

# Charakterisierung des N-Glykosylierungsprofils der neuen Entenzelllinie AGE1.CR und die gerichtete Modifikation der Fucosylierung

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

Christiane Ogorek  
aus Berlin

2011

1.Gutachter: Prof.Dr. Rudolf Tauber

2.Gutachter: Prof.Dr. Werner Reutter

Disputation am 18. April 2012

# Danksagung

## Ich möchte mich bedanken bei:

### *Charité AG*

Prof. Dr. Rudolf Tauber für die hervorragenden wissenschaftlichen Rahmenbedingungen und die Betreuung meiner Doktorarbeit. Prof. Dr. Werner Reutter für die bereits frühzeitige Heranführung an das Feld der Glycobiologie und die Unterstützung meiner Doktorarbeit. Dr. Markus Berger für die Chance dieses spannende Thema bearbeiten zu dürfen und der hervorragenden wissenschaftlichen Betreuung. Dr. Véronique Blanchard für die hervorragende Einführung in das spannende Feld der Glykananalytik. Dr. Matthias Kaup für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung. Detlef Grunow, Dr. Astrid Lusch, Elena Frisch, Anja Krüger, Vanessa Frenz, Xi Liu, Stefan Risch, Susann Eigel, Manuela Hügelland, Karina Biskup und Dennis Mewis für die schöne Zeit in und außerhalb des Labors.

### *ProBioGen AG*

Dr. Volker Sandig für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und das immer offene Ohr. Dr. Ingo Jordan für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die spannenden Einblicke in das Feld der Virologie. Dr. H. Henning von Horsten für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die ausgezeichnete Zusammenarbeit in allen Fragen zur Fucose und Antikörpern. Dr. Karsten Winkler für das bereitgestellte Know-How im Bereich der AK-Expression. Christian Demmler und Dr. Christoph Giese für die wissenschaftliche Unterstützung bei den funktionellen Studien. Anne Furthmann, Stephanie Oehmke, Deborah Horn, Christine Paul und Verena Künzel für die Unterstützung bei virologischen Experimenten und der Gyrosbestimmung. Annette Knabe, Andreas Josch, Michael Thiele, Kristin Höwrig, Holger Bernhardt, Stephan Hartmann, Jana Reuschel, Patrick Reuter, Annika Lubit, Elisa Degenkolben und Renate Lombriser für die schöne Zeit in und außerhalb des Labors.

## Mein besonderer Dank gilt

meinen Familien Ogorek/Lehne und Bahrmann für das in mich gesetzte Vertrauen und die stets liebevolle Unterstützung –

insbesondere Marco Harff.

## Veröffentlichungen

1. „PROCESS FOR PRODUCING MOLECULES CONTAINING SPECIALIZED GLYCAN STRUCTURES“; WO/2011/035884; Erfinder: Sandig V, von Horsten HH, **Ogorek C**; International Filing Date: 21.09.2010.
2. von Horsten HH, **Ogorek C**, Blanchard V, Demmler C, Giese C, Winkler K, Kaup M, Berger M, Jordan I, Sandig V. Production of non-fucosylated antibodies by co-expression of heterologous GDP-6-deoxy-D-lyxo-4-hexulose reductase. *Glycobiology*. 2010 Dec; 20(12):1607-18
3. **Ogorek C**, Jordan I, Sandig V, von Horsten HH. Fucose-Targeted Glyco-Engineering of Pharmaceutical Cell Lines. Part 29. Buch „Antibody Engineering“; aus der Reihe Methods in Molecular Biology; Humana Press Inc., Patrick Chames, vorr. Juli 2012
4. **Ogorek C**, Blanchard V, Winkler K, von Horsten HH, Kaup M, Berger M, Sandig V and Jordan I; „The N-Glycosylation-Profile of the new avian Designer Cell Line AGE1.CR“; in Arbeit

CONGRESS	DATE	POSTERTITLE
19 <sup>th</sup> Joint Glycobiology Meeting, Wageningen, NL	30.11. - 02.12.2008	Characterisation of an Avian Designer Cell Line with a Focus on N-Glycans of Cell Surface and Recombinant Proteins
20 <sup>th</sup> Joint Glycobiology Meeting, Köln	08.11. - 10.11.2009	Characterisation of Avian Designer Cell Lines with Regard to N-Glycans of the Cell Surface and a Recombinant Antibody ( <b>focussing fucose</b> )
Sialoglyco 2010, Berlin	21.08. - 26.08.2010	Characterisation of Avian Designer Cell Lines with Regard to N-Glycans of the Cell Surface and a Recombinant Antibody ( <b>focussing sialic acid</b> )
5 <sup>th</sup> GlycanForum, Berlin	10.03. - 12.03.2011	Characterisation of the N-glycosylation profiles of wild type and glycoengineered avian designer cell lines ( <b>focussing glycoengineering</b> )

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.0.1	N-Glykosylierung . . . . .	2
1.0.2	Heterogenität der N-Glykosylierung . . . . .	5
1.1	Rekombinantes IgG . . . . .	7
1.1.1	IgG-Aufbau . . . . .	7
1.1.2	IgG-Effektorfunktionen . . . . .	9
1.1.2.1	Komplement vermittelte Zellzytotoxizität . . . . .	9
1.1.2.2	Antikörper vermittelte Zellzytotoxizität . . . . .	9
1.1.3	Funktion der IgG-Glykosylierung . . . . .	10
1.1.4	IgG-Halblebenszeit . . . . .	11
1.1.5	Strategien der Fucosereduktion . . . . .	12
1.2	Entenzelllinie . . . . .	13
1.3	Modifizierter Vakzinia Virus Ankara . . . . .	14
1.4	Zielsetzung . . . . .	18
<b>2</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>19</b>
2.1	Zellspezifische N-Glykosylierung . . . . .	19
2.1.1	Lektinfärbung von Zelloberflächen . . . . .	20
2.1.1.1	Fucose-spezifische Lektinfärbung . . . . .	20
2.1.1.2	Sialinsäure-spezifische Lektinfärbung . . . . .	23
2.1.2	Sialinsäuretyp von Membranglykoproteinen . . . . .	25
2.1.3	Monosaccharide von Zellmembranproteinen . . . . .	26
2.1.4	N-Glykanstrukturen von Membranglykoproteinen . . . . .	28
2.2	N-Glykosylierung rekombinanter Antikörper . . . . .	32
2.2.1	Monosaccharide rekombinanter Antikörper . . . . .	33
2.2.2	N-Glykanstrukturen rekombinanter Antikörper . . . . .	35
2.2.3	Bestimmung des Fucosylierungstyps . . . . .	40
2.2.3.1	Fucosidase-Verdau . . . . .	40
2.2.3.2	Endo S-Verdau . . . . .	41

---

2.2.4	Nachweis der Bisecting-Struktur in Entenzelllinien . . . . .	42
2.2.4.1	MALDI-TOF-MS der Ausgangsproteine . . . . .	43
2.2.4.2	HPAEC-PAD-Fraktionierung ausgewählter N-Glykane . . . . .	44
2.2.4.3	CE-LIF-Detektion zur Bestätigung der Bisecting-Struktur . . . . .	46
2.3	Modifikation der Zellfucosylierung . . . . .	48
2.3.1	Fucose-Reduktion am Beispiel rekombinanter Antikörper . . . . .	48
2.3.1.1	Rekombinantes IgG aus Entenzelllinien . . . . .	49
2.3.1.2	Trastuzumab exprimiert in der CHO-Zelllinie . . . . .	50
2.3.1.3	Produktion rekombinanter IgGs . . . . .	51
2.3.2	Glykan-Analytik . . . . .	52
2.3.2.1	Monosaccharide rek.IgGs aus RMD-positiven Entenzelllinien . . . . .	52
2.3.2.2	Monosaccharid-Analyse des Trastuzumab aus RMD-positiven Zellen . . . . .	53
2.3.2.3	Monosaccharide RMD-positiver CHO-Zelllysate . . . . .	54
2.3.2.4	HPAEC-PAD: Bestimmung der Nachweisgrenzen . . . . .	55
2.3.2.5	MALDI-TOF-MS rek.IgGs aus Entenzellen . . . . .	57
2.3.2.6	MALDI-TOF-MS: Trastuzumab aus RMD-positiven CHO-Zellen . . . . .	61
2.3.2.7	Fucosylierungstyp des Trastuzumab aus der CHO-Zelllinie . . . . .	64
2.3.3	Funktionsstudien . . . . .	66
2.3.3.1	IgG-Fc $\gamma$ RIIIa-Bindungsassay . . . . .	66
2.3.3.2	Fc $\gamma$ RIIIa-Bindungsassay des Trastuzumab aus der CHO-Zelllinie . . . . .	68
2.3.3.3	ADCC-Assay des Trastuzumab aus der CHO-Zelllinie . . . . .	69
2.4	Modifizierter Vakzinia Virus Ankara . . . . .	71
2.4.1	Zellinfektion . . . . .	71
2.4.2	MVA-Präparation . . . . .	72
2.4.3	MVA-N-Glykosylierung . . . . .	75
<b>3</b>	<b>Diskussion</b> . . . . .	<b>82</b>
3.1	Zellmembranglykosylierung . . . . .	82
3.2	Rekombinantes IgG . . . . .	83
3.2.1	Neue Strategie der Fucosereduktion . . . . .	86
3.3	Modifizierter Vakzinia Virus Ankara . . . . .	88
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung</b> . . . . .	<b>91</b>
4.1	Zusammenfassung . . . . .	91
4.2	Abstract . . . . .	94

---

---

<b>5</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>96</b>
5.1	Materialien . . . . .	96
5.1.1	Geräte . . . . .	96
5.1.2	Chemikalien . . . . .	97
5.1.3	Verbrauchsmaterial . . . . .	100
5.1.4	Kits . . . . .	100
5.1.5	Antikörper . . . . .	101
5.1.6	Lektine . . . . .	101
5.1.7	Primer/Vektoren . . . . .	101
5.1.8	Enzyme . . . . .	102
5.1.9	Organismen . . . . .	102
5.1.10	Software . . . . .	103
5.2	Molekularbiologische Methoden . . . . .	104
5.2.1	RT-PCR . . . . .	104
5.2.1.1	mRNA-Isolierung . . . . .	104
5.2.1.2	Quantifizierung der RNA . . . . .	104
5.2.1.3	RT-PCR . . . . .	104
5.2.1.4	Real-Time-PCR . . . . .	105
5.2.2	Agarosegelelektrophorese . . . . .	105
5.3	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	107
5.3.1	SDS-PAGE . . . . .	107
5.3.2	Coomassiefärbung . . . . .	107
5.3.3	Western-Blot . . . . .	108
5.3.3.1	Proteintransfer . . . . .	108
5.3.3.2	Immundetektion . . . . .	108
5.3.4	Proteinbestimmung . . . . .	108
5.3.4.1	BCA-Test . . . . .	108
5.3.4.2	<i>IgG1 Gyrolab Sandwich Immuno Assay</i> . . . . .	109
5.3.4.3	Qubit Proteinbestimmung . . . . .	109
5.3.5	Protein-Isolierung . . . . .	109
5.3.5.1	Affinitätschromatographie . . . . .	109
5.3.5.2	Rohmembranpräparation . . . . .	110
5.4	Zellbiologische Methoden . . . . .	111
5.4.1	Zellkultivierung . . . . .	111
5.4.1.1	Zellzahlbestimmung . . . . .	111
5.4.1.2	Einfrieren . . . . .	111
5.4.1.3	Auftauen . . . . .	112

5.4.1.4	Suspensionsadaption . . . . .	112
5.4.2	Transfektion . . . . .	112
5.4.2.1	Linearisierung von DNA-Vektoren . . . . .	112
5.4.2.2	Mikroporation . . . . .	112
5.4.2.3	Liposomale Transfektion . . . . .	113
5.4.3	Selektion . . . . .	113
5.4.3.1	Selektionsdruck . . . . .	113
5.4.3.2	Einzelzellklonierung . . . . .	114
5.4.4	Proteinexpression . . . . .	114
5.4.4.1	Expression in Schüttelröhrchen . . . . .	114
5.4.4.2	Expression in Schüttelkolben . . . . .	114
5.4.4.3	Fed-Batch . . . . .	115
5.4.4.4	Zellernte . . . . .	115
5.4.5	Mikroskopie . . . . .	115
5.4.5.1	Durchlichtmikroskopie . . . . .	115
5.4.5.2	Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	115
5.4.6	Zellbasierte Assays . . . . .	115
5.4.6.1	ADCC-Assay . . . . .	115
5.4.6.2	FcyRIIIa-Bindungsassay . . . . .	116
5.4.6.3	Lektinfärbung . . . . .	117
5.4.6.4	Durchflusszytometrie . . . . .	117
5.4.7	Virologische Methoden . . . . .	117
5.4.7.1	Zellinfektion . . . . .	117
5.4.7.2	MVA-Präparation . . . . .	118
5.4.7.3	MVA-Titration . . . . .	118
5.5	Glykananalytische Methoden . . . . .	119
5.5.1	Enzymatische Freisetzung der N-Glykane . . . . .	119
5.5.1.1	Trypsin . . . . .	119
5.5.1.2	PNGase F . . . . .	119
5.5.1.3	Sialidase . . . . .	120
5.5.1.4	Sialidase S . . . . .	120
5.5.1.5	$\alpha$ -Fucosidase . . . . .	120
5.5.1.6	$\alpha$ 1-3/4-Fucosidase . . . . .	120
5.5.1.7	$\beta$ -Galactosidase . . . . .	120
5.5.1.8	HEXaseI . . . . .	121
5.5.1.9	EndoS . . . . .	121



---

5.5.2	N-Glykanreinigung . . . . .	121
5.5.2.1	Extract-Clean <sup>TM</sup> C18-Säulen . . . . .	121
5.5.2.2	Extract-Clean <sup>TM</sup> Carbograph-Säulen . . . . .	121
5.5.2.3	TopTip <sup>TM</sup> Typ P2-Carbon-Säulen . . . . .	122
5.5.3	MALDI-TOF-MS . . . . .	122
5.5.3.1	MALDI-TOF/TOF-MS . . . . .	123
5.5.3.2	Permethylierung . . . . .	124
5.5.3.3	MS-Messung . . . . .	125
5.5.4	Monosaccharid-Bestimmung . . . . .	126
5.5.4.1	TFA-Hydrolyse . . . . .	127
5.5.4.2	Probentrocknung . . . . .	127
5.5.4.3	Probenfiltration . . . . .	127
5.5.4.4	HPAEC-PAD-Analyse . . . . .	128
5.5.5	Oligosaccharid-Bestimmung . . . . .	128
5.5.6	Kapillarelektrophorese . . . . .	129
5.5.6.1	APTS-Markierung von N-Glykanen . . . . .	129
5.5.6.2	CE-LIF-Analyse . . . . .	130
5.5.7	Sialinsäurebestimmung . . . . .	130
5.5.7.1	Essigsäurehydrolyse . . . . .	130
5.5.7.2	DMB-Markierung von Sialinsäuren . . . . .	131
5.5.7.3	Dionex-Ultimate 3000-Analyse . . . . .	131
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>133</b>
6.1	Exemplarische Spektren . . . . .	133

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Glykan-Biosynthese . . . . .	2
1.2	Übersicht der N-Glykotypen . . . . .	3
1.3	Übersicht der N-Acetylglucosaminyltransferasen . . . . .	4
1.4	Blutgruppenantigene . . . . .	5
1.5	Neu5Ac und Neu5Gc . . . . .	6
1.6	IgG-Aufbau . . . . .	8
1.7	IgG-induzierte Zellyse . . . . .	10
1.8	Biosynthesewege der GDP-Fucose . . . . .	13
1.9	MVA-Reifung . . . . .	15
2.1	Schema: Charakterisierung zellspezifischer N-Glykosylierung . . . . .	20
2.2	Fluoreszenzmikroskopie: Fucosylierung . . . . .	21
2.3	Durchflusszytometrie: Fucosylierung . . . . .	22
2.4	Fluoreszenzmikroskopie: Sialinsäuren . . . . .	23
2.5	Durchflusszytometrie: Sialylierung . . . . .	24
2.6	RP-HPLC: Sialinsäurebestimmung . . . . .	25
2.7	HPAEC-PAD: Monosaccharide von Membranglykoproteinen . . . . .	27
2.8	N-Glykanstrukturen: humane versus Entenzelllinien . . . . .	29
2.9	N-Glykanstrukturen: CHO versus Entenzelllinien . . . . .	30
2.10	Zellspezifische N-Glykosylierungseigenschaften im Überblick . . . . .	31
2.11	Monosaccharide rek.IgGs . . . . .	34
2.12	Zellspezifische N-Glykanstrukturen rek.IgGs . . . . .	36
2.13	Vergleich der N-Glykanstrukturen rek.IgGs . . . . .	37
2.14	N-Glykosylierung der Membranglykoproteine versus rek.IgG . . . . .	38
2.15	Fucosidase-Verdau von N-Glykanen rek.IgGs . . . . .	40
2.16	EndoS-Verdau von N-Glykanen rek.IgGs . . . . .	41
2.17	Schema: Unterscheidung triantennärer- und Bisecting-Struktur . . . . .	42
2.18	MS-Spektren der Ausgangsproteine . . . . .	43
2.19	HPAEC-PAD: Fraktionierung von N-Glykanen . . . . .	45
2.20	MS-Spektren: isolierter triantennärer und Bisecting-Struktur . . . . .	46

---

2.21	CE-LIF: Vergleich der triantennären und Bisecting-Struktur . . . . .	47
2.22	Übersicht der Fucosesynthesewege . . . . .	48
2.23	Nachweis des RMD-Vektors in der AGE1.CR.pIX-Zelllinie. . . . .	50
2.24	Nachweis des RMD-Vektors in der CHO-Zelllinie . . . . .	51
2.25	IgG-Reinheitsprüfung mittels Coomassiefärbung . . . . .	51
2.26	HPAEC-PAD: Monosaccharide des rek.IgG aus CR.pIX-Zellen. . . . .	52
2.27	Monosaccharide des Trastuzumab +/-RMD aus CHO-Zellen . . . . .	53
2.28	HPAEC-PAD: Monosaccharide von Zelllysaten +/-RMD-Expression. . . . .	54
2.29	HPAEC-PAD: LOD-Bestimmung . . . . .	56
2.30	MALDI-TOF-MS: hIgG +/-RMD aus der AGE1.CR-Zelllinie . . . . .	57
2.31	Zusammengefasste MS-Daten rek.IgGs der AGE1.CR-Zelllinie . . . . .	58
2.32	MALDI-TOF-MS: rek.IgG +/-RMD der AGE1.CR.pIX-Zelllinie . . . . .	59
2.33	Zusammengefasste MS-Daten rek.IgGs der AGE1.CR.pIX-Zelllinie . . . . .	60
2.34	MALDI-TOF-MS: Trastuzumab +/-RMD aus der CHO-Zelllinie . . . . .	62
2.35	Zusammengefasste MS-Daten des Trastuzumab aus der CHO-Zelllinie . . . . .	63
2.36	Fucosidase-Verdau: Trastuzumab . . . . .	64
2.37	MALDI-TOF/TOF: Trastuzumab . . . . .	65
2.38	Fc $\gamma$ RIIIa-Bindungsassay: rek.IgG der AGE1.CR-Zelllinie . . . . .	66
2.39	Fc $\gamma$ RIIIa-Bindungsassay: rek.IgGs der AGE1.CR.pIX-Zelllinie . . . . .	67
2.40	Fc $\gamma$ RIIIa-Bindungsassay: Trastuzumab der CHO-Zelllinie. . . . .	69
2.41	ADCC-Assay: Trastuzumab der CHO-Zelllinie. . . . .	70
2.42	Zellmorphologie nach Infektion . . . . .	72
2.43	Western-Blot: MVA-Nachweis . . . . .	73
2.44	MVA-Quantifizierung . . . . .	74
2.45	MS-Daten: MVA aus der BHK-Zelllinie . . . . .	76
2.46	MS-Daten: MVA aus AGE1.CR-Zelllinie . . . . .	77
2.47	MS-Daten: MVA aus AGE1.CR.pIX-Zelllinie . . . . .	78
2.48	MS-Daten: MVA-Sialylierung . . . . .	80
5.1	N-Glykanfreisetzung über PNGase F . . . . .	119
6.1	MS-Spektrum: AGE1.HN-Membranglykoproteine . . . . .	133
6.2	MS-Spektrum: AGE1.CR-Membranglykoproteine . . . . .	134
6.3	MS-Spektrum: AGE1.CR.pIX-Membranglykoproteine . . . . .	134
6.4	MS-Spektrum: CHO-Membranglykoproteine . . . . .	135
6.5	MS-Spektrum: „Membran-MVA“ aus AGE1.CR-Zellen. . . . .	135
6.6	MS-Spektrum: „Membran-MVA“ aus AGE1.CR.pIX-Zellen. . . . .	136
6.7	MS-Spektrum: „Membran-MVA“ aus BHK-Zellen . . . . .	136

---

6.8	MS-Spektrum: "Membran-MVA" aus AGE1.CR-Zellen. . . . .	137
6.9	MS-Spektrum: „Membran-MVA“ aus AGE1.CR.pIX-Zellen. . . . .	137
6.10	MS-Spektrum: „Membran-MVA“ aus BHK-Zellen . . . . .	i

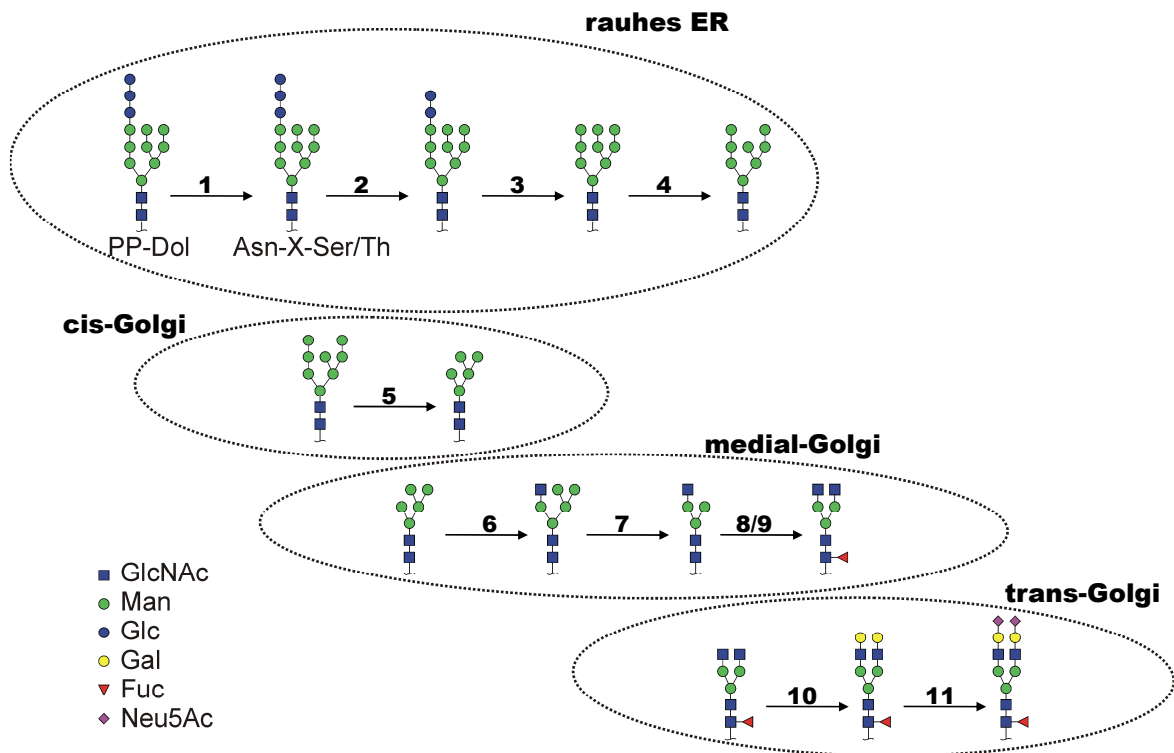
# 1 Einleitung

Auf der Suche nach neuen effektiveren Wegen zur Bekämpfung folgenschwerer Proteinmangelkrankungen, wie beispielsweise der Mangel an Proteinen der Blutgerinnungskaskade oder Alpha-1-Antitrypsin, werden verstärkt rekombinante Proteine verwendet [1]. Im Vergleich zu isolierten Proteinen aus humanem Serum, besteht bei rekombinanten Proteinen durch die Wahl der Produktionszelllinie und gentechnischer Veränderung die Möglichkeit therapeutische Proteine dahingehend zu optimieren, dass sie gegenüber der nativen Form eine höhere therapeutische Wirkung oder eine längere Halblebenszeit besitzen. Zur Vermeidung einer Immunreaktion auf das verabreichte rekombinante Protein, sollten neben der Aminosäuresequenz auch dessen posttranslationale Modifikationen kaum von der nativen Form abweichen. Bei Serumproteinen zeigt sich vor allem die co- und posttranslationale Modifikation der Glykosylierung relevant für die Eigen- und Fremderkennung durch das Immunsystem [2, 3]. Die Proteinglykosylierung trägt zur korrekten Proteinfaltung bei und bietet einen großen Spielraum zur gentechnischen Optimierung von Funktion und Halblebenszeit therapeutischer Proteine [4–7]. Somit können mit zunehmender Optimierung die Applikationsdosen oder -häufigkeiten als auch die Kosten sinken. Therapeutische Proteine werden industriell sowohl aufgrund der grossen Homologie zur humanen Glykosylierung vorwiegend in Säugetierzellen wie der *Chinese Hamster Ovary* Zelllinie (CHO) produziert. Alternativ können rekombinante Proteine in Bakterien-, Pilz-, Hefe-, Insekten- oder Pflanzenzellen exprimiert werden, welche jedoch keine vollständig humanähnliche Glykosylierung erreichen, da ihnen zumeist ein Teil der Glykosyltransferasen des Golgi-Apparates fehlt (Abb.1.1) [8–10]. Zudem können humanfremde Glykosylierungen entstehen, wie die Pauci Mannose bei Insektenzellen [11], wodurch das Risiko eine Immunantwort auszulösen steigt und somit die therapeutische Verwendung des rekombinanten Proteins eingeschränkt ist. Neben der Produktion therapeutischer Proteine mit bestimmtem Glykosylierungsmuster wird nach spezifischen Veränderungen in der

Glykosylierung bei Tumor- oder Autoimmunerkrankungen geforscht [12–15]. Dieses soll die Nutzung geeigneter Biomarker für eine Früherkennung mit höheren Heilungschancen ermöglichen.

### 1.0.1 N-Glykosylierung

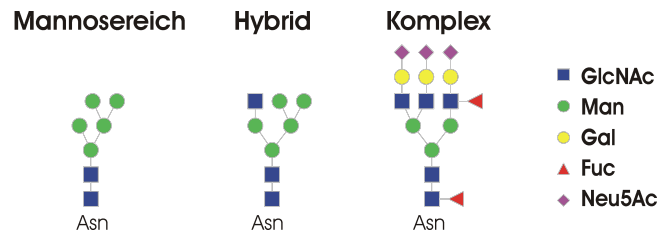
Die verbreitete N-Glykosylierung von Serumproteinen zeigt sich hochrelevant für die korrekte Faltung des Proteins [16] und dessen Interaktion mit verschiedenen Rezeptoren der Signalerkennung [17, 18]. Bei der N-Glykosylierung werden Glykanstrukturen an das Asparagin der Erkennungssequenz Asn-X-Ser oder Thr gebunden, wobei X jede Aminosäure außer Prolin sein kann. Weitere Glykosylierungsformen sind die O-Glykosylierung – an Ser oder Thr gebunden –, sowie Glykolipide und Peptidoglykane [19]. Die N-Glykosylierung beginnt



**Abb. 1.1:** Glykan-Biosynthese im ER, Golgi. 1: Oligosaccharyltransferase; 2/3:  $\alpha$ -GlucosidaseI/II; 4/5:  $\alpha$ -2-Mannosidasen; 6: GlcNAc-TransferaseI; 7:  $\alpha$ -3/6-MannosidaseII; 8: GlcNAc-TransferaseII; 9:  $\alpha$ -1-6-Fucosyltransferase; 10:  $\beta$ -1-4-Galactosyltransferase; 11:  $\alpha$ 2-3/6-Sialyltransferase. [20].

cotranslational mittels des OST-Komplexes im Endoplasmatischen Retikulum (ER). Dabei

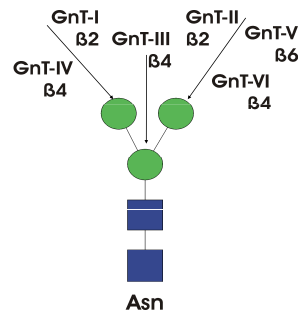
wird eine Vorläuferstruktur – bestehend aus Dolichol gebundenen 14 Monosacchariden – an Asn übertragen [21]. Die Vorläuferstruktur wird posttranslational im rER und Golgi [22, 23] über eine Vielzahl von Enzymen bis zur Core-Struktur getrimmt und über weitere Enzyme zu den verschiedenen N-Glykanten aufgebaut (Abb.1.2). Der N-Glykanab- und Aufbau findet zum Teil überlappend statt, weshalb neben mannosereichen und komplexen N-Glykanen auch die Übergangsform die sogenannten hybriden N-Glykane entstehen.



**Abb. 1.2:** Übersicht der N-Glykanten.

Allen N-Glykanten gemein ist die exklusive Core-Struktur –  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ . Mittels der N-Acetylglucosaminyltransferasen (GnT) I-VI können bis zu fünf N-Acetylglucosamine (GlcNAc) spezifisch angeknüpft werden. Entsprechend der Anzahl angeknüpfter GlcNAc unterscheidet man zwischen bi-, tri-, tetra- und pentaantennären komplexen N-Glykanen. Eine strukturelle Besonderheit stellt die so genannte Bisecting-Struktur dar, wobei ein GlcNAc  $\beta$ -1-4-glykosydisch an die  $\beta$ -Mannose der Core-Struktur geknüpft ist. Die dazu notwendige GnT-III benötigt zur Aktivierung die vorherige GnT-I und -II Aktivität, also eine mindestens biantennäre Struktur und kann sowohl in komplexen als auch in hybriden N-Glykanen integriert sein [19]. Die GnT-III ist in der Lage neben bi- auch tri-, tetra- und pentaantennäre N-Glykanstrukturen als Substrat zu verwenden, da auch höherantennäre Bisecting-Strukturen nachgewiesen werden konnten wie beispielsweise durch Rutherford et al. [4]. Die Anheftung eines Bisecting-GlcNAcs spreizt die N-Glykanstruktur derart, dass keine weitere Anknüpfung antennärer GlcNAc über die GnT-IV-VI möglich ist [24–26].

An antennäres GlcNAc wird anschließend über Galactosyltransferasen Galactose angeheftet. Harvey et al. [27] konnte zeigen, dass auch das Bisecting-GlcNAc galactosyliert wird. Andere Veröffentlichungen weisen jedoch aufgrund sterischer Hinderung auf die ausbleibende Galactosylierung der Bisecting-Struktur hin [19]. Die terminalen Sialinsäuren sind aufgrund ihrer Größe, Position und negativen Ladung hochrelevant für die Proteinkonformation und -funktion. Zudem stellen Sialinsäuren eine wichtige Erkennungssequenz für Rezeptoren dar,



**Abb. 1.3:** Übersicht der N-Acetylglucosaminyltransferasen [19].

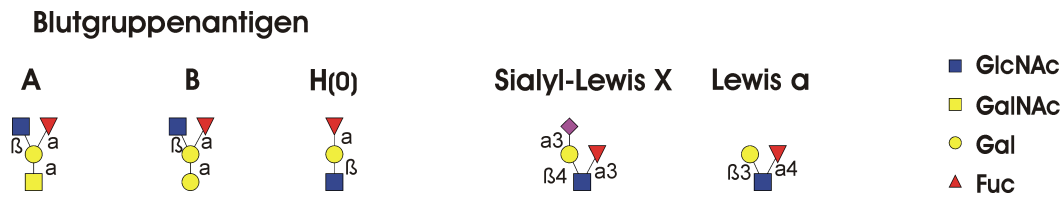
was unter anderem von Eigen- und Fremdzellen genutzt wird. Komplexe N-Glykane können zusätzlich fucosyliert sein, wobei zwischen der  $\alpha$ 1-3/4-gebundenen antennären und der  $\alpha$ 1-6-gebundenen Core-Fucose unterschieden wird. Die Core-Fucosylierung von IgGs zeigte beispielsweise einen erheblichen Effekt auf die Antikörper-vermittelte Zellzytotoxizität (ADCC) [28–30]. Antennäre Fucose in Verbindung mit GlcNAc, Galactose und Sialinsäure – die so genannte Sialyl Lewis X-Struktur ( $\text{SLe}^X$ ) – wird hingegen von verschiedenen Pathogenen als Erkennungssequenz zur Anheftung an die Zelloberfläche genutzt [31, 32].

Häufig sind Fucosen und Sialinsäuren in den verschiedenen Erkennungssequenzen von Pathogenen enthalten [33]. Viren wie der Influenza Virus nutzen vorwiegend Sialinsäuren mittels lektinähnlicher Proteine wie Hämagglutinin auf der Virusoberfläche zur Zellanheftung [33, 34]. *Staphylococcus aureus* benötigt hingegen die fucosylierte Sialyl-Lewis X-Struktur. Bakterien zeigen sich allgemein geringer spezialisiert auf sialylierte Glykanerkennungssequenzen. So benötigt beispielsweise *Pseudomonas aeruginosa* die fucosylierte aber nicht sialylierte Lewis a-Struktur –  $\alpha\text{FucGlcNAc}\beta\text{Gal}$ .

In der evolutionären Entwicklung des Menschen ging die unterschiedliche Glykosylierung der Blutzellen – Grundlage der Einteilung in die Blutgruppen AB0 – mit unterschiedlicher Suszeptibilität für Pathogene einher und war anscheinend hochrelevant für die evolutionäre Entwicklung. So zeigen beispielsweise Menschen der Blutgruppe 0 statistisch mildere Krankheitsverläufe bei Malariainfektion [35]. In äquatornahen Gebieten mit subtropischem Klima, als Lebensgrundlage der Anopheles-Überträger-Moskito, tritt daher eine Konzentrierung der Blutgruppe 0 (40-90 %) auf. In kühleren Gebieten, wo keine Fälle von Malaria auftreten, ist die Blutgruppe 0 mit maximal 40 % weitaus geringer vertreten [35].

Die endständigen Sialinsäuren tragen zudem erheblich zur Halblebenszeit von Serum-Glyko-





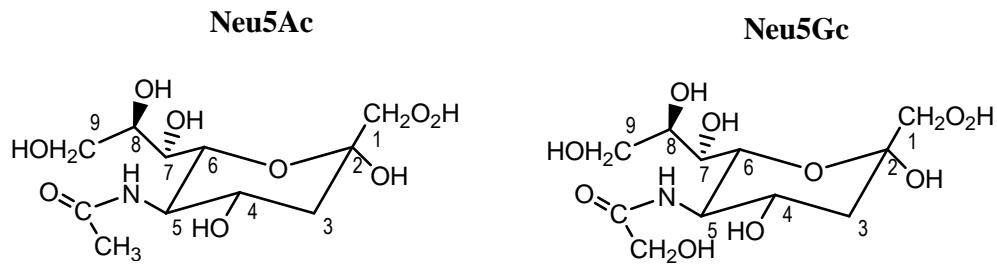
**Abb. 1.4:** Übersicht der Blutgruppenantigene ABO und der Sialyl-Lewis X und Lewis a-Struktur als Erkennungssequenz verschiedener Pathogene [33].

proteinen bei. So werden Glykoproteine mit terminaler Galactose, GlcNAc oder Mannose über den Asialoglykoprotein- und den Mannose-Rezeptor verstärkt gebunden und anschließend abgebaut [36–38]. Bei metastasierenden Tumorzellen konnten erhöhte Mengen der Sialyl-Lewis X Struktur nachgewiesen werden [39]. Viele Tumorerkrankungen weisen zudem erhöhte Mengen an Fucose auf [40–43], was bei neuronalen Zellen zu erhöhter neuronaler Plastizität [44] führt und bei Tumorzellen eventuell ähnlich stimulierend auf das Zellwachstum wirkt. Glykoproteine von Viren, Tumoren und embryonalen Zellen haben anscheinend einen Vorteil gegenüber der Immunabwehr durch die erhöhte Expression der Bisecting-Struktur [45–47], wohingegen Tumorantikörper mit der Bisecting-Struktur eine erhöhte Zellzytotoxizität aufweisen [43].

## 1.0.2 Heterogenität der N-Glykosylierung

Die große Vielfalt von N-Glykanstrukturen steht in starker Korrelation zu den vorhandenen zellspezifischen Glykosyltransferasen sowie deren Expressionsstärken. Die Strukturvielfalt an einer N-Glykosylierungsstelle wird als Mikroheterogenität beschrieben, welche sich durch die Makroheterogenität, also die Strukturvielfalt an verschiedenen N-Glykosylierungsstellen, noch erweitert. Weitere Modifikationen wie die Acetylierung, Phosphorylierung und Sulfatierung können die Heterogenität der N-Glykanstrukturen zusätzlich steigern.

Die N-Glykosylierung kann Spezies- [48–50] und Gewebe-spezifisch variieren [47]. So unterscheiden sich humane Zellen zu den meisten anderen Säugetierzellen in der Expression der ausschließlichen N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) statt der üblichen N-Glykolyneuraminsäure (Neu5Gc). Aufgrund einer Mutation in der CMP-Neu5Ac-Hydroxylase (CMAH) wird die Sialinsäure Neu5Ac nicht weiter zu Neu5Gc hydroxyliert [51, 52]. Wie in Abb.1.5 dargestellt, unterscheidet sich die Neu5Gc in einem zusätzlichen O-Atom.



**Abb. 1.5:** Struktureller Vergleich der Sialinsäuren Neu5Ac und Neu5Gc.

Humane Zellen haben dank dieser Mutation potentiell einen Vorteil gegenüber Pathogenen, die sich auf Neu5Gc als Erkennungssequenz spezifiziert haben. Es zeigte sich, dass die CMAH im Gehirn der meisten Säugetiere geringer exprimiert wird, sodass im Hirnbereich geringere Mengen der Neu5Gc detektiert wurden, selbst bei starker Expression in anderen Organen. Daher wird ein funktioneller Zusammenhang fehlender Neu5Gc im Hirnareal und der komplexen evolutionären Entwicklung beim Menschen vermutet [53]. Auch in Hühnerzellen konnte Neu5Ac nachgewiesen werden. Hunde-, Meerschwein-, Ratten- und Kaninchenzellen weisen sogar beide Sialinsäuretypen auf [49]. Für Hühnerzellen konnte kein CMAH-ähnliches Enzym nachgewiesen werden. Es ist daher wahrscheinlich, dass Vogelzellen nie über die Eigenschaft der Neu5Gc-Synthese verfügten und sich diese erst nach der evolutionären Abspaltung der Vögel bei den Säugetieren entwickelte. Byres et al. [54] konnte auch in Hühnereiern in Abhängigkeit von Neu5Gc-reichen Futtermitteln (Rotes Fleisch, Milchprodukte) den Einbau geringer Mengen Neu5Gc beobachten. Auch in humanem gesunden Gewebe konnten geringe Mengen Neu5Gc und in erkranktem Gewebe sogar erhöhte Mengen beobachtet werden [3, 55, 56], was auf alternative Wege der Sialinsäuregewinnung in Form von Recyclingwegen hindeutet. Für die industrielle Produktion therapeutischer Proteine ist dies ein Grund mehr, auf jegliche Supplementation mit tierischen Neu5Gc-haltigen Produkten zu verzichten.

Die Ausbildung der N-Glykosylierung korreliert zusätzlich mit der jeweiligen Proteinsequenz und Proteinfaltung. Trotz Mikroheterogenität lassen sich so beispielsweise für IgGs relativ Zelllinien-unabhängig mehrheitlich biantennäre, einfach fucosylierte, nicht sialylierte Strukturen im Fc-Teil nachweisen [14, 49].

Zudem können der Grad der Galactosylierung und Sialylierung in Korrelation zu den Kul-

turbedingungen variieren. Nicht nur Medien- oder Feedbestandteile, auch die Art der Fermentation, pH-Wert, Rühreintrag, also Parameter, die auf die Zellvitalität Einfluss nehmen, beeinflussen die Glykosylierung rekombinanter Proteine [57–59]. Die Vielzahl von Einflussfaktoren der Proteinglykosylierung macht Kontrollen und exakte Vorgaben für therapeutische Proteine im Zusammenhang mit der jeweiligen Funktion hochrelevant. Da die Anforderung der N-Glykosylierung an die Funktion des jeweiligen therapeutischen Proteins gekoppelt ist, ist es notwendig, über verschiedene Wege der Zelllinienveränderung durch *Glyco-Engineering* oder auch Supplementierungs- und Kultivierungseffekte zu verfügen und anzuwenden.

## 1.1 Rekombinantes IgG

Der Einsatz rekombinanter Antikörper beispielsweise in der Tumorthherapie wächst stetig, 2008 waren bereits 21 monoklonale Antikörper auf dem US-Markt und weitere 100 in klinischen Testphasen [1]. Mit rekombinanten Antikörpern wie Infliximab, Rituximab, Trastuzumab – meist vom Subtyp IgG1 – erzielen Pharmafirmen bereits hohe Gewinne und forschen stets an deren Verbesserung und Kostenreduktion. Vielversprechend zeigte sich die Modifikation der IgG-Glykosylierung. So ließ sich eine Aktivitätssteigerung um das 50-100fache durch die Reduktion der IgG-Fucosylierung nachweisen [28, 60]. In Korrelation zur IgG-Funktion stehen zudem terminale Sialinsäure, Galactose, GlcNAc und die Bisecting-Struktur.

### 1.1.1 IgG-Aufbau

Immunglobuline (Ig) bestehen aus je zwei schweren (H, *heavy*) und leichten (L, *light*) Ketten. Aufgrund von Unterschieden in der konstanten Region (C) der schweren Kette werden die Igs in die Isotypen IgG, IgA, IgE, IgD und IgM unterteilt. Das IgG ist mit 146 kDa der kleinste Isotyp und ist als einziger plazentagängig (Abb.1.6). Das IgG wird beim Menschen aufgrund weiterer Unterschiede in der schweren Kette ( $\gamma$ ) in die vier Subtypen IgG1-4 unterteilt. Das humane IgG1 ist mit  $\sim 9$  mg/ml am anteilsstärksten im Serum Erwachsener vertreten. Mit 21 Tagen hat das IgG im Vergleich zu den übrigen Isotypen die längste Halblebenszeit [61]. In der konstanten Region – der CH2-Domäne nahe des IgG-Gelenks (*hinge*) – befindet sich am Asparagin 297 (Asn297) die für die IgG-Effektorfunktion wichtige N-Glykosylierungsstelle. Aufgrund der Mikroheterogenität der N-Glykosylierung über eine Variation der Anzahl von

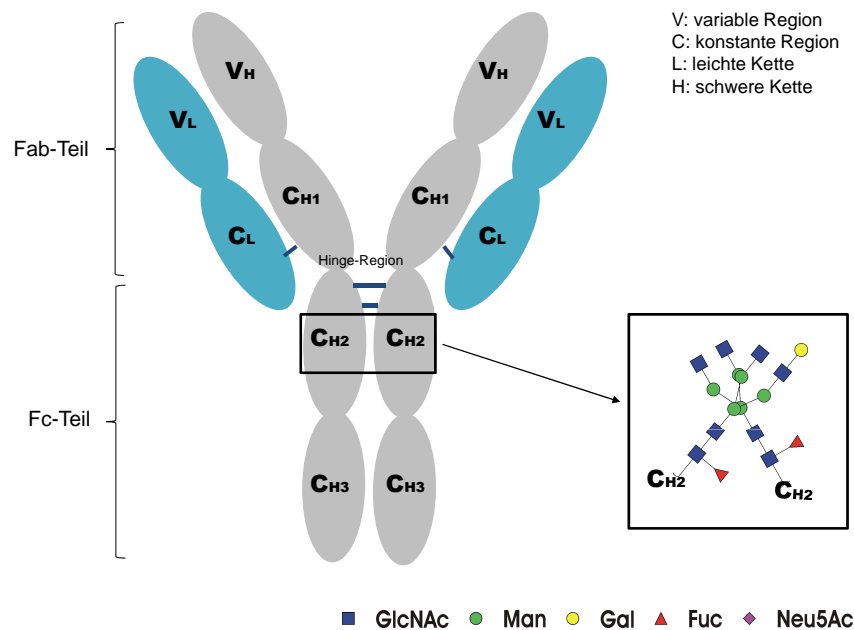


Abb. 1.6: Schematische Übersicht des IgG-Aufbaus.

Galactosen, Sialinsäuren und Fucosen sind für die humane IgG-Glykosylierung über 30 Strukturen bekannt [14]. Humanes Serum-IgG trägt überwiegend ein biantennäres komplexes N-Glykan pro schwerer Kette. Diese ist zu 90 % Core-fucosyliert und überwiegend einfach galactosyliert. Sialylierte Strukturen lassen sich im Fc-Teil nur zu 10 % nachweisen. Zusätzlich finden sich in humanem Serum IgG geringe Mengen nicht fucosylierter Bisecting-Strukturen, Hybridstrukturen sowie die mannosereiche Struktur Man5 [48, 49].

Die N-Glykane interagieren über hydrophobe und hydrophile Wechselwirkungen miteinander und mit dem Aminosäuregerüst. Mittels Röntgen- und NMR-Analysen konnte gezeigt werden, dass die schweren Ketten des Fc-Teils über hydrophobe Interaktion der  $\alpha$ 1-3-Mannose des jeweiligen biantennären N-Glykans verbunden sind [6, 17, 62]. Es wird vermutet, dass die Glykosylierung an dieser Stelle nicht direkt zur Rezeptorerkennung genutzt wird, sondern dass diese sich auf die Konformation des IgG-Moleküls auswirkt und somit indirekt zur Bindungsspezifität beiträgt [7, 43].

30 % der humanen Serum IgG sind zusätzlich im Fab-Teil glykosyliert [63, 64]. Im Vergleich zur Fc-Glykosylierung besitzen N-Glykane des Fab-Teils höhere Anteile sialylierter Strukturen, was anscheinend mit IgG-Aggregation und -Löslichkeit korreliert [14].

Die N-Glykosylierung rekombinanter IgG – zur Produktion von Therapeutika – unterscheidet sich in Abhängigkeit der zellspezifischen Glykosyltransferasen, externer Ressourcen (Medium, Feed) sowie der Produktionsbedingungen (Fermentationsart, Rühreintrag) und ist batchweise zu prüfen [57–59].

## 1.1.2 IgG-Effektorfunktionen

Sobald das IgG spezifisch an sein Antigen (z.B. Tumorzellen, Pathogene, Toxine) bindet, können verschiedene Wege der Immunantwort induziert werden. Zum einen der klassische Weg der Komplementaktivierung (*Complement Mediated Cytolysis*, CDC) und zum anderen die Antikörper vermittelte Zellzytotoxizität (*ADCC*, *Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*).

### 1.1.2.1 Komplement vermittelte Zellzytotoxizität

Bei der Antikörper vermittelten Komplementaktivierung mit resultierender Zellyse bindet der Antikörper-Antigen-Komplex (mindestens 2:1) an das c1q-Protein und aktiviert das Komplement – bestehend aus c1q, -r, -s. Es folgt die Ausbildung des *Membrane Attack Complex* (MAC) bestehend aus c5b-c9, der die Zellyse initiiert (Abb.1.7) [65].

### 1.1.2.2 Antikörper vermittelte Zellzytotoxizität

Antigengebundenes IgG kann zudem über den Fc-Teil an Fc $\gamma$ -Rezeptoren auf Oberflächen natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) und der polymorphkernigen, neutrophilen Leukocyten (PMNs) binden und somit die ADCC auslösen. Aktivierte Effektorzellen, nach IgG-Bindung an den Fc $\gamma$ -RezeptorIIIa (CD16), setzen cytotoxische Granula frei. Diese beinhalten Perforine und Granzyme, die in die Zielzelle eindringen und Apoptose auslösen.

NK-Zellen sind größer als T- und B-Lymphocyten, zirkulieren im Blut und werden von Interferonen oder Cytokinen angelockt. Im Blut zirkulieren vorwiegend die neutrophilen Zellen oder polymorphkernigen neutrophilen Leukocyten (PMNs). Einkernige Phagocyten im Gewebe wie z.B. dem Bindegewebe werden in Histiozyten und Makrophagen unterteilt. Makrophagen bilden die erste Instanz zur Bekämpfung von Eindringlingen. Bei der Pathogenerkennung werden zur Verstärkung neutrophile Zellen aus dem Blut über freigesetzte Chemokine an-

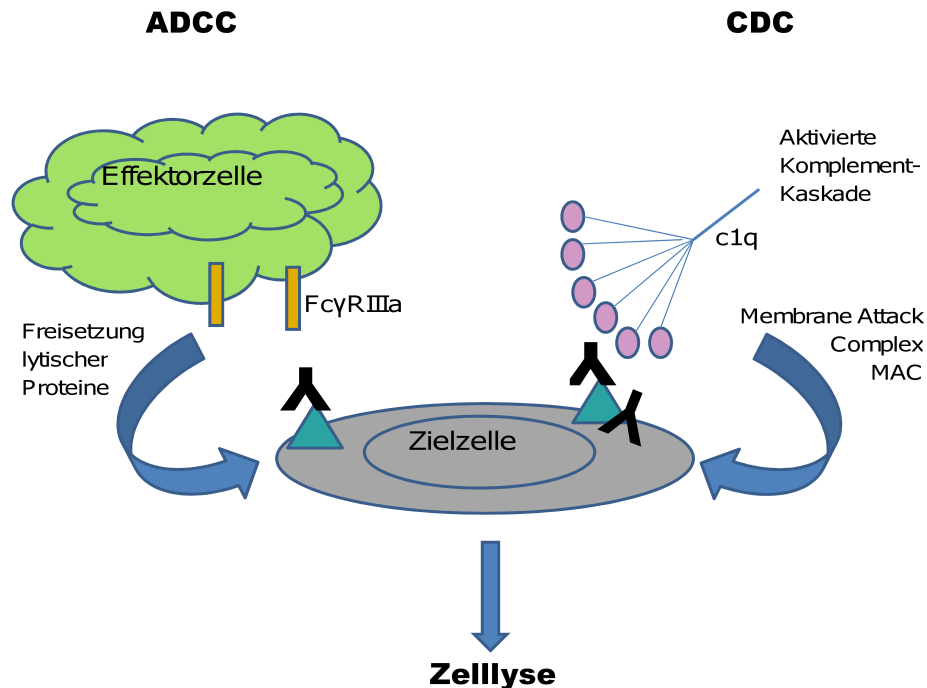


Abb. 1.7: IgG-induzierte Zellyse. [61]

geloockt. Verschiedene Rezeptoren der beiden Phagozyten sorgen für Eigen- und Fremderkennung, so der Makrophagen-Mannoserezeptor, Scavenger-Rezeptor oder der CD14-Rezeptor, der beispielsweise an die bakterielle Lipopolysaccharidschicht (LPS) bindet.

Die Fc $\gamma$ -Rezeptoren können scheinbar zwischen gebundenem und nicht gebundenem IgG-Fc-Teil unterscheiden, da bei Immunkomplexierung die Affinität zum Fc-Teil steigt [66, 67]. Fc $\gamma$ -Rezeptoren lassen sich allgemein in drei Gruppen einordnen – den Fc $\gamma$ RIII (CD16), den Fc $\gamma$ RII (CD32) und den Fc $\gamma$ RI (CD64). Neben dem ADCC-aktivierenden Rezeptor Fc $\gamma$ RIIIa besitzt der Fc $\gamma$ RIIb eine ADCC-inhibierende Funktion [68, 69].

### 1.1.3 Funktion der IgG-Glykosylierung

Effekte der IgG-Glykosylierung auf die IgG-Funktion zeigen sich beispielsweise in der stärkeren CDC-Aktivität bei terminaler Galactose im Vergleich zu terminalem GlcNAc [70]. Die ADCC-Aktivität zeigt sich hingegen unbeeinflusst von terminaler Gal oder GlcNAc [28].

Sialyliertes IgG zeigte eine höhere Affinität zu dem ADCC-inhibierenden Fc $\gamma$ RIIb und besitzt somit anti-inflammatorische Wirksamkeit [71, 72]. Nicht sialyliertes IgG zeigte sich entsprechend mit einer erhöhten ADCC-Aktivität.

Eine besonders starke ADCC-Aktivität konnte durch Verminderung der Core-Fucose der IgG-Glykosylierung erreicht werden, z.B. durch die Expression der nicht fucosylierten Bisecting-Struktur [43, 73], nicht fucosylierter mannosereicher Strukturen [74] oder nicht fucosylierter komplexer N-Glykanstrukturen [28, 60, 75]. Houde et al. [7] zeigte, dass das Fehlen der Core-Fucose zu keiner Konformationsänderung führt, vielmehr werden Erkennungssequenzen im IgG-Fc-Teil freigegeben, die mit der N-Glykosylierung am Asn162 des Fc $\gamma$ RIIIa interagieren [18, 76]. Niwa et al. [77] konnten nachweisen, dass alle Subtypen IgG1-4 bei verminderter Fucosylierung eine verstärkte ADCC-Aktivität aufweisen. Die CDC-Aktivität zeigte sich bei IgG1 und IgG3 unbeeinflusst von der verminderten Fucosylierung, wohingegen sie bei IgG2 und IgG4 nicht mehr messbar war.

*In-vivo*-Experimente konnten bereits die Wirksamkeit nicht fucosylierter IgGs auf die ADCC-Aktivität nachweisen. So führte beispielsweise nicht fucosyliertes Trastuzumab bei Brustkrebspatienten, die den Fc $\gamma$ RIIIa-Allotyp 158Val tragen im Vergleich zum Allotyp 158Phe, zu deutlich höherer ADCC-Aktivität [78]. Klinische Studien mit nicht fucosyliertem Rituximab, zur Behandlung des Non-Hodgkin-Lymphomes (NHL), zeigten ausschließlich bei homozygotem Allotyp 158Val eine gesteigerte ADCC-Aktivität [79]. Auch Lida et al. [75] konnte bei *in-vivo*-Experimenten zeigen, dass nicht fucosyliertes IgG trotz inhibierender Effekte durch Plasma-IgG auf den Fc $\gamma$ RIIIa und fucosyliertes IgG in Konkurrenz um das Antigen zu einer verbesserten ADCC-Aktivität führte.

#### 1.1.4 IgG-Halblebenszeit

Der hohe Anteil terminaler Gal oder GlcNAc bei der IgG-Glykosylierung spräche im Vergleich zu anderen Serumglykoproteinen für eine relativ kurze Halblebenszeit durch das Binden an den Galactose- bzw. Mannose-Rezeptor [37, 80]. Die relativ lange Halblebenszeit von 21 Tagen überrascht daher sehr. Anscheinend ist die im Inneren des IgG-Moleküls liegende N-Glykosylierung nicht frei zugänglich für *Clearance*-Rezeptoren wie den Asialoglykoproteinrezeptor. Israel et al. [81] konnte den potentiellen Degradationsschutzmechanismus in Form des FcRn aufzeigen. Proteolytischen Schutz verleiht nach Raju et al. [82] vor allem das terminale GlcNAc des IgGs.

Der Anteil terminalen GlcNAc in Serum-IgG unterscheidet sich geschlechtsspezifisch [83].

Yamada et al. [84] konnten zeigen, dass Männer im Vergleich zu Frauen bis zum 30. Lebensjahr deutlich höhere Anteile terminalen GlcNAc aufweisen. Zusätzlich ließ sich beim Mann eine Korrelation steigender Anteile terminalen GlcNAc mit dem Alter nachweisen. Steigende Anteile terminalen GlcNAc konnten auch bei chronischen Entzündungen wie Rheumatoider Arthritis, Tuberkulose und Morbus Crohn beobachtet werden [14, 85].

### 1.1.5 Strategien der Fucosereduktion

Zur Erzeugung nicht fucosylierter therapeutischer Antikörper mit gesteigerter ADCC-Effektorfunktion wurden bereits verschiedene Strategien entwickelt. Eine Strategie stellt die nachträgliche Fucosereduktion bei aufgereinigtem, rekombinanten IgG über Fucosidasen dar. Aufgrund sterischer Hinderung bei fehlender Denaturierung des IgGs ist ein effizienter Verdau jedoch nicht möglich [86]. Eine weitere Strategie stellt der *Knockout* oder die Expressionsreduktion mittels RNA-Interferenz von Core-Fucose relevanten Genen wie der  $\alpha$ 1-6-Fucosyltransferase (FUT8), der GDP-Mannose4-6-Dehydratase oder der GDP-Fucose-Transporter dar [87–89]. Die Überexpression der ( $\beta$ -1-4)-N-Acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III) führte zu verstärkt nicht fucosylierten Bisecting-Strukturen [73, 90]. Und auch die Induktion nicht fucosylierter mannosereicher Strukturen mittels des MannosidaseI-Inhibitors Kifunensin zeigte sich erfolgreich in der ADCC-Steigerung [74].

Für die Bereitstellung aktivierter GDP-Fucose stehen den meisten Bakterien und Säugetierzellen der Fucosesyntheseweg und der Fucoserecyclingweg zur Verfügung (Abb.1.8). Primär wird jedoch die Neusynthese durchgeführt. Hier wird aus dem Grundbaustein GDP-Mannose unter Verwendung zwei verschiedener Enzyme – der GDP-Man-4,6-Dehydratase und der GDP-keto-6-desoxymannose-3,5-Epimerase/4-Reduktase – aktivierte GDP-Fucose erzeugt. Nach dessen Transport in den Golgi-Apparat wird die Fucose von der FUT8 in die Core-Struktur komplexer N-Glykane eingebaut. Alternativ ist die Zelle in der Lage, Fucose aus dem extrazellulären Raum (Blut/Medium) über den Fucosetransporter aufzunehmen und in die zelleigene Glykosylierung zu integrieren [91]. In seltenen Fällen der *Leukocyte adhesion deficiency type II* (LADII), die sich durch eine gestörte Transporterfunktion der GDP-Fucose zum Golgi-Apparat auszeichnet, konnten Symptome wie Fieber und Entwicklungsstörungen durch die Einnahme von Fucose gelindert werden [92].



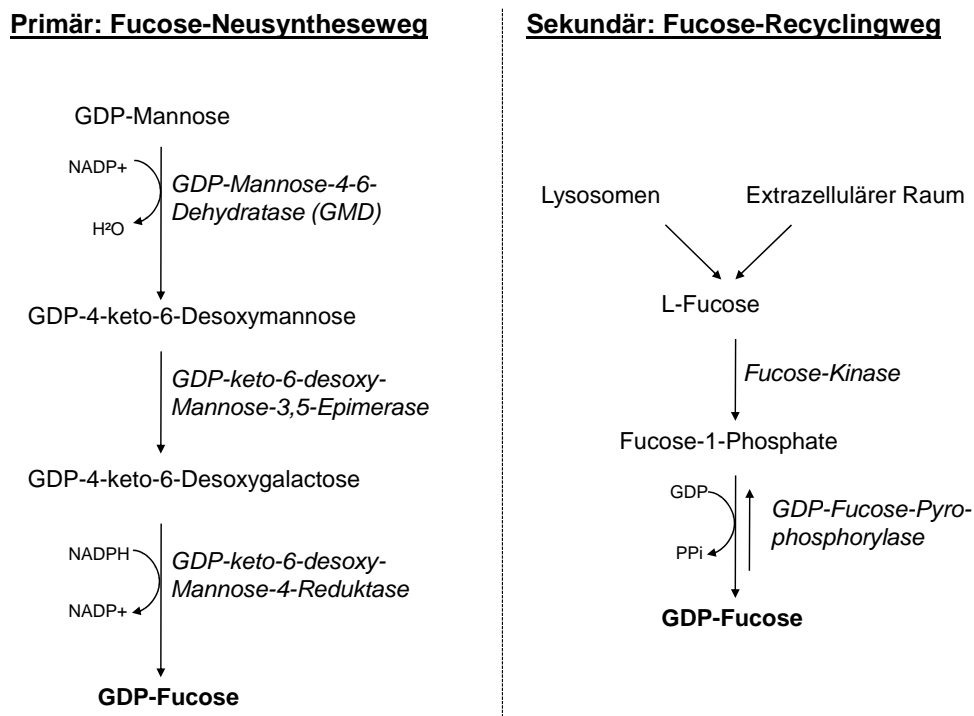


Abb. 1.8: Schematische Übersicht der Biosynthesewege der GDP-Fucose. [5].

## 1.2 Entenzelllinie

Die Entenzelllinie AGE1.CR wurde ausgehend von Retinazellen der Ente *Cairina moschata* über die stabile Expression adenoviraler E1-Gene des humanen Adenovirus Typ 5 immortalisiert [93]. Diese Zelllinie wurde von der ProBioGen AG als Alternative zu primären Hühnerembryofibroblasten (CEF) für die Produktion von Impfstämmen generiert, die auf Vogelzellen adaptiert worden sind. Eine derartige Adaption führt dazu, dass im menschlichen Impfling die Replikation des Impfstammes langsamer erfolgt und das Immunsystem Zeit gewinnt, eine adaptive Antwort zu generieren. Dieses Prinzip ist eine Form von Attenuierung (Abschwächung) und ermöglicht äußerst effiziente Lebendimpfstoffe. AGE1.CR.pIX ist eine zusätzlich modifizierte Form der AGE1.CR-Zelllinie. Sie trägt das pIX-Gen, was als Strukturprotein des humanen Adenovirus Typ 5 die Virusstabilität und Transkriptionsstärke der gebildeten Viren positiv beeinflussen soll [94]. So zeichnet sich die AGE1.CR.pIX-Zelllinie durch eine erhöhte Virusproduktivität für verschiedene Viren aus.

Über die aviäre Glykosylierung bekannt ist vor allem anhand veröffentlichter Daten zu re-

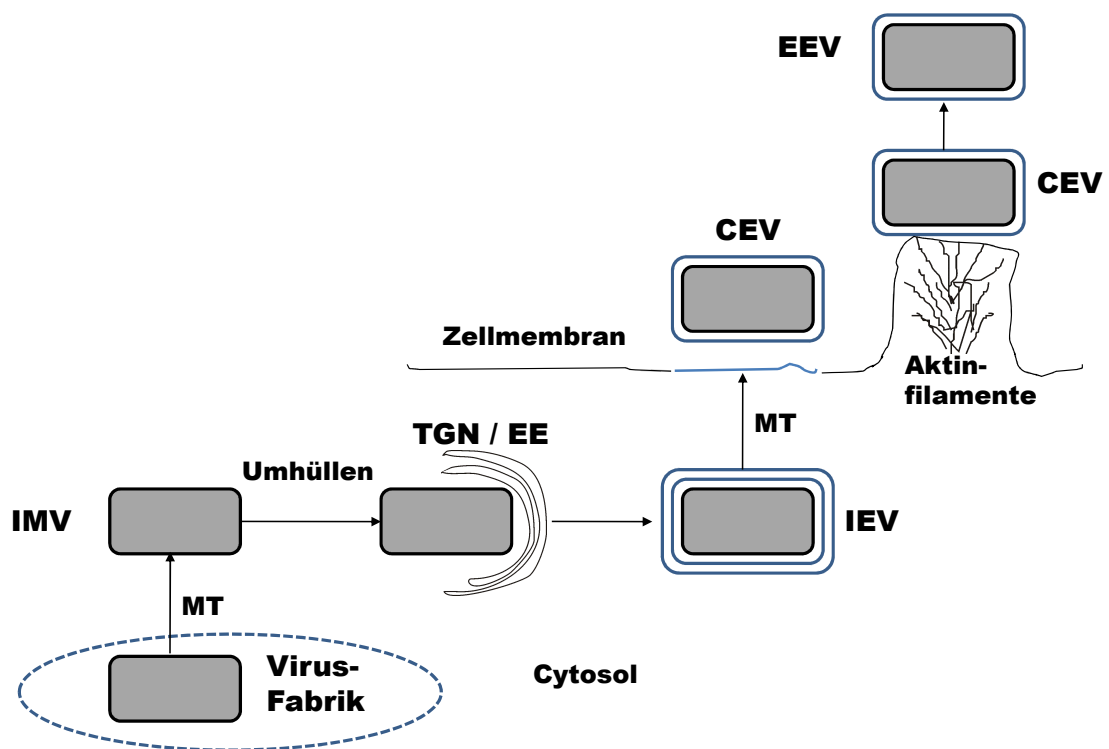
kombinanten humanem IgG aus Hühnerzellen, dass diese ausschließlich die humantypische Sialinsäure Neu5Ac ausbilden [49]. Zudem wurde eine geringe Fucosylierung für aviäre Zellen veröffentlicht, was den Einsatz zur Produktion von Tumor-Antikörpern nahelegt [49,95,96], da hier eine fehlende Core-Fucosylierung zu gesteigerter ADCC führen soll. Sollten sich die Glykosylierungseigenschaften in der hier zu untersuchenden Entenzelllinie bestätigen, wäre demnach eine Nutzung der AGE1.CR neben der Virusproduktion auch für die Produktion therapeutischer Glykoproteine möglich.

### 1.3 Modifizierter Vakzinia Virus Ankara

Der modifizierte Vakzinia Virus Ankara (MVA) stammt von dem Dermovakziniavirus *chorioallantois-vaccinia virus Ankara* (CVA) – einem Vertreter der Orthopoxviren – ab. Der CVA hat erfolgreich als Impfstoff zur weltweiten „Ausrottung“ der Pocken beigetragen, was offiziell am 8. Mai 1980 auf der 33. Versammlung der Weltgesundheitsorganisation verkündet wurde [97]. Zur Reduktion der Impfrisiken durch Nebenwirkungen wurde eine Abschwächung (Attenuierung) des CVA-Virus in über 500 Passagen auf Hühnerembryofibroblasten (CEF) durchgeführt [98–101]. Der hierbei auftretende Verlust von  $\sim 15\%$  des viralen Genoms führte zur Deletion bestimmter Faktoren. Dadurch ist der Replikationszyklus nur noch in bestimmten Zellen vollständig. In den meisten Säugetierzellen, darunter auch menschliche, ist MVA jedoch nicht fähig sich vollständig zu replizieren [102, 103]. Die Immunogenität des MVA im menschlichen Organismus zeigt sich durch den Verlust genetischer Information nicht beeinträchtigt, sondern sogar verstärkt [102, 104], was auf fehlende Immunmodulatoren zurückzuführen ist. Dem attenuierten MVA fehlen gleich mehrere Immunsuppressoren, wie der lösliche Rezeptor für Interferon- $\gamma$ ,  $-\alpha$  and  $-\beta$ , Tumornekrosefaktoren und CC Chemokine [102]. Diese Immunmodulatoren nutzt der wildtypische Pockenvirus, um die Immunantwort des Wirts zu unterlaufen.

Ein Beispiel für die Anwendung von MVA zur Generierung von Tumorstoffen ist TroVax. Dabei handelt es sich um einen rekombinanten MVA-Vektor, der das für verschiedene Adenokarzinome charakteristische Zelloberflächenantigen 5T4 trägt und wird bereits in klinischen Studien am Patienten getestet [105]. In Mäusen konnte bereits eine effiziente Induktion der Immunantwort gegen rekombinante Antigene mit MVA als Vektor gezeigt werden [106].

MVA und andere Vertreter der Vakzinia-Viren sind mit  $\sim 190$  kb doppelsträngiger DNA und einem Durchmesser von 200-400 nm sehr große Viren mit komplexer cytosolischer Replikation. Der Vakzinia-Virus hat ein breites Wirtsspektrum und gelangt über verschiedene Wege, vorwiegend über Endocytose und Fusion, in die Wirtszelle [107–110]. Hierbei ist die Nutzung der verschiedenen Zelleintrittswege Wirts-, Virusstamm- und Reifegrad-abhängig [107, 111]. In der MVA-Replikation entstehen zwei verschiedene infektiöse Virusformen: der intrazelluläre reife Virus (*Intracellular Mature Virus*, IMV) und der extrazelluläre umhüllte Virus (*Extracellular Enveloped Virus*, EEV), die sich in der Anzahl ihrer Membranen und den darin enthaltenen Glykoproteinen unterscheiden. Eine Übersicht der für diese Arbeit relevanten Aspekte der MVA-Reifung ist in Abb.1.9, geändert nach Smith et al. [112], dargestellt.



**Abb. 1.9:** Übersicht zur MVA-Reifung mit seinen unterschiedlichen Membranen und Orten, geändert nach Smith et al. [112]. Intrazellulärer reifer Virus (*intracellular mature virus*, IMV); Virus-Fabriken im Cytosol der Wirtszelle; Mikrotubuli (MT); Mikrotubuli Zentrum (MTOC); Trans-Golgi-Netzwerk (TGN); Frühe Endosomen (EE); intrazellulär umhüllter Virus (*Intracellular Enveloped Virus*, IEV); zellassoziiertes umhülltes Virus (*Cellular Associated Enveloped Virus*, CEV), extrazellulärer umhüllter Virus (*Extracellular Enveloped Virus*, EEV)

Nachdem freier Virus erfolgreich an der Wirtszelloberfläche angedockt und in die Zelle eingedrungen ist, werden frühe mRNAs repliziert und induzieren die virale DNA-Replikation nahe des ER. Es bilden sich schließlich Virusreplikationskomplexe aus, welche von Membranen des rauhen ER umhüllt sind [113]. In diesen sogenannten „Virusfabriken“ sammeln sich große Mengen viraler DNA und Strukturproteine bei gleichzeitigem Ausschluß von Wirtszellproteinen in dem Bereich [114]. Zusätzlich enthalten sie Mitochondria und Filamente des Zytoskelets, welche für den Virusaufbau benötigt werden. Bei fortschreitender Virusreplikation ändert sich die Zusammensetzung der Virusfabriken, so kommen Vimentinfilamente hinzu [115]. Nach der Zusammensetzung der Virus-DNA und -proteine zu unreifen Viruspartikeln, den IVs (*Immature Viruses*), entwickeln sich diese weiter zum nun infektiösen IMV-Partikel, welcher über Mikrotubuli (MT) zum Mikrotubuli Zentrum (MTOC) transportiert wird und somit die Virusfabrik verläßt. Der IMV wird nun in zwei zusätzliche Membranen des Trans-Golgi-Netzwerks (TGN) [114] oder Früher Endosomen (EE) [116] gehüllt und das intrazelluläre umhüllte Virus (*Intracellular Enveloped Virus*, IEV) entsteht. Dieses gelangt schließlich über MT an die Zelloberfläche, wo es über Exocytose unter Verlust der äußeren Membran die intakte Wirtszelle verläßt. Der zellassoziierte umhüllte Virus (*Cellular Associated Enveloped Virus*, CEV) ist zunächst über lange Aktinfilamente an der Zelloberfläche verankert und ist in der Lage benachbarte Zellen zu infizieren. Weiter entfernte Zellen werden von dem EEV, nach Abspaltung des CEV von der Zellmembran, infiziert [112].

