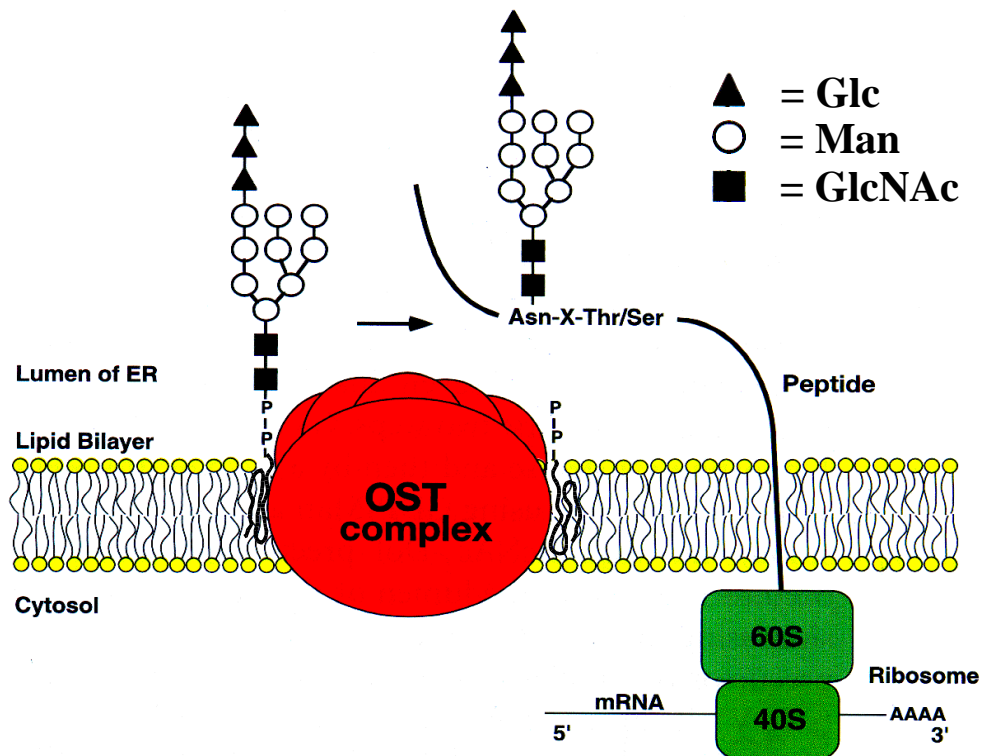


Abbildung 1.8: An der lumenseitigen ER-Membran erfolgt der Transfer der mannose-reichen Dolicholphosphat-Oligosaccharid-Vorläuferstruktur durch eine Oligosaccharyltransferase (OST) an ein Asparagin des translatierten Proteins (nach Marth, 1999 [192]).

Die Modifikation und Kettenverlängerung der mannosereichen Vorläuferstruktur (siehe Abb. 1.9) erfolgt im ER und im Golgi-Apparat durch spezifische Glykosidasen [123] und Glykosyltransferasen [80]. Im ersten Schritt werden dabei im ER alle Glukose- und einige Mannosereste der Oligosaccharid-Vorläuferstruktur entfernt, so daß ein gestutztes oder „truncated“ Glykoprotein entsteht. Die anschließende Zuckerkettenverlängerung der Glykostrukturen des Proteins erfolgt dann überwiegend im Golgi-Komplex. In komplexen Oligosaccharidketten treten endständig häufig die unter physiologischen Bedingungen negativ geladenen Sialinsäuren auf. Sie werden durch Sialyltransferasen im Golgi-Komplex an die Zuckerketten angehängt. Endständige Sialinsäuren beeinflussen in besonderem Maße die Verweildauer eines Glykoproteins und damit die Wirkzeit in einem Organismus, was für therapeutisch eingesetzte Glykoproteine ein wesentliches Kriterium darstellt [99].

Ähnlich wie bei der Biosynthese der Glykosphingolipide handelt es sich bei dem Ergebnis der Modifikation und Kettenverlängerung der Oligosaccharidstrukturen von Glykoproteinen auch um sekundäre Genprodukte, bei denen die Glyko-Strukturen nicht direkt in der DNA der Zelle verschlüsselt vorliegen (siehe 1.3.1.2).

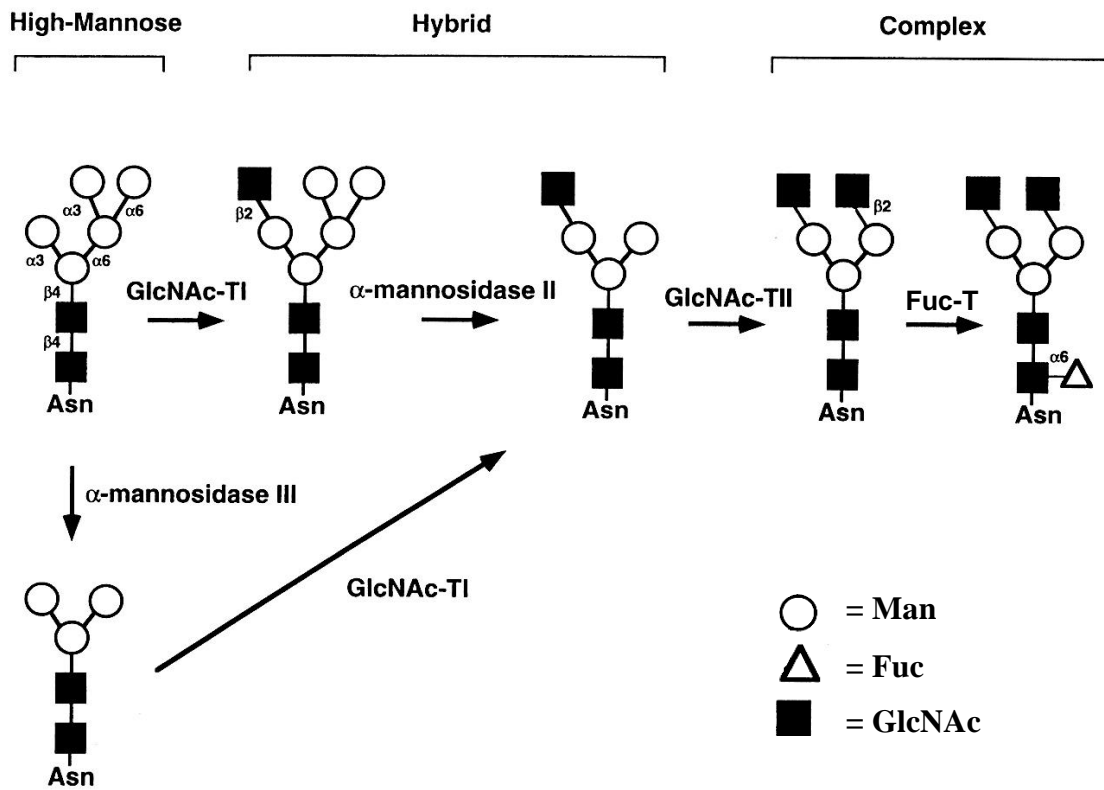


Abbildung 1.9: Die N-Glykan-Modifikationen in Vertebraten im Golgi-Komplex ergeben die drei Subtypen: High Mannose, Hybrid und Komplex Typ 1.10 (nach Marth, 1999 [192]).

Mehrere N-Glykosylierungsstellen am selben Protein können verschiedene Glykanstrukturen aufweisen, was als Oligosaccharid-Heterogenität oder Mikroheterogenität [166] bezeichnet wird. Es scheint, daß die Aminosäuresequenz und die Proteinsekundärstruktur die Glykanmodifikationen beeinflussen [113]. Weitere Faktoren, die die Glykosylierung beeinflussen, sind die Nukleotidzuckerkonzentrationen, die Transportgeschwindigkeiten der Glykoproteine und die Konzentration und Lokalisation der Glykosyltransferasen im ER und Golgi-Komplex. Die Lokalisation der Glykosyltransferasen bestimmt dabei die Reihenfolge der Modifikationen [192]. Einige Glykosyltransferase- und Glykosidasegene enthalten Promotorregionen, die für eine Regulation der Expression verantwortlich sind. Auch sind Mechanismen von Regelkreisen bekannt, die die Aktivität der Glykosyltransferasen beeinflussen [13].

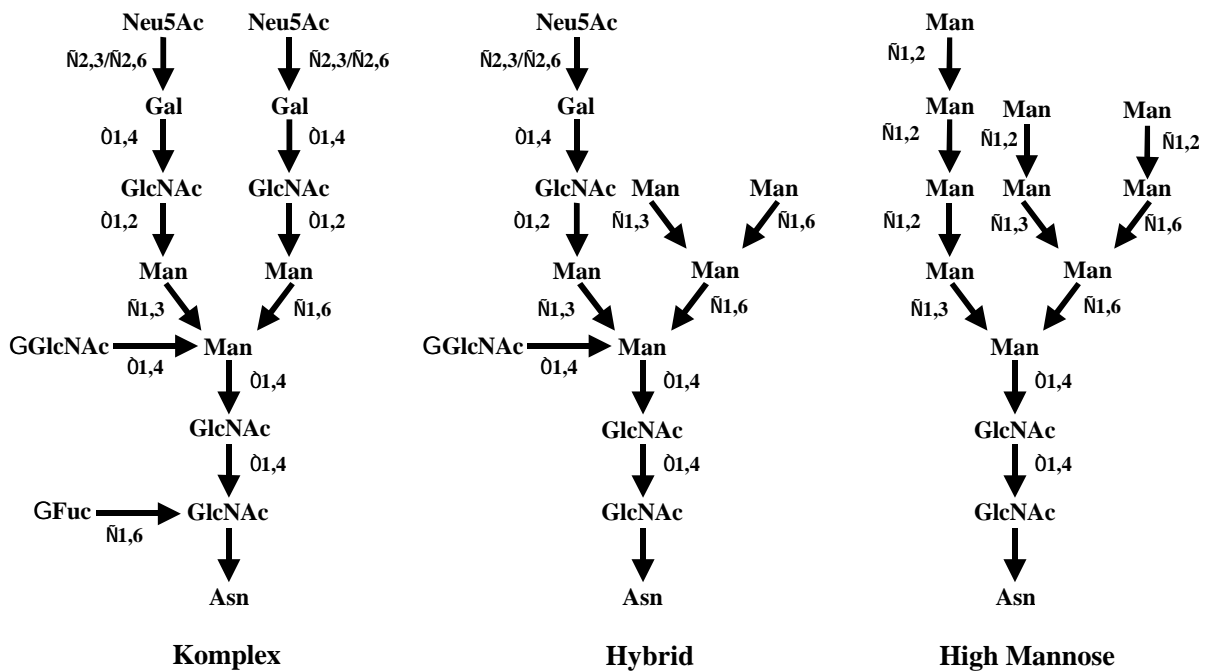


Abbildung 1.10: Beispiele von Strukturen der Oligosaccharid-Seitenketten von natürlich vorkommenden N-Glykanen. Der β 1,4 gebundene GlcNAc-Rest am Asn-nächsten Mannose-Rest ist aus graphischen Gründen nicht in die korrekte Position als Winkelhalbierende der beiden Zuckerketten gezeichnet worden. Das Vorhandensein eines solchen GlcNAc-Restes führt zu einer sogenannten „bisecting“-Struktur.

Als besonders geeignete Expressionssysteme zur Produktion von Wirkstoffen für die Humantherapie haben sich CHO- (Chinese Hamster Ovary) und BHK-Zelllinien (Baby Hamster Kidney) erwiesen, da die Glykosylierungsmuster bei von ihnen produzierten Glykoproteinen den humanen sehr nahe kommen. So wird rekombinantes humanes Erythropoietin (rhEPO), das als Humantherapeutikum zugelassen ist, bei der Firma Amgen (USA) mit einer CHO-Zelllinie produziert.

O-glykosidisch gebundene Oligosaccharide zeigen eine viel größere Heterogenität in ihren Strukturen als die N-gebundenen [111]. Die O-Glykane sind an eine Serin/Threonin-N-Acetylgalaktosamin Grundstruktur gebunden. Die Biosynthese der O-Glykane ist eine späte post-translationale Modifikation der Proteine durch eine Anzahl von aufeinanderfolgenden Glykosyltransferasereaktionen. O-Glykoside sind weniger verzweigt und von geringerer Kettenlänge als N-gekoppelte Oligosaccharide.

Der erste Schritt der Synthese der O-gebundenen Glykane ist die Addition von N-Acetylgalaktosamin (GalNAc) an ein Threonin oder Serin des Proteins im *cis*-Golgi. Die darauf folgende schrittweise Verlängerung der Zuckerkette erfolgt durch die Addition vornehmlich von Galaktose, Fucose und Sialinsäuren [37]. Ein Beispiel für ein hauptsächlich aus O-Glykanen bestehendes Glykoprotein mit sehr großem Zuckeranteil ist das humane intestinale Mucin (größer als 1000 kDa), das Magen- und Darm-Epithelzellen umgibt. Die Form der Mucine wird auch allgemein als „Flaschenbürsten“-Struktur bezeichnet.

1.4.3 Glykosylierung von IgG Antikörpern

Antikörper sind als Bestandteil der Immunantwort in der Lage ein Antigen zu binden und weitere Schritte in der Abwehr von Fremdkörpern zu induzieren. Alle Antikörper sind an einer konservierten Position in den konstanten Domänen ihrer schweren Ketten N-glykosyliert.

Jeder Antikörperisotyp besitzt eine Gruppe N-glykosidisch gebundener Kohlenhydratstrukturen, die einen Einfluß auf die Faltung, Sekretion und funktionale Aktivität haben [200]. IgG Antikörpermoleküle aus tierischen Zellen bestehen zu ca. 2 - 3 % ihrer Masse aus Kohlenhydraten. Bis zu 30 % der humanen Antikörper besitzen zusätzlich F_{ab} assoziierte Zucker.

Die am Asn 297 auf jeder schweren Kette N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharide von IgG Antikörpern haben eine biantennäre Komplex-Typ-Struktur. Das Glykan ist zwischen den C_H2 Domänen verborgen und besitzt starke Wechselwirkungen zu den Aminosäureresten [72]. Diese beiden biantennären N-Glykanstrukturen eines Antikörpers können dabei sowohl gleich (symmetrisch) als auch ungleich (unsymmetrisch) sein [112].

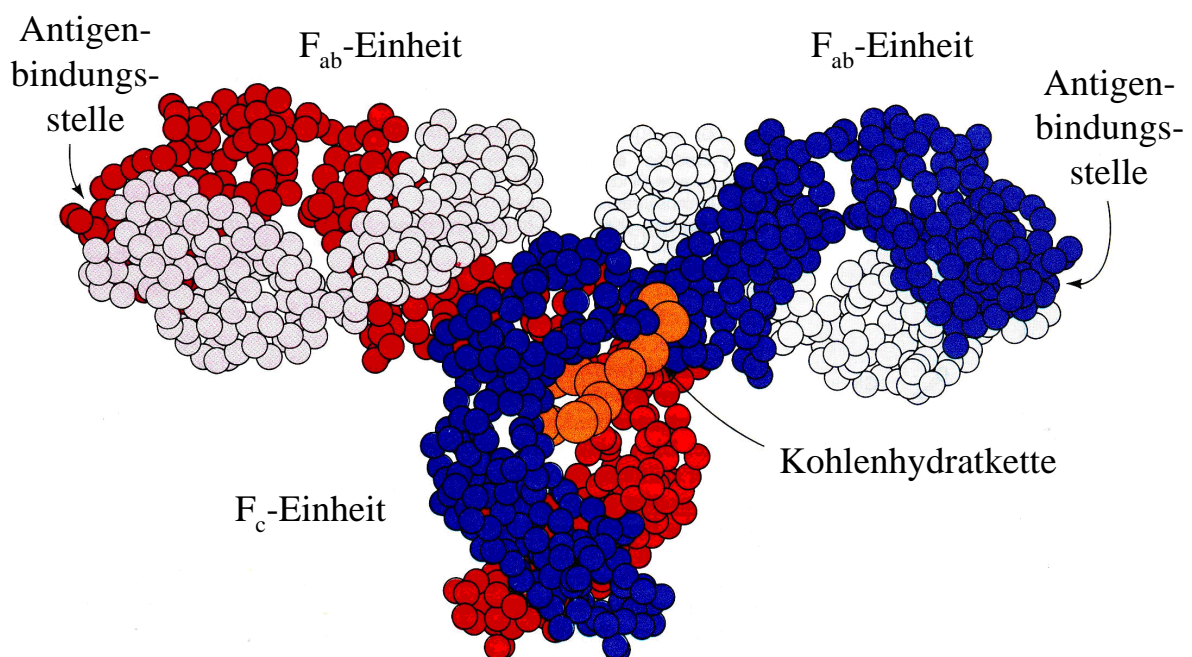


Abbildung 1.11: Schematische Zeichnung der dreidimensionalen Struktur eines IgG Moleküls (nach Silverton et al., 1977 [178]).

Durch moderne Technologien ist die Produktion von Antikörpern oder deren Fragmenten in einer Vielzahl von Organismen möglich. Es werden dazu tierische Zellen, Bakterien, Hefen, Pflanzen- oder Insektenzellen verwendet [201]. Da Antikörper Glykoproteine sind und ihre Glykane die Funktion mitbestimmen, kommen Antikörper aus Bakterien für eine Humantherapie nicht in Frage. Hefen, Pflanzen- und Insek-

tenzellen zeigen im Vergleich zu Säugerzellen so stark veränderte Zuckerstrukturen, so daß sie zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht für eine Antikörperproduktion geeignet sind. Beim Einsatz von Säugerzellen variieren die Strukturen der N-Glykane und das Ausmaß der Glykosylierung je nach Herkunft der Zelllinie [160]. So sind bei humanen Antikörpern häufig „bisecting“ N-Acetylglukosamine vorhanden, während Antikörper aus Mauszellen diesen Verzweigungstyp nicht aufweisen [73]. Ein weiteres signifikantes Charakteristikum von humanen Antikörpern ist das ausschließliche Vorhandensein von Neu5Ac, wohingegen bei Glykoproteinen z.B. von Mäusen oder Ratten auch Neu5Gc zu finden ist [73, 163].

Eine geänderte Glykosylierung hat Einfluß auf die Eigenschaften eines Antikörpers. So kommt es bei rheumatischen Erkrankungen, bei denen Antikörper eine wichtige Rolle spielen, zu Änderungen des normalen Glykosylierungsmusters, wie z.B. einem Anstieg der Fukosylierung der Antikörper [41]. Es wird vermutet, daß ein übermäßig häufiges Vorhandensein von terminalen Sialinsäuren zu einer Aggregationsneigung führt, die die Bildung von unlöslichen Immunkomplexen zur Folge hat [7]. Eine Behandlung von Antikörpern mit β -Galaktosidase zur Abspaltung von Galaktose führt zu einer Änderung der Proteinkonformation und zu einer signifikanten Reduzierung der Bindung von C1q. Der Verlust an Galaktose beeinflußt aber nicht die Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Cytotoxizität [202]. Eine geänderte Glykosylierung hat zudem Einfluß auf die Selbstassoziation und die Kryopräzipitation der Antikörper [144].

Als ein Vermittler in der humoralen Immunantwort interagiert ein Antikörper mittels seiner F_c Region sowohl mit dem zellulären als auch mit den löslichen Komponenten des Immunsystems. Die Bindungsstelle für C1q, der ersten Komponente der Komplementkaskade, ist auf der C_H2 Domäne lokalisiert. Untersuchungen ergaben, daß eine fehlende Glykosylierung in dieser Domäne zu einem Verlust der Bindungsfähigkeit sowohl an C1q als auch an die F_c -Rezeptoren von Monozyten führt oder diese stark einschränkt [188]. Die biologische Halbwertszeit eines IgG_3 -Subtyps wurde durch den Austausch von Asn 297 gegen Gln verkürzt, was auf die fehlende Glykosylierung zurückzuführen war [200]. Außerdem führt eine fehlende Glykosylierung eines Antikörpers zu einer höheren Sensitivität gegenüber Proteasen.

1.5 Einfluß der Kulturbedingungen auf Antikörper Produktion und Glykosylierung

Ein Vergleich der Glykosylierung von Antikörpern, die in Ascites und im Bioreaktor (mit und ohne Serum im Medium) produziert wurden, zeigte einen großen Unterschied bezüglich ihrer Sialylierung. Während beim Antikörper aus Ascites keine Sialinsäuren nachgewiesen werden konnten, enthielt unter serumfreien Kulturbedingungen produzierter Antikörper doppelt soviel Sialinsäure wie unter serumhaltigen Bedingungen produzierter [109, 148]. Auch der Grad der Galaktosylierung des Antikörpers, der im Bioreaktor produziert wurde, war höher als in Ascites [103].

Das verwendete Kultursystem bei der *in vitro* Produktion von Antikörpern hat ebenfalls einen Einfluß auf die Glykosylierung. So zeigte sich, daß bei Kultursystemen mit hoher Zelldichte wie Hollow-Fiber Bioreaktoren im Vergleich zu konventionellen Batch-Kulturen mit niedrigerer Zelldichte, der Grad der Galaktosylierung abnimmt [83, 103]. Die Beobachtung, daß eine Abnahme des Sauerstoffpartialdruckes in der Kultur zu einer verringerten Galaktosylierung der produzierten Antikörper führte [84], könnte diesen Effekt bei hochdichten Zellkulturen plausibel erscheinen lassen.

Die Größe des Inokulums hat in einem Bereich von 1 bis 3×10^5 Zellen/ml als eine Initialgröße einer Zellkultur keinen Einfluß auf die Zell- und Produktausbeute. Ein hoher Anteil (bis zu 40 %) an konditioniertem Medium (= Medium, das aus dem vorherigen Batch der Kultivierung stammt) beim Batch-Beginn hilft, die Lag-Phase zum Kulturbeginn zu verringern und zu einer höheren Zellviabilität zu gelangen, führt aber gleichzeitig zu einer Abnahme der Produktivität der Zellen [30].

Ein mit NS0 Zellen produzierter monoklonaler IgG₁ Antikörper wies mit steigendem Alter der Kultur vermehrt Glykostrukturen vom High-Mannose-Typ auf [164].

Borys et al. (1993) stellten einen Effekt der NH₃ Konzentration auf die Glykosylierung fest. Hohe NH₃ Konzentrationen führten nach ihren Beobachtungen zu einer Abnahme der am weitesten glykosylierten Form des Proteins. Bei niedrigen pH-Werten liegt NH₃ in der protonierten Form als NH₄⁺ vor, welches diesen Effekt nicht zeigte [11].

In dem Bericht von Hayter et al. (1992) zu der Beziehung zwischen Hybridomzellwachstum und Antikörperproduktion wurde ein Einfluß des pH-Wertes der Kultur auf das Zellwachstum und die Produktionsraten festgestellt [57]. Der optimale pH-Wert für das Zellwachstum einer IgG-produzierenden Maus Hybridomzelllinie wurde mit 7,2 im untersuchten Bereich von pH 6,6 bis 7,8 ermittelt. Dagegen konnte die höchste Antikörperproduktion bei einem pH-Wert von 6,8 festgestellt werden. Diese Untersuchungen wurden allerdings nicht bei einem geregelten pH-Wert durchgeführt, sondern es wurden Zellen in einem HEPES-gepufferten und auf ein definierten Anfangs-pH-Wert eingestelltes Medium über 24 h kultiviert. Ozturk et al. (1991) stellten bei einer kontrollierten satzweisen Bioreaktor-Kultivierung einer Maus-Hybridomzelllinie fest, daß die spezifische Antikörperproduktionsrate bei pH-Werten unterhalb von 7,2 auf das Doppelte anstieg [143]. Bei der Ermittlung des Zusammenhanges von Zellwachstum und Antikörperproduktion gelangten Miller et al. (2000), die für ihre Untersuchungen eine kontinuierliche Kultivierung mit geregelter pH-Wert und pO₂ verwendeten, zu der Erkenntnis, daß die Antikörperproduktion nicht wachstumsassoziiert war und höhere Antikörperproduktionsraten bei niedrigeren Wachstumsraten erzielt wurden. Sie stellten auch fest, daß die „pH-Wert Historie“ einen Einfluß auf das Verhalten der Zellen bei einem gegebenen pH-Wert hatte. Unter der „pH-Wert Historie“ wurde dabei der Verlauf des pH-Wertes einer Kultur in den vorangegangenen Passagen bezeichnet. Moran et al. (2000) beschreiben dagegen, daß in ihren Untersuchungen keine Auswirkung des pH-Wertes der Kultur auf das Zellwachstum, die Zellviabilität und die Antikörperproduktion der Myelom Zelllinie NS0 im pH-Wert Bereich von 7,1 bis 7,5 festzustellen war [122].

1.6 Arbeitsziel

Das Arbeitsziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Auswirkungen der Produktionsbedingungen auf die Produktionsraten, Integrität und Funktionalität des monoklonalen R24 Maus-Antikörpers zu ermitteln.

Die Arbeit wurde in zwei Teile untergliedert, wobei der erste die Produktion des monoklonalen R24 Maus-Antikörpers unter verschiedenen Kulturbedingungen beinhaltet. Der Einfluß der Kulturbedingungen sollte dabei im SuperSpinner und im 2-Liter-Bioreaktor untersucht werden, wobei im 2-Liter-Bioreaktor ein unreguliertes HEPES-Puffersystem und geregelte $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Puffersysteme mit den pH-Werten 7,4; 7,2 und 6,9 eingesetzt wurde.

Der zweite Teil der Arbeit handelt von der Aufreinigung und Charakterisierung des produzierten R24 Antikörpers unter besonderer Berücksichtigung der Auswirkungen der Kulturbedingungen auf die Glykosylierung und Funktionalität des IgG_3 -Antikörpers. Als Ausgangspunkt zur Untersuchung der Produktqualität des Antikörpers sollten seine Bindungseigenschaften und Funktionalität überprüft werden. Zu diesem Zweck mußte sein Antigen, das Gangliosid GD_3 , aus Buttermilch aufgereinigt und charakterisiert werden.

Es war angestrebt, die Produktion des monoklonalen IgG_3 Antikörpers R24 unter serumfreien Bedingungen durchzuführen. Zu diesem Zweck war die R24 produzierende Maus-Maus Hybridomzelllinie an serumfreie Bedingungen zu adaptieren. Um alle folgenden Zellkultivierungen mit dem gleichen Zellmaterial starten zu können, was eine Voraussetzung für den korrekten Vergleich der verschiedenen Kultivierungen darstellt, war eine kryokonservierte Zellbank anzulegen. In Kultivierungen im 1-Liter-SuperSpinner mit $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Puffersystem war das Verhalten der serumfrei adaptierten Zelllinie bezüglich der Medienzusammensetzung, der Antikörperkonzentration im Kulturüberstand in der Wachstums- und Absterbephase, der Produktionsleistung bei Langzeitkultivierung und des Einflusses durch den pH-Wert zu testen.

Mit den Erfahrungen und Ergebnissen aus den Kultivierungen im 1-Liter-Maßstab stellte sich daran anschließend die Aufgabe, größere Mengen R24 Antikörper unter möglichst definierten Bedingungen herzustellen. Dazu war ein 2-Liter-Bioreaktor mit blasenfreier Begasung, der im Gegensatz zum SuperSpinner eine Regelung des Sauerstoffpartialdruckes und des pH-Wertes zuließ, einzusetzen. Es sollte R24 Antikörper im $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Puffersystem bei den pH-Werten 7,4; 7,2 und 6,9 und im unregulierten HEPES-Puffersystem produziert werden.

Zur Antikörperaufreinigung aus den Kulturüberständen sollte eine Affinitätschromatographie mittels Protein A im FPLC-System eingesetzt werden.

Anschließend war der Einfluß der unterschiedlichen Kulturbedingungen auf die Antikörperproduktion zu untersuchen. Dazu waren die Eigenschaften und die Reinheit des produzierten und über Protein A gereinigten Proteins mittels SDS-Gelelektrophorese, Isoelektrischer Fokussierung und Gelchromatographie zu über-

prüfen.

Bei der Ermittlung von möglichst günstigen Produktionsbedingungen, die eine hohe Ausbeute bei entsprechender Qualität des Antikörpers gewährleisten, tritt bei Glykoproteinen neben der Integrität der Aminosäuresequenz zunehmend die Glykosylierung in den Mittelpunkt des Interesses [73, 160, 200]. Bei neueren, von der FDA (United States Food and Drug Administration) zugelassenen therapeutisch eingesetzten Glykoproteinen, wird daher mittlerweile neben der Untersuchung der Peptidintegrität auch der Nachweis der Glykosylierung gefordert, bevor entsprechende Produkte für Therapiezwecke eingesetzt werden dürfen [100].

Durch Bindungstests mit zuckerspezifischen Lektinen sollten erste Erkenntnisse über das Vorhandensein und die Verteilung von Oligosaccharidstrukturen im Antikörper erhalten werden.

Zur weiteren Untersuchung, ob und welche Auswirkungen die unterschiedlichen Kulturbedingungen auf die Glykosylierung der Antikörper haben, waren die sowohl chemisch (Hydrazinolyse) als auch enzymatisch (PNGaseF) abgespaltenen Oligosaccharide zu isolieren und massenspektrometrisch mittels Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight-Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) und Electrospray Quadrupol Time-Of-Flight Mass Spectrometry (ESI-QTOF-MS) zu charakterisieren. Die chromatographische Methode der High-Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAEC-PAD) sollte weitere Einzelheiten zur Struktur und Quantität der verschiedenen Oligosaccharide liefern. Zusätzlich zur Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) sollten mit ihr der Sialinsäuregehalt der produzierten Antikörper bestimmt werden.

Um die Funktionalität und Antigenspezifität des zu produzierenden Antikörpers testen zu können, war es zunächst notwendig, sein Antigen, das Gangliosid G_{D3} , zu isolieren und aufzureinigen. Dazu sollten aus einer Gangliosidmischung mittels präparativer Anionenaustauschchromatographie und Adsorptionschromatographie das Gangliosid G_{D3} rein dargestellt werden. Die Charakterisierung des reinen G_{D3} sollte dann durch dünnschichtchromatographische und immunologische Methoden erfolgen. Zur Quantifizierung des isolierten G_{D3} war die Detektion der Sialinsäuren als fluoreszierende Derivate in der RP-HPLC, und photometrisch als Resorcin-Derivate vorgesehen. Das gewonnene G_{D3} sollte dann zum einen in einem ELISA zur Bestimmung des G_{D3} -Bindungsvermögens des produzierten R24 Antikörpers, und zum anderen in zeitaufgelösten Antikörper-Antigen Bindungsstudien mittels SPR (Surface Plasmon Resonance, BIAcore) im Fließkammersystem, eingesetzt werden.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Zellkultivierung

2.1.1 Zelllinie

Zur Produktion des monoklonalen Antikörpers R24 wurde die ATCC-Zelllinie (American Type Culture Collection, Rockville, USA) HB-8445 (Hybridoma Bank) verwendet [6]. Dabei handelt es sich um Maus-Maus Hybridomzellen. Die Zelllinie wurde durch die Fusion von Sp2/0-Ag14 Myelomzellen mit Milzzellen einer (BALB/c \times C57BL/6)F₁ Maus, die mit Zellen der SK-MEL-28 Zelllinie (humanes Melanom) immunisiert wurde, erzeugt [27, 156]. Die HB-8445 Zelllinie sekretiert den monoklonalen Mausantikörper R24 (IgG₃), der gegen ein Zelloberflächenantigen (GD₃) von humanen Melanomzellen gerichtet ist [27, 156].

2.1.2 Medien

Für die Kultivierung der Maus-Hybridomzelllinie HB-8445 gibt die ATCC die Verwendung von 90 % RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) mit nicht-essentiellen Aminosäuren und 10 % [v/v] FCS (Fetal Calf Serum) an. RPMI ist ein Medium, das ursprünglich für Suspensionszellkulturen lymphatische Ursprungs entwickelt wurde [39]. Die zur Kultivierung der Hybridomzellen verwendeten Medien wurden aus Pulvermedienkomponenten unter Zugabe von Reinstwasser (Milli-Q Water Purification System, Millipore, Bedford, MA, USA) und den entsprechenden Supplementen zubereitet. Alle Medien wurden anschließend mit Sterilfiltern (Porenweite 0,2 μm , Sartobran, Satorius AG, Göttingen) unter Verwendung einer Peristaltikpumpe sterilfiltriert und bei +4°C bis zur Verwendung gelagert. Zur Kontrolle der Sterilität wurde eine 10 ml Probe über drei Tage bei 37°C inkubiert. Vor der Zugabe zu den Kulturen wurde das Medium auf 37°C temperiert. Begast wurde mit 95 % Luft und 5 % CO₂, das mit dem Carbonat im Medium als Puffersystem mit physiologischem pH-Wert fungierte.

2.1.2.1 Serumhaltiges Medium

Zur Kultivierung unter serumhaltigen Bedingungen wurde RPMI 1640 Pulvermedium (GibcoBLR, Cat. No.: 51800-043, Karlsruhe) verwendet, dem 10 % FCS (UV-bestrahlt, Viralex, PAA, Cölbe), 2 g/l NaHCO₃, 3 mM L-Glutamin (Merck, Darmstadt) und 1,5 g D-(+)-Glukose (Sigma, Deisenhofen) zugesetzt wurde. Zur Vermeidung von Mykoplasmenkontaminationen enthielt das Medium 10 mg/ml Ciprofloxacin (Ciprobay 100, Bayer, Leverkusen).

2.1.2.2 Serumfreies Medium

Die Zusammensetzung des verwendeten serumfreien Mediums basierte auf einer Mischung von 80 % [w/w] RPMI 1640 (GibcoBLR, Cat. No.: 51800-043, Karlsruhe) und 20 % [w/w] Dulbecco's MEM (Modified Eagle Medium)/Nutrient Mix F12 (1:1) (GibcoBLR, Cat. No.: 32500-035, Life Technologies). Dieses Basalmedium wurde wie folgt supplementiert:

10 mg/l Rinderinsulin (Sigma, Deisenhofen)

10 mg/l Humantransferrin (Intergen, NY, USA)

500 mg/l Humanes Serumalbumin (Human Albumin Solution, Miles Inc., Elkhart, IN, USA)

3 mM L-Glutamin (Merck, Darmstadt)

29 nM Selen (Sigma, Deisenhofen)

1,5 g/l D-(+)-Glukose (Sigma, Deisenhofen)

2,1 g/l NaHCO₃ (Merck, Darmstadt)

Bei Verwendung des HEPES- anstatt des Carbonat-Puffersystems, wurden nur 0,8 mM NaHCO₃ und zusätzlich 20 mM HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure, Roth, Karlsruhe) supplementiert. Vor der Sterilfiltration wurde der pH-Wert des HEPES gepufferten Mediums mit 1 M NaOH auf 7,4 eingestellt.

2.1.3 Kryokonservierung und Stammhaltung

2.1.3.1 Einfrieren der Zellen

Die HB-8445 Hybridomzellen wurden in der Gasphase über flüssigem Stickstoff bei ca. -150°C gelagert. Um eine Zerstörung der Zellmembran durch Kristallbildung beim Einfriervorgang zu verhindern, wurden dem Medium 10 % [v/v] DMSO (Dimethylsulfoxid, Merck, Darmstadt) und 5 g/l Human Serum Albumin als Schutzprotein zugefügt [98].

Durchführung:

1. Einstellen der Zellsuspension auf 2×10^7 Zellen/ml mit $+4^\circ\text{C}$ kaltem RPMI 1640 Medium
2. Zugabe des gleichen Volumens an $+4^\circ\text{C}$ kaltem RPMI 1640 Einfriermedium (20 % [v/v] DMSO, 10 g/l HSA) und vermischen
3. Überführen von je 1 ml der Zellsuspension in Kryogefäße (Nunc, Wiesbaden)
4. Einfrieren bei einer Abkühlrate von ca. $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ auf -80°C
5. Langzeitlagerung in der Gasphase des Stickstofftanks

2.1.3.2 Auftauen der Zellen

Da das beim Einfrieren verwendete DMSO toxisch auf Zellen wirkt, ist ein schnelles Entfernen aus dem Medium nach dem Auftauen von großer Bedeutung, bevor die Stoffwechselaktivitäten der Zellen wieder einsetzen.

Durchführung:

1. Schnelles Auftauen des Kryoröhrchens im Wasserbad, bis nur noch ein kleiner Rest Eis vorhanden ist
2. Überführung der Zellsuspension in ein steriles 10 ml Proberöhrchen
3. Waschen: Tropfenweise Zugabe von 9 ml $+4^\circ\text{C}$ kaltem Medium für 5 min, Mischen und anschließendes Abzentrifugieren bei 100 g
4. Überstand verwerfen und das Zellsediment mit $+4^\circ\text{C}$ kaltem Medium resuspendieren, auf 10 ml auffüllen und den Waschschrift wiederholen.
5. Einstellen der Einsaatdichte von 2×10^5 Zellen/ml mit 37°C vorgewärmtem Medium

2.2 Bioreaktorsysteme

Für die Zellkulturen wurden 250-ml-Spinnerflaschen, 1-Liter-SuperSpinnerflaschen und ein 2-Liter-Bioreaktor eingesetzt. Für serumhaltige Kulturen wurden im kleinen Maßstab Gewebekulturflaschen aus Polystyrol (Nunc, Wiesbaden) mit 25 cm^2 Oberfläche verwendet. Der Gasaustausch erfolgt in den Spinner- und den Gewebekulturflaschen über die Oberfläche des Kulturmediums. Die Inkubation erfolgte bei oberflächenbegasteten Systemen in Brutschränken (Biocenter 2001, Intega Bioscience,

Fernwald) bei 37°C und einer 95 % Luft- und 5% CO₂-Begasung. Alle zur Zellkultur verwendeten Glasgeräte wurden mit tensidfreiem Spülmittel (neodisherGK, Dr. Weigert, Hamburg) gereinigt, mit deionisiertem Wasser gespült und anschließend autoklaviert (121°C, 2 bar).

2.2.1 Spinner

Die Vorkulturen zur Produktion des SuperSpinner-Inokulums wurden in 250-ml-Spinnerflaschen (Techne, Thermo-Dux GmbH, Wertheim/M) kultiviert. Der zentral aufgehängte Glasstab-Taumelrührer mit Magnetkern wurde über einem Drehfeldrührer mit 36 Upm angetrieben.

Zur Anzucht der kryokonservierten HB-8445-Zellen wurden die aufgetauten und mit Medium gewaschenen Zellen mit einer Anfangskonzentration von 1×10^6 Zellen/ml für 24 h kultiviert. Nach 24 h wurde die Kultur bis auf eine Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml durch Zugabe von Medium verdünnt. Der Inhalt des Spinners wurde bei 60 ml Endvolumen mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml als Inokulum für den SuperSpinner mit einem Anfangsfüllvolumen von 200 ml verwendet.

2.2.2 SuperSpinner

Die Kultivierung im 1-Liter-Maßstab erfolgte in einem sogenannten SuperSpinner, der ein leistungsfähiges und flexibles System der Zellkultivierung im Labormaßstab für den Brutschrank und für die Klimakammer mit entsprechender Gasversorgung darstellt (siehe Abbildung 2.1). Die Begasung der Kultur geschieht in diesem System blasenfrei über eine hydrophobe, poröse Hohlfaser-Polypropylenmembran [95], die auf einem Taumelrührer befestigt ist. Das Verfahren hat den Vorteil, daß diese Art der Submersbegasung keine Schaumbildung hervorruft, und daß das gesamte Volumen der Kulturflasche als Kulturvolumen ausgenutzt werden kann. Zudem sind die Zellen durch den Membranrührer nur einem sehr geringem Scherstreß ausgesetzt. Bei kleinen Kulturvolumina bietet diese Reaktorkonfiguration gleichzeitig die Möglichkeit der Oberflächenbegasung analog zur einfachen Spinnerflasche. Das ermöglicht eine große Flexibilität von 0,15 - 1 l Kulturvolumen bei einem 1-Liter-SuperSpinner Gefäß. Eine Probenentnahme mit geringem Kontaminationsrisiko ist auch in einer nicht sterilen Umgebung, das heißt außerhalb einer Reinraumwerkbank, möglich.

Für einen SuperSpinner mit 1 l Kulturvolumen wurden 2 m Hohlfasermembran (Accurel, Akzo-Nobel, Wuppertal) mit 0,4 mm Wandstärke und 1,8 mm Innendurchmesser verwendet. Der Taumelrührer wurde durch einen Drehfeldrührer (H + P Labortechnik, München) mit 33 Upm angetrieben. Alle verwendeten Schläuche bestanden aus Silikon, die Schlauchverbinder aus Polypropylen oder Edelstahl. Die Luftfilter zur sterilen Begasung mit 20 l h^{-1} (95 % wasserdampfgesättigte Luft und 5 % CO₂ (v/v)) waren vom Typ Midisart 2000 (Sartorius, Göttingen). Zur Sterilisation wurde der gesamte Reaktoraufbau samt Schläuchen und Filtern autoklaviert

(121°C, 2 bar). Medienzufuhr und Zellernte wurden unter einer Reinraumwerkbank (lamin air, Heraeus, Hanau) vorgenommen.

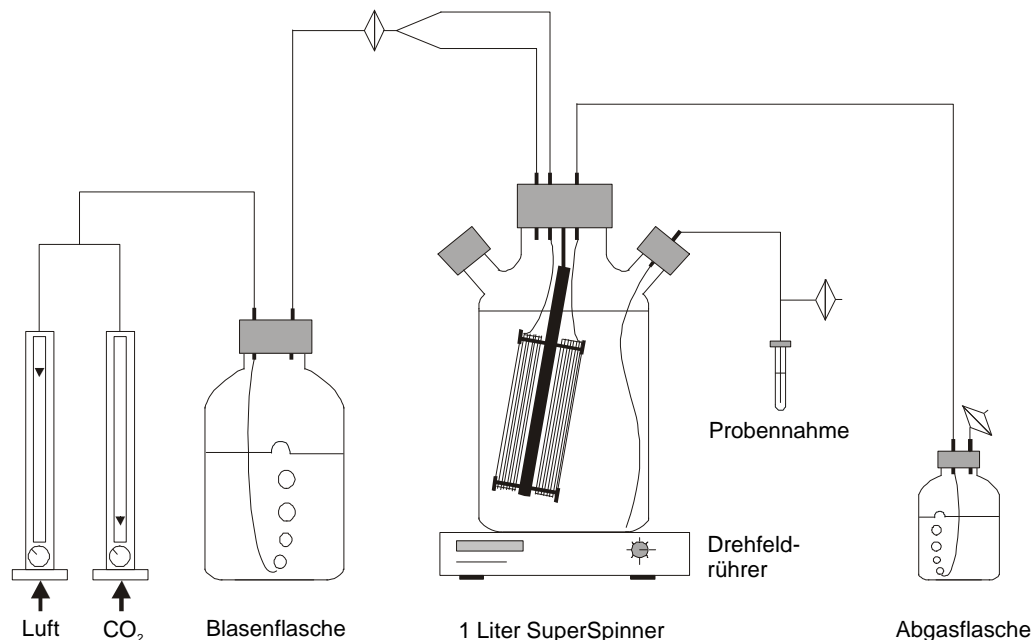


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung eines 1-Liter-SuperSpinner Kultivierungssystems (Iding, 1998).

Im SuperSpinner wurde das Inokulum für den 2-Liter-Bioreaktor bis zu einer Kulturdichte von 1×10^6 Zellen/ml kultiviert.

2.2.3 2-Liter-Bioreaktor

Zur Gewährleistung von dauerhaft definierten und kontrollierten Kulturbedingungen über den gesamten Kultivierungsverlauf hinweg wurde die Produktion des R24 Antikörpers in einem 2-Liter-Bioreaktor (Biostat BF2, B. Braun Biotech International, Melsungen) durchgeführt. In diesem Kultursystem wurden die Temperatur, der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) und der pH-Wert über eine digitale Kontrolleinheit (DCU, Biostat MD, B. Braun Biotech International, Melsungen) kontrolliert und geregelt. Zur Datendokumentation dienen zum einen ein 30-Kanal-Schreiber (Modell 3081, Yokogawa, Tokyo, Japan) und parallel dazu das digitale MFCS (Multi-Fermenter Control System) Datenaufnahmesystem (MFCS-Win1.1, B. Braun International, Melsungen).

Bei dem Bioreaktor handelte es sich um ein in einem Edelstahlrahmen hängendes doppelwandiges Glasgefäß, dessen Mantel zur Temperierung der Kultur mittels

Wasser fungierte. Das Gefäß ist durch einen Edelstahldeckel verschlossen, der mit verschiedenen Durchführungen für pH-, pO_2 - und Temperatursonden sowie Stutzen für Silikonschläuche zur Gas- und Medienzuzug- und -abfuhr, Probenentnahme, Inokulation und Zellernte versehen war. Im Gefäß war zentral, analog zur Konstruktion des SuperSpinners, ein Taumelrührer flexibel am Deckel befestigt, der zur Aufnahme der 4 m langen hydrophoben Accurel-Begasungsmembran (Akzo Nobel, Wuppertal) diente [95, 96].

Die Ernte erfolgte über die Flasche für das Inokulum durch Beaufschlagung des Reaktorkopfraumes mit einem leichten Überdruck von ca. 0,05 bar. Die Regelung des pH-Wertes der Kultur erfolgte über den Anteil an CO_2 in der Begasungsluft, das mit dem Hydrogencarbonat der Kultur im Gleichgewicht stand. Um bei hohen Zelldichten, bei denen erfahrungsgemäß eine Ansäuerung der Kultur eintritt, einen pH-Wert von 7,5 zu halten, wurde bei Bedarf von der DCU über eine Peristaltikpumpe 1 M NaOH automatisch zugefördert. Der pO_2 in der Kultur wurde mit einer Elektrode nach dem Clark-Prinzip (Ingold Messtechnik GmbH, Steinbach/Ts) [68] gemessen; die pH-Messung erfolgte über autoklavierbare Elektroden (Ingold Messtechnik GmbH, Steinbach/Ts). Das gesamte Reaktorsystem (ohne Steuerelektronik) wurde im Autoklaven bei $121^\circ C$ und 1 bar Überdruck feucht autoklaviert.

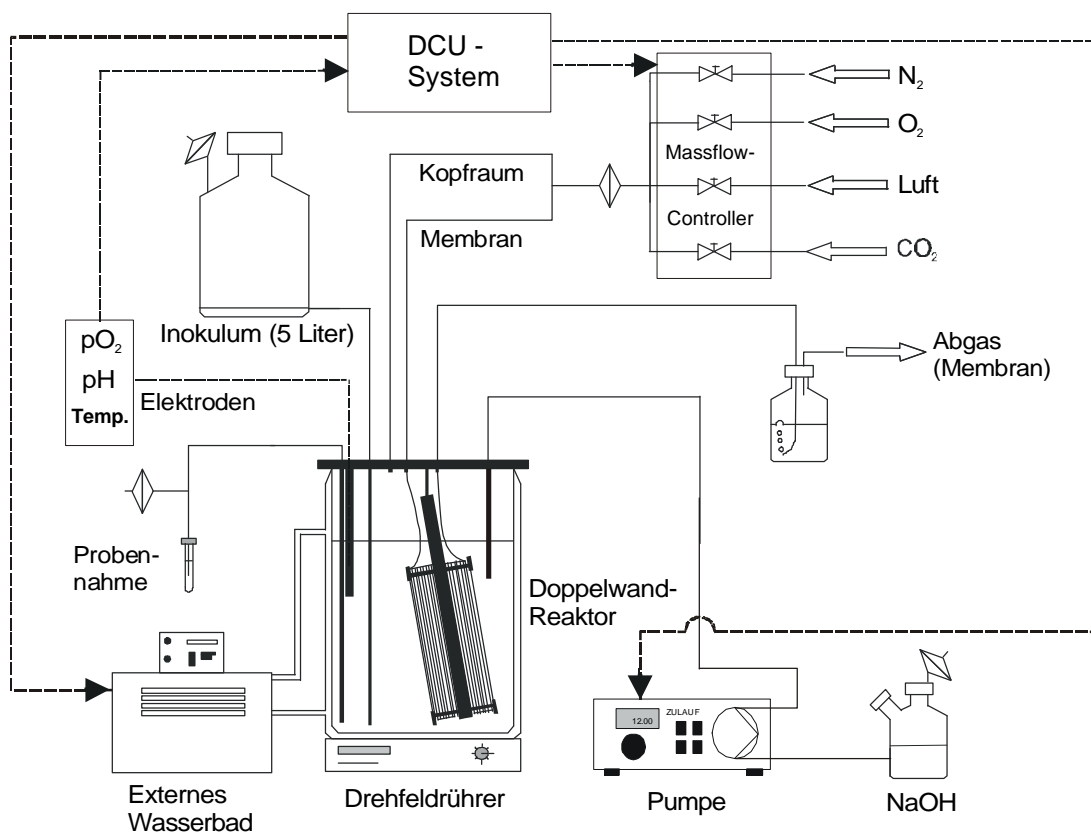


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des verwendeten 2-Liter-Bioreaktor-Kultivierungssystems (nach Iding, 1998).

2.2.3.1 Prozeßführung

Die Zellkultivierung erfolgte im wiederholten, satzweisen Betrieb (engl.: repeated batch, split batch). Ein Inokulum von 800 ml aus der SuperSpinner-Kultur mit einer Zelldichte von ca. 1×10^6 Zellen/ml wurde zum Animpfen des Bioreaktors verwendet. Das Kulturvolumen wurde mit frischem Medium auf 2,3 l aufgefüllt. Bei Erreichen einer Zelldichte von ca. $1,3-1,4 \times 10^6$ Zellen/ml wurde zur Ernte ein Teil des Kulturvolumens abgezogen und durch frisches Medium ersetzt, so daß zu Beginn des zweiten Batches eine Zelldichte von $2-3 \times 10^5$ Zellen/ml vorlag. Nach Erreichen einer Zelldichte von ca. $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml im zweiten Batch wurde der gesamte Reaktorinhalt geerntet.

2.3 Analytik zur Zellkultur

2.3.1 Prozeßanalytik zur Zellkultivierung

Die zur Produktion des Antikörpers R24 durchgeführte Kultivierung der Hybridomzelle HB-8445 im 2-Liter-Bioreaktor unterlag einer „online“-Kontrolle wobei die Prozeßparameter Temperatur, pH-Wert und gelöster Sauerstoff durch im Reaktor vorhandene Sonden gemessen wurden. Daneben wurden die Kulturparameter nach der Probennahme („offline“) sequentiell bestimmt.

2.3.1.1 Zellzahlbestimmung nach der Trypanblau-Ausschlußmethode

Der blaue Farbstoff Trypanblau [32] ist nicht in der Lage, intakte Zellmembranen zu durchdringen. Zellmembranen geschädigter oder toter Zellen werden hingegen durchdrungen, und die Zellen erscheinen im Lichtmikroskop blau gefärbt, was eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen ermöglicht [189].

Zur Zellzahlbestimmung wurde eine Probe der Zellsuspension 1:2 mit Trypanblau-Lösung (0,4 % w/v; Sigma, Deisenhofen) gemischt und die Zellen in einer Zählkammer nach Neubauer unter Zuhilfenahme eines Mikroskops gezählt. Über das bekannte Volumen der Zählkammer konnte hieraus die Zellkonzentration berechnet werden.

2.3.1.2 Zellzahl und Zellgrößenbestimmung mit dem CASY 1

Zusätzlich zur mikroskopischen Bestimmung der Zellzahlen wurde das elektronische Zellzählgerät CASY 1 Modell TTC (Cell Counter and Analyser System, Schärfe, Reutlingen) eingesetzt. Neben Partikelzahlen liefert das CASY 1-System zusätzlich

noch Informationen über die Größenverteilung der Partikel, die einen Rückschluß auf die Lebendzellzahl ermöglichen [175]. Das CASY 1-System arbeitet nach dem Widerstandsmeßprinzip kombiniert mit dem Verfahren der Pulsflächenanalyse [167].

Die zu zählende Zellsuspension wurde in CASYton-Puffer (Fa. Schärfe, Reutlingen) 1:100 bis 1:500 vorverdünnt und der Meßeinheit über eine $150\ \mu\text{m}$ Kapillare zugeführt. Die Meßeinheit des CASY besteht aus zwei Elektroden, die über die Kapillare ein elektrisches Feld aufbauen. Passiert eine Zelle die Kapillare, verändert sich der Widerstand im Feld. Die intakte, geschlossene Lipiddoppelmembran einer Zelle stellt einen Isolator mit einem bestimmten Widerstand dar, der sich von dem eines anderen Kompartimentes wie z.B. eines Zellkernes unterscheidet. Das CASY 1-System nimmt die Widerstandswerte mit einer Frequenz von 1 MHz auf. Die digitalisierten Signale werden einer Pulsflächenanalyse unterworfen, deren Ergebnisse zu einer Berechnung der Zelldurchmesser genutzt wird. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde angenommen, daß es sich bei Partikeln von $> 10\ \mu\text{m}$ und $< 20\ \mu\text{m}$ um lebende Zellen handelt.

2.3.1.3 Glukose- und Laktatbestimmung

Während der Kultivierung von eukaryotischen Zellen beziehen die Zellen einen Hauptteil ihrer benötigten Energie aus der Verstoffwechslung von Glukose. Dieser Stoffwechselweg führt dabei in Reaktorkulturen unter anderem zur Bildung von Laktat als einem Endprodukt. Um den Versorgungszustand einer Zellkultur beurteilen zu können, ist somit von Interesse, die Änderung des Glukose- und Laktat-Gehalts im Kulturmedium festzustellen.

Die Bestimmung der Konzentrationen an Glukose und Laktat während der Kultivierung geschah mit dem automatisierten Analysegerät YSI-Analyser (Yellow Springs Instruments, Ohio, USA). Die Messung erfolgte mittels Biosensoren [198], die enzymatisch, mit den auf Membranen fixierten Enzymen Glukose- und Laktatoxidase arbeiten. Dabei wurde β -D-Glukose mit O_2 zu Glukonolaktone und H_2O_2 bzw. L-Laktat mit O_2 zu Pyruvat und H_2O_2 umgesetzt.

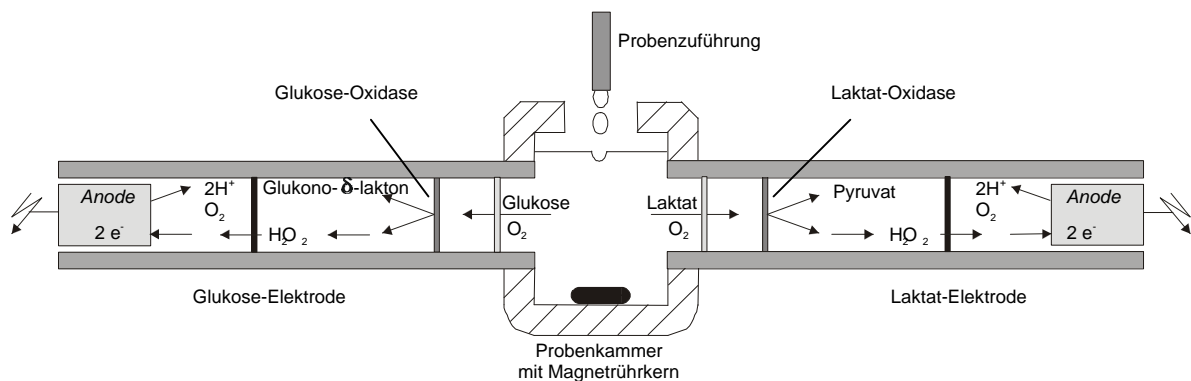


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Glukose- und Laktatbestimmung mit immobilisierten Enzymen (K. Iding, 1998).

Das entstehende Wasserstoffperoxid kann durch die Celluloseacetatmembranen diffundieren und wird an den Platinanoden oxidiert. Der daraus jeweils resultierende Stromfluß ist proportional zur Konzentration an Glukose und Laktat. Zur Messung werden mindestens 40 μl zellfrei zentrifugierter Überstand der Zellsuspension eingesetzt.

2.3.1.4 Ammoniumbestimmung

Das bei einer Kultivierung tierischer Zellen entstehende Ammonium wirkt ab Konzentrationen von 4 mM wachstumsinhibierend auf die Kultur [29]. Es kommt im Laufe einer Kultivierung zu einer Anreicherung von Ammonium, hauptsächlich resultierend aus dem spontanen Zerfall von Glutamin zu Ammonium und Pyroglutamat und durch Ammonium aus dem Proteinstoffwechsel. Dabei scheint nicht das NH_4^+ -Ion cytotoxisch zu wirken, sondern NH_3 , was eine Kultivierung im Säuren bei kritischen Ammoniumkonzentrationen günstiger erscheinen läßt [29].

Die Messung von Ammonium im zellfreien Kulturüberstand beruht auf der Reaktion von primären Aminen mit ortho-Phthaldialdehyd und Thiolverbindungen zu Isoindolderivaten [16]. Es wurden 20 μl Kulturüberstand mit 1,3 ml Derivatisierungsreagenz (250 mg OPA (ortho-Phthaldialdehyd, Aldrich, Steinheim), 500 mg Thioglycolatsäure (Na-Salz, Sigma, Deisenhofen), 2 ml Methanol und 100 ml 0,6 M Boratpuffer (0,6 M Borsäure, pH 10,4)) in einer Mikro-Quarzküvette vermischt und in einem Fluoreszenzdetektor RF-551 (Shimadzu, Kyoto, Japan) die Fluoreszenz bei Licht einer Emissionswellenlänge von 485 nm nach Anregung mit Licht von 415 nm gemessen. Zur Kalibrierung diente eine Zweipunkteichgerade mit einem Meßwert für eine NH_4^+ -Standardlösung (100 mg/l) und der Fluoreszenzintensität nach Zugabe von Wasser.

2.3.1.5 LDH-Aktivitätsmessung

Die LDH (Laktatdehydrogenase, EC 1.1.1.27) ist ein cytosolischer Enzymkomplex, dessen Aktivität, im Medium detektiert, einen Indikator für Zelldefekte und Zellyse in einer Kultur darstellt. Je nach Zelltyp ist der Enzymkomplex in verschiedenen stöchiometrischen Verhältnissen aus vier verschiedenen Untereinheiten aufgebaut [44]. LDH reduziert reversibel unter Beteiligung von $\text{NADH} + \text{H}^+$ Pyruvat zu L-Laktat.

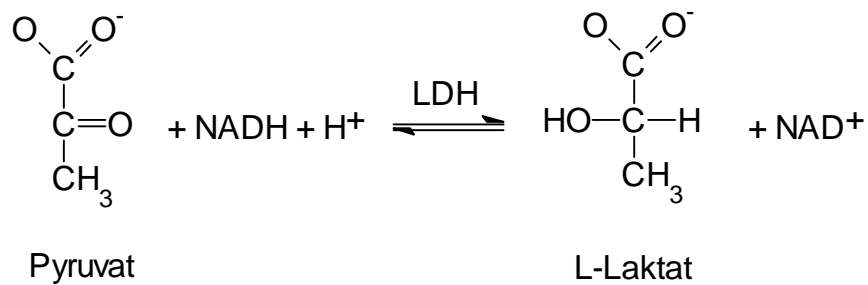


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Substratreaktion der LDH.

Die Abnahme der Konzentration von $\text{NADH} + \text{H}^+$, das zu NAD^+ oxidiert wird, kann photometrisch nachgewiesen werden [126, 193]. Die lineare Verringerung der Extinktion bei 340 nm im Verlauf der Reaktion ist ein Maß der Reaktionsgeschwindigkeit, die bei nicht substratlimitierten Bedingungen proportional zur Enzymkonzentration ist [20].

Zur Messung der Kinetik wurde die Extinktion des Reaktionsansatzes in einer temperierten Quarzküvette in einem Spektrometer (Uvicon 930, Kontron, Neufahrn) bei 340 nm über eine Minute mit einer Meßrate von 50 Messungen/Minute bei 22°C ermittelt.

Der Reaktionsansatz bestand aus:

100 μl zellfreiem Kulturüberstand

100 μl 10 mM Na-Pyruvat (Serva, Heidelberg) in Reaktionspuffer

700 μl Reaktionspuffer (8,7 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ und 0,93 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ auf einen Liter MilliQ-Wasser, pH 7,4)

100 μl 2,7 mM $\text{NADH} + \text{H}^+$ (Boehringer, Mannheim) in Reaktionspuffer

Die Aktivität des Enzyms wurde dabei nach folgender Formel ermittelt [199]:

$$v = \frac{\Delta E}{d \cdot \epsilon \cdot \Delta t} \cdot \frac{V_{\text{Gesamt}}}{V_{\text{Probe}}} \quad (2.1)$$

Tabelle 2.1: Definition der Größen zur Berechnung der LDH Aktivität.

Größe	Bezeichnung	Einheit
v	Reaktionsgeschwindigkeit	$\left[\frac{\text{mol}}{\text{s}\cdot\text{l}}\right] = \left[\frac{\text{kat}}{\text{l}}\right] = \left[\frac{6 \times 10^6 \text{U}}{\text{l}}\right]$
ΔE	Extinktionsdifferenz	
d	Küvetten-Schichtdicke	[cm]
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient von NADH + H ⁺ bei 340 nm	$6300 \left[\frac{1}{\text{mol}\cdot\text{cm}}\right]$
Δt	Meßzeit	[s]
V_{Gesamt}	Gesamtvolumen des Ansatzes	[ml]
V_{Probe}	Probenvolumen	[ml]

2.3.1.6 Aminosäurebestimmung

Weitere Größen zur Beurteilung des Kulturverlaufes bilden die Aminosäurekonzentrationen im Kulturmedium. Die Konzentrationen wurden durch eine Umkehrphasen-HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) bestimmt [15]. Die Analysen wurden mit einem vollautomatischen HPLC-System D450 (Kontron Instruments, Echingen) mit zwei Hochdruckpumpen (Typ 420), einem Autosampler (Typ 460) sowie einem Fluoreszenzdetektor (Typ SFM 25) und einer rechnergestützten Auswerteinheit (Software: KromaSystem 2000, Version 1.60) durchgeführt. Die Trennung fand auf einer RP₁₈-Säule (Ultrasphere ODS, 150 mm x 4,6 mm, Partikelgröße 5 μm , Beckman, München) mit Octadecylsilicat als stationäre Phase statt, der zur Erhöhung der Standzeit eine RP₁₈-Vorsäule (Hypersil ODS, 10 mm x 4,6 mm, Partikelgröße 10 μm , Techlab, Erkerode) vorgeschaltet war. Vor der Trennung erfolgte eine Derivatisierung der Aminosäuren mit OPA (ortho-Phthaldialdehyd, Sigma, Deisenhofen) [97, 17]. Die primären Aminogruppen der Aminosäuren reagieren im Alkalischen (pH-Wert > 9) mit OPA und 3-Mercaptopropionsäure zu fluoreszierenden Isoindolderivaten (siehe Abbildung 2.5). Die Detektion der Isoindolderivate erfolgte bei einer Emissionswellenlänge von 450 nm nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 340 nm.

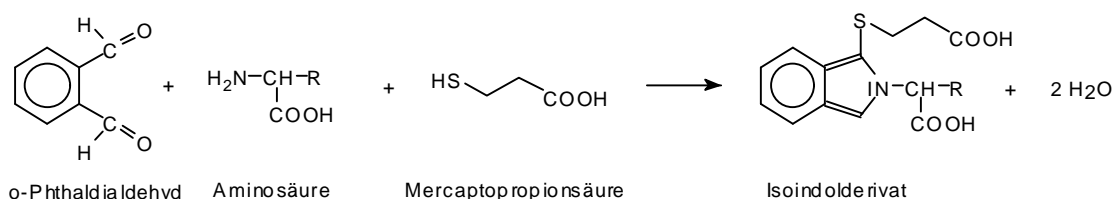


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der chemischen Derivatisierung von Aminosäuren mit o-Phthaldialdehyd.

Zur Probenvorbereitung wurden 50 μl zellfreier Kulturüberstand mit 50 μl Proteinfällungsreagenz gemischt und die ausgefallenen Proteine durch Zentrifugation (3 min bei 15000 g) abgetrennt. Zur Derivatisierung wurden 50 μl des Überstandes mit 100 μl 0,4 M Natriumboratpuffer (pH-Wert 9,5) versetzt, um ein ausreichend basisches Milieu für die Reaktion zu erhalten. Aufgrund der Instabilität der Isoindolderivate erfolgte die Derivatisierung unmittelbar vor der HPLC-Trennung durch automatische Zugabe des Derivatisierungsreagenzes zur Probe.

Proteinfällungsreagenz: 5 % Perchlorsäure und 300 mM δ -Aminovaleriansäure (interner Standard)

Derivatisierungsreagenz: 50 mg o-Phthaldialdehyd in 1 ml Methanol, 100 μl 3-Mercaptopropionsäure und 9 ml 0,6 M Na-Boratpuffer (pH 10,4)

Puffer A: 99 % 0,1 M Na-Acetat (pH 7,5), 1% Tetrahydrofuran

Puffer B: 30 % 0,085 M Na-Acetat (pH 5,2), 70 % Methanol

Die HPLC-Trennung der Aminosäurederivate geschah mit einem Gradienten [17], der vom polareren Puffer A zum unpolaren Puffer B verlief. Mit dieser Methode konnten alle Aminosäuren außer Cystein (das ein nicht fluoreszierendes Derivat ergibt) und Prolin (das nicht mit OPA reagiert) quantitativ detektiert werden.

2.3.1.7 Bestimmung von Mykoplasmenkontaminationen

Mykoplasmen gehören einer Gruppe von Prokaryonten, die als Membranparasiten auf der Cytoplasmamembran ihrer Wirtszellen anhaften. Sie nehmen große Mengen an Arginin aus dem Kulturmedium auf und schwächen ihre Wirte durch Ausscheidung von Stoffwechselprodukten wie Ammonium und Wasserstoffperoxid [169]. Bedingt durch ihre geringe Größe von nur 0,2 - 2 μm und ihre Flexibilität aufgrund einer nicht vorhandenen rigiden Zellwand, können sie nicht mit den üblichen Methoden der Sterilfiltration eliminiert werden. Eine Bekämpfung von Mykoplasmen kann durch Behandlung der Zellkultur mit dem Antibiotikum Ciprofloxacin erfolgen [124]. Zur Kontrolle, ob ein Mykoplasmenbefall der Zellkultur vorlag, wurde eine Färbung mit DNA-bindendem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamino-2-Phenylindol-dihydrochlorid) vorgenommen [98]. Neben der DNA im Zellkern der Wirtszelle sollte bei Befall mit Mykoplasmen deren DNA auf der Zellmembran der Wirtszelle angefärbt werden. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI ist nicht lichtbeständig. So sollten, um ein Ausbleichen zu verhindern, die gefärbten Präparate nur möglichst kurz dem hellen Licht ausgesetzt werden.

