

Entwicklung eines biospezifischen Trennverfahrens  
für die Fraktionierung und Aufreinigung von  
Glykokonjugaten

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Chemie  
der Universität Hamburg

von  
Simone Maria Cartellieri  
aus Bremen

Hamburg 2002

Gutachter:

Professor Dr. Dr. H. Steinhart, Universität Hamburg

Professor Dr.-Ing. B. Niemeyer, Universität der Bundeswehr, Hamburg

Tag der Disputation:

18. April 2002

---

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom März 1999 bis zum Februar 2002 im Institut für Küstenforschung/Physikalische und Chemische Analytik des GKSS-Forschungszentrums Geesthacht GmbH angefertigt. Für die vielfältige Unterstützung möchte ich mich insbesondere bei den folgenden Personen bedanken:

Herrn Professor Dr.-Ing. B. Niemeyer für die Vergabe des interessanten Themas, die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit und die vielen anregenden Diskussionen,

Herrn Professor Dr. Dr. H. Steinhart für die Betreuung der Arbeit im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg,

Herrn Professor Dr.-Ing. B. Neidhart für die vielfältige Unterstützung,

Frau Dr. Heike Helmholtz für die gute Zusammenarbeit,

Herrn Dr. Peter Thiesen und Herrn Oliver Braaß (Institut für Thermodynamik, Universität der Bundeswehr, Hamburg) für den regen Austausch und die gute Zusammenarbeit sowie für die Funktionalisierung der Trägermaterialien. Frau Nicole Laude für die Funktionalisierung der Trägermaterialien und die Durchführung der Elementar-Analytik,

Herrn Matthias Rehfeld (Institut für Technische und Makromolekulare Chemie, Universität Hamburg) für die Trägeranalytik mittels Quecksilber-Porosimetrie und Stickstoff-Adsorption sowie für die gute Zusammenarbeit. Herrn Michael Nau (Institut für Technische und Makromolekulare Chemie, Universität Hamburg) für die Überlassung des Polymer-Trägers H20,

Frau Marion Aderhold und Herrn Michael Schossig-Tiedemann (Institut für Chemie, Abteilung Membranentwicklung, GKSS-Forschungszentrum Geesthacht GmbH) für die Aufnahmen am Raster-Elektronenmikroskop,

den Herren Arne Düsedau, Jens-Peter Petritzki und Ole Hamer, die im Rahmen von Diplomarbeiten bei dieser Arbeit mitwirkten,

Herrn Ansgar Robers für Interesse, Geduld und Unterstützung,

meinen Eltern für die stetige Unterstützung.

Allen Kolleginnen und Kollegen im GKSS-Forschungszentrum danke ich für die nette Zusammenarbeit.

## Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azinobis(3-ethylbenzthiazolinsulfonat)
AGP	saures $\alpha_1$ -Glykoprotein
AMP	Adenosin 5'-Monophosphat
ASF	Asialofetuin
AU	Absorptionseinheiten
BET	Brunauer, Emmet und Teller
BSA	Bovines Serum Albumin
Con A	Concanavalin A
DC	Dünnschichtchromatographie
Ext	Extinktion
FAD	Flavin-adenin-dinukleotid
FBS	Fetales Rinderserum
FET	Fetuin
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GOD	Glucose Oxidase
GPtMS	Glycidoxypropyltrimethoxysilan
H20	Polymer G60-H20
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
HPLAC	High-Performance Liquid Affinity Chromatography
HS	Humanes Serum
I005	Silika XWP-Gel I005
Lac	Lactose
MBP	Mannose bindendes Protein
MPtMS	Mercaptopropyltrimethoxysilan

---

Neu	Neuraminsäure
NeuNAc	N-Acetylneuraminsäure
PAGE	Polyacrylamidgel Elektrophorese
P005	Silika XWP-Gel P005
PDB	Protein Data Bank
PNP-Gal	<i>p</i> -Nitrophenyl $\beta$ -D-Galactose
PNP-Glc	<i>p</i> -Nitrophenyl $\alpha$ -D-Glucose
PNP-Lac	<i>p</i> -Nitrophenyl $\beta$ -D-Lactose
PNP-Man	<i>p</i> -Nitrophenyl $\alpha$ -D-Mannose
POD	Peroxidase
RCA	<i>Ricinus communis</i> Agglutinin
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SLAC	Serial Lectin Affinity Chromatography
Thr	Threonin
Toyopearl	Toyopearl AF-Tresyl-650 M
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSKgel	TSKgel Tresyl-5PW
UV	Ultraviolett
WGA	Wheat Germ Agglutinin

## Symbolverzeichnis

$A_E$	Enzymaktivität [U/L]
$A$	Ausnutzung der Lektin-Bindungsstellen [%]
$A_m$	maximale Kontaktfläche eines Lektinmoleküls [ $\text{nm}^2$ ]
$A_r$	Flächenbedarf von 1 mg Lektin [ $\text{m}^2/\text{mg}$ ]
$A_t$	spezifische Oberfläche des Trägers [ $\text{m}^2/\text{g}$ ]
BSG	Bestimmungsgrenze [ $\mu\text{g}$ ]
$c$	Gleichgewichtskonzentration in der flüssigen Phase [ $\text{mg}/\text{mL}$ ]
$C$	Kapazität [ $\text{mg Adsorptiv}/\text{mL Adsorbens}$ ]
$D$	Dicke der Küvette [mm]
$E$	Extinktion
$\varepsilon$	Extinktionskoeffizient [ $\text{L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ ]
$K_a$	Assoziationskonstante [ $\text{L}/\text{mol}$ ]
$K_d$	Dissoziationskonstante [ $\text{mol}/\text{L}$ ]
$\lambda$	Wellenlänge [nm]
$m$	Molmasse des Lektins [ $\text{g}/\text{mol}$ ]
$m_0$	Menge Lektin aufgegeben [mg]
$m_d$	spezifisch eluierte Proteinmenge [mg]
$m_i$	Menge Lektin immobilisiert [mg]
$m_s$	Menge Lektin im Überstand [mg]
$m_t$	Masse Träger [g]
MW	arithmetischer Mittelwert
$n$	Anzahl
$N_A$	Avogadrozahl = $6,022 \cdot 10^{23}$ [ $\text{mol}^{-1}$ ]
$N_{\text{Adsorptiv}}$	Stoffmenge Adsorptiv gebunden [mol]
$N_i$	Stoffmenge Bindungsstellen des immobilisierten Liganden [mol]
NWG	Nachweisgrenze [ $\mu\text{g}$ ]
$O$	Oberflächenbelegung [%]

---

q	adsorbierte Menge [mg/g]
q <sub>max</sub>	maximale adsorbierte Menge [mg/g]
R	Korrelationskoeffizient (Pearson)
r <sub>ji</sub>	Selektivität, relative Retentionszeit
s	Standardabweichung der Stichprobe
S	Empfindlichkeit, Steigung der Kalibrierfunktion [Ext/μg]
s <sub>rel</sub>	Relative Standardabweichung (Variationskoeffizient) [%]
t	Zeit [min]
t <sub>Ri</sub>	Retentionszeit der Substanz i [min]
t <sub>m</sub>	Totzeit der mobilen Phase [min]
v/v	Volumenverhältnis [mL/mL]
V <sub>ad</sub>	eingesetztes Festbettvolumen [mL]
V <sub>ges</sub>	Volumen in der Küvette [mL]
V <sub>P</sub>	Volumen der Probe [mL]
WF	Wiederfindung [%]
X	Farbstoff
XH <sub>2</sub>	Leukofarbstoff
y	Ausbeute (yield) [%]

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>GRUNDLAGEN .....</b>	<b>4</b>
2.1	AFFINITÄTSTRENNUNG .....	4
2.1.1	<i>Prinzip</i> .....	4
2.1.2	<i>Methoden</i> .....	5
2.2	LEKTINE.....	9
2.2.1	<i>Geschichte und Definition</i> .....	9
2.2.2	<i>Eigenschaften, Vorkommen und biologische Funktionen</i> .....	9
2.2.3	<i>Verwendung</i> .....	12
<b>3</b>	<b>AUSWAHL DER BIOCHEMISCHEN SYSTEME.....</b>	<b>13</b>
3.1	LEKTIN-LIGANDEN .....	13
3.1.1	<i>Concanavalin A</i> .....	13
3.1.2	<i>Ricinus communis Agglutinin</i> .....	15
3.1.3	<i>Wheat Germ Agglutinin</i> .....	15
3.2	GLYKOKONJUGATE.....	17
3.2.1	<i>Definition und Einteilung</i> .....	17
3.2.2	<i>Glykoproteine</i> .....	17
3.2.3	<i>Glykolipide</i> .....	21
3.2.4	<i>Saccharide</i> .....	22
3.3	NATÜRLICHE VIELSTOFFGEMISCHE .....	23
<b>4</b>	<b>TRÄGERSYSTEME .....</b>	<b>24</b>
4.1	TRÄGERMATERIALIEN FÜR DIE PROTEINREINIGUNG .....	24
4.2	VERWENDETE TRÄGERSYSTEME.....	25
4.2.1	<i>Trägermaterialien auf Basis von Silika</i> .....	25
4.2.2	<i>Trägermaterialien auf Basis synthetischer Polymere</i> .....	26
4.2.3	<i>Trägermaterialien auf Basis von Agarose</i> .....	28
4.3	FUNKTIONALISIERUNG .....	29
<b>5</b>	<b>ANALYTIK.....</b>	<b>32</b>
5.1	QUANTITATIVE PROTEINANALYTIK .....	32
5.1.1	<i>Prinzip</i> .....	32
5.1.2	<i>Durchführung</i> .....	32
5.1.3	<i>Validierung</i> .....	33
5.2	QUANTIFIZIERUNG DER IMMOBILISIERUNG .....	35
5.2.1	<i>Bestimmung der Immobilisierungsausbeute</i> .....	35

---

5.2.2	<i>Verifizierung der Überstandsanalytik</i> .....	35
5.2.3	<i>Waschbeständigkeit</i> .....	36
5.3	ENZYMAKTIVITÄT VON PEROXIDASE .....	37
5.4	GEL-ELEKTROPHORESE .....	38
5.5	GLYKOLIPIDANALYTIK .....	39
<b>6</b>	<b>IMMOBILISIERUNG</b> .....	<b>40</b>
6.1	ARBEITSVORSCHRIFTEN .....	40
6.2	KINETIK DER IMMOBILISIERUNG .....	42
6.3	EINFLUSSNEHMENDE PARAMETER .....	44
6.3.1	<i>Angebot und Oberflächenbelegung</i> .....	44
6.3.2	<i>Pufferkapazität und pH-Wert</i> .....	48
6.3.3	<i>Weitere Parameter</i> .....	49
6.4	ÜBERSICHT DER HERGESTELLTEN ADSORBENTIEN .....	50
<b>7</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG DER LEKTIN-ADSORBENTIEN</b> .....	<b>52</b>
7.1	DISKONTINUIERLICHE AFFINITÄTSTRENNUNG .....	52
7.1.1	<i>Adsorptionskinetik</i> .....	52
7.1.2	<i>Adsorptionsisothermen im Gleichgewicht</i> .....	53
7.2	KONTINUIERLICHE AFFINITÄTSTRENNUNG .....	59
7.2.1	<i>Durchführung</i> .....	59
7.2.2	<i>Affinitätstrennung ausgewählter Glykoproteine</i> .....	60
7.2.3	<i>Evaluierung geeigneter Trennbedingungen</i> .....	63
7.2.4	<i>Fraktionierung der Modelladsorptive im Trägervergleich</i> .....	68
7.2.5	<i>Kapazität und Ausnutzung</i> .....	69
7.2.6	<i>Langzeitstabilität</i> .....	72
7.2.7	<i>Strukturspezifische Trennung von Mono- und Disacchariden</i> .....	74
<b>8</b>	<b>AFFINITÄTSTRENNUNG VON GLYKOKONJUGATEN</b> .....	<b>77</b>
8.1	EINZELSTOFFSYSTEME .....	77
8.1.1	<i>Affinitätstrennung von Glykoproteinen</i> .....	77
8.1.2	<i>Aufreinigung von Peroxidase an Con A Adsorbentien</i> .....	80
8.2	DEFINIERTER STOFFMISCHUNGEN .....	83
8.3	NATÜRLICHE VIELSTOFFMISCHUNGEN .....	84
8.3.1	<i>Aufreinigung von Fetuin aus fetalem Rinderserum</i> .....	85
8.3.2	<i>Affinitätstrennung eines Glykolipid-Extraktes</i> .....	88
<b>9</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>92</b>
9.1	HERSTELLUNG VON LEKTIN-ADSORBENTIEN .....	92
9.1.1	<i>Immobilisierung der Lektine</i> .....	92
9.1.2	<i>Materialkosten der Herstellung von Lektin-Adsorbentien</i> .....	94
9.2	KAPAZITÄT UND LANGZEITSTABILITÄT DER ADSORBENTIEN .....	96
9.3	FRAKTIONIERUNG VON GLYKOPROTEINEN .....	97

9.4	TRÄGERMATERIALIEN IM VERGLEICH.....	99
9.5	AUFREINIGUNG VON FETUIN AUS SERUM.....	101
9.6	LEKTIN-AFFINITÄTSTRENNUNG VON GLYKOLIPIDEN.....	102
<b>10</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY .....</b>	<b>104</b>
<b>11</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>106</b>
<b>12</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>116</b>
12.1	STRUKTURFORMELN .....	116
12.2	CHEMIKALIEN .....	117
12.3	GERÄTE .....	120
12.4	KENNDATEN DER VALIDIERTEN PROTEINANALYTIK .....	122
12.4.1	<i>Arbeitsvorschrift</i> .....	122
12.4.2	<i>Analytische Kenndaten</i> .....	123
12.5	TRÄGERMATERIALIEN.....	127
12.5.1	<i>Umrechnungstabelle Masse/Volumen</i> .....	127
12.5.2	<i>Funktionalisierung</i> .....	127
12.6	DIAGRAMME .....	132
12.7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	135

# 1 Einleitung und Zielsetzung

Glykokonjugate, wie Glykoproteine und Glykolipide, gehören zu den wichtigsten Biomolekülen der Zelle, die in vielen physiologischen Prozessen eine entscheidende Rolle spielen. Sie haben unter anderem Funktionen in der Immunabwehr, Zelldifferenzierung, Katalyse sowie allgemein bei Zell-Zell-Interaktionen. Die Einteilung in das ABO-Blutgruppensystem basiert auf zwei antigenen Glykostrukturen, die in der Erythrozytenmembran verankert sind. Die Adhäsion von Mikroorganismen an die Oberfläche von Wirtszellen ist ein Ereignis, welches den Prozeß der Infektion auslöst. Die beteiligten Rezeptoren basieren dabei häufig auf Oligosaccharidstrukturen. Die Bindung des Choleratoxins an das als Rezeptor wirkende Gangliosid GM<sub>1</sub> erfolgt mit hoher Affinität und Spezifität. Das Grippevirus *Influenza* verfügt über ein kohlenhydratbindendes Oberflächenprotein, mit dessen Hilfe es an Oligosaccharide der Wirtszelle andocken kann. Des Weiteren spielen spezifische Saccharid-Protein-Wechselwirkungen bei Entzündungsvorgängen eine Rolle, um nur einige Beispiele zu nennen (Lindhorst, 2000; Kopitz, 1997; Sharon und Lis, 1997). Die Erkennung der in den Oligosaccharidstrukturen der Glykokonjugate verschlüsselten Informationen erfolgt dabei durch die Ausbildung von Komplexen mit spezifischen Liganden. Die beteiligten kohlenhydratbindenden Proteine sind unter anderem Lektine, die jeweils auf die Bindung einer bestimmten Oligosaccharidstruktur spezialisiert sind (Williams und Davies, 2001; Gabius, 1995). Der schematische Aufbau einer eukaryontischen Zellmembran ist in Abb. 1-1 dargestellt.

Glykokonjugate entstehen im Organismus durch die kovalente Verknüpfung von Oligo- oder Polysacchariden mit Proteinen beziehungsweise Lipiden. Die kovalent gebundenen Saccharide weisen durch die große Anzahl der Kombinationsmöglichkeiten eine immense Strukturvielfalt auf. Schon kleine strukturelle Veränderungen innerhalb der Saccharidreste der Glykokonjugate führen zu einer veränderten Wechselwirkung mit anderen Molekülen, die mitunter zu schweren Erkrankungen führen kann. In krankhaft veränderten Zellen können oft charakteristisch veränderte Glykostrukturen im Vergleich zu gesunden Zellen nachgewiesen werden. Das Wissen über Strukturen und Funktionen von Glykokonjugaten kann im Hinblick auf ein Krankheitsbild sowohl diagnostisch als auch therapeutisch von großem Nutzen sein (Lindhorst, 2000; Brockhausen et al., 1998). Die Glykobiologie beschäftigt sich als Spezialgebiet der Biochemie mit den Protein-Kohlenhydrat-Interaktionen. Auf diesem Gebiet konzentrieren sich intensive Aktivitäten der forschenden pharmazeutischen Unternehmen auf die Entwicklung neuer entzündungshemmender Wirkstoffe, neuer Impfstoffe sowie auf Wirkstoffe für die

Krebstherapie (Laine et al., 1997). Allerdings sind zur Zeit erst wenige Pharmazeutika auf der Basis von Glykokonjugaten auf dem Markt (Williams und Davies, 2001).

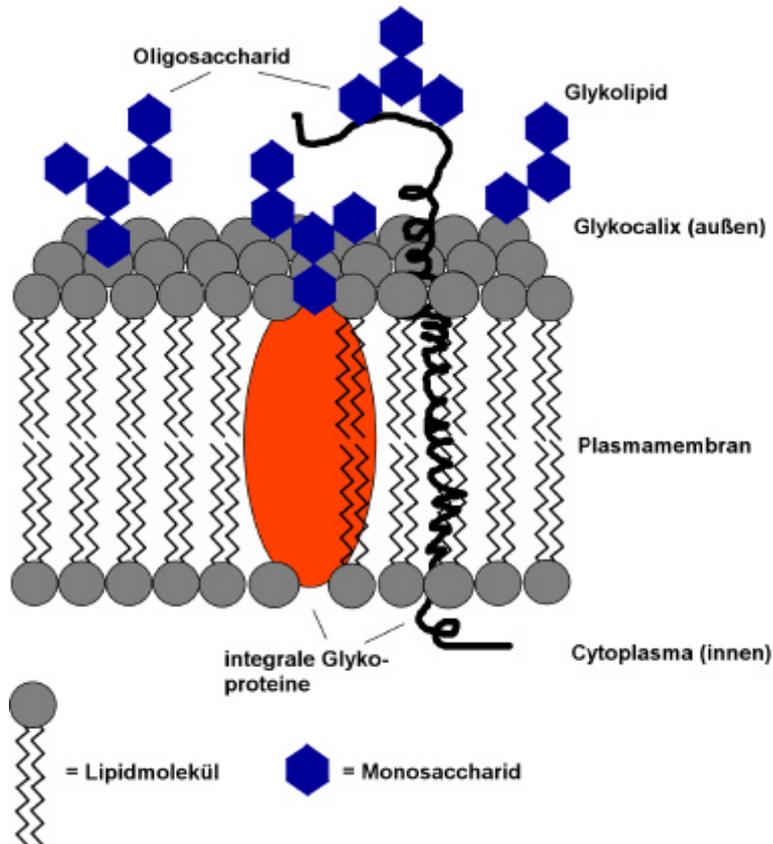


Abb. 1-1: Schematischer Aufbau einer eukaryontischen Zellmembran (nach Lindhorst, 2000)

Für die Arzneimittelentwicklung der modernen Medizin ist eine detaillierte Entschlüsselung der biochemischen Prozesse essentiell. Für eine Aufklärung der zugrundeliegenden Prozesse ist es notwendig, die Glykokonjugate aus dem natürlichen Vielstoffgemisch in möglichst reiner Form und unter Erhalt ihrer Struktur und Wirkung abzutrennen. Für diese Aufgabe sind Trenntechniken wie die Affinitätstrennung geeignet, bei der man sich spezifische Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen zunutze macht. Verfahren der Affinitätstrennung bedienen sich unterschiedlicher biochemischer Bindungsmechanismen, wie derer zwischen Enzym und Substrat, Antigen und Antikörper oder zwischen Lektinen und Glykostrukturen. So kann eine Aufreinigung und Aufkonzentrierung des Zielmoleküls bei gleichzeitiger Konservierung der biologischen Aktivität erzielt werden. Die Affinitätstrennung stellt eine wichtige und unverzichtbare Trenntechnik für die Isolierung und Charakterisierung von biologischen Makromolekülen dar, von der der Fortschritt in Pharmakologie,

Biochemie und Biotechnologie in zunehmendem Maße abhängig ist (Turkova, 1993, Anspach et al., 1989).

Der Einsatz der Affinitätstrennung ist derzeit noch oft auf die biochemische Forschung beschränkt, wo sie der Isolierung der Substanzen im Labormaßstab sowie der Analytik dient. Einer Aufreinigung von biologischen Wertstoffen im Produktionsmaßstab stehen oft hohe Kosten für die Gewinnung der Liganden sowie technologische Schwierigkeiten im Wege. Um diese hochspezifische Trenntechnik auch für die Aufreinigung größerer Mengen von Biomolekülen, wie Glykokonjugaten, attraktiver zu machen, bedarf es noch erheblicher Initiative in der Entwicklung von Adsorbentien, die eine Alternative zur traditionell verwendeten Agarose bieten; außerdem sind die Trennparameter weitreichender zu untersuchen, zu optimieren und an die Anforderungen des Produktionsmaßstabes anzupassen (Turkova, 1993; Zopf und Ohlson, 1990; Narayanan und Crane, 1990; Chase, 1984; Larsson et al., 1983).

Es war die **Zielsetzung** der vorliegenden Arbeit, einen Beitrag zur Lösung der geschilderten Problemstellung zu leisten. Es sollte ein biospezifisches Trennverfahren auf der Basis der Lektin-Affinitätstrennung für die Fraktionierung und Aufreinigung von Glykokonjugaten entwickelt werden. Dabei war es das Ziel, das gesamte Verfahren, von der Auswahl der Lektin-Liganden und der Trägersauswahl über die Immobilisierung der Lektine bis hin zu den Trennparametern, detailliert zu untersuchen, zu optimieren und zu bewerten. Es sollten neue Trägersysteme auf der Basis von Silika und synthetischen Polymeren bearbeitet und mit konventionellen Systemen auf der Basis von Agarose verglichen werden. Weiterhin sollten Lektine mit unterschiedlichen Affinitäten zum Einsatz kommen. Das entwickelte Trennverfahren sollte im weiteren Verlauf der Arbeit für die Fraktionierung und die präparative Aufreinigung von Glykoproteinen eingesetzt werden.

Die **Gliederung** dieser Arbeit spiegelt die systematische Vorgehensweise bei der Entwicklung des biospezifischen Trennverfahrens wider. Nach einer Einführung in die theoretischen Grundlagen wird zunächst die Auswahl der biochemischen Systeme und der Trägersysteme beschrieben. Die begleitende Analytik wird anschließend in ihrer Methodik dargestellt. Dabei werden Ergebnisse zur Validierung und Verifizierung der quantitativen Proteinanalytik aufgezeigt. Die folgenden Kapitel zur Immobilisierung der Liganden, zur Charakterisierung der Lektin-Adsorbentien und zur Affinitätstrennung von Glykokonjugaten enthalten jeweils nach einer kurzen Einführung und Darstellung der Vorgehensweise wesentliche Ergebnisse der experimentellen Arbeit. In der Diskussion werden unter anderem die Kosten der Herstellung von Lektin-Adsorbentien beleuchtet, der Vergleich zwischen den unterschiedlichen Trägersystemen erarbeitet sowie die entwickelte Methode zur Aufreinigung des Glykoproteins Fetuin aus fetalem Rinderserum diskutiert.

## 2 Grundlagen

### 2.1 Affinitätstrennung

Die Affinitätstrennung nimmt eine besondere Stellung unter den Trenntechniken ein, da sie die einzige Technik ist, die es erlaubt, Biomoleküle anhand ihrer biologischen Funktion oder individuellen Struktur abzutrennen. Wegen ihrer Spezifität und Selektivität wird die Affinitätstrennung für die Aufreinigung von Wertstoffen mit therapeutischem Interesse angewendet. Dabei kann diese Technik an sehr unterschiedliche Trennprobleme angepaßt werden und ermöglicht oft schnelle Trennungen, die mit anderen Methoden aufwendig oder mit der geforderten Reinheit unmöglich wären. Daher ist die Affinitätstrennung in vielen Laboratorien etabliert, die sich mit der Aufreinigung von Biomolekülen beschäftigen, wo sie z.B. für die Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern, entsprechenden Antigenen, Rezeptoren oder DNA-bindenden Proteinen eingesetzt wird (Turkova, 1993; Narayanan und Crane, 1990; Walters, 1985).

#### 2.1.1 Prinzip

Das fundamentale Prinzip der Affinitätstrennung beruht auf der Eigenschaft von Biomolekülen, stabile, spezifische und reversible Komplexe miteinander einzugehen. Ein Bindungspartner eines solchen Komplexes wird an einem Träger immobilisiert. Dieses System stellt das spezifische Adsorbens für die Affinitätstrennung dar, mit der der jeweils andere Bindungspartner des Komplexes aufgereinigt werden kann (Turkova, 1993). In Abb. 2-1 werden die Verfahrensschritte der Affinitätstrennung veranschaulicht. Das Affinitäts-Adsorbens, welches durch die kovalente Bindung des Liganden an ein Trägermaterial entstanden ist, bildet die stationäre Phase in einer Trennsäule oder einem Behälter. Es wird eine Substanzmischung aufgegeben, die die zu isolierende Substanz, im Folgenden als Adsorptiv bezeichnet, enthält. Das Adsorptiv bindet (adsorbiert) spezifisch am Liganden, wenn die Affinität groß genug, d.h. die Dissoziationskonstante dieses Komplexes klein genug ist ( $K_d < 10^{-5}$  mol/L). Die Bindung kommt zustande, wenn die Bindungsstellen des Liganden hinreichend zugänglich sind und Parameter wie pH-Wert, Ionenstärke sowie die Verweilzeit die Ausbildung des Komplexes ermöglichen. Beim anschließenden Waschen werden alle Substanzen entfernt, die keine komplementäre Bindungsstelle für den Liganden aufweisen. Die Desorption des gewünschten Adsorptivs erfolgt nun entweder spezifisch durch einen Überschuß an konkurrierendem Liganden (oder Adsorptiv) oder unspezifisch durch sogenannte deformierende Bedingungen, d.h. einen Wechsel von pH-Wert, Ionenstärke, Temperatur oder den Einsatz von deformierenden Agenzien wie Guanidin. Die letztere Methode führt zu Veränderungen der dreidimensionalen Struktur

der Bindungsstelle und kann unter Umständen die biologische Aktivität von Ligand oder Adsorptiv beeinträchtigen. Die Trennsäule wird anschließend durch Spülen mit Puffer wieder regeneriert (Turkova, 1993).

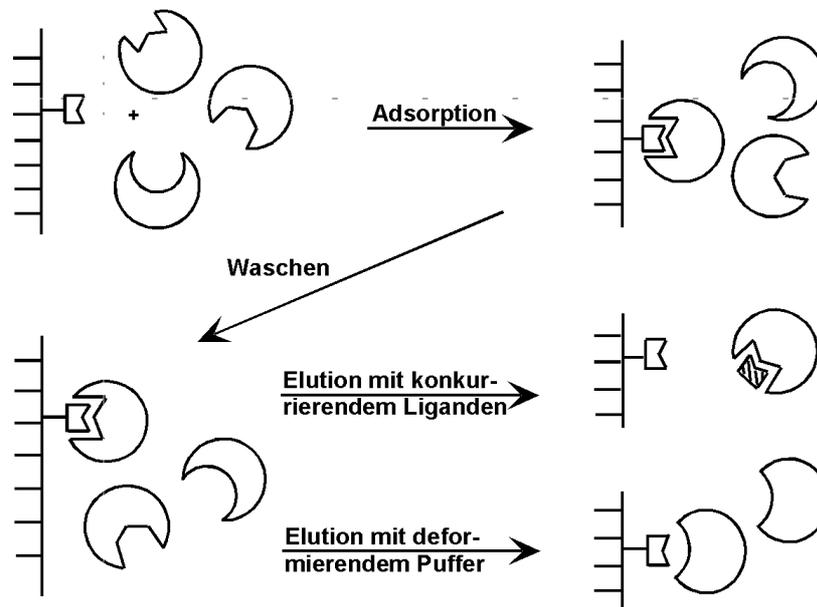


Abb. 2-1: Prozeß der Affinitätsstrennung (nach Turkova, 1993)

Traditionell wird für die beschriebene Trenntechnik der Name Affinitätschromatographie verwendet. Da es sich aber bei dieser spezifischen Technik häufig nicht um eine Chromatographie im eigentlichen Sinne, sondern um einen „On-Off-Mechanismus“, bestehend aus Adsorptions- und Desorptionsschritt, handelt, wird in dieser Arbeit der Begriff Affinitätsstrennung verwendet.

### 2.1.2 Methoden

Ein Meilenstein in der Entwicklung der modernen Affinitätsstrennung war die Entwicklung der Cyanbromid-Methode für die Immobilisierung von Liganden an Agarose von Porath et al. (1967) und Axen et al. (1967). Der Gebrauch von festen, mikropartikulären Trägern in der High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) führte zur Entwicklung der High-Performance Liquid Affinity Chromatography (HPLAC) durch Ohlson et al. (1978). Die entscheidenden Vorteile der Affinitätsstrennung gegenüber anderen flüssigchromatographischen Trennmethode sind die Schnelligkeit der Trennung, die einfache Handhabung, die Spezifität der Trennung und die schonenden Trennbedingungen unter Erhalt der biologischen Aktivität der zu trennenden Substanzen. Obwohl die HPLAC zusätzliche Vorteile bietet, wie hohe Auflösung, bessere Reproduzierbarkeit und Detektierbarkeit, ist die Niederdruck-Affinitätsstrennung auf der Basis von funktionalisierter Agarose bis heute weit

verbreitet. Dies ist vor allem auf die einfache und preisgünstige Handhabung und die traditionelle Verwendung und damit umfangreichen Erfahrungen zurückzuführen. Die präparative Niederdruck-Affinitätstrennung auf der Basis von Agarose eignet sich besonders für die Aufreinigung von Substanzen im Labormaßstab. Für präparative Anwendung im Prozeß-Maßstab bieten sich mechanisch stabile, poröse Trägermaterialien an bzw. sind bei entsprechend großen Säulenvolumina und höheren Volumenströmen unverzichtbar. Auf die verschiedenen Trägersysteme, die für die Affinitätstrennung verwendet werden, wird im einzelnen später in dieser Arbeit eingegangen.

Es gibt in der Affinitätstrennung eine Reihe von Anwendungen, bei denen man sich biochemischer Wechselwirkungen innerhalb unterschiedlicher Stoffgruppen bedient. Die Tabelle 2-1 nennt einige Beispiele für komplementäre Bindungspartner in der Affinitätstrennung. Dabei kann die Rolle von Ligand und Adsorptiv jeweils ausgetauscht werden (Turkova, 1993; Carlsson et al., 1989, S. 277; Janson, 1984, S.31).

*Tabelle 2-1: Beispiele für in der Affinitätstrennung verwendete spezifische und reversible Komplexe*

<b>Ligand</b>	<b>Adsorptiv / aufgereinigtes Produkt</b>
<i>Biospezifische Komplexe</i>	
Lektine	Glykoproteine, Glykolipide, Polysaccharide, Oligosaccharide, Zellen
Antikörper	Antigene, Viren, Zellen
Enzyme	Substrate, Inhibitoren, Co-Faktoren
Nukleinsäuren	Komplementäre Basensequenzen, Histone, Polymerasen
Hormone, Vitamine	Rezeptoren, Carrier-Proteine
Saccharide	Lektine, Enzyme
Protein A, Protein G	Immunglobuline
Heparin	Wachstumsfaktoren, Koagulationsfaktoren, nukleinsäurebindende Proteine
<i>Andere Komplexe</i>	
Synthetische Farbstoffe	Verschiedene Proteine
Metallchelate	Verschiedene Proteine

Grundsätzlich lassen sich gruppenspezifische und hochspezifische Adsorbentien unterscheiden. Als Beispiel für gruppenspezifische Adsorbentien können Heparin- oder

Protein A-Adsorbentien genannt werden. Als gruppenspezifische Methode kann ebenfalls die Metallchelate-Affinitätstrennung angesehen werden, bei der die Eigenschaft von Aminosäuren ausgenutzt wird, mit Metallionen Komplexe zu bilden. Ebenso kann die Farbstoff-Affinitätstrennung dazu gezählt werden, bei der synthetische polyzyklische Farbstoffe wie Cibacron Blue immobilisiert werden, um eine Vielzahl von Enzymen abzutrennen. Hochspezifische Adsorbentien kommen in der Immuno-Affinitätstrennung zum Einsatz, wo Antigen oder Antikörper immobilisiert bzw. aufgereinigt werden. Die Dissoziationskonstanten von Antigen-Antikörper-Komplexen liegen hier bei  $K_d = 10^{-5} - 10^{-11}$  mol/L. Lektin-Adsorbentien können sowohl hochspezifische als auch gruppenspezifische Matrices darstellen, abhängig vom Lektin und der Art der Zielmoleküle. Als Beispiele für Liganden seien hier die Lektine vom Weizen (WGA, Wheat Germ Agglutinin) mit einer Affinität zu N-Acetyl-D-Glucosamin (GlcNAc) und vom Ricinus (RCA, *Ricinus communis* Agglutinin) mit einer Affinität zu  $\beta$ -D-Galactose genannt. Die Dissoziationskonstanten von Lektin-Kohlenhydrat-Komplexen liegen für einfache Zucker bei  $K_d = 10^{-3} - 10^{-4}$  mol/L und für multivalente Makromoleküle bei  $K_d = 10^{-6} - 10^{-7}$  mol/L (Mattiasson, 1988).

Methoden der Affinitätstrennung werden für unterschiedliche Zwecke eingesetzt. Generell kann man dabei analytische von präparativen Anwendungen unterscheiden. Unter besonderer Berücksichtigung der Lektin-Affinitätstrennung werden im Folgenden Beispiele für beide Anwendungen genannt:

### **Analytische Anwendungen der Affinitätstrennung**

Analytische Methoden der Affinitätstrennung kommen beispielsweise bei der Strukturaufklärung von Biomolekülen zum Einsatz. So ergeben sich durch das Retentionsverhalten einer Substanz an einem Lektin-Adsorbens auch entsprechende strukturelle Informationen über die Saccharidreste eines Glykokonjugates. Green und Baenziger (1989) nutzten die Lektin-HPLAC für die Charakterisierung von unbekanntem Oligosacchariden. Als besondere Variante sei die sogenannte serielle Lektin-Affinitätstrennung (SLAC, Serial Lectin Affinity Chromatography) genannt. Eine Kombination verschiedener Lektine wird verwendet, um eine komplexe Mischung von freien Glykanen oder Glykopeptiden zu fraktionieren. Diese Technik bietet sich vor allem an, um N- und O-Glykane zu identifizieren und für eine weiterführende Strukturaufklärung zu isolieren. Durch den Einsatz unterschiedlicher Lektine mit einem breiten Spektrum von Bindungsspezifitäten können Substanzmischungen auf der Basis ihrer Saccharidstrukturen aufgetrennt werden (Yoshida et al., 1999; Cummings, 1997 und 1994; Merkle und Cummings, 1987). Weitere Anwendungen in der analytischen Trennung von Glykostrukturen mittels Lektin-Affinitätstrennung wurden beschrieben von Wang et al. (1988), Green et al. (1987a, 1987b) oder Borchert et al. (1982).

Von Zopf und Ohlson (1990) wird die sogenannte „Weak-affinity chromatography“ beschrieben. In diesem Fall liegen weniger spezifische Bindungsmechanismen vor. Aufgrund von Dissoziationskonstanten im Bereich von  $K_d = 10^{-2} - 10^{-4}$  mol/L kommt es

nicht zu einer festen Adsorption der Probenmoleküle, sondern zu einer Retention und damit zu einer chromatographischen Trennung des Substanzgemisches.

Weiterhin kann die analytische Affinitätstrennung auch als sogenannte „quantitative Affinitätstrennung“ für die Bestimmung von Bindungsparametern und Affinitätskonstanten definierter Komplexe herangezogen werden. Adsorptionskinetiken geben einen Hinweis über die Dauer bis zur Einstellung des Sorptionsgleichgewichts. Adsorptionsisothermen werden im Zustand des Gleichgewichts bestimmt und können diskontinuierlich oder mit Hilfe von Durchbruchkurven in der kontinuierlichen Trennung aufgenommen werden. Für Einzelheiten sei auf die Übersichtsarbeiten von Nicoud und Seidel-Morgenstern (1996), Winzor (1992) oder Chaiken (1986) verwiesen sowie auf Untersuchungen von Finette et al. (1997), Björklund und Hearn (1997) oder Anspach et al. (1990).

Der Einsatz von Lektinen als Lektin-Sensor in der Surface Plasmon Resonance Technik eröffnet eine Vielzahl weiterer analytischer Anwendungen. Bei dieser Technik kann das Lektin beispielsweise an einer Sensoroberfläche immobilisiert werden. Diese wird als Affinitätsdetektor dann in Kombination mit einer Affinitätstrennung oder einer anderen flüssigchromatographischen Trenntechnik verwendet. Die spezifische Adsorption eines Analyten an der Sensoroberfläche induziert dabei in Abhängigkeit von der Menge ein Meßsignal (Blikstad et al., 1996). In umgekehrter Reihenfolge läßt sich auch ein Glykokonjugat immobilisieren und die Affinität zu verschiedenen Lektinen bestimmen (Okazaki et al., 1995).

### **Präparative Anwendungen der Affinitätstrennung**

Die präparativen Affinitätstrennung wird zur Aufreinigung von biologischen Wertstoffen aus natürlichen Vielstoffgemischen, Extrakten oder Nährlösungen eingesetzt. Bei einer hohen Affinität zwischen Ligand und Zielkomponente liegt im allgemeinen eine große Differenz der Bindungskonstanten zu den übrigen Probenkomponenten vor, die eine deutliche Abtrennung des Zielmoleküls zu Folge hat (hohe Selektivität). Dadurch wird auch die Aufgabe von großen Probenvolumina möglich, wenn beispielsweise verdünnte Extrakte vorliegen. Während der Adsorption des Wertstoffs kommt es zur Anreicherung desselben am Adsorbens, und nach dem anschließenden Desorptionsschritt kann eine Aufkonzentrierung des Wertstoffs um den Faktor 100 leicht erreicht werden (Narayanan und Crane, 1990). Die milden Trennbedingungen dieser Technik schonen die biologische Aktivität der Zielmoleküle. Das „On-Off-Trennprinzip“ ermöglicht die automatisierte Anwendung sowohl im diskontinuierlichen Betrieb (Batch-Adsorption) als auch im kontinuierlichen Säulen-Betrieb. Dabei kann die Affinitätstrennung als einziger Trennschritt ausreichen oder zur Feinreinigung verwendet werden. Außer gegebenenfalls Dialyse und Trocknung sind im allgemeinen keine nachfolgenden Verfahrensschritte notwendig.

Aus der Vielfalt der präparativen Anwendungen der Affinitätstrennung sollen hier nur einige wenige erwähnt werden. Ding und Xu (1995) reinigten Rinderthrombin mittels Heparin-Affinitätstrennung auf und erzielten eine 402fache Aufreinigung bei einer Rückgewinnung von 87 %. Eine Aufreinigung mittels Immuno-Affinitätstrennung im Prozeßmaßstab wurde von Wells et al. (1993) für rekombinantes humanes Antigen CD4 beschrieben. Leger et al. (1987) setzten eine Lektin-Affinitätstrennung als letzten Schritt der Aufreinigung von Proteasen aus Pilzkulturen ein und erreichten in der Summe eine 126fache Aufreinigung bei einer Wiederfindung von 32 %. Callaway et al. (1986) reicherten Collagenase mittels Lektin-Affinitätstrennung 55fach an. Renauer et al. (1985) reinigten native Membran-Glykoproteine mittels Lektin-Affinitätstrennung auf und erreichten dabei eine 58fache Anreicherung bei einer Rückgewinnung von 90 %. Humanes Interferon aus Zellkulturen wurde mittels kombinierter Lektin- und Phenyl-Affinitätstrennung aufgereinigt (Faktor 4000) bei einer Rückgewinnung von 63 % (Mikulski et al., 1980). Für weitere Informationen und Beispiele sei auf das Buch von Turkova (1993) sowie die Übersichtsartikel von Burnouf et al. (1998), Ohlson et al. (1989), Janson (1984) oder Chase (1984) verwiesen.

## 2.2 Lektine

### 2.2.1 Geschichte und Definition

Die Entdeckung der Lektine reicht bis in das Jahr 1888 zurück, als Stillmark eine toxische, zellagglutinierende Proteinfraction im Extrakt von Ricinussamen beschrieb. Kurze Zeit darauf entstand der Begriff „Hämagglutinin“ für pflanzliche Proteine, die zur Agglutination von Erythrozyten befähigt sind. Die Bezeichnung „Lektin“ (lat. *legere* = auswählen) für Antikörper-ähnliche Moleküle wurde von Boyd und Shapleigh (1954) eingeführt. 1974 wurde das erste Säugetierlektin aus Leber isoliert (Ashwell und Morell). Heute werden Lektine definiert als Proteine oder Glykoproteine, die spezifisch an Zuckerreste binden und keine Enzymaktivität besitzen. Sie sind damit von Antikörpern und Enzymen abgegrenzt (Lindhorst, 2000; Gabius, 1995; Goldstein und Poretz, 1986; Goldstein et al., 1980).

### 2.2.2 Eigenschaften, Vorkommen und biologische Funktionen

Lektine bestehen aus zwei bis 8 Untereinheiten und verfügen über eine oder mehrere Kohlenhydrat-Bindungsstellen (engl. *carbohydrate recognition domain*), an denen Saccharide gebunden werden. Dabei befähigt ihr multivalenter Charakter die Lektine zur Agglutination von Zellen und Glykokonjugaten, denn durch Quervernetzung können größere Agglomerate entstehen. Die Informationen, die in den Oligosacchariden von Glykokonjugaten kodiert sind, werden von Lektinen erkannt. Die Bindungsstellen

der Lektine erkennen dabei spezifisch Form, Ladung, Anomere, Bindungsposition, Ringgröße, Verzweigung und Monosaccharidsequenz der Kohlenhydratmoleküle, wobei die erkennbaren Einheiten normalerweise Hexamere oder kleinere sind (Laine, 1997). Der biochemische Komplex beinhaltet verschiedene molekulare Kräfte und Wechselwirkungen, wie ionische Bindungen, Wasserstoff-Brückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen oder Charge-Transfer-Komplexe. Das Zusammenspiel dieser Kräfte innerhalb der Bindungsstellen ist die Basis für die Spezifität der Bindung. Dabei spielt auch die Multivalenz, d.h. die Interaktion mit mehreren Bindungsstellen an einem Makromolekül, eine wichtige Rolle im Hinblick auf Spezifität und Stärke (Williams und Davies, 2001; Gabius, 1995). Tabelle 2-2 zeigt beispielhaft Bindungsspezifitäten von Lektinen (die Strukturen einiger Monosaccharide sind in Kapitel 12.1 aufgezeigt).

Tabelle 2-2: Bindungsspezifitäten einiger Lektine (Cummings, 1997)

Lektin	Gebundene Glykostrukturen
<i>Sambucus nigra</i> Agglutinin (SNA)	NeuAc $\alpha$ 2-6GalNAc-R
<i>Helix pomatia</i> Agglutinin (HPA)	GalNAc $\alpha$ 1-R
<i>Ulex europaeus</i> Agglutinin-I (UEA-I)	Fuc $\alpha$ 1-2Gal-R
<i>Maackia amurensis</i> Leukoagglutinin (MAL)	NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-R

Lektine kommen in allen Organismen (Pflanzen, Pilzen, Mikroorganismen und Tieren) vor, wo sie sich in den unterschiedlichsten Geweben und Organen befinden (Cummings, 1997). Sie liegen dabei entweder in gelöster Form oder membranständig vor. Pflanzliche Lektine werden aus Blättern, Stamm, Wurzel, Blüten oder den Samen gewonnen. Viele der charakterisierten Pflanzenlektine stammen aus der Familie der Leguminosen. Aber auch aus Gramineen, Euphorbiaceen oder Solanaceen sind schon seit langer Zeit Lektine bekannt (Rüdiger, 1981). Viele kommerziell erhältliche Lektine sind Samenlektine. Pflanzliche Lektine sind zumeist löslich und besitzen mehrere Bindungsstellen, die ihnen die Eigenschaft zur Agglutination von Zellen verleihen. Viele pflanzliche Lektine sind für den Menschen toxisch oder haben auf menschliche Lymphozyten mitogene Wirkung. Die Toxine Abrin (*Abrus praecastoris*, Paternostererbse) und Ricin (*Ricinus communis*, Wunderbaum) gehören zu den giftigsten Lektinen. Sie bestehen aus einer A- und einer B-Kette, die durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Die B-Kette bindet an die Zelloberfläche während die A-Kette in die Zelle eintritt und dort als Hemmstoff der ribosomalen Proteinsynthese wirkt. Der aktive Teil des Ricin kann über 2000 Ribosomen pro Minute inaktivieren, so daß bereits der Eintritt weniger Moleküle in das Zytosol einen dramatischen Effekt für die Zelle hat (Sandvig und van Deurs, 1999). Abbildung 2-2 zeigt Ricin in seiner räumlichen Struktur. Die A-Kette ist gelb und die B-Kette rot

dargestellt, die weißen Kugelmodelle zeigen Lactosemoleküle, die an den Kohlenhydrat-Bindungsstellen der B-Kette gebunden sind.

