

Reinigung und Charakterisierung
von
 α -1,3-Gal spezifischen Antikörpern

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Andreas Zappe

2019

Die Dissertation wurde von Mai 2016 bis Januar 2019 bei Octapharma Biopharmaceuticals GmbH in Berlin angefertigt und wurde von Frau Prof. Dr. Parr von der Freien Universität Berlin betreut.

1. Gutachter Professor Dr. Maria Kristina Parr
2. Gutachter Professor Dr. Stephan Hinderlich

Disputation am 03.06.2019

Abkürzungsverzeichnis

α -1,3-GT	α -1,3-Galaktosyltransferase
APC	Antigen-präsentierende Zelle
Asn	Asparagin
BSA	Serumalbumin
CDR	„Complementarity determining region“ (Komplementaritätsbestimmende Region)
CMP	Cytidin-Monophosphat
Cys	Cystein
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	„Enzyme-linked immunosorbent assay“ (Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
Fab	Antigen-bindendes Fragment
Fc	Kristallisierbares Fragment
FPLC	„Fast protein liquid chromatography“ (Schnelle Proteinflüssigkeitschromatographie)
Fuc	Fukose
Gal	Galaktose
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalaktosamin
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglukosamin
GT-KO	„Genetically knocked out“ (genetisch inaktiviert)
HPAEC-PAD	„High-Performance Anion-Exchange Chromatography Coupled with Pulsed Electrochemical Detection“ (Hochleistungsanionenaustauscherchromatographie gekoppelt mit gepulster elektrochemischer Detektion)
HPLC	„High performance liquid chromatography“ (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HRP	„Horseradish peroxidase“ (Meerrettichperoxidase)
IdeZ	„Immunoglobulin-degrading enzyme“ (Immunoglobulin-degradierendes Enzym)
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP	Isoelektrischer Punkt
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
iNKT	Invariante natürliche Killer-T-Zelle
IPG	Immobilisierter pH Gradient
LacNAc	<i>N</i> -Acetyllaktosamin
LC-MS	„Liquid chromatography – mass spectrometry“ (Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie)
Man	Mannose
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
Neu5Gc	<i>N</i> -Glycolylneuraminsäure
OST	Oligosaccharyltransferase

PAA	Polyacrylamid
PBS	„Phosphate buffered saline“ (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PNGase F	Peptide- <i>N</i> -glycosidase F
RU	„Response units“ (Antworteinheiten)
SDS-PAGE	„Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis“ (Natriumlaurylsulfat-polyacrylamid gelelektrophorese)
Ser	Serin
SPR	„Surface plasmon resonance“ (Oberflächenplasmonresonanz)
Thr	Threonin
TCR	T-Zell Rezeptor
UDP	Uridindiphosphat

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kategorien von unterschiedlichen Glykokonjugaten in tierischen Zellen.	2
Abbildung 2: Die drei Arten von <i>N</i> -Glykanen.	3
Abbildung 3: Überblick von Glykanstrukturen in unterschiedlichen Expressionssystemen.	4
Abbildung 4: Die Glykobiogenese von <i>N</i> -Glykanen im ER und Golgi-Apparat.	6
Abbildung 5: Methoden zur Analyse der Glykosylierung von Glykoproteinen.	11
Abbildung 6: Exemplarische Struktur eines Antikörpers.	14
Abbildung 7: Exemplarische Strukturen der vier unterschiedlichen IgG-Subklassen.	15
Abbildung 8: Darstellung des α -Gal Epitops als Teil eines komplexen <i>N</i> -Glykans.	17
Abbildung 9: Bekannte Symptome nach Zeckenbissen und Konsum von rotem Fleisch.	20
Abbildung 10: Geographischer Vergleich der US-Staaten.	20
Abbildung 11: Präsentation von Lipid-verknüpftem α -Gal Epitop durch CD1d auf APCs	23
Abbildung 12: Eine durch α -Gal-tragende Proteinstrukturen ausgelöste Immunantwort.	24
Abbildung 13: Schematische Darstellung durchgeführter Experimente in dieser Arbeit.	31
Abbildung 14: Exemplarisches Chromatogramm der anti-Gal Affinitätschromatographie. ...	45
Abbildung 15: Elektrophorese der Antikörpereluate zur Untersuchung auf Fremdprotein.	46
Abbildung 16: Bindungsanalyse von anti-Gal Antikörpern mittels Glykanepitopen.	47
Abbildung 17: Analyse der Bindung von anti-Gal an bovines Thyroglobulin.	49
Abbildung 18: Inhibitorischer ELISA zur Analyse der Bindungsaffinität an BSA- α -Gal.	50
Abbildung 19: Affinitätsanalyse vom anti-Gal Antikörper (1).	52
Abbildung 20: Affinitätsanalyse vom anti-Gal Antikörper (2).	53
Abbildung 21: Interaktion zwischen dem anti-Gal Antikörper und bovinem Thyroglobulin..	55
Abbildung 22: Nachweis der anti-Gal Spezifität mittels Erythrozytenagglutination.	56
Abbildung 23: Nachweis des α -Gal Epitops mittels Western Blot.	58
Abbildung 24: Bestimmung des Detektionslimits vom anti-Gal Antikörper.	59
Abbildung 25: Western Blot von Kogenate, Cetuximab und Nuwiq.	60
Abbildung 26: Gelelektrophorese vom anti-Gal Antikörper (A) und Cetuximab (B).	62
Abbildung 27: Gelelektrophorese von Thyroglobulin, Nuwiq und Kogenate.	63
Abbildung 28: <i>N</i> -Glykosylierungsprofil vom anti-Gal Antikörper.	65
Abbildung 29: <i>N</i> -Glykosylierungsprofile von zwei Modellproteinen.	66
Abbildung 30: <i>N</i> -Glykosylierungsprofile von rekombinanten Faktor VIII-Proteinen.	68
Abbildung 31: <i>N</i> -Glykananalytik von Kogenate mittels Exoglykosidase-Assay.	70
Abbildung 32: Gelelektrophorese der IgG-Subklassen und dem anti-Gal Antikörper.	71
Abbildung 33: Ermittlung der IEPs von anti-Gal mittels 2D-Elektrophorese.	74
Abbildung 34: Ermittlung der IEPs von anti-Gal mittels Western Blot.	74
Abbildung 35: Elektrophorese und Western Blot von anti-Gal und Cetuximab.	75
Abbildung 36: Interaktion von anti-Gal mit dem α -Gal Epitop und dem α -Gal Disaccharid..	79
Abbildung 37: Übersicht über mögliche, durch α -Gal induzierte Immunreaktionen.	90

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Glykane: Struktur, Synthese und Funktion	1
1.1.1	Generelle Strukturen von Monosacchariden und Glykanen	1
1.1.2	Struktur und Diversität von <i>N</i> -glykosidisch verknüpften Glykanen	3
1.1.3	Biosynthese von <i>N</i> -Glykanen in eukaryotischen Zellen	5
1.1.4	Kurze Einführung in <i>O</i> -Glykane	7
1.1.5	Biologische Funktionen von Glykanen	8
1.1.6	Immunogene Glykanepitope	9
1.1.7	Analytische Werkzeuge zur Kontrolle von therapeutischen Glykoproteinen	10
1.2	Einführung in Affinitätsanalysen mittels Oberflächenplasmonresonanz	13
1.3	Struktur und Funktion von Immunglobulinen	14
1.4	Das α -Gal Epitop und die Produktion von anti-Gal Antikörpern	17
1.4.1	Geschichtliche Fakten zum α -Gal Epitop	19
1.4.2	α -Gal-tragende Glykoproteine	21
1.4.3	α -Gal-vermittelte Immunreaktionen	22
1.4.4	Therapeutische Anwendungen von α -Gal Epitopen und anti-Gal Antikörpern	25
1.5	Bisherige Arbeiten zur Analyse von α -Gal Epitopen	26
1.6	Das Ziel der Doktorarbeit	28
2	Material und Methoden	29
2.1	Zusammenfassung verwendeter Materialien und Chemikalien	29
2.2	Übersicht durchgeführter Versuche und Experimente	31
2.3	Reinigung von α -Gal-spezifischen Antikörpern	32
2.4	Pufferwechsel von gereinigten Antikörpern und anderen Proteinen	33
2.5	Quantifizierung von Proteinen	33
2.6	Spezifitätsnachweis gereinigter anti-Gal Antikörper zum α -Gal Epitop	34
2.6.1	Nachweis der Spezifität von anti-Gal zu α -Gal Epitopen mittels ELISA	34
2.6.2	Nachweis der anti-Gal-Spezifität mittels Erythrozytenagglutination	36
2.6.3	Nachweis der anti-Gal-Spezifität mittels Oberflächenplasmonresonanz	36
2.7	Biotinylierung des anti-Gal Antikörpers	37
2.8	Kopplung von anti-Gal Antikörpern mit Meerrettichperoxidase	37
2.9	Gelelektrophorese und Western Blot	38
2.10	Ermittlung der IgG-Subklassen von gereinigten anti-Gal Antikörpern	39
2.11	Isoelektrische Fokussierung von anti-Gal Antikörpern	39
2.12	Färbung von Gelen nach erfolgter Gelelektrophorese	41
2.13	Enzymatische Abspaltung von Glykanepitopen	41
2.13.1	Freisetzung von <i>N</i> -Glykanen	42
2.13.2	Enzymatische Abspaltung von α -1,3-verknüpfter Gal	42
2.13.3	Enzymatische Abspaltung von β -1,4-verknüpfter Gal	42
2.13.4	Enzymatische Abspaltung von Sialinsäuren	42
2.13.5	Spaltung freigesetzter <i>N</i> -Glykane mittels Exoglykosidasen	43
2.14	<i>N</i> -Glykananalytik mittels Massenspektrometrie	43
3	Ergebnisse	45
3.1	Die Reinigung von anti-Gal Antikörpern	45
3.2	Nachweis der Antikörperspezifität mittels ELISA	47
3.2.1	Nachweis der Spezifität mit biotinylierten Glykanepitopen	47
3.2.2	Nachweis der Spezifität mit bovinem Thyroglobulin	49
3.2.3	Nachweis der Spezifität mit synthetischem BSA- α -Gal Konjugat	50
3.3	Nachweis der Spezifität mittels Oberflächenplasmonresonanz	51

3.4	Nachweis der Antikörperspezifität mittels Erythrozytenagglutination.....	55
3.5	Detektion von α -Gal-tragenden Proteinen mittels Western Blot	57
3.6	Das Detektionslimit vom anti-Gal Antikörper im Western Blot	59
3.7	<i>N</i> -Glykananalytik vom anti-Gal Antikörper und von Modellproteinen	61
3.7.1	Effizienz der <i>N</i> -Glykanfreisetzung von verwendeten Proteinen.....	61
3.7.2	<i>N</i> -Glykananalytik von α -Gal-tragenden Glykoproteinen.....	64
3.8	Bestimmung der IgG-Subklassen vom anti-Gal Antikörper.....	71
3.9	Isoelektrische Fokussierung des anti-Gal Antikörpers	73
4	Diskussion.....	76
4.1	Reinigung von anti-Gal Antikörpern aus Octagam	76
4.2	Nachweis der Antikörperspezifität mittels ELISA	77
4.2.1	Streptavidin ELISA mit biotinylierten Glykanepitopen.....	77
4.2.2	ELISA mit bovinem Thyroglobulin	78
4.2.3	Kompetetiver ELISA zum Vergleich der Affinitäten zweier Glykanepitope	78
4.3	Nachweis der Antikörperspezifität mittels Oberflächenplasmonresonanz	79
4.4	Nachweis der Antikörperspezifität mittels Erythrozytenagglutination.....	81
4.5	Verifizierung von Western Blot Experimenten mittels Glykananalytik.....	83
4.5.1	Die <i>N</i> -Glykosylierung des anti-Gal Antikörpers.....	83
4.5.2	Glykananalytik von Modellproteinen zur Verifizierung des Western Blots.....	83
4.6	Ermittelte Charakteristika von gereinigtem anti-Gal Antikörper	86
4.6.1	Verteilung von IgG-Subklassen	86
4.6.2	Isoelektrische Fokussierung des anti-Gal Antikörpers.....	87
4.7	Durch α -Gal-Strukturen ausgelöste Immunreaktionen	88
5	Ausblick.....	91
6	Zusammenfassung.....	93
7	Literaturverzeichnis	95
8	Verzeichnis von erfolgten Publikationen	121
9	Anhang.....	122

1 Einleitung

1.1 Glykane: Struktur, Synthese und Funktion

1.1.1 Generelle Strukturen von Monosacchariden und Glykanen

Die kovalente Verknüpfung von Kohlenhydraten ist eine von vielen post-translationalen Modifikationen, die bei Proteinen und Lipiden auftreten können (1, 2). In meiner Arbeit wird der Fokus auf der Glykosylierung von Proteinen liegen. Der gebildete Komplex aus Protein und Polysaccharid wird als Glykokonjugat definiert während die einzelnen Bestandteile des Zuckers als Monosaccharide bezeichnet werden. Polysaccharide bestehen aus miteinander verknüpften Glykanen, die wiederum aus Monosacchariden aufgebaut sind. Monosaccharide stellen die Grundbausteine für Oligosaccharide und Glykane dar. Sie sind miteinander durch glykosidische Bindungen verbunden. Hierbei wird zwischen α - und β -glykosidischen Bindungen unterschieden. Die Unterscheidung basiert auf der stereochemischen Relation eines exozyklischen Sauerstoffatoms zum anomeren Kohlenstoffatom. Eine α -glykosidische Bindung wird ausgebildet wenn sich das Sauerstoffatom in *trans*-Position zum Kohlenstoffatom befindet. Eine β -glykosidische Bindung erfordert eine *cis*-Position des Sauerstoffatoms in Relation zum Kohlenstoffatom (3). In Säugerglykanen vor allem vorkommende Monosaccharide sind *N*-Acetylglukosamin (GlcNAc ■), Mannose (Man ●), Galaktose (Gal ●), *N*-Acetylgalaktosamin (GalNAc ■), Fucose (Fuc ▲) und Sialinsäuren wie die *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac ◆). Die für die Darstellung der Monosaccharide verwendeten Symbole wurden vom „Consortium for Functional Glycomics“ akzeptiert und anerkannt (4).

Glykane bestehen generell aus einer Kernstruktur, die um verschieden lange Antennen erweitert werden kann. Die Antennen bestehen wiederum aus miteinander verknüpften Monosacchariden. Die Gesamtheit aller Glykane kann in zwei Haupttypen eingeteilt werden: *N*-Glykane und *O*-Glykane. Die Buchstaben „N“ und „O“ signalisieren hierbei die Bindung zwischen dem endständigen Monosaccharidrest des Oligo- oder Polysaccharids und der Aminosäure an der entsprechenden Glykosylierungsstelle. *N*-Glykane binden an die Aminogruppe von Asparagin (Asn) (5) und *O*-Glykane sind *O*-glykosydisch an Hydroxygruppen von Serin (Ser) oder Threonin (Thr) gebunden (6). Eine Übersicht dieser beiden Haupttypen von Glykanen und weiteren Klassen von Glykokonjugaten ist in Abbildung 1 gezeigt.

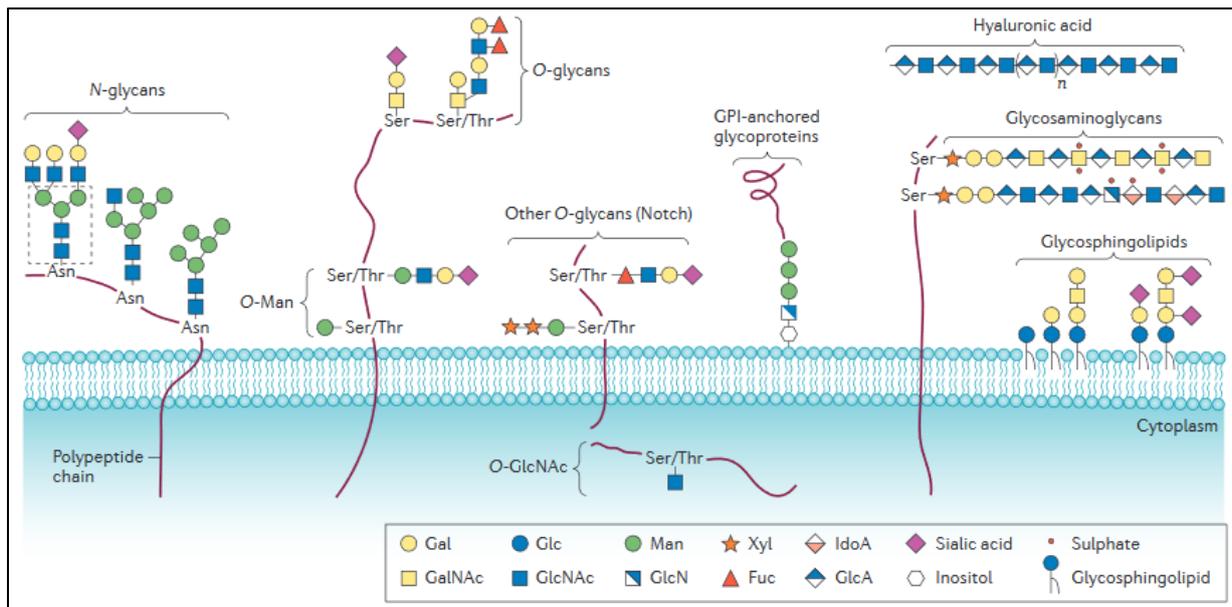


Abbildung 1: Kategorien von unterschiedlichen Glykokonjugaten in tierischen Zellen.

Glykosylierung von Proteinen findet durch das kovalente Anknüpfen von Glykanen an Polypeptide statt. Die kovalente Bindung kommt entweder durch eine *N*-glykosidische oder eine *O*-glykosidische Verknüpfung zustande. Andere Klassen von Glykanen und Glykoproteinen sind an die äußere Plasmamembran gebunden, zum Beispiel Glycosphingolipide, oder sind über eine Bindung an einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker in die Membran eingebettet. Glykosaminoglykane sind Polymere von sich wiederholenden Polysacchariden und sind gebunden an membrangebundene Proteoglykane. Hyaluronsäure ist ein freies Glykosaminoglykan in der zellulären Matrix; Darstellung mit Erlaubnis von (7).

Glykane sind sehr divers hinsichtlich ihrer Monosaccharid-Zusammensetzung und ihren Monosaccharid-Verknüpfungen untereinander. Auch das Auftreten von sulfatierten oder phosphorylierten Glykanen ist möglich (7). Analytisch herausfordernde Aspekte der Glykosylierung von Proteinen sind zwei Phänomene, die als Makroheterogenität und als Mikroheterogenität bezeichnet werden. Makroheterogenität beschreibt die flexible Besetzung von Glykosylierungsstellen, was bedeutet dass nicht jede potenziell mögliche Glykosylierungsstelle tatsächlich glykosyliert ist (8). Mikroheterogenität hingegen beschreibt das Auftreten verschiedener Glykoformen an einer spezifischen Glykosylierungsstelle (9). Das Ausmaß dieser hohen Variabilität kann sich je nach Glykosylierungsstelle unterscheiden und ist zudem abhängig von zellulären Kompartimenten, Geweben und Organen, in denen die Glykoproteine exprimiert werden (10, 11). Eine mögliche Erklärung für Mikroheterogenität ist die unterschiedliche Geschwindigkeit, mit der Glykosylierungsreaktionen im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und Golgi-Apparat stattfinden (12). Derzeit bekannte, biologisch relevante Makromoleküle bestehen aus einem limitierten Repertoire aus Monosacchariden mit wenigen Kombinationen aus verschiedenen Verknüpfungen (13).

1.1.2 Struktur und Diversität von *N*-glykosidisch verknüpften Glykanen

N-Glykane haben eine aus zwei GlcNAc und drei Man bestehende Kernstruktur gemein und können in drei unterschiedliche Typen kategorisiert werden: (a) der „high mannose type“ verfügt nur über Mannose-Einheiten, die zur Verlängerung der Kernstruktur vorhanden sind; (b) der „complex type“ besteht aus Antennen, die mit GlcNAc initiiert und mit Gal-Einheiten sowie Sialinsäuren verlängert werden; (c) der „hybrid type“ ist eine Kombination aus dem „high mannose type“ und dem „complex type“ (14). Die drei Arten von *N*-Glykanen sind in Abbildung 2 dargestellt. *N*-Glykosylierung erfolgt an den Aminosäuresequenzen Asn-X-Ser/Thr/Cystein (Cys), wobei X jede Aminosäure außer Prolin sein kann (15, 16).

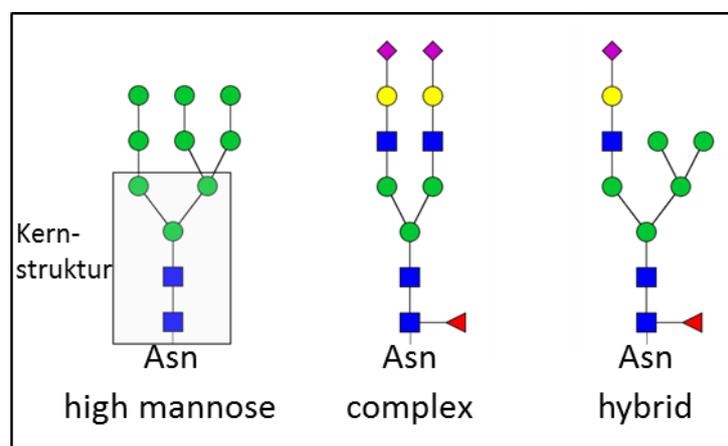


Abbildung 2: Die drei Arten von *N*-Glykanen.

Der „high mannose type“ hat nur Man-Einheiten an die Kernstruktur angeknüpft. Der „complex type“ besteht aus verschiedenen, von GlcNAc begonnenen, antennären Strukturen. Verlängerungen mit Gal-, Fuc-, GlcNAc-, GalNAc- oder Neu5Ac-Einheiten sind möglich. Der „hybrid type“ ist eine Kombination der beiden anderen Glykantypen. Die in der Abbildung gezeigten Monosaccharide wurden mittels folgender Symbole visualisiert: GlcNAc (■), Man (●), Fuc (▲), Gal (●), Neu5Ac (◆).

Die *N*-Glykosylierung von Proteinen ist ein Enzym-gesteuerter Prozess, der vom Genom, von unterschiedlichen Zelltypen und unterschiedlichen Expressionssystem beeinflusst wird (17–19). Die an der Prozessierung von *N*-Glykanen beteiligten Enzyme sind sensitiv gegenüber physiologischen und biochemischen Zuständen der Zelle, in denen entsprechende Glykoproteine prozessiert werden (20). Die Glykosylierung ist generell ein diverser Prozess, weil die zugrundeliegenden Enzymreaktionen hauptsächlich an drei verschiedene Bedingungen geknüpft sind: a) die Zell- und Organ-spezifische Exprimierung entsprechender Enzyme, b) die Verfügbarkeit von aktivierten Nukleotidphosphatzuckern und c) die Verfügbarkeit von Glykan-Vorläufer Molekülen. Die Reihenfolge von bereits stattgefundenen Enzymreaktionen legt hierbei die noch offenen Möglichkeiten weiterer Glykosylierungsmöglichkeiten aufgrund unterschiedlicher Substratspezifitäten der Enzyme fest.

Beispielsweise kann eine Galaktosyltransferase Gal-Einheiten nur an eine bestehende Antenne anknüpfen, wenn GlcNAc das letzte angeknüpfte Monosaccharid ist (21). Es existieren mehrere Glykosyltransferasen für ein und dasselbe Monosaccharid (5, 22). Unterschiedliche Enzymexpression in wiederum unterschiedlichen Organismen resultiert in einer hohen Vielzahl von Glykosylierungsvarianten (23). Dieses Wissen ist besonders wichtig für die Produktion von rekombinanten und therapeutischen Glykoproteinen. Eine Glykosylierung, die ähnlich zu der des plasmatischen Glykoproteins ist, erhöht die Wahrscheinlichkeit für eine vergleichbare Funktion und Halblebenszeit der betreffenden rekombinanten Variante (24). Gängige Zusammensetzungen von Glykanen in verschiedenen Organismen sind in Abbildung 3 gezeigt.

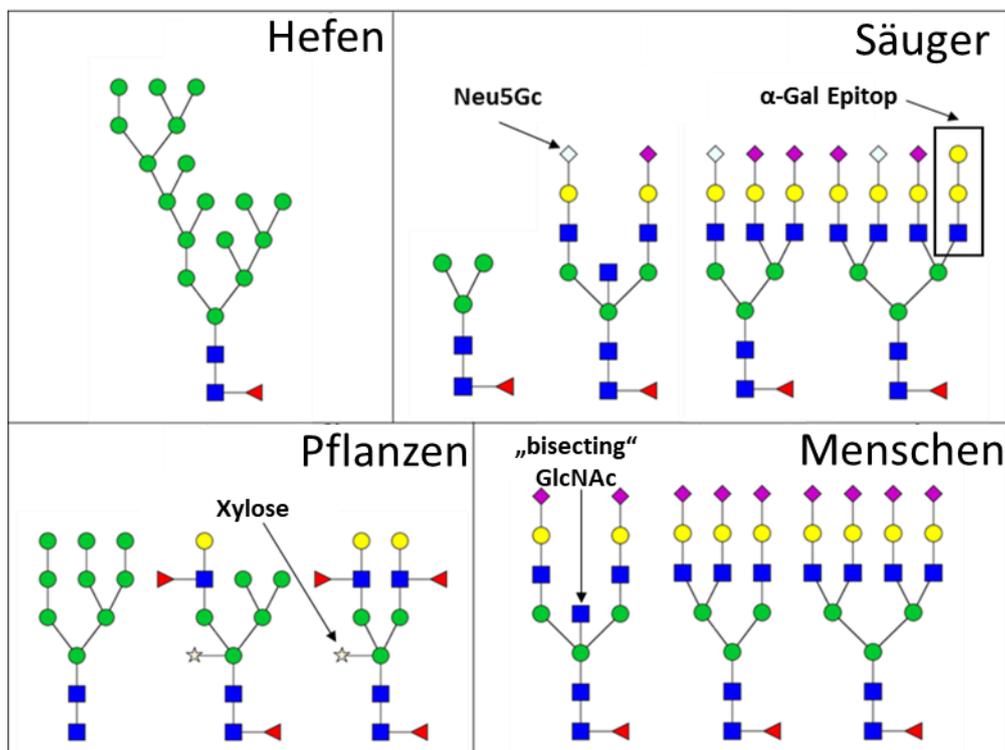


Abbildung 3: Überblick von Glykanstrukturen in unterschiedlichen Expressionssystemen.

Diese exemplarischen Glykanstrukturen kommen in unterschiedlichen Expressionssystemen vor, die für die Produktion von biotherapeutischen Glykoproteinen verwendet werden. Im Gegensatz zu tierischen und pflanzlichen Zellen verloren menschliche Zellen die Fähigkeit, *N*-Glykolyneuraminsäure (Neu5Gc), das α -Gal Epitop und Xylose zu exprimieren. Die Darstellung wurde modifiziert von (23). Die in der Abbildung gezeigten Monosaccharide wurden mittels folgender Symbole visualisiert: GlcNAc (■), Man (●), Fuc (▲), Gal (●), Neu5Ac (◆), Neu5Gc (◇).

Ein Unterschied zwischen Säugern, Pflanzen und Hefen ist die Expressierung von Sialinsäuren. Sialinsäuren sind die *N*- und *O*-Derivate der Neuraminsäure und können in menschlichen und tierischen Zellen exprimiert werden (25). Die Expression von Sialinsäuren in Mollusken, Insekten und Archaeen wurde ebenfalls in der Literatur beschrieben (26). Die gängigsten Derivate von Sialinsäuren sind Neu5Ac und *N*-Glykolyneuraminsäure (Neu5Gc). Normalerweise terminieren Sialinsäuren die Antennen von *N*-Glykanen oder *O*-Glykanen und

werden von Sialyltransferasen angeknüpft. Sialyltransferasen nutzen Cytidin-Monophosphat (CMP)-aktivierte Sialinsäuren als Substrat. Die hohe Diversität der Sialinsäuren basiert auf multiplen Enzymaktivitäten, die während ihrer Synthese auftreten (27).

1.1.3 Biosynthese von *N*-Glykanen in eukaryotischen Zellen

Der Beginn der Biosynthese eukaryotischer *N*-Glykane ist auf der cytoplasmatischen Seite der ER-Membran. Monosaccharide müssen vor ihrer Verwendung für die Synthese von Glykanen aktiviert werden. Diese Aktivierung wird durch das Mitwirken von Monosaccharid-tragenden Nukleotidphosphaten (zum Beispiel UDP-GlcNAc) und phosphorylierten Monosacchariden (zum Beispiel GlcNAc-P) herbeigeführt. Die zugrundeliegenden Reaktionen werden von Kinasen katalysiert, wobei das aktivierte Monosaccharid auch ausgehend von einem zuvor aktivierten Nukleotidzucker synthetisiert werden kann (28).

Die Biosynthese wird mit dem Transfer von phosphoryliertem GlcNAc, ausgehend von Uridindiphosphat(UDP)-GlcNAc, zum Vorläufermolekül Dolicholphosphat initiiert. Der Transfer endet in der Synthese von Dolicholpyrophosphate-GlcNAc, was als Empfänger weiterer Monosaccharide fungiert um das Glykangerüst zu synthetisieren (29). Der Prozess der *N*-Glykosylierung wird mit der sequentiellen Addition von zwei GlcNAc und fünf Man-Einheiten an die Dolicholphosphat-Vorläuferstruktur fortgesetzt (30). Sobald die an Dolicholphosphat gebundene Glykanvorläuferstruktur aus zwei GlcNAc und fünf Man besteht, wird das gesamte Konstrukt mittels Flippasen vom Zytosol in das ER-Lumen transferiert (31). Im Lumen des ER werden weitere sechs Man-Einheiten und drei Glucose-Einheiten an die Glykanstruktur angefügt. Die Monosaccharide gelangen jeweils über eigene Vorläufer-Dolicholphosphat-Moleküle in das Lumen des ER. Der Transfer des am Dolicholphosphat gebundenen Glykan-Vorläufermoleküls an das an einem Ribosom translatierte Proteingerüst wird von der Oligosaccharyltransferase (OST) durchgeführt. Die Phosphatbindung zwischen Dolicholphosphat und GlcNAc wird gespalten und das aus 14 Monosacchariden bestehende Glykan-Vorläufermolekül wird an das Motiv Asn-X-Ser/Thr/Cys am translatierten Protein angeknüpft (32).

Im Anschluss des Transfers vom Glykan-Vorläufermolekül an das Proteingerüst beginnt die durch die Chaperone Calnexin und Calreticulin regulierte Faltung des Proteins (33, 34). Es werden zunächst zwei der drei Glukose-Moleküle nacheinander durch im ER befindliche Glykosidasen abgespalten. Sobald alle Glukose-Moleküle abgespalten wurden, wird durch Interaktionen mit weiteren Proteinen kontrolliert, ob die Faltung erfolgreich ablief oder fehlgeschlagen war. Bei korrekter Faltung des Proteins wird eine einzelne Man-Einheit durch

die im ER befindliche α -Mannosidase abgespalten, bevor der Transfer in das *Cis*-Golgi-Kompartiment stattfindet. Bei einer fehlgeschlagenen Faltung kann entweder erneut ein Glukose-Molekül an das Glykangerüst addiert und der Faltungszyklus neu durchlaufen werden oder das Protein wird zur Degradation in das Zytosol transportiert (35).

Eine generelle Übersicht über die Glykobiogenese von *N*-Glykanen im ER und Golgi-Apparat ist in Abbildung 4 gegeben.

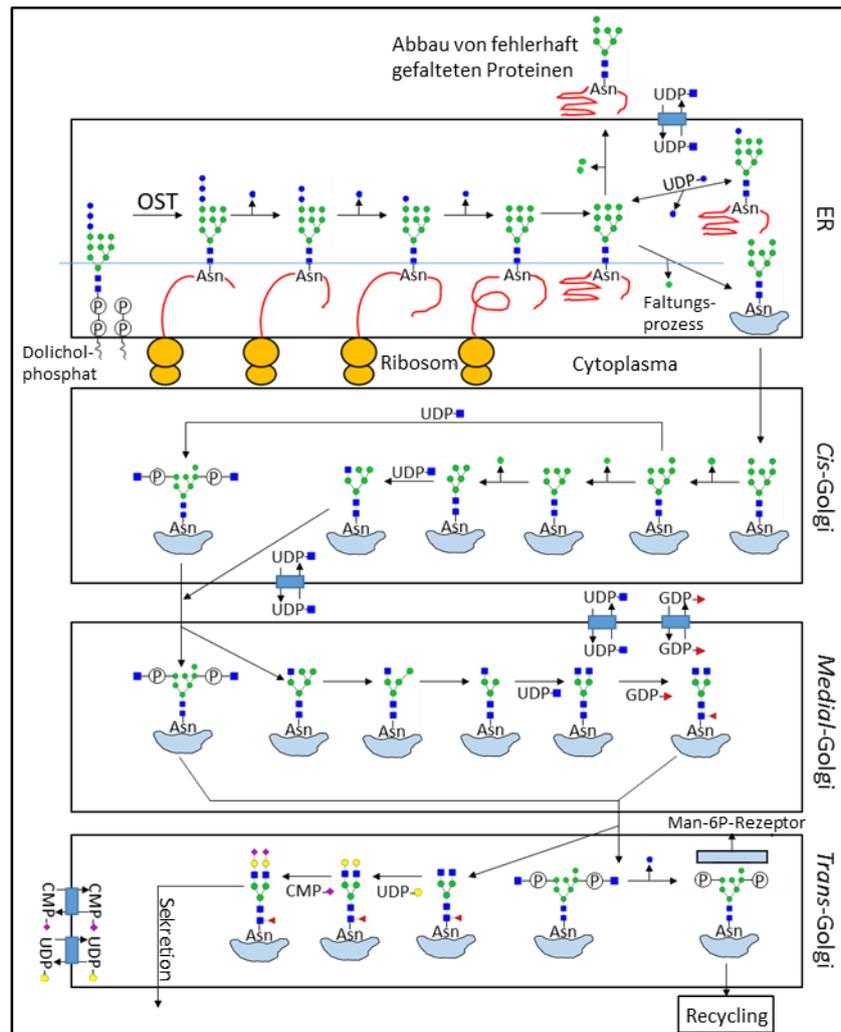


Abbildung 4: Die Glykobiogenese von *N*-Glykanen im ER und Golgi-Apparat.

Die Glykanvorläuferstruktur wird an das Motiv Asn-X-Ser/Thr/Cys am translatierten Protein angeknüpft. Nach der Kontrolle der Faltung wird das Glykan entweder zur Degradation ins Cytoplasma transferiert oder die Glykobiogenese wird im Golgi-Apparat fortgesetzt. Informationen zur Erstellung dieser Abbildung wurden (30) entnommen. Die in der Abbildung gezeigten Monosaccharide wurden mittels folgender Symbole visualisiert: Glukose (●), GlcNAc (■), Man (○), Fuc (▲), Gal (○), Neu5Ac (◆).

Die weitere Prozessierung der am Protein befindlichen *N*-Glykane findet in aufeinanderfolgenden Schritten im *Cis*-Golgi, im *Medial*-Golgi und schließlich im *Trans*-Golgi statt. Im *Cis*-Golgi findet überwiegend die Abspaltung von weiteren zwei Man statt bis $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-Asn}$ entstanden ist (36–38). Im *Medial*-Golgi werden zwei weitere Man durch die α -Mannosidase II abgespalten. Zusätzlich kann eine Addition von Fuc an

GlcNAc-Asn stattfinden. Die Addition von Galaktosen und Sialinsäuren sowie die Ausbildung weiterer Antennen finden im *Trans*-Golgi statt (39). Das fertig prozessierte Glykoprotein wird anschließend mittels vesikulärem Transport zu seinem vorherbestimmten Ort in der Zelle transportiert, insofern es nicht an den Man-6-P-Rezeptor bindet. Dieser Rezeptor erkennt unmodifizierte *N*-Glykane und transferiert sie in Endosomen und Lysosomen zur Degradation (40). Jeder Bestandteil des Golgi-Apparates ist dabei durch das Vorhandensein spezifischer Nukleotidzuckertransporter, Glykosidasen und Glykosyltransferasen charakteristisch für die jeweils stattfindenden Prozessierungsschritte (41–43). Komplexe und hybride *N*-Glykane verfügen zumeist über mit Gal verlängerte Antennen und können sogenannte *N*-Acetyllaktosamin(LacNAc)-Sequenzen (Gal- β -1,4-GlcNAc) bilden. Diese Sequenzen können durch weitere LacNAc-Einheiten verlängert werden (poly-LacNAc). Ähnlich verhält es sich mit der repetitiven Verlängerung durch Sialinsäuren, wodurch Polysialinsäure-Motive entstehen. Diese Motive sind im Speziellen für die Entwicklung des Nervensystems verantwortlich (44, 45).

1.1.4 Kurze Einführung in *O*-Glykane

Die *O*-Glykosylierung ist eine kovalente Modifikation der Aminosäuren Ser oder Thr auf Glykoproteinen. Im Gegensatz zu *N*-Glykanen beginnt die *O*-Glykosylierung nicht mit dem Transfer eines an Dolicholphosphat gebundenen Oligosaccharides, sondern mit der direkten Addition eines Nukleotidphosphat-aktivierten Monosaccharids an die Polypeptidkette. Dafür gehen das Protein, das aktivierte Monosaccharid und eine Polypeptid-*N*-Glykosyltransferase einen ternären Komplex ein. Die Addition von Monosacchariden beginnt im hinteren ER und erstreckt sich mit der Verlängerung der Glykanketten bis zum Golgi-Apparat über das ER-Golgi-Kompartiment. Der Beginn der *O*-Glykosylierung richtet sich hierbei nach der Verfügbarkeit der hauptsächlich an der Membran des Golgi-Apparates lokalisierten Glykosyltransferasen (46). Die im Zytosol lokalisierten *O*-GlcNAc-Transferasen stellen hierbei eine Ausnahme dar (47). Jedes Monosaccharid verfügt über eine eigene, spezifische Familie von Glykosyltransferasen, die in verschiedenen Geweben jeweils unterschiedlich exprimiert werden und eine unterschiedliche Substratspezifität aufweisen (48). Die Vorhersage von *O*-glykosylierten Thr oder Ser gestaltet sich als schwierig, weil keine strukturellen Anzeichen oder Konsensussequenzen existieren. Die unmittelbare Aminosäureumgebung der *O*-Glykosylierungsstelle kann Aufschluss über die Wahrscheinlichkeit einer *O*-Glykosylierung geben, was durch den Vergleich mehrerer

Sequenzen gezeigt werden konnte (49). Es sind bisher acht unterschiedliche Kernstrukturen von *O*-Glykanen bekannt (50).

1.1.5 Biologische Funktionen von Glykanen

Die biologischen Funktionen von Glykanen umfassen alle Prozesse und Bereiche, die verantwortlich für Wachstum, Überleben, Strukturgebung, Schutz und Entwicklung eines Organismus sind (51–54). So führt beispielsweise eine Veränderung der Glykosylierung des vaskulären, endothelialen Wachstumsfaktors zu einer verminderten Expressionsrate und einer geringeren Sekretionseffizienz (55). Veränderungen in der Glykosylierung von Immunoglobulinen (Igs) resultieren in einer Vielzahl verschiedener Effekte hinsichtlich den Fc-Region-vermittelten Effektorfunktionen, beispielsweise veränderte Affinitäten gegenüber Rezeptoren oder verminderte Aktivitäten der antikörperabhängigen zellvermittelten Toxizität. (56, 57). Diese Beispiele implizieren, dass die auf den Glykoproteinen befindlichen Glykane wichtige Funktionen ausüben, da eine Veränderung des Glykanmusters gravierende Folgen haben kann. Proteoglykane und Glykosaminoglykane bilden eine physische Barriere in Form der Glykokalix, was durch eine Analyse von endothelialen Glykanstrukturen ermittelt werden konnte (58). Eine Veränderung der Glykosylierung von α_1 -Antitrypsin führte zu inkorrekt gefalteter und aggregierter Proteine (59), wodurch gezeigt werden konnte, dass die Glykosylierung großen Einfluss auf den Faltungsprozess von Proteinen, ihre Löslichkeit und Konformation ausübt. Dies konnte zusätzlich durch Glykananalytiken und funktionelle Assays mit β -Laktoglobulin und Dextran bestätigt werden (60, 61).

Biologische Funktionen von Glykanen können generell in zwei verschiedene Kategorien eingeteilt werden: a) modulatorisch-strukturelle Funktionen und b) die spezifische Erkennung von Glykanen durch Glykan-bindende Proteine. Zu Glykan-bindenden Proteinen gehören Lektine, Antikörper, Adhäsionsmoleküle oder Glykosaminoglykan-bindende Proteine (62, 63). Als Glykan-bindende Proteine haben Lektine in der Glykobiologie große Wichtigkeit erlangt und werden beispielsweise als Affinitätsmatrizes (64) oder zur Vermittlung zellulärer Erkennungsmechanismen (65) eingesetzt.

Glykan-bindende Proteine können weiter in intrinsische Proteine, die zwischen körpereigenen und körperfremden Glykanen unterscheiden und in extrinsische Proteine, die Glykane anderer Zellen oder von anderen Organismen erkennen, unterteilt werden (51, 66). Kollektine sind ein Beispiel für intrinsische Glykan-bindende Proteine. Sie stellen einen alternativen Weg zur Aktivierung des Komplementsystems dar, wie am Beispiel des Mannose-bindenden Lektins gezeigt wurde (67). Die extrinsische Erkennung von Glykanen durch Glykan-bindende

Proteine basiert auf Zell-Zell Interaktionen durch Integrine und Cadherine, wie in einschlägiger Fachliteratur beschrieben wird (68–70). Glykane auf Glykoproteinen der extrazellulären Matrix ermöglichen außerdem Interaktionen mit anderen Organismen, wie es bei Wirt-Parasit-Beziehungen am Beispiel der Schistosomen gezeigt wurde (71, 72). Ein weiteres Beispiel für die Wichtigkeit der Glykosylierung wurde anhand der Zelladhäsionsregulierenden Funktion von Polysialinsäuren am Beispiel des neuronalen Zell-Adhäsionsmoleküls gezeigt (73). Im Allgemeinen sind die Funktionen von Sialinsäuren sehr divers. Sie stabilisieren Membranen, was durch eine Veränderung des Membranpotenzials vom Herzmuskel festgestellt werden konnte (74) und sie modulieren umweltbedingte Interaktionen (74, 75). Terminale Sialinsäuren können von Virus-Haemagglutinin-Rezeptoren erkannt werden, was den ersten Schritt einer viralen Infektion darstellt (76). Sialinsäuren stabilisieren die Bindung zu geladenen Proteinen aufgrund ihrer negativen Ladung. Sie dienen als Protektanten gegen proteolytischen oder Glykosidase-vermittelten Abbau und verlängern die Lebenszeit ihrer Trägerproteine, was am Beispiel der Verlängerung der Halblebenszeit von rekombinant hergestelltem Erythropoietin gezeigt werden konnte (77). Der in Hepatocyten lokalisierte Asialoglycoproteinrezeptor erkennt und bindet endständige Oligosaccharide ohne Sialinsäuren, beispielsweise Gal oder GalNAc, und entfernt entsprechende Glykoproteine aus der Blutzirkulation. Hinsichtlich der pharmakokinetischen und immunologischen Eigenschaften von therapeutischen Glykoproteinen stellt die Sialylierung daher einen wichtigen Parameter dar (78).

1.1.6 Immunogene Glykanepitope

Das Auftreten von für den eigenen Organismus fremden Glykanstrukturen resultiert in gegen dieses fremde Glykan gerichtete Immunantworten. Dieses Kapitel soll die gängigsten und bekanntesten, immunogenen Glykanepitope kurz zusammenfassend darstellen.

Die hier zunächst erwähnten, immunogenen Glykanepitope sind α -1,3-verknüpfte Fuc und β -1,2-verknüpfte Xylose. α -1,3-Fuc ist an das unterste GlcNAc der *N*-Glykan-Kernstruktur gebunden und kommt sowohl in Insekten, als auch in Pflanzen vor. Verknüpfte Xylose (β -1,2) befindet sich an der ersten Man-Einheit an *N*-Glykan-Kernstrukturen in Pflanzen (79–81). Diese beiden Glykanstrukturen sind mit IgE-vermittelten Immunantworten assoziiert, was durch eine Analyse von klinischen Serumproben und normalen Serumproben von Menschen ermittelt werden konnte (82, 83).

Bei dem nächsten vorgestellten, immunogenen Glykanepitop handelt es sich um Neu5Gc. Dieses Glykanepitop weist eine hohe Ähnlichkeit zu Neu5Ac auf. Es unterscheidet sich von

Neu5Ac nur durch ein einziges Sauerstoffatom (84). Neu5Gc wird aufgrund einer Mutation der CMP-*N*-Acetylneuraminsäurehydroxylase (85) nicht im Menschen synthetisiert, kann aber durch den Konsum von Fleisch oder Milch eingebaut werden (86). Es wird vermutet, dass Neu5Gc-tragende Glykoproteine, aufgenommen durch Fleisch- oder Milchkonsum, mittels Makropinozytose in die Zellen gelangen und durch den lysosomalen Sialinsäuretransporter ins Zytosol transferiert werden. Dies war das Ergebnis verschiedener Experimente mit humanen Epithelzellen, bei denen die selektive Aufnahme von Neu5Gc unter verschiedenen Bedingungen getestet wurde (87). Obwohl das Auftreten von Neu5Gc in Menschen bereits bekannt war, wurde die Präsentation dieses immunogenen Glykanepitops vor dem Immunsystem nicht als gefährlich eingestuft (88). Heutzutage ist bekannt, dass alle Menschen Antikörper gegen Neu5Gc besitzen. Ihre Existenz wurde durch durchflusszytometrische Messungen und Enzym-gekoppelte-Immunadsorbtionstests (ELISAs) belegt (89). Da Hamsterzellen (CHO), die noch immer häufig für die rekombinante Produktion von therapeutischen Glykoproteinen verwendet werden (90), Neu5Gc in Glykane einbauen können, stellt dieses immunogene Glykanepitop ein großes immunogenes Risiko dar, wie bereits in mehreren Artikeln dargelegt wurde (91–93).

Ebenso ist das α -Gal Epitop ein immunogenes Glykanantigen. Es besteht aus dem Trisaccharid GlcNAc- β -1,4-Gal- α -1,3-Gal (94) und befindet sich auf komplexen *N*-Glykanen auf Proteinen oder Lipiden von Nicht-Primaten (95, 96). Das α -Gal Epitop stellt das Hauptthema dieser Arbeit dar und wird in Kapitel 1.4 näher vorgestellt.

1.1.7 Analytische Werkzeuge zur Kontrolle von therapeutischen Glykoproteinen

Die Diversität von Glykanen hinsichtlich ihrer Komposition, Orientierung, Konformation und struktureller Variabilität machte es notwendig, analytische Werkzeuge zu entwickeln, mit denen eine Überwachung, beziehungsweise eine Überprüfung der Glykosylierung von therapeutischen Glykoproteinen möglich wird. Mögliche Folgen bei einer Änderung des Protein-spezifischen Glykosylierungsmusters wurden bereits in 1.1.5 erläutert und müssen bei der Produktion therapeutischer Glykoproteine vermieden werden. Abbildung 5 zeigt eine Übersicht genereller Methoden aus der Glykananalytik, die zur Analyse der Glykosylierung von Proteinen eingesetzt werden. Diese Methodenübersicht wurde anhand eines aktuellen Review-Artikels zusammengestellt (97), der sich mit der Entwicklung von Methoden der Glykananalytik auseinandersetzt und verschiedene Anwendungsbereiche aufzeigt.

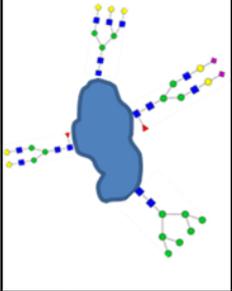
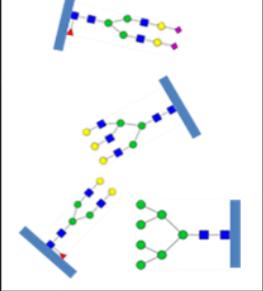
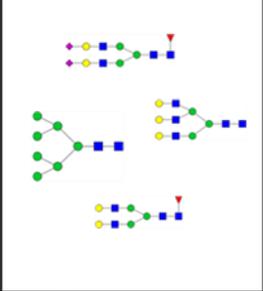
Analyisierte Komponenten	Struktur	Methoden	Information
Intaktes Glykoprotein Proteolyse Enzymatische oder hydrolytische Abspaltung		<ul style="list-style-type: none"> Flüssigchromatographie Massenspektrometrie Gelelektrophorese, SDS-PAGE Isoelektrische Fokussierung Bindungsassays 	Glykanstrukturen Glykan-Heterogenität Glykoformen Sialylierung
Glykopeptide Enzymatisch/hydrolytische Abspaltung		<ul style="list-style-type: none"> Flüssigchromatographie Massenspektrometrie Bindungsassays 	Glykanstrukturen Glykan-Heterogenität Glykoformen Sialylierung Glykosylierungsstellen
Freigesetzte N-Glykane Hydrolytische Freisetzung		<ul style="list-style-type: none"> Flüssigchromatographie Massenspektrometrie Bindungsassays HPAEC-PAD 	Glykanstrukturen Glykan-Heterogenität Sialylierung Glykansequenz Glykanverknüpfungen Glykoformen
Freigesetzte Monosaccharide		<ul style="list-style-type: none"> Flüssigchromatographie HPAEC-PAD 	Art und Menge von Monosacchariden

Abbildung 5: Methoden zur Analyse der Glykosylierung von Glykoproteinen.