Bei der Frage nach der Anzahl der Membranen von IMV-Partikeln stehen sich Ergebnisse einer einzigen Membran [117, 118] denen von zwei Membranen gegenüber [115, 119–121]. Bisher wurde in der Literatur lediglich ein Glykoprotein von  $\sim 40$  kDa beschrieben, welches vermutlich tetraantennäre Strukturen besitzt [122]. IMV-Partikel akkumulieren während der Virusreplikation im Cytosol und treten in der Regel erst bei der Zellyse nach außen, um andere Zellen zu infizieren. Zuvor können aber auch geringere Mengen infektiöser EEV die infizierte Zelle verlassen. EEV-Partikel sind durch ihre zusätzlichen Membranen im Vergleich zu IMV anscheinend besser getarnt und schalten bei der Zellinfektion keine Signalkaskaden an, was beispielsweise bei einer Infektion mit IMV der Fall ist [107]. Die Membran der EEV enthält acht Proteine, davon sieben Glykoproteine [123]. Bei MVA-Immunisierungen von Mäusen von Baur et al. [106] konnten hauptsächlich Antikörper gegen die Virenproteine B5R, A56 und A33R nachgewiesen werden, welche anscheinend die Hauptproteine der EEV-

Oberfläche darstellen.

Damit die Zielzelle mit EEV infiziert werden kann, müssen sich diese zuvor an die Zelloberfläche anheften. Wie Influenzaviren besitzt MVA ein Hämagglutinin (HA). Da jedoch nur zwei Drittel der umhüllten Viren (IEV/CEV/EEV) das HA-Membranprotein (A56) tragen [124], sind Sialinsäuren anscheinend nicht das alleinige Oberflächenantigen, welches von MVA erkannt wird.

## 1.4 Zielsetzung

In der vorliegenden Dissertationsarbeit sollten die N-Glykosylierungseigenschaften der neuen Designerzelllinie AGE1.CR aus der Ente *Cairina moschata* charakterisiert werden. Die Zelllinie stammt aus Retinazellen und wurde über die heterologe Expression der adenoviralen Proteine E1A und E1B von Jordan et al [93] immortalisiert. Eine zweite Zelllinie wurde durch die zusätzliche heterologe Expression des adenoviralen Strukturproteins pIX in der AGE1.CR generiert. Aufgrund von Unterschieden in dem Wachstumsverhalten und der Virusproduktivität sollten die N-Glykosylierungseigenschaften der AGE1.CR- sowie der AGE1.CR.pIX-Zelllinie untersucht und verglichen werden.

Mit besonderer Fokussierung auf Sialylierung und Fucosylierung – aufgrund der funktionellen Relevanz – sollten Zellmembranglykoproteine sowie rekombinante Proteine mittels Lektinfärbung, Chromatographie und Massenspektrometrie untersucht werden. Dass die humantypische N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) nicht nur in Säugetierzellen vorkommt, zeigte bereits Raju et al [49] anhand von Antikörpern des Typs IgG aus Hühnerzellen. Für die Entenzelllinie wurde nun ebenfalls Neu5Ac statt der N-Glykolyneuraminsäure (Neu5Gc) erwartet, was zu prüfen war.

Für Vogelzellen wurde zudem eine geringe Fucosylierung vermutet [95,96], was für die Entenzelllinie im Zusammenhang mit rekombinantem humanem IgG (rek.hIgG) untersucht werden sollte, da sich die Fucosylierung erheblich auf dessen Fc-Effektorfunktion auswirkt. Anhand des rek.IgGs sollte die N-Glykosylierung der Entenzelllinie mit der anderer Spezies verglichen werden [48, 49]. Mittels einer neuen Strategie zur vollständigen Fucosereduktion sollte die Fc-Effektorfunktion des rek.IgGs gesteigert werden, was es in Funktionsstudien zu prüfen galt.

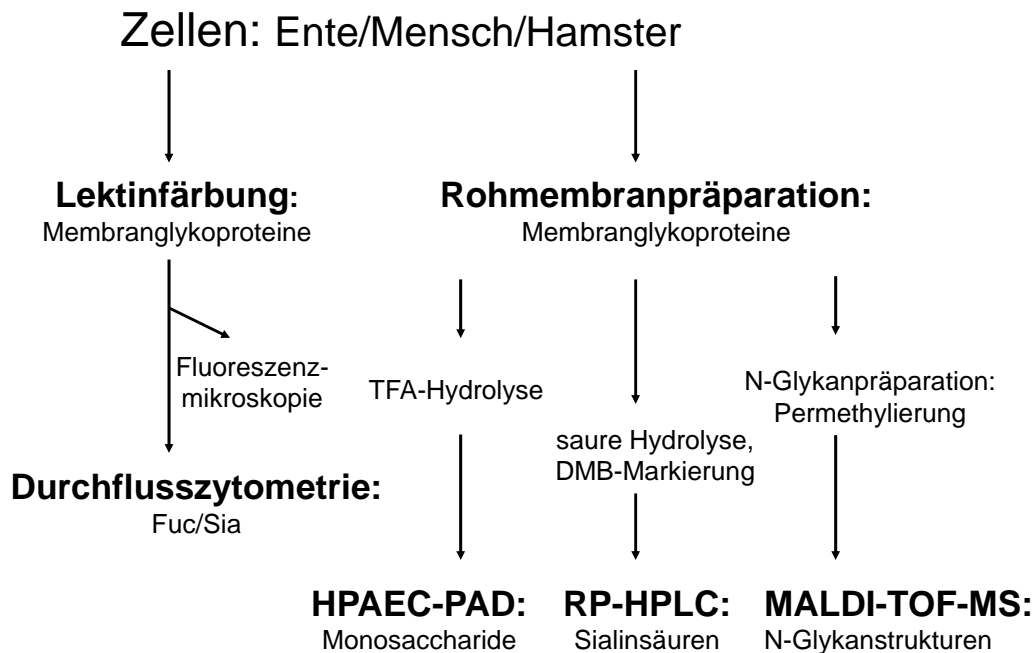
Da die Entenzelllinie eigens für die Produktion von an Vogelzellen adaptierten Viren generiert wurde, sollte zusätzlich der modifizierte Vakzinia Virus Ankara (MVA) darin produziert und dessen N-Glykosylierung untersucht werden. Interessant war neben der zu erwartenden Wirt-ähnlichen N-Glykosylierung der MVA-Partikel [125, 126] vor allem die Untersuchung potentieller infektionsbedingter Änderungen der Zellmembranglykosylierung.

## 2 Ergebnisse

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in Hinblick auf den potentiellen Einsatz der Entenzelllinien – AGE1.CR und AGE1.CR.pIX – zur Produktion therapeutischer Proteine und Impfstoffe für den Menschen auf dem Vergleich der N-Glykosylierung mit der von humanen Zellen. Die Entenzelllinien stammen von ProBioGen und wurden über eine heterologe stabile Expression adenoviraler E1A- und E1B-Gene immortalisiert. Der Zellursprung liegt in Retinazellen der Ente *Cairina moschata* [93]. Exemplarisch für eine humane N-Glykosylierung wurde die AGE1.HN-Zelllinie, aus humanen neuronalen Zellen stammend (ProBioGen), verwendet. Zusätzlich wurde die *Chinese Hamster Ovary* Zelllinie DG44 (CHO), die die verbreitetste Produktionszelllinie für therapeutische Antikörper darstellt, zum Vergleich der N-Glykosylierung herangezogen, da auch die Produktion rekombinanter Antikörper eine potentielle Anwendung der Entenzelllinien darstellt. Es sollte demnach getestet werden, inwieweit sich die N-Glykosylierung von Enten- zu der von Human- und Hamster-Zelllinien unterscheidet.

### 2.1 Zellspezifische N-Glykosylierung

Eine erste Übersicht zur N-Glykosylierung der Entenzelllinien sollte durch die Charakterisierung von zelleigenen Glykoproteinen erhalten werden. Zum einen sollten Membranglykoproteine der Zelloberflächen über Lektine verschiedener Spezifität angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert werden und zum anderen sollten Zellmembranproteine über eine Rohmembranpräparation (RMP) isoliert und deren N-Glykosylierung chromatographisch sowie massenspektrometrisch im Vergleich zu der einer Human- und Hamster-Zelllinie untersucht werden. Eine Übersicht der hierzu angewendeten Analysemethoden zeigt Abb.2.1.



**Abb. 2.1:** Übersicht angewandter Methoden zur Charakterisierung der zellspezifischen N-Glykosylierung von Enten- im Vergleich zu Hamster- und humanen Zelllinien.

## 2.1.1 Lektinfärbung von Zelloberflächen

Die Fucosen und Sialinsäuren haben als terminale Bausteine von N-Glykanstrukturen vielseitige Funktionen. So lässt sich in vielen Tumorzellen häufig eine erhöhte Fucosylierung nachweisen [40–42] und bei Tumor-spezifischen Antikörpern korreliert nachweislich dessen Defucosylierung mit gesteigerter Aktivität in Form der Antikörper-abhängigen Zellzytotoxizität (ADCC) [28–30]. Nachfolgend wurden daher Fucose- und Sialinsäure-spezifische Lektine zur Anfärbung von Membranglykoproteinen eingesetzt und durchflusszytometrisch analysiert.

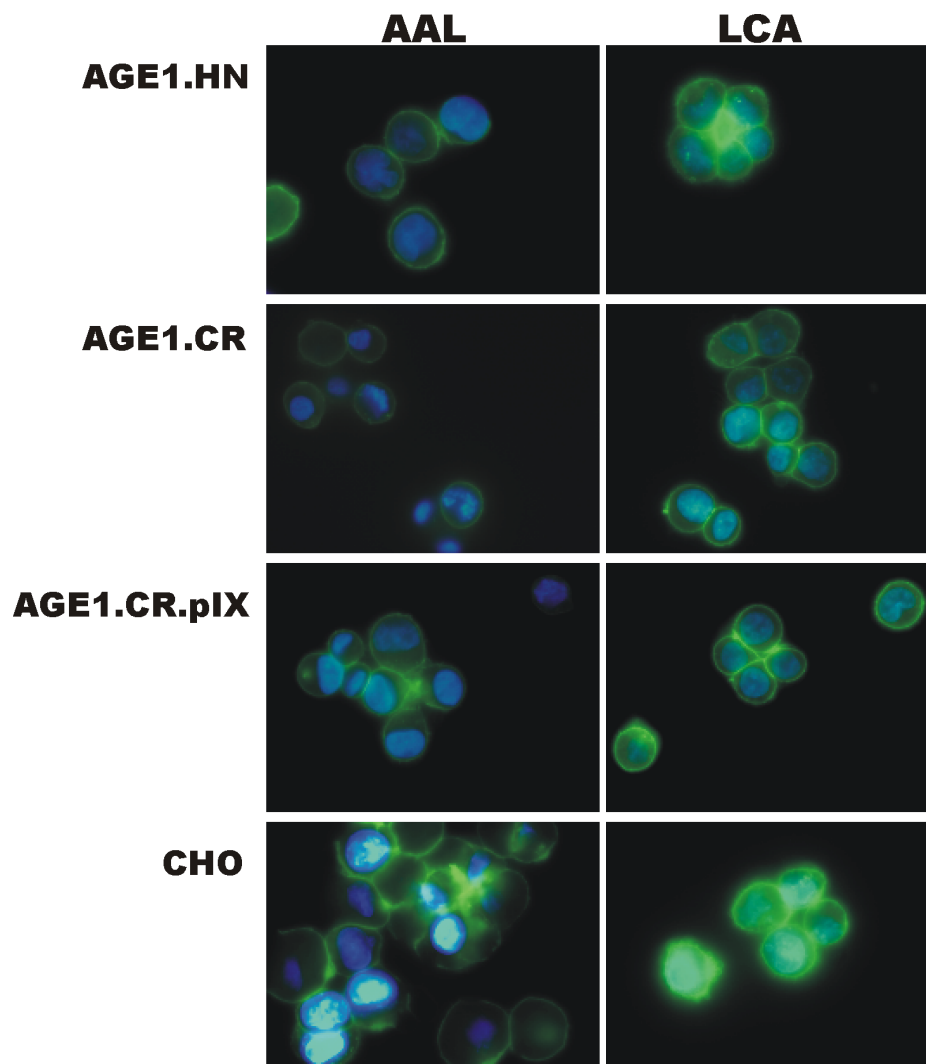
### 2.1.1.1 Fucose-spezifische Lektinfärbung

Neben der Frage nach dem Anteil fucosylierter N-Glykane ist für die Funktion vor allem dessen Verknüpfungsart entscheidend. Hier ist allgemein zwischen der  $\alpha$ 1-6-glykosidisch gebundenen Core-Fucose am reduzierenden Ende und der  $\alpha$ 1-3/4-glykosidisch gebundenen antenären Fucose zu unterscheiden. In diesem Versuch wurden die Zelloberflächen der AGE1.HN- und CHO-Zelllinie im Vergleich zu denen der Entenzelllinien mit Core-Fucose-spezifischen



Lektinen *Aleuria Aurantia Lectin* (AAL) und *Lens Culinaris Agglutinin* (LCA) angefärbt (5.4.6.3) und durchflusszytometrisch analysiert (5.4.6.4). Nach Tateno et al [127] ist das LCA im Vergleich zu AAL spezifischer für Core-Fucose. AAL bindet primär an Core-Fucose, erkennt sekundär mit einem bestimmten Anteil auch antennäre Fucose.

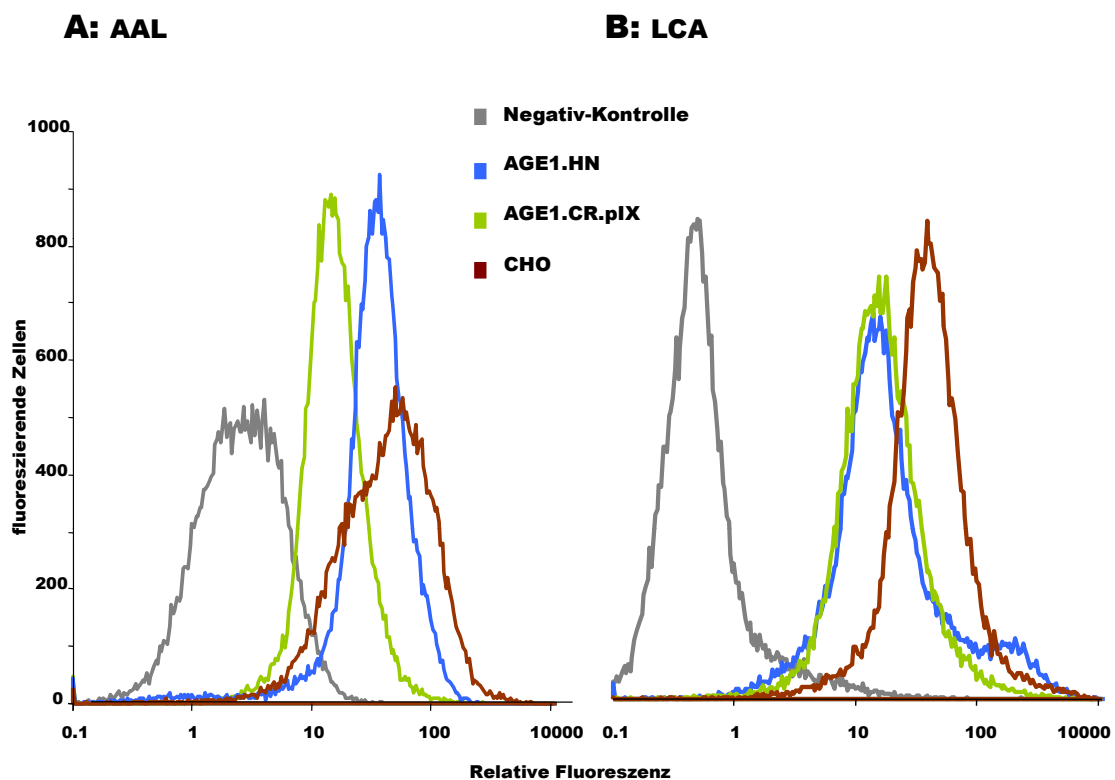
Der Erfolg der jeweiligen Lektinfärbung von Zelloberflächen wurde über Fluoreszenzmikroskopie kontrolliert. In Abb.2.2 sind Fluoreszenzaufnahmen AAL- und LCA-markierter Zelloberflächen gegenübergestellt.



**Abb. 2.2:** Fluoreszenzmikroskopie zur Kontrolle der Lektinfärbung von Zelloberflächen der AGE1.HN-, AGE1.CR-, AGE1.CR.pIX und der CHO-Zelllinie mit Core-Fucose spezifischen Lektinen AAL und LCA. Zusätzlich wurde die DNA mittels DAPI angefärbt, um auch nicht lektin gefärbte Zellen erkennen zu können.

Um auch nichtmarkierte Zellen zu erkennen, wurde die Zellkern-DNA mittels DAPI-Farbstoff blau angefärbt. Die Fluoreszenzaufnahmen zeigen, dass alle über DAPI-gefärbten Zellen auch

eine – wenngleich zum Teil nur schwache – Grünfärbung der Zellmembran aufweisen. Es konnte demnach nicht nur überprüft werden, dass sich die Zelloberflächen positiv für die AAL- und LCA-Färbung zeigten, sondern gleichfalls, dass die Zellmembranen noch sichtlich intakt waren, was für die nachfolgende durchflusszytometrische Analyse relevant war. Zum quantitativen Vergleich von Fluoreszenzintensitäten wurde die durchflusszytometrische Analyse der lektinfärbten Zellen angewendet (Abb.2.3).

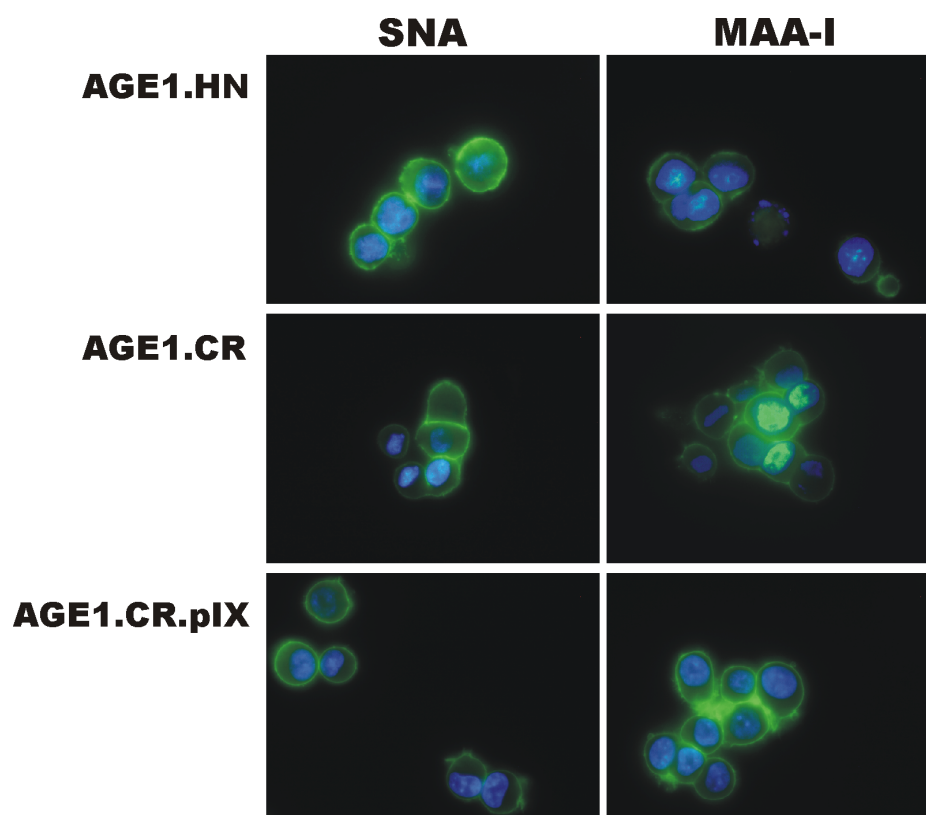


**Abb. 2.3:** Durchflusszytometrische-Analyse lektinmarkierter Zelloberflächen der AGE1.HN-, AGE1.CR.pIX und der CHO-Zelllinie mit den Core-Fucose spezifischen Lektinen AAL (A) und LCA (B).

Da sich in den fucosespezifischen Lektinfärbungen der Zelloberflächen keine Fluoreszenzunterschiede zwischen den Entenzelllinien detektieren ließen, sind in Abb.2.3 exemplarisch nur die Daten der AGE1.CR.pIX-Zelllinie dargestellt. Die lektinmarkierten Zelloberflächen der Entenzelllinien AGE1.CR und AGE1.CR.pIX zeigen sich mit beiden Lektinen ähnlich stark fluoreszierend und dies deutlich geringer im Vergleich zur CHO-Zelllinie, was darauf hindeutet, dass die CHO-Zelllinie deutlich stärker Core-fucosyliert ist. Die lektinmarkierten

Zelloberflächen der humanen Zelllinie (Abb.2.3 A und B) zeigen sich nach Färbung mit AAL (Abb.2.3 A) im Vergleich zu denen der Entenzelllinien stärker fluoreszierend. In der Lektinfärbung mit LCA (Abb.2.3 B) wiesen die Zelloberflächen der humanen Zelllinie und der Entenzelllinien eine ähnlich starke Fluoreszenz auf. Da nach Tateno et al. [127] das LCA im Vergleich zu AAL spezifischer für Core-Fucose ist, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Entenzelllinien ausschließlich Core-fucosyliert sind und die humane Zelllinie zusätzlich antennäre Fucose besitzt.

### 2.1.1.2 Sialinsäure-spezifische Lektinfärbung

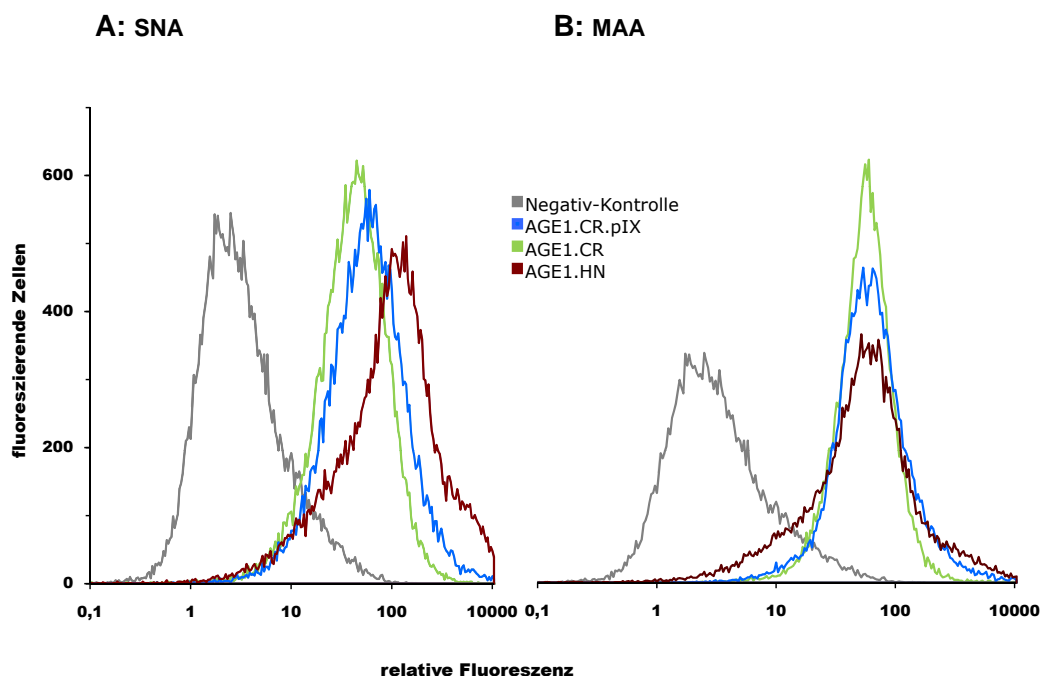


**Abb. 2.4:** Fluoreszenzmikroskopie zur Kontrolle der Lektinfärbung von Zelloberflächen der AGE1.HN-, AGE1.CR-, AGE1.CR.pIX-Zelllinie mit Sialinsäure spezifischen Lektinen SNA und MAA-I. Zusätzlich wurde die DNA mittels DAPI angefärbt, um auch nicht lektinfärbte Zellen erkennen zu können.

Neben dem Sialyierungsgrad wird vor allem zwischen der humantypischen N-Acetyl-Neuraminsäure (Neu5Ac) und der human immunogenen N-Glykolyneuraminsäure (Neu5Gc) unterschieden. Es stellt sich demnach die Frage, ob bei den Entenzelllinien Neu5Gc oder die humantypische Neu5Ac nachgewiesen werden kann. Bei detektierter Neu5Ac gilt es zusätzlich den Verknüpfungstyp zu bestimmen. Herkömmlich wird hier zwischen der  $\alpha$ 2-3,  $\alpha$ 2-6

und  $\alpha$ 2-8 glykosidisch verknüpften Neu5Ac unterschieden, was Zell- und Gewebe-spezifisch variieren kann. Dazu wurden Zelloberflächen von Enten- und CHO-Zelllinien im Vergleich zu denen der humanen Zelllinie über die Lektine *Sambucus Nigra Agglutinin* (SNA; Neu5Ac  $\alpha$ 2-3) und *Maackia Amurensis Agglutinin* (MAA-I; Neu5Ac  $\alpha$ 2-6) markiert (5.4.6.3) und dessen Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch analysiert (5.4.6.4). Die fluoreszenzmikroskopische Prüfung der SNA- und MAA-gefärbten Zelloberflächen zeigte für alle mit DAPI-gefärbten Zellen eine positive Grünfärbung der Zelloberfläche (Abb.2.4).

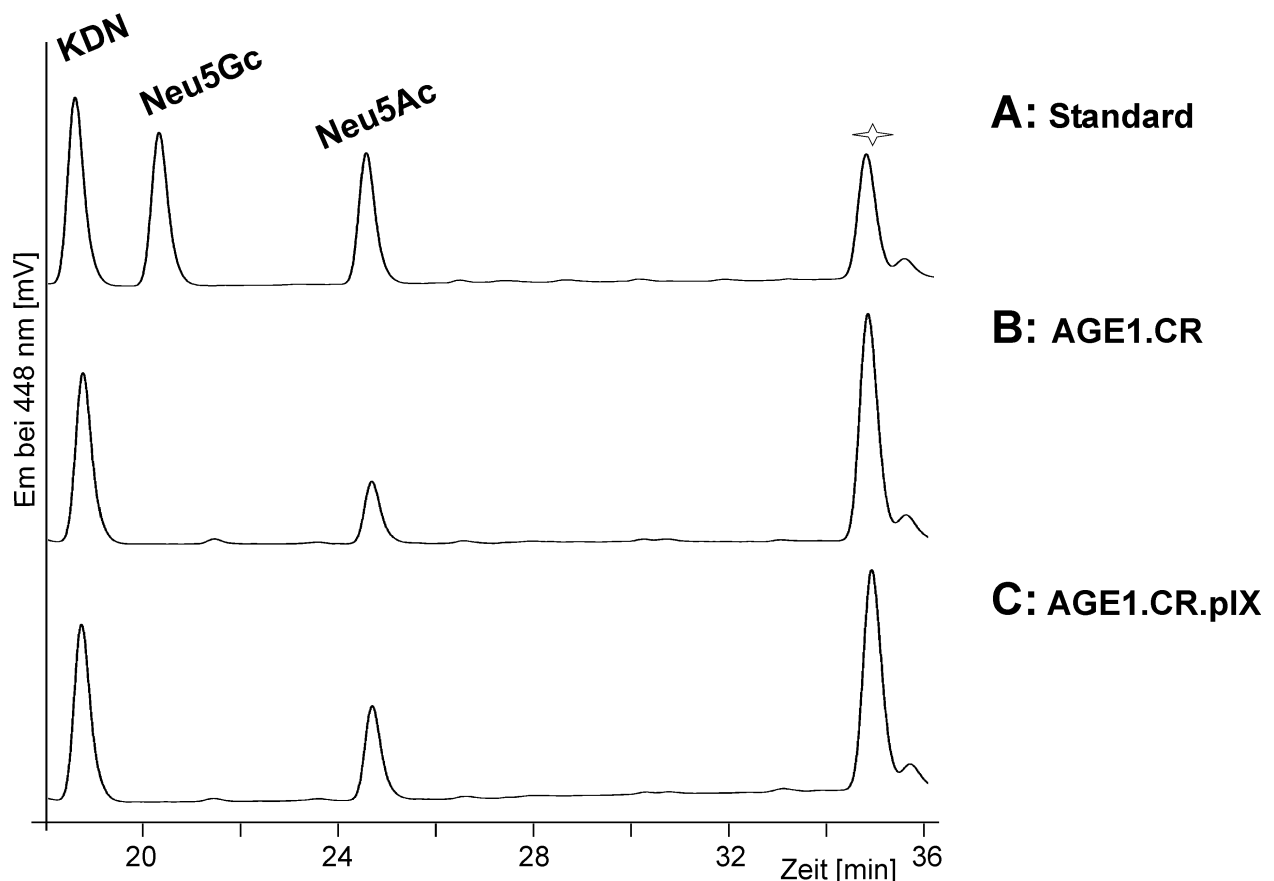
Der quantitative Vergleich der Fluoreszenzintensitäten nach SNA- und MAA-Färbung erfolgt in Abb.2.5 mittels durchflusszytometrischer Analyse. In Sialinsäure-spezifischen Lektinfärbungen zeigten sich die Oberflächen beider Entenzelllinien positiv für  $\alpha$ 2-3- und  $\alpha$ 2-6-verknüpfte Neu5Ac (Abb.2.5 A und B). Im Vergleich zur humanen Zelllinie wiesen die Entenzelllinien eine geringere  $\alpha$ 2-6-verknüpfte Neu5Ac auf (SNA-Färbung s. Abb.2.5 A), die AGE1.CR.pIX- im Vergleich zur AGE1.CR-Zelllinie zeigte sich geringfügig stärker  $\alpha$ 2-6 sialyliert. Nach MAA-I-Färbung (Abb.2.4 B) stellten sich die Zelloberflächen der Entenzelllinien in gleichem Ausmaß  $\alpha$ 2-3 sialyliert dar, wie die der humanen Zelllinie.



**Abb. 2.5:** Durchflusszytometrische-Analyse lektinmarkierter Zelloberflächen der AGE1.HN-, AGE1.CR-, AGE1.CR.pIX-Zelllinie mit den Sialinsäure-spezifischen Lektinen SNA (A) und MAA-I (B).

## 2.1.2 Sialinsäuretyp von Membranglykoproteinen

Nachdem über Lektinfärbungen Neu5Ac in Entenzelllinien nachgewiesen werden konnte (2.1.1), sollte nachfolgend chromatographisch das potentielle Vorhandensein von Neu5Gc untersucht werden. Dafür wurden Membranglykoproteine über Rohmembranpräparation isoliert (5.3.5.2), mittels Trypsin verdaut (5.5.1.1), die N-Glykane über PNGase F freigesetzt (5.5.1.2) und über C18- (5.5.2.1) und Carbographsäulen (5.5.2.2) von Salzen und Proteinen getrennt. Die Sialinsäuren, ausgehend von aufgereinigten N-Glykanen (jeweils 50  $\mu\text{g}$  Protein), wurden schließlich über saure Hydrolyse mit Essigsäure abgespalten (5.5.7.1) und im Anschluss DMB-markiert (5.5.7.2). Die Fluoreszenz markierte Probe wurde dann über RP-HPLC nach 5.5.7.3 analysiert. Zum qualitativen Vergleich sind in Abb.2.6 exemplarisch Chromatogramme der Sialinsäurebestimmung von Membranglykoproteinen der AGE1.CR- (B) und AGE1.CR.pIX-Zelllinie (C) gegenübergestellt.



**Abb. 2.6:** RP-HPLC: Sialinsäurebestimmung der über Rohmembranpräparation isolierten Membranglykoproteine der AGE1.CR- (B) und AGE1.CR.pIX-Zelllinien (C). Der Vergleichsstandard (A) beinhaltet KDN, Neu5Gc und Neu5Ac. Die Sialinsäuren wurden mittels Essigsäurehydrolyse freigesetzt und anschließend DMB-markiert. Der mit Stern markierte Peak ist Label spezifisch.

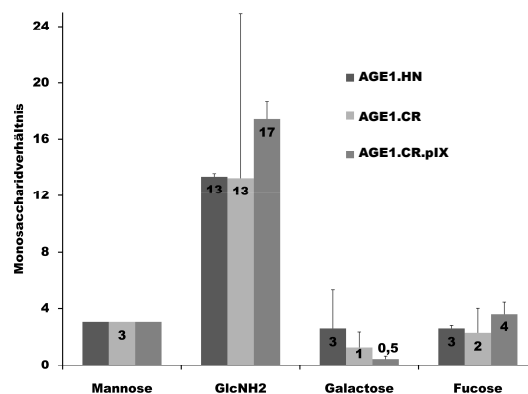
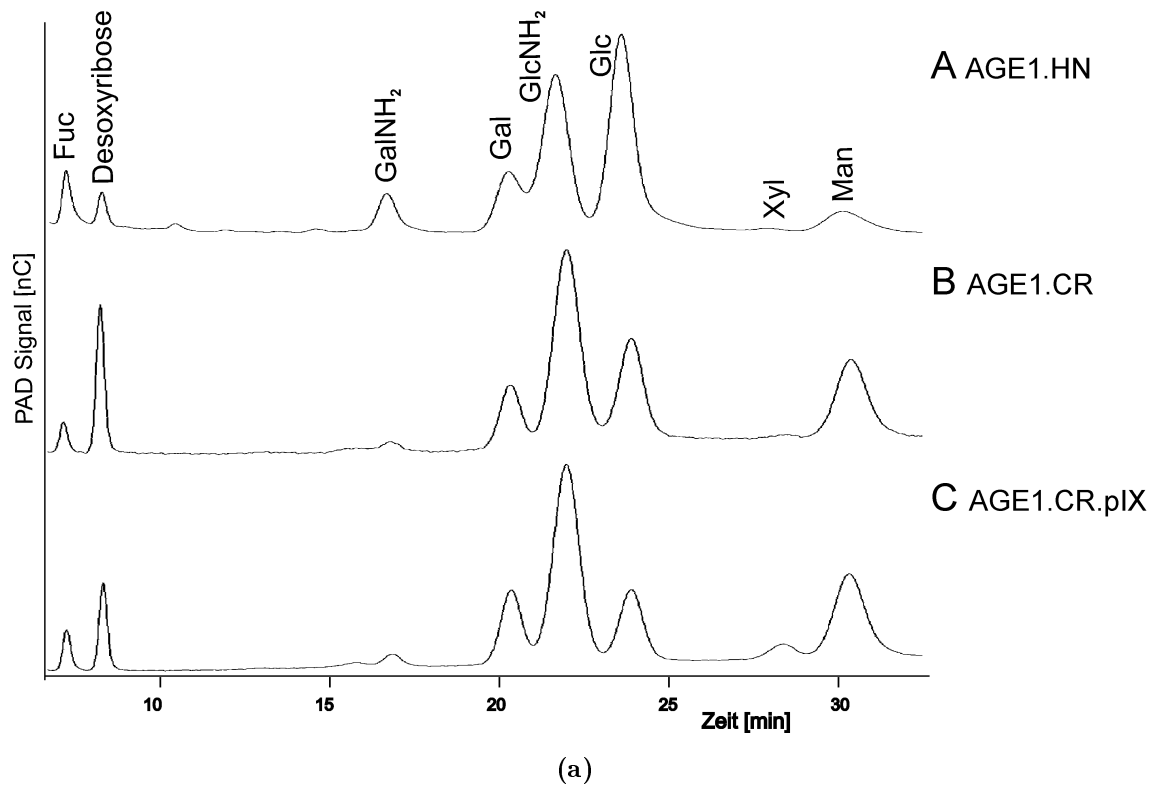
Für die Entenzelllinien konnte lediglich Neu5Ac mit einem Peak bei  $\sim 25$  min, aber keine Neu5Gc bei  $\sim 20$  min (Abb.2.6 A) detektiert werden. Nach der Literatur tragen die meisten Säugetiere Neu5Gc, der Mensch aber trägt aufgrund einer Mutation vorwiegend Neu5Ac und auch Vögel tragen überwiegend Neu5Ac [50, 53, 128].

### 2.1.3 Monosaccharide von Zellmembranproteinen

Nachdem bereits einzelne Saccharide wie Fucose und Sialinsäuren untersucht wurden (2.1.1), stellte sich die Frage nach der weiteren Zusammensetzung der N-Glykanstrukturen mit Blick auf den vorherrschenden N-Glykantyp sowie den Grad der Antennarität und Galactosylierung komplexer N-Glykane. Erste Antworten auf diese Fragen sollte die Monosaccharidanalyse mittels HPAEC-PAD geben. In der Strukturanalyse über MALDI-TOF-MS (2.1.4) sind diese dann zu vertiefen. Für die Untersuchung wurden Membranglykoproteine über Rohmembranpräparation der AGE1.CR-, AGE1.CR.pIX- und AGE1.HN-Zelllinien nach 5.3.5.2 isoliert.

Die in allen Chromatogrammen der Membranglykoproteine (Abb.2.7a) detektierten Monosaccharide Xylose (Xyl) und Glucose (Glc) sind vermutlich auf Verunreinigungen durch das Medium bzw. auf einzelne Schritte der N-Glykanpräparation zurückzuführen, da die detektierten Mengen stark variierten. Durch die saure Hydrolyse werden GalNAc und GlcNAc zu ihren entsprechenden Aminen GalNH<sub>2</sub> und GlcHN<sub>2</sub> hydrolysiert. Sialinsäuren werden unter diesen Bedingungen zerstört und müssen durch mildere Säuren gesondert isoliert werden (2.1.2). Das ebenfalls in allen Proben detektierte GalNH<sub>2</sub> deutet auf das Vorhandensein von O-Glykosylierungen in Membranglykoproteinen der humanen- und den Entenzelllinien, was jedoch in diesem Zusammenhang nicht näher untersucht wurde. Der Grad der Fucosylierung in Membranglykoproteinen der Entenzelllinien (Abb.2.7a B und C) liegt deutlich unterhalb dem der humanen Zelllinie (Abb.2.7a A), was bereits in Fucose-spezifischen Lektinfärbungen (Abschnitt 2.1.1.1) gezeigt wurde.

Die zusammengefassten Daten der Monosaccharidbestimmungen in Abb.2.7b konkretisieren die Unterschiede der exemplarischen Chromatogramme aus Abb.2.7a. Die detektierten Mengen an Mannose (Man) wurden, entsprechend der Kernstruktur von N-Glykanen (drei Man, zwei GlcNAc), auf drei und die übrigen Monosaccharide dazu in Beziehung gesetzt.



**Abb. 2.7:** a) HPAEC-PAD: Monosaccharidbestimmung von über Rohmembranpräparation isolierten Membranglykoproteinen der AGE1.HN- (A), AGE1.CR- (B) und AGE1.CR.pIX-Zelllinie (C). Es wurden jeweils  $50\ \mu\text{g}$  Protein für die TFA-Hydrolyse eingesetzt und mittels  $2,25\ \text{mM}$  KOH-Gradienten analysiert. b) Zusammengefasste HPAEC-PAD-Daten zu Monosacchariden der AGE1.HN-, AGE1.CR- und AGE1.CR.pIX-Zelllinien. Die Daten basieren auf  $n$  Messungen ( $n = 3$  AGE1.HN-,  $n = 6$  Enten-Zelllinien). Die Monosaccharide wurden in Beziehung zu  $\text{Man} = 3$  gesetzt, ausgehend von drei Man der Kernstruktur von N-Glykanen. Die Daten wurden im Student-t-Test (zweiseitig, verschiedene Varianzen) auf Signifikanz hin untersucht. Bei  $p > 0,05$  unterscheiden sich die Daten nicht signifikant und wurden nicht extra markiert.

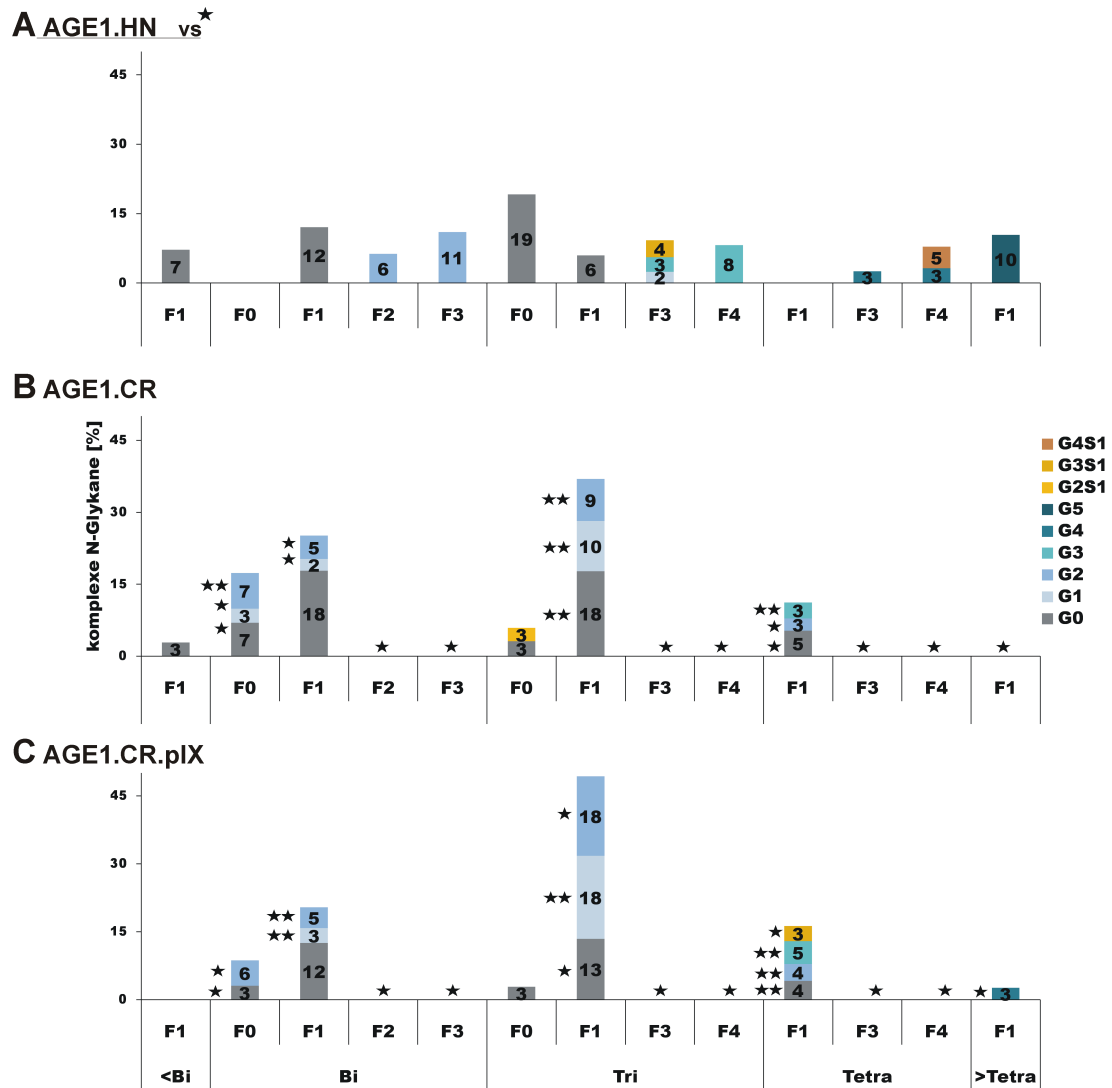
Signifikante Unterschiede anhand der Monosaccharide ließen sich für Zellmembranproteine der Entenzelllinien gegenüber denen der humanen Zelllinie in ihrer deutlich geringeren Menge

an Fucose feststellen, bei GlcNAc und Galactose sieht es tendenziell ähnlich aus. Aufgrund relativ hoher Varianzen war die Signifikanzfeststellung mittels Student-t-Test nicht möglich. Genauere Informationen zur N-Glykosylierung werden in der nachfolgenden massenspektrometrischen Analyse erwartet 2.1.4.

### 2.1.4 N-Glykanstrukturen von Membranglykoproteinen

Zur Bestätigung bisher erlangter Daten zur N-Glykosylierung von Membranglykoproteinen der Entenzelllinien im Vergleich zur humanen Zelllinie wurden nachfolgend die N-Glykane der mittels Rohmembranpräparation isolierten Membranglykoproteine enzymatisch freigesetzt. Nach Trypsin-Verdau der Proteine (5.5.1.1) erfolgte die Freisetzung der N-Glykane mittels PNGase F-Verdau (5.5.1.2), anschließend wurden Verunreinigungen in Form von Salzen und Peptiden über C18- (5.5.2.1) und Carbographsäulen (5.5.2.2) entfernt. Nach Permethylierung der N-Glykane (5.5.3.2) wurden diese massenspektrometrisch analysiert (5.5.3.3). Neben dem Vergleich von Membranglykoproteinen der Entenzelllinien mit denen der humanen Zelllinie wurde auch die CHO-Zelllinie zur Rohmembranpräparation eingesetzt. Exemplarische Spektren sind im Anhang Abb.6.1-6.3 einzusehen. In Abb.2.8 sind die zusammengefassten MALDI-TOF-MS-Daten permethylierter N-Glykane der Membranglykoproteine von Entenzelllinien im Vergleich zu denen der humanen Zelllinie dargestellt. Die N-Glykosylierung der humanen Zelllinie zeigt sich in Bezug auf dessen Fucosylierung besonders heterogen (Abb.2.8 A), vorwiegend tri- ( $\sim 40\%$  bezogen auf komplexe N-Glykane), bi- ( $\sim 30\%$ ) und tetraantennäre ( $\sim 10\%$ ) Strukturen variieren zwischen null und vier Fucosen, über 50% der komplexen N-Glykanstrukturen sind null bis einfach fucosyliert. Der mit 80% relativ hohe Grad der Fucosylierung der AGE1.HN-Zelllinie korreliert mit dem neuronalen Zellursprung [44]. Die triantennären Strukturen zeigen mit  $\sim 60\%$  eine relativ hohe unvollständige Galactosylierung (G0-G2), im Vergleich zu bi- ( $\sim 30\%$ ) und tetraantennären (0%) Strukturen. Die Sialylierung der AGE1.HN ist mit  $\sim 10\%$  relativ gering und beschränkt sich trotz Antennarität bis in den Hexabereich auf einfach sialylierte Strukturen (S1).

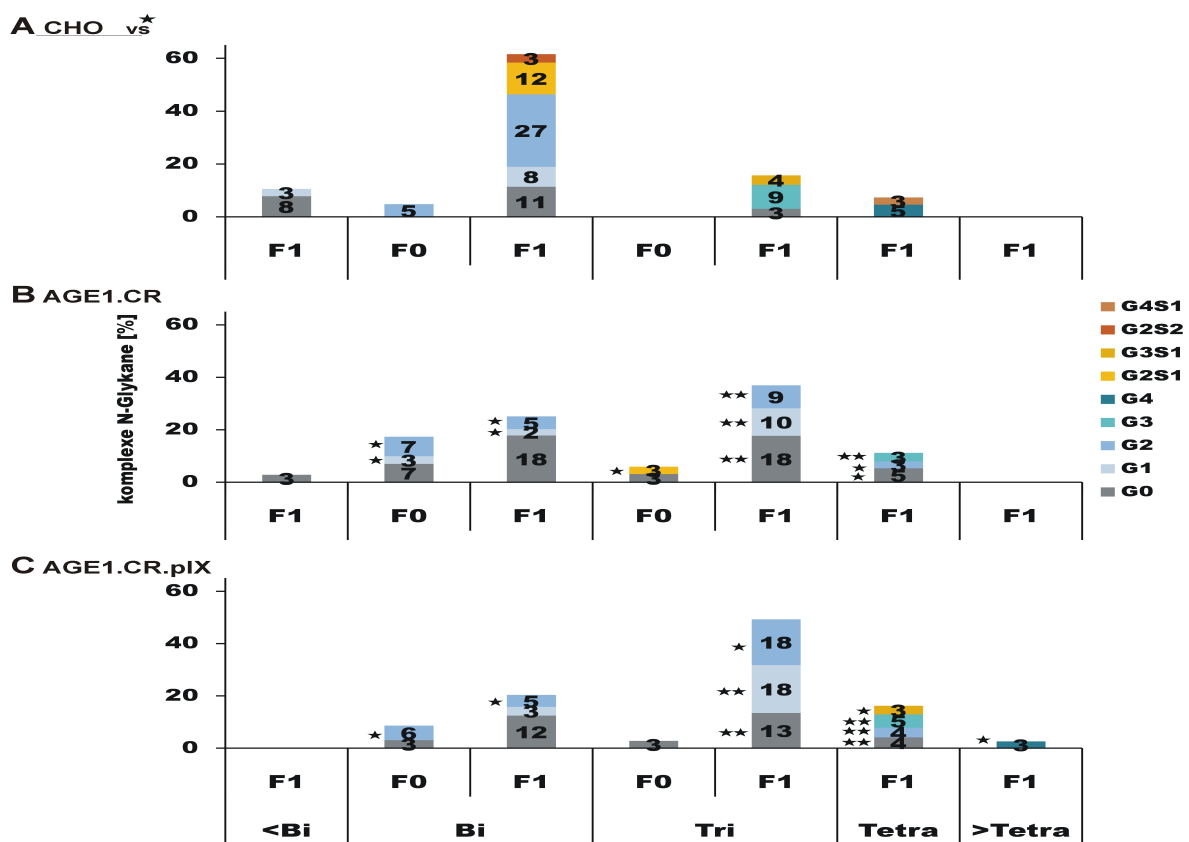




**Abb. 2.8:** Zusammengefasste MALDI-TOF-MS-Daten der komplexen N-Glykane der mittels Rohmembranpräparation isolierten Membranglykoproteine der AGE1.HN- (A), AGE1.CR- (B) und AGE1.CR.pIX-Zelllinie (C). Die Daten beruhen auf permethylierten N-Glykanen mit je n Wiederholungen (n=8 AGE1.HN-, n=9 AGE1.CR-, n=12 AGE1.CR.pIX-Zelllinie). Zur besseren Vergleichbarkeit der hohen Anzahl detektierter N-Glykanstrukturen wurden hier ausschließlich Strukturen mit einem relativen Anteil von  $\geq 2\%$  einbezogen. Diese wurden anhand ihrer relativen Intensitäten bezogen auf die Menge komplexer N-Glykane dargestellt. Die Strukturen sind gemäß ihrer Antennarität (Bi, Tri, etc), Fucosylierung (F), Galactosylierung (G) und Sialylierung (S) aufgetragen. Sialylierte Strukturen sind in Gelbtönen gehalten, um sich stärker abzuheben. Die Daten wurden mittels Student-t Test (zweiseitig, verschiedene Varianzen) auf signifikante Unterschiede hin untersucht. Bei einem Signifikanzniveau  $p < 0,05$  wurden die Daten mit einem Stern markiert, bei  $p < 0,001$  wurden die Daten mit zwei Sternen markiert, bei  $p > 0,05$  unterscheiden sich die Daten nicht signifikant und wurden nicht extra markiert.

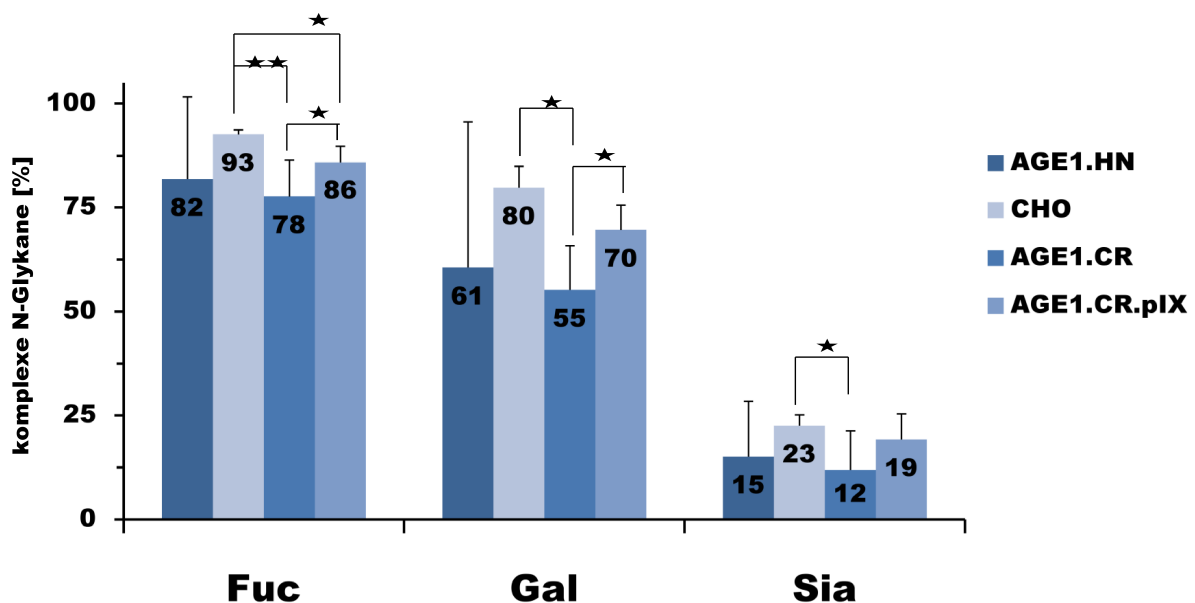
Die AGE1.CR- (Abb.2.8 B) und AGE1.CR.pIX-Zelllinie (Abb.2.8 C) unterscheiden sich nur in wenigen komplexen N-Glykanstrukturen signifikant voneinander (BiG0F1, TetraG3S1F1, PentaG4F1) und zeigen ein sehr ähnliches Spektrum an Strukturen. Im Vergleich zu der AGE1.HN-Zelllinie zeigen sich die N-Glykane der Entenzelllinien überwiegend einfach fuco-

syliert und variieren stärker in ihrer Galactosylierung. Bei Entenzelllinien dominieren mit 40-50 % triantennäre, einfach fucosylierte N-Glykane mit null bis zwei Galactosen. Mit 30-40 % folgt die biantennäre, einfach fucosylierte Struktur mit null bis zwei Galactosen und mit 10-15 % die tetraantennäre, einfach fucosylierte Struktur mit null bis drei Galactosen. Die Sialylierung ist bei Glykanen der Entenzelllinien mit 3 % in noch geringerem Maße vertreten, als dies bereits bei der humanen Zelllinie beobachtet werden konnte. Das nach RP-HPLC (2.1.2) gewonnene Ergebnisse einer potentiell erhöhten Sialylierung der AGE1.CR-Zelllinie, konnte in der massenspektrometrischen Analyse, wie auch schon in Lektinfärbungen (2.1.1.2), nicht bestätigt werden.



**Abb. 2.9:** Zusammengefasste MALDI-TOF-MS-Daten der komplexen N-Glykane der mittels Rohmembranpräparation isolierten Membranglykoproteine der CHO- (A), AGE1.CR- (B) und AGE1.CR.pIX-Zelllinie (C). Die Daten beruhen auf permethylierten N-Glykanen mit je n Wiederholungen (n=8 AGE1.HN-, n=9 AGE1.CR-, n=12 AGE1.CR.pIX-Zelllinie). Zur besseren Vergleichbarkeit der hohen Anzahl detektierter N-Glykanstrukturen wurden hier ausschließlich Strukturen mit einem relativen Anteil von  $\geq 2\%$  einbezogen. Diese wurden anhand ihrer relativen Intensitäten bezogen auf die Menge komplexer N-Glykane dargestellt. Die Strukturen sind gemäß ihrer Antennarität (Bi, Tri, etc), Fucosylierung (F), Galactosylierung (G) und Sialylierung (S) aufgetragen. Sialylierte Strukturen sind in Gelbtönen gehalten, um sie stärker abzuheben. Die Daten wurden mittels Student-t Test (zweiseitig, verschiedene Varianzen) auf signifikante Unterschiede hin untersucht. Bei einem Signifikanzniveau  $p < 0,05$  wurden die Daten mit einem Stern markiert, bei  $p < 0,001$  wurden die Daten mit zwei Sternen markiert, bei  $p > 0,05$  unterscheiden sich die Daten nicht signifikant und wurden nicht extra markiert.

In Abb.2.9 sind die zusammengefassten MALDI-TOF-MS-Daten permethylierter N-Glykane der Membranglykoproteine von Entenzelllinien (B, C) im Vergleich zu denen der CHO-Zelllinie (A) dargestellt. Die komplexen N-Glykane der CHO-Zelllinie zeigen sich mit  $\sim 65\%$  überwiegend biantennär, zu  $\sim 15\%$  tri- und zu  $\sim 10\%$  monoantennär. Die Strukturen sind überwiegend einfach fucosyliert und mit 70-90 % überwiegend vollständig galactosyliert, was die CHO-Zelllinie im Vergleich zur humanen und vor allem zu den Entenzelllinien auszeichnet. Zudem konnte bei N-Glykanen der CHO-Zelllinie mit 20 % der höchste Anteil sialylierter Strukturen detektiert werden. Sie sind überwiegend einfach und maximal zweifach sialyliert. Deutlich signifikante Unterschiede der N-Glykane der Entenzelllinien im Vergleich zur CHO-Zelllinie konnten vor allem für tri- und tetraantennäre Strukturen nachgewiesen werden (\*\*). Die Glykane der Entenzelllinien zeigen sich zwar in geringem Maße vollständig galactosyliert, aber mit einem höheren Anteil hoch antennärer Strukturen.



**Abb. 2.10:** Zusammengefasste MALDI-TOF-MS-Daten der komplexen N-Glykane der Membranglykoproteine der CHO, AGE1.HN-, AGE1.CR- und AGE1.CR.pIX-Zelllinie nach ausgewählten Struktureigenschaften. Die Daten basieren auf permethylierten N-Glykanen von mindestens zwei Messungen ( $n = 8$  AGE1.HN-,  $n = 2$  CHO-,  $n = 9$  AGE1.CR-,  $n = 12$  AGE1.CR.pIX-Zelllinie). Es wurden die prozentualen Anteile fucosylierter (Fuc), galactosylierter (Gal) und sialylierter komplexer N-Glykanstrukturen (Sia) dargestellt. Im Student-t Test (zweiseitig, verschiedene Varianzen) wurden alle Zelllinie auf signifikante Unterschiede hin untersucht. Bei einem Signifikanzniveau  $p < 0,05$  wurden die Daten mit einem Stern markiert, bei  $p < 0,001$  wurden die Daten mit zwei Sternen markiert, bei  $p > 0,05$  unterscheiden sich die Daten nicht signifikant und wurden nicht extra markiert.

Anhand der exemplarischen Spektren in Abb.6.1-6.4 zeigen die Membranpräparationen aller

untersuchten Zelllinien hohe Anteile mannosereicher Strukturen (60-70 %). Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass bei der Rohmembranpräparation neben der Plasmamembran zusätzlich Membranen des endoplasmatischen Retikulums (ER) und des Golgi Apparates isoliert wurden. Im tatsächlichen Fall großer Mengen mannosereicher Strukturen an Zelloberflächen, sollten auch sezernierte Proteine in Abschnitt 2.2 erhöhte Anteile dieser Strukturen tragen.

Die humane AGE1.HN-Zelllinie zeigt sich in Abb.2.10 in ihrer detektierten Menge fucosylierter, galactosylierter und sialylierter komplexer N-Glykanstrukturen ähnlicher zu denen der Entenzelllinien als zur CHO-Zelllinie. Aufgrund hoher Varianzen ließ sich dies trotz acht Wiederholungen nicht signifikant bestätigen. Signifikante Unterschiede zeigten sich hingegen für alle aufgetragenen Eigenschaften zwischen der CHO- und der AGE1.CR-Zelllinie (\*/\*\*). In allen getesteten Zelllinien sind die komplexen N-Glykane der Membranglykoproteine zu hohem Anteil mit ~80 % fucosyliert. Der Anteil der galactosylierter Strukturen liegt mit 55-80 % deutlich niedriger (Abb.2.10; Gal). CHO- im Vergleich zu den Entenzelllinien zeigen mit 80 % den höchsten Anteil galactosylierter Strukturen, was sich auch in der Höhe sialylierter Strukturen widerspiegelt (Sia). Im Vergleich der Entenzelllinien weist die AGE1.CR.pIX-Zelllinie signifikant höhere Anteile fucosylierter und galactosylierter Strukturen auf und auch sialylierte Strukturen zeigen sich deutlich erhöht im Vergleich zur AGE1.CR-Zelllinie.

Nachdem erfolgreich die zellspezifische N-Glykosylierung membranständiger Glykoproteine untersucht wurde, stellte sich die Frage, wie sich die N-Glykosylierung sezernierter Proteine darstellen würde. Zum Vergleich zellspezifischer N-Glykosylierung sezernierter rekombinant hergestellter Glykoproteine zu membranständigen Glykoproteinen wurde nachfolgend ein tumorspezifischer rekombinanter humaner Antikörper vom Typ IgG1 (rek.hIgG) und der *Modified Vaccinia Virus Ankara* (MVA) untersucht.

## 2.2 N-Glykosylierung rekombinanter Antikörper

Da sich die N-Glykosylierung nicht nur zell-, sondern auch proteinspezifisch unterscheiden kann, soll nachfolgend die N-Glykosylierung anhand konkreter Glykoproteine verglichen werden. Zunächst wurden rekombinante Tumor-spezifische Antikörper aus Enten- und CHO-Zelllinien untersucht. Hierbei handelt es sich um Antikörper vom Typ IgG1 (rek.IgG).

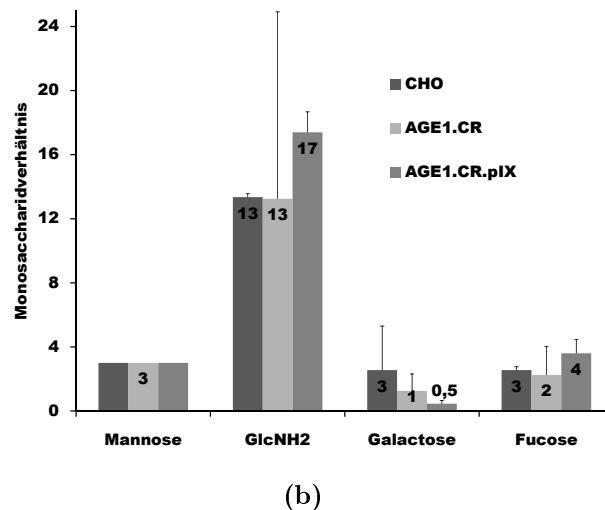
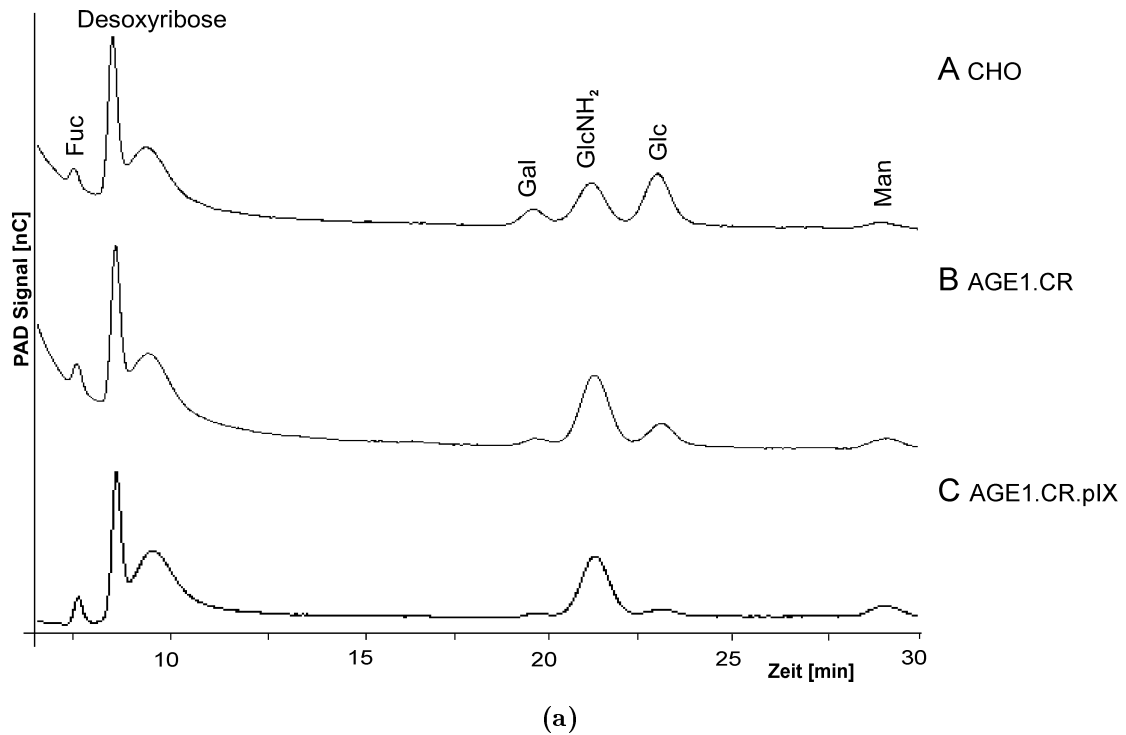
Wobei das rek.IgG in Entenzelllinien ein humaner Antikörper und das in CHO-Zelllinien ein humanisierter Antikörper, Trastuzumab, ist. Humanes IgG (hIgG) besitzt je eine N-Glykosylierungsstelle am Asn 297 im Fc-Teil der schweren Kette, woran zwei N-Glykane pro Antikörper-Molekül miteinander interagieren. Die Fc-Teil-gebundenen N-Glykane sind überwiegend vom komplexen biantennären Typ, Core-fucosyliert und in geringerem Maße ein- bis zweifach galactosyliert und sialyliert [59, 70, 129].

Die Entenzelllinien AGE1.CR und AGE1.CR.pIX wurden liposomal mit dem Konstrukt eines Tumor-spezifischen hIgGs nach 5.4.2 transfiziert, wobei das Konstrukt von der Firma ProBioGen bereit gestellt wurde. Nach einer Einzelzellklonierung transfizierter Zellen nach 5.4.3.2 wurde das rek.IgG in einem serumfreien, chemisch definierten Medium (AEM) im Fed-Batch-Verfahren (5.4.4) produziert. Die Konzentration des rek.IgG wurde während der Expression mit dem Gyrolab-System (5.3.4.2), die Zellzahl und -vitalität mittels Vi-Cell (5.4.1.1) überwacht. Nach 7-10 Tagen wurde das rek.IgG geerntet (5.4.4.4) und über Protein-A-Sepharose (5.3.5.1) mittels pH-Shift aus dem Kulturüberstand isoliert. CHO, als Standardproduktionszelle für rek.IgG, lag bereits mit dem hier betrachteten Tumor-IgG transfiziert und einzelzellkloniert vor. Die Expression des rek.IgG fand unter gleichen Bedingungen in einem ebenfalls serumfreien, chemisch definierten Medium (C8862) statt, die Antikörper wurden unter gleichen Bedingungen aufgereingt und für die N-Glyknanalyse präpariert.

### 2.2.1 Monosaccharide rekombinanter Antikörper

Um eine Übersicht der Zusammensetzung der N-Glykosylierung rek.IgGs zu erhalten, wurden 50  $\mu$ g Protein aus zwei verschiedenen Expressionen TFA-hydrolysiert (5.5.4.1) und die resultierenden Monosaccharide über HPAEC-PAD analysiert. In Abb.2.11a sind exemplarisch die Chromatogramme der Monosaccharide rek.IgGs exprimiert in der CHO- (A), AGE1.CR- (B) und AGE1.CR.pIX-Zelllinie (C) dargestellt. Monosaccharide des rek.IgG aus Enten- und CHO-Zelllinien zeigen eine ähnliche Zusammensetzung, so teilen alle drei Chromatogramme auch die gleiche Verunreinigung an Glucose, welche bereits in den Monosaccharidbestimmungen membranständiger Glykoproteine auftrat (Abschnitt 2.1.3, Abb.2.7a). Zudem ist in allen rek.IgG ein weiterer Peak bei einer Retentionszeit von  $\sim$ 9 min detektiert worden,

der nicht identifiziert werden konnte. Im Gegensatz zu Monosacchariden aviärer und humaner membranständiger Glykoproteine (Abb.2.7a) konnte hier kein GalNAc detektiert werden, was der typischen humanen Ig-Glykosylierung entspricht, welche von IgA ausgenommen [130] keine O-Glykosylierung besitzen.



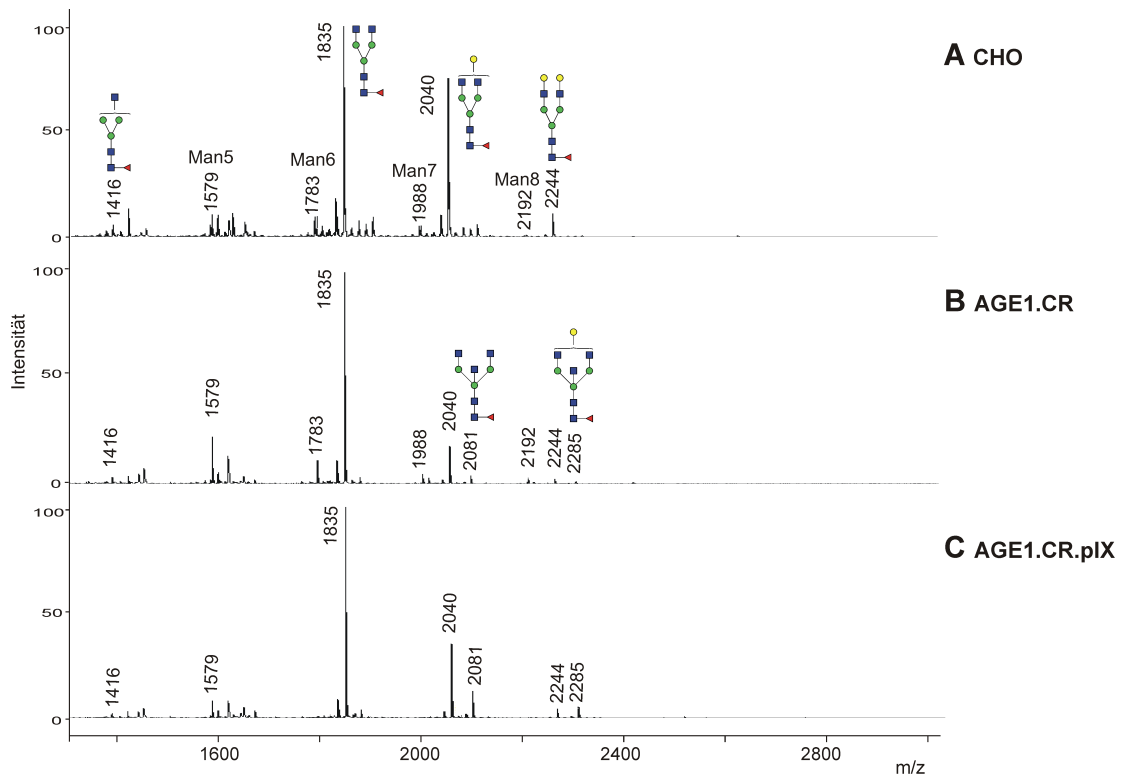
**Abb. 2.11:** HPAEC-PAD: a) Exemplarische Chromatogramme der Monosaccharide rek.IgGs exprimiert in der CHO- (A), AGE1.CR- (B) und AGE1.CR.pIX-Zelllinie (C). 50  $\mu$ g Protein wurde zur TFA-Hydrolyse eingesetzt und mittels 2,25 mM KOH-Gradienten in der HPAEC-PAD analysiert. b) Zum quantitativen Vergleich wurden die detektierten Mengen an Mannose –entsprechend der Core-Struktur von N-Glykanen –auf drei und die restlichen Monosaccharide dazu in Beziehung gesetzt. Im Student-t Test ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Das rek.IgG, exprimiert in Entenzelllinien (Abb.2.11a B, C), weist im Vergleich zu dem der CHO-Zelllinie (Abb.2.11a A) eine deutlich geringere Galactosylierung bei ähnlich hoher Fucosylierung auf. In dem quantitativen Vergleich der Monosacchariddaten (Abb.2.11b), ausgehend von den Peakflächen der einzelnen Monosaccharide von je zwei Messungen, werden die Unterschiede konkreter. Die jeweilig detektierte Menge an Mannose wurde – gemäß der Core-Struktur für N-Glykane – auf drei und alle übrigen Monosaccharide dazu in Beziehung gesetzt.