Gebrauchslösungen für den DAPI-Test

CMF-PBS: Ca^{2+} - Mg^{2+} -Free-Phosphate-Buffered-Saline: auf einen Liter MilliQ-Wasser 8,0 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,15 g Na_2HPO_4 ; 0,2 g KH_2PO_4 , pH 7,2

Fixierlösung: 2 ml 37 % Formaldehydlösung plus 10 ml CMF-PBS mit Saccharose(25 mg/ml)

DAPI-Stammlösung: 1 mg DAPI (Sigma, Deisenhofen) in 10 ml CMF-PBS lösen; Lagerung bei -20°C

DAPI-Gebrauchslösung: 1:100 Verdünnung der DAPI-Stammlösung mit CMF-PBS

Mowiol-Gebrauchslösung: 12 g Mowiol (Hoechst, Frankfurt a. M.) und 30 g Glycerin in 30 ml Wasser bei RT über 2 h rühren. Lösung mit 12 ml 2 M Tris/HCl-Lösung auf einen pH-Wert von 8,5 einstellen und 10 min auf 56°C erhitzen. Anschließend 20 min bei 5000 g Zentrifugieren und über Nacht bei 4°C inkubieren. Lagerung bei -20°C

Durchführung des DAPI-Tests Zur DAPI-Färbung wurden die Zellproben durch Zentrifugation unter Verwendung des Zytosystems (Heraeus Sepatech, Osterode) bei 60 g auf einen Objektträger aufgebracht. Zur Schonung der Zellen wurden sie alternativ direkt auf den Objektträger aufpipettiert und dann zur Entfernung der Puffer im Zytosystem zentrifugiert. Das luftgetrocknete Präparat (ca. 15 min) wurde 15 min bei RT vorsichtig mit der Fixierlösung, in Form eines Tropfens, auf dem Objektträger überschichtet. Nach zweimaligem tropfenweisen Waschen mit CMF-PBS wurde das Präparat mit DAPI-Gebrauchslösung überschichtet und für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit CMF-PBS wurde die Probe zur Anfertigung eines Dauerpräparates nach der vollständigen Trocknung mit einigen Tropfen Mowiol-Lösung und einem Deckglas eingebettet.

Das gefärbte und fixierte Präparat wurde im Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Zeiss, Oberkochen) mit Hilfe der Filterkombination Bandpaßfilter BP365/12, Farbteiler FT 395 und Langpaßfilter LP 420 (Zeiss, Oberkochen) visuell ausgewertet.

2.4 Berechnung zellspezifischer Parameter

Um den Metabolismus der Zellen zu charakterisieren und Vergleiche mit dem Wachstums-, Produktions- und Stoffwechselverhalten anderer Zelllinien zu ermöglichen, wurden zellspezifische Parameter ermittelt.

Die zellspezifischen Parameter der Kultivierungen wurden nach folgenden Formeln ermittelt [152]:

Wachstumsrate: Die Wachstumsgeschwindigkeit dx/dt und die Wachstumsrate μ sind wie folgt definiert:

$$\frac{dx}{dt} = \mu \cdot x \Rightarrow x(t) = x_0 \cdot e^{\mu x t} \Rightarrow \mu = \frac{\ln x - \ln x_0}{t - t_0} \quad (2.2)$$

Spezifische Substratverbrauchsrate:

$$q_s = -\frac{1}{\bar{x}} \cdot \frac{dc_s}{dt} \quad (2.3)$$

Spezifische Produktionsrate:

$$q_p = \frac{1}{\bar{x}} \cdot \frac{dc_p}{dt} \quad (2.4)$$

Tabelle 2.2: Definition der Größen zur Berechnung zellspezifischer Parameter.

Größe	Bezeichnung	Einheit
x	Lebendzelldichte	$\left[\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}}\right]$
\bar{x}^a	mittlere Lebendzelldichte	$\left[\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}}\right]$
x_0	Lebendzelldichte zum Startzeitpunkt	$\left[\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}}\right]$
t	Zeit	[d]
t_0	Zeit zum Startzeitpunkt	[d]
μ	spezifische Wachstumsrate	$\left[\frac{1}{\text{d}}\right]$
q_s	spezifische Substratumsatzrate	$\left[\frac{\text{mol}}{\text{Zellen} \cdot \text{d}}\right]$
c_s	Substratkonzentration im Bioreaktor	$\left[\frac{\text{mol}}{\text{l}}\right]$
q_p	spezifische Produktionsrate	$\left[\frac{\text{mol}}{\text{Zellen} \cdot \text{d}}\right]$
c_p	Produktkonzentration im Bioreaktor	$\left[\frac{\text{mol}}{\text{l}}\right]$

^aDie mittlere Zelldichte \bar{x} wurde in exponentiellen Wachstumsphasen nach der Gleichung $\bar{x} = e^{\left(\frac{\ln x_2 + \ln x_1}{2}\right)}$ und in Phasen linearer Systementwicklung als arithmetisches Mittel $\bar{x} = \frac{x_2 + x_1}{2}$ in dem Zeitintervall zwischen t_1 und t_2 berechnet.

Zur Ermittlung der Sauerstoffverbrauchsrate wurde für ca. 30 min die Gaszufuhr im 2-Liter-Bioreaktor unterbrochen. Aus dem zeitlichen Verlauf der Abnahme des Sauerstoffpartialdruckes in der Kultur wurde die Sauerstoffverbrauchsrate errechnet. Dabei wurde vorausgesetzt, daß 6,87 mg O₂ pro Liter Kulturmedium bei 37°C einer Sättigung von 100 % entspricht. Daraus folgt, daß die Abnahme von 1 % Sauerstoffsättigung dem Verbrauch von 2,15 μMol O₂ pro Liter Medium entspricht. Die spezifische Sauerstoffverbrauchsrate wurde in $\frac{\mu\text{Mol}}{10^6 \cdot \text{h}}$ angegeben.

2.4.1 Rechnergestützte Ermittlung zellspezifischer Parameter

Zur Ermittlung der zellspezifischen Parameter der aus den Kultivierungen gewonnenen Rohdaten wurde das Computerprogramm „Madonna for Windows“ (Version 6.0, University of California at Berkeley) verwendet. Es erlaubt die numerische Simulation von Wachstumsprozessen. Durch die Anpassung von Differentialgleichungen 1. Ordnung, die das Wachstum und die Produktion beschreiben, können die gemessenen Wachstums- und Produktionsverläufe simuliert werden. Den, an die Wachstumsprozesse angepassten Differentialgleichungen können dann theoretische Parameter entnommen werden, die den tatsächlichen zellspezifischen Parametern entsprechen.

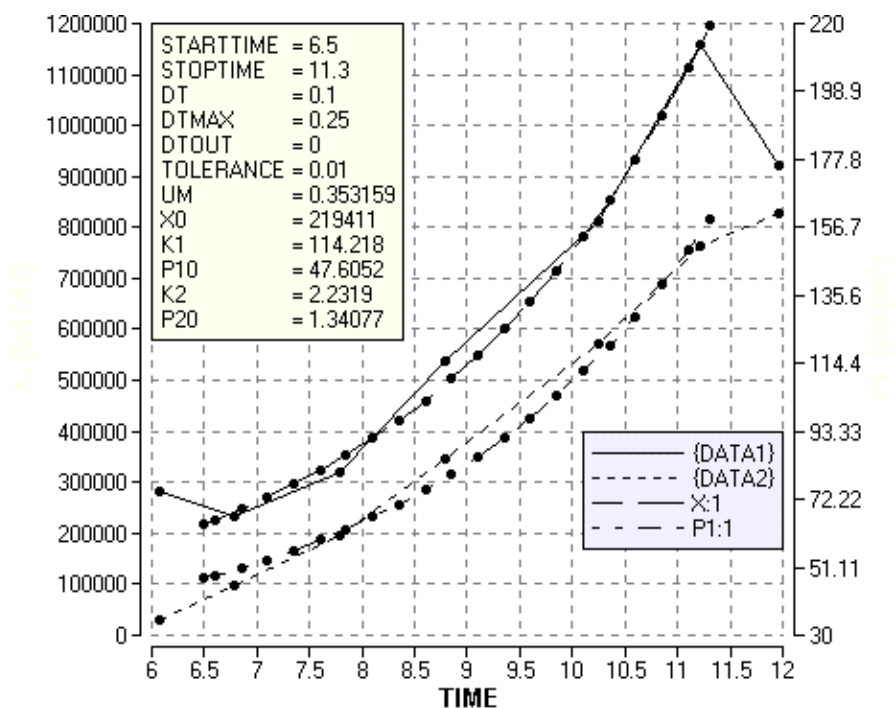


Abbildung 2.6: „Screen shot“ der computergestützten Simulation des Wachstums der Zelllinie HB-8445 durch das numerische Simulationsprogramm „Madonna for Windows“. Die Graphik zeigt den zeitlichen Verlauf der Zelldichte (DATA1) und der Produktkonzentration an R24 Antikörper im Kulturüberstand (DATA2) bei pH 6,9 während der Kultivierung (siehe 3.2.5.3). Auf der x-Achse ist die Kulturdauer in Tagen dargestellt. Die linke y-Achse zeigt die Zellzahl pro ml Kulturvolumen. Die rechte y-Achse zeigt die Konzentration an R24 Antikörper in mg pro Liter Kulturvolumen. Die entsprechenden Simulationen basieren auf den Differentialgleichungen (2.5) und (2.6), wobei $UM = \mu$ und $K1 = q_p/\mu$ entsprechen. $X0$ ist die Zellzahl und $P10$ die Ausgangskonzentration des Antikörpers im Kulturüberstand zu Beginn der Simulation. $K2$ und $P20$ sind Parameter einer in der Abbildung nicht gezeigten Simulation. Die restlichen in der Abbildung aufgeführten Parameter spezifizieren den

Simulationsalgorithmus.

Zur Ermittlung der zellspezifischen Wachstums- und Produktionsrate wurde die Wachstumskinetik während der exponentiellen Wachstumsphase ausgewertet. Dabei wurde das Wachstum durch eine Differentialgleichung 1. Ordnung der Form

$$\frac{dx}{dt} = \mu \cdot x \quad (2.5)$$

simuliert. Auf eine Anpassung mittels Monod Kinetik wurde verzichtet, da das dazu notwendige limitierende Substrat nicht eindeutig ermittelt werden konnte. μ entspricht dabei in der exponentiellen Wachstumsphase der Kultur der maximalen Wachstumsrate (μ_{\max}) im Verlauf der Kultivierung.

Für die Simulation der wachstumsassoziierten Produktionsraten wurde folgender mathematische Zusammenhang zu Grunde gelegt:

$$\frac{dc_p}{dt} = \frac{q_p}{10^6} \cdot x \quad (2.6)$$

2.5 Produktaufreinigung

Die Produktaufreinigung diente zur Aufkonzentrierung und möglichst reinen Darstellung des monoklonalen Maus-Antikörpers R24 vom Typ IgG₃. Dabei handelt es sich vornehmlich um die Entfernung von anderen Peptiden und Proteinen, die bei der weiteren Analytik, speziell zur Glykosylierung des Antikörpers, die Ergebnisse verfälschen würden. Zur Planung der weiteren Aufarbeitung wurde die Stabilität des Antikörpers im Kulturüberstand getestet, um einem eventuellen proteolytischen Abbau Rechnung tragen zu können. Daneben wurde die Sialidaseaktivität im Kulturüberstand und im Zellysat bestimmt, um eine eventuelle Desialylierung des Proteins berücksichtigen zu können.

2.5.1 Abzentrifugieren der Zellen

Da der R24 Antikörper von den HB-8445 Zellen in das Medium sekretiert wurde, war der erste Schritt der Reinigung die Zellabtrennung. Dazu wurde die geerntete Zellsuspension auf mehrere 50 ml Zentrifugenröhrchen (Nunc, Nalge Nunc International, Wiesbaden) verteilt und für 5 min bei 2800 g (Megafuge 1.0, Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellsediment gesammelt und bei -20°C gelagert. Da die Gewinnung des zellfreien Überstandes unter unsterilen Bedingungen erfolgte und die anschließende Lagerung bei +4°C erfolgte, wurde zur Vermeidung von mikrobiellem Wachstum 0,05 % NaN₃ zugesetzt.

2.5.2 Protein A Affinitätschromatographie

Das bakterielle Protein A erkennt spezifisch den F_c Teil von IgG Antikörpern. Es ist in der Affinitätschromatographie sehr gut zur Abtrennung der IgG Antikörpern von weiteren Proteinbestandteilen des Kulturüberstandes geeignet.

2.5.2.1 Chromatographieanlagen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Chromatographieanlagen der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) verwendet. Die Aufreinigungen der R24 Antikörper fanden über eine Protein A Säule mit gepackten Gelbett in einer FPLC-Anlage (Fast Protein Liquid Chromatography) und einer BioPilot-Anlage statt. Das FPLC-System ermöglichte die automatisierte Verarbeitung partikelfreier Lösungen mittels Festbettchromatographie im Labormaßstab. Die in das System integrierte 250 mm x 32 mm Säule (Amicon, Witten) enthielt 75 ml gepacktes Gelbett der verwendeten rProtein A Matrix (Pharmarcia Biotech, Uppsala) [104]. Das Protein A der Matrix ist rekombinanten Ursprungs und besitzt, wie seine native Variante, eine hohe Affinität zur F_c -Region von Immunglobulinen des Typs IgG [33]. Das Bindungsvermögen von Protein A an einen IgG Antikörper wird nicht durch die Glykosylierung beeinflusst [92], was bei der anschließenden Untersuchung bezüglich der proteingebundenen Oligosaccharidstrukturen der aufgereinigten Antikörper natürlich vorausgesetzt werden muß.

Zur Aufreinigung des Maus-Antikörpers wurden produkthaltige Zellkulturüberstände aus Kultivierungen im SuperSpinner und 2-Liter-Reaktor verwendet. Vor dem Probenauftrag wurden die enthaltene Feststoffe durch Zentrifugation abgetrennt.

Tabelle 2.3: Charakteristik der rProtein A Matrix nach Herstellerangaben.

Zusammensetzung:	Quervernetzte, 4 %ige Agarose mit Metallkernen ^a
Partikeldurchmesser:	80 - 165 μm
Partikeldichte ϕ :	1,3 g/ml
Ligand:	Rekombinantes Protein A aus <i>E. coli</i>
Ligandendichte:	6 mg rProtein A/ml Matrix
Kopplungschemie:	Epoxyaktivierung
pH Arbeitsbereich:	3 - 10
Temperaturstabilität:	4 - 40°C
Lagerung:	Puffer mit 20 % EtOH, pH 7, 4 - 8°C

^a Der Metallkern im Matrixmaterial macht eine Nutzung in der Fließbett oder „expanded bed“-Chromatographie möglich.

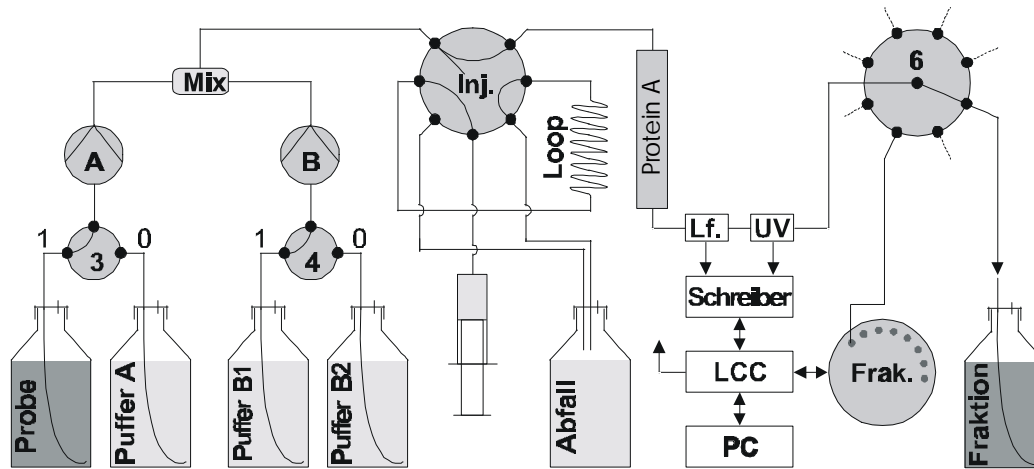


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung einer FPLC-Anlage. Die Stellung der Ventile bei Förderung von Elutionspuffer B1 durch Pumpe B beschreibt den Elutionsvorgang.

Bei den Pumpen A und B (siehe Abbildung 2.7) handelt es sich um Kolbenpumpen der Bauart P-500, die nach Stellung der 2-Wege-Ventile (Solenoid, PSV-100) unterschiedliche Lösungen über einen Mischer zum Injektionsventil befördern. Der Mischer ermöglicht die Erzeugung von Puffergradienten auf der Grundlage variabler Pumpgeschwindigkeiten der Kolbenpumpen A und B. Das Injektionsventil (Inj., Motorventil MV-7) hat die drei Grundstellungen „Load“, „Waste“ und „Inject“, die bestimmen, ob die transportierte Lösung auf die Säule oder in den Abfallbehälter gepumpt wird oder ob der Inhalt des Loops aufgetragen wird. An die Säule schließen sich eine Leitfähigkeitsmesszelle und ein UV-Detektor (Single Path Monitor UV-1) an, deren Signale vom angeschlossenen Schreiber aufgezeichnet werden. Über das Motorventil 6 (IMV-8) wird die Fraktionssammlung kontrolliert. Dabei kann zwischen dem angeschlossenen Fraktionssammler und sechs weiteren Ventilstellungen gewählt werden. Die Steuerung der Anlage kann manuell über die LCC-501-Plus-Einheit oder automatisiert über den Computer erfolgen. Für den automatisierten Betrieb wird der gewünschte Chromatographieverlauf mit Hilfe des „FPLC-Directors“ programmiert.

Der prinzipielle Aufbau der verwendeten BioPilot-Anlage ist weitestgehend analog zu dem der FPLC-Anlage. Sie ist mit Pumpen höherer Pumpleistung (P-6000) ausgestattet, und ermöglicht die Verwendung mehrerer Säulen, die durch Ventile einzeln angesteuert werden können. Auch hier erfolgt die Steuerung der Anlage manuell über die LC-500 Plus Steuereinheit oder computergestützt mit Hilfe des „FPLC-Directors“. Bei der Aufreinigung von R24 Antikörper war Puffer A Waschpuffer und Puffer B Elutionspuffer.

Durchführung: Der pH-Wert des Kulturüberstandes wurde vor dem Auftragen auf die Säule auf 7,5 eingestellt. Vorversuche ergaben, daß kein signifikanter Unter-

schied in den Bindungsraten beim Auftrag im pH-Bereich zwischen 7 und 8 festzustellen ist. Um eine bessere spezifische Bindung des Antikörpers an Protein A zu erzielen, und gleichzeitig unspezifische Bindungen aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen zu verringern, wurde dem Kulturüberstand 3 M NaCl zugesetzt. Vor dem Auftrag wurde die Säule mit dem fünffachen Gelbettvolumen (375 ml) an Waschpuffer bei einer Fließgeschwindigkeit von 70 cm/h äquilibriert. Der Auftrag des Kulturüberstandes geschah bei einer Fließgeschwindigkeit von 22 cm/h. Zum anschließenden Waschen wurde die Säule mit Waschpuffer mit einer Fließgeschwindigkeit von 70 cm/h durchspült. Die Elution erfolgte mit dem Elutionspuffer bei 35 cm/h Fließgeschwindigkeit.

Waschpuffer: 50 mM Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Roth, Karlsruhe), 3 M NaCl in MilliQ-Wasser, pH 8,0

Elutionspuffer: 0,05 M Natriumdihydrogenphosphat, 0,05 mM tri-Natriumcitrat und 0,3 M NaCl in MilliQ-Wasser, pH 3,0

Der Probenauftrag, das Waschen und die Elution wurden mittels des UV-Signals bei 280 nm und der gemessenen Leitfähigkeit überwacht, so daß bei der Elution gezielt die produktenthaltenden Fraktionen gesammelt werden konnten. Anschließend wurde das Eluat neutralisiert und zur Vermeidung von mikrobiellem Wachstum mit 0,05 % [w/w] NaN_3 versetzt.

Die prozentuale Bindungsrate ist definiert als:

$$\frac{\text{Antikörperkonzentration im Durchlauf}}{\text{Antikörperkonzentration vor dem Auftrag}} \cdot 100$$

Die prozentuale Wiederfindungsrate ist definiert als:

$$\frac{\text{Antikörperkonzentration im Eluat}}{\text{Antikörperkonzentration vor dem Auftrag}} \cdot 100$$

2.5.3 Test auf proteolytischen Abbau und Stabilität des R24 Antikörpers im Kulturmedium

Zur Überprüfung der Stabilität des Antikörpers in den Medien mit unterschiedlichen pH-Werten und Puffersystemen wurde deren Einfluß auf das G_{D_3} -Bindungsvermögen des Antikörpers gemessen. Um vergleichbare Aktivitäten zu Beginn des Testes zu haben, wurde zum Test Kulturüberstand aus einem Kultivierungsansatz benutzt, der dann auf die entsprechenden Medienbedingungen eingestellt wurde.

In einem Spinner wurden HB-8445 Zellen bis zu einer Zelldichte von $1,3 \times 10^6$ Zellen/ml kultiviert. Die Suspension wurde anschließend bei 100 g zellfrei zentrifugiert und je 10 ml des Überstandes in 10 ml Zentrifugenröhrchen aus Polystyrol (Nunc, Wiesbaden) gefüllt. Zur Vermeidung von mikrobiellen Kontaminationen wurde 0,05 % [w/w] NaN_3 zugesetzt. Die verschiedenen Proben wurden mit 1 M NaOH auf

einen pH-Wert von 7,4; 7,2 und 6,9 eingestellt. Eine weitere Probe wurde mit 20 mM HEPES bei einem pH-Wert von 7,2 versetzt. Die Proben wurden 7 Tage mit täglicher Kontrolle des pH-Wertes bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle der Integrität des Antikörpers wurde sein G_{D3} -Bindungsvermögen mittels G_{D3} -Bindungs-ELISA bestimmt.

2.5.4 Test auf Sialidaseaktivität

Das Prinzip der Bestimmung der Sialidaseaktivität beruht auf der Umsetzung des Sialidase Substrates MUF-Neu5Ac (2'-(4-Methylumbelliferyl)-D-N-Acetyl-Neuraminsäure) in MUF und Neu5Ac [155]. Das abgespaltene Cumarinderivat MUF fluoresziert und kann im Fluoreszenzdetektor quantitativ bestimmt werden. [42, 127].

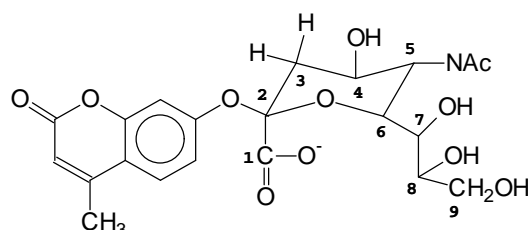


Abbildung 2.8: MUF-Neu5Ac, $M_r = 467,4$ g/mol.

Durchführung: Als Proben, die auf Sialidaseaktivität getestet wurden, dienten zum einen zellfreier Kulturüberstand und zum anderen Zellysat, das durch Aufschluß mit Ultraschall (3 mal 1 min, 10 % Duty Cycle, Stufe 3, Branson Sonifier 250, Hensenstamm) von 1×10^6 Zellen in einem ml Medium gewonnen wurde. Zur Abtrennung von Zelltrümmern wurde das Lysat 5 min bei 15000 g zentrifugiert. Der Überstand enthielt die cytosolische Sialidase. Der Reaktionsansatz zur Überprüfung ihrer Aktivität bestand aus:

10 μ l NaAc-Puffer (0,1 M Natriumacetat, pH 5,5)

25 μ l 4 mM MUF-Neu5Ac in H_2O ¹

65 μ l Probe

Der Reaktionsansatz wurde 60 min bei 37°C in einem Thermoschüttler (Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 900 μ l Glycin-Puffer (0,2 M Glycin in H_2O mit NaOH auf einen pH von 10,4 eingestellt) gestoppt. Anschließend wurde 15 min bei 15000 g zentrifugiert und der Überstand in einer

¹Nach Lagerung bei -20°C vor dem Gebrauch durch 5 min Ultraschallung wieder lösen.

Verdünnung von 1:10 bis 1:100 in H₂O in einer Mikro-Quarzküvette in einem Fluoreszenzdetektor RF-551 (Shimadzu, Kyoto, Japan) vermessen. Die Wellenlänge des anregenden Lichtes betrug 362 nm; die Emission wurde bei 448 nm gemessen. Als Referenz zur Aufnahme einer Eichkurve diente Methylumbelliferon (Sigma, Deisenhofen).

2.6 Produktanalytik

2.6.1 Bestimmung der Antikörperkonzentrationen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in einer Lösung wurde der BCA (Bicinchoninsäure) Test verwendet, der eine Konzentrationsbestimmung des Gesamtproteins zuläßt, wobei auch Bruchstücke oder denaturierte Proteine erfaßt werden, die mittels ELISA nicht nachweisbar sind. Die Konzentration an R24 Antikörper in den Kulturüberständen und in den Fraktionen der Protein A Affinitätschromatographie wurden mittels Sandwich ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbend Assay) bestimmt. Als drittes Nachweissystem für den R24 Antikörper in Lösungen diente die Bestimmung des G_{D3}-Bindungsvermögens mittels G_{D3}-Bindungs-ELISA

2.6.1.1 Bestimmung der Proteingesamtkonzentration mittels BCA Test

Der BCA (Bicinchoninsäure) Test dient zur Bestimmung des Gesamtproteingehaltes einer Lösung [182]. Der BCA Proteintest beruht auf der Biuret Reaktion, bei der Proteine in einem alkalischen Milieu Cu²⁺-Ionen zu Cu⁺-Ionen reduziert. BCA (4,4'-Dicarboxy-2,2'-biquinolin) bildet mit Cu⁺ einen farbigen Komplex, der bei 562 nm spektrophotometrisch gemessen werden kann. Die Empfindlichkeit des Tests liegt zwischen 10 - 2000 mg Protein/l.

Gebrauchslösungen und Reagenzien für die Gesamtproteinbestimmung mittels BCA Test

Reagenz A: Natriumcarbonat, Natriumhydrogencarbonat, BCA Nachweisreagenz, Natriumtetrat in 0,2 N NaOH (Pierce, Illinois, USA)

Reagenz B: 4% Kupfer(II)sulfat (Pierce, Illinois, USA)

BCA Reagenz: 25 ml von Reagenz A wurden mit 0,5 ml Reagenz B gemischt. Es ergab sich eine klare grüne Lösung.

Standard: Maus IgG (Sigma, Deisenhofen)

Arbeitsschritte für die Gesamtproteinbestimmung mittels BCA Test

1. **Probenauftrag:** Es wurden 200 μl BCA Reagenz in jedes Well einer 96 Well Mikrotiterplatte (Nunc, Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark) vorgelegt. Dazu wurden anschließend 20 μl proteinhaltige Probe gegeben, die zuvor entsprechend verdünnt wurde.
2. **Inkubation:** Die Mikrotiterplatte wurde 2 h bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert.
3. **Messung:** Die Extinktion wurde anschließend in einem ELISA Reader (ELX 808, Fa. BioTec Instruments/Kontron, Neufahrn) bei 570 nm gemessen und rechnergestützt ausgewertet.

2.6.1.2 Bestimmung der Konzentration von Maus IgG mittels Sandwich ELISA (IgG_S)

Die Antikörperbestimmung mit einem Sandwich ELISA (IgG_S, „S“ steht für „Sandwich“) wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt [146, 16]. Das Prinzip des Sandwich ELISA ist in der Abbildung 2.9 dargestellt.

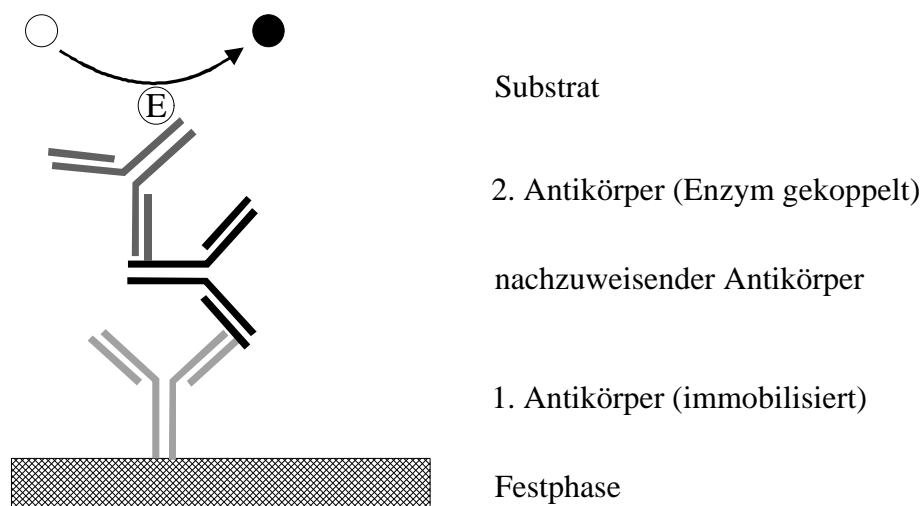


Abbildung 2.9: Prinzipieller Aufbau eines Sandwich ELISA (A. Werner, 1997).

Die Oberflächenmatrix (derivatisiertes Polystyrol) der Mikrotiterplatte wurde zunächst mit einem polyklonalen Primärantikörper, der spezifisch gegen das zu quantifizierende Maus IgG gerichtet ist, beschichtet. Nicht gebundener Primärantikörper wurde mit Waschpuffer entfernt. Zwecks Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen wurde anschließend mit FCS beschichtet. Nach Entfernung des FCS mittels

Waschpuffer wurde mit den zu bestimmenden R24 Antikörperproben überschichtet. Nach dem Waschen wurde, zur Entfernung nicht gebundener R24 Probenantikörper, die Mikrotiterplatte mit polyklonalem Sekundärantikörper, der gegen den Probenantikörper gerichtet ist, beschichtet. Der Sekundärantikörper war mit einem Enzym gekoppelt, das mit einem Substrat eine quantifizierbare Farbreaktion hervorruft, die mit der Menge an gebundenem Probenantikörper korreliert. Die Messung der Extinktion erfolgte in einem ELISA-Reader (ELX 808, Fa. BioTecInstruments/Kontron, Neufahrn). Die Berechnung der Konzentrationen durch Vergleich mit Referenz Maus IgG erfolgte automatisch mit dem Auswertungsprogramm MikroWin 3.15 (Fa. MikroTec Laborsysteme, Overath). In diesem ELISA wurden polyklonale Anti-Maus Antikörper eingesetzt, so daß nicht nur intakte IgG-Moleküle detektiert werden, sondern auch einzelne L- und H-Ketten des IgG.

Gebrauchslösungen und Reagenzien für den quantitativen Maus IgG Sandwich ELISA

Beschichtungspuffer: auf einen Liter MilliQ-Wasser 4,29 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$; 2,93 g NaHCO_3 , pH 9,4

Waschpuffer: 0,05% (v/v) Tween 20 (ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA) in MilliQ-Wasser

Phosphatpuffer (0,137 M): auf einen Liter MilliQ-Wasser 13,7 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$; 9,3 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$; pH 7,0

PBS-Gelb: auf einen Liter MilliQ-Wasser 2,77 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$; 0,34 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$; 0,1 g Tartrazin (Serva, Heidelberg); 8,75 g NaCl; pH 7,2

PBS-Blau: auf einen Liter MilliQ-Wasser 0,44 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$; 0,13 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$; 0,016 g Ethylmercurithiosalicylsäure (Na-Salz)(Serva, Heidelberg); 1,8 g Rinderserumalbumin (Albumin bovine Fraction V, pH 7,0; Serva, Heidelberg); 1,65 g Chloramphenicol (Sigma, Deisenhofen); 0,034 g Neomycinsulfat (Sigma, Deisenhofen); 0,1 g Alphazurin A (Aldrich, Deisenhofen); 0,5 ml Tween 20; 8,75 g NaCl; pH 7,2

PBS/Tween: auf einen Liter MilliQ-Wasser 0,44 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$; 0,13 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$; 0,97 g Ethylmercurithiosalicylsäure (Na-Salz)(Serva, Heidelberg); 0,5 ml Tween 20 (ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA); 8,75 g NaCl; pH 7,2

Substratpuffer: auf einen Liter MilliQ-Wasser 0,94 g $\text{NaB}_3 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$; 0,83 g Zitronensäure-1-Hydrat; 21,47 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$; pH 4,5

Primärantikörperlösung: in 10 ml Beschichtungspuffer 25 μl Ziege-Anti-Maus IgG (2,4 mg/ml AffiniPure goat anti-mouse IgG (H & L), Dianova, Hamburg) verdünnt

IgG Absättigungslösung: auf 9 ml 0,137 M Phosphatpuffer 1 ml FCS (PAA, Cölbe)

IgG Konjugatlösung: 5 ml PBS/Tween, 5 ml FCS und 6 μl Ziege-Anti-Maus IgG mit Peroxidase konjugiert (Anti-mouse IgG (H & L) fr. goat peroxid., Paesel + Lorei, Frankfurt)

IgG Substratlösung: 25 mg ABTS (2,2'-Azino-di- [3-ethylbenzthiazolinesulfonat(6)] ((NH₄)₂), Boehringer, Mannheim) in 15 ml Substratpuffer lösen, 3 μl 30% H₂O₂ dazugeben. (Zur besseren Löslichkeit von ABTS im Substratpuffer kann das ABTS zuvor in ca. 200 μl Wasser gelöst werden)

IgG Standard: 200 mg/l polyklonaler Maus IgG Antikörper (Sigma, Deisenhofen, I-5381)

Arbeitsschritte für die quantitative Maus-IgG-Bestimmung mittels Sandwich ELISA

- 1. Primärantikörperbeschichtung:** Zur Beschichtung einer 96 Well Mikrotiterplatte (Nunc Maxisorb, Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark) wurden je 100 μl Primärantikörperlösung in jedes Well gegeben. Die Inkubation erfolgte für 1h bei 37°C oder über Nacht im Kühlraum (4°C) auf einem Schüttler.
- 2. Waschen:** Zum Waschen der Mikrotiterplatte wurde diese zunächst geleert und auf einem Feuchtigkeit aufsaugenden Papier ausgeklopft. Der dreimalige Waschvorgang mit Waschpuffer wurde nach jedem Inkubationsschritt automatisch durch einen Microplate Strip Washer ELD-40 (Bio-Tek Instruments/Kontron, Neufahrn) ausgeführt. Abschließend wurde restliche Waschlösung durch Ausklopfen von der Platte entfernt.
- 3. Absättigung:** Von der Absättigungslösung wurden je 100 μl in jedes Well gefüllt und 30 min bei RT auf einem Schüttler inkubiert.
- 4. Probenantikörperauftrag:** Die nach der Absättigung gewaschene Mikrotiterplatte wurde mit 100 μl PBS-Blau pro Well beschichtet. In das erste Well jeder Verdünnungsreihe wurden 100 μl der in PBS-Gelb vorverdünnten Probe (ca. 0,1 μg) gefüllt, und eine 1:2 Verdünnungsreihe angelegt. Als Referenz diente Maus IgG Antikörper (Sigma, Deisenhofen). Es wurde für eine Stunde auf dem Schüttler bei RT inkubiert.
- 5. Sekundärantikörperbeschichtung:** Zur Bindung des Sekundärantikörper wurde die gewaschene Mikrotiterplatte mit 100 μl je Well Konjugatlösung überschichtet und für mindestens eine Stunde auf dem Schüttler bei RT inkubiert.
- 6. Substrat:** Als Substrat für die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase wurde ABTS verwendet, das zu einem blauen Farbstoff abgebaut wird.

Dazu wurden die gut gewaschene Mikrotiterplatte mit je 100 μl Substratlösung pro Well beschichtet. Nach ca. 20 min kann die Extinktion bei 405 nm gemessen werden.

2.6.1.3 Bestimmung der Konzentration an G_{D_3} -bindendem R24 Antikörper (IgG_{GD_3}) mittels G_{D_3} -Bindungs-ELISA

Im Gegensatz zu dem zuvor beschriebenen ELISA, der die Konzentration an intaktem IgG-Protein, aber auch von einzelnen H- und L-Ketten detektiert, wurde mit dem folgenden ELISA die antigenspezifische Bindungsfähigkeit des R24 Antikörpers (IgG_{GD_3}) bestimmt. Bei diesem ELISA wurde die 96 Well Mikrotiterplatte (Nunc Maxisorp, Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark) zunächst mit dem Antigen des R24 Antikörpers, dem Gangliosid G_{D_3} , in einer Mischung mit Lipiden beschichtet. Als nächstes wurde dann der R24 Antikörper als Primärantikörper aufgebracht, der selektiv an sein Antigen bindet. Anschließend wurden die gebundenen R24 Antikörper mit einem gegen Maus-IgG gerichteten, alkalische Phosphatase konjugierten Sekundärantikörper detektiert, wobei das Enzym mit einem entsprechendem Substrat eine Farbreaktion katalysiert. Die Farbreaktion wurde bei 405 nm mittels ELISA-Reader (ELX 808, Fa. BioTec Instruments/Kontron, Neufahrn) und einer Referenz aus einem separaten Ansatz quantitativ ausgewertet.

Gebrauchslösungen und Reagenzien für die Konzentrationsbestimmung des G_{D_3} bindenden R24 Antikörpers mittels ELISA

Waschpuffer: 0,05% (v/v) Tween 20 (ICN Biomedicals Inc, Ohio, USA) in MilliQ-Wasser

Absättigungspuffer: CMF-PBS (siehe Seite 2.3.1.7) mit 5% Rinderserumalbumin (Albumin bovine Fraction V, pH 7,0; Serva, Heidelberg) und 0,02% NaN_3 (w/w)

Sekundärantikörperlösung: in 10 ml Absättigungspuffer werden 10 μl Ziege-Anti-Maus IgG, das mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist (Alkaline Phosphatase-conjugated AffiniPure goat anti-mouse IgG + IgM (H & L), Dianova, Hamburg), gelöst.

Glycinpuffer: 0,1 M Glycin, 1 mM ZnCl_2 und 1 mM MgCl_2 in MilliQ-Wasser; pH 10,4

Substratlösung: 16 mM Lösung di-Natrium-4-nitrophenylphosphat Hexahydrat (Fluka, Seelze) in Glycinpuffer

G_{D3} und Lipide

Gangliosidfraction: aus Buttermilch isolierte G_{D3}-Fraktion Nuc-P1 (siehe Kap. 3.2.2 Seite 88)

Lipidmischung: bestehend aus (in Gewichtsprozent) 20% Cholesterol (Sigma, Deisenhofen); 30% Phosphatidylethanolamin (Lipoid S PE, Lipoid KG, Ludwigshafen); 50% Phosphatidylcholin (Lipoid PC 18:0/18:0, Lipoid KG, Ludwigshafen)

Arbeitsschritte für die Konzentrationsbestimmung des G_{D3} bindenden R24 Antikörpers mittels ELISA

1. **Beschichtung:** Zur Beschichtung einer 96 Well Mikrotiterplatte wurden in 10 ml Methanol 5 μg G_{D3} und 50 μg Lipidmischung gelöst und von der Lösung je 100 μl pro Well aufgegeben. Im Luftstrom (ca. 1 m/s) wurde das Methanol unter einem Abzug bei RT 2 h bis zur Trockene abgedampft. Die Mikrotiterplatte wurde dann unter Ölpumpenvakuum getrocknet und vor dem Auftrag des R24 Antikörpers gewaschen.
2. **Waschen:** Der dreimalige Waschvorgang mit dem Waschpuffer wurde nach jedem Inkubationsschritt automatisch durch einen Microplate Strip Washer ELD-40 (Bio-Tek Instruments/Kontron, Neufahrn) ausgeführt. Abschließend wurde restliche Waschlösung durch Ausklopfen von der Platte entfernt.
3. **Absättigung:** Zum Absättigen von unspezifischen Bindungsstellen wurde die Mikrotiterplatte mit Absättigungspuffer für 30 min beschichtet und anschließend gewaschen.
4. **Primärantikörperauftrag:** Vor dem Auftrag des Primärantikörpers erfolgte die Beschichtung der Mikrotiterplatte mit zunächst je 100 μl pro Well Absättigungspuffer. 100 μl der in Absättigungspuffer vorverdünnten Primärantikörperproben (ca. 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurden in das erste Well aufgegeben und in einer 1:2 Verdünnungsreihe vier weitere Verdünnungsschritte bis 1:32 herunterverdünnt. Es wurde 60 min bei RT auf einem Schüttler inkubiert und anschließend gewaschen.
5. **Sekundärantikörperbeschichtung:** Zur Bindung des Sekundärantikörpers wurde die gewaschene Mikrotiterplatte mit 100 μl je Well Sekundärantikörperlösung überschichtet und für mindestens eine Stunde auf dem Schüttler bei RT inkubiert und anschließend gewaschen.
6. **Substrat:** Die gut gewaschene Mikrotiterplatte wurde mit je 100 μl pro Well Substratlösung beschichtet. Nach ca. 30 min konnte die Extinktion bei 405 nm gemessen werden (siehe Kap. 2.6.1.3).

2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) zählt zur Standard-Analytik von Proteinen [91]. Durch die Beladung mit dem anionischen Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat) werden die verschiedenen partiellen Ladungen des Proteins überdeckt, so daß Anionen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit entstehen (1,4 g SDS/g Protein) [176]. Dabei wird die Sekundärstruktur der Proteine durch die Lösung von nicht kovalenten Bindungen aufgehoben, und es kommt zu einer Nettoladung des Proteins, die der Proteinmasse proportional ist. Eine Aufspaltung der Proteine in ihre Polypeptiduntereinheiten kann bei der Trennung von Cystin-Disulfidbrücken durch Behandlung der Probe mit reduzierenden Agenzien wie β -Mercaptoethanol erhalten werden. Bei der Elektrophorese im Polyacrylamidgel, das wie ein Molekülsieb wirkt, sind die relativen Mobilitäten proportional zum Logarithmus der Molekülmassen, die über mitgeführte Markerproteine bestimmt werden können.

Durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist eine Optimierung bezüglich der Bandenschärfe und Bandenauflösung möglich. Dieses wird durch das Vorschalten eines isotachophoretischen Schrittes zum Konzentrieren der Proteine in schmalen Zonen in einem grobporigen Sammelgel vor dem eigentlichen Trenngel erreicht.

Nach der Elektrophorese können die aufgetrennten Proteine durch spezifische Färbemethoden sichtbar gemacht werden.

2.6.2.1 PhastSystem SDS-Page

Für kleine Probenvolumina wurde das PhastSystem von Pharmacia (Uppsala, Schweden) verwendet. Das Gerät ermöglichte eine automatisierte Probenaufgabe und Elektrophorese. Die anschließende Färbung wurde in der automatisierten Färbekammer durchgeführt.

Als Gele für den SDS-Page wurden Fertiggele (PhastGel Gradient 8 - 25, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) und die entsprechenden SDS-Pufferstreifen verwendet. Zur Vorbereitung der Proteinproben wurden diese mit CMF-PBS soweit verdünnt, daß nach Zugabe von 5-fach konzentriertem SDS-Puffer eine Konzentration von ca. 40 ng/ μ l vorhanden war. Anschließend wurde 5 min bei 95°C inkubiert und anschließend bei 15000 g für 5 min abzentrifugiert. 0,3 - 1 μ l Überstand wurden mit einem Probenapplikator (Sample Applicator, Pharmacia, Uppsala, Schweden) auf das Gel gegeben und die Elektrophorese bei folgenden Trennbedingungen gestartet:

Elektrophorese 150 V 6,0 mA 1,8 W 15°C 90 Vh

Der Probenapplikator wurde für den Zeitraum von 0 bis 6 Vh auf das Gel aufgesetzt. Nachdem die Lauffront die Anode erreicht hatte wurde die Elektrophorese abgebrochen.

SDS-Puffer

Nicht reduzierender SDS-Puffer (5-fach konzentriert): 75,5 mg Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan) auf 1 ml MilliQ- Wasser, mit 5 M HCl auf pH 6,9 eingestellt; 500 μ l Glycerin; 250 μ g SDS; 1 mg Bromphenol Blau und 1 mg NaN_3 ; ad 2 ml mit MilliQ-Wasser

Reduzierender SDS-Puffer (5-fach konzentriert): 75,5 mg Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan) auf 1 ml MilliQ- Wasser, mit 5 M HCl auf pH 6,9 eingestellt; 500 μ l Glycerin; 250 μ g SDS; 400 μ l β -Mercaptoethanol; 1 mg Bromphenol Blau und 1 mg NaN_3 ; ad 2 ml mit MilliQ-Wasser

Als Molekulargewichtsreferenz diente eine Mischung aus Standardproteinen mit definiertem Molekulargewicht von 14,4 bis 94 kDa (LMW-Marker (Low Molecular Weight), Pharmacia, Uppsala, Schweden) und ein Maus IgG-Standard (150 kDa, Sigma, Deisenhofen).

2.6.2.2 Novex SDS-Page

Um größere Mengen an Protein für einen anschließenden Western-Blot zur Verfügung zu haben, wurde ein SDS-Page mit größeren Fertiggelen (10 % Tris-Glycin Gel, 1 mm x 10 Well, Novex, San Diego, USA) durchgeführt. Die Elektrophorese fand in einer Xcell II Mini-Cell Elektrophoresekammer (Novex, San Diego, USA) mit einem Electrophoresis Power Supply PS 3002 (Gibco, Eggenstein) Netzgerät statt. Der SDS-PAGE im Novex-System geht auf eine modifizierte Methode von Laemmli (1970) zurück [18].

Laufpuffer: 25 mM Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan); 192 mM Glycin; 0,1 % SDS; pH 8,3

Die verwendeten Probenpuffer sind die gleichen wie in Abschnitt 2.6.2.1. Von den R24 Antikörpern wurden 3 μ g Protein pro Geltasche aufgetragen. Als Molekulargewichtsreferenz diente eine Mischung aus Standardproteinen (LMW-Marker, Pharmacia, Uppsala, Schweden). Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 150 V für ca. 90 min. Das fertige Gel wurde zum Western-Blot verwendet. Nach dem Western-Blot wurden im Gel verbliebene Proteine mit Coomassie Blue (Kap. 2.6.3.2) angefärbt.

2.6.3 Färben der Polyacrylamid-Gele

2.6.3.1 Silberfärbung nach Heukeshoven

Fixierte Proteine können im SDS-Gel bei einem pH-Wert $< 10,5$ Silberionen komplexieren. Die Silberionen werden anschließend durch Reduktion mit Formalde-

hyd bei pH 10,5 - 12,5 gut sichtbar. Die Sensitivität der Methode liegt bei 1 - 5 ng/Proteinbande.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel in der Färbereinheit des PhastSystems (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) einer automatisierten Silberfärbung nach Heukeshoven [61] unterzogen.

Lösungen:

1 Fixierer I: 120 ml Methanol, 80 ml H₂O ad 400 ml mit 20% Trichloressigsäure

2 Fixierer II: 30% Ethanol, 60% H₂O, 10% Essigsäure

3 Heukeshoven-Konditionierer:
30 ml Ethanol + 10 ml 4 M Natriumacetat-Lösung + 0,5 ml Essigsäure + 10 ml 5%-Glutaraldehyd + 0,2 g Natriumthiosulfat, ad 100 ml mit H₂O (vor Gebrauch frisch ansetzen)

4 Versilberer-Abfall

5 MilliQ-Wasser

6 Versilberer: 50 ml 0,4 mM AgNO₂-Lösung + 50 µl 37%-Formaldehyd, ad 200 ml mit H₂O

7 Entwickler:

200 ml 2,5%-Natriumcarbonat + 80 µl 37% -Formaldehyd (vor Gebrauch frisch ansetzen)

8 Stopbad: 50 mM Na-EDTA in H₂O

9 Konservierer: 10 % Glycerin in H₂O

Färbungsschema:

	Zulauf	Ablauf	t [min]	T [°C]
1	1	0	0,5	25
2	2	0	0,4	50
3	2	0	4,0	50
4	3	0	7,0	40
5	5	0	3,0	50
6	5	0	3,0	50
7	5	0	3,0	50
8	5	0	4,0	50
9	5	0	4,0	50
10	6	4	8,0	40
11	6	4	2,0	25
12	7	0	0,4	30
13	7	0	4,0	50
14	8	0	2,0	50
15	5	0	3,0	50
16	9	0	4,0	50
17	5	0	0,4	25

Derart gefärbte Gele können bei mißlungener Färbung wieder entfärbt werden, um anschließend die Färbeprozedur zu wiederholen. Zur Entfärbung wurde das Gel zunächst mit Wasser gewaschen und anschließend mit Kaliumhexacyanoferrat-Kristallen (K₃[Fe(CN)₆]) und dann einigen Natriumthiosulfat-Kristallen bestreut. Das Gel wurde anschließend zur vollständigen Entfärbung mit Wasser gewaschen.

2.6.3.2 Coomassie-Färbung

Neben der Silberfärbung der Proteine im Gel, die sich vor allem durch ihre Empfindlichkeit auszeichnet, wurden die Proteinbanden auch mit dem Färbereagenz Coomassie Blue angefärbt, das eine semiquantitative Auswertung zuläßt. Die Empfindlichkeit der Färbemethode mit Coomassie Blue beträgt 5-100 ng/Proteinbande [138].

Das Gel wurde dazu in einer mit ausreichend Färbelösung gefüllten Schale mit Deckel für 20 min bei 50°C im Wasserbad bewegt. Zum Entfärben der Gelmatrix wurde die Färbelösung durch Entfärber ersetzt und das Gel weiter bei 50°C im Wasserbad inkubiert. Alle 15 - 20 min wurde die Entfärbelösung gegen frischen Entfärber ausgetauscht. Es wurde so lange entfärbt, bis die blauen Banden gut zu erkennen waren. Zur Konservierung wurde das Gel zunächst für 5 min mit 10 % Essigsäure (35°C), anschließend für 5 min mit 10 % Glycerin (50°C) gewaschen und dann getrocknet.

Färbelösung: 1 Tablette Coomassie R-350 (Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden); 50 ml konzentrierte Essigsäure; 100 ml Isopropanol; 150 ml MilliQ-Wasser; Lösung abschließend filtrieren.

Entfärber: 200 ml Isopropanol; 100 ml Essigsäure; 700 ml MilliQ-Wasser

Ein mit Coomassie Blue gefärbtes Gel kann ohne eine vorherige Entfärbung zur Erhöhung der Empfindlichkeit mit Silber nach Heukeshoven gefärbt werden.

2.6.4 Western-Blot

Beim Western-Blot eines SDS-Page (siehe Kap. 2.6.2.1) wandern die durch SDS negativ geladenen Proteine in einem elektrischen Feld in Richtung Anode und adherieren dabei an eine Blotmembran. Es ist zu beachten, daß kleine Proteine schneller wandern können als größere, was bei der Transferzeit des Blotvorganges berücksichtigt werden muß.

Bei dem durchgeführten Western-Blot handelt es sich um einen sogenannten Semiwet-Blot, dessen Vorteile ein geringerer Pufferverbrauch, eine kürzere Transferzeit und eine einfachere Handhabung sind. Gel und Membran werden lediglich durch mit Transfer-Puffer getränkte Pads und Filterpapierlagen von den waagerechten Plattenelektroden getrennt.

Der Blot wurde mit einem Xcell II Blot Module in einer Xcell II Mini-Cell Kammer (Novex, San Diego, USA) mit 1,2 mm Blotpapier (Schleicher&Schüll, Dassel) und einem Biorad Netzgerät (Model 200/2.0, Biorad, München) durchgeführt. Als Blotmembran diente eine PVDF Hybond Membran (Polyvinylidendifluorid, Amersham Buchler, Braunschweig) [45], die mit Methanol hydrophilisiert und 10 min in Transferpuffer äquilibriert wurde. Der Aufbau des Semiwet Western-Blots wird durch Abbildung 2.10 ersichtlich.

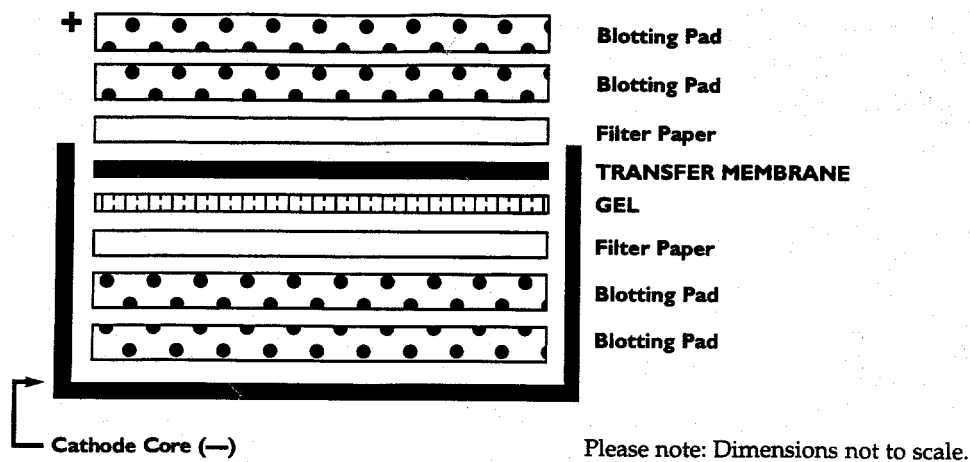


Abbildung 2.10: Aufbau eines Semiwet Western-Blot (Novex, 1995).

Der Transfer erfolgte bei 25 V über eine Transferzeit von 1,5 h.

Transferpuffer: 12 mM Tris-Base (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol), 96 mM Glycin, 20 % Methanol (pH nicht weiter einstellen)

2.6.5 Nachweis von Protein-gebundenen Oligosacchariden mit Lektinen

Die spezifische Bindung von Lektinen an Kohlenhydratstrukturen wird z.B. zur Identifizierung von Protein-gebundenen Oligosacchariden genutzt. Die verwendeten Lektine sind mit dem Steroidhaptan Digoxigenin konjugiert, wodurch eine immunologische Detektion der verschiedenen Lektine mit einem Anti-Digoxigenin Antikörper möglich ist. Der Nachweis der an Oligosaccharide gebundenen Lektine erfolgte auf Basis einer Chemilumineszenzdetektion mit dem ECL-System (Amersham, Braunschweig). Es wurden die drei verschiedenen Lektine verwendet, die folgende Spezifitäten aufweisen:

MAA (*Maackia amurensis* Agglutinin): erkennt spezifisch Sialinsäuren, die $\alpha 2,3$ an Galaktose gebunden sind ($SA\alpha 2 \rightarrow 3Gal$) [194].

SNA (*Sambucus nigra* Agglutinin): erkennt spezifisch Sialinsäuren, die $\alpha 2,6$ an Galaktose gebunden sind ($SA\alpha 2 \rightarrow 6Gal$) [177].

DSA (*Datura stramonium* Agglutinin): erkennt $Gal\beta(1-4)GlcNAc$ in komplexen und hybriden N-Glykanen und $GlcNAc$ in O-Glykanen [23].

Alle Digoxigenin-konjugierten Lektine stammen aus dem DIG Glycan Differentiation Kit (Boehringer, Mannheim). Die Detektion der Oligosaccharide der R24 Antikörper wurden auf der PVDF-Membran der Western-Blots (siehe 2.6.4) bei RT durchgeführt. Die Detektion der Digoxigenin konjugierten Lektine wurde mit Peroxidase konjugierten Schaf Anti-Digoxigenin F_{ab} Antikörperfragmenten mittels Chemilumineszenz durchgeführt [56]. Die Detektion mittels Chemilumineszenz zeichnet sich durch ihre sehr hohe Sensitivität aus. Das Prinzip des ECL-Systems (Enhanced Chemiluminescence, Amersham, Braunschweig) beruht auf dem Umstand, daß bei der enzymatisch begünstigten Oxidation von Luminol ein Teil der freiwerdenden Energie in Form von Licht abgegeben wird, das mit blaulichtempfindlichem Autoradiographiefilm detektiert werden kann. Auf der Blotmembran können nach der Chemilumineszenzreaktion die Proteine mit Coomassie Blue angefärbt werden.

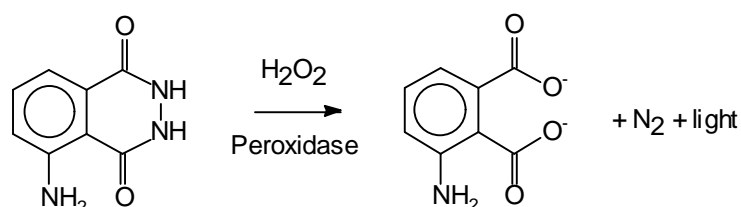


Abbildung 2.11: Enzymatische Umsetzung von Luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazidion) zu 5-Aminophthalsäure.

Gebrauchslösungen und Reagenzien für den Nachweis von Protein-gebundenen Oligosacchariden mit Lektinen

1. **TBS-Puffer:** 20 mM Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan), 137 mM NaCl in MilliQ-Wasser, pH 7,5
2. **Absättiger:** TBS-Puffer mit 0,1 % Tween 20 (Merck- Schuchardt, Hohenbrunn)
3. **Inkubationspuffer:** TBS-Puffer mit 1 mM MgCl₂ und 1mM CaCl₂; pH 7,5
4. **Anti-Digoxigenin-AP Lösung:** 5 μ l (3,75 U) polyklonaler Schaf Anti-Digoxigenin-F_{ab}-Fragmente in 10 ml TBS-Puffer gelöst
5. **ECL-Detektionslösung:** ECL Western Blotting detection reagents (Amersham Buchler, Braunschweig, keine weiteren Herstellerangaben)
6. **Filmmaterial:** Hyperfilm ECL (Amersham Buchler, Braunschweig)
7. **Entwickler:** Entwickler für Autoradiographiefilme, D-19 (Kodak, Chalon-sur-Saone, Frankreich)
8. **Fixierer:** Unifix, Kodak, Chalon-sur-Saone, Frankreich

Durchführung

1. **Absättigen:** Nach dem Antikörper-Transfer auf die PVDF-Membran wurden unspezifische Bindungsstellen durch 30 min Bewegen mit Absättiger auf dem Schüttler blockiert.
2. **Waschen:** Gewaschen wurde mit TBS-Puffer zweimal 10 min
3. **Lektin Inkubation:** In 10 ml Inkubationspuffer wurden 5 μg SNA, DSA oder 40 μg MAA gelöst und die Blotmembran darin 1 h auf dem Schüttler inkubiert und anschließend dreimal gewaschen.
4. **Anti-Digoxigenin-AP Inkubation:** Zur Bindung der peroxidase markierten Anti-Digoxigenin-Antikörperfragmente aus Schaf (Sigma, Deisenhofen) an die Digoxigenin konjugierten Lektine wurden die Blotmembran mit 10 ml Anti-Digoxigenin-AP Lösung überschichtet und für 1 h auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde dreimal gewaschen.
5. **Chemilumineszenzdetektion:** Der indirekte Nachweis der gebundenen Lektine erfolgte auf dem Wege der Chemilumineszenz.
 - (a) Die Blotmembran wurde auf Frischhaltefolie gelegt und mit ECL-Detektionslösung vollständig benetzt und 1 min inkubiert, anschließend in die Frischhaltefolie eingeschlagen und überflüssige Detektionslösung entfernt.
 - (b) Die Blotmembran wurde im Dunkeln zusammen mit einem hochempfindlichen Film in eine Autoradiographiekassette gelegt. Die Expositionsdauer richtete sich nach der Chemilumineszenzintensität und betrug zwischen 10 und 40 sec.
 - (c) Der Film wurde im Dunkeln aus der Autoradiographiekassette genommen und mit einem speziellen Entwickler für Autoradiographiefilme 4 min entwickelt, anschließend kurz gewässert und abschließend fixiert, 10 min gewässert und getrocknet.

2.6.6 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) ist eine elektrophoretische Separationstechnik, bei der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) getrennt werden. Die Nettomolekülladung ist pH-abhängig und beträgt nur am isoelektrischen Punkt Null. Die elektrophoretische Auftrennung des Proteingemisches erfolgt bei der IEF über einen pH-Gradienten. Als Trägermaterial dienen ampholythaltige Polyacrylamidgele, die den Aufbau eines stabilen, linearen pH-Gradienten ermöglichen. Im elektrischen Feld wandern die Proteine zur entgegengesetzt geladenen Elektrode [197]. Die Wanderungsgeschwindigkeit v ist dabei abhängig von der elektrischen Feldstärke E , der Nettoladung des Proteins z und dem Reibungskoeffizienten f , der durch Masse und

Form des wandernden Moleküls sowie der Viskosität des Mediums beeinflusst wird. Diese Abhängigkeiten können in der Formel

$$v = \frac{Ez}{f} \quad (2.7)$$

zusammengefaßt werden.

Die aufgetragenen Proteine wandern im pH-Gradienten bis zu einer Position, an der der pH ihrem pI entspricht. An diesem Punkt beträgt die Nettoladung z des Proteins Null, so daß die Wanderungsgeschwindigkeit v ebenfalls gleich Null ist. Durch Auftrag eines Standardgemisches aus Proteinen mit bekannten isoelektrischen Punkten kann der pI eines unbekanntes Proteins bestimmt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die IEF verwendet, um die isoelektrischen Punkte der unter verschiedenen Kulturbedingungen erzeugten Antikörper miteinander zu vergleichen und so eine Aussage über die Produktidentität machen zu können.

Für die Elektrophorese stand das PhastSystem der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) zur Verfügung, mit dem unterschiedliche elektrophoretische Trennprogramme und anschließende Färbungen automatisiert durchgeführt werden können. Die Fokussierung erfolgte in einem homogenen IEF-Polyacrylamid-Fertiggel mit einem Trennbereich von pH 3 - 9 (PhastGel IEF 3 - 9, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) [151].

Zur Vorbereitung wurden die R24 Antikörper gegen vierfach mit Wasser verdünnte CMF-PBS (siehe 2.3.1.7) 12 h bei 4°C dialysiert (Membran mit 12 - 14 kDa Ausschlußgröße, Medicell International, London, England), in einer Vakuumzentrifuge (Bachofer, Reutlingen) zur Trockne eingengt und mit MilliQ-Wasser auf physiologische CMF-PBS Konzentration aufgefüllt. Diese Vorbehandlung war notwendig, um bei der IEF störende Puffer- und Salzeffekte zu beseitigen. Die Konzentration der Antikörper wurde zum Auftrag auf ca. 70 ng/ μ l mit CMF-PBS verdünnt. Der Auftrag auf das Gel erfolgte mit einem Probenapplikator (Sample Applicator, Pharmacia, Uppsala, Schweden).

Gleichzeitig mit den Proben wurde ein Standardproteingemisch als Marker aufgetragen (IEF Markers 3-10, Serva Liquid Mix, Serva Electrophoresis, Heidelberg). Die elektrophoretische Trennung erfolgte nach dem wie folgt vorgegebenen Programm:

1. Vorfokussierung der Ampholyte:	2000 V	2,5 mA	3,5 W	15°C	75 Vh
2. Probenapplikation	200 V	2,5 mA	3,5 W	15°C	15 Vh
3. IEF der Probenproteine	2000 V	2,5 mA	3,5 W	15°C	410 Vh

2.6.7 Gelchromatographie

Zur Überprüfung der Reinheit und Produktidentität wurde eine Gelfiltration mit dem Smart System (Pharmacia, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Bei dem Smart System handelt es sich um ein Mikroaufreinigungssystem zur Separation von Biomolekülen in kleinem Maßstab mit Flußraten von 10 μ l bis 2 ml pro Minute und einem

Maximaldruck von 25 MPa. Das System besteht aus μ Precision pump, μ Separation unit, μ Peak monitor, μ Fraction collector und Smart Manager Software.

Diese Größenausschlußchromatographie beruht auf einer unterschiedlichen Verteilung von Molekülen zwischen dem stationären weitporigen Gelkompartiment (ca. 100 nm) und dem umgebenden Medium [162]. Kleine Moleküle haben eine vergleichsweise höhere Verweilzeit im Gelkompartiment und benötigen somit ein größeres Elutionsvolumen als große Moleküle, was somit zu einer Trennung von Molekülen nach ihrer Molekülgröße führt.

Als Säule diente eine Superdex 200 PC 3.2/30 (Pharmacia, Schweden) mit einem Trennbereich von 10 - 600 kDa. Es wurden 15 - 70 μ l Probe durch einen 100 μ l Loop auf die Säule aufgegeben. Die im Laufpuffer (50 mM Natriumphosphat; 150 mM Natriumchlorid; pH 7,2) bei einer Flußrate von 40 μ l/min von der Säule eluierten Proteine wurden mittels UV-Signal bei 280 nm detektiert.

2.6.8 Photometrische Bestimmung des Neutralzuckergehaltes

Da der Peptidanteil des Proteins bei vielen Nachweismethoden die Meßergebnisse verfälscht, müssen häufig zunächst die Zucker von dem Peptidanteil getrennt werden.

Der colorimetrische Nachweis mittels der Resorcin/Schwefelsäure Mikromethode [121] stellt eine einfache und schnelle Methode dar, den Gehalt an Neutralzuckern wie Mannose, Fukose, Galaktose und Glukose von Glykoproteinen und Glykolipiden zu bestimmen, ohne daß zuvor die Zucker isoliert werden müssen. Durch die Empfindlichkeit der Methode können Zuckermengen von weniger als 2 nMol in 200 μ l Probe detektiert werden.

Zur Bestimmung des Neutralzuckergehaltes der produzierten Antikörper wurden ca. 200 μ g des Glykoproteins in 200 μ l Puffer in ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) gegeben. Dazu wurden 200 μ l einer wässrigen Resorcinlösung (6 mg/ml) (Merck, Darmstadt) und 1 ml 75 %ige Schwefelsäure pipettiert und anschließend gut gemischt. Der Reaktionsansatz wurde für 30 min auf 95°C erhitzt und dann für weitere 30 min abgedunkelt bei 0°C gekühlt. Der Neutralzuckergehalt der Probe wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei 430 nm (Uvikon Spektrometer, Kontron Instruments, Neufahrn) bestimmt. Als Referenzzucker diente Mannose. Über eine Eichreihe wurde der Neutralzuckergehalt der Antikörper bestimmt.