Therapeutische Glykoproteine können sowohl als intakte Glykoproteine oder in Form von Glykopeptiden zur Glykanalytik eingesetzt werden. Ihre N-Glykane können enzymatisch oder chemisch freigesetzt werden und separat analysiert werden. Alternativ können freigesetzte N-Glykane durch saure Hydrolyse in einzelne Monosaccharide zerlegt und anschließend mit verschiedenen Methoden analysiert werden. Informationen zur Erstellung der Abbildung wurden von (97) und (98) entnommen. Die in der Abbildung gezeigten Monosaccharide wurden mittels folgender Symbole visualisiert: GlcNAc (■), Man (●), Fuc (▲), Gal (●), Neu5Ac (◆).

Die ersten Schritte einer *N*-Glykan-Analyse beinhalten üblicherweise die enzymatische Abspaltung von *N*-Glykanen vom zu analysierenden Glykoprotein mittels Peptide-*N*-glycosidase F (PNGase F). Dies ist ein Enzym, das die Glykankette zwischen dem beginnenden GlcNAc und der auf der Polypeptidkette befindlichen Aminosäure Asn schneidet. Die Funktionsweise der PNGase F wurde bereits anhand der Deglykosylierung von Asn-verknüpften Glykanen belegt (99). Freigesetzte *N*-Glykane können mit Fluorophoren markiert werden, was ihre Fluoreszenzdetektion nach flüssig-chromatographischer Trennmethode wie der hydrophilen Interaktionschromatographie erlaubt. Chromatographie-Systeme können zusätzlich direkt mit Massenspektrometern gekoppelt werden, um alternativ zur Fluoreszenz auch das Masse-Ladungs-Verhältnis von Glykanstrukturen messen zu können. Diese Art der gekoppelten Detektion wurde bereits in vielen Arbeitsgruppen zur Glykananalyse eingesetzt (98, 100–107). Die angesprochenen Methoden liefern strukturelle Informationen über die Zusammensetzung von *N*-Glykanen hinsichtlich der Glykansequenzierung, der Ermittlung von Glykoformen und der Sialylierung.

Die Markierung freigesetzter *N*-Glykane ist nicht zwingend erforderlich. Unmarkierte Glykane können beispielsweise mittels Hochleistungs-Anionenaustauscher-Chromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) oder mittels Massenspektrometrie detektiert werden. HPAEC-PAD wurde beispielsweise zur Detektion unmarkierter Oligosaccharide der Hyaluronsäure angewendet (108). Arbeitsabläufe zur Messung von unmarkierten *N*- und *O*-Glykanen wurden mittels Massenspektrometrie untersucht (109).

Für intakte Glykoproteine oder Glykopeptide bieten sich neben massenspektrometrischen Verfahren auch Bindungsassays mit Lektinen oder isoelektrische Fokussierung (IEF) an. So wurden bereits die Bindung von therapeutischen Glykoproteinen an verschiedene Lektine untersucht (110) und *N*-Glykananalytiken von im Gel befindlichen, isoelektrisch fokussierten Glykoproteinen durchgeführt (111). Die Umkehrphasenchromatographie hat sich für die Analyse von Monosacchariden als vorteilhaft erwiesen, wie es am Beispiel einer Monosaccharidanalytik von Oligosacchariden aus Pflanzen gezeigt werden konnte (112).

Die Freisetzung von *O*-Glykanen von Glykoproteinen erfolgt üblicherweise mittels β -Eliminierung (113) oder Hydrazinolyse (114), beziehungsweise saurer Hydrolyse (97). Abgesehen von diesen Methoden wurde gezeigt, dass eine selektive Freisetzung von *O*-Glykanen enzymatisch möglich ist (115). Freigesetzte *O*-Glykane werden zumeist mit hydrophiler Interaktionschromatographie und via Massenspektrometrie-gekoppelter Flüssigchromatographie analysiert (116).

Diese Methoden erlauben hauptsächlich Aussagen über die Existenz verschiedener Glykoformen, der zugrunde liegenden Glykansequenzen und Informationen über die Besetzung von Glykosylierungsstellen. Komplexe Glykosylierungsprofile therapeutischer Produkte erfordern eine simultane Weiterentwicklung entsprechender analytischer Methoden. Ein einfaches Werkzeug zur Detektion wichtiger Glykanstrukturen, beispielsweise von immunogenen Glykanstrukturen, wäre sehr vorteilhaft und würde sowohl den Arbeitsaufwand senken, als auch eine zeitliche Ersparnis mit sich bringen.

1.2 Einführung in Affinitätsanalysen mittels Oberflächenplasmonresonanz

Die Dissoziationskonstante K_D ist eine Messgröße zur Beschreibung der Bindungsaffinität zwischen zwei Interaktionspartnern. In dieser Arbeit werden Dissoziationskonstanten mittels Oberflächenplasmonresonanz (SPR) unter Verwendung sogenannter SPR-Sensoren bestimmt. Üblicherweise bestehen SPR-Sensor-Chips aus Glas und sind zusätzlich mit einem chemisch inerten Metall, zumeist Gold, beschichtet. Die Goldschicht ist weiterhin beschichtet mit einer Immobilisierungsmatrix, die aus unterschiedlichen, chemischen oder organischen Verbindungen bestehen kann und Bindungsstellen zur Immobilisierung von Molekülen bereitstellt. Je nach Sensoroberfläche wird zwischen kovalenten und ionischen Bindungen unterschieden. Auf dem SPR-Sensor immobilisierte Moleküle werden als Liganden bezeichnet (117). Der Sensor befindet sich in einem Flusskanal, der mit einem Injektionssystem verbunden ist. Bei der Inbetriebnahme wird der SPR-Sensor kontinuierlich von einem Pufferstrom überströmt. Über die gezielte Injektion von Interaktionspartnern, dem Analyten, kann die Interaktion zwischen den Analyten im Pufferstrom und den auf dem Sensor-Chip immobilisierten Liganden analysiert werden. Das Messprinzip beruht auf der Messung der Winkeländerung von auf die Unterseite des Sensors projizierten Lichtwellen während des Auftretens einer Totalreflexion. Die Winkeländerung und eine damit einhergehende Änderung des Brechungsindizes wird hierbei über eine Massenänderung von Molekülen auf dem Sensor, entweder durch Bildung oder Ablösung von Bindungen zwischen Analyt und Ligand, herbeigeführt (118). Die Dissoziationskonstante K_D beschreibt das Verhältnis zwischen frei vorliegenden Analyten und Liganden im Vergleich zu vorliegenden Analyt-Ligand-Komplexen. Demzufolge ist die Bindung zwischen Analyt und Ligand affiner je kleiner die Dissoziationskonstante ist. Der Zeitabschnitt, in dem Analyten aktiv ins System injiziert werden und an immobilisierte Liganden binden, wird als Assoziationsphase bezeichnet. Die detektierten Winkeländerungen werden als „Response Units“ (RU) bezeichnet und verhalten sich proportional zur eingesetzten Analytkonzentration. Die

Dissoziationsphase beginnt mit der Detektion sich lösender Analyten vom Liganden durch den konstanten Pufferfluss nach vollständiger Injektion des Analyten. Je größer das Gefälle der Dissoziationskurve ist, desto kleiner ist die Affinität des Analyten zum Liganden. Bei einer großen Dissoziationskonstanten ist der Anteil von sich aus der Bindung lösenden Analyten ebenfalls groß und es handelt sich um eine schwache Bindung. Insofern die Dissoziationskonstante der beobachteten Interaktion klein ist, so ist auch der Anteil der sich in gleichen Zeitabständen von Liganden lösenden Analyten gering, es handelt sich um eine starke Bindung zwischen Analyt und Ligand. Die kombinierte Aufzeichnung von Assoziations- und Dissoziationsphase einer bestimmten Interaktion wird als Sensogramm bezeichnet (119).

1.3 Struktur und Funktion von Immunoglobulinen

Igs verfügen über zwei schwere und zwei leichte Ketten (120). Jede Kette enthält eine aminoterminal, variable Domäne und eine oder mehrere Carboxylgruppen-terminals, konstante Domäne, die jeweils miteinander durch Disulfidbrückenbindungen verbunden sind (121). Zwei schwere und zwei leichte Ketten bilden zwei Antigen-bindende (Fab) Fragmente und ein kristallisierbares (Fc) Fragment, die über die sogenannte Hinge-Region miteinander verbunden sind (122). Ein kompletter Antikörper, bestehend aus zwei Fab- und einem Fc-Fragment, verfügt über eine Masse von etwa 150 kDa (123). Die generelle Struktur eines Antikörpers ist in Abbildung 6 gezeigt.

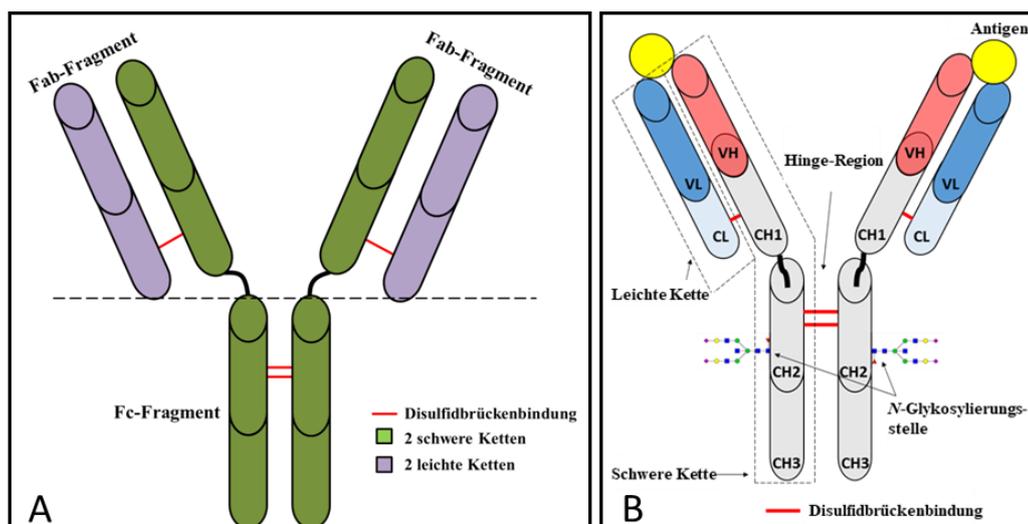


Abbildung 6: Exemplarische Struktur eines Antikörpers.

(A) Ein Antikörper besteht aus zwei schweren (H) und zwei leichten (L) Ketten. Die Fab-Fragmente sind über die Hinge-Region mit dem Fc-Fragment verbunden. (B) Die Ketten eines Antikörpers bestehen aus variablen (V) und konstanten (C) Domänen. Die „complementarity determining regions“ (CDRs) bilden die Antigen-Bindungsstelle auf den Fab-Regionen. Neben anderen möglichen N-Glykosylierungsstellen besitzen Antikörper bei Asn²⁹⁷ eine N-Glykosylierungsstelle. Informationen zur Erstellung von Abbildung A wurden (124) entnommen, Abbildung B wurde modifiziert auf der Grundlage von (124).

Die Fab-Domänen tragen zur Antigen-Spezifität des Antikörpers bei und die Fc-Domäne stellt die strukturelle Stabilität sicher (125). Die variablen Domänen enthalten die sogenannten „complementarity determining regions (CDRs)“. Diese Regionen bilden die Antigenbindungsstelle aus, sind verantwortlich für deren Erkennung und unterscheiden sich zwischen jedem Antikörper. Interaktionen zwischen Igs und Antigenen finden zwischen der Antigenbindungsstelle auf dem Ig (Paratop) und der Bindungsstelle auf dem Antigen (Epitop) statt (125, 126). IgG ist eine der meist vorkommenden Proteinspezies in humanem Serum und es stellt die Hauptklasse der fünf Ig-Klassen dar. Neben IgG existieren die Ig-Klassen IgM, IgD, IgA und IgE. Die unterschiedlichen Ig-Klassen unterscheiden sich hinsichtlich der Struktur ihrer schweren Ketten und den von ihnen vermittelten Effektorfunktionen untereinander (126). IgG kann weiter in vier Subklassen unterteilt werden: IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 (siehe Abbildung 7). Obwohl sie sich in ihrer Primärsequenz sehr ähneln, ist jede Subklasse einzigartig hinsichtlich Antigenbindung, Komplementaktivierung, der Bildung von Immunkomplexen, Effektor-Zellen-Aktivierung und Halblebenszeit, wie es in einem aktuellen Artikel über die Ig-spezifischen Effektorfunktionen beschrieben wurde (127).

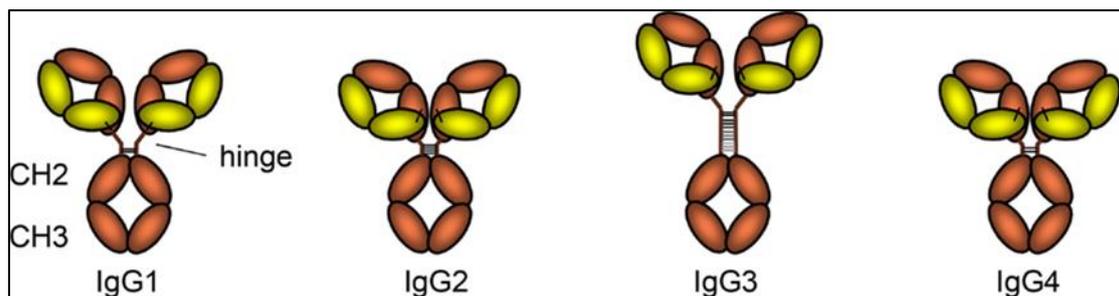


Abbildung 7: Exemplarische Strukturen der vier unterschiedlichen IgG-Subklassen.

IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 sind die vier verschiedenen Subklassen von IgG. Sie unterscheiden sich hinsichtlich der Länge ihrer Hinge-Region und der Anzahl vorhandener Disulfidbrückenbindungen zwischen den schweren Ketten; Darstellung mit Erlaubnis von (128).

IgG ist die häufigste Ig-Klasse im Körper mit der längsten Halblebenszeit im Serum von allen Ig-Isotypen (129). Die variablen Regionen der schweren Kette unterscheiden sich zwischen verschiedenen Antikörpern bezüglich ihrer Struktur und Funktionalität, was hohe Flexibilität und eine breit gefächerte Bindungsaffinität zu antigenen Strukturen ermöglicht (130). Die Zusammenhänge zwischen verschiedenen IgG-Subklassen und vermittelten Effektorfunktionen sind nicht komplett verstanden, weshalb IgG-Subklassen-spezifische Informationen über Immunantworten und Bindungseigenschaften mit Vorsicht zu bewerten sind. Eine erhöhte Produktion von IgG1 ist zumeist das Resultat einer klassischen, adaptiven Immunantwort (131), wohingegen die IgG2- und IgG4-Produktion hauptsächlich durch Polysaccharid-Antigene induziert wird (132, 133).

Die Produktion von IgE-Antikörpern ist mit allergischen Reaktionen assoziiert. IgE wird von Fcε-Rezeptoren auf Mastzellen, Langerhans-Zellen, Basophilen und Eosinophilen gebunden. Die Hauptaufgabe von IgE ist hierbei die Erkennung von Allergenen und die dadurch initiierte Aktivierung von Mastzellen. Aktivierte Mastzellen sekretieren Histamine und Zytokine, was wiederum zu einer erhöhten Produktion von IgE führt. Diese Immunantwort äußert sich in einer allergischen Reaktion, die unbehandelt im schlimmsten Falle zum anaphylaktischen Schock führen kann. Diese Informationen stammen aus Artikeln, die sich mit der Entstehung von Allergien und den prinzipiellen Abläufen allergischer Reaktionen beschäftigen (134, 135).

Wie bereits in 1.1.5 beschrieben wurde, sind Igs in der Regel glykosyliert. Antikörper können sowohl auf ihren Fab-, als auch auf den Fc-Regionen Glykane tragen. Die Antikörperfunktion kann dadurch maßgeblich beeinflusst werden, was am Beispiel verschiedener Glykosylierungsvarianten hinsichtlich Rezeptoraffinität und der antikörpervermittelten Zellzytotoxizität gezeigt wurde (136–138). Durch die Analyse verschiedener Glykosylierungsvarianten konnte gezeigt werden, dass eine Fukosylierung an der *N*-Glykan-Kernstruktur die Aktivität der antikörpervermittelten Zellzytotoxizität vermindert (139). Obwohl die schwere Kette nur über eine *N*-Glykosylierungsstelle verfügt, sind bis zu 32 verschiedene Glykoformen in der Literatur beschrieben (140).

1.4 Das α -Gal Epitop und die Produktion von anti-Gal Antikörpern

Wie bereits ausführlich beschrieben, kann die Glykosylierung von Proteinen multiple Effekte auf die Eigenschaften des Proteins ausüben. In diesem Kapitel wird eine immunogene Glykanstruktur vorgestellt, die das Hauptthema dieser Arbeit darstellt – das α -Gal Epitop (siehe Abbildung 8).

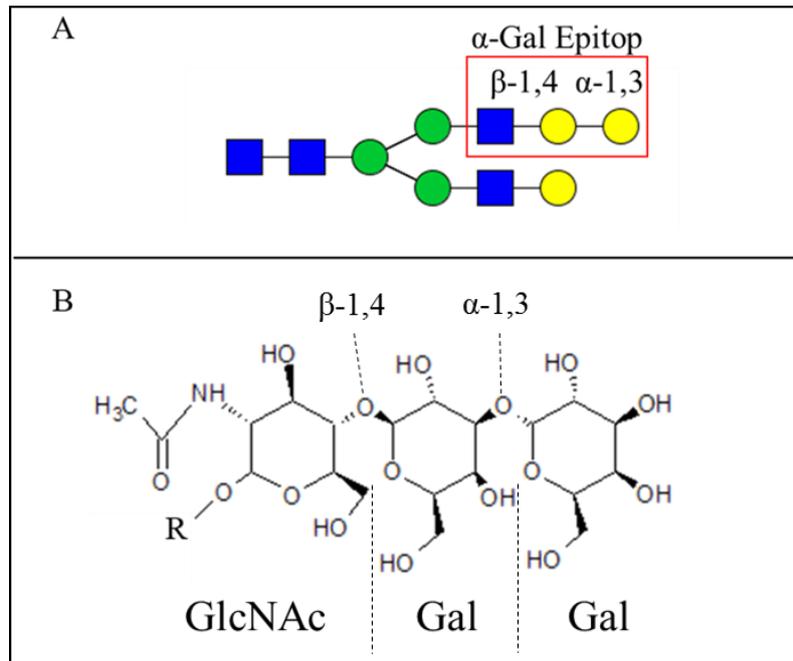


Abbildung 8: Darstellung des α -Gal Epitops als Teil eines komplexen *N*-Glykans.

(A) Das α -Gal Epitop ist ein Trisaccharid bestehend aus GlcNAc und zwei Gal-Einheiten, wobei die terminale Gal-Einheit mit der mittleren Gal-Einheit α -1,3-verknüpft vorliegt. (B) Chemische Formel des α -Gal Epitops. Das „R“ symbolisiert den verbleibenden Rest des in A) gezeigten *N*-Glykans. Die in der Abbildung gezeigten Monosaccharide wurden mittels folgender Symbole visualisiert: GlcNAc (■), Man (●), Fuc (▲), Gal (●).

Das α -Gal Epitop besteht aus dem Trisaccharid GlcNAc- β -1,4-Gal- α -1,3-Gal (94) und wurde ursprünglich von Karl Landsteiner im Jahre 1935 entdeckt (141). Es ist auf komplexen *N*-Glykanen auf Proteinen oder Lipiden von Nicht-Primaten wie Neuweltaffen, Schweinen und Kaninchen lokalisiert (95). Das α -Gal Epitop zeichnet sich durch eine hohe Ähnlichkeit zum B-Antigen des ABO-Blutgruppensystems aus. Der einzige Unterschied beider Glykanepitope ist eine zusätzliche Fukosylierung des B-Antigens an der mittleren Gal-Einheit (95, 96). Primaten, zum Beispiel Menschen, Altweltaffen oder Menschenaffen, können das α -Gal Epitop aufgrund der evolutionären Inaktivierung der α -1,3-Galaktosyltransferase (α -1,3-GT) nicht synthetisieren. Die Inaktivierung der α -1,3-GT wurde durch mehrere, Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Sequenzvergleiche verschiedener Spezies nachvollzogen (142, 143). Das evolutionäre Ereignis, das zur Inaktivierung des Enzyms führte, könnte durch selektiven Druck von Bakterien oder Viren auf Primaten in eurasisch-afrikanischen Gebieten herbeigeführt worden sein. Die Inaktivierung des Enzyms resultierte in der Produktion von

anti-Gal Antikörpern als Schutzmechanismus gegen α -Gal-tragende Pathogene. Dieser Schutzmechanismus ist in der Literatur bereits beschrieben worden und wird durch die bereits genannten DNS-Sequenzvergleiche unterstützt (142, 144). Dies hatte zur Folge, dass Individuen mit Blutgruppe B aufgrund ihrer Selbsttoleranz geringere Titer an anti-Gal Antikörpern produzieren. Dadurch weisen Menschen mit Blutgruppe B höhere Anfälligkeiten für α -Gal-tragende Pathogene, wie beispielsweise den Malariaerreger, auf (145). Die Häufigkeit des Auftretens von Malaria korreliert mit dem Vorliegen von Blutgruppe B, was sich vor allem in Afrika und Asien zeigt, wie in einer epidemiologischen Studie von Cabezas-Cruz *et al.* beschrieben wurde (146). Andererseits wurde aufgrund eben bereits angesprochener Selbsttoleranz bereits postuliert, dass α -Gal-Epitope vom Immunsystem nicht als fremd eingestuft, sondern eher ignoriert werden würden, wie es bei der protektiven Wirkung des B-Antigens bei der Allergie gegen rotes Fleisch der Fall ist (147). Dies steht im Gegensatz zu höheren Anfälligkeiten gegenüber des Malariaerregers aufgrund geringeren anti-Gal Antikörpertitern.

Die α -1,3-GT konkurriert mit Sialyl- und Fukosyltransferasen um das Glykan-Vorläufermolekül, welches als Konsequenz entweder fukosyliert, sialyliert oder α -galaktosyliert sein kann. Dies wurde bei präparativen Versuchen zu Xenotransplantationen nach dem Ausknocken entsprechender Gene beobachtet (148). Die relative Menge von anti-Gal Antikörpern in humanem Serum entspricht bis zu 1% und wurde mittels verschiedener ELISA-Methoden quantifiziert (149–152). Es konnte mittels Western Blot-Versuchen gezeigt werden, dass anti-Gal Antikörper an Lipopolysaccharide von Darmbakterien binden (153). Die kontinuierliche Stimulierung des Immunsystems durch α -Gal-tragende Bakterien der Darmflora hat zur natürlichen Produktion des anti-Gal Antikörpers geführt. Die Induktion der anti-Gal Produktion konnte bereits an einem anderen Beispiel gezeigt werden: Bakterien der Darmflora zeigten eine protektive Immunantwort gegenüber dem Malariaerreger, die in der Produktion von anti-Gal Antikörpern resultierte. Die Existenz von α -Gal-Strukturen auf dem Malariaerreger wurde bereits mittels Immunofluoreszenz nachgewiesen (154), wodurch eine therapeutische Verwendung des anti-Gal Antikörpers als Impfstoff denkbar wäre. Die notwendige Charakterisierung des Antikörpers im Tiermodell, beziehungsweise eine Charakterisierung seiner therapeutischen Wirkung sind bisher nicht erfolgt.

1.4.1 Geschichtliche Fakten zum α -Gal Epitop

Die anti-Gal Antikörper und das α -Gal Epitop gerieten zum ersten Mal vor 18 Jahren in den Fokus der Aufmerksamkeit. Zu dieser Zeit litten viele Menschen an IgE-vermittelten Abstoßungsreaktionen gegenüber dem therapeutischen Antikörper Cetuximab, was durch entsprechende Patientenberichte belegt werden kann (155). ELISA-Versuche und massenspektrometrische Analysen zeigten, dass die IgE-Antikörper der Patienten eine hohe Spezifität für Oligosaccharidstrukturen auf den Fab-Regionen von Cetuximab aufwiesen (156). Diese Strukturen wurden schließlich als α -Gal-Strukturen identifiziert (155–157).

Seit dem Jahr 2000 wurde von zahlreichen Fälle der sogenannten “red meat allergy” berichtet (158–163). Jede allergische Reaktion in allen Fallberichten wurde wahrscheinlich durch einen Zeckenbiss, zum Beispiel von *Amblyomma americanum*, oder auch “Lone Star“ Zecke genannt, ausgelöst. Diese Zecke kann große Distanzen überwinden, indem sie Hirsche als Wirt-Organismen nutzt. Der Lebenszyklus dieser Zecke und ihre vermeintliche Verbindung zu Cetuximab und der Allergie gegen rotes Fleisch wurden bereits in mehreren Artikeln und Berichten dargelegt (164–166) (Abbildung 9). Die geographischen Regionen, in denen von der Fleischallergie und von Abstoßungsreaktionen gegenüber Cetuximab berichtet wurden, überlappen mit den Regionen, in denen das “Rocky Mountain spotted fever” am häufigsten vertreten ist. Dies ist der Name der Krankheit, die üblicherweise durch einen Biss der “Lone Star“ Zecke ausbricht. Die Ausbreitungsregion dieser Krankheit geht unmittelbar mit der Ausbreitung der Zecke einher. Da die Regionen der Allergie gegen rotes Fleisch, der Cetuximab-vermittelten Abstoßungsreaktionen mit dem Ausbreitungsraum der Zecke überlappen, liegt eine logische Verbindung aller drei Phänomene nahe (siehe Abbildung 10). Durch Titerbestimmungen konnte gezeigt werden, dass sich die Anzahl an α -Gal-spezifischen IgE-Antikörpern im Menschen durch einen Zeckenbiss um den Faktor 20 vergrößert (166). Die Verknüpfung von Zeckenbissen mit der Fleischallergie und Abstoßungsreaktionen durch α -Gal Epitope auf Cetuximab ist dadurch sehr wahrscheinlich. α -Gal-vermittelte Immunantworten geschehen auf der ganzen Welt, zahlreiche Berichte aus den vereinigten Staaten, Norwegen, Australien und Japan beschreiben Allergien gegen rotes Fleisch, die durch initialen Kontakt mit α -Gal Epitopen aus Zecken ausgelöst und durch Zeckenbisse in den Organismus eingebracht wurden (167–171).



Abbildung 9: Bekannte Symptome nach Zeckenbissen und Konsum von rotem Fleisch.

Wenn ein Mensch von einer Zecke gebissen wurde, treten keine unmittelbaren Symptome außer einer Rötung und einer kleinen Wunde auf. Der Zeckenbiss führt zur Produktion von anti-Gal IgE Antikörpern. Nach dem Konsum und der Verdauung von rotem Fleisch, treten allergische Symptome wie Urticaria, Angioödem oder Anaphylaxie auf, mit Erlaubnis modifiziert von (141).

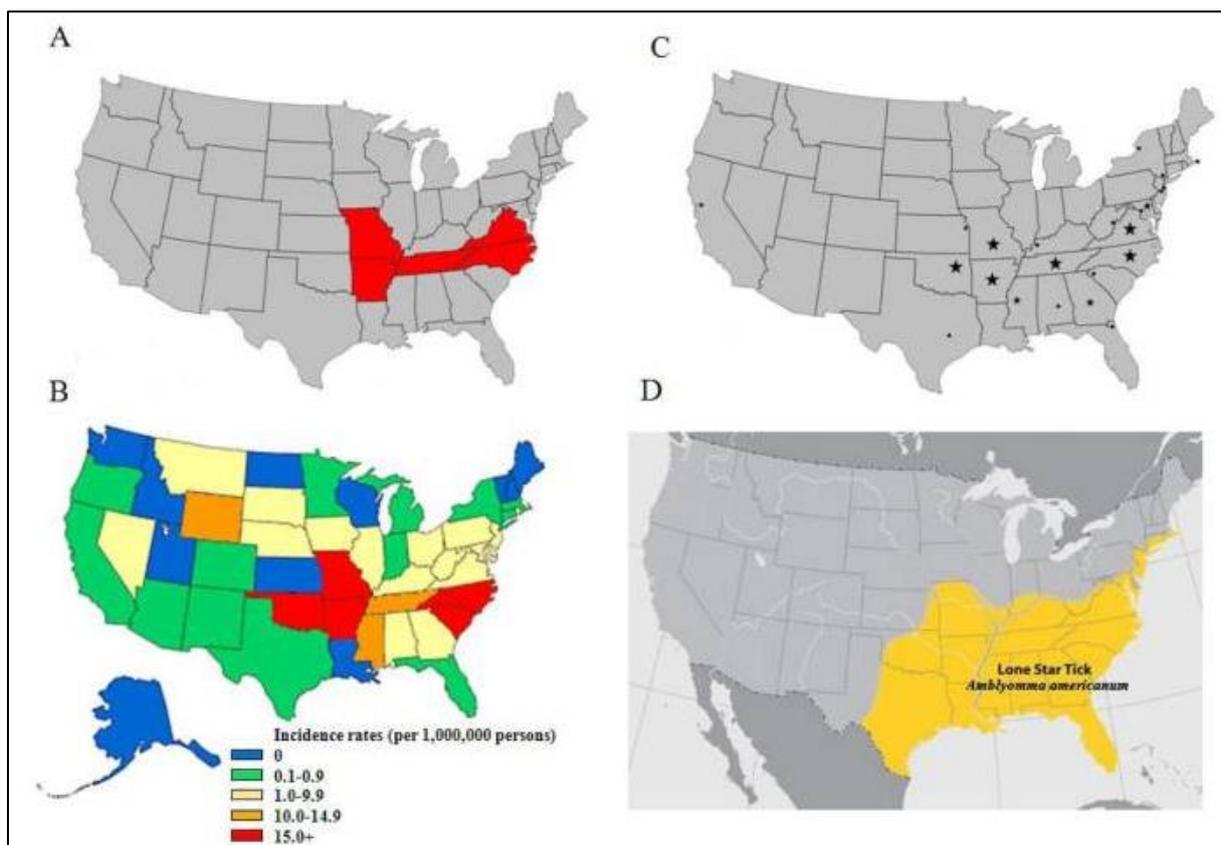


Abbildung 10: Geographischer Vergleich der US-Staaten.

(A) hinsichtlich des Auftretens anaphylaktischer Reaktionen zu Cetuximab, (B) hinsichtlich der Ausbreitung von „Rocky Mountain spotted fever“, (C) hinsichtlich berichteten Fällen von der Allergie gegen rotes Fleisch und (D) der bekannte Ausbreitungsraum der „Lone Star“ Zecke. Die Regionen der Fleischallergie, die Regionen von Abstoßungsreaktionen durch Cetuximab und die Regionen des „Rocky Mountain spotted fever“ überlappen mit dem bekannten Ausbreitungsraum der Zecke, wodurch ein logischer Zusammenhang zwischen Zeckenbissen und α -Gal spezifischer IgE-Produktion nahelegt, mit Erlaubnis von (166).

Ein Artikel berichtet von Fällen, in denen Menschen mit Blutgruppe B nicht an der Allergie gegen rotes Fleisch erkrankten, obwohl sie rotes Fleisch konsumierten (147). Die Erklärung für dieses Phänomen ist durch die bereits angesprochene Ähnlichkeit des α -Gal Epitops zum B-Antigen und die daraus resultierende Selbsttoleranz begründet (siehe 1.4). Allerdings ist nicht bekannt, ob das Auftreten von Blutgruppe B eine protektive Wirkung gegenüber der Gabe von Cetuximab aufweist.

Wie bereits durch Affinitätsbestimmungen gezeigt wurde, lassen sich anti-B Antikörper als eine Art Subpopulation von anti-Gal Antikörpern interpretieren (172, 173). In Menschen mit Blutgruppe B ist diese Subpopulation aufgrund der Selbsttoleranz nicht vorhanden, was in einem geringeren anti-Gal-Repertoire resultiert. Vermutlich ist die Anzahl verfügbarer anti-Gal Antikörper in Menschen mit Blutgruppe B nicht hoch genug, um allergische Reaktionen auszulösen. Eine nachgewiesene Erklärung für dieses Phänomen ist aktuell nicht bekannt.

1.4.2 α -Gal-tragende Glykoproteine

Das α -Gal Epitop ist ein immunogenes Glykanepitop und kann auf Glykoproteinen als Teil eines *N*-Glykans lokalisiert sein (siehe 1.4). Dieses Kapitel gibt einleitende Informationen zu den α -Gal-tragenden Glykoproteinen wieder, die in dieser Arbeit als Modellproteine verwendet wurden.

Bovines Thyroglobulin ist ein dimerisches Protein, das von den folliculären Zellen der Schilddrüse produziert wird. Es ist das Vorläuferprotein der Schilddrüsenhormone Thyroxin und Triiodthyronin (174). Die Präsenz von α -Gal Epitopen auf *N*-Glykanen von bovinem Thyroglobulin wurde bereits mittels Massenspektrometrie (175) und einem Radioimmunoassay (176) nachgewiesen.

Cetuximab ist ein monoklonaler, therapeutischer Antikörper gegen den epidermalen Wachstumsfaktor. Der Antikörper wird in der Maus-Myelom Zelllinie SP2/0 exprimiert (177) und findet Einsatz in der Krebstherapie. Die Eignung des Antikörpers für die Krebstherapie wurde durch eine bewirkte Verminderung der Wachstumsfaktorexpression auf Tumorzellen belegt (178). Der Zusammenhang zwischen Cetuximab und α -Gal wurde bereits in Kapitel 1.4.1 ausführlich beschrieben.

Der plasmatische Blutgerinnungsfaktor VIII besteht aus sechs unterschiedlichen Domänen. Die A1-, A2- und die B-Domäne bilden die schwere Kette und die A3-, C1- und C2-Domäne stellen die leichte Kette von Faktor VIII dar. Die schwere und leichte Kette werden durch die B-Domäne miteinander verbunden (179). Außerdem ist die schwere Kette mit der leichten

Kette durch eine Metallionen-abhängige Interaktion miteinander assoziiert, was durch eine Strukturanalyse des Proteins gezeigt werden konnte (180, 181).

Kogenate ist ein rekombinant hergestelltes Faktor VIII-Präparat, das in Hamsterzellen (BHK) exprimiert wurde (182). Die Präsenz von α -Gal-Strukturen auf Kogenate konnte bereits massenspektrometrisch, sowohl in dieser Arbeit (siehe 3.7), als auch in Literatur, nachgewiesen werden (183). Nuwiq ist ein rekombinant hergestelltes Faktor VIII-Präparat, das in einer humanen Zelllinie exprimiert wurde (184). Durch die Verwendung eines humanen Expressionssystems kann die ungewollte Synthese von α -Gal aufgrund der Inaktivität der α -1,3-GT (siehe Kapitel 1.4) vermieden werden. Hämophilie A wird durch die Gabe von Faktor VIII therapiert. Die Therapie führt zur Produktion von inhibitorischen Antikörpern, die gegen das rekombinante Produkt gerichtet sind und es somit neutralisieren (185). Im Falle von Nuwiq können immunogene Glykanepitope als Ursache für die ungewünschte Antikörperproduktion aufgrund der Expression in einer humanen Zelllinie ausgeschlossen werden. Es ist zur Zeit unklar, welche Auslöser ursächlich für die auftretenden Immunreaktionen bei der Therapie mit rekombinanten Faktor VIII-Präparaten sind (186).

1.4.3 α -Gal-vermittelte Immunreaktionen

Zum aktuellen Zeitpunkt sind drei grundlegende Mechanismen bekannt, wie das α -Gal Epitop zur Formation von Immunantworten im menschlichen Organismus beitragen kann. Generell besteht das Immunsystem aus zwei unterschiedlichen Arten von Verteidigungsmechanismen. Die angeborene Immunabwehr ist eine unspezifische und Antigen-unabhängige Immunantwort, die innerhalb von Minuten bis zu Stunden stattfindet. Die angeborene Immunabwehr verfügt nicht über die Fähigkeit, struktur-spezifische Eigenschaften eindringender Pathogene zu speichern, da dafür Zellen der adaptiven Immunabwehr notwendig sind, sondern erkennt lediglich körperfremde Oberflächenstrukturen (187).

Die zweite Art der Immunabwehr ist das adaptive Immunsystem. Es beinhaltet sogenannte Haupthistokompatibilitätskomplexe, die auf jeder Antigen-präsentierenden Zelle (APC) lokalisiert sind (188). Die Funktion dieser Proteine ist die Bindung von antigenen Strukturen und die Präsentation dieser Strukturen auf der Oberfläche von APCs. Präsentierte Antigene werden von T-Zellen erkannt, die eine spezifische T-Helferzellen (TH)-Antwort einleiten. In Folge dieser Immunantwort werden B-Zellen aktiviert, die daraufhin spezifische Antikörper gegen das Antigen produzieren (189). B-Zellen und APCs exprimieren das CD1d-Molekül, das Glykolipid-Antigene, wie beispielsweise Lipid-verknüpfte α -Gal Epitope, präsentieren

kann (Abbildung 11). Invariante natürliche T-Killerzellen sind eine Subpopulation natürlicher T-Killerzellen und exprimieren einen eigenen T-Zell-Rezeptor (TCR), der CD1d-präsentierte Glykolipid-Antigene erkennt. Der Zusammenhang und die Existenz von invarianten natürlichen T-Killerzellen zu CD1d-präsentierten Lipid-Antigen wurde *in vitro* mit B-Zellen und α -Gal-Ceramid aus Schweine-Erythrozyten gezeigt (133, 190).

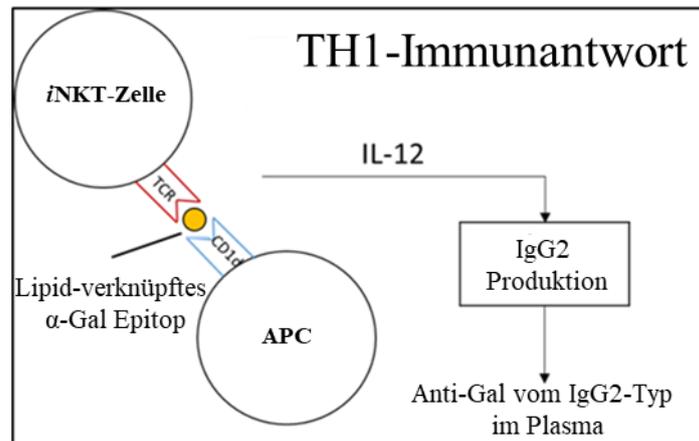


Abbildung 11: Präsentation von Lipid-verknüpftem α -Gal Epitop durch CD1d auf APCs.

Die Erkennung und Bindung von CD1d-präsentiertem α -Gal Epitop durch den TCR der *i*NKT-Zelle führt zur Sekretion von Interleukin 12 (IL-12), wodurch eine TH1-Immunantwort eingeleitet wird. Die Produktion von IgG2 ist charakteristisch für TH1-Immunantworten, Informationen entnommen aus (133).

Die *i*NKT-Zellen reagieren auf die Stimulation durch Lipid-verknüpftes α -Gal mit der Sekretion von Interleukin 12 (IL-12), wie anhand durchflusszytometrischer Messungen nach Ligation von CD1d-Molekülen bestätigt wurde (133). IL-12 aktiviert T-Helferzellen, die wiederum eine TH1-Immunantwort initiieren. Eine TH1-Immunantwort ist laut Literatur charakteristisch für die Produktion von IgG2 und die Sekretion von IL-12 (132, 191, 192). Da durch Western Blot-Versuche bestätigt wurde, dass anti-Gal Antikörper an Lipopolysaccharide verschiedener Darmbakterien binden (153), liegt die Vermutung nahe, dass diese Art von Immunreaktion für die natürliche Produktion von anti-Gal im Menschen verantwortlich ist.

Zahlreiche Fallberichte belegten, dass das α -Gal Epitop durch den Konsum von rotem Fleisch, durch einen Zeckenbiss oder durch die Injektion von Cetuximab in den Blutkreislauf gelangen kann (158–163). Der Erstkontakt zu α -Gal führt zu einer symptomfreien, allergischen Reaktion, in der produzierte anti-Gal IgE Antikörper an Fc ϵ -Rezeptoren von Mastzellen binden und sie dadurch sensibilisieren (193). Die erstmalige Produktion von anti-Gal IgE geschieht hierbei über die Präsentation der α -Gal-Struktur durch APCs nach erfolgter Phagozytose und Prozessierung des Antigens in der Zelle. Die APC migrieren in die Lymphknoten und bewirken eine Aktivierung von T-Zellen zu T-Helferzellen, die wiederum B-Zellen aktivieren. Aufgrund der simultanen Sekretion von IL-4 und IL-13 wurden T-Zellen

zu T2-Helferzellen entwickelt, die durch spezifische Bindung an B-Zellen eine TH2-vermittelte Immunantwort einleiten. Aktivierte B-Zellen produzieren in Folge spezifische anti-Gal IgE Antikörper, die an Mastzellrezeptoren binden (Abbildung 12). Dabei ist anzumerken, dass eine initiale Präsentation des α -Gal Epitops durch einen Zeckenbiss erfolgen muss, um konsekutiv eine Allergie gegen rotes Fleisch zu entwickeln. Vermutlich erfolgt eine Sensitivierung des Immunsystems durch weitere Bestandteile der Zecke, die durch einen Biss in den menschlichen Organismus eingebracht werden. Diese Vermutung kann anhand der aktuell vorhandenen Literatur allerdings nicht belegt werden, weswegen dieser Ansatz spekulativ bleibt.

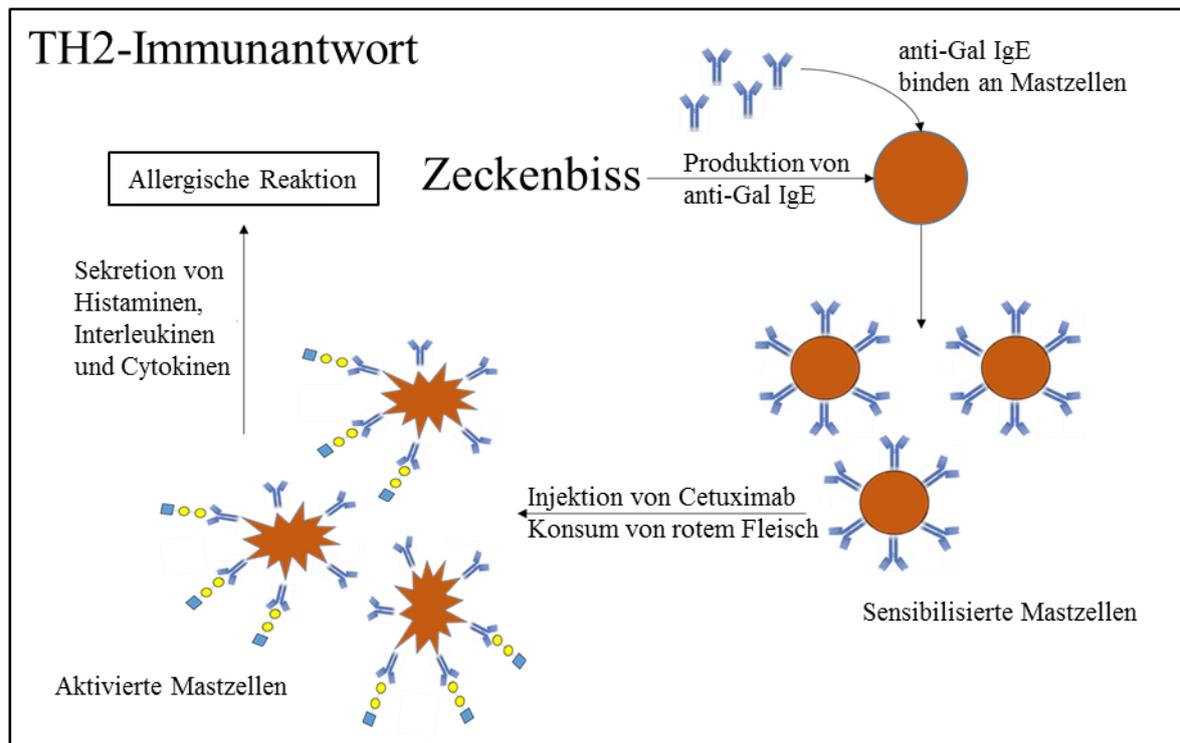


Abbildung 12: Eine durch α -Gal-tragende Proteinstrukturen ausgelöste Immunantwort.

Modell einer durch α -Gal induzierten Immunantwort: Nachdem ein Mensch von der „Lone Star“ Zecke gebissen wurde, werden anti-Gal IgE Antikörper produziert. Diese Antikörper binden und aktivieren Mastzellen. Erneutes Einbringen von α -Gal-Strukturen, zum Beispiel durch die Injektion von Cetuximab oder den Konsum von rotem Fleisch, führt zunächst zur Bindung der Epitope an Mastzellen-gebundene anti-Gal IgE und schließlich zur Ausschüttung von Histamin, Interleukinen und Zytokinen. Die Folge ist eine allergische Reaktion, die im schlimmsten Falle zum anaphylaktischen Schock führen kann. Informationen zur Erstellung dieser Abbildungen wurden entnommen aus (193).

In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem Auslöser dieser Immunreaktion jedoch nicht allein um das α -Gal Epitop handelte, sondern dass α -Gal-tragende Xenopeptide für die Präsentation auf APCs notwendig waren (194). Nach erfolgter Sensitivierung der Mastzellen ruft ein erneutes Einbringen von α -Gal-Strukturen in den humanen Organismus eine schwere Immunreaktion hervor. Aktivierte Mastzellen sekretieren inflammatorische Zytokine, Chemokine und Histamine, die in einer Art Kettenreaktion T2-Helferzellen aktivieren, die wiederum B-Zellen zur Produktion von anti-

Gal IgE und anti-Gal IgG1 anregen. Ohne unmittelbare Behandlung kann diese Immunreaktion zum Tode durch den anaphylaktischen Schock führen. Diese Prinzipien sind in einschlägiger Literatur beschrieben (193–195).

Die letzte der drei möglichen Immunantworten wird durch α -Gal-tragende Schweineorgane nach erfolgter Xenotransplantation ausgelöst. Titerbestimmungen betroffener Patienten zeigten, dass eine Mischung aus anti-Gal Antikörpern und Antikörpern, spezifisch für das Xenograft, produziert wurden (196). Bei durchgeführten Transplantationen von Schweinezellen in den Menschen wurden ein Anstieg von anti-Gal IgG Antikörpern detektiert (197) und Abstoßungsreaktionen beobachtet (196). Die durch die Expression des α -Gal Epitops bedingte, immunologische Barriere zwischen Tier- und Menschenzellen kann durch den Einsatz von Knockout-Schweinen, in denen die Expression von α -Gal Epitopen durch Inaktivierung der α -1,3-GT verhindert wurde, umgangen werden. Die Transplantation von Herz- und Nieren-Xenografts von entsprechend gezüchteten Schweinen in Paviane verlief für bis zu sechs Monate unproblematisch. Allerdings begannen die Paviane, Antikörper gegen das Xenograft zu produzieren, die eine Abstoßungsreaktion initiierten. Es ist hierbei hervorzuheben, dass die entwickelten Antikörper nicht spezifisch für α -1,3-Gal-terminale Strukturen waren (198).

Dieses Beispiel zeigt, dass die erfolgreiche Durchführung von Xenotransplantation noch immer herausfordernd ist. Wie anhand der Detektion Xenograft-spezifischer Antikörper gezeigt wurde, genügt es nicht, die Expression von α -Gal Epitopen durch Inaktivierung der α -1,3-GT zu unterbinden. Durch Expressionsanalysen konnte außerdem nachgewiesen werden, dass das genetische Eingreifen zur Inaktivierung der α -1,3-GT Einfluss auf die Expression von Sialyltransferasen und die CMP-*N*-Acetylneuraminsäurehydroxylase ausüben kann (199, 200). Als Konsequenz erhöhte sich die Expressionsrate des immunogenen Glykanepitops Neu5Gc, das seinerseits zur Ausprägung von Abstoßungsreaktionen beitragen kann (siehe 1.1.6).

1.4.4 Therapeutische Anwendungen von α -Gal Epitopen und anti-Gal Antikörpern

α -Gal Epitope und anti-Gal Antikörper können in einer Vielzahl unterschiedlicher therapeutischer Anwendungen eingesetzt werden. Beispielsweise kann die Immunogenität von Influenza-Vakzinen aufgrund des natürlichen Vorkommens von anti-Gal Antikörpern im Menschen erhöht werden. Dies wurde am Beispiel eines Mausmodells gezeigt, indem Virushaemagglutinin synthetisch mit α -Gal-Strukturen beladen und in eine Maus injiziert wurde. Die α -1,3-GT der Maus wurde zuvor inaktiviert und die Produktion von anti-Gal

Antikörpern wurde durch die Verabreichung von Schweinemembran induziert. Im Vergleich zu unmodifiziertem Virushaemagglutinin wurde eine erhöhte Effizienz der Immunantwort festgestellt. Erklärt wird dieses Phänomen dadurch, dass α -Gal-beschichtetes Virushaemagglutinin durch natürlich vorkommende anti-Gal Antikörper effektiver zu APCs transportiert werden kann als unmodifiziertes Haemagglutinin (201).