Da bei rek.IgG aus allen drei Expressionszelllinien die detektierte Menge an GlcNAc mit 13-17/3 Man deutlich höher liegt als dies bei membranständigen Glykoproteinen mit 3,5-5 GlcNAc/3 Man (Abb.2.7b) der Fall war, werden hier weniger mannosereiche Strukturen erwartet. Trotz tendenzieller Unterschiede konnte für die Monosaccharide der rek.IgG aus CHO im Vergleich zu dem aus aviären Zellen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, vermutlich aufgrund zu hoher Varianzen. Ein eindeutiger Unterschied des rek.IgGs im Vergleich zu membranständigen Glykoproteinen stellt die geringe Menge detektierter Galactose zu GlcNAc (GlcNH<sub>2</sub>) dar, was darauf hinweist, dass überwiegend galactosefreie oder unvollständig galactosylierte N-Glykanstrukturen vorherrschen. Auf signifikante Unterschiede hin im Bereich der Galactosylierung, Fucosylierung und der Antennarität soll in nachfolgender Analyse der N-Glykanstrukturen mittels MALDI-TOF-MS untersucht werden.

### **2.2.2 N-Glykanstrukturen rekombinanter Antikörper**

Zur massenspektrometrischen Analyse von N-Glykanen der verschiedenen rek.IgGs wurden diese zuerst mit Trypsin verdaut. Die N-Glykane wurden anschließend mittels PNGase F (5.5.1) freigesetzt und über C18- (5.5.2.1), gefolgt von Carbographsäulen (5.5.2.2), von Salzen und Proteinresten getrennt. Die N-Glykane wurden nun mittels Sialidase (5.5.1.3) desialyliert oder mit MeI permethyliert (5.5.3.2) und nachfolgend im positiven Modus (PM) des MALDI-TOF-MS analysiert (5.5.3.3).



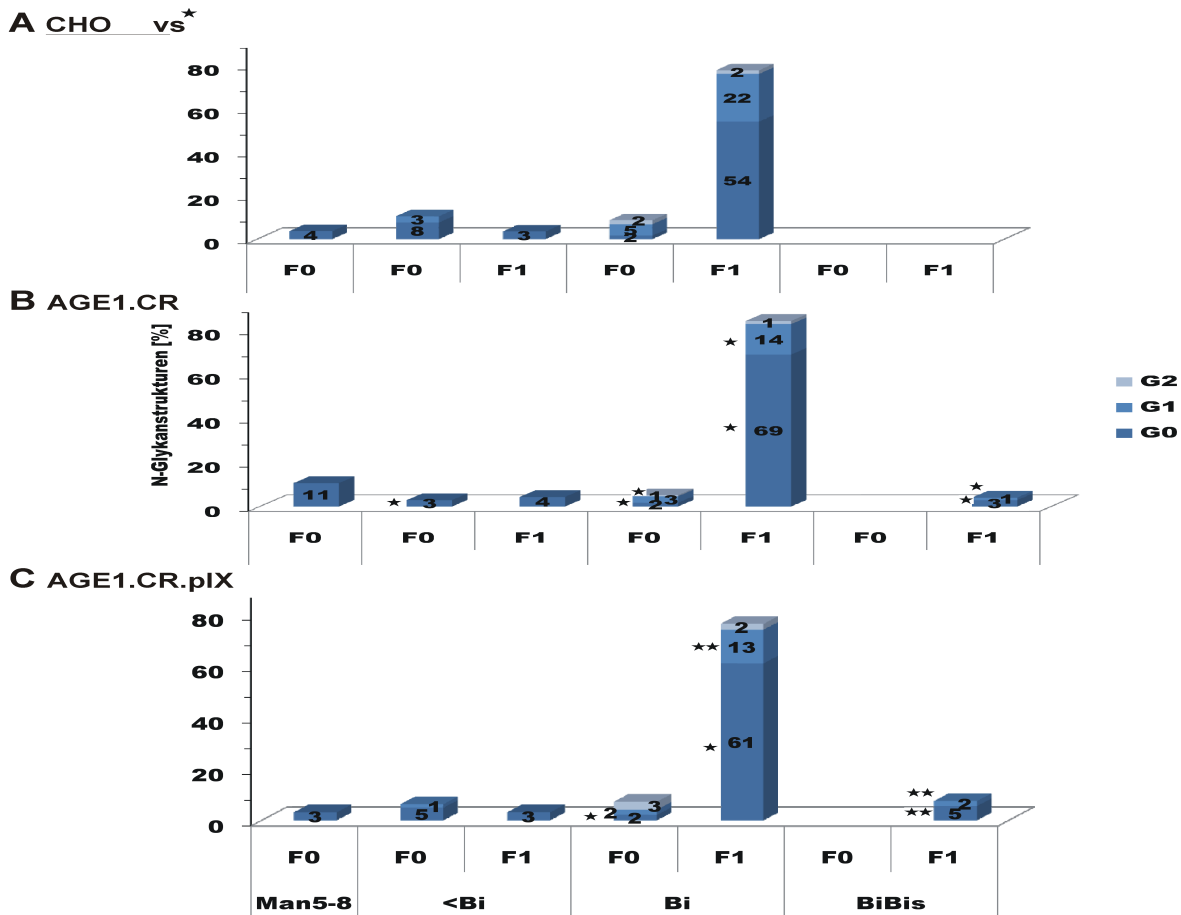
**Abb. 2.12:** Exemplarische MALDI-TOF-MS-Spektren permethylierter N-Glykane des rek.IgG exprimiert in der CHO-Zelllinie (A), AGE1.CR-Zelllinie (B) und der AGE1.CR.pIX-Zelllinie (C). Ausgehend von 50  $\mu\text{g}$  rek.IgG wurden permethylierte N-Glykane mit Arabinosazon als Matrix im Positivmodus mit Reflektor massenspektrometrisch analysiert. Detektierte Massen mit  $m/z$   $[M+Na]^+$ .  $\square$  = GlcNAc,  $\circ$  = Man,  $\diamond$  = Neu5Ac,  $\triangleleft$  = Fuc.

Abb.2.12 zeigt exemplarische Spektren permethylierter N-Glykane des rek.IgGs, exprimiert in der CHO- (A), AGE1.CR- (B) und AGE1.CR.pIX-Zelllinie (C). Die biantennäre, einfach fucosylierte Hauptstruktur (BiG0F1,  $m/z$  1835) sowie dessen einfach galactosylierte (BiG1F1,  $m/z$  2040) und zweifach galactosylierte Variante (BiG2F1,  $m/z$  2244) konnte für rek.IgG aus allen drei Expressionszellen nachgewiesen werden. Die Peakintensitäten der galactosylierten Strukturen sind bei rek.IgG aus der CHO-Zelllinie deutlich höher im Vergleich zu dem aus Entenzelllinien. Zusätzlich ist in rek.IgG aller drei Zelllinien die monoantennäre, einfach fucosylierte Struktur (MonoG0F1,  $m/z$  1416) sowie die Mannose 5-Struktur (Man5,  $m/z$  1579) detektiert worden. Die Strukturen Man6-8 ( $m/z$  1783, 1988, 2192) konnten hingegen ausschließlich in rek.IgG aus der CHO- (Abb.2.12 A) und AGE1.CR- (Abb.2.12 B), nicht aber in der AGE1.CR.pIX-Zelllinie (Abb.2.12 C) nachgewiesen werden.

In rek.IgG beider Entenzelllinien wurden interessanterweise zwei zusätzliche Strukturen ( $m/z$  2081, 2285) identifiziert (Abb.2.12 B/C). Aufgrund der detektierten Massen handelt es sich



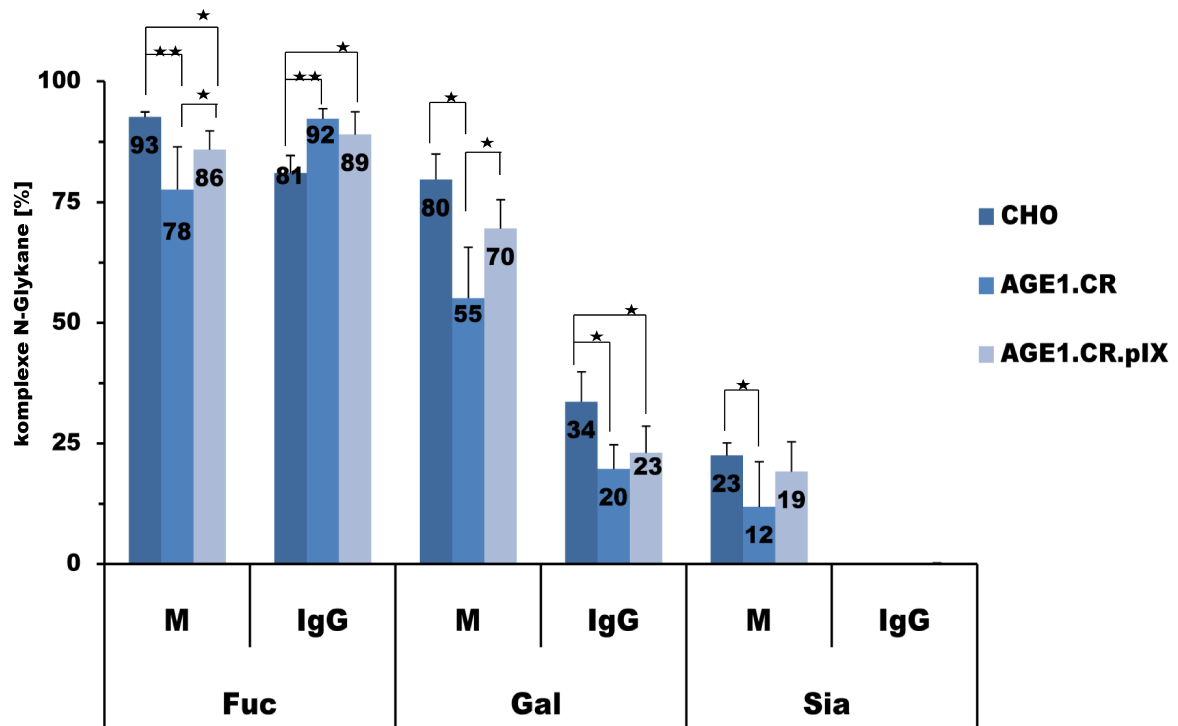
hierbei um die G0 und G1-Variante einer entweder triantennären, einfach fucosylierten Struktur oder aber der für humanes IgG typischen biantennären, einfach fucosylierten Struktur mit zusätzlichem GlcNAc an der  $\beta$ -Mannose des Cores – der sogenannten Bisecting-Struktur. Im Vergleich zur AGE1.CR.pIX- konnte diese potentielle Bisecting-Struktur in rek.IgG aus der AGE1.CR-Zelllinie in deutlich geringerem Maße detektiert werden.



**Abb. 2.13:** Vergleich der Zusammensetzung der über MALDI-TOF-MS detektierten N-Glykanstrukturen permethylierter N-Glykane des rek.IgGs aus der CHO- (A; n=9), AGE1.CR- (B; n=5) und AGE1.CR.pIX-Zelllinie (C; n=12). Ausgehend von je n Messungen sind hier die durchschnittlichen relativen Intensitäten mannosereicher Strukturen (Man 5-8) bezogen auf den Gesamtanteil der N-Glykane und die restlichen Strukturen bezogen auf den Gesamtanteil komplexer N-Glykane dargestellt. Die Antennarität (Mono, Bi, BiBis) und Fucosylierung (F) der Strukturen wurden auf der X-Achse aufgetragen und deren galactosylierten Varianten (G) auf der Y-Achse. Mittels Student-t-Test (zweiseitig, verschiedene Varianzen) wurden die Daten der Entenzelllinien zu denen der CHO-Zelllinie auf signifikante Unterschiede hin getestet. Bei dem Signifikanzniveau  $p < 0,5$  wurden die Daten mit einem Stern markiert, bei  $p < 0,001$  mit zwei Sternen, Daten mit  $p > 0,5$  wurden nicht zusätzlich markiert, diese sind nicht signifikant verschieden.

Die Zusammensetzung der N-Glykosylierung rek.IgGs aus CHO- und Entenzelllinien wurde in Abb.2.13 anhand der relativen Intensitäten aus wiederholten Präparationen verglichen.

Die Daten basieren auf rek.IgG von drei verschiedenen Expressionen, dessen N-Glykane mehrfach präpariert, permethyliert und massenspektrometrisch analysiert wurden. Von der potentiellen Bisecting-Struktur abgesehen, teilen alle rek.IgGs die gleichen komplexen N-Glykanstrukturen. Die biantennäre, einfach fucosylierte Hauptstruktur (BiF1) mit seinen drei Galactosylierungsvarianten (G0-2) ist in rek.IgG aller Zelllinien zu  $\sim 80\%$  vorherrschend (Abb.2.13 A-C).



**Abb. 2.14:** Vergleich der relativen prozentualen Anteile fucosylierter (Fuc), galactosylierter (Gal) und sialylierter (Sia) komplexer N-Glykanstrukturen. Den jeweiligen Anteilen der N-Glykane des rek.IgGs (IgG) wurden die membranständiger Glykoproteine (M; aus Abb.2.10) gegenübergestellt. Ausgehend von mindestens fünf MALDI-TOF-MS-Messungen permethylierter N-Glykane wurden die relativen Intensitäten bezogen auf den Gesamtanteil komplexer N-Glykane dargestellt (rek.IgG:  $n = 9$  CHO-,  $n = 5$  AGE1.CR- und  $n = 12$  AGE1.CR.pIX-Zelllinie). Mittels Student-t-Test (zweiseitig, verschiedene Varianzen) wurden die Daten der Entenzelllinien zu denen der CHO-Zelllinie auf signifikante Unterschiede hin getestet. Bei dem Signifikanzniveau  $p < 0,5$  wurden die Daten mit einem Stern markiert, bei  $p < 0,001$  mit zwei Sternen, Daten mit  $p > 0,5$  wurden nicht zusätzlich markiert, diese sind nicht signifikant verschieden.

Die mannosereichen Strukturen (Man 5-8) zeigen sich in rek.IgG der AGE1.CR-Zelllinie zwar mit 11 % deutlich erhöht (Abb.2.13 B), es konnte jedoch aufgrund zu hoher Varianz kein signifikanter Unterschied mittels Studen-t-Test festgestellt werden. In allen rek.IgGs war die Man 5-Struktur als anteilsstärkste Struktur vorherrschend. Während bei rek.IgG der AGE1.CR.pIX-Zelllinie zusätzlich die Man 6-Struktur in geringem Anteil detektiert wurde,

konnte in rek.IgG der CHO- und AGE1.CR-Zelllinie zusätzlich die Man 6-8-Struktur nachgewiesen werden.

N-Glykanstrukturen des rek.IgGs der AGE1.CR- und AGE1.CR.pIX-Zelllinie unterscheiden sich signifikant in der Menge der potentiellen Bisecting-Struktur, welche bei rek.IgG der AGE1.CR.pIX-Zelllinie mit 8 % in zweifacher Menge detektiert wurde. Unterschiede in den Anteilen fucosylierter, galactosylierter und sialylierter komplexer N-Glykanstrukturen rek.IgGs werden in Abb.2.14 im Vergleich zu denen membranständiger Glykoproteine deutlich.

Anhand der Fucosylierung (Abb.2.14 Fuc) unterscheiden sich die N-Glykane der Entenzelllinien signifikant ( $\star/\star\star$ ) von denen der CHO-Zelllinie, sowohl in rek.IgG als auch membranärer Glykoproteine. Allerdings haben sich die Anteile fucosylierter Strukturen (Fuc) bei membranären Glykoproteine zu denen des rek.IgGs verschoben, sodass die CHO-Zelllinie mit  $\sim 80\%$  bei rek.IgG (Abb.2.14 IgG; Fuc) den geringsten Anteil fucosylierter Strukturen aufwies, hingegen bei membranären Glykoproteinen mit  $93\%$  (Abb.2.14 M; Fuc) den höchsten Anteil fucosylierter Strukturen. Dies könnte auf eine Proteinspezifität in Abhängigkeit von der jeweiligen Produktionszelllinie hindeuten.

Im Bereich der Galactosylierung zeigt sich rek.IgG der CHO-Zelllinie mit  $34\%$  galactosylierter komplexer N-Glykane (Abb.2.14 IgG; Gal) signifikant höher ( $\star$ ) galactosyliert als rek.IgG der Entenzelllinien mit  $\sim 20\%$ . In Abb.2.13 A zu B/C wird dies anhand der BiF1G1-Struktur besonders gut deutlich. Im Vergleich zur Galactosylierung membranärer Glykoproteine (Abb.2.14 M; Gal) bestätigt sich die Beobachtung einer erhöhten Galactosylierung der CHO-Zelllinie. In Abb.2.9 zeigten sich die membranären Glykoproteine der CHO-Zelllinie sogar stärker zweifach statt einfach galactosyliert und weisen allgemein erhöhte Anteile galactosylierter Strukturen ( $80\%$ ) im Vergleich zu rek.IgG ( $34\%$ ) auf. Anhand des rek.IgGs konnte demnach eine proteinspezifische Galactosylierung nachgewiesen werden, welche vermutlich durch die Faltung des Proteins diktiert wird [59].

Auch die Sialylierung des rek.IgGs hatte sich im Vergleich zu membranären Glykoproteinen (Abb.2.14 IgG/M; Sia) reduziert. Hier ist keine erhöhte Sialylierung der CHO-Zelllinien im Vergleich zu den Entenzelllinien mehr detektierbar.

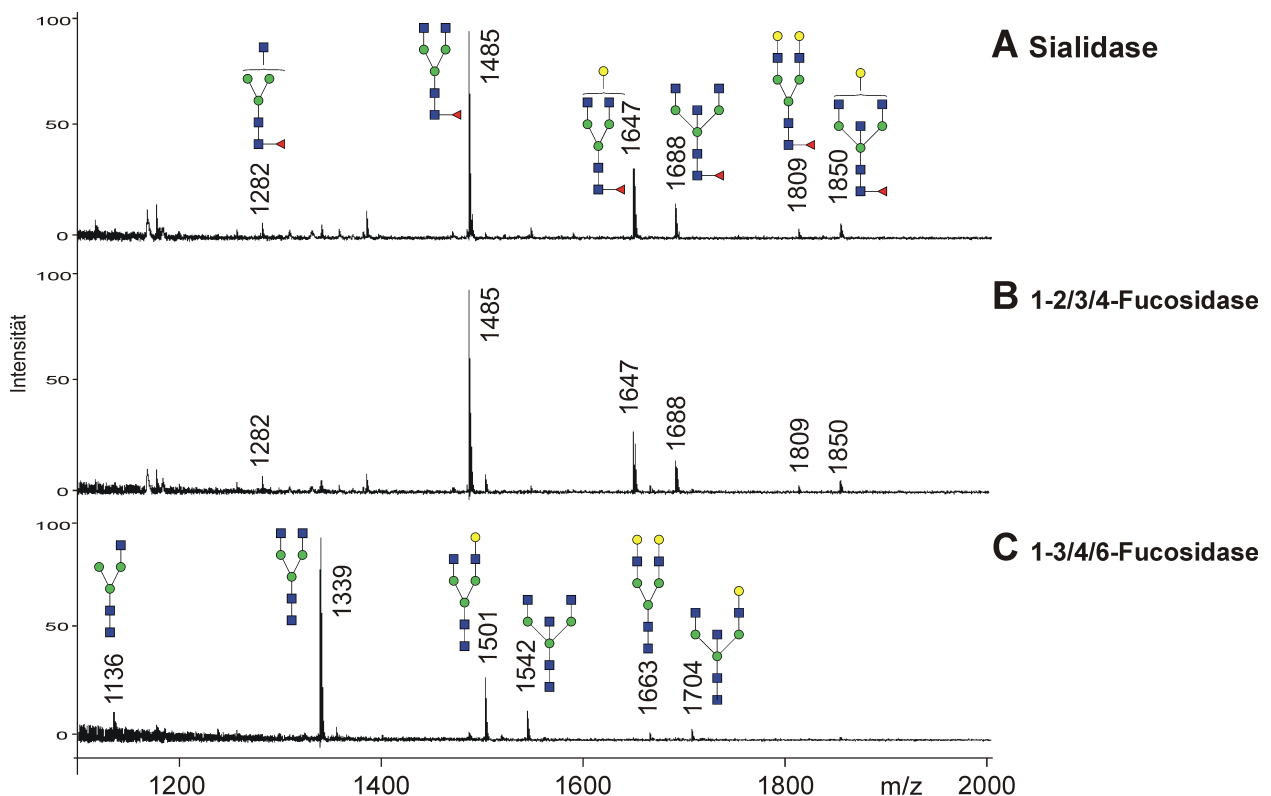
Nachdem die Zusammensetzung sowie die prozentuale Verteilung der N-Glykane rek.IgGs aus Enten- und CHO-Zelllinien über HPAEC-PAD und MALDI-TOF-MS analysiert wurden,

sollte in 2.2.3 der Frage nach dem Fucosylierungstyp und in 2.2.4 der Verifizierung der bislang nur postulierten Bisecting-Struktur in den Entenzelllinien AGE1.CR und AGE1.CR.pIX nachgegangen werden.

## 2.2.3 Bestimmung des Fucosylierungstyps

Aufgrund der besonderen funktionellen Bedeutung in Bezug auf die IgG-vermittelte Zellzytotoxizität (ADCC) war es von Interesse, bei den massenspektrometrisch detektierten, einfach fucosylierten N-Glykanen des rek.IgGs zwischen der  $\alpha$ 1-6 glykosidisch verknüpften Core-Fucose am peptidständigen GlcNAc und der  $\alpha$ 1-3/4 glykosidisch verknüpften antennären Fucose zu unterscheiden. Hierzu wurden desialylierte N-Glykane mittels Exo- und Endoglykosidasen entsprechender Spezifität verdaut und nach Aufreinigung über TopTip-Säulen (5.5.2.3) im Positivmodus mit Reflektor des MALDI-TOF-MS analysiert (5.5.3.3).

### 2.2.3.1 Fucosidase-Verdau



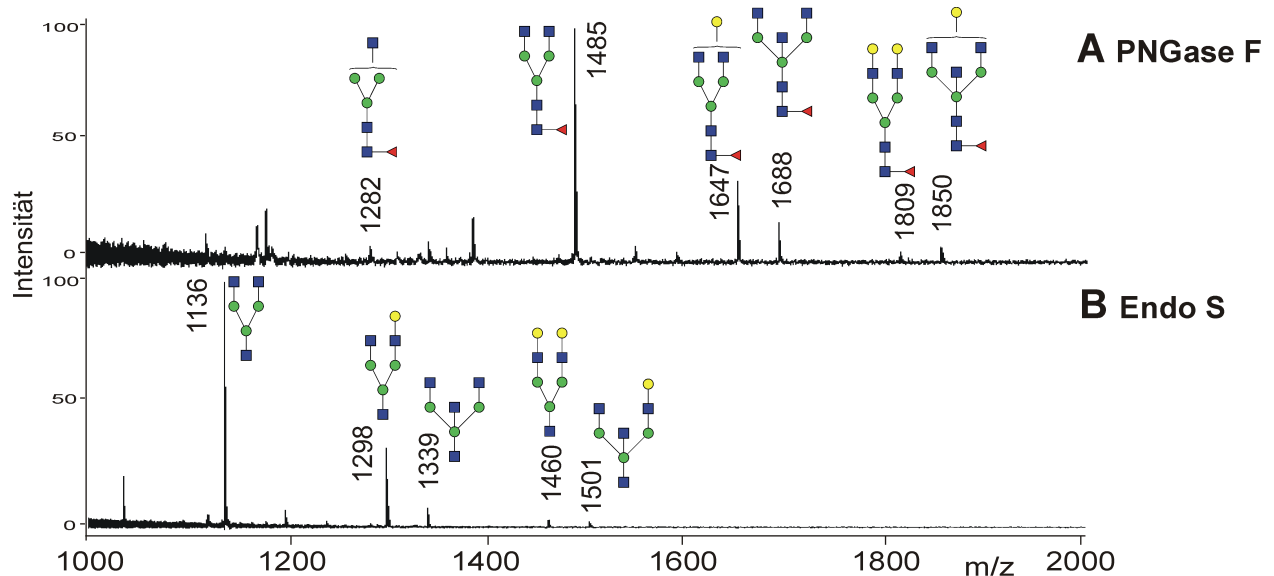
**Abb. 2.15:** Exemplarische MALDI-TOF-MS-Spektren desialylierter N-Glykane des rek.IgGs der AGE1.CR.pIX-Zelllinie (A) nach  $\alpha$ 1-3/4-Fucosidase-Verdau und nach  $\alpha$ 1-2/3/4/6-Fucosidase-Verdau (C).  $\square$  = GlcNAc,  $\circ$  = Man,  $\circ$  = Gal,  $\diamond$  = Neu5Ac,  $\triangleleft$  = Fuc.

Die MS-Spektren nach spezifischem Fucosidase-Verdau sind in Abb.2.15 exemplarisch für rek.IgG aus der AGE1.CR.pIX-Zelllinie dargestellt. In A ist das Spektrum der desialylierten N-Glykane, in B das nach erfolgtem  $\alpha$ 1-3/4-Fucosidase-Verdau (5.5.1.6), spezifisch für antennäre Fucose und in C das Spektrum der N-Glykane nach  $\alpha$ 1-2/3/4/6-Fucosidase-Verdau (5.5.1.5) dargestellt, welche alle Verknüpfungstypen der Fucose schneidet.

Da in Abb.2.15 keine Fucoseabspaltung mit der  $\alpha$ 1-3/4-Fucosidase (B), hingegen eine vollständige Abspaltung der Fucose mit der  $\alpha$ 1-2/3/4/6-Fucosidase erfolgte, zeigt sich die Fucosylierung des rek.IgGs der AGE1.CR.pIX-Zelllinie vom Core-Fucose-Typ. Gleiche Ergebnisse wurden für rek.IgG aus der CHO- und der AGE1.CR-Zelllinie erhalten. Alternativ sollte die Core-Fucosylierung mittels EndoS-Verdau in 2.2.3.2 bestätigt werden.

### 2.2.3.2 Endo S-Verdau

Zur Bestätigung der Core-Fucosylierung wurden N-Glykane statt mit der PNGase F über Endoglykosidase Endo S vom Peptid abgespalten (5.5.1.9), welche nach dem ersten GlcNAc der Core-Struktur der N-Glykane schneidet, an welche die Core-Fucose gebunden ist.



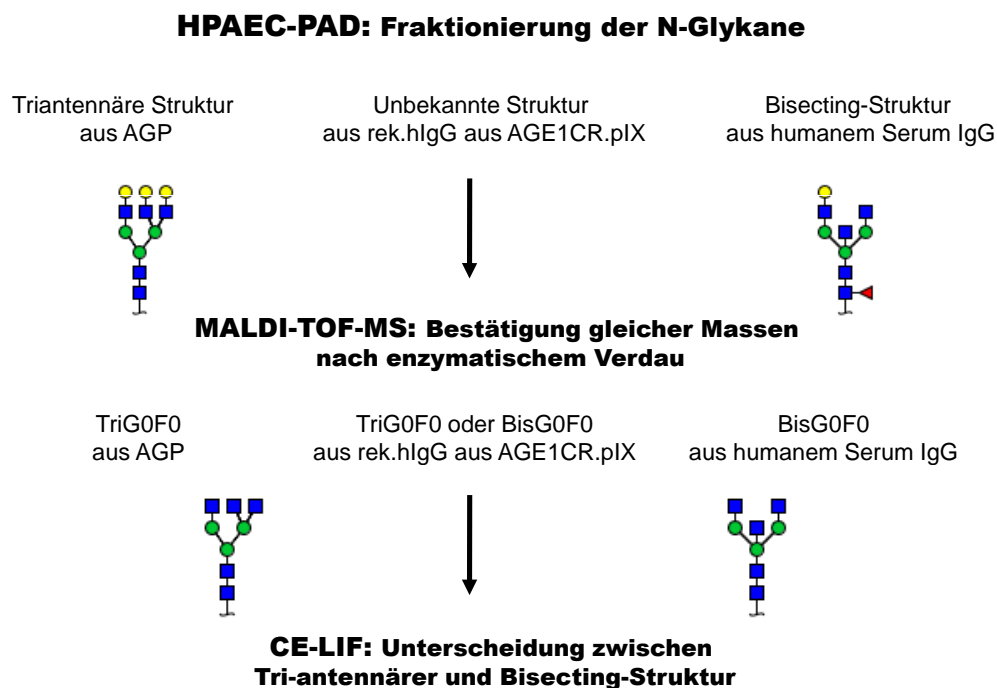
**Abb. 2.16:** Exemplarische MALDI-TOF-MS-Spektren desialylierter N-Glykane des rek.IgGs der AGE1.CR.pIX-Zelllinie nach Freisetzung der N-Glykane mittels PNGase F (A), nach Freisetzung der N-Glykane mittels Endo S (B).  $\square$  = GlcNAc,  $\circ$  = Man,  $\circ$  = Gal,  $\diamond$  = Neu5Ac,  $\triangleleft$  = Fuc.

Der Endo S-Verdau (Abb.2.16 B) führte wie der  $\alpha$ 1-2/3/4/6-Fucosidase-Verdau (Abb.2.15 C) zu vollständig defucosylierten N-Glykanstrukturen und bestätigte somit die Core-Fucosylierung des rek.IgGs aus Entenzelllinien.

## 2.2.4 Nachweis der Bisecting-Struktur in Entenzelllinien

In diesem Abschnitt sollte die Fähigkeit der Entenzelllinien zur Ausbildung der Bisecting-Struktur nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um ein mindestens biantennäres N-Glykan mit einem zusätzlichen GlcNAc an der  $\beta$ -Mannose des Cores, welches aufgrund gleicher Masse von einer nicht vollständig galactosylierten triantennären Struktur im MALDI-TOF-MS nicht zu unterscheiden ist. Bei positivem Nachweis der Bisecting-Struktur wäre dies auch ein indirekter Nachweis einer Glukosaminy-Transferase III (GnT-III) -Aktivität in Entenzellen, welche für dessen Ausbildung notwendig ist und bislang in humanen Zelllinien [131], nicht aber in unveränderten CHO-Zelllinien nachgewiesen wurde [73].

Weder in Fragmentierungsversuchen (MALDI-TOF-TOF) noch in Versuchen mit verschiedenen Exoglykosidasen – inklusive spezifischer Hexosaminidasen – ergaben sich eindeutige Aussagen, die die Bisecting-Struktur belegt oder widerlegt hätten. Eine eindeutige Klärung sollte in diesem Abschnitt mittels Kombination chromatographischer, massenspektrometrischer und elektrophoretischer Methoden herbei geführt werden.

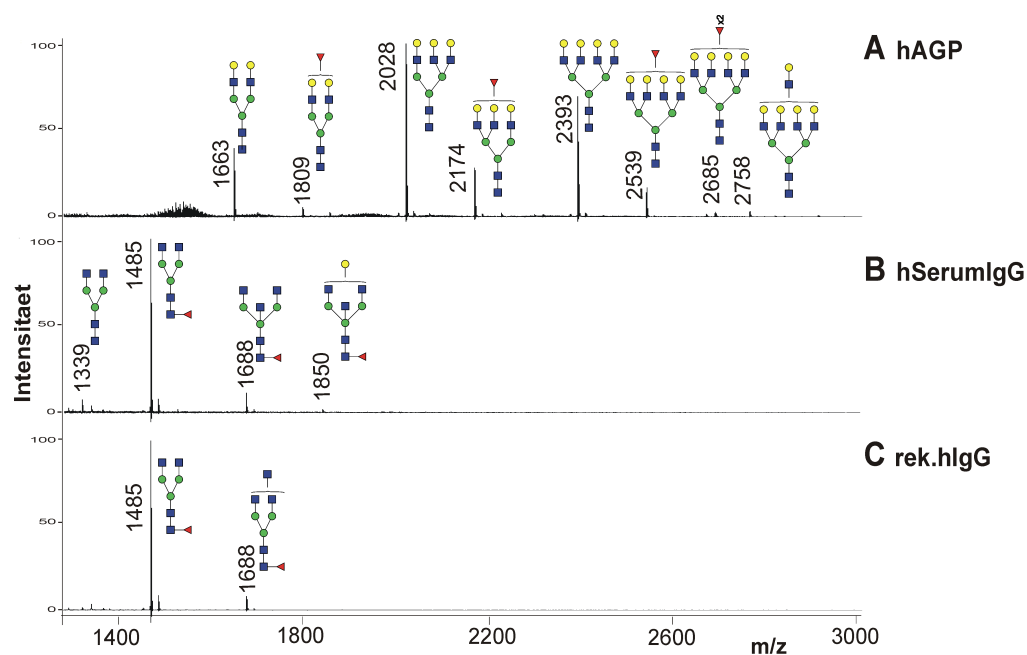


**Abb. 2.17:** Schematische Übersicht zur Unterscheidung zwischen triantennärer- und Bisecting-Struktur.  
□ = GlcNAc, ○ = Man, ○ = Gal, ◇ = Neu5Ac, ◁ = Fuc.

Zur eindeutigen Identifizierung wurde die potentielle Bisecting-Struktur aus rek.IgG der AGE1.CR.pIX-Zelllinie mit der Bisecting-Struktur des aus humanem Serum isolierten IgGs (hSerumIgG) und mit der triantennären Struktur aus humanem Alpha1-saurem-Glykoprotein (AGP) verglichen. Die jeweilige Struktur wurde über HPAEC-PAD präparativ isoliert (5.5.5) und dessen Massen über MALDI-TOF-MS (5.5.3.1) verifiziert.

Anschließend wurden die zu vergleichenden N-Glykanstrukturen – sofern notwendig – mittels Galactosidase- (5.5.1.7) und Fucosidase-Verdau (5.5.1.5) auf die Bisecting-Struktur ohne Galactose und Fucose (BisG0F0, aus hIgG) und die triantennäre Struktur ohne Galactose und Fucose (TriG0F0, aus AGP) jeweils mit dem  $m/z$  1542 (desialyliert,  $[M+Na]^+$ ) reduziert. Zum Vergleich wurden die drei N-Glykanstrukturen aus hIgG, hAGP und der Entenzelle APTS-markiert (5.5.6.1) und über CE-LIF (5.5.6.2) analysiert.

#### 2.2.4.1 MALDI-TOF-MS der Ausgangsproteine



**Abb. 2.18:** MALDI-TOF-MS-Spektren isolierter N-Glykane der Ausgangsproteine vor Oligosaccharid-Trennung über HPAEC-PAD. Desialylierte Glykane wurden im Positivmodus des MALDI-TOF-MS mit Reflektor und Arabinosazon als Matrix analysiert. A: hAGP, B: hSerumIgG, C: rek.IgG der AGE1.CR.pIX-Zelllinie. N-Glykane in B und C wurden nach Desialylierung Galactosidase verdaut, um die Menge der gewünschten Struktur zu erhöhen. Detektierte Massen mit  $m/z$   $[M+Na]^+$ .  $\square$  = GlcNAc,  $\circ$  = Man,  $\circ$  = Gal,  $\diamond$  = Neu5Ac,  $\triangleleft$  = Fuc.

In Abb.2.18 ist eine Übersicht der N-Glykosylierung der Ausgangsproteine nach massenspektrometrischer Analyse dargestellt. Die N-Glykane stammen von jeweils 100  $\mu$ g Protein,

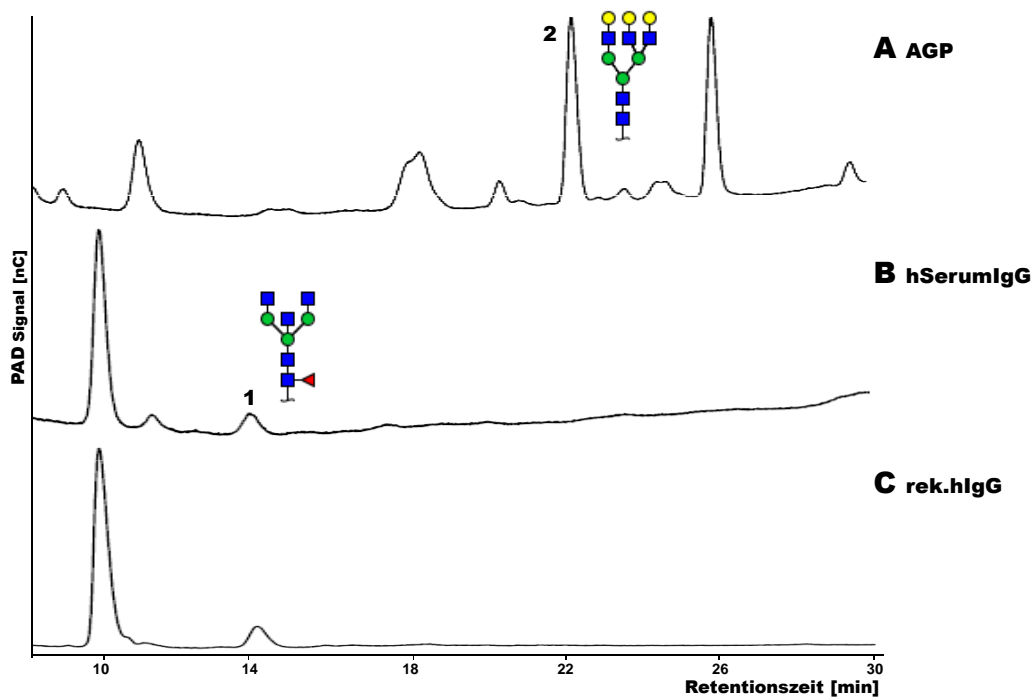
welche wie in 2.2.2 beschrieben präpariert wurden. Desialylierte N-Glykane wurden im Positivmodus des MALDI-TOF-MS mit Reflektor und Arabinosazon als Matrix analysiert.

Das hAGP in Abb.2.18 A zeigt überwiegend vollständig galactosylierte tri- und tetraantennäre Strukturen, im Anschluß soll hier über HPAEC-PAD das triantennäre N-Glykan mit drei Galactosen ohne Fucose (TriG3F0) mit  $m/z$  2028 isoliert werden. Die zuvor Galactosidase verdauten (5.5.1.7) N-Glykane des hSerumIgGs in Abb.2.18 B und des rek.IgG der AGE1.CR.pIX-Zelllinie in Abb.2.18 C teilen überwiegend die gleichen Massen, in hSerumIgG ist noch eine einfach galactosylierte BisG1F1 von  $m/z$  1850 enthalten (B). Aus beiden Antikörpern wurde im Folgenden jeweils die Struktur mit  $m/z$  1688 über HPAEC-PAD isoliert, um diese dann enzymatisch auf die gemeinsame Masse von  $m/z$  1542 zu reduzieren.

#### 2.2.4.2 HPAEC-PAD-Fraktionierung ausgewählter N-Glykane

In Abb.2.19 sind die desialylierten N-Glykane von hAGP (A), hSerumIgG (B) und rek.IgG nach HPAEC-PAD-Fraktionierung dargestellt. N-Glykane in B und C wurden zuvor mit Galactosidase verdaut, um die fraktionierte Menge an BisG0F1 zu erhöhen. Probe A wurde nicht mit Galactosidase verdaut, da die vollständige Galactosylierung der triantennären Struktur eine Bisecting-Struktur ausschließt. Die gesammelten Fraktionen wurden im Anschluss massenspektrometrisch identifiziert und ausschließlich die für die Fragestellung relevanten Fraktionen 1 und 2 wurden in Abb.2.19 markiert. Die gesammelten Fraktionen nach HPAEC-PAD-Fraktionierung (Abb.2.19) wurden dem jeweiligen Peak entsprechend vereinigt, die N-Glykane wurden über Top-Tip (5.5.2.3) von Salzen gereinigt und deren Masse über MALDI-TOF-MS identifiziert. Hierbei konnte dem Peak 1 (Abb.2.19 B) mit einer Retentionszeit von  $\sim 14$  min, ausgehend von N-Glykanen des hIgG, die gesuchte Struktur BisG0F1 mit  $m/z$  1688 zugeordnet werden. Über  $\alpha$ 1-2/3/4/6-Fucosidase-Verdau (5.5.1.5) wurde die Struktur auf die defucosylierte BisG0F0 der Masse  $m/z$  1542 reduziert. Gleiches wurde mit der 14-minütigen Fraktion der N-Glykane des rek.IgGs aus Entenzellen (Abb.2.19 C) durchgeführt. Trotz ähnlicher Retentionszeiten stellt sich die Frage, ob es sich auch bei den isolierten N-Glykanen der Entenzellen um eine Bisecting- statt einer triantennären Struktur handelt.



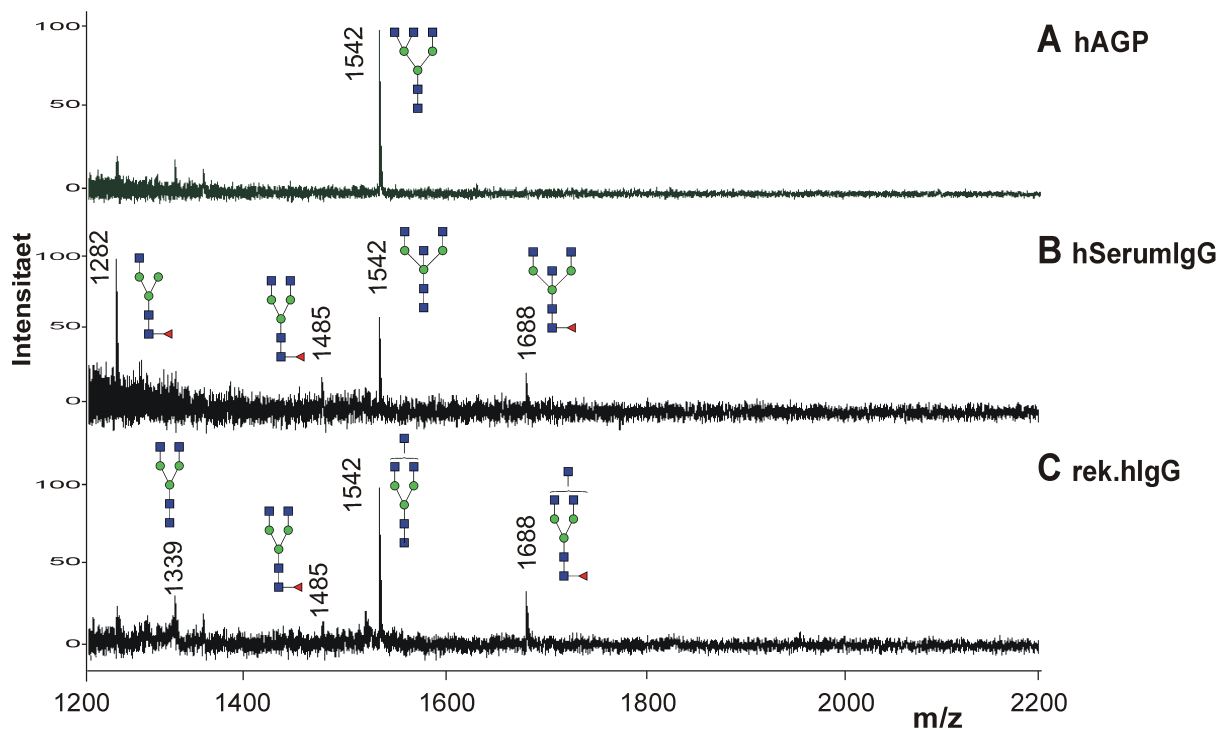


**Abb. 2.19:** HPAEC-PAD: Fraktionierung von desialylierten N-Glykanen ausgehend von je 100  $\mu\text{g}$  hAGP (A), hSerumIgG (B) und rek.IgG aus Entenzellen (C). N-Glykane in B und C wurden zusätzlich mit Galactosidase verdaut. Mittels anschließender Analyse der Massen über MALDI-TOF-MS konnten Peak 1 (B/C) die gesuchte Masse  $m/z$  1688  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  der Struktur BisG0F1/TriG0F1 und Peak 2 (A) die Masse  $m/z$  2028  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  der Struktur TriG3F0 zugeordnet werden.  $\square$  = GlcNAc,  $\circ$  = Man,  $\diamond$  = Neu5Ac,  $\triangleleft$  = Fuc.

Die gesuchte Struktur TriG3F0 mit der Masse  $m/z$  2028 aus hAGP konnte Peak 2 (Abb.2.19 A) mit einer Retentionszeit von 22,2min zugeordnet werden. Über einen Galactosidase-Verdau (5.5.1.7) wurde die isolierte Struktur auf die vergleichbare Struktur TriG0F0 der Masse  $m/z$  1542 reduziert, was in Abb.2.20 massenspektrometrisch überprüft wurde. In allen zu vergleichenden Proben (Abb.2.20 A-C) konnte die gewünschte Masse  $m/z$  1542 als Peak der jeweils höchsten Intensität nachgewiesen werden. Sie waren demnach geeignet anhand ihrer Retentionszeiten in der CE-LIF verglichen zu werden.

Der Galactosidase-Verdau der Probe aus hAGP (A) war vollständig, da hier ausschließlich die Struktur TriG0F0 detektiert wurde. Der  $\alpha$ 1-2/3/4/6-Fucosidase-Verdau der Tri/BisG0F1 (Abb.2.20 B/C) hingegen war unvollständig, da hier zusätzlich Peaks geringerer Intensität fucosylierter Strukturen zu detektieren sind ( $m/z$  1485, 1688). Da die zu vergleichende Masse ( $m/z$  1542) vorherrschend ist, wurde dabei auf einen zweiten  $\alpha$ 1-2/3/4/6-Fucosidase-Verdau

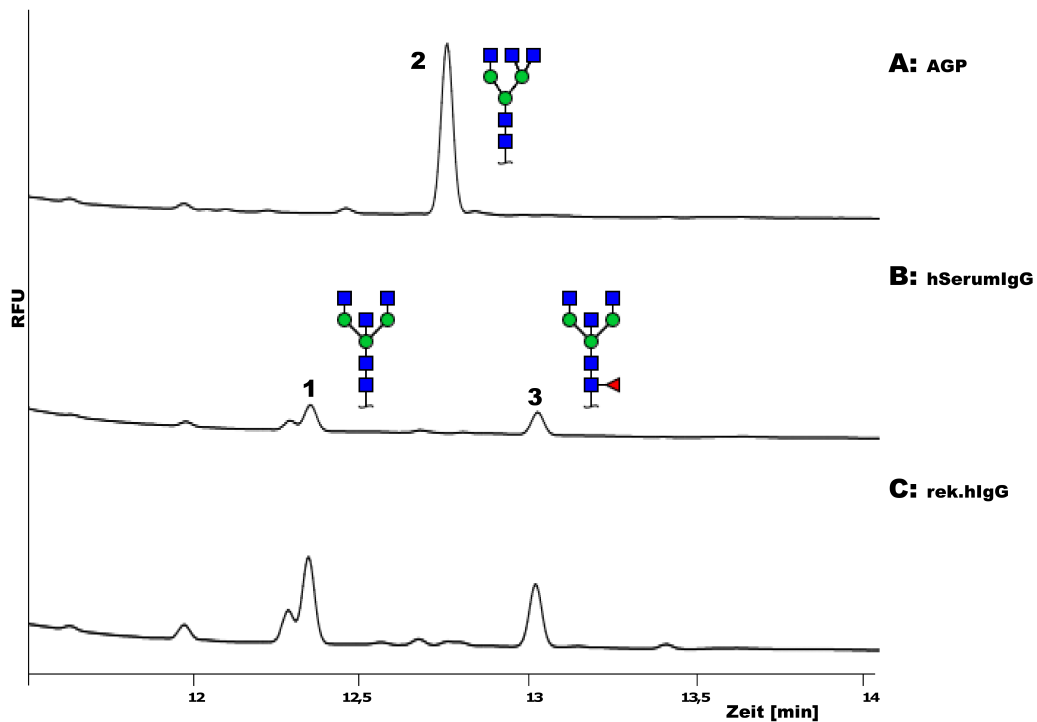
verzichtet, um den Materialverlust durch eine erneute Aufreinigung mittels Top-Tip zu vermeiden.



**Abb. 2.20:** MALDI-TOF-MS-Analyse der über HPAEC-PAD isolierten Strukturen nach Galactosidase- bzw. Fucosidase-Verdau. Desialylierte N-Glykane im Positivmodus des MALDI-TOF-MS mit Reflektor und Arabinosazon als Matrix analysiert. A: Degalactosylierte TriG3F0 aus hAGP. B:  $\alpha$ 1-2/3/4/6-Fucosidase verdaute BisG0F1 aus hSerumIgG. C:  $\alpha$ 1-2/3/4/6-Fucosidase verdaute Tri/BisG0F1 aus rek.IgG aus Entenzellen. Detektierte Massen mit  $m/z$   $[M+Na]^+$ .  $\square$  = GlcNAc,  $\circ$  = Man,  $\circ$  = Gal,  $\diamond$  = Neu5Ac,  $\triangleleft$  = Fuc.

### 2.2.4.3 CE-LIF-Detektion zur Bestätigung der Bisecting-Struktur

Für die vergleichende CE-LIF-Detektion war es notwendig, die zuvor isolierten triantennären und Bisecting-Strukturen der Masse  $m/z$  1542 mit APTS (5.5.6.1) zu labeln, was die Sensitivität der Methode erheblich steigert. Die Detektion wurde nach 5.5.6.2 durchgeführt. Nach der CE-LIF-Analyse der drei Proben (Abb.2.21) ist ein deutlicher Unterschied in der Retentionszeit des TriG0F0 bei 12,75 min (A, Peak 2) und der BisG0F0 bei 12,4 min (B, Peak 1) zu detektieren. Peak 3 (B) bei 13,1 min gehört zur Struktur BisG0F1. Die untersuchten N-Glykane des rek.IgG aus der AGE1.CR.pIX-Zelllinie in Abb.2.21 C zeigen ebenso wie hSerumIgG in B Peak 1 und 3, nicht aber Peak 2 für die triantennäre Struktur.



**Abb. 2.21:** CE-LIF-Detektion der APTS-markierten N-Glykane nach HPAEC-PAD-Isolierung und Glykosidase-Verdau auf die Hauptmasse von  $1542 [M+Na]^+$ . TriG0F0 aus AGP (A). BisG0F0/F1 aus hSerumIgG (B). Tri/BisG0F0/F1 aus rek.IgG aus Entenzellen (C). Peak 1 bei 12,4 min in B stellt die BisG0F0 dar und Peak 3 bei 13,1 min ist dessen fucosylierte Variante BisG0F1. Peak 2 bei 12,75 min in A stellt die TriG0F0 dar.  $\square$  = GlcNAc,  $\circ$  = Man,  $\triangle$  = Gal,  $\diamond$  = Neu5Ac,  $\blacktriangleleft$  = Fuc.

Es konnte demnach eindeutig das Vorhandensein der Bisecting-Struktur und somit einer GnT-III-Aktivität oder einem entsprechenden Enzym in Entenzelllinien nachgewiesen werden. Die kürzere Retentionszeit der Bisecting-Struktur im Vergleich zur triantennären in der CE-LIF-Analyse beruht höchst wahrscheinlich auf der veränderten Form durch das Aufspreizen der antennären GlcNAcs [24–26].

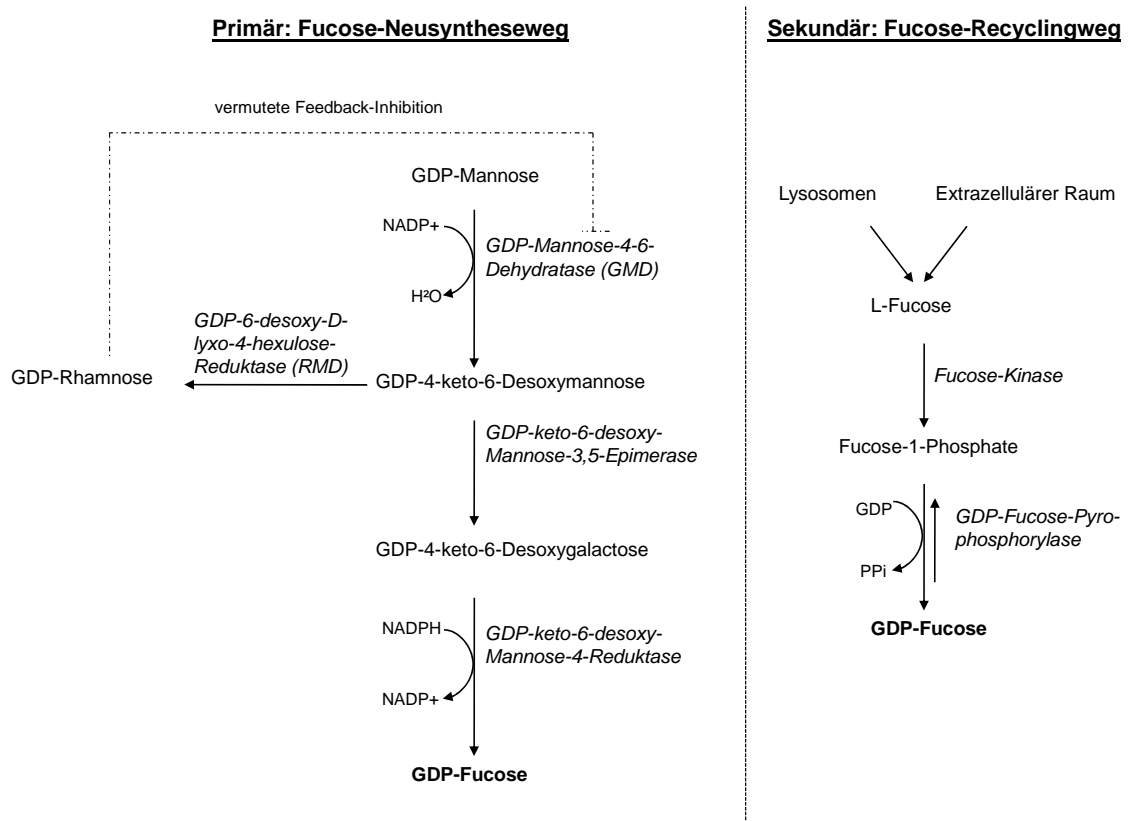
Nach Umana et al. [73] wird bei der CHO-Zelllinie die Core-Fucosylierung durch das Einfügen eines Bisecting-GlcNAcs mittels der GnT-III inhibiert. Diese Beobachtung trifft auf die AGE1.CR- und AGE1.CR.pIX-Zelllinien, aufgrund der überwiegend fucosylierten Bisecting-Strukturen bei rek.IgG, nicht zu.

Die Fähigkeit der Entenzelllinien Bisecting-Strukturen zu exprimieren erhöht, trotz geringerer Galactosylierung, die Ähnlichkeit zur humanen Glykosylierung, als dies bei rek.IgG aus der CHO-Zelllinie der Fall ist. Nach der eindeutigen Identifizierung der Bisecting-Struktur in rek.IgG der Entenzelllinien galt es der Frage nachzugehen, ob sich rek.IgG aus Enten- und CHO-Zelllinien in ihrer Aktivität unterscheiden, was in 2.3.3 untersucht wurde.

## 2.3 Modifikation der Zellfucosylierung

### 2.3.1 Fucose-Reduktion am Beispiel rekombinanter Antikörper

Nachdem in Abschnitt 2.2 die N-Glykosylierung Tumor-spezifischer rek.IgGs in Abhängigkeit der jeweiligen Produktionszelllinie untersucht wurde, sollte im Weiteren die Glykosylierung der rek.IgGs direkt beeinflusst werden. Hierfür wurde der Fucosesyntheseweg der Produktionszelllinien derart verändert, dass rek.IgG mit verringerter Core-Fucosylierung und somit verbesserter ADCC-Effektorfunktion exprimiert werden konnte.



**Abb. 2.22:** Schematische Übersicht zur Fucosesynthese und dem Angriffspunkt der RMD [5].

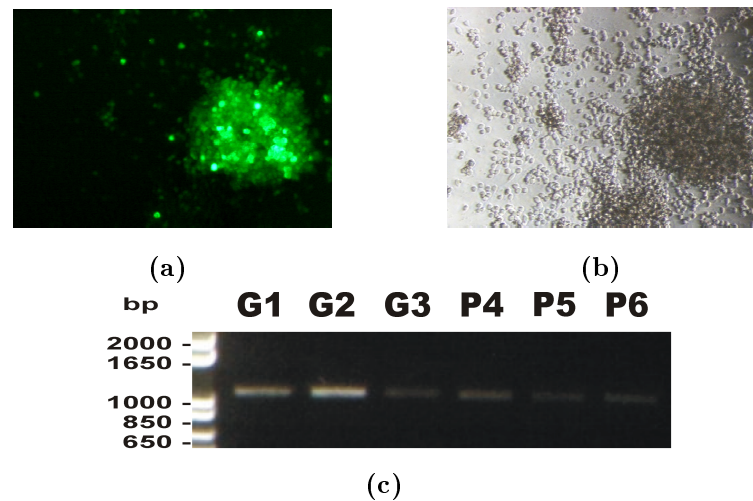
In der Modifikation der Fucosylierung rek.IgGs wird das größte Optimierungspotential gesehen. Veröffentlichte Methoden der Fucose-Reduktionen wie z.B. der *FUT8-Knockout* erzielten eine über 50fache Steigerung der ADCC [28,75]. In dieser Arbeit wurde in den Fucosesyntheseweg von Enten- und CHO-Zelllinien über die heterologe Expression der GDP-6-desoxy-D-lyxo-4-hexulose Reduktase (RMD) eingewirkt, welche ursprünglich aus *Pseudomonas ae-*

*ruginosa* stammt und die Reaktion des Fucosevorläufers GDP-4-keto-6-desoxymannose zu D-Rhamnose katalysiert (Abb.2.22) [132,133]. Bei der rekombinanten Expression des hIgGs war besonders darauf zu achten, dass das Expressionsmedium keine Fucose enthält, um die GDP-Fucose-Entstehung über den alternativen Fucose-Recyclingweg zu vermeiden.

Zuerst wurden hIgG stabil exprimierende Klone der Enten- und CHO-Zelllinien mit RMD cotransfiziert (5.4.2) und anschließend einzellkloniert (5.4.3.2). Die Auswahl RMD-positiver Klone erfolgte über das im Vektor zusätzlich enthaltene grün fluoreszierende Protein (GFP) mittels Fluoreszenzmikroskopie (5.4.5.2). Es folgte der RMD-Expressionsnachweis über RT-PCR (5.2.1), wonach einige Klone für die hIgG-Produktion (5.4.4) ausgewählt wurden. Die Fucosylierung des produzierten Antikörpers wurde, nach dessen Aufreinigung über Protein-A-Sepharose (5.3.5.1), mittels HPAEC-PAD (5.5.4) und MALDI-TOF-MS (5.5.3.1) geprüft. Die hier analysierten rek.IgG aus Enten- und der CHO-Zelllinien sind alle tumorgerichtet und somit ADCC-relevant wirksam, unterscheiden sich jedoch in ihrer Spezifität. Während für das rek.IgG exprimiert in Entenzelllinien das Antigen nicht zur Verfügung stand, ist das rek.IgG aus der CHO-Zelllinie HER2/neu-spezifisch und als Trastuzumab zur Therapie bei Brustkrebspatienten bekannt [134]. Es konnten demnach für beide IgGs funktionelle Studien in Form des ADCC-relevanten Fc $\gamma$ RIIIa-Bindungsassays (5.4.6.2) durchgeführt werden. Eine direkte ADCC-Detektion (5.4.6.1) unter Einbindung des Antigens war ausschließlich bei Trastuzumab möglich. Die neue Methode der Fucose-Reduktion wurde demnach nicht nur in verschiedenen Zellsystemen getestet, sondern zugleich an unterschiedlichen hIgGs.

### 2.3.1.1 Rekombinantes IgG aus Entenzelllinien

Die RMD-Cotransfektion stabil exprimierender IgG-Klone der Entenzelllinien AGE1.CR und AGE1.CR.pIX erfolgte über Mikroporation (5.4.2.2) mit einer relativen Transfektionseffizienz von  $\sim 70\%$  ausgehend von der GFP-Expression. Nach einfacher Einzelzellklonierung wurden GFP-positive Klone über Fluoreszenzmikroskopie ausgewählt (Abb.2.23a). Im Vergleich zur Durchlichtaufnahme (Abb.2.42a) wird deutlich, dass nicht alle Zellen des Klons GFP-positiv sind. Über RT-PCR in Abb.2.42b zeigten alle GFP-positiven Klone eine positive RMD-Expression mit einer PCR-Bande von 1100 bp. Mit Unterschieden in der Bandenintensität und somit in der RMD-Expressionsstärke zeigen Klone der Transfektion G (v.a. G1 und G2) stärkere RMD-Expressionen im Vergleich zu Klonen der Transfektion P.

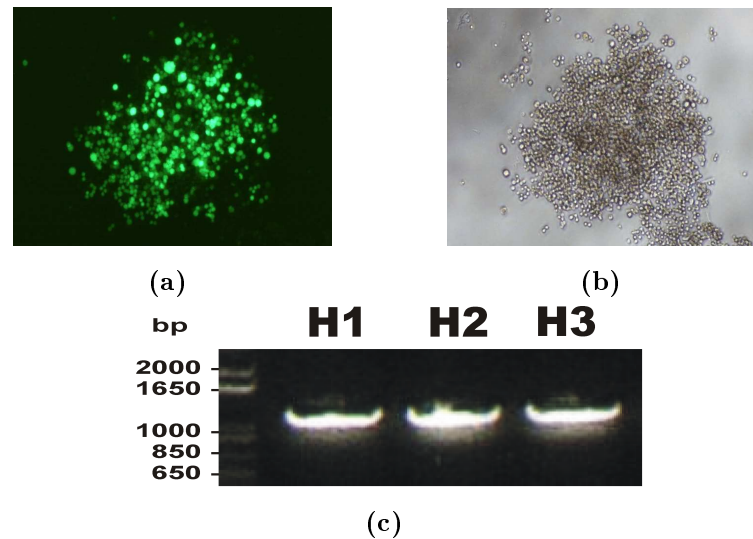


**Abb. 2.23:** Nachweis des RMD-Vektors in AGE1.CR.pIX-Zelllinie. a) Fluoreszenzaufnahme der GFP-Expression RMD-positiver AGE1.CR.pIX-Zelllinie nach einfacher Einzelzellklonierung. b) Durchlichtaufnahme. c) RT-PCR: RMD-Expression verschiedener RMD-positiver AGE1.CR.pIX-Zelllinie der Transfektionen G und P. Kontrolle (K, IgG+/RMD-).

Zur Testung der Fucosereduktion in Korrelation zur RMD-Expressionsstärke wurden zur rek.IgG-Produktion der stärker RMD-exprimierende G2- und der schwächer RMD-exprimierende P4-Klon der Zelllinie AGE1.CR.pIX ausgewählt.

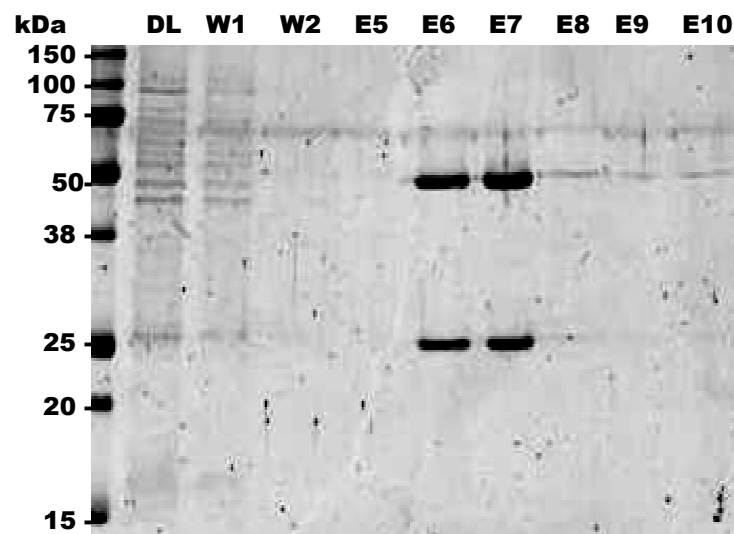
### 2.3.1.2 Trastuzumab exprimiert in der CHO-Zelllinie

Die RMD-Cotransfektion eines Trastuzumab-Klons der CHO-Zelllinie über Mikroperforation (5.4.2.2) erfolgte mit  $\sim 80\%$  relativer Transfektionseffizienz. Nach einfacher Einzelzellklonierung wurden in der Fluoreszenzmikroskopie von RMD-cotransfizierten CHO-Zellen neben GFP-positiven (Abb.2.24a) noch immer GFP-negative Zellen (Abb.2.24b) detektiert, welches über eine zweite Einzelzellklonierung reduziert wurde. Ausgewählte RMD-Klone verschieden starker GFP-Expressionen wurden expandiert und auf deren RMD-Expression über RT-PCR analysiert. Trotz unterschiedlicher GFP-Expressionsstärken zeigten sich kaum Unterschiede in dessen RMD-Expressionsstärke (Abb.2.24c). Für die zur IgG-Expression ausgewählten Klone H1-3 wurden daher keine Unterschiede in deren Grad der Fucose-Reduktion erwartet.



**Abb. 2.24:** Nachweis des RMD-Vektors in der CHO-Zelllinie. a) Fluoreszenzaufnahme der GFP-Expression RMD-positiver CHO-Zellen nach einfacher Einzelzellklonierung. b) Durchlichtaufnahme von Zellen in a. c) RT-PCR: RMD-Expressionsnachweis GFP-positiver CHO-Zellen. Vergleich der RMD-Klone H1-3 nach zweifacher Einzelzellklonierung.

### 2.3.1.3 Produktion rekombinanter IgGs



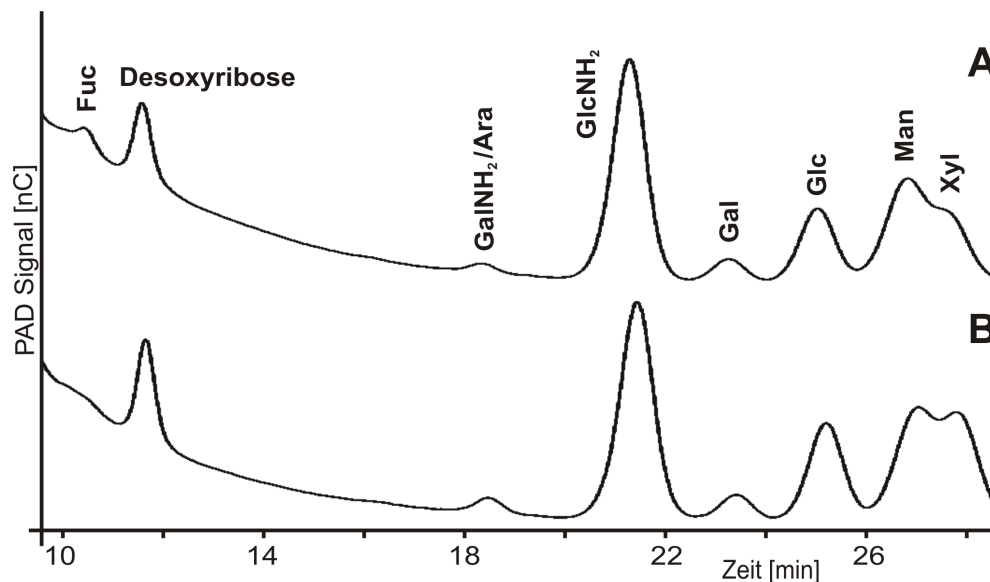
**Abb. 2.25:** Coomassie gefärbtes SDS-Gel zur Produktreinheitsprüfung. Hier exemplarisch die Testung nach IgG-Isolierung über Prot-A-Sepharose des RMD-Klons P4 der AGE1.CR.pIX-Zelllinie. Die einzelnen Fraktionen wurden in einem reduzierenden 12-prozentigem SDS-Gel aufgetrennt und Coomassie gefärbt. Durchlauf (DL), Waschfraktion (W), Eluatfraktion (E). Das reduzierte IgG weist eine Bande der leichten Kette bei 25 kDa und eine Bande der schweren Kette bei 50 kDa auf.

Für die anschließenden Untersuchungen wurden die ausgewählten RMD-Klone B12 der Zelllinie AGE1.CR, G2/P4 der AGE1.CR.pIX-Zelllinie sowie die H1-3 der CHO-Zelllinie im

Fed-Batch-Verfahren nach 5.4.4 produziert. Das hIgG wurde bei einer Zellvitalität >80 % nach 5.4.4.4 geerntet, über Protein-A-Sepharose über pH-Elution (5.3.5.1) aus dem Zellkulturüberstand isoliert und schließlich über Coomassie-gefärbte SDS-Gele (5.3.1; 5.3.2) auf Produktreinheit überprüft. Abb.2.25 zeigt exemplarisch die effiziente Isolierung bei gleichzeitiger Aufkonzentrierung aus dem Protein-/Peptidgemisch (DL, W) vom rek.IgG des RMD-Klons P4 der AGE1.CR.pIX-Zelllinie. Die proteinhaltigen Eluatfraktionen 6 und 7 wurden anschließend vereinigt und nach Proteinbestimmung für die N-Glykananalytik herangezogen.

## 2.3.2 Glykan-Analytik

### 2.3.2.1 Monosaccharide rek.IgGs aus RMD-positiven Entenzelllinien



**Abb. 2.26:** HPAEC-PAD: Monosaccharide des rek.IgG der AGE1.CR.pIX-Zelllinie. Nach TFA-Hydrolyse ausgehend von 50  $\mu$ g gereinigten IgGs RMD-positiver Klone P4 (A) und G2 (B) über HPAEC-PAD, 18 mM KOH-Gradient analysiert.