2.6.9 Bestimmung des proteingebundenen Sialinsäuregehaltes mittels HPLC

Neben der photometrischen Bestimmung des Sialinsäuregehaltes (siehe 2.8.4) erfolgte eine quantitative Bestimmung des Sialinsäuregehaltes im Nanogrammereich

mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion mit dem Reagenz DMB (1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzoldihydrochlorid (Sigma, Deisenhofen)) [53]. Diese Methode läßt eine qualitative und quantitative Unterscheidung zwischen Neu5Ac und Neu5Gc durch eine RP-HPLC zu.

Zur Entfernung von störend hohen Salzkonzentrationen in den Proben wurden R24 Antikörpermengen von ca. 2 mg zunächst gegen CMF-PBS (siehe 2.3.1.7) dialysiert (Membran mit 12 - 14 kDa Ausschlußgrenze, Medicell International, London, England). Dann wurden die ca. 2 ml-Proben zunächst durch Ultrafiltration mit Microsep 30K (Filtron GmbH, Karlsheim) auf ein Volumen von ca. 500 μ l reduziert und anschließend in der Vakuumentrifuge (Bachofer, Reutlingen) zur Trockne eingeeengt. Zur Abspaltung der Sialinsäuren wurden die Proben mit 100 μ l 25 mM H₂SO₄ 90 min bei 80°C (pH < 2) inkubiert und anschließend im Eisbad abgekühlt. Die freigesetzten Sialinsäuren wurden lichtgeschützt mit 100 μ l DMB-Reagenz (10 mg DMB in 6 ml 1 M β -Mercaptoethanol und 18 mM Natriumdithionit) 150 min bei 60°C (pH < 2) zu ihren fluoreszierenden Derivaten umgesetzt. Wenn bei der Umsetzung mit dem DMB-Reagenz ein pH >2 herrscht, kommt es zu einer rot-braun Färbung der Probe und damit zu ihrer Zerstörung. Die Auftrennung der Derivate (40 bis 70 μ l des Derivatisierungsansatzes) erfolgte in einer Kontron D450 Anlage (Kontron Instruments, Echingen), die mit zwei HPLC-Pumpen Typ 420 und einem Autosampler Typ 460 ausgestattet war. Die Auftrennung erfolgte unter isokratischen Bedingungen mit Methanol/Acetonitril/Wasser (9/7/110) über eine 124 mm x 4 mm Superspher RP₁₈-Säule (Bischoff, Leonberg) bei einem Fluß von 1,2 ml/min [31] in einem Zeitraum von 30 min. Die DMB-Derivate wurden mittels Fluoreszenzdetektor (Kontron, Typ SFM 25, Echingen) nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 373 nm bei einer Emissionswellenlänge von 448 nm detektiert. Als Referenzsubstanzen wurden Neu5Ac und Neu5Gc (Sigma, Deisenhofen) verwendet.

2.6.10 Bestimmung der N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharidstrukturen mittels HPAEC-PAD

Für die Trennung und Strukturermittlung der N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharide des R24 Antikörpers wurde die HPAEC-PAD (High-Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection) eingesetzt. Dabei handelte es sich um eine hochauflösende Anionenaustauschchromatographie bei hohen pH-Werten. Die aufgetrennten Oligosaccharide wurden an einer Goldelektrode amperometrisch detektiert [86]. Den Signalen der HPAEC-Profile wurden mit Hilfe von Referenzoligosacchariden [64] die entsprechenden Strukturen zugeordnet.

Die Chromatographie erfolgte mit einer Bio-LC Anlage (Dionex GmbH, Idstein) [63] die mit einer CarboPac PA-100 Säule (4,6x250 mm) bestückt war [140, 60].

Oberhalb eines pH-Wertes von 12 liegen Zucker teilweise in anionischer Form vor, wobei nicht alle OH-Gruppen die gleiche Azidität besitzen. Bei α - und β -Methyl-D-Glykopyranosiden deprotonieren die OH-Gruppen in der Reihenfolge 2-OH > 6-OH > 3-OH > 4-OH mit steigendem pH-Wert [94]. Die unterschiedliche Dissoziation an den einzelnen Hydroxylgruppen wird zusätzlich durch unterschiedliche elektrostatische Wechselwirkungen, resultierend aus dem jeweiligen Umfeld der Zucker, beeinflusst. Die hieraus resultierenden Unterschiede in der Ladung der Zucker machen eine Auftrennung von Oligosacchariden mit verschiedenen Strukturen in der Anionenaustauschchromatographie möglich.

Die N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharide des R24 Antikörpers wurden chemisch mittels Hydrazinolyse abgespalten und anschließend isoliert. Mit den nach dieser Methode gewonnenen Zuckerketten wurden anschließend die HPAEC-PAD und die MALDI-TOF-MS durchgeführt.

Diese Analytik wurde durch die Arbeitsgruppen von Herrn Dr. H. Conradt und Herrn Dr. M. Nimtz an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig durchgeführt.

2.6.11 Deglykosylierung des R24 Antikörpers

Für eine umfassende Oligosaccharid-Strukturaufklärung von Glykoproteinen ist die Abtrennung der intakten Glykanketten vom Proteinteil erforderlich. Zur Freisetzung der Kohlenhydratketten ist es notwendig, die glykosidischen Bindungen vom Glykoprotein zu spalten [40]. Dazu dient in der Regel neben der chemischen Methode der Hydrazinolyse, die enzymatische Abspaltung mit Hilfe der PNGase F (Peptid-N-glycosidase F).

2.6.11.1 Chemische Deglykosylierung durch Hydrazinolyse

Als chemische Methode zur Freisetzung von Glykanen aus Glykoproteinen wird neben der alkalischen Hydrolyse bevorzugt die Hydrazinolyse eingesetzt. Dieser folgen in weiteren Reaktionsschritten die Re-N-Acetylierung und die Abtrennung von Acetylhydrazon. Es werden sowohl N- als auch O-glykosidische Bindungen von Glykoproteinen gespalten. Die resultierenden Glykane sind in einem intakten Zustand, da sie durch Hydrazin vor weiteren Spaltungsreaktionen geschützt werden. Durch gezielte Variation der Reaktionsbedingungen ist eine selektive Spaltung von O- und N-glykosidischen Bindungen möglich [147]. Die Ausbeute liegt meist bei über 85 % [38].

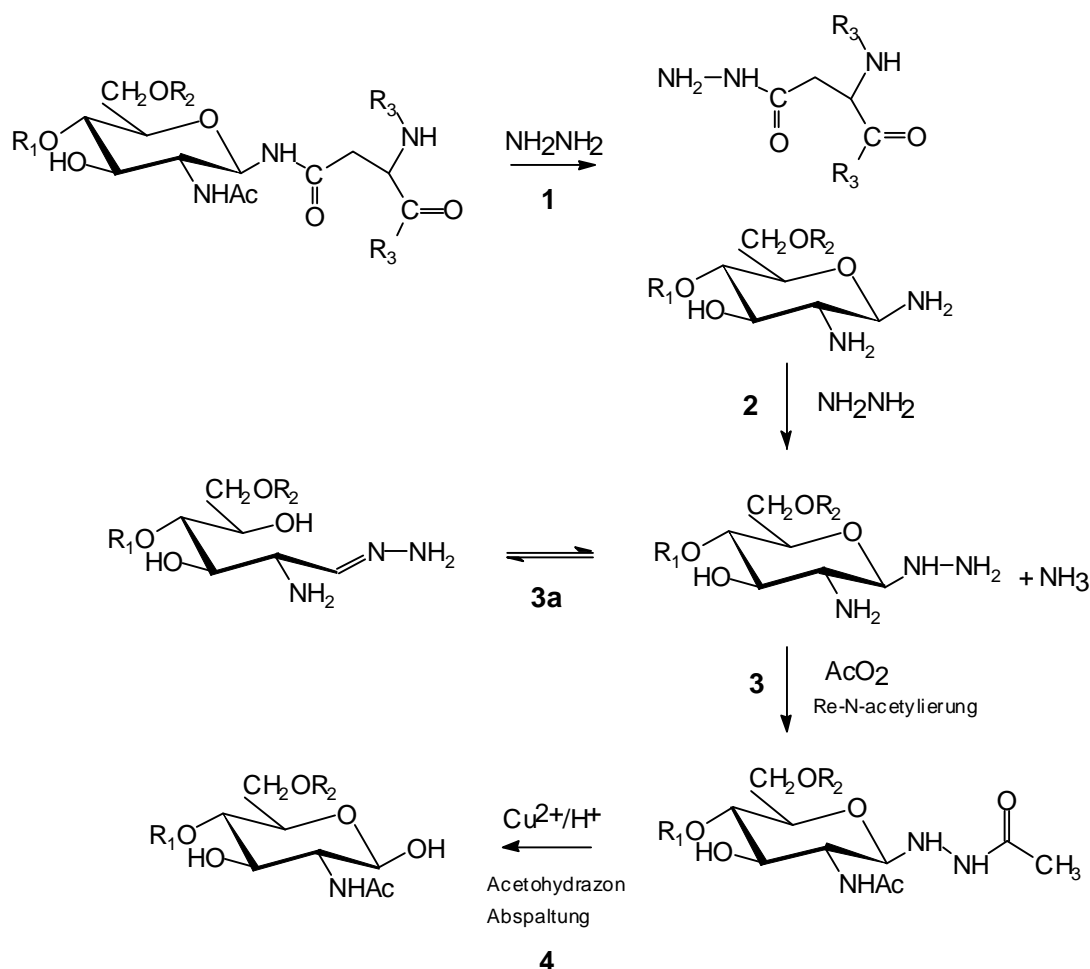


Abbildung 2.12: Hydrazinolyse von asparagingebundenen Zuckerketten. R₁: Zucker; R₂: Wasserstoff oder Fukose; R₃: Polypeptidkette

Der Reaktionsverlauf der Hydrazinolyse ist in Abbildung 2.12 schematisch dargestellt [187, 40]. Dabei ist erwähnenswert, daß das Produkt der reversiblen Ringöffnung **3a** sich weiter umlagern kann, was zu entsprechenden Ausbeuteverlusten führt. Günstigerweise ist Reaktionsschritt **3a** im Vergleich zu den anderen Reaktionsschritten relativ langsam, so daß es bei entsprechend kurzen Reaktionszeiten (8 - 10 h bei 100°C) nur wenige dieser unerwünschten Umlagerungsprodukte entstehen. Die Zwischenprodukte nach den Reaktionsschritten **2** und **3** sind in wässrigen Lösungen stabil, auch wenn sie sauer sind.

Als Nachteile der Abspaltung der Glykane von Glykoproteinen durch Hydrazinolyse ist zum einen die Zerstörung des Peptidanteils zu nennen. Zum anderen können die Sialinsäuren Neu5Ac und Neu5Gc nach der Spaltung der Peptidbindungen und der darauf folgenden Re-N-acetylierung nicht mehr voneinander unterschieden werden. Neu5Gc wird durch diese chemischen Reaktionen zu Neu5Ac.

Um störende Salze zu entfernen, wurden die mittels Protein A gereinigten R24 An-

tikörper vor der Hydrazinolyse gegen 0,5 M Essigsäure für 12 h bei 4°C dialysiert (Membran mit 12 - 14 kDa Ausschlußgrenze, Medicell International, London, England). Die Konzentration der R24 Antikörper wurde anschließend mittels BCA Test gemessen.

Die Hydrazinolyse der R24 Antikörper wurde im Rahmen dieser Arbeit sowohl manuell als auch mittels eines GlycoPrep 1000Automaten (Oxford GlycoSystems, England) durchgeführt.

2.6.11.2 Enzymatische Deglykosylierung mit PNGase F

PNGase F (EC 3.5.1.52) aus dem *Flavobacterium meningosepticum* ist in der Lage spezifisch N-glykosidische Bindungen zwischen N-Acetylglucosamin und Asparaginsäure zu spalten. Dazu ist es notwendig, die N-glykosidische Bindung durch vorherige Denaturierung des Proteins für den enzymatische Zugriff besser zugänglich zu machen [38]. Neben dem Einsatz von Detergentien wie Mega 8 oder Mega 10 kommt der tryptische Verdau zur Anwendung [158].

Zur enzymatischen Abspaltung der N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharide der R24 Antikörper kamen zwei Techniken zum Einsatz: die Abspaltung im SDS-Page und die Abspaltung in Lösung. Zur Abspaltung im SDS-Page wurden die Antikörper-Banden einer Gelelektrophorese ausgestochen und in einen Reaktionsansatz aus NaHCO₃-Puffer (pH 7,0), Trypsin und PNGase F überführt. Nach 16 h bei 37°C wurden die Oligosaccharide mit Wasser extrahiert [87]. Bei Glykanabspaltung in Lösung wurde der Antikörper zunächst mit Detergens und β -Mercaptoethanol denaturiert. Die Abspaltung erfolgte durch Inkubation mit PNGase F für 72 h bei 37°C. Zur Isolierung der N-Glykane wurden die Proteine mit 80 % eiskaltem Ethanol gefällt [87]. Eine finale Reinigung erfolgte mit einer Gelchromatographie. Bei allen enzymatischen Abspaltungen wurde rekombinante PNGase F aus E.coli (N-GlycosidaseF, Boehringer, Mannheim) verwendet.

2.6.12 Massenspektrometrische Strukturaufklärung der N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharide

In der Massenspektrometrie werden die Probemoleküle mit Hilfe einer Ionenquelle in positiv oder negativ geladene, gasförmige Ionen überführt. Diese werden in einem Analysator nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) getrennt und mit einem Detektor registriert.

In Massenspektrometern kommen verschiedene Trennsysteme zum Einsatz. Die verbreitetsten Prinzipien zur Massentrennung von Ionen sind die Ablenkung im Magnetfeld, die Flugzeit (TOF), die Ionen Trap- und Cyclotron-Resonanz-Methode.

Auch werden die massenspektrometrischen Techniken nach der Art der Ionisation unterschieden. Die harten Ionisationsarten wie z.B. die Elektronenstoßionisation sind durch zahlreiche Fragmentierungen gekennzeichnet, die ein relativ komple-

xes Massenspektrum ergeben. Die weichen Ionisationstechniken bewirken nur geringe Molekülfragmentierungen. Auch hochmolekulare Biomoleküle wie Proteine oder Glykoproteine bleiben in ihrer Struktur erhalten. Beispiele für solche weichen Ionisationsarten sind Thermospray (TSP), Fast Atom Bombardement (FAB), Elektrospray (ESI), Feldionisation (FI), Felddesorption (FD) und die Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight-Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) [38, 149].

2.6.12.1 Massenspektrometrie mittels MALDI-TOF MS

Zur qualitativen Strukturaufklärung der Oligosaccharidstrukturen wurden diese mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie vermessen.

Dazu wurden von den unter verschiedenen Kulturbedingungen produzierten R24 Antikörpern die N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharidstrukturen mittels Hydrazinolyse abgespaltenen und anschließend unter sauren Bedingungen desialyliert.

Mit MALDI-TOF MS ist es möglich, auch große Biomoleküle bis zu einem Molekulargewicht von 500 kDa als Ionen im gasförmigen Zustand zu erzeugen und zu vermessen [38]. Dazu werden die Biomoleküle in eine Matrix eingebettet und mit Laserlicht als Ionen in die Gasphase gebracht. Die verwendete Matrix absorbiert dabei im Gegensatz zum Probemolekül das Laserlicht gut, und reißt beim Verdampfen die Probemoleküle mit. Die Ionen können dann mit einem Flugzeitmassenspektrometer analysiert werden.

Die Analysen wurden mit einem Bruker REFLEX MALDI Massenspektrometer [140, 153] durch die Arbeitsgruppe von Herrn Dr. M. Nimtz an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig durchgeführt. Das Instrument war mit einem Verzögerungs-Extraktor und Reflektor ausgerüstet. Der N_2 Laser (337 nm) arbeitete mit 3 nsec Pulsen bei einer Bestrahlungsstärke von 10^7 - 10^8 Wcm^2 . Als Matrix diente 2,5-Dihydroxybenzoesäure (10 mg/ml in 10 % Ethanol). Die Spektren wurden mit einer Beschleunigungsspannung von 20 kV aufgenommen.

2.6.12.2 Massenspektrometrie mittels Nano ESI-QTOF-MS

Bei der ESI-QTOF-MS (Electrospray Quadrupol Time-Of-Flight Mass Spectrometry) werden die Analyten in einer Flüssigkeit durch eine Kapillare gefördert, die an ihrem Ausgang von einem elektrischen Feld umgeben ist. Beim Austritt aus der Kapillare führt dieses zum Versprühen und zur elektrischen Aufladung (Ionisierung) der Moleküle, die dann im Massenspektrometer nach ihrem Masse/Ladung-Verhältnis aufgetrennt werden. Die gezielte Fragmentierung der Moleküle spielt in der ESI-QTOF-MS Analytik eine wichtige Rolle und kann eingesetzt werden, um genauere Strukturinformationen zu erhalten.

Mit der bei den Untersuchungen verwendeten Gerätekonfiguration konnten Oligosaccharide in subnanomolaren Konzentrationen detektiert werden.

Die durchgeführte enzymatische Zuckerabspaltung ist dabei sowohl in Lösung als auch im Gel vorgenommen worden [87].

Die Analysen wurden von Frau D. Šagi in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. J. Peter-Katalinić am Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Universität Münster mit einem Micromass Massenspektrometer, ausgestattet mit einer nanoESI Ionenquelle, durchgeführt [115]. Die Kapillar-Spannung betrug 1.3 kV im Negativ- und 1.5 kV im Positiv-Mode. Die Düsen-Spannung (V_c) betrug 75 V im Negativ- und 88 V im Positiv-Mode.

2.6.13 Biosensor Bindungstests mittels Surface Plasmon Resonance (SPR)

Zur Untersuchung des Bindungsverhaltens des R24 Antikörpers gegenüber seinem Antigen G_{D3} wurde das optische SPR Verfahren verwendet. Die Untersuchungen wurden mit dem Biosensorsystem BIAcore 2000 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Die Abkürzung BIA steht dabei für „Biomolecular Interaction Analysis“, was den Einsatzbereich des Gerätes beschreibt. Es dient der Studie von Wechselwirkungen zwischen Substrat und Analyt (oder Rezeptor und Ligand) auf molekularer Ebene. Der Vorteil der BIA Technologie gegenüber bisherigen Untersuchungssystemen wie ELISA besteht zum einen in der Echtzeitaufnahme der Meßdaten, was eine zeitaufgelöste Analyse ermöglicht. Zum anderen sind keine Sekundärderivate wie mit alkalischer Phosphatase konjugierte Antikörper zur Beobachtung der Wechselwirkungen notwendig.

2.6.13.1 Aufbau und Funktion des BIAcore 2000

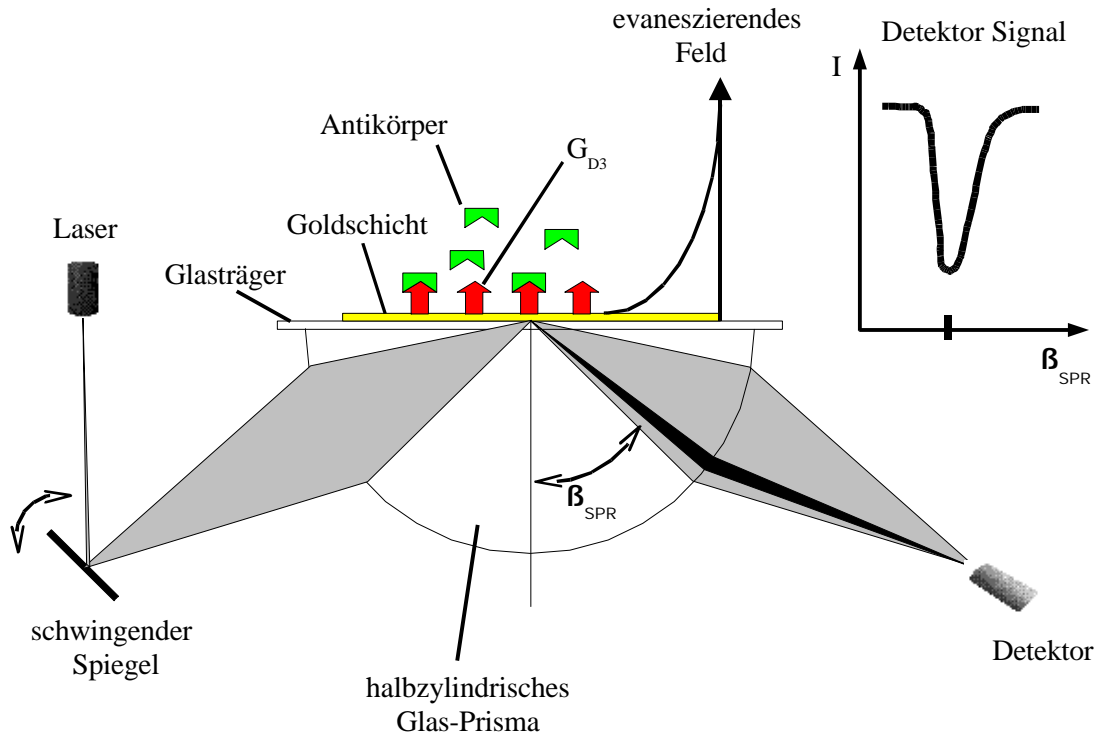


Abbildung 2.13: Schematische Darstellung des Aufbaues und der Funktionsweise eines SPR Biosensorsystems.

Ein goldbedampfter Glasträger wird von einem Laser unter einem sich periodisch ändernden Winkel angestrahlt. An der Phasengrenze des Glasträgers kommt es zur Totalreflektion des Laserlichtes. Abweichend von der klassischen Physik ist im reflektierten Laserlicht unter einem genau definierten Winkel β_{SPR} ein Intensitätsminimum zu beobachten. Diese Erscheinung wird durch die Quantenphysik mittels SPR erklärt. Der Winkel des Intensitätsminimums β_{SPR} ist Abhängig von der Massenkonzentration an der Phasengrenze des Glasträgers. Wird z. B. über den Glasträger, auf dem ein Antigen (z.B. G_{D3}) für einen Antikörper (z.B. R24) immobilisiert ist, eine Antikörperlösung gegeben, nimmt die Massenkonzentration auf der Oberfläche des Glasträgers in Folge der Kopplung des Antikörpers an das Antigen zu. Diese Massenzunahme kann detektiert werden und erlaubt somit eine zeitaufgelöste Analyse der Kopplung des Antikörpers an sein Antigen.

Mit der SPR Biosensor Technologie ist es möglich, sehr genaue Informationen über die Massenkonzentration des Mediums in einer Tiefe von ca. 300 nm oberhalb eines mit Gold bedampften Glasträgers zu erhalten. Bei dem verwendeten Biosensorsystem BIAcore 2000 ist die Anzeige des Detektorsignales so geeicht, daß eine Zunahme von 1000 RU (Resonanz Units) einer Massenzunahme von ca. 1 ng/mm² auf der Glasträgeroberfläche entspricht bei einem Signalrauschen von < 2 RU.

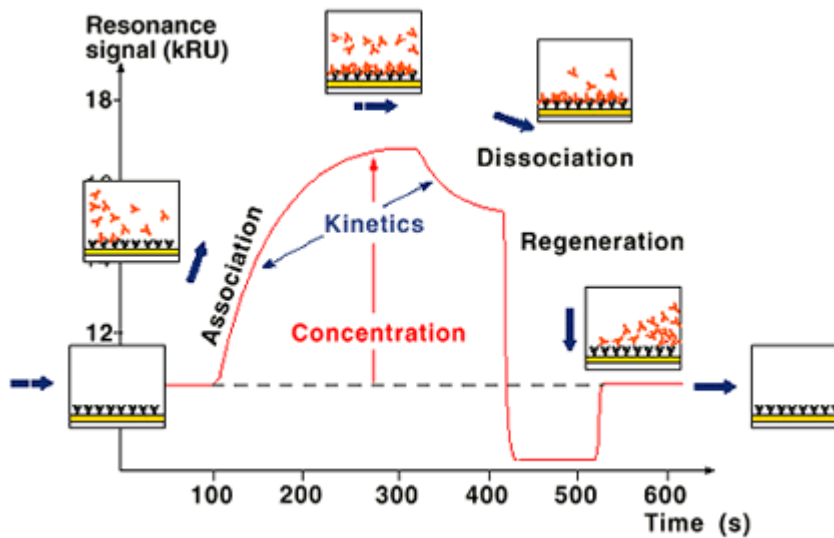


Abbildung 2.14: Schematische Darstellung des Sensogrammes eines BIAcore Gerätes (nach BIAcore, 2000).

Bei dem BIAcore 2000 Gerät ist der Glasträger Teil einer Meßzelle, die als Durchflußkammer konfiguriert ist. Auf dem Glasträger oder auch „Sensochip“ wird ein Substrat immobilisiert, das eine Affinität zu dem zu untersuchenden Analyten besitzt.

2.6.13.2 Physikalische Grundlagen der SPR

Im Folgenden sollen nun die physikalische Grundlagen der Meßtechnik beschrieben werden.

Die SPR Sensortechnik basiert auf Phänomenen bei der Totalreflektion von Licht, die bei dem Übergang von einem optisch dichteren (hier der Glasträger) in ein optisch dünneres Medium (hier die flüssige Phase) auftreten, wenn ein kritischer Einfallswinkel überschritten wird. Abweichend von der klassischen Optik gibt es trotz der Totalreflektion des Lichtstrahls ein elektromagnetisches Feld außerhalb des optisch dichteren Mediums. Die Intensität des totalreflektierten Lichtstrahls ist an der Oberfläche im optisch dünneren Medium nicht sofort gleich Null, sondern dringt bis zu einer Tiefe von ca. $1/4$ der Wellenlänge des verwendeten Lichtes in das angrenzende, optisch dünnere Medium ein. Manchmal wird dieser Effekt als optisches Tunneln beschrieben. Ist das angrenzende Medium eine Goldschicht, wird diese von dem elektromagnetischen Feld durchdrungen, und unter genau definierten Bedingungen kommt es zu einer Interaktion mit den Elektronen im Metall; Licht wird absorbiert und ein Surface Plasmon (ein Quantenobjekt, das nur mit diskreten, erlaubten Energiewerten existiert) wird angeregt (Elektronen Dichte-Welle).

Das erzeugte Plasmon oder auch Plasmaschwingungsquant ist wiederum von einem elektromagnetischen Feld begleitet, der sogenannten „evaneszierenden Welle“, die eine gewisse Ausdehnung auch in den Raum jenseits der Goldschicht hat. Kommt

es nun unter genau definierten Bedingungen zu einer evaneszierenden Welle, geht dem reflektierten Laserlicht Energie verloren, was sich in einem Intensitätsminimum niederschlägt.

Die physikalische Theorie der Fortpflanzung von Licht in einem Material beinhaltet nun Terme, die auch in der optischen Dichte des Materials eine Rolle spielen. So kommt es dazu, daß die Plasmon Resonanz von den gleichen Termen abhängt, wie die optische Dichte der involvierten Materialien. Eine Änderung in der Massenkonzentration und damit in der optischen Dichte der flüssigen Phase kann somit in einer Änderung des Lichtausfallwinkels β_{SPR} nach der Totalreflektion, bei dem ein Intensitätsminimum auftritt, beobachtet werden. Eine Beladung des Glaträgers mit 1 ng/mm^2 Protein und die damit verbundene Änderung in der optischen Dichte resultieren in einer Verschiebung von ca. $0,12^\circ$ im Winkel des Intensitätsminimums.

2.6.13.3 Lösungen und Reagenzien

HEPES Laufpuffer: 10 mM HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanschwefelsäure, Roth, Karlsruhe), 150 mM NaCl, 0,02 % NaN_3 in Milli-Q Wasser.

Gangliosid Stammlösungen: 1 mg/ml Gangliosid in Ethanol/Methanol (9/1, v/v). Vor dem Gebrauch 1 min mit Ultraschall behandeln.

R24 Antikörperlösungen: Die Protein A gereinigten Antikörperproben wurden gegen Laufpuffer dialysierten und auf Konzentrationen von 70 bis 490 nM eingestellt.

2.6.13.4 Durchführung

Die Biosensor-Analyse der R24 Antikörper erfolgte mit $G_{\text{D}3}$, das über hydrophobe Wechselwirkungen auf der Oberfläche eines CM5 Sensorchips, der mit Carboxymethyl-dextran belegt war, immobilisiert wurde [19]. Um in den Sensogrammen Detektorsignale durch unspezifische Bindungen und „bulk“ Effekte, die sich z.B. aus Wechselwirkungen mit Salzen ergeben, zu eliminieren, wurde von dem $G_{\text{D}3}$ Meßsignal der Wert von einer mit $G_{\text{M}1}$ beladenen Meßzelle subtrahiert.

Nach dem Durchlauf der Probelösung mit dem Analyten (R24 Antikörper) floß der reine Laufpuffer durch die Durchflußkammer, was eine Reduzierung der Konzentration des Analyten auf praktisch Null zur Folge hatte. Unter diesen Bedingungen kam es zur Dissoziation des an den Sensorchip gebundenen Analyten aus der die Dissoziationskonstante der Bindung berechnet werden konnte.

Die Gangliosid-Stammlösung wurde 1/3 (v/v) mit HEPES Laufpuffer verdünnt und anschließend 3 min mit Ultraschall behandelt. Zur Immobilisierung wurden $60 \mu\text{l}$ so hergestellter Glykolipidmischung mit einer Flußrate von $5 \mu\text{l}/\text{min}$ über die entsprechende Meßkammer auf dem Sensorchip gepumpt. Alle Operationen bei der

Messung, Regeneration usw. wurden in der Versuchsreihe mit einer festen Flußrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ durchgeführt. Nach der Aufgabe der Glykolipide wurde vier mal mit 20 μl 10 mM NaOH gewaschen, so daß ein stabiles Detektorsignal (Basislinie) entstand.

Die vier Meßkammern des CM5 Sensorchip wurden wie folgt mit Glykolipiden belegt:

Meßkammer 1: Als Referenz nicht mit Glykolipiden belegt.

Meßkammer 2: G_{D3} (SEK02/88-4)

Meßkammer 3: G_{MI} aus Rind (Pallmann, München).

Meßkammer 4: Gangliosidmischung aus Buttermilch (SEK02/88-5)

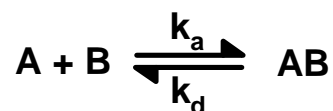
Bei der Messung der Bindungswechselwirkungen wurden die Meßkammern nacheinander in der Reihenfolge 1 - 2 - 3 - 4 von R24 Antikörperlösung durchströmt. Dabei wurde mit je 30 μl Probevolumen über eine Meßzeit von 360 s die Assoziation bestimmt. Die Dissoziation wurde über weitere 360 s bestimmt. Nach jedem Meßzyklus wurde mit 20 μl 10 mM NaOH gewaschen, was die restlichen gebundenen R24 Antikörpermoleküle entfernte.

Zur Regeneration des CM5 Sensorchips vor einer Neubelegung mit Gangliosiden wurde dieser nacheinander mit je 50 μl 20% n-Propanol, 50 % iso-Propanol und vier mal mit 50 % Methanol in Wasser bei einer Flußrate von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ gewaschen.

Alle Tests der Serie wurden mit einer Belegung an Gangliosiden durchgeführt, um den Einfluß durch unterschiedliche Belegungsmengen auszuschließen. Im Laufe der Testserie war kein „shift“ in der Basislinie festzustellen, so daß von einer gleichbleibenden Belegung an Gangliosiden ausgegangen werden konnte.

2.6.13.5 Kinetische Analyse der Bindungsstudien

Zur kinetischen Analyse der aufgenommenen Sensogramme wurde das einfache Bindungsmodell



herangezogen, wobei [A] der Konzentration des immobilisierten Gangliosid, [B] der des Analyten, k_a der Assoziations- und k_d der Dissoziationskonstante entsprechen. [AB] kann in dem verwendeten Biosensorsystem als Konzentration an gebundenem Liegenden interpretiert werden.

Die zur Auswertung der Kinetik herangezogenen Geschwindigkeitsgesetze lauten dabei wie folgt [88]:

Für die Assoziation:

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a[A][B] - k_d[AB] \quad (2.8)$$

Mit den Annahmen für das SPR Signal (R) [77]:

$$[AB] \cong R_A, \quad [B] \cong R_{\max} - R_A, \quad \text{und} \quad [A] = C \quad (2.9)$$

kann Gleichung 2.8 mit Termen des SPR Signals ausgedrückt werden als:

$$\frac{dR}{dt} = k_a C R_{\max} - (k_a C + k_d) R_a \quad (2.10)$$

Eine Lösung der obigen Differentialgleichung ist:

$$R_a = (1 - e^{-(k_a C + k_d)t}) \frac{k_a C R_{\max}}{k_a C + k_d} \quad (2.11)$$

Für die Dissoziation in der Situation, daß nach der Injektion von R24 Antikörpern nur noch Laufpuffer über die Meßkammern gepumpt wird, und so $[B] = 0$ gesetzt werden kann, gilt:

$$\frac{d[AB]}{dt} = -k_d[AB] \quad (2.12)$$

die als Lösung mit Termen des SPR Signals

$$R_a = R_0 e^{-k_d(t-t_0)} \quad (2.13)$$

hat.

Die Auswertung der Sensogramme geschah computergestützt mit dem Programm BIAevaluation (Version 3.1, BIAcore AB, Uppsala, Schweden) nach dem oben beschriebenen Modell, indem zunächst nach Gleichung 2.13 die Dissoziationskonstante k_d ermittelt wurde. Diese wurde dann eingesetzt, um separat die Assoziationskonstante k_a nach Gleichung 2.11 zu ermitteln. Die Bindungskonstante K_A ist der Quotient $\frac{k_a}{k_d}$.

2.7 Isolierung, Aufreinigung und Charakterisierung des Gangliosids G_{D3}

Um neben der quantitativen Bestimmung der produzierten R24 IgG-Antikörper auch Aussagen über deren Aktivität machen zu können, war es notwendig, das spezifische Antigen des Antikörpers zu isolieren. Als Ausgangsmaterial für die Isolierung des Gangliosids G_{D3} , wurde Buttermilch verwendet.

2.7.1 Isolierung von Gangliosiden aus Buttermilch

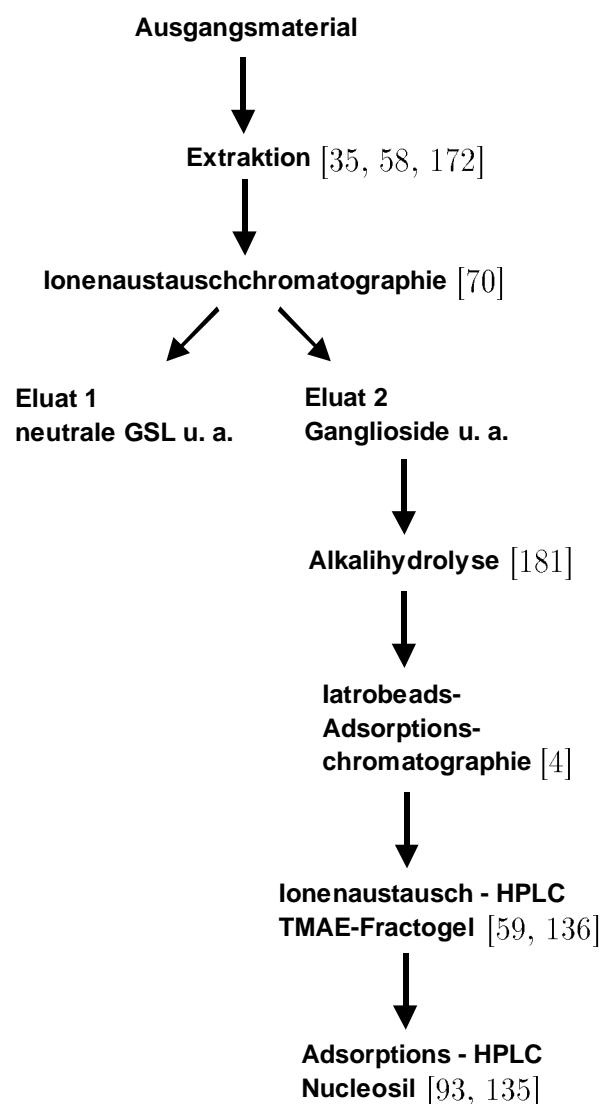


Abbildung 2.15: Schematische Darstellung der Isolierung von Gangliosiden. Die zwischen den einzelnen Isolierungsschritten erfolgte Entsalzung ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht mit aufgeführt worden (nach Heitmann et al.(1998)).

Die Gewinnung der GSL aus biologischem Material erfolgt gewöhnlich durch Extraktion unter Verwendung verschiedener Lösungsmittelgemische, die meist Chloroform, Methanol und Wasser enthalten [93]. Zur weiteren Aufreinigung werden dann häufig säulenchromatographische Verfahren wie die Ionenaustauschchromatographie verwendet [130, 136]. Eine Methode zur Analytik und Isolierung hochreiner Ganglioside ist die Trennung mittels präparativer HPTLC [129, 132, 133].

Das Schema der Isolierung ist in Abbildung 2.15 aufgezeigt.

In dieser Arbeit wurde mir von Herrn Dr. J. Müthing eine Gangliosid-Präparation (HD02/225-2) zur Verfügung gestellt, mit der die Aufreinigungskaskade (vergleiche Abb. 2.15) bis zur Iatrobeads-Adsorptions-Chromatographie nach Standardmethoden durchgeführt worden war [93]. Zur Reindarstellung mußte noch eine präparative Ionenaustausch- und Kieselgel-HPLC durchgeführt werden.

2.7.2 Präparative HPLC

Um aus Gangliosidmischungen definierte, saubere Einzelsubstanzen zu erhalten, wurde zur weiteren Aufarbeitung die präparative HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) verwendet. Die HPLC-Anlage (Gilson Abimed, Langenfeld) bestand aus drei M303 HPLC-Pumpen und dem Hochdruckmischer M811. Die Steuerung erfolgte über einen Computer mit 715 HPLC Controller (Version 1.20), der mittels Interface an die einzelnen Komponenten angeschlossen war. Für die präparative Trennung wurde der Fraktionssammler M202 verwendet. Das Probeaufgabeventil war ein Rheodyne 7125, an das eine 5 ml Probenschleife angeschlossen war.

2.7.2.1 TMAE-Fractogel Anionenaustauschchromatographie

Bei dem TMAE-Fractogel Säulenmaterial erfolgt die Trennung der Ganglioside hauptsächlich in Abhängigkeit vom Sialylierungsgrad der Ganglioside [59, 136].

Die Chromatographie wurde mit Superformance-Glaskartuschen der Größe 150 mm x 10 mm (ca. 12 ml Volumen, Merck, Darmstadt) durchgeführt. Das Säulenmaterial Fractogel EMD TMAE (Trimethylaminoethyl) - 650(s) ist ein starker Ionenaustauscher, dessen Ladungszustand über einen weiten pH-Bereich stabil bleibt. Die hydrophile Fractogel Matrix ist ein Copolymerisat mit einer Korngröße von 25 - 40 μm , das sich durch eine hohe mechanische Stabilität auszeichnet. Die TMAE-Austauschergruppen sind durch tentakelartige Polymerketten mit der porösen, sphärischen Gelmatrix verbunden.

Die Flußrate bei allen Äquilibrierungs-, Trennungs- und Waschschritten betrug 0,5 ml/min. Durch Spülen mit Wasser, Tris-Puffer (0,2 M Tris; 0,5 M NaCl; pH 8,5), Wasser, 1 M Essigsäure, Wasser und Methanol wurde das Material in dieser Reihenfolge in die Acetatform überführt. Nach der Äquilibrierung mit Chloroform/Methanol/Wasser (30/60/8, v/v/v) wurde das Gangliosidgemisch in Äquilibrierungslösung in 4 ml Portionen auf die Säule aufgegeben. Die Trennung erfolgte

mittels eines Ammoniumacetat Gradienten wie in Tabelle 2.4 beschrieben.

Tabelle 2.4: Spül- und Elutionsprogramm der TMAE-Fractogel Anionenaustauscher HPLC.

Zeit [min]	Fluß [ml/min]	A ^a [%]	B ^b [%]	C ^c [%]
0	0,0	100	0	0
3	0,5	100	0	0
210	0,5	100	0	0
220	0,5	0	100	0
247	0,5	0	100	0
490	0,5	0	0	100
546	0,5	0	0	100
557	0,0	0	0	100

^a Prozentualer Anteil der Pumpen an der Gesamtflußrate; Solvent: Chloroform/Methanol/Wasser (30/60/8, v/v/v)

^b Prozentualer Anteil der Pumpen an der Gesamtflußrate; Solvent: Methanol

^c Prozentualer Anteil der Pumpen an der Gesamtflußrate; Solvent: 1 M Ammoniumacetat in Methanol

In der Zeit bis zu $t = 210$ min erfolgte die Probenaufgabe, bis zu $t = 247$ min wurde mit Methanol gewaschen und ab $t = 247$ min bis $t = 490$ min wurde mittels einer linearen Zunahme an Ammoniumacetat im Elutionssolvent eluiert. Es wurden je 1,5 ml-Fractionen im Fraktionensammler aufgefangen.

Nach dem Lauf wurde die Säule wie oben beschrieben gespült und regeneriert. Aliquots der Fractionen wurden dünn-schichtchromatographisch untersucht, entsprechend ihrer Zusammensetzung vereinigt und über Dialyse entsalzt.

2.7.2.2 Entsatzung

In wässrigen Lösungen bilden amphiphile Moleküle wie Glykolipide, wenn sie eine kritische Konzentration, die CMC (Critical Micelle Concentration), überschreiten Mizellen aus, die so groß sind, daß sie nicht durch Dialysemembranen wandern können. So ist es möglich, Glykolipidmischungen mittels Dialyse zu entsalzen [75]. Zur Dialyse wurden Dialyseschläuche mit einer Ausschlußgrenze von 12 - 14 kDa (Medicell International, Liverpool, Großbritannien) verwendet. Es wurde gegen $+4^{\circ}\text{C}$ kaltes MilliQ-Wasser, das zur vollständigen Entsatzung mehrfach gewechselt wurde, im 5-l-Becherglas unter Rühren dialysiert. Die Wasserentfernung aus dem Dialysat fand durch Gefriertrocknung (Gefriertrocknungsanlage Lyovac GT2, Leybold-Heraeus, Hannover) statt.

2.7.2.3 Nucleosil Adsorptionschromatographie

Bei dieser Normalphasen-HPLC fand eine 250 mm x 20 mm-Kieselgelsäule (Nucleosil 50-7, Macherey-Nagel, Düren) Verwendung [93, 135]. Vor dem Trennlauf wurde die Säule mit Chloroform und Methanol gespült und anschließend mit Chloroform/Methanol (85/15, v/v) äquilibriert. Die Trennung erfolgte mittels eines Chloroform/Methanol Gradienten wie in Tabelle 2.5 beschrieben.

In der Zeit bis zu $t = 30$ min erfolgte die Probenaufgabe, ab $t = 30$ min bis zu $t = 110$ min wurde mittels linearem Gradienten die Polarität des Laufmittels erhöht. Es wurden je 2 ml-Fractionen im Fraktionssammler aufgefangen.

Die Fraktionen wurden dünn-schichtchromatographisch untersucht und entsprechend ihrer Zusammensetzung vereinigt.

Tabelle 2.5: Elutionsprogramm der Nucleosil Adsorptions HPLC.

Zeit [min]	Fluß [ml/min]	A ^a [%]	B ^b [%]
0	0,0	85	15
2	4	85	15
30	4	85	15
110	4	0	100
140	0	0	100

^a Prozentualer Anteil der Pumpen an der Gesamtflußrate; Solvent: Chloroform

^b Prozentualer Anteil der Pumpen an der Gesamtflußrate; Solvent: Methanol

2.8 Glykosphingolipidanalytik

Die mit am häufigsten angewendeten Verfahren zur Strukturaufklärung im Bereich der GSL sind dünn-schichtchromatographische Methoden wie die HPTLC (High-Performance Thin-Layer Chromatography) und die Overlay-Technik, einem ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) auf einer entwickelten HPTLC-Platte. Auch entwickeln sich die Techniken der HPLC und der Massenspektrometrie [115, 149] immer mehr zu Standardmethoden in der Glykolipidanalytik.

2.8.1 Analytische Trennung durch Hochleistungs-Dünn-schichtchromatographie (HPTLC)

Bei HPTLC werden mit Kieselgel beschichtete Glasplatten zur Trennung von Stoffgemischen eingesetzt. Das der Dünn-schichtchromatographie zugrundeliegende Trennprinzip basiert auf den unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten der zu

trennenden Einzelkomponenten zwischen der Fest- (Kieselgel) und der Flüssigphase (Laufmittel). Zur Trennung von GSL-Gemischen [130] wurde im Rahmen dieser Arbeit das Prinzip der aufsteigenden Chromatographie verwendet. Die dünn-schichtchromatographische Trennung der GSL wurde zur Überprüfung der Aufreinigungsschritte bei der Isolierung und weiteren analytischen Fragestellungen verwendet [128, 129]. Alle Verhältnisangaben der Laufmittelzusammensetzungen in diesem Kapitel beziehen sich auf das Volumen der Einzelkomponenten.

2.8.1.1 Chromatographieplatten

Für die analytischen HPTLC wurden HPTLC-Fertigplatten der Firma Merck (10 cm x 10 cm, Kieselgel 60, Schichtdicke 0,2 mm) verwendet. Vor dem Gebrauch wurden diese durch 60 min Erhitzen auf 110°C im Trockenschrank aktiviert (getrocknet) und anschließend über Blaugel und Phosphorpentoxid im Exsikkator bei RT gelagert.

2.8.1.2 Auftragung der Proben auf die Platten

Alle Proben wurden mittels des automatischen Probenaufgebers Linomat IV (Cama-g, Muttenz, Schweiz) auf die HPTLC-Platten aufgetragen. Zu analytischen Zwecken wurden Banden von 4 mm Breite (bei geringen Probemengen 4 mm Bandenbreite) und einem Auftragungsfluß von ca. 0,1 $\mu\text{l}/\text{sec}$ beginnend in einem Abstand von 10 mm vom Plattenrand gewählt.

Die aufgetragenen Mengen an Gangliosiden betragen etwa 1 $\mu\text{g}/\text{mm}$ Bandenbreite bei aufgereinigten Einzelsubstanzen und ca. 5 $\mu\text{g}/\text{mm}$ Bandenbreite für Substanzgemische.

2.8.1.3 Entwicklung der Chromatogramme (Laufmittel)

Die HPTLC-Platten wurden 25 - 30 min in einer mit Filterpapier (3MM Chr, Waterman, Maidstone, England) bestückten und äquilibrierten Chromatographiekammer (Desaga, Heidelberg) entwickelt.

Als Laufmittel für maximal 10 Entwicklungen wurden jeweils 100 ml folgender Lösungsmittelgemische verwendet:

Laufmittel 1: Chloroform/Methanol/Wasser (120/70/17), 20 mM CaCl_2 .

Dieses Laufmittel ist gut geeignet zur Auftrennung neutraler Glykosphingolipidstrukturen, die ein bis fünf Neutralzucker aufweisen.

Laufmittel 2: Chloroform/Methanol/Wasser (120/85/20), 20 mM CaCl_2 .

Das polarere Gemisch eignet sich besser zur Auftrennung langkettiger neutraler GSL und negativ geladener Ganglioside.

Laufmittel 3: Chloroform/Methanol/2,5 M NH_4OH in Wasser (120/85/20), 20 mM CaCl_2 . Das alkalische Laufmittel ist speziell für die Trennung von Neu5Ac und Neu5Gc substituierter Ganglioside geeignet.

2.8.2 Analytische Detektion mittels Orcin- und Resorcin-Färbung

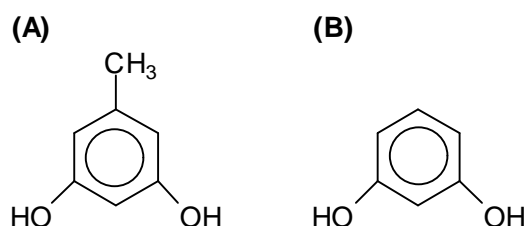


Abbildung 2.16: (A) Orcin; 3,5-Dihydroxy-toluol; $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$; FW = 124,16. (B) Resorcin (Resorcinol); 1,3-Dihydroxy-benzol; $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$; FW = 110,11.

Beide Farbstoffe wurden als Sprühreagenzien eingesetzt. Orcin ist ein generelles Zuckerfärbereagenz [181]. Resorcin hingegen färbt spezifisch Sialinsäuren an [184].

Orcinfärbung: Die Platte wurde mit einer 0,2 %igen Orcinlösung in $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$ (3/1) besprüht und ca. 15 min bei 100°C entwickelt. Neutrale GSL und Ganglioside liefern rotviolette Banden.

Resorcinfärbung: Die Platte wurde mit einer 0,2 %igen Resorcinlösung in $\text{H}_2\text{O}/\text{HCl}_{\text{konz}}$ (2/8, v/v) mit 0,25 ml 0,1 M CuSO_4 in Wasser auf 100 ml besprüht und ca. 30 min bei 100°C entwickelt. Dabei wurde die besprühte Platte mit einer Glasplatte abgedeckt, um ein Austrocknen zu verhindern. Ganglioside ergeben charakteristische blauviolette Banden.

2.8.3 Immunologischer Nachweis von $\text{G}_{\text{D}3}$ mittels Overlay-Technik

Ein relativ einfaches und sehr spezifisches Verfahren zum Nachweis bestimmter GSL-Strukturen ist mit der Overlay-Technik [105] gegeben. Hierbei handelt es sich um einen ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), der auf einer entwickelten HPTLC-Platte durchgeführt wird [106, 134].

Da der Overlay-Test mit wässrigen Medien durchgeführt werden muß, die Kieselgel-DC-Platten aber nicht wasserbeständig sind, fixiert man das Kieselgel nach der

Chromatographie mit einem Kunststoff (Plexigum P28, ein Polyisobutylmethacrylat, Röhm). Die Vorteile dieser Nachweisttechnik liegen in ihrer hohen Spezifität und Empfindlichkeit.

Zum Nachweis wird zunächst ein Antikörper, der gegen eine spezifische Oligosaccharidstruktur gerichtet ist, auf die chromatographierte HPTLC-Platte gegeben. Zur Detektion des gebundenen Antikörpers (Primärantikörper) wird ein zweiter Antikörper (Sekundärantikörper), der gegen die Immunglobulinstruktur des Primärantikörpers gerichtet und mit alkalischer Phosphatase gekoppelt ist, auf die Platte gegeben. Es können auch andere Nachweissysteme verwendet werden, wie z.B. Fluorochrom oder Peroxidase gekoppelte Antikörper, die jedoch durch Azid gehemmt werden können.

Die Bindung des sekundären Antikörpers wird über ein Substrat auf der Platte nachgewiesen, welches von der alkalischen Phosphatase zu einem unlöslichen farbigen Produkt umgesetzt wird, wodurch das zu detektierende GSL sichtbar wird. Der Overlay-Test erfolgt in speziellen Kammern mit 40 ml Überschichtungsvolumen.

Lösungen und Reagenzien

Plexigumlösung: gesättigte Lösung durch zweistündiges Rühren von einem Überschuß Plexigum in n-Hexan

CMF-PBS: 8,0 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 1,15 g/l Na₂HPO₄; 0,2 g/l KH₂PO₄ in Wasser, pH 7,2

Absättiger: CMF-PBS mit 1% Rinderserumalbumin und 0,02% NaN₃ (v/w/w/)

Waschpuffer: CMF-PBS mit 0,05% Tween 21 und 0,02% NaN₃ (v/v/w)

Primärantikörperlösung: in 40 ml Absättiger werden 40 µg R24 Antikörper gelöst.

Sekundärantikörperlösung: in 40 ml Absättiger werden 40 µl Ziege-anti-Maus IgG, das mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist (Alkaline Phosphatase-conjugated AffiniPure goat anti-mouse IgG + IgM (H & L), Dianova, Hamburg), gelöst.

Glycinpuffer: 0,1 M Glycin; 1 mM ZnCl₂; und 1 mM MgCl₂ in Wasser; pH 10,4

BCIP-Färbelösung: 0,05% (w/v) BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat, Roth, Karlsruhe) in Glycinpuffer

Gangliosid Ausgangsmaterial: Anreicherung von Gangliosiden aus Buttermilch, HD02/255-2

Referenzgangliosidmischung: Gangliosidmischung aus humanem Hirn, HD02/113a

Durchführung

1. **Chromatographie:** HPTLC der GSL-Mischung
2. **Trocknung:** HPTLC-Platte für 1 h im Exsikkator unter Ölpumpenvakuum über P_2O_5
3. **Kunststoffbeschichtung:** Beschichtung der HPTLC-Platte erfolgte in mit Plexigum P28 gesättigter Hexanlösung.
4. **ELISA:**
 - (a) **Absättigen:** 15 minütige Inkubation mit Absättiger
 - (b) **Primärantikörper:** Absaugen des Absättigers und Inkubation mit Primärantikörperlösung, Inkubationszeit 1 h
 - (c) **Waschen:** Absaugen des Puffers und viermaliges Waschen mit Waschpuffer
 - (d) **Sekundärantikörper:** 1 h Inkubation mit Sekundärantikörperlösung
 - (e) **Waschen:** Absaugen der Sekundärantikörperlösung und viermaliges Waschen mit Waschpuffer und einmal mit Glycinpuffer
 - (f) **Substrat:** Überschichten mit BCIP-Färbelösung, Inkubation bis die Banden deutlich sichtbar sind
 - (g) **Trocknen:** Absaugen der Färbelösung, waschen mit Glycinpuffer und die Platte bei Raumtemperatur trocknen

2.8.4 Photometrische Bestimmung des lipidgebundenen Sialinsäuregehaltes

Die Bestimmung des Sialinsäuregehaltes von Gangliosidmischungen erfolgte photometrisch nach Umsetzung mit Resorcin [184].

Die zur Trockene eingeeengte Gangliosidprobe wurde in 0,5 ml H_2O aufgenommen und 3 min im Ultraschallbad beschallt. Nach der Zugabe von 0,5 ml Resorcin-Reagenz wurde 15 min bei $100^\circ C$ inkubiert. Die Reaktion wurde durch 10 min Inkubation bei $0^\circ C$ gestoppt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 2 ml Butylacetat/n-Butanol (85/15, v/v) extrahiert. Die Phasentrennung erfolgte bei 3 min Zentrifugation bei 2000 g. Der Sialinsäuregehalt der Oberphase wurde photometrisch bei 580 nm (Uvikon Spektrometer, Kontron Instruments, Neufahrn) im Vergleich zu Referenzen (Neu5Ac, Neu5Gc, Sigma, Deisenhofen) bestimmt.

Resorcin-Reagenz: 10 ml 2% (w/v) Resorcin (Sigma, Deisenhofen) in H_2O plus 0,25 ml 0,1 M $CuSO_4$ in H_2O und 80 ml konz. HCl

Alternativ wurde die Sialinsäurekonzentration und -zusammensetzung auch mittels HPLC ermittelt (siehe 2.6.9).

Kapitel 3

Ergebnisse und Diskussion

3.1 Kultivierung der Zelllinie HB-8445

Die Kultivierung der den R24 Antikörper produzierenden Zelllinie HB-8445 gliedert sich in drei aufeinanderfolgende Abschnitte.

Zuerst wurde die Zelllinie, die nach Empfehlung der ATTC in Medium mit 10 % FCS Anteil kultiviert werden soll, an serumfreie Kulturbedingungen adaptiert, um eine spätere Aufreinigung des Produktes zu vereinfachen. Die Adaptierung erfolgte dabei im Spinner Kultursystem.

Im nächsten Abschnitt wurden im SuperSpinner-System das Wachstums- und Produktionsverhalten der Zelllinie bei veränderten Albumin- und CO_2 -Konzentrationen und in der Langzeitkultivierung untersucht. Zudem wurde in diesem Abschnitt eine Produktionszellbank angelegt. Sie diene als Rücklage für einheitliches Zellmaterial, auf das zurückgegriffen wurde, um eine reproduzierbare Produktion des Antikörpers R24 zu ermöglichen.

Im dritten Abschnitt wurde der R24 Antikörper unter definierten Kulturbedingungen im 2-Liter-Bioreaktor in einem unregulierten HEPES-Puffersystem und in geregelten $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Puffersystemen mit den pH-Werten 7,4; 7,2 und 6,9 produziert.

3.1.1 Adaption an serumfreie Bedingungen

3.1.1.1 Kultivierung in serumhaltigem Kulturmedium

Die Zelllinie HB-8445 wurde zunächst in serumhaltigem Medium (siehe 2.1.2.1) entsprechend der Empfehlung der ATTC kultiviert. Zur Vermeidung von Mykoplasmenkontaminationen wurden dem Medium 10 mg/ml Ciprofloxacin zugesetzt.

Als Kultursysteme dienten dabei 25 cm^2 und 80 cm^2 Kulturflaschen aus klarem Polystyrol (Nunc, Wiesbaden). Die Inkubation der oberflächenbegasteten Systeme in Brutschränken erfolgte bei 37°C und einer CO_2 -Begasung von 5 %.

Bei einem DAPI-DNA-Färbetest (siehe 2.3.1.7) konnten keine Mykoplasmen detektiert werden.

Zur Ermittlung des Wachstumsverhaltens und der Nährstoffansprüche der Zellen unter diesen Standardkulturbedingungen wurden in einer 80 cm² Kulturflasche die Lebendzell- und Totzell- sowie Glukose-, Laktat- und Aminosäurekonzentration über den gesamten Kulturverlauf ermittelt. Die Einsaatdichte betrug 2×10^5 Zellen/ml. Nach einer Lagphase von 30 h schloß sich eine exponentielle Wachstumsphase mit einer Wachstumsrate μ von 1.0/d bis zu einer Zelldichte von $1,4 \times 10^6$ nach 126 h an. Ohne eine ausgeprägte stationäre Phase ging die Kultur nach Erreichen der maximalen Zellzahl direkt in die Absterbephase über. Der Grund hierfür war ein Mangel an Glutamin. Das Aminosäureprofil zeigte an dem Punkt des Überganges von der Wachstumsphase in die Absterbephase einen vollständigen Verbrauch des Glutamins an. Auch Leucin, Isoleucin und Valin wurden von den Zellen stark verbraucht und waren zu Beginn der Absterbephase nur noch in geringen Konzentrationen (15 μ M und weniger) vorhanden. Bei der Kultivierung in der Zellkulturflasche unter serumhaltigen Bedingungen wurde eine maximale Konzentration von 15 mg/l Maus IgG Antikörper zu Beginn der Absterbephase erzielt.

3.1.1.2 Kultivierung im serumreduzierten und serumfreien Kulturmedium

Um die Zelllinie HB-8445 an serumfreie Kulturbedingungen zu adaptieren, wurden parallel zwei unterschiedliche Strategien verfolgt: zum einen die schrittweise Reduzierung des Serumanteils am Kulturmedium und zum anderen der sofortige gänzliche Verzicht auf Serum. Als Basalmedium wurde dabei serumfreies Medium (wie unter 2.1.2.2 beschrieben) verwendet. Das von der ATTC empfohlene RPMI 1640 Medium wurde zu 20% mit einer 1:1 Mischung aus Dulbecco's MEM und Nutrient Mix F12 supplementiert. Dadurch wurden die Konzentrationen der Aminosäuren wie L-Isoleucin, L-Leucin, L-Valin und L-Glutamin erhöht, die ansonsten durch ihre Verknappung während der Kultivierung zu limitierenden Faktoren würden. Dem Basalmedium wurden die Proteine Humantransferrin, Rinderinsulin, humanes Serumalbumin (HSA) und als anorganischer Bestandteil Selenit zugegeben. Ab einem Serumgehalt von weniger als 5% wurde die Serumreduzierung durch Zusatz von 3 g/l HSA kompensiert, was für die Zellen günstigere Kulturbedingungen bewirken sollte.

Die Kultivierung bei erniedrigten Serumkonzentrationen bis zum vollständigen Serumentzug erfolgte zunächst im statischen System in 80 cm² Polystyrol Kulturflaschen. Mit diesem Kultursystem konnte keine Adaption an serumfreie Bedingungen erreicht werden. Bei einer schrittweisen Reduzierung der Serumkonzentration konnten die Zellen an eine Minimalkonzentration von 2,5% Serum im Medium adaptiert werden. Bei einer Serumkonzentration von 1% war eine Kultivierung nur bei einer Einsaatdichte von mehr als 3×10^5 Zellen/ml möglich. Die maximal erreichte Zelldichte betrug unter diesen Bedingungen $5,5 \times 10^5$ Zellen/ml. Die bei der Antikörperaufar-

beitung störenden restlichen 1 % Serum und die unzureichende maximale Zelldichte ließen bei einer Maßstabsvergrößerung keine zufriedenstellenden Ergebnisse erwarten. Eine weitere Reduzierung des Serumgehaltes auf 0 % führte zum Absterben der gesamten Kultur binnen 48 h. Auch eine Supplementierung mit 200 μ M Ethanolamin und 1 ml/l ExCyte 3, einem Lipidextrakt aus Rinderserum, erbrachte in diesem System keine Verbesserungen.

Bei der sofortigen Serumreduktion auf 0 % bei einer Einsaatdichte von 1×10^6 Zellen/ml betrug die Viabilität nach 6 Tagen weniger als 5 %. Eine Adaption an serumfreie Bedingungen konnte auch mit dieser Strategie nicht erzielt werden.

Erst bei einer Kultivierung im gerührten Spinner-System konnte in einem Zeitraum von 30 Tagen eine schrittweise Adaption an serumfreie Kulturbedingungen erreicht werden. Die Serumkonzentrationen der einzelnen Schritte betrugen dabei 10%, 5%, 2,5%, 1% und 0 %. Dabei wurde die entsprechend nächste Erniedrigung der Serumkonzentration vorgenommen, wenn sich die Zellen bei der gegebenen Serumkonzentration in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Die serumfrei adaptierte Kultur wies ein μ von 0,47/d auf. Die Wachstumsrate der serumfrei wachsenden Zellen nahm im Laufe der Kulturdauer zu, so daß nach weiteren 10 Passagen ein μ von 0,7 erreicht wurde.

3.1.1.3 Zusammenfassung und Diskussion

Die Zelllinie HB-8445 konnte im gerührten Spinner-System erfolgreich an serumfreie Kulturbedingungen adaptiert werden. Dem Basalmedium wurden dabei als Proteinbestandteile Humantransferrin, Rinderinsulin und HSA und als anorganischer Bestandteil Selenit zugefügt. Im Verlauf einer Repeated-Batch-Kultivierung von 10 Passagen im Spinner stieg die spezifische Wachstumsrate μ von anfänglich 0,47 auf 0,7 an.

Im statischen System einer Polystyrol Kulturflasche war diese Adaption an serumfreie Kulturbedingungen nicht möglich. Unter diesen Bedingungen mußte ein Mindestanteil von 2,5% Serum im Medium vorhanden sein, damit die Zelllinie eine annähernd exponentielle Wachstumsphase aufwies.

3.1.2 Kultivierung der HB-8445 Zelllinie im SuperSpinner-System unter serumfreien Bedingungen

Im Rahmen einer Maßstabsvergrößerung wurde zur Produktion von monoklonalen R24 Antikörpern als erstes das nach dem Spinner nächst größere Kultivierungssystem, der SuperSpinner, gewählt. Die Kultivierung fand unter serumfreien Bedingungen mit den entsprechend adaptierten Zellen statt (siehe Kap. 3.1.1.2). Während der SuperSpinner-Kultivierung wurde das Verhalten der Zelllinie auf die Veränderung der Serumalbuminkonzentration im Medium und des CO_2 -Anteils in der Begasungsluft untersucht. Die für die Adaption an serumfreie Kulturbedingungen gewählte HSA-

Konzentration von 3 g/l stellt eine ungewöhnlich hohe Proteinkonzentration bei der Kultivierung von Hybridomzelllinien dar und sollte für eine Maßstabsvergrößerung erniedrigt werden.

Es wurde für Hybridomzelllinien beschrieben, daß eine Absenkung des pH-Wertes im Medium zu einer verstärkten Produktion von Antikörpern führen kann [57]. Zur Untersuchung, inwiefern dieser Umstand für eine Steigerung der Antikörperproduktion ausgenutzt werden kann, wurde der CO₂-Anteil in der Begasungsluft auf 20 % erhöht, was zu einer Absenkung des pH-Wertes der Kultur führte.

Aus den einzelnen Batches der Kultivierung wurden Zellen kryokonserviert, die anschließend auf ihre Antikörperproduktivität hin untersucht wurden, um möglichst gut geeignetes Zellmaterial zur Produktion von R24 Antikörpern im 2-Liter-Bioreaktormaßstab zu erhalten.

3.1.2.1 Einfluß der HSA-Konzentration und eines erhöhten CO₂-Anteils in der Begasungsluft auf die zellspezifischen Parameter

Zu Beginn der Kultivierung (siehe Abb. 3.1) in der 1-Liter-SuperSpinnerflasche wurde mit einem 20 %-igen CO₂-Anteil in der Begasungsluft und 3 g/l HSA im Medium kultiviert. In den folgenden Batches wurde mit einer HSA-Konzentration von 0,5 g/l und ab Batch III mit einem CO₂-Anteil in der Begasungsluft von 5 % kultiviert. In dem für die gesamte Kultivierung verwendeten Medium waren 2,1 g/l NaHCO₃ enthalten, was bei einer empfohlenen Zumischung von 5 % CO₂ zur Begasungsluft zu einem pH-Wert-Bereich von 7,4 (zu Beginn des Batches) bis 7,0 (zum Ende des Batches) in diesem Medium führte. Bei einer Kultivierung mit 20 % CO₂ war im Vergleich hierzu der pH-Wert der Kultur um ca. 0,3 pH-Werteinheiten zum Säuren verschoben. Unter den sauren Kulturbedingungen bei 20 % CO₂ zeigte die HB-8445 Zelllinie ein geändertes Wachstums- und Produktionsverhalten (siehe Tab. 3.1).