Die natürliche Produktion von anti-Gal Antikörpern führte zur α -Gal-Immunität, was bedeutet, dass vorhandene anti-Gal Antikörper gegenüber α -Gal-tragenden Proteinen defensive Immunantworten einleiten können. Dieses Prinzip wurde in epidemiologischen Studien der Erreger von Malaria, Chagas-Krankheit und Lyme-Borreliose belegt (202–206). Außerdem konnte in einschlägigen Artikeln zu den Erregern dieser Krankheiten gezeigt werden, dass sie alle über α -Gal Epitope verfügen (154, 207–209). Da für die erwähnten Krankheiten keine Impfstoffe existieren, wird es angestrebt, α -Gal als Vakzin zu nutzen und den Titer von anti-Gal Antikörpern zur Steigerung der Immunabwehr zu erhöhen (146). Selbiges Prinzip wird außerdem für die Behandlung von α -gal-tragenden Tumorzellen angewendet (210).

Effektivere Wundheilungsprozesse können durch Interaktionen zwischen anti-Gal IgG, anti-Gal IgM und α -Gal-Nanopartikeln, die auf verletztes Gewebe aufgetragen werden, herbeigeführt werden. Natürliche anti-Gal Antikörper binden an die Nanopartikel und aktivieren dabei das Komplementsystem. Makrophagen und Stammzellen werden rekrutiert und migrieren zu verletztem Gewebe, was mit schnellerer Wundheilung einhergeht (211–213). Die Diskrepanzen zwischen α -Gal-vermittelten Immunantworten, die zur Immunabwehr beitragen und jenen Immunantworten, die eine allergische Reaktion auslösen, sind momentan unbekannt.

1.5 Bisherige Arbeiten zur Analyse von α -Gal Epitopen

Pionierarbeiten von Galili *et al.* machten es möglich, die Grundlagen von α -Gal Epitopen und anti-Gal Antikörpern hinsichtlich Antikörperreinigung (149, 150), dem Nachweis der Spezifität (150) und der Spezies-spezifischen Verteilung von α -Gal Epitopen (95) zu verstehen. Der anti-Gal Antikörper wurde im Jahre 1983 von Galili während Arbeiten mit roten Blutzellen von Patienten mit β -Thalassämie am Hadassah Krankenhaus in Jerusalem entdeckt. Galili entdeckte die anti-Gal Antikörper, indem er an die Blutzellen gebundene IgG-Moleküle mit Galaktose eluierte (214). Zusätzlich konnte die Existenz von anti-Gal Antikörpern auf Blutzellen von Patienten mit Sichelzellenanämie (215) und auf seneszenten Blutzellen durch Bindungsanalyse bestätigt werden (216). Galili *et al.* wiesen zudem die

Existenz von α -Gal-Strukturen auf roten Blutzellen von Kaninchen nach. Dafür nutzte die Arbeitsgruppe die K562-Zelllinie, welche die erste immortalisierte, humane Krebszelllinie darstellte (217). Der Nachweis basierte auf der Interaktion zwischen Fab-Regionen von anti-Gal Antikörpern und α -Gal-Strukturen auf Kaninchenerythrozyten. Die Fc-Regionen von an die Blutzellen gebundenen anti-Gal Antikörpern banden an Fc-Rezeptoren der K562-Zellen. Diese Interaktionen führten zur Ausbildung von Erythrozyten-Antikörper-Rosetten. Die Anzahl von Rosette-bildenden K562-Zellen war proportional zur Anzahl vorhandener anti-Gal Antikörper. Durch mikroskopische Analysen konnte die Quantifizierung von anti-Gal Antikörpern erfolgen (150).

Die maßgeblich zum Verständnis beitragenden Western-Blot Experimente hinsichtlich der Bindung von anti-Gal Antikörpern an Lipopolysaccharide von Darmbakterien wurden ebenfalls von Galili *et al.* durchgeführt (153). Weiterhin verglichen Galili *et al.* die Eigenschaften von anti-Gal Antikörpern mit Antikörpern gegen Blutgruppe B und kamen zu dem Ergebnis, dass anti-B Antikörper im Grunde eine Subpopulation von anti-Gal Antikörpern darstellen (96) (siehe 1.4). Die Reinigung von anti-Gal Antikörpern aus humanem Plasma oder humanem Serum wurde bereits von anderen Gruppen durchgeführt. Es wurden verschiedene Affinitätsmatrizes wie beispielsweise immobilisierte Melibiose (150) oder bovines Thyroglobulin (218) eingesetzt. Die Spezifität gereinigter anti-Gal Antikörper zum α -Gal Epitop wurde mittels der Agglutination von Kaninchenerythrozyten (150) und verschiedenen ELISAs (149, 219) gezeigt.

Ein aktuelles Forschungsgebiet stellen Xenotransplantationen dar (siehe 1.4.3). Es existieren verschiedene Methoden, um die immunologische Barriere durch α -Gal zu umgehen. Beispielsweise wurden Affinitätschromatographien zur Abreicherung α -Gal-tragender Proteine in Tierplasma durchgeführt (220). Gentherapeutische Methoden zur Inaktivierung der α -1,3-GT, um α -Gal-Toleranz zu induzieren, geraten in den Fokus der Aufmerksamkeit und werden an Schweine- und Mausmodellen getestet (221–223).

Rekombinante Varianten von anti-Gal Antikörpern sind kommerziell erhältlich und wurden für die Verwendung als Detektionsantikörper in ELISA und Western Blot entwickelt (224, 225). Der rekombinante anti-Gal M86 Antikörper wird durch die Fusion von Milz-Lymphozyten von α -1,3-GT-Knockoutmäusen produziert und bindet an α -Gal Epitope auf Glykoproteinen und Glykolipiden. Der Antikörper wird zur Quantifizierung von α -Gal Epitopen im Darmgewebe von Schweinen und auf Zellen verwendet (224, 226). Rekombinanter anti-Gal G-13 Antikörper wird durch die Immunisierung von Balb/c-Mäusen

mit Kaninchenerythrozyten und Fusion mit Sp2/0-Myelomzellen produziert (227). Der anti-Gal G-13 Antikörper kann α -Gal Epitope auf Glykolipiden oder synthetisch hergestellten α -Gal-Glykokonjugaten binden (227, 228).

1.6 Das Ziel der Doktorarbeit

Diese Arbeit wurde mit dem Ziel angefertigt, die Eigenschaften und Anwendungsmöglichkeiten von anti-Gal Antikörpern nach ihrer Reinigung aus humanem Serum zu analysieren. Dafür wurden verschiedene Methoden zur Untersuchung der Antikörperspezifität, wie beispielsweise die Agglutination von Erythrozyten, verwendet. Im Gegensatz zu den bereits durchgeführten Pionierarbeiten (siehe 1.5), die sich vorwiegend mit der Erforschung und Entdeckung des α -Gal Epitops beschäftigten, liegt der Fokus meiner Arbeit auf der Charakterisierung der im Menschen auf natürliche Weise produzierten anti-Gal Antikörper. Das übergeordnete Ziel meiner Arbeit ist zu ermitteln, inwiefern gereinigte und charakterisierte anti-Gal Antikörper als alternatives Werkzeug zur Detektion von α -Gal Epitopen eingesetzt werden können. Die Verbreitung und damit verbundene Gefahren durch immunogene Glykanepitope wurden bereits beschrieben (siehe 1.1.6), was die Notwendigkeit einer schnellen und einfach anzuwendenden Methode zur Detektion dieser Strukturen bekräftigt. Im Gegensatz zur sehr komplexen und zeitlich aufwendigen Glykananalytik (siehe 1.1.7) wäre eine Antikörper-basierte Detektion des α -Gal Epitops vorteilhaft. Um die Tauglichkeit gereinigter anti-Gal Antikörper zur Detektion von α -Gal Epitopen zu untersuchen, werden mittels Western-Blot durchgeführte Bindungsanalysen mit einer konventionellen Glykananalytik von eingesetzten α -Gal-tragenden Modellglykoproteine verglichen. Obwohl viele Eigenschaften von α -Gal Epitopen und anti-Gal Antikörpern bereits bekannt sind, existieren nur wenige Informationen über die Charakteristiken des Antikörpers selbst. Demzufolge gehört es zur Aufgabe dieser Arbeit, die Verteilung der IgG-Subklassen gereinigter anti-Gal Antikörper zu bestimmen, deren isoelektrisches Verhalten zu untersuchen, Bindungsaffinitäten zu ermitteln und die *N*-Glykosylierung des Antikörpers zu analysieren.

Zusammenfassend bestehen die Ziele dieser Arbeit darin, die Spezifität gereinigter anti-Gal Antikörper zum α -Gal Epitop mittels orthogonaler Methoden zu bestätigen und im Rahmen einer detaillierten Charakterisierung weitere, bisher unbekannt Eigenschaften des Antikörpers zu analysieren. Es wird angestrebt, ermittelte Eigenschaften des anti-Gal Antikörpers in einen immunologischen Kontext zu stellen und mit bereits bekannten Prinzipien α -Gal-vermittelter Immunreaktionen zu verbinden.

2 Material und Methoden

2.1 Zusammenfassung verwendeter Materialien und Chemikalien

Alle Chemikalien, Materialien und Proteine wurden von Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland oder von Sigma Aldrich GmbH, Darmstadt, Deutschland bezogen, außer es wurde anders angegeben.

Puffer

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

2,67 mM KCl; 1,47 mM KH₂PO₄;
136,90 mM NaCl; 8,10 mM Na₂HPO₄, pH 7,4

Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)

150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 7,4

Glykanepitope

α -Gal-Matrix (Gal- α -1,3-Gal- β -1,4-GlcNAc-Polyacrylamid (PAA)-Sephrose)	GlyconZ, Auckland, Neuseeland (0070FF)
α -Gal Epitop-PAA-Biotin	GlyconZ, Auckland, Neuseeland (0070BP)
Blutgruppe 0 Antigen-PAA-Biotin	GlyconZ, Auckland, Neuseeland (0089BP)
Blutgruppe A Antigen-PAA-Biotin	GlyconZ, Auckland, Neuseeland (0006BP)
Blutgruppe B Antigen-PAA-Biotin	GlyconZ, Auckland, Neuseeland (0007BP)
Gal- α -1,3-Gal-PAA-Biotin	GlyconZ, Auckland, Neuseeland (0088BP)
Gal- β -1,3-Gal-PAA-Biotin	GlyconZ, Auckland, Neuseeland (0039BP)
Gal- β -1,4-GlcNAc-PAA-Biotin	GlyconZ, Auckland, Neuseeland (0047BP)

Glykoproteine

Rinderserumalbumin (BSA)- α -Gal Konjugat	Dextra Laboratories Ltd, Reading, Vereintes Königreich
Cetuximab	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Rekombinanter Faktor VIII <ul style="list-style-type: none"> • Nuwiq • Kogenate 	Nuwiq: Octapharma Biopharmaceuticals GmbH, Berlin, Deutschland Kogenate: Cranach-pharma GmbH, Hamburg, Deutschland

Enzyme

α (1-3,4,6)-Galaktosidase	Prozyme (GKX-4007), Ballerup, Dänemark
β -Galaktose-Dehydrogenase	Sigma Aldrich GmbH (G6637), Darmstadt, Deutschland
β -1,4-Galaktosidase S	New England Biolabs (P0745S), Frankfurt am Main, Deutschland
IdeZ Protease	New England Biolabs (P0770S), Frankfurt am Main, Deutschland
Rapid PNGase F	Waters GmbH, Eschborn (176003606), Deutschland New England Biolabs (P0710), Frankfurt am Main, Deutschland
Sialidase A	New England Biolabs (P0722), Frankfurt am Main, Deutschland

Entsprechende Puffer für die enzymatischen Reaktionen wurden vom jeweiligen Hersteller zur Verfügung gestellt.

Antikörper

Anti-human Faktor VIII Antikörper	Coachrom Diagnostica (SAF8C), Maria Enzersdorf, Österreich
Anti-human IgG Meerretichperoxidase (HRP)-Konjugat	Sigma Aldrich GmbH (A8792), Darmstadt, Deutschland
Anti-human IgG-Fc Antikörper	Sigma Aldrich GmbH (A1070), Darmstadt, Deutschland
Anti-human IgG-Subklassen	BD Biosciences (555868; 555873), Heidelberg, Deutschland Sigma Aldrich GmbH (I9388; I9513; I7260; I7385), Darmstadt, Deutschland
Humane IgG Subklassenstandards	Bio-Rad (PHP010; 52253004; 52483004; 52543004), München, Deutschland
Octagam	Octapharma Biopharmaceuticals GmbH, Berlin, Deutschland

Verwendete Geräte

Photometer	MultiSkanGo, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland
Hochleistungsflüssigkeitchromatographie (HPLC)-System	Acquity UPLC, Waters GmbH, Eschborn, Deutschland
„Fast Flow Protein Chromatography“ (FPLC)-System	Äkta Pure 25L, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Imager	G:Box, Syngene, Cambridge, Vereintes Königreich
Isoelektrische Fokussierungskammer	Multiphor II, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Affinitätssensor	Biacore T200, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Massenspektrometer	Xevo G2-XS QTOF, Waters GmbH, Eschborn, Deutschland

2.2 Übersicht durchgeführter Versuche und Experimente

Die ersten Experimente dieser Arbeit beinhalteten die Reinigung von anti-Gal Antikörpern aus Octagam. Octagam ist ein humanes Serumkonzentrat, bestehend aus humanen IgG-Antikörpern, und wurde mittels Affinitäts- und Ionenaustauschchromatographie aus Blutspenden gereinigt. Es wird für therapeutische Anwendungsbereiche in immungeschwächten Patienten als intravenöses Immunglobulin verabreicht (229). Zur Reinigung von anti-Gal Antikörpern aus Octagam wurde eine Affinitätschromatographie mit einer mit α -Gal beladenen Affinitätsmatrix durchgeführt. Gebundene Antikörper wurden kompetetiv mit Gal und anschließend durch Absenkung des pH-Wertes eluiert. In Folge wurde zunächst die Spezifität der Antikörper zum α -Gal Epitop mittels ELISA und orthogonalen Methoden untersucht. Anschließend wurden weitere Charakteristika von anti-Gal Antikörpern, wie IgG-Subklassen, das isoelektrische Verhalten oder die *N*-Glykosylierung ermittelt. Parallel wurde eine konventionelle *N*-Glykananalytik von α -Gal-tragenden Glykoproteinen durchgeführt und mit detektierten Signalen aus Western-Blot Experimenten verglichen. Eine schematische Übersicht der durchgeführten Methoden in dieser Arbeit ist in Abbildung 13 visualisiert.

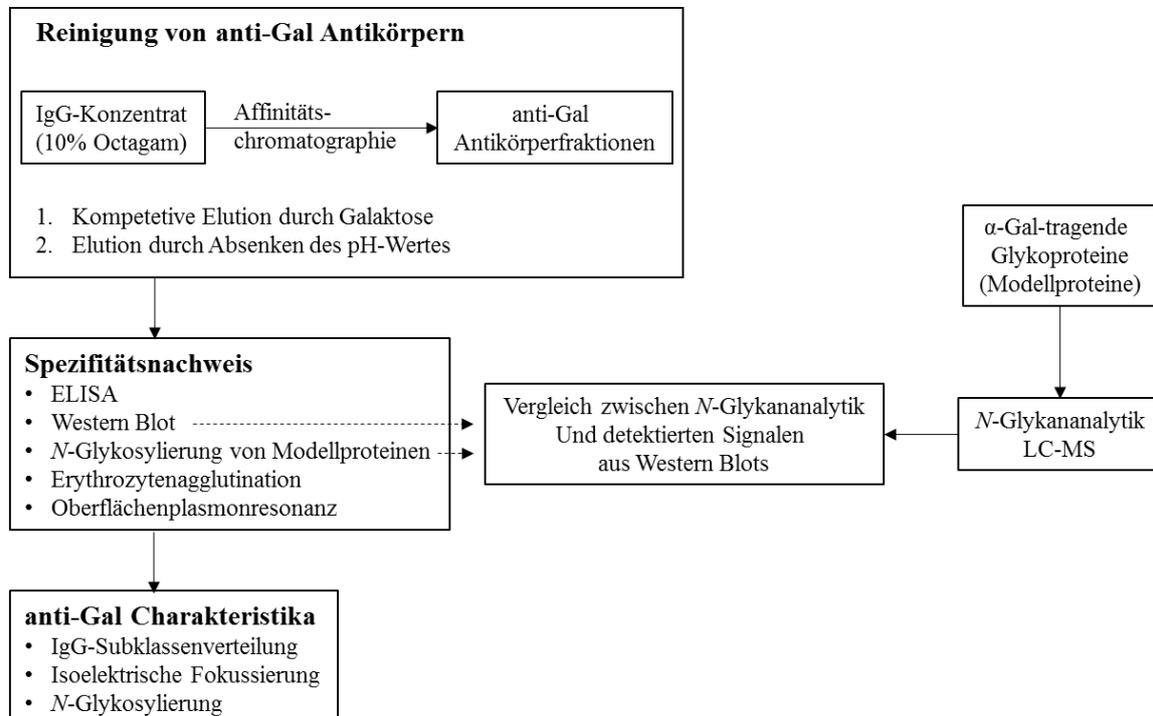


Abbildung 13: Schematische Darstellung durchgeführter Experimente in dieser Arbeit.

Alle Experimente basierten auf der Affinitätschromatographie und der damit verbundenen Reinigung von anti-Gal Antikörpern mittels zweier unterschiedlicher Elutionsstrategien. Die nachfolgenden Experimente hatten zum Ziel, die Spezifität zum α -Gal Epitop nachzuweisen. Anschließend wurden weitere, bisher unbekannte Charakteristika eluierter anti-Gal Antikörper ermittelt.

2.3 Reinigung von α -Gal-spezifischen Antikörpern

Die Reinigung von anti-Gal Antikörpern erfolgte aus dem Ausgangsmaterial Octagam. Dabei handelte es sich um humanes IgG-Serum, das von Octapharma Biopharmaceuticals zur Verfügung gestellt wurde. Zur praktischen Durchführung der Chromatographie wurde das „ÄktaPure25“-FPLC-System (ÄktaPure 25 L, GE Healthcare, Freiburg, Germany) und eine kommerzielle, α -Gal-beladene Affinitätsmatrix (Gal- α -1,3-Gal- β -1,4-GlcNAc) verwendet. Vorhandene Glassäulen (Tricorn 5/50, 5 mm Säulendurchmesser, Volumen 1,16 ml, GE Healthcare, Freiburg, Germany) wurden manuell mit der Affinitätsmatrix gepackt und schließlich an das FPLC-System angeschlossen. Die Säule wurde mit Phosphat-gepufferter Saline (PBS) bei einer Flussrate von 0,5 ml/min solange äquilibriert bis eine stabile Basislinie bei einer Detektion bei 214 nm erreicht wurde. Nach erfolgter Äquilibration der Säule wurde die Probe in das System injiziert. Die Probe bestand aus 5 ml von 10%-igem Octagam und wurde mittels einer Spritze und einer Probenschleife (Volumen 5 ml) geladen. Die Schleife wurde mit PBS bei 0,5 ml/min für 30 min gespült, sodass das gesamte Schleifenvolumen insgesamt dreimal durchlaufen wurde. Der Durchfluss ungebundener Antikörper wurde bei 214 nm detektiert. Nachfolgend wurde mit PBS bei 0,5 ml/min für 10 min gewaschen. Pro durchgeführter Chromatographie wurde die Probe insgesamt dreimal aufgetragen.

An die Affinitätsmatrix gebundene Antikörper wurden kompetitiv mit 500 mM Gal in PBS für 10 min isokratisch eluiert. Unmittelbar nach der kompetitiven Elution wurde eine isokratische, saure Elution mit 100 mM Glycin pH 2,0 für 10 min durchgeführt. Die Fraktionen wurden jeweils separat voneinander gesammelt und bei 4°C gelagert. Die Fraktionen der Elution bei pH 2,0 wurden vor der Lagerung mit 1 M Tris pH 9,0 neutralisiert. Alle Fraktionen wurden in PBS pH 7,4 mittels „Amicon Ultra Centrifugal Filters“ (Cut-off: 30 kDa) umgepuffert (siehe 2.4). Anschließend wurde eine Konzentrationsbestimmung aller umgepufferten Fraktionen mit dem Bicinchoninsäure-Assay durchgeführt (siehe 2.5). Die Affinitätschromatographie wurde insgesamt 15-mal wiederholt und gesammelte Fraktionen wurden vor dem Umpuffern zunächst vereint. Die Affinitätsmatrix wurde nach jeder Chromatographie mit 100 mM Glycin pH 2,0 für 15 min gewaschen und in 20% Ethanol (EtOH) gelagert. Das Säulenmaterial wurde wiederverwendet.

Der verbleibende Gehalt an Gal in gesammelten Fraktionen nach erfolgtem Pufferwechsel wurde enzymatisch mit der β -Galaktose Dehydrogenase bestimmt. Gal reduziert β -Nikotinamid Adenin Dinukleotid (NAD^+), was zur Bildung von NADH führt. Die Absorptionsdifferenz zwischen NAD^+ und NADH ist proportional zum Gehalt von Gal. Die

Absorbtionswerte von verschiedenen konzentrierten Gal-Standards (0; 2,5; 5; 7,5; 10; 15; 20; 25 nM Gal in deionisiertem Wasser) wurden bei 340 nm photometrisch bestimmt (MultiskanGo, Thermo Scientific, Germany) und zur Erstellung einer Kalibrationsgeraden verwendet. Die Bestimmung der Absorption erfolgte in den Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte (Flacher Boden, polysorp). Es wurden 200 µl von 100 mM Tris-HCl pH 8,6 vorgelegt, 10 µl der gesammelten Antikörperfraktion, beziehungsweise 10 µl des angesetzten Gal Standards wurden hinzugefügt und zusammen mit 10 µl von 200 mM NAD⁺ im Well nach der Zugabe von 1 mU β-Galaktose Dehydrogenase bei 37 °C für 10 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch 3-minütiges Erhitzen bei 95 °C gestoppt und die jeweiligen Absorbtionswerte wurden bei 340 nm gemessen.

2.4 Pufferwechsel von gereinigten Antikörpern und anderen Proteinen

Der Pufferwechsel von den in dieser Arbeit genutzten Proteinen wurden mittels „Amicon Ultra Centrifugal Filters“ (Cut-off: 30 kDa) (Merck, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Vor ihrer Verwendung wurden die Filter zunächst für 15 min bei 14000 x g mit deionisiertem Wasser gewaschen. Anschließend wurde die Proteinlösung auf die Filter gegeben und für 15 min bei 14000 x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die im Filter verbleibende, konzentrierte Proteinlösung mit dem Zielpuffer aufgefüllt und erneut für 15 min bei 14000 x g zentrifugiert. Der Pufferwechsel war nach 3-maliger Wiederholung oben genannter Schritte abgeschlossen.

2.5 Quantifizierung von Proteinen

Die Konzentration von gereinigten Antikörpern und von anderen, in dieser Arbeit genutzten Proteinen wurden mit dem Bicinchoninsäure-Assay durchgeführt. Alle dafür notwendigen Reagenzien und Chemikalien waren Bestandteil des kommerziellen Kits und wurden gemäß der vom Hersteller bereitgestellten Anleitung eingesetzt (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland). In die Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte (flacher Boden, maxisorp) wurden jeweils 10 µl der Proteinproben in geeigneten Verdünnungen pipettiert und mit 200 µl von Reagenz A und B (50 A: 1 B) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Absorbtionswerte wurden bei 562 nm photometrisch bestimmt (MultiskanGo, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland | Software: SkanIt Software, Version 3.2). Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über die Erstellung einer Kalibriergeraden mit Rinderserumalbumin (BSA)-Standards (125 µg/ml; 250 µg/ml; 500 µg/ml; 750 µg/ml; 1500 µg/ml; 2000 µg/ml).

2.6 Spezifitätsnachweis gereinigter anti-Gal Antikörper zum α -Gal Epitop

2.6.1 Nachweis der Spezifität von anti-Gal zu α -Gal Epitopen mittels ELISA

Alle zur Spezifitätsbestimmung durchgeführten ELISA Assays wurden, wie nachfolgend beschrieben, durchgeführt, falls keine anderen Informationen angegeben wurden. Detaillierte Informationen folgen in den nachfolgenden Methodenbeschreibungen der jeweiligen Assays.

Das Waschen der verwendeten Mikrotiterplatten erfolgte jeweils dreimal mit PBS/0,1% Tween20 (je 200 μ l/Well). Die Platten wurden mit 1xRoti-Block-Lösung (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) bei 37°C für 1 h geblockt (je 100 μ l/Well). Nach erfolgter Blockierung wurden die Platten erneut gewaschen und entsprechende Proben (siehe 2.6.1.1 bis 2.6.1.3) appliziert. Die Detektion erfolgte mit HRP-gekoppeltem Detektionsantikörper (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland, A0170, Verdünnung 1:10000 in 1xRoti-Block) für 1 h bei 37°C (je 100 μ l/Well) und anschließender Zugabe von Tetramethylbenzidin als Substratlösung (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) für 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Substratlösung ist eine „ready to use solution“. Die Reaktion wurde nach 10 min mit HCl (1 M) gestoppt (je 25 μ l/Well). Absorbtionswerte wurden photometrisch bei 450 nm gemessen (MultiskanGo, Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland | Software: SkanIt Software, Version 3.2). Gemessene Absorbtionswerte wurden durch Subtraktion des Leerwertes (PBS) korrigiert. Es wurden stets Dreifachbestimmungen durchgeführt.

2.6.1.1 Spezifitätsnachweis mittels biotinylierten Glykanepitopen

Eine kommerzielle, mit Streptavidin beschichtete 96-Well-Mikrotiterplatte (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) wurde über Nacht mit 1 μ g/ml von verschiedenen biotinylierten Glykanepitopen in deionisiertem Wasser beschichtet (GlycoNZ, Auckland, Neuseeland) (GlcNAc- β -1,4-Gal- α 1,3-Gal; Gal- α -1,3-Gal; Gal- β -1,3-Gal; GlcNAc- β -1,4-Gal; Blutgruppenantigene A; B; O). Die beschichtete Platte wurde zunächst mit PBS gewaschen und schließlich mit 1xRoti-Block für 1 h bei 37°C geblockt, anti-Gal Proben wurden nach erneutem Waschvorgang in verschiedenen Konzentrationen aufgetragen (0,125 μ g/ml; 0,25 μ g/ml; 0,5 μ g/ml; 1 μ g/ml) und für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Ausklopfen und Waschen der Platte wurde mit dem Detektionsantikörper für 1 h bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Platte gewaschen und mit Substratlösung bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde nach 10 min durch die Zugabe von HCl (1 M) gestoppt. Absorbtionswerte wurden photometrisch bestimmt und über die Subtraktion des Leerwertes korrigiert. Über den Vergleich der Absorbtionswerte untereinander wurde eine relative

Quantifizierung durchgeführt, das gemessene Signal bei beschichtetem α -Gal Epitop wurde als 100% angenommen.

2.6.1.2 Spezifitätsnachweis mittels bovinem Thyroglobulin

Eine 96-Well-Mikrotiterplatte (flacher Boden, maxisorp) wurde über Nacht mit unterschiedlich konzentrierten Lösungen von bovinem Thyroglobulin in 100 mM Ammoniumkarbonat pH 9,6 beschichtet (30 $\mu\text{g/ml}$, 15 $\mu\text{g/ml}$, 7.5 $\mu\text{g/ml}$, 3.75 $\mu\text{g/ml}$, 1.9 $\mu\text{g/ml}$; 0.94 $\mu\text{g/ml}$, 0.47 $\mu\text{g/ml}$, 0.23 $\mu\text{g/ml}$). Thyroglobulin wurde sowohl unverdaut, als auch verdaut mit α -1,3-Galaktosidase eingesetzt. Dafür wurden 50 μg Thyroglobulin in 4 μl 5xReaktionspuffer und 19 μl deionisiertem Wasser mit 1 μl α -1,3-Galaktosidase (5 mU) für 18 h bei 37°C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde das Enzym mittels Zentrifugation in „Amicon Ultra Centrifugal Filters“ (Cut-off: 50 kDa) entfernt. Nach erfolgter Beschichtung der Platte wurde gewaschen und anschließend mit 1xRoti-Block für 1 h bei 37°C geblockt. Nach erneutem Waschen wurden 1 $\mu\text{g/ml}$ von gereinigten anti-Gal Antikörpern in 1xRoti-Block zu den mit Thyroglobulin beschichteten Wells gegeben. Nach 1 h Inkubation bei 37°C wurde die Platte gewaschen und gebundene anti-Gal Antikörper wurden mit dem Detektionsantikörper für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde nach der Inkubation gewaschen und für 5 min mit Substratlösung inkubiert. Das Abstoppen erfolgte mit HCl (1 M), die Absorbtion wurde bei 450 nm photometrisch gemessen.

2.6.1.3 Vergleich der Affinität zwischen dem α -Gal Epitop und Gal- α -1,3-Gal mittels ELISA

Eine 96-Well-Mikrotiterplatte (flacher Boden, maxisorp) wurde über Nacht mit 1 $\mu\text{g/ml}$ BSA- α -Gal-Konjugat in 100 mM Ammoniumkarbonat pH 9,6 beschichtet. Danach wurde die Platte zunächst gewaschen und anschließend mit 1xRoti-Block bei 37°C für 1 h geblockt. Gereinigter und umgepufferter anti-Gal Antikörper wurde in verschiedenen, molaren Überschüssen von biotinyliertem α -Gal Epitop und biotinlyiertem Gal- α -1,3-Gal für 1 h bei Raumtemperatur in H_2O inkubiert (0, 5, 10, 20, 50, 100-facher molarer Überschuss). Für einen 10-fachen molaren Überschuss wurden beispielsweise 1 μl anti-Gal Antikörper (20 nM) zu 19 μl von in H_2O gelöstem Glykanepitop (200 nM) pipettiert und nach 1 h mit H_2O auf 100 μl aufgefüllt. Die mit unterschiedlichen Glykanepitopen inkubierten anti-Gal Antikörper wurden auf die gewaschene Mikrotiterplatte auf gebundenes BSA- α -Gal-Konjugat gegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Detektion, die Substratzugabe, das Stoppen der Reaktion und die photometrische Messung erfolgten wie oben beschrieben.

2.6.2 Nachweis der anti-Gal-Spezifität mittels Erythrozytenagglutination

Das α -Gal Epitop stellt eine von vielen Lipid-verknüpften Glykanstrukturen auf der Membranoberfläche von Kaninchenerythrozyten dar (141). Eine 96-Well-Mikrotiterplatte (runder Boden, maxisorp) wurde mit 1% BSA in deionisiertem Wasser blockiert (je 100 μ l/Well). Anschließend wurde die Platte ausgeklopft und gereinigter anti-Gal Antikörper wurde in physiologischer Salzlösung (0,9% NaCl) zugegeben (je 100 μ l/Well) (Verdünnungsfaktoren: 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280). Zu den unterschiedlich verdünnten anti-Gal Antikörpern wurden jeweils 0,5% v/v rote Blutzellen von Kaninchen (Dunn Labortechnik GmbH, Asbach, Deutschland) oder Menschen in 0,9% NaCl zugegeben (je 100 μ l/Well). Die Platte wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Humane Blutzellen stammen aus Blutspenden (Deutsches Rotes Kreuz, Berlin, Deutschland) und wurden mittels einem Fikoll-Dichtegradienten (GE Healthcare, Braunschweig, Deutschland) von anderen Blutbestandteilen separiert. Verbleibendes Plasma und „Buffy Coat“ konnten nach Zentrifugation (30 min, 400xg ohne Bremse) und drei Waschdurchläufen mit 0,9% NaCl vollständig entfernt werden. Die Zentrifugationen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Agglutination von Erythrozyten wurde visuell ausgewertet und mit dem G-Box Imager System dokumentiert (Syngene, Cambridge, Vereintes Königreich).

2.6.3 Nachweis der anti-Gal-Spezifität mittels Oberflächenplasmonresonanz

Die Affinität von anti-Gal Antikörpern gegenüber verschiedenen Glykanepitopen wurde mittels SPR unter Verwendung des Biacore T200 Systems (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) bestimmt. Biotinylierte Glykanepitope wurden in 10 mM HEPES/150 mM NaCl/0,02% Tween20 pH 7,5 verdünnt und kovalent auf kommerziellen Streptavidin-Chips (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) mit Immobilisierungsleveln von 200 RU beschichtet. 200 RU Biotin wurde als Referenz in einer Flusskammer immobilisiert. Anti-Gal Antikörper wurden in Natriumacetat (10 mM) pH 4,5 verdünnt (157 nM; 52 nM; 17 nM; 6 nM; 2 nM; 0,67 nM). Identische Verdünnungen von anti-Faktor VIII Antikörper (Coachrom Diagnostica, Maria Enzersdorf, Österreich) wurden als Negativkontrolle eingesetzt. Die Interaktion zwischen Antikörpern und beschichteten Glykanepitopen wurde mittels einer Multizyklus-Kinetik bei 20 °C in 10 mM HEPES/150 mM NaCl/0,02% Tween 20 pH 7,5 bei einer Flussrate von 10 μ l/min analysiert. Die Länge der Assoziations- und Dissoziationsphasen betragen jeweils 360 s, beziehungsweise 480 s und die Chipoberflächen wurden mit zwei kurz aufeinanderfolgenden Injektionen von 10 mM Glycin pH 2,0 für 10 s bei 10 μ l/min regeneriert. Die aus der Kinetik ermittelten Bindungsdaten wurden unter Annahme eines 1:1

Langmuir-Bindungsmodells global approximiert. Daraus resultierend konnte die Dissoziationskonstante K_D für jede Interaktion berechnet werden. Das gemessene Signal der Referenzoberfläche wurde automatisch vom Signal der Messzellen subtrahiert. Die Auswertungen wurden mittels der Biacore T200 Kontrollsoftware (Version 2.0.1) und der Evaluierungssoftware (Version 3.1) durchgeführt.

Alternativ wurden unterschiedliche Verdünnungen von bovinem Thyroglobulin in Natriumacetat (10 mM) pH 4,5 (17 nM; 6 nM; 2nM; 0,67 nM; 0,22 nM; 0,073 nM) als Analyten verwendet. Biotinylierte anti-Gal Antikörper (siehe 2.7) wurden zuvor auf einem Streptavidin-beschichteten Chip bis zu einem Immobilisierungslevel von 3000 RU beschichtet. Die Messung und Auswertung erfolgte so wie oben beschrieben.

2.7 Biotinylierung des anti-Gal Antikörpers

Gereinigter anti-Gal Antikörper wurde mit dem EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin Kit (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) biotinyliert. Alle Reagenzien und Chemikalien wurden so eingesetzt, wie es in der vom Hersteller bereitgestellten Anleitung beschrieben war. Es wurden 13,3 μ l einer Biotinlösung (1 nM) zu 100 μ l einer anti-Gal Antikörperlösung (1 mg/ml in PBS) gegeben und für 2 h auf Eis inkubiert. Der Überschuss an nicht reaktivem Biotin wurde durch Umpuffern in 10 mM HEPES/150 mM NaCl/0.02% Tween 20 pH 7,5 abgetrennt (siehe 2.4).

2.8 Kopplung von anti-Gal Antikörpern mit Meerrettichperoxidase

Die Konjugation von gereinigten anti-Gal Antikörpern mit HRP wurde mit einem HRP-Konjugation-Kit (abcam, Cambridge, United Kingdom) durchgeführt. Alle Reagenzien und Chemikalien wurden so eingesetzt, wie es in der vom Hersteller bereitgestellten Anleitung beschrieben war. Es wurden 10 μ l vom Modifier-Reagenz in 100 μ l einer anti-Gal Antikörperlösung (1 mg/ml in PBS) pipettiert. Nach vorsichtigem Mischen wurde diese Lösung zu einem HRP-Lyophilisat gegeben. Es wurde mit der Pipette resuspendiert und für 3 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden 10 μ l vom Quenching-Reagenz zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach weiteren 30 min Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur war die HRP-Konjugation abgeschlossen. Eine nachträgliche Abtrennung von überschüssigem HRP war nicht erforderlich. HRP-konjugierter anti-Gal Antikörper wurde aliquotiert und bei 4°C in PBS gelagert.

2.9 Gelelektrophorese und Western Blot

Die Gelelektrophorese wurde gemäß dem publizierten Prinzip von Laemmli (230) unter reduzierten Bedingungen mit Tris-Glycin Gradientengelen (8-16%; anamed, Groß-Bieberau, Deutschland) in Novex-Gelkassetten (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) durchgeführt. Die Menge und Art applizierter Proben unterscheidet sich zwischen durchgeführten Experimenten und wird in der entsprechenden Ergebnisbeschreibung angegeben. Alle Proben wurden mit Hitze denaturiert (5 min bei 95°C) und in Probenpuffer (0,72% Tris-HCl pH 6,8; 2,5% Natriumlaurylsulfat; 10% Glycerin; 10 mM Dithiothreitol; Bromphenolblau) aufgenommen. Nach erfolgtem Zusammenbau der Gelkassette und Fixierung des Gradientengels wurde die Kammer mit Laufpuffer (250 mM Tris; 1,9 M Glycin; 35 mM Natriumlaurylsulfat) gefüllt und die Taschen des Gels wurden mit maximal 20 µl Probe beladen. Als Proteinmarker wurden 10 µl des Dual Color Protein Standard Marker (Bio-Rad, München, Deutschland) in eine Tasche pipettiert. Für 10 min wurde eine Spannung von 100 V angelegt. Nach erfolgreichem Einlaufen der Proben ins Gel wurde die Spannung auf 150 V erhöht und wieder ausgeschaltet sobald die Bromphenolblau-Lauffront das untere Ende des Gels erreichte.

Nach erfolgter Gelelektrophorese wurde das Gel gegebenenfalls gemäß dem Prinzip nach Towbin *et al.* auf eine Nitrocellulosemembran geblottet (231). Dafür wurde die Membran in Blotpuffer (8,6% Glycin; 3% Tris) getränkt und zusammen mit dem Gel mit einer Blot-Klammer und zwei Filterpapieren zusammengebaut. Die Blot-Klammer wurde in einem mit Blotpuffer gefüllten Tank fixiert. Eine konstante Stromstärke von 250 mA wurde für 1 h angelegt. Nachdem der Blotprozess abgeschlossen war, wurde die Membran über Nacht bei 4°C in 1xRoti-Block blockiert. Am nächsten Tag wurde die Membran mit HRP-konjugiertem anti-Gal Antikörper (1:4000 in Blockpuffer verdünnt) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal mit Tris-gepufferter Saline (TBS)/0,1% Tween20 gewaschen, wobei der dritte Waschschrift ohne Tween20 durchgeführt wurde. Das Signal wurde mit dem SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrat (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) detektiert. Die Membran wurde mit dem G-Box Imager System dokumentiert (Syngene, Cambridge, Vereintes Königreich).

2.10 Ermittlung der IgG-Subklassen von gereinigten anti-Gal Antikörpern

Die IgG-Subklassen von gereinigten anti-Gal Antikörpern wurden mit dem „Human IgG Subclass Profile Kit“ (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) bestimmt. Der ELISA Assay wurde so durchgeführt wie es in den vom Hersteller mitgelieferten Unterlagen beschrieben wurde. Die zur Verfügung gestellten 96-Well-Mikrotiterplatten (flacher Boden) waren bereits mit unspezifisierten IgG Antikörpern beschichtet. Das Kit beinhaltet vier unterschiedliche, monoklonale Antikörper zur spezifischen Detektion der jeweiligen Subklassen IgG1, 2, 3 und 4. Diese Antikörper wurden zuvor mit 2 µg/ml an gereinigten anti-Gal Antikörpern für 5 min inkubiert und schließlich in die Wells der Platte pipettiert (100 µl/Well). Nach einer Inkubation von 1 h bei Raumtemperatur wurden die Platten ausgeklopft und dreimal in Folge mit der mitgelieferten Waschlösung gewaschen. Gebundene Antikörper wurden über einen mitgelieferten, HRP-konjugierten Detektionsantikörper nachgewiesen (1:1000 in Verdünnungspuffer). Nach erneutem Waschen wurde die Substratlösung zugegeben (100 µl/Well) und für 15 min im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Stopplösung beendet (25 µl/Well). Alle erwähnten Reagenzien, außer die anti-Gal Antikörper, waren Teil des kommerziellen ELISA Kits.

Zusätzlich wurden die IgG-Subklassen von anti-Gal Antikörpern mittels radialer Immunodiffusion ermittelt. Dafür wurden kommerzielle Radialimmunodiffusionsplatten mit immobilisierten Antikörpern gegen die IgG-Subklassen verwendet (The Binding Site, Schwetzingen, Deutschland). Neben unverdünnten anti-Gal Proben wurden verschiedene Verdünnungen von mitgelieferten Standards (IgG1: 140; 350; 840; 1400 µg/ml; IgG2: 80; 200; 480; 800 µg/ml) auf die Platten aufgetragen. Die Auswertung erfolgte durch Ausmessen der sich nach 72 h bei 4°C gebildeten, radialen Präzipitationsringe rund um die Auftragspunkte der Proben. Die Durchmesser der Präzipitationsringe sind proportional zur applizierten Menge des entsprechenden Antigens. Die aufgetragenen Mengen von anti-Gal IgG-Subklassen wurden mittels Kalibration mit mitgelieferten IgG-Subklassenstandards berechnet und relativ zueinander quantifiziert. Es wurden stets Dreifachbestimmungen durchgeführt.

2.11 Isoelektrische Fokussierung von anti-Gal Antikörpern

Es wurden 100 µg von gereinigten anti-Gal Antikörpern mit TBS auf eine Konzentration von 300 µg/ml eingestellt. Von dieser Antikörperlösung wurden 20 µl zu 150 µl Rehydrationspuffer gegeben (2,4 M Thioharnstoff; 8,4 M Harnstoff; 4,8% Chaps; 2,4%

Immobilinpuffer; 0,36% Dithiothreitol). Diese Lösung wurde in Vertiefungen einer Kunststoffplatte gegeben, die in einer ausbalancierten Box platziert wurde. Gelstreifen mit immobilisierten pH-Gradienten (IPG) (Immobiline DryStrip pH 3-10, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) wurden vorsichtig in die Lösung in den Spuren ohne Bildung von Luftblasen gelegt. Die Box wurde geschlossen und die Gelstreifen wurden über Nacht in den Proben inkubiert. Am nächsten Tag wurden die vollgesogenen Streifen aus der Box entfernt und auf einer flachen Kunststoffplatte mittig platziert. Beide Enden der Streifen wurden mit zurechtgeschnittenen Stücken eines Filterpapiers bedeckt. Die mit den Streifen beladene Platte wurde in der Fokussierungskammer (Multiphor II, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) platziert und die Streifen wurden mit Mineralöl überschichtet. Die Elektroden wurden angelegt und die IEF wurde bei 20°C gestartet (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Spannungen, Stromstärken und Leistung in verschiedenen Phasen der IEF

Phase	Spannung [V]	Stromstärke [mA]	Leistung [W]	Zeit [min]
1	200	konstant auf 2 mA gehalten	konstant auf 5 W gehalten	1
2	200			15
3	500			1
4	500			15
5	2000			1
6	2000			60
7	3500			60
8	3500			150

Fokussierte Gelstreifen wurden mit Äquilibrationpuffer (6 M Harnstoff; 30% w/v Glycerin; 3% w/w Natriumlaurylsulfat; 50 mM Tris-HCl; 5 mM Dithiothreitol) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde durch Äquilibrationpuffer mit zusätzlichen 5 mM Iodacetamid ersetzt und die Streifen wurden für weitere 15 min inkubiert. Anschließend wurden die Gelstreifen in Laufpuffer (25 mM Tris; 190 mM Glycin; 3,5 mM SDS) gelagert während die Gelapparatur für eine zweidimensionale Gelelektrophorese zusammgebaut wurde. Schließlich wurde das vorbereitete 2D-Tris-Glycin Gel mit einem Gelstreifen beladen und mit erwärmter Agarose (0,5%) überschichtet. Der Dual Color Protein Standard Marker (BioRad, München, Deutschland) wurde ebenfalls aufgetragen. Die Spannung wurde zunächst auf 100 V gesetzt. Nach 15 min wurde die Spannung für die nächsten 75 min auf 150 V erhöht. Nachdem die Gelelektrophorese beendet wurde, wurde das Gel mit Silber gefärbt (siehe 2.12) und mit dem G-Box Imager System dokumentiert (Syngene, Cambridge, Vereintes Königreich). Alternativ wurde das Gel auf eine Nitrocellulosemembran geblottet (siehe 2.9) und via HRP-konjugiertem anti-human IgG detektiert (1:10000 in Blockpuffer verdünnt; Sigma Aldrich GmbH, Darmstadt, Deutschland, A8792).

2.12 Färbung von Gelen nach erfolgter Gelelektrophorese

Coomassie-Blau-Färbung

Gele wurden in 20% Roti-Blue-Konzentrat (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)/ 20% EtOH über Nacht auf dem Gelschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Färbelösung entsorgt und Entfärber (20% EtOH) zugegeben. Die Entfärbelösung wurde über einen Zeitraum von 4 h dreimal durch frische Lösung ersetzt. Gefärbte Gele wurden mit dem G-Box Imager System dokumentiert (Syngene, Cambridge, Vereintes Königreich).

Silberfärbung

Gele wurden für 1 h in Fixierungslösung (40% EtOH; 10% Essigsäure; 0,02% Formaldehyd) inkubiert. Die Fixierlösung wurde entfernt und das Gel wurde dreimal mit 50% EtOH für jeweils 20 min gewaschen. Die Waschlösung wurde entfernt und Gele wurden mit 0,02% Natriumthiosulfat für 1 min inkubiert. Die Lösung wurde entfernt und die Gele wurden dreimal mit deionisiertem Wasser für jeweils 20 s gewaschen. Nach diesem Waschschrift wurden die Gele in Silberlösung (0,16% w/v AgNO_3 ; 0,027% v/v Formaldehyd) für 1 h inkubiert. Die Silbersalzlösung wurde entfernt und die Gele wurden zweimal mit deionisiertem Wasser für jeweils 20 s gewaschen. Schließlich wurden die Gele mit Entwicklerlösung (0,05% w/v Na_2CO_3 ; 0,015% v/v Formaldehyd; 0,0005% v/v Natriumthiosulfat) solange inkubiert bis die Färbung ausreichend sichtbar war. Die Entwicklerlösung wurde entfernt und Gele wurden für 10 min in deionisiertem Wasser inkubiert. Danach wurden die Gele für 10 min in Fixierungslösung fixiert, erneut mit deionisiertem Wasser für 10 min gewaschen und schließlich in 10% EtOH gelagert. Die Gele wurden dokumentiert wie oben beschrieben.

2.13 Enzymatische Abspaltung von Glykanepitopen

Alle Spaltungsreaktionen wurden im Reaktionspuffer des entsprechenden Enzyms in einem Gesamtvolumen von 20 μl durchgeführt, falls nicht anders angegeben. Das bei eingesetzten Glykoproteinlösungen vorliegende Puffersystem wurde zunächst durch deionisiertes Wasser ersetzt (siehe 2.4). Freigesetzte *N*-Glykane wurden nach der enzymatischen Abspaltung mittels der „GlycoWorks HILIC $\mu\text{Elution Plate}$ “ (Waters GmbH, Eschborn, Deutschland) gereinigt und vollständig in einer Vakuumzentrifuge getrocknet (Savant SPD131DDA SpeedVac Concentrator, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland).

2.13.1 Freisetzung von *N*-Glykanen

Bei der Freisetzung der *N*-Glykane von eingesetzten Glykoproteinlösungen wurden zwei verschiedene Methoden angewendet. Zum einen wurde die Abspaltung von *N*-Glykanen gemäß der Beschreibung der Waters GmbH durchgeführt. Zum Vergleichen der Effektivität fand die Freisetzung der *N*-Glykane ebenfalls mit Reagenzien eines anderen Anbieters statt (New England Biolabs).

Zunächst wurden 15 µg des Glykoproteins in 1% Rapigest-Lösung (Waters GmbH, Eschborn, Deutschland) mit 10% Tris(2-carboxyethyl)phosphin (Sigma Aldrich GmbH, Darmstadt, Deutschland) in einem Volumen von 28,8 µl in deionisiertem Wasser inkubiert. Die Proteinlösung wurde für 5 min bei 95°C denaturiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde Rapid PNGase F (Waters GmbH, Eschborn, Deutschland) bis zu einem Gesamtvolumen von 30 µl zugegeben und vorsichtig gemischt. Die Lösung mit Enzym wurde für 30 min bei 50°C inkubiert und anschließend direkt ohne Trocknung für die Fluoreszenzmarkierung eingesetzt.

Zum Vergleichen der Freisetzungseffektivität wurde 1 µl Rapid PNGase F (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) zu 29 µl der Glykoproteinlösung, vorliegend in Reaktionspuffer, gegeben. Die Lösung wurde mit dem Enzym für 10 min bei 50°C inkubiert.

2.13.2 Enzymatische Abspaltung von α -1,3-verknüpfter Gal

Pro 100 µg Glykoprotein wurden 5 mU von α -1,3,4,6-Galaktosidase (GKX5007, Prozyme, Ballerup, Denmark) zur Proteinlösung, vorliegend in Reaktionspuffer, hinzugegeben. Die Lösung wurde für 18 h bei 37°C mit dem Enzym inkubiert.

2.13.3 Enzymatische Abspaltung von β -1,4-verknüpfter Gal

Pro 100 µg Glykoprotein wurden 1 µl von β -1,4-Galaktosidase S (P0745S, New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) zur Proteinlösung, vorliegend in Reaktionspuffer, hinzugegeben. Die Lösung wurde für 3h bei 37°C mit dem Enzym inkubiert.

2.13.4 Enzymatische Abspaltung von Sialinsäuren

Pro 100 µg Glykoprotein wurden 1 µl von Sialidase A (GK80040, Prozyme, Ballerup, Denmark) zur Proteinlösung, vorliegend in Reaktionspuffer, hinzugegeben. Die Lösung wurde für 2 h bei 37°C mit dem Enzym inkubiert.