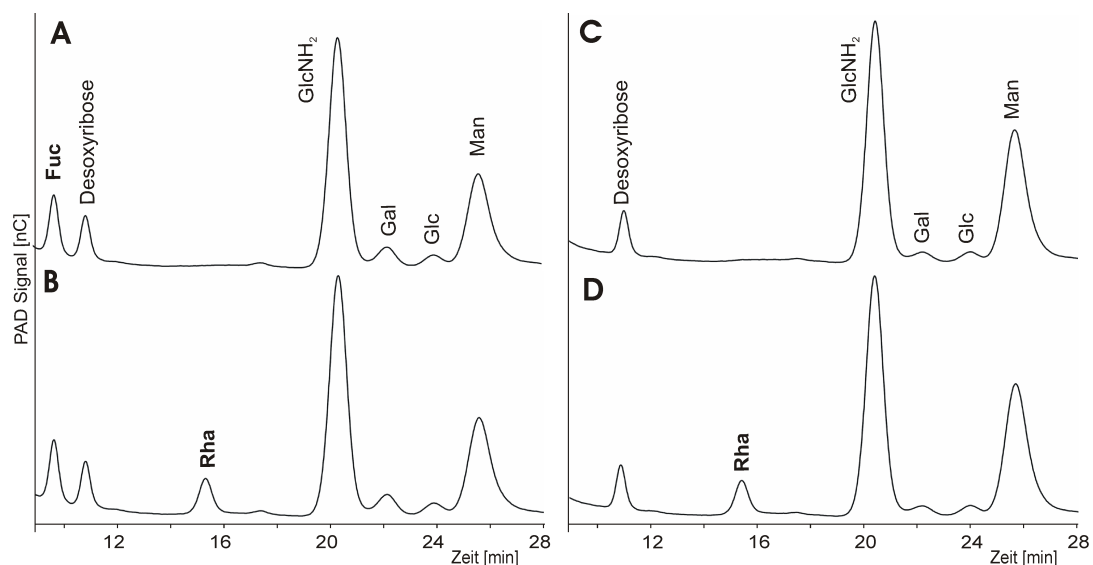
Die Monosaccharidbestimmung über HPAEC-PAD (5.5.4) nach TFA-Hydrolyse diente dem Nachweis der erfolgreichen Fucosereduktion sowie der Prüfung auf den Einbau neuer Monosaccharide, wie beispielsweise Rhamnose, in die Zellproteine. Rhamnose entsteht bei der Umwandlung der GDP-4-keto-6-Desoxymannose durch die exprimierte RMD (s.Abb.2.22). Hierzu wurden die Monosaccharide gereinigter rek.IgGs sowie Zelllysate RMD-positiver Zellen untersucht. L-Rhamnose wurde zum Nachweis der erwarteten D-Rhamnose als Standard verwendet, welches aufgrund fehlender Enantioselektivität der HPAEC-PAD [135] zulässig



ist. Um für Rhamnose einen abgetrennten Peak zu erhalten, wurde hierbei statt des üblichen 2,5 mM der 18 mM KOH-Gradient verwendet.

In Abb.2.26 sind die über HPAEC-PAD detektierten Monosaccharide der RMD-Klone des rek.IgGs der AGE1.CR.pIX-Zelllinie exemplarisch für die Entenzellen dargestellt. Es wurden 50  $\mu$ g Protein TFA-hydrolysiert (5.5.4.1) und mittels 18 mM KOH-Gradienten chromatographiert. Das Abflachen der Basislinie zu Beginn beider Chromatogramme ist auf Salzreste des Probenpuffers zurückzuführen (Tris-Acetat/ Glycin). Verunreinigungen mit Arabinose (Ara), Glucose (Glc) und Xylose (Xyl) wurden probenunabhängig detektiert und gehören nicht zum Monosaccharidspektrum der Entenzelllinien. In dem rek.IgG P4 (Abb.2.26 A) konnte in geringer Menge Fucose detektiert werden, wohingegen in rek.IgG G2 mit stärkerer RMD-Expression (Abb.2.26 B), keine Fucose detektiert werden konnte. Die Fucose-Reduktion über RMD-Expression in den Zellen war demnach erfolgreich. Eine Oligosaccharidbestimmung über MALDI-TOF-MS (2.3.2.5) sollte dies bestätigen und potentielle Veränderungen in der Zusammensetzung der N-Glykanstrukturen aufzeigen.

### 2.3.2.2 Monosaccharid-Analyse des Trastuzumab aus RMD-positiven Zellen

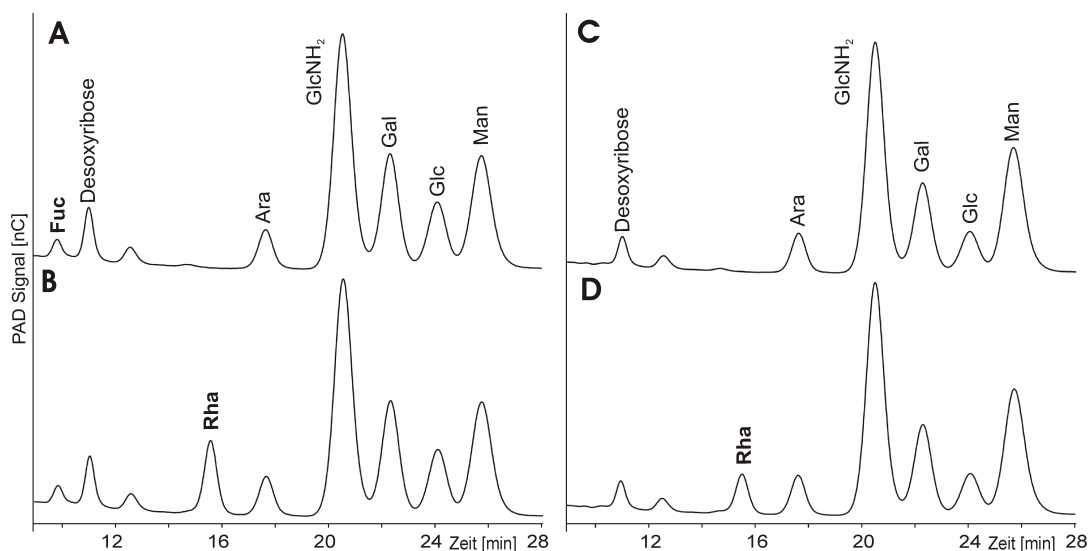


**Abb. 2.27:** HPAEC-PAD: Monosaccharide des Trastuzumab +/-RMD aus CHO. Nach TFA-Hydrolyse, ausgehend von 50  $\mu$ g gereinigten hIgGs, wurden RMD-positive Klone H1-3 mit dem RMD-negativen Kontroll-IgG über HPAEC-PAD mittels 18 mM KOH-Gradient bestimmt. A: Kontroll-IgG B: Kontroll-IgG + Rhamnose C: H2-Klon D: H2-Klon + Rhamnose

In Abb.2.27 sind die über HPAEC-PAD detektierten Monosaccharide der RMD-negativen Trastuzumab-Kontrolle der CHO-Zelllinie (A) exemplarisch denen des RMD-positiven H2-Klons (C) gegenübergestellt. Fucose mit einer Retentionszeit von 9,5 min im Kontroll-IgG (2.27 A) konnte in den RMD-positiven H1-3 Varianten des Trastuzumabs nicht nachgewiesen werden (2.27 C). Die Fucosereduktion über heterologe Expression der RMD war demnach auch in der CHO-Zelllinie erfolgreich. Neben der Fucosereduktion scheint die RMD-Expression sich positiv auf die Mannosylierung auszuwirken, so steigt der Peak der Man im Verhältnis zum GlcNAc (Abb.2.27 C) im Vergleich zur Kontrolle (Abb.2.27 A).

Zur Detektion einer potentiell probenabhängigen Verschiebung der Rhamnose-Retentionszeit wurden die Proben mit Rhamnosestandard versetzt und erneut über HPAEC-PAD analysiert. Nun erscheint sowohl im Chromatogramm der Kontrolle (Abb.2.27 B) als auch vom Klon H2 (Abb.2.27 D) jeweils ein zusätzlicher Peak bei 15,5 min. Es konnte demzufolge keine natürliche Rhamnose in den Monosacchariden der hIgGs der CHO-Zelllinie über HPAEC-PAD nachgewiesen werden.

### 2.3.2.3 Monosaccharide RMD-positiver CHO-Zelllysate



**Abb. 2.28:** HPAEC-PAD: Monosaccharide der Zelllysate RMD-positiver CHO-Zellen. Nach TFA-Hydrolyse  $1 \times 10^6$  lysierter Zellen (Kontrolle und RMD-positiver Zellen H1-3) wurden deren Monosaccharide über HPAEC-PAD mittels 18 mM KOH-Gradient bestimmt. A: Kontrolle B: Kontrolle + Rhamnose C: H2-Klon, D: H2-Klon + Rhamnose

Zur Testung der Zellfucosylierung wurden  $1 \times 10^6$  Zellen nach der Frier-Tau-Methode lysiert und dessen Glykoproteine über Zentrifugation isoliert (5.3.5.2). Nach anschließender

TFA-Hydrolyse wurden nun die Monosaccharide über HPAEC-PAD analysiert. Die Monosaccharide RMD-positiver CHO-Zellen im Vergleich zu RMD-negativen (Abb.2.28) bestätigen die Ergebnisse zum rek.IgG. Auch hier läßt sich in RMD-positiven Zellen, exemplarisch für Klon H2 (Abb.2.28 C), keine Fucose nachweisen, im Vergleich zur detektierten Fucose bei 9,5 min in CHO-Kontrollzellen (Abb.2.28 A). Ausgehend von den Monosacchariden der CHO-Zellysate nimmt die Galactosylierung in RMD-positiven Zellen anscheinend ab (Abb.2.28 C), was in Abschnitt 2.3.2.5 massenspektrometrisch näher untersucht wurde, um diesen und weitere potentielle Unterschiede in Korrelation mit der Fucosereduktion über RMD-Expression aufzuklären.

Rhamnose – als theoretisches Nebenprodukt – konnte auch in den Zellysaten RMD-positiver Zellen nicht nachgewiesen werden (Abb.2.28 C). Erst nach der Zugabe von Rhamnosestandard war Rhamnose bei 15,5min in dem Chromatogramm der Kontrolle (Abb.2.28 B) und des Klons H2 (Abb.2.28 D) erwartungsgemäß nachweisbar. In RMD-positiven CHO-Zellen konnte weder in hIgG noch in den Zellen selbst mittels HPAEC-PAD Fucose oder Rhamnose nachgewiesen werden. Da die Möglichkeit bestand, dass diese zwar vorhanden, aber unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten Methode liegen könnte, wurde in 2.3.2.4 die Nachweisgrenze (*Limit of Detection*, LOD) für Fucose und Rhamnose bestimmt.

#### 2.3.2.4 HPAEC-PAD: Bestimmung der Nachweisgrenzen

Nachdem Fucose und Rhamnose in Fucose-reduzierten Zellen und im Trastuzumab-IgG über HPAEC-PAD nicht nachgewiesen werden konnten, wurde nun die konkrete Nachweisgrenze, der LOD, bestimmt. Hierzu wurden Fucose und Rhamnose seriell 1:1 auf 10-0,02 nmol/ml verdünnt und mittels HPAEC-PAD (18 mM KOH-Gradient) in Dreifachbestimmung analysiert.

In Abb.2.29 A-I ist die stete Abnahme des PAD-Signals bei steigender Verdünnung nachzuvollziehen. Die LOD berechnet sich anhand der Daten wie folgt:

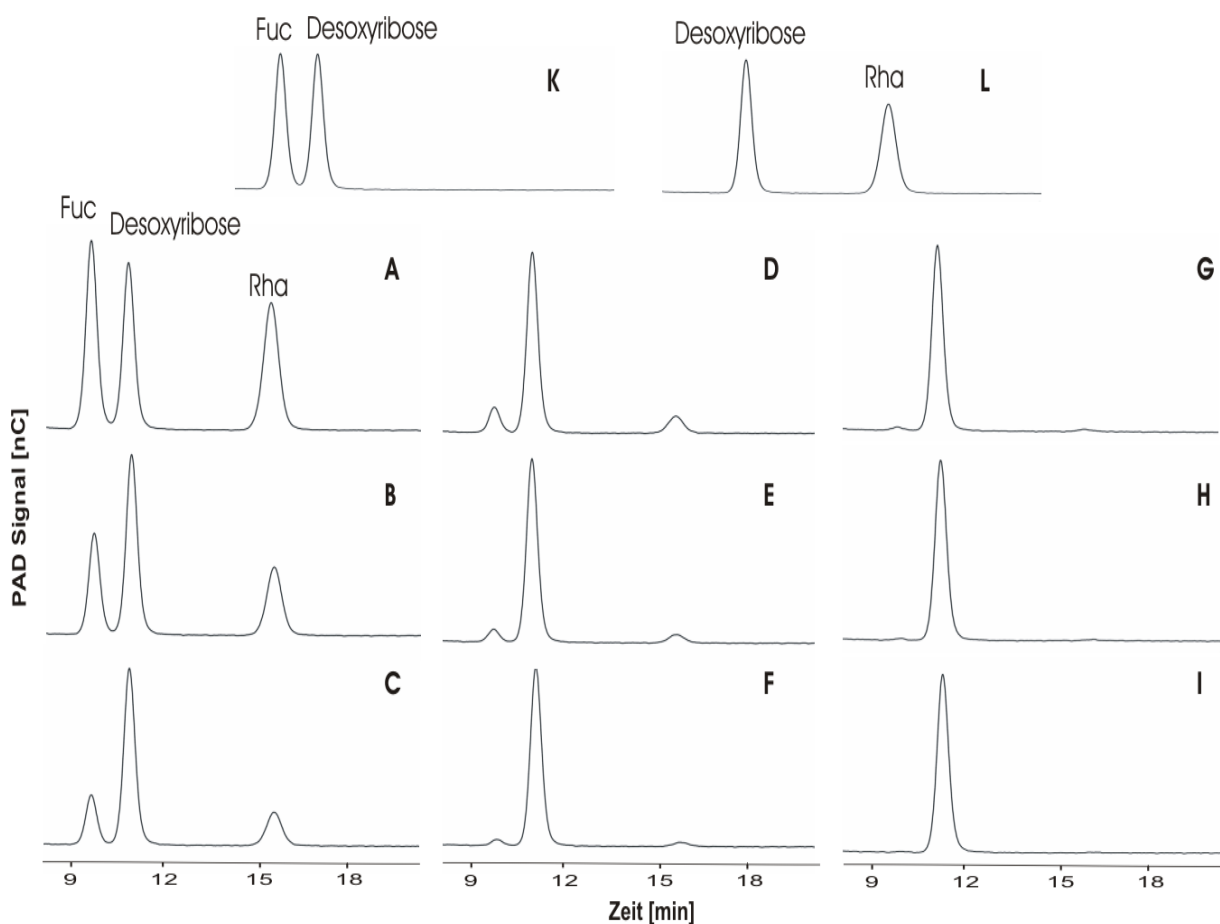
$$DL = LOD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{S} \quad (2.1)$$

DL = Detection Limit; LOD = Limit of Detection;  $\sigma$  = Standardabweichung des PAD-Signals (berechnet über Programm Origin); S = Steigung der Kalibriergeraden

$$LOD(Fuc) = \frac{3,3 \cdot 0,03805}{0,11732} = 1,07 \quad (2.2)$$

$$LOD(Rha) = \frac{3,3 \cdot 0,02953}{0,07923} = 1,23 \quad (2.3)$$

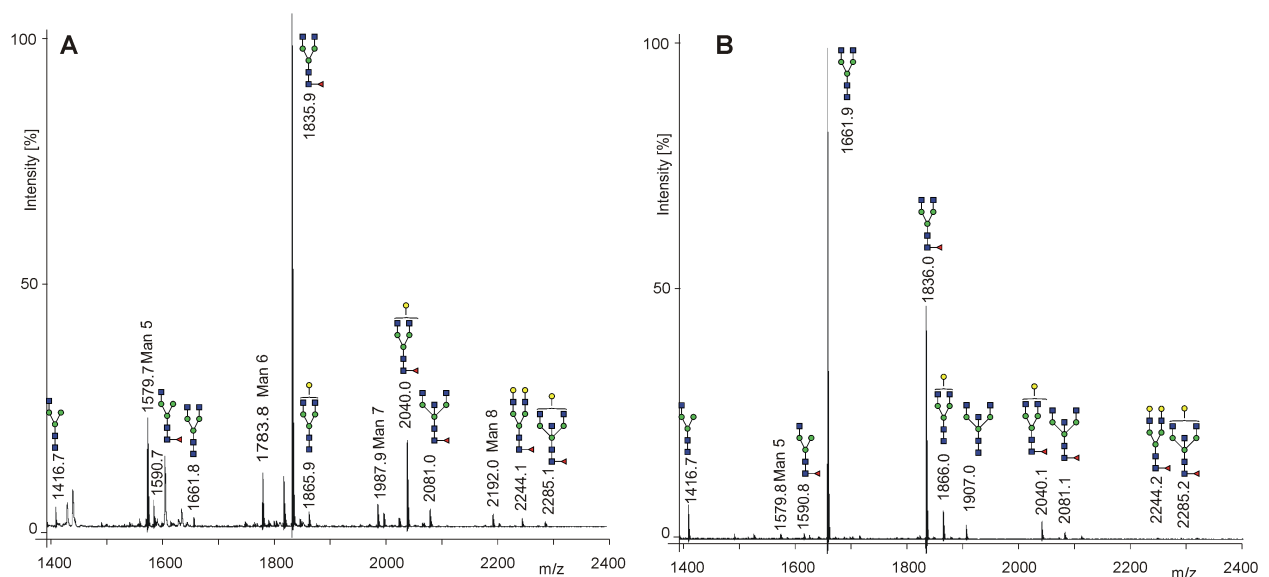
Der LOD für Rhamnose liegt demnach bei 123 pmol/ml und für Fucose bei 107 pmol/ml. Sollten Fucose oder Rhamnose in RMD-positiven Zellen bzw. dem darin exprimierten hIgG vorhanden sein, so liegen deren Konzentrationen unterhalb der genannten Nachweisgrenze der HPAEC-PAD.



**Abb. 2.29:** HPAEC-PAD: LOD-Bestimmung. 10 nmol/ml Fuc, Rha und Desoxyribose wurden seriell 1:1 mit Desoxyribose konstant 10 nmol/ml verdünnt. Die Verdünnungen wurden dreifach mittels HPAEC-PAD, 18 mM KOH-Gradient bestimmt. K: 10 nmol/ml Fuc. L: 10 nmol/ml Rha. A-I: steigende 1:1 Verdünnungen Fuc und Rha.

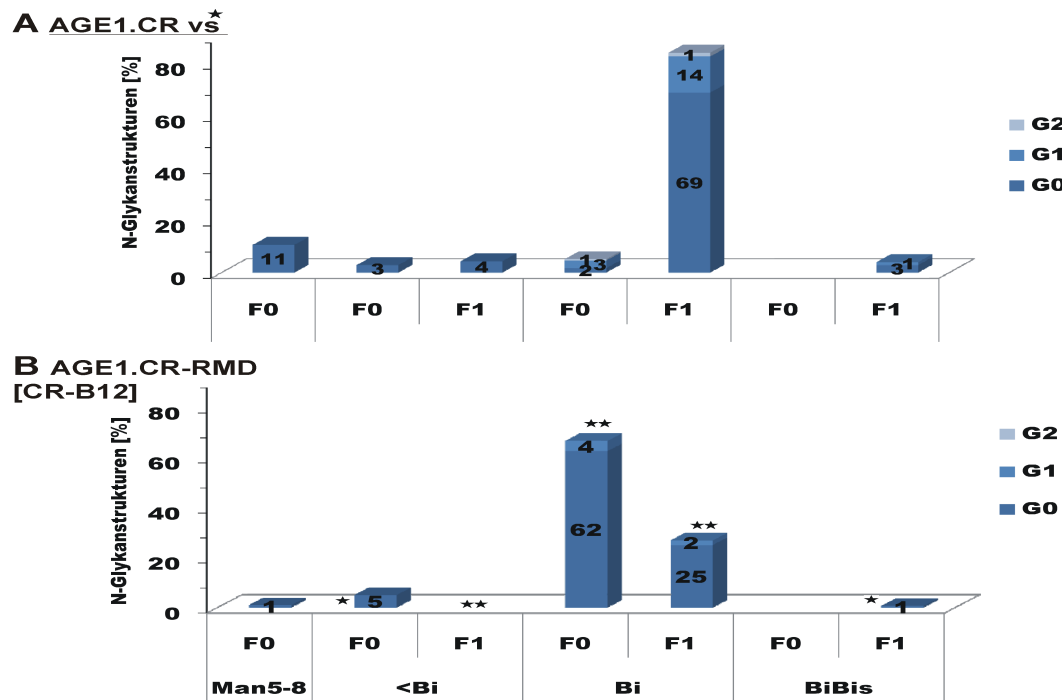
### 2.3.2.5 MALDI-TOF-MS rek.IgGs aus Entenzellen

Die MALDI-TOF-MS-Analyse isolierter N-Glykane rek.IgGs wurde zur Bestätigung der HPAEC-PAD-Daten (2.3.2.1) sowie des Erhalts zusätzlicher Strukturinformationen durchgeführt. Die N-Glykane des fucosereduzierten rek.IgGs aus RMD-positiven AGE1.CR- und AGE1.CR.pIX-Zellen wurden über Trypsin- (5.5.1.1), gefolgt vom PNGase F-Verdau (5.5.1) freigesetzt, über C18- (5.5.2.1) und Carboxygraphensäulen (5.5.2.2) entsalzt und von Peptiden getrennt. Nachdem die N-Glykane permethyliert waren (5.5.3.2), wurden sie mit Arabinosazon als Probenmatrix im Positivmodus mit Reflektor im MALDI-TOF-MS (5.5.3.3) analysiert.



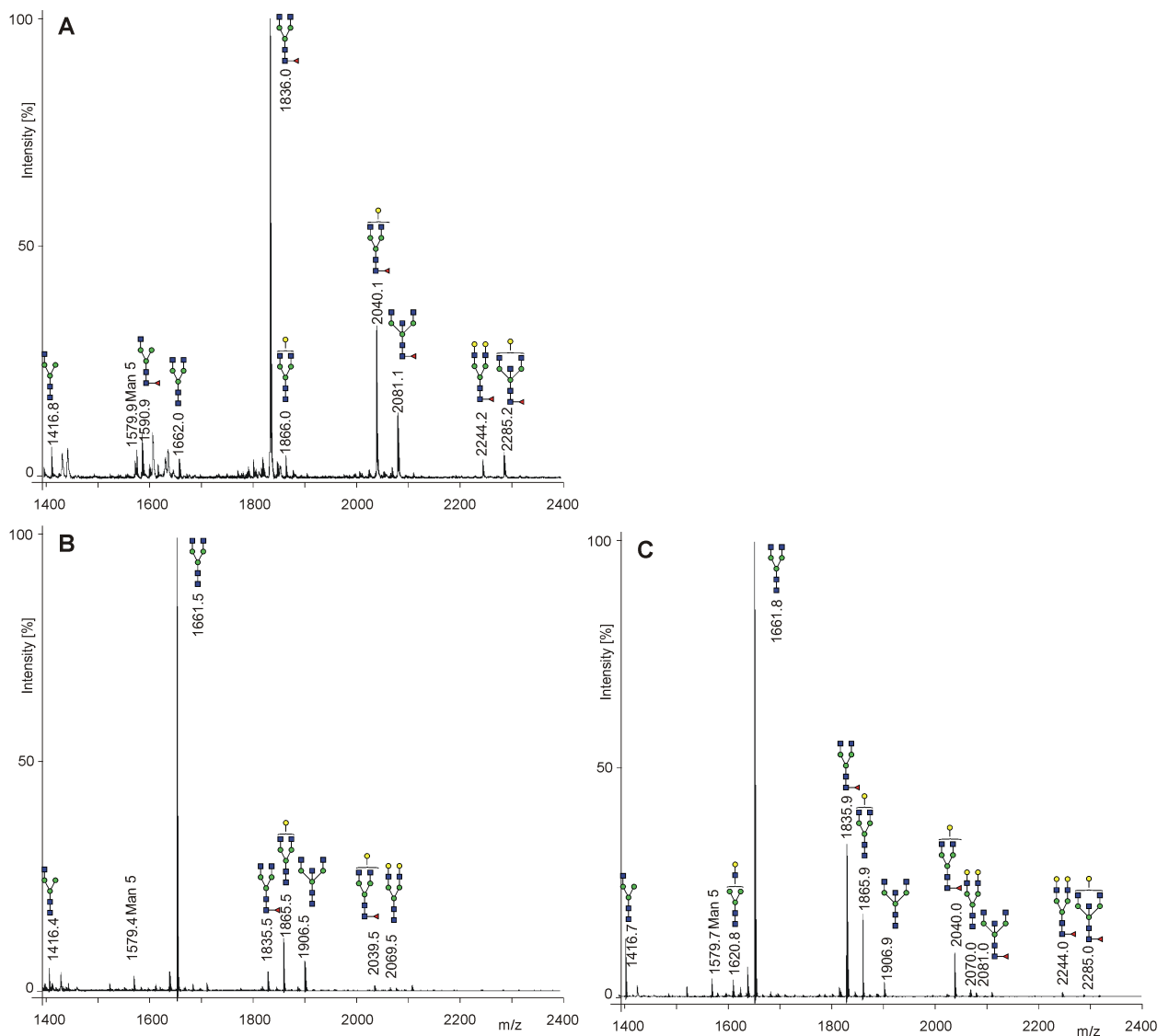
**Abb. 2.30:** MALDI-TOF-MS-Spektren permethylierter N-Glykane des rek.IgG aus der AGE1.CR-Zelllinie. Die Proben wurden mit Arabinosazon als Matrix im Positivmode mit Reflektor massenspektrometrisch analysiert  $[M+Na]^+$ . A: Kontrolle (K), B: B12 (RMD+). Nichtmarkierte Peaks konnten keinen Strukturen zugeordnet werden.  $\square$  = GlcNAc,  $\circ$  = Man,  $\diamond$  = Neu5Ac,  $\triangleleft$  = Fuc.

Die exemplarischen MALDI-TOF-MS-Spektren permethylierter N-Glykane des rek.IgGs aus RMD-positiven AGE1.CR-Zellen des Klons B12 (Abb.2.30 B) im Vergleich zu dem rek.IgG RMD-negativer AGE1.CR-Zellen (Abb.2.30 A) bestätigen die erfolgreiche Reduktion Core-fucosylierter N-Glykanstrukturen. Trotz RMD-Expression konnten zwar noch fucosylierte Strukturen mit  $m/z$  1590, 1836, 2040 und 2081 nachgewiesen werden, aber die Anteile nicht fucosylierter Strukturen mit  $m/z$  1661, 1866 und 1907 überwiegen.



**Abb. 2.31:** Zusammengefasste MALDI-TOF-MS-Daten permethylierter N-Glykane des rek.IgGs aus der AGE1.CR-Zelllinie. A: rek.IgG aus RMD-negativen Zellen mit  $n = 5$  Messungen im Positivmode mit Reflektor und Arabinosazon als Probenmatrix. B: rek.IgG aus RMD-positiven Zellen-Klon B12-mit  $n = 7$  Messungen. Die Daten wurden im Student-t Test (zweiseitig, verschiedene Varianzen) auf ihre Signifikanz im Vergleich zum Kontroll-IgG in A getestet und bei Signifikanzniveau  $p < 0,05$  mit einem Stern markiert, bei  $p < 0,001$  mit zwei Sternen markiert und bei  $p > 0,05$  nicht markiert. Man steht für ein antennäres GlcNAc, Bi für zwei antennäre GlcNAcs und BiBis steht für eine biantennäre Bisecting-Struktur. F0 = Strukturen ohne Fucose, F1 = Strukturen mit einer Fucose, G0 = Strukturen ohne Galactose, G1 = Strukturen mit einer Galactose und G2 = Strukturen mit zwei Galactosen. Sialylierte Strukturen wurden mit einem relativen Anteil  $< 1\%$  detektiert, hier dargestellt wurden nur Strukturen  $> 1\%$ .

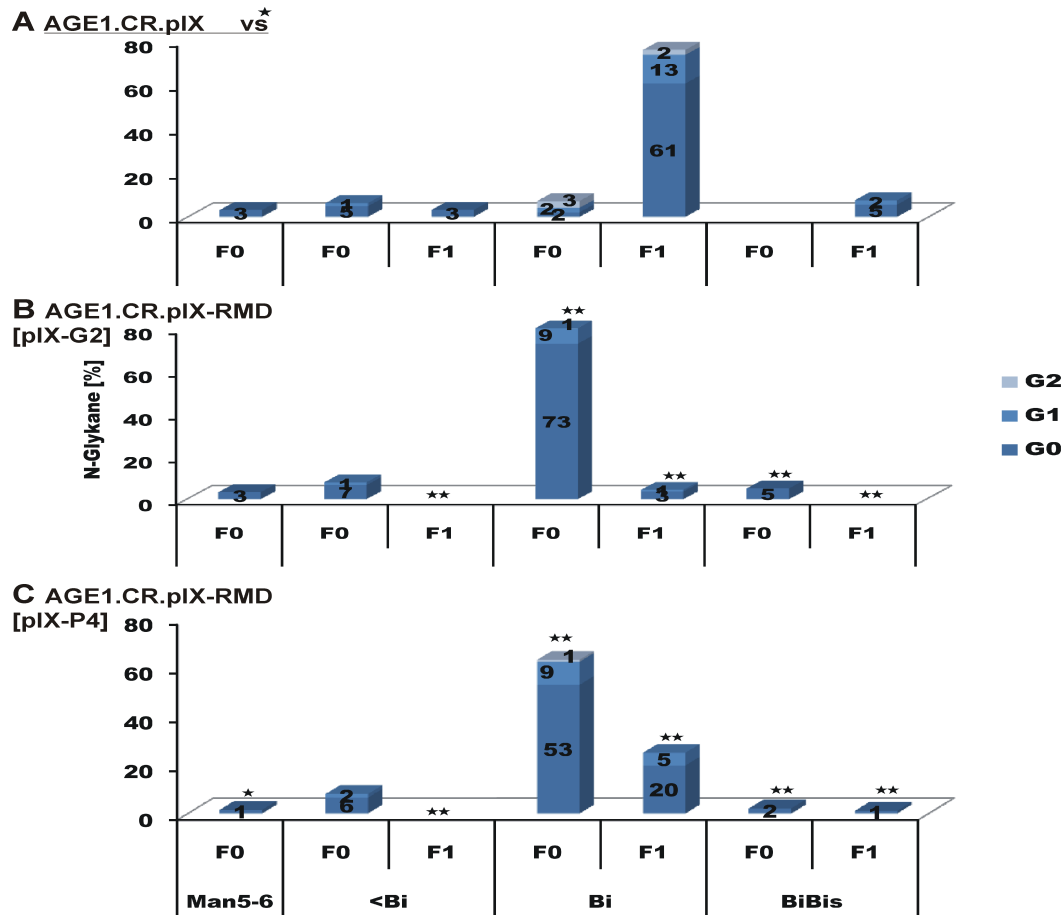
Im Vergleich der relativen Intensitäten zusammengefasster MS-Daten permethylierter N-Glykane rek.IgGs aus der AGE1.CR-Zelllinie (Abb.2.31) wird sichtbar, dass über die RMD-Expression in Klon B12 (B) eine  $\sim 70\%$ ige Fucosereduktion erreicht werden konnte. Zusätzlich fällt auf, dass die Menge der Bisecting-Struktur nach Fucosereduktion reduziert ist. Der Grad der Galactosylierung war bereits vor Fucosereduktion mit  $20\%$  überwiegend einfacher Galactosylierung relativ gering (Abb.2.31 A). Nach Fucosereduktion stieg jedoch der Anteil galactosefreier (G0) Strukturen signifikant um  $16\%$  auf  $93\%$  an (Abb.2.31 B). Die scheinbare Reduktion mannosereicher Strukturen nach Fucosereduktion (Abb.2.31 B) zeigte sich im Student-t-Test als nicht signifikant aufgrund zu hoher Varianzen der verfügbaren Daten.



**Abb. 2.32:** MALDI-TOF-MS-Spektren permetylierter N-Glykane des rek.IgGs der AGE1.CR.pIX-Zelllinie. Die Proben wurden mit Arabinosazon als Matrix im Positivmode mit Reflektor massenspektrometrisch analysiert  $[M+Na]^+$ . A: Kontrolle, B: RMD-Klon G2, C: RMD-Klon P4. Nichtmarkierte Peaks konnten keinen Strukturen zugeordnet werden.  $\square$  = GlcNAc,  $\circ$  = Man,  $\triangle$  = Gal,  $\diamond$  = Neu5Ac,  $\blacktriangle$  = Fuc.

Wie bereits in rek.IgG des Klons B12 der AGE1.CR-Zelllinie führte die RMD-Expression auch bei Klon P4 der AGE1.CR.pIX-Zelllinie zu keiner vollständigen Fucosereduktion. So konnten auch hier noch deutliche Mengen fucosylierter Strukturen des  $m/z$  1835, 2040, 2244 und 2285 detektiert werden (Abb.2.32 C). N-Glykane des rek.IgG des Klons G2 hingegen zeigen fast ausschließlich nicht fucosylierte Strukturen des  $m/z$  1835 und 2039 (Abb.2.32 B). Die stärkere Fucosereduktion bei Klon G2 der AGE1.CR.pIX-Zelllinie im Vergleich zu Klon P4 korreliert vermutlich mit dessen stärkerer RMD-Expression (Abb.2.42b). Neben der Be-

stätigung der erfolgreichen Fucosereduktion über RMD-Expression konnten über MALDI-TOF-MS keine zusätzlichen Strukturen in rek.IgG aus Entenzellen nachgewiesen werden. Der Eingriff in den Fucosesyntheseweg ist demnach hochspezifisch.



**Abb. 2.33:** Zusammengefasste MALDI-TOF-MS-Daten permethylierter N-Glykane des rek.IgGs aus der AGE1.CR.pIX-Zelllinie. A: rek.IgG aus RMD-negativen Zellen mit n=14 Messungen im Positivmode mit Reflektor und Arabinosazon als Probenmatrix. B: rek.IgG aus RMD-positiven Zellen (Klon G2) mit n=12 Messungen und C: rek.IgG aus RMD-positiven Zellen (Klon P4) mit n=12 Messungen. Die Daten wurden im Student-t Test (zweiseitig, verschiedene Varianzen) auf ihre Signifikanz im Vergleich zum Kontroll-IgG in A getestet und bei Signifikanzniveau  $p < 0,05$  mit einem Stern markiert, bei  $p < 0,001$  mit zwei Sternen markiert und bei  $p > 0,05$  nicht markiert. „Man“ steht für mannosereiche Strukturen, welche mit ihrem prozentualen Anteil aller identifizierter Strukturen aufgetragen wurden. Die komplexen N-Glykane wurden unabhängig von mannosereichen Strukturen mit den jeweilig prozentualen Anteilen dargestellt. „Mono“ steht für ein antennäres GlcNAc, „Bi“ für zwei antennäre GlcNAcs und „BiBiS“ steht für eine biantennäre Bisecting-Struktur, „F0“ = Strukturen ohne Fucose, „F1“ = Strukturen mit einer Fucose, „G0“ = Strukturen ohne Galactose, „G1“ = Strukturen mit einer Galactose und „G2“ = Strukturen mit zwei Galactosen. Sialylierte Strukturen wurden mit einem relativen Anteil  $< 1\%$  detektiert, hier dargestellt wurden nur Strukturen  $> 1\%$ .

Im Vergleich der relativen Intensitäten zusammengefasster MS-Daten permethylierter N-Glykane rek.IgGs aus der AGE1.CR.pIX-Zelllinie (Abb.2.33) zeigt Klon G2 (B) zu 96 % und Klon P4 (C) 74 % nicht fucosylierte (F0) Strukturen. Anscheinend führt eine stärkere RMD-



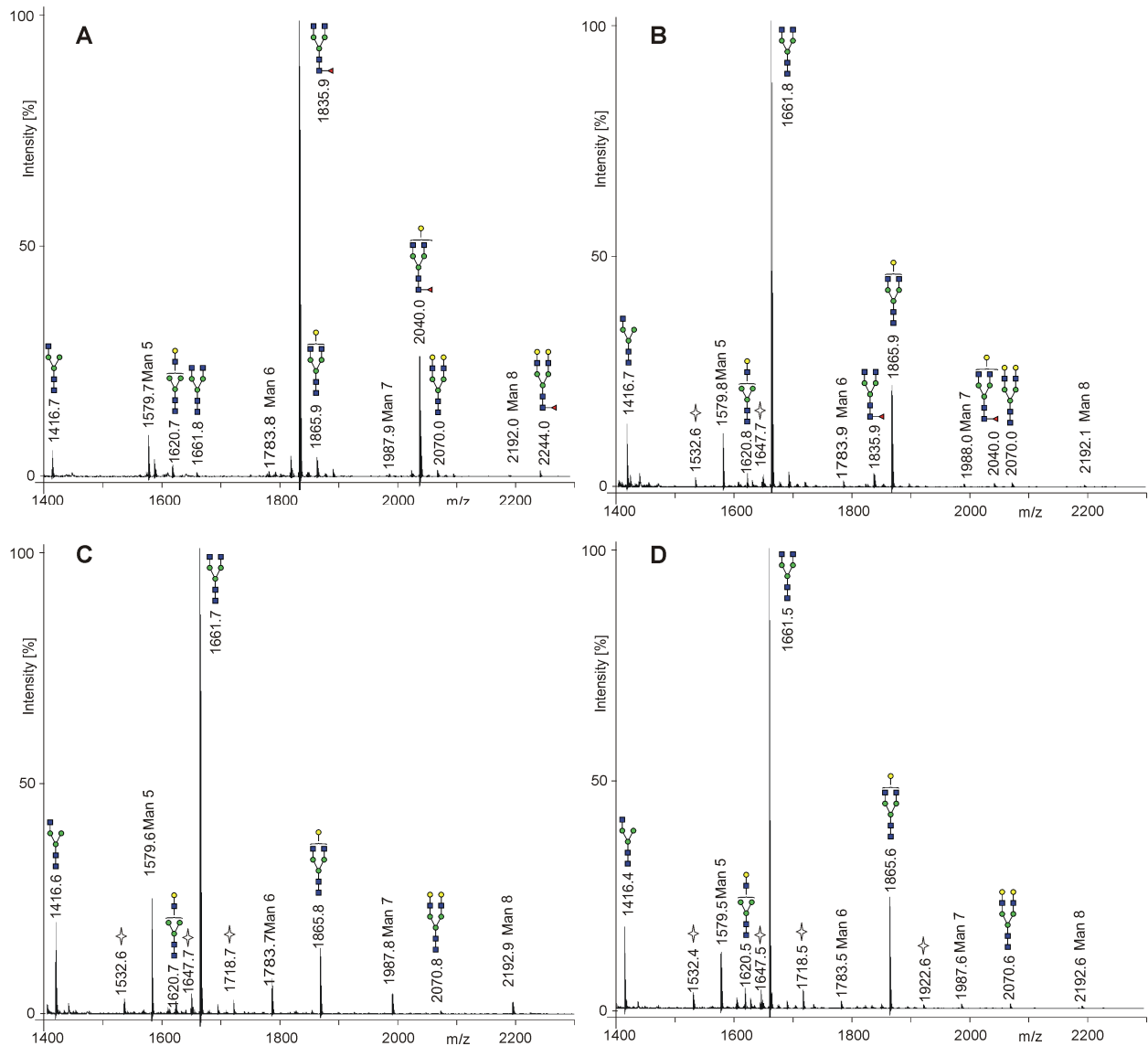
Expression, wie sie bei Klon G2 über RT-PCR nachgewiesen werden konnte (Abb.2.42b), zu einer höheren Fucosereduktion. Auch nach Fucosereduktion in der AGE1.CR.pIX-Zelllinie tritt eine signifikante Reduktion der Bisecting-Struktur auf (BiBis), bei rek.IgG des Klons P4 (Abb.2.33 C) um 60 %, wobei die Reduktion der Bisecting-Struktur in rek.IgG des Klons G2 mit 30 % (Abb.2.33 B) nicht linear mit dem Grad der Fucosereduktion korreliert. In AGE1.CR.pIX-Zelllinie bestätigt sich die Beobachtung der AGE1.CR-Zelllinie. Bei RMD-Expression steigt der Anteil galactosefreier (G0) Strukturen an, was mit 14 % bei rek.IgG des Klons G2 (B) und 6 % bei rek.IgG des Klons P4 (C) mit dem Grad der Fucosereduktion korreliert. Der Anteil mannosereicher Strukturen ist zwar in rek.IgG des Klons P4 (C) um  $\sim 70$  % signifikant reduziert, scheint jedoch nicht mit der RMD-Expression zu korrelieren, da bei Klon G2 (B) keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl mannosereicher Strukturen detektiert wurden.

Im Gegensatz zur Galactosylierung wurden in der Literatur für die Bisecting-Struktur ADCC-verstärkende Eigenschaften beschrieben, wenngleich in geringerem Maße als durch fehlende Core-Fucose [28]. Die hier auftretende Reduktion der Bisecting-Struktur bei gleichzeitiger Fucosereduktion könnte demzufolge die Stärke der Aktivitätssteigerung schmälern. Nachdem die Fucosereduktion mittels stabiler RMD-Expression erfolgreich in den Entenzelllinien AGE1.CR und AGE1.CR.pIX nachgewiesen werden konnte, stellte sich nun die Frage nach dem Grad der Funktionssteigerung des rek.IgGs, welcher in 2.3.3.1 über den Fc $\gamma$ -Rezeptor-Bindungsassay nachgegangen wurde. Interessant war vor allem die Frage, ob sich die verschieden starke Fucosereduktion auch in Form verschiedener Bindungsaktivitäten widerspiegeln würde. Nach Iida et al. [75] wird aufgrund der Konkurrenz von fucosylierten und nicht fucosylierten IgGs um die Antigenbindungsstelle eine geringere ADCC-Verstärkung bei unvollständiger Fucosereduktion erwartet.

### **2.3.2.6 MALDI-TOF-MS: Trastuzumab aus RMD-positiven CHO-Zellen**

In Abb.2.34 B-D sind exemplarische MALDI-TOF-MS-Spektren permetylierter N-Glykane des Trastuzumab-Antikörpers exprimiert in RMD-positiven CHO-Zellen denen des nicht fucosereduzierten Trastuzumabs (Abb.2.34 A) gegenübergestellt. Die N-Glykane wurden wie in 2.3.2.5 präpariert und massenspektrometrisch analysiert. Für alle drei Klone H1-3 (Abb.2.34 B-D) konnten keine bzw. nur Minimalmengen fucosylierter Strukturen für Klon

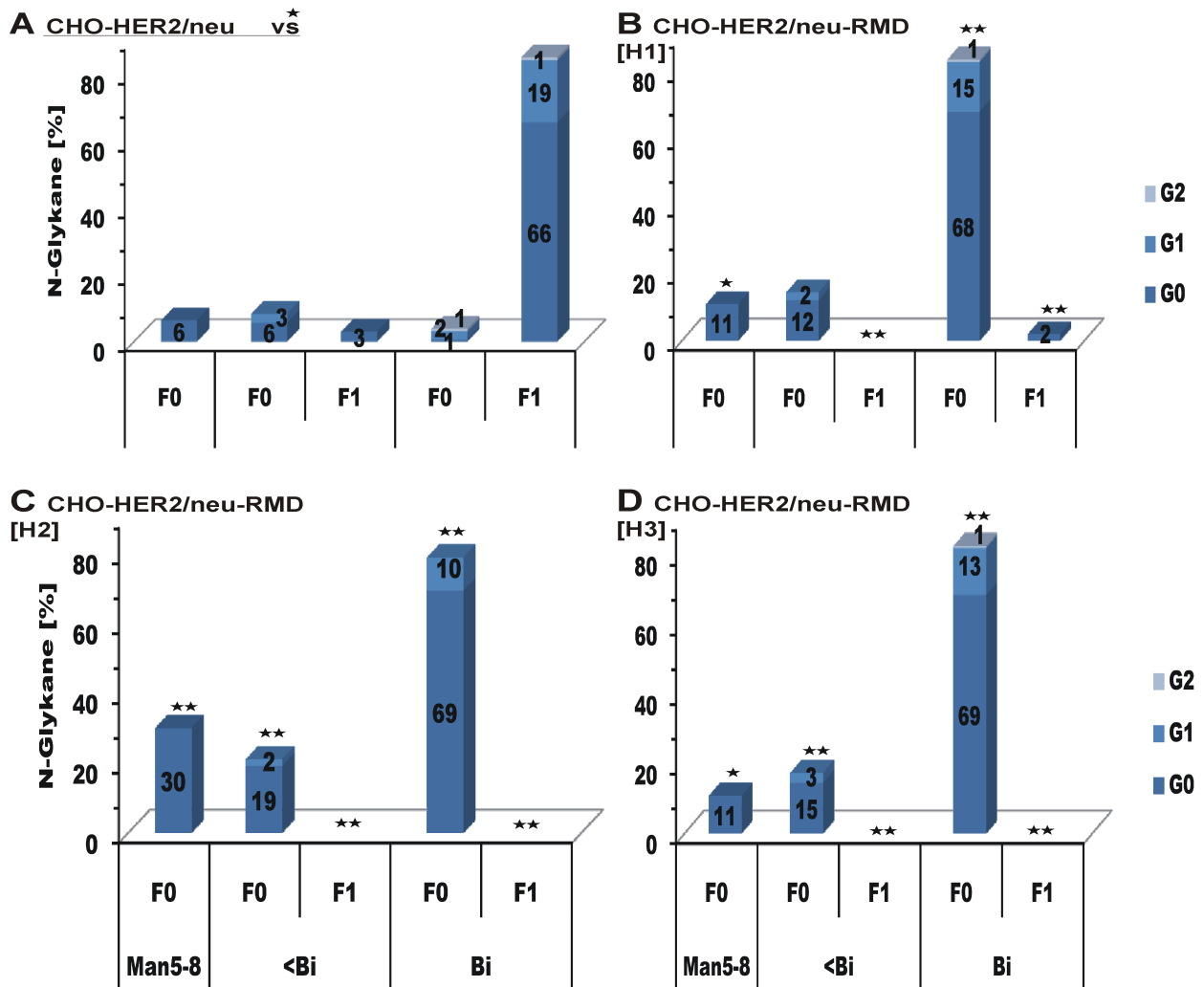
H2 mit  $m/z$  1809 detektiert werden (Abb.2.34 c). Auch in rek.IgG aus RMD-positiver CHO-Zellen konnten zwar fucosereduzierte, aber keine zusätzlichen durch RMD induzierten Strukturen identifiziert werden.



**Abb. 2.34:** MALDI-TOF-MS-Spektren desialylierter N-Glykane des Trastuzumab exprimiert in der CHO-Zelllinie. Die Proben wurden mit Arabinosazon als Matrix im Positivmode mit Reflektor massenspektrometrisch analysiert  $[M+Na]^+$ . A: Kontrolle, B: Klon H1, C: Klon H2, D: Klon H3. Mit Sternen markierte Massen konnten keinen Strukturen zugeordnet werden.  $\square$  = GlcNAc,  $\circ$  = Man,  $\triangle$  = Gal,  $\diamond$  = Neu5Ac,  $\blacktriangleleft$  = Fuc.

Im Vergleich der relativen Intensitäten der zusammengefassten MS-Daten von permethylierten N-Glykanen des rekombinanten Trastuzumab aus der CHO-Zelllinie (Abb.2.35) zeigen alle RMD-positiven Klone H1-3 (B-D) eine nahezu 100-prozentige Fucosereduktion. Ledig-

lich Klon H1 (B) zeigt restliche einfachfucosylierte N-Glykane von 2% der Gesamtmenge komplexer N-Glykane.

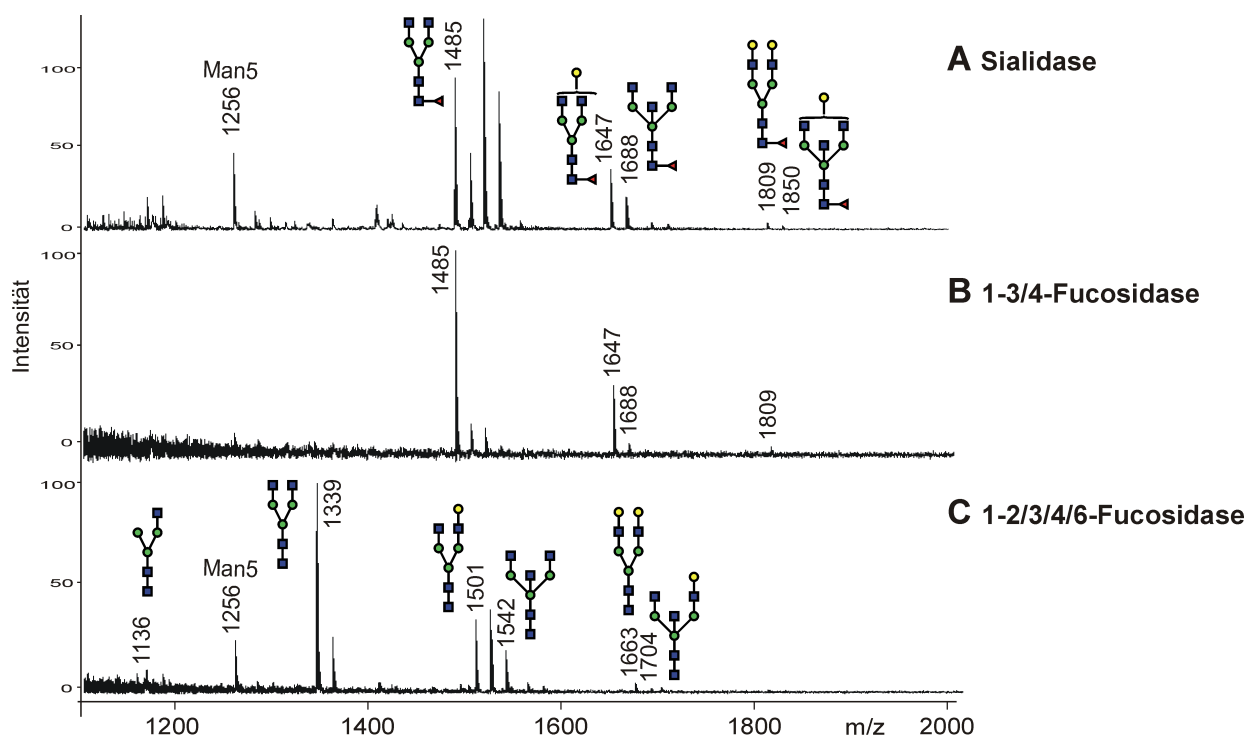


**Abb. 2.35:** Zusammengefasste MALDI-TOF-MS-Daten permethylierter N-Glykane des Trastuzumab exprimiert in der CHO-Zelllinie. A: Trastuzumab aus RMD-negativen Zellen mit  $n = 12$  Messungen im Positivmode mit Reflektor und Arabinosazon als Probenmatrix. B: Trastuzumab aus RMD-positiven Zellen (Klon H1) mit  $n = 5$  Messungen, C: Trastuzumab aus RMD-positiven Zellen (Klon H2) mit  $n = 11$  Messungen und D: Trastuzumab aus RMD-positiven Zellen (Klon H3) mit  $n = 4$  Messungen. Die Daten wurden im Student-t Test (zweiseitig, verschiedene Varianzen) auf ihre Signifikanz im Vergleich zum Kontroll-IgG in A getestet und bei Signifikanzniveau  $p < 0,05$  mit einem Stern markiert, bei  $p < 0,001$  mit zwei Sternen markiert und bei  $p > 0,05$  nicht markiert. „Man“ steht für mannosereiche Strukturen, welche mit ihrem prozentualen Anteil aller identifizierter Strukturen aufgetragen wurden. Die komplexen N-Glykane wurden unabhängig von mannosereichen Strukturen mit den jeweilig prozentualen Anteilen dargestellt. „Mono“ steht für ein antennäres GlcNAc, „Bi“ für zwei antennäre GlcNAcs und „BiBis“ steht für eine biantennäre Bisecting-Struktur, „F0“ = Strukturen ohne Fucose, „F1“ = Strukturen mit einer Fucose, „G0“ = Strukturen ohne Galactose, „G1“ = Strukturen mit einer Galactose und „G2“ = Strukturen mit zwei Galactosen. Sialylierte Strukturen wurden mit einem relativen Anteil  $< 1\%$  detektiert, hier dargestellt wurden nur Strukturen  $> 1\%$ .

Auch bei RMD-exprimierenden CHO-Zellen ist eine signifikante Erhöhung nicht galactosy-

lierter Strukturen (G0) zu verzeichnen, um 13 % für Klon H1 (Abb.2.35 B), um 20 % für Klon H2 (C) und um 12 % für Klon H3 (D), was die Beobachtung in RMD-exprimierenden Entenzellen bestätigt (Abb.2.33). Entgegen den Ergebnissen in Entenzellen zeigen alle CHO-Klone H1-3 signifikant höhere Mengen mannosereicher Strukturen, was in Klon H2 mit einer sechsfachen Menge gegenüber der Kontrolle (A) besonders stark hervortritt. Zusätzlich unterscheiden sich die Klone signifikant in gesteigerter Menge monoantennärer Strukturen (MonoF0) von der Kontrolle. Aufgrund der nach Zhou et al. [74] veröffentlichten ADCC-Steigerung durch mannosereiche Strukturen, wurde für die Funktionsstudien (Abschnitt 2.3.3) des Trastuzumabs nicht nur eine Aktivitätssteigerung durch die erfolgreiche Fucosereduktion, sondern eine zusätzliche Aktivitätssteigerung für Trastuzumab des Klons H2 erwartet.

### 2.3.2.7 Fucosylierungstyp des Trastuzumab aus der CHO-Zelllinie

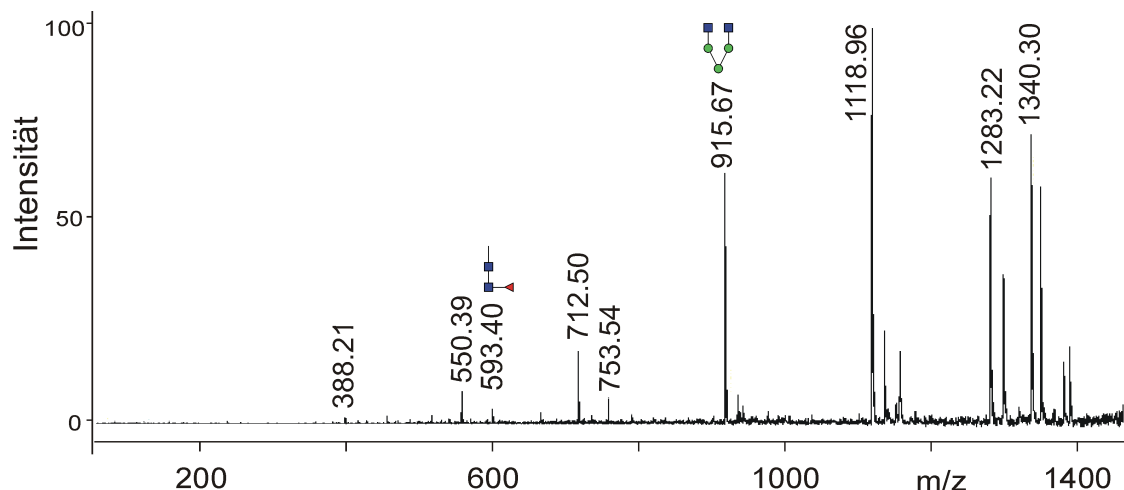


**Abb. 2.36:** Exemplarische MALDI-TOF-MS-Spektren desialylierter N-Glykane des Trastuzumab, exprimiert in der CHO-Zelllinie nach Sialidase-Verdau (A), nach  $\alpha$ 1-3/4-Fucosidase-Verdau (B), nach  $\alpha$ Fucosidase-Verdau (C), zur Unterscheidung zwischen Core- und antennärer Fucose.  $[M+Na]^+$ . □ = GlcNAc, ○ = Man, ◊ = Gal, ◇ = Neu5Ac, ◁ = Fuc.

Für in CHO-Zellen exprimierte Trastuzumab-Antikörper sollte im Folgenden der Fucosylierungstyp geklärt werden. Da die Zellen bereits beim Tumor-spezifischen rek.IgG mit unbekanntem Antigen eine Core-Fucosylierung aufwiesen, wird dies auch für Trastuzumab aus selbigen Zellen erwartet. Das wurde mittels spezifischer Fucosidasen sowie über die massenspektrometrische Fragmentierung untersucht.

Die ausbleibende Fucose-Abspaltung mittels  $\alpha$ 1-3/4-Fucosidase (Abb.2.36 B) im Vergleich zu dem erfolgreichen Verdau mit der  $\alpha$ 1-2/3/4/6-Fucosidase (Abb.2.36 C) bestätigt die vermutete Core-Fucosylierung der N-Glykane.

Zur Bestätigung der Fucosidaseergebnisse wurden die fucosylierten Strukturen mittels MALDI-TOF/TOF fragmentiert und exemplarisch für die Hauptstruktur BiG0F1  $m/z$  1485 (Abb.2.37) dargestellt.



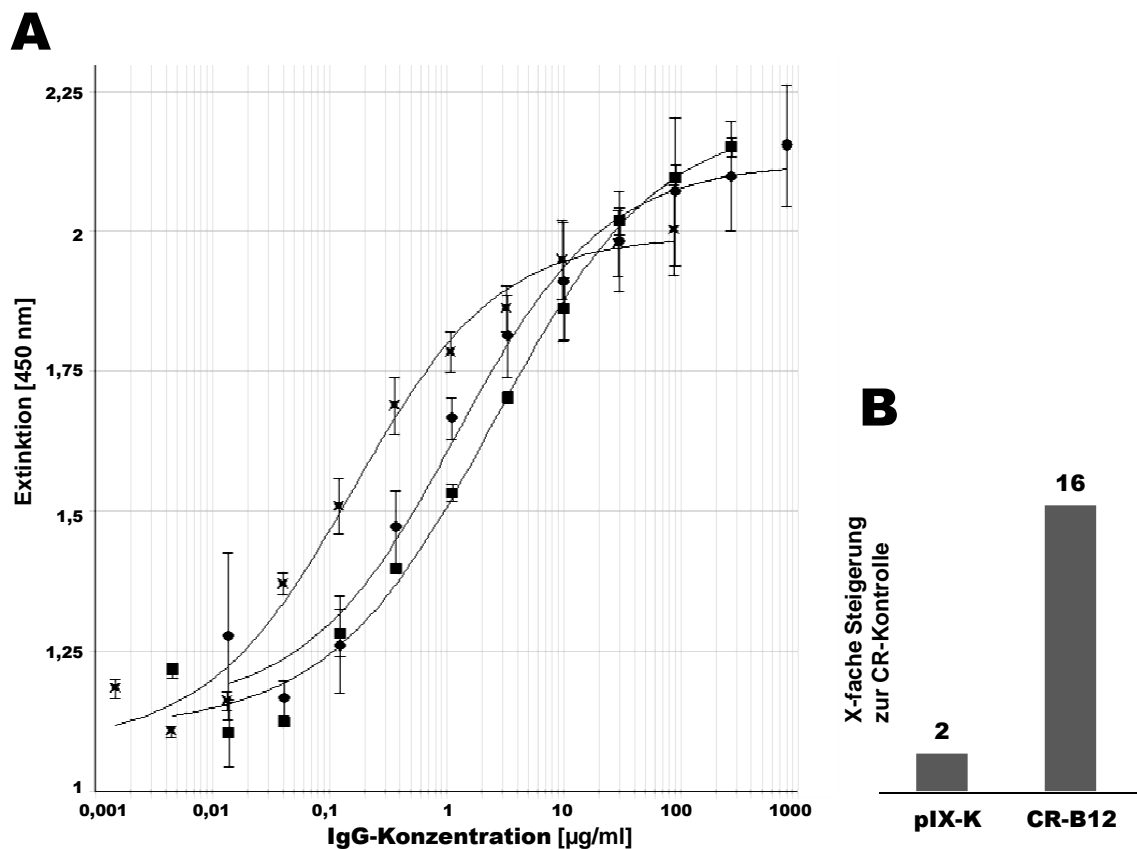
**Abb. 2.37:** Exemplarische MALDI-TOF/TOF-Spektren desialylierter N-Glykane des Trastuzumab exprimiert in der CHO-Zelllinie nach Sialidase-Verdau. Fragmentspektrum des Mutterpeaks  $m/z$  1485  $[M+Na]^+$ . Das entscheidende Peakfragment ist markiert. Die Glykane wurden in Arabinosazon als Matrix im LIFT-modus mit Reflektor mittels MALDI-TOF-MS analysiert.  $\square$  = GlcNAc,  $\circ$  = Man,  $\circ$  = Gal,  $\diamond$  = Neu5Ac,  $\blacktriangleleft$  = Fuc.

In allen Spektren fragmentierter Strukturen des Trastuzumab aus CHO-Zellen ließ sich das Fragment dHex1Hex2 mit  $m/z$  593,4 (Abb.2.37 B) nachweisen und bestätigt somit dessen Core-Fucosylierung.

## 2.3.3 Funktionsstudien

### 2.3.3.1 IgG-Fc $\gamma$ RIIIa-Bindungsassay

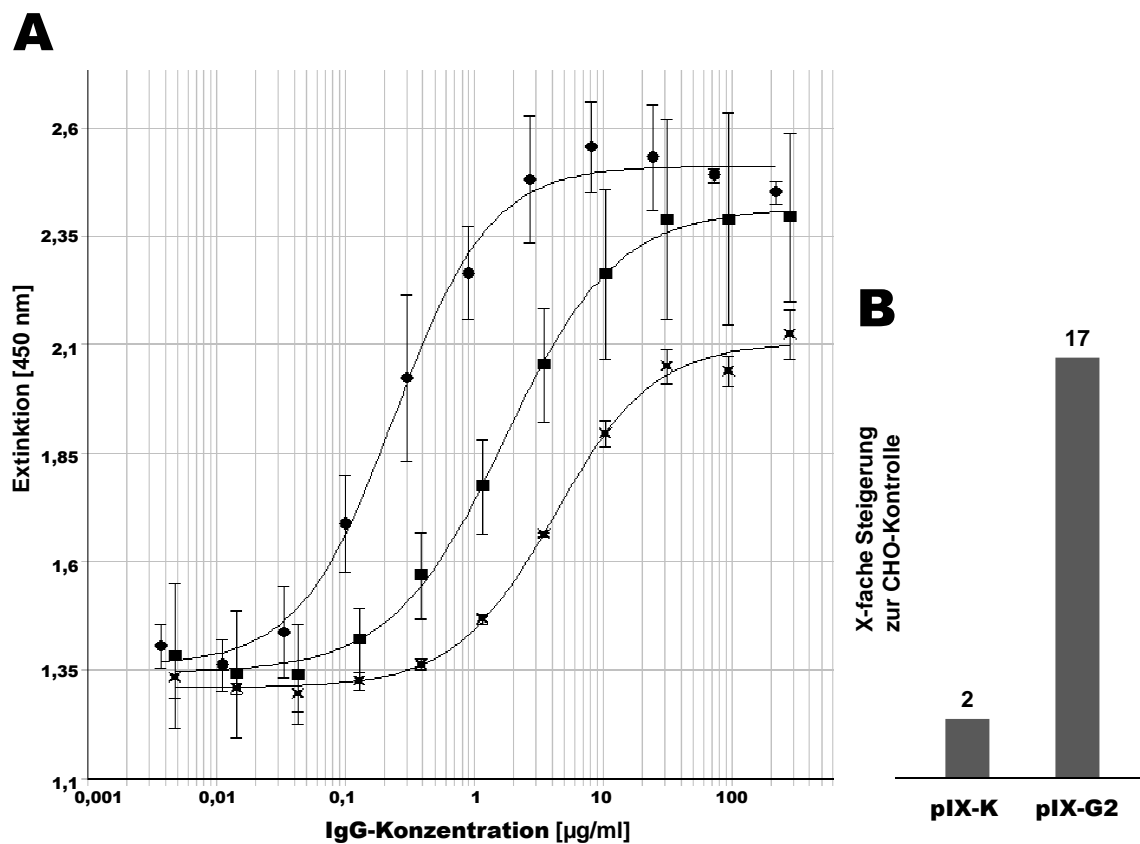
Nachdem Tumor-spezifisches rek.IgG in AGE1.CR-, AGE1.CR.pIX- und CHO-Zelllinien exprimiert, aufgereinigt und dessen N-Glykosylierung untersucht wurde, war es nun besonders interessant, die funktionelle Relevanz detektierter Unterschiede in der N-Glykosylierung zu untersuchen. Hierzu wurden alle rek.IgGs inklusive Trastuzumab auf ihre Fc $\gamma$ RIIIa-Bindungseigenschaften hin getestet und verglichen.



**Abb. 2.38:** Fc $\gamma$ RIIIa-Bindungsassay rek.IgG exprimiert in der AGE1.CR-Zelllinie. A: Bindungskurven des RMD-negativen, fucosylierten Kontroll-IgGs der AGE1.CR-Zelllinie (AGE1.CR-K,  $\square$ ), des RMD-negativen, fucosylierten Kontroll-IgGs aus AGE1.CR.pIX-Zelllinie (AGE1.CR.pIX-K,  $\diamond$ ) und des RMD-positiven, Fucose-reduzierten IgGs des Klons B12 aus AGE1.CR-Zelllinie (AGE1.CR-B12,  $\times$ ). B: X-fache Steigerung der IgG-Fc $\gamma$ RIIIa-Bindung (Faktor der EC<sub>50</sub> AGE1.CR-Kontroll-IgG vs AGE1.CR.pIX-K und vs AGE1.CR-B12).

Die IgG-Bindungsaktivität zu dem Fc $\gamma$ RIIIa stellt eine indirekte Detektion der ADCC-Aktivität des IgGs dar. Der Rezeptor ist auf Fc-Effektorzellen, wie natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), lokalisiert und löst bei IgG-Bindung über die Ausschüttung von Granzymen und

Perforinen die Lyse der IgG-gebundenen Zelle aus (s. Abb. 1.7, S. 10). Es wurden verschiedene Verdünnungen fucosylierten und defucosylierten rek. IgGs aus AGE1.CR-, AGE1.CR.pIX- und CHO-Zelllinien mit dem Fc $\gamma$ RIIIa des Typs 158F nach 5.4.6.2 inkubiert und jeweils deren Bindungskurven nach photometrischer Detektion in Abhängigkeit von der eingesetzten IgG-Konzentration graphisch aufgetragen. Der Wendepunkt der jeweiligen sigmoidalen Bindungskurve entspricht der EC<sub>50</sub> und wird für den Vergleich der Aktivität der verschiedenen rek. IgGs herangezogen.



**Abb. 2.39:** Fc $\gamma$ RIIIa-Bindungsassay rek. IgG exprimiert in der AGE1.CR.pIX-Zelllinie. A: Bindungskurven des RMD-negativen, fucosylierten Kontroll-IgGs aus der AGE1.CR.pIX-Zelllinien (AGE1.CR.pIX-K, □), des RMD-negativen, fucosylierten Kontroll-IgGs aus der CHO-Zelllinie (CHO-K, ×) und des RMD-positiven, Fucose-reduzierten IgGs aus Klon G2 der AGE1.CR.pIX-Zelllinie (AGE1.CR.pIX-G2, ◇). B: X-fache Steigerung der IgG-Fc $\gamma$ RIIIabindung (Faktor der EC<sub>50</sub> CHO-K vs AGE1.CR.pIX-K und vs AGE1.CR.pIX-G2).

Im Vergleich zum fucosylierten rek. IgG, exprimiert in der AGE1.CR-Zelllinie (Abb. 2.38 □), zeigt sich fucosyliertes rek. IgG aus der AGE1.CR.pIX-Zelllinie (Abb. 2.38 ◇) mit einer zweifach stärkeren Fc $\gamma$ -Rezeptorbindung, was in der höheren Menge komplexer N-Glykane des Bisecting-Typs begründet sein könnte. Eine ADCC-Steigerung durch die Bisecting-Struktur,

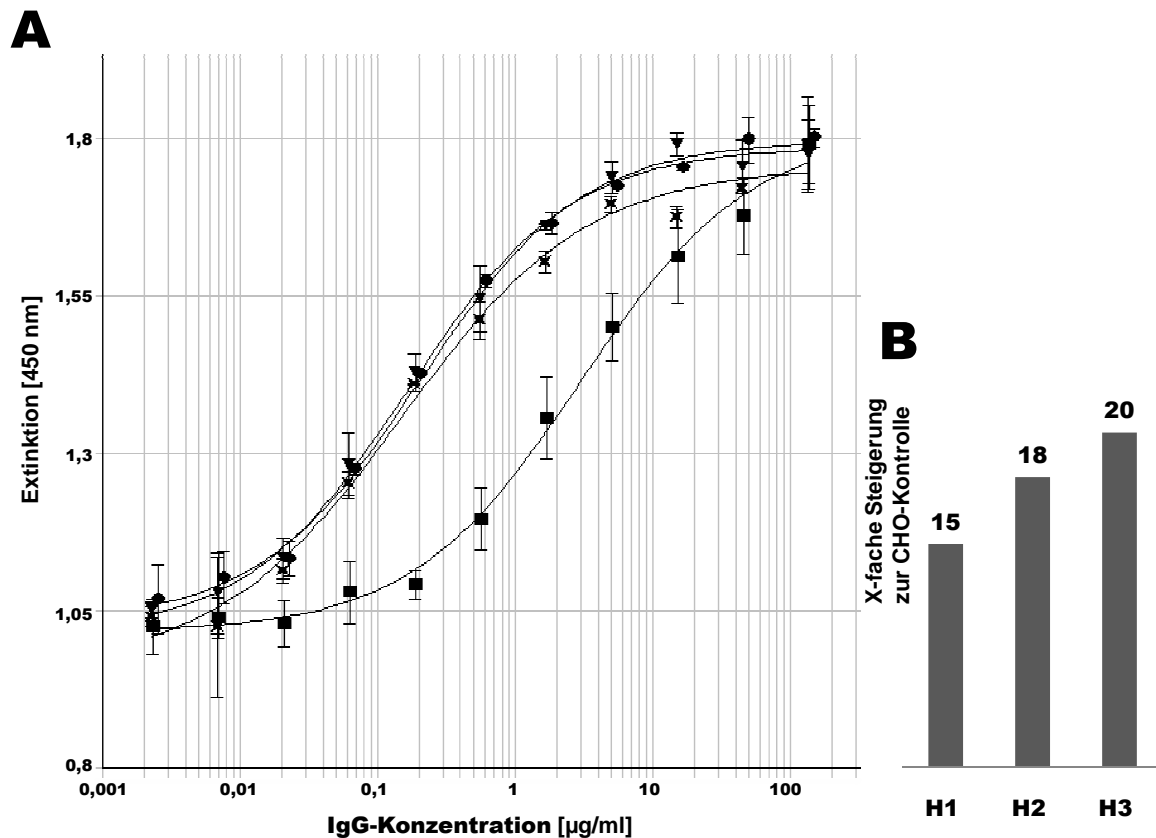
wenngleich in geringerem Ausmaße als durch eine geringere Fucosylierung, konnte bereits veröffentlicht werden [43, 73]. Erwartungsgemäß zeigt sich bei dem Fucose-reduzierten rek.IgG, exprimiert in dem Klon B12 der AGE1.CR-Zelllinie (AGE1.CR-B12), im Vergleich zur fucosylierten Kontrolle eine 16fache Steigerung der Fc $\gamma$ -Rezeptorbindung. Eine Fucosereduktion von 70 % reicht demnach bereits für eine signifikante Funktionssteigerung aus (Abb.2.38  $\times$ ). Nach Iida et al. [75] stellt sich jedoch die Frage, ob die Konkurrenz der verbleibenden 30 % an fucosylierten mit den 70 % erfolgreich nicht fucosylierten rek.IgG um die Antigenbindungsstelle den verstärkenden ADCC-Effekt schmälert und somit die in vivo Fc $\gamma$ RIIIa-Bindung bei 100-prozentiger Fucosereduktion doch höher wäre.