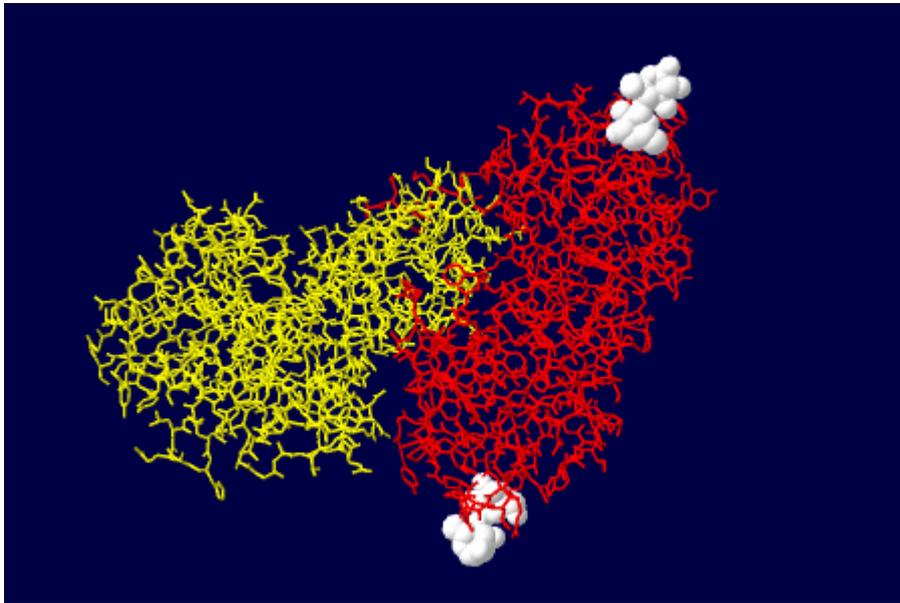


Abb. 2-2: Ricin, A- und B-Kette (PDB-File<sup>1</sup>: 2AAI; Rutenber et al., 1991)

Tierische Lektine variieren stark in ihren Strukturen. Es lassen sich (1) membrangebundene Glykoproteine, (2) lösliche monomere Proteine und Glykoproteine und (3) lösliche multimeren und multivalenten Proteine und Glykoproteine unterscheiden. Sie werden außerdem auch anhand von Sequenzhomologien eingeordnet. Als sogenannte C-Type Lektine werden solche mit gemeinsamen Sequenzmotiv bezeichnet, die zu ihrer Bindungsaktivität Calciumionen benötigen. Galectine besitzen ähnliche Aminosäuresequenzen und benötigen kein Calcium. P-type Lektine binden phosphorylierte Mannosylreste (Lindhorst, 2000; Cummings, 1997).

Die physiologischen Funktionen der Lektine in ihrer natürlichen Umgebung sind noch nicht umfassend geklärt. Viele Lektine dienen als Rezeptoren für Glykokonjugate. Die bekannten Funktionen in Pflanzen erstrecken sich vom einfachen Speicherprotein bis zu Abwehrfunktionen gegen Fremdmoleküle. In Leguminosen spielen Lektine eine Rolle in der Symbiose mit dem Pilz *Rhizobium*, wo sie an der Interaktion beteiligt sind (Lis und Sharon, 1986; S.393ff). Tierische Lektine haben oft hochspezielle Funktionen in der Zelladhäsion, Signalübertragung, bei Entzündungsvorgängen oder beispielsweise eine Funktion als Rezeptor in der Leber bei der Metabolisierung von Asialoproteinen. Das mannosebindende Protein MBP spielt eine Rolle in der frühen Immunabwehr, wo

---

<sup>1</sup> PDB: Protein Data Bank, betrieben vom Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) unter [www.rcsb.org/pdb](http://www.rcsb.org/pdb). Das Kürzel 2AAI bezeichnet den Datensatz (PDB-File) des Proteins. Die räumlichen Strukturen der in dieser Arbeit abgebildeten Proteine wurden mit dem Programm „Swiss-PdbViewer“ erstellt.

es mit Oligosacchariden auf pathogenen Organismen wechselwirkt (Lindhorst, 2000; Gabius, 1995; Cummings, 1997).

### 2.2.3 Verwendung

Schon lange bevor die biologischen Funktionen der Lektine untersucht wurden, machte man sich die Eigenschaften der Pflanzenlektine, Zellen zu agglutinieren und Zucker zu binden, zunutze. Lektine werden dazu verwendet, Zellen zu identifizieren, zu stimulieren und zu separieren, über das Bindungs- und Agglutinationsverhalten Informationen über Glykokonjugate zu gewinnen oder die Aktivität von Glykosyltransferasen zu untersuchen. Die Agglutination von Erythrozyten durch Lektine läßt sich durch Zugabe bestimmter Zucker hemmen. Über diese Inhibitionsversuche wurden klassisch die Bindungsspezifitäten der Lektine selbst festgestellt und quantifiziert. Dabei wird für ein Monosaccharid die Referenzaffinität 1 definiert und man erhält für die untersuchten Mono- und Oligosaccharide die dazu relativen Affinitäten (Goldstein und Poretz, 1986).

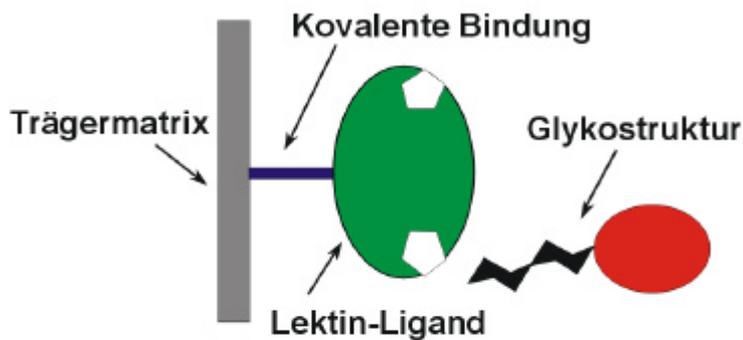


Abb. 2-3: Schematische Darstellung eines immobilisierten Lektins

Für die praktische Anwendung in der Affinitätstrennung werden Lektine an Trägermaterialien immobilisiert (siehe Abb. 2-3). Lektine sind als Liganden schon seit langer Zeit bekannt. Ihre Bindungsfähigkeit gegenüber Glykostrukturen hat man sich für die Aufreinigung einer großen Zahl von Substanzen zunutze gemacht. Zu diesen gehören Oligo- und Polysaccharide, Glykopeptide, Glykoproteine, Glykolipide, Hormone und Zellen (Turkova, 1993; Cummings, 1997; Green und Baenziger, 1989; Borchert et al., 1982). Beispiele für Lektin-Affinitätstrennungen wurden bereits in Kap. 2.1.2 genannt.

## 3 Auswahl der biochemischen Systeme

In diesem Kapitel werden die ausgewählten biochemischen Systeme beschrieben. Dazu gehören die Lektine, die als Liganden in der Affinitätstrennung verwendet wurden, und die als Adsorptive verwendeten Glykokonjugate. Neben den Standardmaterialien aus der Gruppe der Glykoproteine und Glykolipide werden auch die eingesetzten Vielstoffgemische beschrieben.

### 3.1 Lektin-Liganden

Es wurden in dieser Arbeit drei verschiedene Lektine als Liganden eingesetzt. Im Folgenden sollen diese mit ihren wichtigsten Eigenschaften vorgestellt und die Gründe für die Auswahl genannt werden.

#### 3.1.1 Concanavalin A

Das wohl bekannteste, meist untersuchte und aufgrund seiner besonders vielseitigen Bindungseigenschaften technisch am häufigsten verwendete Lektin stammt aus der Schwertbohne (*Canavalia ensiformis*) und heißt Concanavalin A (Con A). Es wurde bereits 1936 aus dem bis zu 3 % des Lektins enthaltenden Samen der Schwertbohne isoliert und kristallisiert. Con A ist ein Metalloprotein, das für seine Bindungsaktivität Calcium- und Manganionen benötigt. Es besteht aus 4 identischen Untereinheiten von jeweils 27000 g/mol und 238 Aminosäuren. Con A ist im Gegensatz zu vielen anderen Lektinen kein Glykoprotein. Seine Quartärstruktur ist abhängig vom pH-Wert, oberhalb von pH 5 liegt Con A als Dimer vor und über pH 7 als Tetramer (Sigma, 2000; Sharon und Lis, 1989; Goldstein und Poretz, 1986).

Abb. 3-1 zeigt auf der linken Seite die räumliche Struktur des Con A in der Backbone-Darstellung. Es wird deutlich, daß das Protein durch Faltblattstrukturen stabilisiert ist. Auch kann man die gebundenen Metallionen deutlich erkennen. Rechts ist Con A unter Hervorhebung seiner 4 Untereinheiten dargestellt. In den Bindungsstellen sind jeweils fixierte Trimannoside als weiße Kugelmodelle hervorgehoben.

Con A bindet Mannose und Glucose, dabei ist das Saccharid-Monomer mit der größten Übereinstimmung zur Bindungsstelle die  $\alpha$ -D-Mannose. Die Affinität zu den Monosacchariden verhält sich dabei in der Reihenfolge  $\alpha$ -D-Glucose <  $\alpha$ -D-Mannose << Methyl- $\alpha$ -D-mannose. Von Swaminathan et al. (1998) wird das 3,6-di-O-( $\alpha$ -D-Mannopyranosyl)- $\alpha$ -D-mannopyranosid als Kohlenhydrat beschrieben, welches die Bindungsstelle ausfüllt. Dam et al. (1998) beschreiben die Fixierung des Core-Trimannosids (siehe auch Abb. 3-5) von asparagingebundenen Oligosacchariden (N-Glykanen) in der Con A-Bindungsstelle. Die Abbildung 3-2 zeigt die von Con A gebundenen Glykane nach Cummings, 1997.

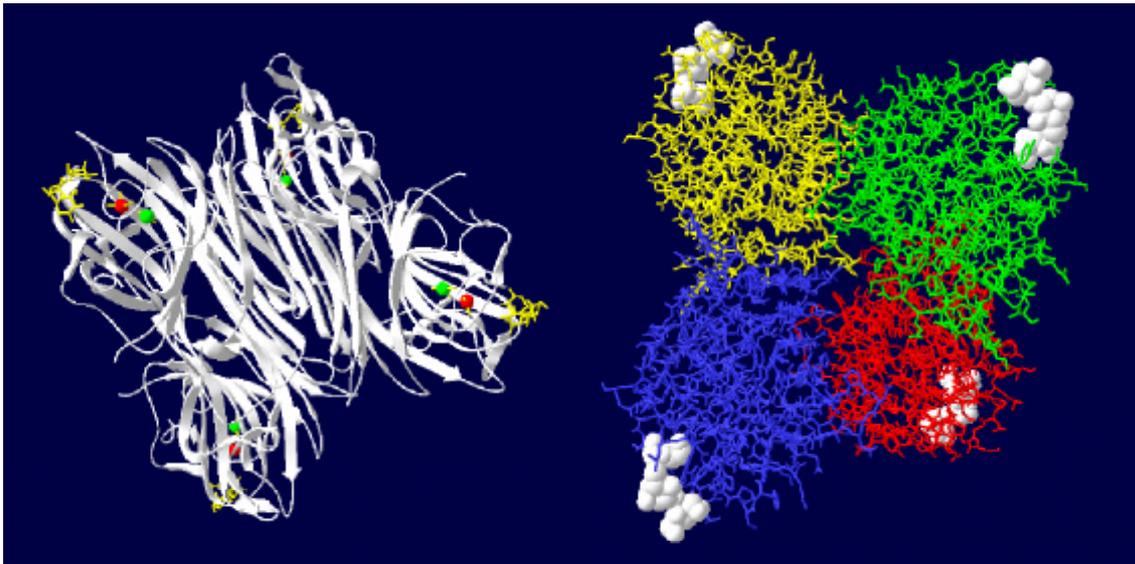


Abb. 3-1: Räumliche Struktur von Con A mit gebundenen Trimannosiden (PDB-File: 1CVN; Naismith und Field, 1996)

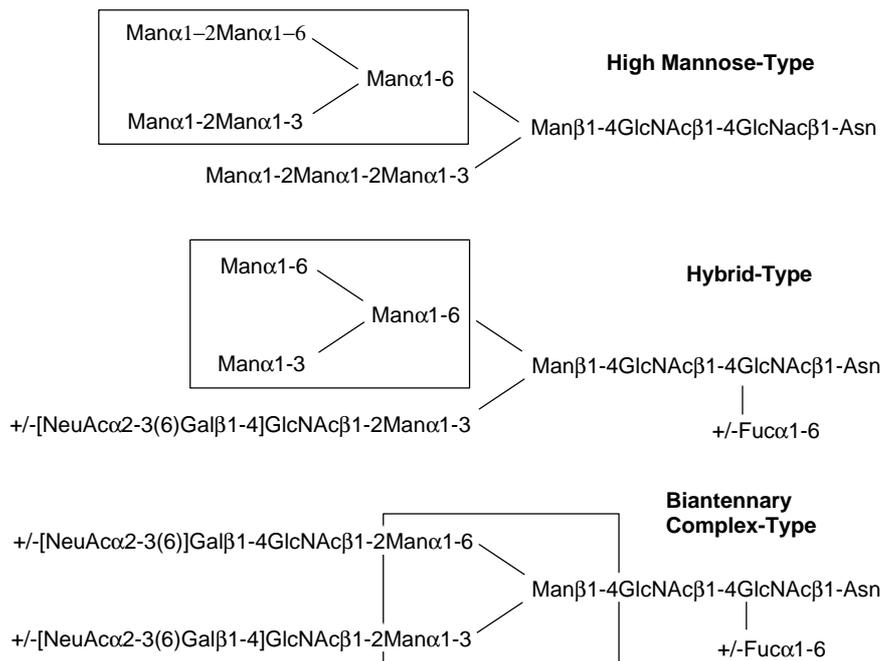


Abb. 3-2: Von Con A gebundene Oligosaccharid-Strukturen (nach Cummings, 1997)

Con A wurde aufgrund seiner Popularität und der dadurch verfügbaren Datenvielfalt und Anwendungsbeispiele als Ligand für die Affinitätstrennung ausgewählt. So bot sich die Möglichkeit, die Entwicklung der Con A-Adsorbentien und Trennparameter

vergleichend zu bewerten. Ein weiterer Vorteil von Con A ist das breite Spektrum der Bindungsaffinitäten gegenüber verfügbaren Glykokonjugaten, denn eine Reihe von Substanzen enthalten endständige Mannosen bzw. das genannte Core-Trimannosid. Nicht zuletzt ist dieses Lektin preisgünstiger als die meisten anderen erhältlichen Lektine und eignet sich aus diesem Grund besonders für methodische Untersuchungen.

### 3.1.2 *Ricinus communis* Agglutinin

Wäßrige Extrakte der Ricinusbohne enthalten zwei unterschiedliche aber strukturell verwandte Lektine. Das eine ist das stark zytotoxisch wirkende und bereits im Kapitel 2.2.2 beschriebene und abgebildete Ricin. Es ist ein schwaches Hämagglutinin und wird aufgrund seiner Molmasse von etwa 60.000 g/mol auch RCA<sub>60</sub> genannt. Das zweite Lektin, das *Ricinus communis* Agglutinin (RCA<sub>I</sub>, RCA<sub>120</sub>), ist ein starkes Hämagglutinin und ein schwacher Inhibitor der Proteinsynthese. Es ist ebenfalls stark toxisch, wenn auch schwächer als Ricin. Das *Ricinus communis* Agglutinin wurde als Ligand in der hier vorliegenden Arbeit verwendet und wird im Folgenden mit RCA abgekürzt. Es ist ein Glykoprotein mit einer Molmasse von 120.000 g/mol und besteht aus zwei Untereinheiten, die sich jeweils aus einer A- und einer B-Kette zusammensetzen und dem Ricin sequentiell und strukturell sehr ähnlich sind (siehe Abb. 2-2). RCA besitzt insgesamt zwei identische und unabhängige Bindungsstellen für β-D-Galactose, die in den B-Ketten der Untereinheiten positioniert sind (Frenoy et al., 1986; Baenziger und Fiete, 1979). Die Bindungsaffinitäten für die freien Saccharide Galactose und Lactose werden mit  $K_d = 8,1 \times 10^{-4}$  bzw.  $K_d = 2,6 \times 10^{-5}$  mol/L angegeben (Goldstein und Poretz, 1986). Generell werden Glykane mit terminalen Galactosen gebunden; Cummings (1997) nennt die Glykostruktur β-D-Gal-1,4-β-D-GlcNAc-1,0-R (terminales Lactosamin) als Voraussetzung für die Bindung eines Glykans, wobei feste Bindungen hochspezifisch nur mit verzweigten, multivalenten N-Glykanen zustande kommen.

RCA ist technologisch besonders interessant aufgrund seiner Spezifität zu Galactose, welche sowohl in Glykoproteinen als auch in tierischen Glykolipiden (Glykosphingolipiden, siehe Kap. 3.2.3) stark repräsentiert ist. Außerdem weist RCA eine große Anzahl stabilisierender Disulfidbrücken auf und ist daher unempfindlich gegen pH Änderungen und Proteolyse. Durch diese Stabilität eignet es sich besonders als Ligand für die Affinitätstrennung.

### 3.1.3 Wheat Germ Agglutinin

Das Lektin *Triticum vulgare* Agglutinin wird im allgemeinen Wheat Germ Agglutinin (WGA) genannt und ist ein Lektin aus dem Samen des Weizens. 1972 gelang es Nagata und Burger sowie LeVine et al., WGA zu isolieren und zu kristallisieren. WGA ist ein kohlenhydratfreies Protein und besteht aus zwei identischen Untereinheiten. Es liegt bei pH 7,2 als Dimer mit einer Molmasse von 36.000 g/mol und bei pH 1,9 als Monomer

mit einer Masse von 18.000 g/mol (Sigma, 2000; Goldstein und Poretz, 1986). Die Struktur von WGA ist in der Abbildung 3-3 dargestellt.

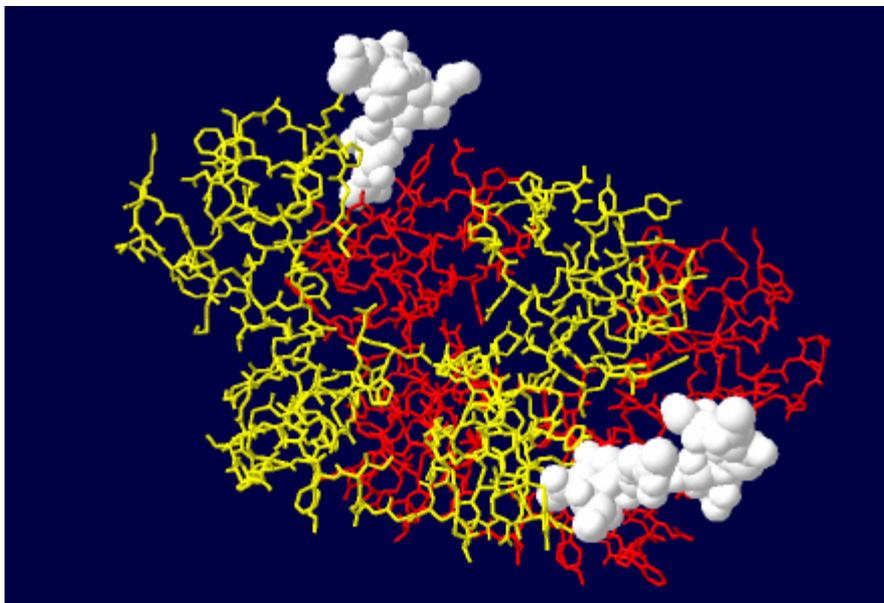


Abb. 3-3: Räumliche Struktur von WGA mit gebundenen Saccharidstrukturen von Sialopeptiden (PDB-File: 1CWG; Wright und Jäger, 1993).

WGA ist ein chitinbindendes Lektin. Messungen mittels Gleichgewichtsdialyse ergaben, daß jedes Monomer zwei unabhängige Bindungsstellen für N-Acetylglucosamin (GlcNAc) besitzt (Nagata und Burger, 1974). Es konnte allerdings festgestellt werden, daß die beiden Bindungsstellen des WGA Monomers unterschiedliche Affinitäten zu GlcNAc und N-Acetylneuraminsäure (NeuNAc) haben. Eine Bindungsstelle (P-Site) des Monomers weist eine Affinität zu beiden Sacchariden auf, während NeuNAc nicht an die zweite Bindungsstelle (S-Site) bindet (Wright, 1984; Wright und Jäger, 1993). Es wird daher im weiteren Verlauf dieser Arbeit von zwei Bindungsstellen für das dimere WGA ausgegangen. Die Bindungsstärke für Oligosaccharide nimmt mit der Anzahl der GlcNAc-Reste stark zu. Das Disaccharid N,N'-Diacetylchitobiose wird 131mal stärker gebunden als das Monomer und das Trisaccharid N,N',N''-Triacetylchitotriose 3700mal stärker (Goldstein und Poretz, 1986). Seine Bindungsaffinität macht WGA als Ligand für die Affinitätstrennung von sialinsäurehaltigen Glykoproteinen interessant.

## 3.2 Glykokonjugate

Im Verlauf dieser Arbeit wurden Glykokonjugate in ihrer Eigenschaft als Adsorptive in der Lektin-Affinitätstrennung untersucht. Es wurden im wesentlichen Glykoproteine bearbeitet, im weiteren Verlauf der Arbeit auch Substanzen aus der Gruppe der Glykolipide.

### 3.2.1 Definition und Einteilung

Glykokonjugate stellen wichtige Biomoleküle der Zelle dar (Kap. 1). Der Begriff Glykokonjugate bezeichnet Moleküle, bei denen ein Kohlenhydratanteil (Mono-, Oligo- oder Polysaccharid) kovalent an ein Protein oder ein Lipid gebunden ist. Die Vielfalt innerhalb dieser Substanzklasse ist sehr groß, denn zu den Glykokonjugaten gehören neben den Glykoproteinen und Glykolipiden, bei denen der Protein- bzw. Lipidanteil überwiegt, auch die Lipopolysaccharide und die Proteoglykane, bei denen der Kohlenhydratanteil überwiegt. Der Kohlenhydratanteil besteht bei den Glykoproteinen und Glykolipiden typischerweise aus bis zu 20 Monosacchariden, bei Lipopolysacchariden und Proteoglykanen kann dieser erheblich größer sein. In der Biosynthese dieser komplexen Glykokonjugate nutzt die Natur neben der Auswahl an unterschiedlichen Monosaccharid-Bausteinen die verschiedensten Verknüpfungs- und Verzweigungsmöglichkeiten, so daß eine gigantische Strukturvielfalt innerhalb dieser Substanzklasse vorliegt.<sup>2</sup> Wenn die Oligosaccharidketten verzweigt sind, spricht man von oligoantennären Verbindungen, wobei normalerweise di- bis pentaantennäre Strukturen vorliegen. Die dadurch gegebene „Multivalenz“ der Moleküle in Bezug auf die Wechselwirkung mit einem Bindungspartner ist ein wichtiger Aspekt für die Spezifität und Stärke der Bindung. An jeder glykosylierten Stelle eines Proteins können die Oligosaccharidstrukturen variieren. Die unterschiedlich glykosylierten Varianten bezeichnet man als Glykoformen dieses Proteins oder auch als Mikroheterogenität. Für weitere Einzelheiten zu diesem Thema sei auf das Buch „Glycosciences“ (Gabius und Gabius, 1997) sowie auf die Übersichtsartikel von Lindhorst (2000), Gabius (2000) oder Brockhausen et al., (1998) verwiesen.

### 3.2.2 Glykoproteine

Zahlreiche Proteine, vor allem tierische Albumine und Globuline, sind Glykoproteine. Sie tragen am Proteingerüst zumeist an mehreren Stellen Oligosaccharid-Seitenketten,

---

<sup>2</sup> Kohlenhydrate weisen innerhalb der biologischen Bindungspartner von Proteinen in einer kurzen Sequenz potentiell die größte Anzahl von Variationsmöglichkeiten auf. Unter Verwendung einer üblichen Bibliothek von 20 verschiedenen Monosacchariden ergeben sich für die Bildung eines Hexasaccharids (einschließlich verzweigter Isomere) theoretisch  $10^{15}$  verschiedene Strukturen (Laine, 1997).

die entweder O-glykosidisch mit den OH-Gruppen von Serin oder Threonin verknüpft sind (O-Glykane) oder N-glykosidisch mit den Amidgruppen des Asparagins (N-Glykane). Die O-Glykane haben häufig den Basisaufbau  $\beta$ -D-Gal-1,3- $\alpha$ -D-GalNAc-1,0-Ser (oder Thr). In den N-Glykanen liegen komplexere, verzweigte Basisstrukturen vor. Das Core-Saccharid (Kern, Basisstruktur) wiederholt sich dabei in vielen unterschiedlichen Proteinen (siehe Abb. 3-4). Dieses trägt variabel weitere Verzweigungen und weitere endständige Saccharidbausteine, wie Mannosen oder Neuraminsäuren.

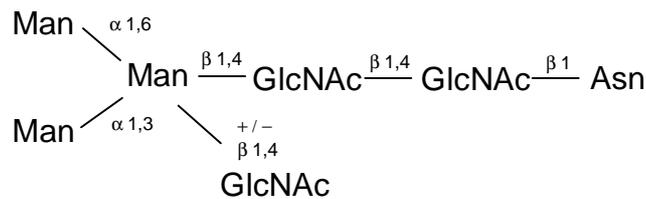


Abb. 3-4: Core-Region der N-Glykane von Glykoproteinen

Die Neuraminsäure besitzt als Bestandteil von Glykokonjugaten eine zentrale Bedeutung. Sie liegt meist in ihrer acetylierten Form vor. Ihre N-Acetyl- und O-Acetylderivate sind unter dem Sammelnamen Sialinsäuren bekannt. Sie spielen bei der organspezifischen Erkennung von Glykoproteinen eine wichtige Rolle. Wenn die endständigen Sialinsäuren durch Neuramidasen abgespalten werden, ändert sich das Merkmal des Glykoproteins beispielsweise mit dem Ergebnis, daß es dem Blutkreislauf durch Abbau in der Leber entzogen wird (Lindhorst, 2000).

In dieser Arbeit wurden die folgenden Glykoproteine ausgewählt und als Adsorptive in der Affinitätstrennung verwendet:

### Fetuin

Fetuin (FET) ist ein im Blut von Säugetieren weit verbreitetes Glykoprotein. Es ist ein  $\alpha$ -Globulin, gehört zur Cystatin-Familie und ist beteiligt an der Akutphasen-Reaktion. Alle Fetuine sind glykosyliert, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. Das Rinder-Fetuin wurde bereits 1944 von Pedersen in hohen Konzentrationen im fetalen Rinderplasma nachgewiesen. Es ist dem menschlichen Serumprotein  $\alpha_2$ HS-Glykoprotein homolog. Rinder-Fetuin enthält einen Kohlenhydratanteil von etwa 30 % bei einer Molmasse von 48.400 g/mol. Es besitzt insgesamt 6 Glykane, von denen 3 bi- und triantennäre N-Glykane mit endständigen Sialinsäuren sind (Sigma, 2000; Green et al., 1988; Nilsson et al., 1979). Trotz seiner vielfältig untersuchten Struktur sind die physiologischen Funktionen dieses Proteins noch nicht vollständig aufgeklärt. Brown et al. (1992) faßten verschiedene Funktionen zusammen, die bisher für Fetuin postuliert wurden. Unter anderem wurde Fetuin eine wachstumsfördernde Wirkung nachgewiesen

(Demetriou et al., 1996), weshalb fetales Rinderserum in Nährmedien für Zellkulturen eingesetzt wird. Fetuin wurde aufgrund der Untersuchungen von Bhavanandan und Katlic (1979) ausgewählt, die dessen Bindung an WGA-Sepharose beschrieben.

### Asialofetuin

Asialofetuin (ASF) wird aus Fetuin durch Abspaltung der Sialinsäuren gewonnen. ASF hat eine Molmasse von 44.200 g/mol (Sigma, 2000) und besitzt analog zu Fetuin 3 asparagingebundene di- und triantennäre N-Glykane. Abbildung 3-5 zeigt ein triantennäres N-Glykan, welches über Asparagin (Asn) mit dem Protein verknüpft ist. Durch die Entfernung der Sialinsäuren liegen die dahinter liegenden  $\beta$ -D-Galactosen als endständige Reste frei. ASF findet Verwendung als Modells substanz in der biochemischen Forschung (Gupta et al., 1996; Yet et al., 1988). Für diese Arbeit wurde ASF als Adsorptiv aufgrund der Untersuchung von Gupta et al. (1996), der die Bindung von RCA und ASF in freier Lösung beschreibt, ausgewählt. Die Affinität zwischen RCA und ASF wurde von Okazaki et al. (1995) mittels Surface Plasmon Resonance bestimmt und mit  $K_a = 1,9 \times 10^8$  L/mol ( $K_d = 5,3 \times 10^{-9}$  mol/L) angegeben.

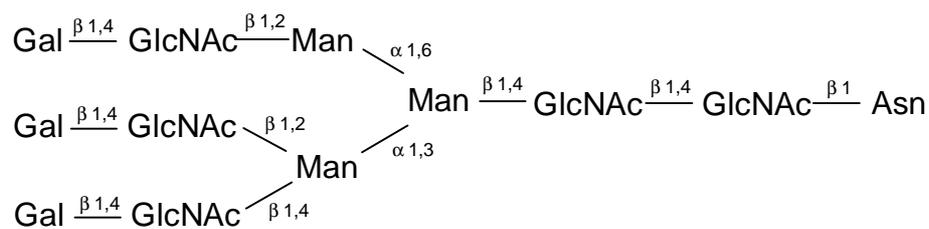


Abb. 3-5: Struktur eines triantennären N-Glykans von Asialofetuin

### Saures $\alpha_1$ -Glykoprotein

Saures  $\alpha_1$ -Glykoprotein (AGP) heißt auch Orosomucoid und ist ebenfalls ein im Blutplasma von Säugetieren vorliegendes Protein. Es enthält bi-, tri- und tetraantennäre Glykane, in denen Galactose, Mannose, Fucose sowie GlcNAc und NeuNAc enthalten sind. Je nach Spezies variieren die Strukturen des AGP. Für diese Arbeit wurde das  $\alpha_1$ -Glykoprotein aus Rinderserum als Adsorptiv für verschiedene Lektin-Adsorbentien eingesetzt. Die Molmasse beträgt  $42.000 \pm 2.000$  g/mol und der Kohlenhydratanteil etwa 26 %. Die biologische Funktion des AGP ist noch nicht eindeutig geklärt. Allerdings wurde im Zusammenhang mit bestimmten Krankheitszuständen ein erhöhter Serumgehalt von AGP festgestellt (Tamura et al., 1989; Hunter und Games, 1995).

### Ovomucoid

Ovomucoid ist ein Trypsin-Inhibitor aus dem Hühnereiweiß mit einer Molmasse von  $28.000 \pm 1.500$  g/mol. Der Anteil von Ovomucoid am Gesamtproteingehalt des

Hühnereiweißes beträgt etwa 10 %. Der Kohlenhydratanteil von Ovomuroid beträgt 20 - 25 % und enthält GlcNAc und NeuNAc als Hauptbestandteile (Watanabe et al., 1981). Ovomuroid wurde ausgewählt, da Bhavanandan und Katlic (1979) eine Bindung von Ovomuroid an WGA-Sepharose beschrieben. Es wurde als Adsorptiv für WGA und RCA eingesetzt.

### **Peroxidase**

Die in dieser Arbeit verwendete Peroxidase (POD) ist ein extrazelluläres Enzym aus dem Meerrettich. POD spaltet Wasserstoffperoxid und katalysiert dadurch die Oxidation verschiedener Substrate. Sie ist ein monomeres Glyko- und Häm-Protein mit einer Molmasse von 44.000 g/mol. Außer dem Eisen(III) in der Häm-Gruppe sind noch 2 Calciumionen pro Molekül enthalten. Es sind 8 neutrale Glykane vorhanden, die alle N-glykosidisch gebunden sind. Das Pflanzenenzym enthält bis zu 21 verschiedene Komponenten (Isoenzyme), von denen die meisten unterschiedliche Glykoformen sind. Meerrettich-POD wurde ausgewählt, da sie eine breite Anwendung in Forschung und Diagnostik für die Markierung und anschließende Analytik von Substanzen findet. Darüber hinaus wurde eine Fraktionierung von POD mittels Con A in der Literatur bereits beschrieben (Gajhede et al., 1997; Borchert et al., 1982).

### **Lactoferrin**

Lactoferrin ist ein eisenbindendes Glykoprotein, das in hohen Konzentrationen in Milch und anderen Körperflüssigkeiten vorhanden ist. Lactoferrin gehört zur Familie der Transferrine und ist an dem Ablauf von Entzündungsprozessen und der Immunantwort beteiligt. Es hat eine bakterizide Wirkung. Das in dieser Arbeit verwendete Lactoferrin stammt aus menschlicher Milch und ist ein monomeres Glykoprotein von 80.000 g/mol (Salmon et al., 1997).

### **Glucose Oxidase**

Die verwendete Glucose Oxidase (GOD) ist ein Flavoprotein aus dem Schimmelpilz *Aspergillus niger*. GOD ist eine Oxidoreduktase und katalysiert in Gegenwart von molekularem Sauerstoff die Oxidation von D-Glucose unter Freisetzung von Wasserstoffperoxid. GOD enthält FAD als prosthetische Gruppe und hat einen Kohlenhydratanteil von 24 - 30 %. Aufgrund der vorhandenen Trimannoside wurde GOD als Adsorptiv für Con A eingesetzt. GOD liegt als dimeres Glykoprotein mit einer Molmasse von etwa 160.000 g/mol vor (Abb. 3-6). Dieses Enzym ist von erheblichem kommerziellen Interesse. Es wird in Biosensoren, in der Lebensmittelherstellung, für die Produktion von Gluconsäure sowie für die Bestimmung von Glucose in medizinischen und Lebensmittelproben eingesetzt (Wohlfahrt et al., 1999; Kalisz et al., 1991).

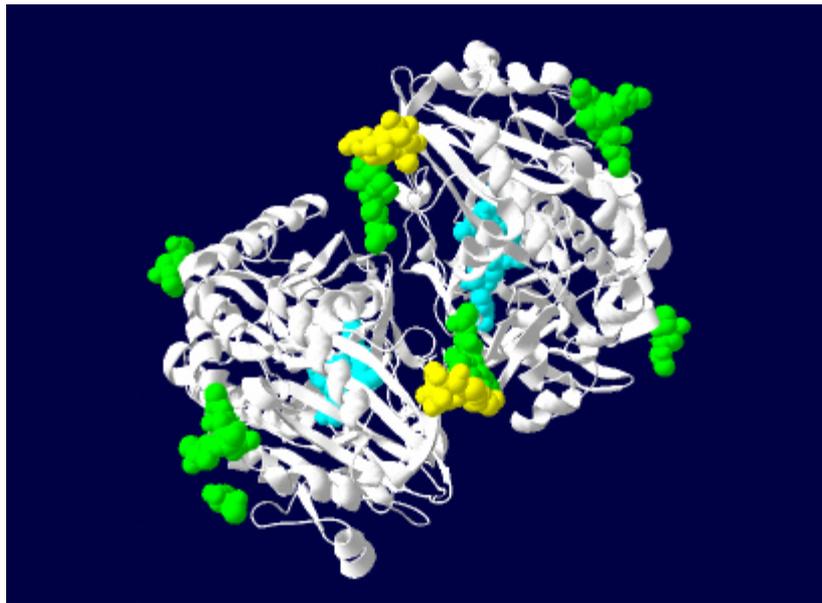


Abb. 3-6: *Glucose Oxidase*; hellblau: FAD, gelb: Trimannosid, grün: GlcNAc, (PDB-File: 1GPE; Wohlfahrt et al., 1999).

### 3.2.3 Glykolipide

Alle biologischen Membranen enthalten Lipidderivate als ihre Hauptbestandteile. Diese Moleküle spielen die wesentliche Rolle für die Ausbildung der Membranstruktur, da sie amphiphil sind und lamellare Doppelschichten ausbilden können. Neben den Phospholipiden und Steroiden liegen auch Glykolipide als Bestandteile der Membranen vor. Glykolipide bestehen aus einem Saccharid- und einem Lipidanteil, die kovalent verknüpft sind. In der Membran ist der lipophile Teil zwischen anderen Lipiden verankert (siehe auch Abb. 1-1), während das hydrophile Glykan in das wäßrige Medium der Zellumgebung hineinreicht. Bei Pflanzen und Algen kommen vor allem Glykoglycerolipide vor, bei denen der Oligosaccharidteil O-glykosidisch an ein 1,2-Di-O-Diacylglycerin gebunden ist. Bei Tieren kommen häufig Glykosphingolipide vor, die auf dem langkettigen Aminoalkohol Sphingosin basieren. Die biologischen Funktionen der Glykolipide sind, wie die der Glykoproteine, sehr vielseitig. Sie sind meist in Prozesse der Zellerkennung und Signalübertragung involviert. Dabei werden die Glykolipide unter anderem von Lektinen gebunden und erkannt. Die Glykosphingolipide kommen vor allem im Nervengewebe von Säugetieren vor und entstehen durch glykosidische Verknüpfung eines Saccharids mit N-Acyl-sphingosin. Der hydrophobe Grundkörper N-Acyl-sphingosin wird als Ceramid bezeichnet (grau unterlegt in Abb. 3-7). Die Cerebroside stellen die einfachsten Glykosphingolipide dar, da sie nur einfache Saccharide tragen. Als Beispiel ist in der Abbildung 3-7 das Galactocerebroside dargestellt, welches essentiell für die Zellmembran der Nervenzellen im Gehirn ist. Ganglioside sind komplexere Glykosphingolipide. Es sind Ceramid-Oligosaccharide, die mindestens einen Sialinsäurerest enthalten. Ganglioside machen

als Membranbestandteile der Zelloberfläche 6 % der Gehirnlipide aus. Glykosphingolipide sind in wässrigen Systemen oft nur schlecht und unter Ausbildung von Mizellen, Vesikeln oder lamellaren Schichten löslich. In organischen Lösungsmitteln lösen sie sich unter Ausbildung inverser Mizellen. Für Details sei auf Lehrbücher der Biochemie (z.B. Voet und Voet, 1994) oder auf die Artikel von Curatolo (1987) oder Hakomori und Igarashi (1995) verwiesen. Die in dieser Arbeit verwendeten Standardsubstanzen wurden in Hinblick auf das Vorhandensein von Galactose, Glucose und GlcNAc sowie nach ihrer Verfügbarkeit ausgewählt. Es wurden folgende Substanzen eingesetzt:

- Galactocerebroside (Typ I und II, aus Rinderhirn)
- Glucocerebroside (aus menschlicher Milz)
- Lactocerebroside (Rind)
- N-Stearyl-Lactocerebroside (halbsynthetisch)
- Monosialogangliosid-GM<sub>1</sub> (aus Rinderhirn)

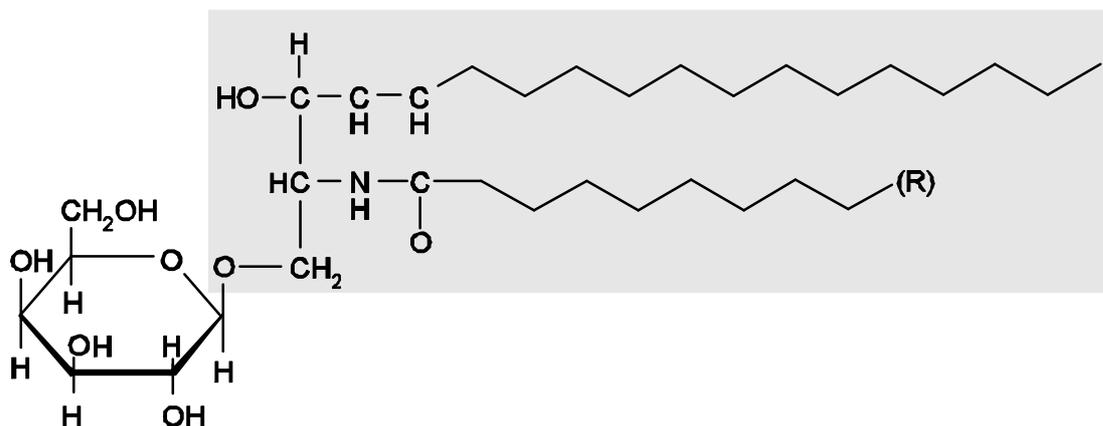


Abb. 3-7: Struktur eines Galactocerebroside (grau: N-Acyl-sphingosin, Ceramid)

### 3.2.4 Saccharide

Die Strukturen einiger Monosaccharide sind im Anhang (Kap. 12.1) dargestellt. Als Elutionszucker zur Verdrängung von spezifisch adsorbierten Glykokonjugaten wurden eingesetzt:

- Mannose für Con A
- Lactose für RCA
- N-Acetyl-glucosamin für WGA

Die Elutionszucker zeigen nur eine schwache Absorption im UV-Bereich ( $\lambda = 280$  nm) und können daher im Detektorsignal gut von den Proteinen unterschieden werden.

Als Adsorptive in der Lektin-Affinitätstrennung wurden weiterhin folgende Zuckerderivate eingesetzt, die durch die Funktionalisierung ein Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 300$  nm aufweisen:

- *p*-Nitrophenyl  $\alpha$ -D-Mannose (PNP-Man)
- *p*-Nitrophenyl  $\beta$ -D-Galactose (PNP-Gal)
- *p*-Nitrophenyl  $\alpha$ -D-Glucose (PNP-Glc)
- *p*-Nitrophenyl  $\beta$ -D-Lactose (PNP-Lac)

### 3.3 Natürliche Vielstoffgemische

#### Fetales Rinderserum

Die flüssige Phase des Blutes ist das Plasma. Serum entsteht aus Plasma durch die Abtrennung (Gerinnung) des Fibrinogens. Fetales Rinderserum (FBS, Fetal Bovine Serum) besteht aus etwa 3 g Gesamtprotein pro 100 mL (Baetz et al., 1976). Für eine Abtrennung von Fetuin aus Rinderserum bietet sich fetales Serum an, da Fetuin hier als eine Hauptkomponente mit einem Gehalt von 1 - 2,1 g / 100 mL vorhanden ist. Im adulten Rinderplasma liegen neben einer Reihe von anderen Proteinen nur etwa 40 - 60 mg Fetuin / 100 mL vor (Brown et al., 1992; Spiro, 1960). Fetuin wird üblicherweise unter Verwendung chemischer Trennverfahren entweder nach Pedersen (1947) mittels Ammoniumsulfatfällung oder nach Spiro (1960) durch eine kalte Ethanol-Extraktion aus Serum aufgereinigt. In dieser Arbeit sollte Fetuin auf der Basis des entwickelten Affinitätstrennverfahrens aus fetalem Serum aufgereinigt werden. FBS wurde in gefrorener Form kommerziell erworben.

#### Rinderhirn-Extrakt

Für die Affinitätstrennung von galactosehaltigen Glykolipiden aus einem natürlichen Vielstoff-Gemisch wurde ein Glykolipid-Rohextrakt aus Rinderhirn ausgewählt und bearbeitet. Dieses Material ist ein Chloroform-Methanol (1/2, v/v) Rohextrakt, der in getrockneter Form kommerziell erworben wurde (Brain Extract Type VII from Bovine Brain). Er enthält die wesentlichen Phospholipide und Glykolipide des Hirngewebes. Die enthaltenen Substanzen wurden mittels Dünnschichtchromatographie qualitativ untersucht. Der Rinderhirn-Extrakt wurde in wässrigem Puffer gelöst und mittels Affinitätstrennung an RCA-Adsorbentien fraktioniert.

## 4 Trägersysteme

### 4.1 Trägermaterialien für die Proteinreinigung

Bei der Produktion von Proteinen ist der Schritt der Aufreinigung, d.h. die Isolierung des Zielproteins aus einem Substanzgemisch, von großer Bedeutung für die Qualität des Produktes. Außerdem trägt dieser Schritt wesentlich zu den gesamten Produktionskosten bei. Oft werden für die Aufreinigung der Proteine chromatographische Methoden oder Methoden der selektiven Adsorption eingesetzt. Die für diese Techniken verwendeten Adsorbentien basieren auf weichen oder harten Trägermaterialien. Weiche Trägermaterialien auf der Basis von Agarose, Dextran oder Cellulose sind nicht nur bei der Aufreinigung im Labormaßstab, sondern auch im Produktionsmaßstab noch weit verbreitet, da sie preiswert sind, die für die Proteintrennung benötigten großen Porendurchmesser besitzen und aufgrund ihrer Hydrophilie eine geringe unspezifische Adsorption von Proteinen aufweisen. Innerhalb der adsorptiven Trenntechniken kommen auch harte Trägermaterialien auf der Basis von Silika oder synthetischen Polymeren zum Einsatz. Diese Materialien bieten viele Vorteile, was zu einem weit verbreiteten Einsatz bei analytischen Trennungen führte und in immer größeren Maße auch eine Verwendung im Produktionsmaßstab zur Folge hat. Ein wesentlicher Vorteil dieser Materialien ist ihre mechanische Stabilität, welche höhere Druckabfälle über die Trennsäule und damit höhere Volumenströme ermöglicht. Die Verwendung von kleineren Partikeln beschleunigt dabei den Stoffübergang. Dadurch daß die Partikel, ausgenommen einige Polymerträger, nicht quellen, kommt es bei verschiedenen Pufferzusammensetzungen oder pH-Werten nicht zu Volumenänderungen. Weiterhin ist ein Scale-up des Labormaßstabs unkompliziert und für das Trägersystem reproduzierbar durchzuführen. Das Resultat dieser Vorteile sind höhere Stoffdurchsätze und geringere Prozeßkosten. Obwohl es eine Reihe vielversprechender Untersuchungen auf diesem Gebiet gibt, besteht immer noch ein großer Forschungs- und Entwicklungsbedarf in Hinblick auf den Einsatz und die Bewertung neuer Trägermaterialien für die Aufreinigung von Proteinen, die den hohen Anforderungen an Effizienz, Produktqualität und Prozeßökonomie gerecht werden können (Conder und Hayek, 2000; Fahrner et al., 1999; Björklund und Hearn, 1997, Finette et al., 1997; Kakita et al., 1991; Anspach et al., 1990). Nachteilig können sich bei Silika die chemische Instabilität gegenüber hohen pH-Werten, die beispielsweise für die Sterilisation angewendet werden, und mitunter unspezifische Adsorption von Proteinen an der Silikaoberfläche erweisen. Letzteres kann durch gezieltes Endcapping oder das Belegen mit hydrophilen Polymeren optimiert werden. Die synthetischen Polymerträger hingegen weisen als Nachteil im wesentlichen die Quellfähigkeit auf.