2.13.5 Spaltung freigesetzter *N*-Glykane mittels Exoglykosidasen

Freigesetzte *N*-Glykane wurden komplett in einer Vakuumzentrifuge getrocknet (Savant SPD131DDA SpeedVac Concentrator, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) und in, für die jeweils verwendete Exoglykosidase, kompatiblen Reaktionspuffer resuspendiert. Die entsprechende Glykosidase wurde zum Reaktionsvolumen hinzugefügt und der Inkubationsschritt wurde durchgeführt, wie oben beschrieben (siehe 2.13.2 bis 2.13.4). Sialidase A und β -1,4-Galaktosidase wurden in einer Spaltungsreaktion kombiniert (jeweils 1 μ l beider Enzyme wurde verwendet). Als Reaktionspuffer wurde Glykopuffer 1 (New England Biolabs, Frankfurt, Vereintes Königreich) verwendet. Die Lösung wurde für 3 h bei 37°C mit den Enzymen inkubiert. Gespaltene *N*-Glykane wurden nach der Inkubation mittels der „GlycoWorks HILIC μ Elution Plate“ (Waters GmbH, Eschborn, Deutschland) gereinigt.

2.14 *N*-Glykananalytik mittels Massenspektrometrie

Die Probenvorbereitung der *N*-Glykane von Glykoproteinen wurde gemäß existierender Anleitungen und Protokollen des RapiFluor-MS *N*-glycan-Kits (Waters GmbH, Eschborn, Deutschland) durchgeführt. Zu analysierende *N*-Glykane wurden mittels Rapid PNGase F freigesetzt (siehe 2.13.1). Die Effizienz der *N*-Glykan-Freisetzung wurde anhand des sichtbaren Massenunterschieds verdauter Glykoproteine via Gelelektrophorese nachgewiesen. Als Vergleich wurde eine orthogonale *N*-Glykan-Freisetzungsmethode angewendet (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) (siehe 2.13.1). Zur Markierung freigesetzter *N*-Glykane wurden 12 μ l einer RapiFluor-MS Lösung (9 mg in 131 μ l Dimethylformamid) zu freigesetzten *N*-Glykanen gegeben und durch Pipettieren gemischt. Nach einer Inkubation von 5 min im Dunkeln wurde die Lösung mit Acetonitril zu einem Gesamtvolumen von 370 μ l zum Stoppen der Reaktion aufgefüllt. Die Reinigung markierter *N*-Glykane wurde mit der „GlycoWorks HILIC μ Elution Plate“ (Waters GmbH, Eschborn, Deutschland) unter Verwendung einer Vakuumpumpe (Welch Gardner Denver Thomas GmbH, Germany) durchgeführt. Die Reinigungsprozedur wurde so durchgeführt, wie es in den Herstellerangaben beschrieben wurde. Mitgelieferte Säulen wurden zunächst dreimal mit jeweils 200 μ l deionisiertem Wasser und anschließend dreimal mit jeweils 200 μ l 85% Acetonitril äquilibriert. Anschließend wurden die Säulen mit markierten *N*-Glykanen beladen. Nachdem die Proben die Säulen vollständig passiert hatten, wurde zweimal mit jeweils 600 μ l 90% Acetonitril/1% Ameisensäure/9% H₂O gewaschen. An das Säulenmaterial gebundene *N*-Glykane wurden dreimal nacheinander mit jeweils 30 μ l von 200 mM

Ammoniumacetat/5% Acetonitril eluiert und anschließend in der Vakuumzentrifuge getrocknet (Savant SPD131DDA SpeedVac Concentrator, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland). Getrocknete und gereinigte *N*-Glykane wurden in 10 µl 94% Acetonitril/ 3% Dimethylformamid/3% H₂O resuspendiert. Gereinigte *N*-Glykane wurden mittels Flüssigchromatographie-gekoppelter Massenspektrometrie (AcquityH UPLC®Class Glycan BEH Amide, 130 Å, 1.7 µm, 2.1x150mm) (Xevo®G2-XS QToF) (LC-MS) (Waters GmbH, Eschborn, Germany) unter Verwendung einer Elektronenspray-Ionisierungsquelle (High Performance Zspray™-Multi mode source) im positiven Messmodus analysiert. Die Säulentemperatur wurde bei 60°C konstant gehalten und das folgende Gradientenprofil wurde angewendet (Tabelle 2).

Tabelle 2: Angewendetes Gradientenprofil für die Detektion von *N*-Glykanen mittels LC-MS (A = 50 mM Ammoniumformiat pH 4,4; B = 100% Acetonitril)

Zeit [min]	Flussrate [ml/min]	% A	% B
0,0	0,4	25	75
35,0	0,4	46	54
36,5	0,2	100	0
39,5	0,2	100	0
43,1	0,2	25	75
47,6	0,4	25	75
55,0	0,4	25	75

Das für die Analyse verwendete LC-MS System verfügte sowohl über einen Fluoreszenz- als auch über einen Massendetektor. Es wurden 4 µl der gereinigten, freigesetzten *N*-Glykanlösung in das System injiziert und entsprechende Glykanstrukturen konnten anhand Fluoreszenz- und Massendetektion zugeordnet werden. Ein Rapifluor-MS markierter Dextranstandard wurde eingesetzt um die Retentionszeit von *N*-Glykanen mit Glukoseeinheiten des Standards vergleichen und zuordnen zu können. Jedem im Fluoreszenzdetektor detektierten Signal konnte eine Anzahl an Glukoseeinheiten zugeordnet werden, womit spezifische Glykanstrukturen zugeordnet werden konnten. Zugeordnete Glykanstrukturen wurden mittels Massendetektion zusätzlich analysiert und überprüft. Die Instrumenteneinstellungen des Massenspektrometers wurden für eine maximale Sensitivität und Detektionsspezifität angepasst (Tabelle 3)

Tabelle 3: Instrumenteneinstellungen des Massenspektrometers für die Analyse von *N*-Glykanen

Kapillarspannung [V]	2750
Konusspannung [V]	80
Quellentemperatur [°C]	120
Desolvatationstemperatur [°C]	500
Konus-Gasvolumenstrom [L/H]	50
Desolvatation-Gasvolumenstrom [L/H]	800
Massenbereich [Da]	750-2500
Korrekturmassenspray	Glu Fibrinopeptid B

3 Ergebnisse

3.1 Die Reinigung von anti-Gal Antikörpern

Die ersten Versuchsschritte dieser Arbeit beinhalteten die Reinigung von anti-Gal Antikörpern aus Octagam, ein human-plasmatisches IgG-Konzentrat, bereitgestellt von Octapharma Biopharmaceuticals GmbH. Dafür wurde eine Affinitätschromatographie mit dem ÄktaPure 25 L Chromatographiesystem unter Verwendung einer Affinitätsmatrix mit präsentiertem α -Gal Epitop durchgeführt. Eine mit der Affinitätsmatrix gepackte Glassäule wurde an das Chromatographiesystem angeschlossen und mit PBS äquilibriert. Anschließend wurden dreimal hintereinander 5 ml Octagam aufgetragen. Während des gesamten Laufs wurde die Absorption bei 214 nm gemessen. Zwischen den Injektionen wurde der Säulendurchlauf detektiert und nach der dritten Injektion wurde die Säule mit PBS gewaschen. Ein exemplarisches Chromatogramm zeigt die bei 214 nm gemessenen Absorptionswerte, die Probeninjektionen und die isokratisch durchgeführten Elutionen mit Gal (1) und Glycin (2) (Abbildung 14).

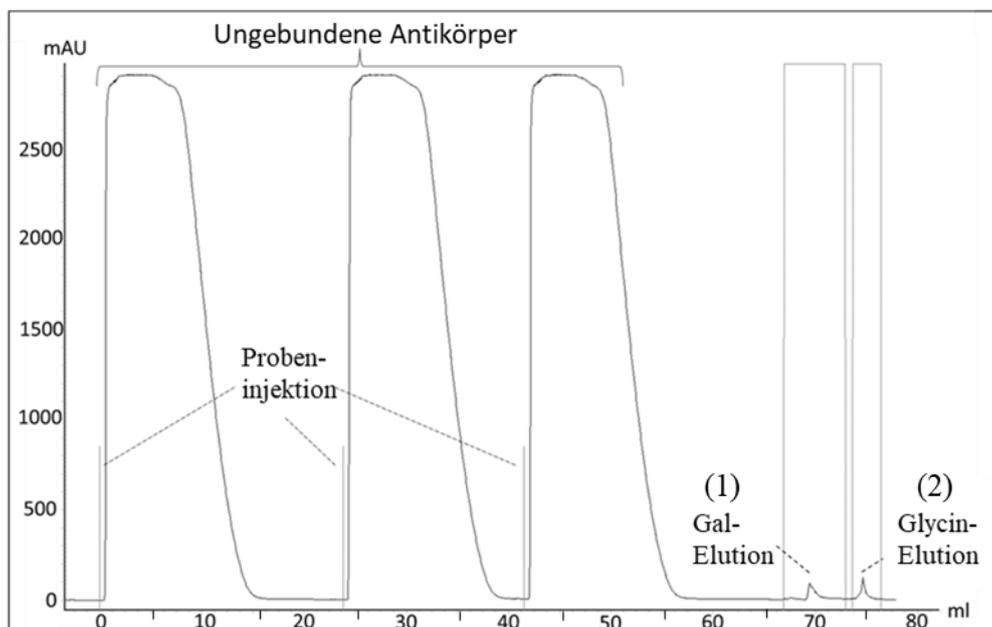


Abbildung 14: Exemplarisches Chromatogramm der anti-Gal Affinitätschromatographie.

Octagam wurde dreimal in das System injiziert (Probeninjektion). Die Absorption des Säulendurchflusses wurde von 0 bis 60 ml detektiert. Die Elution gebundener Antikörper wurde mittels 500 mM Gal (1) und unmittelbar danach mit 100 mM Glycin pH 2,0 (2) durchgeführt. Elutionsfraktionen wurden bei 70 und 75 ml separat voneinander gesammelt.

Anti-Gal Antikörper aus Octagam banden an die Affinitätsmatrix während sich unspezifische Antikörper im Durchfluss befanden. Durch die durchgeführten Elutionen lösten sich an die Säulenmatrix gebundene Antikörper und konnten fraktioniert werden, wobei die erste

Fraktion durch die Elution von Gal separat von der nachfolgenden, Glycin-Elution fraktioniert wurde. Mittels der Evaluierungssoftware des ÄktaPure-Systems wurden die Peakflächen der ungebundenen Antikörper bestimmt und mit den Peakflächen der Signale bei den Elutionen verglichen. Im Vergleich zur bestimmten Peakfläche der ungebundenen Antikörper machten die bei den Elutionen erhaltenen Peaks einen relativen Anteil von jeweils etwa $0,15\% \pm 0,1\%$ aus. Die Form der Peaks war stets heterogen. Damit wurde bestätigt, dass der relative Anteil von anti-Gal Antikörpern in Octagam kleiner als 1% ist, wie in Literatur bereits in Bezug auf humanes Serum angegeben wurde (232, 233). Gesammelte Antikörperfraktionen wurden vereint. Nach dem Pufferwechsel wurden die Konzentrationen beider separat voneinander gesammelten Fraktionen mit dem BCA Assay gemessen und durch Verdünnung mit PBS auf 1 mg/ml eingestellt.

Um die Reinheit eluierter anti-Gal Antikörper zu bewerten, wurden Octagam, eine gesammelte Fraktion ungebundener Antikörper, Gal-eluierte anti-Gal Antikörper und Glycin-eluierte Antikörper mittels reduzierender Gelelektrophorese (siehe 2.9) untersucht (Abbildung 15).

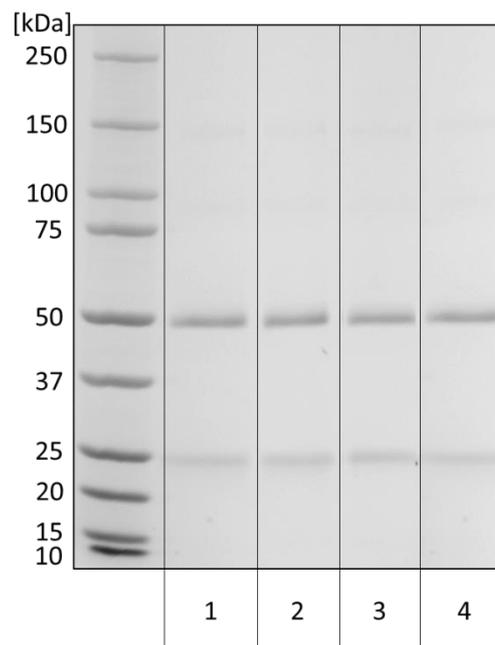


Abbildung 15: Elektrophorese der Antikörpereluat zur Untersuchung auf Fremdprotein.

Ein Tris-Glycin Gradientengel (8-16%) wurde mit jeweils $2\mu\text{g}$ Octagam (1), ungebundenen Antikörpern (2), Gal-eluierten Antikörpern (3) und Glycin-eluierten Antikörpern (4) in reduzierendem Probenpuffer beladen. Das Gel wurde mit Coomassie-brilliant-Blau gefärbt.

Alle Proben zeigten schwache Banden bei 150 kDa (nicht-reduziertes IgG), bei 50 kDa (schwere Kette von IgG) und bei 25 kDa (leichte Kette von IgG). Demzufolge konnte gezeigt werden, dass die eluierten Antikörper keine Kontaminationen außer möglicherweise andere, unspezifische Antikörper enthielten.

3.2 Nachweis der Antikörperspezifität mittels ELISA

3.2.1 Nachweis der Spezifität mit biotinylierten Glykanepitopen

Nach der erfolgreichen Reinigung von anti-Gal Antikörpern sollte deren Spezifität gegenüber dem α -Gal Epitop nachgewiesen werden. Die erste Methode bestand aus einem ELISA, in dem eine mit Streptavidin vorbeschichtete 96-Well-Mikrotiterplatte mit verschiedenen, biotinylierten Glykanepitopen beschichtet wurde. Mit Glykanepitopen beschichtete Wells der Mikrotiterplatte wurden daraufhin mit gereinigtem und umgepuffertem anti-Gal Antikörper aus jeweils beiden gesammelten Fraktionen aus der Affinitätschromatographie inkubiert. Die Bindung an biotinylierte Glykanepitope wurde mit HRP-konjugierten anti-human IgG nachgewiesen. Gemessene Absorbtionswerte wurden relativ zueinander quantifiziert (Abbildung 16).

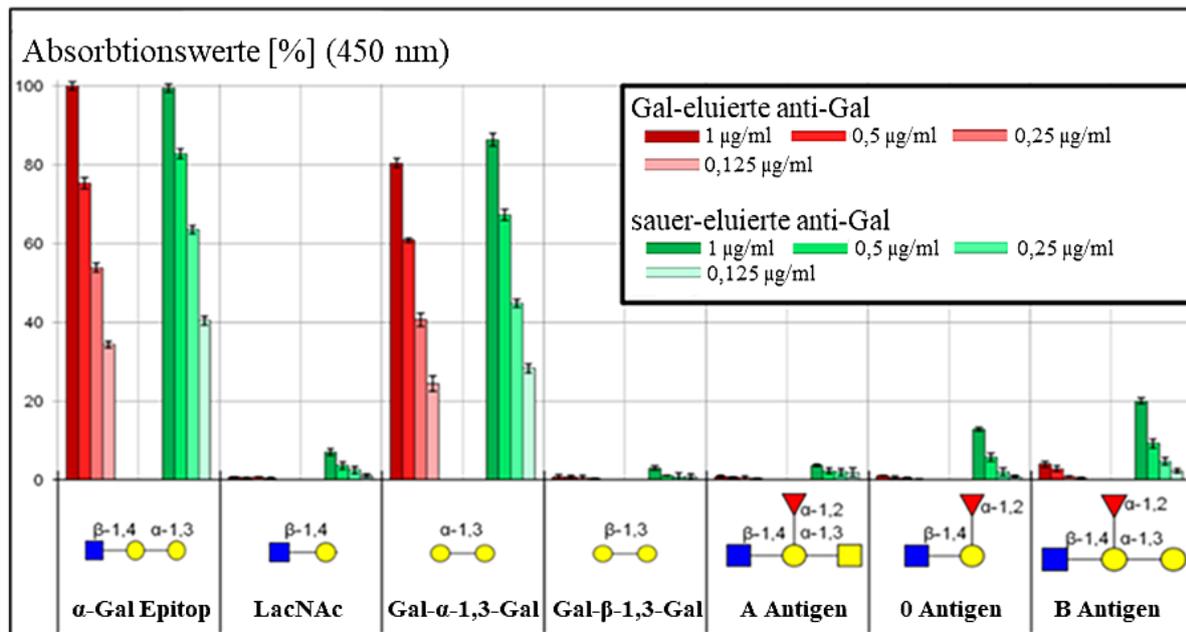


Abbildung 16: Bindungsanalyse von anti-Gal Antikörpern mittels Glykanepitopen.

Normierte Absorbtionswerte von Gal-eluierten Antikörpern sind als rote, von sauer-eluierten Antikörpern als grüne Balken abgebildet. Jedes Eluat wurde in vier verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Die Struktur von jedem Glykanepitop ist unter den entsprechenden Absorbtionswerten abgebildet. Die in der Abbildung gezeigten Monosaccharide wurden mittels folgender Symbole visualisiert: GlcNAc (■), Man (●), GalNAc (■), Fuc (▲), Gal (●).

Es konnte gezeigt werden, dass beide gesammelten anti-Gal Fraktionen endständige α -1,3-Gal-Monosaccharide erkennen. Der detektierte und mit dem Leerwert korrigierte Absorbtionswert bei der Interaktion zwischen anti-Gal Antikörpern und dem α -Gal Epitop wurde auf 100% gesetzt, weil es sich um den höchsten Absorbtionswert, verglichen zu denen der anderen Interaktionen darstellte.

Jedes Glykanepitop ohne terminales α -1,3-Gal-Monosaccharid konnte nicht spezifisch detektiert werden. Das α -Gal Epitop (GlcNAc- β -1,4-Gal- α -1,3-Gal) und das Disaccharid (Gal- α -1,3-Gal) wurden von anti-Gal Antikörpern gebunden, die in Folge vom Detektionsantikörper detektiert wurden. Es ist hierbei anzumerken, dass bei der Interaktion zwischen anti-Gal und dem α -Gal-Disaccharid geringere Absorbtionswerte gemessen wurden, als bei der Interaktion zwischen anti-Gal und dem α -Gal Epitop. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass weder die mit Gal-eluierten, noch die Glycin-eluierten anti-Gal Antikörperfraktionen an LacNAc, Gal- β -1,3-Gal oder dem A-Antigen gebunden hatten. Detektierte Absorbtionswerte dieser Interaktionen waren unter 5% der maximal gemessenen Absorption und wurden daher vernachlässigt. Bei der Interaktion zwischen beiden Antikörperfraktionen mit dem O-Antigen wurde nur eine Bindung von Glycin-eluierten anti-Gal Antikörpern festgestellt. Gal-eluierte anti-Gal Antikörper banden nicht an das O-Antigen, aber ebenso wie Glycin-eluierte anti-Gal Antikörper an Glykanstrukturen mit terminalem α -1,3-Gal.

Das B-Antigen konnte von beiden gesammelten Antikörperfraktionen detektiert werden. Aufgrund des terminalen α -1,3-Gal-Monosaccharids ließ sich die Bindung der Antikörper an diese Glykanstruktur erklären, obgleich die Bindung von Gal-eluierten Antikörpern an das B-Antigen deutlich schwächer detektiert wurde. Aufgrund der zusätzlich vorhandenen Fuc am terminalen Ende des B-Antigens spricht eine schwächere Bindung vom Gal-eluierten anti-Gal Antikörper für dessen hohe Spezifität. Einerseits unterstützt dieses Ergebnis den Erfolg der zuvor durchgeführten Affinitätschromatographie und andererseits konnte damit gezeigt werden, dass die Strategie, Gal als Elutionsmittel zu nutzen, die Ausbeute hochspezifischer anti-Gal Antikörper erhöht.

Zusätzlich wurde untersucht, ob die die Spezifität der eluierten Antikörper zu den Glykanepitopen abhängig von der eingesetzten Antikörperfraktion ist. Dafür wurden verschiedene Konzentrationen der Antikörper eingesetzt. Das proportionale Verhalten gemessener Absorbtionswerte gegenüber den eingesetzten Konzentrationen zeigte keine Veränderungen der Spezifität. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass beide Antikörperfraktionen spezifisch für das α -Gal Epitop und das α -Gal-Disaccharid (Gal- α -1,3-Gal) waren. Gal-eluierte anti-Gal Antikörper zeigten keine Bindung an Glykanepitope ohne terminale α -1,3-Gal-Strukturen, wohingegen die sauer-eluierte Antikörperfraktion offenbar weitere Antikörper erhält, die an Glykanepitope ohne terminale α -1,3-Gal-Strukturen gebunden hatten. Aus diesem Grund wurden in folgenden Experimenten stets die Gal-eluierten anti-Gal Antikörper verwendet.

3.2.2 Nachweis der Spezifität mit bovinem Thyroglobulin

Eine 96-Well-Mikrotiterplatte wurde mit unterschiedlichen Mengen von bovinem Thyroglobulin beschichtet. Zusätzlich wurden jeweils äquivalente Mengen von Thyroglobulin ohne α -Gal Epitope als Negativkontrolle auf die Platte aufgetragen. Die Abspaltung der α -Gal Epitope von eingesetztem Thyroglobulin wurde vor der Beschichtung enzymatisch durch Inkubation mit α -1,3-Galaktosidase erreicht. Die Vollständigkeit der Abspaltung von α -1,3-Gal wurde mittels Massenspektrometrie bestätigt. Anti-Gal Antikörper wurden auf die mit Thyroglobulin beschichtete Platte gegeben und die Bindung an Thyroglobulin wurde mittels HRP-konjugiertem Detektionsantikörper detektiert (Abbildung 17).

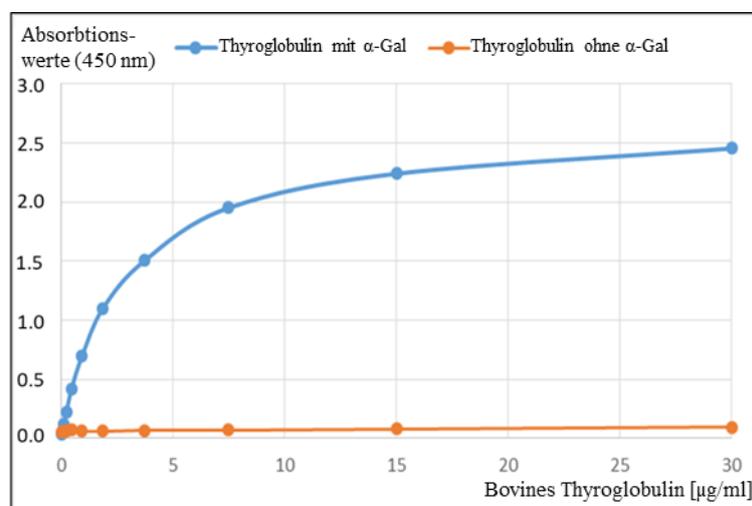


Abbildung 17: Analyse der Bindung von anti-Gal an bovines Thyroglobulin.

Verschiedene Mengen von bovinem Thyroglobulin wurden zur Beschichtung der Mikrotiterplatte eingesetzt. Die blaue Kurve zeigt detektierte Absorbationswerte bei nativem Thyroglobulin mit α -Gal-Strukturen, wohingegen die orangene Kurve die Absorbationswerte von Thyroglobulin mit enzymatisch abgespaltenen α -Gal-Strukturen zeigt. Absorbationswerte wurden mit HRP-konjugiertem anti-human IgG (1:10000) detektiert. Fehlerindikatoren sind in den Markierungspunkten der Kurven.

Der Thyroglobulin-ELISA zeigte, dass anti-Gal Antikörper nur an unverdautes Thyroglobulin mit α -Gal Epitopen gebunden hatte. Detektierte Absorbationswerte stiegen mit der Menge an beschichtetem, unverdaulichem Thyroglobulin und erreichten ab einer eingesetzten Beschichtungskonzentration von 15 $\mu\text{g/ml}$ einen Sättigungszustand. Ab dieser Konzentration waren alle eingesetzten anti-Gal Antikörper an α -Gal Epitope auf Thyroglobulin gebunden, wodurch eine Erhöhung der Beschichtungskonzentration keine weitere Erhöhung der Absorption mit sich brachte. Anti-Gal Antikörper banden nicht an verdautes Thyroglobulin, wodurch erneut bestätigt wurde, dass terminale α -1,3-Gal-Strukturen notwendig für die Interaktion sind.

3.2.3 Nachweis der Spezifität mit synthetischem BSA- α -Gal Konjugat

Zur detaillierteren Untersuchung der Affinität von anti-Gal Antikörpern zum α -Gal Epitop, beziehungsweise zum α -Gal-Disaccharid (Gal- α -1,3-Gal), wurde ein weiterer ELISA Assay durchgeführt, in dem ein synthetisches und kommerziell erhältliches BSA- α -Gal Konjugat zur Beschichtung einer 96-Well-Mikrotiterplatte eingesetzt wurde.

Anti-Gal Antikörper wurden zuvor mit verschiedenen, molaren Überschüssen vom α -Gal Epitop (GlcNAc- β -1,4-Gal- α -1,3-Gal) und dem α -Gal-Disaccharid (Gal- α -1,3-Gal) inkubiert. Die mit den Glykanepitopen inkubierten Antikörper wurden auf die Platte mit beschichtetem BSA- α -Gal-Konjugat gegeben. Das Bindungsverhalten wurde durch die Detektion mittels HRP-konjugiertem anti-human IgG untersucht. Berechnete Absorbtionswerte wurden in Abbildung 18 dargestellt und beschreiben das Bindungsverhalten vom anti-Gal Antikörper an BSA- α -Gal abhängig vom molaren Überschuss des bei der Präinkubation eingesetzten α -Gal Epitops, beziehungsweise des α -Gal-Disaccharids.

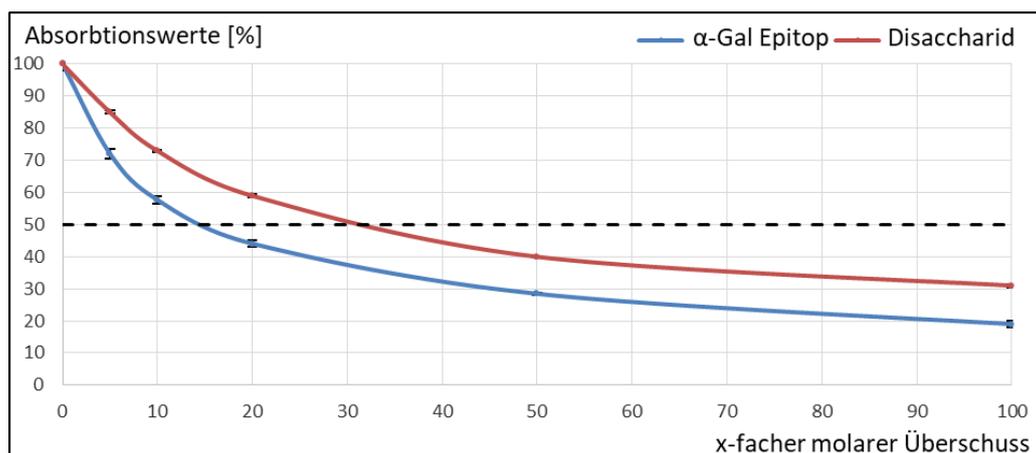


Abbildung 18: Inhibitorischer ELISA zur Analyse der Bindungsaffinität an BSA- α -Gal.

Der anti-Gal Antikörper wurde mit verschiedenen molaren Überschüssen vom α -Gal Epitop, beziehungsweise dem α -Gal Disaccharid inkubiert. Die Bindung von anti-Gal Antikörpern an BSA- α -Gal wurde mit HRP-konjugiertem anti-human IgG detektiert. Berechnete Absorbationswerte wurden relativ zueinander quantifiziert.

Die Absorbationswerte verringerten sich je höher der molare Überschuss an eingesetzten Glykanepitopen in der Präinkubation mit dem anti-Gal Antikörper gewählt wurde. Es konnte beobachtet werden, dass ein 15-facher, molarer Überschuss vom α -Gal Epitop ausreichte um die Bindung vom anti-Gal Antikörper an BSA- α -Gal um 50% zu inhibieren. Im Gegensatz dazu war ein 30-facher, molarer Überschuss des α -Gal-Disaccharids notwendig um in gleichem Maße inhibierend zu wirken. Damit konnte gezeigt werden, dass etwa doppelt so viele Moleküle des α -Gal-Disaccharids im Vergleich zum α -Gal Epitop für eine 50%-ige Inhibierung der Interaktion notwendig waren.

3.3 Nachweis der Spezifität mittels Oberflächenplasmonresonanz

Die bisher durchgeführten ELISA Assays gaben Auskunft darüber, an welche Glykanepitope der gereinigte anti-Gal Antikörper gebunden hatte. All diese Informationen gaben jedoch keine Information über die Bindungsaffinität. Zur detaillierteren Analyse wurden die bereits in den ELISA Assays eingesetzten, biotinylierten Glykanepitope auf einem mit Streptavidin vorbeschichtetem SPR-Chip immobilisiert und mittels SPR analysiert. Unterschiedliche Mengen vom anti-Gal Antikörper wurden als Analyten im Biacore T200 eingesetzt und befanden sich in der Flusszelle über dem mit Glykanepitopen beschichtetem Chip im Fluss. Das Bindungsverhalten der Analyten (anti-Gal Antikörper) an den Liganden (immobilisierte Glykanepitope) wurde durch die Veränderung der Masse auf dem Chip detektiert. Eine Massenänderung führte zu einer detektierbaren Änderung des Brechungswinkels von einfallendem Licht auf den Chip. Die Dissoziationskonstante K_D jeder Interaktion wurde anhand des Kurvenverlaufs der Assoziations- und Dissoziationsphase sowie der maximalen Änderung des Reflektionswinkels berechnet. Die Sensogramme für verschiedene, immobilisierte Glykanepitope als Liganden und anti-Gal Antikörper als Analyten wurden erstellt und sind in Abbildung 19 und Abbildung 20 gezeigt.

Die durch Oberflächenplasmonresonanz ermittelten Dissoziationskonstanten der Interaktionen zwischen anti-Gal Antikörpern und Glykanepitopen bestätigten die bereits in den ELISA Assays bestimmten Bindungsdaten. Mittels SPR konnte eine Bindung des anti-Gal Antikörpers nur an Glykanepitope mit terminalen α -1,3-Gal-Strukturen detektiert werden. Eine Bindung an das B-Antigen konnte nicht nachgewiesen werden. Der anti-Gal Antikörper band an das α -Gal Epitop (GlcNAc- β -1,4-Gal- α -1,3-Gal) und an das α -Gal-Disaccharid (Gal- α -1,3-Gal). Die Funktionalität und Spezifität der Methode konnte anhand der Negativkontrolle bestätigt werden, da keine nachweisbare Bindung an beschichtetes α -Gal Epitop erfolgte. Die berechneten Dissoziationskonstanten von jeder analysierten Interaktionen wurden in Tabelle 4 zusammengefasst.

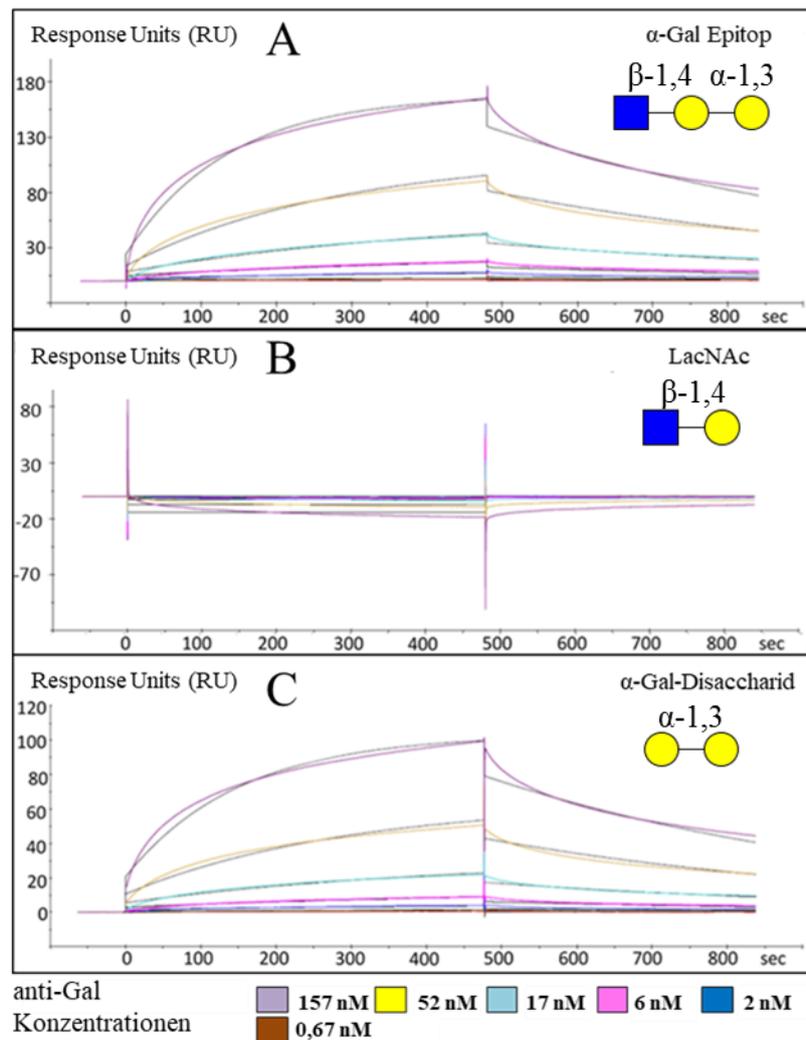


Abbildung 19: Affinitätsanalyse vom anti-Gal Antikörper (1).

Gezeigt sind drei Sensogramme der kinetischen Affinitätsanalysen von den Interaktionen zwischen dem anti-Gal Antikörper und verwendeten Glykanepitopen. Verschiedene Mengen von anti-Gal Antikörpern wurden in den Flusskanal injiziert und die Bindung zu immobilisierten Glykanepitopen (α -Gal Epitop (A), LacNAc (B) und dem α -Gal-Disaccharid (C)) wurde analysiert. Graue Linien zeigen die von der Biacore-Software berechneten Bindungskurven. Die Dissoziationskonstanten K_D für jede Interaktionen wurden, falls möglich, von der Biacore-Software berechnet (Tabelle 4). Die in der Abbildung gezeigten Monosaccharide wurden mittels folgender Symbole visualisiert: GlcNAc (■), Gal (●).

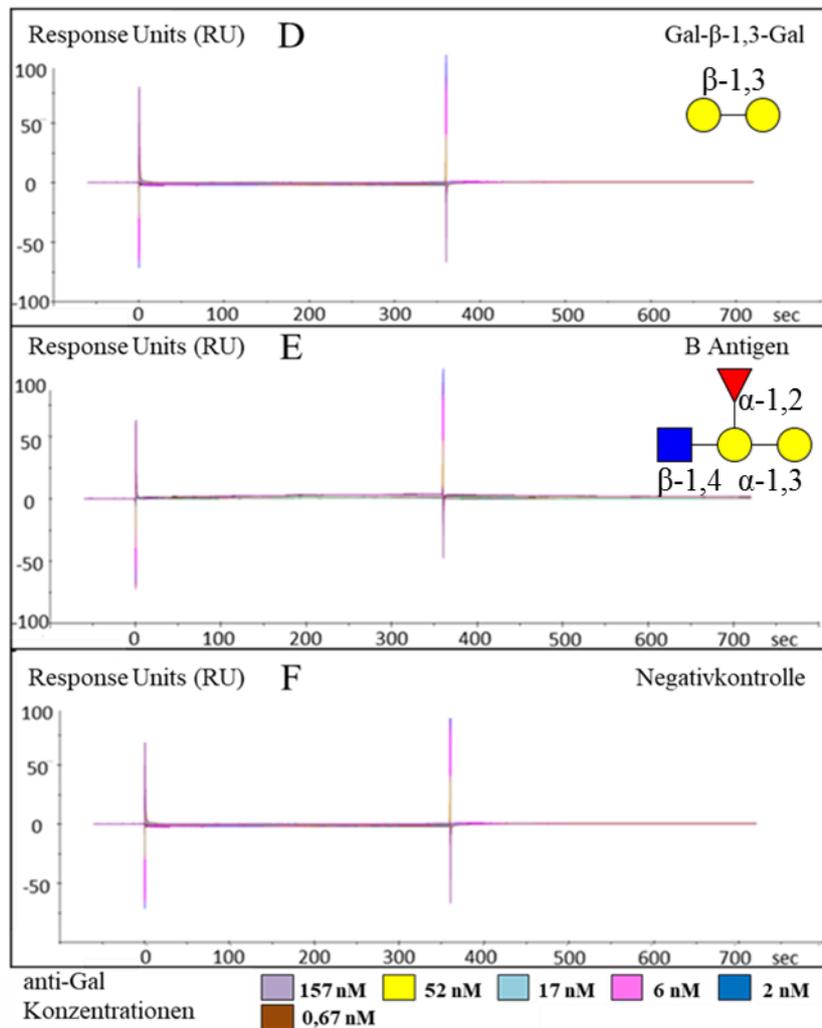
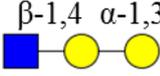
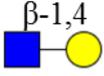
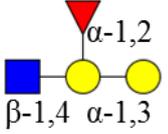


Abbildung 20: Affinitätsanalyse vom anti-Gal Antikörper (2).

Gezeigt sind drei Sensogramme der kinetischen Affinitätsanalysen von den Interaktionen zwischen dem anti-Gal Antikörper und verwendeten Glykanepitopen. Verschiedene Mengen von anti-Gal Antikörpern wurden in den Flusskanal injiziert und die Bindung zu immobilisierten Glykanepitopen (Gal-β-1,3-Gal (D), B Antigen (E); jeweils 200 RU) wurde analysiert. Die Dissoziationskonstanten dieser Interaktionen konnten aufgrund nicht vorhandener Bindungen nicht berechnet werden. Als Negativkontrolle wurde die Bindung eines anti-Blutgerinnungsfaktor VIII Antikörpers an das α-Gal Epitop gemessen (F). Die in der Abbildung gezeigten Monosaccharide wurden mittels folgender Symbole visualisiert: GlcNAc (■), Fuc (▲), Gal (●).

Tabelle 4: Übersicht von berechneten Dissoziationskonstanten K_D von Interaktionen zwischen anti-Gal Antikörper und verschiedenen, auf dem SPR-Chip immobilisierten Glykanepitopen. Die berechneten K_D -Werte wurden zusammen mit entsprechenden Liganden und Beschichtungsdichten zusammengefasst. Die in der Tabelle gezeigten Monosaccharide wurden mittels folgender Symbole visualisiert: GlcNAc (■), Fuc (▲), Gal (●).

Immobilisierter Ligand	Immobilisierungsdichte [RU]	K_D -Wert der Interaktion mit anti-Gal [nM]
α -Gal Epitop (GlcNAc- β -1,4-Gal- α -1,3-Gal) 	200	144 ± 20
<i>N</i> -acetyllaktosamin (LacNAc) (GlcNAc- β -1,4-Gal) 	200	Keine Bindung vorhanden
α -Gal-Disaccharid (Gal- α -1,3-Gal) 	200	191 ± 18
β -Gal-Disaccharid (Gal- β -1,3-Gal) 	200	Keine Bindung vorhanden
B Antigen (GlcNAc- β -1,4-Gal-[α -1,2-Fuc]- α -1,3-Gal) 	200	Keine Bindung vorhanden

Die ermittelten K_D -Werte waren sich untereinander sehr ähnlich und lagen in einem Bereich zwischen 150 und 200 nM. Die Wahl des Liganden (α -Gal Epitop oder α -Gal-Disaccharid) hatte demzufolge keinen großen Einfluss auf die Bindungsaffinität.

Zusätzlich zur Interaktion vom anti-Gal Antikörper zu Glykanepitopen wurde die Affinität von anti-Gal zu einem α -Gal-tragenden Glykoprotein untersucht. Diese Erweiterung des Experiments hatte zum Ziel, die möglichen Effekte von α -Gal Epitopen auf einem Glykoprotein, durch beispielsweise verschiedene Zugänglichkeiten oder Proteinkonformationen, mit in die Analyse der Bindungsaffinität einzubeziehen. Als exemplarisches Glykoprotein

wurde bovines Thyroglobulin ausgewählt und als Analyt verwendet. Der anti-Gal Antikörper wurde biotinyliert und als Ligand auf einem Streptavidin-vorbeschichtetem SPR-Chip immobilisiert. Verschiedene Mengen an Thyroglobulin wurden in den Flusskanal injiziert und die Bindung an anti-Gal wurde analysiert (Abbildung 21).

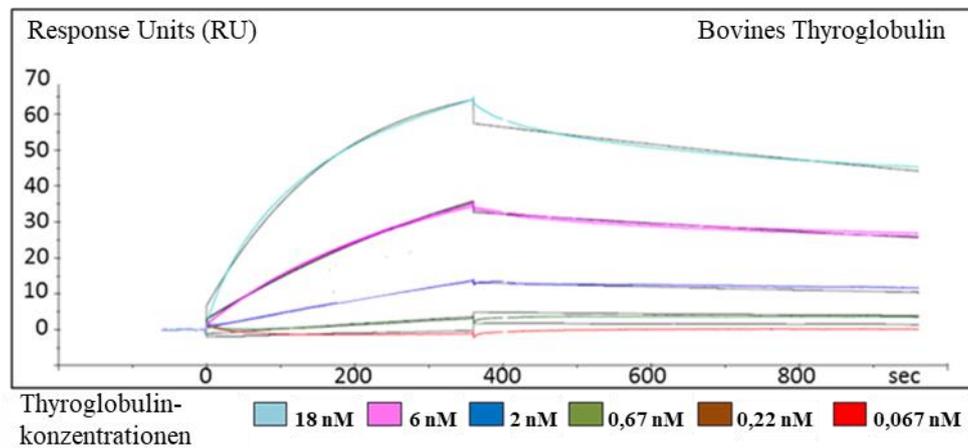


Abbildung 21: Interaktion zwischen dem anti-Gal Antikörper und bovinem Thyroglobulin.

Gezeigt ist ein Sensogramm der kinetischen Affinitätsanalyse von der Interaktion zwischen dem anti-Gal Antikörper und bovinem Thyroglobulin. Verschiedene Mengen von Thyroglobulin wurden in den Flusskanal injiziert und die Bindung zu immobilisiertem anti-Gal Antikörper (3000 RU) wurde analysiert. Graue Linien zeigen die von der Biacore-Software approximierten Bindungskurven. Die Dissoziationskonstante K_D für die Interaktion wurde von der Biacore-Software berechnet

Die Dissoziationskonstante K_D für die Interaktion zwischen dem anti-Gal Antikörper und Thyroglobulin wurde zu $1,6 \pm 0,4$ nM ermittelt. Die ermittelte Dissoziationskonstante war deutlich geringer als der K_D -Wert der Interaktion vom anti-Gal Antikörper mit den Glykanepitopen (siehe Tabelle 4).

3.4 Nachweis der Antikörperspezifität mittels Erythrozytenagglutination

Die Spezifität von anti-Gal Antikörpern gegenüber dem α -Gal Epitop wurde ursprünglich von Galili *et al.* mit einem Erythrozytenagglutinationsassay nachgewiesen (siehe 1.5). Das Ziel des in dieser Arbeit durchgeführten Agglutinationsassays war es, die Bindung vom anti-Gal Antikörper an rote Blutzellen von Kaninchen im Vergleich zu humanen Erythrozyten qualitativ nachzuweisen. Serielle Verdünnungen vom anti-Gal Antikörper wurden mit 0,9% NaCl verdünnt und in die Wells einer Rundboden-Wellplatte pipettiert. Rote Blutzellen von Menschen oder Kaninchen wurden zugegeben und für 24 h bei Raumtemperatur mit den anti-Gal Antikörpern inkubiert. Antikörper gegen das Blutgruppe A Antigen wurden als Kontrolle zur Detektion der humanen Erythrozyten verwendet, nachdem mittels Immunopräzipitation festgestellt wurde, dass sie Blutgruppe A aufwiesen. Als Negativkontrolle wurden Erythrozyten ohne Antikörper in die Wells der Rundbodenplatte gegeben. Eine Fotoaufnahme der Erythrozytenagglutination ist in Abbildung 22 gezeigt.

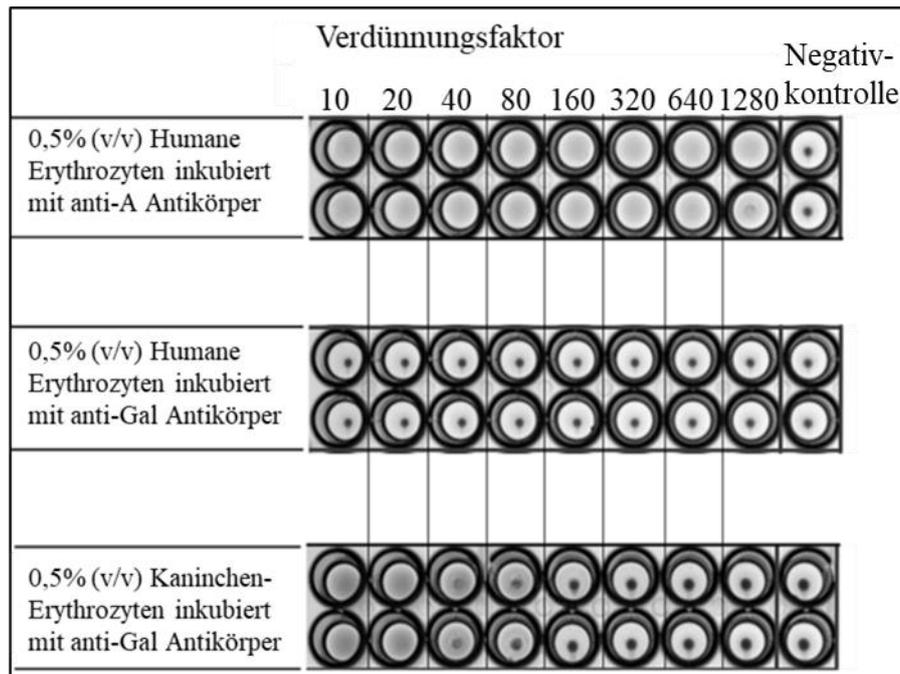


Abbildung 22: Nachweis der anti-Gal Spezifität mittels Erythrozytenagglutination.

Serielle Verdünnungen vom anti-Gal Antikörper (1:10 bis 1:1280) wurden in die Wellplatte pipettiert und mit humanen Erythrozyten (Reihe 1 und 2) und mit Kaninchenerythrozyten (Reihe 3) inkubiert. Der anti-A Antikörper wurde ausschließlich auf humane Erythrozyten angewendet. Ohne Antikörper inkubierte Erythrozyten wurden als Negativkontrolle eingesetzt.

Für einen qualitativen Bindungsnachweis gereinigter anti-Gal Antikörper wurden sowohl humane Erythrozyten (keine Expression von α -Gal), als auch Erythrozyten von Kaninchen (tragen α -Gal) verwendet.

Die Bindung von Antikörpern an Glykanepitope auf Erythrozyten führt zur Ausbildung eines Zell-Zell Netzwerkes, indem die Zellen einen Rasen ausbilden und an den Rändern der Wells haften bleiben. Falls keine Bindung von Antikörpern an Erythrozyten erfolgt, können sich die Zellen untereinander nicht verbinden. Sie gleiten entlang der Wände des Rundboden-Wells hinunter auf den Grund, wo sie einen gut sichtbaren Klumpen bilden. Der eingesetzte anti-A Antikörper zeigte bei allen Verdünnungsfaktoren eine Vernetzung von humanen Erythrozyten. Durch die Klumpenbildung der humanen Erythrozyten nach der Inkubation mit dem anti-Gal Antikörper konnte gezeigt werden, dass sich auf humanen Erythrozyten keine α -Gal Epitope befinden. Der anti-Gal Antikörper vernetzte nur rote Blutzellen von Kaninchen bis zu einem Verdünnungsfaktor zwischen 40 und 80. Mit der Erythrozytenagglutination konnte bestätigt werden, dass der anti-Gal Antikörper nicht an humane Erythrozyten, sondern nur an Kaninchen-Erythrozyten gebunden hatte.

3.5 Detektion von α -Gal-tragenden Proteinen mittels Western Blot

Nachdem die Spezifität von gereinigtem anti-Gal Antikörper gegenüber dem α -Gal Epitop bestätigt und nachgewiesen wurde, war es nun das Ziel, die Eignung der gereinigten Antikörper als Detektionsantikörper im Western Blot zu untersuchen. Der anti-Gal Antikörper wurde zunächst als Primärantikörper in Kombination mit einem sekundären, HRP-konjugiertem Detektionsantikörper zur Detektion von α -Gal-tragenden Proteinen eingesetzt. Die Detektion von α -Gal Epitopen auf dem monoklonalen Antikörper Cetuximab war auf diese Weise nicht möglich, da es sich um einen humanisierten Antikörper handelt (234). Aufgrund der Spezifität des oben genannten, sekundären Detektionsantikörpers für humanes IgG, band der Sekundärantikörper an Cetuximab und verfälschte die Detektion des α -Gal Epitops durch den anti-Gal Antikörper. Aus diesem Grund wurde der anti-Gal Antikörper mit HRP konjugiert (siehe 2.8) um ohne Sekundärantikörper direkt zur Detektion von α -Gal-tragenden Proteinen eingesetzt werden zu können. Schließlich wurden die α -Gal-tragenden Proteine bovines Thyroglobulin, BSA- α -Gal und Cetuximab zunächst via Gelelektrophorese getrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Die Proteine wurden vor der Gelelektrophorese entweder reduziert und alkyliert, mit α -1,3-Galaktosidase verdaut oder mit der IdeZ-Protease verdaut. Als Negativkontrolle wurde BSA zusätzlich auf das Gel aufgetragen und schließlich geblottet. Die geblotteten Proteine wurden mittels dem hergestellten anti-Gal-HRP Konjugat detektiert (Abbildung 23).