Im Fc $\gamma$ RIIIa-Bindungsassay zeigt sich das fucosylierte rek.IgG aus der AGE1.CR.pIX-Zelllinie (Abb.2.39  $\square$ ) im Vergleich zu dem fucosylierten aus der CHO-Zelllinie (Abb.2.39  $\times$ ) mit zweifach geringerer EC<sub>50</sub>, also einer zweifach höheren Bindungsaktivität, was wahrscheinlich ebenfalls mit der Bisectingstruktur als einzigem hier relevanten Unterschied in der N-Glykosylierung zu erklären ist. Die 17fache Aktivitätssteigerung des Fucose-reduzierten rek.IgGs aus Klon G2 der Zelllinie AGE1.CR.pIX (AGE1.CR.pIX-G2, Abb.2.39 B) entspricht trotz der nur 6 % restlich fucosylierten Strukturen der 16fachen Aktivitätssteigerung des rek.IgGs aus Klon B12 der AGE1.CR-Zelllinie (Abb.2.38) mit 30 % restlichen fucosylierten Strukturen. Dies bestätigt die Ergebnisse von Scallon et al. [136], wonach keine vollständige Fucosereduktion für eine maximale ADCC-Steigerung notwendig ist.

### 2.3.3.2 Fc $\gamma$ RIIIa-Bindungsassay des Trastuzumab aus der CHO-Zelllinie

Erwartungsgemäß führt die starke Fucosereduktion von nahezu 100 % bei den Klonen H1-3 des Trastuzumab aus der CHO-Zelllinie ebenfalls zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung in der Fc $\gamma$ RIIIa-Bindungsstudie (Abb.2.40). In Abb.2.40 A sind die Bindungskurven der nicht fucosylierten Trastuzumab H1-3 ( $\diamond$ ,  $\triangle$ ,  $\square$ ) deutlich auf der X-Achse nach links, also in den Bereich geringerer IgG-Konzentration verschoben, welche nach dem Vergleich ihrer EC<sub>50</sub>-Werte zur Kontrolle (Abb.2.40 B) eine Aktivitätssteigerung von 16-19fach aufweisen. Trotz größerer Unterschiede der relativen Menge galactosylierter und mannosereicher Strukturen, unterscheidet sich Trastuzumab aus Klon-H2 in dessen Aktivität kaum von den Klonen H1 und H3, was im nachfolgenden ADCC-Assay unter Einbindung des Antigens bestätigt werden sollte.





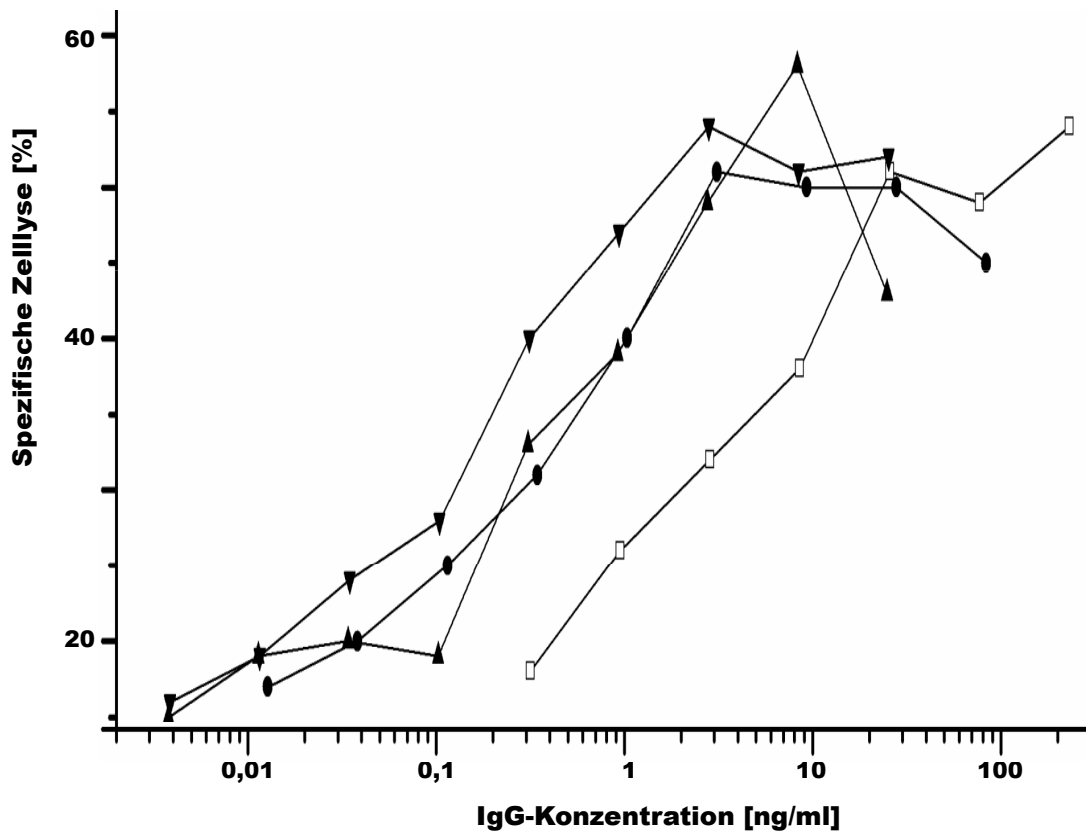
**Abb. 2.40:** Fc $\gamma$ RIIIa-Bindungsassay von Trastuzumab exprimiert in der CHO-Zelllinie. A: Bindungskurven des RMD-negativen, fucosylierten Kontroll-IgGs (CHO-K,  $\square$ ) und der RMD-positiven, nicht fucosylierten Trastuzumabs aus Klon-H1 ( $\diamond$ ), Klon-H2 ( $\triangle$ ) und Klon-H3 ( $\times$ ). B: X-fache Steigerung der IgG-Fc $\gamma$ RIIIabindung (Faktor EC<sub>50</sub> CHO-K vs Klon H1-H3).

### 2.3.3.3 ADCC-Assay des Trastuzumab aus der CHO-Zelllinie

Zur Testung der Antikörper-vermittelten Zellzytotoxizität unter Einbindung Antigen-überexprimierender Zielzellen wurden diese und NK-Zellen als Effektorzellen mit verschiedenen Verdünnungen des rek.IgGs (Trastuzumab aus der CHO-Zelllinie) inkubiert (5.4.6.1). Hierzu muss das Antigen vorliegen, weshalb der ADCC-Assay nur für den Trastuzumab-Antikörper durchgeführt werden konnte. Die verwendeten Zielzellen, BT-474 und SK-BR-3, tragen auf ihrer Oberfläche erhöhte Mengen des Rezeptors HER2, welcher in einer besonders aggressiven Form des Brustkrebses stark überexprimiert wird.

In Abb.2.41 ist die IgG-abhängige Zellyse der BT-474-Zielzellen dargestellt. Die BT-474-Zellen zeigten eine 16-prozentige IgG-unabhängige Lyse durch NK-Zellen und eine 77-prozentige IgG-abhängige, spezifische Zellyse (s.5.4.6.1). Entsprechend der Ergebnisse des Fc $\gamma$ RIIIa-Bindungsassays in Abb.2.40 zeigen die nicht fucosylierten Trastuzumab-Antikörper der Klone H1-3 ebenfalls eine

verstärkte ADCC im Vergleich zur fucosylierten Kontrolle (Abb.2.41 □).



**Abb. 2.41:** ADCC-Assay des Trastuzumab aus der CHO-Zelllinie mit BT-474 als Zielzelle. Fucosylierte Kontrolle (K, □), nicht fucosylierter Klon H1 (Δ), nicht fucosylierter Klon H2 (∇), nicht fucosylierter Klon H3 (○).

Den in Tab.2.1 zusammengefassten Daten des ADCC-Assays zeigen sich die nicht fucosylierten Trastuzumabs der Klone H1-3 mit BT-474-Zielzellen um 9-27fach und mit SK-BR-3-Zielzellen um 14-22fach aktiver im Vergleich zur fucosylierten Kontroll-IgG (K).

REK.IgG	BT-474		SK-BR-3	
	EC <sub>50</sub> [ng/ml]	Ratio [K/H]	EC <sub>50</sub> [ng/ml]	Ratio [K/H]
K	6,03	/	1,31	/
H1	0,454	13	0,0932	14
H2	0,227	27	0,0602	22
H3	0,647	9	0,0917	14

**Tab. 2.1:** EC<sub>50</sub>-Werte nach ADCC-Assay des Trastuzumab +/-RMD.

Entgegen der Ergebnisse des FcγRIIIa-Bindungsassays zeigt sich Trastuzumab aus Klon H2 im Vergleich zu dem aus Klon H1 und H3 unter Verwendung verschiedener Zielzellen mit einer zusätzlich

zweifachen Steigerung der ADCC, was für die Korrelation der Menge an mannosereichen Strukturen mit der ADCC-Steigerung spricht. Die SK-BR-3-Zellen sind zudem sensitiver für die ADCC, da hier, im Vergleich zu BT-474-Zellen, deutlich geringere IgG-Konzentrationen zur Zellyse führen. Dennoch sind die Verhältnisse der gemessenen  $EC_{50}$  F1/F0 (K/H) vergleichbar mit denen der mit BT-474-Zellen gewonnenen Daten.

## 2.4 Modifizierter Vakzinia Virus Ankara

Neben dem potentiellen Einsatz der Entenzelllinien zur Produktion therapeutischer Proteine ist vor allem die Virusproduktion von besonderer Relevanz. Da attenuierte (abgeschwächte) Lebendimpfstoffe im Vergleich zu inaktivierten Viren effektiver Immunantwort aktivieren, wurden verschiedene Viren an Vogelzellen adaptiert, wodurch sie mehrheitlich in ihrer Replikationsfähigkeit in Säugertierzellen eingeschränkt sind [137,138]. Beispiele für an Vogelzellen adaptierte Viren zur Produktion von Lebendimpfstoffen sind der Paramyxoviridae (Mumps, Masern) und der Flaviviridae (Gelbfieber) [139,140]. Der in über 500 Passagen in Hühnerembryofibroblasten (CEF) ebenfalls attenuierte Virus MVA wird zwar nicht wie sein Muttervirus, Vakzinia Virus, als Lebendimpfstoff gegen Pocken eingesetzt, aufgrund seiner hohen Sicherheit aber als potenter Impfvektor für Antigene von Tumoren oder pathogenen Viren untersucht [98,100,101].

MVA zählt mit  $\sim 190$  kb doppelsträngiger DNA und einem Durchmesser von 200-400 nm zu den größten Viren und trägt je nach Reifegrad verschiedene Glykoproteine an seiner Oberfläche [123,141,142]. In diesem Abschnitt sollen MVA-Viren in den Entenzelllinien und der *Baby-Hamster-Kidney*-Zelllinie (BHK-21) produziert werden, um nach Isolierung der Viren dessen N-Glykosylierung zu charakterisieren und zu vergleichen. Betrachtet werden soll, ob sich die N-Glykosylierung des MVA-Virus von der Zellmembranglykosylierung unterscheidet und ob die MVA-Infektion zu allgemein veränderten N-Glykosylierungs-Eigenschaften der Zelle führt.

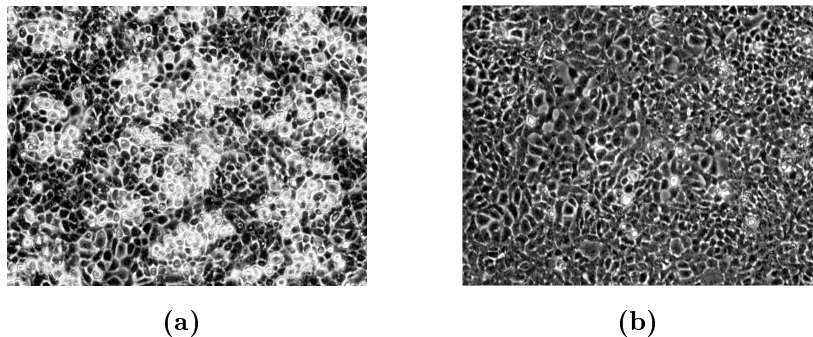
### 2.4.1 Zellinfektion

Eine Übersicht zur Vakzinia Virus-Reifung ist in Abb.1.9 dargestellt und veranschaulicht den Reifeprozess beginnend mit den infektiösen intrazellulären reifen Virionen (IMV), welche in eine [117,118] oder zwei [115,119–121] Membranen gehüllt sind. Die IMV-Partikel tragen nur ein Glykoprotein an ihrer Oberfläche [124]. Deren Anzahl steigt auf sieben mit der Verpackung in zwei zusätzliche Membranen des trans-Golgi-Apparates oder der frühen Endosomen unter Bildung des intrazellulären

umhüllten Virus (*Intracellular Enveloped Virus*, IEV) [123].

Bei Immunisierung mit MVA werden vor allem Antikörper gegen die Glykoproteine A33R, B5R und A56, enthalten in IEV/CEV/EEV, nachgewiesen [142, 143]. In dieser Arbeit sollte die N-Glykosylierung der EEV-Partikel untersucht werden, da diese alle Glykoproteine an ihrer Oberfläche tragen und zudem leicht von noch nicht lysierten Zellen isoliert werden konnten. Die Menge der verschiedenen Reifestadien (IMV/CEV/EEV) variieren auch in der Literatur. Es deutet darauf hin, dass die Infektionsbedingungen wichtig sind für das Verhältnis der verschiedenen Virusformen [144, 145].

So konnte beispielsweise Spehner et al. [146] bei MVA-Infektion einen Anteil an EEV von 15 % erzielen, wohingegen Meiser et al. [144] nur einen Anteil von 4 % erhielt.



**Abb. 2.42:** Die Durchlicht-Mikroskopaufnahme von BHK-Zellen (a) und AGE1.CR-Zellen (b) 24 h nach Infektion mit MVA zeigt die überwiegend intakten Zellen zum Erntezeitpunkt. Die Zellen wurden in diesem Fall zuvor adhärenz in DMEM inklusive 5 % FCS kultiviert und zur Infektion mit MVA aus Zelllysate der MOI=1.0 in DMEM ohne FCS infiziert und nach 24 h für die Präparation nach 2.4.2 geerntet. Die Bilder wurden bei 100facher Vergrößerung aufgenommen.

Zur MVA-Produktion wurden die AGE1.CR-, AGE1.CR.pIX- und die BHK-Zelllinie mit MVA aus Zelllysate mit einer MOI von 1.0 infiziert. Die Zellen wurden vor und nach Infektion in serumfreiem Medium (5.4.7.1) kultiviert und 24 h nach Infektion geerntet. Wie in Abb.2.42 anhand adhärenz BHK und AGE1.CR-Zellen (B) gezeigt, waren die Zellen zum Zeitpunkt der Ernte nach Infektion überwiegend intakt, sodass der EEV-haltige Zellkulturüberstand leicht von den Zellen samt Zellmembranen getrennt werden konnte.

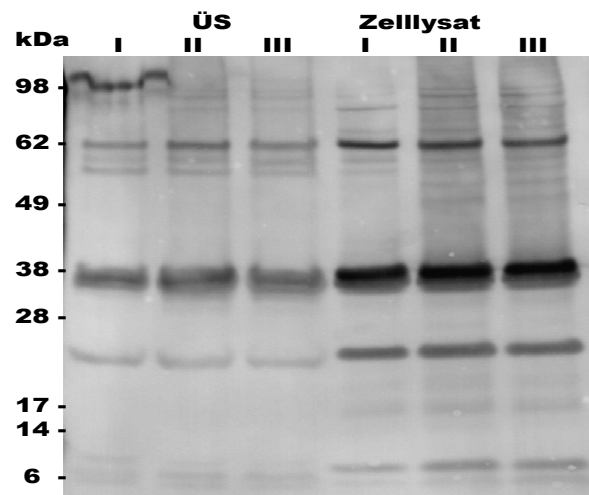
## 2.4.2 MVA-Präparation

Ähnlich der Rohmembranpräparation in Abschnitt 2.1.2 erfolgte die Präparation von EEV aus Zellkulturüberstand und zelluläre MVA-Formen (IMV/IEV/CEV) inklusive der Zellmembranglykoproteine in verschiedenen Zentrifugationsschritten nach 5.4.7.2. Zur qualitativen Testung der gereinigten Viren aus ÜS und Lysate wurde je  $1 \mu\text{g}$  in einem reduzierenden 12 prozentigem SDS-Gel

(5.3.1) aufgetrennt, anschließend auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mit Anti-Vakzinia-Antikörper angefärbt. Zur Beladung des Gels mit gleichen Mengen an Protein wurden die noch infektiösen Partikel mittels Quant-iT<sup>TM</sup> Protein Assay Kit, fluorimetrisch bestimmt 5.3.4.3.

Der Western-Blot in Abb.2.43 zeigt je drei Präparationen von Viruspartikeln aus Zellkulturüberstand (ÜS) und Zellysate exemplarisch aus infizierten AGE1.CR.pIX-Zellen. In allen Proben konnten erfolgreich verschiedene Vakzinia-Proteine angefärbt werden. Bei der obersten Bande mit  $\sim 68$  kDa könnte es sich um das Protein A56R handeln [142,147], welches die Wirkung eines Hämagglutinins hat. Bei den Grippeviren ist HA sogar in der Typbezeichnung (z.B. H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) enthalten, doch ist die Bedeutung für MVA geringer. HA gehört mit vier N-Glykosylierungs-Motiven (N-X-S/T) zu den potentiell am stärksten glykosylierten MVA-Proteinen, nach Krauss et al. [124] liegt es jedoch nur in zwei Dritteln der umhüllten Viren vor.

Bei der Hauptbande mit  $\sim 40$  kDa handelt es sich vermutlich um das Komplement Kontrollprotein B5R, welches mit drei N-Glykosylierungs-Motiven ebenfalls potentiell stark glykosyliert ist. Im Zellysate könnte die Bandenhöhe auf das in IEV zusätzlich enthaltene A36R-Protein hindeuten, welches jedoch nicht glykosyliert ist. Nach Borrego et al. [148] könnte es sich auch um das nicht glykosylierte Protein p37 handeln [142].

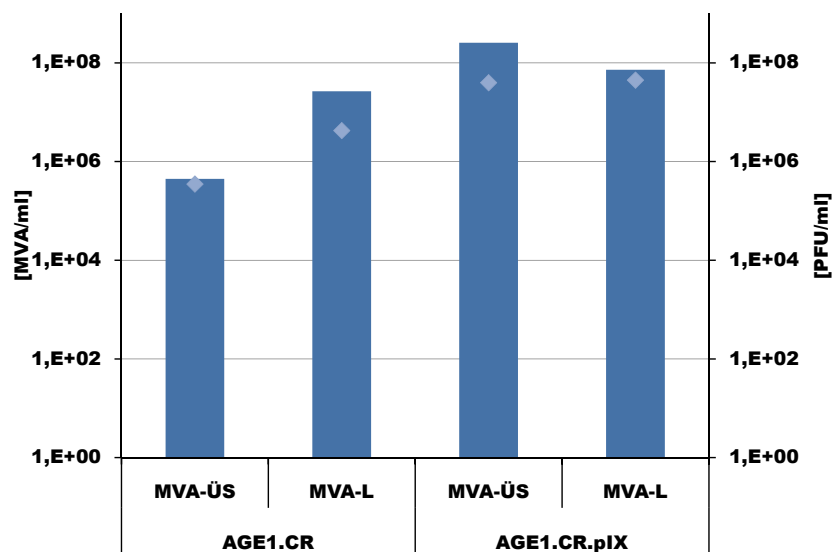


**Abb. 2.43:** Western-Blot zum Nachweis der erfolgreichen MVA-Präparation aus Zellkulturüberstand (ÜS) und Zellysate exemplarisch aus AGE1.CR.pIX-Zellen. Für eine gleiche Gelbeladung wurden die Proteine der isolierten MVA-Partikel mittels Quant-iT<sup>TM</sup> Protein Assay Kit nach 5.3.4.3 bestimmt. Es wurde je  $1 \mu\text{g}$  Protein pro Bande in einem reduzierenden 12 prozentigen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mittels Kaninchen-Anti-Vakzinia-Antikörper und dem HRP-markierten Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper angefärbt.

Die Bande mit  $\sim 25$  kDa könnte die Proteine A33R und A34R, beide in einem Bereich von 23-28 kDa, darstellen [142]. Mit ein bzw. zwei N-Glykosylierungs-Motive sind beide Proteine potentiell

geringer glykosyliert als das A56R und das B5R. In größerer Menge dürfte jedoch das A33R-Protein enthalten sein, da in mit MVA immunisierten Mäusen vorwiegend Antikörper gegen A56R, B5R und A33R detektiert werden konnten [142,143]. Das A33R-Protein könnte aber auch immunogener sein und daher eine starke Antikörperproduktion induzieren.

Die Dreifachbestimmung (Abb.2.43 I, II, III) der Proben aus ÜS und Lysat zeigen das jeweils gleiche Bandenmuster. Im Vergleich des Bandenmusters der Proben aus ÜS und Lysat traten jedoch Unterschiede in den Bandenhöhen auf. So liefen alle Banden außer der bei  $\sim 68$  kDa des ÜS geringfügig unterhalb der entsprechenden Banden des Zelllysats. In Abb.2.44 sind exemplarisch isolierte MVA-Partikel aus infizierten Zellen der AGE1.CR- und AGE1.CR.pIX-Zelllinie dargestellt, welche über Real-Time-PCR mit einer Ausbeute im Bereich von  $10^5$ - $10^8$  MVA/ml bestimmt wurden. Infektiöse Partikel wichen davon um 20-80 % ab und lagen in einem Bereich von  $10^5$ - $10^7$  PFU/ml ( $\diamond$ ). Der hohe Verlust der Infektiösität der MVA-Partikel ist sowohl bei MVA-ÜS als auch bei MVA-Lysat zu verzeichnen und resultiert vermutlich aus den hohen Scherkräften während der Zentrifugation. Da die Infektiösität nicht für die Analyse der N-Glykosylierung relevant ist, wurde dieser Präparationseffekt toleriert und mit der Analyse in Abschnitt 2.4.3 fortgefahren.



**Abb. 2.44:** MVA-Quantifizierung der isolierten MVA-Partikel aus der AGE1.CR- und AGE1.CR.pIX-Zelllinie. Die Anzahl der MVA-Partikel wurde über Real-Time-PCR mit MVA-spezifischen Primern nach 5.2.1.4 bestimmt und in MVA/ml angegeben. Die infektiösen Partikel wurden mittels MVA-Titration auf Vero-Zellen nach 5.4.7.3 in PFU/ml ( $\diamond$ ) angegeben. Zusätzlich wird zwischen zellulären MVA-Partikeln aus Zelllysats (MVA-L) und den extrazellulären MVA-Partikeln aus Zellkulturüberstand (MVA-ÜS) unterschieden. Die Zellen wurden mit MVA der MOI 1.0 infiziert, in FCS-freiem Medium kultiviert und nach 24 h zur Präparation geerntet.

Da die Verhältnisse der Proteinbanden des EEV aus ÜS denen der zellulären MVA aus Lysat entsprechen, wurde ein ähnliches N-Glykosylierungsmuster erwartet. Die präparierten intra- und extrazellulären MVA-Partikel wurden zur Quantifizierung, über Real-Time-PCR mit MVA-spezifischen Primern, in Form von MVA/ml bestimmt (5.2.1.4). Die Anzahl infektiöser Partikel wurden in Form von PFU/ml (*Plaque Forming Units*, PFU) über MVA-Titration auf Vero-Zellen (*African Green Monkey*) durchgeführt (5.4.7.3). Somit konnte überprüft werden, ob ausgeübte Scherkräfte während der Isolierung der Partikel deren Infektiosität beeinträchtigt haben.

### 2.4.3 MVA-N-Glykosylierung

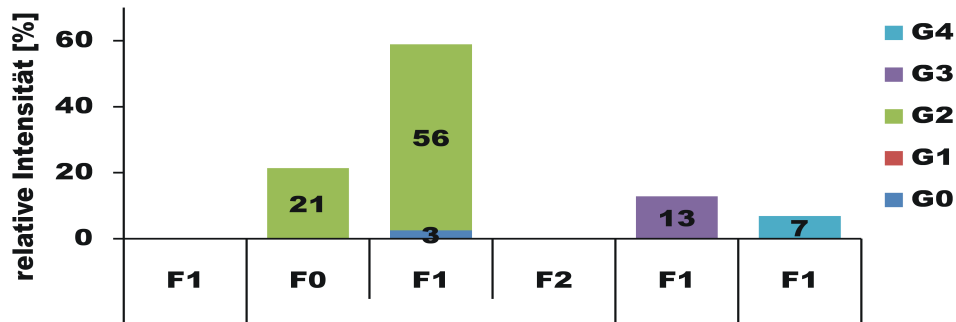
Die aufgereinigten MVA-Partikel aus infizierten Enten- und Hamsterzellen wurden zur Analyse der N-Glykosylierung wie isolierte Glykoproteine behandelt. Zur Inaktivierung und dem Herauslösen membranständiger Proteine wurden die Viren mit verschiedenen Detergenzien bei erhöhter Temperatur inkubiert und im Anschluß zur Freisetzung der N-Glykane mittels PNGase F verdaut (5.5.1.2). Salze, Detergenzien und Peptide wurden über C18- (5.5.2.1) und Carbographsäulen (5.5.2.2) entfernt. Nach Permethylierung der N-Glykane (5.5.3.2), wurden diese massenspektrometrisch analysiert.

Exemplarische Spektren sind im Anhang Abb.6.5-6.10 enthalten. Im Anschluss sollen lediglich zusammengefasste MS-Daten präsentiert werden. Abb.2.45 zeigt die zusammengefassten N-Glykanstrukturen von drei verschiedenen MVA-Präparationen aus infizierten BHK-Zellen (A/B). In dieser Auftragung wurden ausschließlich Strukturen mit einem relativen Anteil von  $\geq 1\%$  einbezogen, zudem wurden sialylierte Strukturen in Abb.2.48 gesondert betrachtet und hier entsprechend ihrer Galactosylierung, Fucosylierung und Antennarität aufgetragen. Ähnlich der Membranglykosylierung der CHO-Zelllinie in Abb.2.9 A aus Abschnitt 2.1.4 besitzt auch die BHK-Zelllinie die biantennäre, einfach fucosylierte Hauptstruktur (BiF1G0-2 in Abb.2.45 A-B). Auch die tri- und tetraantennären, einfach fucosylierten Strukturen (Tri/TetraF1) lassen sich in den MVA-Partikeln der BHK-Zelllinie wiederfinden. Alle detektierten N-Glykanstrukturen zeigen sich überwiegend vollständig galactosyliert (BiG2, TriG3, TetraG4).

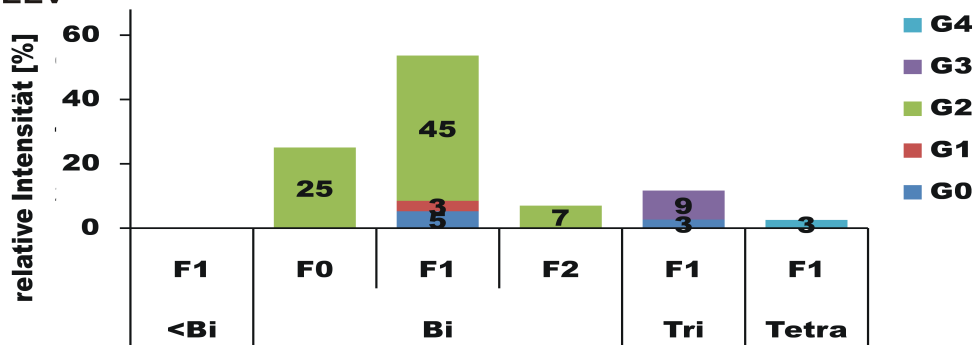
In den extrazellulären Viruspartikeln (EEV) aus Zellkulturüberstand (Abb.2.45 B) konnten überraschenderweise  $\sim 7\%$  der biantennären, zweifach fucosylierten Struktur (BiF2) detektiert werden. Eine erhöhte Fucosylierung könnte für die EEV von Vorteil sein. Die Addition antennärer Fucose führt vermutlich zu einer veränderten Proteinkonformation. Der hohe Grad an Galactosylierung ermöglicht eine vollständige Sialylierung der Strukturen, was in Abb.2.48 verglichen wird. Die

EEV-Partikel (Zellüberstand) unterscheiden sich, von der BiF2-Struktur abgesehen, kaum in Antennarität, Fucosylierung und Galactosylierung zu N-Glykanen zellulärer MVA-Partikel inklusive der Membranglykoproteine.

### A BHK-Membran+MVA



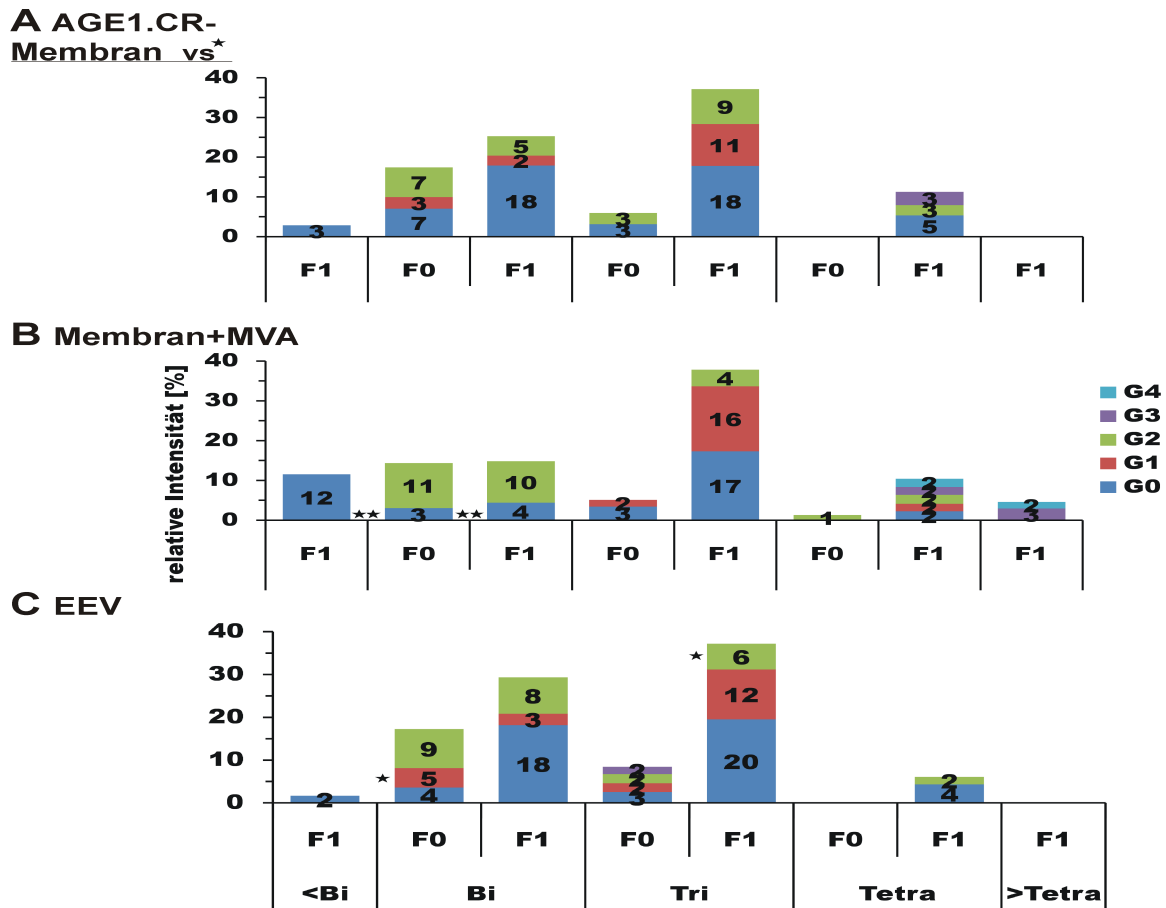
### B BHK-EEV



**Abb. 2.45:** Zusammengefasste MALDI-TOF-MS-Daten der komplexen N-Glykane isolierter MVA-Partikel aus der BHK-Zelllinie. Die Daten beruhen auf permethylierten N-Glykanen aus mindestens zwei Präparationen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden ausschließlich Strukturen mit einem relativen Anteil von  $\geq 1\%$  einbezogen. Diese wurden anhand ihrer relativen Intensitäten bezogen auf die Menge komplexer N-Glykane dargestellt. Die Strukturen sind gemäß ihrer Antennarität (Bi, Tri, Tetra), Fucosylierung (F) und Galactosylierung (G) aufgetragen. Sialylierte Strukturen sind in Abb.2.48 gesondert dargestellt und hier zu entsprechenden nicht sialylierten Strukturen addiert. A: Zelluläre MVA-Partikel (IMV, IEV, CEV) inklusive Membranglykoproteinen aus Zelllysats 24 h nach Infektion aus der BHK-Zelllinie (n = 3). B: Extrazelluläre MVA-Partikel (EEV) (n = 2) aus Zellkulturüberstand (ÜS) 24 h nach Infektion aus der BHK-Zelllinie.

Im Vergleich zu den N-Glykanen des extrazellulären MVA (EEV) der BHK-Zelllinie zeigen sich die der AGE1.CR-Zelllinie wesentlich vielfältiger (Abb.2.46 B/C), was vor allem der größeren Vielfalt an Galactosylierungsvarianten der einzelnen Strukturen zugrunde liegt. So finden sich bei Membranglykoproteinen ohne MVA-Infektion (Abb.2.46 A) sowie im EEV der AGE1.CR-Zelllinie (Abb.2.46 B/C) überwiegend unvollständig galactosylierte N-Glykanstrukturen. Mit  $\sim 50\%$  bei Membranglykoproteinen und 42-50 % bei MVA-Partikeln ist der Anteil galactosefreier Strukturen (G0) sehr hoch und ermöglicht eine weitaus geringere Sialylierung als dies bei MVA und Membranproteinen der BHK-Zelllinie mit maximal 8 % G0 (Abb.2.45 C) gegeben war.

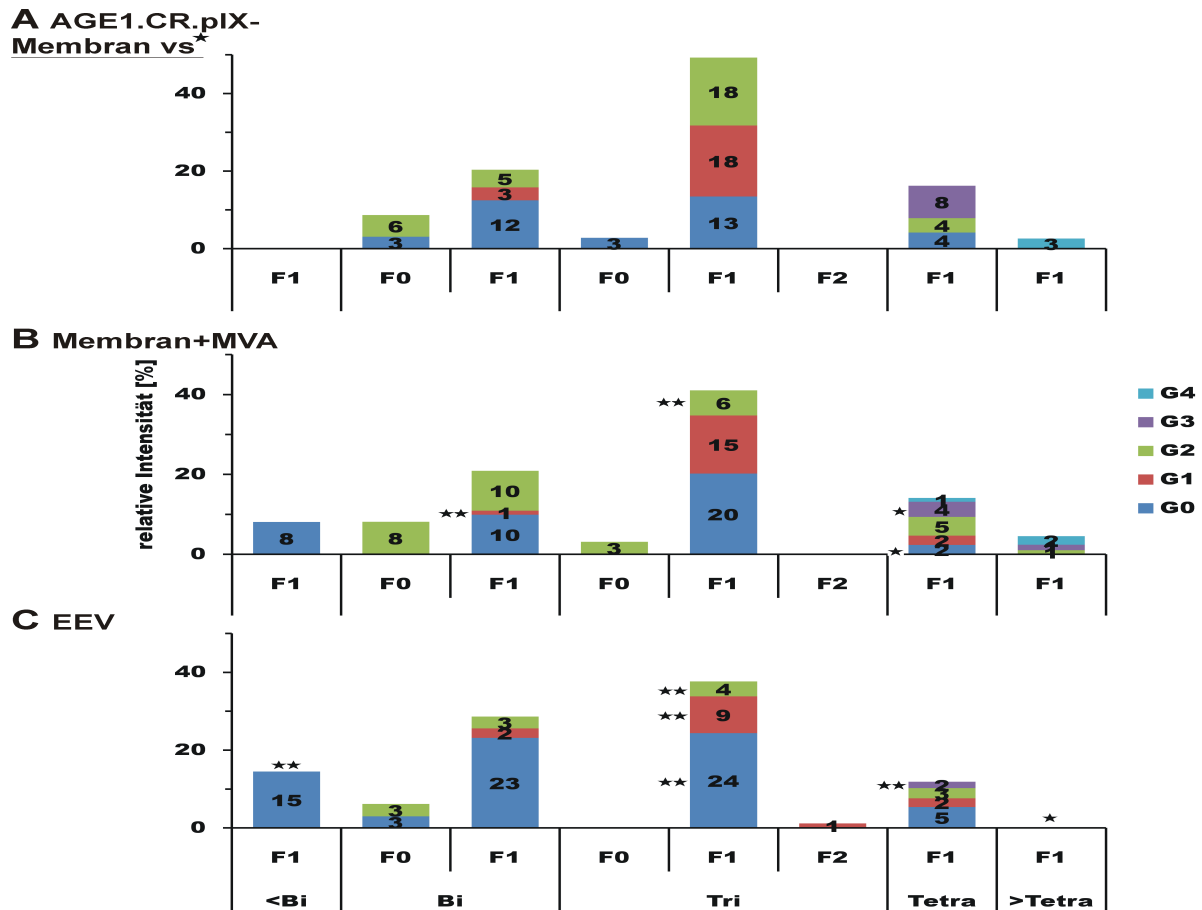




**Abb. 2.46:** Zusammengefasste MALDI-TOF-MS-Daten der komplexen N-Glykane isolierter MVA-Partikel aus der AGE1.CR-Zelllinie. Die Daten beruhen auf permethylierten N-Glykanen aus wenigstens drei Präparationen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden ausschließlich Strukturen mit einem relativen Anteil von  $\geq 1\%$  einbezogen. Diese wurden anhand ihrer relativen Intensitäten bezogen auf die Menge komplexer N-Glykane dargestellt. Die Strukturen sind gemäß ihrer Antennarität (Bi, Tri, Tetra, Penta), Fucosylierung (F) und Galactosylierung (G) aufgetragen. Sialylierte Strukturen sind in Abb.2.48 gesondert dargestellt und hier zu entsprechenden nicht sialylierten Strukturen addiert. A: Membranglykoproteine ohne Infektion ( $n=9$ ). B: Zelluläre MVA-Partikel (IMV, IEV, CEV) inklusive Membranglykoproteinen aus Zellysate (L) 24 h nach Infektion ( $n=3$ ). C: Extrazelluläre MVA-Partikel (EEV) ( $n=3$ ) aus Zellkulturüberstand (ÜS) 24 h nach Infektion. Im Student-t-Test (zweiseitig, verschiedene Varianzen) wurden die Daten auf Signifikanz hin untersucht (A vs B und C) und bei dem Signifikanzniveau  $p < 0,1$  mit einem Stern markiert, bei  $p < 0,01$  mit zwei Sternen und bei nicht nachgewiesener Signifikanz ( $p > 0,1$ ) wurden die Daten nicht zusätzlich markiert.

Die untersuchten EEV der AGE1.CR-Zelllinie weisen keine Erhöhung des Fucosylierungsgrades auf. Es sind wie auch in Membranproteinen mit  $\sim 75\%$  einfach fucosylierte Strukturen (F1) vorherrschend. Zudem bestätigt sich in EEV die triantennäre, einfach fucosylierte Hauptstruktur (TriF1) gefolgt von der biantennären, einfach fucosylierten Struktur (BiF1) und der biantennären, nicht fucosylierten Struktur (BiF0). Das Zellysate, bestehend aus zellulärem MVA inklusive Membranglykoproteinen (2.46 B), weist deutlich erhöhte Anteile der monoantennären, einfach fucosylierten, nicht galactosylierten Struktur ( $<BiF1G0$ ) und den pentaantennären Strukturen (PentaF1) auf.

Zusätzlich ist eine Abnahme biantennärer Strukturen (BiF0/F1) zu verzeichnen, welche jedoch mit höherem Anteil vollständig galactosyliert sind (BiG2F0/F1, Abb.2.46 B), im Vergleich zur triantennären Hauptstruktur und zu den biantennären Strukturen aus Membranglykoproteinen ohne Infektion (Abb.2.46 A) und EEV aus Überstand (Abb.2.46 C).



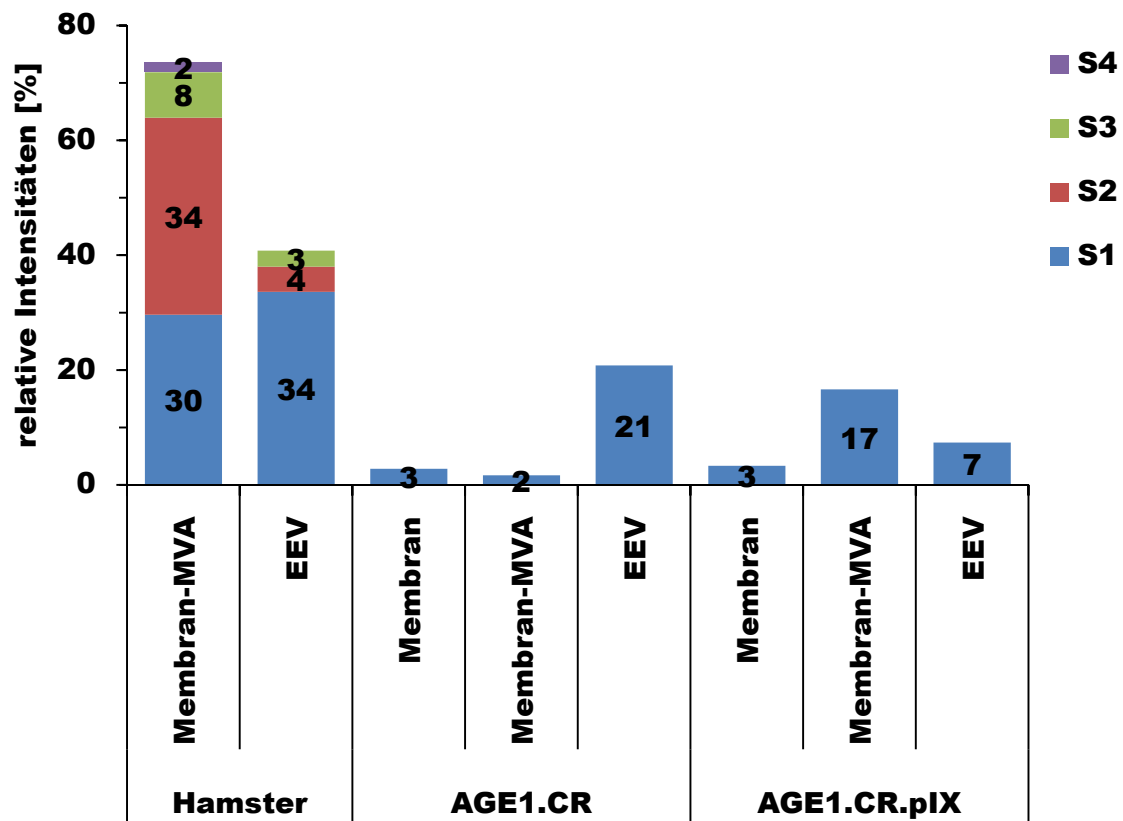
**Abb. 2.47:** Zusammengefasste MALDI-TOF-MS-Daten der komplexen N-Glykane isolierter MVA-Partikel aus der AGE1.CR.pIX-Zelllinie. Die Daten beruhen auf permethylierten N-Glykanen aus n Präparationen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden ausschließlich Strukturen mit einem relativen Anteil von  $\geq 1\%$  einbezogen. Diese wurden anhand ihrer relativen Intensitäten bezogen auf die Menge komplexer N-Glykane dargestellt. Die Strukturen sind gemäß ihrer Antennarität (Bi, Tri, Tetra, Penta), Fucosylierung (F) und Galactosylierung (G) aufgetragen. Sialylierte Strukturen sind in Abb.2.48 gesondert dargestellt und hier zu entsprechenden nicht sialylierten Strukturen addiert. A: Membranglykoproteine ohne Infektion (n = 11). B: Zelluläre MVA-Partikel (IMV, IEV, CEV) inklusive Membranglykoproteinen aus Zelllysate (L) 24 h nach Infektion (n = 4). C: Extrazelluläre MVA-Partikel (EEV) (n = 3) aus Zellkulturüberstand (ÜS) 24 h nach Infektion. Im Student-t-Test (zweiseitig, verschiedene Varianzen) wurden die Daten auf Signifikanz hin untersucht (A vs B und C) und bei dem Signifikanzniveau  $p < 0,1$  mit einem Stern markiert, bei  $p < 0,01$  mit zwei Sternen und bei nicht nachgewiesener Signifikanz ( $p > 0,1$ ) wurden die Daten nicht zusätzlich markiert.

Die N-Glykosylierung der extrazellulären MVA (EEV) aus der AGE1.CR.pIX-Zelllinie (Abb.2.47) unterscheidet sich von der der AGE1.CR-Zelllinie vor allem in den Anteilen nicht fucosylierter Strukturen (F0) von  $\sim 10\%$  im Vergleich zu  $\sim 25\%$  der AGE1.CR-Zelllinie. Was zur Folge hat, dass bei

N-Glykanen der AGE1.CR.pIX-Zelllinie die Hauptstrukturen die triantennäre, einfach fucosylierte Struktur (TriF1), die biantennäre, einfach fucosylierte Struktur (BiF1) und die tetraantennäre, einfach fucosylierte Struktur (TetraF1) bilden. EEV aus Zellkulturüberstand (Abb.2.47 C) hingegen besitzt als dritthäufigste Struktur statt der tetraantennären die monoantennäre, einfach fucosylierte Struktur (<BiF1), welche in Membranproteinen (Abb.2.47 A) nicht detektiert werden konnte. N-Glykane des EEV zeichnen sich mit  $\sim 70\%$  nicht galactosylierter Strukturen (G0) im Vergleich zu  $\sim 40\%$  bei Zellysat (Abb.2.47 B) und Membranproteinen ohne Infektion (Abb.2.47 A) durch eine deutlich geringere Galactosylierung aus, was dessen Sialylierungsmöglichkeiten erheblich minimiert. Erstmals zeigten sich Glykoproteine (EEV) aus der AGE1.CR.pIX-Zelllinie geringer galactosyliert als die der AGE1.CR-Zelllinie. EEV zeigt zudem einen geringen Anteil von  $\sim 1\%$  einer zweifach fucosylierten Struktur, welches auch schon in EEV der BHK-Zelllinie (Abb.2.45 C), nicht aber der AGE1.CR-Zelllinie detektiert werden konnte.

In Abb.2.48 sind die relativen prozentualen Anteile sialylierter komplexer N-Glykanstrukturen der Membranglykoproteine, extrazellulärer MVA-Partikel (EEV) und zellulärer MVA-Partikel inklusive Membranglykoproteinen aus Hamster- und Entenzelllinien dargestellt. Der deutlichste zellspezifische Unterschied in der Sialylierung zeigte sich in ausschließlich einfach sialylierten Strukturen (S1) bei MVA aus Entenzelllinien im Vergleich zu ein- bis vierfach sialylierten Strukturen (S1-S4) bei MVA der Hamster-Zelllinie. Mit  $40\%$  sind MVA-Partikel der BHK-Zelllinie auch in deutlich stärkerem Maße sialyliert als MVA-Partikel aus den Entenzelllinien mit  $7-21\%$ . Im Vergleich zu den Membranglykoproteinen (Membran) sind die MVA-Partikel (MVA) und Zellmembranprotein nach Infektion (Membranen-MVA), von „Membranen-MVA“ der AGE1.CR-Zelllinie abgesehen, stärker sialyliert.

Neben den komplexen N-Glykanen wurden ebenfalls mannosereiche Strukturen nachgewiesen (Anhang Abb.6.5-6.10), die einen Anteil von  $\sim 50\%$  bei EEV und  $\sim 70\%$  bei Zellmembranen inklusive zellulärer MVA-Partikel der detektierten Gesamtstrukturen einnehmen. Da der EEV jedoch seine äußere Membran aus dem trans-Golgi-Netzwerk oder frühen Endosomen erhält, welche einen hohen Anteil mannosereicher Strukturen beinhalten, ist es wahrscheinlich, dass diese Strukturen auch auf der Oberfläche der EEV-Partikel zu finden sind. Ein Anteil der mannosereichen Strukturen des EEV könnte jedoch auch dafür sprechen, dass während der 24 h Virusreplikation einige der Zellen vorzeitig lysiert wurden und daher aus dem Zellkulturüberstand zusammen mit EEV-Partikeln auch Membranglykoproteine isoliert wurden.



**Abb. 2.48:** Vergleich der Sialylierung komplexer N-Glykane isolierter MVA-Partikel im Vergleich zu Membranglykoproteinen aus Hamster- und Enten-Zelllinien. Die Daten basieren auf der MALDI-TOF-MS-Analyse permethylierter N-Glykane im Positivmodus mit Reflektor und Arabinosazon als Probenmatrix. Sialylierte Strukturen mit einer relativen Intensität von  $\geq 1\%$  bezogen auf die Menge komplexer N-Glykane wurden hier in Form von S1-4 dargestellt. Permethylierte N-Glykane der Zellmembranglykoproteine ohne Infektion (Membran) der CHO-, AGE1.CR- und der AGE1.CR.pIX-Zelllinie wurden im Vergleich zu sialylierten N-Glykanstrukturen isolierter extrazellulärer MVA-Partikel aus Zellkulturüberstand (MVA) 24 h nach Infektion und sialylierten N-Glykanstrukturen zellulärer MVA-Partikel inklusive Membranproteinen aus Zelllysate (Membran-MVA) 24 h nach Infektion aus BHK-, AGE1.CR- und der AGE1.CR.pIX-Zelllinie dargestellt. Im Student-t-Test (zweiseitig, verschiedene Varianzen) wurden keine signifikanten Unterschiede zu sialylierten N-Glykanen der Membranproteine festgestellt.

Erhöhte Mengen mannosereicher Strukturen konnten bereits für andere Virusoberflächenproteine, wie das gp120 des HIV, nachgewiesen werden. Diese besondere Eigenschaft stellt eine wichtige Bekämpfungsmöglichkeit von Viren dar. So wurde bereits ein Mannose-spezifischer Antikörper, der 2G12 [149], generiert. Aber auch natürlich vorkommende Mannose-spezifische Lektine, wie beispielsweise das BanLec aus reifen Bananen, könnten zur Bekämpfung von Viren mit mannosereichen Strukturen auf ihrer Oberfläche eingesetzt werden [150, 151].

Die in dieser Arbeit erlangten Hinweise für Häufung mannosereicher Strukturen auf MVA könnten bei einem ungewöhnlichen Fall von Pocken, heute eher als zoonotische Erscheinung (Monkeypox) oder aufgrund bioterroristischer Freisetzung gefürchtet, einen weiteren Therapieansatz zur

Verfügung stellen. In dem Fall des US-amerikanischen Säuglings 2007 [152] konnte nur durch das Notfallmedikament ST-246 der Siga Corp Leben gerettet werden. Unter der Voraussetzung, dass mannosereiche Strukturen auf Virusoberflächen weiter verbreitet sind, könnten Mannose-spezifische Agenzien als Notfallmedikamente gegen seltene Viruserkrankungen sehr wirkungsvoll sowie virusübergreifend sein.

# 3 Diskussion

## 3.1 Zellmembranglykosylierung

In dieser Arbeit wurden die Entenzelllinien AGE1.CR und AGE1.CR.pIX in Hinblick auf ihre N-Glykosylierungseigenschaften hin untersucht. Mit dem Ziel die Entenzelllinien für die Produktion rekombinanter therapeutischer Proteine und Impfstoffe für den Menschen einzusetzen, galt es zu prüfen, inwieweit deren N-Glykosylierung zu der humaner Zellen und herkömmlicher Produktionszelllinien ähnelt. In chromatographischen Untersuchungen konnte für die AGE1.CR- und AGE1.CR.pIX-Zelllinie N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), nicht aber N-Glykolyneuraminsäure (Neu5Gc), nachgewiesen werden (Abschnitt 2.1.2). Dies bestätigt Ergebnisse von Raju et al. [49], der IgG aus verschiedenen Spezies verglich. Im Speziesvergleich wiesen neben humanen Zellen auch Hühner-, Ratten-, Katzen-, Hunde-, Meerschweinchen- und Kaninchenzellen Neu5Ac auf. Jedoch nur Hühnerzellen wiesen neben den humanen Zellen ausschließlich Neu5Ac statt Neu5Gc auf [49]. Der Zeitpunkt der Mutation der CMP-Neu5Ac-Hydrolase (CMAH) – was zur Nichtausbildung der Neu5Gc in humanen Zellen führte – konnte von Chou et al. [153] auf vor ~2,8 Mio Jahren datiert werden. Die Mutation trat dem zur Folge noch vor der evolutionären Entwicklung der heutigen Hirnstruktur auf, was die Vermutung nahelegt, dass in der fehlenden Neu5Gc die Sonderstellung des Menschen begründet liegt [53].

Der Verknüpfungstyp der Neu5Ac in Entenzelllinien konnte über Lektinfärbungen als  $\alpha$ 2-3 und  $\alpha$ 2-6 bestimmt werden (Abschnitt 2.1.1.2). Anhand von humanem Serum-IgG konnte nachgewiesen werden, dass nur die  $\alpha$ 2-6-verknüpfte Neu5Ac relevant für eine anti-inflammatorische Wirkung der IgGs ist [72, 154]. Den dazu notwendigen Fc-Rezeptor konnten Anthony et al. [155] auf Makrophagen als den SIGN-R1 (C-Typ Lektin) identifizieren. Die Fähigkeit der Ente zur Ausbildung beider Verknüpfungstypen macht es notwendig, den jeweiligen Typus des exprimierten rekombinanten Proteins zu bestimmen. Rekombinantes Anti-Tumor-IgG sollte pro-inflammatorisch wirken und somit keine oder nur geringe Mengen der  $\alpha$ 2-6-verknüpften Neu5Ac aufweisen.

Die geringe Fucosylierung von Vogelzellen, gezeigt anhand von IgG aus Hühnerzellen [49, 95] und

IgG aus der Entenzelllinie EB66 [96], konnte in dieser Arbeit anhand der Membranglykoproteine der AGE1.CR- und AGE1.CR.pIX-Zelllinie bestätigt werden. Allgemein wird für Vogelzellen eine geringe  $\alpha$ 1-6-Fucosyltransferase-Aktivität (FUT8) angenommen [156], was in einer geringen Fucosylierung resultiert, wie es von Shinkawa et al. [28] anhand von IgG aus der Rattenzelllinie YB2/0 nachgewiesen werden konnte. In MS-Analysen zeigten sich die komplexen N-Glykane der Entenzelllinien mit 80 % (Abschnitt 2.1.4) einfach fucosylierten Strukturen im Vergleich zu 93 % der CHO-Zelllinie (DG44), geringer fucosyliert, was die Ergebnisse der Lektinfärbung von Zelloberflächen bestätigt (Abschnitt 2.1.1.1).

Ein signifikanter Unterschied zwischen den Entenzelllinien konnte für Membranglykoproteine der AGE1.CR.pIX-Zelllinie in Form einer stärkeren Fucosylierung und Galactosylierung nachgewiesen werden (Abb. 2.10). Die vollständigere Glykosylierung bei der AGE1.CR.pIX-Zelllinie könnte nach Jordan et al. [93] durch die Aktivierung von *Heat-Shock*-Proteinen (HSP) über das stabil integrierte adenovirale pIX-Protein erklärt werden. Anscheinend durchlaufen die Proteine vor der Sezernierung einen stärkeren Kontrollmechanismus oder aber die Aktivität der Galactosyltransferasen ist erhöht. Im Vergleich zur CHO-Zelllinie weist nur die AGE1.CR-Zelllinie signifikant höhere Anteile nicht galactosylierter komplexer N-Glykane auf. In IgGs aus Hühnerzellen konnte Raju et al. [49] ebenfalls eine geringere Galactosylierung nachweisen. Ausgehend von der N-Glykosylierung der Membranglykoproteine der AGE1.CR- und AGE1.CR.pIX-Zelllinie, konnten keine immunogenen Strukturen oder Monosaccharide identifiziert werden. Demnach eignen sich die Zellen zur Produktion von Therapeutika für den Menschen.

## 3.2 Rekombinantes IgG

Die geringere Fucosylierung der Membranglykoproteine der Entenzelllinien im Vergleich zur CHO-Zelllinie bestätigten die Veröffentlichungen einer geringen FUT8-Aktivität [156] und einer geringeren Fucosylierung bei IgG aus der Entenzelllinie EB66 [96]. Da der Speziesvergleich der Membranglykoproteine nicht von den gleichen Glykoproteinen (Art und Menge) ausgeht, ist der Speziesvergleich anhand einzelner Glykoproteine – wie dem IgG – aussagekräftiger. Im Speziesvergleich der N-Glykosylierung des rekombinanten humanen IgGs (rek.IgG), konnte die geringe Fucosylierung der Entenzelllinien nicht bestätigen. Das rek.IgG, exprimiert in der CHO-Zelllinie, weist mit 80 % im Vergleich zu dem aus den Entenzelllinien, mit 90 %, weniger Fucose auf (Abschnitt 2.2.2). Die relativ hohe IgG-Fucosylierung von 90 % der Entenzelllinie steht im Widerspruch zu veröffentlichten Fucosemengen anderer Vogelzelllinien. So zeigte Raju et al. [49] für IgG aus Hühnerzellen eine 70-

prozentige Core-Fucosylierung. Das CD-20-spezifische rek.IgG (Rituximab) aus der Entenzelllinie EB66 von Olivier et al. [96] zeigte mit 40 % deutlich geringere Mengen fucosylierter N-Glykane. In der Studie wurden zugleich variable Mengen zwischen 20 und 70 % fucosylierter Strukturen in Abhängigkeit vom jeweiligen Produktionsklon veröffentlicht. Da die AGE1.CR-Selektion primär auf die Virusproduktivität ausgerichtet war und Viren neben sialylierten auch fucosylierte Strukturen zur Zellanheftung nutzen [33], hat sich anscheinend eine stärker fucosylierende Entenzelllinie etabliert. Daher wird angenommen, dass eine Fucose-fokussierte Zellselektion ebenfalls zu Klonen mit geringerer Fucosylierung geführt hätte. Die Fucosylierung in der Entenzelllinie konnte in dieser Arbeit erfolgreich reduziert werden, indem die bakterielle GDP-6-desoxy-D-lyxo-4-hexulose-Reduktase transfiziert wurde (RMD; Abschnitt 2.3). Dank dieser innovativen Strategie der ProBioGen AG des Eingriffs in die Glykosylierungsmaschinerie etablierter Zelllinien kann auf eine aufwendige Neugenerierung der Zelllinien verzichtet werden.

Veröffentlichte Mengen fucosylierter N-Glykane bei IgG aus der CHO-Zelllinie liegen in der Regel zwischen 90 und 95 % [49,96]. Die in dieser Arbeit detektierte Menge von nur 80 % könnte an der Verwendung der CHO-Zelllinie DG44 liegen. So verwendete Shields et al. [69] zur IgG-Produktion die Zelllinie CHO-DP12 und erhielt eine 98-prozentige Fucosylierung. Unterschiede in der Fucosylierung können demzufolge auf der verwendeten Zelllinie, der abweichenden Proteinsequenz sowie unterschiedlicher Medien und Kultivierungsbedingungen basieren [54,59,157]. Dass die unterschiedliche Proteinsequenz relevant für die Fucosylierung sein könnte, zeigt die Detektion von 88 % Fucose bei Trastuzumab ebenfalls aus der Zelllinie CHO-DG44 (Abschnitt 2.3.2.6 Kontroll-IgG).

Die Galactosylierung korreliert anscheinend in besonderem Maße mit den Kultivierungsbedingungen. So zeigte Shields et al. [69] bei Anti-HER2/neu-IgG aus der CHO-Zelllinie 20 % geringere Anteile nicht galactosylierter Strukturen (G0) bei der Produktion in Spinnerflaschen (Suspensionskultur) im Vergleich zu Zellkulturschalen (statische Kultivierung).

In Suspensionskultur wird das Kulturvolumen stetig durchmischt, wodurch die Zelldiffusionsschicht reduziert wird und die Zellen besser mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden. Trotz steigender Scherkräfte in Form des Rührereintrags bei Spinnerflaschen im Vergleich zur Petrischale, zeigen sich die Zellen in ihrer Galactosylierungs-Eigenschaft effektiver. Das Anti-HER2/neu-IgG aus der CHO-Zelllinie wurde in dieser Arbeit ebenfalls in Suspensionskultur in 50-ml-Bioreaktorröhrchen durchgeführt und zeigt sich mit 75 % G0-Strukturen geringer galactosyliert als der Anti-HER2/neu-IgG, exprimiert in statischer Kultur (70 %) bei Shields et al. [69]. Das Tumor-spezifische rek.IgG aus der CHO-Zelllinie wurde hingegen in Kolben ohne Schikane exprimiert und erreicht eine höhere Galactosylierung mit nur 66 % G0-Strukturen. Zwar liegt die Galactosylierung noch immer



unterhalb der in Spinnerflaschen, ist aber bereits stärker im Vergleich zur statischen Kultivierung bei Shields et al. [69]. Es ist wahrscheinlich, dass die Galactosylierung durch Verwendung von Kolben mit Schikanen – zur Erzeugung turbulenter Strömungen und somit besserer Durchmischung des Kulturvolumens –, Spinnerflaschen oder geregelte Fermentationssysteme weiter zu steigern ist. Das rek.IgG aus den Entenzelllinien zeigt sich trotz der Expression im Kolben mit  $\sim 80\%$  G0-Strukturen gering galactosyliert. Da die verwendeten Kulturbedingungen sowie die Medien- und Feed-Bestandteile überwiegend an die CHO-Zelllinie angepasst wurden, ist nicht auszuschließen, dass eine entsprechende Optimierung für die Entenzelllinie eine erhöhte Galactosylierung zur Folge hätte [54, 59, 157]. Die beobachtete Galactosylierung von  $\sim 55\%$  am Beispiel von IgG aus Hühner- [49] und Entenzelllinien [96] bestärkt die Vermutung, dass die IgG-Produktion in der AGE1.CR- und AGE1.CR.pIX-Zelllinie nicht unter optimalen Bedingungen statt fand.

Für eine Reihe von Spezies konnte die so genannte Bisecting-Struktur – ein  $\beta$ -1-4-verknüpftes GlcNAc an der  $\beta$ -Mannose des Cores – nachgewiesen werden. Dazu gehören der Mensch, der Rhesusaffe, die Kuh, das Meerschwein, die Ziege, das Schaf, die Ratte, das Kaninchen und das Huhn [48, 49, 158]. Zur Ausbildung der Bisecting-Struktur wird die Glykosyltransferase GnT-III benötigt, die gerade in der häufig verwendeten Produktionszelllinie CHO fehlt [73, 159, 160] und für die Fc $\gamma$ -Rezeptorbindung der IgGs relevant ist [43]. Die für Hühnerzellen nachgewiesene Bisecting-Struktur ließ vermuten, dass auch Entenzelllinien über eine entsprechende GnT-III-Aktivität verfügen, was in Abschnitt 2.2.4 über chromatographische und massenspektrometrische Analysen bestätigt werden konnte. Olivier et al. [96] veröffentlichte zwar 15% „andere Strukturen“, machte jedoch keinerlei Aussagen zu einer vorhandenen Bisecting-Struktur in der Entenzelllinie EB66. Da aber andere Aspekte sehr detailliert untersucht wurden, ist fraglich, ob es sich dabei um die Bisecting-Struktur handelt.

Der Nachweis der Bisecting-Struktur in der Entenzelllinie könnte eine Erklärung für die überwiegend unvollständig galactosylierten Strukturen der Membranglykoproteine darstellen (Abschnitt 2.1.4). Vollständig galactosyliert zeigten sich ausschließlich biantennäre Strukturen. Höherentennären Strukturen fehlte hingegen mindestens eine Galactose zur vollständigen Galactosylierung (TriG2, TetraG3, PentaG4). Hierbei handelt es sich vermutlich um Bisecting-Strukturen, welche nach Varki et al. [19] aufgrund sterischer Hinderung nicht weiter galactosyliert werden. Ein Beleg für die Eigenschaft von Vogelzellen auch höherantennäre komplexe N-Glykane mit einer Bisecting-Struktur zu exprimieren, stellt die identifizierte penta-antennäre Struktur des Ovomukoids aus Hühnereiklar dar, nachgewiesen durch Rutherford et al. [4].

Die Fc-Glykosylierung humanen Serum IgGs zeigt sich nach Kobata et al. [161] zu 10 % und rek.IgG aus der CHO-Zelllinie nur zu <5 % sialyliert. Während humane Zellen vorwiegend  $\alpha$ 2-6-verknüpfte Neu5Ac exprimieren, wird sie von CHO-Zelllinien ausschließlich  $\alpha$ 2-3-glykosidisch verknüpft [159]. In unveränderten CHO-Zelllinien können demzufolge keine  $\alpha$ 2-6-sialylierten anti-inflammatorischen IgGs produziert werden.

Die AGE1.CR- und AGE1.CR.pIX-Zelllinien hingegen exprimieren zusätzlich zur  $\alpha$ 2-3-glykosidisch verknüpften Neu5Ac auch die  $\alpha$ 2-6-verknüpfte und sind demnach in der Lage IgG mit anti-inflammatorischer Funktion zu generieren. Der in dieser Arbeit untersuchte rek.IgG wies jedoch eine sehr geringe Sialylierung <1 % auf, was eine in diesem Fall ungewünschte anti-inflammatorische Funktion ausschließt.

Die mannosereichen Strukturen Man5-8 konnten in vergleichbaren Mengen für rek.IgG der AGE1.CR-, AGE1.CR.pIX- und CHO-Zelllinie nachgewiesen werden und bestätigen die geringen Mengen des Anti-CD20-IgGs aus der EB66-Zelllinie nach Olivier et al. [96]. Ohta et al. [162] und Raju et al. [49] konnten neben Man5-9 zusätzlich geringe Mengen an einfach glycosyliertem Man9 für IgG aus Hühnerzellen nachweisen. Die Struktur GlcMan9 wurde weder für IgG aus der EB66-Zelllinie veröffentlicht [96], noch konnte sie für das rek.IgG der AGE1.CR- oder AGE1.CR.pIX-Zelllinie nachgewiesen werden.

In Untersuchungen zu IgG aus Huhn- [49,95] und Entenzelllinien [96] wurden, wie auch in dem in dieser Arbeit untersuchten rek.IgG der AGE1.CR- und AGE1.CR.pIX-Zelllinie, keine für den Menschen potentiell immunogenen Strukturen gefunden. Die humanähnliche N-Glykosylierung (Bisecting-GlcNAc, Neu5Ac) und die robusten Wachstumseigenschaften der AGE1.CR- und AGE1.CR.pIX-Zelllinie macht den Einsatz zur Produktion therapeutischer Antikörper für den Menschen denkbar.

### 3.2.1 Neue Strategie der Fucosereduktion

Zur Optimierung der IgG-Effektorfunktion wurde nach der Detektion einer IgG-typischen starken Fucosylierung, eine neue Strategie zur Fucosereduktion umgesetzt. Bisher durchgeführte Strategien umfassten beispielsweise den *Knockout* oder die Expressionsreduktion der  $\alpha$ 1-6-Fucosyltransferase (FUT8) [60,88], der GDP-Mannose4-6-Dehydratase (GMD) [60,89], die Überexpression der GnT-III [73,90] oder die Erhöhung mannosereicher Strukturen mittels Kifunensin [74]. Im Vergleich zur N-Glykosylierung des hybriden oder mannosereichen Typs besitzt rek.IgG mit komplexer N-Glykosylierung nach Kanda et al. [163] Fucose-unabhängig eine höhere Serumhalblebenszeit.

Zur Steigerung der Aktivität Tumor-spezifischer Antikörper wurde daher in dieser Arbeit die Fucos-

sereduktion komplexer N-Glykane fokussiert. Die neue Strategie der Fucosereduktion basiert auf der stabilen heterologen Expression der GDP-6-desoxy-D-lyxo-4-hexulose-Reduktase (RMD) aus *Pseudomonas aeruginosa*. Die RMD katalysiert die Umsetzung des GDP-Fucose-Vorläufers, GDP-4-keto-6-desoxymannose, zu D-Rhamnose [132, 133] (Schema in Abb.2.22, S.48). Nach der veröffentlichten *Feedback Inhibition* der GMD durch GDP-Fucose [91, 164, 165] bei Säugetierzellen und der GMD-Inhibition bei *Pseudomonas aeruginosa* durch D-Rhamnose nach King et al. [132], wird durch die RMD induzierte Rhamnoseproduktion ebenfalls eine *Feedback Inhibition* der GMD erwartet. Der vorzeitige Abbruch des Fucose-Neusyntheseweges sollte entsprechend zu nicht fucosylierten Glykoproteinen führen. Aufgrund fehlender Rhamnosyltransferasen und -transporter in Wirbeltieren [166] wurde kein Einbau der entstehenden Rhamnose in die zelluläre Glycobiosynthese erwartet.

Die Fucosereduktion mittels RMD-Expression wurde in IgG-exprimierenden Entenzelllinien und einer Anti-HER2/neu-IgG exprimierenden CHO-Zelllinie durchgeführt, sodass der Vergleich der neuen Strategie anhand zweier Zelllinien und Antikörper möglich war. Es zeigte sich in Abschnitt 2.3, dass die RMD-Transfektion bei Enten- und CHO-Zelllinien zu einer erfolgreichen Fucosereduktion führte und somit eine Alternative zu bislang durchgeführten Strategien der Fucosereduktion darstellt.

In Zellproteinen und rek.IgG aus RMD-transfizierten CHO- und Entenzellen konnte mittels HPAEC-PAD und MALDI-TOF-MS erwartungsgemäß kein Einbau von Rhamnose beobachtet werden (Abschnitt 2.3).

Bei Anti-HER2/neu-IgG (Trastuzumab) aus RMD-transfizierter CHO-Zelllinie konnte eine nahezu 100-prozentige Fucosereduktion beobachtet werden. Mittels Fc $\gamma$ -Rezeptor-Bindungsassay und ADCC-Testung mit HER2/neu-überexprimierenden Zielzellen konnte im Vergleich zur fucosylierten Kontrolle eine bis zu 27fach verstärkte Aktivität detektiert werden (Abschnitt 2.3). Stärkere ADCC-Effekte wären in der Testung mit Serum denkbar, was nach Iida et al. [75] mit dem IgG um die Fc $\gamma$ -Rezeptorbindung kompetitiert. Dass auch der Genotyp des Fc $\gamma$ RIIIa-158 Valin (VV) und des Fc $\gamma$ RIIIa-131 Histidin (HH) entscheidend ist für eine starke ADCC-Aktivität, konnte für Trastuzumab von Musolino et al. [78] gezeigt werden.