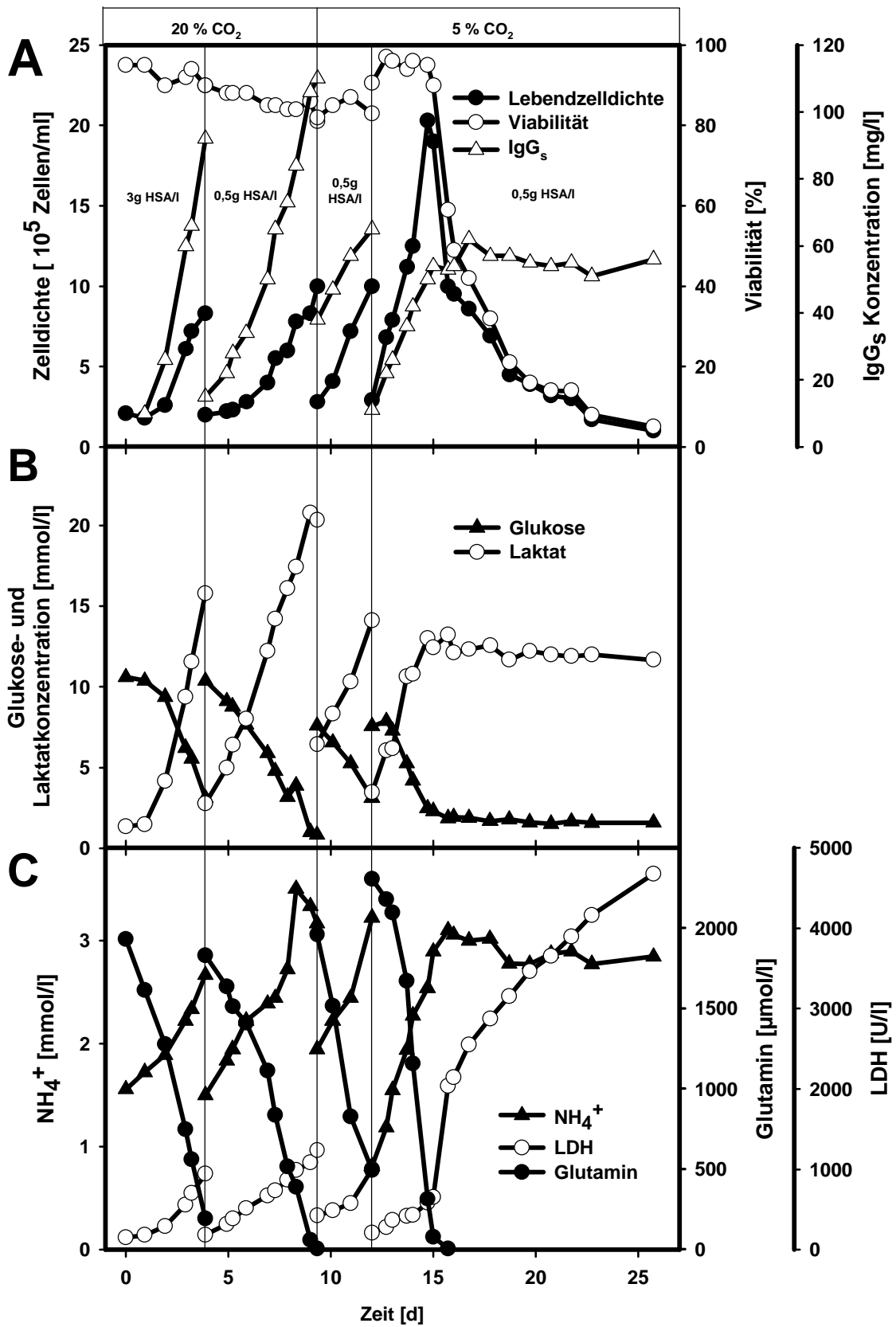


Abbildung 3.1: Zeitlicher Verlauf der Lebendzellzahl, der Viabilität sowie der Kon-

zentration (IgG_S) von Mausantikörpern (**A**), der Konzentrationen von Glukose und Laktat (**B**) und der Konzentrationen von NH_4^+ und Glutamin und die LDH-Aktivität (**C**) im Überstand während vier aufeinanderfolgender satzweiser Prozesse (repeated batch) im 1-Liter-SuperSpinner. Zu den Zeitpunkten $t = 3,8$ d, $9,3$ d und 12 d wurde die Kultur zum Teil abgeerntet und mit frischem Medium aufgefüllt. Im Verlauf der Kultivierung der Zelllinie HB-8445 wurden die HSA-Konzentration im Medium von 3 g/l auf $0,5$ g/l und der Anteil an CO_2 in der Begasungsluft von 20 % auf 5 % verringert.

Tabelle 3.1: Die spezifischen Wachstums-, Produktions- und Verbrauchsrate der R24 Antikörper produzierenden Zelllinie HB-8445 in den vier verschiedenen Batches der 1-Liter-SuperSpinner Kultivierung (vergleiche Abb. 3.1). Die spezifischen Raten wurden in den exponentiellen Wachstumsphasen der Batches ermittelt.

	Batch I ^a	Batch II ^b	Batch III ^c	Batch IV ^d
Zeit [d]	0 - 3,8	3,8 - 9,3	9,3 - 12	12 - 25,7
CO_2 -Begasung [%]	20	20	5	5
HSA-Konzentration [g/l]	3	0,5	0,5	0,5
Wachstumsrate ^e μ [d^{-1}]	0,69	0,34	0,42	0,57
Verbrauchsrate ^e $\left[\frac{\text{mmol}}{10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d}} \right]$				
q_{Glc}	4,21	0,49	1,14	3,79
q_{Gln}	1,25	0,82	0,72	0,72
Produktionsrate ^e $\left[\frac{\text{mmol}}{10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d}} \right]$				
p_{Lac}	8,33	1,00	1,74	7,36
Produktionsrate ^e $\left[\frac{\mu\text{g}}{10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d}} \right]$ IgG				
p_{IgG_S}	69,5	42,2	20,8	19,0

^a Zeitintervall: $t_{1,0} - t_{3,2}$

^b Zeitintervall: $t_{5,0} - t_{9,2}$

^c Zeitintervall: $t_{9,4} - t_{12}$

^d Zeitintervall: $t_{12,0} - t_{14,6}$

^e Ermittlung der spezifischen Raten unter Verwendung des computergestützten Simulationsprogramms „Madonna for Windows“

Aus den in Tabelle 3.1 aufgelisteten Daten ist gut zu erkennen, daß eine Erniedrigung der HSA-Konzentration im Medium zu einer Verlangsamung des Zellwachstums

führte. Desweiteren konnte bei dem Vergleich der Batches II, III und IV festgestellt werden, daß eine Erniedrigung der CO_2 -Konzentration von 20 % auf 5 % und der damit verbundene um 0,3 Einheiten erhöhte pH-Wert bei gleicher HSA Konzentration in der Kultur höhere spezifische Wachstumsraten bewirkte. Auch die Viabilität der Zellen stieg von Batch II mit ca. 85 % auf über 95 % in der Anfangsphase von Batch IV an. Beachtenswert ist, daß in Batch IV die spezifische Wachstumsrate gegenüber Batch III, der unter denselben Bedingungen durchgeführt wurde, nochmals von 0,42 auf 0,57 pro Tag anstieg.

Im Verlauf der Batches II, III und IV war zu beobachten, daß parallel zu dem beschleunigten Wachstum der Zellen ihre spezifische Antikörperproduktivität p_{IgG_S} um 69 % abnahm. Auch lag die erreichte Antikörperkonzentration im Überstand (siehe Abb. 3.1 **A**) bei einer Referenzzellichte von 1×10^6 Zellen/ml in Batch IV mit 36 mg/l nur bei ca. 33 % derjenigen, die in Batch II mit 110 mg/l erreicht wurde.

Nach dem Übergang der Kultur in Batch IV in die Absterbephase blieb die im Kulturüberstand zu detektierende Menge an Antikörpern über einen Zeitraum von ca. 10 Tagen weitgehend konstant. Es kam nicht zu einer verstärkten Freisetzung von Antikörpern durch lysierende Zellen. Zudem konnte anhand der über die 10 Tagen nahezu konstanten Konzentration von Antikörpern festgestellt werden, daß die sezernierten Antikörper im Kulturüberstand nicht oder nur im geringem Maße proteolytisch abgebaut wurden. Die Antikörperproduktion korrelierte mit dem Zellwachstum, so daß innerhalb einer Batches eine wachstumsassoziierte Antikörperproduktion vorlag.

Die Verringerung der CO_2 -Konzentration in der Begasungsluft und die damit verbundene Erhöhung des pH-Wertes der Kultur vom Sauren zum Neutralen führte schnell zu Veränderungen im Stoffwechsel der Zellen, wie aus Tab. 3.1 deutlich wird. So erhöhten sich nach der Umstellung der Kulturbedingungen (zwischen Batch II und III) der Verbrauch von Glukose um 86 % und die Produktion von Laktat um 40 % (siehe Abb. 3.1 **B**). In der zweiten Passage nach der Umstellung (in Batch IV) wurde ein weiterer, sehr starker Anstieg der Verbrauchs- und Produktionsraten registriert. Das Absterben der Kultur in Batch IV ist nicht auf eine Limitierung von Glukose zurückzuführen, da zum Zeitpunkt $t = 25,7$ d noch 1,6 mmol/l Glukose im Medium vorhanden waren. Ein Vergleich der Verbrauchs- und Produktionsraten von Laktat und der Produktionsraten von Glukose zeigen, daß die hohe HSA-Konzentration die Auswirkungen des hohen CO_2 -Partialdruckes in Batch I (20 % CO_2 , 3,0 g/l HSA) nahezu ausgleichen, sodass der Glukose- und Laktat-Umsatz ähnlich hoch waren wie in Batch VI (5 % CO_2 , 0,5 g/l HSA).

Bei dieser Adaption der Zelllinie könnte es sich um zwei Prozesse der Anpassung an die geänderten Kulturbedingungen handeln. So war zum einen eine schnelle Umstellung des Stoffwechsels der Zellen zu beobachten, die sich in einer Halbierung der Antikörperproduktionsrate von Batch II zu Batch III zeigte. Zum anderen könnte es zu einer Anreicherung von Zellklonen in der Zelllinie gekommen sein, die bei neutralen pH-Bedingungen ein schnelleres Zellwachstum und einen erhöhten Glukose- und Laktat-Metabolismus zeigten. Diese Interpretation deckt sich mit den Beobachtun-

gen von Miller et al. (2000), die einen Einfluß auf das Verhalten der Zellen durch die Bedingungen der vorangegangenen Passagen beschreiben [117].

Bei den Aminosäurekonzentrationen im Verlauf der Kultivierung waren keine Besonderheiten festzustellen. Entsprechend dem schnelleren Wachstum bei neutralen pH-Werten ist demgemäß ein schnellerer Verbrauch, besonders von Glutamin, Leucin, Isoleucin, Valin, Lysin, Histidin und Methionin, festzustellen. Das Absterben der Kultur im Batch IV ist auf die Limitierung von Glutamin zurückzuführen (siehe Abb. 3.1 C), das nach $t = 16$ d vollkommen verbraucht war. Der starke Anstieg der Verbrauchsrate von Glukose um 145 % von Batch III zu Batch IV ist beim Glutamin, das eine alternative C-Quelle zur Glukose für die Zellen darstellt, nicht zu beobachten.

Die LDH-Aktivität (siehe Abb. 3.1 C) als ein Indikator für Zelldefekte und Zellyse spiegelt die Zellvialibität, die durch Zellzählung ermittelt wurde, im Verlauf der Kultivierung recht gut wider. Eine vergleichsweise niedrige LDH Aktivität von 421 U/l im Kulturüberstand von Batch IV bei einer identischen Zelldichte von $1,1 \times 10^6$ Zellen/ml gegenüber 1235 U/ml in Batch II zeigt deutlich das geringere Maß an Zelldefekten bei einem neutralen pH-Wert in der Kultur (siehe Abb. 3.1 C). Der Beginn der Absterbephase in Bach IV bei $t = 15,0$ d macht sich neben der sinkenden Viabilität der Zellen auch in einem starken Anstieg der LDH-Aktivität bemerkbar.

3.1.2.2 Langzeitkultivierung

Bei Kultivierungen im wiederholten satzweisen Betrieb im 1-Liter-SuperSpinner bei neutralem pH-Wert über einen Zeitraum von 32 Tagen stellte sich mit zunehmender Kulturdauer eine Abnahme der sezernierten Menge an R24 Antikörper ein. So sank die detektierte Konzentration an R24 Antikörper im Kulturüberstand bei einer Referenz Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml von 65 mg/l zu Beginn der Kultur auf 15 mg/l nach 11 Passagen. Die spezifische Wachstumsrate μ betrug in dieser Passage aber immer noch 0,62/d. Im Verlauf dieser längeren Kultivierungsdauer zeigte sich, daß die Produktionsleistung der an serumfreie Kulturbedingungen adaptierten Zellen nicht stabil war. Zur Erzielung hoher Antikörperausbeuten sollte daher auf Zellmaterial aus möglichst frühen Passagen für das Inokulum zurückgegriffen werden.

3.1.2.3 Erstellung einer Produktionszellbank

Um bei der anstehenden Produktion von R24 Antikörper unter definierten Bedingungen im 2-Liter-Bioreaktor auf geeignetes Zellmaterial für die Inokulation zurückgreifen zu können, wurde eine Produktionszellbank mit Zellmaterial von Batch I (vergleiche Abb. 3.1) angelegt. Pro Kryoröhrchen wurden $1,4 \times 10^7$ Zellen in 1 ml Einfriermedium konserviert.

3.1.2.4 Zusammenfassung und Diskussion

Während der Kultivierung der Zelllinie HB-8445 im 1-Liter-SuperSpinner bei verschiedenen CO₂-Konzentrationen in der Begasungsluft (20 % und 5 %) und unterschiedlichen HSA Konzentrationen (3 g/l und 0,5 g/l) im Medium, konnten Adaptionsreaktionen der Zellen auf die geänderten Kulturbedingungen beobachtet werden.

Eine Verringerung der HSA Konzentration von 3 auf 0,5 g/l wirkte sich negativ auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinie aus, was sich in einer deutlichen Verringerung der spezifischen Wachstumsrate μ von 0,69/d auf 0,34/d bei einer 20 %igen CO₂-Begasung bemerkbar machte. Welche Serumalbuminkonzentration bei unterschiedlichen Kulturbedingungen (pH-Wert der Kultur, CO₂-Konzentration, Puffersystem etc.) optimales Wachstum ermöglicht, ist im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht worden. Alle weiteren Kultivierungen erfolgten mit der für Hybridomzelllinien typischen Albuminkonzentration von 0,5 g/l HSA im Medium.

Eine Verringerung der zur Begasungsluft zugesetzten Menge an CO₂ von 20% auf 5% und ein daraus resultierender Shift des pH-Wertes um 0,3 pH-Einheiten zum Basischen, führte zu einem veränderten Stoffwechsel der Zellen.

So stieg bei der Erhöhung des pH-Wertes der Kultur vom Sauren (20 % CO₂) zum Neutralen (5 % CO₂) die Wachstumsrate μ innerhalb von 2 Passagen um 68 % auf 0,57/d an. Parallel hierzu stieg die Viabilität der Zellen von 85 % auf über 95 % an, was sich auch in der verringerten LDH-Aktivität im Kulturüberstand widerspiegelte. Ein saurer pH-Wert der Kultur stellt einen Stressfaktor für die Zellen dar, der sich negativ auf die Wachstumsgeschwindigkeit auswirkt. Bei Erhöhung von μ stiegen gleichzeitig die Glukoseverbrauchsrate um 350 % und die Laktatproduktionsrate um 330 % von Batch II zu Batch IV an.

Im Gegensatz dazu sank die Antikörperproduktionsrate p_{IgG_S} bei einem Anstieg des pH-Wertes der Kultur zwischen Batch II und Batch IV auf die Hälfte ab. Die Antikörperkonzentration im Kulturüberstand nahm bei einer Referenzzelldichte 1×10^6 Zellen/ml von 110 mg/l in Batch II auf 34 mg/l in Batch IV ab.

Eine repeated-batch Kultivierung bei 5 % CO₂ der serumfrei adaptierten Zellen über 32 Tage zeigte, daß die Produktionsleistung im Verlauf der Kultivierung stark abnahm. Für eine hohe Antikörperausbeute ist daher die Verwendung von Zellmaterial für das Inokulum anzustreben, das aus einer frühen Passage stammt.

Aus den oben beschriebenen Daten kann gefolgert werden, daß ein für eine Zellkultur vergleichsweise niedriger pH-Wert sich zwar negativ auf die Wachstumsrate und die Viabilität der Hybridomzelllinie HB-8445 auswirkt, aber gleichzeitig eine gesteigerte IgG Produktion zur Folge hat. Zur genaueren Untersuchung dieser Zusammenhänge wurden weitere Kultivierungen bei pH-Werten von 7,4; 7,2 und 6,9 mit definierten Kulturparametern durchgeführt (siehe Kap. 3.2.5).

3.2 Reindarstellung des Gangliosids G_{D3}

Im folgenden Abschnitt wird die Reindarstellung des Gangliosids G_{D3} beschrieben. Es diente im Rahmen der Arbeit als Antigen des monoklonalen Antikörpers R24. Als Ausgangsmaterial wurde eine Gangliosidmischung (HD02/225-2) aus Buttermilch verwendet. Das Material war bis zur Stufe der Iatrobeads-Adsorptionschromatographie (siehe 2.15) vorgereinigt. Die Reindarstellung des Gangliosids G_{D3} aus der Gangliosidmischung erfolgte über Anionenaustausch- und Adsorptions-HPLC.

3.2.1 Trennung durch Anionenaustausch-HPLC mit TMAE-Fractogel

Zur Trennung von neutralen GSL und geladenen Gangliosiden ist die Anionenaustauschchromatographie eine häufig genutzte Methode. Bei Gangliosiden läßt die Methode eine weitere Separation in Abhängigkeit vom Sialylierungsgrad (Gruppentrennung in Mono-, Di-, Tri-, etc., -sialoganglioside) der Zuckerstruktur zu [5]. Neben den üblicherweise verwendeten schwachen Ionentauschern wie DEAE-Sephrose [70] konnte durch den Einsatz von starken Ionentauschern wie Q-Sephrose [62] oder TMAE-Fractogel (Trimethylaminoethyl-) [136, 59] bei Gangliosiden eine verbesserte Trennleistung durch die Ausnutzung der Ladungs-, Zuckerkettenlängen- und Strukturunterschiede erzielt werden.

Bei der Trennung auf der TMAE-Fractogel-Säule (150 mm x 10 mm, ca. 12 ml Säulenbettvolumen) wurden 30 mg Gangliosidmischung aus Buttermilch aufgetragen und mit dem in Abschnitt 2.7.2.1 angegebenen Ammoniumacetat-Gradienten eluiert. Aliquots der einzelnen Fraktionen nach der dünnschichtchromatographischen Trennung sind in Abbildung 3.2 dargestellt.

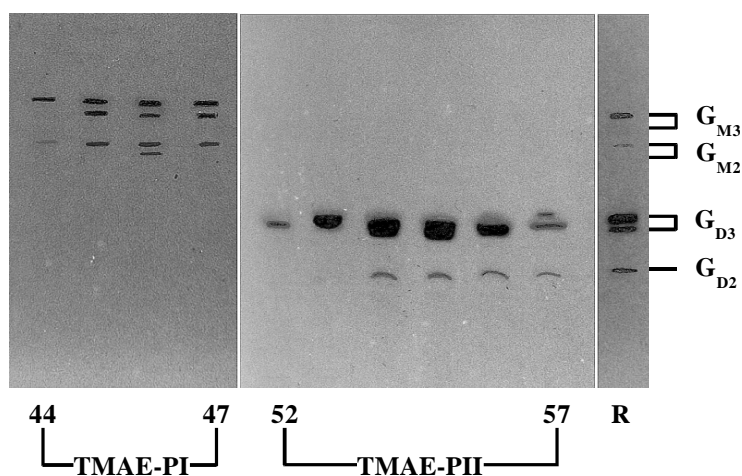


Abbildung 3.2: Dünnschichtchromatogramm der eluierten Fraktionen der Trennung

von 30 mg Gangliosidmischung aus Buttermilch auf einer 150 mm x 10 mm TMAE-Fractogel-Säule. Aliquots von 10 μ l (0,67 %) der einzelnen 1,5 ml Fraktionen wurden mittels HPTLC in Laufmittel 2 getrennt (siehe 2.8.1). Die Färbung erfolgte mit Resorcin-Reagenz. Die Fraktionen 44 - 47 wurden zur Fraktion TMAE-PI und die Fraktionen 52 - 57 zur Fraktion TMAE-II vereinigt. In der Bahn (R) sind 6 μ g des Ausgangsmaterials (HD02/225-2) aufgetragen.

Die finale Aufreinigung von G_{D3} erfolgte mit der Fraktion TMAE-II mittels Adsorptions-HPLC.

3.2.2 Trennung durch Adsorptions-HPLC mit Nucleosil

Die Fraktion TMAE-II aus der Auftrennung der Ganglioside mittels Ionenaustauschchromatographie (siehe Abbildung 3.2), die als Hauptbestandteil das Gangliosid G_{D3} enthält, wurde zur weiteren Reinigung einer Adsorptions-HPLC auf einer Kieselgelsäule unterzogen (siehe Abb. 3.3).

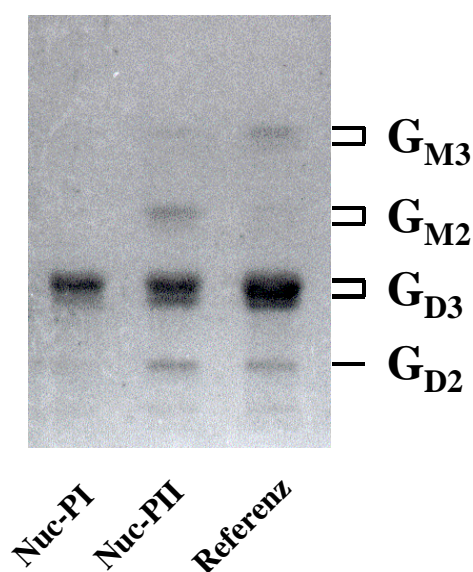


Abbildung 3.3: Resorcin-gefärbtes Dünnschichtchromatogramm der vereinigten Fraktionen der mittels Normalphasen HPLC (Nucleosil Kieselgelsäule) getrennten Gangliosidfraktion TMAE-II. Die HPTLC-Trennung erfolgte mit dem alkalischen Laufmittel 3. Die Fraktionen 0 - 35 wurden zur Fraktion Nuc-PI und die Fraktionen 36 - 55 zur Fraktion Nuc-PH vereinigt. Als Referenz dienten 12 μ g der Gangliosidmischung HD02/225-2 aus Buttermilch.

Die HPTLC Trennung der Fraktionen Nuc-PI und Nuc-PH im alkalischen Laufmittel 3, das eine Separation von Neu5Ac- und Neu5Gc-substituierten Gangliosiden erlaubt, zeigte für das isolierte G_{D3} kein verändertes Laufverhalten. Dieses Ergebnis wurde durch die Analyse des Sialinsäureprofils des isolierten Gangliosids mittels HPLC (siehe Kap. 3.2.4) bestätigt, bei der nur Neu5Ac detektiert wurde.

Eine Zusammenfassung der aus der HPLC-Aufreinigung der Ganglioside aus Buttermilch erhaltenen Fraktionen ist in Abbildung 3.4 dargestellt.

3.2.3 G_{D3} -Detektion mittels Overlay-Technik

Neben der Identifizierung eines Gangliosids anhand einer Zuordnung zu entsprechenden Referenzgangliosiden mit bekanntem Laufverhalten mittels HPTLC bietet der Overlay-Test mit einem spezifischen Antikörper eine eindeutige Strukturzuordnung. Zur Charakterisierung des gereinigten G_{D3} wurde der produzierte R24 Antikörper eingesetzt.

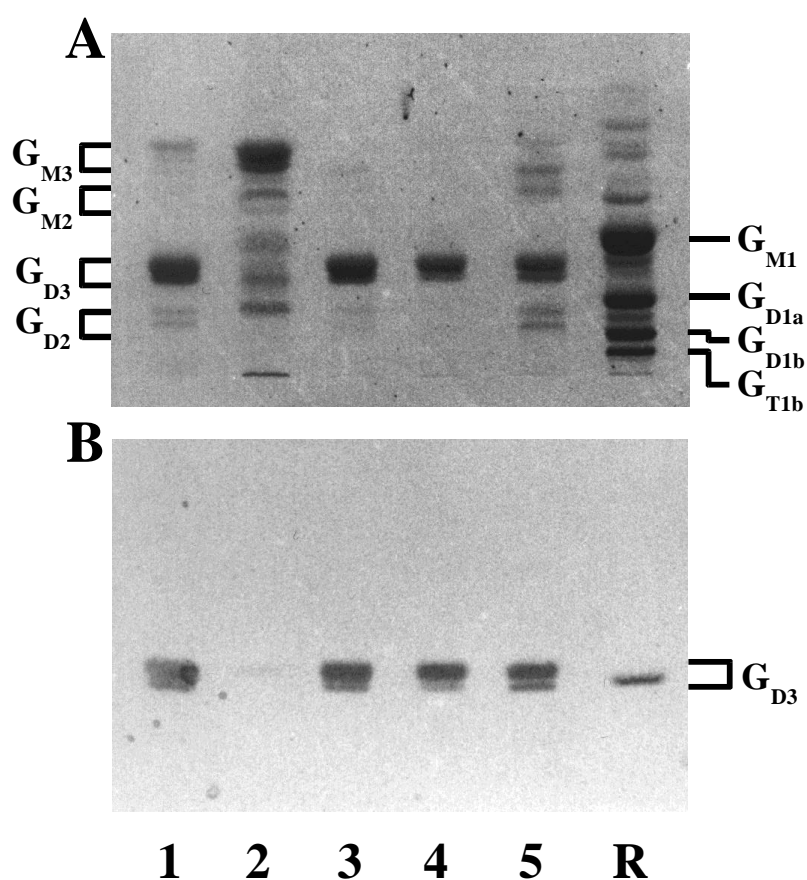


Abbildung 3.4: Orcin-gefärbtes Dünnschichtchromatogramm (A) und Anti- G_{D3} Overlay-Test (B) der mittels TMAE-Fractogel- und Nucleosil-HPLC erzielten Gangliosidfraktionen. Die Trennungen erfolgten im Laufmittel 1. (1) 6 µg Ausgangsmaterial HD02/225-2, (2) 5 µg TMAE-PI (siehe 3.2), (3) 10 µg TMAE-PI (siehe 3.2), (4) 5 µg Nuc-PI (siehe 3.3), (5) 7 µg Nuc-PII (siehe 3.3), (R) 30 µg Referenzgangliosidmischung aus Humanhirn (HD02/113a).

Anhand der immunologischen Markierung ist G_{D3} auf der DC-Platte gut zu identifizieren. Es konnte keine Kreuzreaktivität mit anderen Gangliosiden wie G_{M3} oder G_{D1b} detektiert werden. Die Fraktion Nuc-PI wurde im Folgenden zur Bestimmung

der Konzentration an G_{D3} -bindendem R24 Antikörper und für Bindungsstudien im BIAcore System verwendet.

3.2.4 Quantitative und qualitative Bestimmung des Sialinsäuregehaltes

Zur quantitativen Bestimmung der Menge an G_{D3} in der Fraktion Nuc-PI wurden zwei Verfahren benutzt: zum einen die photometrische Bestimmung des Sialinsäuregehaltes (siehe 2.8.4) und alternativ dazu die Bestimmung mittels HPLC (siehe 2.6.9), die zusätzlich eine Unterscheidung zwischen Neu5Ac und Neu5Gc zuläßt.

Die photometrische Sialinsäurequantifizierung, die keine Unterscheidung zwischen Neu5Ac und Neu5Gc erlaubt, erfolgte mit einer Eichgeraden, die mit Neu5Ac erstellt wurde. Die quantitative und qualitative Sialinsäurebestimmung mittels HPLC erfolgte im Vergleich zu Eichgeraden, die mit Neu5Ac und Neu5Gc erstellt wurden.

Tabelle 3.2: Zusammenfassung der qualitativen und quantitativen Sialinsäurebestimmung des isolierten G_{D3} (Nuc-PI).

Methode	Fraktion	Volumen [ml]	Neu5Ac [ng/ μ l]	Neu5Gc [ng/ μ l]	Sialinsäure	G_{D3} [ng/ μ l] ^a
Photometrie	Nuc-PI	50,0	n.b. ^b	n.b. ^b	36	90
HPLC	Nuc-PI	50,0	47	n.n.	47	118
HPLC	Nuc-PII	19,6	59	n.n.	59	(148) ^c

n.n.: nicht nachweisbar

n.b.: nicht selektiv bestimmbar

^a Der Berechnung liegt zu Grunde, daß beim G_{D3} mit einem Molekulargewicht von $M=1554$ g/mol, Neu5Ac mit $M=309,3$ g/mol 40% der Gesamtmolekülmasse ausmacht.

^b Nur die Gesamtbestimmung von Neu5Ac und Neu5Gc ist möglich.

^c Diese Fraktion enthält neben G_{D3} geringe Mengen von G_{M2} und G_{D2} , so daß die Berechnung nur als Näherung gelten kann.

Aus der HPLC-Bestimmung des Sialinsäuregehaltes konnte die Gesamtmenge des aufgereinigten G_{D3} berechnet werden (siehe Tab. 3.2). Mit der Fraktion Nuc-PI sind 5,9 mg reines G_{D3} und mit Fraktion Nuc-PII ca. 2,9 mg G_{D3} mit Beimengungen von G_{M2} und G_{D2} isoliert worden.

3.2.4.1 Zusammenfassung

Aus 30 mg Gesamtgangliosidmischung aus Buttermilch konnten mittels präparativer Ionenaustausch- und Adsorptions-HPLC 5,9 mg hochreines G_{D3} isoliert werden. Zudem wurden 2,9 mg G_{D3} mit geringen Beimengungen an G_{M2} und G_{D2} gewonnen. Von den möglichen vier Varianten des G_{D3} , die sich aus der Variabilität der Sia-

linsäuren (Neu5Ac und Neu5Gc) in der Disialogruppe ergeben würden, konnte anhand des HPLC-Sialinsäureprofils nur G_{D3} mit zwei Neu5Ac nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit HPTLC-Untersuchungen, bei denen im alkalischen Laufmittel 3 keine Veränderung im Laufverhalten zu erkennen war. Damit ist die Voraussetzung gegeben, das isolierte G_{D3} als spezifisches Antigen des Antikörpers R24 in Bindungstests einzusetzen [186].

Bei dem Overlay-Test mit R24 konnte zudem gezeigt werden, daß der R24 Antikörper nicht mit anderen Gangliosiden aus humanem Hirn, wie G_{M3} oder G_{D1b} , kreuzreagiert. G_{D3} ist in geringer Konzentration im Humanhirn vorhanden und wird mit R24 Antikörpern detektiert. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Untersuchungen von Tai et al. (1988) [186], bei denen lediglich geringe Affinitäten zu G_{T1a} und G_{Q1b} festgestellt werden konnten. Diese hohe Spezifität von R24 ist die Voraussetzung für eine Immuntherapie gegen humane Melanomzellen, die durch eine außerordentlich hohe G_{D3} -Expression gekennzeichnet sind.

3.2.5 Kultivierung der HB-8445 Zelllinie unter serumfreien Bedingungen in unterschiedlichen Kultursystemen

Zur Produktion des Antikörpers R24 mittels der HB-8445 Zelllinie unter geregelten Bedingungen wurde ein 2-Liter-Bioreaktor-Kultursystem verwendet. In diesem Kultivierungssystem ist im Gegensatz zum SuperSpinner eine definierte Regelung des Sauerstoffpartialdruckes (pO_2) und des pH-Wertes (über das Puffersystem CO_2/HCO_3^-) durch eine automatische PID-Regelung (Proportional Integral Differential) der Volumenströme der Gase Stickstoff, Luft, Sauerstoff und Kohlendioxid möglich. Bei allen Kultivierungen im 2-Liter-Bioreaktor wurde mit einem Sauerstoffpartialdruck von 40 % der Luftsättigung im Medium kultiviert. Der in der Literatur beschriebene Einfluß unterschiedlicher Sauerstoffsättigung im Kulturmedium auf das gebildete Produkt, speziell dessen Glykosylierung [85], konnte durch den konstanten Wert für den Sauerstoffpartialdruck während der Kultivierung ausgeschlossen werden.

Um die Reaktion der HB-8445 Zelllinie auf verschiedene serumfreie Kulturbedingungen untersuchen zu können, wurde bei pH-Werten von 7,4; 7,2 und 6,9 kultiviert. Zusätzlich wurden Kultivierungen mit einem HEPES-Puffersystem statt des Bicarbonat- CO_2 Puffersystems durchgeführt. Das Verhalten der Zelllinie wurde zusätzlich bei der Kultivierung im nicht geregelten SuperSpinner untersucht.

Um bei allen Kultivierungen eine Vergleichbarkeit zu erreichen, war es anhand der zuvor beschriebenen Ergebnisse von entscheidender Bedeutung, einheitliches Inokulationszellmaterial zu verwenden. Durch das Zurückgreifen auf identisches Zellmaterial aus der Produktionszellbank (siehe Kap. 3.1.2.3) wurde dieses gewährleistet. Zur Produktion einer ausreichenden Menge von Zellmaterial zur Inokulation in den 2-Liter-Bioreaktor wurde ausgehend von der kryokonservierten Probe ein einheitliches Anzuchtverfahren im Spinner und SuperSpinner, wie es unter 2.2.1 und 2.2.2 beschrieben ist, verwendet.

Bei den Kultivierungen zur Antikörperproduktion wurde die folgende „repeated-batch“ Vorgehensweise gewählt. Die Einsaat geschah mit einer Zelldichte von ca. 2×10^5 bis 4×10^5 Zellen/ml. Nach Erreichen einer Zelldichte von ca. 1×10^6 Zellen/ml im Batch I wurde ein Teil der Kultur abgeerntet und der Reaktor mit frischem Medium aufgefüllt. Nach dem vollständigen Verbrauch von Glutamin im Medium wurde die Kultivierung abgebrochen und Batch II geerntet.

Der Verlauf der Kultivierungen wurde durch die Messung der Parameter Lebendzell-dichte, Totzell-dichte und LDH-Aktivität, den Konzentrationen der Metaboliten des Primärstoffwechsels Glukose, Laktat, Ammonium, der Aminosäuren und der R24-Antikörperkonzentration (IgG_S) verfolgt. Es wurde zusätzlich das G_{D_3} -Bindungsvermögen (IgG_{GD_3}) des Kulturüberstandes im Verlauf der Kultur bestimmt.

Aus den gemessenen Werten für die Lebendzell-dichte, Antikörperkonzentration und dem G_{D_3} -Bindungsvermögen wurden unter Verwendung der computergestützten Wachstumssimulation „Madonna for Windows“ die spezifische Wachstumsrate μ , die spezifischen „Produktionsraten“ q_{IgG_S} und $q_{\text{IgG}_{\text{GD}_3}}$ bestimmt.

Die spezifische Sauerstoffverbrauchsrate wurde bei Erreichen einer Lebendzellkonzentration von 4 bis 6×10^5 Zellen/ml ermittelt, indem für ca. 30 min die Begasung der Kultur unterbrochen wurde. Aus dem zeitlichen Verlauf der Abnahme des Sauerstoffpartialdruckes wurde die Sauerstoffverbrauchsrate berechnet (siehe 2.4).

3.2.5.1 Kultivierung bei einem pH-Wert von 7,4

Zur Produktion von R24 Antikörpern bei einem pH-Wert von 7,4 wurden die HB-8445 Hybridomzellen mit einer Zelldichte von $4,6 \times 10^5$ Zellen/ml bei 2 Liter Kulturvolumen in den Bioreaktor eingesät. Nach 3,0 Tagen wurden bei einer Zelldichte von $1,4 \times 10^6$ Zellen/ml 1,4 l Kultur geerntet (Batch I) und der Bioreaktor mit 1,4 l frischem Medium aufgefüllt. Die Viabilität der Kultur im Batch I betrug während der exponentiellen Wachstumsphase ($t = 0,1$ bis $t = 3$ d) im Durchschnitt 92 %. Nach dem Erreichen einer Zelldichte von $1,2 \times 10^6$ Zellen/ml zum Zeitpunkt $t = 8$ d wurde die Kultivierung abgebrochen und 2 l Kulturvolumen (Batch II) geerntet. Die Viabilität in Batch II betrug während der exponentiellen Wachstumsphase ($t = 4,0$ bis $t = 7,2$ d) im Durchschnitt 90 % und sank zum Ende auf 80 % ab.

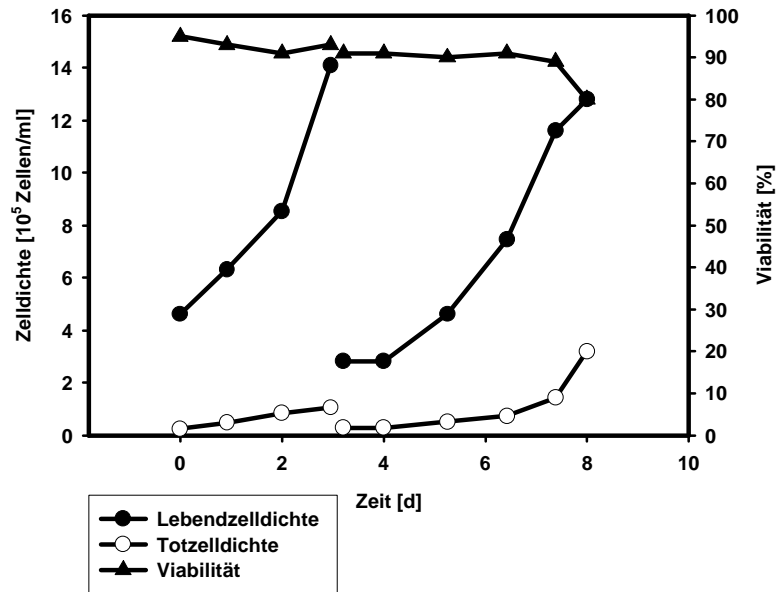


Abbildung 3.5: Lebendzellichte und Totzellichte (ermittelt durch Trypanblau-Ausschlußfärbung) und Viabilität einer zweifach satzweisen Kultivierung der Maushybridomzelllinie HB-8445 im 2-Liter-Bioreaktor bei einem pH-Wert von 7,4 im Kulturmedium. Zum Zeitpunkt $t = 3,0$ d wurde die Kultur zum Teil geerntet und frisches Medium aufgefüllt.

Die spezifischen Wachstumsraten betragen in Batch I $\mu = 0,43/d$ und in Batch II $\mu = 0,37/d$ (siehe Tab. 3.3). Die Konzentrationen an R24 Antikörper im Verlauf der Kultivierung sind in Abb. 3.6 dargestellt. Die Antikörperausbeuten können der Tab. 3.15 entnommen werden.

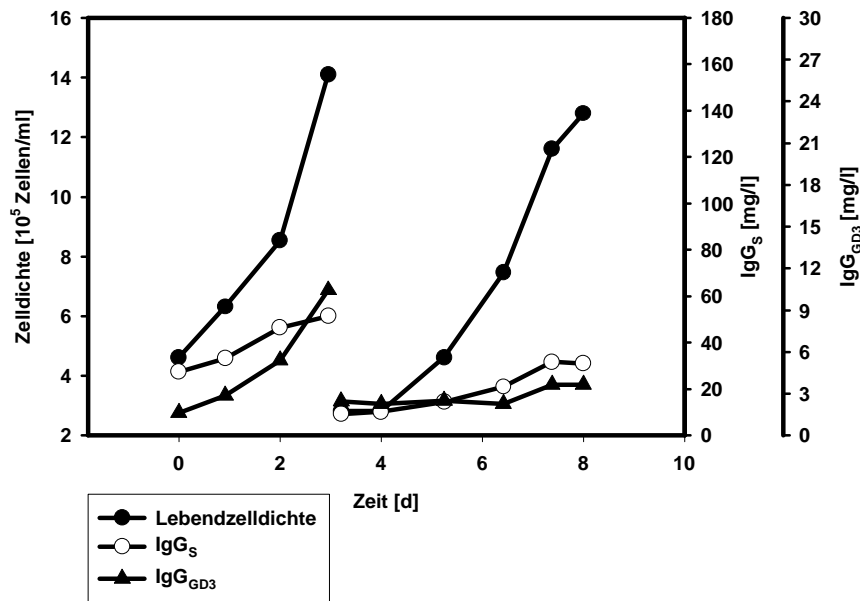


Abbildung 3.6: Lebendzellichte und R24-Antikörperkonzentration einer zweifach

satzweisen Kultivierung der Maushybridomzelllinie HB-8445 im 2-Liter-Bioreaktor bei einem pH-Wert von 7,4 im Kulturmedium. IgG_S: ermittelt durch Sandwich-ELISA (siehe Kap. 2.6.1.2); IgG_{GD3}: ermittelt durch G_{D3} Bindungs-ELISA (siehe Kap. 2.6.1.3).

Die Produktion des R24 Antikörpers (siehe Abb. 3.6) korrelierte in beiden Batches mit dem Wachstum und nahm während des Kulturverlaufes bis zu einer maximalen Konzentration von IgG_S = 51,1 mg/l in Batch I und 31,3 mg/l in Batch II kontinuierlich zu. Die spezifischen Produktionsraten betragen in Batch I $13,8 \mu\text{g } 10^{-6}$ Zellen d⁻¹ und in Batch II $8,2 \mu\text{g } 10^{-6}$ Zellen d⁻¹. Die Konzentration an G_{D3}-bindendem R24 im Kulturüberstand betrug am Ende des Batch I $10,5 \mu\text{g } 10^{-6}$ Zellen d⁻¹ und $3,7 \mu\text{g } 10^{-6}$ Zellen d⁻¹ am Ende der Kultivierung (siehe auch Tab.3.3).

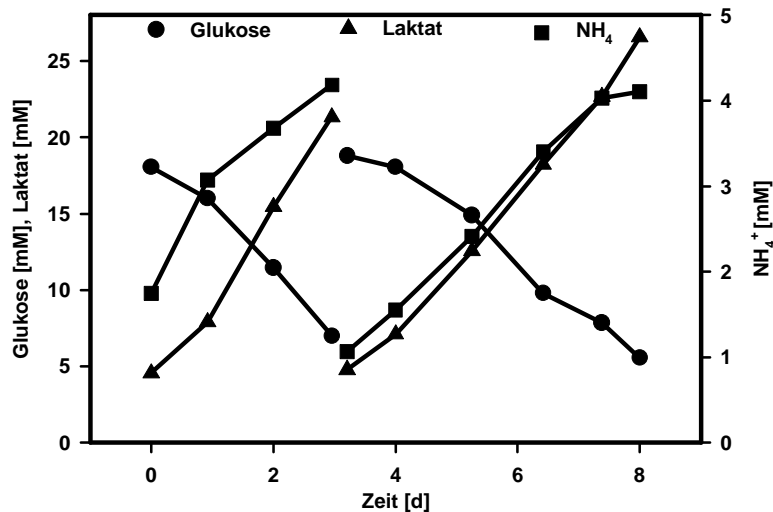


Abbildung 3.7: Glukose-, Laktat- und NH₄⁺-Konzentrationen im Überstand einer zweifach satzweisen Kultivierung der Maushybridomzelllinie HB-8445 im 2-Liter-Bioreaktor bei einem pH-Wert von 7,4.

Die Glukose-, Laktat- und NH₄⁺-Konzentrationen im Verlauf der Kultivierung sind in Abb. 3.7 dargestellt. Das Zellwachstum war nicht durch Glukosemangel limitiert. Die Glukose-Konzentration am Ende der Batches I und II betrug 5 mM. Sowohl die Laktat-Konzentrationen von 21,3 bzw. 26,5 mM als auch die NH₄⁺-Konzentrationen von jeweils 4,1 mM in den Batches I und II erreichten keine toxischen Werte. Die Produktions- und Verbrauchsdaten können Tab. 3.3 entnommen werden.

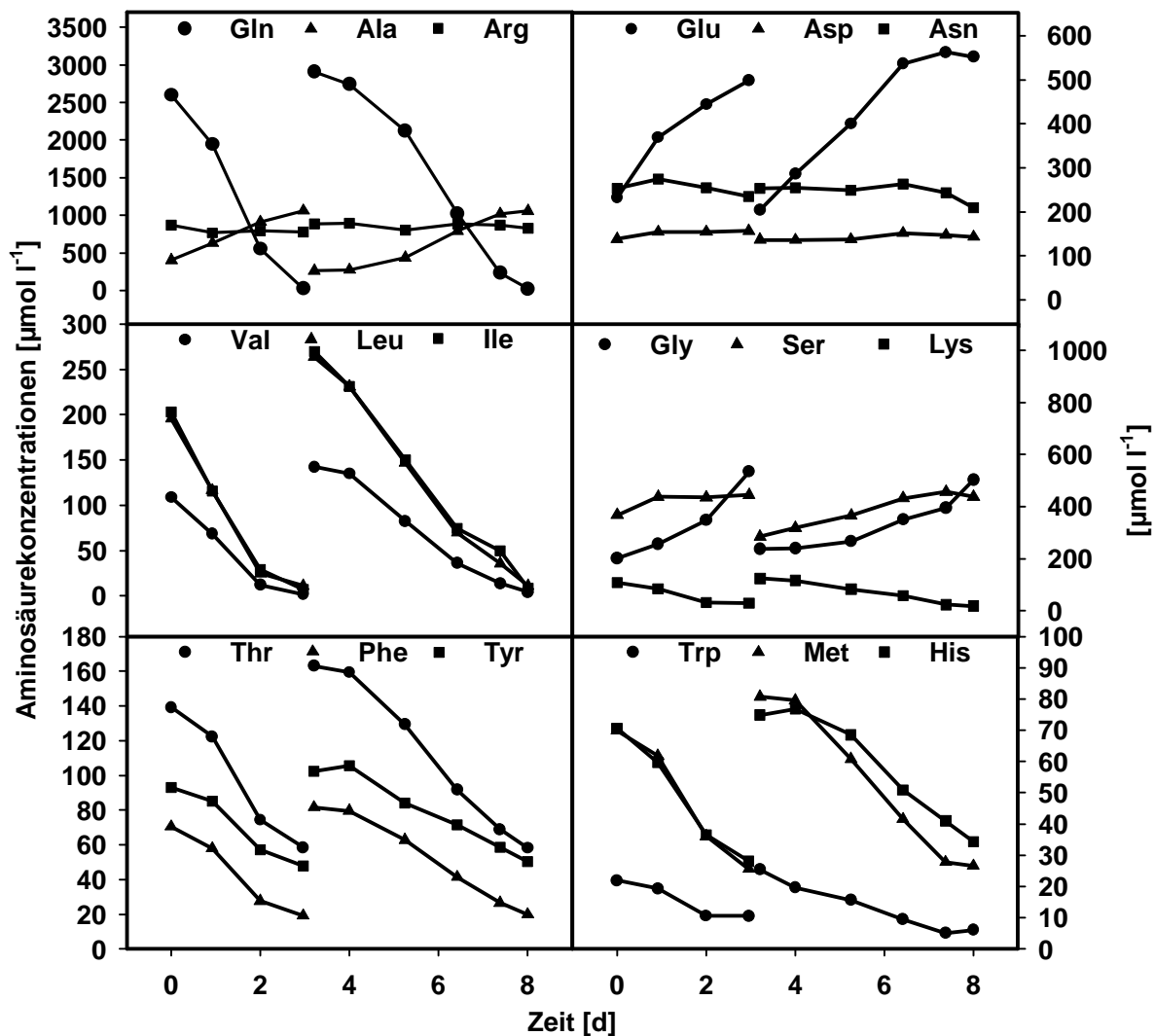


Abbildung 3.8: Aminosäurekonzentrationen im Überstand einer zweifach satzweisen Kultivierung der Maushybridomzelllinie HB-8445 im 2-Liter-Bioreaktor bei einem pH-Wert von 7,4.

Die Konzentrationen von 18 Aminosäuren wurden über den gesamten Zeitraum der Kultivierung im Kulturüberstand gemessen (siehe Abb. 3.8). Keine der Aminosäuren war während der Kultivierung erschöpft. Die Glutaminverbrauchsrate betrug in den Batches I und II 2,31 bzw. 2,73 $\text{mmol } 10^{-6} \text{ Zellen d}^{-1}$ und die Glutamin-Konzentration war zum Batchende auf 31 bzw. 23 μM abgesunken. Gleichzeitig stieg die Glutamat-Konzentration auf 498 bzw. 552 $\mu\text{mol l}^{-1}$ an. Die Aminosäuren Histidin, Threonin, Tyrosin, Methionin, Phenylalanin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Valin und Tryptophan wurden während des Zellwachstums verbraucht, aber keine bis zur Erschöpfung. Die Konzentrationen von Aspartat, Asparagin und Arginin veränderten sich während der Kultivierung kaum. Glycin, Serin und Alanin wurden von den Zellen produziert, wobei der Gehalt an Alanin am stärksten anstieg, und zwar von

405 auf $1063 \mu\text{mol l}^{-1}$ in Batch I und von 264 auf $1059 \mu\text{mol l}^{-1}$ in Batch II.

In der Tab. 3.3 sind die wichtigsten spezifischen Produktions- und Verbrauchsdaten der Kultivierung bei einem pH-Wert von 7,4 im Kulturmedium zusammengefaßt.

Tabelle 3.3: Wachstums-, Verbrauchs- und Produktionsraten in der exponentiellen Wachstumsphase einer Repeated-Batch-Produktion des monoklonalen Antikörpers R24 im 2-Liter-Bioreaktor mit dem Puffersystem $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ bei pH 7,4.

	μ [d ⁻¹]	q _{Glc}	p _{Lac}	q _{Gln}	p _{NH3}	p _{IgG_S}	p _{IgG_{GD3}}	q _{O2}
		[$\frac{\text{mmol}}{10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d}}$] ^a			[$\frac{\mu\text{g}}{10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d}}$] ^b		[$\frac{\mu\text{mol}}{10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d}}$]	
Batch I ^c	0,43	4,71	6,98	0,98	0,57	13,3	4,10	2,57
Batch II ^d	0,37	4,40	6,76	1,01	0,92	8,2	0,57	2,21

^a Diese Einheit gilt für die Glukose- und Glutaminverbrauchsdaten und für die Laktat- und Ammoniumproduktionsdaten.

^b Diese Einheit gilt für die Antikörperproduktionsdaten.

^c Zeitintervall des exponentiellen Wachstums t = 0,1 bis t = 3,0 d

^d Zeitintervall des exponentiellen Wachstums t = 4,0 bis t = 8,0 d

Die Ermittlung der spezifischen Raten erfolgte rechnergestützt unter Verwendung des Simulationsprogramms „Madonna for Windows“.

Um Rückschlüsse auf den Energie-Stoffwechsel der Zellen ziehen zu können (siehe Kap. 3.2.5.6), wurden die in Tab. 3.4 aufgelisteten Quotienten der Glukose- und Glutaminverbrauchsdaten (Glukose und Glutamin als Hauptkohlenstoffquellen) und der Laktat- (Laktat als ein Stoffwechselprodukt der Glykolyse) und Antikörperproduktionsdaten berechnet.

Tabelle 3.4: Quotienten ausgewählter metabolischer Verbrauchs- und Produktionsdaten nach Tab. 3.3

	q _{Glc} /p _{Lac}	q _{Glc} /q _{Gln}	q _{Glc} /p _{IgG_S} ^a	q _{Gln} /p _{IgG_S} ^a
Batch I	0,67	4,81	354	73
Batch II	0,69	4,36	536	123

^a in $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$

3.2.5.2 Kultivierung bei einem pH-Wert von 7,2

Zur Produktion von R24 Antikörpern bei einem pH-Wert von 7,2 wurden die HB-8445 Hybridomzellen mit einer Zelldichte von $2,2 \times 10^5$ Zellen/ml bei 2 Liter Kulturvolumen in den Bioreaktor eingesät. Nach 3,9 Tagen wurden bei einer Zelldichte von $1,45 \times 10^6$ Zellen/ml 1,6 l Kultur geerntet (Batch I) und der Bioreaktor mit 1,6 l frischem Medium aufgefüllt. Die Viabilität der Kultur im Batch I betrug während

der exponentiellen Wachstumsphase ($t = 0,1$ bis $t = 3,3$ d) im Durchschnitt 95 %. Nach dem Erreichen einer Zelldichte von $1,49 \times 10^6$ Zellen/ml zum Zeitpunkt $t = 7,9$ d wurde die Kultivierung abgebrochen und 2 l Kulturvolumen (Batch II) geerntet. Die Viabilität in Batch II betrug während der exponentiellen Wachstumsphase ($t = 4,5$ bis $t = 7,5$ d) im Durchschnitt 92 %.

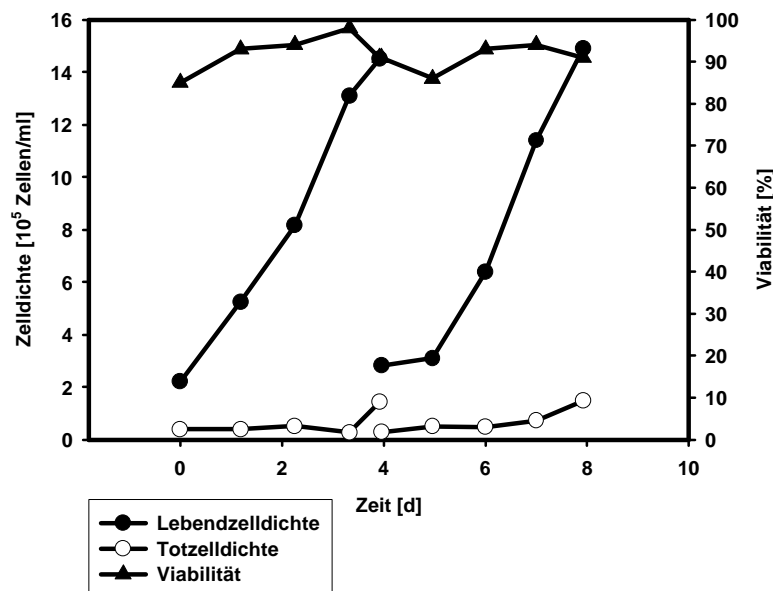


Abbildung 3.9: Lebendzelldichte, Totzelldichte und Viabilität einer zweifach satzweisen Kultivierung der Maushybridomzelllinie HB-8445 im 2-Liter-Bioreaktor bei einem pH-Wert von 7,2 im Kulturmedium. Zum Zeitpunkt $t = 3,9$ d wurde die Kultur zum Teil geerntet und frisches Medium aufgefüllt.

Die spezifischen Wachstumsraten betragen in Batch I $\mu = 0,47/d$ und in Batch II $\mu = 0,61/d$ (siehe Tab. 3.5). Die Konzentrationen an R24 Antikörper im Verlauf der Kultivierung sind in Abb. 3.10 dargestellt. Die Antikörperausbeuten können Tab. 3.15 entnommen werden.

Die Produktion des R24 Antikörpers (siehe Abb. 3.10) korrelierte in beiden Batches mit dem Wachstum und nahm während des Kulturverlaufes bis zu einer maximalen Konzentration von $\text{IgG}_S = 75,3$ mg/l in Batch I und 44,9 mg/l in Batch II kontinuierlich zu. Die spezifischen Produktionsraten betragen in Batch I $19,0 \mu\text{g } 10^{-6}$ Zellen d^{-1} und in Batch II $10,7 \mu\text{g } 10^{-6}$ Zellen d^{-1} . Die Konzentration an GD_{33} -bindendem R24 im Kulturüberstand betrug am Ende des Batch I $16,3 \mu\text{g } 10^{-6}$ Zellen d^{-1} und $11,3 \mu\text{g } 10^{-6}$ Zellen d^{-1} am Ende der Kultivierung (siehe Tab. 3.5).

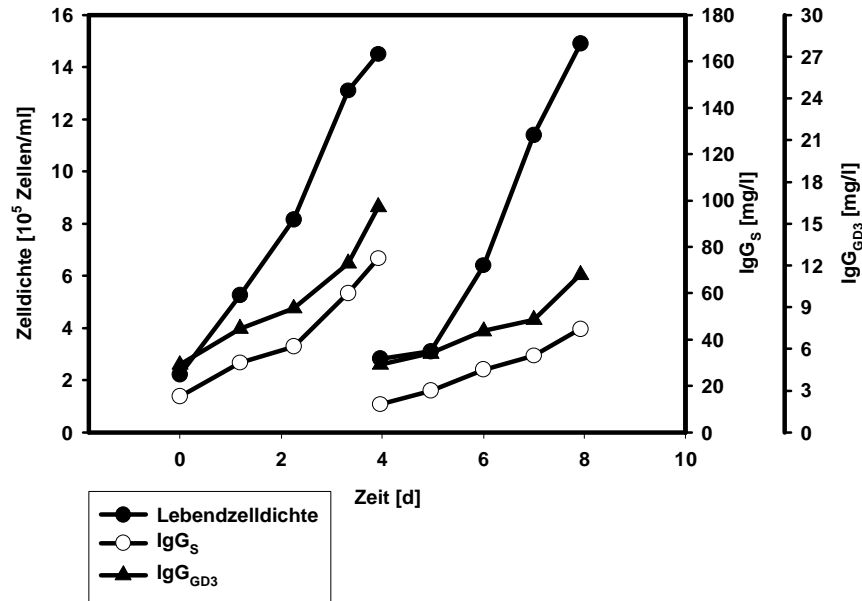


Abbildung 3.10: Lebendzellichte und R24-Antikörperkonzentration einer zweifach satzweisen Kultivierung der Maushybridomzelllinie HB-8445 im 2-Liter-Bioreaktor bei einem pH-Wert von 7,2 im Kulturmedium. IgG_S: ermittelt durch Sandwich-ELISA (siehe Kap. 2.6.1.2); IgG_{GD3}: ermittelt durch G_{D3} Bindungs-ELISA (siehe Kap. 2.6.1.3).

Die Glukose-, Laktat- und NH₄⁺-Konzentrationen im Verlauf der Kultivierung sind in Abb. 3.11 dargestellt. Das Zellwachstum war nicht durch Glukosemangel limitiert. Die Glukose-Konzentrationen am Ende der Batches I und II betragen jeweils 11,1 mM und 10,3 mM.

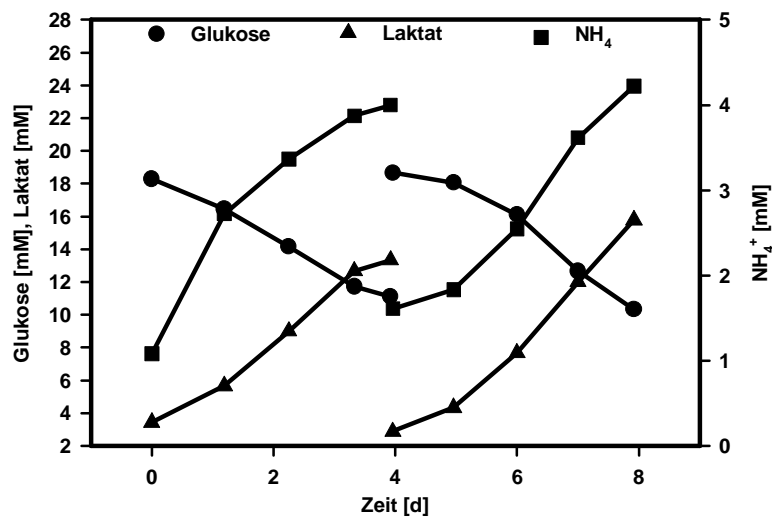


Abbildung 3.11: Glukose-, Laktat- und NH₄⁺-Konzentrationen, im Überstand einer zweifach satzweisen Kultivierung der Maushybridomzelllinie HB-8445 im 2-Liter-

Bioreaktor bei einem pH-Wert von 7,2.

Sowohl die Laktat-Konzentrationen von 13,3 bzw. 15,7 mM als auch die NH_4^+ -Konzentrationen von 4,0 bzw. 4,2 mM in den Batches I und II erreichten keine toxischen Werte. Die Produktions- und Verbrauchsdaten können Tab. 3.5 entnommen werden.

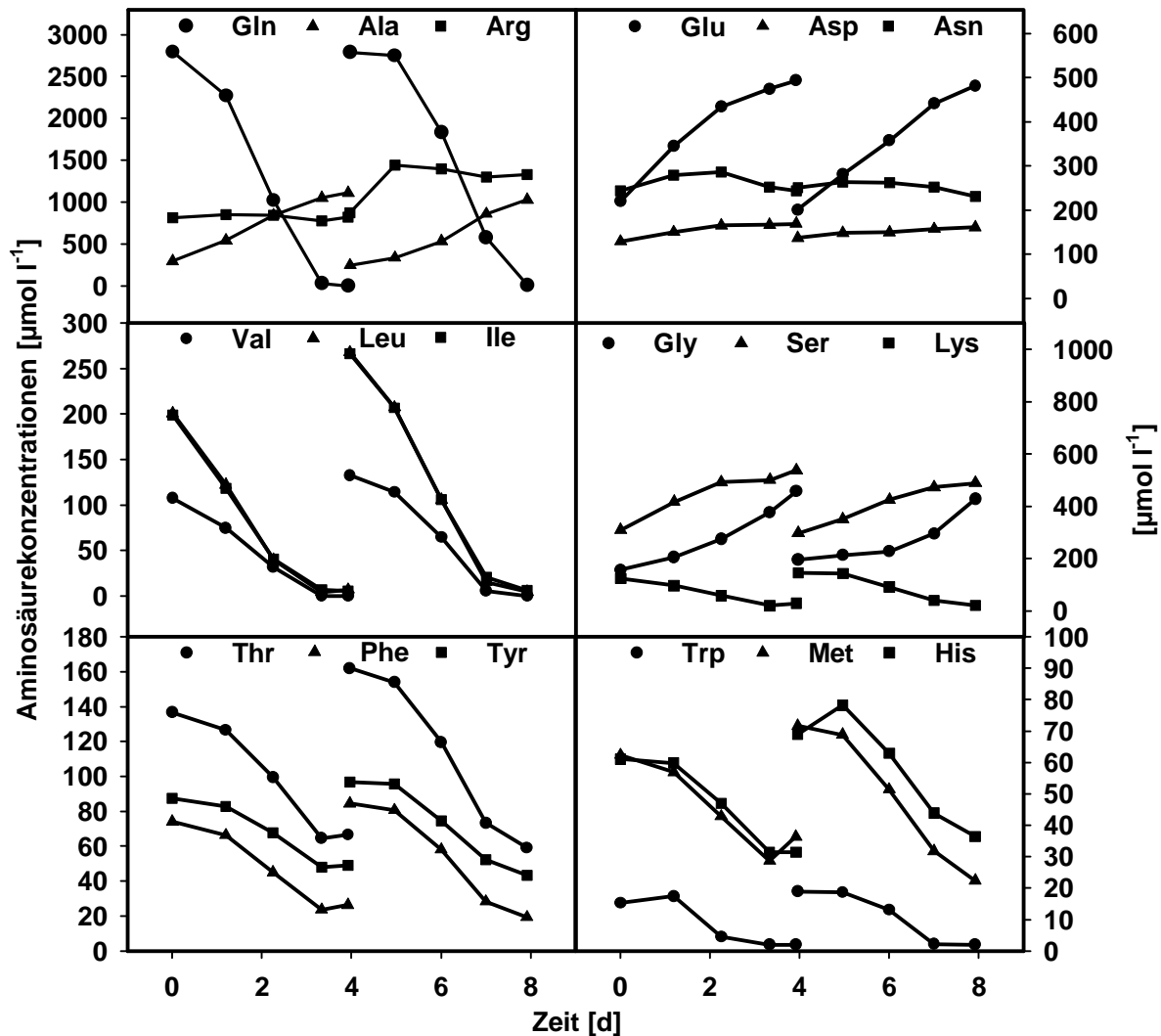


Abbildung 3.12: Aminosäurekonzentrationen im Überstand einer zweifach satzweisen Kultivierung der Maushybridomzelllinie HB-8445 im 2-Liter-Bioreaktor bei einem pH-Wert von 7,2.

Die Glutaminverbrauchsrate betrug in den Batches I und II 2,35 bzw. 2,31 $\text{mmol } 10^{-6} \text{ Zellen d}^{-1}$. Glutamin (siehe Abb. 3.12) war am Ende von Batch I erschöpft, und am Ende von Batch II betrug die Glutaminkonzentration im Überstand noch $9,2 \mu\text{mol l}^{-1}$. Gleichzeitig stieg die Glutamat-Konzentration auf 493 bzw. $480 \mu\text{mol l}^{-1}$ an. Die Aminosäuren Histidin, Threonin, Tyrosin, Methionin, Phenylalanin, Iso-

leucin, Leucin, Lysin, Valin und Tryptophan wurden während des Zellwachstums verbraucht, wobei sowohl Valin als auch Tryptophan zum Ende der Batches erschöpft waren. Die Konzentrationen von Aspartat und Asparagin veränderten sich während der Kultivierung kaum. Arginin zeigte nur im Batch II einen einmaligen Anstieg der Konzentration, blieb ansonsten aber konstant. Glycin, Serin und Alanin wurden von den Zellen produziert, wobei der Gehalt an Alanin am stärksten anstieg, und zwar von 293 auf 1108 $\mu\text{mol l}^{-1}$ in Batch I und von 245 auf 1028 $\mu\text{mol l}^{-1}$ in Batch II.

In der Tab. 3.5 sind die wichtigsten spezifischen Produktions- und Verbrauchsdaten der Kultivierung bei einem pH-Wert von 7,2 im Kulturmedium zusammengefaßt.

Tabelle 3.5: Wachstums-, Verbrauchs- und Produktionsraten in der exponentiellen Wachstumsphase einer Repeated-Batch-Produktion des monoklonalen Antikörpers R24 im 2-Liter-Bioreaktor mit dem Puffersystem $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ bei pH 7,2.