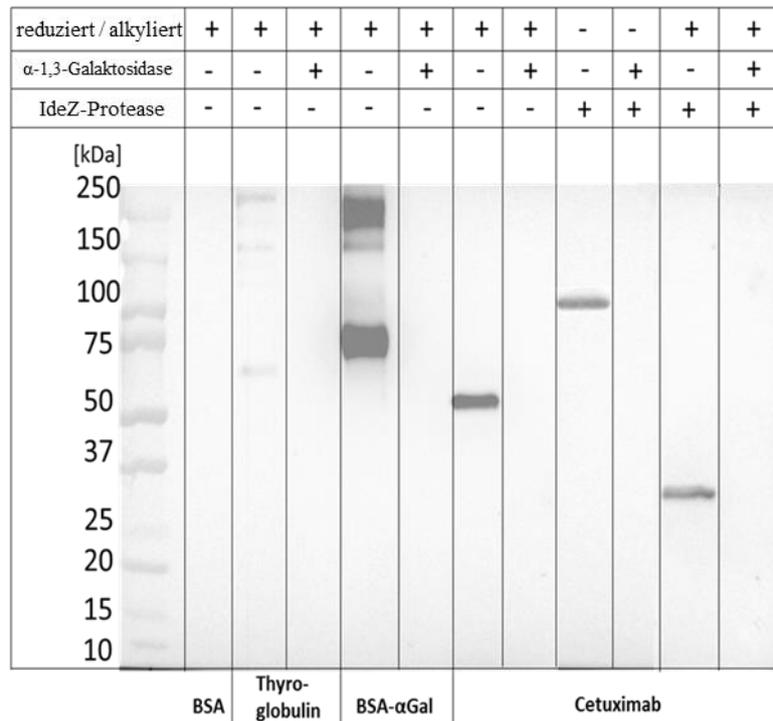


Abbildung 23: Nachweis des α -Gal Epitops mittels Western Blot.

BSA, bovines Thyroglobulin, BSA- α -Gal Konjugat und Cetuximab wurden via Gelelektrophorese (8-16% Tris-Glycin) getrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. BSA diente als Negativkontrolle. Vor der Elektrophorese durchgeführte Probenvorbereitungen wie Reduktion und Alkylierung, Abspaltung von α -Gal mit α -1,3-Galaktosidase oder Spaltung der Hinge-Region mit IdeZ-Protease wurden durch „+“ (angewendet) und „-“ (nicht angewendet) dokumentiert. Der Probenauftrag der Proteine betrug 1 μ g. Die Detektion erfolgte mittels HRP-gekoppeltem anti-Gal Antikörper (1:4000 in Blockpuffer).

Das Western Blot Experiment zeigte, dass der anti-Gal Antikörper weder an BSA, noch an eines der mit α -1,3-Galaktosidase gespaltenen Glykoproteine gebunden hatte. Dies verdeutlichte abermals die Spezifität des anti-Gal Antikörpers zum α -Gal Epitop.

Unverdautes Thyroglobulin konnte von HRP-konjugiertem anti-Gal Antikörper detektiert werden. α -Gal-Strukturen wurden auf Proteinfragmenten zwischen 60 und 250 kDa nachgewiesen. Die unterschiedliche Größe der Fragmente von Thyroglobulin lässt sich anhand der durchgeführten Reduktion der Disulfidbrücken erklären, was bereits in Literatur mittels reduzierender Gelelektrophorese und verschiedenen Proteasen gezeigt wurde (235). Unverdautes BSA- α -Gal wurde von HRP-konjugiertem anti-Gal Antikörper bei etwa 70 kDa detektiert. Detektierte Banden bis zu 250 kDa zeigten wahrscheinlich aggregiertes Protein.

Es konnte gezeigt werden, dass Cetuximab α -Gal-Strukturen auf seinen Fab-Regionen trägt, weil es nach der Spaltung der Hinge-Region durch die IdeZ-Protease vom HRP-konjugierten anti-Gal Antikörper bei 100 kDa detektiert wurde. Reduziertes Cetuximab wurde vom anti-Gal Antikörper bei 50 kDa detektiert, wodurch die in der Literatur belegte Existenz von α -Gal auf den schweren Ketten des Antikörpers (157) bestätigt wurde. Das gleichzeitige

Spalten der Hinge-Region und Reduzierung des Antikörpers führte zu detektierten Fragmenten bei 25 kDa.

3.6 Das Detektionslimit vom anti-Gal Antikörper im Western Blot

Das Detektionslimit von HRP-konjugiertem anti-Gal Antikörper stellt ein wichtiges Charakteristikum als Detektionsantikörper dar. Zur Bestimmung des Detektionslimits vom anti-Gal Antikörper wurden verschiedene Mengen von Cetuximab zunächst gelelektrophoretisch unter reduzierenden Bedingungen getrennt und anschließend geblottet. α -Gal Epitope auf Cetuximab wurden mit dem HRP-konjugierten anti-Gal Antikörper detektiert (Abbildung 24). Cetuximab konnte zur Ermittlung des Detektionslimits verwendet werden, weil die Anzahl an α -Gal Strukturen auf dem Protein bekannt ist und bereits in der Literatur mittels durchgeführter Glykananalytik beschrieben wurde (236).

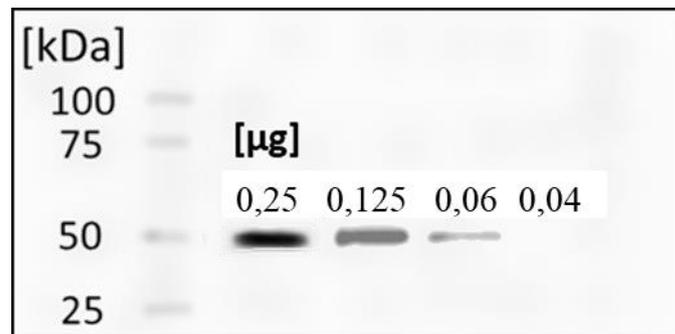


Abbildung 24: Bestimmung des Detektionslimits vom anti-Gal Antikörper.

Verschiedene Mengen von Cetuximab wurden mittels dem anti-Gal-HRP Konjugat (1:4000 in Blockpuffer) zur Bestimmung des Detektionslimits via Western Blot detektiert.

HRP-konjugierter anti-Gal Antikörper konnte Cetuximab bis zu einer Menge von 0,06 μ g nachweisen (0,42 pmol). Eine biantennäre Glykanstruktur wurde als dominierendes α -Gal-tragendes Glykan identifiziert. Dies wurde mittels Glykananalytik in Literatur (237) sowie in dieser Arbeit nachgewiesen (siehe 3.7). Eine weitere *N*-Glykananalytik von Cetuximab bestätigte, dass das Protein über zwei *N*-Glykosylierungsstellen verfügt (238) (siehe auch 1.3), wodurch von einer Anzahl von 4 α -Gal-Strukturen pro Molekül ausgegangen werden kann. Daher konnte das Detektionslimit von HRP-konjugiertem anti-Gal Antikörper auf 1,68 pmol (4 x 0,42 pmol) an α -Gal Epitopen berechnet werden.

Um die Eignung von HRP-gekoppeltem anti-Gal Antikörper weiter zu untersuchen, wurde er zur Detektion von Cetuximab in Kombination mit rekombinantem Faktor VIII, Kogenate und Nuwiq, eingesetzt. Nuwiq sollte hierbei als Negativkontrolle dienen, weil dieser rekombinante Faktor VIII in einer menschlichen Zelllinie, unfähig zur Synthese von α -Gal, exprimiert wurde (239). Es wurden gleiche Mengen von Nuwiq und Kogenate auf das Gel aufgetragen

und anschließend auf eine Membran geblottet. Kogenate und Nuwiq sind rekombinante Faktor VIII-Präparate und beide bestehen aus einer leichten (75 kDa) und einer schweren (85 kDa) Kette. Im Gegensatz zu Nuwiq verfügt Kogenate zusätzlich über die B-Domäne, die schwere und leichte Kette in Kogenate miteinander verbindet (siehe 1.4.2). Kogenate ist ein full-length FVIII Produkt mit einem Molekulargewicht von ca. 250 kDa und Nuwiq ist ein B-Domain-deleted FVIII mit einem Molekulargewicht von ca. 170 kDa. Für Cetuximab wurden zwei Konzentrationen rund um das Detektionslimit vom anti-Gal Antikörper gewählt (0,4 und 0,6 pmol). Alle Proteine wurden sowohl unverdaut, als auch mit α -1,3-Galaktosidase gespalten, eingesetzt (Abbildung 25).

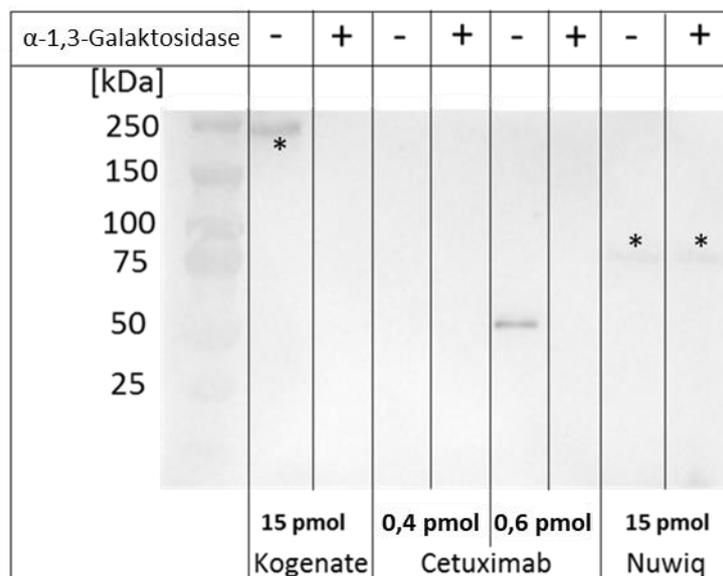


Abbildung 25: Western Blot von Kogenate, Cetuximab und Nuwiq.

Cetuximab wurde reduziert und in zwei Konzentrationen nahe des zuvor ermittelten Detektionslimits eingesetzt. Von Kogenate und Nuwiq wurden äquimolare Mengen verwendet. Die vorherige Abspaltung von α -Gal mittels α -1,3-Galaktosidase wurde mit einem „+“ (angewendet) oder mit einem „-“ (nicht angewendet) dokumentiert. Schwache Signale von rekombinantem Faktor VIII wurden mit einem Sternchen markiert. Die Detektion erfolgte mit HRP-konjugiertem anti-Gal Antikörper (1:4000).

HRP-konjugierter anti-Gal Antikörper detektierte 15 pmol von unverdautem Kogenate und 0,6 pmol von unverdautem Cetuximab. Obwohl Kogenate in reduzierendem Probenpuffer auf das Gel aufgetragen wurde, detektierte HRP-konjugierter anti-Gal Antikörper nur das Gesamtprotein bei einem Molekulargewicht von 250 kDa und nicht seine schwere und leichte Kette oder die B-Domäne. Der Grund dafür könnte die, durch die Konformation und Anordnung der Ketten bedingte, höhere Dichte verfügbarer Bindungsstellen am Gesamtprotein sein, wodurch Bindungen vom anti-Gal Antikörper wahrscheinlicher werden. Zusätzlich hatte der anti-Gal Antikörper schwach an Nuwiq gebunden, obwohl dieser rekombinante Faktor VIII, aufgrund seiner Expression in einer humanen Zelllinie, keine α -Gal-Strukturen tragen sollte (siehe 1.4.2). Die Bindung von anti-Gal an Kogenate und Cetuximab wurde als spezifisch angesehen, weil der anti-Gal Antikörper nicht an die mit

α -1,3-Galaktosidase gespaltenen Glykoproteine gebunden hatte. Aufgrund der Bindung an Nuwiq, sowohl unverdaut, als auch mit α -1,3-Galaktosidase behandelt, ist es wahrscheinlich, dass es sich um eine unspezifische Bindung handelte oder, dass sich unter den gereinigten anti-Gal Antikörpern einige Antikörper befinden, die bei den hier eingesetzten Konzentrationen an Nuwiq gebunden hatten. Als Konsequenz war es erforderlich, die Ergebnisse des Western Blots mittels konventioneller Glykananalytik zu verifizieren.

3.7 N-Glykananalytik vom anti-Gal Antikörper und von Modellproteinen

3.7.1 Effizienz der N-Glykanfreisetzung von verwendeten Proteinen

Die Glykosylierung eines Proteins kann Einfluss auf eine Vielzahl von verschiedenen Effektorfunktionen, die das glykosylierte Protein aufweist, ausüben. Aus diesem Grund ist es entscheidend, die Glykosylierung, insbesondere von therapeutischen Antikörpern, zu kennen, um negative Einflüsse frühzeitig zu erkennen und beheben zu können. Das Ziel der N-Glykananalytiken war die Analyse der N-Glykane von den in dieser Arbeit genutzten Modellproteinen und die Verifizierung der im Western Blot ermittelten Bindungseigenschaften vom anti-Gal Antikörper gegenüber α -Gal-tragenden Glykoproteinen (siehe 3.5). Obwohl die Glykosylierung von Antikörpern im Allgemeinen bereits intensiv mittels LC-MS studiert wurde (240–242), liegen bisher keine Glykananalytiken vom anti-Gal Antikörper vor. Daher stellt die Glykosylierung von anti-Gal einen essenziellen Aspekt als Teil der Antikörpercharakterisierung dar. Um die N-Glykosylierungsprofile des anti-Gal Antikörpers und von den in dieser Arbeit verwendeten Modellproteinen, wie Cetuximab, Thyroglobulin und rekombinanter Faktor VIII, zu analysieren, wurden die N-Glykane zunächst mittels PNGase F freigesetzt (siehe 2.13.1). Zum Nachweis der Abspaltung von N-Glykanen wurden de-N-glykosylierte Proteine zusammen mit unverdauten Glykoproteinen mittels Gelelektrophorese verglichen. Als weitere Referenz wurden die N-Glykane analysierter Glykoproteine mit einer orthogonalen Methode freigesetzt (siehe 2.13.1). Der anti-Gal Antikörper und Cetuximab wurden zusätzlich mit der IdeZ-Protease bei der Hinge-Region gespalten. Die mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbten Gele sind in Abbildung 26 und Abbildung 27 gezeigt.

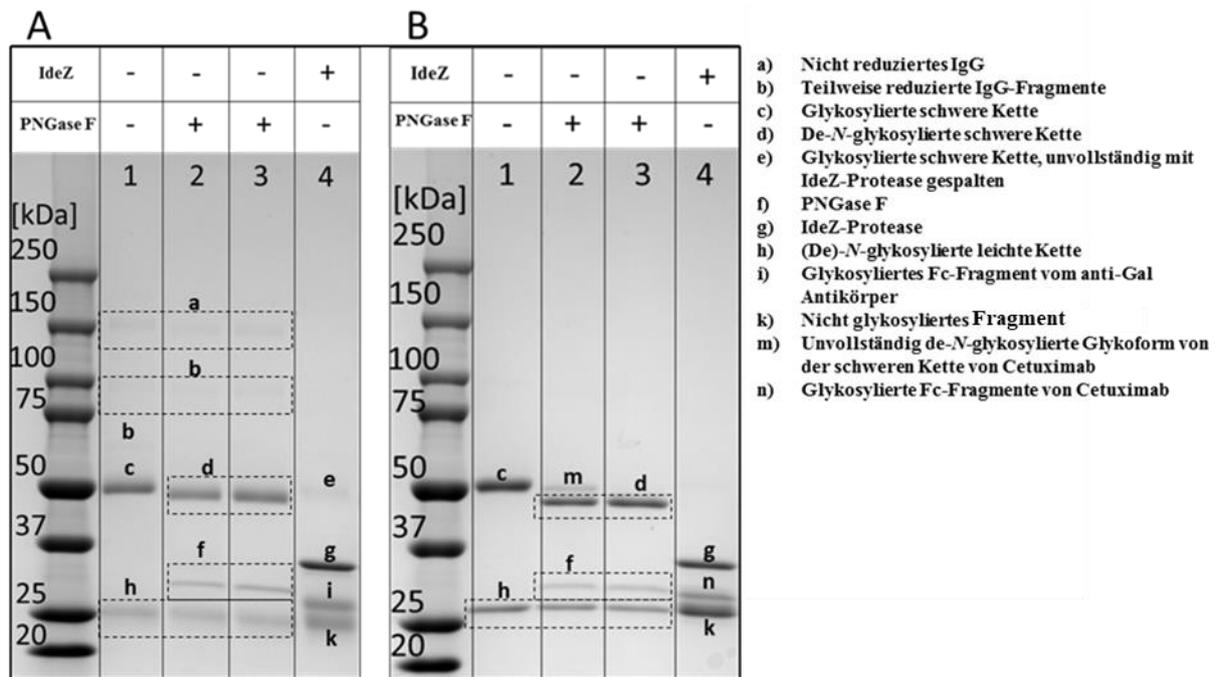


Abbildung 26: Gelelektrophorese vom anti-Gal Antikörper (A) und Cetuximab (B).

Gezeigt ist eine Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen auf einem 8-16% Tris-Glycin-Gradientengel zum Nachweis der *N*-Glykanfreisetzung vom anti-Gal Antikörper und Cetuximab. Die Spaltung in der Hinge-Region, beziehungsweise die Freisetzung von *N*-Glykanen vor der Gelelektrophorese wurden entsprechend mit „+“ (angewendet) oder „-“ (nicht angewendet) dokumentiert. Die Spuren 1, 2, 3 und 4 zeigen unverdaute (1), de-*N*-glykosylierte (Methode von New England Biolabs) (2), de-*N*-glykosylierte (Methode von Waters GmbH) (3) und IdeZ-gespaltene (4) Antikörper. Es wurden jeweils 5 µg Antikörper eingesetzt. Das Gel wurde mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt.

Die Reduktion der Antikörper bewirkte eine Aufspaltung der Disulfidbrückenbindungen, wodurch sich die schweren von den leichten Ketten lösten und jeweils separat bei 50 und 25 kDa angefärbt werden konnten („c“, „d“, „e“, „m“, „h“). Die Abspaltung von *N*-Glykanen vom anti-Gal Antikörper konnte durch den Massenunterschied von de-*N*-glykosyliertem anti-Gal („d“) zu unverdaulichem Antikörper („c“) bestätigt werden. Die durchgeführte Freisetzung von *N*-Glykanen gemäß der Vorschrift der Waters GmbH war ebenso effizient wie die Freisetzung gemäß der Vorschrift von New England Biolabs, was durch die Banden („d“) gezeigt wurde. Die konservierte *N*-Glykosylierungsstelle auf der Fc-Region bei Asn²⁹⁷ konnte anhand der Banden „i“ für anti-Gal und „n“ für Cetuximab nachgewiesen werden. Es handelte sich bei dieser Bande um ein glykosyliertes Fc-Fragment, da ihre Masse nur leicht größer als die vom unglykosyliertem Fragment („k“) war. Verbleibende Banden zeigten nicht-reduziertes IgG („a“), unvollständig reduzierte Fragmente („b“), die IdeZ-Protease („g“) sowie die PNGase F („f“). Im Wesentlichen zeigten die *N*-Glykan-Freisetzungen bei Cetuximab identische Ergebnisse. Ein beobachteter Unterschied war jedoch Bande „m“, bei der es sich vermutlich um eine unvollständig de-*N*-glykosylierte Glykoform der schweren Kette von Cetuximab handelte. Diese Bande wurde nur bei Cetuximab unter Ausführung der Spaltungsreaktion gemäß der Vorschrift von New England Biolabs beobachtet. Die Methode

von Waters zeigte in dem Falle eine effizientere Abspaltung von *N*-Glykanen (Gel B, Spur 3, „d“). Mindestens eine weitere *N*-Glykosylierungsstelle konnte anhand der leicht diffusen Bande „n“ im Vergleich zur deutlichen Bande „i“ vom anti-Gal Antikörper nachgewiesen werden. Eine weitere, schwache Bande, fast unmittelbar über Bande „n“ lässt vermuten, dass sich weitere *N*-Glykosylierungsstellen auf Cetuximab, womöglich auf der Fab-Region befinden. Nachfolgend wurden die *N*-Glykane von bovinem Thyroglobulin, Nuwiq und Kogenate wie oben beschrieben, mit der Methode von Waters und als Vergleich mit der Methode von New England Biolabs freigesetzt. Ebenso wie bei den Antikörpern wurden die Proteine zum Nachweis der Abspaltung von *N*-Glykanen via Gelelektrophorese analysiert (Abbildung 27).

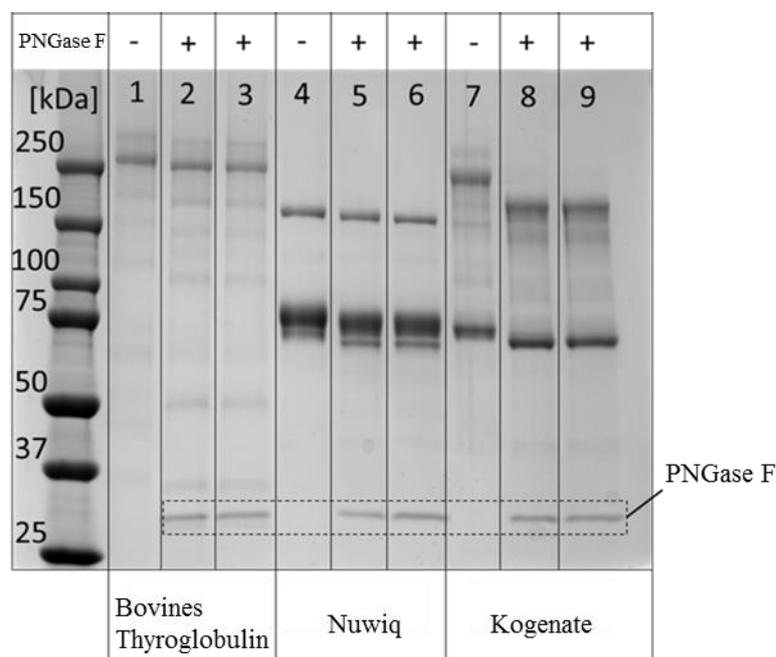


Abbildung 27: Gelelektrophorese von Thyroglobulin, Nuwiq und Kogenate.

Gezeigt ist eine Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen auf einem 8-16% Tris-Glycin-Gradientengel zum Nachweis der *N*-Glykanfreisetzung von eingesetzten Modellproteinen. Unverdaute Glykoproteine sind in den Spuren 1, 4 und 7 aufgetragen, de-*N*-glykosylierte Proteine wurden gemäß der Vorschrift von New England Biolabs (Spuren 2, 5 und 8) oder gemäß der Vorschrift von Waters GmbH (Spuren 3, 6 und 9). Es wurden jeweils 5 µg der Proteine eingesetzt. Das Gel wurde mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt.

Bovines Thyroglobulin wurde unverdaut eingesetzt (Spur 1). Die unterschiedlich großen Fragmente wurden durch die Reduktion von Disulfidbrückenbindungen erzeugt (175) und wurden im Massenbereich zwischen 50 und 250 kDa angefärbt. Der Massenunterschied zwischen der Bande von unverdaulichem Thyroglobulin (Spur 1) und den Banden von de-*N*-glykosyliertem Thyroglobulin (Spuren 2 und 3) sprach für eine effiziente Freisetzung von *N*-Glykanen. Beide angewendeten Freisetzungsmethoden waren gleichermaßen geeignet.

Nuwiq wurde ebenfalls in unverdaulichem Zustand (Spur 4) und mit abgespaltenen *N*-Glykanen (Spur 5 = Methode von New England Biolabs, Spur 6 = Methode von Waters) auf das Gel aufgetragen. Identische Massenunterschiede zeigten eine effiziente Freisetzung von *N*-Glykanen. Zwischen den Freisetzungsmethoden war kein Unterschied festzustellen.

Kogenate wurde auch in unverdaulichem Zustand (Spur 7) sowie de-*N*-glykosyliert auf das Gel aufgetragen (Spur 8 = Methode von New England Biolabs, Spur 9 = Methode von Waters). Gleiche Massenunterschiede zwischen glykosylierten und deglykosylierten Proteinbanden bestätigten die Freisetzung von *N*-Glykanen und wiesen Funktionalität und Effizienz von beiden getesteten Freisetzungsprotokollen nach.

3.7.2 *N*-Glykananalytik von α -Gal-tragenden Glykoproteinen

Nachdem bestätigt wurde, dass *N*-Glykane von den in dieser Arbeit verwendeten Modellproteinen und Antikörpern effizient und vollständig abgespalten werden konnten, wurden freigesetzte *N*-Glykane mit dem Fluorophor Rapifluor-MS markiert und via LC-MS, beziehungsweise LC-FLD analysiert. Ein mit Rapifluor-MS markierter Dextranstandard wurde verwendet, um detektierte Signale anhand spezifischer Glukose-Einheiten eine Retentionszeit-spezifische Glykanstruktur zuzuordnen (siehe 2.14). Diese Art der Zuweisung kann als Vorauswahl möglicher Strukturen verstanden werden. Im zweiten Schritt wurde das Masse/Ladungs-Verhältnis detektierter Signale massenspektrometrisch via LC-MS gemessen. Anhand der zugewiesenen Glukose-Einheiten und massenspektrometrisch gemessenen Masse-Ladungs-Verhältnissen konnte eine finale Zuweisung von Glykanstrukturen zu den detektierten Signalen erfolgen. Die zugeordneten Glykanstrukturen wurden als sogenannte “total ion chromatograms” (TIC) dargestellt. Ein “total ion chromatogram” entsteht, indem alle gemessenen Intensitäten aller aufgenommenen Massenspektren einer Messung bei entsprechenden Retentionszeiten aufsummiert werden.

3.7.2.1 Das *N*-Glykosylierungsprofil vom anti-Gal Antikörper

Die *N*-Glykane vom anti-Gal Antikörper wurden, wie oben beschrieben, enzymatisch freigesetzt (siehe 3.7.2) und mittels LC-MS analysiert. Das TIC der zugeordneten Glykanstrukturen zu detektierten Signalen ist in Abbildung 28 gezeigt.

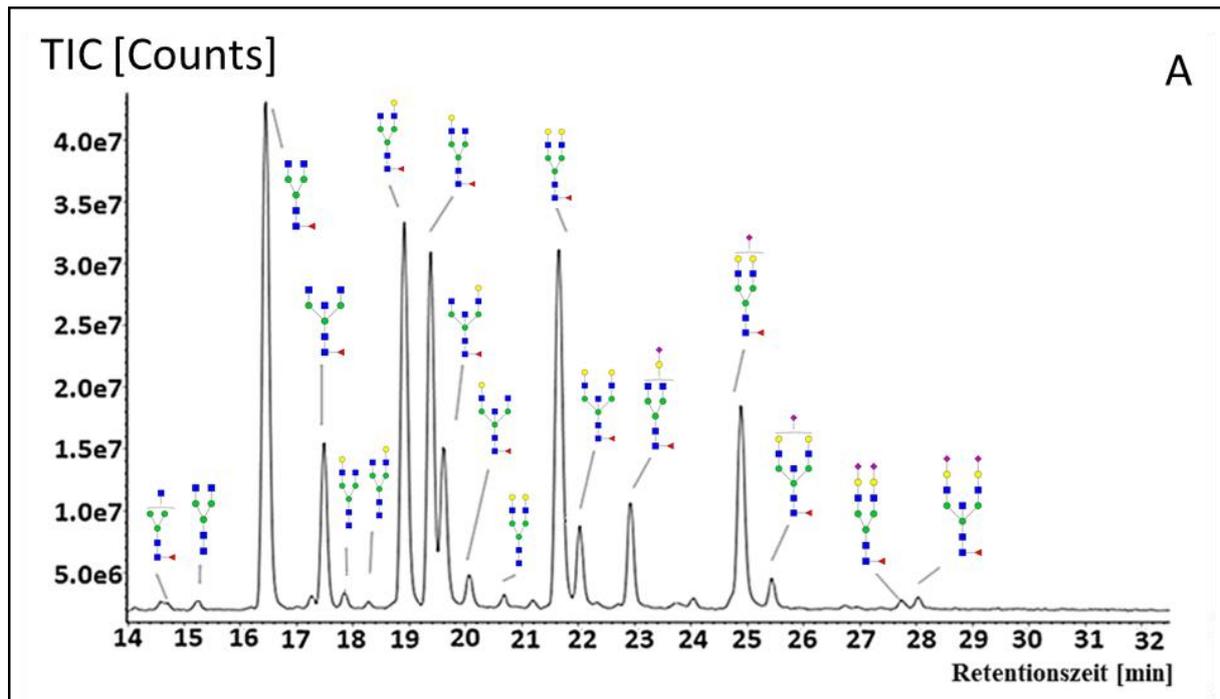


Abbildung 28: N-Glykosylierungsprofil vom anti-Gal Antikörper.

Gezeigt ist das „Total Ion Chromatogram“ von freigesetzten *N*-Glykanen vom anti-Gal Antikörper. Freigesetzte *N*-Glykane wurden via LC-MS analysiert. Ermittelte Glykanstrukturen wurden detektierten Signalen zugeordnet. Die Auswertung erfolgte mit der Waters UNIFI Software (Version 1.9.2). Die in der Abbildung gezeigten Monosaccharide wurden mittels folgender Symbole visualisiert: GlcNAc (■), Man (●), Fuc (▲), Gal (●), Neu5Ac (◆).

Die meisten aller detektierten *N*-Glykane (86%) trugen Fuc am unteren GlcNAc der Kernstruktur. Die häufigste Struktur war ein komplexes, Kern-fukosyliertes Glykan ohne Gal. 15% aller Strukturen verfügten über bisecting GlcNAc und 14% waren sialyliert (13% teilweise, 1% komplett). Nur weniger als 2% aller detektierten Signale konnten nicht identifiziert werden. Die relativen Häufigkeiten vorkommender Glykanstrukturen auf dem anti-Gal Antikörper wurden zusätzlich in Tabelle 5 im Vergleich zu den Glykanstrukturen der Modellproteine zusammengefasst.

3.7.2.2 Die *N*-Glykosylierungsprofile verwendeter Modellproteine

Die *N*-Glykane der Modellproteine wurden enzymatisch freigesetzt (siehe 3.7.1) und mit LC-MS analysiert. Die Zuweisung von Glykanstrukturen zu detektierten Signalen wurde so durchgeführt, wie oben beschrieben (siehe 3.7.2.1).

Zusätzlich zur Bestimmung von *N*-Glykanen war es das Ziel dieser Analytik, die erhaltenen Informationen für die Verifizierung der Ergebnisse aus den Western Blot Experimenten zu verwenden. Die durchgeführte Glykananalytik stellte in dem Sinne eine orthogonale Methode zur Detektion von α -Gal Epitopen dar, um die Eignung des anti-Gal Antikörpers als Detektionsantikörper zu überprüfen. Die zugeordneten Glykanstrukturen von Cetuximab und bovinem Thyroglobulin sind in Abbildung 29 als TIC gezeigt.

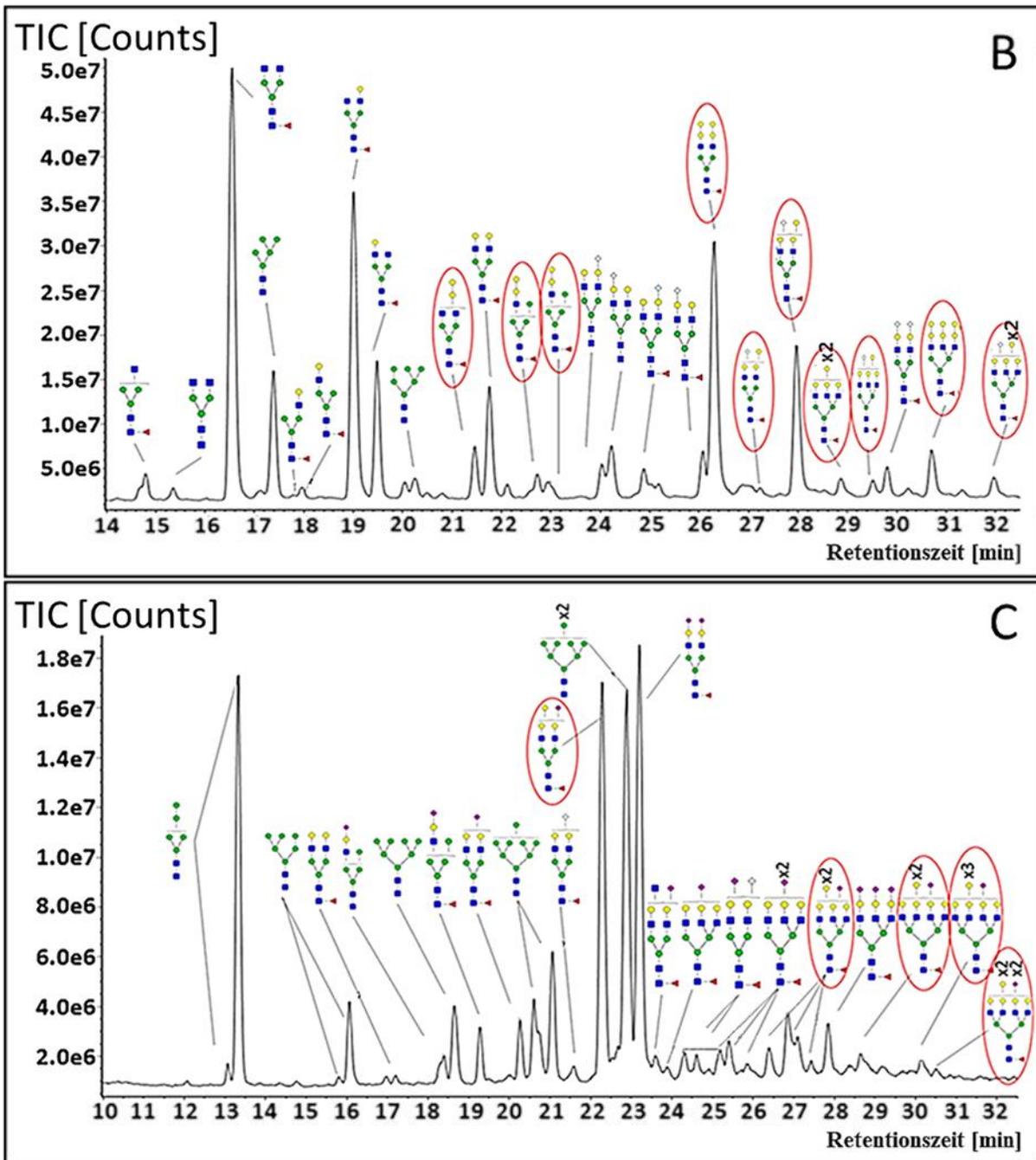


Abbildung 29: N-Glykosylierungsprofile von zwei Modellproteinen.

Gezeigt sind die „Total Ion Chromatograms“ der freigesetzten N-Glykane von Cetuximab (B) und von bovinem Thyroglobulin (C). Freigesetzte N-Glykane wurden via LC-MS analysiert. Entsprechende Glykanstrukturen wurden bestimmt und den detektierten Signalen zugeordnet. Die Auswertung erfolgte mit der Waters UNIFI Software (Version 1.9.2). Rot umrahnte Strukturen verfügen über α -Gal. Die in der Abbildung gezeigten Monosaccharide wurden mittels folgender Symbole visualisiert: GlcNAc (■), Man (●), Fuc (▲), Gal (●), Neu5Ac (◆), Neu5Gc (◇).

Die zugeordneten *N*-Glykane von Cetuximab (siehe Abbildung 29 B) wiesen ein breites Spektrum auf. Sie erstreckten sich von biantennären, degalaktosylierten komplexen Strukturen mit fukosylierter Kernstruktur über triantennäre komplexe Strukturen zu Strukturen mit terminalem α -Gal Epitop. Die Existenz von Neu5Gc ließ sich über die Expression des Antikörpers in der Maus-Myeloma Sp2/0 Zelllinie erklären (178). Die in dieser Arbeit detektierten *N*-Glykane bestätigten die bereits publizierten Glykosylierungsprofile von Yu *et al.* und Qian *et al.* (236, 243). Aufgrund der hohen Verfügbarkeit von α -Gal Epitopen (33%) konnte die Bindung des anti-Gal Antikörpers an α -Gal Epitope auf Cetuximab im Western Blot verifiziert werden (siehe 3.5).

Die freigesetzten *N*-Glykane von bovinem Thyroglobulin (siehe Abbildung 29 C) zeigten ein diverses Spektrum, begonnen bei Glykanstrukturen vom “high mannose”-Typ bis zu komplexen bi-, tri- und tetraantennären Strukturen, auf denen auch α -1,3-verknüpftes Gal vertreten war. Ebenso konnten einige Glykane mit Neu5Gc identifiziert werden. Das in dieser Arbeit detektierte Glykanprofil von Thyroglobulin bestätigte die bereits vorhandenen Glykananalytiken von Rawitch *et al.* und Spiro *et al.* (244, 245). Der hohe Anteil an α -Gal-tragenden Glykanstrukturen verifiziert die im Western Blot detektierte Bindung des anti-Gal Antikörpers an α -Gal Epitope auf bovinem Thyroglobulin (siehe 3.5).

Nachdem die *N*-Glykosylierungsprofile der α -Gal-tragenden Modellproteine erfolgreich bestimmt werden konnten, erfolgten anschließend die Glykananalytiken der rekombinanten Blutgerinnungsfaktoren Kogenate und Nuwiq. Freigesetzte *N*-Glykane von rekombinantem Faktor VIII wurden mit LC-MS analysiert und mit den durch die Western Blot Experimente ermittelten Bindungseigenschaften verglichen. Glykanstrukturen wurden so zugewiesen wie es oben bereits beschrieben wurde (siehe 3.7.2.1). Im Gegensatz zu Kogenate, das in BHK-Zellen exprimiert wurde (246), wurde Nuwiq in der humanen Zelllinie HEK-293-F (247) produziert. Die *N*-Glykosylierungsprofile von Nuwiq und Kogenate wurden in Abbildung 30 gezeigt.

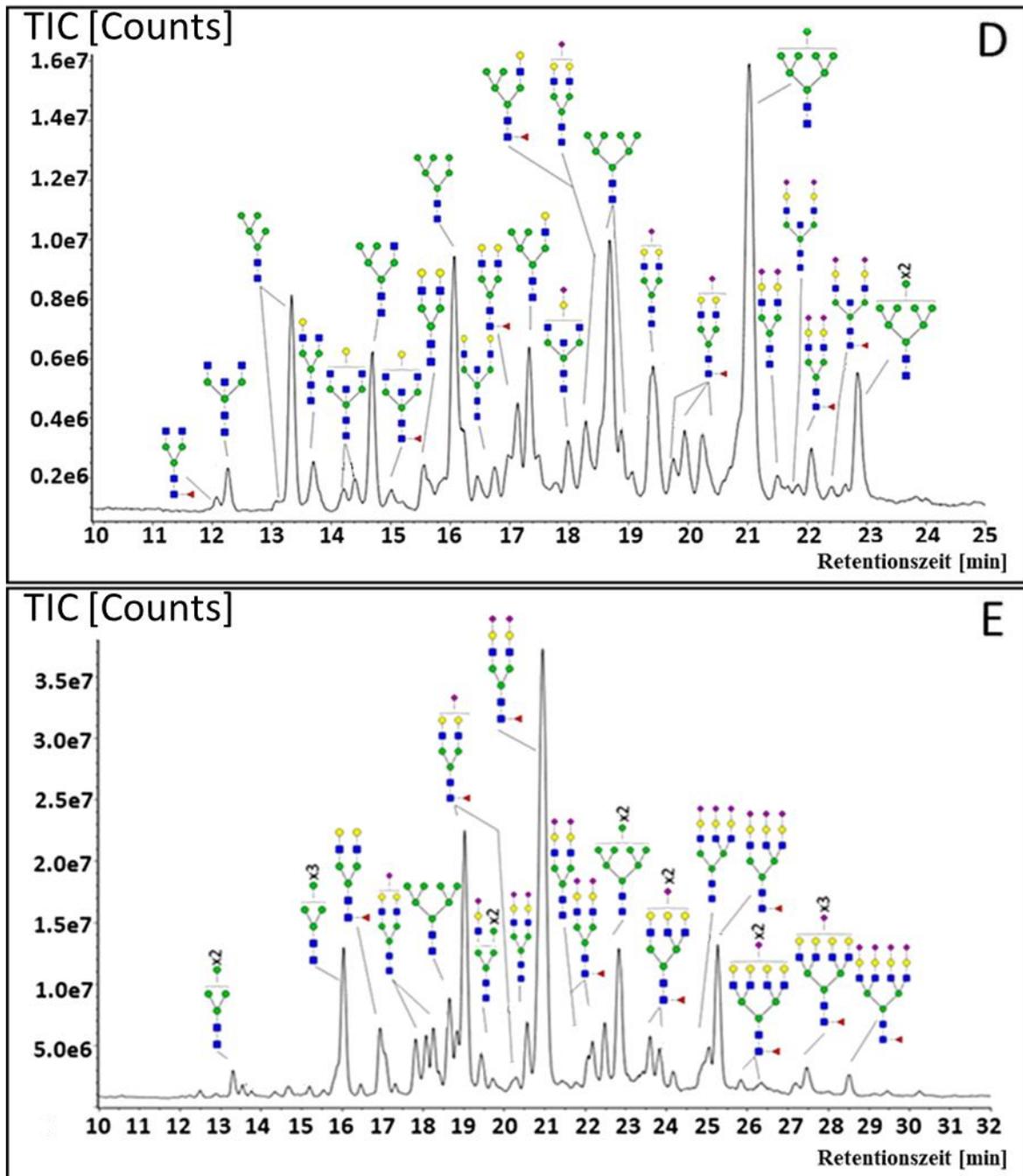


Abbildung 30: N-Glykosylierungsprofile von rekombinanten Faktor VIII-Proteinen.

Gezeigt sind die „Total Ion Chromatograms“ der freigesetzten N-Glykane von Nuwiq (D) und Kogenate (E). Freigesetzte N-Glykane wurden via LC-MS analysiert. Entsprechende Glykanstrukturen wurden bestimmt und den detektierten Signalen zugeordnet. Die Auswertung erfolgte mit der Waters UNIFI Software (Version 1.9.2). Die in der Abbildung gezeigten Monosaccharide wurden mittels folgender Symbole visualisiert: GlcNAc (■), Man (●), Fuc (▲), Gal (●), Neu5Ac (◆).

Detektierte N-Glykane von Nuwiq (siehe Abbildung 30 D) bestanden zu einem hohen Anteil aus Glykanen vom “high mannose“-Typ und aus komplexen, fukosylierten Glykanen mit vollständiger Galaktosylierung und Sialylierung. Ein kleiner Anteil detektierter Strukturen beinhaltete bisecting GlcNAc und war sialyliert. Das in dieser Arbeit detektierte N-Glykosylierungsprofil bestätigte die bereits von Kannicht *et al.* durchgeführte Glykananalytik (248). Nuwiq wurde in den Western Blot Experimenten als Negativkontrolle

verwendet, weil keine α -Gal-tragenden Strukturen identifiziert werden konnten. Die im Western Blot detektierte, schwache Bindung des anti-Gal Antikörpers an Nuwiq (siehe 3.5) konnte mittels Glykananalytik nicht verifiziert werden.

Die N-Glykosylierung von Kogenate (siehe Abbildung 30 E) zeigte einen sehr hohen Anteil an fukosylierten und komplexen Glykanstrukturen im Vergleich zu Glykanen vom „high mannose“-Typ. Zusätzlich konnten stark sialylierte Glykane vom komplexen Typ mit bis zu vier Antennen detektiert werden. Mit der durchgeführten Glykananalytik von Kogenate konnte nicht eindeutig gezeigt werden, ob sich α -Gal-tragende Glykane auf dem Glykoprotein befinden. Die relativen Anteile detektierter Glykanstrukturen von Cetuximab und Thyroglobulin wurden im Vergleich zu den detektierten Glykanstrukturen der rekombinanten Faktor VIII-Proteine (siehe Abbildung 30) in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Relative Anteile von detektierten N-Glykanstrukturen auf den analysierten Modellproteinen. Die prozentualen Anteile an „High mannose“, Fukosylierung, Neu5Ac, Neu5Gc, „Bisecting GlcNAc“, α -1,3-Gal sowie der Anteil an nicht identifizierbaren Strukturen wurden für jedes Modellprotein zusammengefasst. Der Anteil an terminalen α -1,3-Gal Strukturen auf Kogenate konnte mit der hier durchgeführten Glykananalytik nicht ermittelt werden.

Glykoprotein	„High mannose“ [%]	Fuko-sylierung [%]	Neu5Ac [%]		Neu5Gc [%]		„Bisecting GlcNAc“ [%]	α -1,3-Gal [%]	Nicht identifiziert [%]
			teilweise	komplett	teilweise	komplett			
anti-Gal Antikörper	-	86	13	1	-	-	15	-	2
Cetuximab	6	82	-	-	13	1	-	33	2
Thyroglobulin	39	53	33	20	2	-	-	32	4
Nuwiq	58	16	17	3	-	-	6	-	3
Kogenate	18	60	23	43	-	-	-	?	12

Die Ergebnisse des Western Blot Experiments zeigten, dass der anti-Gal Antikörper an Kogenate gebunden hatte (siehe 3.5). Da zunächst keine α -Gal-tragenden Strukturen auf Kogenate mittels Glykananalytik detektiert wurden, konnten die Ergebnisse des Western Blots nicht verifiziert werden. Da ungefähr 12% aller detektierten Signale nicht identifiziert werden konnten, wurde ein Exoglykosidase-Assay zur Komplettierung der Glykananalytik eingesetzt.

3.7.2.3 Exoglykosidase-Assay mit freigesetzten *N*-Glykanen von Kogenate

Zur Komplettierung der Glykananalyse von Kogenate wurden Exoglykosidase-Assays mit Sialidase A und β -1,4-Galaktosidase S durchgeführt. Diese Assays wurden mit dem Ziel durchgeführt, die Existenz von α -Gal unter den mit konventioneller Glykananalytik nicht identifizierten Signalen nachzuweisen. Dafür wurden die *N*-Glykane von Kogenate freigesetzt und vor, beziehungsweise nach der Spaltung durch Exoglykosidasen via LC-MS analysiert (siehe Abbildung 31). Durch die Verwendung von Sialidase A und β -1,4-Galaktosidase S wurden endständige Monosaccharide (Neu5Ac und β -1,4-Gal) von Glykanen abgespalten, wodurch sich ihre Masse und Hydrophobizität änderten.

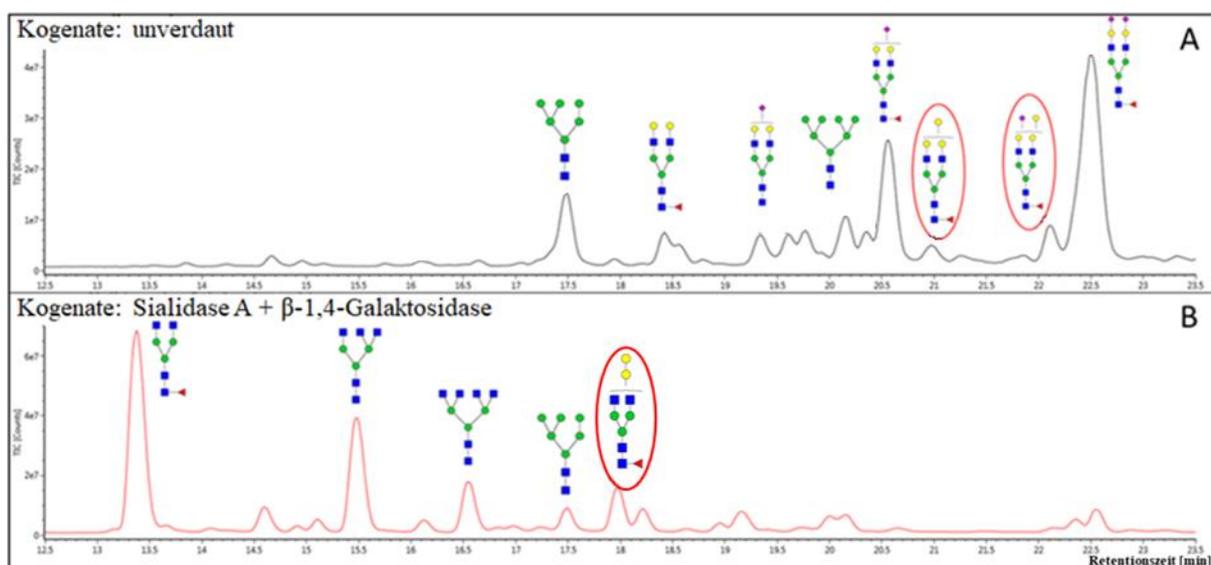


Abbildung 31: *N*-Glykananalytik von Kogenate mittels Exoglykosidase-Assay.