## 4.2 Verwendete Trägersysteme

Generell ist eine Verwendung von meso- und makroporösen<sup>3</sup> Trägermaterialien in der Affinitätstrennung sinnvoll. Diese können sowohl mit mittleren Partikelgrößen (50 - 100  $\mu\text{m}$ ) als Niederdruck-Affinitätstrennung als auch mit Mikropartikeln (10 - 20  $\mu\text{m}$ ) als High-Performance Affinitätstrennung (HPLAC) eingesetzt werden. Die für diese Arbeit verwendeten Trägermaterialien wurden unter einer Reihe von Gesichtspunkten ausgewählt. Einerseits war es wichtig, makroporöse Träger zu verwenden, da die Lektin-Liganden und Adsorptive selbst Makromoleküle mit Molekülausmaßen von 80 Å oder mehr darstellen. Andererseits war es erstrebenswert, Träger mit möglichst großen spezifischen Oberflächen einzusetzen, da der hohe Platzbedarf der Liganden einen minimierenden Faktor für die Arbeitskapazität des Lektin-Adsorbens darstellt. Weiterhin sollten als Trägermaterialien Silika und Polymere verwendet werden; Agarose wurde als Vergleichsmaterial berücksichtigt.

### 4.2.1 Trägermaterialien auf Basis von Silika

Es wurden zwei synthetische, amorphe Silika-Materialien der Firma Grace Davison (Worms) verwendet. Tabelle 4-1 faßt die wichtigsten Kenndaten der Träger zusammen:

Tabelle 4-1 : Kenndaten der verwendeten Silika-Träger

Name (Hersteller)	Arbeits -kürzel	Mittl. Poren- durchmesser [Å] *	Poren- volumen [cm <sup>3</sup> /g] *	Partikel- durchmesser [ $\mu\text{m}$ ] **	Dichte [g/cm <sup>3</sup> ] **	Spez. Oberfläche [m <sup>2</sup> /g] ***
XWP-GEL P005	P005	500	1,0 – 1,2	253	2,23	76
XWP-GEL I005	I005	500	1,0 – 1,2	84	2,18	78

(\* Herstellerangaben; \*\* eigene Messungen; \*\*\* Messungen Universität Hamburg)

Die Partikelgrößenverteilungen wurden mit einer Analysetechnik auf der Basis der Laser-Streuung bestimmt. Der Tabellenwert gibt den Mittelwert der Größenverteilung von je 2 Messungen an. Die Dichte der Materialien wurde mittels Helium-Pyknometrie bestimmt. Der Tabellenwert gibt den Mittelwert von 5 Messungen an. Die Messungen der spezifischen Oberflächen wurden von der Arbeitsgruppe unter Prof. Moritz (Institut für Technische und Makromolekulare Chemie, Universität Hamburg) durchgeführt. Es

<sup>3</sup> Unporöse Trägermaterialien werden mitunter auch für Proteintrennungen verwendet (Lee, 1997), kamen aber wegen der Diskrepanz zwischen benötigter Oberfläche und noch praktikablen Partikel-Dimensionen für diese Arbeit nicht in Frage.

wurde die Methode der Stickstoff-Adsorption mit Auswertung nach BET (Brunauer, Emmet und Teller) verwendet. Die Herstellerangabe für beide Träger war 70 - 90 m<sup>2</sup>/g.

Die Abbildungen zeigen raster-elektronenmikroskopische Aufnahmen des Materials I005 (von der Abteilung Membranentwicklung, Institut für Chemie, GKSS-Forschungszentrum Geesthacht GmbH). Die irregulären Partikelformen sind im Bild links oben deutlich zu erkennen. Die Vergrößerung rechts unten zeigt die Porenöffnungen:

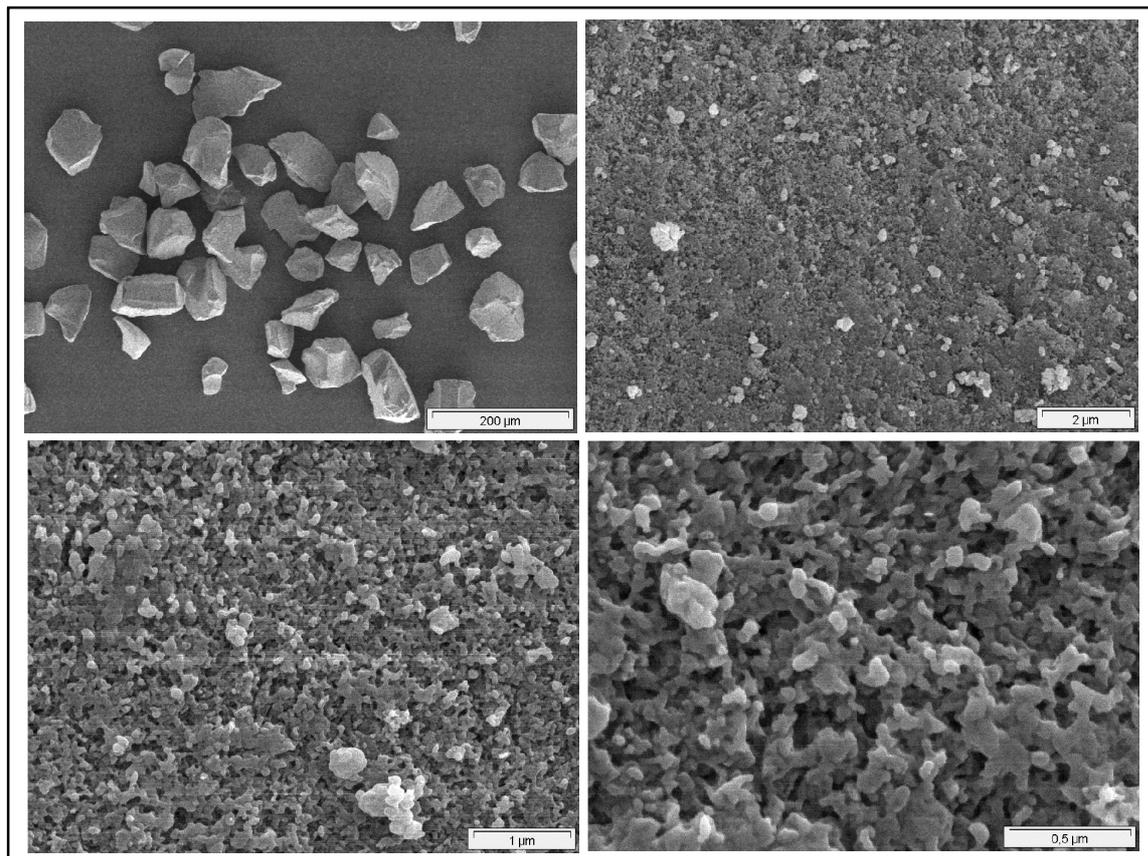


Abb. 4-1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von XWP I005.

#### 4.2.2 Trägermaterialien auf Basis synthetischer Polymere

Es wurde zum einen ein Polymer-Träger (Polymer G60-H20) verwendet, welcher eine Entwicklung der Arbeitsgruppe Prof. Moritz (Institut für Technische und Makromolekulare Chemie, Universität Hamburg) darstellt. Das Material ist ein Copolymer aus Glycidylmethacrylat und Ethylenglycoldimethacrylat, das im Suspensionsverfahren unter Zusatz von 20 % Hexanol als Porogen hergestellt wurde (Nau, 2001). Das makroporöse Material quillt in wässrigen Systemen nicht.

Weiterhin wurde ein Träger der Firma TosohBiosep (Stuttgart) verwendet. Bei diesem Material handelt es sich um ein hydrophiles, halbstarres Copolymer aus

Oligoethylenglykol, Glycidylmethacrylat und Pentaerythrol-Dimethacrylat (Turkova, 1993; S.192f). Das Material ist mit mittleren Partikelgrößen unter dem Namen „Toyopearl“ und mit Mikropartikeln für die HPLC-Anwendung unter dem Namen „TSKgel“ im Handel. Es zeichnet sich durch hohe Hydrophilie, minimale unspezifische Protein-Adsorption und eine hohe chemische Stabilität und pH-Stabilität (von pH 2 - 12) aus. Es ist autoklavierbar und wird von Mikroorganismen nicht angegriffen. Durch die Quellung des Materials in wässrigen Medien vermindert sich allerdings die Druckstabilität. Toyopearl wurde als loses, mit Tresylgruppen funktionalisiertes Material erworben; das verwendete TSKgel wurde, ebenfalls mit Tresylgruppen funktionalisiert, als fertig gepackte HPLC-Säule (7,5 mm × 75 mm Stahlsäule) erworben. Auf die Funktionalisierung wird näher im Kapitel 4.3 eingegangen. Die Tabelle 4-2 faßt die wichtigsten Kenndaten der Träger zusammen. Die Trägeranalytik wurde in Analogie zu den silikatischen Träger durchgeführt (siehe Kap. 4.2.1).

Tabelle 4-2: Kenndaten der verwendeten Polymer-Träger

Name (Hersteller)	Arbeits- kürzel	Mittl. Poren- durchmesser [Å] *	Druck- stabilität [bar] *	Partikel- durchmesser [µm]	Dichte [g/cm <sup>3</sup> ] **	Spez. Oberfläche [m <sup>2</sup> /g]
Toyopearl AF-Tresyl- 650 M	Toyo- pearl	1000	7	65 *	1,32	42 ***
TSKgel Tresyl-5PW	TSKgel	1000	20	10 *	-	-
Polymer G60-H20	H20	3000	-	103 **	1,29	29 *

(\* Herstellerangaben; \*\* eigene Messungen; \*\*\* Messungen Universität Hamburg)

Weiterhin wurde eine mit Con A funktionalisierte Trennsäule der Firma (Sigma-Aldrich, München) für HPLAC Trennungen verwendet. Die Trennsäule mit der Bezeichnung SigmaChrom AF-Con A hatte Dimensionen von 8 mm x 50 mm. Das hydrophile Trägermaterial wies Partikeldimensionen von 20 µm auf und war mit 15 mg Con A/g Träger funktionalisiert (Herstellerangaben), wobei keine volumenbezogene Angabe verfügbar war.

Die Abbildung 4-2 zeigt raster-elektronenmikroskopische Aufnahmen des Materials Toyopearl (von der Abteilung Membranentwicklung, Institut für Chemie, GKSS-Forschungszentrum Geesthacht GmbH). Im Bild links oben sind die gleichmäßig kugelförmigen Partikel zu erkennen. Die beiden unteren Vergrößerungen zeigen die Porenöffnungen, die im Vergleich zu I005 (Abb. 4-1) größer sind:

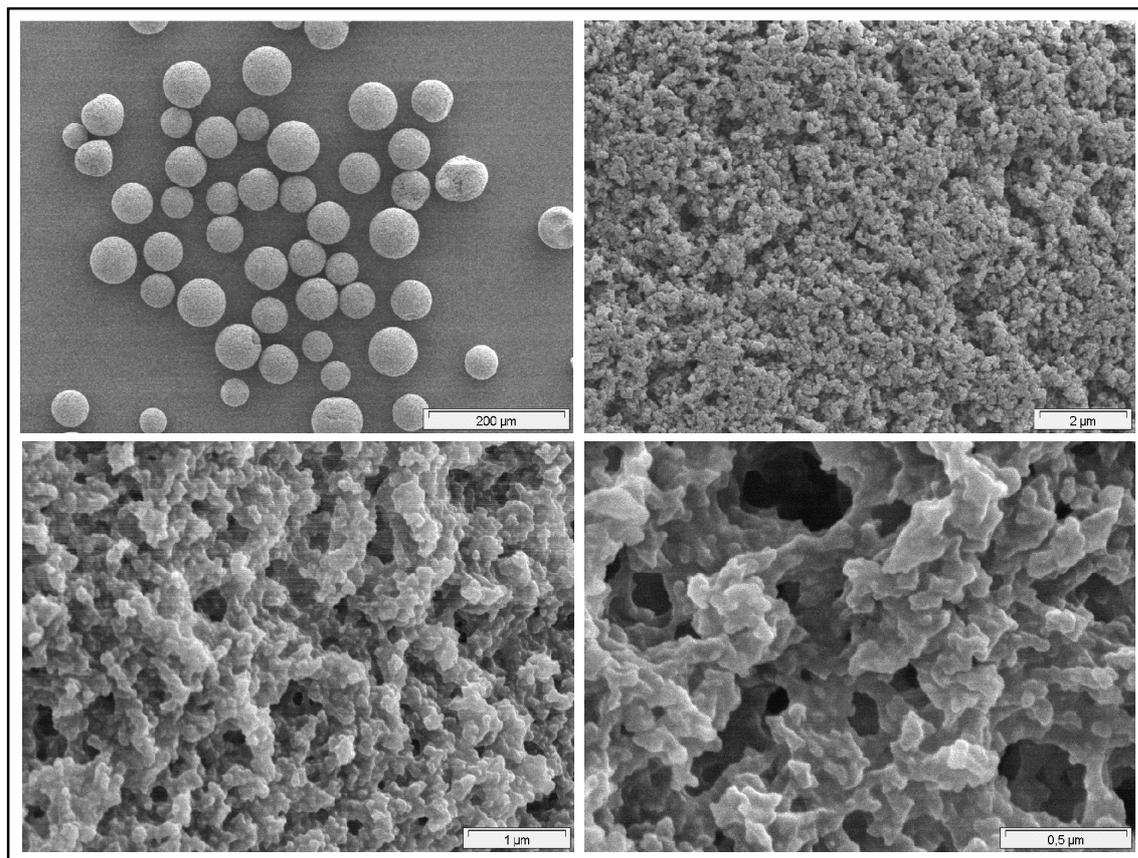


Abb. 4-2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Toyopearl

### 4.2.3 Trägermaterialien auf Basis von Agarose

Für vergleichende Untersuchungen mit den selbst hergestellten Adsorbentien wurden handelsübliche Lektin-Agarosen verwendet. Agarose ist ein quellfähiges Heteropolysaccharid aus Agar, der aus Rotalgen gewonnen wird. Die vorherrschenden Bausteinen der Agarose sind  $\beta$ -D-Galactopyranose und 3,6-Anhydro- $\alpha$ -L-Galactopyranose, die alternierend verknüpft und an etwa jedem 10. Galactoserest mit Schwefelsäure verestert sind (Walters, 1985, S. 1100). Folgende Lektin-Agarosen der Firma Sigma-Aldrich (München) kamen zum Einsatz:

#### 1) Concanavalin A - Agarose

Concanavalin A Typ V-B immobilisiert an vernetzte 4 %ige Agarose-Perlen; Con A wurde vom Hersteller an mit *p*-Nitrophenylchloroformiat funktionalisierte Agarose immobilisiert. Der Con A - Gehalt wird für die verwendete Charge mit 18 mg/mL angegeben. Der mittlere Partikeldurchmesser der Agarose-Perlen wurde auf 85  $\mu$ m bestimmt (He et al., 2001).

## 2) RCA - Agarose

*Ricinus communis* Agglutinin RCA<sub>120</sub> immobilisiert an vernetzte 4 %ige Agarose-Perlen; RCA wurde vom Hersteller an mit *p*-Nitrophenylchloroformiat aktivierte Agarose immobilisiert. Der Proteingehalt wird für die verwendete Charge mit 3,5 mg/mL angegeben.

## 3) WGA - Agarose

*Triticum vulgare* Agglutinin immobilisiert an vernetzte 4 %ige Agarose-Perlen; Der WGA-Gehalt wird mit 6 und 8 mg/mL für die beiden verwendeten Chargen angegeben.

### 4.3 Funktionalisierung

Zur Herstellung eines Affinitätsadsorbens muß der gewählte Ligand, in diesem Fall das Lektin, an die Trägermatrix immobilisiert werden. Dies geschieht aus Stabilitätsgründen möglichst durch eine kovalente Bindung. Generell besteht die Modifizierung eines Trägermaterials zur Herstellung eines Affinitätsadsorbens aus den folgenden Schritten:

- 1) Aktivierung der Trägermatrix mit funktionellen Gruppen (Funktionalisierung)
- 2) Immobilisierung des Liganden
- 3) Inaktivierung bzw. Blockierung der verbleibenden reaktiven Gruppen

Auf die Funktionalisierung der Trägermaterialien (1) wird im Folgenden eingegangen. Die Immobilisierung der Liganden (2) und die Inaktivierung der funktionellen Gruppen (3) werden im Kapitel 6 behandelt.

#### Funktionalisierung der Trägermatrix

Sowohl die in der Literatur beschriebenen als auch die im Handel angebotenen Varianten der möglichen Funktionalisierungen von Trägermaterialien sind vielfältig. Voraussetzung für die Ligandanbindung ist das Vorhandensein von entsprechenden Gruppen am Liganden, die mit der gewählten funktionellen Gruppe des Trägers reagieren können. Es werden unter anderem folgende Varianten beschrieben (Narayanan und Crane; 1990; Carlsson et al., 1989; Nilsson und Mosbach, 1984):

- Aktivierung mit Cyanbromid
- Funktionalisierung mit Carboxylgruppen
- Funktionalisierung mit Aminogruppen
- Funktionalisierung mit Epoxidgruppen
- Funktionalisierung mit organischen Sulfonylchloriden (Tosylchlorid, Tresylchlorid)

Die Immobilisierung der Liganden erfolgt bei individuellen Reaktionsbedingungen und ist häufig unter Verwendung weiterer Chemikalien durchzuführen. Klassisch wird für

die Immobilisierung an Agarose Cyanbromid verwendet. Diese Methode weist aber einige Nachteile auf, wie zum Beispiel die geringe Stabilität der Cyanbromidaktivierung an sich, was die Lagerung der funktionalisierten Träger einschränkt (Nilsson und Mosbach, 1984, S.57). Weiterhin ist die Bindung der Liganden verhältnismäßig instabil (insbesondere bei pH-Werten  $< \text{pH } 5$  und  $> \text{pH } 10$ ), was zur Auswaschung führen kann (Björklund und Hearn, 1997, S.113; Narayana und Crane, 1990, S. 14; Lasch und Koelsch, 1978, S.186). Die Immobilisierung an Epoxidgruppen erfordert 8 - 48 h bei pH-Werten von pH 8,5 - 12. Die Anbindung von Proteinen an mit Carboxylgruppen aktivierte Matrices erfolgt bei pH 4 - 6 in 24 - 48 h. Dabei ist die Verwendung von Carbodiimid für die Reaktion notwendig. Die Immobilisierung von Proteinen an mit Aminogruppen substituierte Träger erfolgt ebenfalls unter Verwendung weiterer Chemikalien wie Carbodiimid oder  $\text{NaCNBH}_3$  (TosohBiosep, 2001; Narayanan und Crane, 1990; Carlsson et al., 1989).

Für diese Arbeit wurde aus mehreren Gründen eine Funktionalisierung mit Tresylchlorid (2,2,2-Trifluorethansulfonyl-chlorid) ausgewählt. Die Funktionalisierung von Trägermaterialien mit Tresylchlorid wurde bereits von Nilsson und Mosbach (1981, 1984, 1987) beschrieben. Sie eignet sich besonders für die Anbindung von Proteinen, da die Reaktion unter milden Bedingungen stattfindet (pH 7-9) und die Proteine nicht schädigt. Die Bindung erfolgt über primäre Aminogruppen oder Thiolgruppen der Aminosäuren des Proteins. Die Reaktion ist vergleichsweise schnell (wenige Stunden) und läuft ohne den Einsatz weiterer Chemikalien ab. Die Tresylaktivierung ist bei trockenem Material oder bei Lagerung in verdünnter Salzsäure einige Monate stabil.

Mitunter ist es sinnvoll, den Träger unter Einbindung eines sogenannten Spacers, eines Abstandshalters, zu funktionalisieren. Dieser Spacer vergrößert die Distanz zwischen Trägeroberfläche und Ligand und kann daher zu einer besseren Zugänglichkeit des Liganden beitragen. Dieses ist insbesondere bei niedermolekularen Liganden und makromolekularen Adsorptiven sinnvoll. Auch bei makromolekularen Liganden, wie den Lektinen, kann die Verwendung eines Spacers von Vorteil sein. Übliche Spacer bestehen aus zwei terminalen funktionellen Gruppen und einer in der Länge wählbaren C-Kette wie z.B. 6-Aminohexansäure (Walters, 1985, S. 1102).

Die Trägermaterialien auf Silika-Basis und der Polymerträger H20 lagen zunächst als Rohmaterialien vor, mit Silanolgruppen einerseits und Epoxidgruppen andererseits auf der Oberfläche. Diese Materialien wurden in der Arbeitsgruppe unter Prof. Niemeyer am Institut für Thermodynamik (Universität der Bundeswehr, Hamburg) funktionalisiert bzw. mit Tresylchlorid aktiviert (Cartellieri et al., 2000). Es wurden jeweils Chargen mit und ohne Einbindung des Spacers Butandioldiglycidylether hergestellt. Bei dem Polymerträger H20 konnte direkt tresyliert werden, da bereits Epoxidgruppen auf der Oberfläche vorlagen. Die tresylierten Träger wurden unter verdünnter Salzsäure gelagert und für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt. Die verschiedenen Varianten der Funktionalisierung sind im Anhang (Kap. 12.5.2) schematisch aufgezeigt. Die verwendeten Trägermaterialien Toyopearl und TSKgel der Firma TosohBiosep

---

wurden mit Thresylgruppen funktionalisiert und in trockener Form bezogen und für die Immobilisierung der Lektine eingesetzt.

## 5 Analytik

### 5.1 Quantitative Proteinanalytik

Für die Quantifizierung der Liganden während der Immobilisierung sowie für die Analytik der Glykoproteine als Adsorptive in der Affinitätstrennung wurde eine einheitliche Proteinanalytik durchgeführt.

#### 5.1.1 Prinzip

Die Konzentration von Proteinen und Glykoproteinen wurde auf der Grundlage der Proteinbestimmung nach Bradford analysiert (Bradford, 1976). Das Prinzip basiert auf einer Farbstoffanlagerung an das Protein, die quantitativ spektrophotometrisch erfaßt werden kann. Durch die Anlagerung des polyzyklischen Farbstoffs Coomassie Brilliant Blau G-250 an die Polypeptidkette des Proteins tritt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von  $\lambda = 465$  nm (braunrote Form) zu einer Wellenlänge von  $\lambda = 595$  nm (blaue Form) ein. Aus dem Mechanismus wird deutlich, daß die gebundene Farbstoffmenge für jedes Protein individuell unterschiedlich ist, weshalb für eine genaue Quantifizierung das in der Probe vorliegende Protein selbst als Standard verwendet werden sollte. Proteine weisen generell eine größere Empfindlichkeit auf als Glykoproteine. Wenn die Probenproteine nicht als Standardmaterial zur Verfügung stehen, ist es üblich, BSA (Bovines Serum Albumin) als Standard zu verwenden und den Proteingehalt „nach Bradford“ anzugeben. Da der Methode eine nichtstöchiometrische Anlagerung zugrunde liegt, tritt ein linearer Zusammenhang zwischen Meßsignal und Konzentration nur in einem kleinen Bereich auf. Durch geeignete Festlegung des Meßbereichs kann aber mit guter Übereinstimmung eine lineare Ausgleichsfunktion für die Auswertung herangezogen werden.

#### 5.1.2 Durchführung

Es wurde ein kommerziell erhältliches Bradford-Farbreagenz der Firma Sigma-Aldrich (München) verwendet. Um den Protein- und Reagenzienverbrauch minimal zu halten und den Probendurchsatz zu erhöhen, wurde die Methode auf die Messung in Mikrotiterplatten angepaßt und in einem entsprechenden Spektrometer vermessen. Es wurden Platten mit 96 Probenplätzen eingesetzt. Da der Farbstoff an Oberflächen adsorbiert, wurden Einwegplatten verwendet. Es wurden jeweils 100  $\mu$ L Proben- und Standardlösungen in die Küvetten vorgelegt und mit 100  $\mu$ L Reagenz versetzt. Nach 10 min wurden die Extinktionen bei  $\lambda = 595$  nm vermessen und gegen einen Reagenzien-Blindwert ausgewertet.

### 5.1.3 Validierung

Die im Kapitel 5.1.2 beschriebene Bestimmung wurde für zwei Proteine (BSA, Con A) und zwei Glykoproteine (RCA, ASF) validiert. Methodisch wurde dabei nach den Richtlinien der „International Conference on Harmonisation“ für die Qualifizierung von Analysemethoden vorgegangen (ICH Steering Committee, 1996).

Die Arbeitsvorschrift der Bestimmung ist im Anhang (Kap. 12.4.1) beschrieben. Jedes Protein wurde 4fach vermessen und die arithmetischen Mittelwerte der Extinktionen verwendet. Die Linearität des Arbeitsbereiches wurde über 6 Standardkonzentrationen (0,2 - 1,0 µg) bestimmt. Es wurden für jeweils 3 verschiedene Probenkonzentrationen von jeweils 3 Einzelproben innerhalb des Arbeitsbereiches die Genauigkeit (Wiederfindung) und die Wiederholpräzision ermittelt. Weiterhin wurden Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ermittelt.

In Tabelle 5-1 sind die wichtigsten analytischen Kenndaten der validierten Methode dargestellt. Alle Proteine zeigten im angegebenen Arbeitsbereich mit Korrelationskoeffizienten von 0,9955 - 0,9992 eine gute Linearität. Die Empfindlichkeit der Bestimmung war erwartungsgemäß für die Proteine BSA und Con A etwas größer als für die Glykoproteine RCA und ASF.

Tabelle 5-1 : Übersicht analytischer Kenndaten der validierten Methode

Kenndaten		BSA	Con A	RCA	ASF
Linearer Meßbereich [µg]		0,2 – 1,0	0,2 – 1,0	0,2 – 1,0	0,2 – 1,0
Korrelationskoeffizient R		0,9955	0,9992	0,9961	0,9977
Empfindlichkeit S [Ext/µg]		0,2053	0,1299	0,1136	0,1254
Mittlere Wiederfindung [%] (je n = 3)	0,4 µg	120,0	120,0	106,0	119,8
	0,6 µg	105,2	100,4	91,1	108,1
	0,8 µg	104,1	104,6	98,2	110,3
Wiederholpräzision / Relative Standardabw. $s_{rel}$ [%] (n = 3)	0,4 µg	3,3	5,4	6,2	1,5
	0,6 µg	6,3	1,9	5,6	2,3
	0,8 µg	2,3	1,9	6,9	2,0
Nachweisgrenze [µg/100µl]		0,022	0,032	0,040	0,036
Bestimmungsgrenze [µg/100µL]		0,067	0,106	0,121	0,110

Bei den mittleren Wiederfindungen traten insgesamt Abweichungen von 0,4 - 20 % auf, wobei die Abweichungen bei den höheren Probenkonzentrationen (0,6 µg; 0,8 µg) nur

0,4 -10,3 % betragen. Die Wiederholpräzisionen (Streuung durch zufällige Fehler) betragen 1,5 – 6,9 %.

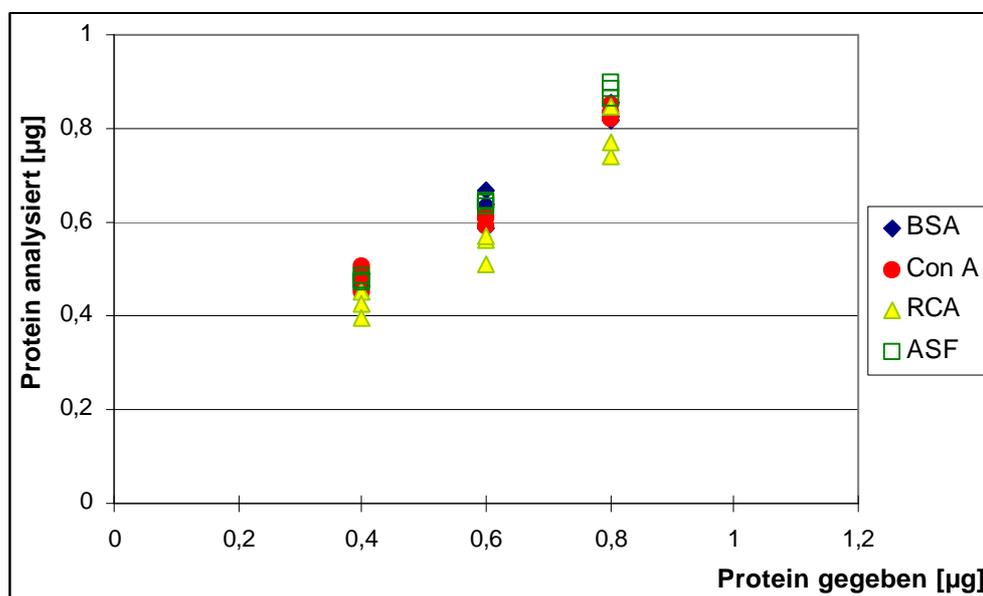


Abb. 5-1: Wiederfindungen der analysierten Proteine

Abbildung 5-1 veranschaulicht die Einzelwerte für die Wiederfindungen der jeweiligen Proteine bei den Probenmengen 0,4 µg, 0,6 µg und 0,8 µg. Diese Übersicht zeigt, daß die Bestimmung insgesamt gute Ergebnisse lieferte, wobei die Einzelmeßwerte um die konventionell wahren Werte streuen. Dabei fällt auf, daß die Bestimmung für 0,4 µg tendenziell gegenüber dem wahren Wert etwas zu hohe Ergebnisse lieferte. Die Wiederfindungen wichen mit 106 - 120 % nach oben ab und waren vom Betrag her größer als die Wiederholpräzision, die hier mit Werten von 1,5 – 6,2 % ähnlich hoch lag wie bei den Proben mit 0,6 und 0,8 µg. Das weist darauf hin, daß hier zu der Streuung durch zufällige Fehler noch ein systematischer Fehler, beispielsweise durch die Einwaage oder aus einem Verdünnungsschritt, beitrug. Die Bestimmungsgrenzen lagen etwa um den Faktor 2 unterhalb der kleinsten Standardkonzentration von 0,2 µg. Einzelheiten zur Validierung finden sich im Anhang (Kap. 12.4.2).

## 5.2 Quantifizierung der Immobilisierung

Bei der Herstellung von Affinitätsadsorbentien ist es wichtig, die an den Träger immobilisierte Ligandmenge zu quantifizieren. Da es sich bei den hier verwendeten Liganden um Proteine und Glykoproteine handelte und die Analytik schnell und einfach sein sollte, wurde die Proteinbestimmung nach Bradford als Überstandsanalytik angewendet.

### 5.2.1 Bestimmung der Immobilisierungsausbeute

Der Überstand der Reaktionslösung wurde am Ende der jeweiligen Reaktionszeit gegen die entsprechende Stammlösung ( $m_0$ ) des zu immobilisierenden Lektins vermessen. Aus dem Verlust an Protein im Überstand ( $m_0 - m_s$ ) wurde die immobilisierte Menge Lektin pro g oder mL Träger berechnet und die Ausbeute  $y$  in % bestimmt:

$$y [\%] = \frac{(m_0 - m_s) * 100}{m_0} \quad [1]$$

$y$  = Ausbeute [%]

$m_0$  = Menge Lektin aufgegeben [mg]

$m_s$  = Menge Lektin im Überstand [mg]

### 5.2.2 Verifizierung der Überstandsanalytik

Es galt, für den weiteren Verlauf der Arbeit sicherzustellen, daß sich mit der oben beschriebenen Überstandsanalytik tatsächlich die am Träger immobilisierte Lektinmenge hinreichend genau quantifizieren läßt. In der Literatur werden verschiedene Methoden beschrieben, wie man den Proteingehalt eines Affinitätsträgers bestimmen kann, wie UV-Absorption, Aminosäure-Analyse nach Hydrolyse des Adsorbens oder die Elementanalyse des Adsorbens (Nilsson und Mosbach, 1984).

Um die Zuverlässigkeit der Überstandsanalytik und damit die Bestimmung der Ausbeute der Immobilisierung nach Kap. 5.2.1 zu überprüfen wurden stichprobenartig mit BSA und Con A belegte Träger mittels Elementaranalyse auf ihren Stickstoffgehalt analysiert. Diese Analytik wurde von der Arbeitsgruppe unter Prof. Niemeyer (Institut für Thermodynamik, Universität der Bundeswehr, Hamburg) durchgeführt. Nach der Immobilisierung der Proteine an verschiedene Adsorbentien wurden diese gründlich gewaschen (15mal), getrocknet und vermessen. Der ermittelte Stickstoffgehalt wurde über die Herstellerangaben des Stickstoffgehalts für das jeweilige Protein in den Proteingehalt umgerechnet.

In der Tabelle 5-2 sind die Ergebnisse von Überstandsanalytik und Elementaranalyse gegenübergestellt. Es wird die prozentuale Abweichung der Elementaranalyse von der Überstandsanalytik angegeben.

*Tabelle 5-2 : Vergleich von Überstandsanalytik und Elementaranalyse*

Träger	Protein	Überstands-analytik [mg/g]	Elementar-analyse [mg/g]	Abweichung [%]
I005 (I)	BSA	17,3 (n = 1)	15,9	- 8
I005 (I)	BSA	9,9 (n = 2)	11,0	+ 11
P005 (I)	BSA	13,8 (n = 2)	17,9	+ 30
I005 (II)	BSA	12,7 (n = 2)	14,0	+ 10
I005 (II)	Con A	38,3 (n = 2)	41,3	+ 8
Toyopearl	Con A	34,6 (n = 5)	27,4	- 21

Die Ergebnisse aus indirekter und direkter Quantifizierung stimmen in der Größenordnung gut überein. Die Abweichungen von bis zu 30 % sind insofern verständlich, da es sich um zwei unterschiedliche Verfahren handelt, die sich in der Probenvorbereitung erheblich unterscheiden. Außerdem mußten bei einigen Trägern volumenbezogene in massenbezogene Werte umgerechnet werden (siehe Umrechnungstabelle Kap. 12.5.1). Es konnte festgestellt werden, daß die Überstandsanalytik tatsächlich am Träger gebundenes Protein bestimmt und hinreichend richtige Werte für die immobilisierte Ligandmenge liefert.

### 5.2.3 Waschbeständigkeit

In einem ergänzenden Versuch wurde die Waschbeständigkeit eines an einem Träger immobilisierten Lektins untersucht. Dies sollte ebenfalls dazu dienen, eine kovalente Bindung von einer adsorptiven Anlagerung des Liganden zu unterscheiden. Ein mit 15,6 mg Con A belegter Silikaträger (0,85 mL) P005 (I) wurde im Anschluß an die Immobilisierung fünfmal mit 2,0 mL 0,2 M Tris-HCl Puffer pH 7,5 gewaschen und die Waschfraktionen auf ihren Proteingehalt hin untersucht (Kap. 5.1.2, Arbeitsvorschrift Kap. 12.4.1).

In Abbildung 5-2 sind die Ergebnisse zur Untersuchung der Waschbeständigkeit der Immobilisierung dargestellt. Es wurden in der Summe 26 µg Con A vom Träger herunter gewaschen, was im Vergleich zur immobilisierten Menge von 15,6 mg etwa 0,2 % entspricht und zu vernachlässigen ist. Nach dem 2. Waschen konnte kein nennenswerter Proteingehalt mehr in der Waschfraktion festgestellt werden.

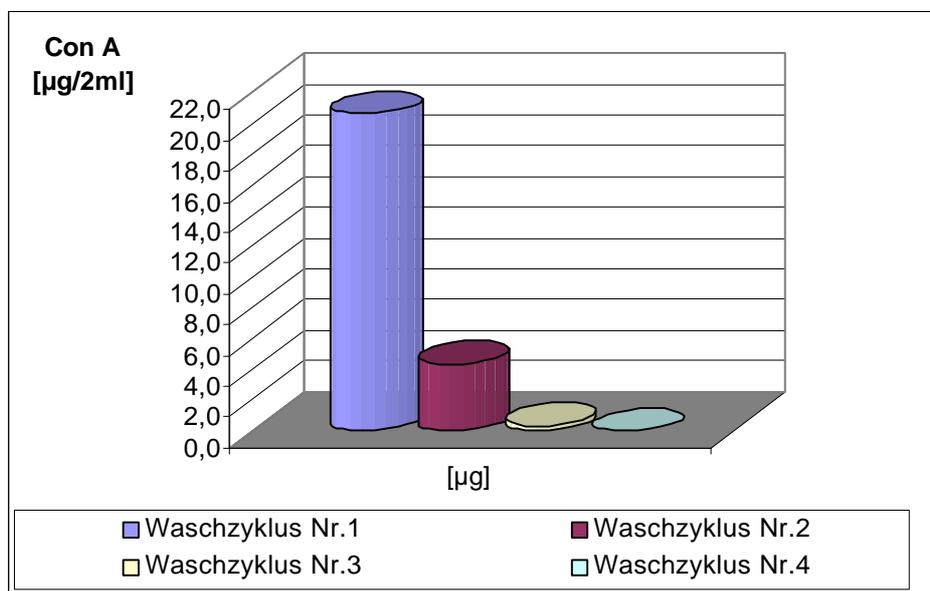
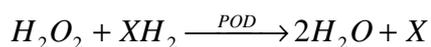


Abb. 5-2 : Waschbeständigkeit von immobilisiertem Con A

Dieses Ergebnis zeigt, daß sich das immobilisierte Con A nicht vom Träger abwaschen ließ. Es unterstreicht die Ergebnisse der Elementaranalyse (Abschnitt 5.2.2) und ist eine weitere Bestätigung dafür, daß den Ergebnissen der Überstandsanalytik für die quantitative Bestimmung der immobilisierten Ligandmenge im wesentlichen kovalente Bindungen und nicht Adsorption am Träger zugrundeliegen.

### 5.3 Enzymaktivität von Peroxidase

Das im Kapitel 3.2.2 beschriebene Enzym Peroxidase (POD) spaltet Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und oxidiert dadurch ein Substrat. Die Enzymaktivität von POD läßt sich durch den Einsatz von als Substrat geeigneten Farbreagenzien photometrisch quantifizieren. Für die Umsetzung zu Beginn der Reaktion gilt:



$XH_2$  = Leukofarbstoff

X = Farbstoff

In dieser Arbeit wurde ein kommerziell erhältlicher Aktivitätstest für POD (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. In der Bestimmung wird der Farbstoff ABTS (2,2'-Azinobis(3-ethylbenzthiazolinsulfonat)) in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in einem Glycin-Citronensäure-Puffer eingesetzt. Die Umsetzung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch POD führt zur Oxidation des ABTS und damit zu einer Veränderung des Absorptionsmaximums. Diese Änderung wurde zu Beginn der Umsetzung (Anfangsreaktionsgeschwindigkeit) bei  $\lambda = 405 \text{ nm}$  quantitativ vermessen. Aus der Änderung der Extinktion pro Zeiteinheit  $dE/dt$  ließ sich die Enzymaktivität  $A_E$  der POD in der Einheit Unit [U] pro Volumen berechnen (siehe Gleichung 2).

$$A_E = \frac{V_{ges} * dE / dt}{\epsilon * D * V_p} \quad [\text{U/L}] \quad [2]$$

$A_E$  = Enzymaktivität [U/L]

$V_{ges}$  = Volumen in der Küvette = 1 mL

E = Extinktion

$dE/dt$  = [ $\text{min}^{-1}$ ]

$\epsilon$  = Extinktionskoeffizient von ABTS =  $1,86 \text{ L} * \text{mmol}^{-1} * \text{mm}^{-1}$

D = Schichtdicke der Küvette = 10 mm

$V_p$  = Volumen der Probe = 0,5 mL

Die Bestimmung der Enzymaktivität sollte für die Bewertung der Affinitätstrennung der POD herangezogen werden und wurde sowohl auf das kommerziell erhältliche Ausgangsprodukt als auch auf verschiedene in der Affinitätstrennung erhaltene Fraktionen angewendet.

## 5.4 Gel-Elektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgel Elektrophorese (SDS PAGE) wurde eingesetzt, um das fetale Rinderserum zu analysieren und die Reinheit und Identität der mittels Affinitätstrennung gewonnenen Proteinfraction zu überprüfen. Es wurde eine Mini-Protean-3 Zelle der Firma BioRad (München) eingesetzt. Die Polyacrylamidgele wurden ebenfalls von BioRad bezogen. Die Tris-HCl-Gele (10 % Acrylamid) hatten jeweils 10 Probenplätze von 30  $\mu\text{L}$ . Als Laufpuffer wurde ein Tris-HCl-Puffer pH 8,3 verwendet. Es wurden 4–18  $\mu\text{g}$  der Standardproteine und Proben aufgegeben. Die Trennung erfolgte bei 200 V und 20–25  $^\circ\text{C}$  in etwa 35 min. Die Färbung erfolgte mit

einer Coomassie-Färbelösung und einer methanolhaltigen Entfärbelösung (BioRad, München). Als Marker wurde ein vorgefärbter Proteinstandard mit einem Molmassenbereich von 10.000 g/mol bis 250.000 g/mol verwendet (BioRad, München).

## 5.5 Glykolipidanalytik

Die qualitative Analytik der Glykolipide wurde mittels Dünnschichtchromatographie (DC) vorgenommen. Dabei wurden die als Standardmaterialien vorhandenen Glykolipide (siehe Kap. 3.2.3), der Glykolipid-Rohextrakt aus Rinderhirn (siehe Kap. 3.3) sowie die in der Affinitätsstrennung erhaltenen Fraktionen in Chloroform/Methanol (2/1, v/v) gelöst. Die Konzentration betrug jeweils 2 mg/mL. Es wurden jeweils 5  $\mu$ L (entsprechend 10  $\mu$ g Glykolipid) auf die DC aufgetragen. Als stationäre Phase dienten Kieselgel 60 Dünnschichtfolien der Firma Merck (Darmstadt). Als mobile Phase wurde eine Mischung aus Chloroform/Methanol/Wasser (11/4/0,6, v/v/v) verwendet. Die Detektion der entwickelten DC Folien erfolgte mit einem Anisaldehyd-Sprühreagenz (Methanol/Eisessig/Schwefelsäure/Anisaldehyd, 2,5/5/4/0,25, v/v/v/v). Nach Erhitzen der Folie auf dem Heizblock (100 °C) für ca. 5 min waren die Glykolipide als farbige Flecken sichtbar.

## 6 Immobilisierung

Für die Immobilisierung von Proteinen an tresylierte Trägermaterialien werden in der Literatur unterschiedliche Bedingungen beschrieben (Nilsson und Mosbach, 1987; Nakamura et al., 1990, 1989). Die Immobilisierung der Proteine wird in wäßrigen Puffern mit pH-Werten von 7-9 vorgenommen. Dabei begünstigt ein höherer pH-Wert die Anbindung, da Hydroxidionen die Reaktion katalysieren (Jennissen, 1995, S.120). Als Reaktionstemperatur werden in der Literatur 4 °C und 25 °C vorgeschlagen, wobei höhere Temperaturen die Reaktion beschleunigen (Nakamura et al., 1989). Die Puffersubstanzen dürfen keine primären Aminogruppen oder Mercaptogruppen enthalten. Im Anschluß an die Immobilisierung müssen verbleibende Tresylgruppen mit einem Überschuß an einem niedermolekularen Reagenz wie Ethanolamin oder Tris abgesättigt werden. Die optimalen Bedingungen für die Immobilisierung hängen auch von den jeweils verwendeten Trägern und Liganden ab. Daher wurden die einflußnehmenden Parameter der Immobilisierung in dieser Arbeit untersucht und eine Methodenoptimierung vorgenommen.

Die Abbildung 6-1 zeigt schematisch ein mit Tresylgruppen aktiviertes Trägermaterial, an das Con A immobilisiert wird.

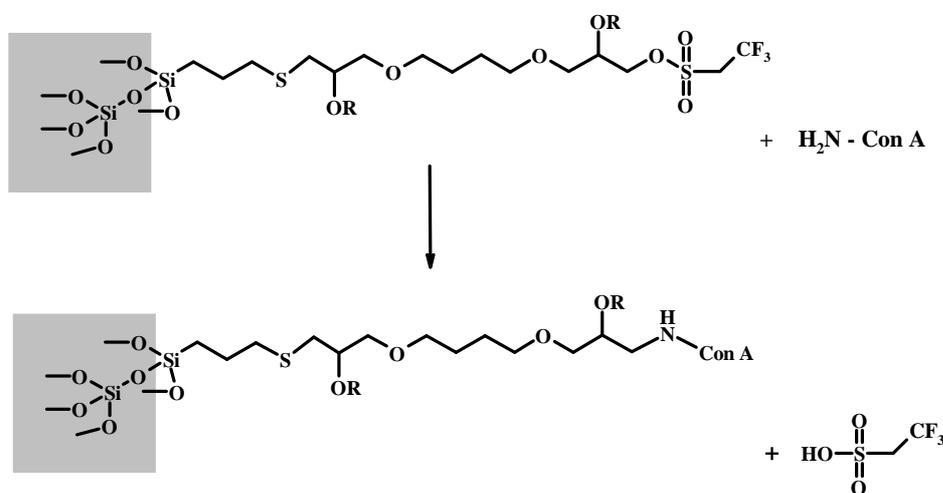


Abb. 6-1: Immobilisierung von Con A an einen tresylierten Silika-Träger

### 6.1 Arbeitsvorschriften

Zu Beginn dieses Kapitels werden die optimierten Arbeitsvorschriften für die Immobilisierung der Lektine RCA, Con A und WGA vorgestellt. Das Trägermaterial wurde dabei jeweils mit dem im Kopplungspuffer gelösten Lektin versetzt und während

der Kopplung durch gelegentliches Umschütteln vermischt. Die Tabelle 6-1 faßt die wichtigsten Reaktionsbedingungen für die Anbindung an die verwendeten losen Trägermaterialien zusammen.