Einer der untersuchten Trastuzumabs enthielt neben nicht fucosylierten komplexen N-Glykanstrukturen erhöhte Anteile (30 %) des mannosereichen Glykanen Man $\alpha$ 5-8, was nach Raju [6] keine zusätzliche Aktivitätssteigerung zur Folge haben sollte, da die Fucosylierung bereits gegen 0 reduziert vorlag. Dennoch konnte im Vergleich zu Klonen mit zweifach geringeren Mengen mannosereicher Strukturen eine höhere ADCC-Aktivität detektiert werden (Abschnitt 2.3.3.3). Eine Fucose-unabhängige Aktivitätssteigerung durch mannosereiche Strukturen [74] ist somit wahrscheinlich.

Fucosyliertes rek.IgG, exprimiert in Entenzelllinien, zeigte sich im Fc $\gamma$ -Rezeptor-Bindungsassay

(Abschnitt 2.3.3.1) ähnlich aktiv zu dem IgG aus der CHO-Zelllinie. Das rek.IgG der Zelllinie AGE1.CR.pIX zeigte sich sogar zweifach aktiver zu dem der CHO-Zelllinie, was vermutlich auf die vorhandene Bisecting-Struktur zurückzuführen ist [73]. Somit hätte auch die hier fucosylierte Bisecting-Struktur einen Fucose-unabhängigen ADCC-steigernden Effekt. Die gesteigerte Fc $\gamma$ RIIIa-Bindungsaktivität nicht fucosylierter rek.IgGs der Entenzelllinien ähnelt der des Trastuzumabs aus der CHO-Zelllinie (16-19fach). Da erst Antigen-gebundenes IgG effektiv an den Fc $\gamma$ RIIIa bindet [61], wären auch für nicht fucosylierte rek.IgGs aus Entenzelllinien eine stärkere Aktivitäts-Steigerung bei ADCC-Testung mit dem Antigen zu erwarten, was für Trastuzumab beobachtet werden konnte. Zusätzlich war in Entenzelllinien eine RMD-expressionsabhängige Fucosereduktion zu beobachten. Klone mit geringerer RMD-Expression wiesen eine geringere Fucosereduktion auf (Abschnitt 2.3). Nach Scallon et al. [136] ist die Fucosereduktion einer der zwei N-Glykane im IgG-Fc-Teil bereits ausreichend für eine maximale Aktivitätssteigerung. Es waren demzufolge keine Aktivitätsunterschiede zwischen den verschieden stark fucosylierten rek.IgGs der Entenzelllinien zu erwarten. Im Fc $\gamma$ -Bindungsassay konnte diese Vermutung bestätigt werden, da keine Unterschiede in der Aktivität zwischen 70 und 94% nicht fucosylierten rek.IgGs nachgewiesen werden konnten. Ähnliche Ergebnisse konnte Olivier et al. [96] mit Anti-CD20-IgG aus der Entenzelllinie EB66 zeigen. In dieser Studie zeigte sich eine maximale ADCC-Steigerung bei einer 50-prozentigen Fucosylierung, eine erhöhte Menge nicht fucosylierter Strukturen (80 %) erbrachte keine zusätzliche ADCC-Steigerung. In Studien von Iida et al. [75] konnten kompetitiv-inhibitorische Effekte fucosylierter mit nicht fucosylierten rek.IgGs um die Antigen-Bindungsstelle beobachtet werden. Zudem zeigte sich fucosyliertes rek.IgG in Konkurrenz mit Plasma-IgG um den Fc $\gamma$ -Rezeptor auf NK-Effektorzellen mit deutlich geringerer Aktivität. Demnach sollte für den therapeutischen Einsatz mit stärkster ADCC ein vollständig nicht fucosyliertes rek.IgG eingesetzt werden. Eindeutige Aussagen zum Ausmaß des ADCC-steigernden Effektes nicht fucosylierter rek.IgGs am Menschen werden jedoch mit höchster Spannung von den laufenden klinischen Studien erwartet.

### 3.3 Modifizierter Vakzinia Virus Ankara

Viren können wirtsspezifische Glykosylierungen zur Zellanheftung, als ersten Schritt der Infektion, nutzen. Diese Glykosylierungsmuster enthalten in der Regel Sialinsäuren oder Fucosen [33], welche durch lektinähnliche Oberflächenproteine gebunden werden. Bei Influenzaviren ist dieses Oberflächenprotein das Hämagglutinin (HA). Für eine Freisetzung von Nachkommenviren stört jedoch die Rezeptorbindung. Bei Influenzaviren sorgt ein weiteres Oberflächenprotein, die Neuraminidase (NA)

für die Abspaltung potentieller Bindungsstellen auf der Zelloberfläche. So geht eine Neuraminidasebehandlung von Zelloberflächen oft mit einer geminderte Infektiösität von Viren einher [167]. Der humane Norovirus bildet eine Ausnahme, dieser zeigte bei Neuraminidasebehandlung von Zellen eine Zunahme der Infektiösität, vermutlich weil durch diesen Schritt sterische Hinderung verringert wird und das eigentlich genutzte fucosylierte Motif besser zugänglich ist. Auch der MVA-Virus besitzt anscheinend neben der Sialinsäureerkennung mittels Hämagglutinin weitere Anheftungsstrategien, da lediglich zwei Drittel der umhüllten Viren Hämagglutinin auf ihrer Oberfläche tragen [124]. Zusätzlich fehlt MVA eine eigene Neuraminidase. Es besteht demnach die Gefahr, dass austretende Viruspartikel an der Wirtszelloberfläche „kleben bleiben“ [168]. Die Beobachtung von Jordan et al. [93], dass die AGE1.CR-Zelllinie über eine höhere MVA-Produktivität im Vergleich zur deutlich stärker sialylierten BHK-Zelllinie verfügt, könnte die Vermutung alternativer, nicht sialylierter Erkennungssequenzen bestätigen.

Anhand des HIV-2 Glykoproteins [125, 169], dem Marburg-Virus [126] und dem HA des Influenza-Virus [170] konnte beispielsweise beobachtet werden, dass Viren eine wirtsspezifische Glykosylierung aufweisen. Die Übernahme einer wirtsspezifischen Glykosylierung in Form von zusätzlichen wirtseigenen Membranen, in die sich der Virus hüllt, erhöht anscheinend die Infektiösität. Bei MVA bestätigt sich dies nach Locker et al. [107] bei der Bindung an HeLa-Zellen in Abhängigkeit verschiedenen umhüllter Viren. So induzierte der nicht zusätzlich umhüllte IMV eine Signalkaskade, während der zusätzlich durch wirtseigene Golgi-Membranen umhüllte EEV diese Signalkaskade nicht auslöst und infektiöser ist.

Von einzelnen Strukturen abgesehen, zeigte sich die N-Glykosylierung der Membranglykoproteine nach MVA-Infektion (Membran-MVA) und der EEV-Partikel (EEV) unter Betrachtung der Antennarität, Galactosylierung und Fucosylierung jeweils vergleichbar zu den gewonnenen Daten aus Membranglykoproteinen ohne Infektion (Abschnitt 2.1.4).

Überraschenderweise zeigte sich im speziessübergreifenden Vergleich der N-Glykosylierung der BHK- und CHO-Zelllinie eine große Ähnlichkeit in Glykosylierungseigenschaften. So konnte eine ähnliche Verteilung überwiegend biantennärer N-Glykane mit einfacher Fucosylierung nachgewiesen werden, was Ergebnisse von Gawlitzek et al. [171] für die BHK-Zelllinie bestätigt. Hard et al. [159] beschrieb eine ähnliche Glykosylierung für CHO-Zellen. Auch die überwiegend vollständige Galactosylierung konnte bestätigt werden.

Die detektierten Unterschiede in der Sialylierung der Membran-MVA und des EEVs lassen vermuten, dass die Zellinfektion mit MVA verändernd in die Glykosylierungsmaschinerie des Wirts eingreift. Einschränkend muss jedoch gesagt werden, dass die erhöhte Sialylierung im Vergleich zur Mem-

branglykosylierung ohne MVA-Infektion auch durch die unterschiedlichen Zellmedien zur Infektion und zur Proliferation der Zellen begünstigt worden sein könnten. Bei infizierten AGE1.CR.pIX- und BHK-Zellen zeigten sich die Membranglykoproteine (Membran-MVA) jeweils stärker sialyliert im Vergleich zu den EEVs. Dies könnte auf die bei Zellaustritt fusionierte äußere Virusmembran der IEVs zurückzuführen sein. Da nach Meiser et al. [144] vorwiegend CEVs gebildet werden, könnte die Endocytose einer solch großen Menge an Virusproteinen langsamer sein als die Exocytose neuer IEVs. Dies könnte eine erhöhte Sialinsäuremenge an der Zelloberfläche erklären.

Bakterielle Eingriffe in die Wirtsglykosylierung, wie die induzierte Sezernierung von Neuraminidasen und Fucosidasen, die die Wirts-Oberflächenglykosylierung zu Gunsten von beispielsweise *Helicobacter pylori* [172] verändern, sind bereits bekannt.

Im Vergleich zu anderen Virenoberflächenproteinen wie das gp120 von HIV, welches vorrangig mit mannosereichen Strukturen des Typs Man 7-9 besetzt ist [173, 174], wurden diese Strukturen bei den hier untersuchten EEV-Partikeln des MVA lediglich mit einem Anteil von 20 % der N-Glykane detektiert.

Die für humane Glykoproteine untypische große Menge mannosereicher Strukturen bietet eine Möglichkeit zur Virusbekämpfung. So wurde beispielsweise der therapeutische Antikörper 2G12 generiert, der im Serum befindliche Viren über deren mannosereiche Strukturen komplexiert und somit an der Infektion neuer Wirtszellen hindert [149, 175]. In einem seltenen US-amerikanischen Fall einer Infektionen mit der *smallpox*, konnte die Gabe virusspezifischer Antikörper ein Leben retten [152]. Aufgrund der häufig erhöhten Anteile mannosereicher Strukturen an Virusoberflächen, versprechen sie eine breite Virusbekämpfungsmöglichkeit. In Kombination mit der prophylaktischen Immunisierung mit attenuierten Lebendimpfstoffen, wie bei dem Vakzinia Virus ACAM2000 [176] und den Virustatika wie Cidofovir Smee2002, Cidovir [177] oder Aciclovir [178], zur Inhibition der DNA-Synthese stehen verschiedene Strategien der Virusbekämpfung zu Verfügung. Gerade mit Blick auf potentielle Virusresistenzen gegen einzelne Strategien zählt es sich wie im Falle des US-amerikanischen Kleinkindes [152] aus, über alternative Strategien zu verfügen. So sollten zukünftig Virusglykosylierungen noch genauer untersucht werden, um neue therapeutische Ansätze zu entdecken.

# 4 Zusammenfassung

## 4.1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurden die N-Glykosylierungseigenschaften der neuen Designerzelllinie AGE1.CR charakterisiert. Die Zelllinie wurde aus Retinazellen der Ente *Cairina moschata* über die Expression adenoviraler Proteine immortalisiert. Durch die zusätzliche Expression des adenoviralen pIX-Proteins wurden in der AGE1.CR veränderte biochemische Eigenschaften beobachtet, die sich möglicherweise auf einen konstitutiv aktivierten Heat-Shock rückführen lassen. Dazu zählen Wachstumsunterschiede und eine verstärkte Virusproduktivität. Da diese einen Einfluss auf die Glykosylierung haben könnten, wurde die N-Glykosylierung beider Entenzelllinien, AGE1.CR- und AGE1.CR.pIX, untersucht. In Hinblick auf die funktionelle Relevanz von N-Glykanen wurde insbesondere die zellspezifische Sialylierung und Fucosylierung der Zellmembranglykoproteine und rekombinant exprimierter Proteine mittels Lektinfärbung, Chromatographie und Massenspektrometrie analysiert.

Über RP-HPLC konnte für die AGE1.CR- und AGE1.CR.pIX-Zelllinien die ausschließliche Expression von Neu5Ac statt der bei tierischen Zellen häufig auftretenden Neu5Gc nachgewiesen werden. Mittels spezifischer Lektine konnte der Verknüpfungstyp der Neu5Ac beider Entenzelllinien als  $\alpha$ 2-3- und  $\alpha$ 2-6-glykosidisch bestimmt werden. Im Gegensatz zur häufig verwendeten Produktionszelllinie *Chinese Hamster Ovary* (CHO), welche ausschließlich  $\alpha$ 2-3-verknüpfte Neu5Ac aufweist, eignen sich die Entenzelllinien somit insbesondere zur Produktion von anti-inflammatorischen rekombinanten IgGs (rek.IgG).

Die Zellmembranglykosylierung wies überwiegend triantennäre komplexe N-Glykane auf. Somit exprimieren die Entenzelllinien, ähnlich zur humanen neuronalen Zelllinie (AGE1.HN, ProBioGen), höherantennäre komplexe N-Glykane, im Vergleich zur CHO-Zelllinie mit überwiegend biantennären Strukturen. Der Fucosylierungsgrad konnte chromatographisch und massenspektrometrisch anhand von Membranglykoproteinen nachgewiesen werden. Hierbei zeigten sich die Entenzelllinien überwiegend einfach-fucosyliert mit einem insgesamt geringeren Fucosylierungsgrad als die CHO-Zelllinie.

Im Gegensatz zu Membranglykoproteinen wiesen die rek.IgGs aus beiden Entenzelllinien einen für IgG typischen hohen Anteil an Core-Fucose auf.

Im Weiteren ließ sich für beide Entenzelllinien im Vergleich zur CHO-Zelllinie, sowohl für Membranglykoproteine als auch für rek.IgG, eine geringere Galactosylierung messen. Die AGE1.CR.pIX-Zelllinie wies im Vergleich zur AGE1.CR-Zelllinie v.a. eine höhere Galactosylierung auf. Dies könnte in der Aktivierung von Heat-Schock-Proteinen durch das pIX-Protein begründet sein, was mit einer strengeren Kontrolle der Proteinfaltung einhergeht. Da die Proteinglykosylierung für eine korrekte Proteinfaltung entscheidend sein kann, ist eine vollständigere Galactosylierung bei der AGE1.CR.pIX-Zelllinie im Vergleich zur AGE1.CR-Zelllinie plausibel. Anhand des rek.IgGs konnte über eine Kombination verschiedener Analysemethoden die Eigenschaft der Entenzelllinien zur Ausbildung der Bisecting-Struktur nachgewiesen werden. Diese Struktur findet sich ebenfalls häufig in IgG, welches aus humanem Serum isoliert wurde, nicht aber in rek.IgG aus der CHO-Zelllinie.

Für rek.IgG, exprimiert in den Entenzelllinien, und Anti-HER2/neu (Trastuzumab), exprimiert in der CHO-Zelllinie, konnte erfolgreich eine neue Strategie zur Fucosereduktion mit gesteigerter Fc-Effektorfunktion durchgeführt werden. Die Methode inhibiert den Neusyntheseweg der GDP-Fucose und stellt eine Alternative zu derzeit verfügbaren Strategien, wie der Expressionsreduktion der FUT8, dar und ermöglicht die Generierung stabiler Zelllinien mit nahezu vollständig inhibierter Fucosylierung.

In den Entenzelllinien, welche insbesondere zur Virusproduktion geeignet sind, wurde weiterhin der Virus *Modified Vaccinia Virus Ankara* (MVA) produziert und dessen N-Glykosylierung massenspektrometrisch untersucht. Die N-Glykosylierung der MVA-Partikel zeigte sich erwartungsgemäß wirtsähnlich. MVA-Partikel und Membranglykoproteine nach Infektion wiesen jedoch überraschenderweise, im Vergleich zu Membranglykoproteinen ohne Infektion, eine erhöhte Sialylierung auf. Es wird vermutet, dass MVA-Partikel mit gesteigerter Sialylierung längere Serumhalblebenszeiten aufweisen und sich eventuell mit höherer Affinität an die Wirtszelloberfläche anheften. Diese Arbeit wirft die Frage auf, ob MVA diese Eigenschaft gezielt hervorrufen kann. In Zukunft könnte dies beispielsweise anhand von Experimenten mit weiteren Zelllinien näher untersucht werden.

Anhand der untersuchten Zellmembranglykosylierung und der Glykosylierung des rek.IgGs konnten erfolgreich spezifische Glykosylierungseigenschaften der Entenzelllinien nachgewiesen werden. Hierzu zählen die Ausbildung überwiegend komplexer N-Glykane, die Fähigkeit zur Ausbildung der Bisecting-Struktur, sowie die Ausbildung der Core-Fucose und der Sialylierung mit ausschließlich Neu5Ac in  $\alpha$ 2-3- und  $\alpha$ 2-6-Verknüpfung. Es konnten zudem keine für den Menschen potentiell immunogenen Monosaccharide (z.B. Xylose oder Neu5Gc) oder Oligosaccharide (z.B. ausschließlich man-



nosereiche Strukturen) identifiziert werden. Die Entenzelllinien bilden somit eine human-ähnliche Glykosylierung aus und sind aufgrund dessen nicht nur geeignet zur Produktion von Viren, sondern auch von rekombinanten therapeutischen Proteinen für den Menschen.

## 4.2 Abstract

In the present dissertation the N-glycosylation profile of a new avian cell line, AGE1.CR, has been characterised. This cell line has been developed from retina cells of the Muscovy duck (*Cairina moschata*) by immortalization via stable transfection with E1 genes from human adenovirus type 5 and was designed by ProBioGen AG to replace primary chicken cells in the field of vaccine production. AGE1.CR.pIX is a modified CR cell line transfected for stable expression of the pIX-gene that encodes a structural protein of human adenovirus type 5. This modification further increases productivity of the cell line for certain viral vectors. However the AGE1.CR.pIX cell line showed an increased glucose consumption and propensity to cell-cell aggregation. Given that cell contacts and glycosylation are closely related, the N-glycosylation profile of both avian cell lines – AGE1.CR and AGE1.CR.pIX – was characterised. With regard to functionality the focus of the characterisation was on cell-specific sialylation and fucosylation. In addition, native cell membrane glycoproteins and recombinant glycoproteins were analysed by specific lectin staining, chromatography and mass spectrometry.

Sole expression of N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) instead of typical N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) was determined by RP-HPLC for the AGE1.CR- and AGE1.CR.pIX cell line as in human cells. Surprisingly, specific lectin staining coupled with FACS-analysis showed an  $\alpha$ 2-3- and  $\alpha$ 2-6-glykosidic linked Neu5Ac for avian cell lines. In comparison, the common used producer cell line chinese hamster ovary (CHO) exclusively expresses  $\alpha$ 2-3-linked Neu5Ac. Due to the ability of expressing  $\alpha$ 2-6-linked Neu5Ac the avian cell lines are useful to produce anti-inflammatory recombinant human IgGs (rec.IgG). The analysed N-glycosylation profile of avian cell membrane glycoproteins exhibited predominantly complex type tri-antennary N-glycans. Similar to the analysed human neuronal cell line (AGE1.HN, ProBioGen), avian cells showed a higher antennary composition in contrast to the CHO cell line with predominantly complex type bi-antennary N-glycans.

By chromatography and mass spectrometry, a decreased fucosylation state could be determined for avian cell membrane glycoproteins in contrast to CHO. Complex type N-glycans were found to be predominantly single fucosylated in the  $\alpha$ 1-6-linked state also known as core-fucose. In contrast to a decreased fucosylation state of avian cell membrane glycoproteins rec.IgG was produced with a IgG-typical high core-fucosylation.

Furthermore, in comparison of avian and CHO cell lines avian cell membrane glycoproteins and rec.IgGs showed a decreased galactosylation state. The AGE1.CR showed further a decreased galactosylation state in contrast to the AGE1.CR.pIX cell line, as the only detected difference in

between of the two avian N-glycosylation profiles.

Because galactosylation is one of the final processing steps of well-folded proteins this supports the model where pIX in the AGE1.CR.pIX activates heat shock responses that potentially improve protein folding and maturation. It is also demonstrated that the avian cells, as opposed to CHO, express rec.IgG with bisecting GlcNAc structures similar to IgG in human serum.

Furthermore a new strategy for stable reduction of fucosylation was successfully implemented in avian and CHO cell lines expressing rec.IgG. This method inhibits the de novo synthesis of GDP-Fucose and demonstrates a novel alternative to common strategies such as the  $\alpha$ 1-6-fucosyltransferase (FUT8) -knockout. rec.IgG with demonstrated reduction in fucosylation showed an increased Fc mediated effector function.

The avian cell lines, were further used to produce the modified vaccinia virus ankara (MVA), an important strain for vectorial vaccine applications. The N-glycosylation profile of MVA produced in avian cells reflected host properties. However, MVA-particles exhibited an increased sialylation state as compared with the cell membrane glycoproteins. We speculate that the virus promotes this state as MVA-particles with higher sialylation are protected against early clearing out of serum by asialoglycoprotein receptors.

With the help of analysed cell membrane glycoproteins and rec.IgGs, elementary characteristics of the avian N-glycosylation profile could be determined. Thus the AGE1.CR and AGE1.CR.pIX cell lines showed an  $\alpha$ 2-3- and  $\alpha$ 2-6-linked Neu5Ac, bisecting-GlcNAc and core-fucosylation. Finally, in the avian N-glycosylation profile no for human potent immunogenic monosaccharides, such as Xylose or Neu5Gc, could be found. Recombinant human IgG from AGE1.CR resembled low amounts of mannose rich structures as detected with CHO cells. Thus the new avian cell lines – AGE1.CR and AGE1.CR.pIX – exhibit a human-like N-glycosylation profile and appear suitable not only for virus production but also for production of therapeutic proteins.

# 5 Material und Methoden

## 5.1 Materialien

### 5.1.1 Geräte

GERÄTE	NAME	HERSTELLER
Zentrifuge	Desaspeed LC-1K	Desaga, Wiesloch
	J2-21	Beckmann, Krefeld
	Optima <sup>TM</sup> LE-80K	Beckmann, Krefeld
	Avanti <sup>TM</sup> J20	Beckmann, Krefeld
	Sigma 2-16K	Sartorius, Göttingen
	Galaxy Mini	VWR, Darmstadt
SpeedVac	Zentrifuge	Heraeus, Düsseldorf
	Kühlfalle	Heraeus, Düsseldorf
	Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim
Inkubator	Thermomix Comfort	Eppendorf, Wessling-Berzdorf
	T10A	Heraeus, Düsseldorf
	CB150	Binder, Tuttlingen
	Certomat	Sartorius, Göttingen
	Unimax 1010/1000	Heidolph, Schwabach
	UT6	Heraeus, Düsseldorf
	HeraCell	Thermo Fischer Scientific, Langenselbold
	Multitron HT	Infors, Bottmanningen, Schweiz
Sterilbank	HeraSafe KS12	Thermo Fischer Scientific, Langenselbold
	LaminAir	Heto Holten, Allerød, Dänemark
Waage	Handy H51	Sartorius, Göttingen
	ME235S	Sartorius, Göttingen
Ultraschallbad	Sonorex TK52	Bandelin, Berlin
bidest.H <sub>2</sub> O	MilliQ Gradient A10	Millipore, Schwalbach
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA

Magnetrührer	RH basic	IKA Labortechnik, Staufen
pH-Meter	pH211	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Pipetten	Research, variabel	Eppendorf, Wessling-Berzdorf
Gelimager	Gel Doc <sup>TM</sup> XR	Bio-Rad, München
Scanner	A3 Scanner	Bio-Rad, München
Plattenreader	Infinite M200	Tecan, Crailsheim
MicroPorator	MP-100	Digital Bio, Ace High-end Tower, Korea
Zellsortierer	CyFlow space	Partec, Münster
Zellseparator	Magnetic bead separator	Milteny, Bergisch Gladbach
PCR-Maschine	PTC-100 <sup>TM</sup>	MJ Research, Inc. Watertown, USA
Fluorometer	Qubit®Fluorometer	Invitrogen, Karlsruhe
Real-Time-Cycler	StepOnePlus	AB, Foster City, CA
Zellzählgerät	Vi-Cell XR	Beckman Coulter, Brea, CA
Mikroskop	Olympus IX-50	Olympus, Hamburg
	Leica DM IL LED	Leica, Wetzlar
Proteinmeßgerät	MicroPorator MP-100	PEQLAB, Erlangen
	Gyrolab xP workstation	Gyros AB, Uppsala, Schweden
FPLC	GE Pharmacia FPLC	Amersham Pharmacia, Freiburg
CE	CE-MDQ-PACE	Beckman Coulter, Brea, CA
HPLC	Summit HPLC	Dionex, Idstein
HPAEC-PAD	HPAE-PAD	Dionex, Idstein
MALDI-TOF-MS	Ultraflex <sup>R</sup> III smartbeam <sup>TM</sup> MALDI TOF/TOF	Bruker Daltonics, Bremen

### 5.1.2 Chemikalien

CHEMIKALIEN	FIRMA
ACN	J.T.Baker, Deventer, Holland
Acrylamide/BisSolution 30 %	Bio-Rad, München
AEM	Invitrogen, Karlsruhe
αMEM	Lonza, Verviers, Belgien
α1sGP	Human, Hermentine
APS	Bio-Rad, München
APTS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Agarose monomeric avidin	Pierce/Perbio, Bonn
Aminosäuren 50 ×	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

---

Ammoniaklösung >25 %	Merck, Darmstadt
Arabinose	Roth, Karlsruhe
Asparagin-L 133 mM	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
<i>Biosafe Coomassie</i>	Bio-Rad, München
Blockierungsreagenz	Roche, Mannheim
<i>Brilliant Stain</i>	Bio-Rad, München
Calcein AM	Invitrogen, Karlsruhe
Chloroform	Merck, Darmstadt
<i>CryoSure</i> -DMSO	WAK, Steinbach
Cyanbromid aktivierte Sepharose 4B	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dapi	Serva, Mannheim
Desoxyribose	Fluka(Sigma)Steinheim
DH	Oxford Glycoscience, Abingdon, UK
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
DMSO	Merck, Darmstadt
DNA-Leiter, <i>1 kb-Plus</i>	Invitrogen, Karlsruhe
DTAF	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA
DTE	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DMEM/F12 1:1	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA-free (Tabletten 25 x)	Roche, Mannheim
Effectene <sup>TM</sup>	Qiagen, Hilden
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol (HPLC-Grade)	Merck, Darmstadt
Ethanol (vergällt)	Herbeta, Berlin
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
FCS	Biochrom, Berlin
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Fructose	Fluka(Sigma)Steinheim
Fucose	Fluka(Sigma)Steinheim
Geneticin/G418	PAA, Pasching, Österreich
Galactosamin hydrochlorid	Fluka(Sigma)Steinheim
Galactose	Fluka(Sigma)Steinheim
Galactose 1 M	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glucose	Fluka(Sigma)Steinheim
Glucose 2,5 M	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glucosamin hydrochlorid	Fluka(Sigma)Steinheim
Harnstoff	Merck, Darmstadt

---

---

Hefe-Hydrolysat	SAFC Bioscience, Lenexa, KA, USA
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
HT	Invitrogen, Karlsruhe
Lipofectamine <sup>TM</sup>	Invitrogen; Carlsbad, CA
Luminol	Roth, Karlsruhe
Mannose	Fluka(Sigma)Steinheim
Medium C8862	SAFC Bioscience, Lenexa, KA, USA
Medium CD293	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Methyl-Iodid 12C	Fluka(Sigma)Steinheim
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid Plätzchen	Merck, Darmstadt
Natronlauge	J.T.Baker, Deventer, Holland
NP40	Calbiochem, Bad Soden
OGP	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
p-Coumaric Acid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Penicillin-Streptomycin	BioChrom, Berlin
Protein A-Sepharose <sup>TM</sup> 4B	Invitrogen, CA, USA
Puromycin	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe
Saponin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Soja-Hydrolysat	SAFC Bioscience, Lenexa, KA, USA
Stabiles Gln	Invitrogen, Karlsruhe
Sucrose	Calbiochem, Bad Soden
Super-DHB	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TEMED	Bio-Rad, München
TMB	Seramun, Dolgenbroth
TFA	Merck, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe
TrypLE <sup>TM</sup>	Invitrogen, Karlsruhe
Tween20	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Vitamine+Mineralien 100 ×	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Vollblut	Haema, Berlin
Wasserstoffperoxid	Roth, Karlsruhe
Zeocin	Invitrogen, Karlsruhe

---

### 5.1.3 Verbrauchsmaterial

VERBRAUCHSMATERIAL	HERSTELLER
6/12/24/96er Lochplatten	TPP, Trasadingen, Schweiz
25/7 cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Vakuumfilter (150 ml Flasche), PES 0,22 μm	TPP, Trasadingen, Schweiz
Spritzenfilter, PES 0,22 μm	TPP, Trasadingen, Schweiz
konische Zentrifugenröhrchen 15/50 ml BRT 50 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
Kryoröhrchen 2 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
schwarze 96er Fluoreszenzplatten	Thermo Fischer Scientific, Langenselbold
5/10/25 ml Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
0,125/0,5/2L Erlenmeyerkolben	VWR, Darmstadt
<i>Cloning discs</i> , 3 mm	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
C-18-Säulen	Waters Milford, MA, USA
Carbograph SPE Säulen	Grace Davison, Deerfield, IL
TopTip <sup>TM</sup> Typ P2-Carbon-Säulen	Sunchrom, Friedrichsdorf
<i>Bio-Traces</i> Nitrocellulosemembran	Pall, Dreieich
Blotting-Filterpapier	Whatman, Maidstone, England
Millex Syringe Driven Filter Unit, 0,22 μm	Millipore, Bedford, USA
VivaSpin 6/30.000 MVCO, PES	VivaScience, Hannover
Glasflaschen	Schütt, Göttingen
Objekträger/Deckel	Roth, Karlsruhe
Glas-Vials 2 ml (2-SV)	Chromacol/Abimed, Langenfeld
Glas-Deckel 2 ml (8-SCJ)	Chromacol/Abimed, Langenfeld
Glas-Septen 2 ml (8-ST101)	Chromacol/Abimed, Langenfeld
Glas-Vials 4 ml	Wheaton/VWR, Darmstadt
Glas-Deckel 4 ml	Wheaton/VWR, Darmstadt

### 5.1.4 Kits

TESTKIT	HERSTELLER
NucleoSpin® RNAII Kit	Macherey-Nagel, Düren
Quant-iT <sup>TM</sup> RNA Assay Kit	Invitrogen, Carlsbad, CA
Quant-iT <sup>TM</sup> DNA Assay Kit	Invitrogen, Carlsbad, CA
Quant-iT <sup>TM</sup> Protein Assay Kit	Invitrogen, Carlsbad, CA



cAMV First-Strand cDNA Synthesis Kit	Invitrogen, Carlsbad, CA
BCA <sup>TM</sup> Protein Assay Kit	Pierce(Perbio), Rockford, USA
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i> , 250	Qiagen, Hilden
<i>Carbohydrate Labeling and Analysis Kit</i>	Beckman Coulter, Brea, CA
Mikroporations-Kit	Peqlab, Erlangen

### 5.1.5 Antikörper

ANTIKÖRPER	HERSTELLER
pHuman Serum IgG	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
pRabbit Anti-Vaccinia	Quartett, Berlin
pGoat Anti-Rabbit-HRP	Promega Corp., Mannheim
Anti-FcyIIIa-His	RD Systems, Minneapolis, MN
mAnti-Tetra-His	Qiagen, Hilden
mAnti-Human-HRP	Dianova, Hamburg
Anti-CD56-Alexa488	BD, San Jose, CA
Anti-CD16-PE	BD, San Jose, CA

### 5.1.6 Lektine

LEKTIN	ABKÜRZUNG	KONJUGAT	SPEZIFITÄT
Sambucus Nigra Agglutinin	SNA	Biotin	$\alpha$ 2,6 Sia
Maackia Amurensis Agglutinin	MAA	Biotin	$\alpha$ 2,3 Sia
Aleuria Aurantia Lectin	AAL	Biotin	Fuc $\alpha$ 1,6 GlcNAc
Lens Culinaris Agglutinin	LCA	Fluorescein	Fuc $\alpha$ 1,6 GlcNAc

Die angeführten Lektine stammen von Vector Laboratories; Burlingame, CA.

### 5.1.7 Primer/Vektoren

GEN	PRIMER	SEQUENZ	PRODUKT	HERSTELLER
RMD	vorwärts	AGATCTGCCACCATGACC	1116 bp	MolBiol, Berlin
	rückwärts	GAGCGCAAACCTCTTC		

Tumor-spezifisches IgG1: Expressionsvektor von ProBioGen (PBG, Berlin); leichte und schwere Kette in einem Vektor; Puromycinresistenzgen

Trastuzumab (Herceptin®); Anti-HER2/neu-IgG1; Klon von PBG zum Test der RMD-

Strategie zur Fucosereduktion eingesetzt.

RMD: Expressionsvektor von ProBioGen (PBG, Berlin); Aminosäuresequenz (304 AS) aus *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (GenBank: AAG08839.1); enthält zusätzlich eine *green fluorescent protein* (GFP)-Sequenz

### 5.1.8 Enzyme

GRUPPE	ENZYME	FIRMA
Endoglykosidasen	N-Glykosidase F	Roche Diagnostics, Mannheim
	Endo-S	Andre Winkler, DRFZ
Exoglykosidasen	Neuraminidase	Roche Diagnostics, Mannheim
	Sialidase S	Roche Diagnostics, Mannheim
	β-Galactosidase	Roche Diagnostics, Mannheim
	HEXase III, GKX5003	ProZyme, San Leandro, CA
	HEXase I, GKX80050	ProZyme, San Leandro, CA
	Fucosidase GKX5019	ProZyme, San Leandro, CA
Restriktionsenzyme	Fucosidase GKX5006	ProZyme, San Leandro, CA
	NruI	Roche Diagnostics, Mannheim
	SpeI	Roche Diagnostics, Mannheim
	Taq-Polymerase	Qiagen, Hilden
	Trypsin TPCK 1426	Sigma-Aldrich, St Louis, MO

Die jeweilige Enzymspezifität ist in Abschnitt 5.5.1, S.119 und ??, S.?? nachzulesen.

### 5.1.9 Organismen

URSPRUNG	ZELLINIE	
Moschusente ( <i>Cairina moschata</i> ST4)	AGE1.CR	Cairina Retina (PBG)
	AGE1.CR.pIX	Cairina Retina+pIX (PBG)
Human	AGE1.HN	Humane Neuronale (PBG)
	HEK-293	<i>Human Embryonic Kidney</i>
	ATCC-CRL-1573	
	SK-BR3 <sup>1</sup>	epithelial/adhärent; Brustkrebszellen; starke HER2/neu-Expression
	BT-474 <sup>2</sup>	

<sup>1</sup> *Cell Lines Service* (CLS), Eppelheim

<sup>2</sup> *American Type Culture Collection* (ATCC), Manassas, VA

Hamster	CHO-DG44	Chinese hamster ovary (CHO); Dihydrofolatreduktase negativ
	BHK-21	Bovine Hamster Kidney
Affe	Vero	<i>African Green Monkey Kidney</i>
	ATCC-CCL-81	
MVA	ATCC-VR-1508	<i>Modified Vaccinia Virus Ankara</i>

### 5.1.10 Software

SOFTWARE	HERSTELLER
GlycoWorkbench	[179]
Glyco-Peakfinder	[180]
Chromeleon Client	Dionex, Idstein
Gyrolab Evaluator Software Version 6.8	Gyros AB, Uppsala, Schweden
flex Control 3.0	Bruker Daltonics, Bremen
flex Analysis 3.0	Bruker Daltonics, Bremen
32 Karat	Beckmann, Krefeld
Magellan6 Version 6.4/6.1	Tecan, Crailsheim
Image Lab <sup>TM</sup>	Bio-Rad, München
PDQuest	Bio-Rad, München
ViewfinderLite <sup>TM</sup> 1.0	Olympus, Hamburg

## 5.2 Molekularbiologische Methoden

### 5.2.1 RT-PCR

Zum Nachweis der RNA-Expression wird die messenger RNA (mRNA) aus Zellen isoliert und über eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase, RT) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Diese bildet nun die Grundlage zum spezifischen Gennachweis mittels herkömmlicher Polymerasekettenreaktion (PCR).

#### 5.2.1.1 mRNA-Isolierung

Hierbei wird der NucleoSpin® RNA II Kit verwendet.  $2 \times 10^6$  Zellen werden gemäß dem Protokoll zur Isolierung von mRNA aus Eukaryoten eingesetzt und abschließend in  $60 \mu\text{l}$  eluiert.

#### 5.2.1.2 Quantifizierung der RNA

Die isolierte mRNA wird mit dem *Quant-iT<sup>TM</sup> RNA Assay Kit* quantifiziert. Dafür werden die Proben mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und im Qubit Fluorometer detektiert ( $630_{Ex}/680_{Em}$  nm). Abgesehen von SDS ist diese Methode unempfindlich gegenüber herkömmlichen Konzentrationen an Salzen, Lösungsmitteln und Proteinen. Der *Quant-iT<sup>TM</sup> RNA Assay Kit* hat einen linearen Bereich von 5-100 ng. Die Messung von Triplikaten hat einem Variationskoeffizienten (VK) von  $\leq 10\%$ . Die Proben werden mit beiliegendem Puffer in dünnwandigen, lichtdurchlässigen 0,5-ml-Gefäßen gemäß dem Hersteller-Protokoll verdünnt. Die Messung ist auf Raumtemperatur ausgelegt, die Proben werden entsprechend behandelt.

#### 5.2.1.3 RT-PCR

Die unspezifische Umschreibung isolierter mRNA in cDNA wird mittels *cloned avian myeloblastosis virus (AMV) First-Strand cDNA Synthesis Kit* durchgeführt. mRNA wird mit AMV Reverser Transkriptase (AMV-RT) und einem Gemisch von DNA-Primern, bestehend aus 6 zufällig gepaarten Nukleotiden, in verschiedene RNA-cDNA-Hybridstränge umgeschrieben. In einem zweiten Schritt wird nun die cDNA durch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase mit erhöhter Temperaturstabilität (Taq-Polymerase) und genspezifischen DNA-Primern (vorwärts und rückwärts) exponentiell amplifiziert. Der Erfolg wird über Agarosegelelektrophorese geprüft.

Der Ansatz wird bei  $65^\circ\text{C}$ , 5 min denaturiert. Es folgt die Zugabe für die Amplifikation: Zur cDNA-Synthese (RT) wurde der Ansatz 10 min bei  $25^\circ\text{C}$  (Primeranlagerung), 50 min bei  $55^\circ\text{C}$  (cDNA-Synthese) und 5 min bei  $85^\circ\text{C}$  (Synthesestop) inkubiert.  $2 \mu\text{l}$  der *first-strand*

REAGENZIEN	1 × ANSATZ
<i>random-hexamer</i> Primer	10-20 pmol
mRNA	500 ng
10 mM dNTP Mix	2 $\mu$ l
DEPC H <sub>2</sub> O	ad 12 $\mu$ l
$\Sigma$ Volumen	12 $\mu$ l

REAGENZIEN	1 × ANSATZ
5 × cDNA Synthesepuffer	4 $\mu$ l
0,1 M DTT	1
RNaseOUT <sup>TM</sup> (40 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
DEPC H <sub>2</sub> O	1 $\mu$ l
cloned AMV RT (15 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
$\Sigma$ Volumen	20 $\mu$ l

Synthese werden anschließend für die Genamplifikation mit spezifischen Primern wie folgt eingesetzt.

REAGENZIEN	1 × ANSATZ/TEMP/ZEIT
cDNA	2 $\mu$ l
$\rightleftharpoons$ Primer	je 20 pmol
Taq-Polymerase	0,5 U
10 mM dNTP Mix	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM
DEPC H <sub>2</sub> O	ad 25 $\mu$ l
$\Sigma$ Volumen	25 $\mu$ l

#### 5.2.1.4 Real-Time-PCR

Eine Möglichkeit der relativen Quantifizierung des MVA-Virus stellt die Real-Time-PCR dar. Die Virus-DNA wird isoliert und über Gen-spezifische Sonden quantifiziert (StepOnePlus). Die Anzahl der benötigten PCR-Zyklen, für das Erreichen eines bestimmten Schwellenwertes, wird als Maß für die Menge an ursprünglich enthaltenem Template gesetzt [181]. Zur Normalisierung wird zusätzlich das E1-Gen detektiert, als Maß für die ursprüngliche Zellzahl.

#### 5.2.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient hier der Auftrennung von DNA nach Größe. Die eingesetzte Konzentration bestimmt die Porengröße des Gels und somit dessen Trennleistung. Zur Testung linearisierter Plasmid-DNA und PCR-Produkte werden 0,7%ige Agarosegele verwendet. Die Proben werden ad 1 × Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipet-

PCR:	1 Zyklus	Initiale Denaturierung	94 °C 5 min
		Denaturierung	94 °C, 1 min
	25 Zyklen	Primeranlagerung	56 °C 30 sec
		DNA-Amplifikation	72 °C 1 min
	1 Zyklus	Finale DNA-Amplifikation	72 °C 5 min

tiert. Die Trennung erfolgt in 45 min, 75 V in 1 × Tris/Acetat/EDTA-Puffer (TAE). Zur Anfärbung der DNA werden dem Gel 2 µl Ethidiumbromid (2,5 mg/ml) vor Auspolymerisation zugegeben. Die DNA-Banden werden im Geldoc bei ultraviolettem Licht (366 nm) visualisiert.

5 × Probenpuffer	60 % Glycerin, 60 mM EDTA, 0,025 % Bromphenolblau (bei ca. 300 bp), 0,025 % Xylencyanol (bei ca. 1000 bp)
50 × TAE-Puffer	242 g Tris, 57,1 ml Acetat, 100 ml 0,5 M EDTA, ad 1 l H <sub>2</sub> O
DNA-Standard	1 kb-Plus DNA-Leiter

## 5.3 Proteinbiochemische Methoden

### 5.3.1 SDS-PAGE

Zur Auftrennung von Proteingemischen wird die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gel-elektrophorese (SDS-PAGE, [182]) verwendet.

Für die Proteinauftrennung werden 12-prozentige Trenngele und 4-prozentige Sammelgele gemäß 5.11 hergestellt. Nach Auspolymerisation wird das Gel in die Gelapparatur eingespannt, welche mit  $1 \times$  SDS-Laufpuffer gefüllt wird. Die Proteine werden regulär mit  $1 \times$  reduzierenden Probenpuffer versetzt und anschließend für 5 min bei  $95^\circ\text{C}$  denaturiert. Proteine werden bei konstant 20 mA per Gel und maximal 200 V aufgetrennt. Das Molekulargewicht wird mit  $3 \mu\text{l}$  Proteinmarker (*Brilliant Stain*) bestimmt.

REAGENZIEN	TRENNGEL [12 %]	SAMMELGEL [4 %]
H <sub>2</sub> O	4,1 ml	2,95 ml
Trenngelpuffer	1,7 ml	/
Sammelgelpuffer	/	1,25 ml
SDS 10 %	100 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$
A/Bis	4 ml	650 $\mu\text{l}$
TEMED	10 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$
APS 10 %	100 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$

$1 \times$ SDS-Laufpuffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
$4 \times$ SDS-Probenpuffer	0,3 M Tris/HCl, pH 6,8; 50 % (v/v) Glycerol; 15 % (w/v) SDS; 0,015 % (w/v) Bromphenolblau
reduzierend	+ 50 mM DTT

### 5.3.2 Coomassiefärbung

Zur SDS-Entfernung werden die Gele nach Proteinauftrennung  $3 \times 5$  min in H<sub>2</sub>O gewaschen. Proteine werden 20 min bei RT in *Bio-Safe Coomassie Stain* angefärbt. Der Farbstoff benötigt keine Lösemittel und besitzt eine Sensitivität bis zu 8 ng pro Proteinbande. Der Hintergrund wird mit H<sub>2</sub>O ca. 30 min entfärbt und das Farbergebnis mit dem A3-Scanner aufgenommen. Die gefärbten Proteinbanden können nun für eine Glykanpräparation ausgeschnitten werden.

### 5.3.3 Western-Blot

#### 5.3.3.1 Proteintransfer

Nach Proteinauftrennung im SDS-PAGE werden die Proteine elektrophoretisch im Tankblotverfahren auf Nitrozellulosemembranen übertragen.

Blot-Sandwich: Kathode ▷ Schwamm, Filterpapier, SDS-Gel, Blotmembran, Filterpapier, Schwamm ◁ Anode

Nach Auffüllen der Blotapparatur mit Blotpuffer (25 mM Tris; 114 mM Glycin; 10 % (v/v) Ethanol) und einem Eisakku zum Kühlen werden die Proteine 1 h bei 250 mA geblottet.

#### 5.3.3.2 Immundetektion

REAGENZIEN	MVA
Blockierung	30 min
Waschschritt	5 min, 1 × TBS
Rabbit-Anit-Vaccinia [1:4000]	1,5 h
Goat-Anti-Rabbit [1:2500]	1 h
Waschschritt	3 × 5 min, 1 × TBS
	5 min, 1 × PBS
Detektion	

Zur Detektion der Chemilumineszenz wird die Membran zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt und mit dem Detektionsmix (1 ml Lösung B, 10 µl Lösung A, 3 µl 3-prozentiger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) inkubiert. Das Signal wird bei entsprechender Inkubationszeit am *VersaDoc 4000 MP* detektiert.

Blockierungsreagenz	5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS
1 × PBST	1 × PBS; 0,1 % Tween 20
Detektions-Lösung A	6,8 mM p-Cumarsäure in DMSO
Detektions-Lösung B	0,1 M Tris, pH 8,5; 1,25 mM Luminol

### 5.3.4 Proteinbestimmung

#### 5.3.4.1 BCA-Test

Die Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA) hat eine Sensitivität von 0,1-1 µg/ml, störende Substanzen sind v.a. EDTA, 1 M Glycin, 2 M Natriumacetat und 1 M Natriumphosphat. Proteine werden mit einem BCA-Kupfergemisch inkubiert. Neben der Peptidbindung sind Cystein, Cystin, Tyrosin und Tryptophan für die Reduktion des Kupfers verantwortlich. Es entsteht ein farbiger Cu<sup>+</sup> + BCA-Komplex, dessen Farbintensität mit der



Proteinkonzentration korreliert. Der *BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit* von Pierce wurde im 96-Lochplattenformat verwendet. Proben und Standardproteine (bovines Serumalbumin, BSA) werden mit 10  $\mu\text{l}$  pro Vertiefung in Doppelbestimmung vorgelegt. Die Konzentrationen 0, 25, 50, 100, 200, 400 und 800  $\mu\text{g}/\text{ml}$  werden im jeweiligen Probenpuffer verdünnt. 100  $\mu\text{l}$  der Färbelösung (A:B, 1:50) werden zu jeder Probe und dem Standard pipettiert. Nach 30 min bei 37 °C wird die Farbintensität bei 562 nm am *Infinite M200* ausgelesen und die Proteinkonzentration detektiert.

#### 5.3.4.2 IgG1 Gyrolab Sandwich Immuno Assay

Die Konzentrationsbestimmung des humanen IgG1 (hIgG) wird über den *Gyrolab Sandwich Immuno Assay* (Gyrolab xP workstation) bei ProBioGen in Auftrag gegeben [183]. Affinitätsmikrosäulen auf Gyrolab Bioaffy *compact disc* (CD) bilden die Grundlage. Mit einem Durchmesser von 12 cm und 104 Mikrosäulen/CD ermöglichen diese einen Probenhochdurchsatz. Die Mikrosäulen besitzen ein Säulenbettvolumen von 15 nl und sind mit Streptavidin gesättigt. Vor Probenzugabe werden die Säulen mit einem biotinylierten AK beladen, welcher den Fc-Teil des Proben- bzw. Standard-IgGs bindet. Gebundenes IgG wird nun mit Alexa Fluor 647 Fluoreszenz-markiertem Antikörper über den Fab-Teil gebunden und bei 647 nm detektiert.

#### 5.3.4.3 Qubit Proteinbestimmung

Proteine werden zudem mit dem *Quant-iT<sup>TM</sup> Protein Assay Kit* quantifiziert. Hierzu werden die Proben Fluoreszenz-markiert (15 min, RT) und im Qubit Photometer (450<sub>Ex</sub>/570<sub>Em</sub> nm) detektiert. Von Detergenzien abgesehen, ist diese Methode unempfindlich gegenüber herkömmlichen Konzentrationen an Salzen, Lösungsmitteln und DNA. Der *Quant-iT<sup>TM</sup> Protein Assay Kit* hat einen linearen Bereich von 0,5-4  $\mu\text{g}$ . Als Kalibrierstandard dient BSA. Die Proben werden gemäß der Herstellervorschrift verdünnt.

### 5.3.5 Protein-Isolierung

#### 5.3.5.1 Affinitätschromatographie

Eine Säule mit 5 mm Durchmesser wird mit 1 ml Protein A-Sepharose<sup>TM</sup>4B gepackt. Die Säule besitzt somit eine Kapazität von 40 mg für IgG1. Nach Äquilibrieren der Säule mit dem Waschpuffer (0,2 mM Phosphatpuffer, pH 7,2) wurde der Kulturüberstand 1:1 im Waschpuffer verdünnt und mit 1 ml/min über die Säule gepumpt (FPLC). Die Säule wird 3  $\times$  mit 10 ml Waschpuffer gespült. Eluiert wird der AK über pH-Absenkung (0,1 M Glycinpuffer, pH 3). Es werden 1-ml-Fraktionen gesammelt, und jeweils mit 50  $\mu\text{l}$  1 M Tris/HCl pH 8,3 neutralisiert.

Die proteinhaltigen Fraktionen werden online über UV-Messung (280 nm) bestimmt. Die Reinheit des eluierten Proteins wird über SDS-PAGE (5.3.1) und Coomassiefärbung (5.3.2) getestet.

### 5.3.5.2 Rohmembranpräparation

Zur Isolierung von Membranglykoproteinen werden  $10^7 - 10^8$  Zellen verwendet. Diese werden 5 min bei  $100 \times g$  vom Kulturüberstand abgetrennt und 1 x mit  $500 \mu\text{l}$  PBS gewaschen. Das Pellet wird bei  $-20^\circ\text{C}$  weggefroren oder direkt für die Zellyse eingesetzt. Dafür werden unterschiedliche Arten durchgeführt. In der Regel werden die Zellen mit einem 10 ml Potter homogenisiert. Dabei werden die Zellen in  $1,5 \text{ ml}$  kalter H1-Puffer +  $400 \mu\text{l}$  Lösung I aufgenommen und im Potter homogenisiert. Restlich intakte Zellen werden mit  $20 \text{ ml}$  H2-Puffer aufgeschlossen. Zelltrümmer werden 15 min bei  $3000 \times g$  abzentrifugiert. Alternativ werden die Zellen über die Frier-Tau-Methode lysiert. Hierzu werden die Zellen in  $300 \mu\text{l}$   $25 \text{ mM}$  Phosphatpuffer, pH 7,2, aufgenommen und  $3 \times -80^\circ\text{C}/37^\circ\text{C}$  und je 5 min im Ultraschall inkubiert. Große Zelltrümmer werden in 15 min bei  $3.000 \times g$  abgetrennt. Zur Isolierung der Membranproteine werden diese 20 min bei  $21.000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$  pelletiert. Das Pellet wird  $3 \times$  mit  $300 \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und 10 min,  $21.000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Es folgt die Delipidierung über Methanol/Chloroform-Extraktion. Hierzu wird das Pellet in  $300 \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen und mit  $800 \mu\text{l}$  Methanol sowie  $400 \mu\text{l}$  Chloroform für 30 min unter Vortexen auf Eis inkubiert. Sollte keine Phasendurchmischung vorherrschen, ist der Wasseranteil zu hoch und wird mit weiterer Methanolzugabe ausgeglichen. Die Membranproteine werden nun 20 min,  $21.000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$  pelletiert und  $2 \times$  mit  $400 \mu\text{l}$  Ethanol gewaschen. Die Pellets werden in  $300 \mu\text{l}$   $25 \text{ mM}$  Phosphatpuffer pH 7,2 resuspendiert. Bei Bedarf wird diesem bis zu 2% SDS und NP40 zugefügt und die Pellets zur besseren Lösung mit Ultraschall behandelt.

Lösung I	1 Tablette $25 \times$ EDTA-free (Roche); $2 \text{ ml}$ H1-Puffer
H1-Puffer	$1 \text{ mM}$ $\text{NaHCO}_3$ ; $150 \text{ mM}$ $\text{KCl}$ ; $2 \text{ mM}$ $\text{CaCl}_2$ , pH 7,6
H2-Puffer	$1 \text{ mM}$ $\text{NaHCO}_3$ , pH 7,6

## 5.4 Zellbiologische Methoden

### 5.4.1 Zellkultivierung

Adhärente Zellen werden in T25 oder T75er Zellkulturflaschen bei 37 °C, 7,5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank HeraCell gehalten. Zur Zellpassagierung werden die Zellen mit TrypLE<sup>TM</sup> abgelöst und im neuen Medium aufgenommen. Sterile Arbeiten werden an der Sterilbank LaminAir durchgeführt. Suspensionszellen werden mit serologischer Pipette vereinzelt und nach Zellzahlbestimmung auf die gewünschte Zelldichte eingestellt (5 × 10<sup>5</sup> Zellen/ml). Bei Zellverdünnungen <1:5, wird das verbrauchte Medium über 5 min 100 × g abzentrifugiert. Suspensionszellen werden bei statischer Kultivierung in Zellkulturflaschen bei 37 °C, 7,5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit oder in geschüttelter Kultivierung in Bioreaktorröhrchen (50 ml BRT) im Schüttelbrutschrank (Multitron HT) bei 37 °C, 7,5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchtigkeit und 180 rpm gehalten. Allgemein werden die Vogelzellen im Bereich 0,5-3 × 10<sup>6</sup> Zellen/ml und DG44 im Bereich 0,4-2 × 10<sup>6</sup> Zellen/ml kultiviert.

MEDIUM	ZUSÄTZE	ZELLEN	KULTIVIERUNG
DMEM/F12 (1:1)	5 % dialysiertes, hitzeinaktiviertes FCS	alle	in Adhärenz
AEM	2 mM stabiles Gln	AGE1.CR/-pIX	in Suspension
ProCHO4	4 mM stabiles Gln, 1 × HT	DG44[TumorAK]	in Suspension
C8862	2 mM stabiles Gln, 1 × HT	DG44 [AK+RMD]	in Suspension

#### 5.4.1.1 Zellzahlbestimmung

Zellzahl und Zellvitalität werden mit dem Vi-CELL<sup>TM</sup>XR bestimmt. 500 µl Probe wird automatisch mit Trypanblau gefärbt und fotogestützt nach Größe und Färbung der Zellen detektiert. Es wird die Software ViCell XR.2.03 verwendet. 5 × 10<sup>4</sup>-1 × 10<sup>7</sup> Zellen/ml von 2-70 µm Durchmesser können mit 6 % CV detektiert werden. Bei kleineren Zellkulturvolumina, z.B. zur Selektionseinsaat nach Transfektion, werden die Zellen manuell mit Trypanblau angefärbt und über Neubauer Zählkammer gezählt.

#### 5.4.1.2 Einfrieren

Zur Zelleinfrierung werden 0,5-1 × 10<sup>7</sup> vitale Zellen/1,5 ml Einfriermedium verwendet. Die Zellvitalität sollte bei ≥90 % liegen. Das Einfriermedium für Suspensionszellen besteht aus dem jeweiligen Kultivierungsmedium und 7,5 % DMSO (*cryo sure*). Für adhärenente Zellen besteht das Einfriermedium aus 15 % des Kultivierungsmediums, 10 % DMSO und 65 % FCS. Die Zellen werden nach 5 min 100 × g in dem Einfriermedium aufgenommen und in einem auf 4 °C vortemperierten Isopropanolbad (*Mr.Frosty*) auf -86 °C langsam heruntergekühlt.

Für eine längere Einlagerung der Zellen werden diese am Folgetag in die Gasphase eines flüssigen N<sub>2</sub>-Tanks überführt. Es werden 2-ml-Kryoröhrchen mit Innengewinde verwendet.

#### 5.4.1.3 Auftauen

Zum Zellrevitalisieren werden die Kryoröhrchen kurz im 37°C Wasserbad angetaut, dann werden die Zellen in 10 ml, 4°C kaltem Kultivierungsmedium über sanftes Pipettieren aufgenommen. Zellzahl und Vitalität werden bestimmt, die Zellen 5 min bei 100 × g abzentrifugiert und in gewohnter Zelldichte eingesät.

#### 5.4.1.4 Suspensionsadaption

Die Zelladaption von adhärenter hin zur Suspensionskultur erfolgt durch einfachen Medienwechsel mit dem Suspensionsmedium. Adhärenente Zellen werden mit TrypLE abgelöst, mit FCS-haltigem Medium abgestoppt, 5 min bei 100 × g abzentrifugiert und in frischem Suspensionsmedium resuspendiert. Zellen werden für die Schüttelkultur mit 5 × 10<sup>5</sup> Zellen/ml in BRTs mit 5-20 ml eingesät.

### 5.4.2 Transfektion

Das Einbringen der Plasmid-DNA erfolgt auf zwei Wegen. Die Transfektion von Suspensionszellen fand über Mikroporation statt. Die Transfektion der Vogelzellen wurde zum Teil liposomal durchgeführt.

#### 5.4.2.1 Linearisierung von DNA-Vektoren

Für eine erhöhte Wahrscheinlichkeit der stabilen Integration der DNA ins Genom wird die Plasmid-DNA vor der Transfektion enzymatisch linearisiert, 10 μl der Plasmid-DNA für AK mit 20 U des Enzyms NruI in SuRE/cutB-Puffer mit H<sub>2</sub>O ad 40 μl werden 2 h bei 37°C inkubiert. Das RMD-Plasmid wird mit SpeI in Puffer H linearisiert. Die linearisierte DNA wird über den *QIAquick Gel Extraction Kit* dem Herstellerprotokoll entsprechend aufgereinigt. Die DNA-Reinheit wird in einem 0,7%igen Agarosegel überprüft (5.2.2). Die DNA-Menge wird über *Quant-iT<sup>TM</sup> DNA Assay Kit* bestimmt.

#### 5.4.2.2 Mikroporation

Die Transfektion über Mikroporation wird mit dem MikroPorator MP-100 durchgeführt. Puffer und Küvette stammen aus dem entsprechenden Mikroporations-Kit. Es werden folgende Einstellungen verwendet.

Zelldichte	$1 \times 10^6$ Zellen/100 $\mu$ l
DNA	10 $\mu$ g/100 $\mu$ l
Puls [mA]	1500 (AGE1.CR, AGE1.CR.pIX)/1650 (CHO-DG44)
Pulsweite [ms]	10
Pulsanzahl	3

Das Transfektionsmedium für die AGE1.CR- und AGE1.CR.pIX-Zelllinie besteht aus AEM, CD293(1:4), 2 mM stabiles Gln, 1 % Lipomin. Die Zellen werden  $2 \times$  in 5 ml  $1 \times$  PBS gewaschen und im Transfektionspuffer resuspendiert, mit der DNA gemischt und in 10  $\mu$ l Mikroportionspitzen (GoldTips, Mikroportions-Kit) mikroportiert. Anschließend werden die Zellen in 1 ml konditioniertem Medium in einer 6-Lochplatte für 4 h, alternativ ü.N., inkubiert. Es folgt die Selektion bzw. Einzelzellklonierung. Das Transfektionsmedium für CHO-DG44-Zellen ist das Suspensionsmedium.

### 5.4.2.3 Liposomale Transfektion

Zur liposomalen Transfektion der AGE1.CR- und AGE1.CR.pIX-Zelllinie mit dem TumorAK werden 2  $\mu$ g DNA, 20  $\mu$ l Enhancer, 200  $\mu$ l Puffer EC gemischt und 2-5 min bei RT inkubiert. 20  $\mu$ l Effectene<sup>TM</sup> werden zugegeben und weitere 5-10 min bei RT inkubiert. Die Zellen werden zu 80 % Konfluenzdichte in 6-Lochplatten eingesät, mit 1 ml frischem DMEM/F12, 5 % FCS versorgt und für 3 h mit dem DNA-Effectene-Mix inkubiert. Dann wird das Medium gegen neues ausgetauscht.

## 5.4.3 Selektion

### 5.4.3.1 Selektionsdruck

Puromycin ist ein aus *Streptomyces alboniger* isoliertes Antibiotikum, welches durch den verfrühten Abbruch der Translation die Proteinbiosynthese in Pro- sowie Eukaryoten hemmt. Zellen sterben bereits nach 1-3 Tagen. Das Resistenzgen ist das pac Gen. Geneticin®/G418 ist ein Antibiotikum, welches die Proteinbiosynthese von Pro- und Eukaryonten blockiert. Zellen sterben nach ca. 3-7 Tagen. Die Resistenz wird durch das neo Gen von Transposon Tn5 vermittelt.

ANTIBIOTIKUM[PROTEIN]	[ $\mu$ g/ml]	ZELLE	FCS
Puromycin [TumorAK]	0,7	AGE1.CR, AGE1.CR.pIX	-
	1,4	AGE1.CR, AGE1.CR.pIX	+
	0,7	CHO-DG44	-
G418 [RMD]	150	AGE1.CR, AGE1.CR.pIX	-
	400	CHO-DG44	-

Selektionsmedium der AGE1.CR- und AGE1.CR.pIX-Zelllinie [TumorAK/RMD] ist das AEM/CD293 (1:4) mit 2 mM stabilem Gln, 1 % Lipomin und jeweiligem Selektionsdruck. Selektionsmedium für CHO-DG44 [RMD] ist das  $\alpha$ MEM mit 4 mM stabilem Gln, 1  $\times$  HT und Selektionsdruck.

### 5.4.3.2 Einzelzellklonierung

Die mikroporierten Zellen werden einen Tag nach Transfektion gezählt und bei Zellvitalität  $>80\%$  im entsprechenden Selektionsmedium in 96 Lochplatten 100  $\mu$ l/Loch eingesät.

- AGE1.CR- und AGE1.CR.pIX-Zelllinie [RMD]: 20 Zellen [AK+/RMD+] + 100 Zellen [AK+/RMD-] pro Vertiefung
- CHO-DG44[RMD]: 2 Zellen [AK+/RMD+] /Vertiefung

AGE1.CR- und AGE1.CR.pIX-Zellen [Tumor-AK] werden 24 h nach liposomaler Transfektion  $2 \times 10^6$  Zellen in 30 ml DMEM/F12, 5 % FCS und 1,4  $\mu$ g/ml Puromycin in eine 15 cm<sup>2</sup> Zellkulturschale eingesät. Nach ungefähr zwei Wochen unter Selektionsdruck wachsen Einzelklone hoch und werden mit in TrypLE getränkten Plättchen (*cloning discs*, 3 mm Durchmesser) isoliert. Es folgt eine Expansion der Klone bis diese gesichert werden und die Proteinexpression für die Glykananalytik startet.

## 5.4.4 Proteinexpression

### 5.4.4.1 Expression in Schüttelröhrchen

Die Proteinexpression erfolgt in 50-ml-Filterreaktorröhrchen bei einem Füllvolumen von 15-20 ml. Die Zellen werden unter normalen Bedingungen im Schüttelinkubator kultiviert. Die Zellen werden an Tag 0 auf  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml bei einer Zellvitalität  $>80\%$  eingestellt. Die Zellzahl und Vitalität wird während der Expressionsphase überwacht und die Zellen bei einer Vitalität  $\geq 80\%$  geerntet (regulär d 7). Als Expressionsmedium dient für die Entenzelllinien AEM- mit 2 mM stabilen Gln und für die CHO-Zelllinie C8862-Medium mit 4 mM stabilen Gln.

### 5.4.4.2 Expression in Schüttelkolben

Zur Proteinexpression in Schüttelkolben werden diese für ausreichenden O<sub>2</sub>-Eintrag mit maximal 25 % des Füllvolumens eingesetzt. Die Zelldichten und -medien entsprechen denen der Expression in Schüttelröhrchen. Es werden 100 und 500 ml Kulturen angesetzt. Die Kultivierungsbedingungen unterscheiden sich lediglich in der Schüttelintensität mit 150 rpm.

#### 5.4.4.3 Fed-Batch

Um das Zellsterben in Abhängigkeit des Mediumverbrauchs hinaus zu zögern, werden die Kulturen in regelmäßigen Abständen zugefüttert. Die Feedzusammensetzung und -menge vermindert die pH-Absenkung durch die Produktion von Lactat und sorgt für den Nachschub von Glucose. Der Feed setzt sich aus den Komponenten Hefe-/ Soja-Hydrolysat, Vitamine+Mineralien, Aminosäuren, Glucose, Galactose und stabiles Gln zusammen.

#### 5.4.4.4 Zellernte

Allgemein wird versucht die Proteinexpression bei einer Zellvitalität  $\geq 80\%$  durchzuführen. Der proteinhaltige Zellkulturüberstand wird 5 min,  $100 \times g$  von intakten Zellen getrennt. Zellfragmente werden bei 30 min,  $6000 \times g$  abgetrennt. Nach Aufklaren des Überstandes wird dieser durch einen  $2,5 \mu\text{m}$  porengroßen Filter steril filtriert. Der Überstand wird für die Aufreinigung (5.3.5) verwendet oder bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert.

### 5.4.5 Mikroskopie

#### 5.4.5.1 Durchlichtmikroskopie

Die Überwachung der Zellmorphologie erfolgt im Olympus IX-50 überwiegend in 100 maximal in 200facher Vergrößerung. Fotos werden mit einer CCD-Kamera aufgenommen.

#### 5.4.5.2 Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzbilder werden mit der Olympus IX-50 mit c-mount Adapter aufgenommen. Zur Bestimmung der Fluoreszenzstärke werden Bilder mit entsprechendem Fluoreszenzfilter im Vergleich zum Phasenkontrast aufgenommen. Dazu wird regulär eine 200fache Vergrößerung gewählt. Zur Bildbearbeitung wird die Software ViewFinderLite<sup>TM</sup> 1.0 verwendet.

### 5.4.6 Zellbasierte Assays

#### 5.4.6.1 ADCC-Assay

Primäre humane NK-Zellen werden von *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMCs) isoliert. PBMCs werden aus dem Vollblut gesunder Menschen über Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. NK-Zellen werden mittels magnetischer Partikel separiert. Deren Reinheit wird durchflusszytometrisch erfasst (PE-konjugierter CD16 und Alexa488-konjugierter CD56 AK). Die Zelllinien BT-474 ([184], invasiv ductale Brustkrebszellen, CLS) und SK-BR-3 ([185], Adenokarzinomzellen der Brust, human, ATCC) werden als Zielzellen verwendet.

Beide Zelltypen exprimieren an ihrer Oberfläche den *Human Epidermal Growth Factor Receptor Type 2* (HER2/neu) in großem Maße. Drei Tage vor der ADCC-Testung werden die Zielzellen aus einer Zellbank revitalisiert. AK-abhängige NK-Zell induzierte Zielzellyse wird in einer Vitalfärbung quantifiziert (Calcein AM). Zielzellen werden gemäß der Herstellerangaben gefärbt.  $2 \times 10^4$  vitale Zellen/50  $\mu\text{l}$  RPMI1640, 10 % FCS werden vorgelegt. Die Proben werden seriell 1:3 in RPMI 1640, 10 % FCS verdünnt und zu 50  $\mu\text{l}$ /Vertiefung mit  $n=3$  pipettiert sowie 30 min bei 37 °C inkubiert. Dann werden 50  $\mu\text{l}$ /Vertiefung NK-Zellen (1:5; NK:Ziel-Zellen) zugegeben, 3 min,  $200 \times g$  abzentrifugiert und schließlich 4 h bei 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert.

Für jede Ziellzelle wird die spontane (ohne AK/NK-Zellen), AK-unabhängige (ohne AK, mit NK-Zellen) sowie die totale (saponininduziert, ohne AK/NK-Zellen) Zielzellyse bestimmt. Die totale Zellyse wird mit 15  $\mu\text{l}$ /Vertiefung 0,1 mg/ml Saponin in RPMI1640, 10 % FCS in 15-minütiger Inkubation ausgelöst. Gleiches Volumen an Medium wird zur Meßgenauigkeit in die übrigen Vertiefungen pipettiert. Die Platten werden 3 min  $150 \times g$  abzentrifugiert und je 100  $\mu\text{l}$  in schwarze 96er Fluoreszenzplatten überführt. Die Platten werden im Infinite F200 (485<sub>Ex</sub>/535<sub>Em</sub> nm) ausgelesen. Die Datenauswertung erfolgt mit der Software Magellan 6.1.

$$\text{spezifische Zellyse}[\%] = \frac{MFl_{Probe} \cdot MFl_{spontan}}{MFl_{total} \cdot MFl_{spontan}} \cdot 100 \quad (5.1)$$

$MFl_{Probe}$  = Mean Fluorescence intensity, AK-induzierte Zielzellyse;  $MFl_{spontan}$  = spontane Farbstofffreigabe der Zellen;  $MFl_{total}$  = Detergenz induzierte Lyse

#### 5.4.6.2 FcyRIIIa-Bindungsassay

Der FcyRIIIa-Bindungsassay, zur Bestimmung der Bindungsaktivität des AKs zum ADCC-relevanten FcyRIIIa, erfolgt mit kleinen Änderungen nach [186]. Es wird ein Histidin markierter HIS-FcyRIIIa (22 kDa; 158F) in Verbindung mit einem Anti-Tetra-HIS AK verwendet. Der Anti-Tetra-HIS AK wird an Immunoplaten gebunden und freie Bindungsstellen anschließend mit Blockingreagenz gesättigt. Der rekombinante FcyRIIIa wird an die Platte gebunden, bevor die AK-Proben in geeigneter Verdünnungsreihe getestet werden (1:3 Verdünnung ausgehend von 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Nach einzelnen Inkubationsschritten wird die Testplatte  $3 \times$  mit  $1 \times$  PBS, 0,2 % Tween-20 gewaschen. Es folgt der immunchemische Nachweis mit Peroxidase-konjugiertem Anti-human AK. Die Bindungsstärke der AK-Proben wird über die Peroxidaseaktivität detektiert. Tetramethylbenzidine (TMB) wird als Entwicklungslösung verwendet, die Farbreaktion wird mit 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  abgestoppt und bei 450 nm ausgelesen.



### 5.4.6.3 Lektinfärbung

Die Zellen der Negativkontrolle werden mit  $20 \mu\text{g/ml}$  des Fluorescein markierten Goat-Anti-Rabbit-AKs +  $8 \mu\text{g/ml}$  Dapi inkubiert. Fluorescein markierte Lektine LCA/UEAI/LTL werden mit  $20 \mu\text{g/ml}$ , +  $8 \mu\text{g/ml}$  Dapi für 45 min, RT, unter Lichtausschluß inkubiert. 5-DTAF (5-(4,6-Dichlorotriazinyl) aminofluorescein)  $492_{Ex}/517_{Em}$  nm. Fluorescein  $485_{Ex}/514_{Em}$  nm. Ein Teil der gefärbten Zellen wird nun auf einen Objektträger gegeben und Fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die restlichen Zellen werden durchflusszytometrisch bestimmt.

Waschen	$1 \times 10^7$ Zellen, 5 min $100 \times g$ in 15 ml Röhrchen + 2 ml 1% Formaldehyd in $1 \times$ PBS (v/v)
Fixierung	45 min RT; 5 min $300 \times g$ ad $5 \times 10^6$ Zellen/ml in $1 \times$ PBS
Lektinfärbung	+ $40 \mu\text{g/ml}$ SNA/MAA/AAL 45 min, RT, unter Lichtausschluß 5 min $100 \times g$ ; in $1 \times$ PBS waschen + $8 \mu\text{g/ml}$ Dapi, + 1/100 DTAF 45 min, RT, unter Lichtausschluss Quantifizierung über Durchflusszytometrie

### 5.4.6.4 Durchflusszytometrie

Die lektinegefärbten Zellen werden mittels Fluoreszenzintensität in der Durchflusszytometrie auf die Expression bestimmter Saccharide hin analysiert. Die markierten Zellen durchwandern vereinzelt eine dünne Kapillare vorbei an einem Laserstrahl. Die Intensität der Emission des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffes ist ein Maß für die auf der Zelloberfläche vorhandenen Saccharide.