Freigesetzte *N*-Glykane von Kogenate wurden entweder unverdaut (A) oder mit Sialidase A und β -1,4-Galaktosidase gespalten (B) via LC-MS analysiert. Gezeigt sind die TICs der freigesetzten *N*-Glykane von Kogenate. Ermittelte Glykanstrukturen wurden den detektierten Signalen zugeordnet. Die Spaltungsreaktionen mit Exoglykosidasen wurden zuvor mit freigesetzten und Rapifluor-MS markierten *N*-Glykanen von Kogenate durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Waters UNIFI Software (Version 1.9.2). Rot umrahmte Strukturen verfügen über α -Gal. Die in der Abbildung gezeigten Monosaccharide wurden mittels folgender Symbole visualisiert: GlcNAc (■), Man (●), Fuc (▲), Gal (○), Neu5Ac (◆).

In unverdaulichem Zustand gaben zwei detektierte Signale einen Hinweis auf α -Gal-tragende Glykanstrukturen (rote Rahmen in Abbildung 31 A). Es ist anzumerken, dass die detektierten Signale der potenziell α -1,3-galaktosylierten Strukturen nicht die Hauptsignale von allen im zugrundeliegenden Massenspektrum vorhandenen Signalen darstellten. Die Komplexität der Glykanstrukturen auf Kogenate machte es erforderlich, das Massenspektrum durch die Verwendung von Exoglykosidasen zu vereinfachen. Freigesetzte *N*-Glykane von Kogenate wurden desialyliert und anschließend wurden β -1,4-verknüpfte Gal abgespalten. Da terminal α -1,3-galaktosylierte Glykane kein spezifisches Substrat für die verwendeten Exoglykosidasen darstellten, waren entsprechende Antennen von den Spaltungsreaktionen nicht betroffen. Beobachtete Retentionszeitverschiebungen von detektierten Glykanstrukturen

konnten somit nur durch Abspaltungen von Sialinsäuren oder β -1,4-verknüpftem Gal verursacht worden sein. Die Detektion einer komplexen Glykanstruktur mit zwei Gal nach der Spaltung mit den Exoglykosidasen gab einen Hinweis auf die Existenz von α -1,3-galaktosylierten Strukturen (rote Umrahmung in Abbildung 31 B). Die Existenz von α -Gal-tragenden Glykanstrukturen auf Kogenate würde die Bindung des anti-Gal Antikörpers an Kogenate erklären und die Ergebnisse des Western Blots in dieser Hinsicht verifizieren (siehe 3.5). Die vermeintlich α -Gal-tragende Glykanstruktur wurde bereits mittels LC-MS von *Canis et al.* gefunden und nachgewiesen (183), womit das Vorhandensein von α -Gal auf Kogenate bestätigt wurde.

3.8 Bestimmung der IgG-Subklassen vom anti-Gal Antikörper

In diesem Teil der Ergebnisse wurde die Verteilung der IgG-Subklassen von gereinigtem anti-Gal Antikörper untersucht. Die relativen Anteile der Subklassen IgG1, 2, 3 und 4 stellten wichtige Charakteristika des Antikörpers dar, weil eine Vielzahl verschiedener Effektorfunktionen von IgG-Subklassen durch unterschiedliche Bindungseigenschaften der Fc-Regionen herbeigeführt werden (128). Besonders im Falle von Immunantworten, an denen α -Gal als stimulierendes Antigen beteiligt ist, lässt sich anhand der Subklassen von produzierten Antikörpern zurückverfolgen, welche Art von Immunreaktion initiiert wurde (zum Beispiel TH1- oder TH2-Immunantworten). Als erstes Experiment wurden zunächst kommerzielle IgG-Subklassen zusammen mit gereinigtem anti-Gal Antikörper gelelektrophoretisch getrennt, um mögliche Unterschiede anhand von Massendifferenzen zu ermitteln (siehe Abbildung 32).

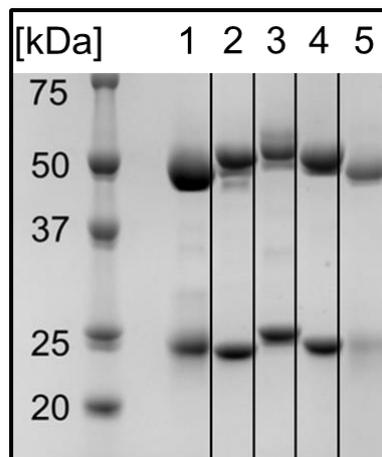


Abbildung 32: Gelelektrophorese der IgG-Subklassen und dem anti-Gal Antikörper.

Humane IgG-Subklassen (1 bis 4) und der anti-Gal Antikörper (5) wurden in einem Tris-Glycin Gradientengel (8-16%) anhand ihrer unterschiedlichen Massen unter reduzierenden Bedingungen getrennt. Das Gel wurde mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt. Der Probenauftrag betrug 2 μ g bei den Subklassenstandards und 1 μ g beim anti-Gal Antikörper.

Die Auflösung der voneinander getrennten Banden war in dem abgebildeten Massenbereich sehr gering, so dass nur grob abgeschätzt werden konnte, dass die IgG-Subklassen des anti-Gal Antikörper wahrscheinlich hauptsächlich aus IgG1 und IgG2 bestehen. Eine relative Quantifizierung enthaltener Subklassen war mit dieser Methode nicht möglich.

Zur genaueren Bestimmung der anti-Gal IgG-Subklassen wurde ein kommerzielles ELISA Kit erworben. Die mitgelieferten Platten waren mit einem unbekanntem Antikörper vorbeschichtet. Im Kit enthaltene monoklonale Antikörper, jeweils spezifisch für IgG 1, 2, 3 oder 4, wurden mit dem anti-Gal Antikörper präinkubiert, so dass die entsprechenden Subklassenanteile vom monoklonalen Antikörper gebunden wurden. Die präinkubierten Lösungen wurden schließlich auf die vorbeschichtete Platte gegeben, die Fc-Regionen der monoklonalen Antikörper banden an die Beschichtungsantikörper. Die präsentierten anti-Gal Subklassen konnten mit einem HRP-konjugierten Detektionsantikörper detektiert und mittels Kalibrierung mit mitgelieferten Standardproben quantifiziert werden. Anti-Gal IgG2 war mit 83% die häufigste Subklasse, gefolgt von anti-Gal IgG1 mit 14% sowie anti-Gal IgG3 mit 2% und anti-Gal IgG4 mit 1%.

Alternativ wurde die Bestimmung der anti-Gal IgG-Subklassen mit radialen Immunodiffusionsplatten durchgeführt. Auch für diese Bestimmung wurde ein kommerzielles Kit erworben. Der anti-Gal Antikörper sowie mitgelieferte IgG-Standards wurden auf die Immunodiffusionsplatten aufgetragen. Die Platten enthielten jeweils einen subklassenspezifischen Antikörper, so dass die im anti-Gal Antikörper vorhandenen IgG-Subklassen unterschiedlich weit in das Gel diffundieren konnten bis sich die Konzentrationen zwischen IgG-Subklasse und immobilisiertem Antikörper angeglichen hatten. Dies führte zur Bildung von einer radial um den Probenauftragungspunkt verlaufenden Präzipitationslinie, dessen Durchmesser proportional zur eingesetzten IgG-Subklassenkonzentration war. Eine relative Quantifizierung der anti-Gal IgG-Subklassen war dadurch nach erfolgter Kalibration mit den mitgelieferten Standards möglich. Obwohl die radiale Immunodiffusion eine sehr ungenaue Methode ist, wird sie noch immer zur Bestimmung von IgG-Subklassen angewendet (249, 250). Die Durchmesser der Präzipitationsringe sowie die ermittelten Anteile der IgG-Subklassen wurden in Tabelle 6 dokumentiert. IgG2 stellte mit einem Anteil von 76% die häufigste Subklasse dar, gefolgt von IgG1 mit 24%. IgG3 und IgG4 wurden nicht detektiert.

Tabelle 6: Bestimmung der IgG-Subklassen mittels radialen Immunodiffusionsplatten. Gemessene Durchmesser der Kalibratoren und anti-Gal Proben wurden quadriert und mit entsprechend berechneten Konzentrationen zusammengefasst. Die relativen Anteile an IgG-Subklassen wurden durch Normalisierung der berechneten IgG-Konzentrationen ermittelt. IgG3 und IgG4 wurden nicht detektiert.

Subklasse	Kalibrator- konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Quadrierter Durchmesser [cm^2]		Proben- konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Relativer Anteil [%]
		Kalibrator	Probe		
IgG1	1400	0,81	0,36 \pm 0,06	492 \pm 111	24 \pm 6
	840	0,64			
	350	0,25			
	140	0,16			
IgG2	800	0,64	0,55 \pm 0,05 (1:2 Verdünnung)	1422 \pm 137	76 \pm 7
	480	0,36			
	200	0,16			
	80	0,09			
IgG3	-	-	n.d. *	-	-
IgG4	-	-	n.d. *	-	-

* nicht detektiert

Die durch den kommerziellen ELISA berechneten Anteile der IgG-Subklassen konnten mit den Immunodiffusionsplatten als orthogonale Methode bestätigt werden.

3.9 Isoelektrische Fokussierung des anti-Gal Antikörpers

Zur Erweiterung des Spektrums an ermittelten Antikörpercharakteristika wurde eine IEF des anti-Gal Antikörpers mit anschließender 2D-Gelelektrophorese zur Bestimmung seiner isoelektrischen Punkte (IEPs) durchgeführt. Aufgrund der Polyklonalität des anti-Gal Antikörpers konnte nicht ausgeschlossen werden, dass unterschiedliche Subpopulationen von Antikörpern mit jeweils unterschiedlichen Nettoladungen existieren. Zunächst wurden kommerzielle Gelstreifen mit immobilisiertem pH Gradienten (IPG-Streifen) mit anti-Gal Antikörper beladen. Die mit anti-Gal Antikörpern beladenen Gelstreifen wurden in der IEF-Kammer isoelektrisch fokussiert und anschließend für eine 2D-Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen vorbereitet. Nach erfolgter Äquilibration mit Laufpuffer (siehe 2.9) wurde ein 2D-Tris-Glycin Gradientengel mit dem fokussierten IPG-Streifen beladen. Das Gel wurde nach erfolgter Gelelektrophorese mit Silber gefärbt und ist in Abbildung 33 gezeigt.

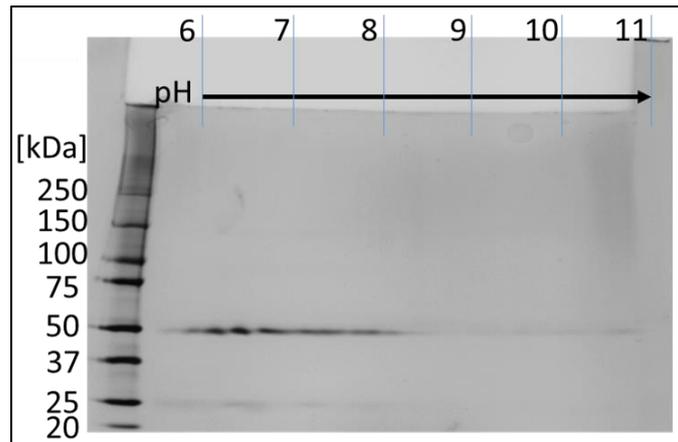


Abbildung 33: Ermittlung der IEPs von anti-Gal mittels 2D-Elektrophorese.

Ein 2D-Tris-Glycin Gradientengel (8-16%) wurde mit isoelektrisch fokussiertem anti-Gal Antikörper beladen. Im IPG-Streifen immobilisierter anti-Gal Antikörper wurde zuvor reduziert und alkyliert. Die eingesetzte Probenmenge betrug 6 µg. Das Gel wurde mit Silber gefärbt.

Die 2D-Gelelektrophorese zeigte jeweils eine Linie, bestehend aus dicht aneinander gereihten Punkten bei 50 kDa und 25 kDa, welche die schwere und leichte Kette des Antikörpers repräsentierten. Die angefärbten Punkte bildeten eine Horizontale von pH 6 bis pH 8 und gaben damit den sehr breiten Bereich an isoelektrischen Punkten an, über die der polyklonale anti-Gal Antikörper verfügte. Eine zweite 2D-Gelelektrophorese wurde durchgeführt und isoelektrisch fokussierter anti-Gal Antikörper wurde nach erfolgter Elektrophorese auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Der anti-Gal Antikörper wurde mittels HRP-konjugiertem anti-human IgG detektiert. Der Blot ist in Abbildung 34 gezeigt.

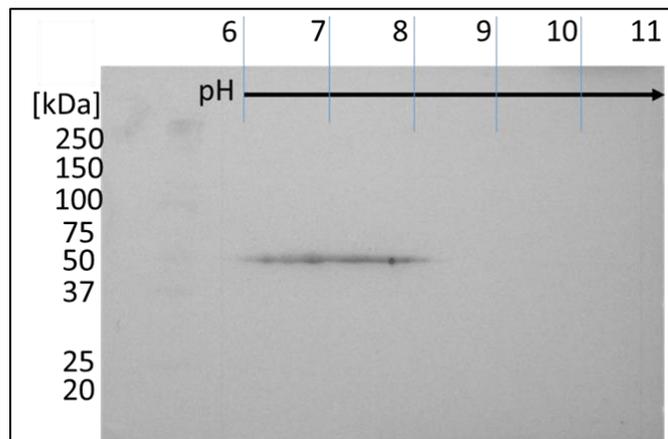


Abbildung 34: Ermittlung der IEPs von anti-Gal mittels Western Blot.

Der anti-Gal Antikörper wurde zunächst isoelektrisch fokussiert und nach erfolgter 2D-Gelelektrophorese auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Die Detektion erfolgte mittels HRP-konjugiertem anti-human IgG (1:10000). Die genutzte Probenmenge betrug 6 µg.

Der zur Detektion verwendete Antikörper band an den anti-Gal Antikörper auf der Membran und die Entwicklung mittels Chemilumineszenz führte zur Detektion einer bei 50 kDa horizontal verlaufenden Linie von pH 6 bis pH 8. Im Gegensatz zum angefertigten Silbergel war keine horizontale Linie bei 25 kDa sichtbar. Vermutlich lag dies an der mangelnden

Affinität des genutzten Detektionsantikörpers zur leichten Kette von IgG. Mittels reduzierender Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass sich der anti-Gal Antikörper nahezu vollständig reduzieren ließ (siehe Abbildung 35 links). Die Funktionalität des Detektionsantikörpers wurde anhand einer durchgeführten Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blot bestätigt (siehe Abbildung 35 rechts).

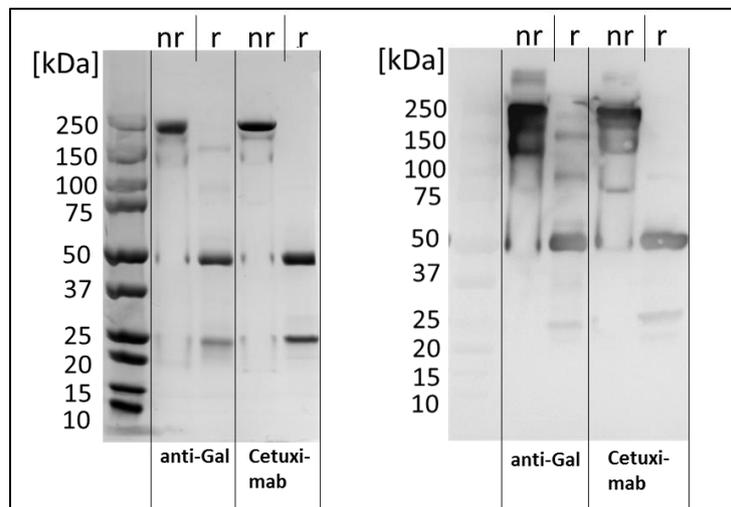


Abbildung 35: Elektrophorese und Western Blot von anti-Gal und Cetuximab.

Zum Nachweis der vollständigen Reduzierbarkeit vom anti-Gal Antikörper und Cetuximab wurde eine Gelelektrophorese auf einem Tris-Glycin Gradientengel (8-16%) in nicht-reduziertem (nr) oder reduziertem (r) Zustand, gefärbt mit Coomassie-Brilliant-Blau durchgeführt (links). Ein Western Blot von anti-Gal Antikörper und Cetuximab (reduziert, r, und nicht-reduziert, nr) wurde zum Nachweis der Funktionalität des Detektionsantikörpers durchgeführt (rechts). Es wurde derselbe Detektionsantikörper wie im Western Blot nach erfolgter 2D-Gelelektrophorese verwendet. Es wurden jeweils 2,5 µg an Antikörpern eingesetzt.

Das gefärbte Gel zeigt, dass anti-Gal sowie Cetuximab nahezu vollständig reduziert werden konnten. Nach der Reduzierung waren intensive Banden bei 50 kDa und 25 kDa sichtbar. Unvollständig reduzierte Antikörper zeigten Banden bei 150 kDa und 100 kDa. Der Western Blot zeigte stark detektierte Banden beider Antikörper im nicht-reduzierten Zustand im Massenbereich von 150 bis 250 kDa. Im reduzierten Zustand wurden die schweren Ketten bei 50 kDa intensiver detektiert als die leichten Ketten bei 25 kDa aber beide Banden waren deutlich sichtbar. Diese beiden Tests bestätigten, dass der anti-Gal Antikörper erfolgreich reduziert werden konnte und dass die Affinität des Detektionsantikörpers zur leichten Kette von IgG geringer war als zur schweren Kette.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der nach der 2D-Elektrophorese angefertigte Western Blot über weniger Hintergrundfärbung verfügte als das Silbergel. Der detektierte Bereich an isoelektrischen Punkten zwischen pH 6 und 8 demonstrierte die Polyklonalität des anti-Gal Antikörpers und unterstützte die zunächst angestellte Vermutung, dass anti-Gal Subpopulationen mit unterschiedlichen Ladungszuständen existieren.

4 Diskussion

4.1 Reinigung von anti-Gal Antikörpern aus Octagam

Die Reinigung und Separation des anti-Gal Antikörpers stellte die Grundlage für alle durchgeführten Spezifitäts- und Charakterisierungsexperimente dar. Die Antikörper wurden aus Octagam mittels einer Affinitätschromatographie unter Verwendung einer α -Gal-präsentierenden Affinitätsmatrix gereinigt. Eine kompetitive Elution mit Gal und eine nachfolgende Elution mit Glycin führten zu zwei jeweils separat gesammelten Antikörperfraktionen. Zur Optimierung der Affinitätschromatographie wurden die Elutionen testweise unter Verwendung eines linearen Gradienten durchgeführt. Dieser Versuch zeigte, dass eine Konzentration von 75 mM Gal bereits ausreichte, um den anti-Gal Antikörper von der Affinitätsmatrix zu lösen. Die ursprüngliche Form und Peakfläche erhaltener Signale blieben erhalten. Der lineare Gradient wurde nur während der kompetitiven Elution angewendet, zur genaueren Untersuchung verschieden affiner Subpopulationen wäre ein pH-Gradient denkbar.

Eine weitere Methode zur Optimierung der Chromatographie könnte die Verwendung einer weiteren Affinitätssäule beinhalten. Beispielsweise, eine in Reihe mit der α -Gal-präsentierenden Säule verbundenen, nur aus Sepharose bestehenden Säulenmatrix könnte verbleibende, unspezifische Antikörper aus dem anti-Gal Eluat entfernen. Aufgrund eines schnellen Druckanstieges erwies sich diese Methode jedoch nicht als praktikabel (Anhang 2). In einem alternativen Versuchsansatz wurde ein rezirkulierender Probenauftrag zur Steigerung der Ausbeute durchgeführt, indem der Säulendurchfluss zurück in das Probenreservoir geleitet und die Säule über Nacht kontinuierlich beladen wurde. Auch hier führte ein zwar schleichender, aber dennoch reproduzierbarer Druckanstieg zum frühzeitigen Beenden der Methode (Anhang 3).

Nach erfolgter Fraktionierung der Antikörper wurde festgestellt, dass die Konzentration von anti-Gal in diesen Fraktionen nicht ausreichte, um die Fraktionen unmittelbar in weiteren Assays einzusetzen. Die Konzentrierung der Fraktionen führte gleichermaßen zur Konzentrierung der in den Fraktionen enthaltenen Salzen und Pufferinhaltsstoffen, vor allem Gal, was zu Störungen nachfolgender Analysen führen könnte. Ein Pufferwechsel war somit unumgänglich.

Peakflächen eluierter anti-Gal Antikörper nahmen einen Anteil von 0,15% bis 0,25%, verglichen mit Peakflächen des Säulendurchflusses, ein. Es ist anzumerken, dass dieser Anteil als überschätzt angesehen werden kann, weil das Signal des Säulendurchflusses die Detektorsättigung erreichte. Dies könnte sich durch Verdünnen der injizierten Octagam-Probe beheben lassen, wobei die berechnete Ausbeute mit steigendem Verdünnungsfaktor demzufolge sinken würde. Dies wurde jedoch nicht durchgeführt, weil eine Quantifizierung in diesem Experiment nicht im Vordergrund stand. Der durch ELISA-Experimente bereits ermittelte Anteil von anti-Gal unter 1% konnte dennoch bestätigt werden (151, 152).

4.2 Nachweis der Antikörperspezifität mittels ELISA

4.2.1 Streptavidin ELISA mit biotinylierten Glykanepitopen

ELISA Assays stellen wahrscheinlich eine der am meisten verwendeten Methoden dar, wenn die Interaktionen zwischen einem Antikörper und entsprechenden Antigenen untersucht werden soll. Der in dieser Arbeit angewendete ELISA nutzte biotinylierte Glykanepitope zum Spezifitätsnachweis von anti-Gal. Es hatte sich herausgestellt, dass mit Gal eluierte Antikörper ausschließlich an Strukturen mit terminalem α -1,3-Gal gebunden hatten, wohingegen mit Glycin pH 2,0 eluierte Antikörper auch Bindungen an das O- und B-Antigen zeigten. Die Elution mit Gal basierte auf der strukturellen Ähnlichkeit zur Affinitätsmatrix und der dadurch erfolgten Verdrängung gebundener Antikörper. Im Gegensatz zur Glycin-Elution, die das Lösen der Antikörper durch deren Ladungsänderung herbeiführte, wurde bei der Elution mit Gal eine spezifischere Mischung aus anti-Gal Antikörpern erhalten, wie der durchgeführte ELISA zeigte (siehe 3.2.1).

Glykane sind sehr heterogen und die Variabilität von den in der Natur vorkommenden Glykanen ist groß (siehe 1.1.2). Aufgrund begrenzter Kapazität des ELISA konnte nur eine Auswahl verschiedener Glykane zum Testen der Bindungseigenschaften vom anti-Gal Antikörper getroffen werden. Zur Analyse der Bindung von anti-Gal an weitere Glykanepitope könnte ein Multiarray-Chip zur simultanen Bindungsanalyse an eine Vielzahl verschiedener Strukturen eingesetzt werden (251).

Zusätzlich muss erwähnt werden, dass detektierte Signale nur relativ zueinander ausgewertet werden konnten, weil kein repräsentativer anti-Gal Standard existiert. Theoretisch könnte jedes Glykoprotein, von dem die Anzahl an tragenden α -Gal Epitopen bereits via Glykananalytik bestimmt wurde, als Standardprotein verwendet werden, zum Beispiel bovines Thyroglobulin (244, 245) oder Cetuximab (155, 236). Allerdings haben Faktoren wie

unterschiedliche Zugänglichkeiten oder Proteinkonformationen entscheidenden Einfluss auf die Wiederfindung und die Quantifizierung von anti-Gal Antikörpern, so dass sich ein Vergleich von normierten Messwerten auf unterschiedliche Referenzproteine als problematisch herausstellen würde. Das Ziel dieses Assays war jedoch nicht die Quantifizierung, sondern der Nachweis der Spezifität. Es konnte gezeigt werden, dass die Gal-eluierte Antikörperfraktion hochspezifisch für terminale α -1,3-Gal war und sonst an keine der anderen verfügbaren Glykanepitope gebunden hatte. Aus diesem Grund wurde nur die mit Gal eluierte Antikörperfraktion für weitere Versuche verwendet.

4.2.2 ELISA mit bovinem Thyroglobulin

Oben bereits angesprochene Faktoren wie Proteinkonformation oder unterschiedliche Zugänglichkeiten des Glykanepitops wurden durch die Verwendung eines Glycoproteins in diesem ELISA einbezogen. Zum Nachweis der Spezifität wurden α -Gal Epitope mittels der α -1,3-Galaktosidase von der Hälfte des eingesetzten Thyroglobulins abgespalten. Eingesetzter anti-Gal Antikörper band ausschließlich an unverdautes Thyroglobulin, wodurch unspezifische Bindungen an das Protein ausgeschlossen werden konnten. Gleichzeitig konnte die Effizienz der α -Gal-Abspaltung insofern bewertet werden, dass keine zugänglichen α -Gal Epitope mehr auf dem Protein vorhanden waren.

4.2.3 Kompetitiver ELISA zum Vergleich der Affinitäten zweier Glykanepitope

Ein weiterer ELISA Assay wurde zum Vergleich der Bindungsaffinitäten zwischen dem α -Gal Epitop und dem α -Gal-Disaccharid verwendet. Das Prinzip des ELISAs beruhte auf der vorherigen Inkubation des anti-Gal Antikörpers mit unterschiedlichen molaren Überschüssen von α -Gal Epitop und α -Gal Disaccharid. Durch diese vorherige Inkubation wurde ein Anteil der Bindungsregionen vom anti-Gal Antikörper abhängig von der Menge gewählter molarer Überschüsse blockiert. Dieses Prinzip wurde bereits bei anderen ELISAs eingesetzt und stellt eine gängige Methode dar (252, 253). Die Bindung von unterschiedlich blockierten anti-Gal Antikörpern an synthetisches BSA- α -Gal Konjugat wurde analysiert und es zeigte sich, dass doppelt so viele Moleküle des α -Gal-Disaccharids im Vergleich zum α -Gal Epitop notwendig waren, um die Bindung an das Glykokonjugat um 50% zu inhibieren. Das α -Gal Epitop verfügt im Gegensatz zum α -Gal-Disaccharid über GlcNAc, wodurch das Glykanepitop eine höhere Zahl an Interaktionen zum Antikörper eingehen kann als das Disaccharid (siehe Abbildung 36). Die Existenz von GlcNAc bewirkt eine stabilisierende Wirkung aufgrund Wasserstoffbrückenbindungen zu Antigen-bindenden Regionen des anti-Gal Antikörpers und Van der Waals-Kräften zwischen Aminosäuren der jeweiligen Polypeptidketten (223).

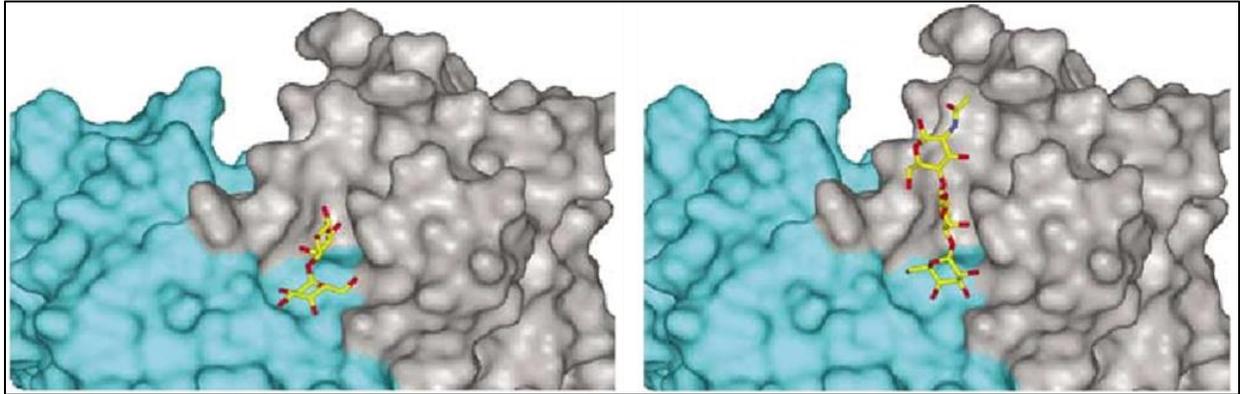


Abbildung 36: Interaktion von anti-Gal mit dem α -Gal Epitop und dem α -Gal Disaccharid.

Diese Simulation zeigt die Interaktion vom anti-Gal Antikörper mit dem α -Gal Disaccharid (links) und dem α -Gal Epitop (rechts). Die Existenz von GlcNAc führt zu komplett unterschiedlichen Konformationen des Glykanepitops in der Bindungstasche des Antikörpers. Die eingegangene Konformation bei Anwesenheit von GlcNAc (rechts) erlaubt mehr Kontaktfläche zum Polypeptid als ohne GlcNAc (links), was zu einer stabileren Bindung führt, mit Erlaubnis von (223).

Die Struktur und Positionierung des α -Gal Epitops ist gestreckter als beim α -Gal Disaccharid und kann Kontakt zu einer größeren Oberfläche der Antigen-bindenden Regionen des anti-Gal Antikörpers aufbauen. Die größere Kontaktfläche führte zu einer stabilisierenden Wirkung der Interaktion und letztendlich zu einer höheren Affinität.

4.3 Nachweis der Antikörperspezifität mittels Oberflächenplasmonresonanz

Der Nachweis der Spezifität vom anti-Gal Antikörper erfolgte zusätzlich mittels SPR-Messungen unter Verwendung des Biacore T200 Systems. Die schon im ELISA eingesetzten Glykanepitope wurden hier genutzt, um auf Streptavidin-beschichteten SPR-Chips immobilisiert zu werden. Die Interaktion zwischen dem anti-Gal Antikörper mit immobilisierten Glykanepitopen wurde analysiert, indem die Dissoziationskonstante K_D unter Annahme eines 1:1 Bindungsmodells berechnet wurde. Die hohe Spezifität vom anti-Gal Antikörper zu terminaler α -1,3-verknüpfter Gal konnte ebenfalls durch SPR-Messungen bestätigt werden. Berechnete Dissoziationskonstanten vom α -Gal Epitop ($K_D = 144 \pm 20$ nM) und dem α -Gal Disaccharid ($K_D = 161 \pm 18$ nM) belegten eine geringfügig höhere Affinität des α -Gal Epitops im Vergleich zum α -Gal Disaccharid. Dieses Ergebnis unterstützt die bereits im inhibitorischen ELISA ermittelten Erkenntnisse (siehe 4.2.3). Im Vergleich zu den Dissoziationskonstanten anderer Kohlenhydrat-spezifischer Antikörper war die ermittelte Affinität des anti-Gal Antikörpers sehr hoch. Die Dissoziationskonstanten von hochaffinen, monoklonalen Antikörpern gegen Chlamydia-Lipopolysaccharide waren im Bereich von 500 bis 700 nM (254). Diese bestimmten Dissoziationskonstanten sind zwei- bis viermal größer als die bestimmten Konstanten bei der Interaktion zwischen dem anti-Gal Antikörper

und α -Gal. Interaktionen zwischen therapeutischen Antikörpern und ihren entsprechenden Antigenen weisen Dissoziationskonstanten im pikomolaren Bereich auf (255). Die Dissoziationskonstanten für Interaktionen zwischen humanem IgE und bovinem Thyroglobulin, beziehungsweise synthetischem BSA- α -Gal belaufen sich auf 36 nM bei Thyroglobulin und auf 363 nM bei BSA- α -Gal (218). Im Zusammenhang mit den berechneten Dissoziationskonstanten von anderen Interaktionen, lagen die für den anti-Gal Antikörper ermittelten Affinitäten in einem plausiblen Bereich.

Physiologisch relevante Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Glykanen treten eher in Situationen auf, bei denen die Proteinmobilität reduziert werden muss, zum Beispiel während der Migration von Leukozyten in entzündetes Gewebe (Leukozytenrolling) (256). Während dieses Prozesses binden Proteine auf Leukozyten an Proteoglykane auf der Oberfläche von Endothelzellen. Die Mobilität der Leukozyten wird daraufhin reduziert um die Position der Zelle so zu orientieren, dass eine Migration durch die Membran möglich wird. Glykaninteraktionen sind nicht hochaffin, weil eine stabile Bindung zwischen einem Glykan und einem Protein oftmals nicht notwendig ist, um die vorgesehene, biologische Funktion zu erfüllen (257).

Die Bindungsanalyse zwischen dem anti-Gal Antikörper und bovinem Thyroglobulin führten zu einer Dissoziationskonstanten von $1,6 \pm 0,4$ nM. Die Differenz der ermittelten K_D -Werte von Glykanepitopen und Thyroglobulin war groß, was den stabilisierenden Effekt aufgrund der lokalen Polypeptidsequenz von Thyroglobulin verdeutlichte. Ähnliche Effekte konnten bereits mit SPR-Messungen bei Interaktionen von kleinen Molekülen mit Proteinkomplexen ermittelt werden (258).

In einer von Plum *et al.* gemessenen Interaktion zwischen humanen IgE und bovinem Thyroglobulin wurde eine Dissoziationskonstante von 36 nM ermittelt (218). Im Vergleich zur Interaktion zwischen anti-Gal und bovinem Thyroglobulin ($1,6 \pm 0,4$ nM) war der von Plum *et al.* gemessene K_D -Wert etwa um den Faktor 20 größer, was für eine geringere Affinität sprach. Es war anzunehmen, dass die aktiven Bindungspartner der von Plum *et al.* genutzten IgE Antikörper tatsächlich anti-Gal Antikörper vom IgE-Typ waren. Ein genereller Unterschied hinsichtlich der Affinität zwischen IgG und IgE könnte durch die unterschiedliche Affinitätsreifung von an der Antikörperproduktion beteiligten B-Zellen begründet sein (siehe 1.4.3). Ein weiterer Unterschied besteht im methodischen Aufbau der durchgeführten SPR-Messung. Plum *et al.* immobilisierte IgE Antikörper auf einem

carboxylmethylierten Chip (218), wohingen in dieser Arbeit eine spezielle anti-Gal-Fraktion zunächst biotinyliert und dann auf einem mit Streptavidin beschichtetem Chip immobilisiert wurde (2.6.3). Die Immobilisierung via Biotin erwies sich in dieser Arbeit als sehr robust und stabil. Die hohe Stabilität der kovalenten Bindung zwischen Biotin und Streptavidin wurde bereits von Weber *et al.* anhand einer Analyse der Kristallstrukturen bestätigt (259).

Es existieren zahlreiche methodische Aspekte, die einen Einfluss auf die Affinitätsmessung haben können. Die Immobilisierungsdichte des Liganden auf dem Chip ist von entscheidender Bedeutung, weil sie das Bindungsverhalten des Analyten sowohl positiv, als auch negativ beeinflussen kann. Es sollte stets angestrebt werden, möglichst physiologische Verhältnisse zu simulieren. Die Entfernung zwischen immobilisierten Ligandmolekülen auf dem Chip hat hierbei direkten Einfluss auf die Präsentation zugänglicher Bindungsstellen gegenüber dem Analyten. Wenn die Distanz zwischen Ligandmolekülen zu gering ist, könnten eigentlich zugängliche Bindungsstellen blockiert werden, wohingegen zu große Abstände, beziehungsweise zu geringe Immobilisierungsdichten, zu der sogenannten Massentransportlimitierung führen können. Ab dem Moment, wo dieses Phänomen eintritt, ist der Transport von Analyt-Molekülen auf die Chipoberfläche durch den Diffusionsprozess begrenzt. Die Berechnung der Dissoziationskonstanten erfordert einen Überschuss an Analyt-Molekülen, so dass sichergestellt ist, dass der Fokus der Berechnung auf die Interaktion zwischen Analyt und Ligand gerichtet werden kann und nicht zusätzlich durch die Diffusion des Analyten beeinflusst wird (260). Ein Hauptfokus der in dieser Arbeit durchgeführten SPR-Messungen war es, geeignete Parameter zur Berechnung der Dissoziationskonstanten für die Interaktion zwischen dem anti-Gal Antikörper und immobilisierten Glykanepitopen zu ermitteln. Die verwendete Biacore T200 Software verfügt über viele implementierte Modelle, in denen physikalische und stereochemische Bindungseigenschaften der Analyt- und Ligandmoleküle berücksichtigt werden (261). Wichtig anzumerken ist, dass es dem Experimentator obliegt, ein für den biologischen Kontext geeignetes Modell auszuwählen, um die optimalen Simulationsparameter für die Berechnung des K_D -Wertes einzustellen.

4.4 Nachweis der Antikörperspezifität mittels Erythrozytenagglutination

Obwohl die Spezifität vom anti-Gal Antikörper bereits mittels verschiedenen ELISA Assays, Western Blot und SPR bestätigt wurde, wurde es angestrebt, weitere orthogonale Methoden zum Nachweis der Spezifität anzuwenden. In der Vergangenheit wurde bereits von Galili *et al.* eine Erythrozytenagglutination zum Spezifitätsnachweis durchgeführt (215) (siehe 1.5). In

dieser Arbeit wurde die Erythrozytenagglutination zur Verifizierung der Ergebnisse eingesetzt (siehe 3.4). Das ehemals in Primaten für die Synthese von α -Gal Epitopen zuständige Enzym wurde im Laufe der Evolution inaktiviert (siehe 1.4). Aus diesem Grund sollten sich auf humanen Erythrozyten keine α -Gal Epitope befinden, wohingegen rote Blutzellen von Kaninchen über α -Gal Epitope auf ihren Zelloberflächen verfügen (siehe 1.4) und darum für einen qualitativen Bindungsnachweis gereinigter anti-Gal Antikörper verwendet wurden. Die Bindung des anti-Gal Antikörpers an rote Blutzellen von Kaninchen wurde durch die visuell sichtbare Ausbildung eines Zellrasens nachgewiesen, wohingegen die Bildung eines Zellklumpens auf dem Grund des Wells dafür sprach, dass keine Vernetzung von Antikörpern stattgefunden hatte.

Der Erythrozytenagglutinationsassay konnte die Spezifität des anti-Gal Antikörpers verifizieren, da keine Bindung an humane Blutzellen, dafür aber an Blutzellen von Kaninchen festgestellt werden konnte. Es ist anzumerken, dass die Bindung an α -Gal Epitope auf Kaninchenerythrozyten nicht direkt nachgewiesen, sondern nur via Vernetzung der Zellen untereinander gezeigt wurde. Für die Vernetzung der Zellen ist es jedoch irrelevant, an welche Strukturen der Antikörper auf der Erythrozytenoberfläche gebunden hatte. Aufgrund der Klumpenbildung von humanen Erythrozyten ist es wahrscheinlich, dass α -Gal Epitope auf Kaninchenerythrozyten die Bindungspartner darstellten, eindeutig gezeigt werden konnte dies jedoch nicht. Auf der Oberfläche von Erythrozyten befindet sich eine Vielzahl anderer Glykane wie beispielsweise die AB0, Diego, MNS, Duffy oder Kell Antigene (262). Eine Bindung des anti-Gal Antikörpers an diese Epitope ist zwar unwahrscheinlich, kann aber nicht ausgeschlossen werden.

Zur Optimierung des Assays könnte die Erythrozytenagglutination um die bereits von Galili *et al.* genutzte Methode der Rosettenformation erweitert werden (150). Der von Galili *et al.* durchgeführte Assay konnte neben dem Spezifitätsnachweis gleichzeitig die Menge gebundener anti-Gal Antikörper quantifizieren. Es kann angenommen werden, dass der in dieser Arbeit verwendete BCA-Assay ebenso geeignet für die Quantifizierung des anti-Gal Antikörpers war, obwohl es sich bei dieser Methode nicht um eine IgG-spezifische Quantifizierungsmethode handelte. Der gereinigte anti-Gal Antikörper war spezifisch und es konnte mittels Gelelektrophorese gezeigt werden, dass nach der Affinitätschromatographie gesammelte Fraktionen nur aus Antikörpern bestanden. Somit würden IgG-spezifische Quantifizierungsmethoden, wie beispielsweise die Rosettenmethode von Galili *et al.* oder ein

IgG-spezifischer ELISA, keine Vorteile gegenüber Methoden haben, welche die totale Proteinmenge quantifizieren.

Als zusätzliche Erweiterung der hier durchgeführten Erythrozytenagglutination könnten die α -Gal Epitope auf roten Blutzellen von Kaninchen enzymatisch abgespalten werden und in Bindungsanalysen mit gereinigtem anti-Gal Antikörper eingesetzt werden. Eine Agglutination der roten Blutzellen würde bestätigen, dass nur α -Gal Epitope die Bindungspartner für den anti-Gal Antikörper darstellten.

4.5 Verifizierung von Western Blot Experimenten mittels Glykananalytik

Die in dieser Arbeit verwendeten Modellproteine Thyroglobulin, Cetuximab, BSA- α -Gal und rekombinanter Faktor VIII wurden via Western Blot mit HRP-konjugiertem anti-Gal Antikörper detektiert. Die Western Blot Versuche dienten sowohl zur Untersuchung der Eignung von anti-Gal als Detektionsantikörper, als auch als zusätzlicher Spezifitätsnachweis, indem Proteine ohne α -Gal Epitope versucht wurden zu detektieren.

Die Freisetzung der *N*-Glykane dieser Proteine und ihre nachfolgende Analyse mittels LC-MS dienten zur Verifizierung der Ergebnisse aus den Western Blot Versuchen. Zusätzlich wurde das *N*-Glykosylierungsprofil des anti-Gal Antikörpers ermittelt, weil es laut dem aktuellen Wissensstand noch nicht analysiert wurde.

4.5.1 Die *N*-Glykosylierung des anti-Gal Antikörpers

Die Glykosylierung von Antikörpern kann einen großen Einfluss auf ihre Eigenschaften und Effekte im Immunsystem ausüben. Fukosylierungen können beispielsweise die antikörperabhängige Zellzytotoxizität inhibieren (139) und bisecting GlcNAc reguliert die Bindungseigenschaften gegenüber Fc γ -Rezeptoren (263). Der nachgewiesene, hohe Grad an Fukosylierung (86%), der geringe Grad an Sialylierung (13%) und der geringe Anteil an bisecting GlcNAc (15%) entsprachen dem Glykosylierungsprofil von humanem IgG (91). Da der anti-Gal Antikörper kontinuierlich produziert wird, gehört er zum humanen IgG-Repertoire dazu. Daher ist es plausibel, dass sich seine *N*-Glykosylierung der von humanem IgG ähnelt.

4.5.2 Glykananalytik von Modellproteinen zur Verifizierung des Western Blots

Eine Vielzahl verschiedener *N*-Glykane wurden auf Cetuximab, Thyroglobulin und rekombinantem Faktor VIII identifiziert, unter anderem auch das α -Gal Epitop (3.7). Die

Zuweisung von Glykanstrukturen basierte auf zwei Parametern, i) die Retentionszeit in hydrophiler Interaktionschromatographie und ii) das Masse-Ladungs-Verhältnis der Struktur. Eine Auswahl möglicher Glykanstrukturen wurde automatisch von der Massenspektrometersoftware vorgeschlagen und es oblag dem Experimentator, welche der vorgeschlagenen Strukturen dem aktuellen Signal tatsächlich zugeordnet werden sollte. Der zweite Schritt der Glykananalytik bestand aus der Bestätigung der zugewiesenen Strukturen. Die Mehrheit der in dieser Arbeit verwendeten Glykoproteine wurden bereits analysiert, Informationen über ihre Glykosylierung konnten einschlägiger Literatur entnommen und durch ermittelte Glykosylierungsprofile in dieser Arbeit bestätigt werden (siehe 3.7). Kogenate stellte eine Ausnahme dar, weil das Glykosylierungsprofil dieses Proteins sehr komplex war, was die Detektion von α -Gal Epitopen erschwerte. Die Bestätigung, beziehungsweise eine detailliertere Analyse der *N*-Glykane auf Kogenate wurde mittels einer LC-MS-Analyse unter Verwendung von Exoglykosidasen durchgeführt. Exoglykosidasen wurden bereits häufig als Werkzeuge der Glykananalytik zur weiteren Strukturaufklärung in Kombination mit LC-MS eingesetzt (264–266). Durch die Kombination zweier Exoglykosidasen konnte eine α -Gal-tragende Glykanstruktur auf Kogenate gefunden werden, die bereits von Canis *et al.* beschrieben wurde (183). Im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit verwendeten Exoglykosidase-Assay verwendeten Canis *et al.* eine Kombination aus MALDI-MS, MS/MS und GC-MS, was eine deutlichere Detektion und Bestätigung der α -Gal-tragenden Struktur ermöglichte.

Die mittels Glykananalytik detektierten α -Gal Epitope auf Cetuximab, bovinem Thyroglobulin und Kogenate bestätigten die im Western Blot vom anti-Gal Antikörper detektierten Banden. Zum Nachweis der Antikörperspezifität wurden α -Gal Epitope auf den Modellproteinen abgespalten und gleiche Mengen an unverdauten und de- α -galaktosylierten Proteinen wurden im Western Blot Experiment eingesetzt. HRP-konjugierter anti-Gal Antikörper band nur an die unverdauten Modellproteine, womit gezeigt wurde, dass keine unspezifischen Bindungen an die de- α -galaktosylierten Proteine stattfanden.

Der Unterschied zwischen den Signalintensitäten von detektierten Banden ließ sich durch unterschiedliche Mengen von α -Gal Epitopen auf den Modellproteinen erklären. Die Lokalisierung und Menge von α -Gal-tragenden Strukturen auf Cetuximab wurde bereits mittels LC-MS untersucht (89, 228). Aus diesem Grund konnten unterschiedliche Verdünnungen von Cetuximab genutzt werden, um das Detektionslimit vom anti-Gal Antikörper zu ermitteln. Es konnte beobachtet werden, dass offensichtlich eine bestimmte Menge von α -Gal Epitopen auf einem Protein vorhanden sein muss (zum Beispiel 33% auf

Cetuximab oder 32% auf bovinem Thyroglobulin), um unspezifische Bindungen des anti-Gal Antikörpers zu verhindern. Es konnte beobachtet werden, dass HRP-konjugierter anti-Gal Antikörper schwach an Nuwiq gebunden hatte, obwohl mittels Glykananalytik gezeigt werden konnte, dass sich keine α -Gal Epitope auf Nuwiq befanden. Wahrscheinlich ist auch die eingesetzte Menge des Proteins entscheidend, da diese unspezifische Bindung zum ersten Mal beobachtet wurde, als gleiche molare Mengen von Kogenate und Nuwiq und eine sehr geringe Menge von Cetuximab, nahe des ermittelten Detektionslimits von anti-Gal, im Western Blot Experiment eingesetzt wurden. Bei einer Erhöhung der Konzentration von Cetuximab konnte der anti-Gal Antikörper lediglich α -Gal Epitope auf Cetuximab detektieren und zeigte weder unspezifische Bindungen an Nuwiq, noch detektierte er auf Kogenate befindliche α -Gal Epitope. Die Anzahl der α -Gal Epitope auf Kogenate war im Vergleich zu denen auf Cetuximab sehr gering, so dass das detektierte Signal von Cetuximab andere Signale überstrahlte. In geringen Konzentrationsbereichen von α -Gal müssten die Versuchsparameter des Western Blots erneut angepasst werden. Möglicherweise würde eine höhere Verdünnung vom anti-Gal Antikörper das Problem der unspezifischen Bindung an Nuwiq beheben. Allerdings bestünde dann die Möglichkeit, dass auch die α -Gal Epitope auf Kogenate nicht mehr detektiert werden können. Es kann dennoch nicht geleugnet werden, dass der gereinigte anti-Gal Antikörper noch andere, unspezifische Antikörper beinhaltet oder dass der anti-Gal Antikörper selbst zu unspezifischen Bindungen neigt, wenn ein bestimmter, konzentrationsabhängiger Schwellenwert an vorhandenen α -Gal Epitopen auf dem zu detektierenden Protein nicht erreicht wurde.

Es ist anzumerken, dass in dieser Arbeit nur *N*-Glykane freigesetzt und analysiert worden sind. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich α -Gal Epitope auch auf *O*-Glykanen befinden können. Die Existenz von α -1,3-Gal auf *O*-Glykanen von *Schizosaccharomyces pombe* konnte mittels konventioneller Glykananalytik bestätigt werden (267–269). Es wurden drei Gene im Genom von *Schizosaccharomyces pombe* mit α -1,3-Galaktosyltransferaseaktivität identifiziert (267). Die Existenz von *O*-verknüpften α -Gal Epitopen auf den in dieser Arbeit verwendeten Modellproteinen konnte nicht ausgeschlossen werden. Allerdings verhinderte eine de-*N*-Glykosylierung von bovinem Thyroglobulin die Bindung vom anti-Gal Antikörper komplett (siehe 3.2.2), wodurch *O*-Glykane mit α -Gal Epitopen auf Thyroglobulin ausgeschlossen werden konnten. Die *O*-Glykosylierung von bovinem Thyroglobulin wurde in zwei Artikeln von Xavier *et al.* (174) und von Ząbczyńska *et al.* (270) kurz thematisiert, ist aber unbekannt und es existieren bisher keine methodischen Ansätze zur *O*-Glykananalytik auf bovinem Thyroglobulin.

Weder auf Cetuximab, noch auf humanem IgG, außer auf IgG3 (271), konnten bisher *O*-Glykane nachgewiesen werden. Die Glykosylierung von Nuwiq wurde studiert und *O*-Glykane inklusive α -Gal konnten nicht nachgewiesen werden (272). Dem aktuellen Wissensstand nach, wurde bisher lediglich die *N*-Glykosylierung (183), aber nicht die *O*-Glykosylierung von Kogenate untersucht.

4.6 Ermittelte Charakteristika von gereinigtem anti-Gal Antikörper

4.6.1 Verteilung von IgG-Subklassen

Nachdem die Spezifität von gereinigtem anti-Gal Antikörper erfolgreich nachgewiesen werden konnte, war es nun das Ziel, bisher unbekannte Charakteristika des Antikörpers zu untersuchen. Daher wurde die Verteilung der IgG-Subklassen vom anti-Gal Antikörper mit zwei verschiedenen Methoden ermittelt.