*Tabelle 6-1: Bedingungen zur Immobilisierung der Lektine*

Lektin	Menge Träger [mg]	Kopplungspuffer	Menge Lektin [mg]	Volumen Puffer [mL]	Temp. [°C]	Zeit [h]
RCA	400	0,5 mol/L Phosphat pH 8,0; 0,1 mol/L NaCl	10	4	20 - 25	4 oder 20
Con A	400	s.o.	16	4	20 - 25	4
WGA	400	s.o.	16	4	20 - 25	4

### Besonderheiten

- RCA wurde in Phosphatpuffer gelöst und mit Natriumazid stabilisiert erworben. Vor der Immobilisierung wurde das Lektin gegen Phosphatpuffer dialysiert, um das Natriumazid zu entfernen (2 Tage, 14000 Da Größenausschluß der Dialysemembran). Es hatte sich zuvor gezeigt (Kap. 6.3.3), daß Natriumazid die Anbindung des Lektins an Tresylgruppen beeinflusst.
- Bei der Immobilisierung der Lektine RCA und Con A wurde jeweils ein 50facher molarer Überschuß an Lactose bzw. Mannose zugegeben, um die Bindungsstellen während der Anbindung zu stabilisieren.
- Im Anschluß an die Immobilisierung wurden die freien Tresylgruppen durch einen Überschuß an Tris abgesättigt. Dafür wurden die Träger für 2 h mit 0,2 mol/L Tris-HCl-Puffer pH 8,0 versetzt. Im Anschluß wurden die Träger sorgfältig mit dem jeweiligen Arbeitspuffer gewaschen und im Lagerpuffer aufbewahrt.

*Tabelle 6-2: Arbeits- und Lagerpuffer*

Lektin	Arbeitspuffer	Lagerpuffer
RCA	0,01 mol/L Phosphat pH 7,2 0,15 mol/L NaCl	Arbeitspuffer + 0,02 % Natriumazid
Con A	0,1 mol/L Acetat pH 5 o. 6 0,1 mol/L NaCl; 1mmol/L Ca <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Arbeitspuffer + 0,02 % Thimerosal
WGA	0,1 mol/L Phosphat pH 7,4 0,1 mol/L NaCl	Arbeitspuffer + 0,02 % Natriumazid

Die Immobilisierung des Lektins RCA an die TSKgel-Säule erfolgte im Durchflußverfahren. Die Säule wurde mit Wasser und Kopplungspuffer gespült. Anschließend wurde eine Lösung von 20 mg RCA in 6 mL Puffer bei 20°C und 0,2 mL/min über die Säule zirkuliert. Nach 11 h wurde die Reaktion gestoppt und für 2 h mit Tris-HCl pH 8,0 gespült. Die fertige RCA Säule wurde wie für die losen Materialien beschrieben gewaschen und gelagert.

Wenn die tatsächliche Durchführung der Immobilisierung von den oben genannten Bedingungen abwich, wie beispielsweise während der Methodenentwicklung, wird auf die Änderungen hingewiesen.

## 6.2 Kinetik der Immobilisierung

Für den Erhalt der biologischen Aktivität der Lektine und eine schnelle Einsatzfähigkeit der Adsorbentien sollte die Anbindung der Lektine möglichst wenig Zeit beanspruchen. Um eine optimale Reaktionszeit für die Anbindung zu finden, wurde die Kinetik der Immobilisierung für die Lektine RCA und Con A an jeweils 2 verschiedenen Trägermaterialien bestimmt.

RCA wurde entsprechend der Arbeitsvorschrift in Kap. 6.1 an die Träger Toyopearl und I005 (III) immobilisiert. Bis zu einer Zeit von 20 h wurden Proben aus dem Reaktionsüberstand entnommen und der Gehalt an RCA entsprechend der Arbeitsvorschrift in Kap. 12.4.1 quantifiziert. Con A wurde entsprechend der Arbeitsvorschrift in Kap. 6.1 an den Träger Toyopearl (abweichend 15 mg Con A) und an den Träger P005 (I) (abweichend 300 mg Träger) immobilisiert und über einen Zeitraum von 4 h analysiert (Arbeitsvorschrift Kap. 12.4.1). Die Ausbeute der Immobilisierung  $y$  [%] wurde entsprechend 5.2.1 bestimmt.

In der Abbildung 6-2 sind die zeitlichen Verläufe der Immobilisierung von RCA an Toyopearl und Silika dargestellt (Cartellieri et al., 2001a). Für Silika war die Anbindung schon nach 30 min mit einer Ausbeute von 99,1 % nahezu abgeschlossen. Nach 4 h wurde eine Ausbeute von 99,5 % erreicht. Die Immobilisierung an Toyopearl verlief etwas langsamer, wobei hier nach 4 h 91,5 % erreicht wurden. Nach 20 h erreichte die Ausbeute einen Wert von 92,9 %.

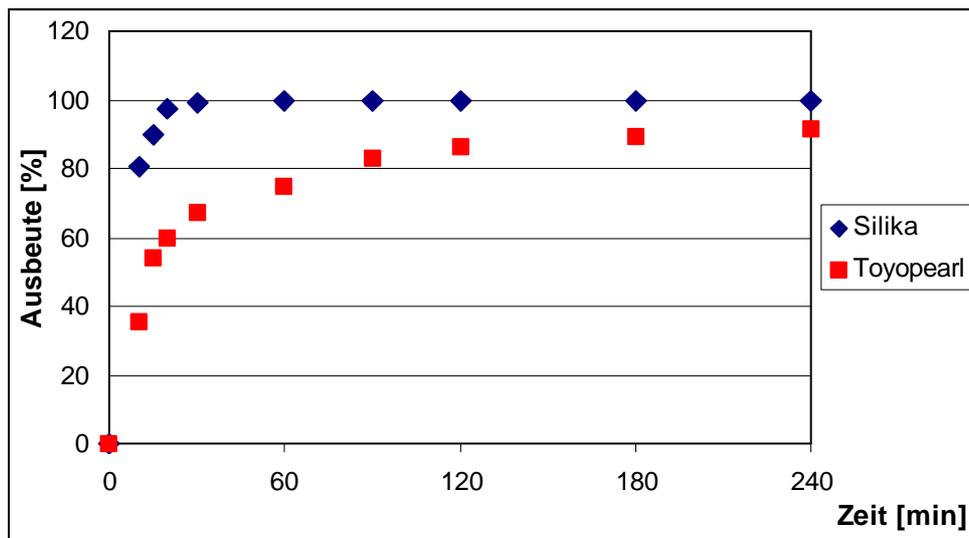


Abb. 6-2 : Kinetik der Immobilisierung für RCA

Abbildung 6-3 zeigt den zeitlichen Verlauf der Immobilisierung von Con A an Toyopearl und Silika. Die Anbindung des Lektins an den Silikaträger erreichte nach etwa 120 min eine Ausbeute von 95,7 % und war nahezu abgeschlossen (Petritzki, 2000). Nach 4 h wurde eine Ausbeute von 97,5 % erreicht. Bei Toyopearl verlief die Immobilisierung von Con A etwas langsamer. Hier wurde das Maximum mit 97 % nach 4 h erreicht.

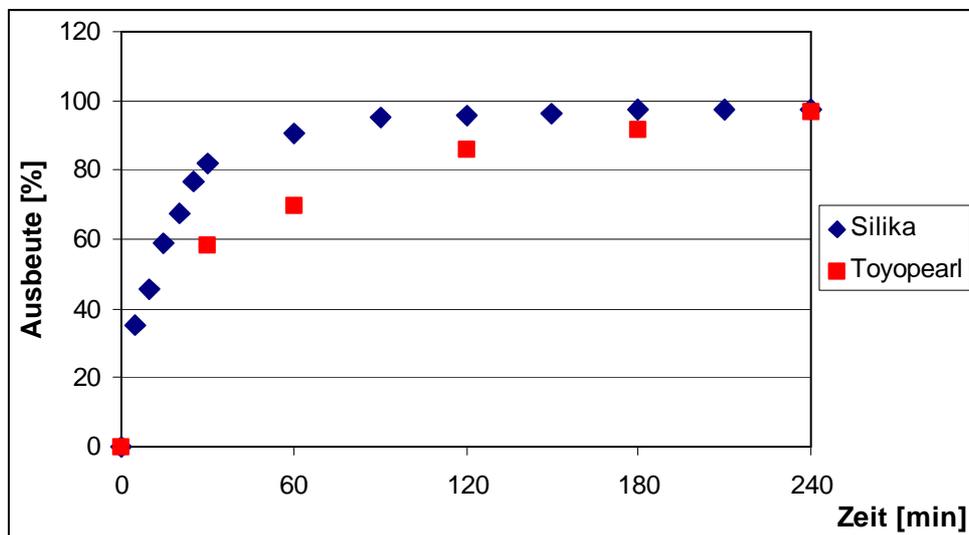


Abb. 6-3: Kinetik der Immobilisierung für Con A

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß die Immobilisierung der Lektine an Silika und Toyopearl nach 4 h abgeschlossen war. Dieser Zeitbedarf ist sowohl im Hinblick auf die biologische Aktivität der Lektine als auch auf einen schnellen Einsatz der Adsorbentien optimal kurz. Je nach Bedarf kann innerhalb von 30 – 60 min ein funktionsfähiges

Lektin-Adsorbens hergestellt werden oder aus praktischen Gründen eine Immobilisierung über Nacht (20 h) vorgenommen werden.

### 6.3 Einflußnehmende Parameter

Im Laufe der Methodenentwicklung zur Herstellung der Lektinadsorbentien wurde der Einfluß verschiedener Parameter auf das Ergebnis der Ligandanbindung untersucht. Die Untersuchungen sollten eine Optimierung der Reaktionsbedingungen möglich machen und zu einer Aussage führen, welche Menge eines Lektins an einem Träger immobilisiert werden sollte.

#### 6.3.1 Angebot und Oberflächenbelegung

Das Ergebnis der Immobilisierung setzt sich aus verschiedenen Größen zusammen, die von Interesse sind und optimiert werden sollten. Diese Größen sind:

- die angebundene Menge Lektin [mg/g Träger]
- die prozentuale Ausbeute  $y$  [%]
- der Materialverlust an Lektin im Überstand [mg]
- die erzielte Oberflächenbelegung auf dem Träger [%]

Generell ist es erstrebenswert, eine möglichst große Menge Lektin anzubinden, da dieses direkt die Arbeitskapazität des Adsorbens bestimmt. Gleichzeitig sollte die prozentuale Ausbeute der Immobilisierung möglichst hoch und der daraus resultierende Materialverlust im Überstand möglichst gering ausfallen, da die meist teuren Lektine den Preis der Adsorbensherstellung wesentlich bestimmen. Weiterhin sollte die Ligandendichte auf der Trägeroberfläche, d.h. die prozentuale Oberflächenbelegung, nicht zu hoch sein, da es zu sterischer Hinderung während der Anlagerung der Adsorptive kommen kann, wenn die Bindungsstellen benachbarter Liganden zu dicht liegen (siehe auch Diskussion Kap. 9.1.1). Aus diesen Anforderungen wird deutlich, daß für die optimal zu immobilisierende Lektinmenge ein Kompromiß gefunden werden muß. Im Folgenden wird zunächst die Berechnung der Oberflächenbelegung dargelegt. Anschließend werden Untersuchungen zum Einfluß der angebotenen Lektinmenge auf das Ergebnis der Immobilisierung zusammengefaßt.

#### Berechnung der Oberflächenbelegung

Zur Abschätzung des Flächenbedarfs eines Lektins auf einer Trägeroberfläche wurden die molekularen Ausmaße herangezogen. Die Abmessungen für jedes Lektin wurden aus der dreidimensionalen Kristallstruktur aus den Datensätzen der PDB (Protein Data Bank) abgeleitet (siehe Abb. 2-2, Abb. 3-1 und Abb. 3-3). Die Ausdehnungen der Lektine wurden als Abstände [ $\text{Å}$ ] zwischen einzeln wählbaren Atomen mit dem

Programm Swiss-PDB Viewer erhalten. Die Tabelle 6-3 zeigt die maximalen Abmessungen einer möglichen Kontaktfläche für die drei Lektine und den daraus berechneten Flächenbedarf pro mg Lektin (Berechnung siehe Gleichung [3]).

Tabelle 6-3: Flächenbedarf der Lektine

Lektin	Molekulare Ausdehnung [ $\text{\AA} * \text{\AA}$ ]	Kontaktfläche $A_m$ [ $\text{nm}^2$ ]	Flächenbedarf Lektin $A_r$ [ $\text{m}^2/\text{mg}$ ]
Con A	72 * 68	49	0,273
WGA	70 * 42	29	0,492
RCA	80 * 80	64	0,330

$$A_r [\text{m}^2 / \text{mg}] = \frac{A_m * N_A}{m * 1000 * 10^{18}} \quad [3]$$

$A_r$  = Flächenbedarf von 1 mg Lektin [ $\text{m}^2/\text{mg}$ ]

$A_m$  = maximale Kontaktfläche eines Lektinmoleküls [ $\text{nm}^2$ ]

$N_A$  = Avogadrokonstante =  $6,022 * 10^{23}$  [ $\text{mol}^{-1}$ ]

$m$  = Molmasse des Lektins [ $\text{g}/\text{mol}$ ]

Für eine bekannte Menge Lektin, die an einen Träger immobilisiert wurde, läßt sich die prozentuale Oberflächenbelegung auf dem Träger berechnen.

$$O[\%] = \frac{m_i * A_r * 100}{m_t * A_t} \quad [4]$$

$O$  = Oberflächenbelegung [%]

$m_i$  = Menge Lektin immobilisiert [mg]

$m_t$  = Masse Träger [g]

$A_t$  = spezifische Oberfläche des Trägers (siehe Kap. 4.2) [ $\text{m}^2/\text{g}$ ]

### Einfluß der angebotenen Menge

Um den Einfluß des Angebots an Ligand zu untersuchen, wurden konstanten Trägermengen jeweils unterschiedliche Mengen Lektin angeboten. Die Immobilisierung der Lektine WGA und RCA erfolgte am Träger Toyopearl. Es wurde nach 4 h der

Proteingehalt im Reaktionsüberstand quantifiziert (Arbeitsvorschrift Kap. 12.4.1) und die Ausbeute der Immobilisierung  $y$  [%] entsprechend Gleichung [1] (Kap. 5.2.1) bestimmt.

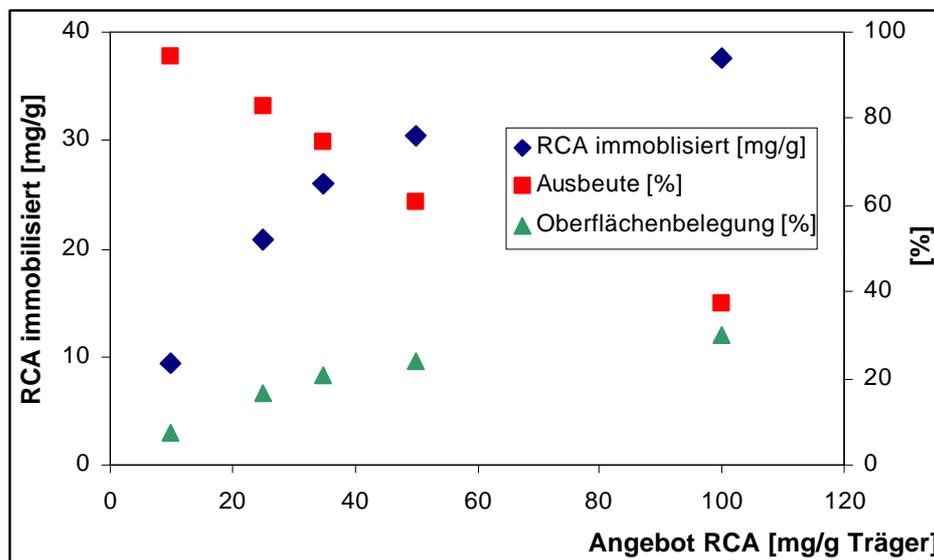


Abb. 6-4: Einfluß des Angebots an RCA auf die Ausbeute der Immobilisierung und die Oberflächenbelegung

Die Abbildung 6-4 zeigt den Einfluß der angebotenen Menge RCA auf die immobilisierte Menge RCA (primäre Ordinate) und die prozentuale Ausbeute der Immobilisierung [%] sowie die Oberflächenbelegung [%] (sekundäre Ordinate). Die Untersuchung zeigt, daß mit steigendem Angebot an RCA die immobilisierte Menge an RCA anstieg. Die Oberflächenbelegung stieg von 7,5 % auf 30 % an, während die prozentuale Ausbeute von anfangs 94 % auf 38 % bei einem Angebot von 100 mg RCA/g Träger sank. Der resultierende Materialverlust an RCA war bei einem Angebot von 100 mg/g mit 62 mg bereits erheblich (siehe auch Diskussion Kap. 9.1). Für eine effiziente Immobilisierung sollten daher nicht mehr als 25 mg RCA/g Toyopearl angeboten werden (Cartellieri et al., 2001a). Die Ausbeute lag hier bei 83 % mit einem Ergebnis von 20,7 mg RCA/g Träger und einer Oberflächenbelegung von 16 %.

Der Einfluß des Angebots an WGA auf das Ergebnis der Immobilisierung ist in Abb. 6-5 dargestellt. Es wird deutlich, daß mit steigendem Angebot auch die immobilisierte Menge WGA und die Oberflächenbelegung anstieg. Dabei wurde bei einem Angebot von 100 mg WGA nahezu eine Sättigung am Träger erreicht. Die Oberflächenbelegung erreichte 108,9 % und die immobilisierte Menge 91,5 mg/g. Bei weiterer Erhöhung des Angebots ließ sich die immobilisierte RCA-Menge nur noch geringfügig steigern, und die prozentuale Kopplungsausbeute sank von zuvor 92 - 99 % auf 74 %.

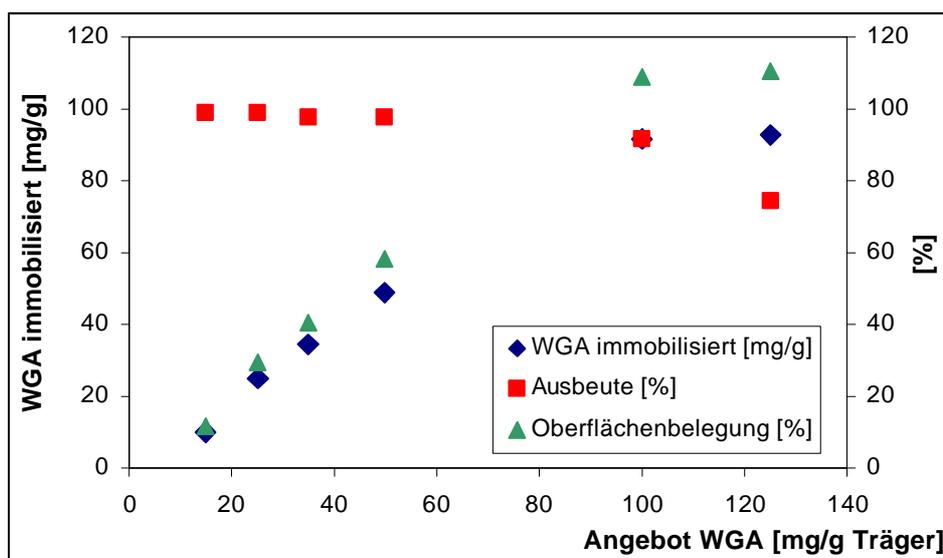


Abb. 6-5 Einfluß des Angebots an WGA auf die Ausbeute der Immobilisierung und die Oberflächenbelegung

Für eine effiziente Immobilisierung und unter Berücksichtigung einer optimalen Oberflächenbelegung zur Vermeidung sterischer Hinderung sollten nicht mehr als 50 mg WGA/g Toyopearl angeboten werden. Dies führte bei einer Ausbeute von 98 % zu einer Oberflächenbelegung von 58 % (Cartellieri et al., 2002).

### Einfluß der Lektinkonzentration

Es wurde untersucht, ob die Konzentration, in der das Lektin angeboten wird, ebenfalls einen Einfluß auf die Ausbeute der Immobilisierung hat. Das Lektin RCA wurde üblicherweise (siehe Kap. 6.1) mit einer Anfangskonzentration von 2,5 mg/mL immobilisiert. Eine Erhöhung der Konzentration (gegenüber 2,5 mg/mL) wäre nicht sinnvoll, da eine ausreichende Puffermenge zur Verfügung gestellt werden muß (siehe Kap. 6.3.2). Es wurden in diesem Versuch die Ausbeuten der Immobilisierung für kleinere Konzentrationen von 1,7 mg/mL bis 0,8 mg/mL RCA bei einem Angebot von 10 mg/g Träger bestimmt.

In Abb. 6-6 wird deutlich, daß die Lektinkonzentration im untersuchten Bereich keinen Einfluß auf das Ergebnis der Immobilisierung hatte. Bei einer Erniedrigung der Konzentration auf 1,7 bis 0,8 mg/mL wurden noch immer sehr gute Ausbeuten zwischen 90 – 98 % erreicht.

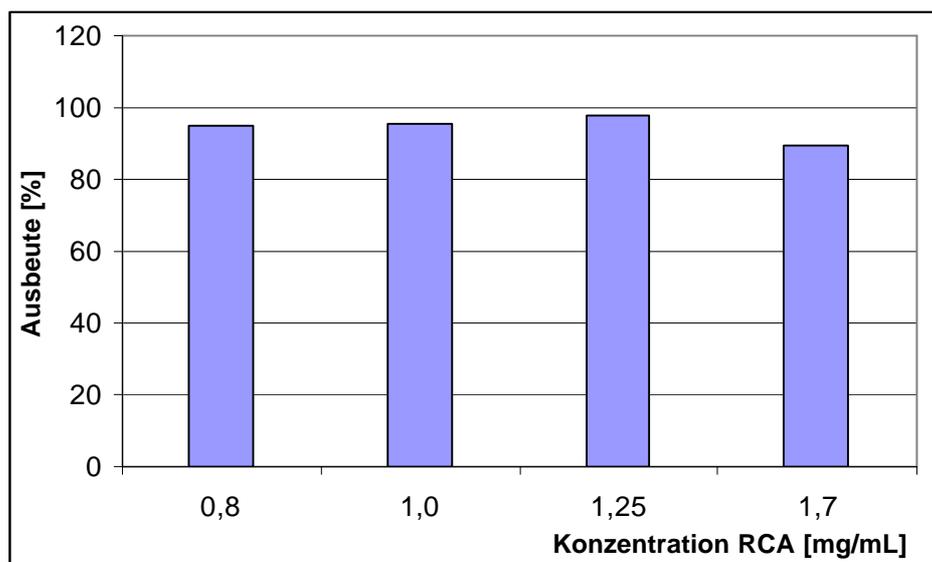


Abb. 6-6: Einfluß der RCA-Konzentration auf die Ausbeute der Immobilisierung

### 6.3.2 Pufferkapazität und pH-Wert

Der pH-Wert hat einen Einfluß auf die Immobilisierung an Tressylgruppen. Ein hoher pH-Wert begünstigt generell die Reaktion. In der Literatur werden gute Kopplungsausbeuten von 80 – 100 % für pH-Werte von pH 7 - 9 dokumentiert. Bei pH 6 betragen die Ausbeuten nur ca. 10 - 50 % (Nakamura et al., 1990, 1989). Da bei pH 9 eine Beeinträchtigung der Aktivität der Lektine vermutet wird, sollte die Immobilisierung in dieser Arbeit bei pH 7 - 8 vorgenommen werden. Die Pufferkapazität muß so gewählt werden, daß die bei der Immobilisierung frei werdenden sauren Abgangsgruppen (Sulfonsäure) neutralisiert werden. Nilsson und Mosbach (1987) dokumentierten, daß die Puffermolarität daher 0,1 – 0,2 mol/L sein sollte. Um geeignete Bedingungen festzulegen, wurden die in Tab 6-4 aufgeführten Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten und Molaritäten für die Immobilisierung an Toyopearl eingesetzt.

Tabelle 6-4: Kopplungspuffer

Puffer	Lektin	Puffer	pH-Wert	Molarität [mol/L]
A	RCA	Phosphat	7,8	0,25
B	RCA	Phosphat	8,0	0,25
C	RCA	Phosphat	8,0	0,5

Der Einfluß der Puffer A, B und C auf die Ausbeute der Immobilisierung wird in Abb. 6-7 deutlich. Unter Verwendung von Puffer A wurde nach 4 h eine Ausbeute von 52 % erreicht. Durch eine zu geringe Pufferkapazität sank der pH-Wert nach 4 h ab und die Ausbeute stieg nicht weiter, sondern sank nach 6 h leicht ab auf 45 %. Bei gleicher

Pufferkapazität und einem höherem pH-Wert von 8,0 (Puffer B) stieg die Anbindung von 58 % (4 h) auf 69 % (20h). Puffer C bewirkte mit einem pH-Wert von 8,0 und einer Molarität von 0,5 mol/L deutlich höhere Ausbeuten von 75 % nach 4 h und 83 % nach 20 h. Diese Ergebnisse zeigen, daß der pH-Wert und damit verbunden die Pufferkapazität einen entscheidenden Einfluß auf die Ausbeute haben. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde Puffer C als Kopplungspuffer verwendet (siehe Kap. 6.1).

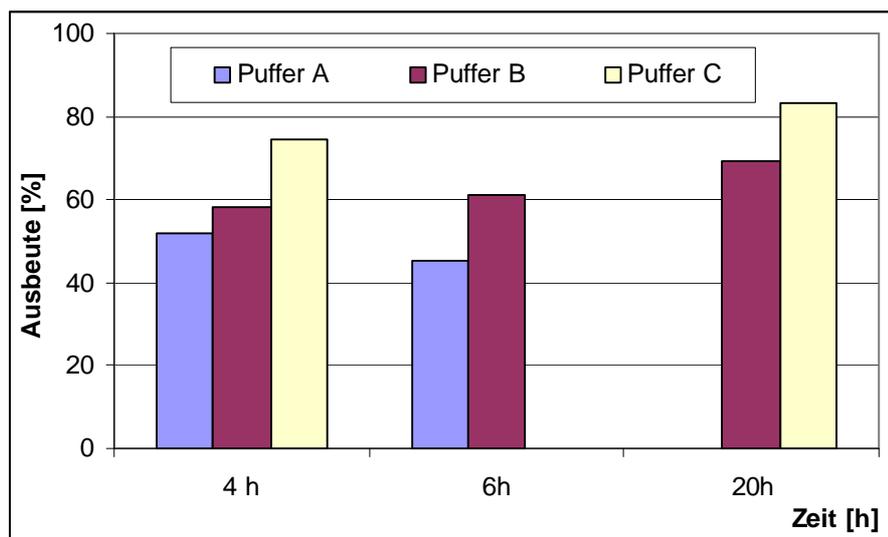


Abb. 6-7: Einfluß der Pufferzusammensetzung auf die Ausbeute der Immobilisierung

### 6.3.3 Weitere Parameter

#### Puffersubstanz

Für die Immobilisierung bei pH 8,0 wird in der Literatur auch die Verwendung von Carbonatpuffer vorgeschlagen (Nakamura et al., 1989). Um die Eignung von Phosphat- und Carbonatpuffer für die Immobilisierung zu vergleichen wurde Con A unter Verwendung des jeweiligen Puffers an Toyopearl immobilisiert. Nach 4 h wurde der pH-Wert überprüft und anschließend die Ausbeute der Immobilisierung bestimmt. Der pH-Wert war bei beiden Puffern konstant geblieben. Die Ergebnisse der Ausbeuten (Mittelwerte  $n = 2$ ) sind in der Tabelle 6-5 dargestellt. Es wird deutlich, daß der Phosphatpuffer die besseren Ergebnisse für die Immobilisierung liefert.

Tabelle 6-5: Vergleich von Phosphat- und Carbonatpuffer

Lektin	Puffer	Zeit [h]	Ausbeute [%]	Con A immobilisiert [mg/g]
Con A	Carbonat pH 8,0	4	55	20,7
Con A	Phosphat pH 8,0	4	90	33,8

### **Temperatur**

Der Einfluß des Parameters Temperatur auf die Immobilisierung wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Höhere Temperaturen beschleunigen grundsätzlich die Anbindung an Tressylgruppen (Nakamura et al., 1990, 1989). Bei besonders empfindlichen Liganden kann eine Immobilisierung bei 4°C durchgeführt werden. Für die hier verwendeten Lektine bot sich eine Immobilisierung bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) an, da hier schon nach 1 bis 4 h maximale Ausbeuten erreicht werden.

### **Hemmende Parameter**

Es zeigte sich, daß das Vorhandensein von Natriumazid im Kopplungspuffer die Immobilisierung behinderte. So wurden bei einer Azidkonzentration von 7,6 µmol/mL für die Anbindung von 10 mg RCA an 400 mg Toyopearl wesentlich geringere Immobilisierungsausbeuten erreicht. Nach 2 h betrug die Ausbeute nur 0,3 %. Nach 20 h wurde eine Ausbeute von 28 % erreicht.

## **6.4 Übersicht der hergestellten Adsorbentien**

Die Ergebnisse der Herstellung verschiedener Lektin Adsorbentien sind als Übersicht in Tabelle 6-6 dargestellt. Die Adsorbentien wurden im Verlauf der Arbeit für unterschiedliche Versuche verwendet. Es ist jeweils die immobilisierte Menge Lektin pro g und mL Träger angegeben sowie die Ausbeute  $y$  [%] und die Oberflächenbelegung  $O$  [%]. Die Anzahl der Bindungsstellen [nmol/mL Träger] ist für die Charakterisierung der Adsorbentien wichtig. Diese wird im folgenden Kapitel 7 beschrieben. Aus diesem Wert kann die Kapazität des Adsorbens abgeschätzt und die Ausnutzung der Bindungsstellen bestimmt werden (siehe Kapitel 7.2.5). Entsprechende Werte für die Lektin-Agarosen wurden aus den Herstellerangaben über die Lektinmenge pro mL Adsorbens berechnet. Es wird deutlich, daß die Ausbeuten überwiegend zwischen 90 und 100 % liegen. Die Oberflächenbelegungen liegen für RCA Toyopearl und Con A Toyopearl zwischen 14 und 25 %. Bei WGA Toyopearl wurden größere Ligandmengen immobilisiert, was zu Oberflächenbelegung von 40 – 47 % führte. Aufgrund der größeren spezifischen Oberfläche von Silika (vergleiche Tabelle 4-1) belief sich die Oberflächenbelegung hier auf 9 – 19 %. Aufgrund der vergleichsweise geringen Oberfläche des H<sub>2</sub>O Trägers (siehe Tabelle 4-2) wurden hier Oberflächenbelegungen von 55 % realisiert. Für die HPLAC Säule RCA TSKgel wird nur ein ungefährender Wert für die Ligandmenge angegeben, da dieser durch die Immobilisierung im Durchflußverfahren (siehe Kap. 6.1) nicht exakt quantifiziert werden konnte. Für die HPLAC Säule Sigma-Chrom AF-Con A war keine volumenbezogene Angabe über die immobilisierte Con A Menge verfügbar.

Tabelle 6-6: Übersicht der hergestellten Lektin-Adsorbentien

Lektin	Träger	Lektin immobilisiert [mg/g Träger]	Lektin immobilisiert [mg/mL Träger]	Bindungsstellen [nmol/mL Träger]	Ausbeute [%]	Oberflächenbelegung O [%]
<b>RCA</b>	Toyopearl	17,3	4,1	67,8	69	14
		20,7	4,9	81,2	83	16
		23,2	5,5	91,0	93	18
		18,4	4,3	72,2	72	15
	I005 (III)	24,9	10,4	173	99,5	11
	I005 (IV)	24,8	10,3	172	99	11
	TSKgel	-	~ 4,6	~ 76,6	~ 77	-
	Agarose	-	3,5	58,3	-	-
<b>Con A</b>	Toyopearl	33,8	8,0	295	90	22
		37,5	8,8	327	97	25
		35,7	8,4	311	95	23
	I005 (II)	26,3	11,0	406	93	9
	I005 (V)	25,7	10,7	396	98	9
	P005 (I)	53,2	18,4	682	98	19
	Agarose	-	18	667	-	-
	<b>Con A</b>	Sigma-ChromAF	15	-	-	-
<b>WGA</b>	Toyopearl	39,8	9,4	520	99	47
		39,1	9,2	511	98	46
		33,7	7,9	441	99	40
	I005 (III)	19,1	7,9	439	99,6	12
	H20 (I)	32,2	7,9	439	99	55
	H20 (II)	32,6	8,0	444	99,8	55
	Agarose	-	8,0	444	-	-
		-	6,0	333	-	-

## 7 Charakterisierung der Lektin-Adsorbentien

Im Kapitel 6 wurde die Immobilisierung der Lektine an Trägermatrices, d.h. die eigentliche Herstellung der Affinitätsadsorbentien, beschrieben. Nachdem die Quantifizierung der angebotenen Ligandmenge erfolgte, waren die Lektin-Adsorbentien einsatzbereit. Im vorliegenden Kapitel schließt sich die Charakterisierung der Adsorbentien im Hinblick auf ihre Funktionsfähigkeit in der Affinitätstrennung an. Die Charakterisierung ist zum einen wichtig für die in dieser Arbeit vorgenommene Verfahrensentwicklung, da sie einen Vergleich und eine Bewertung der Lektin-Adsorbentien ermöglicht. Zum anderen sind Elemente dieser Charakterisierung auch unverzichtbar für die spätere Anwendung des Trennverfahrens, denn es werden Modellsysteme und Bewertungskriterien benötigt, mit denen eine Überprüfung der Adsorbentien während des Betriebs möglich ist. Es werden im Folgenden zunächst Untersuchungen zum Verhalten der Adsorbentien in der diskontinuierlichen Affinitätstrennung aufgezeigt. Anschließend werden die Adsorbentien mittels unterschiedlicher Modellsysteme in der kontinuierlichen Trennung charakterisiert.

### 7.1 Diskontinuierliche Affinitätstrennung

Die diskontinuierliche Trennung wird im allgemeinen für die Charakterisierung von Adsorbentien herangezogen, um die Sorptionsvorgänge bis hin zum Gleichgewichtszustand zu untersuchen. Für die Aufnahme der Adsorptionsisothermen wird zunächst die Zeitdauer der Gleichgewichtseinstellung des Modelladsorptivs an dem entsprechenden Adsorbens bestimmt (Adsorptionskinetik).

#### 7.1.1 Adsorptionskinetik

Die Kinetik der Adsorption des Proteins Glucose Oxidase (GOD) wurde an verschiedenen Con A Adsorbentien untersucht. Als Trägermaterialien kamen Silika I005(V), Toyopearl und Agarose zum Einsatz. Die Kinetik wurde in einem auf 25°C temperierten, gerührten Behälter aufgenommen (He et al., 2001). In definierten Zeitabständen wurden Proben aus dem Überstand entnommen und der Proteingehalt quantifiziert (Vorschrift Kap. 12.4.1). Es wurden die in Tabelle 7-1 aufgestellten Trägermengen und Enzymkonzentrationen eingesetzt:

Tabelle 7-1: Adsorbentien für die Adsorptionskinetik

Lektin-Adsorbens	Con A immobilisiert [mg/mL Träger]	Abtropfgewicht Adsorbens [mg]	GOD [mg/mL]	Volumen [mL]
Con A Silika	10,7	305	0,50	20
Con A Toyopearl	8,4	405	0,50	20
Con A Agarose	18*	576	0,53	50

\* Herstellerangabe

Die Adsorptionskinetik von Glucose Oxidase an den verschiedenen Con A Adsorbentien ist in der Abbildung 7-1 dargestellt. Es wird deutlich, daß sich das Sorptionsgleichgewicht nach etwa 100 min eingestellt hatte. Die stärkere Abnahme der GOD-Konzentration bei Con A Agarose ist auf die größere Anzahl zur Verfügung stehender Con A Liganden zurückzuführen (vergleiche Tabelle 7-1).

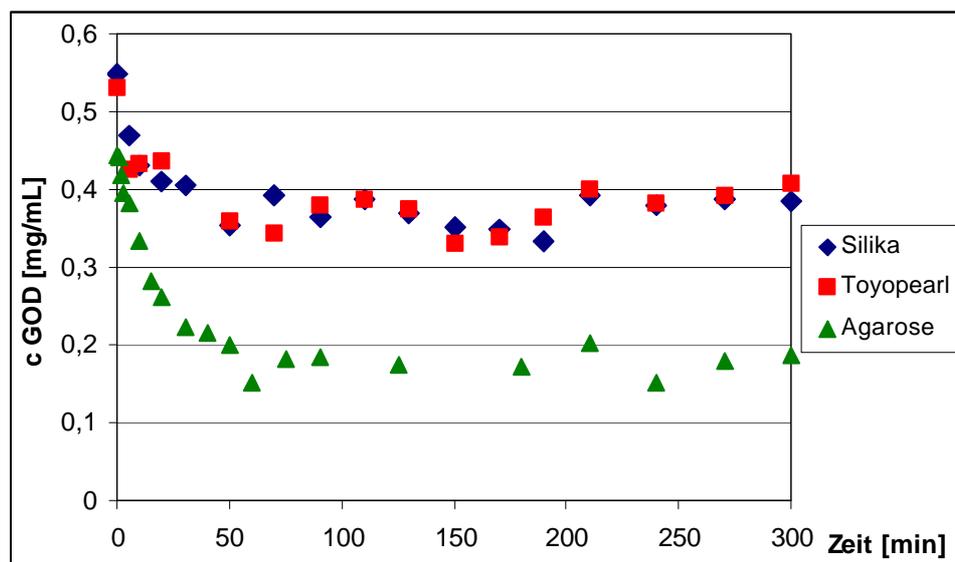


Abb. 7-1: Adsorptionskinetik von Glucose Oxidase an Con A Adsorbentien

### 7.1.2 Adsorptionsisothermen im Gleichgewicht

#### Adsorptionsisothermen zur Beschreibung von Sorptionsvorgängen

Die Beziehung zwischen der im Gleichgewicht am Affinitätsträger adsorbierten Stoffmenge und der Konzentration in der flüssigen Phase bei einer konstanten Temperatur wird Adsorptionsisotherme genannt. Zur mathematischen Beschreibung von Sorptionsvorgängen gibt es verschiedene Modelle. Zur Theorie der unterschiedlichen Modelle sei auf das Buch von Atkins (1996) verwiesen. Die Arbeiten

von Nicoud und Seidel-Morgenstern (1996), Winzor (1992), Chaiken (1986) sowie von Finette et al. (1997) oder Björklund und Hearn (1997) geben einen Überblick über die Beschreibung von Sorptionsvorgängen in der Affinitätstrennung. Im Folgenden wird das in dieser Arbeit verwendete Modell nach Langmuir beschrieben, welches für die Affinitätstrennung überwiegend von Bedeutung ist.

### Adsorptionsisotherme nach Langmuir

Das Modell von Langmuir geht bei der Beschreibung des Adsorptionsgleichgewichts von mehreren Voraussetzungen aus. Die Adsorption erfolgt ausschließlich in monomolekularen Schichten und alle Adsorptionsplätze sind energetisch gleichwertig. Weiterhin findet keine Wechselwirkung zwischen den adsorbierenden Molekülen statt. Aus dem dynamischen Gleichgewicht zwischen Adsorption und Desorption ergibt sich nach Gleichung 5 die am Träger adsorbierte Stoffmenge:

$$q = \frac{q_m * c}{K_d + c} \quad [5]$$

$q$  = adsorbierte Menge [mg/g Adsorbens]

$q_m$  = maximale adsorbierte Menge [mg/g Adsorbens]

$c$  = Gleichgewichtskonzentration in der flüssigen Phase [mg/mL]

$K_d$  = Dissoziationskonstante [mg/mL]

Die Bedingung einer homogenen Oberfläche mit gleichwertigen Adsorptionsplätzen ist für den Affinitätsträger nicht vollständig erfüllt, da sie sich aus spezifischen Bindungsstellen am Liganden und „unspezifischen“ Adsorptionsplätzen auf der Trägeroberfläche zusammensetzt. Liegt allerdings eine große Differenz zwischen den Affinitätskonstanten des Adsorptivs zum Liganden und zum Träger vor, dann findet im Idealfall nur Adsorption am Liganden statt. Je höher die Spezifität des Adsorbens zum betrachteten Adsorptiv ist, desto besser läßt sich eine Adsorptionsisotherme also mit dem Modell nach Langmuir beschreiben. In der Literatur wird für die Beschreibung von Sorptionsvorgängen an Affinitätsträgern das Modell nach Langmuir, teilweise mit Abwandlungen, angewendet (Conder und Hayek, 2000; Lakhiari et al., 1998; Finette et al., 1997; Björklund und Hearn, 1997; Nicoud und Seidel-Morgenstern, 1996, Anspach et al., 1989; Anderson und Walters, 1986). In dieser Arbeit zeigte sich, daß die empirisch bestimmten Isothermen sich hinreichend gut mit dem Modell nach Langmuir beschreiben ließen. Daher wurde dieses Modell ausschließlich verwendet.

Die Bestimmung der Adsorptionsisothermen für die Lektin-Adsorbentien liefert demnach verschiedene Aussagen. Über den Verlauf der Isothermen und die Anpassung mit dem Modell nach Langmuir läßt sich eine Aussage über die Spezifität des Adsorbens gewinnen. Aus der Auswertung der experimentellen Daten mit Hilfe der Linearform der Langmuirgleichung erhält man die Dissoziationskonstante des Affiniätskomplexes  $K_d$  und die maximale Bedeckung  $q_m$  des Adsorbens. Die für GOD erhaltene Dissoziationskonstante  $K_d$  [mg/mL] wurde über die Molmasse von GOD in  $K_d$  [mol GOD/L] umgerechnet.

Linearform der Langmuirgleichung (Scatchard Plot):

$$\frac{q}{c} = \frac{q_m}{K_d} - \frac{1}{K_d} * q \quad [6]$$

### Durchführung

Es wurden Adsorptionsisothermen an Con A Toyopearl, Con A Silika und Con A Agarose aufgenommen (Adsorbentien siehe Tabelle 7-1). Als Adsorptiv wurde wieder das Enzym Glucose Oxidase verwendet. Es wurden etwa 50 mg Con A Toyopearl, 40 mg Con A Silika und 100 mg Con A Agarose in verschließbare Behälter genau eingewogen (Abtropfgewicht). Jeweils 5 mL GOD-Lösung wurden mit steigender Konzentration zugegeben und die Behälter bei 25°C unter Schütteln für 20 h equilibriert. Im Gleichgewichtszustand wurde die Proteinkonzentration im Überstand quantifiziert (Vorschrift siehe Kap. 12.4.1). Aus der Differenz zur Aufgabemenge konnte die adsorbierte Proteinmenge  $q$  [mg/g Träger] berechnet werden.

### Ergebnisse

Die ermittelten Werte für  $q$  wurden gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. In der Abb. 7-2 ist die Adsorptionsisotherme des Adsorbens Con A Toyopearl dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, daß die adsorbierte Menge GOD am Träger mit steigender Konzentration in der Lösung einem Maximalwert  $q_m$ , d.h. einer Sättigung, entgegen strebte. Die Beschreibung der experimentellen Daten nach Langmuir (Gleichung 5 und 6) lieferte Werte für  $K_d$  und  $q_m$ .

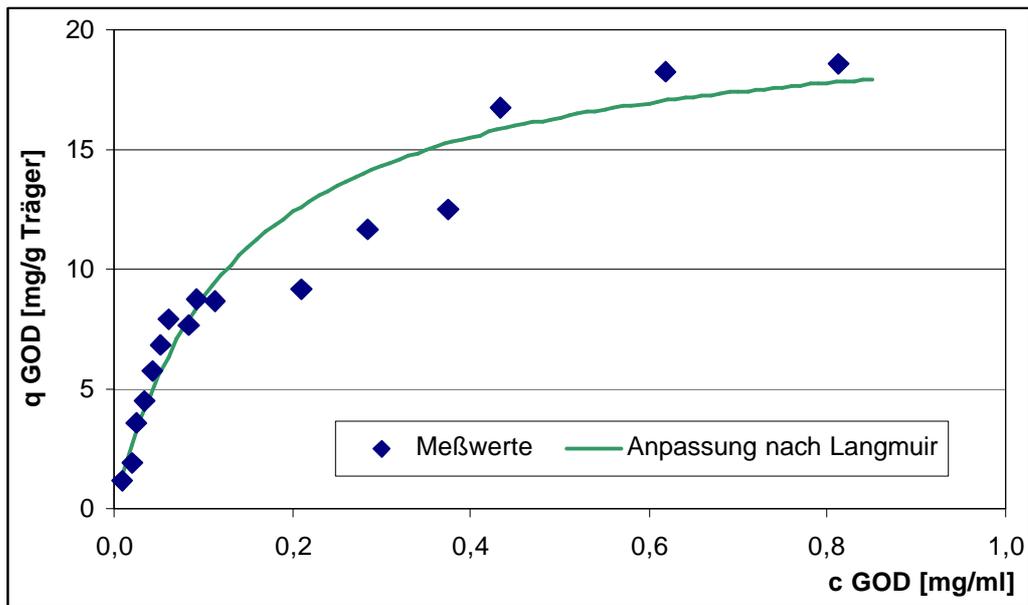


Abb. 7-2: Adsorptionsisotherme an Con A Toyopearl

Die Bestimmung der Werte  $q_m$  und  $K_d$  wurde aus der Linearisierung der Meßwerte nach der Langmuirgleichung (Scatchard Plot, Gleichung 6) vorgenommen. Die Auftragung erfolgte in der Form  $q/c$  gegen  $q$ . Der Scatchard Plot ist für Con A Toyopearl beispielhaft in Abb. 7-3 dargestellt. Mittels linearer Regression wurde die Ausgleichsgerade bestimmt und aus deren Steigung und Achsenabschnitt die Werte für  $q_m$  und  $K_d$  bestimmt.