## 5.4.7 Virologische Methoden

### 5.4.7.1 Zellinfektion

	ADHÄRENT	SUSPENSION
Zelltyp	AGE1.CR, AGE1.CR.pIX, BHK-21	
Gefäß	T75er	BRT
Volumen	$2 \times 10$ ml/T75er	15-20 ml
Medium <i>Vorkultur</i>	DMEM, 5% FCS	AEM, 2 mM stabiles Gln
Medium <i>Infektion</i>		DMEM ohne FCS
MOI		1.0

Zelldichte	$1 \times 10^6$ Zellen/ml
Virusernte	24 h nach Infektion

---

Zur Virusproduktion werden die Zellen auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in DMEM ohne FCS eingestellt und mit 1 Virus/Zelle (*Multiplicity Of Infection*, MOI = 1.0) infiziert. Die Virusernte erfolgt nach 24 h, die Zellen sind noch intakt und so läßt sich der zellinterne vom -externen Virus trennen. Zur Infektion wird Zellysate verwendet, welches demnach alle Subtypen des Virus enthält (Intra- und Extrazelluläre).

#### 5.4.7.2 MVA-Präparation

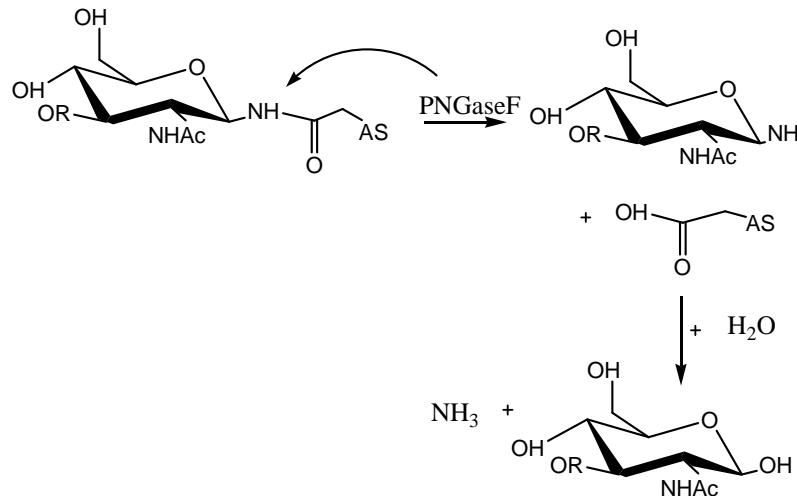
Die Präparation extrazellulären MVA (*Extracellular Enveloped Virus*, EEV) aus Zellkulturüberstand beginnt mit der Abreicherung von intakten Zellen ( $2 \times 5$  min  $100 \times g$ ). Die 15-50 ml Überstände werden mit 13-prozentigem (w/v) Polyethylenglykol (PEG) in H<sub>2</sub>O auf 8 % PEG gebracht und 30 min auf Eis inkubiert. Für 60 min  $6.600 \times g$  werden die Viruspartikel pelletiert. Diese werden in 500  $\mu$ l DMEM ohne FCS resuspendiert. Für die anschließende Glykananalytik wird überschüssiges PEG durch Ultrazentrifugation 60 min bei  $150.000 \times g$ ,  $10^\circ\text{C}$  durch 20-prozentige Sucrose abgereinigt. Die Viruspartikel werden nun in 150  $\mu$ l  $1 \times$  PBS aufgenommen und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Im Folgenden wird über Qubit die Proteinkonzentration bestimmt, um im Western-Blot (5.3.3) gleiche Konzentrationen zu vergleichen. Zudem werden die gereinigten Viruspartikel über Virus-Titration und Real-Time-PCR quantifiziert. Intrazelluläre Viruspartikel (*Intracellular Mature Virus*, IMV; *Cellular Enveloped Virus*, CEV) werden ähnlich präpariert. Die vom Zellkulturüberstand getrennten intakten Zellen werden über drei Zyklen der Frier-Tau-Methode (5.3.5.2) aufgeschlossen. Größere Zellbruchstücke werden bei 5 min  $100 \times g$ , gefolgt von 5 min  $300 \times g$ , abgetrennt. Es folgt die PEG-Fällung und Zentrifugation durch Sucrose.

#### 5.4.7.3 MVA-Titration

Zur MVA-Titration werden Verozellen (*African Green Monkey Kidney*) in Monolayerkultur mit MVA in serieller 1:10 Verdünnung infiziert [93]. Die in die Verozellen eingedrungenen MVA-Partikel replizieren sich ohne jedoch anschließend die Zellen verlassen zu können und werden dann angefärbt und mikroskopisch ausgezählt. Gemäß der Verdünnung erhält man die Anzahl intakter, infektiöser Viren (*Plaque Forming Unit*, PFU) in PFU/ml.

## 5.5 Glykananalytische Methoden

### 5.5.1 Enzymatische Freisetzung der N-Glykane



**Abb. 5.1:** N-Glykanfreisetzung über PNGase F. AS: Aminosäure.

Für die enzymatische Freisetzung von N-Glykanen mittels PNGase F [187, 188] werden Glykoproteine zuvor mit Trypsin in Glykopeptide gespalten oder mittels Detergenzien denaturiert. Sofern nicht anders vermerkt, werden alle enzymatischen Reaktionen 18 h bei 37 °C und 150 rpm im Unimax 1010/1000 von Heidolph inkubiert und in 5 min bei 95 °C abgestoppt. Für eine anschließende MALDI-TOF-MS-Messung werden die Ansätze über TopTip Typ P2-Carbon entsalzt (5.5.2.3) und in der SpeedVac eingeeengt.

#### 5.5.1.1 Trypsin

Die 23 kDa große Serinprotease Trypsin katalysiert die C-terminale Spaltung der Peptidbindungen von Lysin und Arginin sowie deren Amid- und Estern. Keine Spaltung erfolgt bei carboxyterminalem Prolin. Der Verdau von 50-100 µg Protein wird in maximal 300 µl 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,2, und 2 µg/ml Trypsin (Sigma) inkubiert. Es folgt die N-Glykanfreisetzung über PNGase F.

#### 5.5.1.2 PNGase F

Mit der Peptid-N<sup>4</sup>-(Acetyl-β-glucosaminyl)-asparaginamidase F (PNGase F, Roche) aus *Flavobacterium meningosepticum* werden spezifisch asparagingebundene N-Glykane vom Peptidrücken abgespalten. Hierzu werden 10 mU PNGase F/µg Protein in 250 mM Phosphatpuffer, pH 7,2, eingesetzt. Bei Proteindenaturierung mittels Detergenzien wird dem Phosphatpuffer

1 % (v/v) SDS, 10 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol zugefügt und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Nach kurzem Abkühlen und einer Verdünnung von 1:10 in H<sub>2</sub>O wird neben 0,1 % (v/v) NP40 die PNGase F dazu gegeben. Die freigesetzten N-Glykane werden im Anschluß über C18-Säulen (5.5.2.1) von Peptiden gereinigt.

#### 5.5.1.3 Sialidase

Für eine Messung der N-Glykane im Positivmodus des MALDI-TOF-MS müssen jegliche Ladungen des Oligosaccharides neutralisiert werden. Neben der Permethylierung geschieht dies durch das Abspalten der negativ geladenen endständigen N-Acetyl-Neuraminsäurereste. Statt der chemischen Abspaltung von Sialinsäuren wird hierbei die Neuraminidase von Roche verwendet, welche  $\alpha$ 2-3/6/8 glykosidisch verknüpfte Sialinsäuren freisetzt [189, 190]. Das Enzym unterscheidet nicht zwischen der N-Acetyl-Neuraminsäure (Neu-5-Ac) und der N-Glykolyl-Neuraminsäure (Neu-5-Gc). Der Verdau wird mit 0,1 U/ml Neuraminidase in 50 mM Natriumacetatpuffer, pH 5, durchgeführt. Für die enzymatische Sequenzierung kann direkt mit der Galactosidase fortgefahren werden.

#### 5.5.1.4 Sialidase S

Mit der Sialidase S (Prozyme) werden spezifisch  $\alpha$ 2-3 glykosidisch verknüpfte Sialinsäuren abgespalten [191]. 0,4 U/ml der Sialidase S in 50 mM Natriumacetatpuffer, pH 5, werden für die Abspaltung eingesetzt.

#### 5.5.1.5 $\alpha$ -Fucosidase

Die  $\alpha$ 1-3/4/6 spezifische Fucosidase(GKX5006) von Prozyme wird in einem zweiten Ansatz parallel zur  $\alpha$ 1-3/4-Fucosidase eingesetzt. Die  $\alpha$ -Fucosidase spaltet zusätzlich die  $\alpha$ 1-6 verknüpfte core-Fucose am ersten GlcNAc der Corestruktur. Es werden 0,4 mU/ml in 50 mM Natriumacetatpuffer, pH 5, für die Abspaltung eingesetzt.

#### 5.5.1.6 $\alpha$ 1-3/4-Fucosidase

Die  $\alpha$ 1-3/4-spezifische Fucosidase(GKX5019) von Prozyme spaltet die antennären Fucosen. Hierzu werden 4 mU Enzym/ml in 50 mM Natriumacetatpuffer, pH 5, eingesetzt. Für die enzymatische Sequenzierung kann direkt mit dem Galactosidaseverdau fortgefahren werden.

#### 5.5.1.7 $\beta$ -Galactosidase

Die Abspaltung der Galactosen wird mit der  $\beta$ -1-4-spezifischen Galactosidase (GKX-5013, *Bovine Testis*) von Prozyme durchgeführt. Das Enzym wird mit 0,5 U/ml im entsprechenden

Probenpuffer, pH 4, eingesetzt. Die  $\beta$ -Galactosidase schneidet nicht, wenn eine antennäre Fucose vorhanden ist, der Verdau sollte bei Bedarf mit entsprechender Fucosidase gekoppelt werden. Es folgt nun die Abspaltung der GlcNAc-Reste.

#### 5.5.1.8 HEXaseI

$\beta$ -N-Acetylhexosaminidase/HEXaseI (GK80050) aus *Streptococcus pneumoniae*, rekombinant exprimiert in E.coli, spaltet in Konzentrationen  $<50$  mU/ml  $\beta$ -1-2 verknüpfte GlcNAc, außer bei höherer Antennarität oder vorhandenen bisecting Strukturen ( $\beta$ 1-6/4-verknüpft). Dann wird lediglich das  $\beta$ -1-2 GlcNAc am Mannose  $\alpha$ 1-3-Arm gespalten. Bei höheren Konzentrationen werden auch  $\beta$ -1-4 und  $\beta$ 1-6 verknüpfte GlcNAc freigesetzt. Der Verdau wird mit 40 mU/ml in 50 mM Natriumacetatpuffer, pH 5, durchgeführt und für mindestens 4 h inkubiert.

#### 5.5.1.9 EndoS

Die Endoglykosidase S (EndoS) aus *Streptococcus pyrogenes* wird zur Bestätigung der core-Fucose eingesetzt. Es katalysiert die Spaltung nach dem ersten GlcNAc im Core, wodurch N-Glykane mit einem GlcNAc weniger sowie ohne core-Fucose entstehen. Detektierte Fucosen nach erfolgtem EndoS-Verdau liegen demnach antennär vor. Für den Verdau werden 0,2 U/ml Enzym in 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,2, eingesetzt.

### 5.5.2 N-Glykanreinigung

#### 5.5.2.1 Extract-Clean<sup>TM</sup> C18-Säulen

Nach erfolgter N-Glykanabspaltung wird nun über *Reversed-Phase Extract-Clean<sup>TM</sup>-solid phase extraction (SPE)*-C18-Säulen 100 mg/1,5 ml eine erste Trennung der Glykane von Proteinen und Peptiden durchgeführt. Die hier verwendete Säulenmatrix besteht aus C18-Ketten, welche aufgrund ihrer Unpolarität und Hydrophobizität die in der Probe enthaltenen Proteine und Peptide über hydrophobe Wechselwirkungen bindet. Die polaren N-Glykane passieren die Säule im Durchfluß. Die Säule wird mit  $3 \times 400 \mu\text{l}$  80 % (v/v) ACN, 0,1 %ig (v/v) TFA und  $3 \times 400 \mu\text{l}$  0,1 %ig (v/v) TFA äquilibriert. Die ad 0,1 % (v/v) TFA angesäuerte Probe wird nun auf die Säule gegeben und mit  $3 \times 400 \mu\text{l}$  0,1 % (v/v) TFA gespült. Mit dem angesäuerten Durchlauf wird zur Entsalzung über Carbographsäulen fortgefahren.

#### 5.5.2.2 Extract-Clean<sup>TM</sup> Carbograph-Säulen

Die *Extract-Clean<sup>TM</sup> Carbograph SPE* Säulen 150 mg/4 ml bestehen aus einer Graphitmatrix, welche sich durch den polaren Retentionseffekt (PRE) auszeichnet. Elektronen-Donor-

Akzeptor-Wechselwirkungen zwischen dem Graphit und polaren oder ionischen Verbindungen entstehen. Das Graphit bindet die Glykane, welche somit aufkonzentriert und zugleich von Puffersubstanzen, wie Salzen und nichtionischen Detergenzien, abgetrennt werden [192]. Die Säule wird mit  $3 \times 500 \mu\text{l}$  80 % (v/v) ACN, 0,1%ig (v/v) TFA und  $3 \times 500 \mu\text{l}$  0,1%ig (v/v) TFA äquilibriert. Der Durchlauf der C18-Säule bzw. die ad 0,1% (v/v) TFA angesäuerte Probe wird nun auf die Säule gegeben und mit  $3 \times 500 \mu\text{l}$  0,1 % (v/v) TFA gespült. Geladene und ungeladene Glykane werden mit  $3 \times 500 \mu\text{l}$  25 % (v/v) ACN, 0,1%ig (v/v) TFA eluiert. Das Eluat wird in der SpeedVac eingengt und im Anschluß desialyliert oder permethyliert.

### 5.5.2.3 TopTip<sup>TM</sup> Typ P2-Carbon-Säulen

Bei Volumina  $<100 \mu\text{l}$  werden TopTip<sup>TM</sup> Typ P2 Carbon-Säulen zur Entsalzung verwendet – regulär nach enzymatischem Verdau, um für die massenspektrometrische Analyse störende Salze zu entfernen. Die Minisäulen in Pipettenspitzenform werden mit Adapter in 1,5-2 ml Reaktionsgefäße arretiert und das Fluid über Tischzentrifugen in ca. 5 sec hindurch zentrifugiert. Die Säule wird  $3 \times$  mit  $10 \mu\text{l}$  80 % (v/v) ACN, 0,1%ig (v/v) TFA und  $3 \times 10 \mu\text{l}$  0,1%ig (v/v) TFA äquilibriert. Die ad 0,1% (v/v) TFA angesäuerte Probe wird nun auf die Säule gegeben und mit  $3 \times 10 \mu\text{l}$  0,1%igem (v/v) TFA nachgewaschen. Geladene und ungeladene Glykane werden mit  $3 \times 5 \mu\text{l}$  25 % (v/v) ACN, 0,1%iger (v/v) TFA eluiert. Das Eluat wird getrocknet und für die massenspektrometrische Analyse, enzymatische Verdaue oder eine der Derivatisierungsmethoden weiterverwendet.

## 5.5.3 MALDI-TOF-MS

Die Massenspektrometrie (MS) ermöglicht die Identifizierung ionisierbarer Moleküle über die Detektion der Molekülmasse nach Ladung ( $m/z$ ) bis in den Femto- und Subfemtombereich [193]. Grundlegend besteht ein Massenspektrometer aus einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor. Bei hier verwendeter *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation* (MALDI) werden die Probenmoleküle zur schonenderen Ionisierung in eine Matrix kokristallisiert. Als Matrix dienen kleine organische Moleküle, die bei verwendeter Laserwellenlänge eine hohe Energieabsorption besitzen. Bei gepulstem Laserbeschuß (hier smartbeam-II<sup>TM</sup> Laser) werden Matrix- und Probenmoleküle ionisiert. Die Verwendung von natrium- und kaliumhaltigen Puffern und Matrices sorgt für die Entstehung der überwiegend einfach geladenen Ionen mit den Massen  $M[\text{Na}^+]$ ,  $M[\text{K}^+]$ . Die Matrix verstärkt durch Protonentransfer die Zahl geladener Probenmoleküle. Bei der MALDI-MS können örtliche und zeitliche Unterschiede in der Ionisierung der Probenmoleküle zu einer „Anfangsenergieverteilung“ der Ionen gleicher Massen und somit zu einer geringeren Massenauflösung führen. Dem entgegen wirkt die Verwendung der verzögerten Ionenextraktion sowie eines

Ionenspiegels (Reflektor). Die beschleunigten Ionen passieren ein mit Vakuum evakuiertes Flugrohr von 1-4 m. Bei Verwendung eines Reflektors wird die Trennschärfe bei gleichzeitiger Wegverlängerung erhöht. Dieser besteht aus einem elektrischen Gegenfeld und sorgt für eine Richtungsumkehr der Ionen, Geschwindigkeitsunterscheide gleicher Molekülmassen werden durch verschieden starkes Eindringen in das Gegenfeld ausgeglichen. Das Quadrat der nun am Detektor gemessenen Flugzeit *Time-Of-Flight* (TOF) ist proportional zum Verhältnis Molekülmasse/Ladung. Allgemein benötigen kleine Molekülmassen eine kürzere Flugzeit [193].

$$\frac{m}{z} = \frac{2eU}{L^2} t^2 \quad (5.2)$$

$m$ = Ionenmasse;  $z$ =Ladungszahl;  $e$ =Elementarladung;  $U$ =Beschleunigungsspannung;  $L$ =Länge der feldfreien Driftstrecke des Flugrohres;  $t$ =Flugzeit

### 5.5.3.1 MALDI-TOF/TOF-MS

Über massenspektrometrische Fragmentierung ( $MS^2$ ) können zusätzliche Informationen, wie die Reihenfolge einzelner Zucker von Oligosacchariden, gewonnen werden [194,195]. So kann z.B. über charakteristische Molekülfragmente zwischen core- und antennärer Fucose unterschieden werden. Nach der Ionisierung werden bestimmte Probenmoleküle nach Beschleunigung über Massefilter (*Precursor Ion Selector*, PCIS) nach dem Bradbury Nielsen Prinzip isoliert. Diese sogenannten Mutter-Ionen werden über Laser induzierte Dissoziation (LID)-LIFT fragmentiert. Zur Intensitätsverstärkung kleiner Fragmente kann die kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) angewendet werden. Hierzu wird das entsprechende Kompartiment mit Helium begast. Ein nachgeschalteter Filter (*Post Lift Metastable Suppressor*, PLMS) lenkt nicht fragmentierte Mutter-Ionen ab, um eine nachträgliche Fragmentierung auszuschließen und die Wahrscheinlichkeit einer Detektorsättigung zu minimieren.

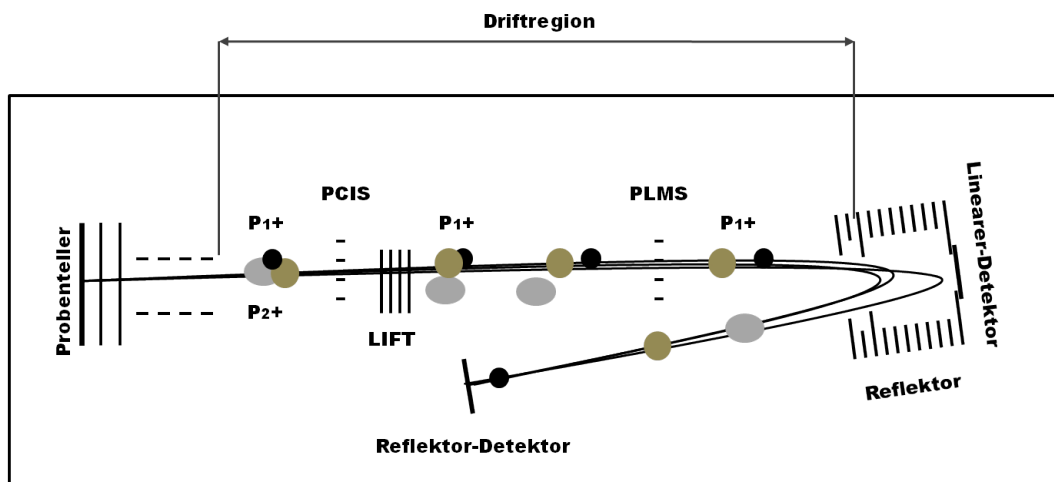


Abb. 5.2: Schema MALDI-TOF-MS. Nach Bruker Daltonics.

### 5.5.3.2 Permethylierung

Zur zeitgleichen massenspektrometrischen Detektion geladener und ungeladener Glykane werden diese mittels Methylierungsreagenz unter stark basischen Bedingungen derivatisiert. In der Permethylierungsreaktion werden freie OH-Gruppen zu Methylethern derivatisiert, welches die Ionisierbarkeit der Glykane verstärkt und native Ladungen neutralisiert [83,196, 197].

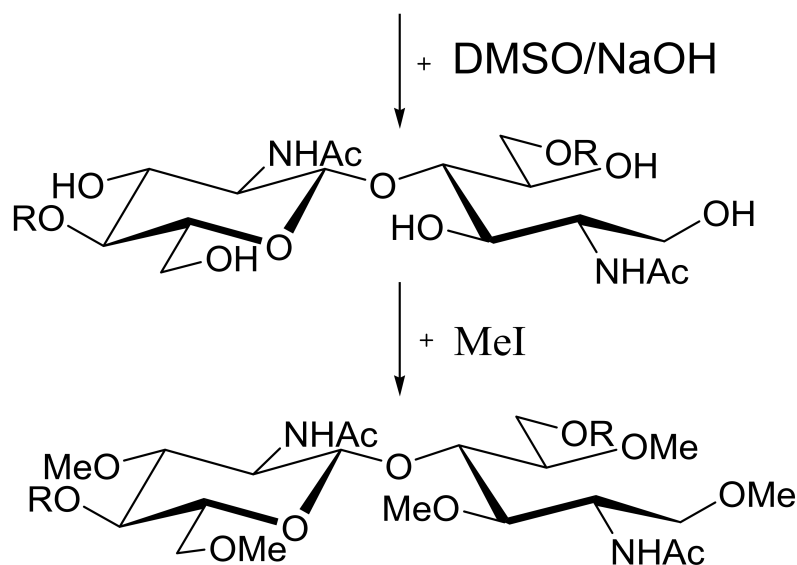


Abb. 5.3: Permethylierungsreaktion

Die in 2 ml Glasgefäßen (2-SV) mit 300  $\mu$ l Einsätzen eingeeingte Probe wird in DMSO-NaOH 30 min bei RT inkubiert. Für das DMSO-NaOH werden wenige NaOH-Plättchen in einem Mörser zerkleinert und mit ca. 2 ml wasserfreiem Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen. Es folgt die Zugabe von Methyljodid ( $\text{CH}_3\text{I}$ ). Nach 60 minütiger Inkubation unter regelmäßigem Vortexen folgt eine zweite Zugabe von DMSO-NaOH und  $\text{CH}_3\text{I}$ . Weitere 60 min später startet die Wasser-Chloroform-Extraktion, zur Trennung der derivatisierten Glykane von überschüssigem  $\text{CH}_3\text{I}$  und Salzen. Dazu wird  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{CHCl}_3$  zugegeben und die obere, wässrige Phase wird verworfen. Die organische Phase wird mehrmalig mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen, bis die abgenommene wässrige Phase einen neutralen pH-Wert aufweist. Das  $\text{CHCl}_3$  wird anschließend in der SpeedVac verdampft und die Probe massenspektrometrisch analysiert.



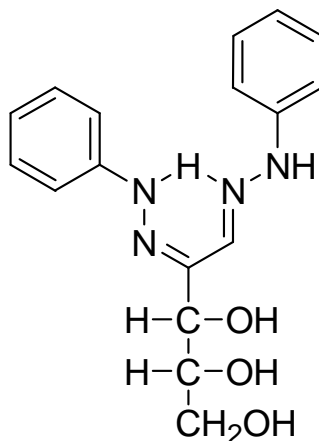


Abb. 5.4: Arabinosazon

### 5.5.3.3 MS-Messung

Ionenquellen-Spannung 1	25 kV
Ionenquellen-Spannung 2	21,5 kV
Reflektor-Spannung 1	26,3 kV
Reflektor-Spannung 2	13,65 kV
Linsen-Spannung	10,5 kV
PIE ( <i>Pulsed Ion Extraction</i> )	10 ns
Laserintensität	30-50 im Positivmodus
Software (Unix)	flexControl 3.0, flexAnalysis 3.0

Desialylierte/permethylierte Glykane werden mit Ara oder Super DHB als Probenmatrix auf ein MALDI-Stahltarget (MTP-384) mittels der *Dry-Droplet-Methode* gespottet. Hierzu werden je  $0,5 \mu\text{l}$  der Probe und der Matrix auf dem Target gemixt und bei RT kokristallisiert. Die Glykane werden im Positivmodus [194, 198] des Ultraflex<sup>R</sup> III smartbeam<sup>TM</sup> MALDI TOF/TOF Massenspektrometer von Bruker Daltonics analysiert.

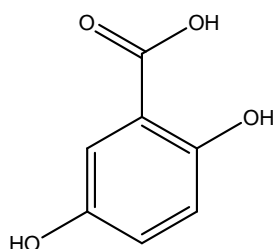


Abb. 5.5: DHB. 154,12 g/mol.

Desialylierte Proben werden zum Spotten in  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen, permethylierte hingegen in kaltem 70%igen (v/v) ACN. Das Probenresuspensionsvolumen wird der jeweiligen Proben-

menge angepasst. Ara wird mit 5 mg/ml in 70 % (v/v) EtOH gelöst [199] verwendet. Super DHB wird mit 10 mg/ml in 50 % (v/v) ACN gelöst für desialylierte Proben und in 10 % (v/v) ACN gelöst für permethylierte Proben verwendet. Zur Kalibrierung der jeweiligen Messung wird Dextran-Hydrolysat von Glycoscience (DH; 1,5 mg/ml) als Standard mitgeführt. Die Fragmentierung wird mit dem LID-LIFT durchgeführt. Hier wird die geräteinterne Kalibrierung verwendet. Die erhaltenen Daten [m/z] werden im Anschluß mit den öffentlichen Datenbanken GlycoWorkBench [179] und GlycoPeakFinder [180] ausgewertet. Geräteeinstellungen für die Fragmentierung sind wie folgt:

Ionenquellen-Spannung 1	8 kV
Ionenquellen-Spannung 2	7,15 kV
Reflektor-Spannung 1	29,5 kV
Reflektor-Spannung 2	13,7 kV
Linsen-Spannung	3,6 kV
LIFT 1	19
LIFT 2	3,1
PIE	10 ns
Laserintensität	50-100 im Positivmodus
Software (Unix)	flexControl 3.0, flexAnalysis 3.0

### 5.5.4 Monosaccharid-Bestimmung

Neutrale Monosaccharide werden über *high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection* (HPAEC-PAD) quantitativ und qualitativ bestimmt [200–202]. Die Messung über Redoxpotentiale an einer Goldelektrode ermöglicht eine sensitive Detektion ohne vorherige Derivatisierung der Probe. Die Monosaccharide bilden unter stark alkalischen Bedingungen ( $\text{pH} > 13$ ) negativ geladene Alkoholate und wechselwirken mit der Anionenaustauschermatrix (Carbo Pac). Die Monosaccharide unterscheiden sich in ihrer Acidität, welche sich durch die Stellung der OH-Gruppen ergibt.

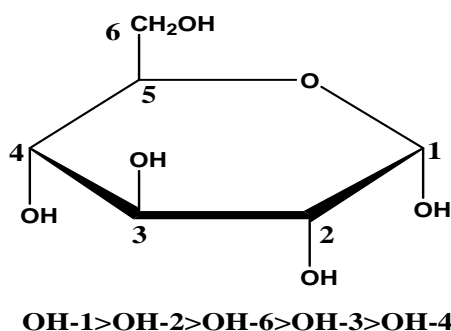


Abb. 5.6: Saccharid-Acidität

In der sauren Hydrolyse von Glykanen mittels TFA werden N-Acetylhexosen (GalNAc; GlcNAc) de-N-acetyliert, wobei die korrespondierenden Aminozucker (GalNH<sub>2</sub>; GlcNH<sub>2</sub>) entstehen. N-Acetyl- und N-Glycolylneuraminsäuren (Neu5Ac; Neu5Gc) werden in der TFA-Hydrolyse zersetzt und müssen zur Detektion unter milderer Hydrolysebedingungen mit HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oder enzymatisch freigesetzt werden. TFA hat hier den Vorteil in der SpeedVac schnell und nahezu restlos zu verdampfen. Die Monosaccharidbestimmung mittels HPAEC-PAD ermöglicht eine schnelle und einfache Übersicht über vorhandene Monosaccharide sowie erste Einblicke über den vorherrschenden Glykosylierungstyp. So deutet ein GlcNAc/Man < 0,5 auf N-Glykane des mannosereichen Typs, hingegen GlcNAc/Man = 1-2 auf den komplexen Typ hin. Der Nachweis von GalNAc weist aufgrund seines seltenen Einbaus in N-Glykanen auf das Vorhandensein von O-Glykosylierungen hin.

#### 5.5.4.1 TFA-Hydrolyse

50 µg Protein oder deren bereits aufgereinigte Glykane werden in 1,5 ml Schraubgefäße vorgelegt und in 400 µl 2 N TFA gelöst. Die saure Hydrolyse inkubiert 4 h bei 100 °C im Trockenschrank. Anschließend werden die Proben abgekühlt und in der SpeedVac zur Trockne eingengt. Nach dem Waschen mit 500 µl H<sub>2</sub>O und erneutem Einengen kann die Probe für die HPAEC-PAD-Messung im Probenzumischstandard aufgenommen werden. Dieser besteht aus 200 pmol/Injektionsvolumen D-Fructose und 2-Deoxy-D-ribose. Der Kalibrierstandard setzt sich zusammen aus 200 pmol/Injektionsvolumen D-Fructose, 2-Deoxy-D-ribose und 100 pmol/Injektionsvolumen Arabinose (Ara), D-Galactose (Gal), D-Glucose (Glc), D-Mannose (Man), L-Fucose (Fuc), N-Acetyl-D-galactosamin (GalNH<sub>2</sub>), N-Acetyl-D-glucosamin (GlcNH<sub>2</sub>) und Xylose (Xyl). Bei Bedarf kommen noch 100 pmol L-Rhamnose (Rha) dazu. Alle verwendeten Monosaccharide stammen von Fluka. Zur Prüfung der Hydrolyse werden 75 pmol α1-saures Glykoprotein (AGP, human) und H<sub>2</sub>O als Leerwert mit hydrolysiert.

#### 5.5.4.2 Probentrocknung

Wässrige Lösungen, flüchtige Salze, Lösemittel und Säuren werden in der SpeedVac bei 37 °C unter Vakuum verdampft. An der Gefäßwandung zurückbleibende Glykane werden in neuer Lösung aufgenommen oder bei -20 °C gelagert.

#### 5.5.4.3 Probenfiltration

Bei sichtbar enthaltenen Schwebstoffen wird die Probe nach Hydrolyse vor der HPAEC-PAD-Messung filtriert. Hierzu werden Millex-GV Syring Driven Filter (Millipore) mit 0,22 µm

großen Poren verwendet. Nach dem Waschen der Filter mit  $50 \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  wird die Probe filtriert und mit Wasser nachgewaschen. Die Partikel verbleiben auf bzw. im Filter.

#### 5.5.4.4 HPAEC-PAD-Analyse

Die Detektion der Monosaccharide über HPAEC-PAD erfolgt nach isokratischer Trennung mit 2,25 bzw. 18 mM KOH. Die Elutionsrangfolge der Monosaccharide unterscheidet sich. Bei 2,25 mM KOH eluiert zuerst Fuc, gefolgt von Desoxyribose, Rha oder Ara, GalNH<sub>2</sub>, Gal, GlcNH<sub>2</sub>, Glc, Xyl, Man und Fru. Bei 18 mM KOH eluiert zuerst Fuc, gefolgt von Desoxyribose, Rha, Ara/GalNH<sub>2</sub>, GlcNH<sub>2</sub>, Gal, Glc, Man und Xyl. Die nachfolgenden Parameter beschreiben die Messung.

Trennsäule	CarboPac PA1 250 × 2 mm
Vorsäule	CarboPac PA1 50 × 2 mm
Eluent A	2,25/18 mM KOH
Eluent B	200 mM NaOH
Eluent C	100 mM NaOH, 600 mM NaAc
Flussrate	0,25 ml/min
$T_{(Saeule/Detektor)}$	25 °C
$T_{(Probengeber)}$	10 °C
Volumen <sub>(Injektion)</sub>	10 $\mu\text{l}$

#### 5.5.5 Oligosaccharid-Bestimmung

Aufgereinigte N-Glykane von 100  $\mu\text{g}$  Protein werden in desialylierter Form ohne Derivatisierung über die Anionenaustauschermatrix nach ihrer Acidität unter alkalischen Bedingungen aufgetrennt und fraktioniert [203, 204]. Die Peak entsprechend vereinigten Fraktionen können nach Entsalzung über TopTip massenspektrometrisch analysiert werden. Die isolierten Glykane werden im Anschluss APTS-markiert und als Vergleichsstandard für die CE-Messung verwendet. Die Elution erfolgt bei dieser Methode durch eine steigende NaAc-Konzentration.

Trennsäule	CarboPac PA1 250 × 2 mm
Vorsäule	CarboPac PA1 50 × 2 mm
Eluent A	100 mM NaOH
Eluent B	100 mM NaOH, 600 mM NaAc
Eluent C	100 mM NaOH, 120 mM NaAc
$T_{(Saeule/Detektor)}$	25 °C

FLUSSRATE [ml/min]	ZEIT [min]	ELUENTA [%]	ELUENTB [%]	ELUENTC [%]
	0	100	0	0
0,4	10	100	0	0
	90	55	45	0
0,2	100	0	100	0
	105	0	0	100
	125	0	0	100
0,4	130	100	0	0
	150	100	0	0

Tab. 5.22: Gradient HPAEC-PAD

### 5.5.6 Kapillarelektrophorese

Ähnlich der Proteintrennung mittels SDS-PAGE werden bei der Kapillarelektrophorese N-Glykane einheitlich negativ geladen und elektrophoretisch nach Größe und Form getrennt. Ein Molekül des Fluorophors APTS wird hierbei über reduktive Aminierung am reduzierenden Ende des Oligosaccharides gebunden. Die drei Sulfonsäuregruppen des APTS sorgen für die einheitlich negative Ladung. Native Ladungen in Form von Sialinsäuren werden zur besseren Auftrennung chemisch (5.5.7.1) oder enzymatisch (5.5.1.3) entfernt. In einer mit Puffer gefüllten Kapillare wandern die Oligosaccharide nun mit spezifischer Mobilität in Richtung Anode. Die hier verwendete Quarzkapillare ist von innen beschichtet mit Polyvinylalkohol (PVA).

#### 5.5.6.1 APTS-Markierung von N-Glykanen

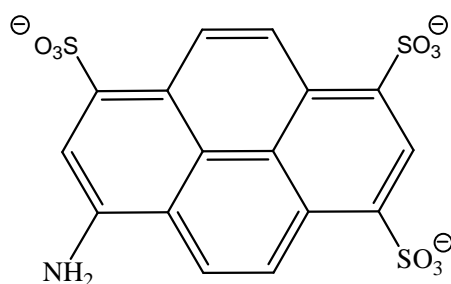


Abb. 5.7: APTS. 523,40 g/mol.

Unter Verwendung des *Carbohydrate Labeling and Analysis Kits* werden N-Glykane wie folgt APTS markiert. Desialylierte Glykane, ausgehend von ca. 25  $\mu\text{g}$  Protein, werden in PCR-Reagiergefäße vorgelegt und getrocknet. Es werden 0,5  $\mu\text{l}$  1 M Natriumcyanoborhydrid ( $\text{NaCNBH}_3$ ), 0,5  $\mu\text{l}$  L6 APTS-Reagenz, 3  $\mu\text{l}$  des Label Puffers (10 % HAc:Tetrahydrofuran

(L3:THF; 1:1) und 0,1 fmol Maltose als internen Standard dazu gegeben. Die Labelreaktion findet bei RT, ü.N., alternativ 90 min bei 60 °C, unter Lichtausschluss statt. Der Ansatz wird mit 25  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O aufgefüllt und davon 5  $\mu\text{l}$  zur CE-Messung in weiteren 20  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O verdünnt eingesetzt.

### 5.5.6.2 CE-LIF-Analyse

Im Vergleich zu den HPLC-Methoden zeichnet sich die CE-Analyse von Glykanen durch eine hohe Sensitivität, hoher Auflösung bei geringem Zeitaufwand aus. Ein Lauf dauert ca. 20 min. Es wird die Software 32Karat mit dem Gerät CE-MDQ-PACE von Beckman Coulter verwendet.

CHO-Kapillare	amorpher Quarz ( <i>fused silica</i> ) 50 $\mu\text{m}$ Durchmesser ca.60 cm Länge Polyvinylalkohol(PVA)-Innenbeschichtung
Puffer	CHO-Puffer von Beckman Coulter
Spannung	30 kV
Detektor	laserinduzierte Fluoreszenz (LIF) 455 <sub>Ex</sub> /512 <sub>Em</sub> nm

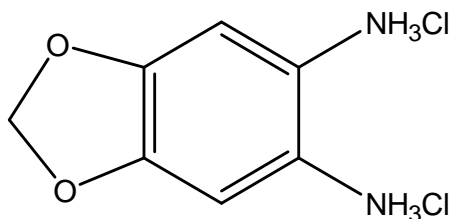
## 5.5.7 Sialinsäurebestimmung

Zur HPLC-Bestimmung von Sialinsäuren werden die Sialinsäuren chemisch vom Glykoprotein oder Glykan abgespalten (5.5.7.1), DMB-markiert [205, 206] und schließlich über eine RP18-Säule analysiert. Die verwendete Kieselgelsäule ist mit C18-Ketten modifiziert und somit stark hydrophob. Die verschiedenen Sialinsäuretypen werden über hydrophobe Wechselwirkungen mit der Säulenmatrix unter Absenkung der Polarität der mobilen Phase aufgetrennt. Die Sialinsäuren N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), N-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) und 2-Keto-3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nononsäure (KDN) werden als Standard eingesetzt.

### 5.5.7.1 Essigsäurehydrolyse

Zur chemischen Desialylierung wird das Glykoprotein (ca. 50  $\mu\text{g}$ ) oder die bereits aufgereinigten Glykane in 3 M Essigsäure 90 min bei 80 °C und 150 rpm inkubiert. Der Ansatz wird mit 25-prozentigem Ammoniak neutralisiert und mit 500  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O in der SpeedVac eingengt. Zur Salz Entfernung werden die Proben in EtOH und EtOH:MeOH (1:1) aufgenommen und zur Trockne eingengt.

### 5.5.7.2 DMB-Markierung von Sialinsäuren



**Abb. 5.8:** DMB.120,11 g/mol; 373<sub>Ex</sub>/448<sub>Em</sub> nm

Nach der Essigsäurehydrolyse werden die Sialinsäuren mit dem Fluoreszenzfarbstoff 1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzol (DMB) markiert, um eine Detektion hoher Sensitivität zu ermöglichen. Die Sialinsäuren werden in 20  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O und 100  $\mu\text{l}$  DMB-Reagenz aufgenommen und bei 56 °C 2,5 h unter Lichtausschluss inkubiert. Das Labelreagenz besteht aus 2,7 M DMB in 2 M HCl, 9 mM Natriumdisulfit und 0,5 M  $\beta$ -Mercaptoethanol. Zusätzlich zur Probe wird der Kalibrierstandard, bestehend aus je 500 pmol/ml Neu5Ac, Neu5Gc und KDN DMB markiert. Als internen Standard wird jeder Probe 7,5 pmol KDN vor DMB-Markierung zugegeben. Als Zuzugstandard wird eine 10 pmol/ml KDN-Lösung DMB-markiert.

### 5.5.7.3 Dionex-Ultimate 3000-Analyse

Der DMB-gelabelte Kalibrierstandard wird zu 500 fmol/Injektion in H<sub>2</sub>O verdünnt und zur Quantifizierung 3x mittels RP-HPLC gemessen. Die Proben werden gemäß des internen KDN-Standards auf 500 fmol/Injektion in H<sub>2</sub>O verdünnt gemessen.

Ultimate 3000	Eluentenspeicher; Dionex, Idstein HPLC-Pumpe Säulenofen Autoinjektor
RF 2000	Fluoreszenz-Detektor
Software	Chromeleon 6.80
Methode	RP18-HPLC
Säule	Gemini 5 $\mu$ C18 110 A 250 $\times$ 4,6 mm Phenomenex, Aschaffenburg
Vorsäule	Gemini C18 3 $\times$ 4 mm (Phenomenex, Aschaffenburg)
Eluent A	H <sub>2</sub> O

---

Eluent B	ACN:MeOH (3:2)
Detektor	Dionex-Fluoreszenzdetektor RF 2000
	$373_{Ex}/448_{Em}$ nm
Flussrate	0,5 ml/min
T(Säule)	30 °C

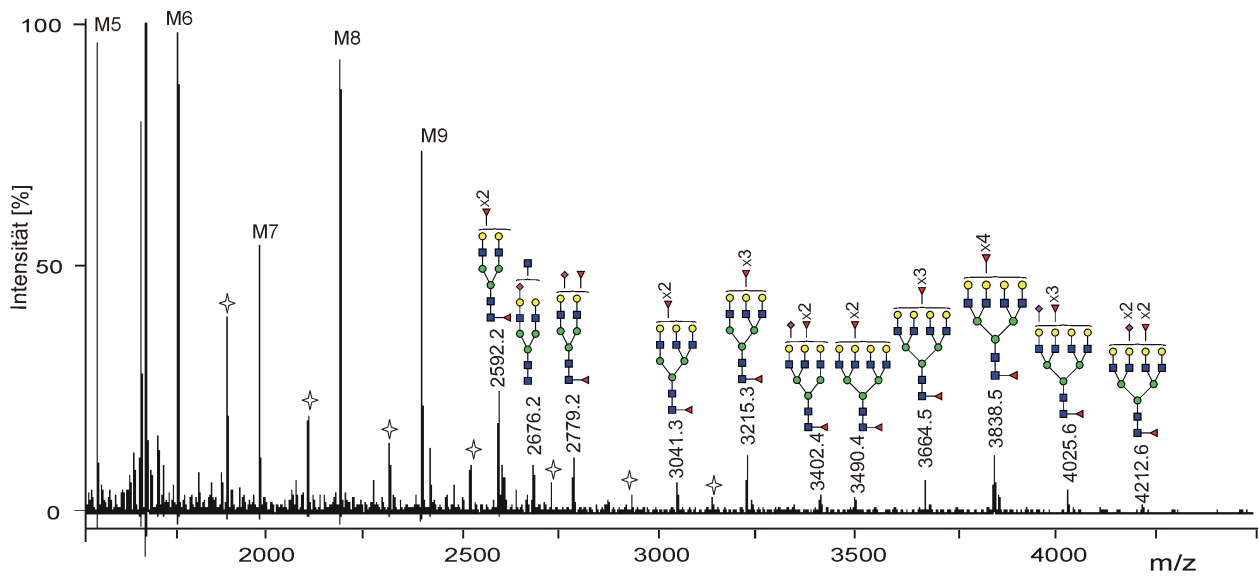
FLUSSRATE	ZEIT	ELUENTA	ELUENTB
[ml/min]	[min]	[%]	[%]
	0	83	15
	10	83	15
	60	65	33
0,5	61	0	100
	71	0	100
	72	83	15
	87	83	15

**Tab. 5.25:** Gradient RP18-HPLC

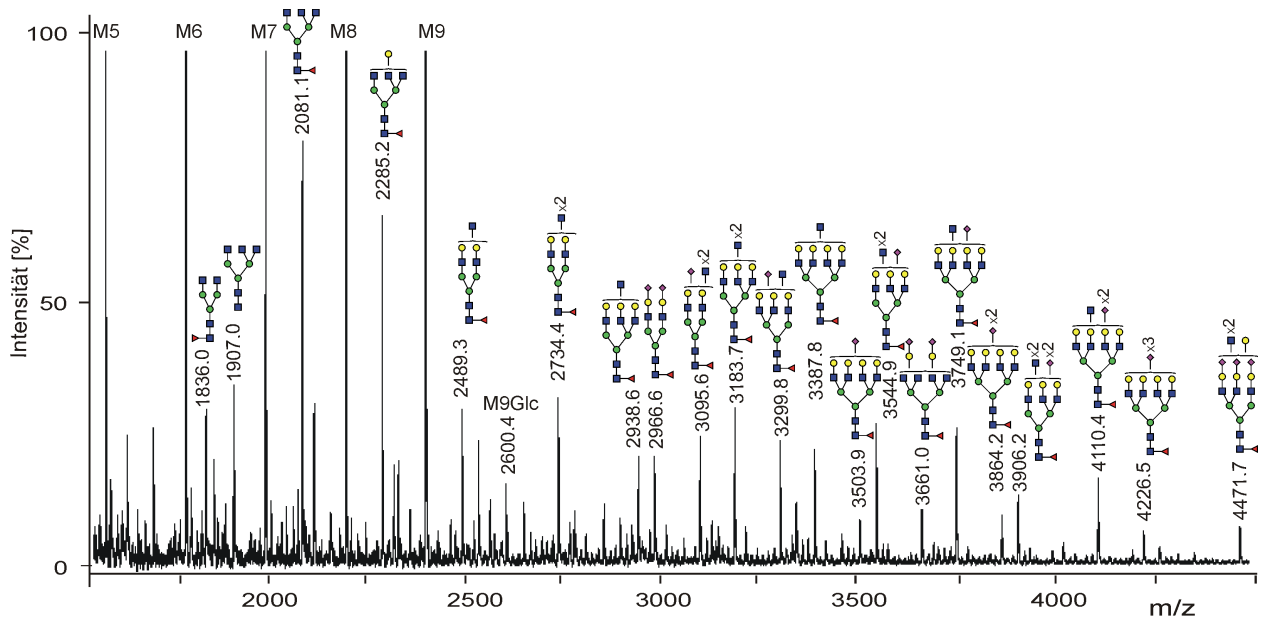


# 6 Anhang

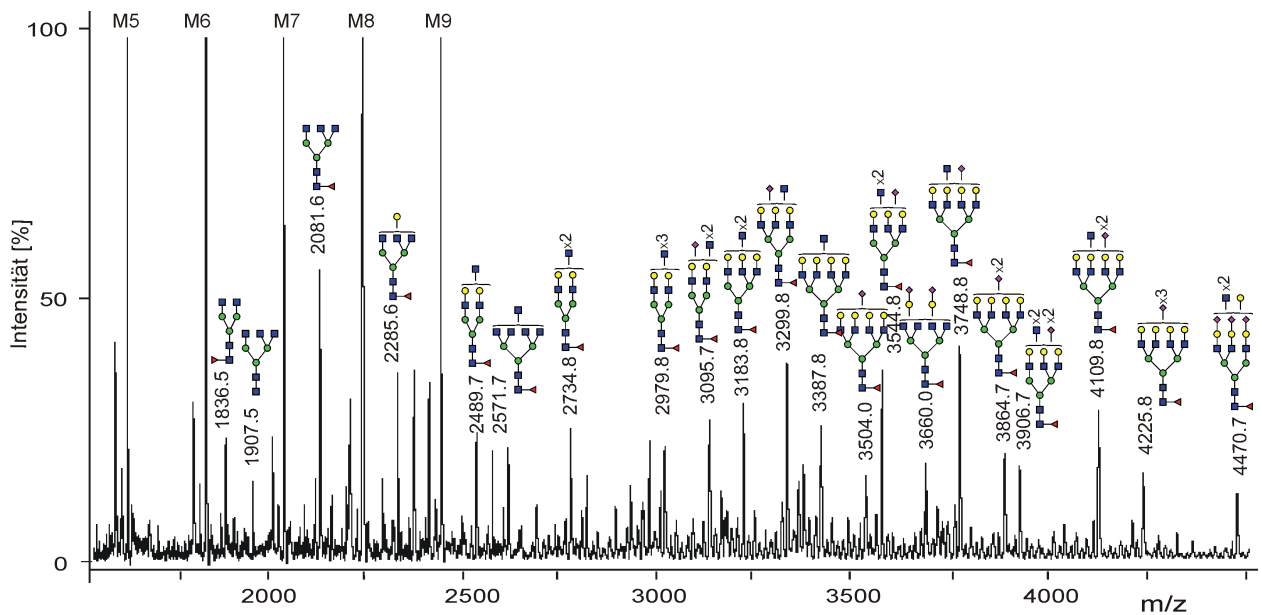
## 6.1 Exemplarische Spektren



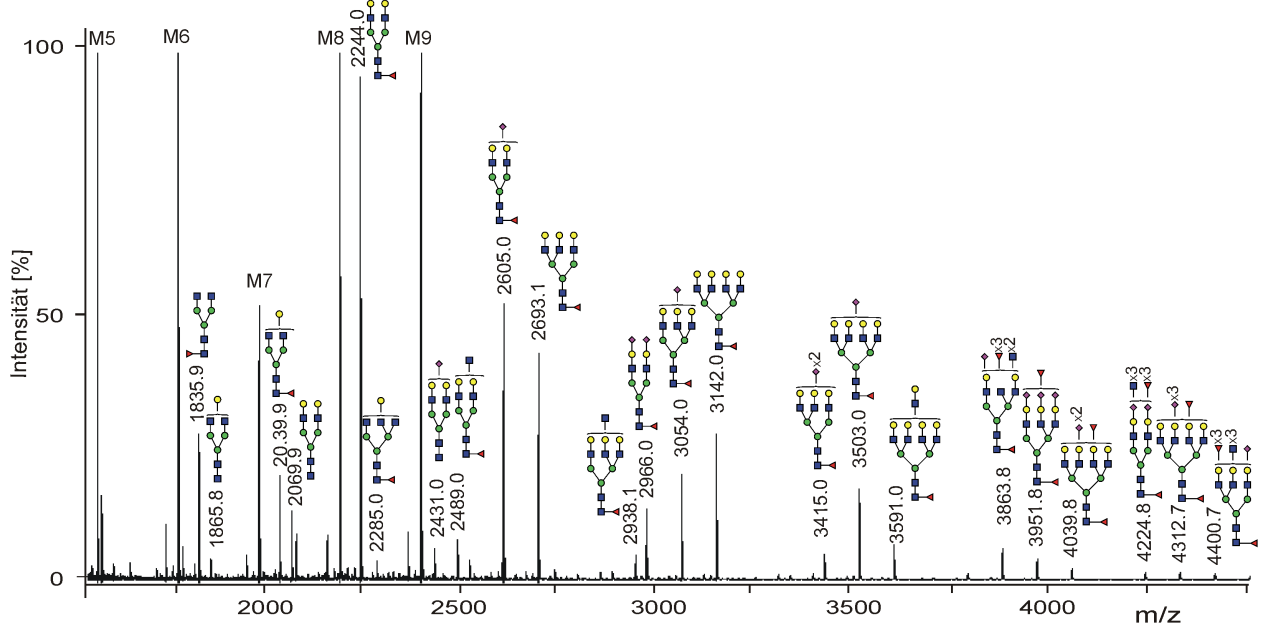
**Abb. 6.1:** Exemplarisches MALDI-TOF-MS-Spektrum permethylierter N-Glykane der mittels Rohmembranpräparation isolierten Membranglykoproteine der AGE1.HN-Zelllinie. Sterne markieren eine DH-Verunreinigung. Die Probe wurde mit Arabinosazon als Matrix im Positivmodus mit Reflektor massenspektrometrisch analysiert  $[M+Na]^+$ .  $\square$  = GlcNAc,  $\circ$  = Man,  $\circ$  = Gal,  $\diamond$  = Neu5Ac,  $\triangleleft$  = Fuc.



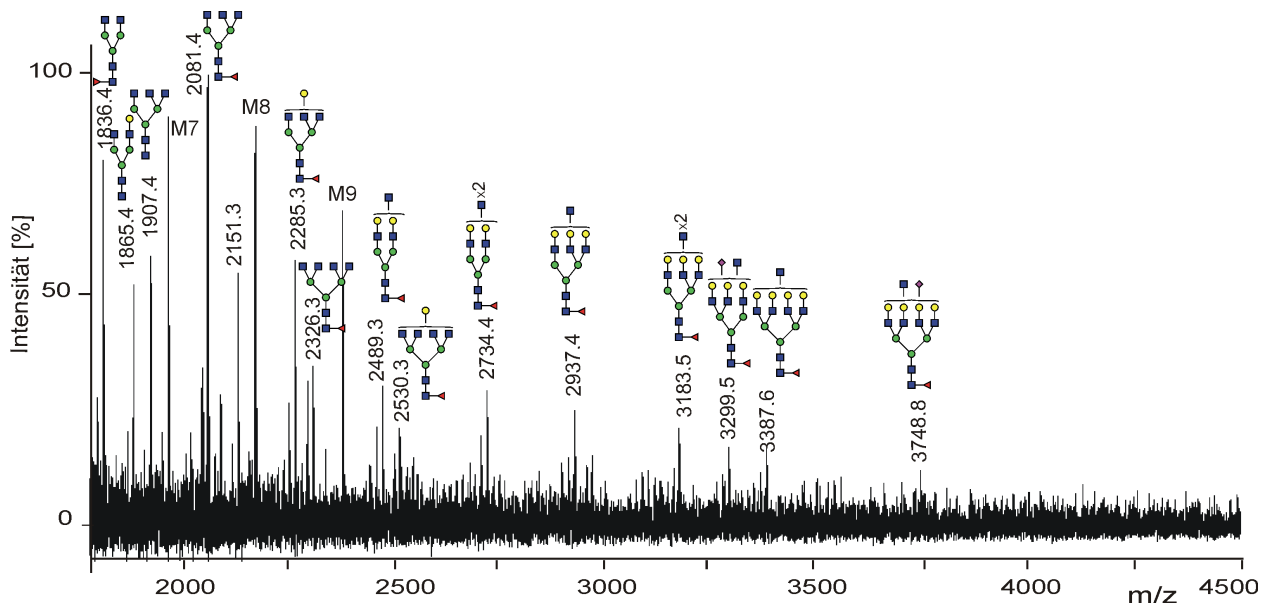
**Abb. 6.2:** Exemplarisches MALDI-TOF-MS-Spektrum permethylierter N-Glykane der mittels Rohmembranpräparation isolierten Membranglykoproteine der AGE1.CR-Zelllinie. Die Probe wurde mit Arabinosazon als Matrix im Positivmodus mit Reflektor massenspektrometrisch analysiert  $[M+Na]^+$ .  $\square$  = GlcNAc,  $\circ$  = Man,  $\circ$  = Gal,  $\diamond$  = Neu5Ac,  $\triangleleft$  = Fuc.



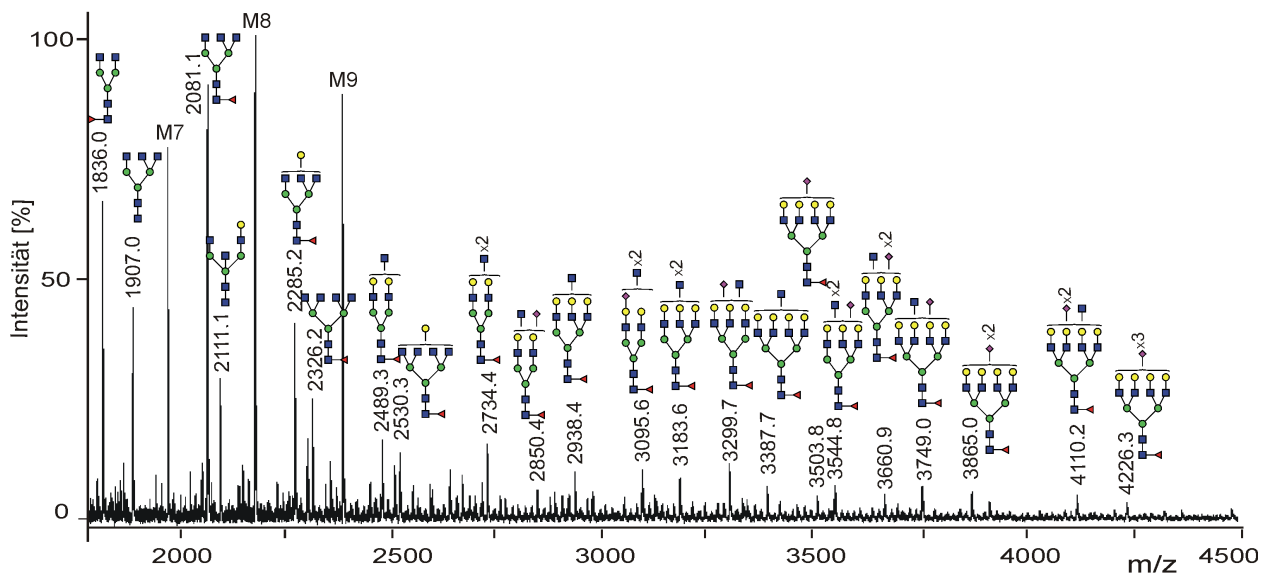
**Abb. 6.3:** Exemplarisches MALDI-TOF-MS-Spektrum permethylierter N-Glykane der mittels Rohmembranpräparation isolierten Membranglykoproteine der AGE1.pIX-Zelllinie. Die Probe wurde mit Arabinosazon als Matrix im Positivmodus mit Reflektor massenspektrometrisch analysiert  $[M+Na]^+$ .  $\square$  = GlcNAc,  $\circ$  = Man,  $\circ$  = Gal,  $\diamond$  = Neu5Ac,  $\triangleleft$  = Fuc.



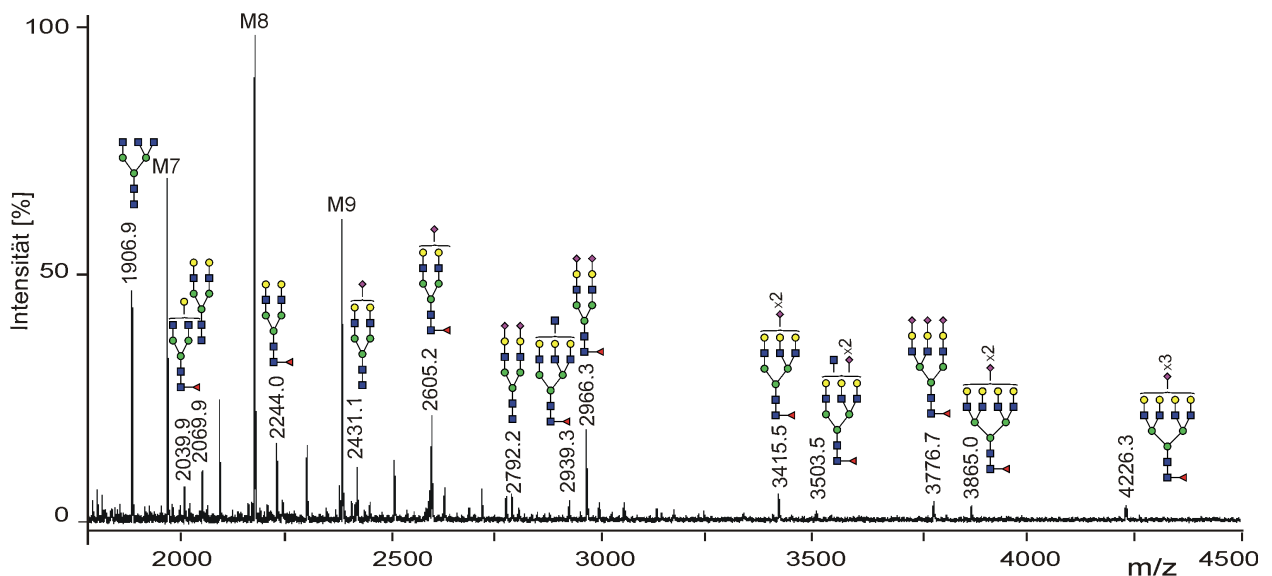
**Abb. 6.4:** Exemplarisches MALDI-TOF-MS-Spektrum permethylierter N-Glykane der mittels Rohmembranpräparation isolierten Membranglykoproteine der CHO-Zelllinie. Die Probe wurde mit Arabinosazon als Matrix im Positivmodus mit Reflektor massenspektrometrisch analysiert  $[M+Na]^+$ .  $\square$  = GlcNAc,  $\circ$  = Man,  $\circ$  = Gal,  $\diamond$  = Neu5Ac,  $\triangleleft$  = Fuc.



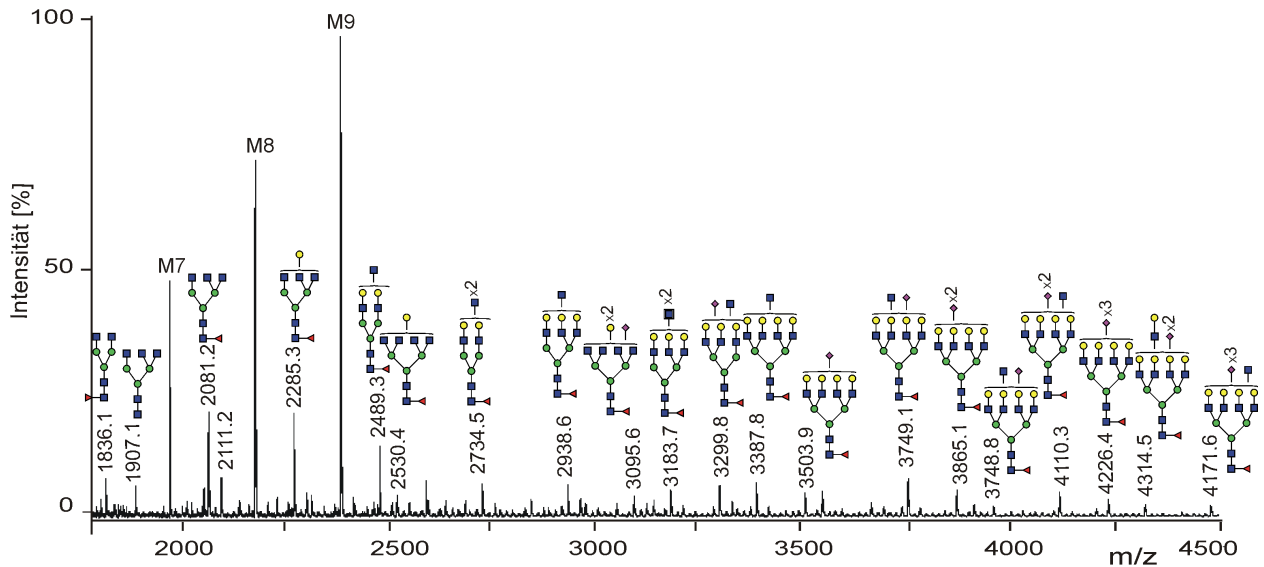
**Abb. 6.5:** Exemplarisches MALDI-TOF-MS-Spektrum permethylierter N-Glykane isolierter „Die Membran+MVA“ aus AGE1.CR-Zellen. Die Zellen wurden mit MVA der MOI 1.0 infiziert und nach 24 Inkubation geerntet. „Die Membran+MVA“ wurden aus Zellkulturüberstand nach 5.4.7.2 präpariert. Die N-Glykane wurden mit Arabinosazon als Matrix im Positivmodus mit Reflektor massenspektrometrisch analysiert  $[M+Na]^+$ .  $\square$  = GlcNAc,  $\circ$  = Man,  $\circ$  = Gal,  $\diamond$  = Neu5Ac,  $\triangleleft$  = Fuc.



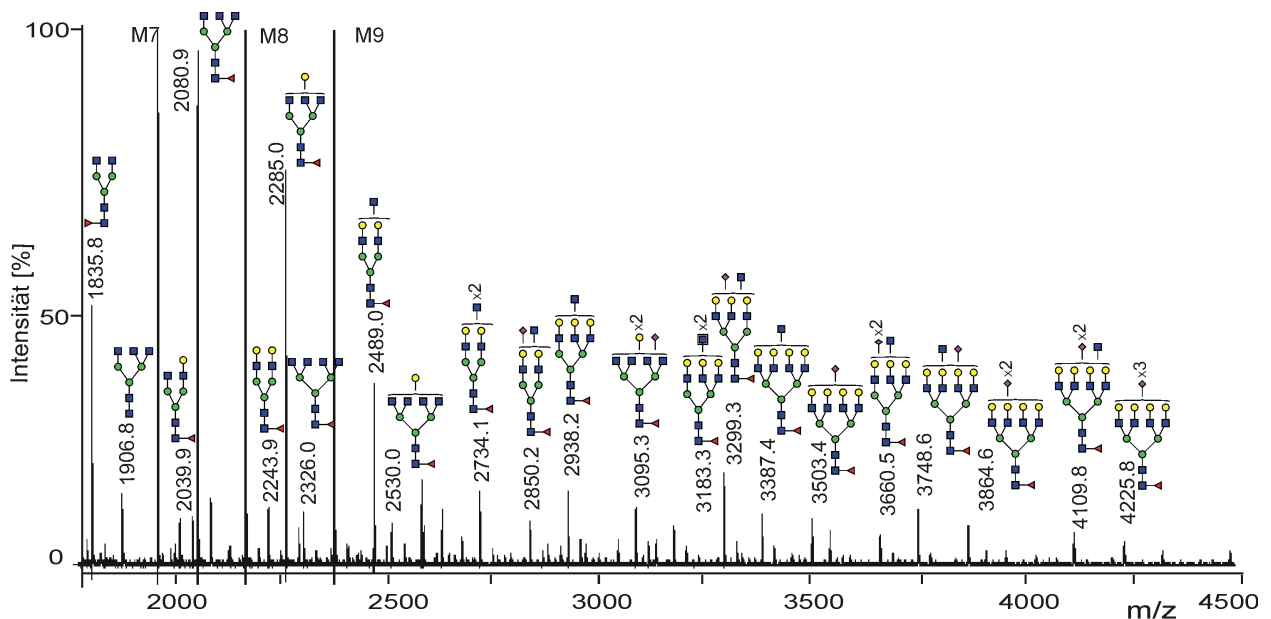
**Abb. 6.6:** Exemplarisches MALDI-TOF-MS-Spektrum permethylierter N-Glykane isolierter „Membran-MVA“ aus AGE1.CR.pIX-Zellen. Die Zellen wurden mit MVA der MOI 1.0 infiziert und nach 24 Inkubation geerntet. „Membran-MVA“ wurde aus Zellkulturüberstand nach 5.4.7.2 präpariert. Die N-Glykane wurden mit Arabinosazon als Matrix im Positivmodus mit Reflektor massenspektrometrisch analysiert  $[M+Na]^+$ .  $\square$  = GlcNAc,  $\circ$  = Man,  $\circ$  = Gal,  $\diamond$  = Neu5Ac,  $\blacktriangleleft$  = Fuc.



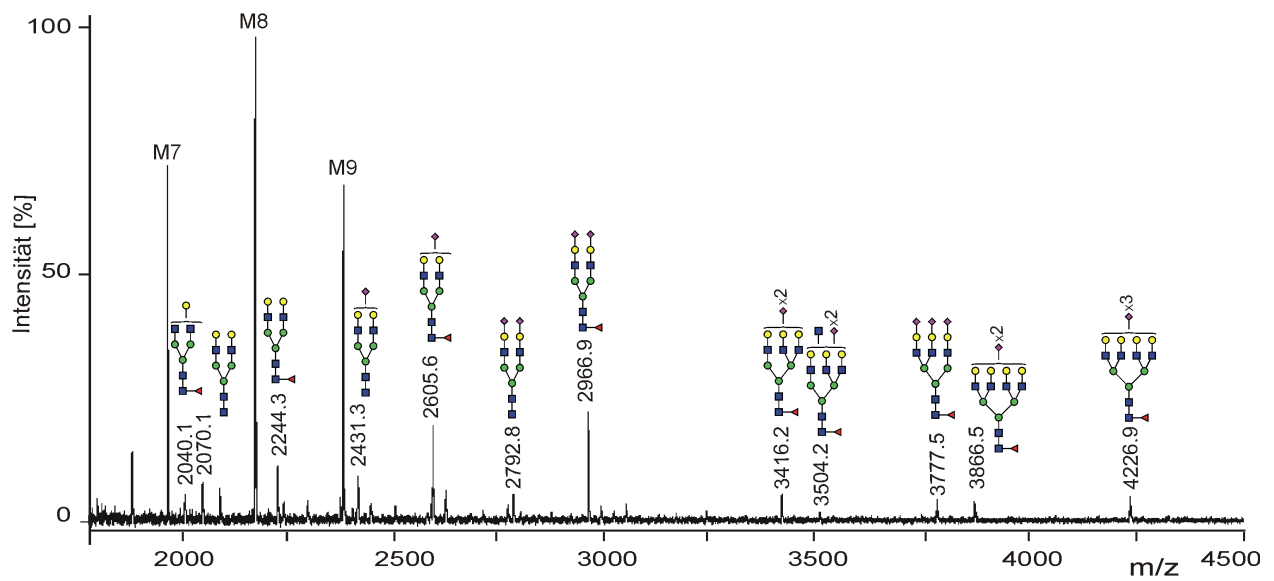
**Abb. 6.7:** Exemplarisches MALDI-TOF-MS-Spektrum permethylierter N-Glykane isolierter „Membran-MVA“ aus BHK-Zellen. Die Zellen wurden mit MVA der MOI 1.0 infiziert und nach 24 Inkubation geerntet. „Die Membran+MVA“ wurde aus Zellkulturüberstand nach 5.4.7.2 präpariert. Die N-Glykane wurden mit Arabinosazon als Matrix im Positivmodus mit Reflektor massenspektrometrisch analysiert  $[M+Na]^+$ .  $\square$  = GlcNAc,  $\circ$  = Man,  $\circ$  = Gal,  $\diamond$  = Neu5Ac,  $\blacktriangleleft$  = Fuc.



**Abb. 6.8:** Exemplarisches MALDI-TOF-MS-Spektrum permethylierter N-Glykane isolierter „Membran-MVA“ aus AGE1.CR-Zellen. Die Zellen wurden mit MVA der MOI 1.0 infiziert und nach 24 Inkubation geerntet. „Membran-MVA“ wurde aus Zellkulturüberstand nach 5.4.7.2 präpariert. Die N-Glykane wurden mit Arabinosazon als Matrix im Positivmodus mit Reflektor massenspektrometrisch analysiert  $[M+Na]^+$ .  $\square$  = GlcNAc,  $\circ$  = Man,  $\circ$  = Gal,  $\diamond$  = Neu5Ac,  $\triangleleft$  = Fuc.