Es wurden mehrere ELISA Assays durchgeführt, bei denen die Verteilung der IgG-Subklassen aufgrund von beobachteten Kreuzreaktivitäten zwischen IgG1 und IgG2 nicht erfolgreich bestimmt werden konnte. Aus diesem Grund wurde ein kommerzielles ELISA Kit zur Bestimmung der IgG-Subklassen erworben. Das Kit enthielt zwei Assay-Kontrollen, welche die Funktionalität des Assays und korrekte Konzentrationsbestimmungen bestätigen konnten. Andere Gruppen nutzten das kommerzielle ELISA Kit ebenfalls zur Bestimmung von IgG-Subklassen und erzielten ebenfalls erfolgreiche Ergebnisse (273–276).

Im Gegensatz zu den zunächst durchgeführten ELISA Assays verfügte der kommerzielle ELISA über vorbeschichtete Mikrotiterplatten, die eine feste Orientierung genutzter Antikörper ermöglichten. Auf diese Weise hatten alle anti-Gal Antikörper die gleichen Voraussetzungen, um von beschichteten anti-IgG Subklassenantikörpern gebunden zu werden. Möglicherweise führte diese fehlende Orientierung beschichteter Antikörper in den zuvor durchgeführten ELISAs zu den beobachteten Kreuzreaktionen bei IgG1 und IgG2. Die ermittelte Verteilung der IgG-Subklassen vom anti-Gal Antikörper konnten erfolgreich in einen Zusammenhang mit den von α -Gal-Strukturen initiierten Immunreaktionen gestellt werden (siehe 1.4.3).

Eine weitere Methode zur Bestimmung von IgG-Subklassen war die Verwendung von Radialimmunodiffusionsplatten. Diese Methode basierte auf der Ausbildung von Präzipitationslinien in einem Gel, wobei der quadrierte Durchmesser dieser Linie proportional zur eingesetzten Antigenkonzentration war. Die Quantifizierung erfolgte mittels Kalibration mit mitgelieferten Standards. Diese Methode wurde durch manuelles Ausmessen der

Durchmesser der kreisförmigen Präzipitationslinien ausgewertet und war daher sehr ungenau. Die ermittelte Verteilung der IgG-Subklassen war dennoch ähnlich zu der bereits bestimmten Verteilung beim kommerziellen ELISA Kit (siehe 3.8). Von anderen Gruppen ausgeführte Experimente mit Radialimmunodiffusionsplatten führten ebenfalls zu ungenauen Ergebnissen (277–279), weshalb mehr Vertrauen in die ermittelte Subklassenverteilung des ELISA gelegt werden sollte.

Die Verteilung von IgG-Subklassen vom anti-Gal Antikörper konnte mit zwei Methoden erfolgreich bestimmt werden. Die detektierten anti-Gal IgG-Subklassen entsprachen einer anti-Gal IgG Subklassenverteilung, wie sie bereits durch Antikörpertiterbestimmungen bei gesunden Menschen von Rispen *et al.* festgestellt wurde (280). An dieser Stelle ist anzumerken, dass Rispen *et al.* anti-Gal IgG Subklassen aus Plasma von Patienten untersuchten und in dieser Arbeit eine ausgewählte Antikörperfraktion zur Analyse verwendet wurde. Eine unmittelbar direkte Vergleichbarkeit ist damit wahrscheinlich nicht gegeben.

4.6.2 Isoelektrische Fokussierung des anti-Gal Antikörpers

Die Erforschung der Antikörpercharakteristika wurde mit der Bestimmung des isoelektrischen Verhaltens und der isoelektrischen Punkte vom anti-Gal Antikörper fortgesetzt. Dafür wurde der anti-Gal Antikörper zunächst mittels IPG-Streifen isoelektrisch fokussiert und schließlich mittels reduzierender 2D-Gelelektrophorese hinsichtlich Masse getrennt. Zusätzlich zur Färbung von Gelen mit Silber wurden Gele geblottet und via HRP-gekoppeltem anti-human IgG Antikörper detektiert. Im Gegensatz zum Western Blot zeigte das Silbergel eine deutlich stärkere Hintergrundfärbung und einige Artefakte in Form von horizontalen Linien (siehe 3.9). Die Ausbildung solcher Färbungsartefakte sind auf Wechselwirkungen der zur Reduktion verwendeten Chemikalien wie Dithiothreitol mit dem Silber-Färbereagenz zurückzuführen (281). Durch die Antikörper-spezifische Detektion beim Western Blot wurde die Detektion dieser Artefakte verhindert.

Der im Western Blot verwendete Detektionsantikörper detektierte die leichte Kette von IgG nicht in gleichem Maße wie die schwere Kette. Die vollständige Reduzierbarkeit des anti-Gal Antikörpers wurde mittels eindimensionaler Gelelektrophorese und Western Blot bestätigt (siehe 3.9). Der Western Blot zeigte eine schwächere Intensität der Bande der leichten Kette, die im Gegensatz zum Western Blot nach zweidimensionaler Trennung dennoch deutlich sichtbar war. Eine mögliche Erklärung liegt in der lokalen Proteinkonzentration begründet, die im Falle des eindimensionalen Western Blots höher war (eine konzentrierte Bande) als beim zweidimensionalen Western Blot (eine horizontale Linie aus mehreren dichten Punkten).

Aufgrund der Polyklonalität des Detektionsantikörpers war es nicht auszuschließen, dass er eine höhere Affinität zur schweren Kette von IgG aufwies als zur leichten Kette.

Der ermittelte Bereich von isoelektrischen Punkten zwischen pH 6 und pH 8 entsprach dem Bereich der isoelektrischen Punkte von humanem IgG, wie bereits von Prin *et al.* und Williamson *et al.* ermittelt werden konnte (282, 283). Der isoelektrische Punkt ist ein sehr wichtiges Charakteristikum von Antikörpern weil er Einsicht in die Nettoladung des Antikörpers bei bestimmten pH-Werten gibt. Aufgrund der natürlichen Produktion des Antikörpers im Menschen gehört anti-Gal zum IgG-Grundrepertoire, weshalb sein IgG-ähnliches isoelektrisches Verhalten und ähnlich bestimmte, isoelektrische Punkte plausibel waren.

4.7 Durch α -Gal-Strukturen ausgelöste Immunreaktionen

Die α -Gal Allergie gelangte in den Fokus der Aufmerksamkeit, nachdem der Konsum von rotem Fleisch allergische Symptome wie Rötung, Juckreiz, Übelkeit, Kopfschmerzen und Asthma auslöste (158, 160, 284). Anhand geographischer Überschneidungen von Abstoßungsreaktionen durch Cetuximab, Fällen von Allergien gegen rotes Fleisch und der Ausbreitung der "Lone Star" Zecke konnte ein Zusammenhang zwischen Zeckenbissen und Abstoßungsreaktionen durch α -Gal-tragende Proteinen hergestellt werden (148, 149, 153). Die am ehesten in einen immunologischen Kontext einzuordnenden Charakteristika vom anti-Gal Antikörper stellte die Verteilung der IgG-Subklassen dar. Es wurden 83% IgG2 und 14% IgG1 ermittelt. Die sehr kleinen Anteile an IgG3 und IgG4 wurden vernachlässigt.

Die Produktion von anti-Gal IgG2 könnte durch die natürliche Stimulation des Immunsystems durch α -Gal-tragende Bakterien der Darmflora herbeigeführt worden sein (153). Sobald das Immunsystem zusätzlich durch einen Zeckenbiss oder durch ein sonstiges α -Gal-tragendes Molekül (rotes Fleisch, Cetuximab) stimuliert wurde, sollte laut Literatur eine vermehrte Produktion von anti-Gal IgE und anti-Gal IgG1 eingeleitet werden (siehe 1.4.3). Durch mehrere Titerbestimmungen und Patientenstudien über α -Gal wurde ermittelt, dass der durchschnittliche Titer von anti-Gal IgG1 in gesunden Menschen bei ungefähr 10% liegt (280). Hohe Anteile an IgG2 sind demnach charakteristisch für eine TH1-vermittelte Immunantwort. Während der Immunantwort sekretiertes Interleukin 12 führte zur Produktion von IgG2 (285, 286). Lipid-verknüpfte α -Gal Epitope auf dem Lipopolysaccharid von Darmbakterien können von CD1d-Rezeptoren auf APCs präsentiert werden und über die Erkennung des T-Zell-Rezeptors von iNKT-Zellen eine TH1-vermittelte Immunantwort

einleiten (siehe 1.4.3.). Der ermittelte Anteil von anti-Gal IgG2 war charakteristisch für diese Art von Immunantwort. Durch die Bestimmung von IgG-Subklassen konnten die biologischen Vorgänge, die zur Produktion der ermittelten Subklassenverteilung führten, zurückverfolgt und nachvollzogen werden. Es war plausibel, dass anti-Gal IgG2 aufgrund der natürlichen Stimulierung des Immunsystems durch lipid-verknüpfte α -Gal-Strukturen auf Lipopolysacchariden produziert wurde. α -Gal-tragende Glykoproteine hätten zur Produktion von anti-Gal IgE und anti-Gal IgG1 geführt (siehe unten), so dass die Ursache der anti-Gal IgG2-Produktion wahrscheinlich auf die natürliche Stimulation durch Darmbakterien eingegrenzt werden kann.

Im Falle einer symptomatischen, allergischen Reaktion, die erst nach einer zweiten Stimulierung des Immunsystems auftritt, wurden hohe Titer von anti-Gal IgE zusammen mit anti-Gal IgG1 gemessen (280). Die Produktion dieser Antikörper war wahrscheinlich die Konsequenz einer von IL 13 und IL 5 ausgelösten TH2-Immunantwort (287). Das Prinzip dieser allergischen Reaktion verläuft wie folgt (siehe auch 1.4.3). α -Gal-tragende Allergene binden an auf Mastzellen gebundene anti-Gal IgE, woraufhin die Mastzellen aktiviert und Histamin sowie weitere Chemokine und Zytokine ausschütten (193). Das Resultat wäre wiederum eine vermehrte Ausschüttung von anti-Gal IgE und anti-Gal IgG1, was zur Verstärkung der allergischen Reaktion bis zum anaphylaktischen Schock führen kann.

In den letzten Jahren wurden die anti-Gal Titer gesunder Menschen mit denen von Patienten verglichen, die von Zecken gebissen wurden und unter Fleischallergie litten (280). Der gemessene Anteil an IgG2 in gesunden Menschen entsprach dabei dem in dieser Arbeit bestimmten Anteil von IgG2 mittels dem kommerziellen ELISA Kit. An der Allergie erkrankte Patienten hatten ungefähr 50% IgG1 und 50% IgG2 (280). Der hohe Anteil an IgG1 diene dabei vermutlich zur Speicherung des immunologischen Gedächtnisses zur Aufrechterhaltung der allergischen Immunantwort und zur Produktion hochspezifischer anti-Gal IgE durch einen "Class-Switch" zu IgE-produzierenden B-Zellen (288, 289).

Es ist zur Zeit unbekannt, wie therapeutische Applikationen von anti-Gal Antikörpern zur Schwächung oder Vermeidung von allergischen Reaktionen eingesetzt werden könnten. Die Injektion von anti-Gal IgG2 wäre denkbar, da diese Subklasse auf natürliche Weise im Menschen produziert wird. Ein höherer Titer an anti-Gal IgG2 könnte α -Gal-tragende Allergene möglicherweise binden und abbauen bevor eine allergische Reaktion eingeleitet werden konnte.

Eine Übersicht aller in dieser Arbeit angesprochenen, α -Gal-vermittelten Immunreaktionen und daraus resultierende Produktionen von Antikörper wurden in Abbildung 37 zusammengefasst.

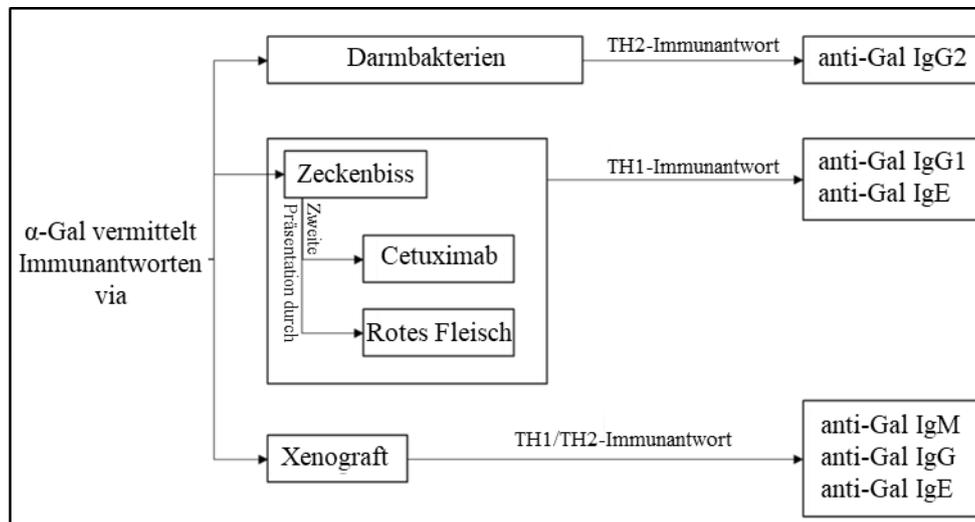


Abbildung 37: Übersicht über mögliche, durch α -Gal induzierte Immunreaktionen.

Das α -Gal Epitop kann Lipid-gebunden auf Darmbakterien, als Teil von *N*-Glykanen im Speichel von Zecken, auf Cetuximab oder in rotem Fleisch, oder auf in Xenotransplantationen transplantierten Organen lokalisiert sein. α -Gal auf Darmbakterien leitet TH2-vermittelte Immunantworten mit nachfolgender Produktion von anti-Gal IgG2 ein. α -Gal im Speichel von Zecken, auf Cetuximab oder in rotem Fleisch leitet eine TH1-vermittelte Immunantwort mit nachfolgender Produktion von anti-Gal IgE und anti-Gal IgG1 ein. α -Gal auf Xenografts leitet eine komplexe, TH1-vermittelte Immunantwort ein, bei der anti-Gal IgM, anti-Gal IgG1 und anti-Gal IgE produziert werden.

5 Ausblick

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente und Versuche gaben erstmalig einen Einblick in die Eigenschaften und Charakteristika von isolierten anti-Gal Antikörpern.

Von Galili *et al.* durchgeführte Pionierarbeiten konnten bereits wichtige Aspekte wie die Reinigung, die Spezifität vom anti-Gal Antikörper und die Eigenschaften des α -Gal Epitops hinsichtlich der Ausbildung von Immunantworten und Allergien beleuchten.

Im Gegensatz zu den Arbeiten von Galili *et al.* stellt meine Arbeit eine detaillierte Analyse der Antikörperspezifität gegenüber dem α -Gal Epitop sowie eine tiefgehende Charakterisierung von gereinigtem anti-Gal Antikörper hinsichtlich seiner N-Glykosylierung, seiner IgG-Subklassen, seiner Eignung als Detektionsantikörper und seinem isoelektrischen Verhalten bereit.

Meine Arbeit setzte es sich als Ziel, anti-Gal Antikörper erstmalig in bisher nicht vorhandener Tiefe zu analysieren und ihre Eigenschaften in einen immunologischen Kontext zu setzen. Es wäre erstrebenswert, die in dieser Arbeit ermittelten Charakteristika auf zelluläre Assays als *in vitro* Simulation zu übertragen. Ein fundamentales Wissen über die immunologischen Prozesse ist entscheidend zur Anwendung von anti-Gal Antikörper im Kontext der Vakzinoptimierung oder in Xenotransplantationen.

Ein zweiter Ansatz, der in zukünftigen Experimenten weiterverfolgt werden könnte, ist ein methodischer Aspekt bezüglich der Quantifizierung von α -Gal Epitopen auf Glykoproteinen. Obwohl kommerzielle ELISA Assays für die Quantifizierung von α -Gal bereits existieren, wäre es erstrebenswert, einen Assay zu entwickeln, der unabhängig von Proteinkonformation oder α -Gal-Zugänglichkeit funktioniert. Proteine mit bekanntem α -Gal-Gehalt könnten als Standardproteine genutzt werden, wobei sich auch in diesem Fall die Besetzung und Zugänglichkeit von α -Gal aufgrund von unterschiedlichen Proteinkonformationen und der Mikroheterogenität von Glykanen unterscheiden kann.

Für eine weitergehende Verifizierung könnten durchgeführte Assays mit rekombinant produzierten anti-Gal Antikörpern wiederholt werden, um einerseits mögliche Unterschiede zwischen den Antikörpern zu ermitteln und andererseits um Strategien zur Optimierung der Glykosylierung zu entwickeln und die Eignung für therapeutische Zwecke zu untersuchen.

Die Wechselwirkungen zwischen anti-Gal Antikörpern und Glykanepitopen könnten, zusätzlich zu den in dieser Arbeit durchgeführten Affinitätsmessungen, auf einem molekularen

Level mittels Kristallisation und Strukturanalyse analysiert werden. Eine Strukturanalyse der bei den Interaktionen beteiligten Bindungspartnern würde das Verständnis über die Struktur und Konformation der Bindungstasche von anti-Gal erhöhen. Diese Messungen könnten mit bereits erfolgten SPR-Messungen kombiniert werden, um bestimmte strukturelle Aspekte mit berechneten Affinitäten zu vereinbaren.

6 Zusammenfassung

Das α -Gal Epitop ist ein immunogenes Glykan-Epitop, das aus der Trisaccharidstruktur GlcNAc- β -1,4-Gal- α -1,3-Gal besteht. Es kann als Anteil komplexer *N*-Glykane auf Glykoproteinen oder als Lipid-verknüpftes Glykokonjugat auf Zelloberflächen von Nicht-Primaten wie Neuweltaffen, Schweinen und Kaninchen präsentiert werden. Menschen und Altweltaffen exprimieren das α -Gal Epitop aufgrund der evolutionär bedingten Inaktivierung der α -1,3-Galaktosyltransferase nicht. Antikörper gegen das α -Gal Epitop werden als Immunantwort gegen Darmbakterien produziert, die α -Gal Strukturen auf ihrer Lipopolysaccharidschicht tragen. Es ist bekannt, dass α -Gal tragende Proteine zu Abstoßungsreaktionen und Anaphylaxie in Primaten führen. Obwohl viele geschichtliche Fakten und Eigenschaften des α -Gal Epitops bekannt sind, existiert nur wenig Wissen betrefflich der Charakteristiken von anti-Gal Antikörpern im Menschen. Darum wurden anti-Gal Antikörper in dieser Arbeit erstmalig aus Octagam gereinigt und hinsichtlich ihrer Spezifität gegenüber dem α -Gal Epitop, der Verteilung von IgG Subklassen, ihrem isoelektrischen Punkt und ihrer *N*-Glykosylierung untersucht. Die bislang nur mit wenigen Methoden gezeigte Spezifität von anti-Gal Antikörpern zum α -Gal Epitop wurde in meiner Arbeit durch verschiedene orthogonale Methoden, darunter ELISA, Erythrozytenagglutination, Oberflächenplasmonresonanz und Western Blot, in bisher nicht vorhanden gewesener Detailliertheit und Tiefe nachgewiesen. Neben dem erfolgreichen Nachweis der Antikörperspezifität wurden erstmalig bedeutende anti-Gal Charakteristika wie die Distribution von IgG-Subklassen, das isoelektrische Verhalten und die *N*-Glykosylierung analysiert. Gereinigte und spezifische anti-Gal Antikörper bestanden hauptsächlich aus dem IgG2 Isotyp (83%). Anti-Gal Antikörper zeigten human-IgG ähnliches Verhalten sowie eine human-IgG ähnliche Glykosylierung, dominiert von biantennären und fukosylierten *N*-Glykanstrukturen. Die Verwendung der gereinigten Antikörper als Werkzeug für die Detektion von α -Gal Strukturen auf Cetuximab, bovinem Thyroglobulinen und rekombinantem Faktor VIII wurde innerhalb dieser Arbeit untersucht und das gewonnene Wissen über verschiedene Charakteristika der anti-Gal Antikörper wurde in einen Zusammenhang mit im humanen Organismus ablaufenden Immunreaktionen gestellt. Die Experimente und Versuche dieser Arbeit gaben einen zuvor noch nicht existenten Einblick in Eigenschaften und Charakteristika isolierter anti-Gal Antikörper und zeigten mögliche Verwendungen gereinigter anti-Gal Antikörper zur Detektion des α -Gal Epitops auf.

The α -Gal epitope is an immunogenic glycan epitope which consists of the trisaccharide structure GlcNAc- β -1,4-Gal- α -1,3-Gal. It can be presented as part of complex type *N*-glycans on glycoproteins or as lipid-linked glycan conjugate on cell surfaces of non-primate mammals like new world monkeys, pigs and rabbits. Humans and old world monkeys do not express the α -Gal epitope due to the evolutionary inactivation of the α -1,3-galactosyltransferase which is the catalyzing enzyme for its synthesis. Antibodies against the α -Gal epitope are produced naturally as immunological response to intestinal bacteria that bear α -Gal structures on their lipopolysaccharide chains. It is common knowledge that α -Gal bearing proteins lead to hyperacute rejection and anaphylaxis in primate organisms. Although much about α -Gal and its background is already known, only little knowledge exists concerning the characteristics of anti-Gal antibodies in human.

Therefore, for the first time, anti-Gal antibodies were purified from Octagam and characterized in terms of specificity towards the α -Gal epitope, IgG subclass distribution, isoelectric behaviour and glycosylation. The specificity of anti-Gal antibodies to the α Gal epitope, which so far has been shown only with a few methods, has been investigated in my work by various orthogonal methods including ELISA, erythrocyte agglutination, SPR and Western Blot. In addition to the successful detection of antibody specificity, significant anti-Gal characteristics such as distribution of IgG subclasses, isoelectric behavior, and *N*-glycosylation were analyzed for the first time.

Purified anti-Gal antibodies consisted mainly of the IgG2 isotype (83%). Anti-Gal showed human IgG like isoelectric behaviour as well as a typical human IgG-like *N*-glycosylation profile dominated by biantennary, fucosylated *N*-glycan structures. The usage of these purified antibodies as a tool for the detection of α -Gal structures on Cetuximab, bovine Thyroglobuline and recombinant Factor VIII is investigated and discussed within this work. The gained knowledge about the characteristics of the anti-Gal antibody was linked to immune reactions occurring in the human body for the first time. The experiments and investigations carried out in this work gave a previously non-existent insight into the properties and characteristics of isolated anti-Gal antibodies and discovered the suitability of the purified anti-Gal antibody as detection antibody for the α -Gal epitope.

7 Literaturverzeichnis

1. Berger, E. G., Buddecke, E., Kamerling, J. P., Kobata, A., Paulson, J. C., and Vliegthart, J. F. (1982) Structure, biosynthesis and functions of glycoprotein glycans. *Experientia* **38**, 1129–1162
2. Bieberich, E. (2014) Synthesis, Processing, and Function of N-glycans in N-glycoproteins. *Advances in neurobiology* **9**, 47–70
3. Meisenberg, G., and Simmons, W. H. (2012) *Principles of medical biochemistry*, 3rd Ed., Elsevier/Mosby, Philadelphia
4. Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H., Stanley, P., Marth, J. D., Bertozzi, C. R., Hart, G. W., and Etzler, M. E. (2009) Symbol nomenclature for glycan representation. *Proteomics* **9**, 5398–5399
5. Schwarz, F., and Aebi, M. (2011) Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. *Current opinion in structural biology* **21**, 576–582
6. Schachter, H., and Brockhausen, I. (1989) The biosynthesis of branched O-glycans. *Symposia of the Society for Experimental Biology* **43**, 1–26
7. Pinho, S. S., and Reis, C. A. (2015) Glycosylation in cancer: Mechanisms and clinical implications. *Nature reviews. Cancer* **15**, 540–555
8. Zacchi, L. F., and Schulz, B. L. (2016) N-glycoprotein macroheterogeneity: Biological implications and proteomic characterization. *Glycoconjugate journal* **33**, 359–376
9. Di Wu, Struwe, W. B., Harvey, D. J., Ferguson, M. A. J., and Robinson, C. V. (2018) N-glycan microheterogeneity regulates interactions of plasma proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **115**, 8763–8768
10. Stavenhagen, K., Hinneburg, H., Thaysen-Andersen, M., Hartmann, L., Varón Silva, D., Fuchser, J., Kaspar, S., Rapp, E., Seeberger, P. H., and Kolarich, D. (2013) Quantitative mapping of glycoprotein micro-heterogeneity and macro-heterogeneity: An evaluation of mass spectrometry signal strengths using synthetic peptides and glycopeptides. *Journal of mass spectrometry : JMS* **48**, 627–639
11. An, H. J., Froehlich, J. W., and Lebrilla, C. B. (2009) Determination of glycosylation sites and site-specific heterogeneity in glycoproteins. *Current Opinion in Chemical Biology* **13**, 421–426
12. Hossler, P., Mulukutla, B. C., and Hu, W.-S. (2007) Systems analysis of N-glycan processing in mammalian cells. *PloS one* **2**, e713

13. Xiang, Y., Zhang, X., Nix, D. B., Katoh, T., Aoki, K., Tiemeyer, M., and Wang, Y. (2013) Regulation of protein glycosylation and sorting by the Golgi matrix proteins GRASP55/65. *Nature communications* **4**, 1659
14. Schachter, H. (1991) The ‘yellow brick road’ to branched complex N -glycans. *Glycobiology* **1**, 453–461
15. Mellquist, J. L., Kasturi, L., Spitalnik, S. L., and Shakin-Eshleman, S. H. (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
16. Shakin-Eshleman, S. H., Spitalnik, S. L., and Kasturi, L. (1996) The amino acid at the X position of an Asn-X-Ser sequon is an important determinant of N-linked core-glycosylation efficiency. *The Journal of biological chemistry* **271**, 6363–6366
17. Brooks, S. A. (2006) Protein glycosylation in diverse cell systems: Implications for modification and analysis of recombinant proteins. *Expert. Rev. Proteomics.* **3**, 345–359
18. Goochee, C. F., and Monica, T. (1990) Environmental effects on protein glycosylation. *Biotechnology (N. Y.)* **8**, 421–427
19. Varki, A. (1998) Factors controlling the glycosylation potential of the Golgi apparatus. *Trends Cell Biol.* **8**, 34–40
20. Medzihradzky, K. F., Kaasik, K., and Chalkley, R. J. (2015) Tissue-Specific Glycosylation at the Glycopeptide Level. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **14**, 2103–2110
21. van Die, I., van Tetering, A., Schiphorst, W. E.C.M., Sato, T., Furukawa, K., and van den Eijnden, D. H. (1999) The acceptor substrate specificity of human β 4-galactosyltransferase V indicates its potential function in O -glycosylation. *FEBS letters* **450**, 52–56
22. Saravanan, C., Cao, Z., Head, S. R., and Panjwani, N. (2010) Analysis of differential expression of glycosyltransferases in healing corneas by glycogene microarrays. *Glycobiology* **20**, 13–23
23. Ghaderi, D., Zhang, M., Hurtado-Ziola, N., and Varki, A. (2012) Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation. *Biotechnol. Genet. Eng Rev.* **28**, 147–175
24. van Beers, M. M. C., and Bardor, M. (2012) Minimizing immunogenicity of biopharmaceuticals by controlling critical quality attributes of proteins. *Biotechnology journal* **7**, 1473–1484

25. Jäckh, R. (1976) Chemie und Biologie der Sialinsäuren. *Chemie in unserer Zeit* **10**, 139–146
26. Angata, T., and Varki, A. (2002) Chemical Diversity in the Sialic Acids and Related α -Keto Acids: An Evolutionary Perspective. *Chem. Rev.* **102**, 439–470
27. Chou, W. K., Hinderlich, S., Reutter, W., and Tanner, M. E. (2003) Sialic acid biosynthesis: Stereochemistry and mechanism of the reaction catalyzed by the mammalian UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 2455–2461
28. Mookerjee, S., Coolbear, T., and Sarkar, M. L. (1983) Key role of dolichol phosphate in glycoprotein biosynthesis. *Canadian journal of biochemistry and cell biology = Revue canadienne de biochimie et biologie cellulaire* **61**, 1032–1040
29. Schenk, B., Fernandez, F., and Waechter, C. J. (2001) The ins(ide) and outs(ide) of dolichyl phosphate biosynthesis and recycling in the endoplasmic reticulum. *Glycobiology* **11**, 61R-70R
30. Kornfeld, R., and Kornfeld, S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annual review of biochemistry* **54**, 631–664
31. Rush, J. S. (2015) Role of Flippases in Protein Glycosylation in the Endoplasmic Reticulum. *Lipid insights* **8**, 45–53
32. Silberstein, S., and Gilmore, R. (1996) Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase. *FASEB J.* **10**, 849–858
33. Deprez, P., Gautschi, M., and Helenius, A. (2005) More than one glycan is needed for ER glucosidase II to allow entry of glycoproteins into the calnexin/calreticulin cycle. *Mol. Cell* **19**, 183–195
34. Williams, D. B. (2006) Beyond lectins: The calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* **119**, 615–623
35. Oda, Y., Hosokawa, N., Wada, I., and Nagata, K. (2003) EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin. *Science* **299**, 1394–1397
36. Roth, J., Ziak, M., and Zuber, C. (2003) The role of glucosidase II and endomannosidase in glucose trimming of asparagine-linked oligosaccharides. *Biochimie* **85**, 287–294
37. Trombetta, E. S. (2003) The contribution of N-glycans and their processing in the endoplasmic reticulum to glycoprotein biosynthesis. *Glycobiology* **13**, 77R-91R
38. Herscovics, A. (1999) Importance of glycosidases in mammalian glycoprotein biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1473**, 96–107

39. Brockhausen, I., Narasimhan, S., and Schachter, H. (1988) The biosynthesis of highly branched N-glycans: Studies on the sequential pathway and functional role of N-acetylglucosaminyltransferases I, II, III, IV, V and VI. *Biochimie* **70**, 1521–1533
40. Gary-Bobo, M., Nirdé, P., Jeanjean, A., Morère, A., and Garcia, M. (2007) Mannose 6-phosphate receptor targeting and its applications in human diseases. *Current medicinal chemistry* **14**, 2945–2953
41. Lairson, L. L., Henrissat, B., Davies, G. J., and Withers, S. G. (2008) Glycosyltransferases: Structures, functions, and mechanisms. *Annual review of biochemistry* **77**, 521–555
42. Abdel Rahman, A. M., Ryczko, M., Nakano, M., Pawling, J., Rodrigues, T., Johswich, A., Taniguchi, N., and Dennis, J. W. (2015) Golgi N-glycan branching N-acetylglucosaminyltransferases I, V and VI promote nutrient uptake and metabolism. *Glycobiology* **25**, 225–240
43. Moremen, K. W., Trimble, R. B., and Herscovics, A. (1994) Glycosidases of the asparagine-linked oligosaccharide processing pathway. *Glycobiology* **4**, 113–125
44. Colley, K. J., Kitajima, K., and Sato, C. (2014) Polysialic acid: Biosynthesis, novel functions and applications. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **49**, 498–532
45. Drake, P. M., Nathan, J. K., Stock, C. M., Chang, P. V., Muench, M. O., Nakata, D., Reader, J. R., Gip, P., Golden, K. P., Weinhold, B., Gerardy-Schahn, R., Troy, F. A., and Bertozzi, C. R. (2008) Polysialic acid, a glycan with highly restricted expression, is found on human and murine leukocytes and modulates immune responses. *J. Immunol.* **181**, 6850–6858
46. Gill, D. J., Chia, J., Senewiratne, J., and Bard, F. (2010) Regulation of O-glycosylation through Golgi-to-ER relocation of initiation enzymes. *The Journal of cell biology* **189**, 843–858
47. Bond, M. R., and Hanover, J. A. (2015) A little sugar goes a long way: the cell biology of O-GlcNAc. *The Journal of cell biology* **208**, 869–880
48. Hassan, H., Bennett, E. P., Mandel, V., Hollingsworth, M. A., and Clausen, H. (2000) Control of Mucin-Type O-Glycosylation: O-Glycan Occupancy is Directed by Substrate Specificities of Polypeptide GalNAc-Transferases. In Ernst, B., Hart, G. W., Sinäy, P., Eds. *Carbohydrates in chemistry and biology*, Weinheim, New York, Wiley-VCH

49. O'Connell, B., Tabak, L. A., and Ramasubbu, N. (1991) The influence of flanking sequences on O-glycosylation. *Biochemical and biophysical research communications* **180**, 1024–1030
50. Hounsell, E. F., Davies, M. J., and Renouf, D. V. (1996) O-linked protein glycosylation structure and function. *Glycoconjugate journal* **13**, 19–26
51. Varki, A. (1993) Biological roles of oligosaccharides: All of the theories are correct. *Glycobiology* **3**, 97–130
52. Varki, A. (2017) Biological roles of glycans. *Glycobiology* **27**, 3–49
53. Weinbaum, S., Tarbell, J. M., and Damiano, E. R. (2007) The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annual review of biomedical engineering* **9**, 121–167
54. Parker, R. B., and Kohler, J. J. (2010) Regulation of intracellular signaling by extracellular glycan remodeling. *ACS chemical biology* **5**, 35–46
55. Yeo, T. K., Senger, D. R., Dvorak, H. F., Freter, L., and Yeo, K. T. (1991) Glycosylation is essential for efficient secretion but not for permeability-enhancing activity of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor). *Biochemical and biophysical research communications* **179**, 1568–1575
56. Kobata, A. (2008) The N-linked sugar chains of human immunoglobulin G: Their unique pattern, and their functional roles. *Biochimica et biophysica acta* **1780**, 472–478
57. Abès, R., and Teillaud, J.-L. (2010) Impact of Glycosylation on Effector Functions of Therapeutic IgG. *Pharmaceuticals* **3**, 146–157
58. Schött, U., Solomon, C., Fries, D., and Bentzer, P. (2016) The endothelial glycocalyx and its disruption, protection and regeneration: A narrative review. *Scandinavian journal of trauma, resuscitation and emergency medicine* **24**, 48
59. Powell, L. M., and Pain, R. H. (1992) Effects of glycosylation on the folding and stability of human, recombinant and cleaved alpha 1-antitrypsin. *J Mol. Biol.* **224**, 241–252
60. Jimenezcastano, L., Lopezfandino, R., Olano, A., and Villamiel, M. (2005) Study on β -lactoglobulin glycosylation with dextran: Effect on solubility and heat stability. *Food Chemistry* **93**, 689–695
61. Shental-Bechor, D., and Levy, Y. (2009) Folding of glycoproteins: Toward understanding the biophysics of the glycosylation code. *Current opinion in structural biology* **19**, 524–533
62. LIS, H., and Sharon, N. (1993) Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *Eur J Biochem.* **218**, 1–27

63. Taylor, M. E., and Drickamer, K. (2009) Structural insights into what glycan arrays tell us about how glycan-binding proteins interact with their ligands. *Glycobiology* **19**, 1155–1162
64. Merkle, R. K., and Cummings, R. D. (1987) Lectin affinity chromatography of glycopeptides. *Methods Enzymol.* **138**, 232–259
65. LIS, H., and Sharon, N. (1998) Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chemical reviews* **98**, 637–674
66. Helenius, A. (2001) Intracellular Functions of N-Linked Glycans. *Science* **291**, 2364–2369
67. Turner, M.W. (2003) The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Molecular immunology* **40**, 423–429
68. Zhao, Y., Sato, Y., Isaji, T., Fukuda, T., Matsumoto, A., Miyoshi, E., Gu, J., and Taniguchi, N. (2008) Branched N-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins. *The FEBS journal* **275**, 1939–1948
69. Nagae, M., and Yamaguchi, Y. (2012) Function and 3D structure of the N-glycans on glycoproteins. *International journal of molecular sciences* **13**, 8398–8429
70. Bucior, I., and Burger, M. M. (2004) Carbohydrate-carbohydrate interactions in cell recognition. *Current opinion in structural biology* **14**, 631–637
71. van Die, I., and Cummings, R. D. (2010) Glycan gimmickry by parasitic helminths: A strategy for modulating the host immune response? *Glycobiology* **20**, 2–12
72. Poulain, D., and Jouault, T. (2004) *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors and responses: Elements for a decisive crosstalk. *Current opinion in microbiology* **7**, 342–349
73. Mühlenhoff, M., Eckhardt, M., and Gerardy-Schahn, R. (1998) Polysialic acid: Three-dimensional structure, biosynthesis and function. *Current opinion in structural biology* **8**, 558–564
74. Bhattacharyya, M. L., Nathan, R. D., and Shelton, V. L. (1981) Release of sialic acid alters the stability of the membrane potential in cardiac muscle. *Life Sciences* **29**, 1071–1078
75. Varki, A. (2007) Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. *Nature* **446**, 1023–1029
76. Wagner, R., Matrosovich, M., and KLENK, H.-D. (2002) Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Reviews in medical virology* **12**, 159–166

77. Fukuda, M. N., Sasaki, H., Lopez, L., and Fukuda, M. (1989) Survival of recombinant erythropoietin in the circulation: The role of carbohydrates. *Blood* **73**, 84–89
78. Zhou, Q., and Qiu, H. (2018) The Mechanistic Impact of N-Glycosylation on Stability, Pharmacokinetics, and Immunogenicity of Therapeutic Proteins. *J. Pharm. Sci.*
79. Bardor, M., Faveeuw, C., Fitchette, A.-C., Gilbert, D., Galas, L., Trottein, F., Faye, L., and Lerouge, P. (2003) Immunoreactivity in mammals of two typical plant glyco-epitopes, core alpha(1,3)-fucose and core xylose. *Glycobiology* **13**, 427–434
80. Kötzler, M. P., Blank, S., Behnken, H. N., Alpers, D., Bantleon, F. I., Spillner, E., and Meyer, B. (2012) Formation of the immunogenic α 1,3-fucose epitope: Elucidation of substrate specificity and of enzyme mechanism of core fucosyltransferase A. *Insect biochemistry and molecular biology* **42**, 116–125
81. Kurz, S., King, J. G., Dinglasan, R. R., Paschinger, K., and Wilson, I. B. H. (2016) The fucomic potential of mosquitoes: Fucosylated N-glycan epitopes and their cognate fucosyltransferases. *Insect biochemistry and molecular biology* **68**, 52–63
82. van Ree, R. (2002) Carbohydrate epitopes and their relevance for the diagnosis and treatment of allergic diseases. *International archives of allergy and immunology* **129**, 189–197
83. Rup, B., Alon, S., Amit-Cohen, B.-C., Brill Almon, E., Chertkoff, R., Tekoah, Y., and Rudd, P. M. (2017) Immunogenicity of glycans on biotherapeutic drugs produced in plant expression systems-The taliglucerase alfa story. *PloS one* **12**, e0186211
84. Naito, Y., Takematsu, H., Koyama, S., Miyake, S., Yamamoto, H., Fujinawa, R., Sugai, M., Okuno, Y., Tsujimoto, G., Yamaji, T., Hashimoto, Y., Itoharu, S., Kawasaki, T., Suzuki, A., and Kozutsumi, Y. (2007) Germinal center marker GL7 probes activation-dependent repression of N-glycolylneuraminic acid, a sialic acid species involved in the negative modulation of B-cell activation. *Mol. Cell Biol.* **27**, 3008–3022
85. Chou, H.-H., Hayakawa, T., Diaz, S., Krings, M., Indriati, E., Leakey, M., Paabo, S., Satta, Y., Takahata, N., and Varki, A. (2002) Inactivation of CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase occurred prior to brain expansion during human evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 11736–11741
86. Tangvoranuntakul, P., Gagneux, P., Diaz, S., Bardor, M., Varki, N., Varki, A., and Muchmore, E. (2003) Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 12045–12050

87. Bardor, M., Nguyen, D. H., Diaz, S., and Varki, A. (2005) Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid into human cells. *J Biol. Chem.* **280**, 4228–4237
88. Ghaderi, D., Taylor, R. E., Padler-Karavani, V., Diaz, S., and Varki, A. (2010) Implications of the presence of N-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins. *Nature biotechnology* **28**, 863–867
89. Gao, B., Long, C., Lee, W., Zhang, Z., Gao, X., Landsittel, D., Ezzelarab, M., Ayares, D., Huang, Y., Cooper, D. K. C., Wang, Y., and Hara, H. (2017) Anti-Neu5Gc and anti-non-Neu5Gc antibodies in healthy humans. *PloS one* **12**, e0180768
90. Omasa, T., Onitsuka, M., and Kim, W.-D. (2010) Cell engineering and cultivation of chinese hamster ovary (CHO) cells. *Current pharmaceutical biotechnology* **11**, 233–240
91. Zhang, P., Woen, S., Wang, T., Liau, B., Zhao, S., Chen, C., Yang, Y., Song, Z., Wormald, M. R., Yu, C., and Rudd, P. M. (2016) Challenges of glycosylation analysis and control: An integrated approach to producing optimal and consistent therapeutic drugs. *Drug discovery today* **21**, 740–765
92. Varki, A. (2011) Biotherapeutic Products Containing the Non-Human Sialic Acid Neu5Gc (NGNA) -Implications and Potential Solutions, American Association of Pharmaceutical Scientists
93. Samraj, A. N., Pearce, O. M. T., Läubli, H., Crittenden, A. N., Bergfeld, A. K., Banda, K., Gregg, C. J., Bingman, A. E., Secrest, P., Diaz, S. L., Varki, N. M., and Varki, A. (2015) A red meat-derived glycan promotes inflammation and cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, 542–547
94. Galili, U. (2013) Discovery of the natural anti-Gal antibody and its past and future relevance to medicine. *Xenotransplantation*.
95. Galili, U., Shohet, S. B., Kobrin, E., Stults, C. L., and Macher, B. A. (1988) Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells. *The Journal of biological chemistry* **263**, 17755–17762
96. Galili, U., Buehler, J., Shohet, S. B., and Macher, B. A. (1987) The human natural anti-Gal IgG. III. The subtlety of immune tolerance in man as demonstrated by crossreactivity between natural anti-Gal and anti-B antibodies. *The Journal of experimental medicine* **165**, 693–704

97. Zhang, L., Luo, S., and Zhang, B. (2016) Glycan analysis of therapeutic glycoproteins. *mAbs* **8**, 205–215
98. Montacir, O., Montacir, H., Springer, A., Hinderlich, S., Mahboudi, F., Saadati, A., and Parr, M. K. (2018) Physicochemical Characterization, Glycosylation Pattern and Biosimilarity Assessment of the Fusion Protein Etanercept. *The protein journal* **37**, 164–179
99. Tarentino, A. L., Gomez, C. M., and Plummer, T. H. (2002) Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide: N-glycosidase F. *Biochemistry* **24**, 4665–4671
100. Bigge, J. C., Patel, T. P., Bruce, J. A., Goulding, P. N., Charles, S. M., and Parekh, R. B. (1995) Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-amino benzamide and anthranilic acid. *Anal. Biochem.* **230**, 229–238
101. Hilliard, M., Alley, W. R., McManus, C. A., Yu, Y. Q., Hallinan, S., Gebler, J., and Rudd, P. M. (2017) Glycan characterization of the NIST RM monoclonal antibody using a total analytical solution: From sample preparation to data analysis. *mAbs* **9**, 1349–1359
102. Guile, G. R., Rudd, P. M., Wing, D. R., Prime, S. B., and Dwek, R. A. (1996) A rapid high-resolution high-performance liquid chromatographic method for separating glycan mixtures and analyzing oligosaccharide profiles. *Anal. Biochem.* **240**, 210–226
103. Largy, E., Cantais, F., van Vyncht, G., Beck, A., and Delobel, A. (2017) Orthogonal liquid chromatography-mass spectrometry methods for the comprehensive characterization of therapeutic glycoproteins, from released glycans to intact protein level. *Journal of chromatography. A* **1498**, 128–146
104. Lopez Aguilar, A., Briard, J. G., Yang, L., Ovryn, B., Macauley, M. S., and Wu, P. (2017) Tools for Studying Glycans: Recent Advances in Chemoenzymatic Glycan Labeling. *ACS chemical biology* **12**, 611–621
105. Melmer, M., Stangler, T., Premstaller, A., and Lindner, W. (2011) Comparison of hydrophilic-interaction, reversed-phase and porous graphitic carbon chromatography for glycan analysis. *Journal of chromatography. A* **1218**, 118–123
106. Beck, A., Debaene, F., Diemer, H., Wagner-Rousset, E., Colas, O., van Dorsselaer, A., and Cianféroni, S. (2015) Cutting-edge mass spectrometry characterization of originator, biosimilar and biobetter antibodies. *Journal of mass spectrometry : JMS* **50**, 285–297
107. Albrecht, S., Vainauskas, S., Stöckmann, H., McManus, C., Taron, C. H., and Rudd, P. M. (2016) Comprehensive Profiling of Glycosphingolipid Glycans Using a Novel Broad

- Specificity Endoglycoceramidase in a High-Throughput Workflow. *Analytical chemistry* **88**, 4795–4802
108. Rothenhöfer, M., Grundmann, M., Bernhardt, G., Matysik, F.-M., and Buschauer, A. (2015) High performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) for the sensitive determination of hyaluronan oligosaccharides. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **988**, 106–115
109. Morelle, W., Faid, V., Chirat, F., and Michalski, J. C. (2009) Analysis of N- and O-linked glycans from glycoproteins using MALDI-TOF mass spectrometry. *Methods Mol. Biol.* **534**, 5–21
110. Zhang, L., Luo, S., and Zhang, B. (2016) The use of lectin microarray for assessing glycosylation of therapeutic proteins. *mAbs* **8**, 524–535
111. Zhou, Q., Park, S.-H., Boucher, S., Higgins, E., Lee, K., and Edmunds, T. (2004) N-linked oligosaccharide analysis of glycoprotein bands from isoelectric focusing gels. *Analytical biochemistry* **335**, 10–16
112. Yan, J., Shi, S., Wang, H., Liu, R., Li, N., Chen, Y., and Wang, S. (2016) Neutral monosaccharide composition analysis of plant-derived oligo- and polysaccharides by high performance liquid chromatography. *Carbohydrate Polymers* **136**, 1273–1280
113. Taylor, A. M., Holst, O., and Thomas-Oates, J. (2006) Mass spectrometric profiling of O-linked glycans released directly from glycoproteins in gels using in-gel reductive beta-elimination. *Proteomics* **6**, 2936–2946
114. Kozak, R. P., Royle, L., Gardner, R. A., Bondt, A., Fernandes, D. L., and Wuhrer, M. (2014) Improved nonreductive O-glycan release by hydrazinolysis with ethylenediaminetetraacetic acid addition. *Analytical biochemistry* **453**, 29–37
115. Yang, S., Onigman, P., Wu, W. W., Sjogren, J., Nyhlen, H., Shen, R.-F., and Cipollo, J. (2018) Deciphering Protein O-Glycosylation: Solid-Phase Chemoenzymatic Cleavage and Enrichment. *Analytical chemistry* **90**, 8261–8269
116. Zauner, G., Koeleman, C. A. M., Deelder, A. M., and Wuhrer, M. (2012) Mass spectrometric O-glycan analysis after combined O-glycan release by beta-elimination and 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone labeling. *Biochimica et biophysica acta* **1820**, 1420–1428
117. Liedberg, B., Lundström, I., and Stenberg, E. (1993) Principles of biosensing with an extended coupling matrix and surface plasmon resonance. *Sensors and Actuators B: Chemical* **11**, 63–72

118. Englebienne, P., van Hoonacker, A., and Verhas, M. (2003) Surface plasmon resonance: Principles, methods and applications in biomedical sciences. *Spectroscopy* **17**, 255–273
119. Hahnefeld, C., Drewianka, S., and Herberg, F. W. (2004) Determination of kinetic data using surface plasmon resonance biosensors. *Methods in molecular medicine* **94**, 299–320
120. Esparvarinha, M., Nickho, H., Mohammadi, H., Aghebati-Maleki, L., Abdolalizadeh, J., and Majidi, J. (2017) The role of free kappa and lambda light chains in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **91**, 632–644
121. Liu, H., and May, K. (2012) Disulfide bond structures of IgG molecules: Structural variations, chemical modifications and possible impacts to stability and biological function. *mAbs* **4**, 17–23
122. Adlersberg, J. B. (1976) The immunoglobulin hinge (interdomain) region. *Ric. Clin. Lab* **6**, 191–205
123. Burton, D. R., and Gregory, L. (1986) Structure and Function of Immunoglobulins. In French, M. A. H., Ed. *Immunoglobulins in Health and Disease*, Dordrecht, Springer Netherlands
124. O'Kennedy, R., Murphy, C., and Devine, T. (2016) Technology advancements in antibody purification. *ANTI* Volume 6, 17–32
125. Schroeder, H. W., and Cavacini, L. (2010) Structure and function of immunoglobulins. *The Journal of allergy and clinical immunology* **125**, S41-52
126. Späth, P. J. (1999) Structure and Function of Immunoglobulins. *Sepsis* **3**, 197–218
127. Vidarsson, G., Dekkers, G., and Rispens, T. (2014) IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. *Front Immunol.* **5**, 520
128. Vidarsson, G., Dekkers, G., and Rispens, T. (2014) IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. *Front Immunol.* **5**, 520
129. Kontermann, R. E. (2011) Strategies for extended serum half-life of protein therapeutics. *Current Opinion in Biotechnology* **22**, 868–876
130. MacCallum, R. M., Martin, A. C., and Thornton, J. M. (1996) Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography. *J Mol. Biol.* **262**, 732–745
131. Mathers, A. R., and Cuff, C. F. (2004) Role of interleukin-4 (IL-4) and IL-10 in serum immunoglobulin G antibody responses following mucosal or systemic reovirus infection. *Journal of virology* **78**, 3352–3360