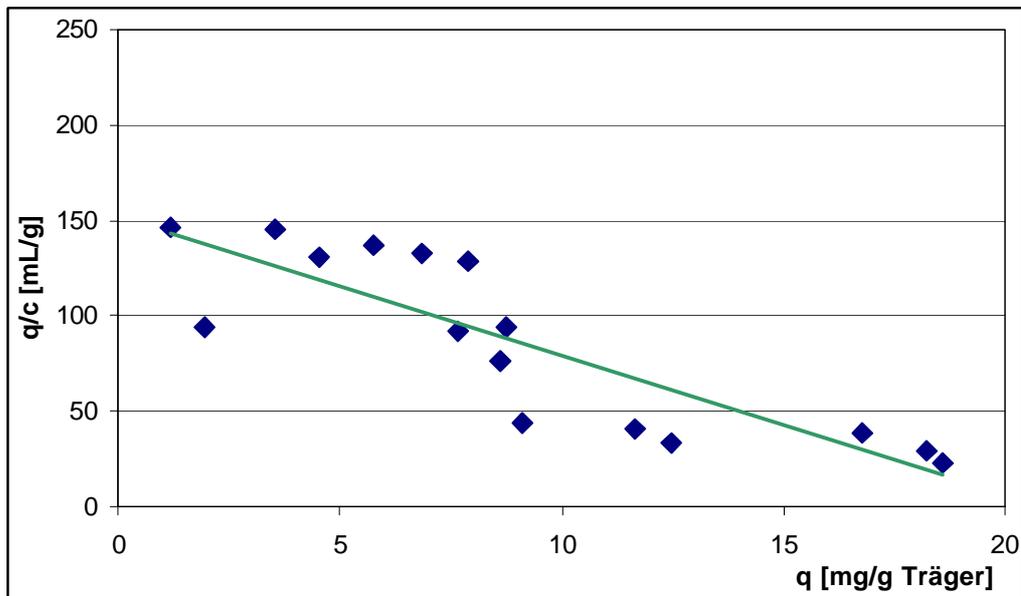


Abb. 7-3: Scatchard Plot der Adsorptionsisotherme an Con A Toyopearl

Für  $q_m$  und  $K_d$  ergaben sich:

$$q_m = 20,8 \text{ mg GOD/g Träger}$$

$$K_d = 0,136 \text{ mg GOD/mL} = 9,1 \cdot 10^{-7} \text{ mol/L}$$

Mit Hilfe der experimentell gewonnenen Werte für  $q_m$  und  $K_d$  wurde die Isotherme nach Langmuir berechnet und zusammen mit den Meßwerten im Diagramm dargestellt (Abb. 7-2). Der Vergleich der Meßwerte mit der Langmuirfunktion zeigt eine gute Übereinstimmung mit dem Modell. Für die Bestimmung der Isothermen weiterer Träger wurde entsprechend vorgegangen. Die Abbildungen 7-4 und 7-5 zeigen die Adsorptionsisothermen von Con A Silika und Con A Agarose.

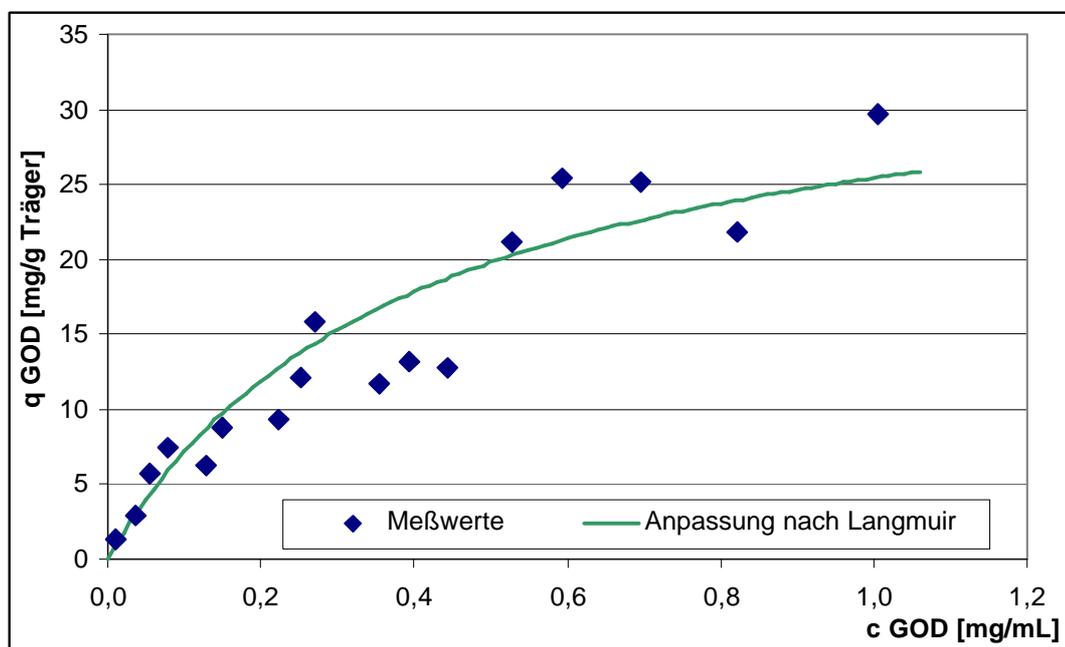


Abb. 7-4: Adsorptionsisotherme an Con A Silika

Die dargestellten Isothermen an Silika und Agarose lassen sich ebenfalls gut mit dem Modell nach Langmuir beschreiben. Insbesondere bei Con A Agarose (Abb. 7-5) zeigte sich eine hohe Affinität zum Adsorptiv GOD. Die Sättigung des Adsorbens  $q_m$  deutet sich schon bei Konzentrationen von ca. 0,5 mg/mL an. Die Isotherme an Con A Silika (Abb. 7-4) läßt durch ihren flacheren Verlauf auf eine geringere Affinität zum Adsorptiv GOD schließen. Auch deutet sich die Sättigung des Adsorbens  $q_m$  erst ab 1,0 mg/mL an. Die Isotherme an Con A Toyopearl liegt von ihrem Verlauf her zwischen Agarose und Silika. Eine Sättigung deutet sich hier ab 0,8 mg/mL an und die Steigung der Isothermen im Anfangsbereich liegt ebenfalls zwischen Agarose und Silika.

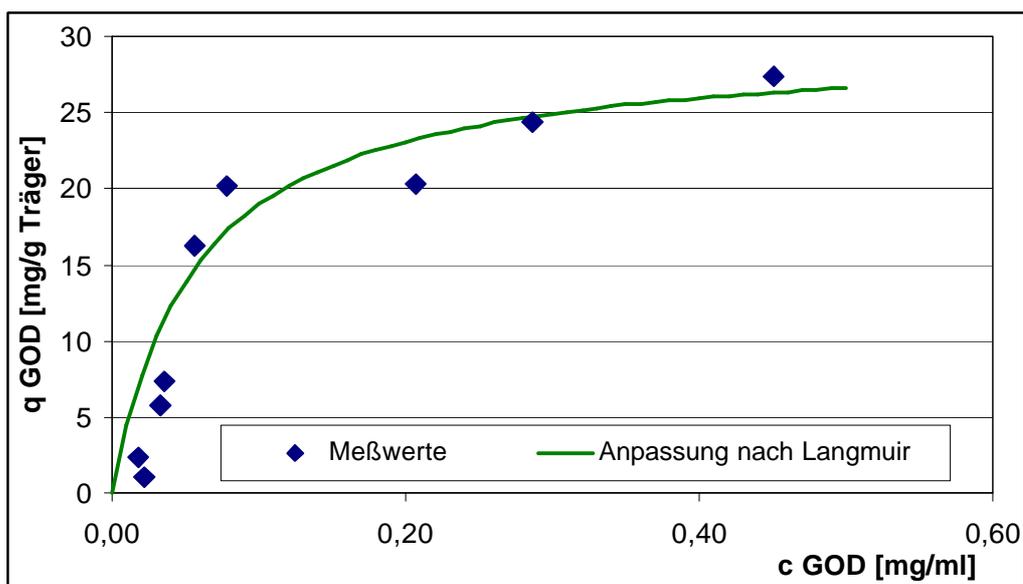


Abb. 7-5: Adsorptionsisotherme an Con A Agarose

Insgesamt zeigen alle Con A Adsorbentien eine hohe Affinität zu GOD. Die Dissoziationskonstanten liegen in der gleichen Größenordnung ( $K_d = 10^{-6} - 10^{-7}$  mol/L). Die Spezifität wird dabei von Agarose über Toyopearl zu Silika etwas geringer. Dieses wird auch durch die Gegenüberstellung der Werte für  $q_m$  und  $K_d$  anschaulich (siehe Tabelle 7-2).

Tabelle 7-2: Vergleich der Langmuir-Konstanten verschiedener Con A Adsorbentien

Adsorbens	Con A immobilisiert [mg/mL Träger]	$q_m$ GOD [mg/g Abtropfgewicht]	Theoretische max. Kapazität für GOD [mg/mL Träger]	$K_d$ GOD [mol/L]
Con A Silika	10,7	35,5	59	$2,6 \cdot 10^{-6}$
Con A Toyopearl	8,4	20,8	47	$9,1 \cdot 10^{-7}$
Con A Agarose	18	29,6	100	$3,7 \cdot 10^{-7}$

$K_d$  stellt ein Maß für die Affinität der Bindung dar, welche bei Con A Agarose mit der kleinsten Dissoziationskonstante demnach am größten ist. Der Vergleich der Werte für  $q_m$  zeigt eine höhere Maximalbeladung für Con A Silika (35,5 mg/g) als für Con A Agarose (29,6 mg/g), obwohl die theoretische Kapazität für GOD bei Silika mit 59 mg/g geringer ist als bei Agarose mit 100 mg/g. Dieser Effekt könnte zum einen mit besserer Zugänglichkeit der Liganden am Silikaträger (vergleiche Kapazität und Ausnutzung, Kap. 7.2.5) erklärt werden, könnte zum anderen aber auch auf einen

Beitrag an unspezifischer Adsorption zurückzuführen sein. Der Einfluß des Trägermaterials auf die Adsorption der Glykoproteine wird im Kapitel 9.4 diskutiert.

## 7.2 Kontinuierliche Affinitätstrennung

### 7.2.1 Durchführung

Die kontinuierliche Affinitätstrennung steht in dieser Arbeit für die Trennung im Säulen-Durchflußbetrieb. Dazu wurde üblicherweise eine Glassäule von 7 mm Innendurchmesser  $\times$  50 mm mit 0,5 oder 1 mL des Lektin-Adsorbens befüllt.

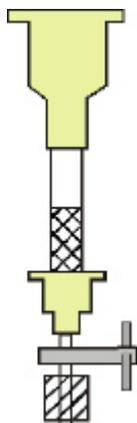


Abb. 7-6: Trennsäule zur Niederdruck-Affinitätstrennung

Die Affinitätstrennung wurde mit dem jeweiligen Arbeitspuffer (siehe Tabelle 6-2) und einem Fluß von 0,8 mL/min durchgeführt. Am Affinitätsträger adsorbiertes Protein wurde nach gründlichem Spülen mit dem Arbeitspuffer jeweils durch Zugabe eines Überschusses des zum Lektin komplementären Saccharids (Elutionspuffer) desorbiert. Es wurden folgende Systeme zur spezifischen Desorption eingesetzt (siehe Kap. 3.2.5):

- 0,1 mol/L Lactose für RCA Adsorbentien
- 0,1 mol/L Mannose für Con A Adsorbentien
- 0,2 mol/L N-Acetylglucosamin für WGA Adsorbentien

Das Adsorbens wurde mit mehreren Säulenvolumina des Elutionspuffers gespült. Im Anschluß wurde das Adsorbens durch gründliches Spülen mit dem Arbeitspuffer vom Saccharid wieder befreit und so regeneriert (vergleiche Prinzip der Affinitätstrennung Kap. 2.1.1). Die Glykoproteine wurden bei  $\lambda = 280$  nm detektiert. Fraktionen, in denen Protein quantifiziert werden sollte, wurden direkt in entsprechenden Meßkolben

(10, 25, 50 mL) aufgefangen. Die Konzentration an Glykoprotein wurde mittels Proteintest (Vorschrift Kap. 12.4.1) bestimmt.

### 7.2.2 Affinitätstrennung ausgewählter Glykoproteine

Wie zu Beginn dieses Kapitels erläutert ist es wichtig, die Eigenschaften der hergestellten Lektinadsorbentien in der Affinitätstrennung mit definierten Modellsystemen zu untersuchen. Für die Charakterisierung und als Kontrollsystem im kontinuierlichen Säulenbetrieb sind nur Modelladsorptive geeignet, welche folgende Anforderungen erfüllen:

- die Affinität des Adsorptivs muß hoch genug für eine feste Bindung am Lektin sein
- die Bindung muß reversibel, d.h. das Adsorptiv vollständig desorbierbar sein
- das Modelladsorptiv muß leicht zu quantifizieren sein
- das Adsorbens muß nach der Desorption vollständig regenerierbar sein
- das Modelladsorptiv sollte leicht erhältlich sein

Die Affinitätstrennung verschiedener Glykoproteine wurde an den drei Lektinen RCA, Con A und WGA untersucht (Auswahl siehe Kap. 3.2.2). Das System Con A/GOD, welches als Modellsystem für die Adsorptionsisothermen geeignet war, bot sich nicht als Modellsystem für den kontinuierlichen Betrieb an, da GOD aufgrund der starken Affinität zu Con A, welche auf das Vorhandensein von Trimannosiden zurückzuführen ist (vergleiche Kap. 3.2.2, Abb. 3.6), nicht vollständig desorbiert und das Adsorbens nicht vollständig regeneriert werden konnte (vergleiche Abb. 8-2). Anhand der genannten Kriterien wurden geeignete Modelladsorptive für die Lektine bestimmt und für die Charakterisierung im kontinuierlichen Betrieb verwendet.

Für das Lektin RCA wurde das Glykoprotein Asialofetuin (ASF) für die Charakterisierung ausgewählt (Cartellieri et al., 2001a). Die Affinitätstrennung von ASF an RCA Toyopearl ist in Abb. 7-7 dargestellt. Es wurden hier 1,7 mL Adsorbens eingesetzt und 1 mg ASF aufgegeben. Der überwiegende Anteil des ASF Materials wurde am Lektin gebunden, nur ein geringer Anteil zeigte keine Affinität und wurde mit dem Spülvolumen von der Säule gewaschen (Peak nach 9 min). Der Pfeil zeigt den Stufengradienten von 0,1 mol/L Lactose an. Dies bewirkte die Desorption des gebundenen ASF von den RCA-Bindungsstellen. Das Glykoprotein wurde nach 20 min in konzentrierter Form eluiert, wobei die anschließende Basislinienerhöhung durch die Eigenabsorption der Lactose bedingt war.

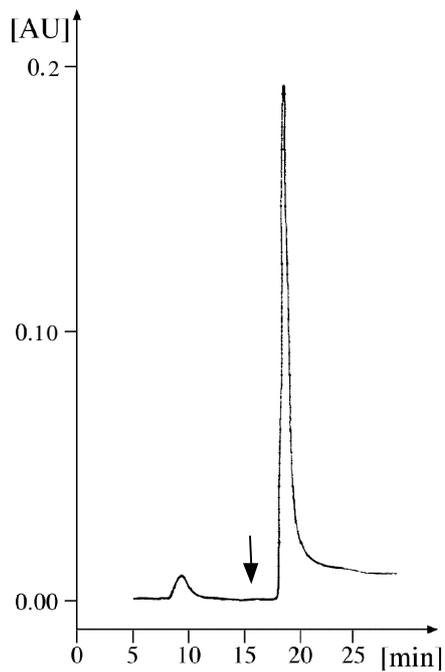


Abb. 7-7: Affinitätstrennung von Asialofetuin an RCA Toyopearl

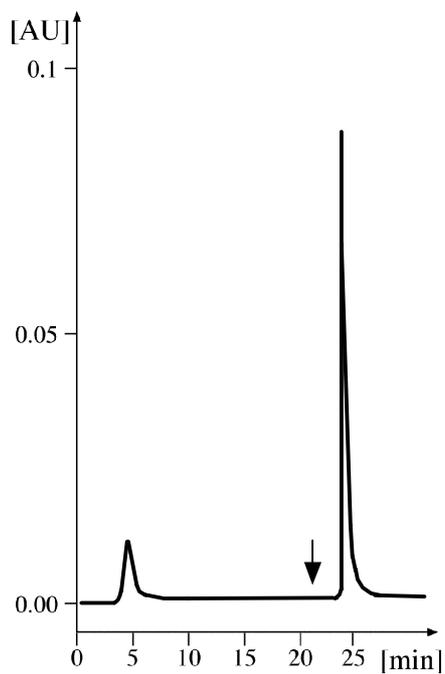


Abb. 7-8: Affinitätstrennung von Peroxidase an Con A Silika

Für das Lektin Con A wurde das Glykoprotein Peroxidase (POD) als Modelladsorptiv eingesetzt. Abb. 7-8 zeigt eine Affinitätstrennung von POD an 1 mL des Adsorbens

Con A Silika I005 (IV). Es wurden 500  $\mu\text{g}$  POD aufgegeben. Die Trennung wurde mit Acetatpuffer (pH 5,0) durchgeführt. Nicht gebundenes Material wurde mit dem Spülvolumen (4 min) vom Adsorbens gewaschen. Der überwiegende Anteil des POD Materials wurde adsorbiert und die Elution des Glykoproteins erfolgte nach 20 min mit 0,1 mol/L Mannose (Pfeil).

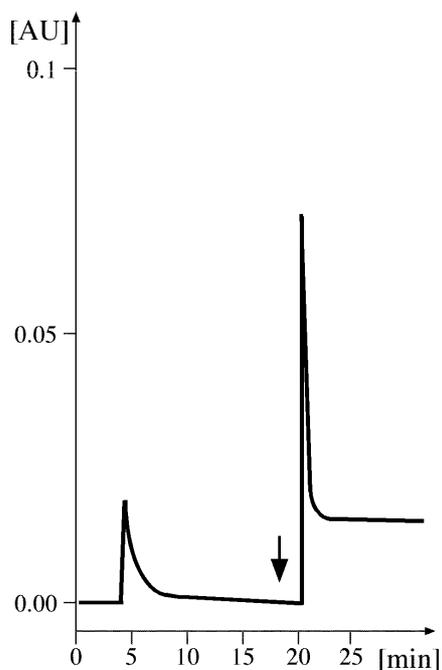


Abb. 7-9: Affinitätstrennung von Fetuin an WGA Toyopearl

Für die Affinitätstrennung an WGA Adsorbentien wurde das Glykoprotein Fetuin verwendet. Eine typische Trennung an WGA Toyopearl ist in Abb. 7-9 dargestellt. Es wurden 0,5 mL des Adsorbens eingesetzt und 500  $\mu\text{g}$  Fetuin aufgegeben. Nicht gebundenes Material wurde durch Spülen mit dem Arbeitspuffer entfernt (Peak bei 4 min). Der Pfeil zeigt die Elution des gebundenen Fetuins mit 0,2 mol/L N-Acetylglucosamin.

Es zeigte sich zudem, daß das Glykoprotein Ovomuroid als Modellsystem für die Trennung an WGA Adsorbentien ebenfalls geeignet war (vergleiche auch Kap. 7.2.6 und Kap. 8.1.1, Abb. 8-1). Eine Diskussion der Trennergebnisse erfolgt in Kapitel 9.3.

### 7.2.3 Evaluierung geeigneter Trennbedingungen

#### pH-Wert

Um die geeigneten Bedingungen für die Lektin-Affinitätstrennung festzulegen, wurde der Prozeßparameter pH-Wert für jedes Lektin anhand des entsprechenden Modelladsorptivs optimiert. Es erfolgte die Untersuchung der Adsorbentien RCA-Toyopearl, WGA-Toyopearl und -Agarose sowie Con A-Toyopearl. Folgende Puffer wurden für die unterschiedlichen pH-Werte eingesetzt:

- 0,1 mol/L Acetatpuffer für pH 3,0, 4,0, 5,0 und 6,0
- 0,1 mol/L Phosphatpuffer für pH 6,8, 7,2 und 7,4
- 0,1 mol/L Tris-HCl Puffer für pH 8,0 (für pH 7,4 bei Con A)

Die Proteine ASF, FET und POD wurden beim entsprechenden pH-Wert mit dem Elutionszucker desorbiert und die spezifisch eluierte Proteinmenge quantifiziert sowie die Gesamtwiederfindung des Proteins ermittelt. Es wurden bei RCA- und Con A-Toyopearl Doppelbestimmungen durchgeführt (Ausnahme: RCA pH 7,2: n = 5; pH 6 n = 3). Bei WGA-Toyopearl erfolgten Dreifachbestimmungen. Die Fehlerindikatoren in den Abbildungen geben jeweils die Minimal- und Maximalwerte an.

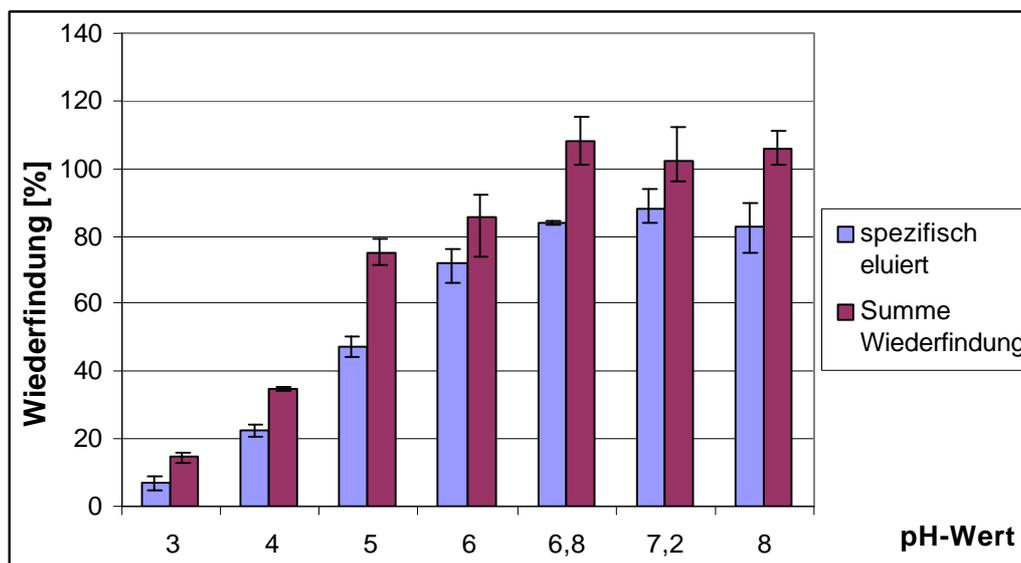


Abb. 7-10: Einfluß des pH-Wertes auf die Affinitätstrennung an RCA Toyopearl

Der Einfluß des pH-Wertes auf die Fraktionierung und die Gesamtwiederfindung von ASF an RCA Toyopearl ist in Abb. 7-10 dargestellt. Es ergab sich ein Optimum für die Adsorption und Desorption von ASF bei pH 7,2. Bei pH 6,8 und 8 waren nur geringfügige Abweichungen zu erkennen. Die Wiederfindung des eluierten ASF war mit über 80 % ebenfalls sehr hoch. Von pH 6 bis pH 3 war eine deutliche Verringerung der desorbierten Proteinmenge sowie der Gesamtwiederfindung festzustellen. Dieses

deutet auf ein Versagen der Elution bei niedrigem pH-Wert hin. Das wurde ebenfalls dadurch deutlich, daß bei einer pH-Wert Änderung von pH 3 auf pH 7,2 eine Nachelution des gebundenen ASF möglich war. Als Erklärung für diesen Effekt können Konformationsänderungen der Proteine und veränderte Ladungsverhältnisse auf der Trägeroberfläche bei niedrigem pH-Wert angenommen werden, die sich auf die Bindung des ASF am RCA auswirken. Als Ergebnis kann zusammengefaßt werden, daß eine Affinitätstrennung an RCA Toyopearl zwischen pH 6,8 und 8 gut möglich ist, das Optimum liegt bei pH 7,2. Bei Bedarf kann mit eingeschränkter Kapazität auch bei niedrigeren pH-Werten gearbeitet werden, ohne daß das Adsorbens nachhaltig geschädigt wird.

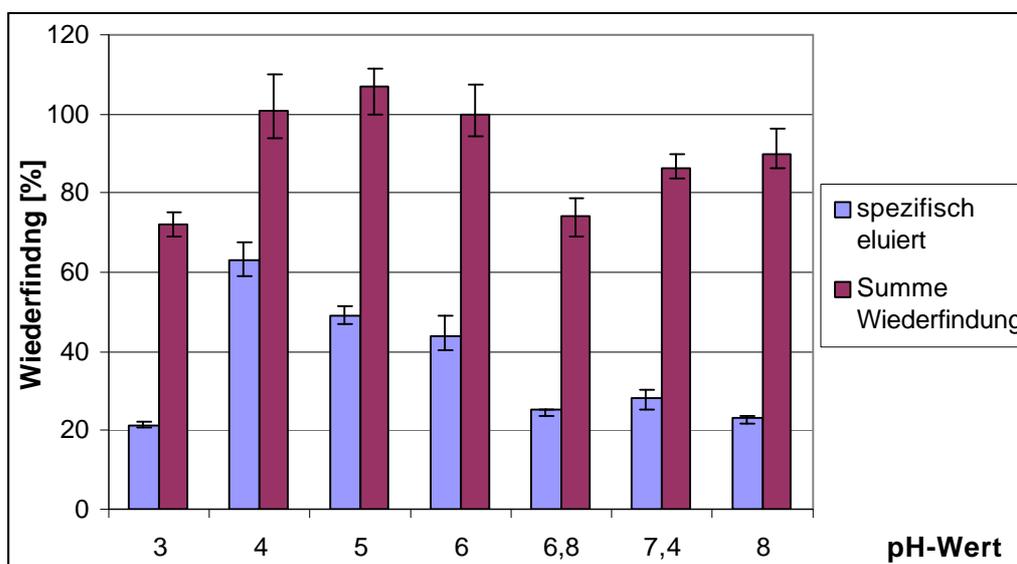


Abb. 7-11: Einfluß des pH-Wertes auf die Affinitätstrennung an WGA Toyopearl

In Abb. 7-11 ist der Einfluß des pH-Wertes auf die Affinitätstrennung von Fetuin an WGA Toyopearl dargestellt. Es zeigte sich ein Plateau bei pH 6,8 bis 8,0 mit einer Wiederfindung von spezifisch adsorbierten und desorbierten Fetuin zwischen 23 % und 28 %. Ein Optimum zeichnete sich bei pH 4 ab mit 63 % Wiederfindung an eluiertem Fetuin. Bei pH 3 kam es zu einem beträchtlichen Abfall der eluierten Menge sowie der Gesamtwiederfindung. Für die Anwendung ist zusammenzufassen, daß eine Affinitätstrennung an WGA Toyopearl optimal bei pH 4 durchzuführen ist. Bei Biomolekülen bietet sich für den Erhalt der biologischen Aktivität jedoch oft der Betrieb bei neutralem pH-Wert an, weshalb im weiteren Verlauf der Arbeit pH 7,4 verwendet wurde. Das Adsorbens nahm bei pH 3 keinen nachhaltigen Schaden (Hamer, 2000).

Weiterhin wurde eine pH-Wert Optimierung auch mit WGA Agarose für pH 6, 6,8, 7,4 und 8,0 durchgeführt. Das Diagramm zu diesem Versuch ist im Anhang (Abb. 12-7) dargestellt. Es zeigte sich eine vergleichbare Tendenz zu WGA Toyopearl. Das Optimum lag bei pH 7,4 mit 36 % Fetuin in der Elutionsfraktion und einer

Gesamtwiederfindung von 99 %. Im Gegensatz zu WGA Toyopearl wurde die Funktionsfähigkeit der WGA Agarose beim Betrieb bei pH 3 allerdings beeinträchtigt. Die Stabilität des Adsorbens WGA Agarose ist bei kleinen pH-Werten nicht gegeben (Hamer, 2000).

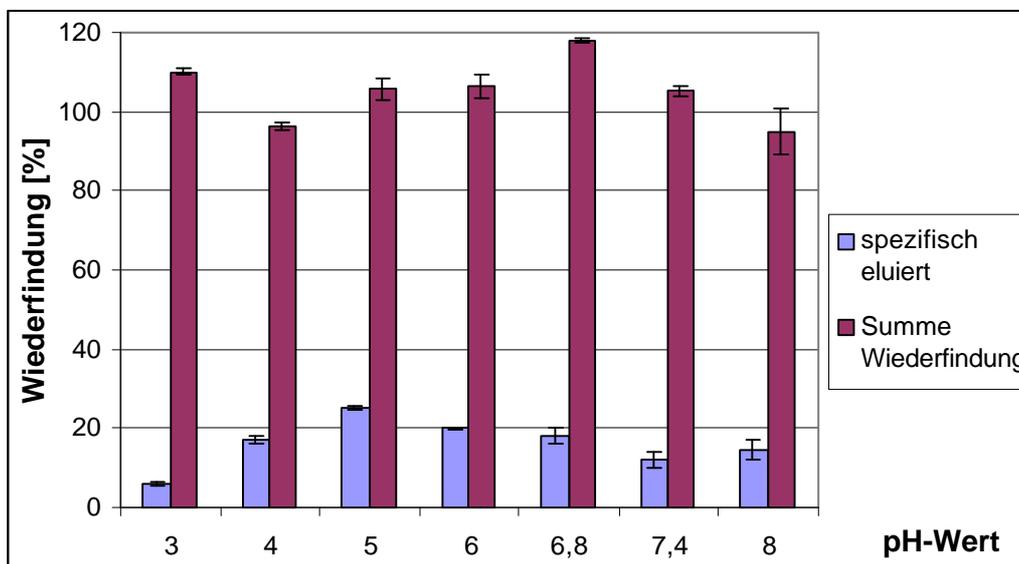


Abb. 7-12: Einfluß des pH-Wertes auf die Affinitätstrennung an Con A Toyopearl

Bei der Affinitätstrennung von POD an Con A Toyopearl (Abb. 7-12) zeigte sich ein Optimum bei pH 5 mit einer Wiederfindung von 25,2 % POD in der Elutionsfraktion. Bei pH 4 und pH 3 war ein Abfall der Bindung und Elution von POD auf 17,0 % bzw. 6,2 % der Aufgabemenge zu verzeichnen. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Systemen RCA und WGA war für Con A Toyopearl kein signifikanter Einfluß des pH-Wertes auf die Gesamtwiederfindung festzustellen. Ebenso war der Einfluß des pH-Wertes auf die Fraktionierung von POD in der Affinitätstrennung nicht so gravierend. Das Adsorbens Con A Toyopearl zeigte keine Beeinträchtigung durch den Betrieb bei pH 3 und war anschließend uneingeschränkt einsatzfähig. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde mit Con A Adsorbentien bei pH 5 oder pH 6 gearbeitet.

### Unspezifische Elution

Im Folgenden wurden Untersuchungen zur unspezifischen Elution vorgenommen (vergleiche auch Kap. 2.1.1). Eine unspezifische Elution der Glykoproteine ist von Interesse, um gegebenenfalls die spezifische Desorption durch die Elutionszucker zu ersetzen. Dies kann zur Reduzierung von Aufwand und Kosten bei der Elution für größere Maßstäbe interessant sein, allerdings unter Verlust von Spezifität. Auch ist die unspezifische Elution für die Regeneration der Adsorbentien wichtig. Unter diesem Aspekt wurden einige übliche Methoden (Turkova, 1993, S.346; Carlsson et al., 1989, S.310; Walters, 1985, S. 1108) der unspezifischen Elution an WGA Toyopearl untersucht. Hierzu gehört auch die Elution durch pH-Änderung. Die Untersuchungen

zum Einfluß des pH-Wertes (siehe oben) haben allerdings gezeigt, daß für die verwendeten Lektinsysteme keine Desorption der Modelladsorptive durch eine pH-Änderung im Bereich pH 3 bis 8 möglich ist.

Es wurden folgende weitere Parameter auf ihre Elutionskraft und auf die anschließende Regenerierung des Adsorbens hin untersucht:

- erhöhte Ionenstärke: NaCl
- nicht ionisches Detergenz: Octylglucosid
- anionisches Detergenz: Natriumdodecylsulfat (SDS)
- chaotropes Salz: Guanidin HCl

Als Adsorbens wurde WGA Toyopearl verwendet. Das Trägermaterial Toyopearl ist stabil gegenüber pH-Werten von 2 - 12 und gegenüber allen verwendeten Elutionsbedingungen. Es galt zu untersuchen, ob eine unspezifische Elution unter den jeweiligen Bedingungen möglich ist und ob das Lektin als Ligand in seiner Aktivität nachhaltig geschädigt wird. Für die Adsorption des Glykoproteins Fetuin an WGA Toyopearl und das anschließende Spülen wurde der Arbeitspuffer Phosphatpuffer pH 7,4 eingesetzt. Es wurden jeweils 500 µg Fetuin auf 0,5 mL Adsorbens aufgegeben. Für SDS und Guanidin-HCl wurden 250 µg Fetuin auf 0,25 mL WGA Toyopearl aufgegeben. Die unspezifische Elution erfolgte dann unter Zugabe des entsprechenden Agens im Arbeitspuffer. Anschließend wurde gespült und mit dem Elutionszucker GlcNAc im Arbeitspuffer eine spezifische Nachelution vorgenommen. Der Proteingehalt wurde in den Fraktionen „Spülen“, „unspezifische Elution“ und „spezifische Elution“ quantifiziert. Es wurden mit Ausnahme von SDS und Guanidin-HCl Doppelbestimmungen durchgeführt. Im Anschluß an jeden Versuch erfolgte die Überprüfung der Funktionsfähigkeit des Lektin-Adsorbens unter Standardbedingungen (Kap. 7.2.1). Die Ergebnisse sind in Tabelle 7-3 dargestellt.

Durch die Erhöhung der Ionenstärke durch Zugabe von 1 bzw. 2 mol/L NaCl konnte keine Desorption des Fetuins ausgelöst werden. Es war keine Beeinträchtigung des Adsorbens festzustellen. Durch den Einsatz von 0,5 % Octylglucosid konnte ein Teil des gebundenen Fetuins unspezifisch desorbiert werden. Die Wiederfindung bei der unspezifischen Elution betrug 8 %. Es wurden anschließend 27 % des aufgegeben Fetuin mit GlcNAc nacheluiert. Die Summe der Wiederfindung betrug 111 % und das Adsorbens wurde durch die Behandlung nicht nachhaltig beeinträchtigt. Die Elutionen mit SDS und Guanidin-HCl wurden nur qualitativ ausgewertet, da die Stoffe den Proteintest stören. Ein Chromatogramm für die Elution mit Guanidin-HCl ist im Anhang beispielhaft aufgezeigt (Abb. 12-8). Es war bei beiden Substanzen deutlich die Desorption von Protein erkennbar. Bei der anschließenden Überprüfung unter Standardbedingungen zeigte sich allerdings, daß das Adsorbens WGA Toyopearl geschädigt worden war und nicht mehr funktionsfähig war. Es wurden in der Spülfraktion des mit SDS behandelten Adsorbens 105 % des aufgegeben Proteins, bei

Guanidin-HCl 117 % quantifiziert. Das Lektin war durch die Behandlung denaturiert worden (Hamer, 2000).

*Tabelle 7-3: Unspezifische Elution von Fetuin an WGA Toyopearl*

Elutionsmittel	Fraktion	Absolute Menge FET [ $\mu\text{g}$ ]	Wiederfindung [%]	Summe Wiederfindung [%]	Schädigung des Adsorbens
1 mol/L NaCl	Spülen	373	75	92	Nein
	Unspez. Elution	0	0		
	Spez. Elution	86	17		
2 mol/L NaCl	Spülen	250	50	68	Nein
	Unspez. Elution	0	0		
	Spez. Elution	92	18		
0,5 % Octylglucosid	Spülen	379	76	111	Nein
	Unspez. Elution	41	8		
	Spez. Elution	135	27		
0,05 % SDS	Spülen	+			Ja
	Unspez. Elution	+			
4 mol/L Guanidin-HCl	Spülen	+			Ja
	Unspez. Elution	+			

+ Auswertung des Detektorsignals zeigte, daß Protein vorhanden war

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß eine unspezifische Elution des Fetuins mit bis zu 2 mol/L NaCl nicht möglich war. Das Protein konnte durch die Zugabe von 0,05 % SDS sowie durch 4 mol/L Guanidin-HCl unspezifisch eluiert werden, allerdings auf Kosten der Funktionsfähigkeit des Lektin-Adsorbens. Diese Behandlung kommt nur für Ausnahmefälle in Betracht. Der Einsatz von 0,5 % Octylglucosid führte zu einer teilweisen Elution des gebundenen Fetuins und beeinträchtigte das WGA Adsorbens nicht. Diese Methode kann sich eignen, um sie für eine Reinigung des Lektin Adsorbens von Probenbestandteilen einzusetzen.

Insgesamt kann die spezifische Desorption durch den Zucker GlcNAc durch keine der untersuchten Behandlungen, einschließlich der pH-Wert Änderung, ersetzt werden. Dieses Ergebnis bestätigt die hohe Spezifität und Stabilität des Affinitätskomplexes bei der Lektin-Affinitätstrennung. Um eine lange Funktionsfähigkeit des Adsorbens sicher zu stellen, sollten die Proben möglichst vorgereinigt bzw. sterilfiltriert aufgegeben werden.

### 7.2.4 Fraktionierung der Modelladsorptive im Trägervergleich

Zum Vergleich der Trägermaterialien in der kontinuierlichen Affinitätsreinigung wurden Modelladsorptive an unterschiedlichen Adsorbentien fraktioniert. Die Untersuchung des Glykoproteins Fetuin erfolgte an 5 verschiedenen WGA Adsorbentien (H20(I), H20 (II), Silika I005 (III), Toyopearl und Agarose). Es wurde unter Standardbedingungen (Kap. 7.2.1) gearbeitet und jeweils 500 µg Fetuin auf 0,5 mL WGA Adsorbens aufgegeben. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt und der Proteingehalt in den einzelnen Fraktionen quantifiziert. In Abb. 7-13 sind die Wiederfindungen in den Elutionsfraktionen und die Gesamtwiederfindung dargestellt. Die Fraktionierung des Glykoproteins Asialofetuin erfolgte an verschiedenen RCA Adsorbentien (Silika I005 (IV), Toyopearl und Agarose). Es wurde unter Standardbedingungen (Kap. 7.2) gearbeitet und jeweils 500 µg ASF auf 1 mL RCA Adsorbens aufgegeben. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und der Proteingehalt in den Fraktionen bestimmt.

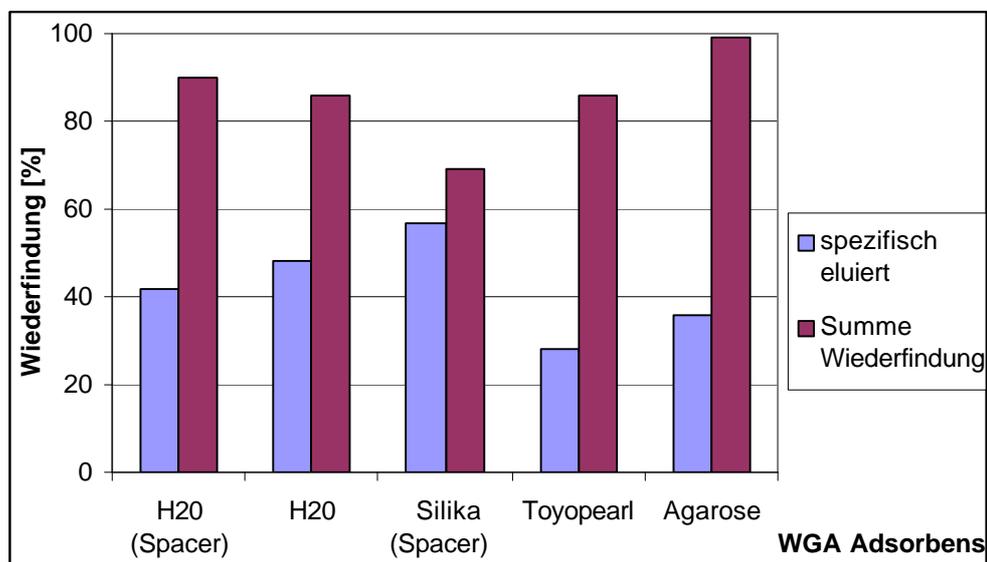


Abb. 7-13: Fraktionierung von Fetuin an verschiedenen WGA Adsorbentien

Die Ergebnisse in Abb. 7-13 zeigen, daß die Fraktionierung des Fetuins an den Adsorbentien unterschiedlich verlief. Es lag dabei keine Überladung der Adsorbentien vor (Kapazität der Adsorbentien für Fetuin siehe Kap 7.2.4). WGA Toyopearl und WGA Agarose zeigen hier mit 28 % und 36 % den geringsten Anteil an adsorbiertem und desorbiertem Fetuin. Für die Adsorbentien H20 (I) und H20 (II) liegt dieser Anteil bei 42 % und 48 %. Silika I005 (III) wies mit 57 % die größte Fraktion von adsorbiertem und desorbiertem Fetuin auf. Allerdings war die Gesamtwiederfindung bei Silika mit 69 % gering. Im Vergleich der RCA Adsorbentien (Abb. 7-14) zeigte sich der höchste Anteil für gebundenes ASF mit 86 % bei RCA Toyopearl. Für Agarose lag diese Fraktion bei 65 %. Vom Adsorbens RCA Silika I005 (III) konnten nur 55 % des aufgegebenen ASF eluiert werden. Die Gesamtwiederfindung betrug hier nur 64 %.

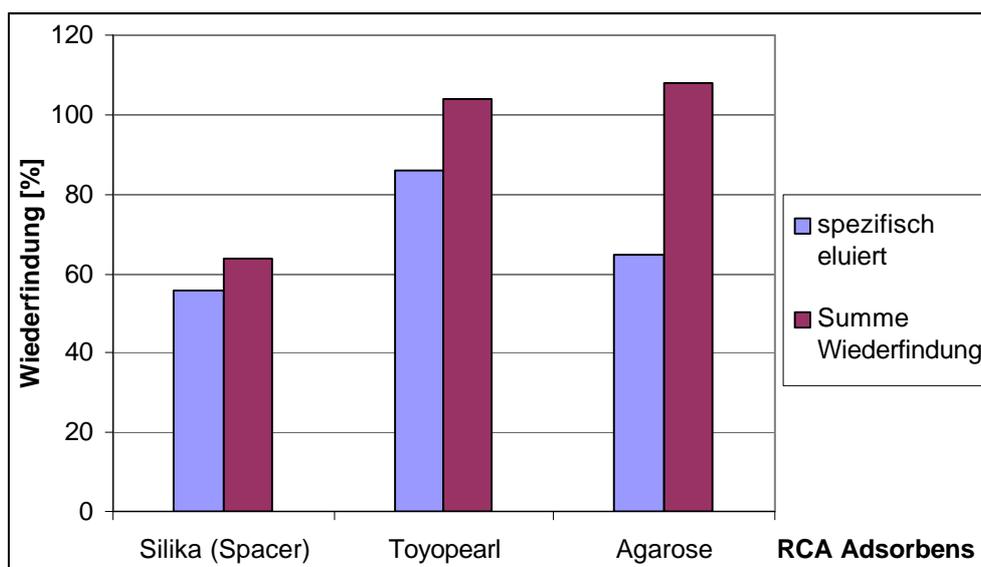


Abb. 7-14: Fraktionierung von ASF an verschiedenen RCA Adsorbentien

Aus den Versuchen wurde deutlich, daß die Fraktionierung der Glykoproteine nicht nur auf deren stoffliche Beschaffenheit zurückzuführen ist, sondern auch vom Adsorbens beeinflusst wird. Ebenso ist die Gesamtwiederfindung an den einzelnen Adsorbentien unterschiedlich. Aus der Tatsache, daß die Gesamtwiederfindung bei Silika mit 69 % bzw. 64 % gering ist, liegt der Schluß nahe, daß die Glykoproteine durch unspezifische Adsorption am Träger nicht vollständig eluierbar waren. Diese Effekte werden in der Diskussion in den Kapiteln 9.3 und 9.4 ausführlich diskutiert und bewertet.

### 7.2.5 Kapazität und Ausnutzung

Eine sehr wichtige Eigenschaft eines Lektin-Adsorbens ist die Kapazität. Zum einen ist es wichtig zu wissen, welche Probenmenge bearbeitet werden kann beziehungsweise welche Menge eines Wertstoffs in einem Affinitätszyklus aufgereinigt werden kann. So kann eine optimale Adsorbensmenge eingesetzt werden. Zum anderen ist die Kapazität aber auch ein wichtiges Kriterium, um eine Überprüfung des Adsorbens nach längerem Gebrauch zu ermöglichen.

Die Kapazität der einzelnen Lektin Adsorbentien wurde für das jeweilige Modelladsorptiv bestimmt (Standardbedingungen, Kap. 7.2.1). Dazu wurde das Glykoprotein im Überschuß auf die Säule gegeben und bei geschlossenem Auslaßventil anschließend für 20 min adsorbiert. Danach wurde die Säule 20 min lang gespült, bis kein Protein mehr detektiert werden konnte. Anschließend wurde unter Standardbedingungen mit dem jeweiligen Elutionszucker für 20 min eluiert und in den aufgefangenen Fraktionen der Proteingehalt bestimmt. Die Kapazität  $C$  [mg/mL] eines Adsorbens für ein Modelladsorptiv wurde folgendermaßen berechnet:

$$C[\text{mg} / \text{mL}] = \frac{m_d}{V_{ad}} \quad [7]$$

C = Kapazität [mg Adsorptiv/mL Adsorbens]

$m_d$  = spezifisch eluierte Proteinmenge [mg]

$V_{ad}$  = eingesetztes Festbettvolumen [mL]

Eine weiteres wichtiges Charakteristikum der Adsorbentien ergibt sich durch die Berechnung der prozentualen Ausnutzung der Bindungsstellen A [%] aus der experimentell ermittelten Kapazität:

$$A[\%] = \frac{N_{\text{Adsorptiv}} * 100}{N_i} \quad [8]$$

A = Ausnutzung der Lektin-Bindungsstellen [%]

$N_{\text{Adsorptiv}}$  = gebundene Stoffmenge des Adsorptivs [mol]

$N_i$  = Stoffmenge Bindungsstellen des immobilisierten Liganden [mol]

Einige Ergebnisse für RCA und Con A Adsorbentien sind beispielhaft in Tabelle 7-4 aufgezeigt. Es wurden die Kapazitäten für ASF bzw. POD bestimmt ( $n = 2$ ) und die Ausnutzung berechnet.