	μ [d ⁻¹]	q _{Glc}	p _{Lac}	q _{Gln}	p _{NH3}	p _{IgG_S}	p _{IgG_{GD3}}	q _{O2}
			$\left[\frac{\text{mmol}}{10^6 \text{ Zellen-d}}\right]^a$			$\left[\frac{\mu\text{g}}{10^6 \text{ Zellen-d}}\right]^b$		$\left[\frac{\mu\text{mol}}{10^6 \text{ Zellen-d}}\right]$
Batch I ^c	0,47	2,91	4,15	1,10	1,11	19,0	3,12	2,76
Batch II ^d	0,61	4,01	5,64	1,41	1,32	10,7	1,72	3,10

^a Diese Einheit gilt für die Glukose- und Glutaminverbrauchsdaten und für die Laktat- und Ammoniumproduktionsdaten.

^b Diese Einheit gilt für die Antikörperproduktionsdaten.

^c Zeitintervall des exponentiellen Wachstums t = 0,1 bis t = 3,8 d

^d Zeitintervall des exponentiellen Wachstums t = 4,7 bis t = 7,5 d

Die Ermittlung der spezifischen Raten erfolgte rechnergestützt unter Verwendung des Simulationsprogramms „Madonna for Windows“.

In Tab. 3.6 sind Quotienten der Glukose- und Glutaminverbrauchsdaten und der Laktat- und Antikörperproduktionsdaten aufgelistet, die Rückschlüsse auf den Energie-Stoffwechsel der Zellen zulassen (siehe Tab. 3.14).

Tabelle 3.6: Quotienten ausgewählter metabolischer Verbrauchs- und Produktionsdaten nach Tab. 3.5

	q _{Glc} /p _{Lac}	q _{Glc} /q _{Gln}	q _{Glc} /p _{IgG_S} ^a	q _{Gln} /p _{IgG_S} ^a
Batch I	0,70	2,65	153	58
Batch II	0,71	2,84	375	131

^a in $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$

3.2.5.3 Kultivierung bei einem pH-Wert von 6,9

Zur Produktion von R24 Antikörpern bei einem pH-Wert von 6,9 wurden die HB-8445 Hybridomzellen mit einer Zelldichte von $1,9 \times 10^5$ Zellen/ml bei 2 Liter Kulturvolumen in den Bioreaktor eingesät. Nach 5,8 Tagen wurden bei einer Zelldichte von $9,2 \times 10^5$ Zellen/ml 1,4 l Kultur geerntet (Batch I) und der Bioreaktor mit 1,4 l frischem Medium aufgefüllt. Die Viabilität der Kultur im Batch I betrug während der exponentiellen Wachstumsphase ($t = 0,1$ bis $t = 4,9$ d) im Durchschnitt 85 % und sank zum Ende auf 73 % ab. Nach dem Erreichen einer Zelldichte von $9,2 \times 10^5$ Zellen/ml zum Zeitpunkt $t = 12$ d wurde die Kultivierung abgebrochen und 2 l Kulturvolumen (Batch II) geerntet. Die Viabilität in Batch II betrug während der exponentiellen Wachstumsphase ($t = 7,0$ bis $t = 11,0$ d) im Durchschnitt 80 % und sank zum Ende auf 63 % ab.

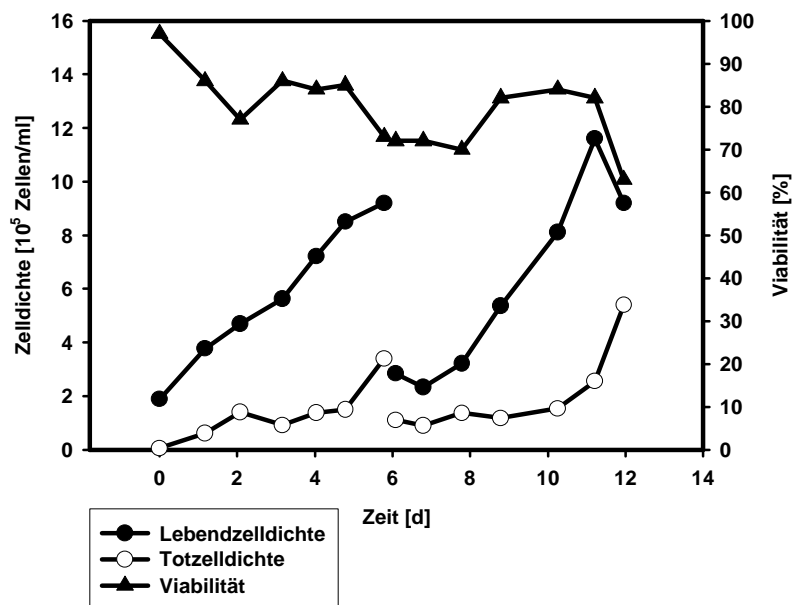


Abbildung 3.13: Lebendzellichte, Totzellichte und Viabilität einer zweifach satzweisen Kultivierung der Maushybridomzelllinie HB-8445 im 2-Liter-Bioreaktor bei einem pH-Wert von 6,9 im Kulturmedium. Zum Zeitpunkt $t = 5,8$ d wurde die Kultur zum Teil geerntet und frisches Medium aufgefüllt.

Die spezifischen Wachstumsraten betragen in Batch I $\mu = 0,25/d$ und in Batch II $\mu = 0,34/d$ (siehe Tab. 3.7). Die Konzentrationen an R24 Antikörper im Verlauf der Kultivierung sind in Abb. 3.14 dargestellt. Die Antikörperausbeuten können Tab. 3.15 entnommen werden.

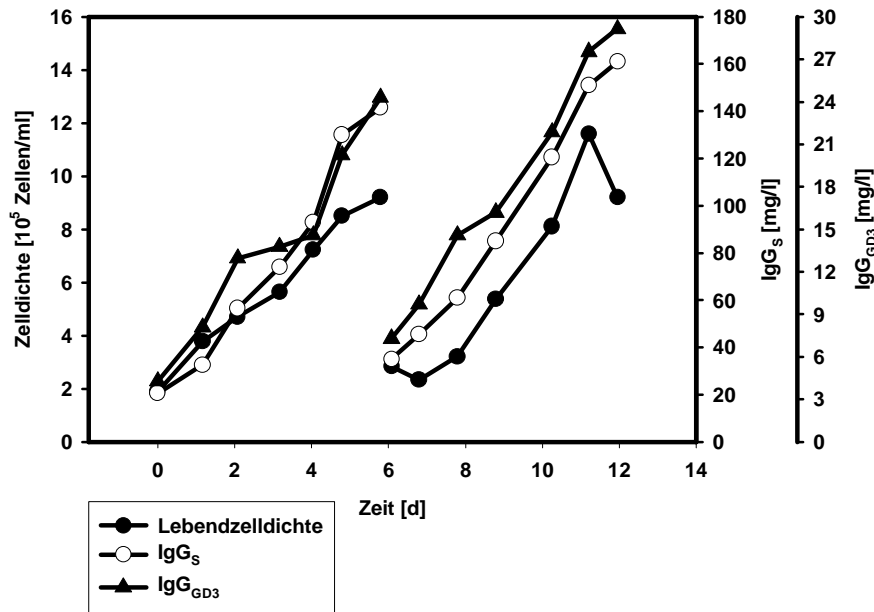


Abbildung 3.14: Lebendzellendichte und R24-Antikörperkonzentration einer zweifach satzweisen Kultivierung der Maushybridomzelle HB-8445 im 2-Liter-Bioreaktor bei einem pH-Wert von 6,9 im Kulturmedium. IgG_S: ermittelt durch Sandwich-ELISA (siehe 2.6.1.2); IgG_{GD3}: ermittelt durch GD₃ Bindungs-ELISA (siehe 2.6.1.3).

Die Produktion des R24 Antikörpers (siehe Abb. 3.14) korrelierte in beiden Batches mit dem Wachstum und nahm während des Kulturverlaufes bis zu einer maximalen Konzentration von IgG_S = 141,7 mg/l in Batch I und 161,0 mg/l in Batch II kontinuierlich zu. Die spezifischen Produktionsraten betragen in Batch I $43,5 \mu\text{g} \cdot 10^{-6} \text{ Zellen} \cdot \text{d}^{-1}$ und in Batch II $42,3 \mu\text{g} \cdot 10^{-6} \text{ Zellen} \cdot \text{d}^{-1}$. Die Konzentration an GD₃-bindendem R24 im Kulturüberstand betrug am Ende des Batch I $24,3 \mu\text{g} \cdot 10^{-6} \text{ Zellen} \cdot \text{d}^{-1}$ und $29,1 \mu\text{g} \cdot 10^{-6} \text{ Zellen} \cdot \text{d}^{-1}$ am Ende der Kultivierung (siehe Tab. 3.7).

Die Glukose-, Laktat- und NH₄⁺-Konzentrationen im Verlauf der Kultivierung sind in Abb. 3.15 dargestellt. Das Zellwachstum war nicht durch Glukosemangel limitiert. Die Glukose-Konzentrationen am Ende der Batches I und II betragen jeweils 13,6 bzw. 14,1 mM. Sowohl die Laktat-Konzentrationen von 6,3 bzw. 4,8 mM als auch die NH₄⁺-Konzentrationen von 4,3 bzw. 4,2 mM in den Batches I und II erreichten keine toxischen Werte. Die Produktions- und Verbrauchsdaten können Tab. 3.7 entnommen werden.

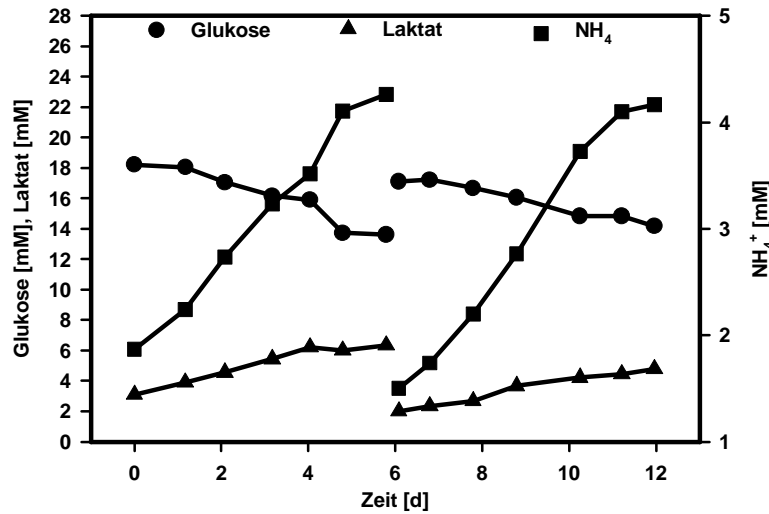


Abbildung 3.15: Glukose-, Laktat- und NH₄⁺-Konzentrationen im Überstand einer zweifach satzweisen Kultivierung der Maushybridomzelllinie HB-8445 im 2-Liter-Bioreaktor bei einem pH-Wert von 6,9.

In der Tab. 3.7 sind die wichtigsten spezifischen Produktions- und Verbrauchsdaten der Kultivierung bei einem pH-Wert von 6,9 im Kulturmedium zusammengefaßt.

Tabelle 3.7: Wachstums-, Verbrauchs- und Produktionsraten in der exponentiellen Wachstumsphase einer Repeated-Batch-Produktion des monoklonalen Antikörpers R24 im 2-Liter-Bioreaktor mit dem Puffersystem CO₂/HCO₃⁻ bei pH 6,9.

	μ [d ⁻¹]	q_{Glc}	p_{Lac}	q_{Gln}	p_{NH_3}	p_{IgG_S}	$p_{IgG_{GD3}}$	q_{O_2}
		[$\frac{mmol}{10^6 \text{ Zellen} \cdot d}$] ^a				[$\frac{\mu g}{10^6 \text{ Zellen} \cdot d}$] ^b		[$\frac{\mu mol}{10^6 \text{ Zellen} \cdot d}$]
Batch I ^c	0,25	1,75	1,26	1,12	0,95	43,5	4,26	2,65
Batch II ^d	0,34	1,32	1,04	1,24	1,09	42,3	5,49	2,68

^a Diese Einheit gilt für die Glukose- und Glutaminverbrauchsdaten und für die Laktat- und Ammoniumproduktionsdaten.

^b Diese Einheit gilt für die Antikörperproduktionsdaten.

^c Zeitintervall des exponentiellen Wachstums t = 0,1 bis t = 4,9 d

^d Zeitintervall des exponentiellen Wachstums t = 7,0 bis t = 11,0 d

Die Ermittlung der spezifischen Raten erfolgte rechnergestützt unter Verwendung des Simulationsprogramms „Madonna for Windows“.

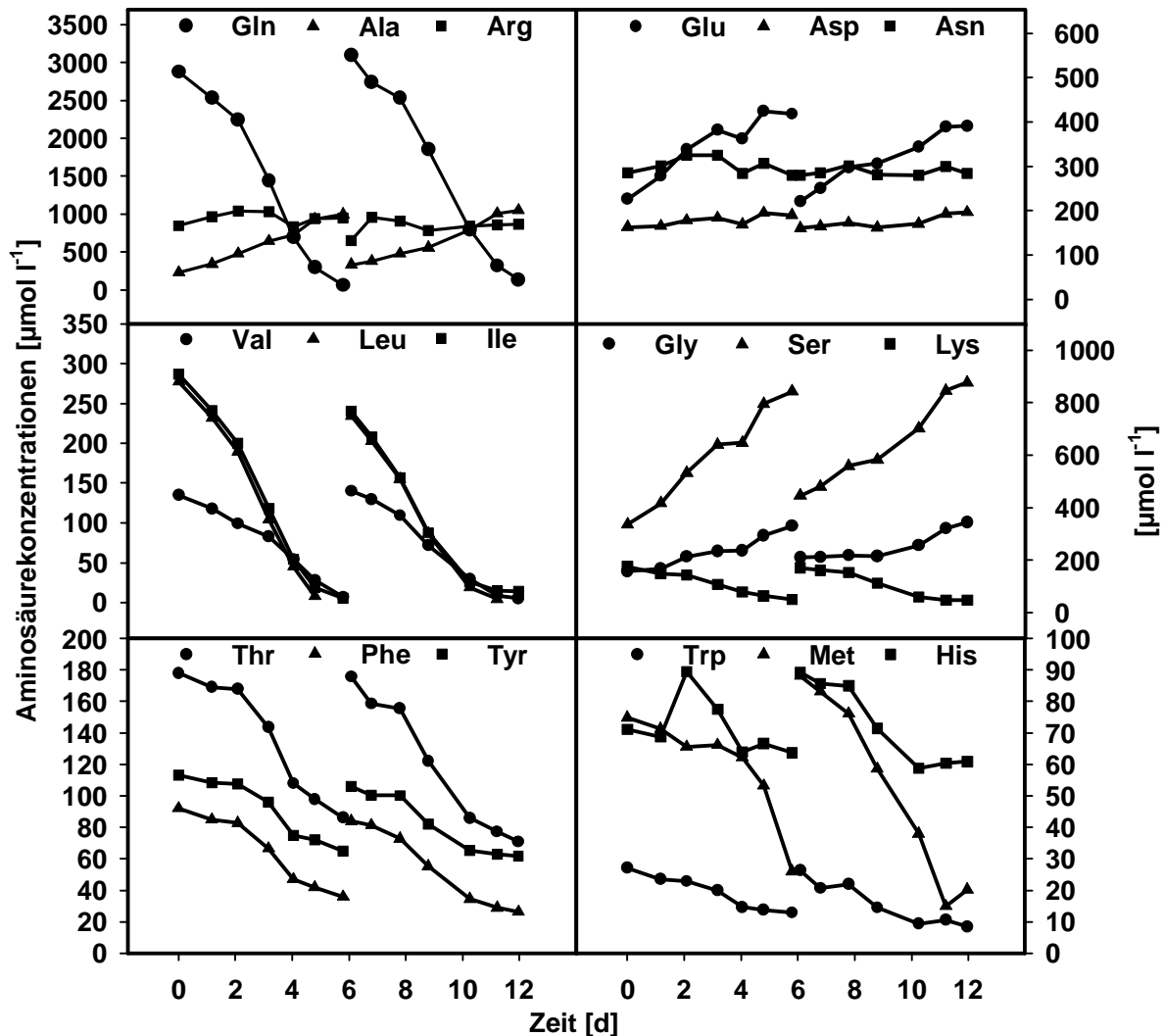


Abbildung 3.16: Aminosäurekonzentrationen im Überstand einer zweifach satzweisen Kultivierung der Maushybridomzelllinie HB-8445 im 2-Liter-Bioreaktor bei einem pH-Wert von 6,9.

Die Glutaminverbrauchsrate betrug in den Batches I und II 4,49 bzw. 3,64 mmol 10^{-6} Zellen d^{-1} , und die Glutamin-Konzentration war zum Batchende auf 63,2 bzw. 135,6 μM abgesunken (siehe Abb. 3.16). Gleichzeitig stieg die Glutamat-Konzentration auf 418 bzw. 390 $\mu\text{mol l}^{-1}$ an. Die Aminosäuren Histidin, Threonin, Tyrosin, Methionin, Phenylalanin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Valin und Tryptophan wurden während des Zellwachstums verbraucht, wobei nur Leucin jeweils am Ende der Batches erschöpft war. Die Konzentrationen von Aspartat, Asparagin und Arginin veränderten sich während der Kultivierung kaum. Glycin, Serin und Alanin wurden von den Zellen produziert, wobei der Gehalt an Alanin am stärksten anstieg, und zwar von 230 auf 997 $\mu\text{mol l}^{-1}$ in Batch I und von 332 auf 1050 $\mu\text{mol l}^{-1}$ in Batch II.

Um Rückschlüsse auf den Energie-Stoffwechsel der Zellen ziehen zu können (siehe Kap. 3.2.5.6), wurden die in Tab. 3.8 aufgelisteten Quotienten der Glukose- und Glutaminverbrauchsrate und der Laktat- und Antikörperproduktionsrate berechnet.

Tabelle 3.8: Quotienten ausgewählter metabolischer Verbrauchs- und Produktionsraten nach Tab. 3.7

	q_{Glc}/p_{Lac}	q_{Glc}/q_{Gln}	$q_{Glc}/p_{IgG_S}^a$	$q_{Gln}/p_{IgG_S}^a$
Batch I	1,39	1,56	40	26
Batch II	1,28	1,06	31	29

^a in $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$

3.2.5.4 Kultivierung unter Verwendung eines HEPES-Puffersystems

Zur Produktion von R24 Antikörpern im HEPES-gepufferten Medium wurden die HB-8445 Hybridomzellen mit einer Zelldichte von $2,9 \times 10^5$ Zellen/ml bei 2 Liter Kulturvolumen in den Bioreaktor eingesät. Nach 5,0 Tagen wurden bei einer Zelldichte von $1,23 \times 10^6$ Zellen/ml 1,5 l Kultur geerntet (Batch I) und der Bioreaktor mit 1,5 l frischem Medium aufgefüllt. Die Viabilität der Kultur im Batch I betrug während der exponentiellen Wachstumsphase ($t = 0,9$ bis $t = 4,0$ d) im Durchschnitt 90 % und sank zum Ende auf 83 % ab.

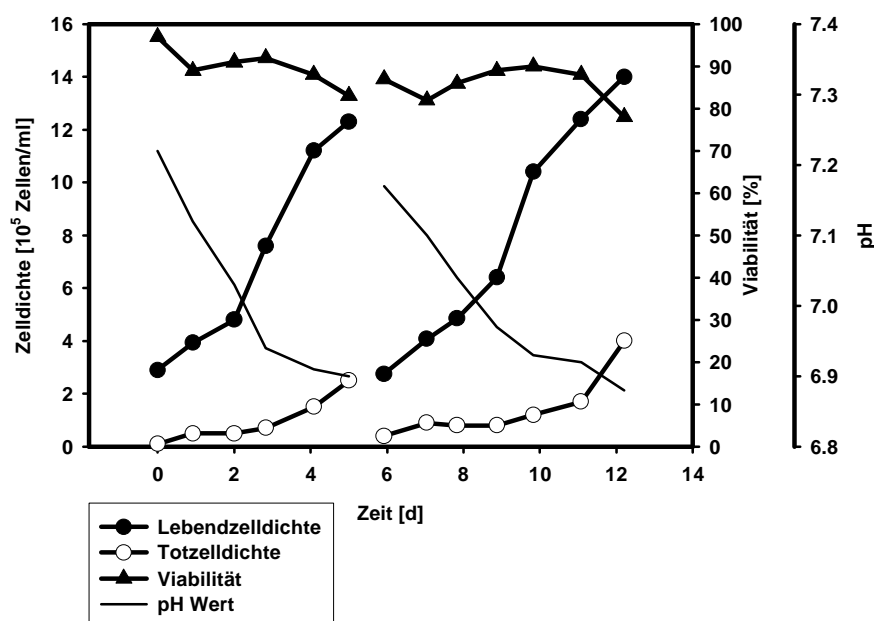


Abbildung 3.17: Lebend- und Totzellendichte, Viabilität und pH-Wert einer zweifach satzweisen Kultivierung der Maushybridomzelllinie HB-8445 im 2-Liter-Bioreaktor mit HEPES-gepuffertem Kulturmedium. Zum Zeitpunkt $t = 5,0$ d wurde die Kultur

zum Teil geerntet und frisches Medium aufgefüllt.

Nach dem Erreichen einer Zelldichte von $1,40 \times 10^6$ Zellen/ml zum Zeitpunkt $t = 12,2$ d wurde die Kultivierung abgebrochen und 2 l Kulturvolumen (Batch II) geerntet. Die Viabilität in Batch II betrug während der exponentiellen Wachstumsphase ($t = 7,0$ bis $t = 11,1$ d) im Durchschnitt 85 % und sank zum Ende auf 78 % ab.

Die spezifischen Wachstumsraten betragen in Batch I $\mu = 0,38/d$ und in Batch II $\mu = 0,28/d$ (siehe Tab. 3.9). Die Konzentrationen an R24 Antikörper im Verlauf der Kultivierung sind in Abb. 3.18 dargestellt. Die Antikörperausbeuten können Tab. 3.15 entnommen werden.

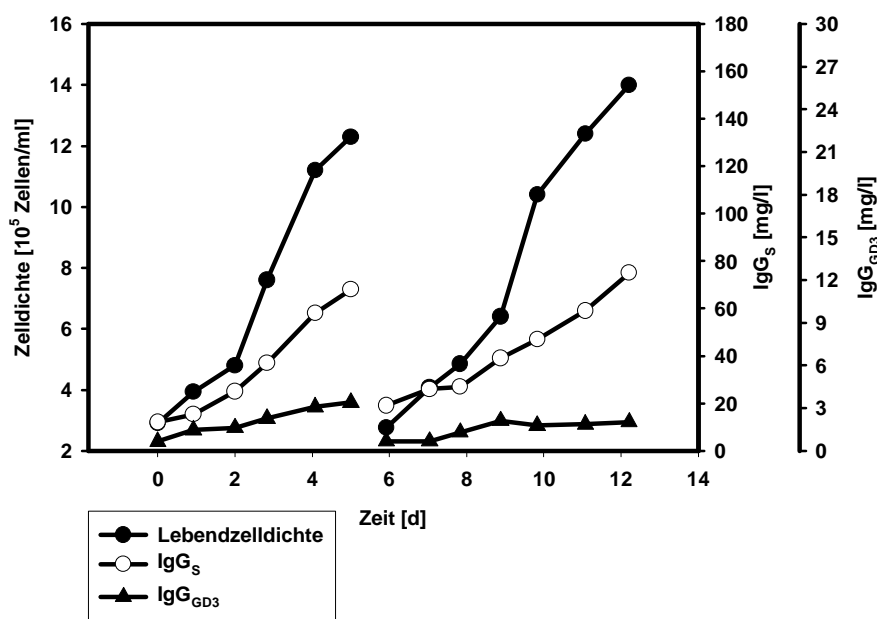


Abbildung 3.18: Lebendzellendichte und R24-Antikörperkonzentration einer zweifach satzweisen Kultivierung der Maushybridomzelllinie HB-8445 im 2-Liter-Bioreaktor mit HEPES-gepuffertem Kulturmedium. IgG_S : ermittelt durch Sandwich-ELISA (siehe Kap. 2.6.1.2); IgG_{GD3} : ermittelt durch G_{D3} Bindungs-ELISA (siehe Kap. 2.6.1.3).

Die Produktion des R24 Antikörpers (siehe Abb. 3.18) korrelierte in beiden Batches mit dem Wachstum und nahm während des Kulturverlaufes bis zu einer maximalen Konzentration von $IgG_S = 68,4$ mg/l in Batch I und 75,2 mg/l in Batch II kontinuierlich zu. Die spezifischen Produktionsraten betragen in Batch I $21,5 \mu g 10^{-6}$ Zellen d^{-1} und in Batch II $11,1 \mu g 10^{-6}$ Zellen d^{-1} . Die Konzentration an G_{D3} -bindendem R24 im Kulturüberstand betrug am Ende des Batch I $3,4 \mu g 10^{-6}$ Zellen d^{-1} und $2,0 \mu g 10^{-6}$ Zellen d^{-1} am Ende der Kultivierung (siehe Tab. 3.9).

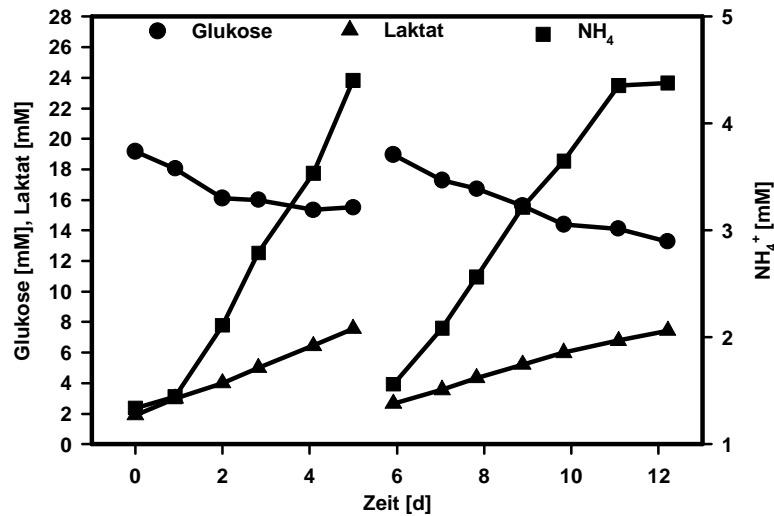


Abbildung 3.19: Glukose-, Laktat- und NH_4^+ -Konzentrationen im Überstand einer zweifach satzweisen Kultivierung der Maushybridomzelllinie HB-8445 im 2-Liter-Bioreaktor mit HEPES-gepuffertem Kulturmedium.

Die Glukose-, Laktat- und NH_4^+ -Konzentrationen im Verlauf der Kultivierung sind in Abb. 3.19 dargestellt. Das Zellwachstum war nicht durch Glukosemangel limitiert. Die Glukose-Konzentrationen am Ende der Batches I und II betrug 15,5 bzw. 13,3 mM. Sowohl die Laktat-Konzentrationen von 7,6 bzw. 7,4 mM als auch die NH_4^+ -Konzentrationen von jeweils 4,4 mM in den Batches I und II erreichten keine toxischen Werte. Die Produktions- und Verbrauchsdaten können Tab. 3.9 entnommen werden.

Die Glutaminverbrauchsrate betrug in den Batches I und II 2,77 bzw. 2,91 $\text{mmol } 10^{-6} \text{ Zellen d}^{-1}$, und die Glutamin-Konzentration war zum Batchende auf 322 bzw. 6 μM abgesunken (siehe Abb. 3.20). Gleichzeitig stieg die Glutamat-Konzentration auf jeweils 505 $\mu\text{mol l}^{-1}$ an. Die Aminosäuren Histidin, Threonin, Tyrosin, Methionin, Phenylalanin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Valin und Tryptophan wurden während des Zellwachstums verbraucht, wobei Tryptophan zum Ende der Batches erschöpft war. Die Konzentrationen von Aspartat, Asparagin, Arginin und Glycin veränderten sich während der Kultivierung kaum. Serin und Alanin wurden von den Zellen produziert, wobei der Gehalt an Alanin am stärksten anstieg, und zwar von 162 auf 848 $\mu\text{mol l}^{-1}$ in Batch I und in Batch II von 275 auf 999 $\mu\text{mol l}^{-1}$ in Batch II.

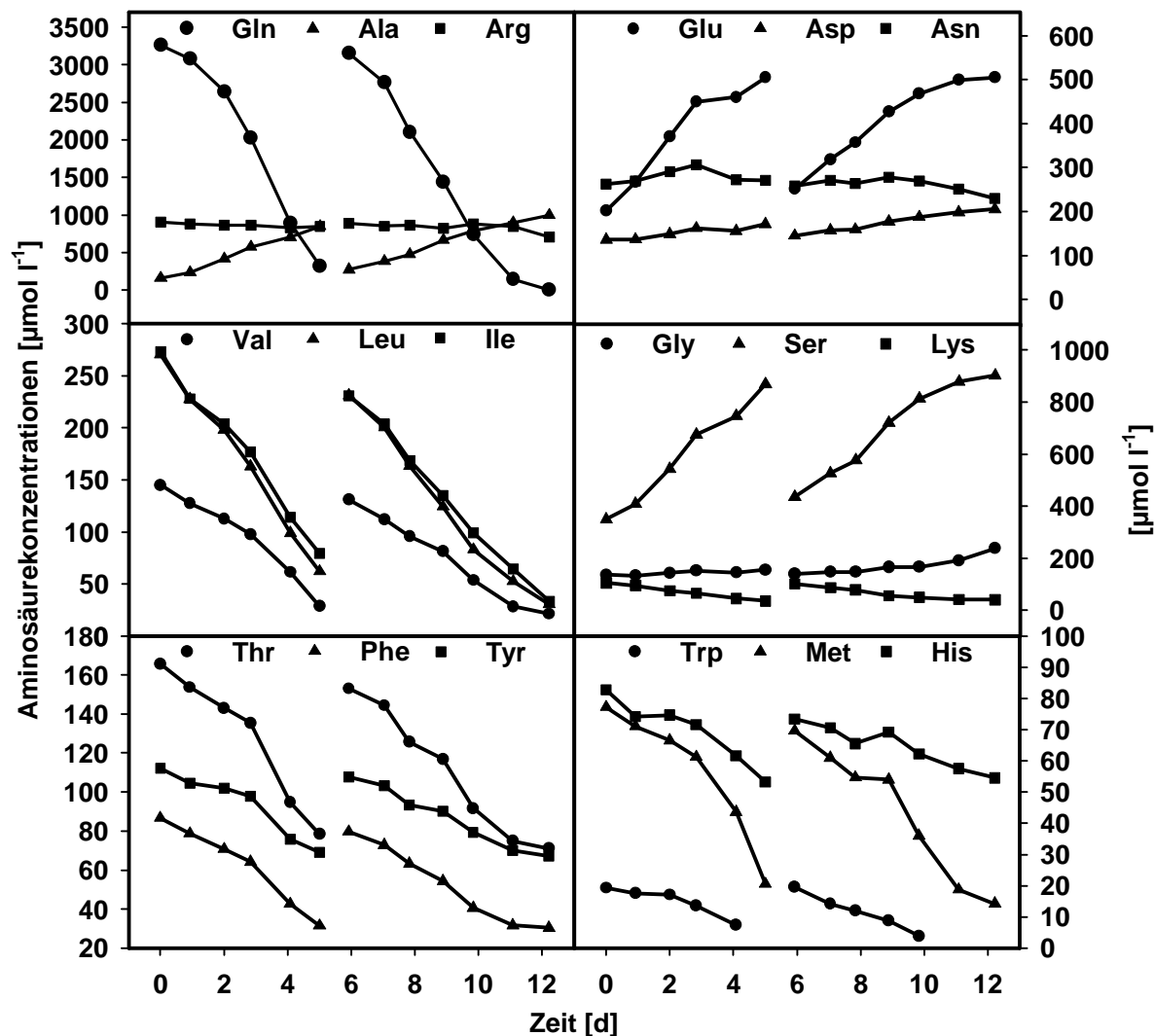


Abbildung 3.20: Aminosäurekonzentrationen im Überstand einer zweifach satzweisen Kultivierung der Maushybridomzelllinie HB-8445 im 2-Liter-Bioreaktor mit HEPES-gepuffertem Kulturmedium.

In der Tab. 3.9 sind die wichtigsten spezifischen Produktions- und Verbrauchsdaten der Kultivierung im HEPES-gepufferten Kulturmedium zusammengefasst.

Tabelle 3.9: Wachstums-, Verbrauchs- und Produktionsraten in der exponentiellen Wachstumsphase einer Repeated-Batch-Produktion des monoklonalen Antikörpers R24 im 2-Liter-Bioreaktor mit dem HEPES-Puffersystem.

	μ [d ⁻¹]	q_{Glc}	p_{Lac}	q_{Gln}	p_{NH3}	p_{IgG_S}	$p_{IgG_{GD3}}$	q_{O_2}
			$\left[\frac{mmol}{10^6 \text{ Zellen} \cdot d}\right]^a$			$\left[\frac{\mu g}{10^6 \text{ Zellen} \cdot d}\right]^b$		$\left[\frac{\mu mol}{10^6 \text{ Zellen} \cdot d}\right]$
Batch I ^c	0,38	2,08	1,99	1,05	1,34	21,5	0,82	2,47
Batch II ^d	0,28	1,06	1,02	0,81	0,71	11,1	0,33	1,73

^a Diese Einheit gilt für die Glukose- und Glutaminverbrauchsdaten und für die Laktat- und Ammoniumproduktionsraten.

^b Diese Einheit gilt für die Antikörperproduktionsraten.

^c Zeitintervall des exponentiellen Wachstums $t = 0,9$ bis $t = 4,0$ d

^d Zeitintervall des exponentiellen Wachstums $t = 7,0$ bis $t = 11,1$ d

Die Ermittlung der spezifischen Raten erfolgte rechnergestützt unter Verwendung des Simulationsprogramms „Madonna for Windows“.

Um Rückschlüsse auf den Energie-Stoffwechsel der Zellen ziehen zu können (siehe Kap. 3.2.5.6), wurden die in Tab. 3.10 aufgelisteten Quotienten der Glukose- und Glutaminverbrauchsdaten und der Laktat- und Antikörperproduktionsraten berechnet.

Tabelle 3.10: Quotienten ausgewählter metabolischer Verbrauchs- und Produktionsraten nach Tab. 3.9

	q_{Glc}/p_{Lac}	q_{Glc}/q_{Gln}	$q_{Glc}/p_{IgG_S}^a$	$q_{Gln}/p_{IgG_S}^a$
Batch I	1,04	1,98	97	49
Batch II	1,03	1,31	96	73

^a in $\mu mol/\mu g$

3.2.5.5 Kultivierung im 1-l-SuperSpinner

Zur Produktion von R24 Antikörpern im 1-Liter-SuperSpinner wurden die HB-8445 Hybridomzellen mit einer Zelldichte von $3,0 \times 10^5$ Zellen/ml bei 0,9 Liter Kulturvolumen in den Bioreaktor eingesät. Nach 4,1 Tagen wurden bei einer Zelldichte von $1,49 \times 10^6$ Zellen/ml 0,7 l Kultur geerntet (Batch I) und der Bioreaktor mit 0,7 l frischem Medium aufgefüllt. Die Viabilität der Kultur im Batch I betrug während der exponentiellen Wachstumsphase ($t = 0,1$ bis $t = 3$ d) im Durchschnitt 92 % und sank zum Ende auf 83 % ab. Bei einer Zelldichte von $1,90 \times 10^6$ Zellen/ml zum Zeitpunkt $t = 7,1$ d wurde die Kultivierung abgebrochen und 0,9 l Kulturvolumen (Batch II) geerntet. Die Viabilität in Batch II betrug während der exponentiellen Wachstumsphase ($t = 4,0$ bis $t = 7,0$ d) im Durchschnitt 95 % und sank zum Ende auf 90 % ab. Die höchste erreichte Lebendzellendichte im Batch II betrug $2,03 \times 10^6$ Zellen/ml zum Zeitpunkt $t = 6,8$ d.

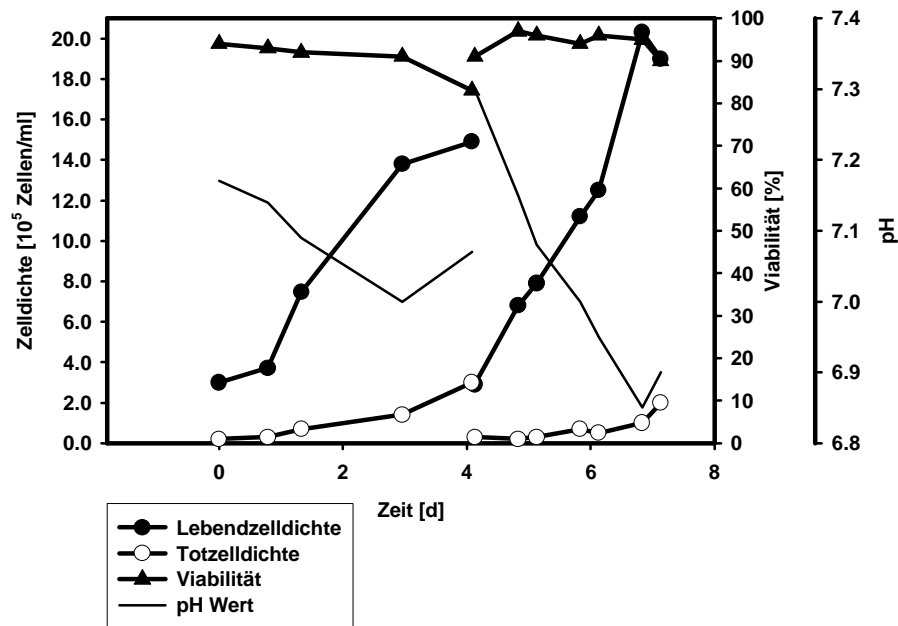


Abbildung 3.21: Lebend- und Totzellendichte, Viabilität und pH-Wert einer zwei-fach satzweisen Kultivierung der Maushybridomzelllinie HB-8445 im 1-Liter-SuperSpinner. Zum Zeitpunkt $t = 4,1$ d wurde die Kultur zum Teil geerntet und frisches Medium aufgefüllt.

Die spezifischen Wachstumsraten betragen in Batch I $\mu = 0,49/d$ und in Batch II $\mu = 0,60/d$ (siehe Tab. 3.11). Die Konzentrationen an R24 Antikörper im Verlauf der Kultivierung sind in Abb. 3.22 dargestellt. Die Antikörperausbeuten können Tab. 3.15 entnommen werden.

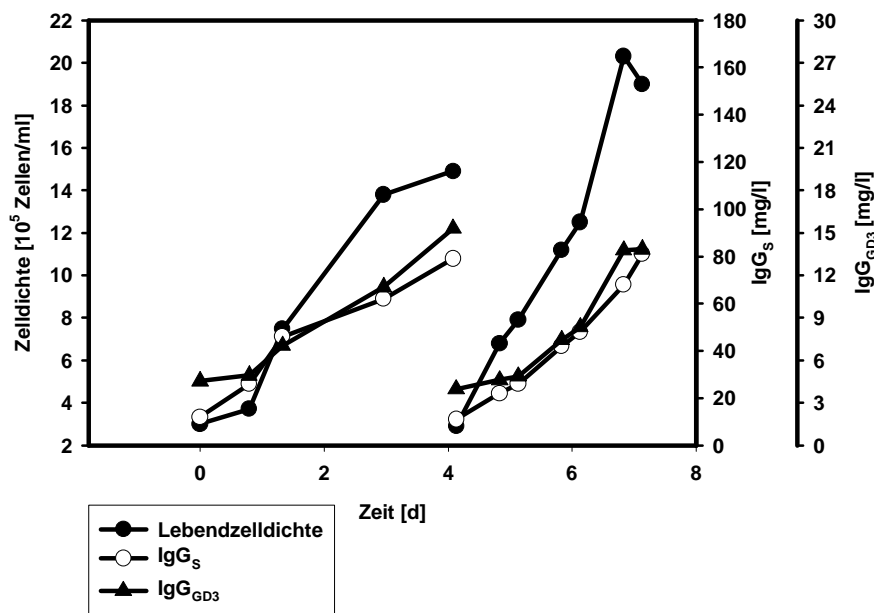


Abbildung 3.22: Lebendzellendichte und R24-Antikörperkonzentration einer zwei-

fach satzweisen Kultivierung der Maushybridomzelllinie HB-8445 im 1-Liter-SuperSpinner. IgG_S: ermittelt durch Sandwich-ELISA (siehe 2.6.1.2); IgG_{GD3}: ermittelt durch G_{D3} Bindungs-ELISA (siehe 2.6.1.3).

Die Produktion des R24 Antikörpers (siehe Abb. 3.22) korrelierte in beiden Batches mit dem Wachstum und nahm während des Kulturverlaufes bis zu einer maximalen Konzentration von IgG_S = 79,0 mg/l in Batch I und 81,0 mg/l in Batch II kontinuierlich zu. Die spezifischen Produktionsraten betragen in Batch I $20,5 \mu\text{g } 10^{-6}$ Zellen d⁻¹ und in Batch II $20,8 \mu\text{g } 10^{-6}$ Zellen d⁻¹ (siehe Tab. 3.11). Die Konzentration an G_{D3}-bindendem R24 im Kulturüberstand betrug am Ende des Batch I $15,4 \mu\text{g } 10^{-6}$ Zellen d⁻¹ und $14,0 \mu\text{g } 10^{-6}$ Zellen d⁻¹ am Ende der Kultivierung.

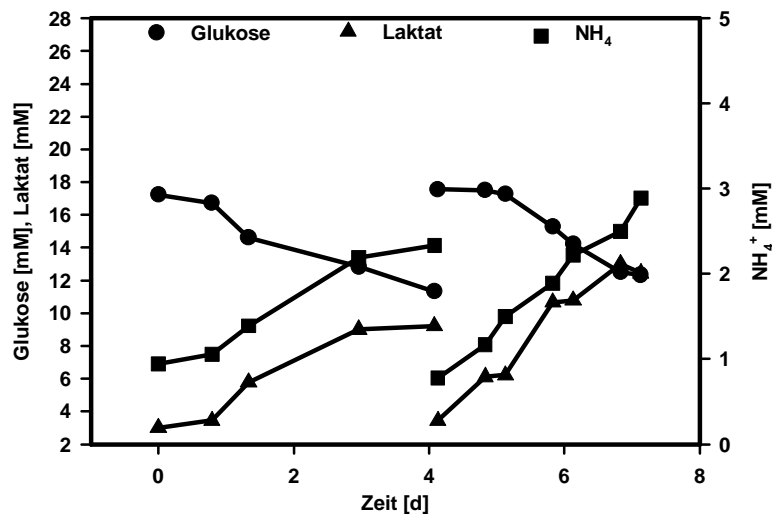


Abbildung 3.23: Glukose-, Laktat- und NH₄⁺-Konzentrationen im Überstand einer zweifach satzweisen Kultivierung der Maushybridomzelllinie HB-8445 im 1-Liter-SuperSpinner.

Die Glukose-, Laktat- und NH₄⁺-Konzentrationen im Verlauf der Kultivierung sind in Abb. 3.23 dargestellt. Das Zellwachstum war nicht durch Glukosemangel limitiert. Die Glukose-Konzentrationen am Ende der Batches I und II war 11,3 bzw. 12,3 mM. Sowohl die Laktat-Konzentrationen von 9,2 bzw. 12,4 mM als auch die NH₄⁺-Konzentrationen von 2,3 bzw. 2,9 mM in den Batches I und II erreichten keine toxischen Werte. Die Produktions- und Verbrauchsdaten können der Tab. 3.11 entnommen werden.

Die Glutaminverbrauchsrate betrug in den Batches I und II $1,52$ bzw. $1,29 \text{ mmol } 10^{-6}$ Zellen d⁻¹. Glutamin war am Ende von Batch I verbraucht, und die Glutamin-Konzentration war zum Ende von Batch II auf $77 \mu\text{M}$ abgesunken (siehe Abb. 3.24). Gleichzeitig stieg die Glutamat-Konzentration auf 493 bzw. $409 \mu\text{mol l}^{-1}$ an. Die Aminosäuren Histidin, Threonin, Tyrosin, Methionin, Phenylalanin, Isoleucin, Leucin, Valin und Lysin wurden während des Zellwachstums verbraucht. Nur Tryptophan war jeweils zum Ende der beiden Batches erschöpft. Die Konzentrationen von

Aspartat, Asparagin und Arginin veränderten sich während der Kultivierung kaum. Glycin, Serin und Alanin wurden von den Zellen produziert, wobei der Gehalt an Alanin am stärksten anstieg, und zwar von 293 auf 1009 $\mu\text{mol l}^{-1}$ in Batch I und in Batch II von 265 auf 1019 $\mu\text{mol l}^{-1}$.

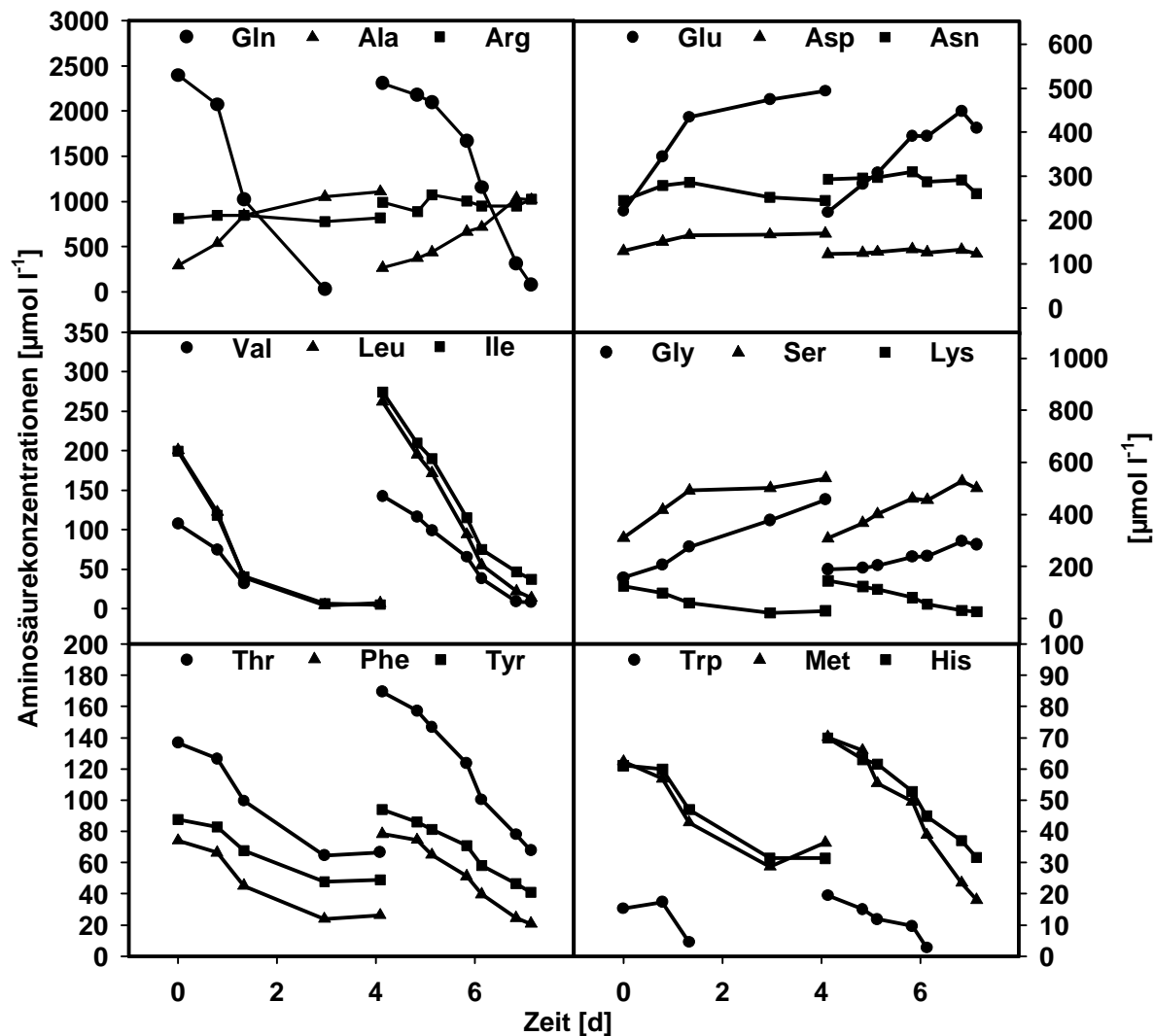


Abbildung 3.24: Aminosäurekonzentrationen im Überstand einer zweifach satzweisen Kultivierung der Maushybridomzelllinie HB-8445 im 1-Liter-SuperSpinner.

In der Tab. 3.11 sind die wichtigsten spezifischen Produktions- und Verbrauchs-raten der Kultivierung im 1-Liter-SuperSpinner zusammengefasst. Die spezifische Sauerstoffverbrauchsrate konnte in diesem Kultivierungssystem auf Grund der nicht vorhandenen Meßeinrichtung zur Registrierung des Sauerstoffpartialdruckes nicht ermittelt werden.

Tabelle 3.11: Wachstums-, Verbrauchs- und Produktionsraten in der exponentiellen Wachstumsphase einer Repeated-Batch-Produktion des monoklonalen Antikörpers R24 im 1-Liter-SuperSpinner.

	μ [d ⁻¹]	q_{Glc}	p_{Lac}	q_{Gln}	p_{NH3}	p_{IgG_S}	$p_{IgG_{GD3}}$	q_{O_2}
		[$\frac{mmol}{10^6 \text{ Zellen} \cdot d}$] ^a				[$\frac{\mu g}{10^6 \text{ Zellen} \cdot d}$] ^b		[$\frac{\mu mol}{10^6 \text{ Zellen} \cdot d}$]
Batch I ^c	0,49	1,94	2,74	0,74	0,57	20,5	3,12	n.b.
Batch II ^d	0,60	2,09	3,52	0,77	0,63	20,8	3,77	n.b.

^a Diese Einheit gilt für die Glukose- und Glutaminverbrauchsrate und für die Laktat- und Ammoniumproduktionsrate.

^b Diese Einheit gilt für die Antikörperproduktionsrate.

^c Zeitintervall des exponentiellen Wachstums $t = 0,1$ bis $t = 3,0$ d

^d Zeitintervall des exponentiellen Wachstums $t = 4,0$ bis $t = 7,0$ d

n.b.: nicht bestimmt

Die Ermittlung der spezifischen Raten erfolgte rechnergestützt unter Verwendung des Simulationsprogramms „Madonna for Windows“.

Um Rückschlüsse auf den Energie-Stoffwechsel der Zellen ziehen zu können (siehe Kap. 3.2.5.6), wurden die in Tab. 3.12 abgebildeten Quotienten der Glukose- und Glutaminverbrauchsrate und der Laktat- und Antikörperproduktionsrate berechnet.

Tabelle 3.12: Quotienten ausgewählter metabolischer Verbrauchs- und Produktionsrate nach Tab. 3.11

	q_{Glc}/p_{Lac}	q_{Glc}/q_{Gln}	q_{Glc}/p_{IgG_S} ^a	q_{Gln}/p_{IgG_S} ^a
Batch I	0,71	2,62	95	36
Batch II	0,59	2,71	100	37

^a in $\mu mol/\mu g$

3.2.5.6 Vergleich der Wachstums-, Verbrauchs- und der Produktionsrate von HB-8445 unter verschiedenen Kulturbedingungen

Wachstumsrate Üblicherweise werden Hybridome bei einem pH-Wert von 7,2 kultiviert, der aus Erfahrung die günstigsten Bedingungen für das Wachstum ergibt [57, 143]. Das bestätigt sich in einem Vergleich der spezifischen Wachstumsrate in Tabelle 3.13, aus der hervorgeht, daß die Wachstumsrate des kultivierten Zellklons von HB-8445 bei einem pH-Wert von 7,2 am höchsten war. Dabei war eine Steigerung der Wachstumsrate vom ersten zum zweiten Batch zu beobachten, was auf eine Adaption der Zellen an die für die Vermehrung günstigen Kulturbedingungen schließen läßt.

Sowohl bei einem saureren als auch basischeren pH-Wert des Kulturmediums als 7,2

stellte sich eine geringere Wachstumsrate der Zellen ein. Im Basischen, bei pH 7,4, betrug die durchschnittliche Wachstumsrate 74 % von derjenigen bei pH 7,2.

Tabelle 3.13: Wachstums- und R24 Produktionsraten während der Repeated-Batch-Produktion des monoklonalen Antikörpers R24 im 2-Liter-Bioreaktor mit den Puffersystemen $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ (pH-Wert 7,4; 7,2 und 6,9) und HEPES und im SuperSpinner-Kultursystem.

	pH 7,4	pH 7,2	pH 6,9	HEPES	SuperSpinner
Wachstumsrate ^a					
μ [d^{-1}]	0,40	0,54	0,30	0,33	0,55
Produktionsraten ^a					
$\left[\frac{\mu\text{g}}{10^6 \text{ Zellen d}} \right]$ IgG					
p_{IgG_S}	10,8	14,9	42,9	16,3	20,7
$p_{IgG_{D3}}$	2,34 ^b	2,42	4,88	0,58	3,45
Produktionsraten ^a					
$\left[\frac{\text{mmol}}{10^6 \text{ Zellen d}} \right]$					
p_{Lac}	6,83	4,90	1,15	1,51	3,13
p_{NH_3}	0,75	1,22	1,02	1,03	0,60
Verbrauchsraten ^a					
$\left[\frac{\text{mmol}}{10^6 \text{ Zellen d}} \right]$					
q_{Glc}	4,56	3,46	1,54	1,57	2,02
q_{Gln}	1,00	1,26	1,18	0,93	0,76

^a Arithmetischer Mittelwert gebildet aus den Raten der Batches I und II

^b $p_{IgG_{D3}}$ des ersten und des zweiten Batches wichen stark voneinander ab (siehe Tab. 3.3).

Die Kultivierung der HB-8445 Hybridomzelllinie bei einem pH-Wert von 6,9 zeigte, daß die spezifische Wachstumsrate unter diesen relativ sauren Bedingungen nur gut die Hälfte (55 %) derjenigen betrug, wie sie bei einem pH-Wert von 7,2 erreicht wurde.

Ein vergleichbar hohe Wachstumsrate wie bei einem pH-Wert von 7,2 wiesen die Zellen im 1-Liter-SuperSpinner auf, bei dem zu Beginn des jeweiligen Batches bis zu einer Zelldichte von fast 1×10^6 Zellen/ml ein pH-Wert von größer 7,05 vorlag, was ein für das Wachstum günstiger Bereich zu sein scheint. Erst gegen Ende der Batches, bei Zelldichten von über $1,2 \times 10^6$ Zellen/ml, sank der pH-Wert des Kulturmediums unter 7,0.

Im ungerregelten, mit HEPES-gepufferten, Kultursystem wuchsen die Zellen vergleichsweise langsam. Die Wachstumsrate erreichte hier nur 61 % im Vergleich zur Kultur bei pH 7,2 im $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferten System. Verglichen mit dem ebenfalls

ungeregelten SuperSpinner, der über den Kulturverlauf ähnlichen pH-Werte zeigte, führte der Einsatz von HEPES als Puffersubstanz zu einer deutlichen Reduzierung der Wachstumsrate von 60 % der Wachstumsrate bei pH 7,2.

Antikörperproduktionsraten Für die Produktion von R24 Antikörpern war ein pH-Wert von 6,9 am günstigsten. Trotz der niedrigen Wachstumsrate wurde für die spezifische Produktionsrate ein Wert erreicht, der im Durchschnitt 180% über der der Kultivierung bei einem pH-Wert von 7,2 lag. Die spezifische Produktionsrate $q_{IgG_{GD3}}$, als ein Maß für die Qualität des Antikörpers, zeigt ein ähnliches Verhalten wie die spezifische Produktionsrate q_{IgG_S} .

Bei der Adaption der Zellen an pH 7,4 kam es zu einem ähnlich hohen Verlust an Antikörperproduktivität, verglichen mit der optimalen Kultur bei pH 6,9, wie er schon bei pH 7,2 zu beobachten war, was sich in den erniedrigten spezifischen Produktionsraten q_{IgG_S} und $q_{IgG_{GD3}}$ widerspiegelt.

Im unregelmäßig SuperSpinner war eine vergleichsweise hohe Antikörperproduktivität festzustellen, die im Durchschnitt um 39 % höher lag als bei pH 7,2. Im Gegensatz zur Kultivierung bei einem pH-Wert von 7,2 nahm die spezifische Produktionsrate im SuperSpinner im zweiten Batch nicht ab, sondern blieb konstant. Eine Adaption der Zelllinie mit der Folge geringerer Produktivität scheint unter diesen pH-Wert-Bedingungen verhindert zu sein oder nur verlangsamt zu erfolgen. Längerfristige Kultivierungsversuche zeigten aber auch im SuperSpinner einen Verlust an Produktivität nach 11 Passagen, wie in Kap. 3.1.2.2 beschrieben wurde. Es ist somit wahrscheinlich, daß für die Entwicklung der Produktivität dieser Zelllinie im 1-Liter-SuperSpinner im Repeated-Batch-Verfahren unter anderem ausschlaggebend ist, bei welchen Zelldichten und welchem pH-Wert ein neuer Batch gestartet wird.

Bei der Kultivierung mit HEPES-gepuffertem Medium war im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Systemen mit CO_2/HCO_3^- -Pufferung eine divergente Entwicklung der IgG Antikörperproduktion und des G_{D3} -Bindungsvermögens zu beobachten (siehe Abb. 3.18). Wie aus der Tabelle 3.13 zu entnehmen ist, betrug in dem HEPES-gepuffertem System die Produktionsrate $q_{IgG_{GD3}}$ nur ca. 3 % von q_{IgG_S} . Im Vergleich dazu wurden bei den anderen Kultivierungen 10 % bis 15 % detektiert. Die Qualität des Antikörpers (seine Fähigkeit G_{D3} zu binden) der HEPES-Kultur war also im Vergleich zu den anderen Systemen schlecht. Er besaß nur 1/3 oder weniger an G_{D3} -Bindungsfähigkeit im Vergleich zu den in den anderen Systemen produzierten Antikörpern. Zu IgG_{GD3} als Wert für die Konzentration des G_{D3} -bindenden Antikörpers muß einschränkend hinzugefügt werden, daß seine absolute Größe, speziell im Vergleich zu IgG_S , nur als Näherung für die realen Konzentrationen herangezogen werden kann. Er bezieht sich auf einen Standard aus einer Referenzaufarbeitung des R24 Antikörpers, dessen Konzentration mit dem Sandwich-ELISA bestimmt wurde. Es war also kein Standard-Antikörper mit 100 %-tiger Bindungsfähigkeit, sondern ein reiner „Bezugsantikörper“. Ein Vergleich der ermittelten IgG_{GD3} -Werte und der entsprechenden Produktionsraten untereinander ist jedoch gut möglich.

Bei den zur Produktion im HEPES-gepufferten System verwendeten Zellen handelte es sich um an diese Bedingungen adaptierte Zellen. Sie wiesen ein schlechteres Pro-

duktionsverhalten auf, als die der Produktionszellbank entnommenen Zellen. Wurden die an das HEPES-System adaptierten Zellen im bicarbonatgepufferten 1-Liter-SuperSpinner kultiviert, so konnte eine R24 Antikörperkonzentration von $\text{IgG}_S = 13 \text{ mg/l}$ bei einer Zelldichte von $1,2 \times 10^6$ Zellen/ml erzielt werden. Diese Antikörperkonzentration entspricht derjenigen, die bei Langzeitkultivierung nach 11 Passagen im 1-Liter-SuperSpinner gemessen wurde (siehe 3.1.2.2). Das G_{D_3} -Bindungsvermögen ($\text{IgG}_{\text{GD}_3} = 1,9 \text{ mg/l}$) dieses Antikörpers zeigte im Vergleich zur Antikörperkonzentration IgG_S eine gute Qualität des Antikörpers an, die der im $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferten System produzierten Antikörper ähnlich war. Die Qualität des Antikörpers ist somit sehr wahrscheinlich von den Kulturbedingungen abhängig, und nicht von den verschieden adaptierten Zellen.

In den oben beschriebenen 2-Liter-Bioreaktor- und 1-Liter-SuperSpinner-Kultivierungen der Hybridomzelle HB-8445 unter serumfreien Bedingungen konnten die Beobachtungen, die zuvor bei der unter 3.1.2 aufgeführten Kultivierung im 1-Liter-SuperSpinner bezüglich der Auswirkungen des pH-Wertes im Kulturmedium auf das Zellwachstum und die Antikörperproduktion bestätigt werden. Ein saurer pH-Wert im Kulturmedium führte zu einer Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit bei gleichzeitig erhöhter Antikörperproduktion.

Die Antikörperproduktion korrelierte in allen Kultursystemen in unterschiedlichem Ausmaß mit dem Wachstum der Zellen.

Die Beobachtung einer erhöhten Antikörperproduktion in einer Hybridomzelllinie bei einem erniedrigten pH-Wert deckt sich mit Daten von Hayter et al. (1992) [57], die ein pH-Wert Optimum von 6,8 für die Antikörperproduktionsrate feststellten. Ozturk et al. (1991) beschrieben eine Steigerung der Antikörperproduktionsrate um das Doppelte bei einer Erniedrigung des pH-Wertes unter 7,2 [143].

Miller et al. (2000) berichteten, daß die „pH-Wert Historie“ das Verhalten von Zellen bei einem gegebenen pH-Wert beeinflusst [117]. Unter der „pH-Wert Historie“ wurde dabei der Verlauf des pH-Wertes einer Kultur in den vorangegangenen Passagen bezeichnet. Diese Aussage deckt sich mit den Beobachtungen, die bei den Kultivierungen gemacht wurden, speziell bei einem Vergleich der Wachstums- und Produktionsraten des ersten und des zweiten Batches der jeweiligen Kultur. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Vermutung, daß es bei der Änderung des pH-Wertes einer Kultur zu längerfristigen Adaptionsvorgängen der Zellen oder vielleicht sogar eine Anreicherung einer Subpopulation kommt.

Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsraten Die Konzentrationsentwicklung von Glukose und Laktat im Kulturüberstand im Verlauf der Kultivierungen zeigte eine Abhängigkeit von den gewählten Kulturbedingungen, (siehe Tab. 3.13). Besonders auffällig sind hier die hohen Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsraten in den Kultivierungen bei pH 7,4 und 7,2. Ozturk et al. (1991) berichteten in ihren Untersuchungsergebnissen ebenfalls von einem Anstieg des Glukoseverbrauchs und der Laktatproduktion bei den Kultivierungen einer Maus Hybridomzelllinie bei basischen pH-Werten [143]. Bei niedrigen pH-Werten scheint der Stoffwechsel der Zellen derart umgestellt zu werden, daß im Vergleich zur verbrauchten Glukose rela-

tiv wenig Laktat produziert wurde (siehe Tab. 3.14). Dieses Verhalten konnte bei den Kulturen pH 6,9 und der zum Ende der Batches entstehenden sauren Bedingungen bei der HEPES-Kultur beobachtet werden.

Glutamin und NH_3 Die in der Kultur erreichten maximalen Ammoniumkonzentrationen sind unter allen Kulturbedingungen sehr ähnlich. Für das Wachstum von Hybridomzellen wird beschrieben, daß bei einem sehr basischem pH-Wert von 7,8 im Kulturmedium eine Konzentration von 4 mM NH_4Cl eine 50 %ige Wachstumsinhibition bewirkte [29]. Bei einem pH-Wert von 6,8 lag die NH_4Cl Konzentration für eine 50 %ige Wachstumsinhibition doppelt so hoch. Bei den oben beschriebenen Kultivierungen wurden diese kritischen Ammoniumkonzentrationen von über 4 mM erst zum Abschluß der jeweiligen Batches erreicht, und haben somit kaum einen Einfluß in der exponentiellen Wachstumsphase gehabt. In hochzellichten Kultursystemen würde die Ammoniumkonzentration als wachstumsinhibitorischer Faktor eine wichtigere Rolle spielen. In diesen Systemen ist es günstiger, bei niedrigen pH-Werten zu kultivieren. Unter diesen Bedingungen ist eine höhere Toleranz gegen Ammonium vorhanden, da bei einem niedrigen pH-Wert weniger NH_3 als wahrscheinlich inhibitorische Substanz vorhanden wäre, welches mit dem NH_4^+ -Ion im Gleichgewicht steht.

Ein Vergleich der Glutaminkonzentrationen im Kulturüberstand ergab bei allen Kultivierungen eine ähnliche Entwicklung bezogen auf die Zelldichte in der Kultur.

Quotienten der Produktions- und Verbrauchsdaten Die Quotienten in Tab. 3.14 geben Hinweise auf die Stoffwechselaktivitäten der Zellen unter den verschiedenen Kulturbedingungen.

Tabelle 3.14: Quotienten der Verbrauchs- und Produktionsraten während der Repeated-Batch-Produktion des monoklonalen Antikörpers R24 im 2-Liter-Bioreaktor im SuperSpinner Kultursystem.

	pH 7,4	pH 7,2	pH 6,9	HEPES	SuperSpinner
Quotienten ^a					
q_{Glc}/p_{Lac}	0,68	0,71	1,34	1,04	0,65
q_{Glc}/q_{Gln}	4,59	2,75	1,31	1,65	2,67
q_{Glc}/p_{IgG_S} ^b	445	264	36	97	98
q_{Gln}/p_{IgG_S} ^b	98	95	28	61	37

^a Arithmetischer Mittelwert gebildet aus den Raten der Batches I und II

^b in $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$

In der Kultivierung bei einem pH-Wert von 7,2 betrug der Quotient q_{Glc}/p_{Lac} 0,71. Bei einer leichten Verschiebung der Kulturbedingungen zum Sauren (pH 6,9) wurde im Vergleich zum Glukoseverbrauch weniger Laktat produziert, so daß der Quotient q_{Glc}/p_{Lac} mit 1,34 um 89 % höher war als bei pH 7,2. Eine Kultivierung bei pH 7,4

hatte hingegen, verglichen mit den Standardbedingungen bei pH 7,2, kaum Auswirkungen auf das Verhältnis des Glukoseverbrauchs zur Laktatproduktion.