132. Metzger, D. W. (2010) Interleukin-12 as an adjuvant for induction of protective antibody responses. *Cytokine* **52**, 102–107
133. Liu, S., Kandeve, T., and Tchervenkov, J. (2009) CD1d-mediated interaction between activated T cells and B cells is essential to B-cell proliferation and anti-alpha-Gal antibody production. *Transplantation proceedings* **41**, 398–402
134. Jawdat, D. M., Albert, E. J., Rowden, G., Haidl, I. D., and Marshall, J. S. (2004) IgE-Mediated Mast Cell Activation Induces Langerhans Cell Migration In Vivo. *J. Immunol.* **173**, 5275–5282
135. Stone, K. D., Prussin, C., and Metcalfe, D. D. (2010) IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *The Journal of allergy and clinical immunology* **125**, S73-80
136. Sondermann, P., Huber, R., Oosthuizen, V., and Jacob, U. (2000) The 3.2-A crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc gammaRIII complex. *Nature* **406**, 267–273
137. Xue, J., Zhu, L.-P., and Wei, Q. (2013) IgG-Fc N-glycosylation at Asn297 and IgA O-glycosylation in the hinge region in health and disease. *Glycoconjugate journal* **30**, 735–745
138. Subedi, G. P., and Barb, A. W. (2015) The Structural Role of Antibody N-Glycosylation in Receptor Interactions. *Structure (London, England : 1993)* **23**, 1573–1583
139. Li, T., DiLillo, D. J., Bournazos, S., Giddens, J. P., Ravetch, J. V., and Wang, L.-X. (2017) Modulating IgG effector function by Fc glycan engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**, 3485–3490
140. Strohl, W. R. (2012) IgG glycans and glyco-engineering. In Strohl, W. R., Strohl, L. M., Eds. *Therapeutic antibody engineering: Current and future advances driving the strongest growth area in the pharmaceutical industry* / William R. Strohl and Lila M. Strohl, Sawston, Woodhead Pub
141. Steinke, J. W., Platts-Mills, T. A., and Commins, S. P. (2015) The alpha-gal story: Lessons learned from connecting the dots. *J. Allergy Clin. Immunol.* **135**, 589–596
142. Galili, U., and Swanson, K. (1991) Gene sequences suggest inactivation of alpha-1,3-galactosyltransferase in catarrhines after the divergence of apes from monkeys. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 7401–7404
143. Lantéri, M., Giordanengo, V., Vidal, F., Gaudray, P., and Lefebvre, J.-C. (2002) A complete alpha1,3-galactosyltransferase gene is present in the human genome and partially transcribed. *Glycobiology* **12**, 785–792

144. Larsen, R. D., Rivera-Marrero, C. A., Ernst, L. K., Cummings, R. D., and Lowe, J. B. (1990) Frameshift and nonsense mutations in a human genomic sequence homologous to a murine UDP-Gal:beta-D-Gal(1,4)-D-GlcNAc alpha(1,3)-galactosyltransferase cDNA. *J Biol. Chem.* **265**, 7055–7061
145. Cabezas-Cruz, A., and La Fuente, J. de (2017) Immunity to α -Gal: The Opportunity for Malaria and Tuberculosis Control. *Frontiers in immunology* **8**, 1733
146. Cabezas-Cruz, A., Mateos-Hernández, L., Alberdi, P., Villar, M., Riveau, G., Hermann, E., Schacht, A.-M., Khalife, J., Correia-Neves, M., Gortazar, C., and La Fuente, J. de (2017) Effect of blood type on anti- α -Gal immunity and the incidence of infectious diseases. *Experimental & molecular medicine* **49**, e301
147. Hamsten, C., Tran, T. A. T., Starkhammar, M., Brauner, A., Commins, S. P., Platts-Mills, T. A. E., and van Hage, M. (2013) Red meat allergy in Sweden: Association with tick sensitization and B-negative blood groups. *The Journal of allergy and clinical immunology* **132**, 1431–1434
148. Ezzelarab, M., Ayares, D., and Cooper, D. K. (2005) *Carbohydrates in xenotransplantation*, Immunology and Cell Biology **83**, 396–404
149. Galili, U., Anaraki, F., Thall, A., Hill-Black, C., and Radic, M. (1993) One percent of human circulating B lymphocytes are capable of producing the natural anti-Gal antibody. *Blood* **82**, 2485–2493
150. Galili, U., Rachmilewitz, E. A., Peleg, A., and Flechner, I. (1984) A unique natural human IgG antibody with anti-alpha-galactosyl specificity. *The Journal of experimental medicine* **160**, 1519–1531
151. Yu, P. B., Holzknicht, Z. E., Bruno, D., Parker, W., and Platt, J. L. (1996) Modulation of natural IgM binding and complement activation by natural IgG antibodies: A role for IgG anti-Gal alpha1-3Gal antibodies. *J. Immunol.* **157**, 5163–5168
152. Tomlinson, S., and Nussenzweig, V. (1997) Human alternative complement pathway-mediated lysis of rabbit erythrocytes is enhanced by natural anti-Galalpha1-3Gal antibodies. *J. Immunol.* **159**, 5606–5609
153. Galili, U., Mandrell, R. E., Hamadeh, R. M., Shohet, S. B., and Griffiss, J. M. (1988) Interaction between human natural anti-alpha-galactosyl immunoglobulin G and bacteria of the human flora. *Infection and immunity* **56**, 1730–1737
154. Yilmaz, B., Portugal, S., Tran, T. M., Gozzelino, R., Ramos, S., Gomes, J., Regalado, A., Cowan, P. J., d'Apice, A. J. F., Chong, A. S., Doumbo, O. K., Traore, B., Crompton,

- P. D., Silveira, H., and Soares, M. P. (2014) Gut microbiota elicits a protective immune response against malaria transmission. *Cell* **159**, 1277–1289
155. Chung, C. H., Mirakhur, B., Chan, E., Le, Q. T., Berlin, J., Morse, M., Murphy, B. A., Satinover, S. M., Hosen, J., Mauro, D., Slebos, R. J., Zhou, Q., Gold, D., Hatley, T., Hicklin, D. J., and Platts-Mills, T. A. (2008) Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1109–1117
156. Berg, E. A., Platts-Mills, T. A., and Commins, S. P. (2014) Drug allergens and food--the cetuximab and galactose-alpha-1,3-galactose story. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **112**, 97–101
157. Platts-Mills, T. A., Schuyler, A. J., Tripathi, A., and Commins, S. P. (2015) Anaphylaxis to the carbohydrate side chain alpha-gal. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* **35**, 247–260
158. Arslan Lied, G. (2017) Red meat allergy induced by tick bites: A Norwegian case report. *European annals of allergy and clinical immunology* **49**, 186–188
159. Chinuki, Y., Ishiwata, K., Yamaji, K., Takahashi, H., and Morita, E. (2016) Haemaphysalis longicornis tick bites are a possible cause of red meat allergy in Japan. *Allergy* **71**, 421–425
160. Commins, S. P., Satinover, S. M., Hosen, J., Mozena, J., Borish, L., Lewis, B. D., Woodfolk, J. A., and Platts-Mills, T. A. (2009) Delayed anaphylaxis, angioedema, or urticaria after consumption of red meat in patients with IgE antibodies specific for galactose-alpha-1,3-galactose. *J. Allergy Clin. Immunol.* **123**, 426–433
161. Khoury, J. K., Khoury, N. C., Schaefer, D., Chitnis, A., and Hassen, G. W. (2017) A tick-acquired red meat allergy: A case series. *The American journal of emergency medicine*
162. Michel, S., Scherer, K., Heijnen, I. A. F. M., and Bircher, A. J. (2014) Skin prick test and basophil reactivity to cetuximab in patients with IgE to alpha-gal and allergy to red meat. *Allergy* **69**, 403–405
163. Wolver, S. E., Sun, D. R., Commins, S. P., and Schwartz, L. B. (2013) A peculiar cause of anaphylaxis: No more steak? The journey to discovery of a newly recognized allergy to galactose-alpha-1,3-galactose found in mammalian meat. *Journal of general internal medicine* **28**, 322–325
164. Commins, S. P., and Platts-Mills, T. A. E. (2013) Tick bites and red meat allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **13**, 354–359

165. Commins, S. P., Jerath, M. R., Cox, K., Erickson, L. D., and Platts-Mills, T. (2016) Delayed anaphylaxis to alpha-gal, an oligosaccharide in mammalian meat. *Allergy international : official journal of the Japanese Society of Allergology* **65**, 16–20
166. Commins, S. P., James, H. R., Kelly, L. A., Pochan, S. L., Workman, L. J., Perzanowski, M. S., Kocan, K. M., Fahy, J. V., Nganga, L. W., Ronmark, E., Cooper, P. J., and Platts-Mills, T. A. (2011) The relevance of tick bites to the production of IgE antibodies to the mammalian oligosaccharide galactose-alpha-1,3-galactose. *J. Allergy Clin. Immunol.* **127**, 1286–1293
167. van Nunen, S. (2015) Tick-induced allergies: Mammalian meat allergy, tick anaphylaxis and their significance. *Asia Pacific allergy* **5**, 3–16
168. Ebo, D. G., Faber, M., Sabato, V., Leysen, J., Gadisseur, A., Bridts, C. H., and Clerck, L. S. de (2013) Sensitization to the mammalian oligosaccharide galactose-alpha-1,3-galactose (alpha-gal): Experience in a Flemish case series. *Acta clinica Belgica* **68**, 206–209
169. Rizer, J., Brill, K., Charlton, N., and King, J. (2017) Acute hypersensitivity reaction to Crotalidae polyvalent immune Fab (CroFab) as initial presentation of galactose- α -1,3-galactose (α -gal) allergy. *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)* **55**, 668–669
170. Uasuf, C. G., Torina, A., Ferrantelli, V., and Brusca, I. (2018) An unusual case of positive sIgE to Galactose-alpha-1,3-galactose from South Italy. *European annals of allergy and clinical immunology* **50**, 45–47
171. Venturini, M., Lobera, T., Sebastián, A., Portillo, A., and Oteo, J. A. (2017) IgE antibodies to alpha-gal in foresters and forest workers from La Rioja, North of Spain. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*, 0
172. Galili, U. (1988) The Two Antibody Specificities Within Human Anti-Blood Group B Antibodies. *Transfusion Medicine Reviews* **2**, 112–121
173. Brestoff, J. R., Tesfazghi, M. T., Zaydman, M. A., Jackups, R., Kim, B. S., Scott, M. G., Gronowski, A. M., and Grossman, B. J. (2018) The B antigen protects against the development of red meat allergy. *The journal of allergy and clinical immunology. In practice*
174. Xavier, A. C. W., Maciel, R. M. B., Vieira, J. G. H., Dias-da-Silva, M. R., and Martins, J. R. M. (2016) Insights into the posttranslational structural heterogeneity of thyroglobulin and its role in the development, diagnosis, and management of benign and malignant thyroid diseases. *Archives of endocrinology and metabolism* **60**, 66–75

175. Apostolovic, D., Krstic, M., Mihailovic, J., Starkhammar, M., Cirkovic Velickovic, T., Hamsten, C., and van Hage, M. (2017) Peptidomics of an in vitro digested α -Gal carrying protein revealed IgE-reactive peptides. *Sci. Rep.* **7**, 5201
176. Thall, A., and Galili, U. (1990) Distribution of Gal alpha 1----3Gal beta 1----4GlcNAc residues on secreted mammalian glycoproteins (thyroglobulin, fibrinogen, and immunoglobulin G) as measured by a sensitive solid-phase radioimmunoassay. *Biochemistry* **29**, 3959–3965
177. Patel, D., Guo, X., Ng, S., Melchior, M., Balderes, P., Burtrum, D., Persaud, K., Luna, X., Ludwig, D. L., and Kang, X. (2010) IgG isotype, glycosylation, and EGFR expression determine the induction of antibody-dependent cellular cytotoxicity in vitro by cetuximab. *Human antibodies* **19**, 89–99
178. Harding, J., and Burtneß, B. (2005) Cetuximab: An epidermal growth factor receptor chimeric human-murine monoclonal antibody. *Drugs Today (Barc.)* **41**, 107–127
179. Fay, P. J. (2006) Factor VIII structure and function. *Int. J Hematol.* **83**, 103–108
180. Wakabayashi, H., Koszelak, M. E., Mastro, M., and Fay, P. J. (2001) Metal Ion-independent Association of Factor VIII Subunits and the Roles of Calcium and Copper Ions for Cofactor Activity and Inter-Subunit Affinity †. *Biochemistry* **40**, 10293–10300
181. Ngo, J. C., Huang, M., Roth, D. A., Furie, B. C., and Furie, B. (2008) Crystal structure of human factor VIII: Implications for the formation of the factor IXa-factor VIIIa complex. *Structure.* **16**, 597–606
182. Yoshioka, A., Fukutake, K., Takamatsu, J., and Shirahata, A. (2003) Clinical evaluation of a recombinant factor VIII preparation (Kogenate) in previously untreated patients with hemophilia A. *Int. J Hematol.* **78**, 467–474
183. Canis, K., Anzengruber, J., Garenaux, E., Feichtinger, M., Benamara, K., Scheiflinger, F., Savoy, L.-A., Reipert, B. M., and Malisauskas, M. (2018) In-depth comparison of N-glycosylation of human plasma-derived factor VIII and different recombinant products: From structure to clinical implications. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*
184. Klukowska, A., Szczepański, T., Vdovin, V., Knaub, S., Bichler, J., Jansen, M., Dzhunova, I., and Liesner, R. J. (2018) Long-term tolerability, immunogenicity and efficacy of Nuwiq® (human-cl rhFVIII) in children with severe haemophilia A. *Haemophilia* **24**, 595–603
185. Klintman, J., Hillarp, A., Berntorp, E., and Astermark, J. (2013) Long-term anti-FVIII antibody response in Bethesda-negative haemophilia A patients receiving continuous replacement therapy. *British journal of haematology* **163**, 385–392

186. Cannavò, A., Valsecchi, C., Garagiola, I., Palla, R., Mannucci, P. M., Rosendaal, F. R., and Peyvandi, F. (2017) Nonneutralizing antibodies against factor VIII and risk of inhibitor development in severe hemophilia A. *Blood* **129**, 1245–1250
187. Medzhitov, R., and Janeway, C. (2000) Innate immunity. *N. Engl. J Med.* **343**, 338–344
188. Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2010) Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science (New York, N.Y.)* **327**, 291–295
189. Berger, A. (2000) Th1 and Th2 responses: What are they? *BMJ* **321**, 424
190. Yue, S. C., Shaulov, A., Wang, R., Balk, S. P., and Exley, M. A. (2005) CD1d ligation on human monocytes directly signals rapid NF-kappaB activation and production of bioactive IL-12. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 11811–11816
191. Germann, T., Bongartz, M., Dlugonska, H., Hess, H., Schmitt, E., Kolbe, L., Kölsch, E., Podlaski, F. J., Gately, M. K., and Rude, E. (1995) Interleukin-12 profoundly up-regulates the synthesis of antigen-specific complement-fixing IgG2a, IgG2b and IgG3 antibody subclasses in vivo. *Eur. J. Immunol.* **25**, 823–829
192. Metzger, D. W., Buchanan, J. M., Collins, J. T., Lester, T. L., Murray, K. S., van Cleave, V. H., Vogel, L. A., and Dunnick, W. A. (1996) Enhancement of humoral immunity by interleukin-12. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **795**, 100–115
193. Galli, S. J., and Tsai, M. (2012) IgE and mast cells in allergic disease. *Nature medicine* **18**, 693–704
194. Tanemura, M., Yin, D., Chong, A. S., and Galili, U. (2000) *Differential immune responses to alpha-Gal epitopes on xenografts and allografts // Differential immune responses to alpha-gal epitopes on xenografts and allografts: Implications for accommodation in xenotransplantation*, *J. Clin. Invest. The Journal of clinical investigation* **105**, 301–310
195. He, J.-S., Subramaniam, S., Narang, V., Srinivasan, K., Saunders, S. P., Carbajo, D., Wen-Shan, T., Hidayah Hamadee, N., Lum, J., Lee, A., Chen, J., Poidinger, M., Zolezzi, F., Lafaille, J. J., and Curotto de Lafaille, M. A. (2017) IgG1 memory B cells keep the memory of IgE responses. *Nat. Commun.* **8**, 641
196. Kobayashi, T., and Cooper, D. K. (1999) Anti-Gal, alpha-Gal epitopes, and xenotransplantation. *Sub-cellular biochemistry* **32**, 229–257
197. Galili, U. (February 2012) *Anti-Gal and Anti-Non Gal Antibody Barriers in Xenotransplantation // Xenotransplantation*, InTech, Rijeka, Croatia

198. Zeyland, J., Lipiński, D., and Słomski, R. (2015) The current state of xenotransplantation. *Journal of applied genetics* **56**, 211–218
199. Thorlacius-Ussing, L., Ludvigsen, M., Kirkeby, S., Vorum, H., and Honoré, B. (2013) Proteomic analysis of tissue from α 1,3-galactosyltransferase knockout mice reveals that a wide variety of proteins and protein fragments change expression level. *PloS one* **8**, e80600
200. Malykh, Y. N., Shaw, L., and Schauer, R. (1998) The role of CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase in determining the level of N-glycolylneuraminic acid in porcine tissues. *Glycoconj. J.* **15**, 885–893
201. Abdel-Motal, U. M., Guay, H. M., Wigglesworth, K., Welsh, R. M., and Galili, U. (2007) Immunogenicity of influenza virus vaccine is increased by anti-gal-mediated targeting to antigen-presenting cells. *J Virol.* **81**, 9131–9141
202. Wykes, M. N. (2013) Why haven't we made an efficacious vaccine for malaria? *EMBO reports* **14**, 661
203. Ghorbani, M., and Farhoudi, R. (2018) Leishmaniasis in humans: Drug or vaccine therapy? *Drug design, development and therapy* **12**, 25–40
204. Dumonteil, E., Bottazzi, M. E., Zhan, B., Heffernan, M. J., Jones, K., Valenzuela, J. G., Kamhawi, S., Ortega, J., Leon Rosales, S. P. de, Lee, B. Y., Bacon, K. M., Fleischer, B., Slingsby, B. T., Cravioto, M. B., Tapia-Conyer, R., and Hotez, P. J. (2012) Accelerating the development of a therapeutic vaccine for human Chagas disease: Rationale and prospects. *Expert review of vaccines* **11**, 1043–1055
205. La Greca, F., and Magez, S. (2011) Vaccination against trypanosomiasis: Can it be done or is the trypanosome truly the ultimate immune destroyer and escape artist? *Human vaccines* **7**, 1225–1233
206. Stanek, G., Wormser, G. P., Gray, J., and Strle, F. (2012) Lyme borreliosis. *The Lancet* **379**, 461–473
207. Moura, A. P. V., Santos, L. C. B., Brito, C. R. N., Valencia, E., Junqueira, C., Filho, A. A. P., Sant'Anna, M. R. V., Gontijo, N. F., Bartholomeu, D. C., Fujiwara, R. T., Gazzinelli, R. T., McKay, C. S., Sanhueza, C. A., Finn, M. G., and Marques, A. F. (2017) Virus-like Particle Display of the α -Gal Carbohydrate for Vaccination against Leishmania Infection. *ACS central science* **3**, 1026–1031
208. Zamze, S. E., Ashford, D. A., Wooten, E. W., Rademacher, T. W., and Dwek, R. A. (1991) Structural characterization of the asparagine-linked oligosaccharides from

- Trypanosoma brucei type II and type III variant surface glycoproteins. *J Biol. Chem.* **266**, 20244–20261
209. Couto, A. S., Gonçalves, M. F., Colli, W., and Lederkremer, R. M. de (1990) The N-linked carbohydrate chain of the 85-kilodalton glycoprotein from Trypanosoma cruzi trypomastigotes contains sialyl, fucosyl and galactosyl (alpha 1-3)galactose units. *Mol. Biochem. Parasitol.* **39**, 101–107
210. Galili, U. (2013) In situ conversion of tumors into autologous tumor-associated antigen vaccines by intratumoral injection of alpha-gal glycolipids. *Oncoimmunology.* **2**, e22449
211. Wigglesworth, K. M., Racki, W. J., Mishra, R., Szomolanyi-Tsuda, E., Greiner, D. L., and Galili, U. (2011) Rapid recruitment and activation of macrophages by anti-Gal/alpha-Gal liposome interaction accelerates wound healing. *J. Immunol.* **186**, 4422–4432
212. Galili, U. (2017) α -Gal Nanoparticles in Wound and Burn Healing Acceleration. *Advances in wound care* **6**, 81–92
213. Hurwitz, Z. M., Ignatz, R., Lalikos, J. F., and Galili, U. (2012) Accelerated porcine wound healing after treatment with α -gal nanoparticles. *Plastic and reconstructive surgery* **129**, 242e-251e
214. Galili, U. (2013) Discovery of the natural anti-Gal antibody and its past and future relevance to medicine. *Xenotransplantation* **20**, 138–147
215. Galili, U., Clark, M. R., and Shohet, S. B. (1986) Excessive binding of natural anti-alpha-galactosyl immunoglobulin G to sickle erythrocytes may contribute to extravascular cell destruction. *The Journal of clinical investigation* **77**, 27–33
216. Galili, U., Flechner, I., Knyszynski, A., Danon, D., and Rachmilewitz, E. A. (1986) The natural anti-alpha-galactosyl IgG on human normal senescent red blood cells. *British journal of haematology* **62**, 317–324
217. Lozzio, B. B., Lozzio, C. B., Andersson, L. C., Nilsson, K., and Gahmberg, C. G. (1977 // 1979) Properties of the K562 cell line derived from a patient with chronic myeloid leukemia // K562—A human erythroleukemic cell line. *Int. J. Cancer* **19** // **23**, 136
218. Plum, M., Michel, Y., Wallach, K., Raiber, T., Blank, S., Bantleon, F. I., Diethers, A., Greunke, K., Braren, I., Hackl, T., Meyer, B., and Spillner, E. (2011) Close-up of the immunogenic alpha1,3-galactose epitope as defined by a monoclonal chimeric immunoglobulin E and human serum using saturation transfer difference (STD) NMR. *J Biol. Chem.* **286**, 43103–43111

219. Teranishi, K., Manez, R., Awwad, M., and Cooper, D. K. C. (2002) Anti-Gal alpha 1-3Gal IgM and IgG antibody levels in sera of humans and old world non-human primates. *Xenotransplantation* **9**, 148–154
220. Galili, U. (1993) Interaction of the natural anti-Gal antibody with α -galactosyl epitopes: A major obstacle for xenotransplantation in humans. *Immunology today* **14**, 480–482
221. Galili, U. (2013) α 1,3Galactosyltransferase knockout pigs produce the natural anti-Gal antibody and simulate the evolutionary appearance of this antibody in primates. *Xenotransplantation* **20**, 267–276
222. Platz, J., Bonenfant, N. R., Uhl, F. E., Coffey, A. L., McKnight, T., Parsons, C., Sokocevic, D., Borg, Z. D., Lam, Y.-W., Deng, B., Fields, J. G., DeSarno, M., Loi, R., Hoffman, A. M., Bianchi, J., Dacken, B., Petersen, T., Wagner, D. E., and Weiss, D. J. (2016) Comparative Decellularization and Recellularization of Wild-Type and Alpha 1,3 Galactosyltransferase Knockout Pig Lungs: A Model for Ex Vivo Xenogeneic Lung Bioengineering and Transplantation. *Tissue engineering. Part C, Methods* **22**, 725–739
223. Park, M. S., Kim, T. G., Lee, K. M., Chung, C. Y., Kwon, S.-S., Yoon, I.-H., and Park, C.-G. (2014) Effects of reduction in the alpha-gal antigen on bony union: A model of xenobone graft using GalT knockout mouse. *Xenotransplantation* **21**, 267–273
224. Galili, U., LaTemple, D. C., and Radic, M. Z. (1998) A sensitive assay for measuring alpha-Gal epitope expression on cells by a monoclonal anti-Gal antibody. *Transplantation* **65**, 1129–1132
225. Chen, Z. C., Tanemura, M., and Galili, U. (2001) Synthesis of -gal epitopes (Gal 1-3Gal 1-4GlcNAc-R) on human tumor cells by recombinant 1,3galactosyltransferase produced in *Pichia pastoris*. *Glycobiology* **11**, 577–586
226. Gao, H.-W., Li, S.-B., Sun, W. Q., Yun, Z.-M., Zhang, X., Song, J.-W., Zhang, S.-K., Leng, L., Ji, S.-P., Tan, Y.-X., and Gong, F. (2015) Quantification of α -Gal Antigen Removal in the Porcine Dermal Tissue by α -Galactosidase. *Tissue engineering. Part C, Methods* **21**, 1197–1204
227. Galili, U., Basbaum, C. B., Shohet, S. B., Buehler, J., and Macher, B. A. (1987) Identification of erythrocyte Gal alpha 1-3Gal glycosphingolipids with a mouse monoclonal antibody, Gal-13. *J Biol. Chem.* **262**, 4683–4688
228. Buehler, J., Galili, U., and Macher, B. A. (1987) Use of the enzyme-linked immunoadsorbent assay to monitor the purification of glycosphingolipid antigens by high-performance liquid chromatography. *Analytical biochemistry* **164**, 521–525

229. Frenzel, W., Wietek, S., Svae, T.-E., Debes, A., and Svorc, D. (2016) Tolerability and safety of Octagam® (IVIg): A post-authorization safety analysis of four non-interventional phase IV trials. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **54**, 847–855
230. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685
231. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 4350–4354
232. Galili, U. (1988) The natural anti-Gal antibody, the B-like antigen, and human red cell aging. *Blood cells* **14**, 205–228
233. Macher, B. A., and Galili, U. (2008) The Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc-R (alpha-Gal) epitope: A carbohydrate of unique evolution and clinical relevance. *Biochim. Biophys. Acta* **1780**, 75–88
234. Veisi, K., Farajnia, S., Zarghami, N., Khorshid, H. R. K., Samadi, N., Safdari, Y., and Ahmadzadeh, V. (2015) Development and Evaluation of a Cetuximab-based Humanized Single Chain Antibody Against EGFR-overexpressing Tumors. *Drug research* **65**, 624–628
235. Veneziani, B. M., Giallauria, F., and Gentile, F. (1999) The disulfide bond pattern between fragments obtained by the limited proteolysis of bovine thyroglobulin. *Biochimie* **81**, 517–525
236. Qian, J., Liu, T., Yang, L., Daus, A., Crowley, R., and Zhou, Q. (2007) Structural characterization of N-linked oligosaccharides on monoclonal antibody cetuximab by the combination of orthogonal matrix-assisted laser desorption/ionization hybrid quadrupole-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and sequential enzymatic digestion. *Analytical biochemistry* **364**, 8–18
237. Jefferis, R. (2005) Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnology progress* **21**, 11–16
238. Liu, S., Gao, W., Wang, Y., He, Z., Feng, X., Liu, B.-F., and Liu, X. (2017) Comprehensive N-Glycan Profiling of Cetuximab Biosimilar Candidate by NP-HPLC and MALDI-MS. *PLoS one* **12**, e0170013
239. Casademunt, E., Martinelle, K., Jernberg, M., Winge, S., Tiemeyer, M., Biesert, L., Knaub, S., Walter, O., and Schröder, C. (2012) The first recombinant human

- coagulation factor VIII of human origin: Human cell line and manufacturing characteristics. *European journal of haematology* **89**, 165–176
240. Zheng, K., Bantog, C., and Bayer, R. (2011) The impact of glycosylation on monoclonal antibody conformation and stability. *mAbs* **3**, 568–576
241. Liu, L. (2015) Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *J. Pharm. Sci.* **104**, 1866–1884
242. Higel, F., Seidl, A., Sorgel, F., and Friess, W. (2016) N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **100**, 94–100
243. Yu, C., Gao, K., Zhu, L., Wang, W., Wang, L., Zhang, F., Liu, C., Li, M., Wormald, M. R., Rudd, P. M., and Wang, J. (2016) At least two Fc Neu5Gc residues of monoclonal antibodies are required for binding to anti-Neu5Gc antibody. *Scientific reports* **7**, 20029
244. Rawitch, A. B., Pollock, H. G., and Yang, S. X. (1993) Thyroglobulin glycosylation: Location and nature of the N-linked oligosaccharide units in bovine thyroglobulin. *Archives of biochemistry and biophysics* **300**, 271–279
245. Spiro, R. G., and Bhoyroo, V. D. (1984) Occurrence of alpha-D-galactosyl residues in the thyroglobulins from several species. Localization in the saccharide chains of the complex carbohydrate units. *The Journal of biological chemistry* **259**, 9858–9866
246. Afonja, O., Kozak, R., Petraro, P., Michaels, L. A., Mathew, P., Lemm, G., and Kessler, C. (2016) Baby hamster kidney cell-derived recombinant factor VIII: A quarter century of learning and clinical experience. *Expert review of hematology* **9**, 1151–1164
247. Klukowska, A., Szczepanski, T., Vdovin, V., Knaub, S., Jansen, M., and Liesner, R. (2015) Novel, human cell line-derived recombinant factor VIII (Human-cl rhFVIII, Nuwiq) in children with severe haemophilia A: Efficacy, safety and pharmacokinetics. *Haemophilia*.
248. Kannicht, C., Ramstrom, M., Kohla, G., Tiemeyer, M., Casademunt, E., Walter, O., and Sandberg, H. (2013) Characterisation of the post-translational modifications of a novel, human cell line-derived recombinant human factor VIII. *Thromb Res.* **131**, 78–88
249. Renaud, D. L., Duffield, T. F., LeBlanc, S. J., Haley, D. B., and Kelton, D. F. (2018) Clinical and metabolic indicators associated with early mortality at a milk-fed veal facility: A prospective case-control study. *Journal of dairy science* **101**, 2669–2678

250. Kay, E., Pratt, R., Wasserman, S., Khan, W., and Hudecki, P. (2016) Radial Immunodiffusion Method for Evaluation of C1-Esterase Inhibitor Function. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **137**, AB253
251. Culf, A. S., Cuperlovic-Culf, M., and Ouellette, R. J. (2006) Carbohydrate microarrays: Survey of fabrication techniques. *OMICS*. **10**, 289–310
252. Prasatkaew, W., Nanthanawat, P., Khongchareonporn, N., and Kingtong, S. (2018) A monoclonal antibody against Lates calcarifer vitellogenin and a competitive ELISA to evaluate vitellogenin induction after exposure to xenoestrogen. *Journal of Environmental Sciences*
253. Schuster, I., Mertens, M., Köllner, B., Korytář, T., Keller, M., Hammerschmidt, B., Müller, T., Tordo, N., Marianneau, P., Mroz, C., Rissmann, M., Stroh, E., Dähnert, L., Hammerschmidt, F., Ulrich, R. G., and Groschup, M. H. (2016) A competitive ELISA for species-independent detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus specific antibodies. *Antiviral research* **134**, 161–166
254. Müller-Loennies, S., MacKenzie, C. R., Patenaude, S. I., Evans, S. V., Kosma, P., Brade, H., Brade, L., and Narang, S. (2000) Characterization of high affinity monoclonal antibodies specific for chlamydial lipopolysaccharide. *Glycobiology* **10**, 121–130
255. Bee, C., Abdiche, Y. N., Pons, J., and Rajpal, A. (2013) Determining the binding affinity of therapeutic monoclonal antibodies towards their native unpurified antigens in human serum. *PloS one* **8**, e80501
256. Sundd, P., Pospieszalska, M. K., Cheung, L. S.-L., Konstantopoulos, K., and Ley, K. (2011) Biomechanics of leukocyte rolling. *Biorheology* **48**, 1–35
257. Cohen, M. (2015) Notable Aspects of Glycan-Protein Interactions. *Biomolecules* **5**, 2056–2072
258. Gurung, A. B., Bhattacharjee, A., Ajmal Ali, M., Al-Hemaid, F., and Lee, J. (2017) Binding of small molecules at interface of protein-protein complex - A newer approach to rational drug design. *Saudi journal of biological sciences* **24**, 379–388
259. Weber, P., Ohlendorf, D., Wendoloski, J., and Salemme, F. (1989) Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. *Science* **243**, 85–88
260. Schuck, P., and Zhao, H. (2010) The role of mass transport limitation and surface heterogeneity in the biophysical characterization of macromolecular binding processes by SPR biosensing. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **627**, 15–54

261. Murphy, M., Jason-Moller, L., and Bruno, J. (2006) Using Biacore to measure the binding kinetics of an antibody-antigen interaction. *Current protocols in protein science* **Chapter 19**, Unit 19.14
262. Reid, M. E., and Mohandas, N. (2004) Red blood cell blood group antigens: Structure and function. *Seminars in hematology* **41**, 93–117
263. Reusch, D., and Tejada, M. L. (2015) Fc glycans of therapeutic antibodies as critical quality attributes. *Glycobiology* **25**, 1325–1334
264. Abrahams, J. L., Packer, N. H., and Campbell, M. P. (2015) Relative quantitation of multi-antennary N-glycan classes: Combining PGC-LC-ESI-MS with exoglycosidase digestion. *The Analyst* **140**, 5444–5449
265. Edri-Brami, M., Sharoni, H., Hayoun, D., Skutelsky, L., Nemirovsky, A., Porgador, A., and Lichtenstein, R. G. (2015) Development of stage-dependent glycans on the Fc domains of IgG antibodies of ALS animals. *Experimental neurology* **267**, 95–106
266. Song, T., Aldredge, D., and Lebrilla, C. B. (2015) A Method for In-Depth Structural Annotation of Human Serum Glycans That Yields Biological Variations. *Analytical chemistry* **87**, 7754–7762
267. Ohashi, T., Fujiyama, K., and Takegawa, K. (2012) Identification of novel α 1,3-galactosyltransferase and elimination of α -galactose-containing glycans by disruption of multiple α -galactosyltransferase genes in *Schizosaccharomyces pombe*. *The Journal of biological chemistry* **287**, 38866–38875
268. Gemmill, T. R., and Trimble, R. B. (1999) Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochimica et biophysica acta* **1426**, 227–237
269. Gemmill, T. R., and Trimble, R. B. (1999) *Schizosaccharomyces pombe* produces novel Gal0-2Man1-3 O-linked oligosaccharides. *Glycobiology* **9**, 507–515
270. Ząbczyńska, M., Kozłowska, K., and Pocheć, E. (2018) Glycosylation in the Thyroid Gland: Vital Aspects of Glycoprotein Function in Thyrocyte Physiology and Thyroid Disorders. *International journal of molecular sciences* **19**
271. Plomp, R., Dekkers, G., Rombouts, Y., Visser, R., Koeleman, C. A. M., Kammeijer, G. S. M., Jansen, B. C., Rispens, T., Hensbergen, P. J., Vidarsson, G., and Wuhrer, M. (2015) Hinge-Region O-Glycosylation of Human Immunoglobulin G3 (IgG3). *Molecular & cellular proteomics : MCP* **14**, 1373–1384
272. Kannicht, C., Kröning, M., Solecka-Witulska, B. A., Kohla, G., and Rosenlöcher, J. (2017) Comparative N-Glycosylation Analysis of the Fc Portions of a Chimeric Human

- Coagulation Factor VIII and Immunoglobulin G1 // Comparative N-Glycosylation Analysis of the Fc Portions of a Chimeric Human Coagulation Factor VIII and Immunoglobulin G1. *Bioengineering (Basel)* **4**
273. Okano, T., Nishikawa, T., Watanabe, E., Watanabe, T., Takashima, T., Yeh, T.-W., Yamashita, M., Tanaka-Kubota, M., Miyamoto, S., Mitsuiki, N., Takagi, M., Kawano, Y., Mochizuki, Y., Imai, K., Kanegane, H., and Morio, T. (2017) Maternal T and B cell engraftment in two cases of X-linked severe combined immunodeficiency with IgG1 gammopathy. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* **183**, 112–120
274. Bilgen, T., Ata, P., Tozki, J., Tozki, H., and Titiz, M. I. (2017) Cytotoxic Antibody Detection by Means of Flow-Cytometric Cross-Match. *Transplantation proceedings* **49**, 440–444
275. Yazdani, U., Zaman, S., Hynan, L. S., Brown, L. S., Dewey, R. B., Karp, D., and German, D. C. (2016) Blood biomarker for Parkinson disease: Peptoids. *NPJ Parkinson's disease* **2**
276. Zaman, S., Yazdani, U., Deng, Y., Li, W., Gadad, B. S., Hynan, L., Karp, D., Roatch, N., Schutte, C., Nathan Marti, C., Hewitson, L., and German, D. C. (2016) A Search for Blood Biomarkers for Autism: Peptoids. *Scientific reports* **6**, 19164
277. Dunn, A., Duffy, C., Gordon, A., Morrison, S., Argüello, A., Welsh, M., and Earley, B. (2017) Comparison of single radial immunodiffusion and ELISA for the quantification of immunoglobulin G in bovine colostrum, milk and calf sera. *Journal of Applied Animal Research* **46**, 758–765
278. Gray, E. S., Madiga, M. C., Moore, P. L., Mlisana, K., Abdool Karim, S. S., Binley, J. M., Shaw, G. M., Mascola, J. R., and Morris, L. (2009) Broad neutralization of human immunodeficiency virus type 1 mediated by plasma antibodies against the gp41 membrane proximal external region. *Journal of virology* **83**, 11265–11274
279. Choi, Y., Lee, S., Kwon, S. Y., Lee, Y., Park, Y. K., and Ban, S. J. (2017) Analysis of the proficiency of single radial immunodiffusion assays for quality control of influenza vaccines in Korea. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization* **50**, 137–140
280. Rispens, T., Derksen, N. I., Commins, S. P., Platts-Mills, T. A., and Aalberse, R. C. (2013) IgE production to alpha-gal is accompanied by elevated levels of specific IgG1 antibodies and low amounts of IgE to blood group B. *PLoS. One.* **8**, e55566
281. Wu, X., Xu, C., and Wang, W. (2017) Reduction and Alkylation of Proteins in 2D Gel Electrophoresis: Before or after Isoelectric Focusing? *Frontiers in chemistry* **5**, 59

-
282. Prin, C. (1995) Isoelectric restriction of human immunoglobulin isotypes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1243**, 287–289
283. Williamson, A. R. (1971) Antibody isoelectric spectra. Analysis of the heterogeneity of antibody molecules in serum by isoelectric focusing in gel and specific detection with haptens. *Eur. J. Immunol.* **1**, 390–394
284. Fischer, J., Yazdi, A. S., and Biedermann, T. (2016) Clinical spectrum of α -Gal syndrome: From immediate-type to delayed immediate-type reactions to mammalian innards and meat. *Allergo journal international* **25**, 55–62
285. Bliss, J., van Cleave, V., Murray, K., Wiencis, A., Ketchum, M., Maylor, R., Haire, T., Resmini, C., Abbas, A. K., and Wolf, S. F. (1996) IL-12, as an adjuvant, promotes a T helper 1 cell, but does not suppress a T helper 2 cell recall response. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **156**, 887–894
286. Tuo, W., Palmer, G. H., McGuire, T. C., Zhu, D., and Brown, W. C. (2000) Interleukin-12 as an adjuvant promotes immunoglobulin G and type 1 cytokine recall responses to major surface protein 2 of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Infection and immunity* **68**, 270–280
287. McKenzie, G. J., Bancroft, A., Grecis, R. K., and McKenzie, A. N. (1998) A distinct role for interleukin-13 in Th2-cell-mediated immune responses. *Current biology : CB* **8**, 339–342
288. Snapper, C. M., Finkelman, F. D., and Paul, W. E. (1988) Regulation of IgG1 and IgE Production by Interleukin 4. *Immunol. Rev.* **102**, 51–75
289. Xiong, H., Dolpady, J., Wabl, M., Curotto de Lafaille, M. A., and Lafaille, J. J. (2012) Sequential class switching is required for the generation of high affinity IgE antibodies. *The Journal of experimental medicine* **209**, 353–364

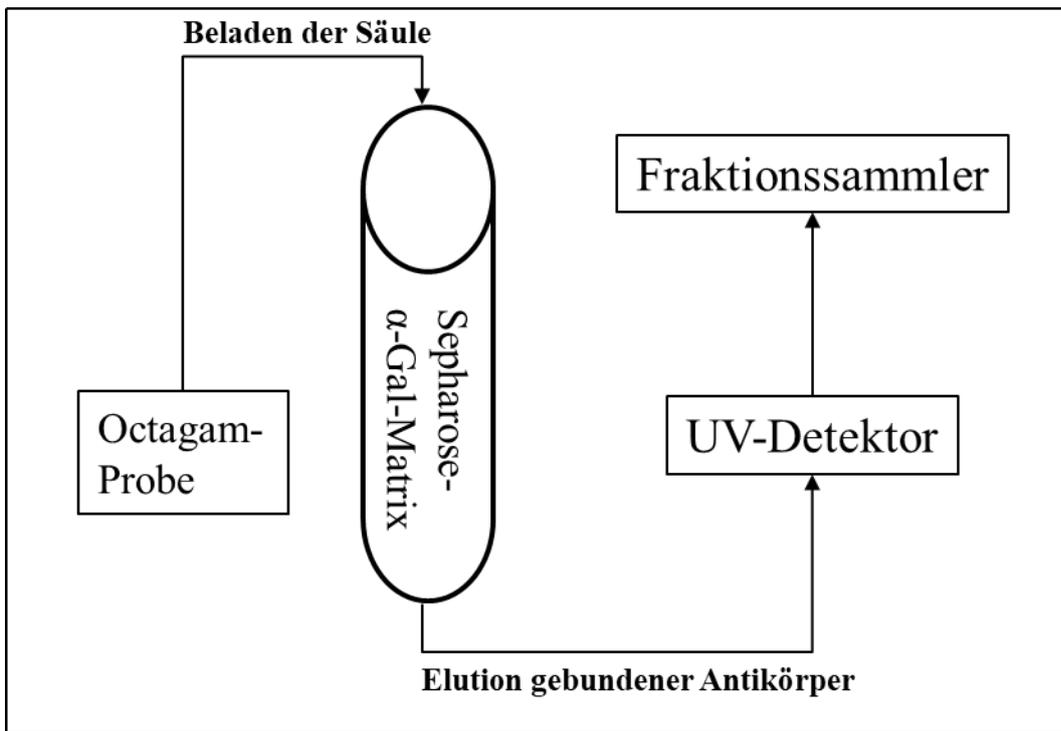
8 Verzeichnis von erfolgten Publikationen

Zappe, A., Rosenlöcher, J., Parr, M. K., Kohla, G. (2017): Purification and proof of specificity of anti-galactose (Gal) antibodies towards the antigenic α -Gal epitope. *poster presentation at the GlycoBioTec symposium 2017*

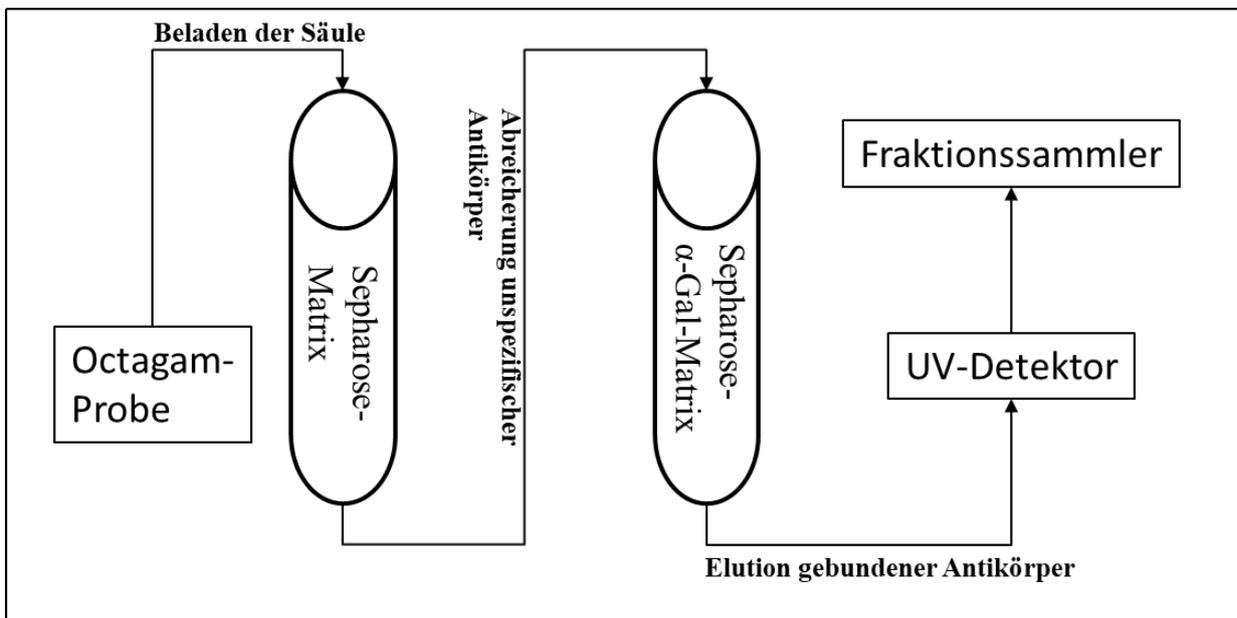
Publikation in Vorbereitung:

Zappe, A., Rosenlöcher, J., Parr, M. K., Hinderlich, S., Kohla, G. (2019): In-depth characterization of anti-Gal antibodies and proof of their specificity towards the α -Gal epitope. *Journal of biological chemistry*

9 Anhang

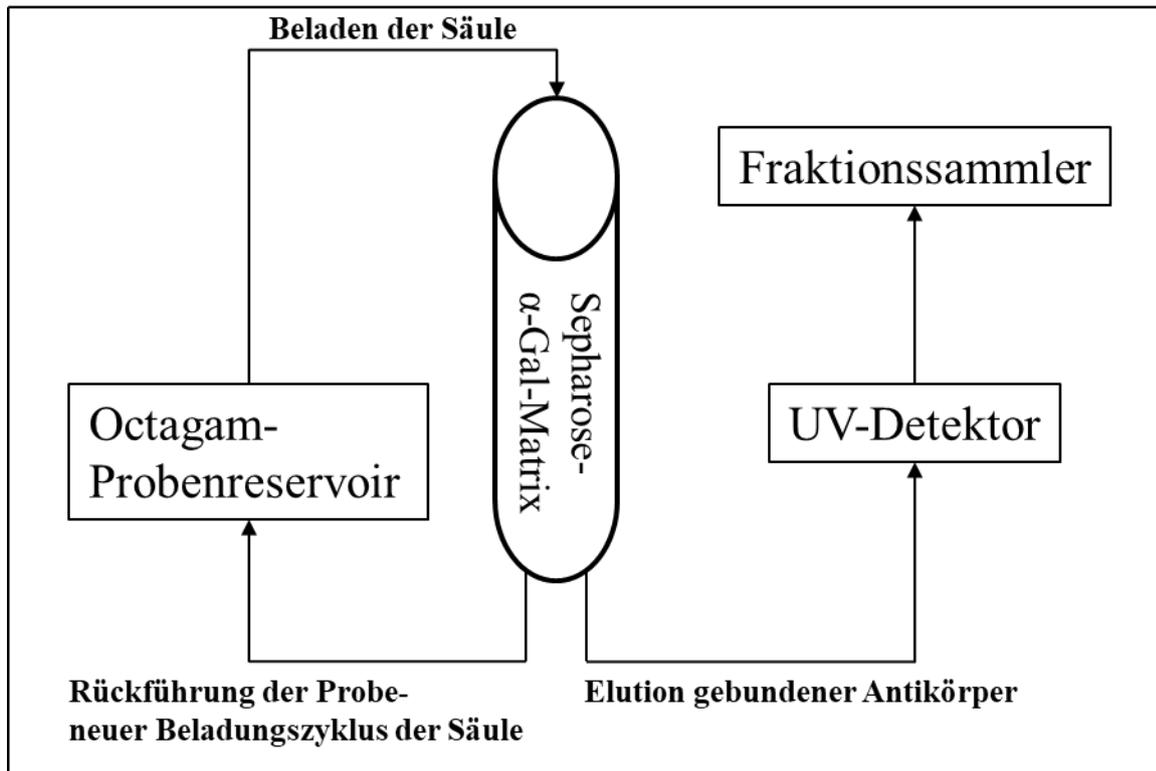


Anhang 1: Anordnung der Chromatographie-Komponenten bei durchgeführter Affinitätschromatographie. Die Affinitätssäule wurde mit der Octagam-Probe beladen, bei der Elution gelangten sich gelöste Antikörper unmittelbar zum UV-Detektor und anschließend zum Fraktionssammler.



Anhang 2: Anordnung der Chromatographie-Komponenten bei versuchter Optimierung der Affinitätschromatographie.

Eine Sepharosesäule wurde mit der Octagam-Probe beladen und die Probe wurde direkt weiter zur Affinitätssäule gepumpt. Für die Elution wurde die Sepharosesäule entfernt. Von der Affinitätssäule gelöste Antikörper gelangten unmittelbar zum UV-Detektor und anschließend zum Fraktionssammler. Ein zu hoher Druckanstieg führte zum Beenden dieses Versuchs.



Anhang 3: Anordnung der Chromatographie-Komponenten bei versuchter Optimierung der Affinitätschromatographie.

Die Affinitätsäule wurde mit der Octagam-Probe beladen und der Säulendurchfluss wurde rezirkulierend erneut auf die Säule aufgetragen. Dafür wurde der Säulendurchfluss über eine Kapillare zurück in das Probenreservoir befördert. Bei der Elution gelangten gelöste Antikörper unmittelbar zum UV-Detektor und anschließend zum Fraktionssammler. Diese Art der Auftragung wurde für 12h durchgeführt, ein zu hoher Druckanstieg führte zum Beenden dieses Versuchs