*Tabelle 7-4: Kapazität und Ausnutzung für RCA und Con A Adsorbentien*

<b>Adsorbens</b>	<b>Kapazität C [mg Adsorptiv / mL Adsorbens]</b>	<b>Ausnutzung der Bindungsstellen [%]</b>
RCA Toyopearl	2,5 mg ASF	82
RCA Agarose	1,2 mg ASF	47
RCA Silika I005 (IV)	2,5 mg ASF	35
RCA TSKgel	1,7 mg ASF	~ 50
Con A Toyopearl	1,6 mg POD	11
Con A Agarose	3,4 mg POD	14

Die Untersuchungen ergaben für RCA Toyopearl eine Kapazität von 2,5 mg ASF/mL. Dies entsprach einer sehr hohen Ausnutzung der RCA Bindungsstellen von 82 %. Dieser Wert zeigt, daß gleichzeitig zwei Moleküle ASF an einem RCA Liganden adsorbieren können, d.h. daß im Mittel beide Bindungsstellen des Lektins gut zugänglich sind. Die Ausnutzung der Bindungsstellen von Con A Agarose mit 14 % und Con A Toyopearl mit 11 % ergab ähnliche große Werte. Der Grund für die insgesamt niedrigere Ausnutzung gegenüber den RCA Adsorbentien ist in der Molekülgeometrie von Con A zu vermuten. Bei Con A sitzen 4 Bindungsstellen pro Tetramer auf den Ecken eines Tetraeders (siehe Abb. 3-1). Es ist anschaulich, daß hier im ungünstigsten Fall nur eine Bindungsstelle für ein makromolekulares Adsorptiv wie POD zugänglich sein kann.

Zum Vergleich der Trägermaterialien wurde die Kapazität für das Glykoprotein Fetuin an 5 verschiedenen WGA Adsorbentien untersucht (H20(I), H20 (II), Silika I005 (III), Toyopearl und Agarose). Die Kapazitäten (nicht dargestellt) lagen zwischen 1,5 mg Fetuin/mL für H20 (II) und 5,1 mg Fetuin/mL für Silika. Die Kapazität von WGA Toyopearl betrug 1,8 mg Fetuin/mL. In Abb. 7-15 ist die daraus berechnete Ausnutzung für die verschiedenen WGA Adsorbentien gegenübergestellt. Dabei sind die Werte für die immobilisierte Ligandmenge sowie die Oberflächenbelegung des Trägers mit Ligand zum Vergleich ebenfalls abgebildet (für Agarose läßt sich aufgrund der Struktur keine Oberflächenbelegung berechnen).

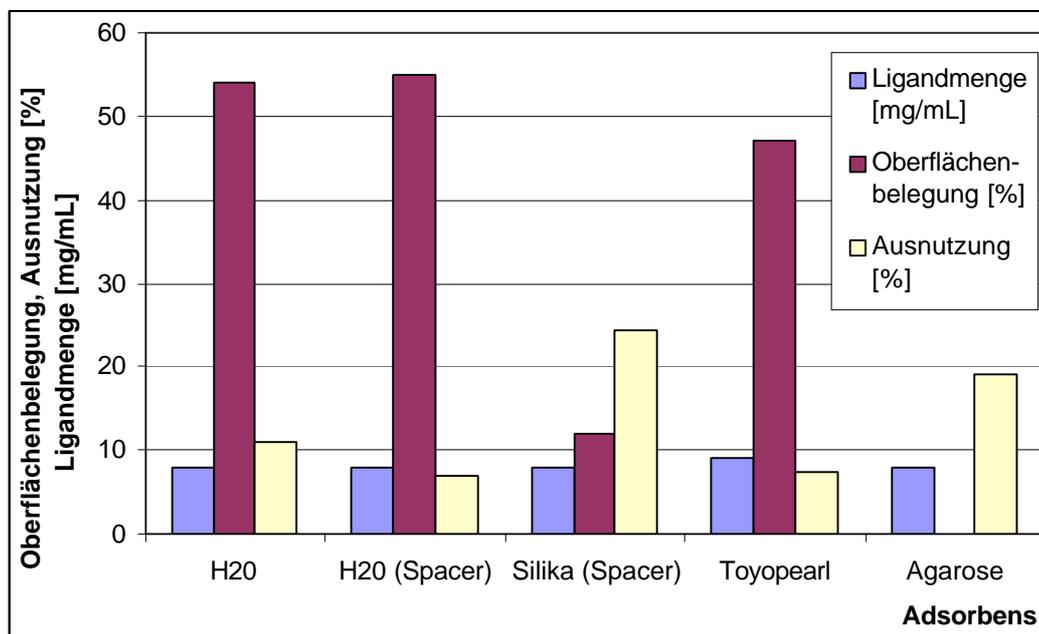


Abb. 7-15: Ausnutzung der Bindungsstellen verschiedener WGA Adsorbentien

Dabei wies H20 (II) mit Spacer die geringste Ausnutzung von 7 % auf. WGA Silika zeigte die höchste Ausnutzung mit 24 %. Der Vergleich unter Berücksichtigung der Oberflächenbelegung mit WGA zeigt, daß eine niedrige Oberflächenbelegung von 12 % bei Silika mit einer hohen Ausnutzung einher ging. Eine geringere Ligandendichte führt

zu einer geringen sterischen Hinderung während der Adsorption und einer guten Zugänglichkeit. Die Tatsache, daß die Ausnutzung der Bindungsstellen maximal 24 % betrug, kann in diesem Fall auf die Molekülstruktur des WGA zurückgeführt werden, die offenbar keine gleichzeitige Bindung von zwei Molekülen Fetuin pro immobilisiertem WGA Dimer ermöglicht.

### 7.2.6 Langzeitstabilität

Ein sehr wichtiges Kriterium für die Bewertung der Lektin Adsorbentien ist deren Langzeitstabilität. Insbesondere bei diesen relativ teuren Materialien und bei einer möglichen Anwendung in technischen Dimensionen ist der Aspekt der Stabilität entscheidend für die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens. Durch die Verwendung von Proteinliganden ist die Stabilität nicht selbstverständlich vorauszusetzen und sollte daher für verschiedene Adsorbentien untersucht werden. Dazu wurden die Kapazitäten für die Modelladsorptive entsprechend der in Kap. 7.2.5 beschriebenen Durchführung bestimmt (jeweils Doppelbestimmungen). Die Lagerung der Lektin-Adsorbentien erfolgte in den jeweiligen Lagerpuffern (Tabelle 6-2). Die Adsorbentien wurden während der Untersuchungen nicht für die Bearbeitung anderer Proben verwendet.

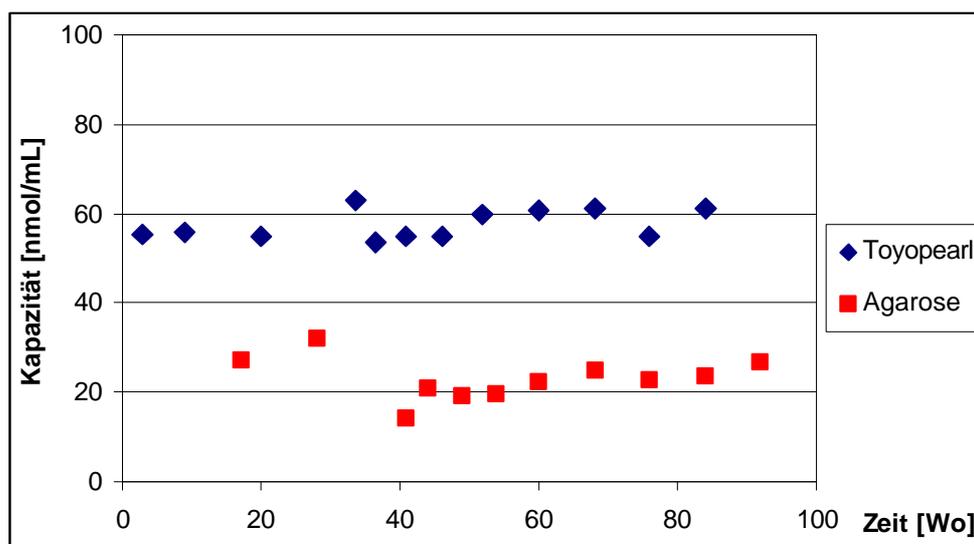


Abb. 7-16: Langzeitstabilität von RCA Adsorbentien

In Abb. 7-16 ist die Kapazität von RCA Toyopearl und RCA Agarose für das Adsorptiv ASF über einen untersuchten Zeitraum von 84 Wochen (1,6 Jahre) dargestellt. Es waren keine Anzeichen für einen Abfall der Kapazität erkennbar. Innerhalb des untersuchten Zeitraums war die Stabilität der RCA Adsorbentien unverändert gewährleistet.

Die Langzeitstabilität der Adsorbentien Con A Toyopearl und Con A Agarose bezüglich der Kapazität für das Adsorptiv Peroxidase (POD) ist in Abb. 7-17 wiedergegeben. Im Rahmen dieser Untersuchungen zeigte sich ein Abfall der Kapazität für POD innerhalb der ersten 15 bis 20 Wochen um ca. 50 %. Im weiteren Verlauf (50 Wochen) war keine Verringerung der Kapazität mehr zu verzeichnen.

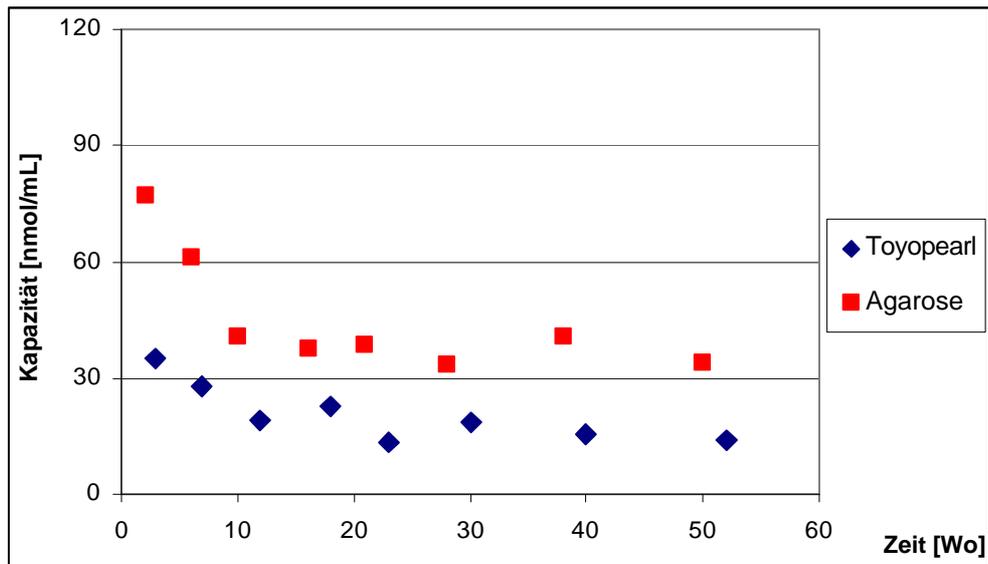


Abb. 7-17: Langzeitstabilität von Con A Adsorbentien

Die Bestimmung der Langzeitstabilität der Adsorbentien WGA Toyopearl und WGA Agarose wurde mit dem Adsorptiv Ovomuroid durchgeführt. Die Kapazität für Ovomuroid ist in Abb. 7-18 über einen Zeitraum von 31 Wochen dargestellt. Dabei zeigte sich kein Abfall der Kapazität innerhalb des untersuchten Zeitraums und damit eine gute Langzeitstabilität der Adsorbentien.

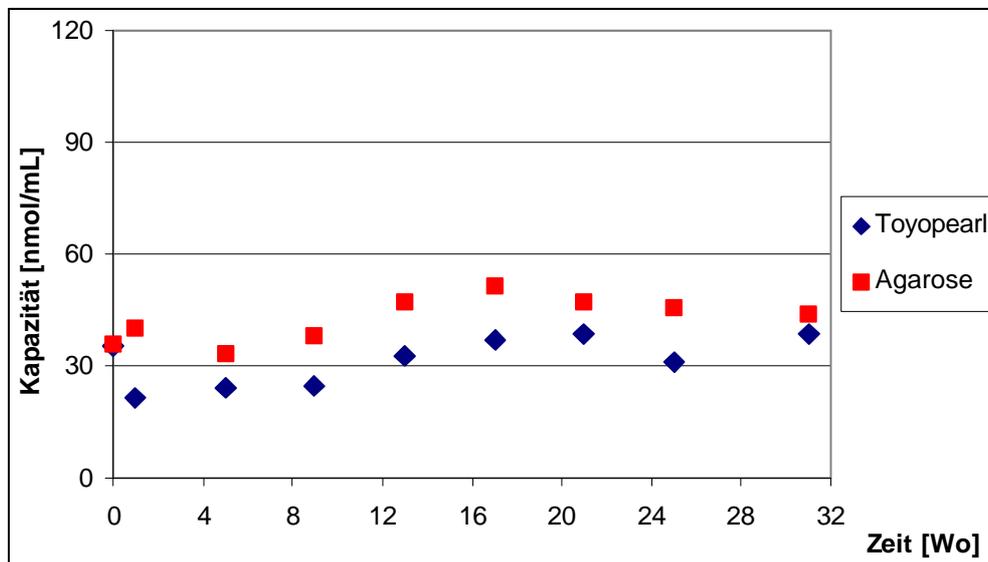


Abb. 7-18: Langzeitstabilität von WGA Adsorbentien

### 7.2.7 Strukturspezifische Trennung von Mono- und Disacchariden

Die Trennleistung der HPLAC wurde anhand der strukturspezifischen Trennung von Mono- und Disacchariden untersucht. Die Affinität zu diesen Sacchariden ist schwächer als gegenüber Makromolekülen. So weisen Lactose und Galactose eine Affinität zu RCA von  $K_d = 10^{-4} - 10^{-5}$  [mol/L] auf (siehe Kap. 3.2.1). Diese Substanzen werden nicht „fest“ am RCA-Adsorbens gebunden, sondern entsprechend der Bindungsaffinität retardiert, so daß es zu einer chromatographischen Trennung kommt (siehe auch Kap. 2.1.2, Analytische Anwendungen; Zopf und Ohlson, 1990). Die Trennung der Saccharide Glucose, Mannose, Lactose und Galactose wurde an der HPLAC Säule RCA TSKgel vorgenommen, um die Strukturspezifität der Lektin-Affinitätstrennung und die Trennleistung der Lektin HPLAC aufzuzeigen. Gleichzeitig wurde ein Modellsystem benötigt, mit dem die Trennleistung der Säule in regelmäßigen Abständen überprüft werden kann.

Es wurde die Trennsäule mit 4,6 mg RCA/mL Festbett (siehe Kap. 4.2.2, Kap 6.1 und Tabelle 6-6) und einer Kapazität von 1,7 mg ASF/mL (siehe Tabelle 7-4) verwendet. Die Saccharide wurden als Nitrophenylderivate eingesetzt, um eine Detektion bei  $\lambda = 300$  nm zu ermöglichen (Aufgabe jeweils 4  $\mu$ g). Als mobile Phase diente der Arbeitspuffer Phosphatpuffer pH 7,2 bei einem Fluß von 1 mL/min. Es wurde sowohl isokratisch als auch mit einem Lactosegradienten gearbeitet. Die Abbildungen 7-19 und 7-20 zeigen die Trennung der Mono- und Disaccharide.

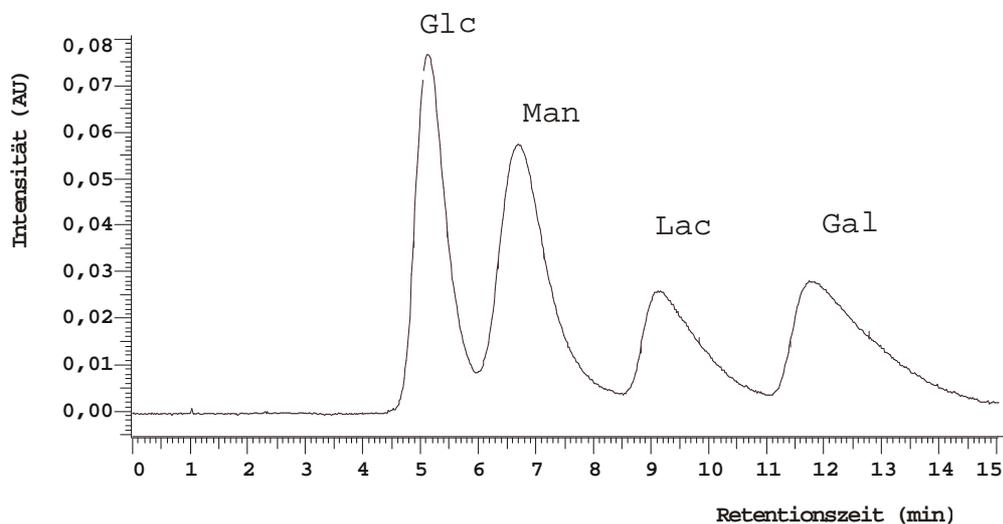


Abb. 7-19: Strukturspezifische Trennung von Sacchariden an RCA TSKgel

Das dargestellte Chromatogramm zeigt die affinitätschromatographische Trennung der Saccharide. Dabei fand eine Trennung nach der Struktur der Substanzen statt, d.h., der Zucker, dessen Struktur die größte Komplementarität zur RCA Bindungsstelle hatte, wurde mit der größten Affinität gebunden und am stärksten retardiert. Für RCA waren

dies Nitrophenyl-Lactose und -Galactose, die nach 9,17 min und 11,74 min eluierten. Die Saccharide Mannose und Glucose wurden zeitversetzt nach der Totzeit von 2,29 min weniger verzögert. Die Trennung dieser Standardsubstanzen zeigt die Strukturspezifität und Selektivität der Lektin-HPLAC. Durch Anlegen eines Gradienten (von 3,5 min bis 13,5 min auf 50 mmol/L Lactose) konnte die Trennzeit verkürzt und die Auflösung für die Substanzen Lactose und Galactose verbessert werden (Cartellieri et al., 2001a, b).

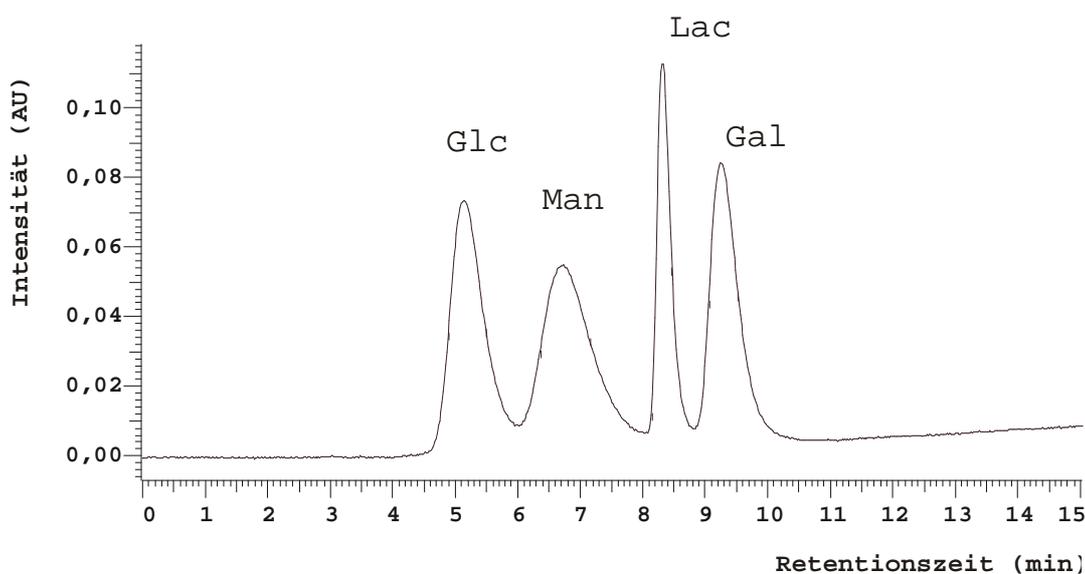


Abb. 7-20: Strukturspezifische Trennung von Sacchariden an RCA TSKgel mit Lactose-Gradient

Die beschriebene RCA HPLAC Säule kann vergleichbar auch für die strukturspezifische Trennung von Oligosacchariden, Glykopeptiden oder anderen Glykokonjugaten eingesetzt werden. Im Verlauf dieser Arbeit wurde die aufgezeigte Trennung als Modellsystem (Testchromatogramm) zur Überprüfung der RCA Säule im Tagesbetrieb verwendet.

### Selektivität und Langzeitstabilität der RCA HPLAC-Säule

Die Selektivität  $r_{ji}$  bezeichnet die relative Retention einer Substanz und ist ein Maß für die Trennleistung einer Säule. Sie berechnet sich wie folgt (Schwedt, 1994):

$$r_{21} = \frac{t_{R2} - t_m}{t_{R1} - t_m} \quad [9]$$

$r_{ji}$  = Selektivität, relative Retentionszeit

$t_m$  = Totzeit der mobilen Phase [min]; hier  $t_m = 2,29$  min

$t_{Ri}$  = Retentionszeit der Substanz i

Die Trennleistung (Selektivität) der RCA TSKgel Säule wurde überprüft und über einen längeren Zeitraum (10 Monate) überwacht. In der Tabelle 7-5 sind die Retentionszeiten der Saccharide und die Selektivitäten der Testchromatogramme direkt nach der Herstellung des Adsorbens (Abb. 7-19) und nach 10 Monaten (nicht dargestellt) gegenübergestellt.

Tabelle 7-5: Selektivität der RCA HPLAC-Säule

<b>Analyt</b>	<b>Retentionszeit <math>t_{Ri}</math> [min]</b>	<b>Selektivität (rel. Retentionszeit) <math>r_{ji}</math> [min]</b>
<i>Testchromatogramm nach Immobilisierung von RCA</i>		
Glucose	$t_{R1} = 5,12$	-
Mannose	$t_{R2} = 6,69$	$r_{21} = 1,55$
Lactose	$t_{R3} = 9,17$	$r_{32} = 1,56$
Galactose	$t_{R4} = 11,74$	$r_{43} = 1,37$
<i>Testchromatogramm nach 10 Monaten Betrieb</i>		
Glucose	$t_{R1} = 5,12$	-
Mannose	$t_{R2} = 6,66$	$r_{21} = 1,54$
Lactose	$t_{R3} = 8,62$	$r_{32} = 1,45$
Galactose	$t_{R4} = 11,52$	$r_{43} = 1,46$

Das Testchromatogramm, welches 10 Monate nach der Herstellung des Adsorbens aufgenommen wurde, zeigte nahezu keine Veränderung der Retentionszeiten und Selektivitäten. In der Zwischenzeit waren 80 Proben, die aus Standardsubstanzen (Glykoproteine, Glykolipide) und Vielstoffgemischen (Extrakten, Serum) bestanden, bearbeitet worden. Es wird aus dem Vergleich deutlich, daß das Adsorbens dadurch kaum beeinflußt wurde. Die geringfügig reduzierte Aktivität der RCA Liganden führte lediglich zu einer leichten Verkürzung der Retentionszeiten von Mannose, Lactose und Galactose. Die Untersuchung ergab eine gute Langzeitstabilität des Adsorbens im Tagesbetrieb.

## 8 Affinitätstrennung von Glykokonjugaten

Im Kapitel 7 wurde die Charakterisierung der entwickelten Lektin-Adsorbentien ausführlich beschrieben. Nachdem anhand von Modellsystemen die Parameter der Affinitätstrennung für die jeweiligen Lektinsysteme optimiert und die Adsorbentien hinsichtlich Kapazität, Ausnutzung und Stabilität charakterisiert wurden, standen die Systeme für die Anwendung in weiteren Affinitätstrennungen zur Verfügung. Im vorliegenden Kapitel werden ausgewählte Lektin-Affinitätstrennungen (Niederdrucktrennungen und HPLAC) beschrieben. Dabei wird eine Unterteilung in Einzelstoffsysteme, definierte Stoffmischungen und Vielstoffgemische vorgenommen. Als präparative Anwendungen der Lektin-Affinitätstrennung wird die Aufreinigung des Enzyms Peroxidase sowie die Isolierung von Fetuin aus fetalem Rinderserum beschrieben.

### 8.1 Einzelstoffsysteme

#### 8.1.1 Affinitätstrennung von Glykoproteinen

Die Affinitätstrennung einzelner Glykoproteine und deren Fraktionierung wurde an den Lektinsystemen WGA und Con A untersucht. An der HPLAC-Säule RCA TSKgel wurden Affinitätstrennungen von Glykoproteinen vorgenommen.

Für die Trennungen am Lektin WGA wurde 0,5 mL des Adsorbens WGA Agarose eingesetzt. Es wurden jeweils 500 µg der Glykoproteine Fetuin, Ovomuroid, Asialofetuin (ASF) und saures  $\alpha_1$ -Glykoprotein (AGP) aufgegeben. Nach dem Spülen wurde mit 0,2 mol/L GlcNAc eluiert und der Proteingehalt in Spülfraction und Eluat quantifiziert. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Affinitätstrennungen an Con A wurden mit 1 mL Con A Toyopearl (7,9 mg Con A/mL Träger) bei pH 5 durchgeführt. Es wurden jeweils 500 µg der Glykoproteine Peroxidase (POD),  $\alpha_1$ -Glykoprotein (AGP), Glucose Oxidase (GOD) sowie 600 µg Lactoferrin aufgegeben (Dreifachbestimmung) und unter Zugabe von 0,1 mol/L Mannose eluiert. Der Proteingehalt wurde ebenfalls in den Spülfractionen und Eluaten bestimmt. Die Affinitätstrennungen an der HPLAC-Säule RCA-TSKgel wurden mit dem Arbeitspuffer (Phosphatpuffer pH 7,2) bei einem Fluß vom 1,0 ml/min als mobile Phase durchgeführt. Es wurden jeweils 200 µg der Glykoproteine Ovomuroid, saures  $\alpha_1$ -Glykoprotein (AGP), Fetuin (FET) und Asialofetuin (ASF) analysiert. Die Elution erfolgte durch einen Stufengradienten von 0,07 mol/L Lactose. Die Detektion erfolgte bei  $\lambda = 280$  nm.

In Abbildung 8-1 ist die Fraktionierung der Glykoproteine Fetuin, Ovomuroid, ASF und AGP an WGA Agarose dargestellt. Dabei zeigt sich, daß Fetuin und Ovomuroid mit nahezu gleichen Anteilen an der WGA Agarose binden. Die Wiederfindung im Eluat beläuft sich für Fetuin auf 36 % bei einer Gesamtwiederfindung von 99 % und bei

Ovomucoid auf 38 % bei einer Gesamtwiederfindung von 96 %. Wie bereits im Kapitel 7.2.2 ausgeführt, eignet sich Ovomuroid ebenfalls als Modelladsorptiv für die Charakterisierung von WGA Adsorbentien. Das Glykoprotein ASF adsorbierte zu einem Anteil von 12 % am WGA. Das läßt darauf schließen, daß noch Reste von Sialinsäuren am Kohlenhydratanteil des ASF vorhanden sind (vergleiche Herstellung von ASF aus Fetuin Kap. 3.2.2), da WGA eine Affinität zu GlcNAC aufweist. Die Ergebnisse stimmen gut mit der Abtrennung von ASF an RCA-Adsorbentien überein (vergleiche die Kapitel 7.2.2 und 7.2.4). An RCA Agarose und RCA Toyopearl wurden 65 - 86 % des ASF gebunden, was auf das Vorhandensein von terminalen Galactosen zurückzuführen ist. Die Wiederfindung des Glykoproteins AGP im Eluat betrug nur 6 %. Dieses Ergebnis könnte auf die Mikroheterogenität des Proteins (siehe Kap. 3.2.1) zurückgeführt werden. Weiterhin können auch ungenügendes Spülen oder unspezifische Adsorption als Gründe genannt werden. Es wurde in diesem Fall davon ausgegangen, daß AGP keine signifikante Affinität zu WGA aufweist (vergleiche dazu Abb. 12-11).

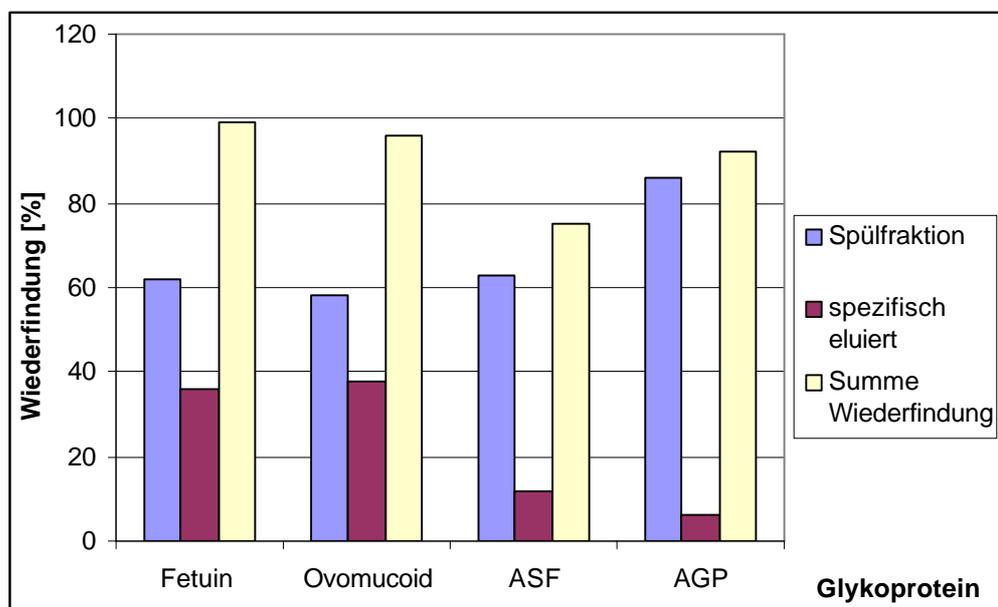


Abb. 8-1: Affinitätstrennung von Glykoproteinen an WGA Agarose

Die Affinitätstrennung der Substanzen POD, AGP, GOD und Lactoferrin an Con A Toyopearl ist in Abb. 8-2 wiedergegeben. Die Fraktionierung von POD wurde bereits als Modellsystem für Con A Adsorbentien (Kap. 7.2.2) beschrieben. Es wurden 31 % an Con A Toyopearl adsorbiert und eluiert. AGP wurde zu 55 % adsorbiert und eluiert. Dieses weist auf ein Vorhandensein von mannosehaltigen Strukturen hin (vergleiche Affinität von Con A Kap. 3.1.1. sowie Zusammensetzung von AGP Kap. 3.2.2). Glucose Oxidase wurde zu 56 % nach der Adsorption eluiert. Allerdings betrug die Gesamtwiederfindung nur 78 %. Dieses Ergebnis ist auf die große Affinität von ca.  $K_d = 10^{-7}$  mol/L zu Con A (vergleiche Kap. 7.1.2) zurückzuführen. GOD eignet sich wegen der starken Bindung als Modellsubstanz für die Aufnahme von Adsorptionsisothermen, war allerdings aufgrund der schlechten Eluierbarkeit als

Modelladsorptiv für die kontinuierliche Affinitätstrennung an Con A Adsorbentien ungeeignet. Die hohe Gesamtwiederfindung für die Affinitätstrennung von Lactoferrin mit 143 % läßt vermuten, daß hier mit der Elution auch Ligand vom Träger abgelöst wurde.

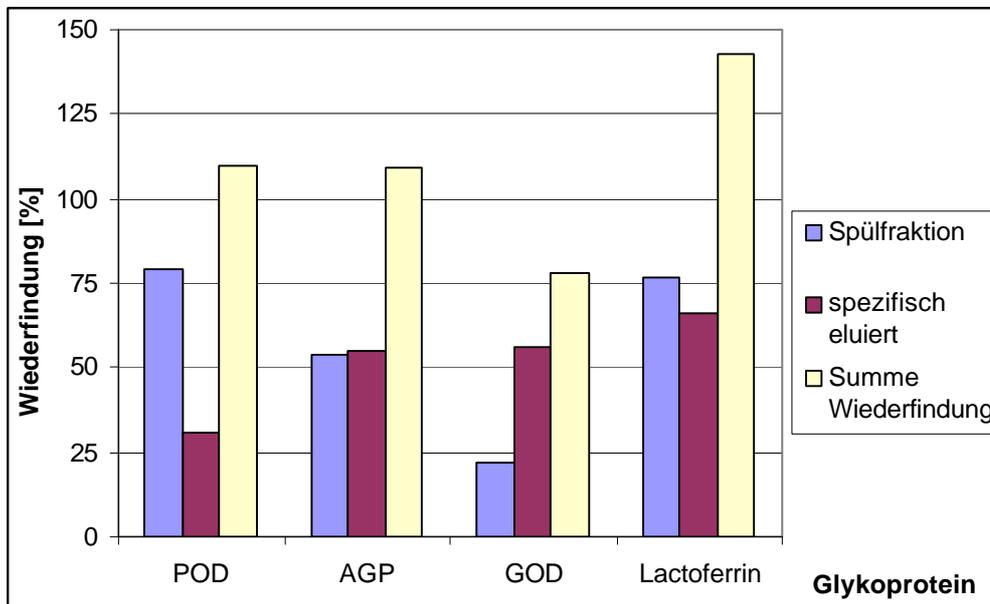


Abb. 8-2: Affinitätstrennung von Glykoproteinen an Con A Toyopearl

Im Folgenden sind die Chromatogramme einiger Affinitätstrennungen an der RCA-TSKgel Säule dargestellt. Die Fraktionierung von Ovomuroid ist in Abb. 8-3 wiedergegeben. Der Pfeil zeigt die Elution des absorbierten Materials an.

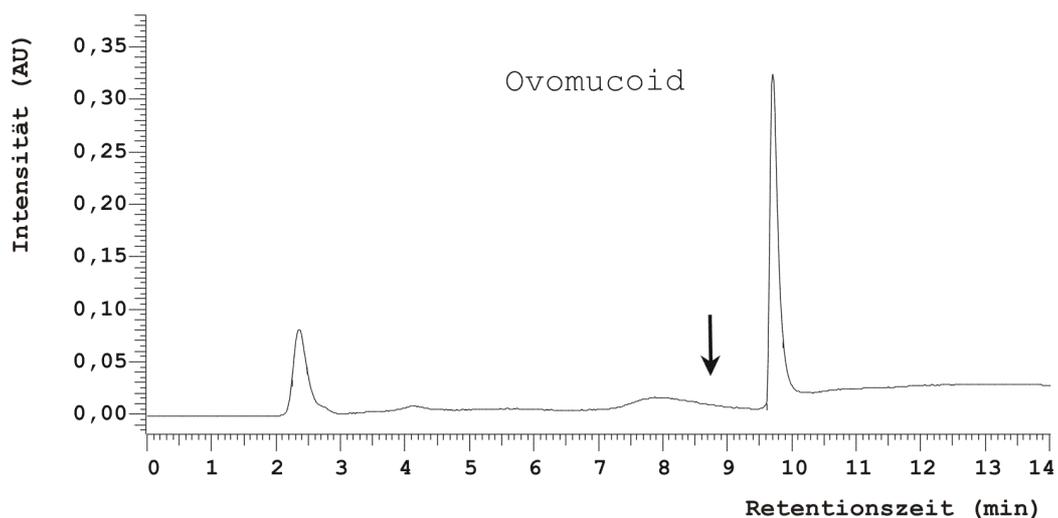


Abb. 8-3: Affinitätstrennung von Ovomuroid mittels HPLAC an RCA TSKgel

Ovomucoid zeigte eine Bindungsaffinität zu RCA, was auf das Vorhandensein von terminalen Galactosen schließen läßt. Dieses Ergebnis zeigte im Zusammenhang mit der Abtrennung von Ovomuroid an WGA (Abb. 8-1) die Heterogenität der Kohlenhydratstruktur, in der sowohl GlcNAc als auch Galactose vorhanden ist (siehe auch Diskussion Kap. 9.3).

Das Chromatogramm der Trennung von AGP mittels HPLAC an RCA TSKgel ist in Abb. 8-4 dargestellt. Die spezifische Desorption mit Lactose weist wiederum auf das Vorhandensein von endständigen Galactoseresten hin (vergleiche Kap. 3.2.2).

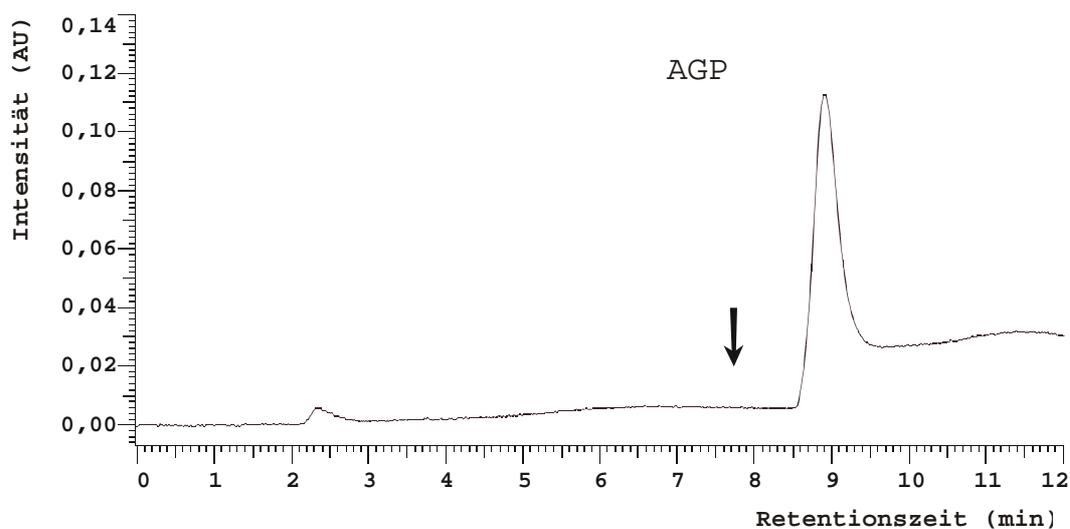


Abb. 8-4: Affinitätstrennung von AGP mittels HPLAC an RCA TSKgel

Die Affinitätstrennung von Asialofetuin (ASF) und Fetuin (FET) mittels HPLAC an RCA TSKgel ist im Anhang (Kap. 12.6, Abb. 12-9 und 12-10) abgebildet. Es zeigte sich bei der Trennung von ASF (entsprechend den Ergebnissen in Kap. 7.2.2, Abb. 7-7), daß der überwiegende Anteil des Asialofetuin am RCA Adsorbens gebunden und mit Lactose spezifisch eluiert werden konnte. Das Glykoprotein Fetuin wurde durch die Affinitätstrennung an RCA in 3 Fraktionen getrennt. Eine Fraktion zeigte keine Affinität zum RCA und eluierte mit dem Totvolumen. Ein großer Anteil zeigte schwache Affinität zum RCA und wurde retardiert. Eine Fraktion des Fetuin wurde am RCA gebunden und mittels Lactose spezifisch eluiert.

Die Ergebnisse verdeutlichen die Heterogenität der Kohlenhydratstruktur von Glykoproteinen. Die Fraktionierung der Glykoproteine wird in Kap. 9.3 diskutiert.

### 8.1.2 Aufreinigung von Peroxidase an Con A Adsorbentien

Die Bindungsaffinität des aus dem Meerrettich stammenden Enzyms Peroxidase zum Lektinliganden Con A wurde bereits mehrfach beschrieben (Kap. 7.2.2, Abb. 7-8). In den hier dargestellten Untersuchungen wurde überprüft, ob die Aufreinigung von

Peroxidase an Con A Adsorbentien mit einer Steigerung der Enzymaktivität verbunden ist. Um diese Fragestellung zu bearbeiten wurde eine kommerziell erhältliche Peroxidase-Präparation (siehe Kap. 3.2.2) unter Verwendung der Lektin-Adsorbentien Con A Silika und Con A Agarose aufgereinigt und die relative Enzymaktivität im Vergleich zum Ausgangsmaterial bestimmt.

Für die Aufreinigung der Peroxidase (POD) wurden die Adsorbentien Con Silika I005 (IV) und Con A Agarose verwendet. Die Affinitätstrennung wurde mit Acetatpuffer pH 5,0 durchgeführt. Jeweils 500 µg POD wurden an den Adsorbentien aufgereinigt und mehrere Spülfraktionen sowie die mit Mannose eluierte Fraktion in 10 mL Meßkolben aufgefangen. Die in den Fraktionen vorliegende Proteinmenge wurde mittels Proteinbestimmung ermittelt (Arbeitsvorschrift Kap. 12.4.1). Die Enzymaktivität des Ausgangsmaterials POD sowie die Aktivität in den einzelnen Fraktionen wurde wie in Kap. 5.3 beschrieben quantifiziert und nach Gleichung [2] berechnet. Die Enzymaktivität  $A_E$  [U/L] wurde auf die quantifizierte Proteinmenge bezogen und als relative Enzymaktivität in [U/mg Protein] ausgedrückt. Die relativen Enzymaktivitäten in den jeweiligen Spülfraktionen sowie in der aufgereinigten POD Fraktion wurden mit der relativen Enzymaktivität des Ausgangsmaterials verglichen. Die Ergebnisse für die beiden verwendeten Adsorbentien sind in Abb. 8-5 und 8-6 dargestellt.

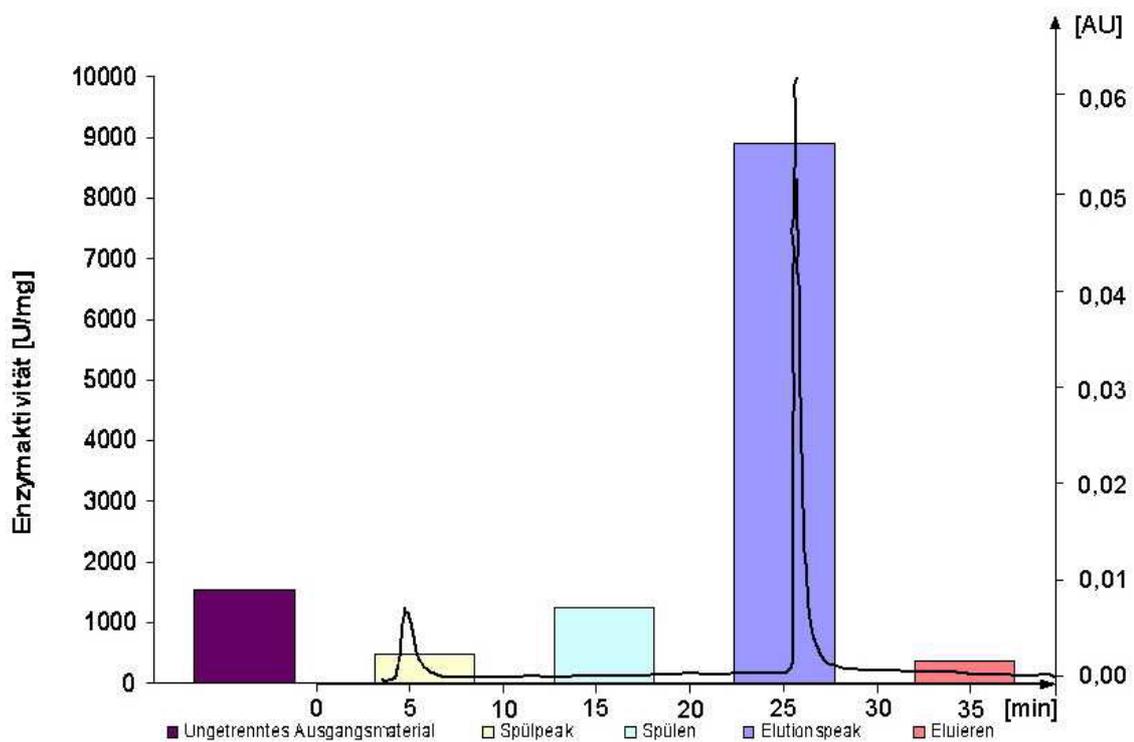


Abb. 8-5: Aufreinigung von Peroxidase an Con A Silika

Die Aufreinigung von POD an Con A Silika ist in Abb. 8-5 dargestellt. Auf der primären Ordinate ist die relative Enzymaktivität [U/mg] des Ausgangsmaterials und

der Fraktionen der Affinitätstrennung aufgetragen. Die relative Aktivität der Ausgangspräparation von 1531 U/mg war dabei etwas höher als der Wert, der für dieses Material angegeben war. Die Herstellerangabe (Sigma-Aldrich, München) für die Enzymaktivität belief sich auf ca. 600 – 1000 U/mg (umgerechnet auf ABTS). Die untersuchten Spülfraktionen sowie die eluierte Fraktion, die das aufgereinigte Material enthielt, sind in der Abbildung mit dem Chromatogramm der Affinitätstrennung überlagert, welches über die Zeit [min] aufgetragen wurde und die Absorption bei  $\lambda = 280$  nm auf der sekundären Ordinate anzeigt. Aus den Ergebnissen wird deutlich, daß die drei Spülfraktionen eine geringere relative Enzymaktivität aufwiesen als das ungetrennte Ausgangsmaterial. Das am Lektin adsorbierte und spezifisch eluierte Peroxidase material wies hingegen eine deutlich erhöhte relative Enzymaktivität von 8898 U/mg gegenüber dem Ausgangsmaterial auf. Die Aufreinigung der Peroxidase mittels Affinitätstrennung an Con A Silika bewirkte eine Steigerung der Enzymaktivität um den Faktor 5,8.