Der Quotient q_{Glc}/q_{Gln} gibt einen Hinweis auf das Verhältnis der Nutzung von Glukose oder Glutamin als C-Quelle im Stoffwechsel der Zellen. In der Kultivierung bei einem pH-Wert von 7,4 war der Quotient q_{Glc}/q_{Gln} um 67 % größer, und bei pH 6,9 um 52 % niedriger als bei pH 7,2. Die Hybridomzellen scheinen also ihren Energiebedarf vermehrt mit Glukose als C-Quelle gedeckt zu haben, je basischer die Kulturbedingungen waren.

Die Quotienten q_{Glc}/p_{IgG_S} und q_{Gln}/p_{IgG_S} geben eine Relation des Verbrauches der C-Quellen Glukose und Glutamin bezogen auf die Antikörperproduktion an. Je basischer die Kulturbedingungen im CO_2/HCO_3^- -gepufferten System waren, um so mehr Glukose wurde im Vergleich zu Antikörperproduktion verbraucht. So wurde bei pH 7,4 das 1,7-fache an Glukose verbraucht, verglichen mit der Kultur bei pH 7,2. Auffällig ist der geringe Verbrauch von Glukose (14 %) und auch Glutamin (29 %) bezogen auf die Antikörperproduktion bei pH 6,9 verglichen mit jenem bei pH 7,2 (100 %). Die Zellen benötigten bei dem sauren pH-Wert durch die Umstellung des Zellstoffwechsels auf die stärkere Antikörperproduktion vermutlich weniger Glukose und Glutamin zur Deckung ihres Energiebedarfes für das relativ langsame Wachstum.

Bei den Kultivierungen konnte kein signifikanter Einfluß der Kulturbedingungen auf die spezifischen Sauerstoffverbrauchsdaten festgestellt werden. Diese Beobachtung deckt sich mit denen von Ozturk et al. (1991), die keinen Einfluß des pH-Wertes auf den Sauerstoffverbrauch von Hybridomkulturen feststellten [143].

3.2.5.7 Untersuchung der Stabilität von R24 Antikörpern in verschiedenen Kulturmedien

Zur Untersuchung der Stabilität des Antikörpers in den verschiedenen Kulturmedien wurde Produktüberstand aus einer 250 ml Spinnerkultivierung in verschiedenen konditionierten Medien 7 Tage bei 37 °C bebrütet. Anschließend wurde das G_{D3} Bindungsvermögen der Proben mittels ELISA bestimmt und miteinander verglichen.

Je 10 ml Kulturüberstand der Spinnerkultur, die bei einer Zelldichte von $1,3 \times 10^6$ Zellen/ml geerntet worden war wurden mittels NaOH und HCl auf die pH-Werte 7,4, 7,2 und 6,9 eingestellt. Eine Probe wurde mit 20 mM HEPES versetzt und der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Der pH-Wert der Proben wurde alle 24 h kontrolliert und gegebenenfalls eingestellt. Zur Vermeidung von Kontaminationen während der Bebrütung wurde 0,05 % NaN_3 zu den Proben gegeben. Die anschließende Bestimmung des G_{D3} Bindungsvermögens ergab für die Proben pH 7,4 und 7,2 einen Wert von $IgG_{GD3} = 22,1$ mg/l. Ein leicht höherer IgG_{GD3} -Wert wurde bei der HEPES-Probe mit 22,9 mg/l festgestellt. Die höchste G_{D3} -Bindungskapazität mit 23,7 mg/l besaß die Probe pH 6,9. Die Dreifachbestimmung ergab dabei eine Streuung der Werte um max. 15 %.

Die gemessenen Werte stimmen innerhalb der Fehlertoleranz der Messungen prak-

tisch überein. Es ist somit sehr unwahrscheinlich, daß unterschiedliche Aktivität von Proteasen oder sonstige Faktoren die sezernierten Antikörper zerstörten, und es somit zu den Differenzen in der Antikörperkonzentration und im G_{D3} Bindungsvermögen in den verschiedenen Kultivierungen kam. Von Schlaeger et al. (1987) wurde beschrieben, daß es erst unterhalb eines pH-Wertes von 4,5 in serumfreien Kulturüberständen von Maushybridomkulturen zu massiver proteolytischer Spaltung von Antikörpern kommt [168]. Die erhaltenen Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Ackermann et al. (1995) überein, daß Änderungen in der strukturellen und funktionellen Heterogenität von sekretierten Antikörpern nicht auf extrazelluläre oder medienbedingte Faktoren zurückzuführen waren [1].

Eine weitere Antikörper-Probe, welche nicht bebrütet wurde, sondern über den gleichen Zeitraum bei 4°C gelagert worden war, ergab einen IgG_{GD3} -Wert von 25,4 mg/ml. Der Vergleich des G_{D3} Bindungsvermögens der R24 Antikörper im bebrüteten und nicht bebrüteten Kulturüberstand läßt auf eine nur geringe proteolytische Aktivität im Kulturüberstand schließen.

3.2.5.8 Zusammenfassung

Im 2-Liter-Bioreaktor wurde die R24 produzierende Zelllinie HB-8445 in CO_2/HCO_3^- -gepufferten Medien bei den geregelten pH-Werten 7,4; 7,2 und 6,9 sowie im pH-Wert ungeregelten mit HEPES-gepufferten Medium kultiviert. Daneben erfolgte die R24 Produktion im ungeregelten 1-Liter-SuperSpinner mit CO_2/HCO_3^- -Pufferung.

Die verschiedenen Kulturbedingungen hatten signifikanten Einfluß auf die Wachstumsgeschwindigkeit, die R24 Produktionsraten und auf den Metabolismus der Zellen. Es zeigte sich, daß der üblicherweise für die Kultivierung von Säugerzellen verwendete pH-Wert von 7,2 die besten Voraussetzungen für ein optimales Wachstum der Zellen bot. Unter sauren Kulturbedingungen bei pH 6,9 sank die Wachstumsrate μ mit 0,34/d auf die Hälfte der bei pH 7,2 gemessenen. Auch eine Kultivierung im HEPES-gepufferten Medium führte, wie bei pH 6,9, nahezu zu einer Halbierung der Wachstumsrate.

Die Antikörperproduktion war unter allen Kulturbedingungen in unterschiedlichem Ausmaß mit dem Zellwachstum korreliert. Die höchsten spezifischen R24 Produktionsraten wurde bei pH 6,9 gemessen. Sie lagen mit $p_{IgG_S} = 42,3 \mu g 10^{-6}$ Zellen d^{-1} doppelt so hoch wie bei pH 7,2 Kultur. Im Verlauf der Kultivierung bei pH 7,2 halbierte sich die spezifische R24 Produktionsrate von 19 im Batch I auf $10,7 \mu g 10^{-6}$ Zellen d^{-1} im Batch II. Dieses Absinken der R24 Produktion von Batch I nach Batch II war auch bei pH 7,4 und in der HEPES-Kultur zu beobachten. Nur im SuperSpinner und bei pH 6,9 blieb die R24 Produktion in den beiden Batches nahezu konstant.

Ein Maß für die Qualität des produzierten R24 Antikörpers ist das G_{D3} -Bindungsvermögen (IgG_{GD3} , die Menge R24 Antikörper, die an G_{D3} bindet) im Vergleich zur Antikörperkonzentration (IgG_S). Auffallend war hier das um 2/3 geringere Bindungsvermögen des im HEPES-gepufferten Medium produzierten Anti-

körpers (vergleiche Kap 3.3.1).

Ein Vergleich der Stabilität des sezernierten R24 Antikörpers unter den verwendeten Kulturbedingungen zeigte, daß im Bereich zwischen pH 7,4 und 6,9 sowie im HEPES-gepufferten Medium keine proteolytische Aktivität feststellbar war. Es kann somit als sicher angenommen werden, daß die unterschiedlichen Kulturbedingungen während der R24 Produktion ausschlaggebend für die unterschiedlichen Antikörpermengen bei den Kultivierungen waren.

Das verwendete Medium, eine Mischung aus RPMI 1640, DMEM und Nutrient Mix F12 war gut auf die Bedürfnisse der Zellen abgestimmt. Im Verlauf der Kultivierungen wurden die Konzentrationen von 18 Aminosäuren, Glukose, Laktat und NH_4^+ im Kulturüberstand gemessen. Erst gegen Ende der Batches waren Glutamin, Tryptophan, Valin und Leucin weitestgehend verbraucht, so daß kein das exponentielle Wachstum der Zellen limitierendes Substrat festgestellt wurde. Laktat und NH_4^+ erreichten in den Kulturen keine wachstumsinhibierenden Konzentrationen. Auffällig niedrige Verbräuche von Glukose wurden bei pH 6,9 und in der HEPES-Kultur gemessen, die bei ca. der Hälfte derer der pH 7,4 und pH 7,2 Kultivierungen lagen. Bei der Kultivierung mit pH 7,4 war ein vergleichsweise hoher Verbrauch an Glukose und eine starke Produktion von Laktat im Vergleich zum Glutaminverbrauch festzustellen. Bei pH 6,9 wurde im Gegenteil dazu ein entsprechend geringerer Verbrauch, verglichen mit den Standardbedingungen bei pH 7,2, gemessen. Zudem war die Laktatproduktion bei pH 6,9 im Vergleich zum Glukoseverbrauch um gut die Hälfte niedriger als bei pH 7,2.

Die Kultivierung der HB-8445 Zellen bei einem pH-Wert von 6,9 stellte somit eine gute Möglichkeit dar, die Antikörperproduktivität gegenüber den üblichen Kulturbedingungen bei pH 7,2 mehr als zu verdoppeln.

3.3 Aufreinigung des R24 Antikörpers

In den zuvor beschriebenen 2-Liter-Bioreaktor Kultivierungen bei pH 7,4; 7,2 und 6,9 sowie HEPES-Pufferung wurden jeweils ca. 3,5 l und im 1-Liter-SuperSpinner 1,6 l produkthaltiger Überstand produziert, dessen Aufarbeitung im Folgenden beschrieben werden soll. Ziel der Aufreinigung war dabei die effiziente Gewinnung von hoch reinem R24 Antikörper, der zur Untersuchung der proteingebundenen Oligosaccharide und für Bindungsstudien dienen sollte.

3.3.1 Affinitätsreinigung mittels Protein A-Säulenchromatographie

Das zur Aufreinigung des Produktes verwendete Protein A „erkennt“ spezifisch den F_c Teil von IgG-Antikörpern. Die Bindung von IgG Antikörpern an Protein A wird nicht durch die N-Glykane an der C_H2 -Domäne im F_c der Antikörper beeinflusst

[92], so daß es zu keiner selektiven An- oder Abreicherung von Antikörpern kommt, die bestimmte N-Glykane besitzen. Diese spezifische Affinitätsreinigung war somit sehr gut zur Abtrennung der Antikörper von weiteren Proteinbestandteilen des Kulturüberstandes geeignet. In einem einzigen Reinigungsschritt konnten die weiteren Proteinbestandteile im Kulturüberstand wie HSA, Insulin und Transferrin sowie von den Hybridomzellen sezernierte und aus Zelltrümmern stammende Proteine abgetrennt werden.

Vor der Protein A-Chromatographie wurden die Kulturüberstände der jeweiligen Batches I und II der 2-Liter-Bioreaktor und der SuperSpinner Produktion des monoklonalen Antikörpers R24 vereinigt und zellfrei zentrifugiert. Die Antikörperkonzentrationen in den Kulturüberständen der Batches (siehe Kap. 3.2.5) und in den Eluaten wurden mittels Sandwich-ELISA (siehe Kap. 2.6.1.2) bestimmt. Die Konzentration an G_{D3} -bindenden R24 Antikörper wurde mit dem G_{D3} -Bindungs-ELISA ermittelt (siehe Kap. 2.6.1.3).

Der Quotient $Q_{IgG} = IgG_{GD3} / IgG_s$ stellt ein Maß für die Qualität des produzierten Antikörpers dar, der ausdrückt, in wie weit der Antikörper in der Lage ist, G_{D3} zu binden. Im Idealfall sollte $Q_{IgG} = 1$ sein. Da aber im Sandwich-ELISA polyclonale Anti-Maus-Antikörper verwendet wurden, wurden bei dieser Antikörperkonzentrationsbestimmung auch IgG-Fragmente, die nicht in der Lage sind G_{D3} zu binden, „erkannt“. Zudem besaß der R24-Referenz-Antikörper, der bei den G_{D3} -Bindungstests verwendet wurde, selbst kein 100 %-iges Bindungsvermögen an G_{D3} , da kein z.B. G_{D3} -affinitätschromatographisch aufgereinigter R24 Antikörper verfügbar war. Somit sind die Werte der Antikörperkonzentrationen aus den G_{D3} -Bindungstests zwar gut zum Vergleich miteinander geeignet, aber als absolute Größen nur bedingt aussagekräftig. Die genannten Gründe erklären, warum die Werte für IgG_{GD3} wesentlich kleiner als für IgG_s sind und somit die Q_{IgG} wesentlich kleiner als 1 sind.

Im Verlauf der Säulenchromatographien konnten die in der Tabelle 3.15 aufgeführten Ausbeuten ermittelt werden.

Durch die 2-Liter-Bioreaktor-Kultivierungen konnten je nach Kulturbedingung zwischen 134 mg (pH 7,4) und 521 mg (pH 6,9) R24 Antikörper produziert werden. Die Wiederfindungsrate nach der Protein A-Aufreinigung betrug bei den CO_2/HCO_3^- -gepufferten Kulturen zwischen 39 und 45 %, was in diesen Systemen zu Ausbeuten nach der Reinigung von 58 mg bei pH 7,4 bis zu 224 mg bei pH 6,9 führte. Die Wiederfindungsrate des Antikörpers aus der HEPES-Kultur betrug bei der Protein A-Aufreinigung nur 15 %. Dieser hohe Verlust an R24 Antikörper während der Aufreinigung ist mit der „schlechteren Qualität“ (siehe Kap. 3.4.1.1) des Antikörpers aus der HEPES-Kultur zu erklären.

Tabelle 3.15: Ausbeuten des im 2-Liter-Bioreaktor ($\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ - und HEPES-Pufferung) und im SuperSpinner-Kultursystem produzierten mAk R24 nach Protein A-Aufreinigung.

Kultursystem	pH 7,4	pH 7,2	pH 6,9	HEPES	Super- Spinner
Ernte					
Kulturüberstand [l] ^a	1,4/2,0	1,6/2,0	1,4/2,0	1,5/2,0	0,7/0,9
IgG _s [mg] ^b	71,3/62,7	120,5/89,8	198,6/322,5	102,6/150,4	55,3/72,9
IgG _{GD3} [mg] ^c	14,8/7,4	26,2/23,0	34,0/58,2	5,1/4,0	10,8/12,6
$Q_{\text{IgG}} = \text{IgG}_{\text{GD3}} / \text{IgG}_s$	0,20/0,12	0,22/0,25	0,17/0,18	0,05/0,03	0,20/0,17
Protein A Aufreinigung ^d					
IgG _s aufgetragen [mg]	134	210	521	253	128
IgG _s gebunden [mg] ^e	77	123	286	68	77
Bindungsrate [%]	58	59	55	27	60
Wiederfindungsrate [%]	43	39	43	15	45
IgG _s Ausbeuten ^f					
[mg/l] ^g	17	23	66	11	36
Gesamt [mg]	58	83	224	39	58

^a Batch I / Batch II

^b IgG_s: IgG aus Kulturüberstand, quantifiziert mit Sandwich ELISA

^c IgG_{GD3}: An G_{D3} bindendes IgG, Nachweis mit G_{D3} Bindungs-ELISA

^d Durchgeführt mit den vereinigten Kulturüberständen von Batch I und Batch II

^e Berechnet aus den im Durchfluß bestimmten IgG Mengen

^f Wiedergefunden im Eluat

^g Bezogen auf einen Liter Kulturüberstand

Die Effizienz einer Reinigungsmethode für ein Protein kann unter anderem durch den Konzentrierungsfaktor beschrieben werden. Wie aus Tab. 3.16 entnommen werden kann, war die Konzentration der Antikörper im Eluat, mit Ausnahme der HEPES-Kultur, ca. 25-fach höher als im Kulturüberstand. Der niedrigere Konzentrierungsfaktor bei der Reinigung der Antikörper aus der HEPES-Kultur kann mit der unter Kap. 3.4.1.1 begründeten „schlechteren Qualität“ des Antikörpers erklärt werden.

Tabelle 3.16: Auflistung der Konzentrierungsfaktoren von R24 Antikörper nach Protein A-Aufreinigung (siehe Kap. 2.5.2).

Kultivierungsbedingungen	R24-Konzentration im Kulturüberstand $\left[\frac{mg}{l}\right]^a$	R24-Konzentration im Eluat $\left[\frac{mg}{l}\right]^a$	Konzentrierungsfaktor
pH 7,4	39	1000	26
pH 7,2	58	1400	24
pH 6,9	153	4000	26
HEPES	72	600	8
SuperSpinner	80	1900	25

^a Quantifiziert mittels Sandwich ELISA (IgG_S)

3.3.1.1 Zusammenfassung

Die Protein A-Affinitätschromatographie in Verbindung mit der FPLC- und dem BioPilot-System stellt eine einfache und schnelle Methode zur Aufreinigung und Ankonzentrierung des Antikörpers R24 von Typ IgG₃ aus dem Kulturüberstand dar.

Bei den 2-Liter-Bioreaktor-Kultivierungen konnten je nach Kulturbedingung zwischen 521 mg (pH 6,9) und 134 mg (pH 7,4) R24 Antikörper produziert werden, die im Kulturüberstand vorlagen. Im 1-Liter-SuperSpinner betrug die produzierte Menge R24 vor der Protein A-Reinigung 128 mg.

Bei der zur Aufreinigung des R24 Antikörpers durchgeführten Protein A-Affinitätschromatographie war ein nicht unerheblicher Verlust von Antikörpern zu verzeichnen. Die Wiederfindungsraten des unter den verschiedenen CO₂/HCO₃⁻-gepufferten Kulturbedingungen hergestellten R24 Antikörpers betrug 39 bis 45 %. Bei der Aufarbeitung der im HEPES-Puffersystem produzierten Antikörper wurde eine im Vergleich zu den anderen Systemen noch niedrigere Wiederfindungsrate (1/3) detektiert, was mit einem hohen Anteil von IgG-Fragmenten bei den produzierten Antikörpern begründet sein dürfte.

Der Vergleich der Mengen an Protein A gereinigtem Antikörper pro Liter geerntetem Kulturüberstand zeigt einen sehr deutlichen Einfluß der Kulturbedingungen auf die Antikörper-Produktivität und die Fähigkeit des R24 Antikörpers, an Protein A zu binden. Bei einem pH-Wert von 6,9 konnte mit 66 mg R24 Antikörper/l Kulturüberstand nach der Aufreinigung das Dreifache dessen geerntet werden, was bei den Standard-Kulturbedingungen mit einem pH-Wert von 7,2 erreicht wurde. Die Produktionsbedingungen bei einem hohen pH-Wert von 7,4 führten zu einer Abnahme der Menge an Antikörper nach der Protein A-Reinigung um ca. 25 % gegenüber den Standardbedingungen. Bei dem HEPES-gepufferten System konnte sogar nur eine Ausbeute von 50 % erreicht werden. Mit dem SuperSpinner-Kultursystem konnte eine Ausbeute von gut 160 % derjenigen des Bioreaktors bei pH 7,2 erreicht werden. Der SuperSpinner ist somit eine gute Alternative zur wesentlich aufwendigeren Bioreaktorkultivierungen.

Ein ähnliches Bild wie bei der Wiederfindungsrate stellt sich auch bei den in Tabelle 3.16 aufgeführten Konzentrierungsfaktoren dar. Die um ca. 2/3 geringere Aufkonzentrierung an R24 Antikörper aus der HEPES-Kultivierung kann auch hier mit der „schlechteren Qualität“ des R24 Antikörpers begründet werden.

Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, daß ein pH-Wert bei der Kultivierung der HB-8445 Zellen von 6,9 zu einer optimalen Ausbeute (sowohl quantitativ als auch qualitativ) an Protein A-gereinigtem R24 Antikörper im Vergleich zu allen anderen Ansätzen führt.

3.4 Molekulare Charakterisierung des R24 Antikörpers

Im folgenden Kapitel soll untersucht werden, welchen Einfluß die verschiedenen Kultivierungsbedingungen auf die molekulare Struktur der produzierten Antikörper haben.

Mit den Techniken der SDS-Gelelektrophorese und Gelchromatographie wurden die Größe und die Reinheit der durch Protein A-Chromatographie isolierten Antikörper überprüft. Die isoelektrische Fokussierung (IEF) diente zum Vergleich der Ladungsstruktur der Antikörper untereinander. Bei den darauf folgenden Lektin-Bindungstests sollte als erstes überprüft werden, ob die R24 Antikörper überhaupt glykosyliert waren, und wenn ja, ob in der schweren und/oder der leichten Kette. Die Bestimmung des Gehaltes an Neutralzuckern mittels Resorcin gab Hinweise auf den Gesamtgehalt an Oligosacchariden. Der Gehalt der Antikörper an Sialinsäuren wurde durch HPLC ihrer fluoreszierenden Derivate bestimmt. Die Strukturen der mittels Hydrazinolyse abgespaltenen N-Glykane wurden chromatographisch mittels HPAEC-PAD und die Molmassen massenspektrometrisch mit der MALDI-TOF-Massenspektrometrie charakterisiert. Die Massen der enzymatisch abgespaltenen N-Glykane wurden mit Hilfe der ESI-QTOF-Massenspektrometrie bestimmt. Zur genaueren Charakterisierung der enzymatisch abgespaltenen N-Glykane wurden die Molmassen von Fragmenten ausgewählter Oligosaccharide mittels ESI-QTOF-MS/MS bestimmt.

3.4.1 Überprüfung des Molekulargewichts und der Reinheit der aufgearbeiteten R24 Antikörper

Die Reinheit der mittels Protein A Affinitätschromatographie isolierten R24 Antikörper wurde mittels SDS-Gelelektrophorese und der Gelchromatographie bestimmt, die neben einer Molekulargewichts-Zuordnung auch eine Überprüfung auf Verunreinigung durch andere Proteine zulassen.

3.4.1.1 SDS-Gelelektrophorese

Zur Molekulargewichts-Zuordnung mittels SDS-PAGE wurde das automatisierte PhastSystem verwendet. Abb. 3.25 zeigt die Auftrennung der R24 Antikörper aus den verschiedenen Kultivierungsansätzen (siehe Kap. 3.2.5) im SDS-Gradientengel. Die aufgetragenen Antikörper waren zuvor durch Protein A-Affinitätschromatographie (siehe Kap. 3.3.1) aus den Kulturüberständen aufgereinigt worden. Die Detektion der Proteinbanden nach der Auftrennung erfolgte mittels der sehr empfindlichen Silberfärbung nach Heukeshoven (1988), die allerdings keine quantitative Berechnung der Proteinmengen erlaubt.

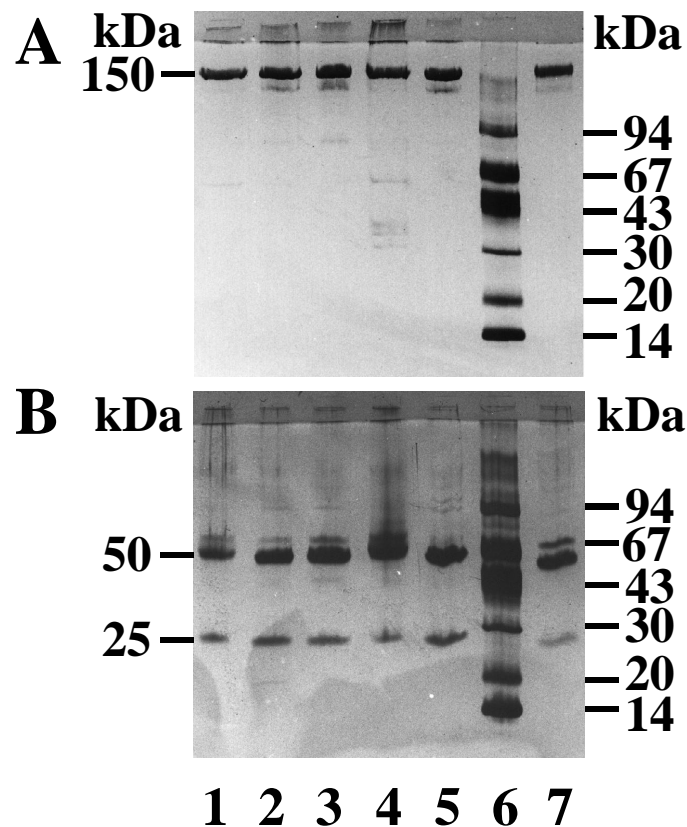


Abbildung 3.25: SDS-PAGE im Gradientengel (8-25 %) der mittels Protein A Affinitätschromatographie aufgereinigten R24 Antikörper unter nicht reduzierenden (A) und unter reduzierenden Bedingungen (B). Auf die Bahnen wurde in (A) aufgetragen: (1) 0,1 μg R24 aus pH 7,4 Kultivierung, (2) 0,1 μg R24 aus pH 7,2 Kultivierung, (3) 0,2 μg R24 aus pH 6,9 Kultivierung, (4) 0,1 μg R24 aus HEPES-Kultivierung, (5) 0,2 μg R24 aus SuperSpinner Kultivierung, (6) 1 μg LMW Markerproteine und (7) 0,1 μg Maus IgG Referenz-Antikörper. Im Gel (B) wurden die doppelten Mengen an Protein im Vergleich zu (A) aufgetragen. Die Proteinbanden wurden durch Silberfärbung angefärbt.

Unter nicht reduzierenden Bedingungen, (Abb. 3.25 A), chromatographierten die Antikörper aus den verschiedenen Kultivierungsansätzen (Bahnen 1 bis 5) auf gleicher Höhe mit dem Referenz-Mausantikörper (Bahn 7). Die Antikörper wiesen das für IgG-Antikörper zu erwartende Molekulargewicht von 150 kDa auf. Die Antikörper aus den Bioreaktor-Kultivierungen bei pH 7,2 und 6,9 sowie der SuperSpinner Kultur zeigten die gleichen Doppelbanden (Mikroheterogenität) wie der Referenz-Antikörper. Die SDS-PAGE zeigt nach der Protein A-Reinigung neben den Antikörpern keine weiteren Proteine. Die schwachen Banden bei 25, 50 und 75 kDa sind auf Antikörperfragmente (leichte und schwere Ketten) zurückzuführen.

Durch eine Reduktion der Disulfidbrücken mit β -Mercaptoethanol werden die leichten und schweren Ketten der Antikörpermoleküle voneinander getrennt. In der SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen (Abb. 3.25 B) sind bei allen Antikörpern aus den verschiedenen Kulturen die leichten Ketten bei 25 kDa und die schweren Ketten bei 50 kDa zu sehen [55]. Die Zuordnung erfolgte über Referenzproteine mit definierten Molmassen.

Mittels einer SDS-PAGE, bei dem die zellfreien Kulturüberstände aufgetrennt wurden, konnte gezeigt werden, daß der Überstand aus dem HEPES-Kultursystem einen, im Vergleich zu den anderen Kultursystemen, erhöhten Anteil an Protein mit einem Molekulargewicht von 25 kDa aufwies. Dieses entspricht der Größe der leichten Kette eines IgG Antikörpers. Diese Proteine wurden, wenn es sich um die leichte Kette des IgG Antikörpers handelte, bei der Antikörperkonzentrationsbestimmung mittels ELISA mit erfaßt, trugen aber nicht zum G_{D3} -Bindungsvermögen des Produktes bei. Das ist eine Erklärung für den niedrigen IgG_{GD3} -Wert und folglich auch für den niedrigen Quotienten Q_{IgG} (siehe Tab. 3.15) der HEPES-Kultivierung, der ein Maß für die Qualität des produzierten Antikörpers darstellt. Das bei der Aufreinigung verwendete Protein A bindet IgG Antikörper im Bereich des F_c Teils des Antikörpers. Die Überproduktion von leichten Ketten des Antikörpers, die nicht an Protein A binden, erklärt auch, warum so wenig Produkt aus dem Kulturüberstand der HEPES-Kultur an die Säule bindet.

3.4.1.2 Gelchromatographie

Bei der Gelchromatographie geschieht die Auftrennung der einzelnen Bestandteile einer Proteinmischung nach ihrer Größe bzw. nach ihrem Stokes-Radius. Das Elutionsvolumen der verwendeten Gelfiltrationssäule für Proteine, die mit über 600 kDa praktisch zu groß sind, um in die Poren des Gelmaterials eindringen zu können, beträgt bei der verwendeten Säule (siehe Kap. 2.6.7) ca. 0,9 ml. Das Elutionsvolumen für sehr kleine Moleküle, wie z.B. Salze, beträgt 2 bis 2,2 ml und für das 150 kDa große R24 Antikörpermolekül ca. 1,3 ml.

In Abbildung 3.26 sind die Elutionsprofile der mittels Protein A aufgereinigten R24 Antikörper der verschiedenen Kultivierungen dargestellt.

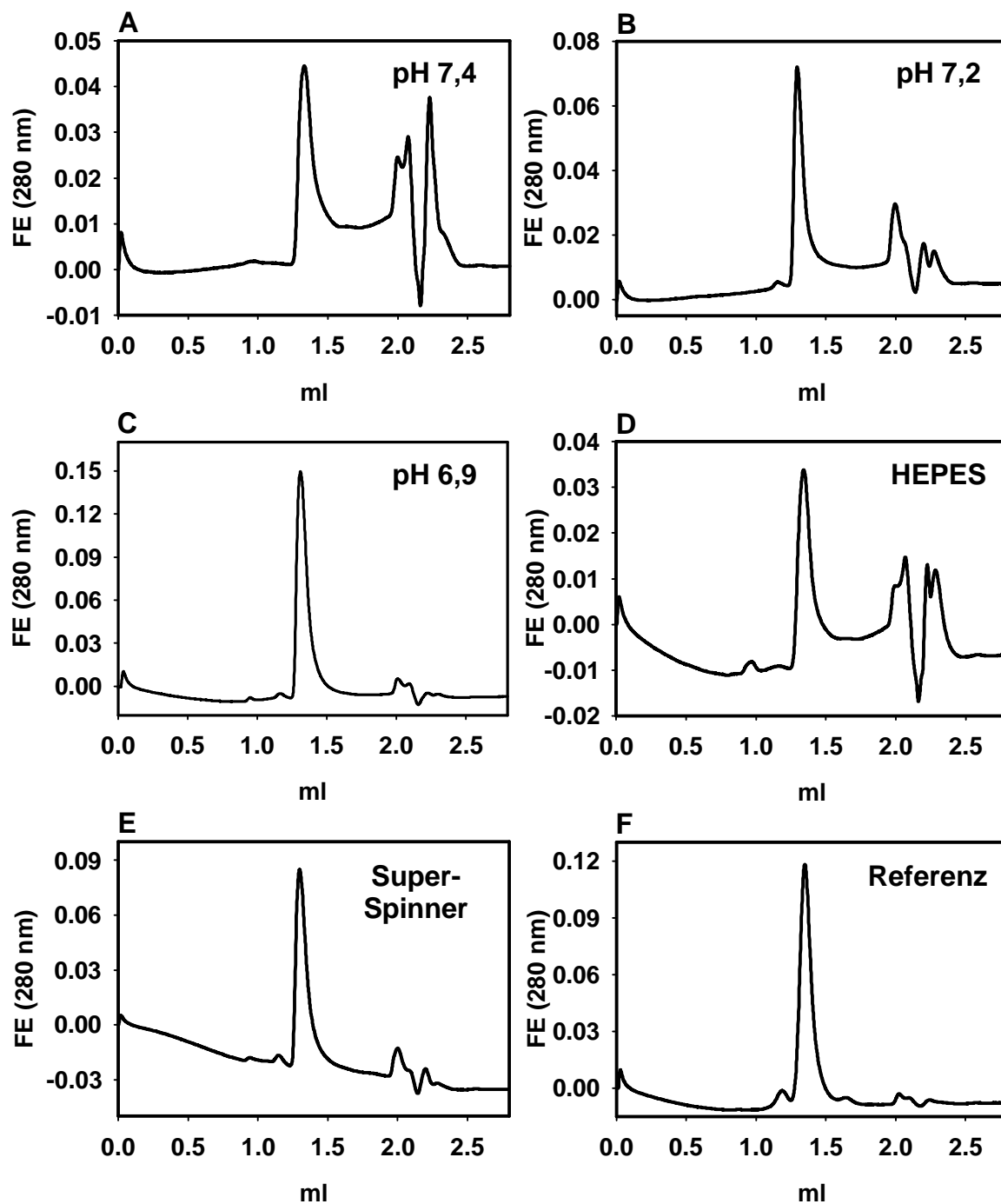


Abbildung 3.26: Elutionsprofile der mittels Protein A aufgereinigten R24 Antikörper. Die Gelfiltration erfolgte über eine Superdex 200 PC 3.2/30 10 – 600 kDa Gelfiltrationssäule im SmartSystem. Aufgetragen wurden an R24 Antikörper: (A) 10 μg in 70 μl (Kultivierung bei pH-Wert 7,4), (B) 17 μg in 25 μl (Kultivierung bei pH-Wert 7,2), (C) 29 μg in 15 μl (Kultivierung bei pH-Wert 6,9), (D) 9 μg in 70 μl (Kultivierung mit HEPES), (E) 20 μg in 25 μl (Kultivierung im Super-Spinner) und (F) 24 μg Referenz Maus IgG in 60 μl . Die Signalintensitäten sind in Fluoreszenz-Einheiten (FE) dargestellt.

Alle R24 Antikörper sowie auch der Referenz Antikörper eluierten von der Gelchromatographiesäule bei einem Elutionsvolumen von ca. 1,3 ml. Die Peaks in den Elutionsprofilen ab einem Elutionsvolumen von ca. 1,9 ml stammen von Salzen aus dem Puffer, in dem die Antikörperproben auf die Säule aufgegeben wurden. Diese „Salzpeaks“ sind um so höher, je niedriger der Antikörper bei der Aufgabe auf die Säule im Puffer konzentriert war. Die Breite der Peaks ist abhängig vom Volumen, in dem der Antikörper auf die Säule aufgegeben wurde. Die Unterschiede in den Elutionsprofilen, wie z.B. in den Läufen A und C in Abbildung 3.26, resultieren daher aus den verschiedenen Konzentrationen des Antikörpers im Eluat der Protein A Affinitätschromatographie bei der Aufgabe auf die Säule und den unterschiedlichen Aufgabevolumina.

Die Gelchromatographie der Antikörper zeigte neben dem Signal des R24 Antikörpers keinen weiteren Peak von Fremdproteinen.

3.4.1.3 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Bei der isoelektrischen Fokussierung (IEF) werden Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt getrennt. Es stellt also ein gegenüber der Gelchromatographie und Gelelektrophorese selbständiges System dar, bei dem nicht nach der Größe sondern nach der Ladungsstruktur der Proteine aufgetrennt wird. Unterschiede in der Ladungsstruktur der untersuchten Antikörper können hiermit sichtbar gemacht werden. Um den störenden Einfluß von hohen Salzkonzentrationen bei der isoelektrischen Fokussierung zu vermeiden, wurden die Antikörperproben zuvor gegen Phosphatpuffer dialysiert. Abb. 3.27 zeigt die IEF der Protein A gereinigten R24 Antikörper aus den verschiedenen Kultivierungsansätzen. Der IEF-Marker erlaubt anhand von Referenzproteinen die Zuordnung des isoelektrischen Punktes zu einer Proteinbande.

Wie in Abb. 3.27 zu erkennen ist, ergibt die IEF bei allen eingesetzten Antikörpern das gleiche Bandenmuster. Anhand der IEF konnte somit kein erkennbarer Einfluß der Kultivierungsbedingungen auf die Ladungsstruktur und den damit verbundenen isoelektrischen Punkt der Proteine nachgewiesen werden.

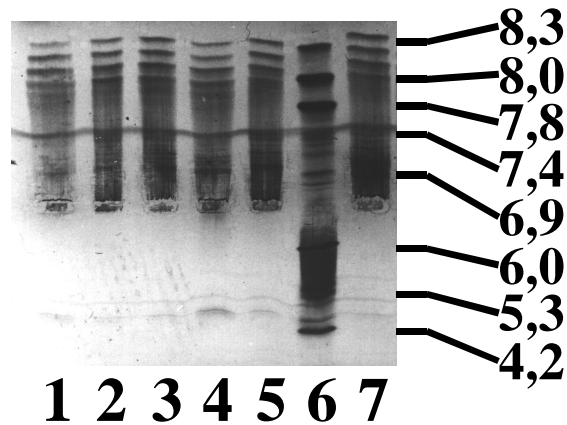


Abbildung 3.27: IEF-Gel (PhastSystem, pH 3 - 9) der mittels Protein A Affinitätschromatographie aufgereinigten R24 Antikörper: (1) 0,1 μg R24 aus pH 7,4 Kultivierung, (2) 0,2 μg R24 aus pH 7,2 Kultivierung, (3) 0,2 μg R24 aus pH 6,9 Kultivierung, (4) 0,1 μg R24 aus HEPES-Kultivierung, (5) 0,2 μg R24 aus SuperSpinner Kultivierung, (6) 0,5 μg IEF Marker und (7) 0,1 μg Maus IgG Referenz-Antikörper.

Es wurde auch untersucht, inwiefern sich die Behandlung von R24 Antikörper mit Neuraminidase durch die Abspaltung von negativ geladenen Sialinsäuren auf die Ladungsstruktur des Proteins auswirkt. Dazu wurden 0,5 μg zuvor gegen HEPES Puffer dialysierter R24 Antikörper (Kultur pH 7,2) in 10 μl 2 h mit 0,25 mU Neuraminidase aus *Vibrio cholerae* inkubiert.

Der Versuch, die Sialinsäure mittels Neuraminidase abzuspalten, erbrachte kein detektierbar geändertes Laufverhalten des Proteins in der IEF, das bei einer Abspaltung der negativ geladenen Sialinsäuren zu erwarten gewesen wäre. Die Abspaltung der Sialinsäure ist vermutlich durch die sterisch ungünstige Lage der N-gebundenen Oligosaccharidketten an der C_H2 Domäne im F_c Teil des Antikörpers erschwert. Diese N-Glykane, an denen häufig Sialinsäuren zu finden sind, liegen bei IgG Antikörpern, wie anhand von Röntgenstrukturanalysen [183] festgestellt werden konnte, zwischen den Proteinketten des F_c Teil des Antikörpers und sind somit durch diese nach außen hin abgeschirmt.

In Abb. 3.27 ist eine erhebliche Mikroheterogenität bei den Antikörperbanden zu erkennen. Häufig werden diese Heterogenitäten eines Proteins in der IEF mit unterschiedlichen proteingebundenen Oligosacchariden erklärt. Nach Untersuchungen von Mimura et al. (1995) sind nicht die Glykosylierungen sondern andere Faktoren für die Mikroheterogenität von monoklonalen Antikörpern verantwortlich [118]. Diese „anderen Faktoren“, die nicht weiter spezifiziert wurden, werden offensichtlich kaum durch die verschiedenen Kulturbedingungen beeinflusst.

3.4.1.4 Zusammenfassung

Das durch die Protein A Affinitätschromatographie aufgereinigte Produkt aus den verschiedenen Kultivierungsansätzen entspricht in seinem Molekulargewicht der erwarteten Größe für IgG Antikörper von 150 kDa, was sowohl durch die SDS-Gelelektrophorese als auch durch die Gelchromatographie im Vergleich mit einem Maus IgG Referenz-Antikörper gezeigt werden konnte. Das Laufverhalten der Antikörper in SDS-Gelelektrophorese und der Gelchromatographie ist identisch. Die unterschiedlichen Bedingungen bei der Kultivierung haben keinen erkennbaren Effekt auf die Größe des produzierten R24 Antikörpers.

Wie zu erwarten war, wurde durch die Reduktion mit β -Mercaptoethanol der R24 Antikörper in 25 kDa (leichte Kette) und 50 kDa (schwere Kette) große Fragmente gespalten. Das Laufverhalten der Antikörperfragmente zeigte keine Unterschiede, weder zwischen den verschiedenen R24 Antikörpern noch zu dem Maus IgG Referenz-Antikörper, wie in Abbildung 3.25 B zu erkennen ist.

Die SDS-Gelelektrophorese in Abbildung 3.25 zeigt neben den R24 Antikörpern keine weiteren Proteine in dem Eluat der Protein A Affinitätschromatographie. Auch bei der Gelfiltration der Antikörper konnte neben dem Signal des R24 Antikörpers kein diskretes Signal eines Fremdproteins detektiert werden. Alle untersuchten Antikörper besaßen bei der Gelchromatographie ein identisches Laufverhalten. Die Resultate der Gelelektrophorese konnten somit bestätigt werden.

Auch die isoelektrische Fokussierung zeigte keinen Einfluß der Kulturbedingungen auf die produzierten Antikörper, die somit identische Ladungsstrukturen besaßen.

3.4.2 Untersuchungen zur Glykosylierung des R24 Antikörpers

3.4.2.1 Detektion von proteingebundenen Oligosacchariden mittels Lektinen

Um herauszufinden, ob der R24 Antikörper überhaupt glykosyliert ist, wurde mit im SuperSpinner produzierten Antikörpern Lektin-Bindungstests durchgeführt. Dieser einfache Test läßt bereits Aussagen über die terminalen Zuckerstrukturen zu, da das *Maackia amurensis* Agglutinin (MAA) spezifisch an Neu5Ac α (2-3)Gal [194], das *Sambucus nigra* Agglutinin (SAA) spezifisch an α (2-6)-sialylierte Galaktose [177] und *Datura stramonium* Agglutinin (DSA) an die Gal β (1-4)GlcNAc-Sequenz [23] bindet.

Die Antikörper wurden einer SDS Gelelektrophorese (Novex Gele) unterworfen, dann mittels Westernblot auf eine PVDF Membran übertragen, auf der dann die Lektin-Bindungstests durchgeführt wurden. Die anschließende Detektion der gebundenen und mit Digoxigenin konjugierten Lektine erfolgte mittels Chemilumineszenz.

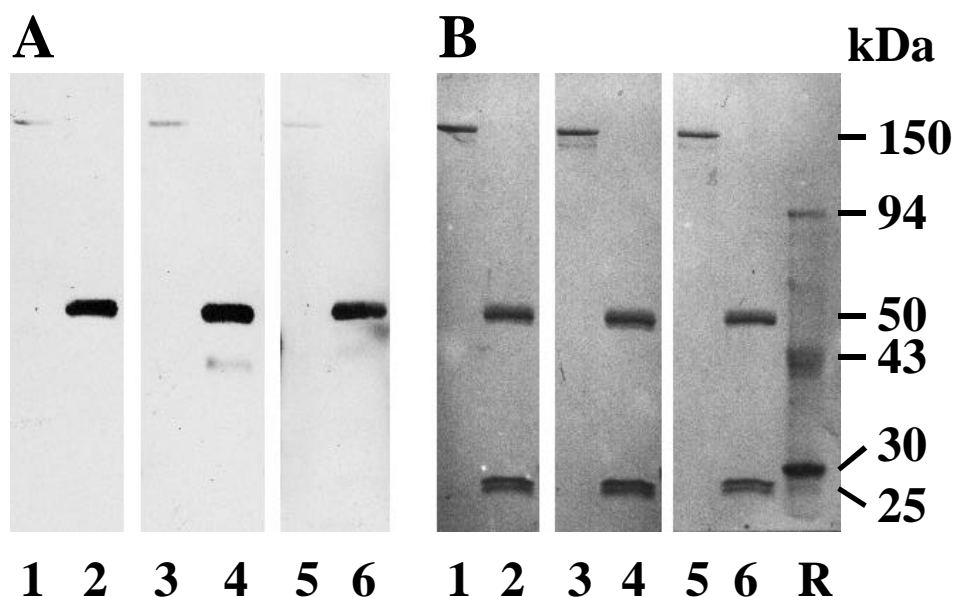


Abbildung 3.28: Lektin-Bindungstests des auf eine PVDF Membran übertragenen R24 Antikörpers. Auf die Bahnen wurde aufgetragen: (1), (3) und (5) jeweils $1,5 \mu\text{g}$ R24 Antikörper unter nicht reduzierenden Bedingungen; (2), (4) und (6) jeweils $1,5 \mu\text{g}$ R24 Antikörper unter reduzierenden Bedingungen. Als Standard dienten Referenzproteine (LMW) in Bahn (R). In (A) ist das Ergebnis der Chemilumineszenz-Detektion der gebundene Lektine dargestellt. Auf den Bahnen (1) und (2) wurde das Lektin MAA, auf den Bahnen (3) und (4) SNA und auf den Bahnen (5) und (6) DSA verwendet. In (B) sind die mittels Coomassie Blue-Färbung markierten Proteine auf derselben PVDF Membran nach der Chemilumineszenz-Detektion dargestellt.

Bei den Lektin-Bindungstests wurde zum einen das Gesamtprotein als auch das durch Reduktion in leichte und schwere Ketten gespaltene Protein untersucht. In Abb. 3.28 (A) ist zu erkennen, daß sowohl in der schweren Kette (50 kDa) als auch im Gesamtprotein (150 kDa) Neu5Ac α (2-3)Gal, α (2-6)sialylierte Galaktose und die Gal β (1-4)GlcNAc-Sequenz vorhanden waren. An die leichte Kette des Antikörpers, gut in Abb. 3.28 (B) bei 25 kDa zu erkennen, hat keines der Lektine (A) gebunden. Die wesentlich schwächere Ausprägung der Lektinbanden im Falle des Gesamtproteins (Abb. 3.28 (A), die Bahnen (1), (3) und (5)) im Vergleich zu Abb. 3.28 (A) (Bahnen (2), (4) und (6)) hat zwei Ursachen: zum einen die schlechte Zugänglichkeit der Glykostrukturen, die im Inneren des Antikörpers liegen und erst durch die Reduktion für die Lektine gut zu erreichen sind, und zum anderen den langsameren Transfer der großen Antikörpermoleküle auf die PVDF Membran im Western Blot verglichen mit den Antikörperfragmenten. Die Befunde des Lektin Bindungstests stimmen mit den in der Literatur aufgeführten Daten zur der Glykosylierung der leichten und schweren Kette von IgG Antikörpern überein [145].

3.4.2.2 Bestimmung des Neutralzuckergehaltes des R24 Antikörpers

Die colorimetrische Bestimmung des Gehaltes an proteingebundenen Neutralzuckern wie Mannose, Fukose und Galaktose erfolgte mittels der Resorcin/Schwefelsäure Mikromethode nach Monsigny et al. (1988) [121]. Bei dieser Methode absorbieren die verschiedenen mit Resorcin gefärbten Zucker unterschiedlich stark UV-Licht. So tragen Man (100 % Relative Absorption (RA)), Fuc (74 % RA) und Gal (72 % RA) sehr stark zur Absorption bei, während GlcNAc (2 % RA) und Neu5Ac (0 % RA) kaum zu detektieren sind. Zur quantitativen Auswertung wurde eine Eichreihe mit Mannose als Standard erstellt. Mannose ist Hauptbestandteil der erwarteten N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharide der Antikörper und eignet sich somit am ehesten als Standard.

Tabelle 3.17: Neutralzucker-Gehalt von 1 mg R24 Antikörper.

Kultivierungs- bedingungen	Neutralzuckergehalt ^a [$\mu\text{g}/\text{mg}$ IgG]
pH 7,4	9,19
pH 7,2	9,01
pH 6,9	9,01
HEPES	9,94
SuperSpinner	9,55

^aBezogen auf Mannose als Standard

Die in Tabelle 3.17 aufgeführten Gehalte an Neutralzuckern der produzierten Antikörper zeigen, daß die unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen so gut wie keinen Einfluß auf den gesamten Neutralzuckergehalt des Proteins hatten. Im Durchschnitt waren 9,3 μg Neutralzucker pro mg Antikörper zu detektieren.

Aus den in der Literatur [121] aufgeführten relativen Absorptionen der verschiedenen Zucker kann die Absorption für die, laut Literatur zu erwartenden, biantennären Digalakto-Komplex-Typ-Oligosaccharidstrukturen abgeschätzt werden. Legt man für die Berechnung eine fukosylierte biantennäre Digalakto-Komplex-Typ-Struktur zu Grunde, entspricht die erwartete Absorption von 3·Man, 2·Gal und 1·Fuc (die vier GlcNAc tragen nur geringfügig und die Sialinsäuren überhaupt nicht zur Absorption bei) derjenigen von ca. 5 Mannose-Einheiten. Hieraus kann dann auf das Vorhandensein von vergleichsweise ca. 1,5 bis 1,6 Mol fukosylierten biantennären Digalakto-Komplex-Typ-Oligosacchariden pro Mol Antikörpermolekül unter allen Kulturbedingungen geschlossen werden. Wenn die Komplex-Typ-Strukturen allerdings nicht vollständig galakto- oder fukosyliert sind, steigt das Verhältnis von Zuckerketten pro Antikörpermolekül an. Die erwartete zweifache N-Glykosylierung pro Antikörper (eine N-Glykosylierung pro schwerer Kette) entspricht also den erhaltenen Resultaten [148].

3.4.2.3 Qualitative und quantitative Bestimmung des Sialinsäuregehaltes mittels HPLC

Die Untersuchungen des Sialinsäuregehaltes der unter verschiedenen Kulturbedingungen produzierten R24 Antikörper erfolgten mittels RP-HPLC und HPAEC-PAD. Zur Bestimmung des Gehaltes der R24 Antikörper an Neu5Ac und Neu5Gc wurden diese zunächst durch eine Säurehydrolyse von den proteingebundenen Oligosacchariden abgespalten. Nach Derivatisierung der Sialinsäuren mit dem fluoreszierenden Farbstoff DMB wurden die Sialinsäuren Neu5Ac und Neu5Gc mittels einer RP-HPLC aufgetrennt und mit dem Fluoreszenzdetektor bei 448 nm gemessen [53]. Anhand der Peakflächen (Abb. 3.29) der Sialinsäureprofile konnte anhand von Eichgeraden, die mittels Referenzsubstanzen erstellt wurden, eine rechnergestützte Quantifizierung von Neu5Ac und Neu5Gc vorgenommen werden.

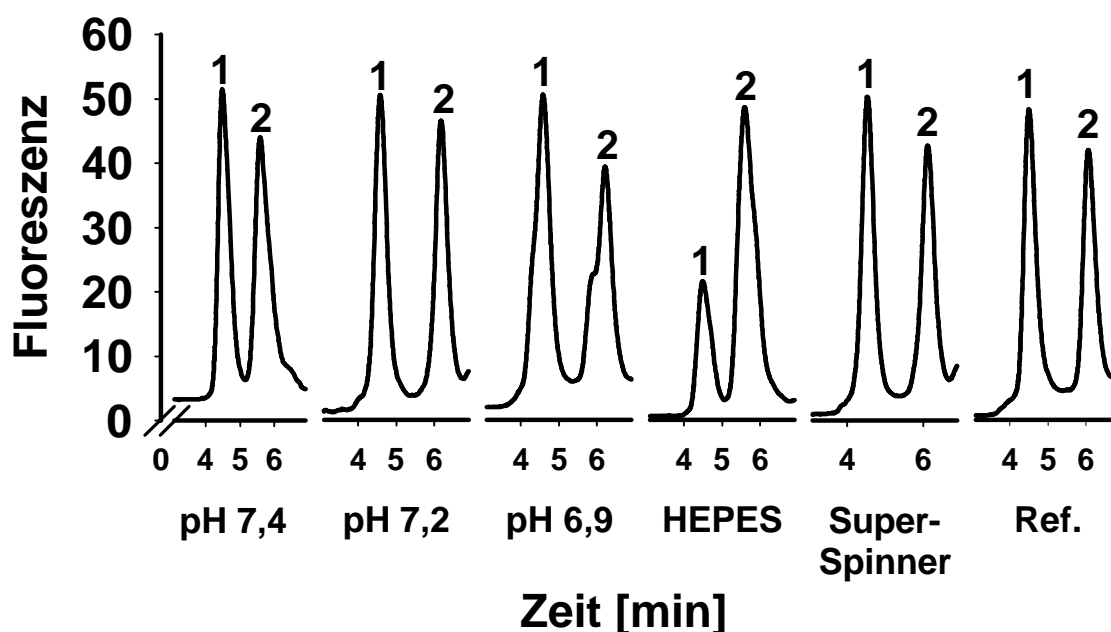


Abbildung 3.29: Elutionsprofile der Reversed-Phase HPLC der fluoreszierenden DMB-Derivate von Neu5Gc (1) und Neu5Ac (2) der R24 Antikörper, die mit drei $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ (pH 7,4; 7,2 und 6,9) und einem HEPES-Puffersystem im 2-Liter-Bioreaktor sowie im SuperSpinner Kultursystem produziert wurden.

Die rechnergestützte Auswertung der Peakflächen von Neu5Ac und Neu5Gc ist in Tab. 3.18 dokumentiert.

Tabelle 3.18: Gehalt des R24 Antikörpers an Neu5Ac und Neu5Gc und das molare Verhältnis der Sialinsäuren zu den R24 Antikörpern, ermittelt durch RP-HPLC.

Kultivierungs- bedingungen	Neu5Ac $\left[\frac{\mu\text{g}}{\text{mg IgG}}\right]$	Neu5Gc $\left[\frac{\mu\text{g}}{\text{mg IgG}}\right]$	$\frac{\text{Mol Neu5Ac}}{\text{Mol Antikörper}}$ ^a [%]	$\frac{\text{Mol Neu5Gc}}{\text{Mol Antikörper}}$ ^a [%]	$\frac{\text{Mol Sialinsäure}}{\text{Mol Antikörper}}$ ^a [%]
pH 7,4	0,262	0,196	12,7	9,0	21,7
pH 7,2	0,268	0,280	13,0	12,9	25,9
pH 6,9	0,139	0,147	6,7	6,8	13,5
HEPES	0,380	0,130	18,4	6,0	24,4
SuperSpinner	0,217	0,243	10,5	11,2	21,7

^a Molmasse R24: 150000 g/mol; Molmasse Neu5Ac: 309,3 g/mol;
Molmasse Neu5Gc: 325,3 g/mol

Wie aus Tab. 3.18 hervorgeht, lag das molare Verhältnis zwischen den Sialinsäuren und den Antikörpern bei den $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferten (mit Ausnahme der Kultur bei pH 6,9) und der HEPES-gepufferten Kultivierungen bei 21 bis 25 %. Bei der pH 6,9 Kultivierung wurden mit knapp 13,5 % ein nur ca. halb so hoher Sialinsäuregehalt gemessen. Diese Ergebnisse stimmen mit den von Partel et al. 1992 veröffentlichten [148] Daten überein. Die von Partel et al. mittels radioaktiver Markierung bestimmten Mengen an Sialinsäuren in Maus IgGs, welche in serumfreiem Medium produziert wurden, ergaben ein molares Verhältnis von 19 %. In allen Kultivierungen besaß der Antikörper nahezu gleiche Mengen von Neu5Ac und Neu5Gc, mit Ausnahme der Antikörper, die im HEPES-Kultursystem produziert wurden und dreimal so viel Neu5Ac wie Neu5Gc besaßen.

Das molare Verhältnis von Neu5Ac zu Neu5Gc wurde zusätzlich durch HPAEC-PAD ermittelt. Dazu wurden zwei verschiedene Vorgehensweisen gewählt. Als erstes wurden die Sialinsäuren durch Säurehydrolyse vom Antikörper abgespalten und chromatographiert. Beim zweiten Ansatz wurden zunächst die N-Glykane mittels Hydrazinolyse vom Antikörper abgespalten und isoliert. Darauffolgend wurden die Sialinsäuren von den N-Glykanen säurehydrolytisch abgespalten und chromatographiert (siehe Abb. 3.30). Da keine genauen Angaben über die hierfür eingesetzten Antikörpermengen vorlagen, konnte eine absolute quantitative Auswertung nicht erfolgen. Die HPAEC-PAD wurde von Herrn Dr. H. Conradt an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig durchgeführt.

Tabelle 3.19: Molares Neu5Ac/Neu5Gc-Verhältnis des R24 Antikörpers ermittelt nach Derivatisierung durch RP-HPLC und in nativer Form durch HPAEC-PAD.

Kultivierungs- bedingungen	Neu5Ac/ Neu5Gc ^a	Neu5Ac/ Neu5Gc ^b	Neu5Ac/ Neu5Gc ^c
pH 7,4	1 / 0,71	1 / 1,34	1 / 0,23
pH 7,2	1 / 0,99	1 / 1,59	1 / 0,59
pH 6,9	1 / 1,01	1 / 1,28	1 / 0,69
HEPES	1 / 0,33	1 / 0,44	1 / 0,20
SuperSpinner	1 / 1,06	1 / 1,11	1 / 0,76

^a Bestimmung als DMB-Derivate durch RP-HPLC nach Abspaltung mittels Säurehydrolyse vom Gesamtprotein.

^b Bestimmung mittels HPAEC-PAD nach Abspaltung durch Säurehydrolyse vom Gesamtprotein.

^c Bestimmung mit HPAEC-PAD nach N-Glykanabspaltung mittels Hydrazinolyse und anschließender Säurehydrolyse.

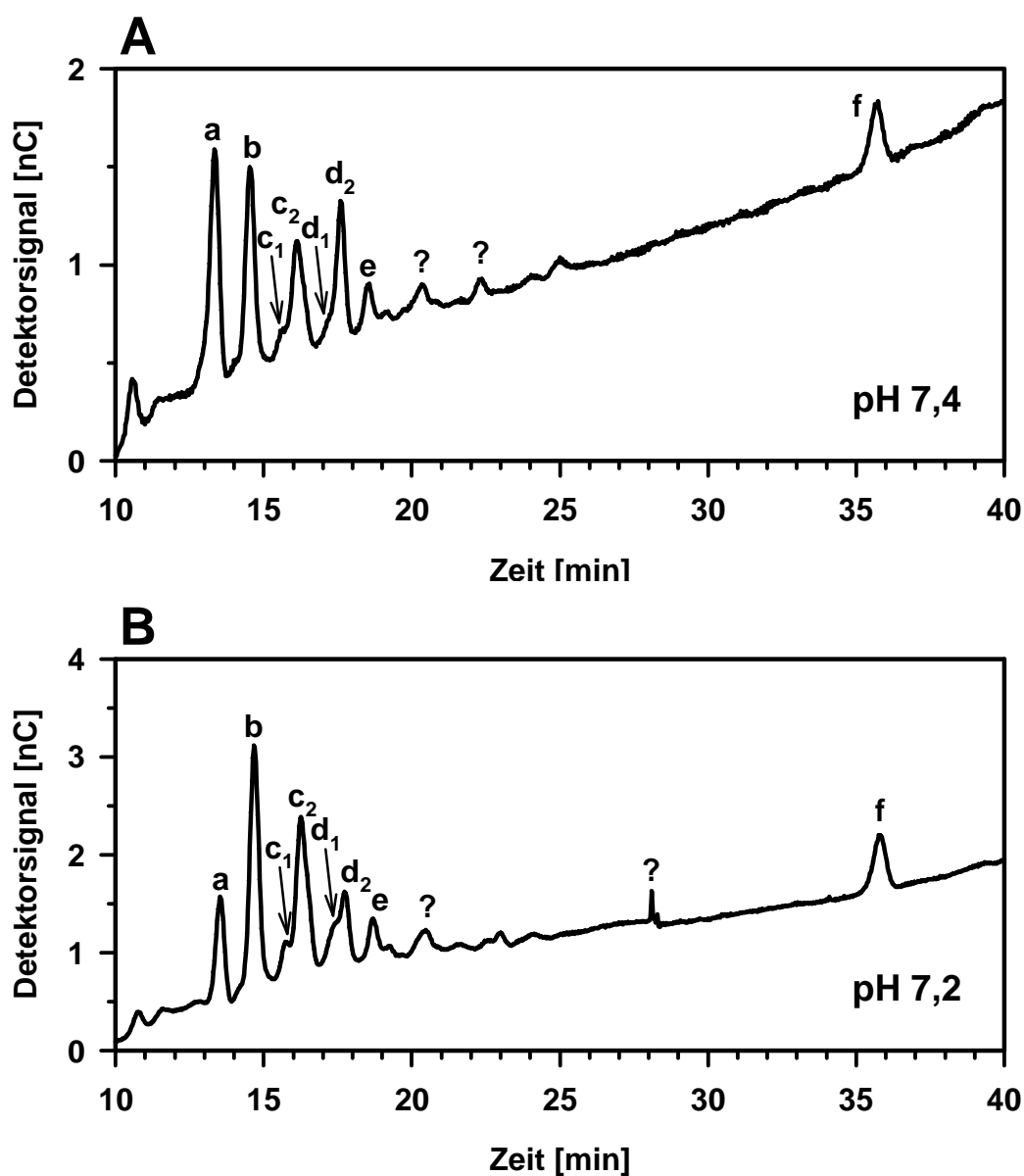
Die ermittelten Neu5Ac/Neu5Gc-Verhältnisse (Tab. 3.19) zeigen, daß die mittels RP-HPLC erhaltenen Molverhältnisse weitestgehend mit denen bei der HPAEC-PAD übereinstimmen. In beiden Fällen waren die Sialinsäuren von den Antikörpern direkt säurehydrolytisch abgespalten worden. Im Vergleich hierzu weichen die Molverhältnisse von Neu5Ac zu Neu5Gc in den Zuckerketten, die zunächst hydrazinolytisch abgespalten wurden, zum Teil deutlich voneinander ab. Bei Sialinsäurebestimmungen, die nach Hydrazinolyse der Oligosaccharide und anschließender Säurehydrolyse erfolgte, war der Gehalt an Neu5Ac deutlich erhöht. Dieses Ergebnis kann mit der, zumindest teilweisen, Abspaltung der Acetyl- bzw. Glykolylguppe der Sialinsäuren bei der Hydrazinolyse und der späteren Reacetylierung (siehe Kap. 2.6.11.1) erklärt werden. Bei diesen chemischen Reaktionen wird Neu5Gc zunächst desglykolyliert, und durch anschließende Reacetylierung wird Neu5Ac gebildet.

Alle Bestimmungen des Sialinsäuregehaltes ergaben, daß Neu5Ac und Neu5Gc im R24 Antikörper vorhanden waren. Das ist von besonderem Interesse, da Neu5Gc beim Menschen nicht vorkommt [160] und es somit beim Einsatz des Antikörpers bei der Immuntherapie beim Menschen zu Komplikationen auf Grund der Immunogenität von Neu5Gc kommen könnte. Raju et al. (2000) beschreiben hingegen, daß in Maus IgG Antikörpern kein Neu5Ac zu finden ist [160]. Es ist somit ein wichtiger Befund, daß die murine Hybridomzelle HB-8445 in der Lage ist, IgG Antikörper zu produzieren, die sowohl Neu5Gc als auch Neu5Ac besitzen.

3.4.2.4 Strukturelle Charakterisierung und Quantifizierung der Asialo-Oligosaccharide mittels HPAEC-PAD

Zur qualitativen und quantitativen Charakterisierung der N-glykosidisch gebundenen Asialo-Oligosaccharide der R24 Antikörper wurden diese mittels HPAEC-PAD

chromatographisch aufgetrennt. Dazu wurden die N-Glykane durch Hydrazinolyse vom Protein abgespalten und durch milde Säurehydrolyse desialyliert [173, 170]. Anhand von Referenzoligosacchariden und den Sialinsäuren Neu5Ac und Neu5Gc konnten den Peaks in den Elutionsprofilen der HPAEC-PAD definitive Oligosaccharidstrukturen zugeordnet werden [60].