**Abb. 6.9:** Exemplarisches MALDI-TOF-MS-Spektrum permethylierter N-Glykane isolierter „Membran-MVA“ aus AGE1.CR.pIX-Zellen. Die Zellen wurden mit MVA der MOI 1.0 infiziert und nach 24 Inkubation geerntet. „Membran-MVA“ wurde aus Zellkulturüberstand nach 5.4.7.2 präpariert. Die N-Glykane wurden mit Arabinosazon als Matrix im Positivmodus mit Reflektor massenspektrometrisch analysiert  $[M+Na]^+$ .  $\square$  = GlcNAc,  $\circ$  = Man,  $\circ$  = Gal,  $\diamond$  = Neu5Ac,  $\triangleleft$  = Fuc.



**Abb. 6.10:** Exemplarisches MALDI-TOF-MS-Spektrum permethylierter N-Glykane isolierter „Membran-MVA“ aus BHK-Zellen. Die Zellen wurden mit MVA der MOI 1.0 infiziert und nach 24 Inkubation geerntet. „Membran-MVA“ wurden aus Zellkulturüberstand nach 5.4.7.2 präpariert. Die N-Glykane wurden mit Arabinosazon als Matrix im Positivmodus mit Reflektor massenspektrometrisch analysiert  $[M+Na]^+$ .  $\square$  = GlcNAc,  $\circ$  = Man,  $\circ$  = Gal,  $\diamond$  = Neu5Ac,  $\triangleleft$  = Fuc.

# Literaturverzeichnis

- [1] REICHERT, JM.: Free Content Monoclonal Antibodies as Innovative Therapeutics. In: *curr pharm biotechnol.* 9 (2008), S. 423–430
- [2] HOLLMIG, ST. ; ARIIZUMI, K. ; CRUZ, PD. J.: Recognition of non-self-polysaccharides by C-type lectin receptors dectin-1 and dectin-2. In: *Glycobiology* 19 (2009), Nr. 6, S. 568–575
- [3] PADLER-KARAVANI, V. ; YU, H. ; CAO, H. ; CHOKHAWALA, H. ; KARP, F. ; VARKI, N. ; CHEN, X. ; VARKI, A.: Diversity in specificity, abundance, and composition of anti-Neu5Gc antibodies in normal humans: Potential implications for disease. In: *Glycobiology* 18 (2008), Nr. 10, S. 818–830
- [4] RUTHERFORD, TJ. ; NEVILLE, DCA. ; HOMANS, SW.: Influence of the Extent of Branching on Solution Conformations of Complex Oligosaccharides: A Molecular Dynamics and NMR Study of a Penta-Antennary "Bisected"N-Glycan. In: *Biochemistry* 34 (1995), Oktober, Nr. 43, S. 14131–14137. – ISSN 0006–2960
- [5] HORSTEN, HH. von ; OGOREK, C. ; BLANCHARD, V. ; DEMMLER, C. ; GIESE, C. ; WINKLER, K. ; KAUP, M. ; BERGER, M. ; JORDAN, I. ; SANDIG, V.: Production of Non-fucosylated Antibodies by Co-Expression of Heterologous GDP-6-deoxy-D-lyxo-4-hexulose reductase. In: *Glycobiology* (2010)
- [6] RAJU, TS.: Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs. In: *Curr Opin Immunol.* 20 (2008), August, Nr. 4, S. 471–478. – ISSN 0952–7915
- [7] HOUDE, D. ; PENG, Y. ; BERKOWITZ, SA. ; ENGEN, JR.: Post-translational modifications differentially affect IgG1 conformation and receptor binding. In: *Molecular & Cellular Proteomics* [7], S. 1716–1728
- [8] HSU, KL. ; PILOBELLO, KT. ; MAHAL, LK.: Analyzing the dynamic bacterial glycome with a lectin microarray approach. In: *Nat Chem Biol* 2 (2006), März, Nr. 3, S. 153–157. – ISSN 1552–4450

- [9] SZYMANSKI, CM. ; WREN, BW.: Protein glycosylation in bacterial mucosal pathogens. In: *Nat Rev Micro* 3 (2005), März, Nr. 3, S. 225–237. – ISSN 1740–1526
- [10] GOMORD, V. ; FITCHETTE, AC. ; MENU-BOUAOUICHE, L. ; SAINT-JORE-DUPAS, C. ; PLASSON, C. ; MICHAUD, D. ; FAYE, L.: Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. In: *Plant Biotechnol J*. 8 (2010), Nr. 5, S. 564–587. – ISSN 1467–7652
- [11] NORTH, S. ; KOLES, K. ; HEMBD, C. ; MORRIS, H. ; DELL, A. ; PANIN, V. ; HASLAM, S.: Glycomic studies of *Drosophila melanogaster* embryos. In: *Glycoconj J*. 23 (2006), S. 345–354. – ISSN 0282–0080. – 10.1007/s10719-006-6693-4
- [12] MATSUMOTO, K. ; SHIMIZU, C. ; ARAO, T. ; ANDOH, M. ; KATSUMATA, N. ; KOHNO, T. ; YONEMORI, K. ; KOIZUMI, F. ; YOKOTE, H. ; AOGI, K. ; TAMURA, K. ; NISHIO, K. ; FUJIWARA, Y.: Identification of Predictive Biomarkers for Response to Trastuzumab Using Plasma FUCA Activity and N-Glycan Identified by MALDI-TOF-MS. In: *J Proteome Res*. 8 (2009), Februar, Nr. 2, S. 457–462. – ISSN 1535–3893
- [13] MIYOSHI, E. ; MORIWAKI, K. ; NAKAGAWA, T.: Biological Function of Fucosylation in Cancer Biology. In: *J Biochem* 143 (2008), Nr. 6, S. 725–729
- [14] RADEMACHER, TW. ; PAREKH, RB. ; DWEK, RA. ; ISENBERG, D. ; ROOK, G. ; AXFORD, JS. ; ROITT, I.: The role of IgG glycoforms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: *Springer Semin Immunopathol* 10 (1988), S. 231–49
- [15] AHN, YH. ; KIM, YS. ; JI, ES. ; LEE, JY. ; JUNG, JA. ; KO, JH. ; YOO, JS.: Comparative Quantitation of Aberrant Glycoforms by Lectin-Based Glycoprotein Enrichment Coupled with Multiple-Reaction Monitoring Mass Spectrometry. In: *Anal Chem*. 82 (2010), Juni, Nr. 11, S. 4441–4447. – ISSN 0003–2700
- [16] HOMANS, SW. ; DWEK, RA. ; RADEMACHER, TW.: Solution conformations of N-linked oligosaccharides. In: *Biochemistry*. 26 (1987), Oktober, Nr. 21, S. 6571–6578. – ISSN 0006–2960
- [17] KRAPP, S. ; MIMURA, Y. ; JEFFERIS, R. ; HUBER, R. ; SONDERMANN, P.: Structural Analysis of Human IgG-Fc Glycoforms Reveals a Correlation Between Glycosylation and Structural Integrity. In: *J Mol Biol*. 325 (2003), Januar, Nr. 5, S. 979–989. – ISSN 0022–2836
- [18] MATSUMIYA, S. ; YAMAGUCHI, Y. ; SAITO, J. ; NAGANO, M. ; SASAKAWA, H. ; OTAKI, S. ; SATOH, M. ; SHITARA, K. ; KATO, K.: Structural Comparison of Fucosylated and
-



- Nonfucosylated Fc Fragments of Human Immunoglobulin G1. In: *J Mol Biol.* 368 (2007), Mai, Nr. 3, S. 767–779. – ISSN 0022–2836
- [19] VARKI, A. ; CUMMINGS, R. ; ESKO, J. ; FREEZE, H. ; HART, G. ; MARTH, J.: *Essentials of Glycobiology.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999
- [20] KORNFELD, R. ; KORNFELD, S.: Assembly of Asparagine-Linked Oligosaccharides. In: *Annu Rev Biochem* 54 (1985), Nr. 1, S. 631–664
- [21] ROTH, J.: Protein glycosylation in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus and cell type-specificity of cell surface glycoconjugate expression: analysis by the protein A-gold and lectin-gold techniques. In: *Histochem Cell Biol* 106 (1996), S. 79–92
- [22] TRAUB, LM. ; KORNFELD, S.: The trans-Golgi network: a late secretory sorting station. In: *Curr Opin Cell Biol.* 9 (1997), August, Nr. 4, S. 527–533. – ISSN 0955–0674
- [23] VARKI, A.: Factors controlling the glycosylation potential of the Golgi apparatus. In: *Trends Cell Biol.* 8 (1998), Januar, Nr. 1, S. 34–40. – ISSN 0962–8924
- [24] BROCKHAUSEN, I. ; HULL, E. ; HINDSGAUL, O. ; SCHACHTER, H. ; SHAH, RN. ; MICHNICK, SW. ; CARVER, JP.: Control of glycoprotein synthesis. Detection and characterization of a novel branching enzyme from hen oviduct, UDP-N-acetylglucosamine:GlcNAc beta 1-6 (GlcNAc beta 1-2)Man alpha-R (GlcNAc to Man) beta-4-N-acetylglucosaminyltransferase VI. In: *J Biol Chem.* 264 (1989), Nr. 19, S. 11211–11221
- [25] HARPAZ, N. ; SCHACHTER, H.: Control of glycoprotein synthesis. Processing of asparagine-linked oligosaccharides by one or more rat liver Golgi alpha-D-mannosidases dependent on the prior action of UDP-N-acetylglucosamine: alpha-D-mannoside beta 2-N-acetylglucosaminyltransferase I. In: *J Biol Chem.* 255 (1980), Nr. 10, S. 4894–4902
- [26] NARASIMHAN, S.: Control of glycoprotein synthesis. UDP-GlcNAc:glycopeptide beta 4-N-acetylglucosaminyltransferase III, an enzyme in hen oviduct which adds GlcNAc in beta 1-4 linkage to the beta-linked mannose of the trimannosyl core of N-glycosyl oligosaccharides. In: *J Biol Chem.* 257 (1982), Nr. 17, S. 10235–10242
- [27] HARVEY, DJ. ; CRISPIN, M. ; SCANLAN, C. ; SINGER, BB. ; LUCKA, L. ; CHANG, VT. ; RADCLIFFE, CM. ; THOBHANI, S. ; YUEN, CT. ; RUDD, PM.: Differentiation between isomeric triantennary N-linked glycans by negative ion tandem mass spectrometry and confirmation of glycans containing galactose attached to the bisecting (β1-4-GlcNAc) residue in N-glycans from IgG. In: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (2008), Nr. 7, S. 1047–1052. – ISSN 1097–0231
-

- [28] SHINKAWA, T. ; NAKAMURA, K. ; YAMANE, N. ; SHOJI-HOSAKA, E. ; KANDA, Y. ; SAKURADA, M. ; UCHIDA, K. ; ANAZAWA, H. ; SATOH, M. ; YAMASAKI, M. ; HANAI, N. ; SHITARA, K.: The Absence of Fucose but Not the Presence of Galactose or Bisecting N-Acetylglucosamine of Human IgG1 Complex-type Oligosaccharides Shows the Critical Role of Enhancing Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity. In: *J Biol Chem.* [28], S. 3466–3473
- [29] DESJARLAIS, JR. ; LAZAR, GA. ; ZHUKOVSKY, EA. ; CHU, SY.: Optimizing engagement of the immune system by anti-tumor antibodies: an engineer's perspective. In: *Drug Discovery Today* 12 (2007), November, Nr. 21-22, S. 898–910. – ISSN 1359–6446
- [30] ITO, A. ; ISHIDA, T. ; UTSUNOMIYA, A. ; SATO, F. ; MORI, F. ; YANO, H. ; INAGAKI, A. ; SUZUKI, S. ; TAKINO, H. ; RI, M. ; KUSUMOTO, S. ; KOMATSU, H. ; IIDA, S. ; INAGAKI, H. ; UEDA, R: Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody exercises potent ADCC-mediated antitumor effect in the novel tumor-bearing humanized NOD/Shi-scid, IL-2R $\gamma$ null mouse model. In: *Cancer Immunol Immunother.* 58 (2009), S. 1195–1206
- [31] BAKER, HM. ; BASU, I. ; CHUNG, MC. ; CARADOC-DAVIES, T. ; FRASER, JD. ; BAKER, EN.: Crystal Structures of the Staphylococcal Toxin SSL5 in Complex with Sialyl Lewis X Reveal a Conserved Binding Site that Shares Common Features with Viral and Bacterial Sialic Acid Binding Proteins. In: *J Mol Biol.* 374 (2007), Dezember, Nr. 5, S. 1298–1308. – ISSN 0022–2836
- [32] CHUNG, MC. ; WINES, BD. ; BAKER, H. ; LANGLEY, RJ. ; BAKER, EN. ; FRASER, JD.: The crystal structure of staphylococcal superantigen-like protein 11 in complex with sialyl Lewis X reveals the mechanism for cell binding and immune inhibition. In: *Molecular Microbiology* 66 (2007), Nr. 6, S. 1342–1355. – ISSN 1365–2958
- [33] IMBERTY, A. ; VARROT, A.: Microbial recognition of human cell surface glycoconjugates. In: *Curr Opin Struct Biol.* 18 (2008), Oktober, Nr. 5, S. 567–576. – ISSN 0959–440X
- [34] HASELHORST, T. ; FLEMING, FE. ; DYASON, JC. ; HARTNELL, RD. ; YU, X. ; HOLLOWAY, G. ; SANTEGOETS, K. ; KIEFEL, MJ. ; BLANCHARD, H. ; COULSON, BS. ; ITZSTEIN, M. von: Sialic acid dependence in rotavirus host cell invasion. In: *Nat Chem Biol* 5 (2009), Februar, Nr. 2, S. 91–93. – ISSN 1552–4450
- [35] CSERTI, CM. ; DZIK, WH.: The ABO blood group system and Plasmodium falciparum malaria. In: *Blood* 110 (2007), Nr. 7, S. 2250–2258
-

- [36] RICHARDS, AA. ; COLGRAVE, ML. ; ZHANG, J. ; WEBSTER, J. ; SIMPSON, F. ; PRESTON, E. ; WILKS, D. ; HOEHN, KL. ; STEPHENSON, M. ; MACDONALD, GA. ; PRINS, JB. ; COONEY, GJ. ; XU, A. ; WHITEHEAD, JP.: Sialic Acid Modification of Adiponectin Is Not Required for Multimerization or Secretion but Determines Half-Life in Circulation. In: *Mol Endocrinol* 24 (2010), Nr. 1, S. 229–239
- [37] STAHL, PD.: The mannose receptor and other macrophage lectins. In: *Curr Opin Immunol*. 4 (1992), Februar, Nr. 1, S. 49–52. – ISSN 0952–7915
- [38] ASHWELL, G. ; HARFORD, J.: Carbohydrate-Specific Receptors of the Liver. In: *Annu Rev Biochemistry*. 51 (1982), Juni, Nr. 1, S. 531–554. – ISSN 0066–4154
- [39] SAITOH, O. ; WANG, WC. ; LOTAN, R. ; FUKUDA, M.: Differential glycosylation and cell surface expression of lysosomal membrane glycoproteins in sublines of a human colon cancer exhibiting distinct metastatic potentials. In: *J Biol Chem*. 267 (1992), Nr. 8, S. 5700–5711
- [40] OKUYAMA, N. ; IDE, Y. ; NAKANO, M. ; NAKAGAWA, T. ; YAMANAKA, K. ; MORIWAKI, K. ; MURATA, K. ; OHIGASHI, H. ; YOKOYAMA, S. ; EGUCHI, H. ; ISHIKAWA, O. ; ITO, T. ; KATO, M. ; KASAHARA, A. ; KAWANO, S. ; GU, J. ; TANIGUCHI, N. ; MIYOSHI, E.: Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer: A detailed analysis of the oligosaccharide structure and a possible mechanism for fucosylation. In: *Int. J. Cancer* 118 (2006), Nr. 11, S. 2803–2808. – ISSN 1097–0215
- [41] THOMPSON, S. ; DARGAN, E. ; TURNER, G.A.: Increased fucosylation and other carbohydrate changes in haptoglobin in ovarian cancer. In: *Cancer Lett*. 66 (1992), September, Nr. 1, S. 43–48. – ISSN 0304–3835
- [42] TURNER, GA. ; SKILLEN, AW. ; BUAMAH, P. ; GUTHRIE, D. ; WELSH, J. ; HARRISON, J. ; KOWALSKI, A.: Relation between raised concentrations of fucose, sialic acid, and acute phase proteins in serum from patients with cancer: choosing suitable serum glycoprotein markers. In: *J Clin Pathol*. 38 (1985), Nr. 5, S. 588–592
- [43] TAKAHASHI, M. ; KUROKI, Y. ; OHTSUBO, K. ; TANIGUCHI, N.: Core fucose and bisecting GlcNAc, the direct modifiers of the N-glycan core: their functions and target proteins. In: *Carbohydr Res* 344 (2009), August, Nr. 12, S. 1387–1390. – ISSN 0008–6215
- [44] MURREY, HE. ; GAMA, CI. ; KALOVIDOURIS, SA. ; LUO, WI. ; DRIGGERS, EM. ; PORTON, B. ; HSIEH-WILSON, LC.: From the Cover: Protein fucosylation regulates
-

- synapsin Ia/Ib expression and neuronal morphology in primary hippocampal neurons. In: *PNAS* 103 (2006), Nr. 1, S. 21–26
- [45] ISAJI, T. ; KARIYA, Y. ; XU, Q. ; FUKUDA, T. ; TANIGUCHI, N. ; GU, J.: Functional Roles of the Bisecting GlcNAc in Integrin-Mediated Cell Adhesion. In: FUKUDA, Minoru (Hrsg.): *Glycobiology* Bd. Volume 480. Academic Press, 2010. – ISSN 0076–6879, S. 445–459
- [46] SAKAI, H. ; YAMAGISHI, F. ; MIURA, M. ; HATA, K. ; KOYAMA, I. ; SAKAGISHI, Y. ; KOMODA, T.: Sugar Chain Heterogeneity of Human Urinary Chorionic Gonadotropin Determined by Serial Lectin Affinity Chromatography: Difference between Benign and Malignant Disease. In: *Tumor Biology* 15 (1994), Nr. 4, S. 230–235. – ISSN 1010–4283
- [47] JACQUINOT, PM. ; LEGER, D. ; WIERUSZESKI, JM. ; CODDEVILLE, B. ; MONTREUIL, J. ; SPIK, G.: Change in glycosylation of chicken transferrin glycans biosynthesized during embryogenesis and primary culture of embryo hepatocytes. In: *Glycobiology* 4 (1994), Nr. 5, S. 617–624
- [48] HAMAKO, J. ; MATSUI, T. ; OZEKI, Y. ; MIZUOCHI, T. ; TITANI, K.: Comparative studies of asparagine-linked sugar chains of immunoglobulin G from eleven mammalian species. In: *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 106 (1993), Dezember, Nr. 4, S. 949–954. – ISSN 0305–0491
- [49] RAJU, TS. ; BRIGGS, JB. ; BORGE, SM. ; JONES, AJS.: Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. In: *Glycobiology* 10 (2000), Nr. 5, S. 477–486
- [50] SCHAUER, R. ; SRINIVASAN, GV. ; CODDEVILLE, B. ; ZANETTA, JP. ; GUÉRARDEL, Y.: Low incidence of N-glycolylneuraminic acid in birds and reptiles and its absence in the platypus. In: *Carbohydr Res* 344 (2009), August, Nr. 12, S. 1494–1500. – ISSN 0008–6215
- [51] CHOU, HH. ; TAKEMATSU, H. ; DIAZ, S. ; IBER, J. ; NICKERSON, E. ; WRIGHT, KL. ; MUCHMORE, EA. ; NELSON, DL. ; WARREN, ST. ; VARKI, A.: A mutation in human CMP-sialic acid hydroxylase occurred after the Homo-Pan divergence. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998), Nr. 20, S. 11751–11756
- [52] IRIE, A. ; KOYAMA, S. ; KOZUTSUMI, Y. ; KAWASAKI, T. ; SUZUKI, A.: The Molecular Basis for the Absence of N-Glycolylneuraminic Acid in Humans. In: *J Biol Chem.* 273 (1998), Nr. 25, S. 15866–15871

- [53] VARKI, A.: Loss of N-glycolylneuraminic acid in humans: Mechanisms, consequences, and implications for hominid evolution. In: *Am J Phys Anthropol.* 116 (2001), Nr. S33, S. 54–69. – ISSN 1096–8644
- [54] BYRES, E. ; PATON, AW. ; PATON, JC. ; LOFLING, JC. ; SMITH, DF. ; WILCE, MCJ. ; TALBOT, UM. ; CHONG, DC. ; YU, H. ; HUANG, S. ; CHEN, X. ; VARKI, NM. ; VARKI, A. ; ROSSJOHN, J. ; BEDDOE, T.: Incorporation of a non-human glycan mediates human susceptibility to a bacterial toxin. In: *Nature* 456 (2008), Dezember, Nr. 7222, S. 648–652. – ISSN 0028–0836
- [55] HIGASHI, H. ; HIRABAYASHI, Y. ; FUKUI, Y. ; NAIKI, M. ; MATSUMOTO, M. ; UEDA, S. ; KATO, S.: Characterization of N-Glycolylneuraminic Acid-containing Gangliosides as Tumor-associated Hanganutziu-Deicher Antigen in Human Colon Cancer. In: *Cancer Research* 45 (1985), Nr. 8, S. 3796–3802
- [56] TANGVORANUNTAKUL, P. ; GAGNEUX, P. ; DIAZ, S. ; BARDOR, M. ; VARKI, N. ; VARKI, A. ; MUCHMORE, E.: Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. In: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100 (2003), Nr. 21, S. 12045–12050
- [57] BORYS, MC. ; DALAL, NG. ; ABU-ABSI, NR. ; KHATTAK, SF. ; JING, Y. ; XING, Z. ; LI, ZJ.: Effects of culture conditions on N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) content of a recombinant fusion protein produced in CHO cells. In: *Biotechnol Bioeng.* 105 (2010), Nr. 6, S. 1048–1057. – ISSN 1097–0290
- [58] WATSON, E. ; SHAH, B. ; LEIDERMAN, L. ; HSU, YR. ; KARKARE, S. ; LU, HS. ; LIN, FK.: Comparison of N-Linked Oligosaccharides of Recombinant Human Tissue Kallikrein Produced by Chinese Hamster Ovary Cells on Microcarrier Beads and in Serum-Free Suspension Culture. In: *Biotechnol Prog.* 10 (1994), Nr. 1, S. 39–44. – ISSN 1520–6033
- [59] HILLS, AE. ; PATEL, A. ; BOYD, P. ; JAMES, DC.: Metabolic control of recombinant monoclonal antibody N-glycosylation in GS-NS0 cells. In: *Biotechnol Bioeng.* 75 (2001), Nr. 2, S. 239–251. – ISSN 1097–0290
- [60] IMAI-NISHIYA, H. ; MORI, K. ; INOUE, M. ; WAKITANI, M. ; IIDA, S. ; SHITARA, K. ; SATOH, M.: Double knockdown of  $\alpha$ 1,6-fucosyltransferase (FUT8) and GDP-mannose 4,6-dehydratase (GMD) in antibody-producing cells: a new strategy for generating fully non-fucosylated therapeutic antibodies with enhanced ADCC. In: *BMC Biotechnol.* [60], S. 84. – ISSN 1472–6750
-

- [61] JANEWAY, CA. ; TRAVERS, P. ; WALPORT, M. ; SHLOMCHIK, M.: *Immunologie. 5. Auflage*. Spektrum Akademischer Verlag, 2002
- [62] YAMAGUCHI, Y. ; KATO, K. ; SHINDO, M. ; AOKI, S. ; FURUSHO, K. ; KOGA, K. ; TAKAHASHI, N. ; ARATA, Y. ; SHIMADA, I.: Dynamics of the carbohydrate chains attached to the Fc portion of immunoglobulin G as studied by NMR spectroscopy assisted by selective <sup>13</sup>C labeling of the glycans. In: *J Biomol NMR* 12 (1998), S. 385–94
- [63] WRIGHT, A. ; MORRISON, SL.: Effect of glycosylation on antibody function: implications for genetic engineering. In: *Trends Biotechnol.* 15 (1997), Januar, Nr. 1, S. 26–32. – ISSN 0167–7799
- [64] JEFFERIS, R.: Antibody therapeutics: isotype and glycoform selection. In: *Expert Opin Biol Ther* 7 (2007), Nr. 9, S. 1401–1413
- [65] PEITSCH, MC. ; TSCHOPP, J.: Assembly of macromolecular pores by immune defense systems. In: *Curr Opin Cell Biol.* 3 (1991), August, Nr. 4, S. 710–716. – ISSN 0955–0674
- [66] MACLENNAN, Ian C. M. ; GULBRANSON-JUDGE, Adam ; TOELLNER, Kai-Michael ; CASAMAYOR-PALLEJA, Montserrat ; SZE, Daniel M Y. ; CHAN, Eric Y-T ; LUTHER, Sanjiv A. ; ORBEA, Hans A.: The changing preference of T and B cells for partners as T-dependent antibody responses develop. In: *Immunol Rev* 156 (1997), Nr. 1, S. 53–66. – ISSN 1600–065X
- [67] LANZAVECCHIA, A.: Receptor-Mediated Antigen Uptake and its Effect on Antigen Presentation to Class II-Restricted T Lymphocytes. In: *Annu Rev Immunol.* 8 (1990), Nr. 1, S. 773–793
- [68] GESSNER, JE. ; HEIKEN, H. ; TAMM, A. ; SCHMIDT, RE: The IgG Fc receptor family. In: *Ann Hematol* 76 (1998), S. 231–48
- [69] SHIELDS, RL. ; LAI, J. ; KECK, R. ; O'CONNELL, LY. ; HONG, K. ; MENG, YG. ; WEIKERT, SHA. ; PRESTA, LG.: Lack of Fucose on Human IgG1 N-Linked Oligosaccharide Improves Binding to Human Fc $\gamma$ RIII and Antibody-dependent Cellular Toxicity. In: *J Biol Chem.* 277 (2002), Nr. 30, S. 26733–26740
- [70] HODONICZKY, J. ; ZHENG, YZ. ; JAMES, DC.: Control of Recombinant Monoclonal Antibody Effector Functions by Fc N-Glycan Remodeling in Vitro. In: *Biotechnol Prog.* 21 (2005), Nr. 6, S. 1644–1652. – ISSN 1520–6033
-

- [71] SCALLON, B.J. ; TAM, SH. ; MCCARTHY, SG. ; CAI, AN. ; RAJU, TS.: Higher levels of sialylated Fc glycans in immunoglobulin G molecules can adversely impact functionality. In: *Mol Immunol* 44 (2007), März, Nr. 7, S. 1524–1534. – ISSN 0161–5890
- [72] KANEKO, Y. ; NIMMERJAHN, F. ; RAVETCH, JV.: Anti-Inflammatory Activity of Immunoglobulin G Resulting from Fc Sialylation. In: *Science* 313 (2006), Nr. 5787, S. 670–673
- [73] UMANA, P. ; JEAN-MAIRET, J. ; BAILEY, JE.: Tetracycline-Regulated overexpression of glycosyltransferases in Chinese hamster ovary cells. In: *Biotechnol Bioeng.* 65 (1999), Nr. 5, S. 542–549. – ISSN 1097–0290
- [74] ZHOU, Q. ; SHANKARA, S. ; ROY, A. ; QIU, H. ; ESTES, S. ; MCVIE-WYLIE, A. ; CULM-MERDEK, K. ; PARK, A. ; PAN, C. ; EDMUNDS, T.: Development of a simple and rapid method for producing non-fucosylated oligomannose containing antibodies with increased effector function. In: *Biotechnol Bioeng.* 99 (2008), Nr. 3, S. 652–665. – ISSN 1097–0290
- [75] IIDA, S. ; KUNI-KAMOCHI, R. ; MORI, K. ; MISAKA, H. ; INOUE, M. ; OKAZAKI, A. ; SHITARA, K. ; SATOH, M.: Two mechanisms of the enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) efficacy of non-fucosylated therapeutic antibodies in human blood. In: *BMC Cancer* [75], S. 58
- [76] FERRARA, C. ; STUART, F. ; SONDERMANN, P. ; BRÜNKER, P. ; UMANA, P.: The Carbohydrate at FcγRIIIa Asn-162. In: *J Biol Chem.* 281 (2006), Februar, Nr. 8, S. 5032–5036
- [77] NIWA, R. ; NATSUME, A. ; UEHARA, A. ; WAKITANI, M. ; IIDA, S. ; UCHIDA, K. ; SATOH, M. ; SHITARA, K.: IgG subclass-independent improvement of antibody-dependent cellular cytotoxicity by fucose removal from Asn297-linked oligosaccharides. In: *J Immunol Methods.* [77], S. 151 – 160. – ISSN 0022–1759
- [78] MUSOLINO, A. ; NALDI, N. ; BORTESI, B. ; PEZZUOLO, D. ; CAPELLETTI, M. ; MISSALE, G. ; LACCABUE, D. ; ZERBINI, A. ; CAMISA, R. ; BISAGNI, G. ; NERI, TM. ; ARDIZZONI, A.: Immunoglobulin G Fragment C Receptor Polymorphisms and Clinical Efficacy of Trastuzumab-Based Therapy in Patients With HER-2/neu-Positive Metastatic Breast Cancer. In: *J Clin Oncol.* 26 (2008), April, Nr. 11, S. 1789–1796
- [79] CARTRON, G. ; DACHEUX, L. ; SALLES, G. ; SOLAL-CELIGNY, P. ; BARDOS, P. ; COLOMBAT, P. ; WATIER, H.: Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal
-

- antibody and polymorphism in IgG Fc receptor Fc $\gamma$ RIIIa gene. In: *Blood* 99 (2002), Nr. 3, S. 754–758
- [80] STAHL, PD. ; EZEKOWITZ, RAB.: The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. In: *Curr Opin Immunol.* 10 (1998), Februar, Nr. 1, S. 50–55. – ISSN 0952–7915
- [81] ISRAEL, EJ. ; WILSKER, DF. ; HAYES, KC. ; SCHOENFELD, D. ; SIMISTER, NE.: Increased clearance of IgG in mice that lack beta 2-microglobulin: possible protective role of FcRn. In: *Immunology* 89 (1996), S. 573–8
- [82] RAJU, TS. ; SCALLON, B.: Fc Glycans Terminated with N-Acetylglucosamine Residues Increase Antibody Resistance to Papain. In: *Biotechnol Prog.* 23 (2007), Nr. 4, S. 964–971. – ISSN 1520–6033
- [83] RUHAAK, L. ; ZAUNER, G. ; HUHN, C. ; BRUGGINK, C. ; DEELDER, A. ; WUHRER, M.: Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. In: *Anal Bioanal Chem.* [83], S. 3457–3481
- [84] YAMADA, E. ; TSUKAMOTO, Y. ; SASAKI, R. ; YAGYU, K. ; TAKAHASHI, N.: Structural changes of immunoglobulin G oligosaccharides with age in healthy human serum. In: *Glycoconj J.* 14 (1997), S. 401–5
- [85] PEKELHARING, JM. ; HEPP, E. ; KAMERLING, JP. ; GERWIG, GJ. ; LEIJNSE, B.: Alterations in carbohydrate composition of serum IgG from patients with rheumatoid arthritis and from pregnant women. In: *Ann Rheum Dis* 47 (1988), Nr. 2, S. 91–95
- [86] INTRA, J. ; PEROTTI, ME. ; PAVESI, G. ; HORNER, D.: Comparative and phylogenetic analysis of  $\alpha$ -l-fucosidase genes. In: *Gene* 392 (2006), Nr. 1-2, S. 34 – 46. – ISSN 0378–1119
- [87] KANDA, Y. ; YAMANE-OHNUKI, N. ; SAKAI, N. ; YAMANO, K. ; NAKANO, R. ; INOUE, M. ; MISAKA, H. ; IIDA, S. ; WAKITANI, M. ; KONNO, Y. ; YANO, K. ; SHITARA, K. ; HOSOI, S. ; SATOH, M.: Comparison of cell lines for stable production of fucose-negative antibodies with enhanced ADCC. In: *Biotechnol Bioeng.* [87], S. 680–688
- [88] YAMANE-OHNUKI, N. ; KINOSHITA, S. ; INOUE-URAKUBO, M. ; KUSUNOKI, M. ; IIDA, S. ; NAKANO, R. ; WAKITANI, M. ; NIWA, R. ; SAKURADA, M. ; UCHIDA, K. ; SHITARA, K. ; SATOH, M.: Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: An ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. In: *Biotechnol Bioeng.* [88], S. 614–622
-



- [89] KANDA, Y. ; IMAI-NISHIYA, H. ; KUNI-KAMOCHI, R. ; MORI, K. ; INOUE, M. ; KITAJIMA-MIYAMA, K. ; OKAZAKI, A. ; IIDA, Sh. ; SHITARA, K. ; SATOH, M.: Establishment of a GDP-mannose 4,6-dehydratase (GMD) knockout host cell line: A new strategy for generating completely non-fucosylated recombinant therapeutics. In: *Journal of Biotechnology* [89], S. 300–310. – ISSN 0168–1656
- [90] FERRARA, C. ; BRÜNKER, P. ; SUTER, T. ; MOSER, S. ; PÜNTENER, U. ; UMANA, P.: Modulation of therapeutic antibody effector functions by glycosylation engineering: Influence of Golgi enzyme localization domain and co-expression of heterologous  $\beta$ 1, 4-N-acetylglucosaminyltransferase III and Golgi  $\alpha$ -mannosidase II. In: *Biotechnol Bioeng.* 93 (2006), Nr. 5, S. 851–861. – ISSN 1097–0290
- [91] SULLIVAN, FX. ; KUMAR, R. ; KRIZ, R. ; STAHL, M. ; XU, GY. ; ROUSE, J. ; CHANG, X. ; BOODHOO, A. ; POTVIN, B. ; CUMMING, DA.: Molecular Cloning of Human GDP-mannose 4,6-Dehydratase and Reconstitution of GDP-fucose Biosynthesis in Vitro. In: *J Biol Chem.* [91], S. 8193–8202
- [92] ETZIONI, A. ; PHILLIPS, LM. ; PAULSON, JC. ; HARLAN, JM.: Leukocyte adhesion deficiency (LAD) II. In: *Ciba Found Symp* 189 (1995), S. 51–8
- [93] JORDAN, I. ; VOS, A. ; BEILFUSS, S. ; NEUBERT, A. ; BREUL, S. ; SANDIG, V.: An avian cell line designed for production of highly attenuated viruses. In: *Vaccine* 27 (2009), Nr. 5, S. 748 – 756. – ISSN 0264–410X
- [94] ROSA-CALATRAVA, M. ; GRAVE, L. ; PUVION-DUTILLEUL, F. ; CHATTON, B. ; KEDINGER, C.: Functional Analysis of Adenovirus Protein IX Identifies Domains Involved in Capsid Stability, Transcriptional Activity, and Nuclear Reorganization. In: *J Virol.* 75 (2001), Nr. 15, S. 7131–7141
- [95] ZHU, L. ; LAVOIR, MC. van d. ; ESHPANDE, S. ; DIAMOND, JH. ; GREEN, L. ; HALK, EL. ; HEYER, BS. ; KAY, RM ; KERCHNER, A. ; LEIGHTON, PA. ; MATHER, CM. ; MORRISON, SL. ; NIKOLOV, ZL. ; PASSMORE, DB. ; PRADAS-MONNE, A. ; PRESTON, BT. ; RANGAN, VS. ; SHI, M. ; SRINIVASAN, M. ; WHITE, SG. ; WINTERS-DIGIACINTO, P. ; WONG, S. ; ZHOU, W. ; ETCHES, RJ.: Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens. In: *Nat Biotech* 23 (2005), September, Nr. 9, S. 1159–1169. – ISSN 1087–0156
- [96] OLIVIER, S. ; JACOBY, M. ; BRILLON, C. ; BOULETREAU, S. ; MOLLET, T. ; NERRIERE, O. ; ANGEL, A. ; DANET, S. ; SOUTTOU, B. ; GUEHENNEUX, F. ; GAUTHIER, L. ; BERTHOMÉ, M. ; VIÉ, H. ; BELTRAMINELLI, N. ; MEHTALI, M.: EB66 cell line, a
-

- duck embryonic stem cell-derived substrate for the industrial production of therapeutic monoclonal antibodies with enhanced ADCC activity. In: *MAbs* 2 (2010)
- [97] FENNER, F. ; HENDERSON, DA. ; ARITA, I. ; JEZEK, Z. ; LADNYI, ID.: *Smallpox and its Eradication*. World Health Organisation, Genf, 1988
- [98] HOCHSTEIN-MINTZEL, V. ; HUBER, H. H.C. & S. H.C. & Stickl: Virulenz und Immunogenität eines modifizierten Vaccinia-Virus (Stamm MVA). In: *Z Immunitätsforsch Exp Klin Immunol* 144 (1972), S. 140–145
- [99] STICKL, HA.: Smallpox Vaccination and its Consequences: First Experiences with the Highly Attenuated Smallpox Vaccine "MVA". In: *preventive medicine* 3 (1974), S. 97–101
- [100] WEBSTER, DP. ; DUNACHIE, S. ; MCCONKEY, S. ; POULTON, I. ; MOORE, AC. ; WALTHER, M. ; LAIDLAW, SM. ; PETO, T. ; SKINNER, MA. ; GILBERT, SC. ; HILL, AVS.: Safety of recombinant fowlpox strain FP9 and modified vaccinia virus Ankara vaccines against liver-stage *P. falciparum* malaria in non-immune volunteers. In: *Vaccine* 24 (2006), Nr. 15, S. 3026 – 3034. – ISSN 0264–410X
- [101] PARRINO, J. ; MCCURDY, LH. ; LARKIN, BD. ; GORDON, IJ. ; RUCKER, SE. ; ENAMA, ME. ; KROUP, RA. ; ROEDERER, M. ; BAILER, RT. ; MOODIE, Z. ; GU, L. ; YAN, L. ; GRAHAM, BS.: Safety, immunogenicity and efficacy of modified vaccinia Ankara (MVA) against Dryvax® challenge in vaccinia-naïve and vaccinia-immune individuals. In: *Vaccine* 25 (2007), Nr. 8, S. 1513 – 1525. – ISSN 0264–410X
- [102] BLANCHARD, TJ. ; ALCAMI, A. ; ANDREA, P. ; SMITH, GL.: Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine. In: *J Gen Virol* 79 (1998), Nr. 5, S. 1159–1167
- [103] MEYER, H. ; SUTTER, G. ; MAYR, A.: Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. In: *J Gen Virol* 72 (1991), Nr. 5, S. 1031–1038
- [104] HIRSCH, VM. ; FUERST, TR. ; SUTTER, G. ; CARROLL, MW. ; YANG, LC. ; GOLDSTEIN, S. ; PIATAK, MJr. ; ELKINS, WR. ; ALVORD, WG. ; MONTEFIORI, DC. ; MOSS, B. ; LIFSON, JD.: Patterns of viral replication correlate with outcome in simian immunodeficiency virus (SIV)-infected macaques: effect of prior immunization with a trivalent SIV vaccine in modified vaccinia virus Ankara. In: *J Virol*. 70 (1996), Nr. 6, S. 3741–3752
-

- [105] KIM, DW. ; KRISHNAMURTHY, V. ; BINES, SD. ; KAUFMAN, HL.: TroVax, a recombinant modified vaccinia Ankara virus encoding 5T4: Lessons learned and future development. In: *Hum Vaccin* 6 (2010), S. 12–19
- [106] BAUR, K. ; BRINKMANN, K. ; SCHWENEKER, M. ; PATZOLD, J. ; MEISINGER-HENSCHER, C. ; HERMANN, J. ; STEIGERWALD, R. ; CHAPLIN, P. ; SUTER, M. ; HAUSMANN, J.: Immediate-Early Expression of a Recombinant Antigen by Modified Vaccinia Virus Ankara Breaks the Immunodominance of Strong Vector-Specific B8R Antigen in Acute and Memory CD8 T-Cell Responses. In: *J Virol.* 84 (2010), Nr. 17, S. 8743–8752
- [107] LOCKER, JK. ; KUEHN, A. ; SCHLEICH, S. ; RUTTER, G. ; HOHENBERG, H. ; WEPF, R. ; GRIFFITHS, G.: Entry of the Two Infectious Forms of Vaccinia Virus at the Plasma Membrane Is Signaling-Dependent for the IMV but Not the EEV. In: *Mol. Biol. Cell* 11 (2000), Nr. 7, S. 2497–2511
- [108] CARTER, GC. ; LAW, M. ; HOLLINSHEAD, M. ; SMITH, GL.: Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans. In: *J Gen Virol* 86 (2005), Nr. 5, S. 1279–1290
- [109] WHITBECK, JC. ; FOO, CH. ; LEON, M. Ponce d. ; EISENBERG, EJ. ; COHEN, GH.: Vaccinia virus exhibits cell-type-dependent entry characteristics. In: *Virology* 385 (2009), März, Nr. 2, S. 383–391. – ISSN 0042–6822
- [110] CHANG, SJ. ; CHANG, YX. ; IZMAILYAN, R. ; TANG, YL. ; CHANG, W.: Vaccinia Virus A25 and A26 Proteins Are Fusion Suppressors for Mature Virions and Determine Strain-Specific Virus Entry Pathways into HeLa, CHO-K1, and L Cells. In: *J Virol.* 84 (2010), Nr. 17, S. 8422–8432
- [111] BENGALI, Z. ; TOWNSLEY, AC. ; MOSS, B.: Vaccinia virus strain differences in cell attachment and entry. In: *Virology* 389 (2009), Juni, Nr. 1-2, S. 132–140. – ISSN 0042–6822
- [112] SMITH, GL. ; LAW, M.: The exit of Vaccinia virus from infected cells. In: *Virus Res* 106 (2004), Dezember, Nr. 2, S. 189–197. – ISSN 0168–1702
- [113] WELSCH, S. ; DOGLIO, L. ; SCHLEICH, S. ; LJ., Krijnse: The Vaccinia Virus I3L Gene Product Is Localized to a Complex Endoplasmic Reticulum-Associated Structure That Contains the Viral Parental DNA. In: *J Virol.* 77 (2003), Nr. 10, S. 6014–6028
-

- [114] SCHMELZ, M. ; SODEIK, B. ; ERICSSON, M. ; WOLFFE, EJ. ; SHIDA, H. ; HILLER, G. ; GRIFFITHS, G.: Assembly of vaccinia virus: the second wrapping cisterna is derived from the trans Golgi network. In: *J Virol.* 68 (1994), Nr. 1, S. 130–147
- [115] RISCO, C. ; RODRIGUEZ, JR. ; LOPEZ-IGLESIAS, C. ; CARRASCOSA, JL. ; ESTEBAN, M. ; RODRIGUEZ, D.: Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment Membranes and Vimentin Filaments Participate in Vaccinia Virus Assembly. In: *J Virol* 76 (2002), Nr. 4, S. 1839–1855
- [116] TOOZE, J. ; HOLLINSHEAD, M. ; REIS, B. ; RADSAK, K. ; KERN, H.: Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. In: *Eur J Cell Biol.* 60 (1993), S. 163–78
- [117] HOLLINSHEAD, M. ; VANDERPLASSCHEN, A. ; SMITH, GL. ; VAUX, DJ.: Vaccinia Virus Intracellular Mature Virions Contain only One Lipid Membrane. In: *J Virol.* 73 (1999), Nr. 2, S. 1503–1517
- [118] DALES, S. ; MOSBACH, EH.: Vaccinia as a model for membrane biogenesis. In: *Virology* 35 (1968), Nr. 4, S. 564 – 583. – ISSN 0042–6822
- [119] SODEIK, B. ; DOMS, RW. ; ERICSSON, M. ; HILLER, G. ; MACHAMER, CE. ; HOF, W. van ' . ; MEER, G. van ; MOSS, B. ; GRIFFITHS, G.: Assembly of vaccinia virus: role of the intermediate compartment between the endoplasmic reticulum and the Golgi stacks. In: *J Cell Biol* 121 (1993), Nr. 3, S. 521–541
- [120] GRIFFITHS, G. ; ROOS, N. ; SCHLEICH, S. ; LOCKER, JK.: Structure and Assembly of Intracellular Mature Vaccinia Virus: Thin-Section Analyses. In: *J Virol.* 75 (2001), Nr. 22, S. 11056–11070
- [121] GRIFFITHS, G. ; WEPF, R. ; WENDT, T. ; LOCKER, JK. ; CYRKLAFF, M. ; ROOS, N.: Structure and Assembly of Intracellular Mature Vaccinia Virus: Isolated-Particle Analysis. In: *J Virol.* 75 (2001), Nr. 22, S. 11034–11055
- [122] GARON, CF. ; MOSS, B.: Glycoprotein synthesis in cells infected with vaccinia virus : II. A glycoprotein component of the virion. In: *Virology* 46 (1971), November, Nr. 2, S. 233–246. – ISSN 0042–6822
- [123] PAYNE, L.: Polypeptide composition of extracellular enveloped vaccinia virus. In: *J Virol.* 27 (1978), Nr. 1, S. 28–37
- [124] KRAUSS, O. ; HOLLINSHEAD, R. ; HOLLINSHEAD, M. ; SMITH, GL.: An investigation of incorporation of cellular antigens into vaccinia virus particles. In: *J Gen Virol* 83 (2002), Nr. 10, S. 2347–2359
-

- [125] LIEDTKE, S. ; GEYER, R. ; GEYER, H.: Host-cell-specific glycosylation of HIV-2 envelope glycoprotein. In: *Glycoconj J.* 14 (1997), S. 785–93
- [126] GEYER, H. ; WILL, C. ; FELDMANN, H. ; KLENK, HD. ; GEYER, R.: Carbohydrate structure of Marburg virus glycoprotein. In: *Glycobiology* 2 (1992), Nr. 4, S. 299–312
- [127] TATENO, H. ; NAKAMURA-TSURUTA, S. ; HIRABAYASHI, J.: Comparative analysis of core-fucose-binding lectins from *Lens culinaris* and *Pisum sativum* using frontal affinity chromatography. In: *Glycobiology* 19 (2009), Mai, Nr. 5, S. 527–536
- [128] BISHOP, JR. ; GAGNEUX, P.: Evolution of carbohydrate antigens–microbial forces shaping host glycomes? In: *Glycobiology* 17 (2007), Nr. 5, S. 23–34
- [129] ROUTIER, FH. ; DAVIES, MJ. ; BERGEMANN, K. ; HOUNSELL, EF: The glycosylation pattern of humanized IgG1 antibody (D1.3) expressed in CHO cells. In: *Glycoconj J.* 14 (1997), S. 201–7
- [130] NOVAK, J. ; TOMANA, M. ; KILIAN, M. ; COWARD, L. ; KULHAVY, R. ; BARNES, S. ; MESTECKY, J.: Heterogeneity of O-glycosylation in the hinge region of human IgA1. In: *Mol Immunol* 37 (2000), Nr. 17, S. 1047–1056. – ISSN 0161–5890
- [131] TAKEGAWA, Y. ; DEGUCHI, K. ; NAKAGAWA, H. ; NISHIMURA, SI.: Structural Analysis of an N-Glycan with "β1-4 Bisecting Branch" from Human Serum IgG by Negative-Ion MSn Spectral Matching and Exoglycosidase Digestion. In: *Anal Chem.* 77 (2005), September, Nr. 18, S. 6062–6068. – ISSN 0003–2700
- [132] KING, JD. ; POON, KKH. ; WEBB, NA. ; ANDERSON, EM. ; MCNALLY, DJ. ; BRISSON, JR. ; MESSNER, P. ; GARAVITO, RM. ; LAM, JS.: The structural basis for catalytic function of GMD and RMD, two closely related enzymes from the GDP-d-rhamnose biosynthesis pathway. In: *FEBS Journal* [132], S. 2686–2700
- [133] KNEIDINGER, B. ; GRANINGER, M. ; ADAM, G. ; PUCHBERGER, M. ; KOSMA, P. ; ZAYNI, S. ; MESSNER, P.: Identification of Two GDP-6-deoxy-d-lyxo-4-hexulose Reductases Synthesizing GDP-d-rhamnose in *Aneurinibacillus thermoaerophilus* L420-91T. In: *J Biol Chem.* [133], S. 5577–5583
- [134] UNTCH, M. ; JACKISCH, C. ; THOMSEN, C. ; NITZ, U. ; MINCKWITZ, G ; KAUFMANN, M. von: Adjuvante Therapie mit Trastuzumab bei Mammakarzinompatientinnen. In: *Dtsch Arztebl* 103 (2006), S. A–3406 / B–2961 / C–2841
- [135] HORTON, D.: *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 59. ACADEMIC PRESS, 2004. – 274 S.
-

- [136] SCALLON, B. ; MCCARTHY, S. ; RADEWONUK, J. ; CAI, A. ; NASO, M. ; RAJU, TS. ; CAPOCASALE, R.: Quantitative in vivo comparisons of the Fc $\gamma$ receptor-dependent agonist activities of different fucosylation variants of an immunoglobulin G antibody. In: *Int Immunopharmacol.* 7 (2007), Nr. 6, S. 761 – 772. – ISSN 1567–5769
- [137] JORDAN, I. ; NORTHOFF, S. ; THIELE, M. ; HARTMANN, S. ; HORN, D. ; HÖWING, K. ; BERNHARDT, H. ; OEHMKE, S. ; HORSTEN, H. von ; REBESKI, D. ; HINRICHSSEN, L. ; ZELNIK, V. ; MUELLER, W. ; SANDIG, V.: A chemically defined production process for highly attenuated poxviruses. In: *Biologicals* 39 (2011), Januar, S. 50–58. – ISSN 1045–1056
- [138] COX, R.J. ; BROKSTAD, KA. ; OGRA, P.: Influenza Virus: Immunity and Vaccination Strategies. Comparison of the Immune Response to Inactivated and Live, Attenuated Influenza Vaccines. In: *Scand J Immunol.* 59 (2004), Nr. 1, S. 1–15. – ISSN 1365–3083
- [139] AGUILAR, HC. ; LEE, B.: Emerging paramyxoviruses: molecular mechanisms and antiviral strategies. In: *Expert Rev Mol Med* 13 (2011), S. null–null
- [140] LECH, P.J. ; RUSSELL, S.J.: Use of attenuated paramyxoviruses for cancer therapy. In: *Expert Review of Vaccines* 9 (2010), Nr. 11, S. 1275–1302
- [141] MOSS, B. ; ROSENBLUM, EN. ; GARON, CF.: Glycoprotein synthesis in cells infected with vaccinia virus III. Purification and biosynthesis of the virion glycoprotein. In: *Virology* 55 (1973), September, Nr. 1, S. 143–156. – ISSN 0042–6822
- [142] SMITH, GL. ; VANDERPLASSCHEN, A. ; LAW, M.: The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. In: *J Gen Virol* 83 (2002), Nr. 12, S. 2915–2931
- [143] GARCIA, AD. ; MESEDA, CA. ; MAYER, AE. ; KUMAR, A. ; MERCHLINSKY, M. ; WEIR, JP.: Characterization and Use of Mammalian-Expressed Vaccinia Virus Extracellular Membrane Proteins for Quantification of the Humoral Immune Response to Smallpox Vaccines. In: *Clin. Vaccine Immunol* 14 (2007), Nr. 8, S. 1032–1044
- [144] MEISER, A. ; BOULANGER, D. ; SUTTER, G. ; KRIJNSE LOCKER, J.: Comparison of virus production in chicken embryo fibroblasts infected with the WR, IHD-J and MVA strains of vaccinia virus: IHD-J is most efficient in trans-Golgi network wrapping and extracellular enveloped virus release. In: *J Gen Virol* 84 (2003), Nr. 6, S. 1383–1392
- [145] OKEKE, MI. ; NILSSEN, O. ; TRAAVIK, T.: Modified vaccinia virus Ankara multiplies in rat IEC-6 cells and limited production of mature virions occurs in other mammalian cell lines. In: *J Gen Virol* 87 (2006), Nr. 1, S. 21–27
-

- [146] SPEHNER, D. ; DRILLIEN, R. ; PROAMER, F. ; HOUSSAIS-PÊCHEUR, C. ; ZANTA, MA. ; GEIST, M. ; DOTT, K. ; BALLOUL, JM.: Enveloped Virus Is the Major Virus Form Produced during Productive Infection with the Modified Vaccinia Virus Ankara Strain. In: *Virology* 273 (2000), Nr. 1, S. 9 – 15. – ISSN 0042–6822
- [147] GOMEZ, CE. ; RODRIGUEZ, D. ; RODRIGUEZ, JR. ; ABAITUA, F. ; DUARTE, C. ; ESTEBAN, M.: Enhanced CD8+ T cell immune response against a V3 loop multi-epitope polypeptide (TAB13) of HIV-1 Env after priming with purified fusion protein and booster with modified vaccinia virus Ankara (MVA-TAB) recombinant: a comparison of humoral and cellular immune responses with the vaccinia virus Western Reserve (WR) vector. In: *Vaccine* 20 (2001), Nr. 5-6, S. 961 – 971. – ISSN 0264–410X
- [148] BORREGO, B. ; LORENZO, MM. ; BLASCO, R.: Complementation of P37 (F13L gene) knock-out in vaccinia virus by a cell line expressing the gene constitutively. In: *J Gen Virol* 80 (1999), Nr. 2, S. 425–432
- [149] HESSELL, AJ. ; RAKASZ, EG. ; POIGNARD, P. ; HANGARTNER, L. ; LANDUCCI, G. ; FORTHAL, DN. ; KOFF, WC. ; WATKINS, DI. ; BURTON, DR.: Broadly Neutralizing Human Anti-HIV Antibody 2G12 Is Effective in Protection against Mucosal SHIV Challenge Even at Low Serum Neutralizing Titers. In: *PLoS Pathog* 5 (2009), Mai, Nr. 5
- [150] PEUMANS, WJ. ; PROOST, P. ; SWENNEN, RL. ; VAN DAMME, EJM.: The Abundant Class III Chitinase Homolog in Young Developing Banana Fruits Behaves as a Transient Vegetative Storage Protein and Most Probably Serves as an Important Supply of Amino Acids for the Synthesis of Ripening-Associated Proteins. In: *Plant Physiol.* 130 (2002), Nr. 2, S. 1063–1072
- [151] SWANSON, MD. ; WINTER, HC. ; GOLDSTEIN, IJ. ; MARKOVITZ, David M.: A Lectin Isolated from Bananas Is a Potent Inhibitor of HIV Replication. In: *J Biol Chem.* 285 (2010), März, Nr. 12, S. 8646–8655
- [152] MARRIS, Emma: Dramatic rescue relieves rare case of smallpox infection. In: *Nat Med* 13 (2007), Mai, Nr. 5, S. 517–517. – ISSN 1078–8956
- [153] CHOU, Hsun-Hua ; HAYAKAWA, Toshiyuki ; DIAZ, Sandra ; KRINGS, Matthias ; INDRIATI, ETTY ; LEAKEY, Meave ; PAABO, Svante ; SATTA, Yoko ; TAKAHATA, Naoyuki ; VARKI, Ajit: Inactivation of CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase occurred prior to brain expansion during human evolution. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002), Nr. 18, S. 11736–11741
-

- [154] ANTHONY, RM. ; NIMMERJAHN, F. ; ASHLINE, DJ. ; REINHOLD, VN. ; PAULSON, JC. ; RAVETCH, JV.: Recapitulation of IVIG Anti-Inflammatory Activity with a Recombinant IgG Fc. In: *Science* 320 (2008), Nr. 5874, S. 373–376
- [155] ANTHONY, RM. ; WERMELING, F. ; KARLSSON, MCI. ; RAVETCH, JV.: Identification of a receptor required for the anti-inflammatory activity of IVIG. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105 (2008), Nr. 50, S. 19571–19578
- [156] STRUPPE, E. ; STAUDACHER, E.: Occurrence of GDP-fucose: [beta]-N-acetylglucosamine (Fuc to Asn-linked GlcNAc) [alpha]1,6-fucosyltransferases in porcine, sheep, bovine, rabbit and chicken tissues. In: *Biochim Biophys Acta* 1475 (2000), Juli, Nr. 3, S. 360–368. – ISSN 0304–4165
- [157] WERNER, RG. ; KOPP, K. ; SCHLUETER, M.: Glycosylation of therapeutic proteins in different production systems. In: *Acta Paediatr.* 96 (2007), S. 17–22. – ISSN 1651–2227
- [158] MIZUOCHI, T. ; TANIGUCHI, T. ; SHIMIZU, A. ; KOBATA, A.: Structural and numerical variations of the carbohydrate moiety of immunoglobulin G. In: *J Immunol* 129 (1982), Nr. 5, S. 2016–2020
- [159] HARD, K. ; MEKKING, A. ; DAMM, JBL. ; KAMERLING, JP. ; DE BOER, W. ; WIJNANDS, RA. ; VLIAGENTHART, JFG.: Isolation and structure determination of the intact sialylated N-linked carbohydrate chains of recombinant human follitropin expressed in Chinese hamster ovary cells. In: *Eur J Biochemistry*. 193 (1990), Nr. 1, S. 263–271. – ISSN 1432–1033
- [160] LIFELY, MR. ; HALE, C. ; BOYCE, S. ; KEEN, MJ. ; PHILLIPS, J.: Glycosylation and biological activity of CAMPATH-1H expressed in different cell lines and grown under different culture conditions. In: *Glycobiology* 5 (1995), Nr. 8, S. 813–822
- [161] KOBATA, A.: *A journey to the world of glycobiology*. Biomedical and Life Sciences, 2000
- [162] OHTA, M. ; HAMAKO, J. ; YAMAMOTO, S. ; HATTA, H. ; KIM, M. ; YAMAMOTO, T. ; OKA, S. ; MIZUOCHI, T. ; MATSUURA, F.: Structures of asparagine-linked oligosaccharides from hen egg-yolk antibody (IgY). Occurrence of unusual glucosylated oligo-mannose type oligosaccharides in a mature glycoprotein. In: *Glycoconj J* 8 (1991), S. 400–13
- [163] KANDA, Y. ; YAMADA, T. ; MORI, K. ; OKAZAKI, A. ; INOUE, M. ; KITAJIMA-MIYAMA, K. ; KUNI-KAMOCHI, R. ; NAKANO, R. ; YANO, K. ; KAKITA, S. ; SHITARA,
-



- K. ; SATOH, M.: Comparison of biological activity among nonfucosylated therapeutic IgG1 antibodies with three different N-linked Fc oligosaccharides: the high-mannose, hybrid, and complex types. In: *Glycobiology* [89], S. 104–118. – ISSN 0168–1656
- [164] SOMOZA, JR. ; MENON, S. ; SCHMIDT, H. ; JOSEPH-MCCARTHY, D. ; DESSEN, A. ; STAHL, ML. ; SOMERS, WS. ; SULLIVAN, FX.: Structural and kinetic analysis of *Escherichia coli* GDP-mannose 4,6 dehydratase provides insights into the enzyme's catalytic mechanism and regulation by GDP-fucose. In: *Elsevier Science Ltd* 8 (2000), S. 123–135
- [165] BISSO, A. ; STURLA, L. ; ZANARDI, D. ; DE FLORA, A. ; TONETTI, M.: Structural and enzymatic characterization of human recombinant GDP-mannose-4,6-dehydratase. In: *FEBS Letters* [165], S. 370 – 374. – ISSN 0014–5793
- [166] WEBB, NA. ; MULICHAK, AM. ; LAM, JS. ; ROCCHETTA, HL. ; GARAVITO, RM.: Crystal structure of a tetrameric GDP-mannose 4,6-dehydratase from a bacterial GDP-rhamnose biosynthetic pathway. In: *Protein Science* [166], S. 529–539
- [167] LINDESMITH, L. ; MOE, C. ; MARIONNEAU, S. ; RUVOEN, N. ; JIANG, X. ; LINDBLAD, L. ; STEWART, P. ; LEPENDU, J. ; BARIC, R.: Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. In: *Nat Med* 9 (2003), Mai, Nr. 5, S. 548–553. – ISSN 1078–8956
- [168] BASAK, S. ; TOMANA, M. ; COMPANS, RW.: Sialic acid is incorporated into influenza hemagglutinin glycoproteins in the absence of viral neuraminidase. In: *Virus Res* 2 (1985), Februar, Nr. 1, S. 61–68. – ISSN 0168–1702
- [169] LIEDTKE, S. ; ADAMSKI, M. ; GEYER, R. ; PFÜTZNER, A. ; RÜBSAMEN-WAIGMANN, H. ; GEYER, H.: Oligosaccharide profiles of HIV-2 external envelope glycoprotein: dependence on host cells and virus isolates. In: *Glycobiology* 4 (1994), Nr. 4, S. 477–484
- [170] SCHWARZER, J. ; RAPP, E. ; HENNIG, R. ; GENZEL, Y. ; JORDAN, I. ; SANDIG, V. ; REICHL, U.: Glycan analysis in cell culture-based influenza vaccine production: Influence of host cell line and virus strain on the glycosylation pattern of viral hemagglutinin. In: *Vaccine* 27 (2009), Juli, Nr. 32, S. 4325–4336. – ISSN 0264–410X
- [171] GAWLITZEK, M. ; VALLEY, U. ; WAGNER, R.: Ammonium ion and glucosamine dependent increases of oligosaccharide complexity in recombinant glycoproteins secreted from cultivated BHK-21 cells. In: *Biotechnol Bioeng.* 57 (1998), Nr. 5, S. 518–528. – ISSN 1097–0290
-

- [172] DWARAKANATH, AD. ; TSAI, HH. ; SUNDERLAND, D. ; HART, CA. ; FIGURA, N. ; CRABTREE, JE. ; RHODES, Jonathan M.: The production of neuraminidase and fucosidase by *Helicobacter pylori*: Their possible relationship to pathogenicity. In: *FEMS Immunol Med Microbiol.* 12 (1995), Nr. 3-4, S. 213–216. – ISSN 1574–695X
- [173] MIZUOCHI, T. ; MATTHEWS, TJ. ; KATO, M. ; HAMAKO, J. ; TITANI, K. ; SOLOMON, J. ; FEIZI, T.: Diversity of oligosaccharide structures on the envelope glycoprotein gp 120 of human immunodeficiency virus 1 from the lymphoblastoid cell line H9. Presence of complex-type oligosaccharides with bisecting N-acetylglucosamine residues. In: *J Biol Chem.* 265 (1990), Nr. 15, S. 8519–8524
- [174] GEYER, H. ; HOLSCHBACH, C. ; HUNSMANN, G. ; SCHNEIDER, J.: Carbohydrates of human immunodeficiency virus. Structures of oligosaccharides linked to the envelope glycoprotein 120. In: *J Biol Chem.* 263 (1988), Nr. 24, S. 11760–11767
- [175] LYERLY, HK. ; REED, DL. ; MATTHEWS, TJ. ; LANGLOIS, AJ. ; AHEARNE, PA. ; PETTEWAY, SR. ; WEINHOLD, KJ.: Anti-GP 120 Antibodies from HIV Seropositive Individuals Mediate Broadly Reactive Anti-HIV ADCC. In: *AIDS Res Hum Retroviruses* 3 (1987), Nr. 4, S. 409–422
- [176] NALCA, A. ; ZUMBRUN, EE.: ACAM2000: The new smallpox vaccine for United States Strategic National Stockpile. In: *Drug Discovery Today* 4 (2010), S. 71–79
- [177] MAGEE, Wendy C. ; ALDERN, Kathy A. ; HOSTETLER, Karl Y. ; EVANS, David H.: Cidofovir and (S)-9-[3-Hydroxy-(2-Phosphonomethoxy)Propyl]Adenine Are Highly Effective Inhibitors of Vaccinia Virus DNA Polymerase When Incorporated into the Template Strand. In: *Antimicrob Agents Chemother.* 52 (2008), Nr. 2, S. 586–597
- [178] WAGSTAFF, AJ. ; FAULDS, D. ; GOA, KL.: Aciclovir. A reappraisal of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. In: *Drugs* 47 (1994), S. 153–205
- [179] CERONI, A. ; MAASS, K. ; GEYER, H. ; GEYER, R. ; DELL, A. ; HASLAM, SM.: GlycoWorkbench: A Tool for the Computer-Assisted Annotation of Mass Spectra of Glycans . In: *J Proteome Res.* 7 (2008), April, Nr. 4, S. 1650–1659. – ISSN 1535–3893
- [180] MAASS, K. ; RANZINGER, R. ; GEYER, H. ; LIETH, CW. von d. ; GEYER, R.: Glycopeakfinder–de novo composition analysis of glycoconjugates. In: *Proteomics* 7 (2007), Nr. 24, S. 4435–4444. – ISSN 1615–9861
-

- [181] LIVAK, KJ. ; SCHMITTGEN, TD.: Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. In: *Methods* 25 (2001), Dezember, Nr. 4, S. 402–408. – ISSN 1046–2023
- [182] UK, Laemmli: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 15 (1970), S. 680–5
- [183] ANDERSSON, P. ; JESSON, G. ; KYLBERG, G. ; EKSTRAND, G. ; THORSÉN, G.: Parallel Nanoliter Microfluidic Analysis System. In: *Anal Chem.* 79 (2007), Juni, Nr. 11, S. 4022–4030. – ISSN 0003–2700
- [184] LASFARGUES, EY. ; COUTINHO, WG. ; REDFIELD, ES.: Isolation of two human tumor epithelial cell lines from solid breast carcinomas. In: *J Natl Cancer Inst* 61 (1978), S. 967–78
- [185] ZABRECKY, JR. ; LAM, T. ; MCKENZIE, SJ. ; CARNEY, W.: The extracellular domain of p185/neu is released from the surface of human breast carcinoma cells, SK-BR-3. In: *J Biol Chem.* [185], S. 1716–1720
- [186] NIWA, R. ; HATANAKA, S. ; SHOJI-HOSAKA, E. ; SAKURADA, M. ; KOBAYASHI, Y. ; UEHARA, A. ; YOKOI, H. ; NAKAMURA, K. ; SHITARA, K.: Enhancement of the Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity of Low-Fucose IgG1 Is Independent of Fc $\gamma$ -RIIIa Functional Polymorphism. In: *Clin Cancer Res.* [186], S. 6248–6255
- [187] MUSSAR, KJ. ; MURRAY, GJ. ; MARTIN, BM. ; VISWANATHA, T.: Peptide: N-glycosidase F: studies on the glycoprotein aminoglycan amidase from *Flavobacterium meningosepticum*. In: *J Biochem Biophys Methods.* [187], S. 53 – 68. – ISSN 0165–022X
- [188] TRETTER, V. ; ALTMANN, F. ; MÄRZ, L.: Peptide-N4-(N-acetyl- $\beta$ -glucosaminy)asparagine amidase F cannot release glycans with fucose attached alpha 1-3 to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue. In: *Eur J Biochemistry.* [188], S. 647–652
- [189] UCHIDA, Y. ; TSUKADA, Y. ; SUGIMORI, T.: Enzymatic Properties of Neuraminidases from *Arthrobacter ureafaciens*. In: *J Biochem* [189], S. 1573–1585
- [190] OHTA, Y. ; TSUKADA, Y. ; SUGIMORI, T.: Purification and Properties of Neuraminidase Isozymes in *Arthrobacter ureafaciens* Mutant. In: *J Biochem* [190], S. 1086–1089
- [191] GLASGOW, LR. ; PAULSON, JC. ; HILL, RL.: Systematic purification of five glycosidases from *Streptococcus (Diplococcus) pneumoniae*. In: *J Biol Chem.* [191], S. 8615–8623
-

- [192] PACKER, NH. ; LAWSON, MA. ; JARDINE, DR. ; REDMOND, JW.: A general approach to desalting oligosaccharides released from glycoproteins. In: *Glycoconj J.* [192], S. 737–747
- [193] F.LOTTSPREICH/H.ZORBAS: *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, 1998
- [194] WUHRER, M. ; DEELDER, AM.: Matrix-assisted laser desorption/ionization in-source decay combined with tandem time-of-flight mass spectrometry of permethylated oligosaccharides: targeted characterization of specific parts of the glycan structure. In: *Rapid Commun Mass Spectrom* [194], S. 943–951
- [195] MORELLE, W. ; SLOMIANNY, MC. ; DIEMER, H. ; SCHAEFFER, C. ; DORSSELAER, A. van ; MICHALSKI, JC.: Structural characterization of 2-aminobenzamide-derivatized oligosaccharides using a matrix-assisted laser desorption/ionization two-stage time-of-flight tandem mass spectrometer. In: *Rapid Commun Mass Spectrom* [195], S. 2075–2084
- [196] WEDEPOHL, S. ; KAUP, M. ; RIESE, SB. ; BERGER, M. ; DERNEDDE, J. ; TAUBER, R. ; BLANCHARD, V.: N-Glycan Analysis of Recombinant L-Selectin Reveals Sulfated GalNAc and GalNAcGalNAc Motifs. In: *J Proteome Res.* 9 (2010), Juli, Nr. 7, S. 3403–3411. – ISSN 1535–3893
- [197] CIUCANU, I.: Per-O-methylation reaction for structural analysis of carbohydrates by mass spectrometry. In: *Analytica Chimica Acta* [197], S. 147 – 155. – ISSN 0003–2670
- [198] HARVEY, DJ.: Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates. In: *Mass Spectrom Rev.* [198], S. 349–450
- [199] CHEN, P. ; BAKER, AG. ; NOVOTNY, MV.: The Use of Osazones as Matrices for the Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Carbohydrates. In: *Anal Biochemistry.* [199], S. 144 – 151. – ISSN 0003–2697
- [200] SR., Jeffrey: Analyzing Sialic Acids Using High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection. In: *Anal Biochemistry.* [200], S. 3 – 9. – ISSN 0003–2697
- [201] ANDERSEN, R. ; SØRENSEN, A.: Separation and determination of alditols and sugars by high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. In: *J Chromatogr A.* 897 (2000), Nr. 1-2, S. 195 – 204. – ISSN 0021–9673
- [202] HARDY, MR. ; TOWNSEND, RR. ; LEE, YC.: Monosaccharide analysis of glycoconjugates by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. In: *Anal Biochemistry.* [202], S. 54 – 62. – ISSN 0003–2697
-

- [203] HERMENTIN, P. ; WITZEL, R. ; DOENGES, R. ; BAUER, R. ; HAUPT, H. ; PATEL, T. ; PAREKH, RB. ; BRAZEL, D.: The mapping by high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection and capillary electrophoresis of the carbohydrate moieties of human plasma  $\alpha$ 1-acid glycoprotein. In: *Anal Biochemistry*. [203], S. 419 – 429. – ISSN 0003–2697
- [204] BOUSFIELD, GR. ; BAKER, VL. ; GOTSCHALL, RR. ; BUTNEV, VY. ; BUTNEV, VY.: Carbohydrate Analysis of Glycoprotein Hormones. In: *Methods* [204], S. 15 – 39. – ISSN 1046–2023
- [205] HARA, S. ; YAMAGUCHI, M. ; TAKEMORI, Y. ; FURUHATA, K. ; OGURA, H. ; NAKAMURA, M.: Determination of mono-O-acetylatedN-acetylneuraminic acids in human and rat sera by fluorometric high-performance liquid chromatography. In: *Anal Biochemistry*. [205], S. 162 – 166. – ISSN 0003–2697
- [206] MANZI, Adriana E. ; DIAZ, Sandra ; VARKI, Ajit: High-pressure liquid chromatography of sialic acids on a pellicular resin anion-exchange column with pulsed amperometric detection: A comparison with six other systems. In: *Anal Biochemistry*. [206], S. 20 – 32. – ISSN 0003–2697
-