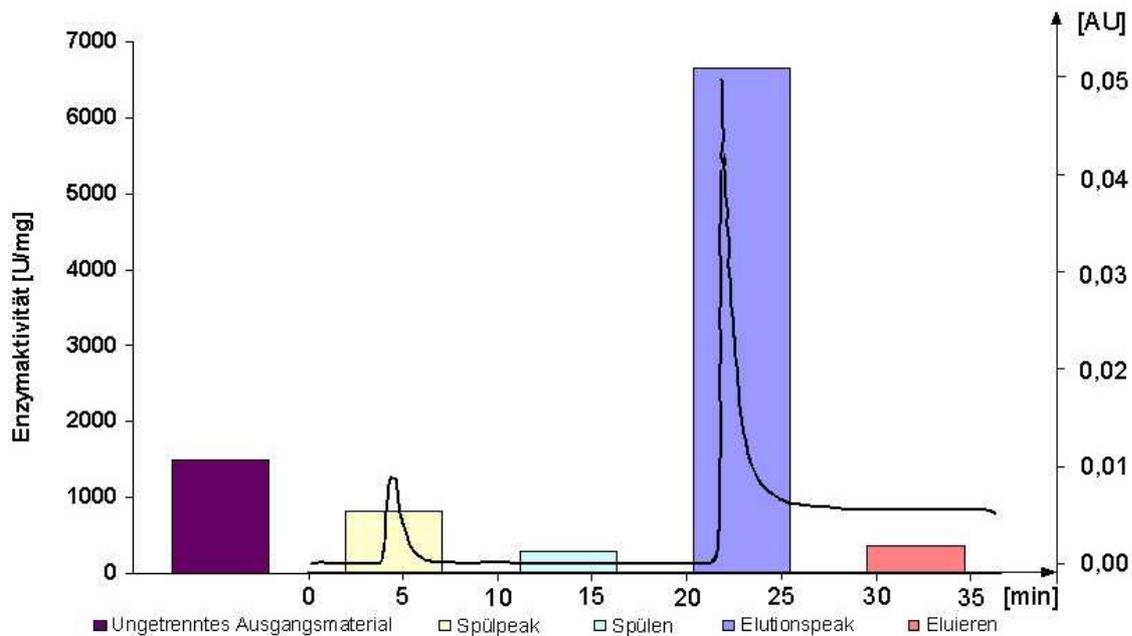


Abb. 8-6: Aufreinigung von Peroxidase an Con A Agarose

Die Affinitätstrennung von Peroxidase an Con A Agarose ist in Abb. 8-6 aufgezeigt. Die Enzymaktivität des Ausgangsmaterials wurde hier mit 1497 U/mg bestimmt. Aus der Abbildung wird deutlich, daß bei dieser Affinitätstrennung ebenfalls eine Steigerung der Enzymaktivität gegenüber dem ungetrennten Ausgangsmaterial erzielt wurde. Die Aktivität im Elutionspeak betrug 6661 U/mg Protein. Es wurde hier eine Aufreinigung um den Faktor 4,4 erreicht.

Die Ergebnisse zeigen, daß eine Peroxidase-Präparation aus Meerrettich mittels Affinitätstrennung an Con A Adsorbentien unter Steigerung der Enzymaktivität aufgereinigt werden konnte.

## 8.2 Definierte Stoffmischungen

In diesem Abschnitt soll ein kurzer Einblick gegeben werden, welche weiteren Möglichkeiten die Affinitätstrennung für die Trennung von Proteinen und Glykoproteinen bietet. Um dieses zu verdeutlichen soll die Trennung zweier definierter Stoffmischungen, die aus Standardmaterialien hergestellt wurden, aufgezeigt werden. Es handelt sich dabei um das realitätsnahe Trennproblem der Abtrennung des Serumproteins saures  $\alpha_1$ -Glykoprotein (AGP) vom Rinderserum Albumin (BSA). Weiterhin wird das hypothetische Trennproblem von Glykoproteinen und einfachen Sacchariden vorgestellt.

Die Trennungen erfolgten mittels Lektin HPLAC. Dabei wurden die Säulen RCA TSKgel und SigmaChrom AF-Con A verwendet (siehe Kap. 4.2.2 und Tabelle 6-6). Für die Trennung an RCA TSKgel wurde der Phosphatpuffer pH 7,2 bei einem Fluß von 1 mL/min als mobile Phase verwendet. Die Elution erfolgte mit einem Stufengradienten von 0,07 mol/L Lactose. Die Trennung an SigmaChrom AF-Con A wurde mit Acetatpuffer pH 6,0 bei einem Fluß von 1 mL/min durchgeführt, wobei mit 0,2 mol/L Mannose eluiert wurde. Die Chromatogramme der Trennungen sind in Abb. 8-7 und 8-8 wiedergegeben.

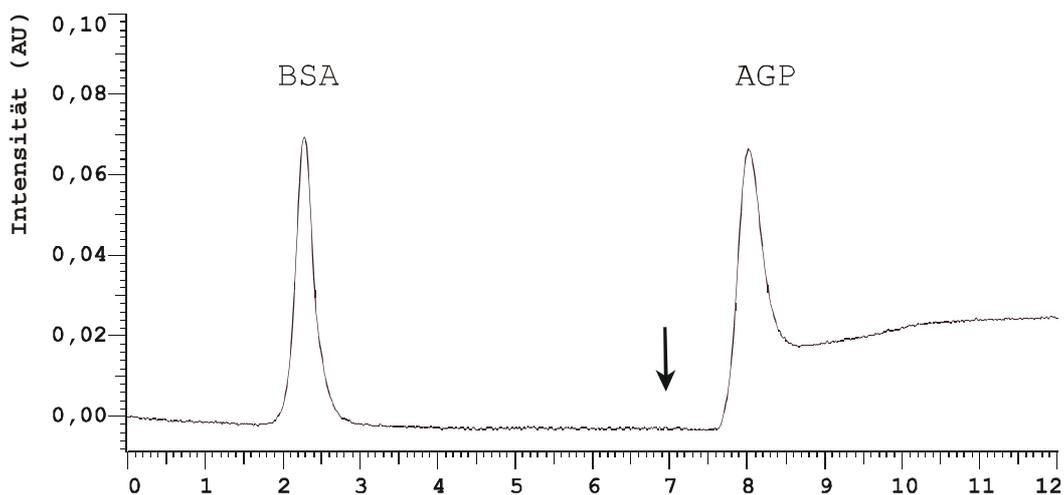


Abb. 8-7: Affinitätstrennung von BSA und AGP an RCA TSKgel

Das Chromatogramm in Abb. 8-7 zeigt die Affinitätstrennung von AGP und BSA (je 200  $\mu$ g Protein). BSA, welches keine Bindungsaffinität zum Liganden RCA besitzt, wird mit dem Totvolumen eluiert. AGP bindet am Lektin und kann durch Zugabe von

Lactose (Pfeil) desorbiert werden. Es wird deutlich, daß AGP mittels Affinitätstrennung an RCA TSKgel von BSA abgetrennt bzw. aufgereinigt werden kann. Diese Affinitätstrennung könnte beispielsweise für Aufgabenstellungen herangezogen werden, bei denen AGP aus Serum aufgereinigt wird, wobei auch eine Abtrennung von BSA erfolgen muß.

In Abb. 8-8 ist die Affinitätstrennung eines Stoffgemisches aus FET, POD und vier Sacchariden (Nitrophenylderivate) an SigmaChrom AF-Con A dargestellt. Es wurden jeweils 200 µg der Proteine und 4 µg der Saccharide eingesetzt. Es wird deutlich, daß Fetuin keine Affinität zu Con A aufwies und mit dem Totvolumen eluierte. Die Saccharide Lactose, Galactose, Glucose und Mannose wurden entsprechend ihrer Affinität zu Con A retardiert, wobei Mannose mit der höchsten Affinität am stärksten zurückgehalten wurde. Die Elutionsreihenfolge der strukturspezifischen Affinitätstrennung der Saccharide kehrte sich entsprechend der Bindungsspezifität an Con A gegenüber der Trennung an RCA um (vergleiche Abb. 7-19). Die durch den Pfeil gekennzeichnete Elution mit Mannose führte zur Desorption der spezifisch gebundenen Peroxidase, welche so von den übrigen Substanzen abgetrennt werden konnte.

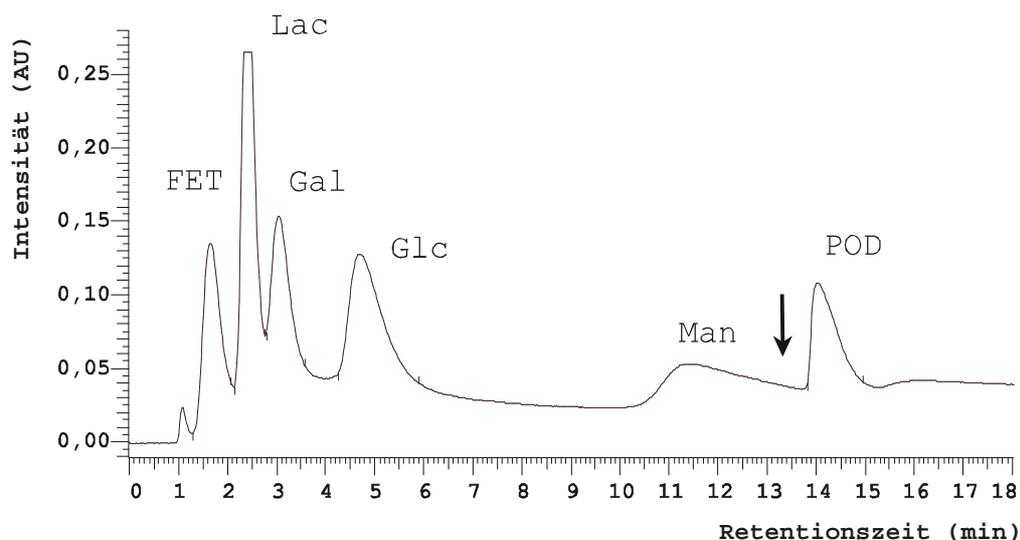


Abb. 8-8: Affinitätstrennung von FET, POD und Nitrophenyl-Sacchariden an SigmaChrom AF-Con A

### 8.3 Natürliche Vielstoffmischungen

In den Kapiteln 8.1 und 8.2 wurde die Anwendung der Lektin-Affinitätstrennung in der Fraktionierung und Aufreinigung von Einzelstoffsystemen und definierten Stoffmischungen beschrieben. Im vorliegenden Kapitel 8.3 wird die Anwendung des entwickelten Affinitätstrennverfahrens für die Fraktionierung und Aufreinigung von

Glykokonjugaten aus Vielstoffmischungen beschrieben. Es wird die Aufreinigung des Glykoproteins Fetuin aus dem natürlichen Vielstoffgemisch Serum aufgezeigt. Daran schließt sich die Affinitätstrennung eines Glykolipid-Extraktes aus Rinderhirn an.

### 8.3.1 Aufreinigung von Fetuin aus fetalem Rinderserum

Das im Rinderserum vorliegende Glykoprotein Fetuin weist unter anderem eine wachstumsfördernde Wirkung auf und wird vielfältig eingesetzt (siehe Kap. 3.2.2). Es ist kommerziell erhältlich und wird üblicherweise unter Verwendung chemischer Trennverfahren (siehe Kap. 3.3) aus dem Serum gewonnen. In dieser Arbeit wurde eine effiziente Methode zur Gewinnung von Fetuin aus Serum mittels Lektin-Affinitätstrennung entwickelt (Cartellieri et al., 2002). Fetuin wurde dabei unter Verwendung des WGA Adsorbens Toyopearl aus fetalem Rinderserum (FBS) aufgereinigt. Fetales Serum bot sich für die Gewinnung von Fetuin an, da es dort mit einem Gehalt von 1 - 2,1 g/100 mL vorliegt, während im adulten Plasma nur etwa 60 mg Fetuin/100 mL vorhanden sind.

Für die Aufreinigung von Fetuin wurde 1 mL WGA Toyopearl unter Verwendung des Arbeitspuffers (Phosphatpuffer pH 7,4) mit einem Fluß von 0,8 mL/min eingesetzt. Es wurden 500 µL des in Kap. 3.3 beschriebenen Serums in der Verdünnung 1:10 aufgegeben. Nach gründlichem Spülen wurde mit 0,2 mol/L GlcNAc eluiert (Chromatogramm Abb. 8-9). Die Fraktion, welche das spezifisch eluierte Material enthielt, wurde nach Dialyse und Gefriertrocknung mittels SDS PAGE (Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgel Elektrophorese) analysiert (Durchführung siehe Kap. 5.4).

Das Chromatogramm in Abb. 8-9 zeigt die Affinitätstrennung des fetalen Rinderserums an WGA Toyopearl. Es wird deutlich, daß ein großer Anteil des Serum keine Affinität zum WGA aufwies und mit dem Totvolumen ausgewaschen wurde. Gleichzeitig wurde eine Fraktion aus dem Serum am WGA Adsorbens gebunden und konnte durch Zugabe von GlcNAc (Pfeil) spezifisch eluiert werden. Die Affinität von Fetuin zu WGA Adsorbentien wurde in dieser Arbeit bereits beschrieben (Abb. 7-9). Weiterhin war überprüft worden, ob die Serumproteine BSA und AGP, von denen das Fetuin unter anderem abgetrennt werden mußte, eine Affinität zu WGA zeigten. Das im Anhang aufgezeigte Chromatogramm (Abb. 12-11) zeigt die Affinitätstrennung von BSA und AGP an WGA Toyopearl. Es war keine Bindung von BSA oder AGP an WGA erkennbar (vergleiche auch Abb. 8-1).

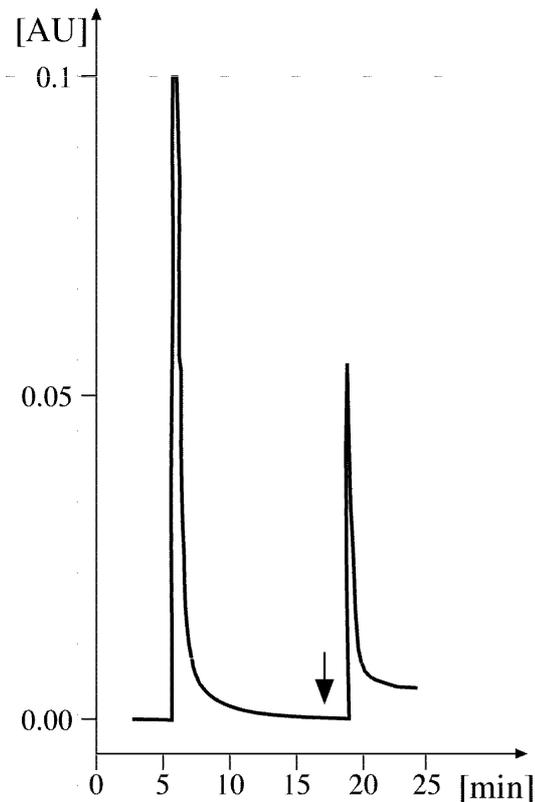


Abb. 8-9: Affinitätstrennung von fetalem Rinderserum (FBS) an WGA Toyopearl

Die Abbildung 8-10 zeigt das Ergebnis der SDS PAGE Analytik. Es wurde ein Fertig-Gel mit 10 % Acrylamid (Vernetzungsgrad) verwendet. Durch die Coomassie-Färbung konnten die Proteine als dunkelblaue Banden detektiert werden. In der ersten Spalte wurde das Standardmaterial BSA (66.000 g/mol) aufgetragen; es ist als deutliche Bande im Bereich zwischen 60 und 70 kDa (Marker, Spalte 5) erkennbar. Im Bereich von > 100 kDa sind weitere Proteinkomponenten zu erkennen. Das native Serum ist in der Spalte 2 zu erkennen. Durch die Trennung im Gel wurden dabei vier Hauptkomponenten sichtbar. Deutlich ließ sich BSA als ein Hauptbestandteil des Serums im Vergleich mit dem Standard identifizieren. In der Spalte 3 wurde das an WGA Toyopearl aufgereinigte Material (Elutionsfraktion aus Abb. 8-9) analysiert. Es ließ sich im Vergleich mit dem Serum als eines der vier Hauptkomponenten des Serums identifizieren. Im Vergleich mit dem kommerziellen Standardmaterial Fetuin, welches in Spalte 4 sichtbar ist, konnte die aufgereinigte Substanz als Fetuin identifiziert werden. Die SDS PAGE Analytik bestätigte die Aufreinigung des Glykoproteins Fetuin aus nativem Rinderserum mittels WGA Affinitätstrennung in einer guten Reinheit.

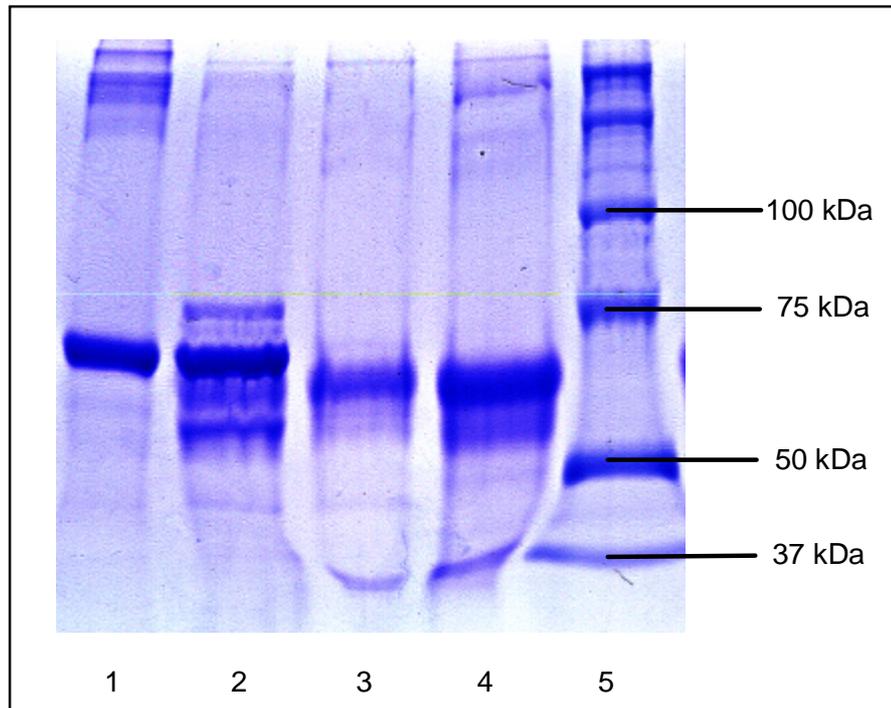


Abb. 8-10: SDS PAGE Analytik von fetalem Rinderserum und Serumproteinen. 1) BSA Standard, 2) FBS, 3) aufgereinigte Fraktion, 4) FET Standard, 5) Marker

In einer ergänzenden Versuchsreihe wurde die Aufgabemenge von FBS variiert, um die Ausbeute der Aufreinigung von Fetuin aus Serum zu optimieren. Es wurde 1 mL des Adsorbens WGA Toyopearl (9,2 mg WGA/mL) verwendet. Es wurden unterschiedliche Volumina des 1:10 verdünnten Serums aufgegeben (1mL, 0,75 mL, 0,5 mL und 0,25 mL entsprechend 100  $\mu$ L, 75  $\mu$ L, 50  $\mu$ L und 25  $\mu$ L Serum) und nach Spülen wie zu Beginn des Abschnitts beschrieben mit 0,2 mol/L GlcNAc eluiert. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt und das aufgereinigte Fetuin mittels Proteintest in der Elutionsfraktion quantifiziert.

Die Ausbeute der Aufreinigung von Fetuin ist in Abb. 8-11 in Abhängigkeit von der Aufgabemenge des FBS aufgetragen. Dabei wurde die aufgereinigte Menge an Fetuin einerseits auf 1 mL des eingesetzten Adsorbens bezogen (Darstellung in blau) und andererseits auf 100  $\mu$ L Serum bezogen (Darstellung in rot). Dieses verdeutlicht die Optimierung der Ausbeute in Hinblick auf die Auslastung des eingesetzten Adsorbens und andererseits die Optimierung der Ausbeute in Hinblick auf das eingesetzte Serum. Mit steigender Aufgabemenge auf 100  $\mu$ L Serum konnte die Ausbeute an Fetuin auf 1,6 mg Fetuin/mL Adsorbens gesteigert werden. Bei einer Aufgabemenge von 25  $\mu$ L Serum konnten 2,16 mg Fetuin/100  $\mu$ L Serum aufgereinigt werden. Die Ergebnisse zeigen, daß durch Variation der Aufgabemenge an FBS die Ausbeute des aufgereinigten Fetuins optimiert werden konnte. Für einen Kompromiß zwischen guter Auslastung des Adsorbens und hoher Rückgewinnung des Fetuins aus FBS sollten 75 – 100  $\mu$ L

Serum/mL WGA Toyopearl aufgegeben werden. Das entspricht 1,31 – 1,60 mg FET/mL Adsorbens sowie 1,60 – 1,75 mg FET/100  $\mu$ L Serum.

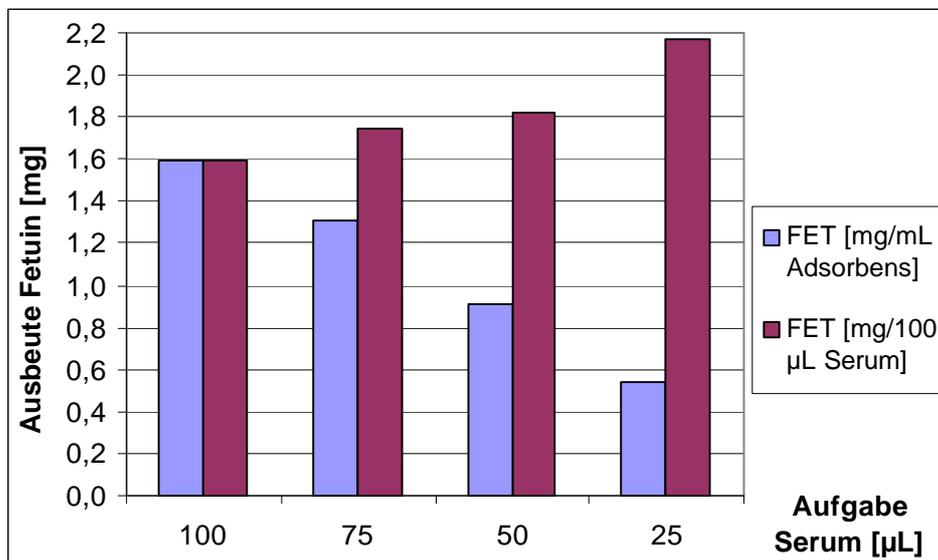


Abb. 8-11: Ausbeute der Aufreinigung von Fetuin aus Serum in Abhängigkeit von der Aufgabemenge

Es konnte gezeigt werden, daß das Glykoprotein Fetuin mittels Lektin-Affinitätstrennung aus dem natürlichen Vielstoffgemisch FBS in guter Reinheit und mit hoher Ausbeute aufgereinigt werden konnte. Die Trennmethode bestand dabei aus einem einzigen Trennschritt der Affinitätstrennung. Außer Dialyse und Gefrier-trocknung waren keine weiteren Verfahrensschritte notwendig.

### 8.3.2 Affinitätstrennung eines Glykolipid-Extraktes

Das in dieser Arbeit entwickelte Trennverfahren wurde anhand von Glykoproteinen charakterisiert und war im wesentlichen für eine Anwendung in der Fraktionierung und Aufreinigung von Glykoproteinen aus Stoffmischungen ausgelegt. Darüber hinaus stellte sich die Frage, ob das entwickelte Verfahren auch für die Affinitätstrennung weiterer Glykokonjugate geeignet wären, zu denen die Glykolipide zählen (vergleiche Kap. 3.2.). Da Glykolipide hinsichtlich ihrer pharmakologischen Wirkung eine überaus vielversprechende Substanzklasse darstellen (Kap. 3.2.3), wurde die Lektin-Affinitätstrennung eines Glykolipidextraktes aus Rinderhirn untersucht. Dieser Lipid-Rohextrakt stellt ein natürliches Vielstoffgemisch dar, welches die wesentlichen Phospholipide und Glykolipide des Hirngewebes enthält (Kap. 3.3). Einige der im Rinderhirn vorhandenen Galactocerebroside waren auch als Standardmaterial erhältlich und standen für die Analytik zur Verfügung. Daher wurde in den hier beschriebenen

Untersuchungen eine Affinitätstrennung unter Verwendung des Lektinliganden RCA durchgeführt, wobei die Abtrennung von galactosehaltigen Glykolipiden aus dem Rohextrakt angestrebt wurde.

Für die Affinitätstrennung des Glykolipid-Extraktes wurde 1 mL des Adsorbens RCA Toyopearl (4,3 mg RCA/mL) eingesetzt und als mobile Phase Phosphatpuffer pH 7,2 mit 20 % (v/v) Methanol als Lösungsvermittler verwendet. Der Elutionspuffer wurde daraus unter Zusatz von 0,1 mol/L Lactose hergestellt. Die Lösungsmittelbeständigkeit des Lektin-Adsorbens war zuvor überprüft worden, wobei sich bis zu einem Anteil von 20 % Methanol (v/v) keine Beeinträchtigung gezeigt hatte. Für die Affinitätstrennung wurden 7 mg Rohextrakt in 5 mL der mobilen Phase suspendiert. Durch Ultraschall und Filtration durch eine Fritte (20  $\mu\text{m}$  Poren) wurde eine leicht getrübe Lösung erzeugt. 1 mL dieser Lösung wurde mittels Affinitätstrennung an RCA Toyopearl fraktioniert (Vierfachbestimmung). Die erhaltenen Spül- und Elutionsfraktionen wurden dreimal mit je 2 mL Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten Chloroformphasen jeder Fraktion wurden unter Stickstoff bis zur Trockne eingengt und anschließend in je 200  $\mu\text{L}$  Chloroform/Methanol (2/1, v/v) gelöst. Die Analytik dieser Lösungen sowie der Glykolipid-Standardmaterialien und des Rohextraktes erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (DC) (Durchführung siehe Kap. 5.5).

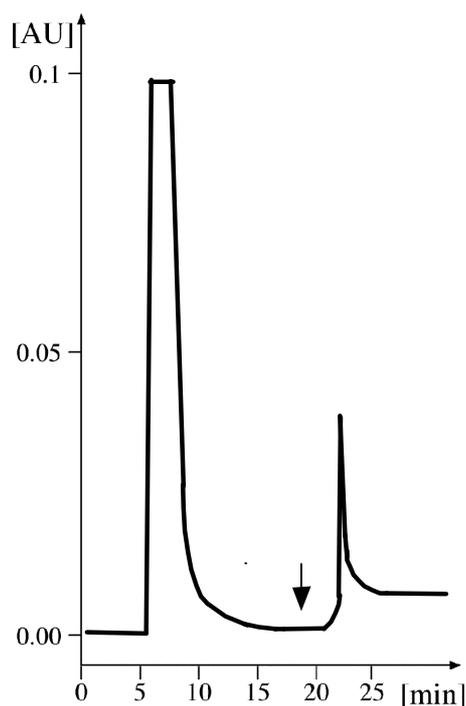
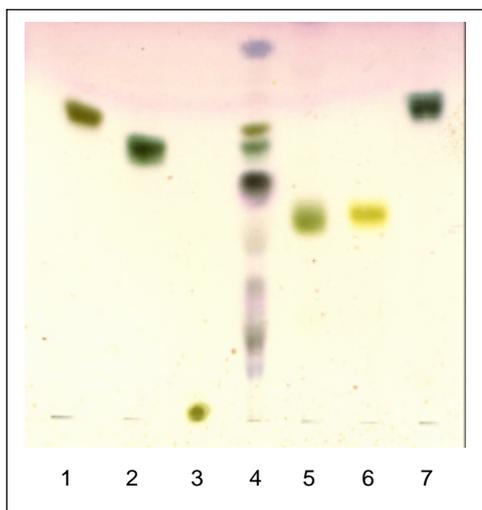


Abb. 8-12: Affinitätstrennung eines Glykolipid-Extraktes an RCA Toyopearl

Das in Abb. 8-12 dargestellte Chromatogramm zeigt die Affinitätstrennung des Glykolipid-Extraktes aus Rinderhirn an RCA Toyopearl. Es wird deutlich, daß eine Fraktion am RCA Adsorbens gebunden hatte und unter Zugabe von Lactose (Pfeil)

spezifisch eluiert werden konnte. In Abbildung 8-13 ist die dünnschichtchromatographische Trennung von Glykolipidstandards und dem Rohextrakt aus Rinderhirn dargestellt.

- 1) Galactocerebroside Typ I
- 2) Galactocerebroside Typ II
- 3) Gangliosid GM<sub>1</sub>
- 4) Rinderhirn-Extrakt
- 5) Lactocerebroside
- 6) Stearyl-Lactocerebroside
- 7) Glucocerebroside



*Abb. 8-13: Dünnschichtchromatographie von Glykolipiden*

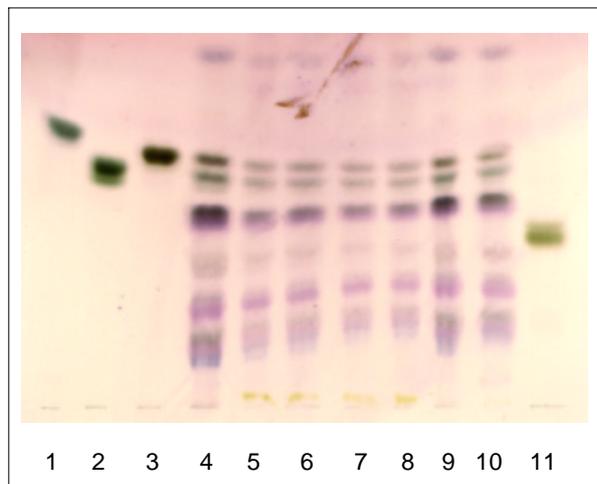
Die DC zeigt, daß der Glykolipid-Rohextrakt 4) eine Vielzahl von Komponenten enthielt. Von diesen konnten über den Vergleich von Farbe und Retention im Vergleich mit den Standards 1) und 2) die Galactocerebroside des Typs I und II identifiziert werden. Die übrigen Glykolipid-Standards waren im Extrakt nicht enthalten.

Die DC-Analytik der in der Affinitätstrennung erhaltenen Fraktionen ist in Abb. 8-14 dargestellt.

- 1) Glucocerebroside
- 2) Galactocerebroside Typ II
- 3) Galactocerebroside Typ I
- 4) Rinderhirn-Extrakt
- 5 – 8) Elutionsfraktionen

9 – 10) Spülfraktionen

11) Lactocerebroside



*Abb. 8-14: Dünnschichtchromatographie eines Glykolipid-Extraktes nach Affinitätstrennung an RCA Toyopearl*

Die DC Analytik zeigt, daß in den nicht am RCA gebundenen Fraktionen, die durch einfaches Spülen von der Säule entfernt wurden (Spülfraktion 9-10), die gleichen Substanzen enthalten waren wie in den am RCA gebundenen und spezifisch eluierten Fraktionen. Die enthaltenen Substanzen entsprachen jeweils dem Ausgangsmaterial. Das Ergebnis zeigt, daß mittels Affinitätstrennung an RCA Toyopearl keine Auftrennung des Glykolipid-Vielstoffgemisches möglich war und keine galactosehaltigen Glykolipide aus diesem Gemisch selektiv abgetrennt werden konnten.

Aufgrund des amphiphilen Charakters der Glykolipide haben diese die Eigenschaft, sich in wäßrigen Medien in Form von Mizellen oder lamellaren Strukturen zu lösen (vergleiche Kap. 3.2.3). Daher wurden die vorgestellten Ergebnisse dahingehend interpretiert, daß es wahrscheinlich zur Ausbildung von Mischmizellen der Glykolipide kam und diese Mizellen als Ganzes über die in das wäßrige Medium hinein ragenden Galactosereste am Lektin RCA binden konnten. Die spezifische Desorption führte anschließend zur Elution der Mischmizellen. Eine Abtrennung einzelner Substanzen war nicht möglich.

Es läßt sich zusammenfassen, daß sich die Affinitätstrennung mittels RCA Toyopearl methodisch auch für die Bearbeitung von Glykolipiden eignet. Eine Abtrennung von Einzelsubstanzen war im Rahmen der vorgestellten Untersuchungen aber nicht möglich. Die Lektin-Affinitätstrennung kann allerdings zur Abtrennung von Glykolipid-Mizellen eingesetzt werden (vergleiche Diskussion Kap. 9.6).

## 9 Diskussion

Im Rahmen der Diskussion werden einige wichtige Aspekte der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse kapitelübergreifend sowie im Kontext der Literatur beleuchtet. Die Herstellung der Lektin-Adsorbentien wird zunächst hinsichtlich der Methodik diskutiert. Weiterhin werden die Herstellungskosten der Lektin-Adsorbentien erarbeitet und bewertet. Die Methode zur Aufreinigung von Fetuin aus Rinderserum wird mit in der Literatur beschriebenen Verfahren verglichen.

### 9.1 Herstellung von Lektin-Adsorbentien

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methodenentwicklung zur Herstellung von Lektin-Adsorbentien auf der Basis von Polymer- und Silikatträgern vorgenommen. Unter Verwendung der Lektine RCA, Con A und WGA wurde eine Auswahl unterschiedlicher Lektin-Adsorbentien hergestellt.

#### 9.1.1 Immobilisierung der Lektine

Die kovalente Anbindung der Lektine an die Trägermaterialien erfolgte über eine Aktivierung mit Tressylgruppen (siehe Kap. 4.3 und Kap. 6). Diese Methode bietet gegenüber anderen Aktivierungen den Vorteil, daß die Reaktion unter milden Bedingungen, in kurzer Zeit und mit hohen Ausbeuten verläuft. Außerdem kann das tressylierte Material mehrere Monate gelagert werden. Die Immobilisierung der Liganden kann dann sehr kurzfristig erfolgen, wenn das Affinitätsadsorbens benötigt wird.

Die Immobilisierung der Lektine wurde methodisch in Anlehnung an die von Nakamura et al. (1989, 1990) sowie Nilsson und Mosbach (1987) beschriebenen Bedingungen zur Immobilisierung von Proteinliganden an tressylierte Träger durchgeführt. Aus den Arbeiten wurde deutlich, daß die Bedingungen für die Immobilisierung vom jeweiligen Protein, Trägermaterial und der Anzahl der vorhandenen Tressylgruppen abhängig waren.

In dieser Arbeit wurden die Lektine RCA, Con A und WGA an tressylierte Polymer- und Silikatträger immobilisiert. Die einflußnehmenden Parameter wurden untersucht und für die einzelnen Systeme angepaßt und optimiert. Die optimierten Bedingungen der Immobilisierung sind in Tabelle 6-1 dargestellt. Die Untersuchung der Kinetik der Anbindung erfolgte für die Lektine RCA und Con A an den Materialien Silika und Toyopearl. Dabei zeigte sich, daß die Immobilisierung an Silika nach 30 bzw. 120 min mit Ausbeuten von 96 – 99 % abgeschlossen war. An Toyopearl wurden nach 240 min 92 – 98 % Ausbeute erreicht. Der schnellere Verlauf der Immobilisierung an Silika

kann mit der größeren spezifischen Oberfläche des Silkaträgers erklärt werden (siehe Tabelle 4-1 und 4-2), wodurch den Lektinliganden mehr Platz und mehr Tressylgruppen zur Verfügung stehen. Weiterhin könnte die Quellung des Polymers eine Rolle spielen, da dieses trocken für die Immobilisierung eingesetzt wurde. Insgesamt ergaben die Untersuchungen, daß Lektin-Adsorbentien für einen schnellen Einsatz innerhalb von 30 - 240 min hergestellt werden können. Aus praktischen Gründen kann ebenfalls eine Immobilisierung über Nacht (20 h) durchgeführt werden. Die verwendeten Lektine RCA, Con A und WGA konnten mit sehr guten Ausbeuten von 70 – 100 % (siehe Tabelle 6-6) an alle verwendeten Materialien immobilisiert werden.

Nakamura et al. (1990) führten eine Methodenoptimierung für die Immobilisierung von verschiedenen Antikörpern an das Trägermaterial TSKgel Tressyl-5-PW durch. Dabei ergaben sich optimale Bedingungen bei 25°C in 1 mol/L Phosphatpuffer pH 7,5 und einer Reaktionszeit von 2 h, wenn 2 - 3 mg Antikörper/mL Träger immobilisiert wurden, bzw. von 6 - 7 h, wenn 10 mg Antikörper immobilisiert wurden mit Ausbeuten von > 80 %. Nakamura et al. (1989) immobilisierten das Lektin Con A an Toyopearl AF-Tressyl-650 M. Unter optimierten Bedingungen erreichten sie in 16 h eine Anbindung von 13 mg Con A/mL Träger bei 25 °C mit einer Ausbeute von 88 % (0,1 mol/L Carbonatpuffer pH 8,0). In dieser Arbeit wurden in 4 h im Mittel 8 mg Con A/mL Toyopearl mit Ausbeuten von 90 – 99 % immobilisiert (0,5 mol/L Phosphatpuffer pH 8), was einer verbesserten Ausbeute in kürzerer Zeit entspricht.

Die Ausbeute der Immobilisierung ist nicht nur von der Art des Liganden und dem Trägermaterial abhängig, sondern auch von der angebotenen Ligandmenge. Die Anbindung der makromolekularen Lektine wird dabei durch die zur Verfügung stehende Trägeroberfläche limitiert. Die Untersuchungen in Kap. 6.3.1 (Abb. 6-4 und 6-5) zeigen die Abhängigkeit der immobilisierten Ligandmenge, der prozentualen Ausbeute und der Oberflächenbelegung vom Lektinangebot. Es konnte gezeigt werden, daß sich die Anbindung und die Oberflächenbelegung einem Maximalwert annähert, während die prozentuale Ausbeute sinkt. In dieser Arbeit wurden die Lektine an Toyopearl mit Oberflächenbelegungen von 14 – 47 % bzw. an Silika mit Oberflächenbelegungen von 9 – 19 % immobilisiert. Aufgrund der geringen spezifischen Oberfläche des Polymers H20 wurden bei diesem Material 55 – 71 % der Oberfläche belegt (siehe Tabelle 6-6). Aufgrund der Tatsache, daß es sich bei Lektinen zumeist um sehr teure Materialien handelt, sind möglichst hohe Ausbeuten (> 80 %) erstrebenswert, die bei Oberflächenbelegungen von 10 – 69 % erreicht werden. Ein weiterer Vorteil einer geringen Oberflächenbelegung und der daraus geringeren Ligandendichte ist die bessere Zugänglichkeit der Liganden und damit die höhere Ausnutzung der Bindungsstellen. Ein hohe Ligandendichte hingegen kann zu sterischer Hinderung während der Adsorption von makromolekularen Adsorptiven führen und die Zugänglichkeit der Liganden herabsetzen. Dieser Effekt wurde unter anderem von Nakamura et al. (1990, S. 105) sowie Narayanan und Crane (1990, S. 15) beschrieben. Andererseits sollte ebenfalls berücksichtigt werden, daß eine geringe Ligandendichte eine ebenfalls geringe Arbeitskapazität bedeutet, was den Einsatz größerer

Festbettvolumina erfordert. Dies führt wiederum zu einer schlechteren Auflösung und einer verlängerten Trennzeit. Die Diskussion dieser Zusammenhänge verdeutlicht, daß ein Kompromiß für eine optimale Ligandendichte gefunden werden muß, bei der Immobilisierungsausbeute, Arbeitskapazität und Ausnutzung berücksichtigt werden sollten. Ein weiterer zu beachtender Aspekt sind die Materialkosten (s.u. Kap. 9.1.2).

### 9.1.2 Materialkosten der Herstellung von Lektin-Adsorbentien

Ein Aspekt, der für die industrielle Anwendung von Affinitätstrennverfahren eine wichtige Rolle spielt, sind die verhältnismäßig hohen Kosten der Herstellung von Affinitätsadsorbentien. Die Materialkosten für aktivierte Trägermaterialien und Proteinliganden, wie Antikörper oder Lektine, sind mitunter erheblich. Durch eine effiziente Immobilisierung der Liganden können diese Kosten minimiert werden. Anhand der Lektine RCA, WGA und Con A wurden die Materialkosten der hergestellten Lektinadsorbentien unter Verwendung des Trägers Toyopearl in Abhängigkeit von der Ligandendichte berechnet und gegenübergestellt. Die angegebenen Materialpreise basieren auf den jeweiligen Listenpreisen vom Januar 2002 (inkl. MwSt). Bei einer Abnahmemenge von 5 g kostet 1 g des Trägers Toyopearl AF-Tresyl 650 M 36,42 € (TosohBiosep, Stuttgart). 10 mg des verwendeten RCA kosten 154,80 € Bei einer Abnahmemenge von 100 mg kosten 10 mg des verwendeten WGA 48,88 € und 10 mg des verwendeten Con A Typ VI 5,32 € (Lektine von Sigma-Aldrich, München).

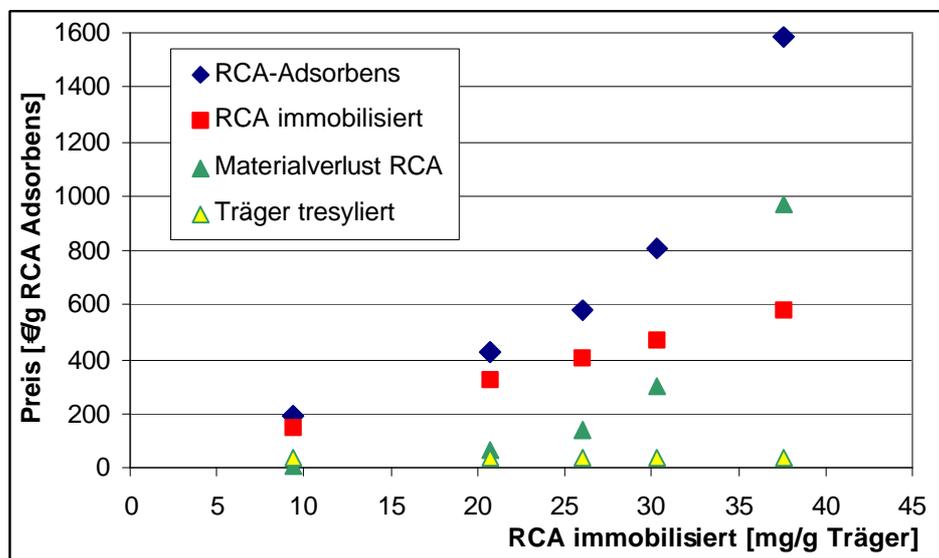


Abb. 9-1: Materialkosten für die Herstellung von 1 g RCA Toyopearl in Abhängigkeit von der Ligandendichte

In Abb. 9-1 sind die Materialkosten in €/g fertiges RCA Adsorbens dargestellt. Mit ansteigender immobilisierter Ligandmenge von 9 - 38 mg RCA/g steigen die Kosten für das Adsorbens auf 1584 €/g an. Dabei wird deutlich, daß die im vorangegangenen Kapitel diskutierte Ausbeute der Immobilisierung einen entscheidenden Einfluß auf die

Gesamtkosten hat, da der Materialverlust an Lektin im Reaktionsüberstand mit immer größerer Belegung exponentiell ansteigt (unter der Annahme, daß überschüssiges Lektin nicht wieder aufbereitet wird). Am Beispiel RCA wird ebenfalls ersichtlich, daß der Preis des tresylierten Trägermaterials Toyopearl nur einen geringen Anteil der Gesamtkosten verursacht. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte ist für RCA Adsorbentien eine geringe Ligandendichte erstrebenswert (vergleiche auch Kap. 9.1.1). Es wurden 17 – 23 mg RCA/g Toyopearl immobilisiert (siehe Tabelle 6-6), die mit Kosten von ca. 400 €/g RCA Adsorbens verbunden sind.

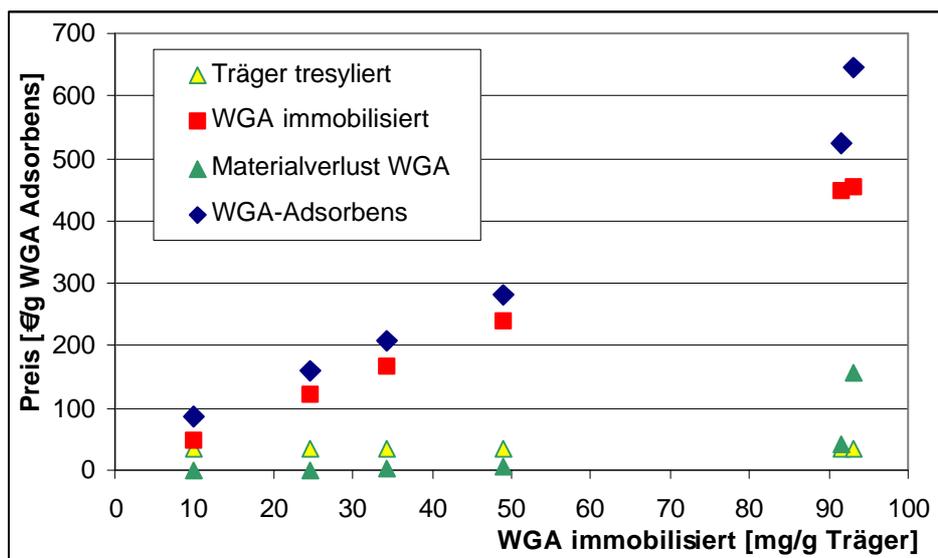


Abb. 9-2: Materialkosten für die Herstellung von 1 g WGA Toyopearl in Abhängigkeit von der Ligandendichte

Die Materialkosten für das Adsorbens WGA Toyopearl sind in Abb. 9-2 dargestellt. Aufgrund des vergleichsweise geringeren Preises für das Lektin WGA fallen die Kosten für das tresylierte Trägermaterial etwas mehr ins Gewicht als bei RCA-Adsorbentien. Da sich die Ausbeute der Immobilisierung erst ab ca. 90 mg WGA/g Toyopearl verschlechtert (vergleiche Abb. 6-5) sind die Gesamtkosten des Adsorbens unterhalb dieser Ligandendichte nahezu direkt vom Preis des immobilisierten WGA abhängig. Bis zur Ligandendichte von 90 mg/g ist eine effiziente Immobilisierung möglich. In dieser Arbeit wurden üblicherweise 34 – 40 mg WGA/g Toyopearl immobilisiert (siehe Tabelle 6-6) die mit Kosten von ca. 250 €/g Adsorbens verbunden sind.

Im Vergleich zu den meisten anderen Lektinen stellt Con A insofern einen Sonderfall dar, da es mit 0,53 €/mg verhältnismäßig preisgünstig ist (siehe Auswahl in Kap. 3.1.1). So geht bei der Herstellung der Con A Adsorbentien der Preis des tresylierten Trägermaterials zu einem großen Anteil in die Gesamtkosten ein. Das bedeutet, daß höhere Ligandendichten für eine effiziente Immobilisierung erstrebenswert sind. In dieser Arbeit wurden üblicherweise 34 - 38 mg Con A/g Toyopearl immobilisiert. Das entspricht Materialkosten von 55 - 57 €/g Con A Adsorbens bei einem Preis von 36,42 €/g für das tresylierte Trägermaterial Toyopearl.