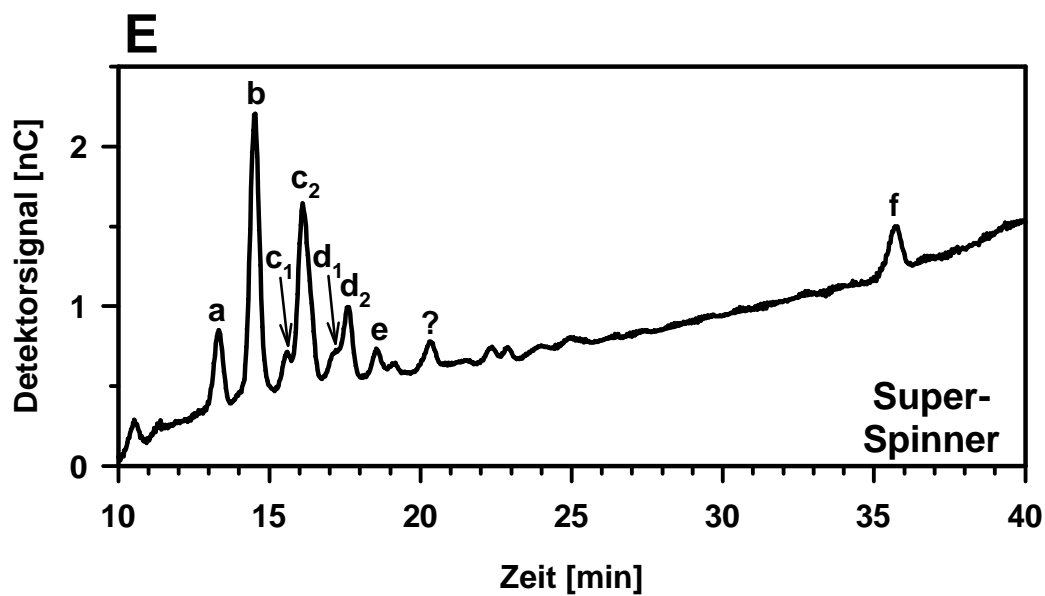
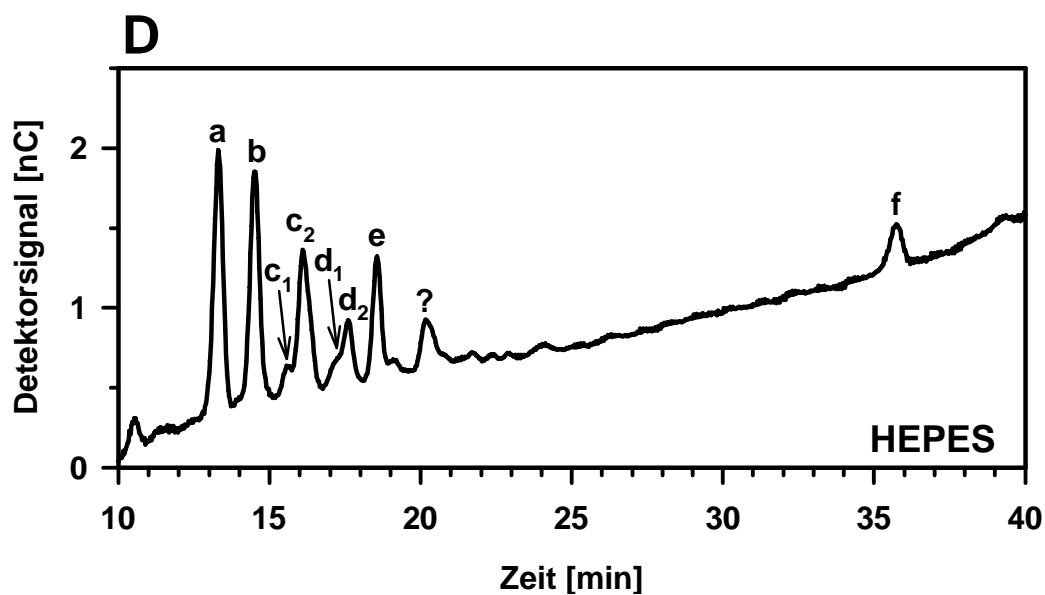
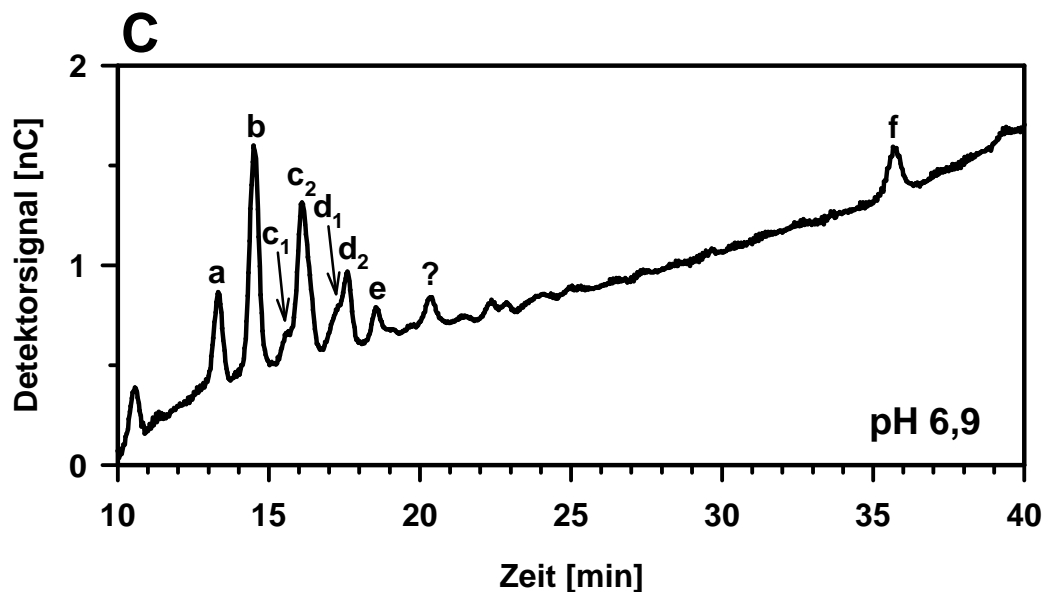


Abbildung 3.30: HPAEC-PAD Elutionsprofile der N-glykosidisch gebundenen Asialo-Oligosaccharide der R24 Antikörper, die unter verschiedenen Kulturbedingungen produziert wurden. (A) pH-Wert 7,4, (B) pH-Wert 7,2, (C) pH-Wert 6,9, (D) HEPES, (E) SuperSpinner. Den markierten Peaks konnten durch Vergleichsläufe mit entsprechenden Referenzsubstanzen die in Abb. 3.31 dargestellten Strukturen zugeordnet werden.

Abb. 3.30 zeigt die HPAEC-Elutionsprofile der neutralen Oligosaccharide (Peaks b, c₁, c₂, d₁, d₂ und e) und die aus den Oligosacchariden stammenden Sialinsäuren Neu5Ac und Neu5Gc (Peaks a und f). Peak b markiert eine fukosylierte biantennäre Agalakto-Komplex-Typ-Zuckerkette während Peak c₂ einer fukosylierten biantennären Monogalakto-Komplex-Typ-Zuckerkette entspricht. Neben diesen beiden Hauptkomponenten ist die fukosylierte biantennäre Digalakto-Komplex-Typ-Zuckerkette (Peak d₂) das dritthäufigst vorkommende Oligosaccharid. Es konnten auch geringere Mengen von nicht fukosylierten Agalakto-, Monogalakto- und Digalakto-Komplex-Typ-Oligosacchariden (Peaks c₁, d₁ und e) detektiert werden. In Abb. 3.31 sind die in den HPAEC-Profilen zugeordneten Oligosaccharidstrukturen schematisch dargestellt. In Tab. 3.20 sind die prozentualen Verhältnisse der Oligosaccharid-Peakflächen aufgeführt.

Die HPAEC-PAD-Messung der desialylierten N-Glykane der unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen produzierten R24 Antikörper zeigten, daß in allen Antikörpern die zu erwartenden biantennären Strukturen vom Komplex-Typ zu finden waren [73]. Ein Maß für die Mengen der N-Glykane stellt das Integral über die Peakflächen dar, die den verschiedenen Oligosacchariden zugeordnet werden konnten. Die Peakflächen der Peaks wurden dazu rechnergestützt ermittelt, was eine quantitative Interpretation ermöglichte.

Da keine genauen Angaben über die für die HPAEC-PAD eingesetzten Antikörpermengen vorlagen, konnte eine absolut quantitative Auswertung nicht erfolgen. Die Peakflächen konnten auch nicht als ein absolut genaues, quantitatives Maß für die einzelnen Strukturen gewertet werden, da dazu eine Eichung des Detektorsignals für jede einzelne Struktur notwendig gewesen wäre. Eine relative Quantifizierung der einzelnen Strukturen bei den fünf R24 Antikörpern untereinander war aber möglich (siehe Tab. 3.20).

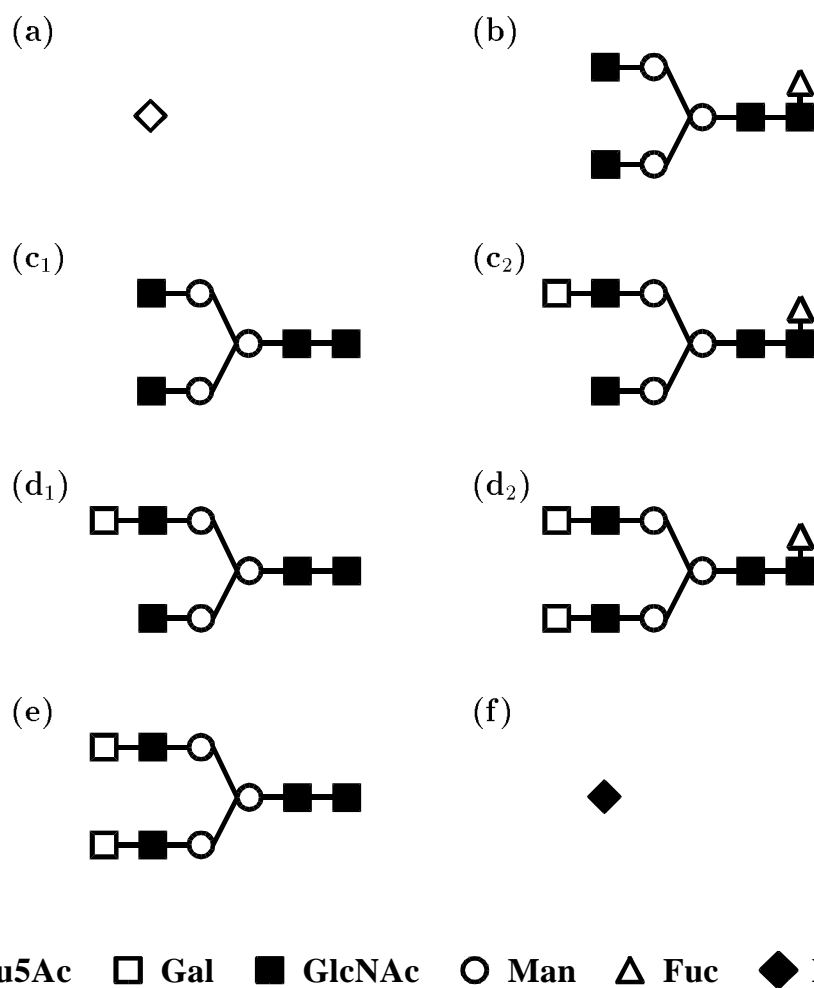


Abbildung 3.31: Schematische Darstellung der Sialinsäuren und der biantennären Komplex-Typ-Oligosaccharidstrukturen, die in den HPAEC-PAD Profilen (siehe Abbildung 3.30) den markierten Peaks zugeordnet werden konnten.

Unter allen Kultivierungsbedingungen war dabei ein ähnliches Verteilungsmuster der Oligosaccharide zu finden. Ausgehend von der Komplex-Typ-Grundstruktur waren alle Formen der Zuckerketten, angefangen von der biantennären Agalacto- (ca. 50 %) über die Monogalacto- (ca. 30 %) bis zur Digalacto-Komplex-Typ-Struktur (ca. 20 %), vorhanden. Ca. 80 % der N-Glykane waren dabei an der Kernstruktur fukosyliert. „Bisecting“-Strukturen, wie sie bei humanen Antikörpern häufig zu finden sind, konnten in den Elutionsprofilen nicht identifiziert werden.

Tabelle 3.20: Auflistung der prozentualen Verhältnisse der Oligosaccharid-Peakflächen (b), (c₁+c₂), (d₁+d₂) und (e) der HPAEC-PAD Profile (Abbildung 3.30).

Kultivierungs- bedingungen	Peak (b) [%]	Peak (c ₁ +c ₂) ^a [%]	Peak (d ₁ +d ₂) ^b [%]	Peak (e) [%]
pH 7,4	36	28	28	8
pH 7,2	41	36	18	5
pH 6,9	39	39	18	4
HEPES	38	32	14	16
SuperSpinner	43	38	14	5

^a Der Anteil des defukosylierten Oligosaccharids c₁ beträgt ca. 20 bis 25 % an der Gesamtfraktion c₁ + c₂.

^b Der Anteil des defukosylierten Oligosaccharids d₁ beträgt ca. 15 bis 40 % an der Gesamtfraktion d₁ + d₂.

Als ein Trend in den CO₂/HCO₃⁻-gepufferten Systemen konnte festgestellt werden, daß es bei den N-gebundenen Oligosacchariden mit einem Absinken des pH-Wertes zu einer Verminderung von Galaktose-tragenden Strukturen kam. Der im HEPES-Puffersystem produzierte Antikörper besaß einen auffallend hohen Anteil an der biantennären Digalakto-Struktur e ohne Fukose (siehe Abb. 3.31).

Zur Verifizierung der mittels HPAEC-PAD gefundenen N-Glykane wurden zusätzlich massenspektrometrische Techniken eingesetzt.

3.4.2.5 Molmassenbestimmung der Asialo-Oligosaccharide mittels MALDI-TOF-MS

Mittels MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight-Mass Spectrometry) wurden die Molmassen der bei der HPAEC-PAD gefundenen und postulierten Strukturen bestimmt. Die Oligosaccharide wurden von den R24 Antikörpern mittels Hydrazinolyse abgespalten und säurehydrolytisch desialyliert. Mit MALDI-TOF-MS ist es möglich auch große Biomoleküle als Ionen im gasförmigen Zustand zu erzeugen und ihre m/z-Werte zu bestimmen. Dazu werden die Oligosaccharide in eine Matrix aus 2,5-Dihydroxybenzoesäure eingebettet und mit Laserlicht als Ionen in die Gasphase gebracht. Die Ionen können dann mit einem Flugzeitmassenspektrometer detektiert werden.

Die MALDI-TOF-Massenspektrometrie wurde durch das Labor von Dr. M. Nimtz an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig durchgeführt [140].

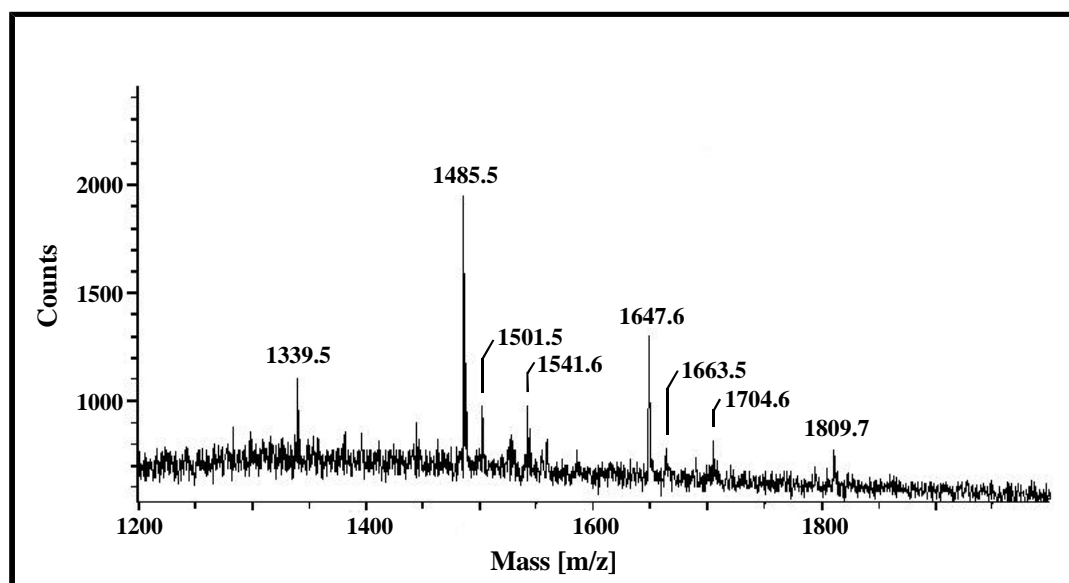


Abbildung 3.32: MALDI-TOF Massenspektrum der mittels Hydrazinolyse abgespaltenen und durch Säurehydrolyse desialytierten Oligosaccharide der R24 Antikörper aus der SuperSpinner-Kultur.

Die MALDI-TOF Massenspektren der Asialo-Oligosaccharide der R24 Antikörper aus der HEPES- und den vier $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferten Kulturen ergaben Signale der $(\text{M}+\text{Na})^+$ -Ionen für m/z bei 1339 ($\text{Hex}_3\text{HexNAc}_4$), 1485 ($\text{Hex}_3\text{HexNAc}_4\text{dHex}_1$), 1501 ($\text{Hex}_4\text{HexNAc}_4$), 1647 ($\text{Hex}_4\text{HexNAc}_4\text{dHex}_1$), 1663 ($\text{Hex}_5\text{HexNAc}_4$) und 1809 ($\text{Hex}_5\text{HexNAc}_4\text{dHex}_1$). $(\text{M}+\text{Na})^+$ -Ionen bei m/z 1541 ($\text{Hex}_3\text{HexNAc}_5$) und 1704 ($\text{Hex}_4\text{HexNAc}_5$) waren in den Spektren der Oligosaccharide aus den Kulturen bei pH 7,2; 6,9 und der SuperSpinner-Kultur zu finden.

Die Massensignale im MALDI-TOF-Spektrum konnten den mittels HPAEC-PAD identifizierten Oligosacchariden zugeordnet werden. Eine Auflistung und Zuordnung der N-Glykanstrukturen zu den m/z -Werten ist in Tab. 3.21 dargestellt. Aus den Spektren der N-Glykane aus den Kultivierungen bei pH 7,2 und pH 6,9 und der SuperSpinner-Kultur konnten Molmassen ermittelt werden, die den in Tab. 3.21 vorgeschlagenen „bisecting“ Strukturen I ($m/z = 1541,6$) und II ($m/z = 1704,6$) zugeordnet werden können. Die Signalintensität dieser Strukturen ist vergleichsweise niedrig (vergleiche Abb. 3.32). In den Spektren der $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferten Kultur bei pH 7,4 und der HEPES-Kultur sind die Signal-Rauschverhältnisse zu ungünstig, als daß Peaks der „bisecting“ Strukturen I oder II zweifelsfrei zu erkennen waren.

Tabelle 3.21: Die m/z -Werte der einfach geladenen Molekülonen der Asialo-N-Glykane aus R24 Antikörpern (SuperSpinner) des MALDI-TOF Massenspektrums (vergleiche Abb. 3.32).

Peak ^a	Strukturen ^b	m/z [M+Na] ⁺
b:	$\text{GlcNAc}\hat{0}2\text{Man}\hat{N}6$ $\text{GlcNAc}\hat{0}2\text{Man}\hat{N}3$ $\hat{6}\text{Man}\hat{0}4\text{GlcNAc}\hat{0}4\text{GlcNAc}$ $\text{Fuc}\hat{N}6$	1485,5
c ₁ :	$\text{GlcNAc}\hat{0}2\text{Man}\hat{N}6$ $\text{GlcNAc}\hat{0}2\text{Man}\hat{N}3$ $\hat{6}\text{Man}\hat{0}4\text{GlcNAc}\hat{0}4\text{GlcNAc}$	1339,5
c ₂ :	$\text{Gal}\hat{0}4\text{GlcNAc}\hat{0}2\text{Man}\hat{N}6$ $\text{GlcNAc}\hat{0}2\text{Man}\hat{N}3$ $\hat{6}\text{Man}\hat{0}4\text{GlcNAc}\hat{0}4\text{GlcNAc}$ $\text{Fuc}\hat{N}6$	1647,6
d ₁ :	$\text{Gal}\hat{0}4\text{GlcNAc}\hat{0}2\text{Man}\hat{N}6$ $\text{GlcNAc}\hat{0}2\text{Man}\hat{N}3$ $\hat{6}\text{Man}\hat{0}4\text{GlcNAc}\hat{0}4\text{GlcNAc}$	1501,5
d ₂ :	$\text{Gal}\hat{0}4\text{GlcNAc}\hat{0}2\text{Man}\hat{N}6$ $\text{Gal}\hat{0}4\text{GlcNAc}\hat{0}2\text{Man}\hat{N}3$ $\hat{6}\text{Man}\hat{0}4\text{GlcNAc}\hat{0}4\text{GlcNAc}$ $\text{Fuc}\hat{N}6$	1809,7
e:	$\text{Gal}\hat{0}4\text{GlcNAc}\hat{0}2\text{Man}\hat{N}6$ $\text{Gal}\hat{0}4\text{GlcNAc}\hat{0}2\text{Man}\hat{N}3$ $\hat{6}\text{Man}\hat{0}4\text{GlcNAc}\hat{0}4\text{GlcNAc}$	1663,5
I:	$\text{GlcNAc}\hat{0}2\text{Man}\hat{N}6$ $\text{GlcNAc}\hat{0}4\text{Man}\hat{0}4\text{GlcNAc}\hat{0}4\text{GlcNAc}$ $\text{GlcNAc}\hat{0}2\text{Man}\hat{N}3$ $\text{Fuc}\hat{N}6$	1541,6
II:	$\text{Gal}\hat{0}4\text{GlcNAc}\hat{0}2\text{Man}\hat{N}6$ $\text{GlcNAc}\hat{0}4\text{Man}\hat{0}4\text{GlcNAc}\hat{0}4\text{GlcNAc}$ $\text{GlcNAc}\hat{0}2\text{Man}\hat{N}3$ $\text{Fuc}\hat{N}6$	1704,6

^a Benennung: siehe auch HPAEC-PAD (Abb. 3.30)

^b Postulierte Strukturen der Asialo-Oligosaccharide

3.4.2.6 Molmassenbestimmung der Oligosaccharide mittels Nano ESI-QTOF-MS

Zur genaueren Charakterisierung der Oligosaccharidstrukturen wurden die mit PN-Gase F [87] enzymatisch abgespaltenen nativen N-Glykane mittels ESI-QTOF-MS (Electrospray Quadrupol Time-of-Flight Mass Spectrometry) untersucht.

Die durch das Versprühen in ein elektrisches Feld geladenen (ionisierten) Oligosaccharide wurden mit einem Flugzeitmassenspektrometer analysiert. Die erhaltenen Signale entsprechen dem Quotienten von Masse/Ladung (m/z) der Moleküle. Bei der ESI-QTOF-MS der Oligosaccharide der R24 Antikörper wurden die Signale der zweifach geladenen Molekülonen ausgewertet.

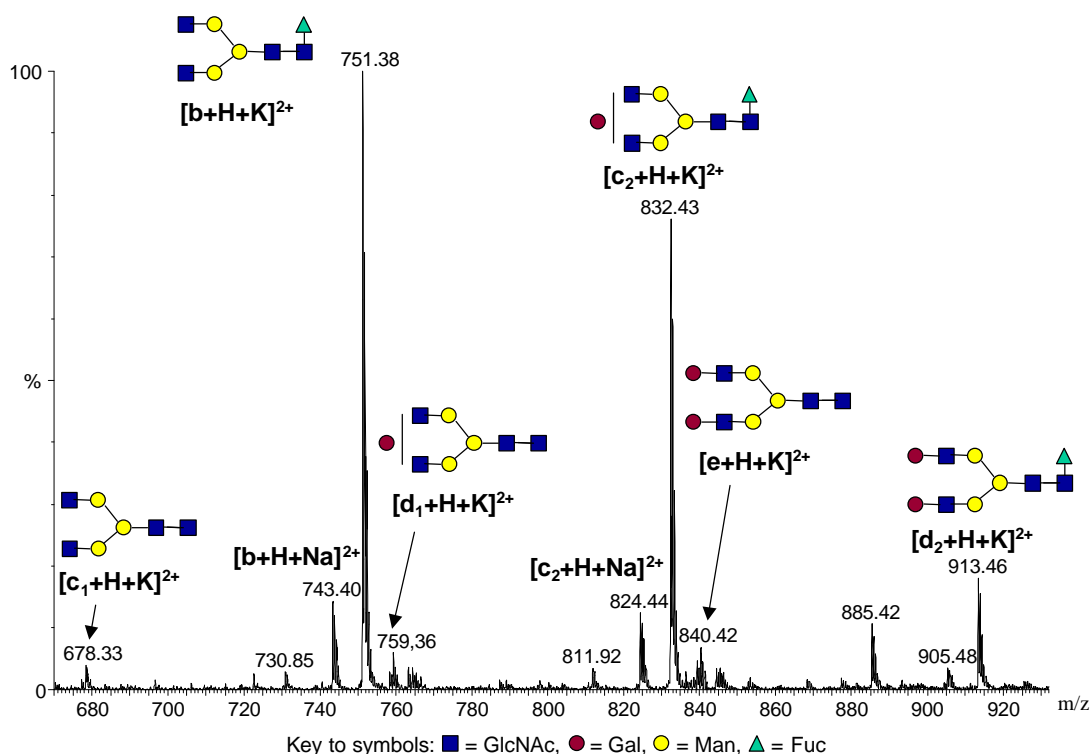


Abbildung 3.33: Nano ESI-QTOF-Massenspektrum der enzymatisch abgespaltenen nativen Oligosaccharide der R24 Antikörper aus der 2-Liter-Bioreaktor-Kultivierung bei einem pH-Wert von 7,2. Dargestellt sind die Signale der zweifach geladenen Molekülonen.

Die nativen N-Glykane der R24 Antikörpern erschienen bei der nano ESI-QTOF-MS als einfach und doppelt geladenen Molekülonen, die mit Natrium oder Kalium assoziiert waren.

Die nativen Oligosaccharide der R24 Antikörper aus der HEPES- und den vier $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferten Kulturen ergaben bei den doppelt geladene Ionen Signale für m/z bei 678,3 ($\text{Hex}_3\text{HexNAc}_4$), 751,4 ($\text{Hex}_3\text{HexNAc}_4\text{dHex}_1$), 759,4 ($\text{Hex}_4\text{HexNAc}_4$), 832,4 ($\text{Hex}_4\text{HexNAc}_4\text{dHex}_1$), 840,4 ($\text{Hex}_5\text{HexNAc}_4$) und 913,5 ($\text{Hex}_5\text{HexNAc}_4\text{dHex}_1$).

Die Massensignale im ESI-QTOF-Massenspektrum konnten den mittels HPAEC-PAD identifizierten Oligosacchariden vom Komplex-Typ zugeordnet werden. Eine Auflistung und Zuordnung der N-Glykanstrukturen zu den m/z -Werten ist in Tab. 3.22 dargestellt. Um von Signalen der zweifach geladenen Ionen auf das Molekulargewicht zu schließen, ist der m/z Wert des Signals mit zwei zu multiplizieren.

Tabelle 3.22: m/z-Werte in der ESI-QTOF-MS doppelt geladener Molekülonen der neutralen N-Glykane aus R24 Antikörpern (siehe Abbildung 3.33).

Peak ^a	Strukturen ^a	m/z [M+H+K] ²⁺
b:	$\text{GlcNAc}\overset{0}{2}\text{Man}\overset{\bar{N}}{\bar{N}}\overset{6}{6}\text{Man}\overset{0}{4}\text{GlcNAc}\overset{0}{4}\text{GlcNAc}$ $\text{GlcNAc}\overset{0}{2}\text{Man}\overset{\bar{N}}{\bar{N}}\overset{3}{3}\text{Man}\overset{0}{4}\text{GlcNAc}\overset{0}{4}\text{GlcNAc}$	751,4
c ₁ :	$\text{GlcNAc}\overset{0}{2}\text{Man}\overset{\bar{N}}{\bar{N}}\overset{6}{6}\text{Man}\overset{0}{4}\text{GlcNAc}\overset{0}{4}\text{GlcNAc}$ $\text{GlcNAc}\overset{0}{2}\text{Man}\overset{\bar{N}}{\bar{N}}\overset{3}{3}\text{Man}\overset{0}{4}\text{GlcNAc}\overset{0}{4}\text{GlcNAc}$	678,3
c ₂ :	$\text{Gal}\overset{0}{4}\text{GlcNAc}\overset{0}{2}\text{Man}\overset{\bar{N}}{\bar{N}}\overset{6}{6}\text{Man}\overset{0}{4}\text{GlcNAc}\overset{0}{4}\text{GlcNAc}$ $\text{GlcNAc}\overset{0}{2}\text{Man}\overset{\bar{N}}{\bar{N}}\overset{3}{3}\text{Man}\overset{0}{4}\text{GlcNAc}\overset{0}{4}\text{GlcNAc}$	832,4
d ₁ :	$\text{Gal}\overset{0}{4}\text{GlcNAc}\overset{0}{2}\text{Man}\overset{\bar{N}}{\bar{N}}\overset{6}{6}\text{Man}\overset{0}{4}\text{GlcNAc}\overset{0}{4}\text{GlcNAc}$ $\text{GlcNAc}\overset{0}{2}\text{Man}\overset{\bar{N}}{\bar{N}}\overset{3}{3}\text{Man}\overset{0}{4}\text{GlcNAc}\overset{0}{4}\text{GlcNAc}$	759,4
d ₂ :	$\text{Gal}\overset{0}{4}\text{GlcNAc}\overset{0}{2}\text{Man}\overset{\bar{N}}{\bar{N}}\overset{6}{6}\text{Man}\overset{0}{4}\text{GlcNAc}\overset{0}{4}\text{GlcNAc}$ $\text{Gal}\overset{0}{4}\text{GlcNAc}\overset{0}{2}\text{Man}\overset{\bar{N}}{\bar{N}}\overset{3}{3}\text{Man}\overset{0}{4}\text{GlcNAc}\overset{0}{4}\text{GlcNAc}$	913,5
e:	$\text{Gal}\overset{0}{4}\text{GlcNAc}\overset{0}{2}\text{Man}\overset{\bar{N}}{\bar{N}}\overset{6}{6}\text{Man}\overset{0}{4}\text{GlcNAc}\overset{0}{4}\text{GlcNAc}$ $\text{Gal}\overset{0}{4}\text{GlcNAc}\overset{0}{2}\text{Man}\overset{\bar{N}}{\bar{N}}\overset{3}{3}\text{Man}\overset{0}{4}\text{GlcNAc}\overset{0}{4}\text{GlcNAc}$	840,4

^a Benennung nach HPAEC-PAD (Abb. 3.30)^b Postulierte Strukturen der Asialo-Oligosaccharide

Die bei der ESI-QTOF-MS erhaltenen Molekülmassen der enzymatisch abgespaltenen N-Glykane der R24 Antikörper decken sich mit den Resultaten der MALDI-TOF-MS. Allerdings konnten im Gegensatz zu den MALDI-TOF-Spektren keine „bisecting“-Strukturen in den ESI-QTOF-Spektren nachgewiesen werden.

Eine noch genauere Untersuchung von einzelnen Molekülonen der Oligosaccharidmischung ist durch die Technik der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) möglich. Dazu wird aus der Mischung der verschiedenen Molekülonen bei der MS ein „Mutterion“ für eine zweite MS heraus gefiltert und nach Fragmentierung die Massen der Bruchstücke detektiert. Als ein Beispiel ist in Abb. 3.34 das MS/MS-Spektrum (A) und das mit den zugehörigen Strukturen versehene Fragmentierungsmuster (B) des Mutterions m/z = 913,5 aus Abb. 3.33 (Struktur d₂ aus Tab. 3.22) dargestellt.

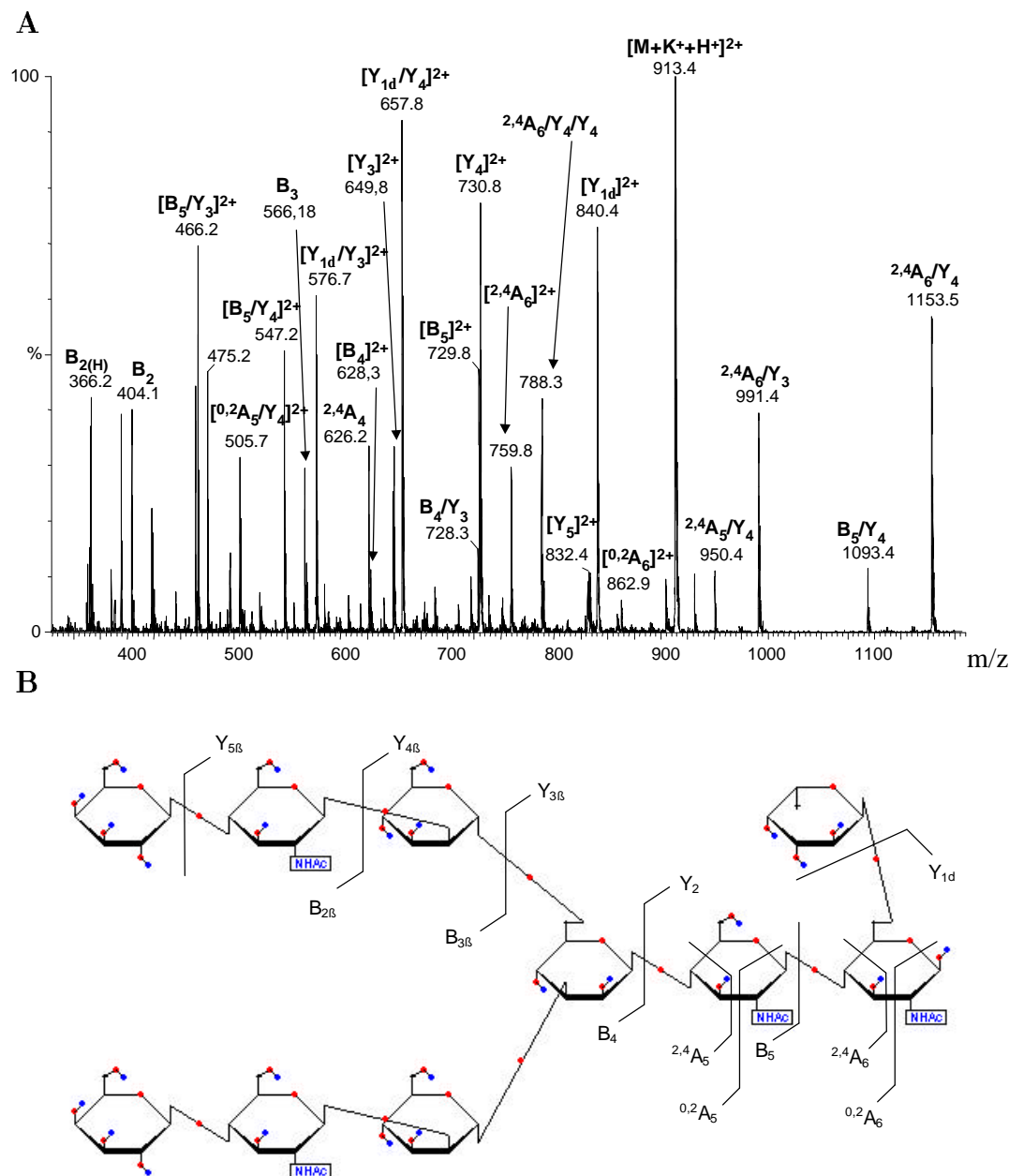


Abbildung 3.34: (A) ESI-QTOF-MS/MS des aus R24 Antikörper (pH 7,2) stammenden nativen N-Glykans d_2 (Tab. 3.22) mit dem Mutterion $m/z = 913,5$ ($[M+H+K]^{2+}$, vergleiche Abb. 3.33) und (B) die postulierte molekulare Struktur des nativen N-Glykans d_2 (Tab. 3.22) und sein Fragmentierungsmuster.

Die Molekulationenfragmente des fukosylierten Asialo-Digalakto-Komplex-Typ-Oligosaccharids (vergleiche Tab. 3.22, Struktur d_2) erschienen als einfach und doppelt geladene Spezies, die an Natrium und Kalium assoziiert waren. In Abb. 3.34 (A) sind nur die doppelt geladenen Spezies wie $[B_5]^{2+}$ mit ihrem Ladungszustand in der Abbildung markiert. Die Nomenklatur zur Beschreibung der Fragmentationen richtet sich nach dem Modell von Domon et al. (1988) [28]. Im MS/MS-Spektrum dominier-

ten die nach Spaltung der glykosidischen Bindungen entstandenen Ionen (B-Ionen), von denen viele durch innere Fragmentierung entstanden waren. Aber auch Teile von Ringstrukturen der Zucker, sogenannte „cross-ring“-Fragmente ($^{0,2}A$ -, $^{2,4}A$ -Ionen) waren als Fragmentionen zu beobachten. Sowohl der Satz von B-Ionen, wie z.B. $B_{2(H)}$ bei m/z 366,2, B_2 bei m/z 404,1, B_3 bei m/z 566,2, $[B_4]^{2+}$ bei m/z 628,3 und $[B_5]^{2+}$ bei m/z 729,8 als auch „cross-ring“-Fragmente zeigen die Richtigkeit der postulierten fukosylierten biantennären Digalakto-Komplex-Typ-Struktur.

In den ESI-QTOF-Spektren wurden neben den Asialo-Oligosacchariden auch sialylierte biantennäre Komplex-Typ-Zuckerketten detektiert, deren Spektren hier nicht aufgeführt sind. Dabei wurden allerdings nur Oligosaccharide gefunden, die die Sialinsäure Neu5Ac enthielten. Warum keine Neu5Gc-tragenden Oligosaccharide zu finden waren, wird zur Zeit intensiv diskutiert.

Die ESI-QTOF-Messungen wurden von Frau D. Šagi in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. J. Peter-Katalinić (Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Universität Münster) durchgeführt [115].

3.4.2.7 Sialidaseaktivität der Hybridomzelllinie HB-8445

Von proteingebundenen Oligosacchariden können durch postsekretorische Desialylierung die Sialinsäuren abgespalten werden. So besitzen z.B. CHO-Zellen cytosolische Sialidasen, die bei der Lyse der Zellen in das Medium übergehen. Mit fortschreitender Kulturdauer kommt es so zu einer Akkumulation von Sialidaseaktivität im Kulturüberstand [127].

Zur Überprüfung der Sialidaseaktivität in der HB-8445 Kultur wurden im Verlauf einer SuperSpinner Kultivierung sowohl Zellproben als auch Proben des Kulturüberstandes genommen und auf ihre Sialidaseaktivität hin untersucht. Die dabei gemessenen Aktivitäten sind in Tabelle 3.23 aufgeführt. Zur Aktivitätsbestimmung wurde das synthetische Sialidasesubstrat MUF-Neu5Ac eingesetzt, von dem das fluoreszierende Cumarinderivat MUF durch Sialidasen abgespalten werden kann. Als Referenzlösung diente 1 mM Methylumbelliferon (MUF) in H_2O .

Tabelle 3.23: Auflistung der gemessenen Sialidaseaktivitäten im Verlauf einer SuperSpinner Kultivierung von HB-8445 Zellen.

Zellkonzentration in der Kultur [10^5 Zellen/ml]	Sialidaseaktivität im Kulturüberstand [FU] ^a	Sialidaseaktivität im Zellysat ^b [FU] ^a
2,9	50	52
6,8	55	52
7,9	53	53
11,2	50	53
12,5	53	50
20,3	53	52
19,0	53	48
10,0	51	47

^a FU = Fluorescence Units

^b aus 1×10^6 Zellen

Die Eichung erfolgte mit 1mM MUF, wobei 1 FU einer Aktivität von $1,19 \text{ nmol h}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ entspricht.

Die 1 mM MUF-Referenzlösung ergab ein Signal von 850 FU. Zur Ermittlung der Grundfluoreszenz, der Fluoreszenz also, die bereits ohne eine Sialidaseaktivität vorhanden ist, dienten Proben mit frischem Medium, die im Mittel ein Signal von 45 FU ergaben. Die Empfindlichkeitsgrenze dieser Methode lag bei ca. $5 \text{ nmol h}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ Umsatz von MUF-Neu5Ac, was in diesem Test 6 FU entspricht.

Sowohl im Kulturüberstand als auch im Zellysat konnte keine signifikante Sialidaseaktivität festgestellt werden. Alle gemessenen Werte lagen nur geringfügig über der Grundfluoreszenz des Testes. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Aussagen von Gramer et al. (1994, 1995), die für Hybridomzelllinien im Gegensatz zu CHO Zelllinien nahezu keine cytosolische Sialidaseaktivität nachweisen konnten [42, 43]. Daraus kann geschlossen werden, daß bei sezernierten R24 Antikörpern im Kulturüberstand keine postsekretorische Desialylierung der Oligosaccharidketten stattgefunden hat.

3.4.2.8 Zusammenfassung

Bei den Lektin-Bindungstests wurden sowohl im Gesamtprotein als auch in den schweren Ketten Neu5Ac α (2-3)Gal, α (2-6)-sialylierte Galaktose und die Gal β (1-4)GlcNAc-Sequenz detektiert. Diese Befunde der Lektin-Bindungstests stimmen mit den in der Literatur aufgeführten Strukturen der N-Glykane von IgG Antikörpern überein [145], die in den folgenden HPAEC- und MS-Untersuchungen genauer bestimmt wurden.

Die unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen hatten keinen Einfluß auf den „Neutralzucker Gehalt“ (Mannose, Fucose und Galaktose) des Proteins. Im Durchschnitt waren $9,3 \mu\text{g}$ Neutralzucker pro mg Antikörper zu detektieren. Eine Abschätzung (nach der genaueren Bestimmung der Zuckerstrukturen) ergab das Vorhanden-

sein von ca. 1,5 bis 1,6 biantennären Komplex-Typ-Zuckerketten pro Antikörper. Die Neutralzuckerbestimmung ist somit also konsistent zu den zu erwartenden Ergebnissen [148].

Die Bestimmung des Sialinsäuregehaltes der R24 Antikörper mittels RP-HPLC ergab, daß Neu5Ac und Neu5Gc vorhanden waren. Das molare Verhältnis von Sialinsäuren zu Antikörpern betrug unter allen Kultivierungsbedingungen, mit Ausnahme der Kultivierung bei pH 6,9, ca. 25 %. Während der Kultivierung bei einem pH-Wert von 6,9 sank das Verhältnis mit einem Wert von 14 % fast auf die Hälfte ab. Das molare Verhältnis von Neu5Ac zu Neu5Gc betrug bei fast allen analysierten Antikörpern 1:1. Nur die Antikörper, die im HEPES-Kultursystem produziert wurden, zeigten ein Neu5Ac/Neu5Gc-Verhältnis von ca. 3:1. Die molaren Verhältnisse von Neu5Ac zu Neu5Gc bei den säurehydrolytisch vom Gesamtprotein abgespaltenen Sialinsäuren waren sowohl bei der RP-HPLC als auch der HPAEC-PAD identisch.

Die Trennung der desialylierten N-Glykane der, unter verschiedenen Kulturbedingungen produzierten R24 Antikörper mittels HPAEC-PAD zeigte, daß alle Antikörper die zu erwartenden biantennären Strukturen vom Komplex-Typ besaßen. Unter allen Kulturbedingungen war dabei ein ähnliches Verteilungsmuster der Oligosaccharide zu finden. Ausgehend von der Komplex-Typ-Grundstruktur waren sämtliche Formen der Zuckerketten, angefangen von der biantennären Agalacto- (ca. 50 %), über die Monogalacto- (ca. 30 %) bis zur Digalacto-Komplex-Typ-Struktur (ca. 20 %), vorhanden. Ca. 80 % der N-Glykane waren dabei an der Kernstruktur fukosyliert. Der im HEPES-Puffersystem produzierte Antikörper besaß einen auffallend hohen Anteil der biantennären Digalacto-Struktur ohne Fukose an der Kernstruktur (16 %) im Vergleich zu den anderen Antikörpern (ca. 6 %). „Bisecting“-Strukturen, die bei humanen Antikörpern häufig anzutreffen sind, konnten nicht nachgewiesen werden. Als ein Trend bei den $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ gepufferten Systemen kann festgestellt werden, daß es bei den N-gebundenen Oligosacchariden bei Absinken des pH-Wertes zu einer Verminderung von galaktosylierten Zuckerstrukturen kam.

Von den bei der HPAEC-PAD gefundenen N-Glykanen konnten mittels massenspektrometrischer Methoden die Molmassen bestimmt werden. Sowohl mittels MALDI-TOF-MS der durch Hydrazinolyse als auch mittels ESI-QTOF-MS der durch Enzymspaltung erzeugten N-Glykane wurden übereinstimmende Oligosaccharidstrukturen detektiert, die alle auf dem fukosylierten biantennären Komplex-Typ basierten. Bei den hydrazinolytisch abgespaltenen und säurehydrolytisch desialylierten N-Glykanen konnten bei der MALDI-TOF-MS zusätzlich zu den mittels ESI-QTOF-MS und HPAEC-PAD detektierten Strukturen Molekülmassen detektiert werden, die den „bisecting“ Komplex-Typ-Oligosacchariden zugeordnet werden könnten.

Zur detaillierten strukturellen Aufklärung der enzymatisch abgespaltenen nativen N-Glykane wurden ESI-QTOF-MS/MS Untersuchungen durchgeführt. Mittels Tandem-ESI-QTOF-Spektrometrie der fukosylierten biantennären Digalacto-Komplex-Typ-Oligosaccharide ($[\text{M}+\text{H}+\text{Ka}]^{2+}$, $m/z = 913,5$) konnten die postulierten Strukturen verifiziert werden.

Bei den ESI-QTOF-Messungen wurden neben den Asialo-Oligosacchariden auch sia-

lylierte biantennäre Komplex-Typ-Zuckerketten detektiert, die allerdings nur die Sialinsäure Neu5Ac aufwiesen. Warum kein Neu5Gc mittels ESI-MS bei den nativen Oligosacchariden nachgewiesen werden konnte, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch unklar.

Die Überprüfung von HB-8445 Zellkulturen ergab weder im Kulturüberstand noch auch im Zellysate Sialidaseaktivität. Somit konnte gezeigt werden, daß bei den in den Kulturüberstand sezernierten R24 Antikörpern keine postsekretorische Desialylierung der Oligosaccharide stattgefunden hatte.

3.4.3 Messung der molekularen Interaktion des R24 Antikörpers mit immobilisiertem G_{D3} (Biomolecular Interaction Analysis)

Bei der Biosensor Technologie wird das optische Detektionsprinzip der Surface Plasmon Resonance (SPR) angewandt. Das Biosensorsystem BIAcore 2000 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) ist so geeicht, daß eine Zunahme von 1000 RU (Resonance Units) einer Massenzunahme von ca. 1 ng/mm^2 auf der Chipoberfläche bei einem Signalrauschen von $< 2 \text{ RU}$ entspricht. Wird nun über den Sensorchip, auf dem das Antigen für einen Antikörper immobilisiert ist, eine Antikörperlösung gegeben, nimmt die Massenkonzentration auf der Oberfläche des Sensorchips in Folge der Kopplung des Antikörpers an das Antigen zu. Diese Massenzunahme erlaubt in einem Fließkammersystem eine zeitaufgelöste Studie der Kopplung des Antikörpers an sein Antigen.

Bei dem verwendeten BIAcore 2000 Gerät ist der Sensorchip Teil einer Durchflußmeßzelle, durch die fortwährend HEPES-Laufpuffer gepumpt wird.

Die Biosensor Analyse der R24 Antikörper erfolgte mit dem Gangliosid G_{D3} , das über hydrophobe Wechselwirkungen auf der Oberfläche eines CM5 Sensorchips, der mit Carboxymethyl-dextran belegt war, immobilisiert wurde [19]. Um in den Sensogrammen Detektorsignale durch unspezifische Bindungen und „bulk“ Effekte, die sich z.B. aus Salzeffekten ergeben, zu eliminieren, wurde von dem G_{D3} -Meßsignal das Meßsignal von einer mit G_{M1} beladenen Meßzelle subtrahiert.

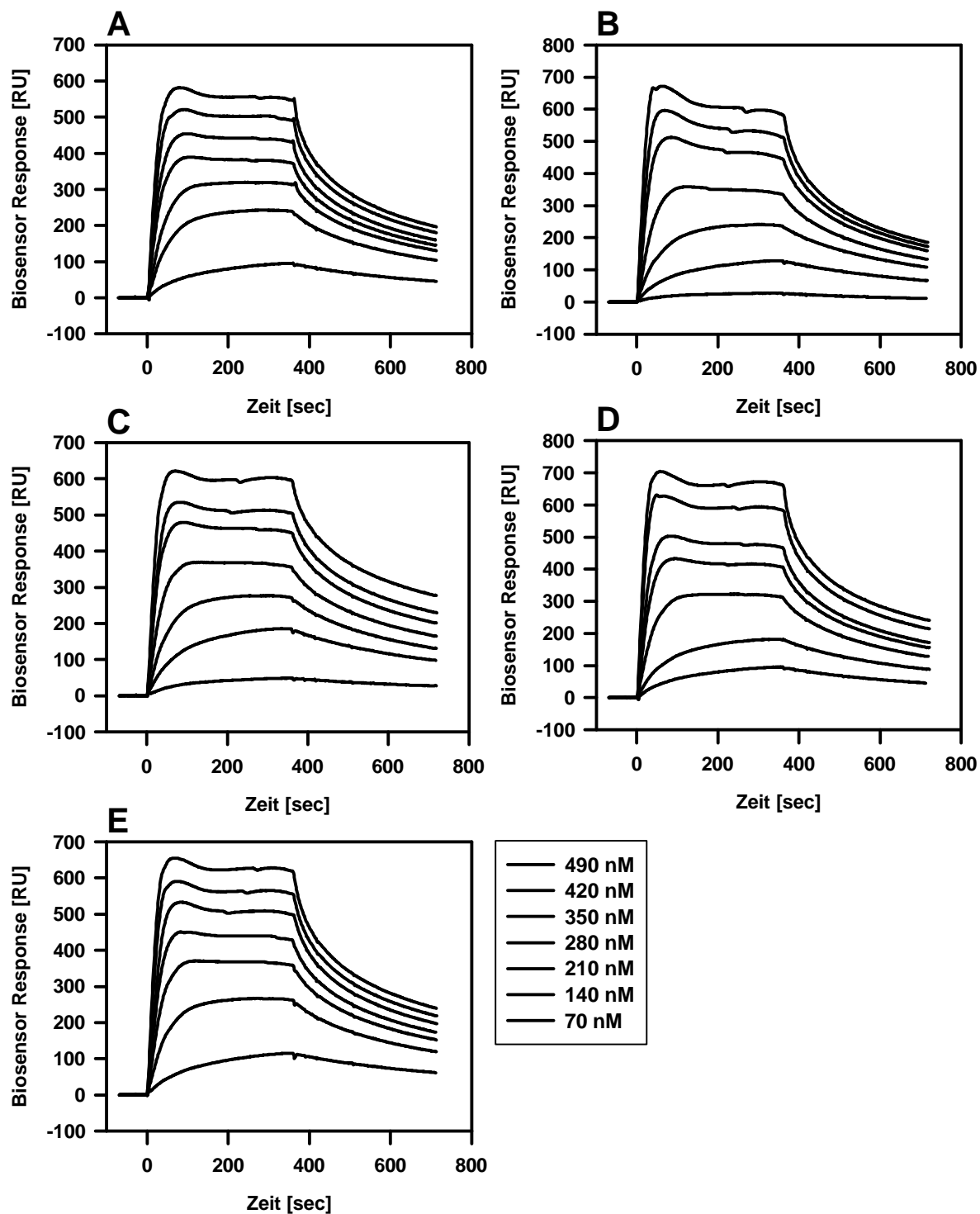


Abbildung 3.35: Bindungskinetik von immobilisiertem G_{D3} und R24 Antikörpern, die unter verschiedenen Kulturbedingungen produziert wurden: (A) pH-Wert 7,4, (B) pH-Wert 7,2, (C) pH-Wert 6,9, (D) HEPES, (E) SuperSpinner. Es wurden jeweils $30 \mu\text{l}$ R24 Antikörper mit abnehmenden Konzentrationen von 490 nM bis 70 nM injiziert. Die Flußrate betrug $5 \mu\text{l}/\text{min}$ über immobilisiertem G_{D3} . Bei den

gezeigten Sensogrammen ist das Signal der unspezifischen Wechselwirkung mit G_{M1} des Kontrollkanals subtrahiert worden.

Tabelle 3.24: Assoziationskonstanten k_a , Dissoziationskonstanten k_d und Bindungskonstanten K_A der in Abb. 3.35 gezeigten R24 – G_{D3} Interaktionen.

Kultivierungs- bedingungen	K_A^a [$\frac{10^7}{M}$]	k_a [$\frac{10^4}{M \cdot \text{sec}}$]	k_d [$\frac{10^{-3}}{\text{sec}}$]
pH 7,4	4,7	9,8	2,1
pH 7,2	3,3	7,1	2,2
pH 6,9	5,3	8,7	1,6
HEPES	4,0	7,7	1,9
SuperSpinner	4,4	7,1	1,9

^a nach Gleichung 2.8 (Kap. 2.6.13.5) ermittelt

Die Bindungskonstanten K_A für die Bindung des R24 Antikörpers aus den verschiedenen Kultivierungen an das Gangliosid G_{D3} betragen zwischen $3,3 \times 10^7/M$ und $5,3 \times 10^7/M$. Die Assoziationskonstanten k_a lagen im Bereich zwischen $7,1 \times 10^4/M \cdot \text{sec}$ und $9,8 \times 10^4/M \cdot \text{sec}$. Die Dissoziationskonstanten k_d lagen zwischen $1,6 \times 10^{-3}/\text{sec}$ und $2,2 \times 10^{-3}/\text{sec}$.

Catimel et al. (1998) hatten für die Bindung von R24 Antikörpern an G_{D3} im BIAcore-System eine K_A von $1,8 \times 10^6 M^{-1}$ mit $k_a = 4,41 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ und $k_d = 4,41 \times 10^{-2} s^{-1}$ bestimmt [19]. Ein Vergleich mit den in dieser Arbeit ermittelten Werten zeigt, daß die Assoziationskonstanten k_a in der gleichen Größenordnung wie die von Catimel et al. (1998) liegen. Die gemessenen Dissoziationskonstanten k_d und damit auch K_A sind allerdings um eine Zehnerpotenz kleiner als von Catimel et al. angegeben. Dippold et al. (1992) ermittelten mittels ELISA-Messungen eine Bindungskonstante K_A von $2 \times 10^7 M^{-1}$ [26]. Dieser Wert ist nahezu identisch mit der in der vorliegenden Arbeit bestimmten durchschnittlichen Bindungskonstanten von $4,3 \times 10^7 M^{-1}$.

Einschränkend muß zur Bestimmung der Bindungskonstanten angemerkt werden, daß sich das Adsorptions- und Desorptionsverhalten des R24 Antikörpers im verwendeten Biosensor System nur annähernd durch eine einfache 1:1 Bindung nach Langmuir beschreiben läßt [10]. Um den Einfluß von Massentransport-Effekten, „re-binding“ und „complex multi-order“ Kinetiken weitestgehend zu unterdrücken, wurden nach Catimel et al. (1998) die Bereiche der Sensogramme ausgewertet, die in der Auftragung von $\ln \text{abs}(dR/dt)$ gegen t annähernd linear waren. Die ermittelten Bindungskonstanten müssen also immer im Kontext zu dem verwendeten Test- und Datenanalyseverfahren gesehen werden und stellen nur bedingt eine absolute Kenngröße der Interaktion von R24 Antikörpern mit G_{D3} dar. Ein Vergleich der Bindungskonstanten verschiedener Antikörper in dem gleichen Meßsystem ist aber trotz aller Einschränkungen sehr gut möglich.

Ungenauigkeiten bei der Bestimmung von K_A ergab sich vor allem aus Ungenauigkeiten bei den Konzentrationen der eingesetzten Antikörper z.B. durch Pipettierfehler.

Daraus resultiert für die Bindungskonstanten ein Fehler von mindestens $\pm 1 \times 10^7 / M$ bei einem angenommenen Fehler von 10 % bei den zur Berechnung verwendeten Konzentrationsangaben. Im Rahmen der Ungenauigkeit der Messungen von K_a kann festgestellt werden, daß die Kulturbedingungen bei der Produktion des R24 Antikörpers keinen Einfluß auf dessen Bindungsverhalten an G_{D3} ausübten.

Das Bindungsverhalten im oben beschriebenen R24 – G_{D3} -System ist nicht allein von den Rezeptor- und Liganden-Konzentrationen abhängig. Als Beispiel für den Einfluß der Salzkonzentration auf die Bindung von R24 Antikörper an G_{D3} wurde HEPES-Puffer mit NaCl-Konzentrationen im Bereich von 150 mM (Standardkonzentrationen) bis 200 mM verwendet (siehe Abb. 3.36).

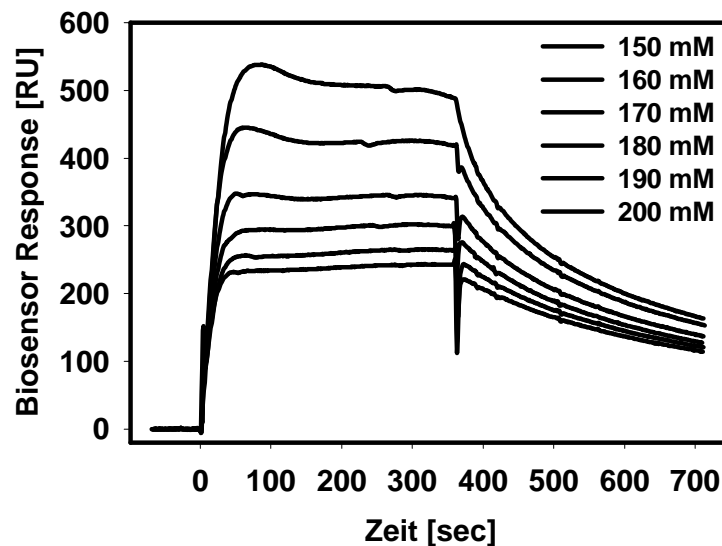


Abbildung 3.36: Bindungskinetik von R24 Antikörpern und immobilisiertem G_{D3} bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen (150 bis 200 mM) im Aufgabepuffer. Für den Test wurde R24 Antikörper aus einer Kultivierung bei pH-Wert 7,2 mit einer Konzentration von 350 nM eingesetzt. Die Durchführung erfolgte wie in Abb. 3.35 beschrieben.

Aus Abb. 3.36 ist gut ersichtlich, wie stark der Einfluß der verschiedenen Salzkonzentrationen auf das Bindungsverhalten des R24 Antikörpers war. Ausgehend von einer physiologischen Salzkonzentration von 150 mM war eine starke Abnahme der Bindungsaffinität von R24 zu G_{D3} bei geringfügigen Erhöhungen der NaCl-Konzentration zu beobachten.

Die Bindungskonstanten K_A (siehe Tab. 3.25) der R24 Antikörper bei den verschiedenen NaCl-Konzentrationen an G_{D3} betragen zwischen $3,6 \times 10^7 / M$ (150 mM NaCl) und $10,2 \times 10^7 / M$ (200 mM NaCl). Die Assoziationskonstanten k_a lagen im Bereich zwischen $8,2 \times 10^4 / M \cdot \text{sec}$ (150 mM NaCl) und $18,7 \times 10^4 / M \cdot \text{sec}$ (200 mM NaCl). Die Dissoziationskonstanten k_d lagen zwischen $1,8 \times 10^{-3} / \text{sec}$ (150 mM NaCl) und $2,3 \times 10^{-3} / \text{sec}$ (200 mM NaCl).

Tabelle 3.25: Auflistung der maximalen Signalstärke und der nach Gleichung 2.13 ermittelten Bindungskonstanten der Biosensor Analysen der R24 Antikörper-G_{D3} Interaktionen bei verschiedenen Salzkonzentrationen im Aufgabepuffer (vergleiche Abb. 3.36).

NaCl Konzentration [mM]	Maximale Signalstärke [RU]	K_A [$\frac{10^7}{M}$]	k_a [$\frac{10^4}{M\cdot\text{sec}}$]	k_d [$\frac{10^{-3}}{\text{sec}}$]
150	537	3,6	8,2	2,3
160	445	6,8	14,8	2,2
170	347	7,0	14,5	2,1
180	301	8,6	17,0	2,0
190	264	8,5	16,0	1,9
200	243	10,2	18,7	1,8

Die Unterschiede der Bindungskonstanten K_A bei den verschiedenen NaCl-Konzentrationen ergaben sich aus den verschiedenen Assoziationskonstanten (siehe Tab. 3.25). So war k_a bei 200 mM NaCl fast dreifach größer als bei 150 mM NaCl. Die Dissoziationskonstanten hingegen waren nahezu gleich, was sich mit der Versuchsdurchführung erklären läßt. Nur bei der Assoziation bis zum Zeitpunkt $t = 360$ s (siehe Abb. 3.36) waren im Puffer die verschiedenen NaCl-Konzentrationen vorhanden. Bei der Dissoziation hingegen wurde die Oberfläche der Meßkammer bei allen Messungen mit Puffer (Laufpuffer) überspült, der einheitlich 150 mM NaCl enthielt. Die gleichen NaCl-Konzentrationen bei der Dissoziation sollten somit auch zu den gleichen Dissoziationskonstanten führen.

Die Salzkonzentration im Puffer war ein die Messungen stark beeinflussender Faktor in diesem System. Da es sich bei der Bindung von Antikörpern an ihre Antigene um elektrostatische Wechselwirkungen handelt, ist dieses Salzeffekt auch zu erwarten gewesen; bemerkenswert ist aber, wie stark sich der Einfluß der Salzkonzentration im Puffer auswirkte. In Abbildung 3.36 ist deutlich zu erkennen, daß bei steigenden Salzkonzentrationen die Bindung zunehmend schlechter wird. Besonders zu beachten ist, daß bereits ein Konzentrationsunterschied von 10 mM NaCl im Puffer (150 mM zu 160 mM NaCl) einen 20 %-tigen Unterschied im maximalen Meßsignal und sogar fast eine Halbierung der Bindungsrate zur Folge hatte. Bei einer NaCl-Konzentration von 500 mM im Aufgabepuffer konnte praktisch keine Antikörperassoziation mehr detektiert werden. Durch die Zugabe von 5 mM CaCl_2 zu dem HEPES-Aufgabepuffer mit 150 mM NaCl (Versuchsbedingungen wie in Abb. 3.36) nahm das Meßsignal um 20 % ab, was auf einen starken Einfluß von Ca^{2+} auf das Bindungsverhalten hindeutet.

Um verschiedene Antikörperproben miteinander vergleichen zu können, muß vor allem darauf geachtet werden, daß alle Proben die gleichen Pufferbedingungen sowohl zum Zeitpunkt der Assoziation als auch bei der Dissoziation haben. Diese Voraussetzung für die Messungen wurde durch vorhergehende Dialyse der Antikörperproben gegen den im BIAcore 2000 verwendeten Laufpuffer geschaffen.

3.4.3.1 Zusammenfassung

Die Untersuchung des Bindungsverhaltens des R24 Antikörpers zum Gangliosid G_{D3} mittels SPR im BIAcore 2000 ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den unter verschiedenen Kulturbedingungen produzierten Antikörpern. Die ermittelten Bindungskonstanten K_A lagen alle in einem Bereich von $3,3 \times 10^7 / M \pm$ bis $5,3 \times 10^7 / M$ mit einem Mittelwert von $4,3 \times 10^7 / M$. Im Rahmen der Meßgenauigkeit von ca. $\pm 1 \times 10^7 / M$ können sie als nahezu identisch bewertet werden. Die unterschiedlichen Kulturbedingungen hatten somit keinen Einfluß auf die Bindungseigenschaften von R24 Antikörpern an G_{D3} .

Kapitel 4

Zusammenfassung

Bei dem monoklonalen Maus IgG₃ Antikörper (mAk) R24 aus der Maus-Maus Hybridomzelllinie HB-8445 (ATCC) handelt es sich um einen potentiellen Kandidaten für den therapeutischen Einsatz beim Menschen zur Behandlung von malignen Melanomen. Er ist gegen das Gangliosid G_{D3} gerichtet und in der Lage, bei metastasierenden Melanomen das Tumorwachstum zu unterbinden, was in einer ganzen Reihe von klinischen Untersuchungen nachgewiesen werden konnte.

Die vorliegende Arbeit behandelt die Auswirkungen der Produktionsbedingungen auf die Produktionsraten, Integrität und Funktionalität des mAk R24.

Die Arbeit kann in zwei Teile untergliedert werden, wobei sich der erste Teil mit der Produktion und Aufreinigung des mAk R24 unter verschiedenen Kulturbedingungen beschäftigt. Der Einfluß der Kulturbedingungen wurde dabei im SuperSpinner und in 2-Liter-Bioreaktor-Kultursystemen untersucht. Im 2-Liter-Bioreaktor fanden ein unreguliertes HEPES-Puffersystem und geregelte CO₂/HCO₃⁻-Puffersysteme mit den pH-Werten 7,4; 7,2 und 6,9 Verwendung.

Der zweite Teil der Arbeit handelt von der Aufreinigung und Charakterisierung des produzierten R24 Antikörpers unter besonderer Berücksichtigung der Auswirkungen der Kulturbedingungen auf die Glykosylierung und Funktionalität des Antikörpers. Als Grundlage zur Untersuchung der Antigen-Bindungseigenschaften des Antikörpers wurde sein Antigen, das Gangliosid G_{D3}, aus Buttermilch isoliert, aufgereinigt und charakterisiert.

Adaption an serumfreie Kulturbedingungen. Die Zelllinie HB-8445 konnte unter gerührten Bedingungen im Spinner-System an eine serumfreie Kultivierung adaptiert werden. Das Basalmedium wurde dabei mit Humantransferrin, Rinderinsulin und humanem Serumalbumin (HSA) als Proteinbestandteile und Selenit als anorganischem Bestandteil supplementiert. Im statischen System einer Polystyrol Gewebekulturflasche war eine Kultivierung mit weniger als 2,5% Serum im Medium nicht möglich.

Einfluß des CO₂-Partialdruckes und der Albumin-Konzentrationen auf das Zellwachstum und die mAk-Produktion. Während der Kultivierung der Zelllinie HB-8445 im 1-Liter-SuperSpinner unter Variation des CO₂-Anteils in der Begasungsluft und der HSA Konzentration im Medium konnten die Adaptionsreaktionen der Zellen auf die geänderten Kulturbedingungen studiert werden.

Eine Verringerung der HSA Konzentration (bei 20 % CO₂) von 3 auf 0,5 g/l wirkte sich negativ auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinie aus, was sich in einer deutlichen Verringerung der spezifischen Wachstumsrate μ von 0,69 auf 0,34/d bemerkbar machte.

Eine Änderung der zur Begasungsluft zugesetzten Menge an CO₂ von 20% auf 5% (v/v) und ein daraus resultierender Shift des pH-Wertes vom schwach sauren (ca. 6,9) zu einem für eine Kultur von Säugerzellen „neutralen“ pH-Wert (ca. 7,2) hatte eine Reihe von Adaptionsvorgängen der Zelllinie zur Folge. So stieg bei der Umstellung der Kultivierungsbedingungen die spezifische Wachstumsrate der Zellen von 0,34/d (bei pH ca. 6,9) nach Erniedrigung des CO₂-Partialdruckes auf 0,57/d (bei pH ca. 7,2) an. Im Rahmen der Langzeitkultivierung wurde nach 10 weiteren Passagen (32 Tage) ein μ von 0,62/d ermittelt.

Die CO₂-Reduktion und die damit verbundene Erhöhung des pH-Wertes der Kultur führte sehr schnell zu einer Reaktion im Stoffwechsel der Zellen. Die spezifische Glukoseverbrauchsrate $q_G = 0,49 \mu\text{M } 10^{-6} \text{ Zellen d}^{-1}$ und die spezifische Laktatproduktionsrate $p_G = 1,00 \mu\text{M } 10^{-6} \text{ Zellen d}^{-1}$ erhöhten sich infolge der CO₂-Reduktion auf Werte von 1,14 bzw. 1,74 $\mu\text{M } 10^{-6} \text{ Zellen d}^{-1}$.

Bei der spezifischen Produktionsrate des mAk R24 bewirkte die Erhöhung des pH-Wertes eine Verringerung der Antikörper-Produktivität. Hier sank die spezifische Produktionsrate p_{IgG_S} von 42 $\mu\text{g } 10^{-6} \text{ Zellen d}^{-1}$ bei erhöhtem pH-Wert auf ca. die Hälfte ab. Während der Langzeitkultivierung sank die in den Kulturüberstand sezernierte Menge an IgG innerhalb von 11 Passagen in einem Zeitraum von 35 Tagen von 65 mg auf 15 mg in einem Liter Kulturüberstand bei einer Referenz-Zelldichte von $1 \times 10^6/\text{ml}$ ab.

2-Liter-Bioreaktor Kultivierungen unter verschiedenen Pufferbedingungen (HEPES, pH 7,4; 7,2 und 6,9). Bei den 2-Liter-Bioreaktor Kultivierungen der Hybridomzelle HB-8445 mit einem pH-Wert geregelten CO₂/HCO₃⁻-Puffersystem (pH-Werte 7,4; 7,2 und 6,9) unter serumfreien Bedingungen, konnten die Auswirkungen des pH-Wertes auf die Wachstums- und Produktionsraten der oben beschriebenen Kultivierung im 1-Liter-SuperSpinner bestätigt werden. Desweiteren wurde der Einfluß eines unregulierten HEPES-Puffersystems im 2-Liter-Bioreaktor auf die Wachstums- und Produktionsraten untersucht. Im Vergleich zu den 2-Liter-Bioreaktor-Kulturen wurde eine CO₂/HCO₃⁻-gepufferte 1-Liter-SuperSpinner-Kultivierung mit 5 % CO₂ und 0,5 g/l HSA durchgeführt. Bei den 2-Liter-Bioreaktor-Kultivierungen konnten, im Gegensatz zur SuperSpinner-Kultivierung, der Sauerstoffpartialdruck und der pH-Wert geregelt und konstant gehalten werden. Die gesamte Prozeßführung aller Kultivierungen im zweifach wie-

derholten, satzweisen Betrieb (repeated batch) wurde auf eine möglichst hohe Reproduzierbarkeit hin ausgelegt.

Ein Vergleich der Wachstumsraten des HB-8445 Zellklons zeigte ein deutliches Optimum bei einem pH-Wert von 7,2. Mit einem μ von 0,61/d im zweiten Batch lag der Wert für μ nahezu doppelt so hoch wie unter den anderen Kulturbedingungen im 2-Liter-Bioreaktor. Nur im unregelmäßig betriebenen 1-Liter-SuperSpinner wurde ein ähnlich schnelles Wachstum der Zellen gefunden. Im Gegensatz zu den optimalen Bedingungen für ein maximales Wachstum der Zellen bei pH 7,2 wurden die höchsten Antikörperproduktionsraten unter sauren Kulturbedingungen bei einem pH-Wert von 6,9 erreicht. Die Produktionsraten betragen dabei $p_{IgG_S} = 42,3 \mu\text{g } 10^{-6} \text{ Zellen d}^{-1}$, ermittelt mit einem Sandwich-ELISA, und $p_{IgG_{GD3}} = 5,49 \mu\text{g } 10^{-6} \text{ Zellen d}^{-1}$ für G_{D3} -bindenden Antikörper. Die Antikörperproduktion erreichte bei pH 6,9 im zweiten Batch der Kultivierung damit gut das Vierfache im Vergleich zu den beiden 2-Liter-Bioreaktor-Kultivierungen bei höheren pH-Werten. Die Kultivierung im 1-Liter-SuperSpinner, die einen pH-Wert-Bereich von 7,3 bis 6,9 durchlief, zeigte doppelt so hohe Antikörperproduktionsraten wie unter den Standardbedingungen bei pH 7,2. Bei der Verwendung des HEPES-Puffersystems, bei dem die Kultivierung einen pH-Wert-Bereich von 7,2 bis 6,9 durchlief, kam es im 2-Liter-Bioreaktor zu einer verstärkten Produktion eines Proteins mit einem Molekulargewicht von ca. 25 kDa. Hierbei handelt es sich vermutlich um leichte Ketten des Antikörpers, die im Sandwich-ELISA als Maus IgG erkannt wurden, aber nicht in der Lage waren sich an G_{D3} zu binden. So konnte bei der HEPES-Kultur im Vergleich zu den $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferten Kultivierungen nur ca. 33 % der G_{D3} -Bindungskapazität detektiert werden.

Vergleicht man die Stabilität der sezernierten R24 Antikörper unter verschiedenen Medienbedingungen, so konnte gezeigt werden, daß die unterschiedlichen Kulturbedingungen ausschlaggebend für die unterschiedlichen mAk-Produktionsraten waren. Während einer 7-tägigen Inkubation unter allen Pufferbedingungen war keine signifikante proteolytische Aktivität feststellbar, die zu einem Verdau der sezernierten Antikörper führen könnte.

Ein Vergleich der Aminosäurekonzentrationen im Kulturüberstand ergab bei allen Kultivierungen einen wachstumsbezogenen Verbrauch. Der Umsatz der Zellen von Glutamin so wie von Valin, Leucin, Isoleucin, Tryptophan und Methionin war so hoch, daß sie zum Ende der Batches zum Teil aufgebraucht waren. Auch die Aminosäuren Histidin, Threonin, Tyrosin, und Phenylalanin wurden während des Zellwachstums verbraucht, waren am Ende der Batches aber noch in höheren Konzentrationen vorhanden. Die Konzentrationen von Aspartat und Asparagin veränderten sich während der Kultivierung kaum während Glycin, Serin und Alanin von den Zellen produziert wurden. Nur die Konzentration von Serin und Glycin wiesen bei den unterschiedlichen Kulturbedingungen unterschiedliche Verläufe auf. Bei der Kultur bei pH-Wert 6,9 und der HEPES-Kultur wurde im Vergleich zu den anderen Kulturen nahezu doppelt so viel Serin produziert. Eine entgegengesetzte Auswirkung des pH-Wertes waren bei der Glycinkonzentration im Verlauf der Kulturen

zu verzeichnen. In den Kultivierungen bei pH-Werten von 7,4 und 7,2 und in der SuperSpinner-Kultur verdoppelte sich die Glycin-Konzentration im Verlauf der Kultivierung. In der Kultivierung bei einem pH-Wert von 6,9 stieg die Konzentration an Glycin um nur 65 %, und in der HEPES-gepufferten Kultur blieb die Glycinkonzentration nahezu konstant.

Die Konzentrationsentwicklung von Glukose und Laktat im Kulturüberstand im Verlauf der Kultivierung zeigte eine Abhängigkeit von den gewählten Kulturbedingungen auf. Besonders hervorzuheben ist hier der um ca. 80 % erhöhte Verbrauch von Glukose und die um fast 70 % gesteigerte Produktion von Laktat bei einem pH-Wert von 7,4 im Vergleich zu den Standardbedingungen bei einem pH-Wert von 7,2. Auffällig waren zudem der relativ niedrige Glukose-Verbrauch und die Laktat-Produktion in SuperSpinner Kultursystem.

Die Erhöhung der Ammoniumkonzentration im Kulturüberstand führte nicht zu toxischen Konzentrationen und schien keine nennenswerte inhibitorische Wirkung auf das Wachstum der Zelllinie unter den beschriebenen Kulturbedingungen zu haben.

G_{D3} Isolierung. Aus Buttermilch konnte mit Hilfe der präparativen Ionenaustausch- und Adsorptions-HPLC 5,9 mg hochreines G_{D3} isoliert werden. Zudem wurden 2,9 mg G_{D3} mit geringen Beimengungen an G_{M2} und G_{D2} isoliert. Anhand des HPLC-Sialinsäureprofils des isolierten G_{D3} konnte gezeigt werden, daß nur die Sialinsäure Neu5Ac enthalten war, was sich durch HPTLC-Untersuchungen und einem Overlay-Bindungstest, einem ELISA auf einer DC-Platte, bestätigte. Damit war die Voraussetzung gegeben, das isolierte G_{D3} als spezifisches Antigen des Antikörpers R24 für molekulare Interaktionsstudien einzusetzen.

Aufreinigung des R24 Antikörpers. Die Protein A-Affinitätschromatographie in Verbindung mit der FPLC- und dem BioPilot-System stellt für den IgG₃-Antikörper R24 eine einfache und schnelle Methode zur Aufreinigung aus dem Kulturüberstand dar. Die Wiederfindungsraten der unter den verschiedenen Kulturbedingungen hergestellten R24 Antikörper betrug recht einheitlich 40 bis 45 %. Bei der Aufarbeitung der im HEPES-Puffersystem produzierten Antikörper wurde allerdings eine im Vergleich zu den anderen Systemen um 2/3 niedrigere Wiederfindungsrate detektiert, was an einem hohen Anteil an unvollständig sezernierten Antikörpern (nur leichte Kette) liegen dürfte.

Der Vergleich der Ausbeuten an Protein A-gereinigtem Antikörper pro Liter geernteten Kulturüberstand zeigte einen sehr deutlichen Einfluß der Kulturbedingungen auf die R24-Produktion. Bei einem pH-Wert von 6,9 konnten mit 66 mg aufgereinigtem R24 Antikörper/l Kulturüberstand das Dreifache dessen geerntet werden, was bei den Standardkulturbedingungen mit einem pH-Wert von 7,2 erreicht wurde. Produktionsbedingungen mit einem hohen pH-Wert von 7,4 führten zu einer Abnahme von sezerniertem Antikörper um ca. 25 % gegenüber den Standardbedingungen. Bei dem HEPES-gepufferten System konnte vergleichsweise nur eine 50

%-tige Ausbeute erreicht werden. Mit dem SuperSpinner-Kultursystem konnte eine um 60 % höhere Ausbeute im Vergleich zum Bioreaktor beim Standard pH-Wert 7,2 erzielt werden. Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, daß eine Erniedrigung des pH-Wertes zu einer wesentlich höheren Ausbeute an R24 Antikörpern führte.

Proteinchemische Charakterisierung des mAk. Alle mittels Protein A-Affinitätschromatographie aufgereinigten Antikörper aus den verschiedenen Kultivierungsansätzen entsprachen in ihrem Molekulargewicht der erwarteten Größe für IgG Antikörper von 150 kDa, was sowohl durch die Gelchromatographie als auch durch die SDS-Gelelektrophorese im Vergleich mit einem Referenz Maus IgG Antikörper gezeigt werden konnte. Auch die gelelektrophoretische Auftrennung der durch Reduktion in leichte (25 kDa) und schwere Ketten (50 kDa) gespaltenen Antikörper zeigte keine Unterschiede zwischen den verschiedenen R24 Antikörpern.

Die isoelektrische Fokussierung ergab bei allen eingesetzten Antikörpern das gleiche Bandenmuster. Anhand der isoelektrischen Fokussierung konnte somit kein erkennbarer Einfluß der Kultivierungsbedingungen auf die Ladungsstruktur und dem damit verbundenen isoelektrischen Punkt der Proteine nachgewiesen werden.

Ermittlung der N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharide. IgG Antikörpermoleküle besitzen grundsätzlich eine N-glykosidisch gebundene biantennäre Oligosaccharidstruktur vom Komplex-Typ am Asn 297 in der C_H2 Domäne der schweren Ketten. Sie ist u. a. unerlässlich für die Kooperation der Antikörper mit immunologischen Effektorsystemen wie dem Komplementsystem.

Die Überprüfung einer Zellkultur von HB-8445 Zellen ergab keine meßbare Sialidaseaktivität, weder im Kulturüberstand noch im Zellysate, so daß eine postsekretorische Desialylierung ausgeschlossen werden kann.

Um herauszufinden, ob der R24 Antikörper überhaupt glykosyliert ist, wurde mit im SuperSpinner produzierten Antikörpern Lektin-Bindungstests durchgeführt. In der schweren Kette des Antikörpers konnten Neu5Ac α (2-3)Gal, α (2-6) sialylierte Galaktose und die Gal β (1-4)GlcNAc-Sequenz identifiziert werden, während in der leichten Kette des Antikörpers mit den genannten Lektinen keine Glykostrukturen detektiert werden konnten.

Die Bestimmung des Zuckergehaltes der Antikörper ergab, daß die unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen einen geringen Einfluß auf den Gesamtzuckergehalt des Proteins hatten. Im Durchschnitt waren 9,3 μ g Neutralzucker (Mannose, Fruktose und Galaktose) pro mg Antikörper zu detektieren. Eine Abschätzung ergab das Vorhandensein von im Mittel ca. 1,5 bis 1,6 Zuckerketten pro Antikörper. Die Grundlage für die Berechnung bestand in der Annahme, daß ausschließlich fukosylierte biantennäre Digalacto-Komplex-Typ-N-Glykane vorhanden waren.

Die Bestimmung des Sialinsäuregehaltes der R24 Antikörper ergab das Vorkommen von Neu5Ac und Neu5Gc. Das molare Verhältnis zwischen Sialinsäuren und Anti-

körpern betrug unter fast allen Kultivierungsbedingungen ca. 24 % (ca. 0,490 μg Sialinsäure pro mg mAk). Einzig bei einer Kultivierung bei einem pH-Wert von 6,9 sank das Verhältnis mit ca. 14 % (ca. 0,286 μg Sialinsäure pro mg mAk) auf nahezu die Hälfte ab. Das molare Verhältnis von Neu5Ac zu Neu5Gc betrug bei den analysierten Antikörpern 1:1. Die einzige Ausnahme bildeten die Antikörper, die im HEPES-Kultursystem produziert wurden, und ein Neu5Ac/Neu5Gc-Verhältnis von ca. 3:1 aufwiesen.

Die Analyse der N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharidstrukturen der unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen produzierten R24 Antikörper mittels HPAEC-PAD zeigte, daß in allen Antikörperproben die zu erwartenden biantennären Strukturen vom Komplex-Typ zu finden waren. Bei allen Kultivierungsbedingungen war dabei ein ähnliches Verteilungsmuster der Oligosaccharide zu finden. Ausgehend von der biantennären Komplex-Typ-Grundstruktur waren alle Formen der Zuckerketten, angefangen von der biantennären Agalakto- (ca. 50 %), über die Monogalakto- (ca. 30 %) bis zur Digalakto-Komplex-Typ-Struktur (ca. 20 %), vorhanden. Ca. 80 % der N-Glykane waren dabei an der Kernstruktur fukosyliert. Als ein Trend bei den $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferten Systemen konnte festgestellt werden, daß es bei den N-gebundenen Oligosaccharidstrukturen mit einem Absinken des pH-Wertes zu einer Verminderung von Galaktose-tragenden Strukturen kam. Der im HEPES-Puffersystem produzierte Antikörper besaß einen auffallend hohen Anteil an biantennärem Digalakto-Oligosaccharid ohne Fukose an der Kernstruktur.

Die nach der HPAEC postulierten N-Glykanstrukturen konnten im Folgenden mit Hilfe massenspektrometrischer Methoden bestätigt werden. Sowohl mit der MALDI-TOF-Massenspektrometrie der hydrazinolytisch abgespaltenen und säurehydrolytisch desialylierten N-Glykane als auch mit der ESI-QTOF-Massenspektrometrie mit enzymatisch abgespaltenen nativen N-Glykanen wurden Molekülmassen detektiert, die auf fukosylierten biantennären Komplex-Typ-Strukturen basierten.

Die MALDI-TOF-Massenspektren der Asialo-Oligosaccharide der R24 Antikörper aus der HEPES- und den vier $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferten Kulturen ergaben Signale der $(\text{M}+\text{Na})^+$ -Ionen für m/z bei 1339 ($\text{Hex}_3\text{HexNAc}_4$), 1485 ($\text{Hex}_3\text{HexNAc}_4\text{dHex}_1$), 1501 ($\text{Hex}_4\text{HexNAc}_4$), 1647 ($\text{Hex}_4\text{HexNAc}_4\text{dHex}_1$), 1663 ($\text{Hex}_5\text{HexNAc}_4$) und 1809 ($\text{Hex}_5\text{HexNAc}_4\text{dHex}_1$). In den MALDI-TOF-Spektren der Antikörper aus den Kulturen bei pH 7,2; 6,9 und der SuperSpinner-Kultur waren $(\text{M}+\text{Na})^+$ -Molekülionen bei m/z 1541 ($\text{Hex}_3\text{HexNAc}_5$) und 1704 ($\text{Hex}_4\text{HexNAc}_5$) zu finden, die auf das Vorkommen von „bisecting“ Komplex-Typ-Oligosacchariden hinwiesen. Diese Strukturen konnten aber weder in den ESI-Massenspektren noch in den HPAEC-Profilen detektiert werden.

Die enzymatisch abgespaltenen nativen Oligosaccharide der R24 Antikörper aus der HEPES- und den vier $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -gepufferten Kulturen ergaben bei der ESI-QTOF-Massenspektrometrie für die doppelt geladenen Ionen Signale für m/z bei 678,3 ($\text{Hex}_3\text{HexNAc}_4$), 751,4 ($\text{Hex}_3\text{HexNAc}_4\text{dHex}_1$), 759,4 ($\text{Hex}_4\text{HexNAc}_4$), 832,4 ($\text{Hex}_4\text{HexNAc}_4\text{dHex}_1$), 840,4 ($\text{Hex}_5\text{HexNAc}_4$) und 913,5 ($\text{Hex}_5\text{HexNAc}_4\text{dHex}_1$).

Zur Aufklärung der Abfolge der Monosaccharide und der Verzweigung

gen in den Oligosaccharidketten der nativen N-Glykane wurden ESI-QTOF-Tandemmassenspektren (MS/MS-Spektren) erstellt. Im MS/MS-Spektrum dominierten die nach Spaltung der glykosidischen Bindungen entstandenen Ionen (B-Ionen), von denen viele durch innere Fragmentierung entstanden sind. Aber auch Teile von Ringstrukturen der Zucker, sogenannte „cross-ring“-Fragmente, waren als Fragmentationen zu beobachten. Sowohl der Satz von B-Ionen als auch „cross-ring“-Fragmente zeigten die Richtigkeit der postulierten fukosylierten biantennären Digalacto-Komplex-Typ-Struktur.

Bei der ESI-Massenspektrometrie wurden neben den Asialo-Oligosacchariden auch sialylierte biantennäre Komplex-Typ-Zuckerketten detektiert, die allerdings nur die Sialinsäure Neu5Ac aufwiesen. Warum kein Neu5Gc mittels ESI-Massenspektrometrie in der Fraktion der nativen Oligosaccharide nachweisbar war, konnte bisher nicht geklärt werden.

Surface Plasmon Resonance-Bindungsstudien. Die Untersuchung des Bindungsverhaltens des R24 Antikörpers zu seinem Antigen G_{D3} mittels SPR mit dem BIAcore 2000-Gerät ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen hergestellten Antikörpern. Die ermittelten Bindungskonstanten K_A lagen alle im Bereich zwischen $3,3 \times 10^7 / M$ und $5,3 \times 10^7 / M$ und sind im Rahmen der Meßgenauigkeit als übereinstimmend zu bewerten. Als ein die Messungen stark beeinflussender Faktor in diesem System stellte sich die Salzkonzentration im verwendeten Puffer heraus. So führte bereits eine um 10 mM höhere NaCl-Konzentration im Puffer nahezu zu einer Halbierung der Bindungsrate.

4.1 Fazit und Ausblick

Der zunehmende Einsatz von Antikörpern in der Medizin zu diagnostischen und vor allem auch zu therapeutischen Zwecken (Immuntherapie) führt zwangsläufig zu der Notwendigkeit, strukturell exakt definierte Antikörper produzieren zu können. Bei der Produktion von monoklonalen Antikörpern hat sowohl das zelluläre Expressionssystem als auch das biotechnologische Produktionssystem einen Einfluß auf die Struktur der Antikörper. Zur genauen Charakterisierung von Glykoproteinen wie den Antikörpern sollten neben der proteinchemischen Charakterisierung auch die Glykosylierung bestimmt werden. Kulturparameter wie die Zelldichte, der Sauerstoffpartialdruck und, wie in dieser Arbeit gezeigt, der pH-Wert wirken sich insbesondere auf die Glykosylierung der Antikörper aus. Folglich ist bei der Herstellung von monoklonalen Antikörpern den Produktionsbedingungen besondere Beachtung zu schenken. Um ein möglichst hohes Maß an Reproduzierbarkeit bei der Antikörperherstellung zu gewährleisten, müssen die Kulturparameter in einem Produktionssystem kontrollierbar sein. Mit dem Wissen über den Einfluß, den die Produktionsbedingungen auf die Oligosaccharide von Glykoproteinen haben, kann bei der Erzeugung von Glykoproteinen den Erfordernissen der Medizin Rechnung getragen

werden. Es wird somit auch in der Zukunft von großem Interesse sein, die Auswirkungen der Produktionsbedingungen auf die Glykosylierung von Proteinen zu untersuchen.

Im Zusammenhang mit dem Einsatz von R24 Antikörpern für die Immuntherapie stellt sich die Frage nach der Immunogenität des Glykoproteins. Neben der immunogenen Wirkung eines monoklonalen Mausantikörpers, die auf den Proteinanteil zurückzuführen ist, ist die immunogene Wirkung des Oligosaccharidteils [141], die sich aus dem Vorhandensein der Sialinsäure Neu5Gc ergibt, noch zu untersuchen. Da keine Patientenserum von Probanden, die mit R24 Antikörpern behandelt wurden, zur Verfügung stehen, sollen Hühner, die wie der Mensch kein Neu5Gc besitzen, mit R24 Antikörpern immunisiert werden. Die Seren der Hühner sollen dann auf Antikörper gegen Neu5Gc tragende Glykokonjugate getestet werden. So können Rückschlüsse auf die Immunogenität von Neu5Gc-tragenden Sialoglykoproteinen gezogen werden.

Abkürzungen

BCA	4,4'-Dicarboxy-2,2'-biquinolin
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Chloroform
C _x	Länge des Aliphaten im Ceramid (x = Zahl der C-Atome)
Cer	Ceramid
CMF-PBS	Ca ²⁺ -Mg ²⁺ Free-Phosphate Buffered Saline
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE	Diethylaminoethyl-
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DMB	1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzoldihydrochlorid
DSA	<i>Datura stramonium</i> Agglutinin
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ESI-QTOF-MS	Electrospray Ionization - Quadrupole Time-Of-Flight - Mass Spectrometry
expo.	exponentiell
FAB-MS	Fast Atom Bombardment-Mass Spectrometry
Fuc	Fukose
Gal	Galaktose
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
Gb	Globo-
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spektrometry
G _{D1a}	IV ³ - α -Neu5Ac,II ³ - α -Neu5Ac-Gg ₄ Cer
G _{D1b}	II ³ - α -(Neu5Ac) ₂ -Gg ₄ Cer
G _{D2}	II ³ - α -(NeuAc) ₂ -Gg ₃ Cer
G _{D3}	II ³ - α -(NeuAc) ₂ -LacCer
Gg	Ganglio-
Gg ₃ Cer	Gangliotriaosylceramid, GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1Cer
Glc	Glukose
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
G _{M2}	II ³ - α -Neu5Ac-Gg ₃ Cer
G _{M3}	II ³ - α -Neu5Ac-LacCer
GSL	Glykosphingolipid(e)
G _{T1b}	IV ³ - α -Neu5Ac,II ³ - α -(Neu5Ac) ₂ -Gg ₄ Cer

HPAEC-PAD	High-Performance Anion Exchange Chromatography - Pulsed Amperometric Detection
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
HPTLC	High-Performance Thin-Layer Chromatography
Ig	Immunglobulin
K60	Kieselgel 60
LacCer	Laktosylceramid, Gal β 1-4Glc1-1Cer
Lc	Lacto-
LDH	Laktat Dehydrogenase (EC 1.1.1.28)
Le ^x	Lewis X
LMW	Low Molecular weight
M	Methanol
MAA	<i>Maackia amurensis</i> Agglutinin
MALDI-TOF-MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time-Of-Flight - Mass Spectrometry
m	Molmasse
min	Minuten
MS	Mass Spectrometry
MUF-Neu5Ac	4-Methyl-Umbelliferyl- α -D-N-Acetylneuraminsäure
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
Neu5Gc	N-Glykolylnneuraminsäure
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PBS	Phosphate Buffered Saline
RP	Reversed-Phase
rpm	revolutions per minute
sec	Sekunden
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfat - Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SNA	<i>Sambucus nigra</i> Agglutinin
THC	Trihexosylceramid
TLC	Thin-Layer Chromatography
UV	Ultraviolett
v	Volumenteil
w	Gewichtsteil
W	Wasser
(x/y/z)	x, y, z sind Volumenteile
z	Ladung

Literaturverzeichnis

- [1] M. Ackermann, U. Marx, and V. Jäger (1995): *Influence of cell- and media-derived factors on the integrity of human monoclonal antibody after secretion into serum-free cell culture supernatants*. Biotechnol. Bioeng., **45**, 97–106.
- [2] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. Watson (1990): *Molekularbiologie der Zelle*. VCH Verlagsgesellschaft, Berlin, 1. Auflage.
- [3] R. Alpaugh, M. von Mehren, I. Palazzo, M. Atkins, J. Sparano, L. Schuchter, L. Weiner, and J. Dutcher (1998): *Phase IB trial for malignant melanoma using R24 monoclonal antibody, interleukin-2/alpha-interferon*. Med Oncol., **15(3)**, 191–198.
- [4] S. Ando, M. Isobe, and Y. Nagai (1976): *High performance preparative column chromatography of lipids using a new porous silica, Iatrobeads*. Biochim. Biophys. Acta, **424**, 98–105.
- [5] S. Ando, H. Waki, K. Kon, and Y. Kishimoto (1987): *Up-to-date chromatography of gangliosides*. in: H. Rahmann (Hrsg.) *Gangliosides and modulation of neuronal functions*. Springer Verlag, Berlin, pages 167–177.
- [6] ATCC (1994): *Cell lines and hybridomas*. ATCC, Rockville, MD 20852, USA.
- [7] J. Axford (1999): *Glycosylation and rheumatic disease*. Biochim. Biophys. Acta., **1455**, 219–229.
- [8] F. Baert and P. Rutgeerts (2000): *Medical therapies for ulcerative colitis and Crohn's disease*. Curr. Gastroenterol. Rep., **2**, 446–450.
- [9] R. Baldwin and V. Byers (1985): *Monoclonal antibody for cancer detection and therapy*. Academic Press, London, 1. Auflage.
- [10] BIAcore (1996): *BIAevaluation Software Handbook*. BIAcore AB, Uppsala, Schweden, 3.0 Auflage.
- [11] M. Borys, D. Linzer, and E. Papoutsakis (1993): *Ammonia affects the glycosylation pattern of recombinant mouse placental lactogen-I by chinese hamster ovary cells in ph-dependent manner*. Biotechnol Bioeng., **43**, 505–514.

- [12] B. Brandley, S. Swiedler, and P. Robbins (1990): *Carbohydrate ligands of the LEC cell adhesion molecules*. Cell, **63**, 861–863.
- [13] K. Brew, T. Vanaman, and R. Hill (1968): *The role of alpha-lactalbumin and the a protein in lactose synthetase: a unique mechanism for the control of a biological reaction*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **59**, 491–497.
- [14] J. Brisson and J. Carver (1983): *The relation of three-dimensional structure to biosynthesis in the N-linked oligosaccharides*. Can. J. Biochem. Cell Biol., **61**, 1067–1078.
- [15] H. Büntemeyer (1988): *Entwicklung eines Perfusionssystems zur kontinuierlichen Kultivierung tierischer Zellen in Suspension*. Dissertation, Universität Hannover.
- [16] H. Büntemeyer (2000): *Off-line analysis in animal cell culture, methods*. in *Encyclopedia of Cell Technology*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK.
- [17] H. Büntemeyer, D. Lütkemeyer, and J. Lehmann (1991): *Optimization of serum-free fermentation processes for antibody production*. Cytotechnology, **5**, 57–67.
- [18] S. Cannon-Carlson and J. Tang (1997): *Modification of the Laemmli sodium polyacrylamid gel electrophoresis procedure to eliminate artifacts on reducing and nonreducing gels*. Anal. Biochem., **246**, 146–148.
- [19] B. Catimel, A. Scott, F. Lee, N. Hanai, G. Ritter, S. Welt, L. Old, A. Burgess, and E. Nice (1998): *Direct immobilization of gangliosides onto gold-carboxymethyldextran sensor surface by hydrophobic interaction: application to antibody characterization*. Glycoiology, **8**, 927–938.
- [20] H. Chmiel (1991): *Bioprozeßtechnik 1*. UTB Gustav Fischer, Stuttgart, 1. Auflage.
- [21] H. Chmiel, W. Hammes, and J. Bailey (1987): *Biochemical engineering*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1. Auflage.
- [22] J. Chu and F. Sharom (1990): *Interleukin-2 binds to gangliosides in micelles and lipid bilayers*. Biochim. Biophys. Acta., **1028**, 205–214.
- [23] J. F. Crowley, I. J. Goldstein, J. Arnap, and J. Lönnngren (1984): *Carbohydrate binding studies on the lectin from Datura stamonium seeds*. Arch. Biochem. Biophys., **231**, 524–533.
- [24] G. Czihak, H. Langer, and H. Ziegler (1996): *Biologie*. Springer-Verlag, Berlin, 6. Auflage.

- [25] N. Dickler, G. Ragupathi, N. Liu, C. Musselli, D. Martino, V. Miller, M. Kris, F. Brezicka, P. Livingston, and S. Grant (1999): *Immunogenicity of a fucosyl-gm1-keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccine in patients with small cell lung cancer*. Clin. Cancer Res., **5**, 2773–2779.
- [26] W. Dippold and H. Bernhard (1992): *Immunorecognition of ganglioside epitopes: correlation between affinity and cytotoxicity of gangliosides antibodies*. Eur. J. Cancer, **28A**, 1605–1610.
- [27] W. Dippold, K. Lloyd, L. Li, H. Ikeda, H. Oettgen, and L. Old (1980): *Cell surface antigens of human malignant melanoma: Definition of six antigenic system with mouse monoclonal antibodies*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 6114–6118.
- [28] B. Domon and C. Costello (1988): *A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates*. Glycoconjugates J., **5**, 397–409.
- [29] C. Doyle and M. Butler (1990): *The effect of pH on the toxicity of ammonia to a murine hybridoma*. J. Biotechnol., **15**, 91–100.
- [30] R. Dutton, J. Scharer, and M. Moo-Young (1999): *Hybridoma growth and productivity: effects of conditioned medium and of inoculum size*. Cytotechnology, **29**, 1–10.
- [31] S. Duvar, J. Peter-Katalinić, F. Hanisch, and J. Müthing (1997): *Isolation and structural characterization of glykosphingolipides of in vitro propagated bovine aortic endothelial cells*. Glycobiology, **7**, 1099–1109.
- [32] H. M. Evans and W. Schulemann (1914): *The action of vital stains belonging to the benzidine group*. Science, **39**, 443–454.
- [33] P. L. Ey, S. J. Prowse, and C. R. Jenkin (1978): *Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose*. Biochemistry., **15**, 429–436.
- [34] T. Feizi, R. Childs, K. Watanabe, and S. Hakomori (1979): *Three types of blood group i specificity among monoclonal anti-I autoantibodies revealed by analogues of a branched erythrocyte glycolipid*. J. Exp. Med., **149**, 975–980.
- [35] J. L. M. Folch, M. Lees, and G. H. Sloaene-Stanley (1957): *A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues*. J. Biol. Chem., **226**, 497–509.
- [36] M. Fukuda, H. Sasaki, L. Lopez, and Fukuda M. (1989): *Survival of recombinant erythropoietin in the circulation: the role of carbohydrates*. Blood, **73**, 84–89.

- [37] H. Gabius and S. Gabius (1997): *Glycoscience*. Chapman & Hall, London, 1. Auflage.
- [38] M. H. Gey (1998): *Instrumentelle Bioanalytik*. Vieweg, Braunschweig, 1. Auflage.
- [39] GibcoBRL (1998): *Zellkultur 98-99 Katalog*. Live Technologies, Karlsruhe.
- [40] GlycoSystem (1994): *Tools for Glycobiology*. Oxford GlycoSystem, London, UK, 1. Auflage.
- [41] I. Gornik, G. Maravic, J. Dumic, M. Flogel, and G. Lauc (1999): *Fucosylation of igg heavy chains is increased in rheumatoid arthritis*. Clin. Biochem., **32**, 605–608.
- [42] M. J. Gramer and C. F. Goochee (1994): *Glycosidase activities of the 293 and NSO cell-lines, and of an antibody-producing hybridoma cell line*. Biotechnol. Bioeng., **43**, 423–428.
- [43] M. J. Gramer, C. F. Goochee, D. Brousseau, and M. Sliwowski (1995): *Removal of sialic acid from a glycoprotein in CHO cell culture supernatant by action of an extracellular CHO cell sialidase*. Bio/Technology., **13**, 692–698.
- [44] W. Groß, K. Ring, and E. Lodemann (1989): *Physiologische Chemie*. VCH, Weinheim, 1. Auflage.
- [45] J. Gültekin and G. Palade (1988): *The use of polyvinylidendifluorid membranes as a general blotting matrix*. Anal. Biochem., **172**, 320–329.
- [46] S. Hakomori (1981): *Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis*. Ann. Rev. Biochem., **50**, 733–764.
- [47] S. Hakomori (1985): *Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: overview and perspectives*. Cancer Res., **45**, 2405–2414.
- [48] S. Hakomori (1986): *Glykosphingolipide*. Spektrum der Wissenschaft, **6**, 90–101.
- [49] S. Hakomori (1990): *Bifunctional role of glycosphingolipids*. J. Biol. Chem., **265**, 18713–18716.
- [50] S. Hakomori (1998): *Cancer-associated glycosphingolipid antigens: their structure, organization, and function*. Acta Anat (Basel), **161**, 79–90.
- [51] C. Hammond, I. Braakman, and A. Helenius (1994): *Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **91**, 913–917.

- [52] N. Hanai, K. Nakamura, and K. Shitara (2000): *Recombinant antibodies against ganglioside expressed on tumor cells*. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **46**, 13–17.
- [53] S. Hara, Y. Takemori, M. Yamaguchi, M. Nakamura, and Y. Ohkura (1987): *Fluorimetric high performance liquid chromatography of N-acetyl and N-glycolylneuraminic acid and its application to their microdetermination in human and animal sera, glycoproteins and glycolipids*. *Anal. Biochem.*, **164**, 138–145.
- [54] T. Harder and K. Simons (1997): *Caveolae, digs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains*. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, 534–542.
- [55] E. Harlow and D. Lane (1988): *Antibodies, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA, 1. Auflage.
- [56] A. Haselbeck, E. Schickaneder, H. v.d. Eltz, and Hösel (1990): *Structural characterization of glycoprotein carbohydrate chains by using digoxigenin-labeled lectin on blots*. *Anal. Biochem.*, **191**, 25–30.
- [57] P. Hayter, N. Kirkby, and R. Spier (1992): *Relationship between hybridoma growth and monoclonal antibody production*. *Enzyme. Microb. Technol.*, **14**, 454–461.
- [58] D. Heitmann, M. Lissel, R. Kempken, and J. Müthing (1996): *Replacement of chloroform throughout glycosphingolipid isolation*. *Biomed. Chromatogr.*, **10**, 245–250.
- [59] D. Heitmann, H. Ziehr, and J. Müthing (1998): *Large scale purification of gangliosides GM3(Neu5Ac) and GM3(Neu5Gc) by TMAE-fractogel high-performance liquid chromatography*. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.*, **710**, 1–8.
- [60] P. Hermentin, R. Witzel, J. Vliegthart, J. Kamerling, M. Nimtz, and H. Conradt (1992): *A strategy for the mapping of N-glycans by high-pH anion-exchange chromatoghy with pulsed amperometric detection*. *Anal. Biochem.*, **203**, 281–289.
- [61] J. Heukeshoven and R. Dernick (1988): *Improved silver staining procedure for fast staining in phastsystem development unit 1. Staining of sodium dodecyl sulfate gels*. *Electrophoresis*, **9**, 28–33.
- [62] Y. Hirabayashi, T. Nakao, M. Matsumoto, K. Obata, and S. Ando (1988): *Improved method for large-scale purification of brain gangliosides by Q-Sepharose column chromatography*. *J. Chromatogr.*, **445**, 377–384.
- [63] A. Hoffmann, M. Nimtz, and H. Conradt (1997): *Molecular characterization of β -trace protein in human serum and urin: a potential diagnostic marker for renal disease*. *Glycobiology*, **7**, 499–506.

- [64] A. Hoffmann, M. Nimtz, U. Wurster, and H. Conradt (1994): *Carbohydrate structures of β -trace protein from human cerebrospinal fluid: evidence for “brain-type” N-glycosylation*. J. Neurochem., **63**, 2185–2196.
- [65] A. Houghton, D. Mintzer, C. Cordon-Cardo, S. Welt, B. Fliegel, S. Vadhan, E. Carswell, M. Melamed, H. Oettgen, and L. Old (1985): *Mouse monoclonal IgG3 antibody detecting GD3 ganglioside: a phase I trial in patients with malignant melanoma*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**, 1242–1246.
- [66] R. Huber and H. Ziegler (1999): *Lexikon der Biologie (1)*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1. Auflage.
- [67] Y. Igarashi, H. Nojiri, N. Hanai, and S. Hakomori (1989): *Gangliosides that modulate membrane protein function*. Methods Enzymol., **179**, 521–541.
- [68] Ingold (1990): *Anleitung zur PO₂-Elektrode*. Ingold, Steinbach/Ts.
- [69] IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (1998): *Nomenclature of lipids*. Eur. J. Biochem., **257**, 293–298.
- [70] M. Iwamori and Y. Nagai (1978): *A new chromatographic approach to the resolution of individual gangliosides*. Biochem. Biophys. Res. Commun., **528**, 257–267.
- [71] K. Jacobson and C. Dietrich (1999): *Looking at lipid rafts?* Trends Cell Biol., **9**, 87–91.
- [72] R. Jefferis, J. Lund, and J. Pound (1998): *IgG-Fc-mediated effector functions: molecular definition of interaction sites for effector ligands and the role of glycosylation*. Immunol. Rev., **163**, 59–76.
- [73] N. Jenkins, R. Parekh, and D. James (1996): *Getting the glycosylation right: implications for the biotechnology industry*. Nat. Biotechnol., **14**, 975–981.
- [74] M. Kaminski, C. MacKenzie, M. Mooibroek, T. Dahms, T. Hiramata, A. Houghton, P. Chapman, and S. Evans (1999): *The role of homophilic binding in anti-tumor antibody R24 recognition of molecular surfaces. demonstration of an intermolecular beta-sheet interaction between *vh* domains*. J. Biol. Chem., **274**, 5597–5604.
- [75] J. N. Kanfer and C. Spielvogel (1973): *On the loss of gangliosides by dialysis*. J. Neurochem., **20**, 1483–1485.
- [76] R. Kannagi (1997): *Carbohydrate-mediated cell adhesion involved in hematogenous metastasis of cancer*. Glycoconj. J., **14**, 577–584.
- [77] R. Karlsson, A. Michaelsson, and L. Mattsson (1991): *Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system*. J. Immunol. Methods, **145**, 229–240.

- [78] J. Kirkwood, R. Mascari, H. Edington, M. Rabkin, R. Day, T. Whiteside, D. Vlock, and J. Shipe-Spotloe (2000): *Analysis of therapeutic and immunologic effects of R24 anti-gd3 monoclonal antibody in 37 patients with metastatic melanoma*. *Cancer*, **88**, 2693–2702.
- [79] E. Klenk (1942): *Gangliosides, a new group of sugar-containing brain lipids*. *Hoppe Seyler s Z. Physiol. Chem.*, **273**, 76–86.
- [80] A. Kobata (1992): *Structures and function of the sugar chain of glycoproteins*. *Eur. J. Biochem.*, **209**, 483–501.
- [81] G. Köhler and C. Milstein (1975): *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. *Nature*, **256**, 495–497.
- [82] R. Kornfeld and S. Kornfeld (1985): *Assembly of asparagine-linked oligosaccharides*. *Annu. Rev. Biochem.*, **54**, 631–664.
- [83] B. Kumpel, T. Rademacher, G. Rook, P. Williams, and I. Wilson (1994): *Galactosylation of human IgG monoclonal anti-D produced by EBV-transformed B-lymphoblastoid cell lines is dependent on culture method and affects Fc receptor-mediated functional activity*. *Hum. Antibodies Hybridomas*, **5**, 143–151.
- [84] J. Kunkel, D. Jan, J. Jamieson, and M. Butler (1998): *Dissolved oxygen concentration in serum-free continuous culture affects n-linked glycosylation of a monoclonal antibody*. *J. Biotechnol.*, **62**, 55–71.
- [85] J. Kunkel, D. Jan, J. Jamieson, and M. Butler (1998): *Dissolved oxygen concentration in serum-free continuous culture affects N-linked glycosylation of a monoclonal antibody*. *J. Biotechnol.*, **62**, 55–71.
- [86] C. Kunz, S. Rudloff, A. Hintelmann, G. Pohlentz, and H. Egge (1996): *High-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection and molar response factors of human milk oligosaccharides*. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.*, **685**, 211–221.
- [87] B. Küster, S. F. Wheeler, A. P. Hunter, R. A. Dwek, and D. J. Harvey (1997): *Sequencing of N-linked oligosaccharides directly from protein gels: in-gel deglycosylation followed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and normal-phase high-performance liquid chromatography*. *Anal. Biochem.*, **250**, 82–101.
- [88] G. Kuziemko, M. Stroh, and C. Stevens (1996): *Cholera toxin binding affinity and specificity for gangliosides determined by surface plasmon resonance*. *Biochemistry*, **35**, 6375–6384.
- [89] S. Ladisch, B. Gillard, and L. Wong, C. Ulsh (1983): *Shedding and immunoregulatory activity of YAC-1 lymphoma cell gangliosides*. *Cancer Res.*, **43**, 3808–3813.

- [90] S. Ladisch, A. Hasegawa, R. Li, and M. Kiso (1995): *Immunosuppressive activity of chemically synthesized gangliosides*. *Biochemistry*, **34**, 1197–1202.
- [91] U. K. Laemmli (1970): *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, **227**, 680–685.
- [92] R. Leatherbarrow and R. Dwek (1983): *The effect of aglycosylation on the binding of mouse IgG to staphylococcal protein A*. *FEBS Lett.*, **164**, 227–230.
- [93] R. Ledeen and R. Yu (1982): *Gangliosides: Structure, isolation and analysis*. *Methods Enzymol.*, **83**, 139–191.
- [94] Y. Lee (1990): *High-performance anion-exchange chromatoghy for carbohydrate analysis*. *Anal. Biochem.*, **189**, 151–162.
- [95] J. Lehmann, G. W. Piehl, and R. Schulz (1985): *Blasenfreie Zellkulturbeasung mit bewegten, porösen Membranen*. *BioTech-Forum*, **2**, 112–117.
- [96] J. Lehmann, G. W. Piehl, and R. Schulz (1987): *Bubble free cell culture aeration with porous moving membranes*. *Dev. Biol. Standard*, **66**, 227–240.
- [97] C. K. Lim (1987): *HPLC of small molecules - a practical approach*. IRL Press, Oxford.
- [98] T. Lindl and J. Bauer (1994): *Zell- und Gewebekultur*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 3. Auflage.
- [99] H. Lis and N. Sharon (1993): *Protein glycosylation. structural and functional aspects*. *Eur. J. Biochem.*, **91**, 1–27.
- [100] D. Liu (1992): *Glycoprotein pharmaceuticals—scientific and regulatory considerations, and the United-States Orphan Drug-Act*. *Trends Biotechnol.*, **17**, 32–36.
- [101] K. Lloyd and K. Furukawa (1998): *Biosynthesis and functions of gangliosides: recent advances*. *Glycoconj. J.*, **15**, 627–636.
- [102] P. Lowy, G. Keighley, and H. Borsook (1960): *Inactivation of erythropoietin by neuraminidase and mild substitution reactions*. *Nature*, **185**, 102–103.
- [103] J. Lund, N. Takahashi, H. Nakagawa, M. Goodall, T. Bentley, S. Hindley, R. Tyler, and R. Jefferis (1993): *Control of IgG/Fc glycosylation: a comparison of oligosaccharides from chimeric human/mouse and mouse subclass immunoglobulin Gs*. *Mol. Immunol.*, **30**, 741–748.
- [104] D. Lütkemeyer, N. Ameskamp, N. Tebbe, H. Wittler, and J. Lehmann (1999): *Estimation of cell damage in bench- and pilot-scale affinity expanded-bed chromatography for the purification of monoclonal antibodies*. *Biotechnol. Bioeng.*, **65**, 114–119.

- [105] L. J. Magnani, B. Nilsson, M. Brockhaus, D. Zopf, Z. Steplewski, H. Koprowski, and V. Ginsburg (1982): *A monoclonal antibody-defined antigen associated with gastrointestinal cancer is a ganglioside containing sialylated lacto-N-fucopentaose II*. J. Biol. Chem., **257**, 14365–14369.
- [106] L. J. Magnani, D. F. Smith, and V. Ginsburg (1980): *Detection of gangliosides that bind cholera toxin: direct binding of ^{125}I -labeled toxin to thin layer chromatograms*. Anal. Biochem., **109**, 399–402.
- [107] H. Maguire, D. Berd, E. Lattime, P. McCue, S. Kim, P. Chapman, and M. Mastrangelo (1998): *Phase I study of R24 in patients with metastatic melanoma including evaluation of immunologic parameters*. Cancer Biother. Radiopharm., **13**, 13–23.
- [108] D. Mahuran (1999): *Biochemical consequences of mutations causing the GM2 gangliosidoses*. Biochim Biophys Acta, **1455**, 105–138.
- [109] B. Maiorella, J. Winkelhake, J. Young, B. Moyer, R. Bauer, M. Hora, J. Andya, J. Thomson, T. Patel, and R. Parekh (1993): *Effect of culture conditions on IgM antibody structure, pharmacokinetics and activity*. Biotechnology, **11**, 387–392.
- [110] D. Marcus (1984): *A review of the immunogenic and immuno-modulatory properties of glycosphingolipids*. Mol. Immunol., **21**, 1083–1091.
- [111] J. Marth (1996): *Complexity in O-linked oligosaccharide biosynthesis engendered by multiple polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases*. Glycobiology, **6**, 701–705.
- [112] K. Masuda, Y. Yamaguchi, K. Kato, N. Takahashi, I. Shimada, and Y. Arata (2000): *Pairing of oligosaccharides in the Fc region of immunoglobulin G*. FEBS Lett., **473**, 349–357.
- [113] J. Mellquist, L. Kasturi, S. Spitalnik, and S. Shakin-Eshleman (1998): *The amino acid following an asn-X-Ser/Thr sequon is an important determinant of N-linked core glycosylation efficiency*. Biochemistry, **37**, 6833–6837.
- [114] W. Merritt, V. Der-Minassian, and G. Reaman (1994): *Increased GD3 ganglioside in plasma of children with T-cell acute lymphoblastic leukemia*. Leukemia., **8**, 816–822.
- [115] W. Metelmann, J. Müthing, and J. Peter-Katalinić (2000): *Nano-electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometric analysis of a ganglioside mixture from human granulocytes*. Rapid Commun. Mass Spectrom., **175**, 543–550.
- [116] E. Meillet, B. Mania-Farnell, D. George, J. Inokuchi, and E. Bremer (2000): *Modulation of EGF receptor activity by changes in the GM3 content in a human epidermoid carcinoma cell line*. Exp. Cell Res., **256**, 74–82.

- [117] W. Miller, H. Blanch, and C. Wilke (2000): *A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in batch and continuous suspension culture: effect of nutrient concentration, dilution rate, and pH*. Biotechnol. Bioeng., **69**, 853–871.
- [118] Y. Mimura, E. Kabat, T. Tanaka, M. Fujimoto, K. Takeo, and K. Nakamura (1995): *Microheterogeneity of mouse antidextran monoclonal antibodies*. Electrophoresis, **16**, 116–123.
- [119] L. Minasian, T. Szatrowski, M. Rosenblum, T. Steffens, M. Morrison, P. Chapman, L. Williams, C. Nathan, and A. Houghton (1994): *Hemorrhagic tumor necrosis during a pilot trial of tumor necrosis factor-alpha and anti-GD3 ganglioside monoclonal antibody in patients with metastatic melanoma*. Blood, **83**, 56–64.
- [120] L. Minasian, T. Yao, T. Steffens, D. Scheinberg, L. Williams, E. Riedel, A. Houghton, and P. Chapman (1995): *A phase I study of anti-GD3 ganglioside monoclonal antibody R24 and recombinant human macrophage-colony stimulating factor in patients with metastatic melanoma*. Cancer, **75**, 2251–2257.
- [121] M. Monsigny, C. Petit, and A. Roche (1988): *Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulfuric acid micromethod*. Anal. Biochem., **175**, 525–530.
- [122] E. Moran, S. McGowan, J. McGuire, J. Frankland, I. Oyebade, W. Waller, L. Archer, L. Morris, J. Pandya, S. Nathan, L. Smith, M. Cadette, and J. Michalowski (2000): *A systematic approach to the validation of process control parameters for monoclonal antibody production in fed-batch culture of a murine myeloma*. Biotechnol. Bioeng., **69**, 242–255.
- [123] K. Moremen, R. Trimble, and A. Herscovics (1994): *Glycosidases of the asparagine-linked oligosaccharide processing pathway*. Glycobiology, **4**, 113–125.
- [124] J. M. Mowles (1988): *The use of ciprofloxacin for the elimination of mycoplasma from naturally infected cell lines*. Cytotechnology, **1**, 355–358.
- [125] K. Mullis and F. Faloona (1987): *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaktion*. Methods Enzymol., **155**, 335–350.
- [126] E. Munzert, R. Heidemann, H. Büntemeyer, J. Lehmann, and J. Müthing (1997): *Production of recombinant human antithrombin III on 20-l bioreactor scale: correlation of supernatant neuraminidase activity, desialylation, and decrease of biological activity of recombinant glycoprotein*. Biotechnol. Bioeng., **56**, 441–448.

- [127] E. Munzert, J. Müthing, H. Büntemeyer, and J. Lehmann (1996): *Sialidase activity in culture fluid of Chinese hamster ovary cells during batch culture and its effect on recombinant human antithrombin III integrity*. Biotechnol. Prog., **12**, 559–563.
- [128] J. Müthing (1996): *Influenza A and Sendai viruses preferentially bind to fucosylated gangliosides with linear poly-N-acetyllactosaminyl chains from human granulocytes*. Carbohydr. Res., **290**, 217–224.
- [129] J. Müthing (1998): *TLC in structure and recognition studies of glycosphingolipids*. Methods in Molecular Biology, **76**, 183–195.
- [130] J. Müthing (2000): *High-performance liquid chromatography of glycosphingolipids*. Methods Enzymol., **312**, in press.
- [131] J. Müthing, S. Duvar, D. Heitmann, F. Hanisch, U. Neumann, G. Lochnit, R. Geyer, and J. Peter-Katalinić (1999): *Isolation and structural characterization of glycosphingolipids of in vitro propagated human umbilical vein endothelial cells*. Glycobiology, **9**, 459–468.
- [132] J. Müthing and D. Heitmann (1993): *Nondestructive detection of gangliosides with lipophilic fluorochromes and their employment for preparative high-performance thin-layer chromatography*. Anal. Biochem., **208**, 121–124.
- [133] J. Müthing and S. Kemminer (1996): *Nondestructive detection of neutral glycosphingolipids with lipophilic anionic fluorochromes and their employment for preparative high-performance thin-layer chromatography*. Anal. Biochem., **238**, 195–202.
- [134] J. Müthing and U. Neumann (1993): *Selective detection of terminally $\alpha 2-3$ and $\alpha 2-6$ sialylated neolacto-series gangliosides by immunostaining on thin layer chromatograms*. Biomed. Chromatogr., **7**, 158–161.
- [135] J. Müthing, J. Peter-Katalinić, F. Hanisch, and U. Neumann (1991): *Structural studies of gangliosides from YAC-1 mouse lymphoma cell line by immunological detection and fast atom bombardment mass spectrometry*. Glycoconjugate J., **8**, 414–423.
- [136] J. Müthing and F. Unland (1994): *Improved separation of isomeric gangliosides by anion-exchange high-performance liquid chromatography*. J. Chromatogr., B **658**, 39–45.
- [137] M. Nasi, M. Meyers, P. Livingston, A. Houghton, and P. Chapman (1997): *Anti-melanoma effects of R24, a monoclonal antibody against GD3 ganglioside*. Melanoma Res., **7**, 155–162.
- [138] V. Neuhoff (1985): *Clear background and high sensitive protein staining with Commassie Blue dyes in polyacrylamid gels: a systematic analysis*. Electrophoresis, **6**, 427–448.

- [139] J. Niederkorn, J. Mellon, M. Pidherney, E. Mayhew, and R. Anand (1993): *Effect of anti-ganglioside antibodies on the metastatic spread of intraocular melanomas in a nude mouse model of human uveal melanoma*. *Curr. Eye Res.*, **12**, 347–358.
- [140] M. Nimtz, E. Grabenhorst, H. Conradt, L. Sanz, and J. Calvete (1999): *Structural characterisation of the oligosaccharide chain of native and crystallized boar seminal plasma spermadhesin PSP-I and PSP-II glycoforms*. *Eur. J. Biochem.*, **265**, 703–718.
- [141] A. Noguchi, C. Mukuria, E. Suzuki, and M. Naiki (1995): *Immunogenicity of N-glycolylneuraminic acid-containing carbohydrate chains of recombinant human erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells*. *J. Biochem.*, **117**, 59–62.
- [142] D. Ockert, M. Schmitz, M. Hampl, and E. Rieber (1999): *Advances in cancer immunotherapy*. *Immunol. Today*, **20**, 63–65.
- [143] S. Ozturk and B. Palsson (1991): *Growth, metabolic, and antibody production kinetics of hybridoma cell culture: 2. effects of serum concentration, dissolved oxygen concentration, and medium pH in a batch reactor*. *Biotechnol. Prog.*, **7**, 481–494.
- [144] R. Parekh, R. Dwek, and T. Rademacher (1988): *Rheumatoid arthritis as a glycosylation disorder*. *Br. J. Rheumatol.*, **27**, 162–169.
- [145] R. Parekh, R. Dwek, B. Sutton, D. Fernandes, A. Leung, D. Stanworth, and T. Rademacher (1985): *Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum igg*. *Nature*, **316**, 452–457.
- [146] C. Parker (1990): *Immunoassays*. *Methods Enzymol.*, **182**, 700–718.
- [147] T. Patel, J. Bruce, A. Marry, C. Bigge, M. Wormald, A. Jaques, and R. Parekh (1993): *Use of hydrazine to release in intact and unreduced both form N- and O-linked oligosaccharides from glycoprotein*. *Biochem.*, **32**, 679–693.
- [148] T. Patel, B. Parekh, B. Moellering, and C. Prior (1992): *Different culture methods lead to differences in glycosylation of a murine IgG monoclonal antibody*. *Biochem. J.*, **285**, 839–845.
- [149] J. Peter-Katalinić and H. Egge (1990): *Desorption mass spectrometry of glycosphingolipids*. *Methods Enzymol.*, **193**, 713–733.
- [150] J. Peters and H Baumgarten (1990): *Monoklonale Antik rper*. Springer Verlag, Berlin, 2. Auflage.
- [151] Pharmacia (1989): *PhastSystemTM Separation Technique File No. 100*. Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden, 1. Auflage.

- [152] S. J. Pirt (1985): *Principles of Microbe and Cell Cultivation*. Blackwell Scientific, Oxford, 1. Auflage.
- [153] S. Pohl, A. Hoffmann, A. Rüdiger, M. Nimtz, J. Jaeken, and H. Conradt (1997): *Hypoglycosylation of a brain glycoprotein (β -trace protein) in CDG syndromes due to phosphomannomutase deficiency and N-acetylglucosaminyl-transferase II deficiency*. *Glycobiology*, **7**, 1077–1084.
- [154] G. Pohlentz, D. Klein, G. Schwarzmann, D. Schmitz, and K. Sandhoff (1988): *Both GA2, GM2, and GD2 synthases and GM1b, GD1a, and GT1b synthases are single enzymes in golgi vesicles from rat liver*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7044–7048.
- [155] M. Poiter, L. Mameli, M. Bélisle, and S. Dallaire, L. Melançon (1979): *Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium (4-methylumbelliferyl- α -D-N-acetylneuraminate) substrate*. *Anal. Biochem.*, **94**, 287–296.
- [156] C. Pukel, K. Lloyd, L. Travassos, W. Dippold, H. Oettgen, and L. Old (1982): *GD₃ a prominent ganglioside of human melanoma. detection and characterization by mouse monoclonal antibody*. *J. Exp. Med.*, **155**, 1133–1147.
- [157] K. Pullen, M. Johnson, A. Phillips, G. Ball, and N. Finter (1985): *Very large scale suspension cultures of mammalian cells*. *Developments in Biological Standardization*, **60**, 175–177.
- [158] Townsend R. and Hotchkiss A. (1997): *Techniques in glycobiology*. Dekker and Marcel, New York, 1. Auflage.
- [159] H. Rahmann (1987): *History of ganglioside research*. Springer Verlag, Berlin, 1. Auflage.
- [160] T. Raju, J. Briggs, S. Borge, and A. Jones (2000): *Species-specific variation in glycosylation of igg: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics*. *Glycobiology*, **10**, 477–486.
- [161] G. Rebel, J. Robert, and P. Mandel (1980): *Glycolipids and cell differentiation*. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **125**, 159–166.
- [162] H. Rehm (1996): *Der Experimentator: Proteinbiochemie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1. Auflage.
- [163] G. Reuter and R. Schauer (1994): *Determination of sialic acids*. *Methods Enzymol.*, **230**, 168–199.
- [164] D. Robinson, C. Chan, C. Yu, P. Tsai, J. Tung, T. Seamans, A. Lenny, A. Lee, J. Irwin, and M. Silberklang (1994): *Characterization of a recombinant antibody produced in the course of a high yield fed-batch process*. *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 727–735.

- [165] D. Saffran, R. Reiter, A. Jakobovits, and O. Witte (1999): *Target antigens for prostate cancer immunotherapy*. *Cancer Metastasis Rev.*, **18(4)**, 437–449.
- [166] H. Schachter (1986): *Biosynthetic controls that determine the branching and microheterogeneity of protein-bound oligosaccharides*. *Biochem. Cell Biol.*, **64**, 163–181.
- [167] J. Schärfe (1988): *Impulsflächenanalyse*. *LaborPraxis*, **10**, 1096–1103.
- [168] E. Schlaeger, B. Eggimann, and A. Gast (1987): *Protolytic activity in the culture supernatans of mouse hybridoma cells*. *Dev. Biol. Stand.*, **66**, 403–408.
- [169] H. G. Schlegel (1985): *Allgemeine Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 6. Auflage.
- [170] P. Schlenke, E. Grabbenhorst, M. Nimtz, and H. Conradt (1999): *Construction of stable BHK-21 cell lines co-expressing human glycosyltransferases and secretory glycoproteins*. *Cytotechnology*, **30(3)**, 17–25.
- [171] R. Schnaar (1991): *Glycosphingolipids in cell surface recognition*. *Glycobiology*, **1**, 477–485.
- [172] R. L. Schnaar (1994): *Isolation of glycosphingolipids*. *Methods Enzymol.*, **230**, 348–370.
- [173] S. Schröter, P. Derr, H. Conradt, M. Nimtz, G. Hale, and C. Kirchhoff (1999): *Mala-specific modification of human CD52*. *J. Biol. Chem.*, **274**, 29862–29873.
- [174] G. Schwarting and A. Summers (1980): *Gangliotetraosylceramide is a T cell differentiation antigen associated with natural cell-mediated cytotoxicity*. *J. Immunol.*, **124**, 1691–1694.
- [175] T. Seewöster and J. Lehmann (1997): *Cell size distribution as a parameter for the predetermination of exponential growth during repeated batch cultivation of CHO cells*. *Biotechnol. Bioeng.*, **55**, 793–797.
- [176] A. L. Shapiro, E. Vinuela, and J. V. Maizel Jr. (1967): *Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**, 815–820.
- [177] N. Shibuya, I. J. Goldstein, M. Broekaert, W. F. Nsimba-Lubaki, B. Peeters, and W. J. Peumans (1987): *The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac(α 2-6)Gal/GalNAc sequence*. *J. Biol. Chem.*, **262**, 1569.
- [178] E. Silverton, M. Navia, and D. Davies (1977): *Three-dimensional structure of an intact human immunoglobulin*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **74**, 5140–5144.
- [179] K. Simons and E. Ikonen (1997): *Functional rafts in cell membranes*. *Nature*, **387**, 569–572.

- [180] S. Singer and G. Nicholson (1972): *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. Science, **175**, 720–731.
- [181] V. Skipski (1975): *Thin-layer chromatography of natural glycosphingolipids*. Methods Enzymol., **35**, 396–425.
- [182] P. Smith, R. Krohn, G. Hermanson, A. Mallia, F. Gartner, M. Provenzano, E. Fujimoto, N. Goeke, B. Olson, and D. Klenk (1985): *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal. Biochem. 1985, **150**, 76–85.
- [183] B. Sutton and D. Phillips (1983): *The three-dimensional structure of the carbohydrate within the Fc fragment of immunoglobulin G*. Biochem. Soc. Trans., **11**, 130–132.
- [184] L. Svennerholm (1957): *Quantitative estimation of sialic acids: a colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method*. Biochim. Biophys. Acta, **24**, 604–611.
- [185] L. Svennerholm (1963): *Chromatographic separation of human brain gangliosides*. J. Neurochem., **10**, 613–623.
- [186] T. Tai, I. Kawashima, K. Furukawa, and K. Lloyd (1988): *Monoclonal antibody R24 distinguishes between different N-Acetyl- and N-Glycolylneuraminic acid derivatives of gangliosid GD3*. Arch. Biochem. Biophys., **260**, 51–55.
- [187] S. Takasaki, T. Mizuochi, and A. Kobata (1982): *Hydrazinolysis of asparagine-linked sugar chains to produce free oligosaccharides*. Methods. Enzymol., **83**, 263–269.
- [188] M. Tao and S. Morrison (1989): *Studies of aglycosylated chimeric mouse-human igg. role of carbohydrate in the structure and effector functions mediated by the human igg constant region*. J. Immunol., **143**, 2595–2601.
- [189] J. R. Tennant (1964): *Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability*. Transplantation, **2**, 685–694.
- [190] G. van Echten and K. Sandhoff (1993): *Ganglioside metabolism-enzymology, topology, and regulation*. J Biol. Chem., **268**, 5341–5344.
- [191] A. Varki (1993): *Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct*. Glycobiology, **3**, 97–103.
- [192] A. Varki, R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, G. Hart, and J. Marth (1999): *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1. Auflage.
- [193] R. Wagner, A. Marc, J. Engasser, and A. Einsele (1992): *The use of lactate-dehydrogenase (LDH) release kinetics for the evaluation of death and growth of mammalian cells in perfusion reactors*. Biotechnol. Bioeng., **39**, 320–326.

- [194] W.-C. Wang and R. D. Cummings (1988): *The immobilized leucoagglutinin from the seeds of Maackia amurensis binds with high affinity to complex-type Ans-linked oligosaccharides terminal sialic acid-linked α -3,3 to penultimate galactose residues.* J. Biol. Chem., **263**, 4576–4585.
- [195] L. Weiner (1999): *Monoclonal antibody therapy of cancer.* Semin Oncol., **26**, 43–51.
- [196] S. Welt, E. Carswell, C. Vogel, H. Oettgen, and L. Old (1987): *Immune and non-immune effector functions of IgG3 mouse monoclonal antibody R24 detecting the disialoganglioside GD3 on the surface of melanoma cells.* Clin. Immunol. Immunopathol., **45**, 214–229.
- [197] R. Westermeier (1990): *Elektrophorese-Praktikum.* Verlag Chemie, Weinheim, 1. Auflage.
- [198] S. T. Williams (1992): *Biosensor-based analyser: measurement of glucose, sucrose, lactose, L-lactate and alcohol.* BTF, **9**, 302–304.
- [199] K. Wilson and K. H. Goulding (1991): *Methoden der Biochemie.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 3. Auflage.
- [200] A. Wright and L. Morrison (1997): *Effect of glycosylation on antibody function: implications for genetic engineering.* Trends Biotechnol., **15**, 26–32.
- [201] A. Wright, S. Shin, and S. Morrison (1992): *Genetically engineered antibodies: progress and prospects.* Crit. Rev. Immunol., **12**, 125–168.
- [202] Y. Yamaguchi, K. Kato, M. Shindo, S. Aoki, K. Furusho, K. Koga, N. Takahashi, Y. Arata, and I. Shimada (1998): *Dynamics of the carbohydrate chains attached to the Fc portion of immunoglobulin G as studied by NMR spectroscopy assisted by selective ^{13}C labeling of the glycans.* J. Biomol. NMR, **12**, 385–394.
- [203] R. Yu and S. Ando (1980): *Structures of some new complex gangliosides of fish brain.* Adv. Exp. Med. Biol., **125**, 33–45.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sven Eric Kemminer
Adresse: Imperialstr. 59, 32257 Bünde
Geburtsdatum und -ort: 07.06.1968 in Bünde
Familienstand: ledig

Schulausbildung:

1974 - 1978: Grundschule Bünde-Ahle
1978 - 1988: Freiherr-vom-Stein-Gymnasium, Bünde
Juni 1988: Abitur

Wehrdienst:

Okt. 1988 - Dez. 1989: Grundwehrdienst (PzBtl 74, Cuxhaven)

Studium:

Okt. 1989 - Sept. 1995: **Chemiestudium** an der Universität Bielefeld
Sept. 1995: **Chemie Diplom**; Diplomarbeit:
Durchführung an der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld, AG Zellkulturtechnik (Leitung: Prof. Dr.-Ing. J. Lehmann); Thema: „Zerstörungsfreie Detektion von neutralen Glykosphingolipiden mit lipophilen Fluorochromen und ihre Anwendung für die präparative Dünnschichtchromatographie“.

Okt. 1995 - Mai 1998: **Physikstudium** an der Universität Bielefeld
Mai 1998: Erste **Staatsprüfung** zum Lehramt für die Sekundarstufe II und Sekundarstufe I in den Fächern Physik und Chemie.

Jan. 1998 - Jan. 2001: **Promotion** an der Universität Bielefeld (AG Zellkulturtechnik, Technische Fakultät) bei Prof. Dr.-Ing. J. Lehmann unter der Betreuung von HD Dr. J. Müthing

Berufliche Tätigkeiten:

Aug. 1996 - Aug. 1997: Mitarbeit als wissenschaftlicher Angestellter im Rahmen eines interdisziplinären **Forschungsprojektes** der Universität Bielefeld und der Universität Mainz mit dem Thema: „Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung von Lipiden und Glykolipiden als Rezeptoren von bakteriellen porenbildenden Toxinen“.