Die Materialkosten des verwendeten Silikaträgers I005 sind bei einer Funktionalisierung im eigenen Labor etwas geringer als für den funktionalisierten Träger Toyopearl. Bei einer Herstellung von beispielsweise 100 g tresyliertem Silika I005 (IV) belaufen sich die reinen Materialkosten auf etwa 1940,00 € entsprechend 19,40 €/g Träger (Volz, 2001).

## 9.2 Kapazität und Langzeitstabilität der Adsorbentien

Die hergestellten Lektin-Adsorbentien wurden anhand von ausgewählten Glykoproteinen in der kontinuierlichen Trennung charakterisiert. Dabei erfolgte die Bestimmung der Arbeitskapazitäten und daraus die Berechnung der Ausnutzung der Lektin-Bindungsstellen (siehe Kap. 7.2.5). Für das Adsorbens RCA Toyopearl ergab sich dabei eine sehr hohe Ausnutzung von 82 % (siehe Tabelle 7-4). Dieses Ergebnis zeigt, daß größtenteils beide Bindungsstellen des Lektins RCA für die Anbindung des makromolekularen Adsorptivs Asialofetuin zugänglich waren. Diese Tatsache spricht für die Beschaffenheit des Lektin-Adsorbens, d.h., daß sowohl die Porengeometrie des Trägermaterials als auch die Ligandendichte (Oberflächenbelegung von 16 %) die Anbindung der Adsorptive optimal ermöglichten und daß die Aktivität der Lektinliganden durch eine schonende Immobilisierung optimal erhalten wurde. Für Con A und WGA Adsorbentien wurden Ausnutzungen von 11 – 14 % (Tabelle 7-4) bzw. von 7 - 24 % (Abb. 7-15) ermittelt. Der Grund für die vergleichsweise geringere Ausnutzung gegenüber den RCA Adsorbentien ist nicht genau bekannt und wird in der Molekülgeometrie von Con A und WGA vermutet. Bei Con A sitzen 4 Bindungsstellen pro Tetramer auf den Ecken eines Tetraeders (siehe Abb. 3-1). Es ist anschaulich, daß hier im ungünstigsten Fall nur eine Bindungsstelle für ein makromolekulares Adsorptiv wie Peroxidase zugänglich sein kann. In der Literatur sind nur wenige vergleichbare Ergebnisse dokumentiert. Borchert et al. (1982) dokumentierten 14 % Ausnutzung der Con A Bindungsstellen bei der Affinitätstrennung von Peroxidase an Con A Silika. Dieser Wert stimmt mit den Ergebnissen dieser Arbeit sehr gut überein. Fowell und Chase (1986) dokumentierten für unterschiedliche Immuno-adsorbentien 10 – 25 % Ausnutzung der immobilisierten Antikörper. Nakamura et al. (1990) erreichten für immobilisierte Antikörper Bindungseffizienzen von 70 – 80 %.

Weiterhin wurden Langzeitstabilitäten von Lektin-Adsorbentien untersucht. Es wurde dabei eine sehr gute Stabilität der RCA- und WGA-Adsorbentien ermittelt (siehe Kap. 7.2.6 und 7.2.7). In der Literatur sind kaum vergleichbare Untersuchungen beschrieben. Nakamura et al. (1990) beschrieben in der HPLAC eine Abnahme der Arbeitskapazität eines Immuno-adsorbents auf der Basis von TSKgel Tresyl-5PW nach 100 Affinitätszyklen. Für die Anwendung von Affinitätstrennverfahren im Produktionsmaßstab ist die Wiederverwendbarkeit und damit auch die Langzeitstabilität der Adsorbentien ein wichtiger Aspekt (Chase, 1984). Aufgrund der relativ hohen Kosten für die Bereitstellung der Adsorbentien kann ein kontinuierlicher Betrieb mit

häufig wiederholten Affinitätszyklen effizienter sein als der Gebrauch von großen Festbettvolumina (Fahrner et al., 1999, Janson, 1982).

### 9.3 Fraktionierung von Glykoproteinen

In den Kapiteln 7.2 und 8.1 wurde die kontinuierliche Affinitätstrennung verschiedener Glykoproteine an Lektin-Adsorbentien beschrieben. Dabei fand eine Fraktionierung des aufgegebenen Standardproteins in eine nicht adsorbierte und eine adsorbierte, spezifisch eluierbare Fraktion statt (vergleiche Abb. 7-7 bis 7-15 sowie 8-1 bis 8-4). Es stellt sich daher die Frage, worin sich die nicht bindenden Komponenten und die gebundene Substanz unterscheiden und von welchen Faktoren die Fraktionierung beeinflusst wird.

Die nicht bindende Fraktion bei der Affinitätstrennung der Glykoproteine kann zu einem Teil aus Verunreinigungen durch andere Proteinkomponenten bestehen. Dieser Anteil sollte bei den kommerziellen Standardmaterialien der Glykoproteine nur minimal sein. Als weitere Ursache wird die natürliche Heterogenität der Glykoproteine angesehen. Diese bestehen oft aus verschiedenen „Glykoformen“ oder können in der Kohlenhydratstruktur einer Glykoform auch weitere Mikroheterogenitäten aufweisen (siehe Kap. 3.2.1 und 3.2.2; Gabius, 2000; Lindhorst, 2000; Brockhausen et al., 1998; Laine, 1997). Dadurch kann es zur Fraktionierung des Proteins an einem Lektin-Adsorbens kommen, wobei je nach Affinität zur Lektinbindungsstelle unterschiedliche Glykosylierungsmuster getrennt werden. Beispielsweise besteht der Glykanpool des Glykoproteins Asialofetuin, welches Affinität zu RCA zeigt (Abb. 7-7), hauptsächlich aus triantennären Oligosacchariden (N-Glykanen), enthält aber auch biantennäre N-Glykane und Disaccharide (O-Glykane) (Yet et al., 1988). Die Bindung zwischen ASF und RCA erfolgt dabei über die triantennären Glykane (Gupta et al., 1996; Green et al., 1988; siehe auch Abb. 3-5). Veränderungen der nativen Kohlenhydratstruktur können aber auch durch die Gewinnung der Proteine oder eine Weiterbehandlung verursacht werden. Dies wird am Beispiel ASF deutlich, welches aus Fetuin durch Abspaltung der Sialinsäuren hergestellt wird. Diese Behandlung könnte zu weiteren Abbauprodukten führen bzw. in geringem Maße Sialinsäuren hinterlassen. So können in dem kommerziellen Produkt mehrere in der Glykosylierung unterschiedliche Komponenten enthalten sein, wenn die Aufreinigung nicht zuckerspezifisch erfolgte, was üblicherweise der Fall ist. Auch bei der Gewinnung anderer Glykoproteine, die oft durch chemische Trennverfahren, wie die Ausfällung mit Ammoniumsulfat oder Ethanol, isoliert werden (Pedersen, 1947; Spiro, 1960), können Artefakte entstehen. Dabei verhindern schon geringfügige strukturelle Veränderungen die Bindung am Lektin (vergleiche die Bindungseigenschaften der Lektine Kap. 2.2.2).

Die Fraktionierung der Glykoproteine während der kontinuierlichen Trennung wird von einigen Parametern beeinflusst. Dazu gehören der pH-Wert (Kap. 7.2.3) und das Adsorbens selbst (Kap. 7.2.4). Der pH-Wert hat einen Einfluß auf die Ausbildung des

biochemischen Komplexes zwischen Ligand und Adsorptiv, da die vielfältigen Wechselwirkungen verändert werden und es zu Konformationsänderungen bei den Proteinen kommt. Gleichzeitig ändern sich mit dem pH Wert auch Ladungsverhältnisse auf der Trägeroberfläche, die das Adsorptionsverhalten beeinflussen können.

In Kap. 7.2.4 zeigte sich ein deutlicher Einfluß des Adsorbens auf die Fraktionierung der Glykoproteine Fetuin und Asialofetuin. Es kann dabei nicht eindeutig unterschieden werden, ob dieser Einfluß auf das Trägermaterial oder die Ligandendichte zurückzuführen ist. Das Trägermaterial kann durch hydrophobe oder ionische Wechselwirkungen (Narayanan und Crane, 1990) an der Trägeroberfläche, durch Diffusionseffekte oder durch die sterische Zugänglichkeit der Liganden die Bindung der Adsorptive beeinflussen.

In Bezug auf die Ligandendichte zeigte sich der positive Einfluß einer geringen Oberflächenbelegung auf die Adsorption des Glykoproteins Fetuin (vergleiche Abb. 7-13 und 7-15).

Weiterhin wurde in Kapitel 8.1 beschrieben, daß einige Glykoproteine Bindungsaffinitäten zu zwei unterschiedlichen Lektinen zeigen. Dabei binden die Glykoproteine Fetuin, Asialofetuin und Ovomuroid sowohl an das Lektin WGA als auch an RCA. Saures  $\alpha_1$ -Glykoprotein bindet sowohl an Con A als auch an RCA. Dieses Bindungsverhalten kann ebenfalls auf die Heterogenität der Glykoproteine zurückgeführt werden, wodurch es zur Bindung unterschiedlicher Glykostrukturen an den jeweiligen Lektinen kommt. Darauf deutet auch die Tatsache hin, daß die Glykoproteine jeweils nur anteilig an einem Lektin binden. Darüberhinaus können unterschiedliche Lektine auch Bindungsaffinitäten zu einem gleichen Strukturelement eines Glykoproteins aufweisen. Der Vergleich der Affinitätstrennung von Fetuin an WGA (Abb. 7-9) und an RCA (Abb. 12-10) zeigt, daß RCA teilweise ebenfalls eine Bindungsaffinität zu Glykanen des Fetuin zeigt. Diese Bindungsaffinitäten von RCA gegenüber Oligosacchariden des Fetuin wurden bereits von Baenziger und Fiete (1979) beschrieben.

Die Kohlenhydratstruktur eines Glykoproteins hat als Erkennungsmarker innerhalb biologischer Prozesse eine große Bedeutung. Durch die spezies- und gewebeabhängige Verteilung unterschiedlicher Glykoformen erhält ein Zellprotein ein charakteristisches Eigenschaftsspektrum. Diese Tatsache verdeutlicht erneut, wie wichtig es ist, diese Substanzen durch Verwendung eines spezifischen und schonenden Trennverfahrens wie der Lektin-Affinitätstrennung aufzureinigen. Dabei erfolgt je nach der Bindungsspezifität des Lektins eine Konzentrierung auf ein oder mehrere Strukturelemente der Glykoproteine.

## 9.4 Trägermaterialien im Vergleich

Im folgenden Abschnitt wird ein kapitelübergreifender Vergleich der in der Affinitätstrennung verwendeten Trägermaterialien auf der Basis von Silika, synthetischen Polymeren und Agarose vorgenommen. Dabei werden die Träger zunächst auf der Basis der Ergebnisse dieser Arbeit verglichen und bewertet. Anschließend werden die Ergebnisse zusammengefaßt und in den Kontext der Literatur eingeordnet.

Die Übersicht der hergestellten Adsorbentien in Tabelle 6-6 zeigt am Beispiel von WGA, daß Adsorbentien mit vergleichbaren Ligandmengen von 7,9 – 9,4 mg WGA/mL deutlich unterschiedliche Oberflächenbelegungen aufwiesen, bedingt durch die unterschiedlichen spezifischen Oberflächen der Träger. Das Adsorbens auf der Basis von Silika I005 hatte dabei die geringste Oberflächenbelegung mit 12 %, während sich die Belegungen für Toyopearl auf 40 - 47 % und für H20 auf 55 % beliefen. Die Schlußfolgerung aus diesem Vergleich der Trägermaterialien ist, daß die Materialien auf der Basis von Silika aufgrund der größeren zur Verfügung stehenden Oberfläche für die Immobilisierung der makromolekularen Lektinliganden besonders gut geeignet sind. Dadurch besteht die Möglichkeit, größere Ligandmengen zu immobilisieren und dadurch höhere Arbeitskapazitäten pro Volumeneinheit Festbett zu erreichen (vergleiche Auswahl der Träger Kap. 4.2) oder bei einer geringen Oberflächenbelegung eine optimale Ausnutzung der Liganden zu erzielen (s.u.). Der letztere Effekt wird durch die Ergebnisse der Untersuchungen in Kapitel 7.2.4 und 7.2.5 bestätigt. In Abb. 7-15 ist die Ausnutzung der Lektinbindungsstellen sowie die Oberflächenbelegung für WGA Adsorbentien verschiedener Trägermaterialien gegenübergestellt. Dabei zeigte sich eine höhere Ausnutzung bei Adsorbentien mit einer geringen Oberflächenbelegung analog der Reihenfolge Silika, Toyopearl, H20. Bezüglich der Ausnutzung (Zugänglichkeit) der Liganden lieferte das Silikamaterial I005 demnach besonders gute Ergebnisse.

Die Fraktionierung der Glykoproteine Fetuin und Asialofetuin an WGA bzw. RCA Adsorbentien ergab in Abhängigkeit vom Trägermaterial unterschiedliche Ergebnisse (siehe Abb. 7-13 und 7-14). Während Silika im Vergleich gute Ergebnisse für die Anbindung von Fetuin lieferte, lag die Gesamtwiederfindung bei nur 69 % im Vergleich zu über 86 % für die übrigen Träger. Für die Fraktionierung von Asialofetuin an RCA Adsorbentien zeigte Silika gegenüber Toyopearl und Agarose ein schlechteres Ergebnis bezüglich der Desorption des Glykoproteins aufgrund der niedrigen Gesamtwiederfindung, die hier bei nur 64 % lag. Dieser Effekt wird dadurch erklärt, daß bei Silika durch unspezifische Adsorption der Glykoproteine an der Trägeroberfläche keine vollständige Elution möglich war. Die vergleichsweise geringe Ausnutzung von RCA Silika mit 35 % (Tabelle 7-4) gegenüber RCA Toyopearl und Agarose mit 82 % bzw. 47 % wird ebenfalls auf die schlechte Eluierbarkeit des ASF von Silika zurückgeführt. Diese Tatsache bedeutet einen Nachteil für den Einsatz von Silika in der Affinitätstrennung.

Die Untersuchung von Con A Adsorbentien auf der Basis der Trägermaterialien Agarose, Toyopearl und Silika in der diskontinuierlichen Affinitätstrennung ergab unterschiedliche Bindungsaffinitäten für das Glykoprotein Glucose Oxidase. Es kann bei der Anbindung eines Proteins an einem Affinitätsadsorbens grundsätzlich davon ausgegangen werden, daß neben der sogenannten spezifischen Adsorption am Liganden auch teilweise unspezifische Adsorption an der Trägeroberfläche stattfindet, so daß sich die ermittelte Affinitätskonstante  $K_d$  an einem Adsorbens aus der Summe der Affinitäten zusammensetzt. Je kleiner die Konstante  $K_d$  desto größer ist die Spezifität der Bindung und desto kleiner ist der Anteil an unspezifischer Adsorption. Die Gegenüberstellung der Werte für  $q_m$  und  $K_d$  siehe (Tabelle 7-2) zeigt, daß die Spezifität von Silika über Toyopearl bis hin zur Agarose anstieg. Diese Tendenz wurde auch aus der graphischen Darstellung der Adsorptionsisothermen (Abb. 7-2, 7-4, 7-5) deutlich. Je größer die Spezifität der Bindung des Adsorptivs, desto deutlicher zeigt sich die Annäherung an die Maximalbeladung  $q_m$  und desto besser läßt sich die Adsorption mit dem Modell nach Langmuir beschreiben (vergleiche Beschreibung des Modells Kap. 7.1.2).

Insgesamt läßt sich schlußfolgern, daß alle verwendeten Trägermaterialien für die Lektin-Affinitätstrennung von Glykoproteinen gut geeignet sind, wobei die Materialien individuelle Einschränkungen aufweisen. Dabei zeigten kommerzielle Lektin-Agarosen im Vergleich besonders gute Eigenschaften bezüglich Spezifität und Wiederfindung der fraktionierten Glykoproteine, d.h. geringe unspezifische Adsorption. Allerdings birgt das Trägermaterial Agarose entscheidende Nachteile bezüglich der chemischen Stabilität gegenüber niedrigen pH-Werten und organischen Lösungsmitteln (vergleiche auch Einfluß des pH Wertes Kap. 7.2.3), sowie der mechanischen und mikrobiologischen Stabilität. Generell ist Agarose nur für geringe Volumenströme geeignet und weist oft eine schlechte Auflösung und geringe Arbeitskapazität auf, wodurch dieses Material insbesondere für präparative Anwendungen im Produktionsmaßstab häufig ungeeignet ist (Narayanan und Crane, 1990; vergleiche auch Kap. 2.1.2 und 4.1). Das Trägermaterial Toyopearl (synthetisches Polymer) weist im Vergleich hinsichtlich Spezifität, mechanischer und chemischer Stabilität, geringer unspezifischer Adsorption, Oberflächenbelegung, Kapazität und Ausnutzung insgesamt gute Eigenschaften auf. Als negativer Aspekt kann die Quellung des Materials genannt werden, wodurch die Druckstabilität eingeschränkt wird (7 bar, siehe Tabelle 4-2). Dies bedeutet auch eine Einschränkung hinsichtlich des Festbettvolumens bzw. der Volumenströme im präparativen Maßstab. Das Trägermaterial H20 (synthetisches Polymer) hatte ebenfalls gute Eigenschaften für einen Einsatz in der Affinitätstrennung. Als negativ erwies sich lediglich die geringe spezifische Oberfläche von  $29 \text{ m}^2/\text{g}$ , die eine Einschränkung der Ligandmenge und damit der Arbeitskapazität bedeutet. Die verwendeten Silikaträger weisen im Vergleich sehr gute Eigenschaften hinsichtlich der Immobilisierung der Liganden, der Oberflächenbelegung sowie der Kapazität und Ausnutzung auf. Die mechanische und chemische Stabilität (Ausnahme pH-Werte  $> 8$ ) von Silika ist bekanntermaßen sehr gut (vergleiche Kap. 4.1). Im Rahmen dieser Arbeit

erwies sich auch die zur Anwendung zeitnahe Funktionalisierung der Träger als vorteilhaft, da hier die Aktivität der Tressylgruppen besser gewährleistet ist, als bei einem kommerziell funktionalisierten Träger, der mitunter durch Lagerung schon eine eingeschränkte Aktivität aufweisen kann. Nachteilig für den Einsatz von Silika in der Affinitätstrennung erwies sich in den Untersuchungen dieser Arbeit im wesentlichen der Beitrag der unspezifischen Adsorption, wodurch die Spezifität herabgesetzt wird. Diese Eigenschaft von Silikaträgern wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben. Durch geeignete Maßnahmen wie die zielgerichtete chemische Modifizierung der Silanolgruppen (Endcapping) oder die Belegung mit hydrophilen Materialien (z.B. Dextran) kann die Oberflächenaktivität der Silikaträger aber weiter reduziert werden (Mingalyov et al., 1997; Lakhiari et al., 1995; Narayanan und Crane, 1990; Ohlson et al., 1978; vergleiche auch Kap. 4.1).

Obwohl für die Affinitätstrennung viele Trägermaterialien zur Verfügung stehen, sind in der Literatur nur wenige vergleichende Untersuchungen dokumentiert. Fowell und Chase (1986) beschrieben ausführliche Untersuchungen zum Vergleich von Trägern auf der Basis von Agarose, synthetischen Polymeren und Silika für die Eignung als Immunoabsorbentien. Es zeigte sich dabei ein geringer Einfluß des Trägers auf die Bindungsaffinitäten ( $K_d$ ), während die erreichten Ligandendichten und die Kapazitäten der Antikörper-Absorbentien unterschiedlich waren.

Es wird auch in Zukunft kein Trägermaterial geben, welches für alle Anwendungen der Affinitätstrennung gleichermaßen geeignet ist. So wird es weiterhin nötig sein, entsprechend der Zielsetzung eine Auswahl vorzunehmen. Diese richtet sich nach den Stoffsystemen, dem Maßstab, dem angestrebten Anwendungszeitraum und nach gewünschter Spezifität und Auflösung.

## 9.5 Aufreinigung von Fetuin aus Serum

Um die Anwendbarkeit des entwickelten Trennverfahrens für die Aufreinigung eines Glykoproteins aus einem natürlichen Vielstoffgemisch zu zeigen, wurde eine effiziente Methode der Lektin-Affinitätstrennung zur Aufreinigung von Fetuin aus fetalem Rinderserum entwickelt (siehe Kap. 8.3.1). Als Adsorbens wurde dabei WGA Toyopearl eingesetzt. Die Methode besteht aus nur einem spezifischen Trennschritt, bei dem Fetuin direkt aus dem Serum aufgereinigt werden kann. Das isolierte Fetuin wurde mittels SDS PAGE Analytik identifiziert.

Ein Vorteil der Methode ist neben der Spezifität die besonders einfache und schnelle Durchführung. Das Serum kann dabei nach Sterilfiltration und Verdünnung direkt auf die Säule gegeben werden. Im Anschluß an die Affinitätstrennung, die etwa 25 min beansprucht, wird die Produktfraktion dialysiert und gefriergetrocknet, wodurch das Fetuin in einer guten Reinheit erhalten wird. Durch die Optimierung der Aufgabemenge an Serum hinsichtlich hoher Auslastung des Adsorbens und hoher Rückgewinnung des

Fetuius aus dem Serum können bis zu 1,6 mg Fetuin/mL Adsorbens und umgerechnet bis zu 21,6 mg FET/mL Serum isoliert werden. Unter Berücksichtigung beider Faktoren können optimal 1,31 – 1,60 mg FET/ml Adsorbens und 16,0 – 17,5 mg FET/mL Serum aufgereinigt werden. Diese Ausbeute ist sehr hoch hinsichtlich des dokumentierten Fetuingehalts von 10 - 21 mg/mL Serum (Brown et al., 1992; Spiro, 1960). Die beschriebene Methode bietet sich für eine Gewinnung von Fetuin aus Serum im Labor-, Technikums- oder Produktionsmaßstab an.

Fetuin wird üblicherweise mittels chemischer Trennverfahren aus fetalem Serum gewonnen. In der von Pedersen (1947) entwickelten Methode wird Fetuin durch die Ausfällung mit Ammoniumsulfat gewonnen. Das in dieser Arbeit verwendete Standardmaterial Fetuin wurde laut Hersteller (Sigma-Aldrich, München) nach dieser Methode produziert. Diese Methode liefert eine Fetuinpräparation, die laut Literatur Verunreinigungen durch höhermolekulare Proteine enthält. Wenn eine größere Reinheit benötigt wird, sollte eine weitere Aufreinigung mittels Gelfiltration erfolgen (Gupta et al., 1996; Green et al., 1988; Spiro, 1960). Anhand der Methode von Spiro (1960) wird Fetuin mittels einer kalten Ethanolextraktion in der Gegenwart von Zink- und Bariumionen aus dem Serum isoliert. Diese Methode liefert Fetuin in einer hohen Reinheit, die durch die Homogenität in Elektrophorese und Ultrazentrifugation gezeigt wurde (Spiro, 1960). Allerdings ist die Methode aufwendig, da mehrere zeitintensive Trennschritte erforderlich sind, wodurch auch die Produktausbeute beeinträchtigt wird. Spiro (1960) dokumentierte eine Ausbeute von bis zu 8,1 mg Fetuin/mL Serum, was gegenüber der hier beschriebenen Methode eine geringere Ausbeute bedeutet.

Ein genereller Nachteil der chemischen Trennverfahren gegenüber der Affinitätstrennung ist die geringe Spezifität, wodurch bei Glykoproteinen meist keine Unterscheidung der Glykosylierungsmuster möglich ist. Die Lektin-Affinitätstrennung bietet sich demnach als Verfahren an, wenn Fetuin mit einem definierten Glykosylierungsmuster in einer hohen Reinheit benötigt wird.

## 9.6 Lektin-Affinitätstrennung von Glykolipiden

Im Kapitel 8.3.2 wird die Affinitätstrennung eines Glykolipid-Extraktes aus Rinderhirn beschrieben. Dabei war angestrebt worden, im Extrakt enthaltene galactosehaltige Glykolipide mittels eines RCA Adsorbens aus dem Gemisch abzutrennen. Die Untersuchungen zeigten, daß durch die Affinitätstrennung lediglich ein Gemisch aus Glykolipiden (entsprechend dem Rohextrakt) gewonnen werden konnte. Das Ergebnis wurde dahingehend interpretiert, daß sich aus den Glykolipiden Mischmizellen bilden, die als ganze Einheit adsorbiert und desorbiert wurden (Ausbildung von Mizellen und lamellaren Strukturen durch amphiphile Lipide siehe Kap. 3.2.3).

Die Bindungsaffinitäten zwischen Lektinen und Glykolipiden wurden bereits für die Bearbeitung unterschiedlicher Fragestellungen herangezogen und in der Literatur häufig

beschrieben. So dokumentierten Curatolo et al. (1978) die Agglutination von Vesikeln aus Lactosylceramid und Phospholipiden durch das Lektin RCA. Barua et al. (1984) untersuchten Lektin-Glykolipid-Interaktionen anhand von Liposomen und den Lektinen Con A und RCA. Die Bindung von Monosialogangliosiden in Lipidmonoschichten durch das Lektin WGA wurde von Sato et al. (1998) untersucht.

Theoretisch bietet sich die Affinitätstrennung auch zur Aufreinigung von Glykolipiden an. Diese stellen eine Substanzklasse von erheblichem pharmakologischen Interesse dar (Hakomori und Igarashi, 1995; Curatolo, 1987). Auch aufgrund der großen strukturellen Vielfalt wäre die Anwendung einer spezifischen Trennmethode wie der Lektin-Affinitätstrennung gegenüber den herkömmlich verwendeten Methoden wie der präparativen DC oder der Normalphasenchromatographie sinnvoll (Hugosson et al., 1998; Bouhours et al. 1995; Barua et al., 1984). Allerdings wurde die Anwendung der Lektin-Affinitätstrennung zur Aufreinigung von Glykolipiden in der Literatur bisher kaum dokumentiert. Smith und Torres (1989) führten Untersuchungen zur Lektin-Affinitätstrennung von Glykolipiden durch. Sie stellten fest, daß die Affinitätstrennung intakter Glykolipide schwierig ist, da diese in den üblicherweise verwendeten wäßrigen Puffern Mischmizellen ausbilden. Um dieses Problem zu umgehen, verwendeten sie ein Gemisch aus Tetrahydrofuran und Wasser während der Affinitätstrennung, wodurch die Mizellbildung unterdrückt werden sollte. Sie erreichten unter diesen Bedingungen die Abtrennung eines Glykolipids aus einem Lipidextrakt am *Helix pomatia* Lektin. Tsao und Kim (1981) untersuchten die Affinitätstrennung von galaktosehaltigen Glykolipiden an RCA Sepharose. Dabei stellten sie fest, daß monovalente Glykolipide nicht gebunden wurden. Im Gegensatz dazu wurden Liposomen mit Glykolipiden, die mehrere Galactosen enthielten, am RCA gebunden. Die Aufreinigung zweier bakterieller Lipophosphoglykane mittels Lektin-Affinitätstrennung wurde von Gorocica et al. (1997) beschrieben. Anders als bei den bisher beschriebenen Glykolipiden handelte es sich hier allerdings um wasserlösliche Substanzen mit einem Polysaccharidanteil.

Aus den hier vorgenommenen Untersuchungen zur Affinitätstrennung von Glykolipiden und den in der Literatur dokumentierten Beispielen läßt sich schlußfolgern, daß die Lektin-Affinitätstrennung von intakten Glykolipiden im wesentlichen unter zwei Voraussetzungen zur Aufreinigung einzelner Komponenten führen kann: (1) wenn die Glykolipide hinreichend wasserlöslich sind (wie z.B. Lipopolysaccharide) und dadurch die Affinität zum Lektin stärker sein kann als die Affinität zur Ausbildung von Aggregaten (Mizellen) untereinander; bzw. (2) wenn die Mizellen durch den Einsatz von Lösungsmitteln zerstört werden können, ohne daß die Bindungseigenschaften des Lektins davon beeinträchtigt werden. Die Lektin-Affinitätstrennung kann generell zur Abtrennung von glykolipidhaltigen Mizellen, Vesikeln oder Liposomen eingesetzt werden.

## 10 Zusammenfassung / Summary

Glykokonjugate spielen in vielen physiologischen Prozessen eine wichtigen Rolle und sind daher für die Entwicklung neuer pharmazeutischer Wirkstoffe von Bedeutung. Zur Gewinnung dieser Substanzen werden biospezifische Trennverfahren, wie die Lektin-Affinitätstrennung, benötigt. Obwohl diese Methoden viele Vorteile bieten, ist ihr Einsatz wegen technologischer Schwierigkeiten, einer geringen Auswahl an Adsorbentien und hoher Kosten auf Spezialanwendungen beschränkt. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Trennverfahren auf Basis der Lektin-Affinitätstrennung für die Fraktionierung und Aufreinigung von Glykokonjugaten entwickelt, welches eine technologische Verbesserung darstellt und sich sowohl für analytische als auch für präparative Anwendungen eignet.

Im Rahmen der Methodenentwicklung zur **Herstellung von Lektin-Adsorbentien** wurden die Lektine *Ricinus communis* Agglutinin (RCA), Concanavalin A (Con A) und Wheat Germ Agglutinin (WGA) an unterschiedliche Träger auf der Basis von Silika und synthetischen Polymeren immobilisiert und die einflußnehmenden Parameter optimiert. Es wurde so eine Auswahl hochwirksamer Adsorbentien für die Affinitätstrennung verschiedener Glykokonjugate bereitgestellt.

Die **Charakterisierung der hergestellten Lektin-Adsorbentien** erfolgte sowohl mittels diskontinuierlicher Affinitätstrennung (Aufnahme von Adsorptionsisothermen) als auch durch die kontinuierliche Trennung ausgewählter Glykoproteine. Zum Vergleich wurden ebenfalls kommerzielle Lektin-Adsorbentien charakterisiert. Die Untersuchung wichtiger Eigenschaften der Adsorbentien erfolgte anhand von Modellsystemen und führte zur Optimierung der Trennparameter. Es wurden die Kapazitäten für die Adsorption einzelner Glykoproteine bestimmt und die Ausnutzung der Lektinliganden ermittelt. Weiterhin konnten sehr gute Langzeitstabilitäten von RCA- und WGA-Adsorbentien über Zeiträume von 30 bis 84 Wochen nachgewiesen werden.

Das entwickelte **Trennverfahren fand Anwendung** für die Fraktionierung und Aufreinigung von Glykokonjugaten. Anhand von Einzelstoffsystemen und synthetischen Stoffmischungen konnte die Fraktionierung verschiedener Glykoproteine aufgezeigt werden. Mittels Con A Affinitätstrennung erfolgte die Aufreinigung einer Meerrettich-Peroxidase-Präparation unter Steigerung der Enzymaktivität. Die Affinitätstrennung eines Glykolipid-Extraktes aus Rinderhirn führte zur Abtrennung eines Glykolipidgemisches. Dieses Ergebnis wurde dahingehend gedeutet, daß eine Fraktionierung von Glykolipid-Mischmizellen erfolgte. Weiterhin wurde eine effiziente Methode zur Aufreinigung des Glykoproteins Fetuin aus dem natürlichen Vielstoffgemisch fetalem Rinderserum mittels WGA Affinitätstrennung entwickelt, welche höhere Ausbeuten als herkömmliche Methoden lieferte.

Glycoconjugates play an important role in many physiological processes and thus are potential candidates for the development of new pharmacologically active substances. Biospecific separation techniques like lectin affinity separation are needed for the isolation and purification of these compounds. Although these techniques offer many advantages they are often restricted to special applications due to technological problems, a limited choice of adsorbents and high costs. In the present work a separation procedure based on lectin affinity separation for the fractionation and purification of glycoconjugates has been developed. This technologically improved procedure is suitable for both analytical and preparative applications.

A method development for the **preparation of lectin-adsorbents** was carried out. Therefore the lectins *Ricinus communis* Agglutinin (RCA), Concanavalin A (Con A) and Wheat Germ Agglutinin (WGA) were immobilized onto different support materials based on silica and synthetic polymers and influencing parameters were optimized. Thus a selection of highly active adsorbents for the affinity separation of glycoconjugates was produced.

The **characterization of the prepared lectin-adsorbents** was performed using batch adsorption techniques (adsorption isotherms) and the continuous affinity separation of selected glycoproteins. For a comparison commercial lectin-adsorbents were also characterized. Using model systems the analysis of adsorbent properties was carried out resulting in optimized separation conditions. Capacities for adsorption of different glycoproteins were determined and the ligand accessibilities were calculated. Investigations concerning the long term stability proved a very good stability for RCA and WGA adsorbents over a period of 30 to 84 weeks.

The developed separation procedure **was applied in the fractionation and purification of glycoconjugates**. The fractionation of certain glycoproteins could be shown when single compounds and defined mixtures were applied. Using Con A adsorbents the purification of a peroxidase preparation from horseradish could be achieved showing an enhanced enzymatic activity. Affinity separation of a glycolipid-extract from bovine brain yielded a glycolipid mixture instead of single compounds. This result was interpreted to be due to a fractionation of mixed glycolipid micelles. Furthermore, an efficient procedure for purification of the glycoprotein fetuin from the natural source fetal bovine serum was developed using WGA affinity separation. The developed procedure resulted in an improved product yield when compared with conventional methods.

## 11 Literatur

- Anderson, D. J.; Walters, R. R. (1986): Equilibrium and Rate Constants of Immobilized Concanavalin A Determined by High-Performance Affinity Chromatography. *Journal of Chromatography*, **376**, 69-85.
- Anspach, F. B.; Johnston, A.; Wirth, H. J.; Unger, K. K.; Hearn, M. T. W. (1990): Thermodynamic and Kinetic Investigations on Rigid and Soft Affinity Gels with Varying Particle and Pore Sizes: Comparison of Thermodynamic Parameters and the Adsorption Behaviour of Proteins Evaluated from Bath and Frontal Analysis Experiments. *Journal of Chromatography*, **499**, 103-124.
- Anspach, F. B.; Johnston, A.; Wirth, H.-J.; Unger, K. K.; Hearn, M. T. W. (1989): High-Performance Liquid Affinity Chromatography of Amino Acids, Peptides and Proteins – Thermodynamic und Kinetic Investigations on Rigid and Soft Affinity Gels with Varying Particle and Pore Sizes. *Journal of Chromatography*, **476**, 205 - 225.
- Ashwell, G.; Morell, A. G. (1974): The Role of Surface Carbohydrates in the Hepatic Recognition and Transport of Circulating Glycoproteins. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, **41**, 99-128.
- Atkins, P. W.: *Physikalische Chemie*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1996.
- Axen, R.; Porath, J.; Ernback, S. (1967): Chemical Coupling of Peptides and Proteins to Polysaccharides by Means of Cyanogen Halides. *Nature*, **214**, 1302-1304.
- Baenziger, J. U.; Fiete, D. (1979): Structural Determinants of *Ricinus communis* Agglutinin and Toxin Specificity for Oligosaccharides. *The Journal of Biological Chemistry*, **254**, 9795-9799.
- Baetz, A. L.; Hubbert, W. T.; Graham, C. K. (1976): Changes of Biochemical Constituents in Bovine Fetal Fluids with Gestational Age. *American Journal of Veterinary Research*, **37**, 1047-1052.
- Barua, T. K.; Raychowdhury, M. K.; Chakrabarti, P. (1984): Lectin-Glycolipid Interaction. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, **21**, 73-75.
- Bhavanandan, V. P.; Katlic, A. W. (1979): The Interaction of Wheat Germ Agglutinin with Sialoglycoproteins. *The Journal of Biological Chemistry*, **254**, 4000-4008.
- Björklund, M.; Hearn, M. T. W. (1997): Characterisation of Silica-Based Heparin Affinity Sorbents from Equilibrium Binding Studies on Plasma Fractions Containing Thrombin. *Journal of Chromatography*, **762**, 113-133.

- Blikstad, I.; Fägerstam, L. G.; Bhikhabhai, R.; Lindblom, H. (1996): Detection and Characterization of Oligosaccharides in Column Effluents using Surface Plasmon Resonance. *Analytical Biochemistry*, **233**, 42-49.
- Borchert, A.; Larsson, P. O.; Mosbach, K. (1982): High-Performance Liquid Affinity Chromatography on Silica-Bound Concanavalin A. *Journal of Chromatography*, **244**, 49-56.
- Bouhours, D.; Hansson, G. C.; Bouhours, J. F. (1995): Structure and Genetic Polymorphism of Blood Group A-Active Glycosphingolipids of the Rat Large Intestine. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1255**, 131-140.
- Boyd, W. C.; Shapleigh, E. (1954): Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins. *Science*, **119**, 419.
- Bradford, M. M. (1976): A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Brockhausen, I.; Schutzbach, J.; Kuhns, W. (1998): Glycoproteins and their Relationship to Human Disease. *Acta Anatomica*, **161**, 36-78.
- Brown, W. M.; Saunders, N.R.; Mollgard, K.; Dziegielewska, K. M. (1992): Fetuin - An Old Friend Revisited. *BioEssays*, **14**, 749-755.
- Burnouf, T.; Goubran, H.; Radosevich, M. (1998): Application of Bioaffinity Technology in Therapeutic Extracorporeal Plasmapheresis and Large-Scale Fractionation of Human Plasma. *Journal of Chromatography B*, **715**, 65-80.
- Callaway, J. E.; Garcia, J. A.; Hersh, C. L.; Yeh, R. C.; Gilmore-Hebert, M. (1986): Use of Lectin Affinity Chromatography for the Purification of Collagenase from Human Polymorphonuclear Leukocytes. *Biochemistry*, **25**, 4757-4762.
- Carlsson, J.; Janson, J.-C.; Sparrman, M.: Affinity Chromatography. In: Janson, J.-C.; Ryden, L. (Hrsg.) *Protein Purification - Principles, High Resolution Methods and Applications*. New York, Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1989, S. 275-329.
- Cartellieri, S.; Braaß, O.; Helmholz, H.; Thiesen, P.; Niemeyer, B.: Functionalization of Silica for the Immobilization of Lectins. In: *Biotechnology 2000, Poster Abstracts, Berlin*. Vol. 4, Frankfurt am Main: DECHEMA e.V., 2000, S. 79-81.
- Cartellieri, S.; Helmholz, H.; Niemeyer, B. (2001a): Preparation and Evaluation of *Ricinus communis* Agglutinin Affinity Adsorbents Using Polymeric Supports. *Analytical Biochemistry*, **295**, 66-75.
- Cartellieri, S.; Helmholz, H.; Neidhart, B.; Niemeyer, B.: Strukturspezifische Trennung von Mono- und Disacchariden mittels High-Performance Liquid Affinity Chromatography (HPLAC). In: *Anakon 2001, Kurzreferate, Konstanz*.

- Gesellschaft Deutscher Chemiker - Fachgruppe Analytische Chemie, 2001b, S. 118.
- Cartellieri, S.; Hamer, O.; Helmholz, H.; Niemeyer, B. (2002): One-Step Affinity Purification of Fetuin From Fetal Bovine Serum. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **35**, 83-89.
- Chaiken, I. M. (1986): Analytical Affinity Chromatography in Studies of Molecular Recognition in Biology: A Review. *Journal of Chromatography*, **376**, 11-32.
- Chase, H. A. (1984): Scale-up of Immunoaffinity Separation Processes. *Journal of Biotechnology*, **1**, 67-80.
- Conder, J. R.; Hayek, B. O. (2000): Adsorption Kinetics and Equilibria of Bovine Serum Albumin on Rigid Ion-Exchange and Hydrophobic Interaction Chromatography Matrices in a Stirred Cell. *Biochemical Engineering Journal*, **6**, 215-223.
- Cummings, R. (1994): Use of Lectins in Analysis of Glycoconjugates. *Methods in Enzymology*, **230**, 66-86.
- Cummings, R. D.: Lectins as Tools for Glycoconjugate Purification and Characterization. In: Gabius, H.-J.; Gabius, S. (Hrsg.): *Glycosciences - Status and Perspectives*. Weinheim: Chapman & Hall, 1997, S. 191-199.
- Curatolo, W.; Yau, A. O.; Small, D. M.; Sears, B. (1978): Lectin-Induced Agglutination of Phospholipid/Glycolipid Vesicles. *Biochemistry*, **17**, 5740-5744.
- Curatolo, W. (1987): Glycolipid Function. *Biochimica et Biophysica Acta*, **906**, 137-160.
- Dam, T. K.; Cavada, B. S.; Grangeiro, T. B.; Santos, C. F.; de Sousa, F. A. M.; Oscarson, S.; Bewer, C. F. (1998): *Diocleinae* Lectins Are a Group of Proteins with Conserved Binding Sites for the Core Trimannoside of Asparagine-linked Oligosaccharides and Differential Specificities for Complex Carbohydrates. *The Journal of Biological Chemistry*, **273**, 12082-12088.
- Demetriou, M.; Binkert, C.; Sukhu, B.; Tenenbaum, H. C.; Dennis, J. W. (1996): Fetuin/ $\alpha$ 2-HS Glycoprotein Is a Transforming Growth Factor- $\beta$  Type II Receptor Mimic and Cytokine Antagonist. *The Journal of Biological Chemistry*, **271**, 12755-12761.
- Ding, Z.; Xu, Y. (1995): A Rapid Simplified Purification of Bovine Thrombin. *Preparative Biochemistry*, **25**, 21-28.
- Fahrner, R. L.; Whitney, D. H.; Vanderlaan, M.; Blank, G. S. (1999): Performance Comparison of Protein A Affinity-Chromatography Sorbents for Purifying Recombinant Monoclonal Antibodies. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **30**, 121-128.

- Finette, G. M. S.; Mao, Q. M.; Hearn, M. T. W. (1997): Comparative Studies on the Isothermal Characteristics of Protein Adsorbed Under Batch Equilibrium Conditions to Ion-Exchange, Immobilised Metal Ion Affinity and Dye Affinity Matrices with Different Ionic Strength and Temperature Conditions. *Journal of Chromatography*, **763**, 71-90.
- Fowell, S. L.; Chase, H. A. (1986): A Comparison of Some Activated Matrices for Preparation of Immunosorbents. *Journal of Biotechnology*, **4**, 355-368.
- Frenoy, J. P.; Tran, A. T.; Bourrillon, R. (1986): Structure and Stability of *Ricinus communis* Hemagglutinin. *The Biochemical Journal*, **240**, 227-231.
- Gabius, H.-J. (2000): Biological Information Transfer Beyond the Genetic Code: The Sugar Code. *Naturwissenschaften*, **87**, 108-121.
- Gabius, H.-J.; Gabius, S. (Hrsg.): *Glycosciences - Status and Perspectives*. Weinheim: Chapman & Hall, 1997. ISBN 3-8261-0073-5
- Gabius, H.-J. (1995): Protein-Zucker-Erkennung. *Naturwissenschaften*, **82**, 533-543.
- Gajhede, M.; Schuller, D. J.; Henriksen, A. T.; Smith, A.; Poulos, T. L. (1997): Crystal Structure of Horseradish Peroxidase C at 2.15 Å Resolution. *Nature Structural Biology*, **4**, 1032-1038.
- Goldstein, I. J.; Poretz, R. D.: Isolation, Physicochemical Characterization, and Carbohydrate-Binding Specificity of Lectins. In: Liener, I. E.; Sharon, N.; Goldstein, I. J. (Hrsg.) *The Lectins - Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*. Orlando: Academic Press, 1986, S. 33-243.
- Goldstein, I. J.; Hughes, R. C.; Monsigny, M.; Osawa, T.; Sharon, N. (1980): What Should Be Called a Lectin? *Nature*, **285**, 66.
- Gorocica, P.; Monroy, A.; Rivas, B.; Estrada-Parra, S.; Leroy, Y.; Chavez, R.; Zenteno, E. (1997): Purification of the Lipophosphoglycan from Two *Leishmania mexicana* Strains by Lectin Affinity Chromatography. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, **27**, 1-17.
- Green, E. D.; Brodbeck, R. M.; Baenziger, J. U. (1987a): Lectin Affinity High-Performance Liquid Chromatography: Interactions of N-Glucanase-Released Oligosaccharides with Leukoagglutinating Phytohemagglutinin, Concanavalin A, *Datura stramonium* Agglutinin, and *Vicia villosa* Agglutinin. *Analytical Biochemistry*, **167**, 62-75.
- Green, E.D.; Brodbeck, R. M.; Baenziger, J. U. (1987b): Lectin Affinity High-Performance Liquid Chromatography: Interactions of N-Glycanase-Released Oligosaccharides with *Ricinus communis* Agglutinin I and *Ricinus communis* Agglutinin II. *The Journal of Biological Chemistry*, **262**, 12030-12039.
- Green, E.D.; Adelt, G.; Baenziger, J. U.; Wilson, S.; Halbeek, H. V. (1988): The Asparagine-linked Oligosaccharides on Bovine Fetuin. *The Journal of Biological Chemistry*, **263**, 18253-18268.

- Green, E. D.; Baenziger, J. U. (1989): Characterization of Oligosaccharides by Lectin Affinity High-Performance Liquid Chromatography. *Trends in Biochemical Sciences*, **14**, 168-172.
- Gupta, D.; Kaltner, H.; Dong, X.; Gabius, H.-J.; Brewer, C. F. (1996): Comparative Cross-Linking Activities of Lactose-Specific Plant and Animal Lectins and a Natural Lactose-Binding Immunoglobulin G Fraction from Human Serum with Asialofetuin. *Glycobiology*, **6**, 843-849.
- Hakomori, S. I.; Igarashi, Y. (1995): Functional Role of Glycosphingolipids in Cell Recognition and Signaling. *Journal of Biochemistry*, **118**, 1091-1103.
- Hamer, O.: *Herstellung und Vergleich von Lectin-Adsorbentien zur Affinitätstrennung von Glykokonjugaten*. Hamburg, Fachhochschule, Fachbereich Naturwissenschaftliche Technik, Diplomarbeit, 2000 (unveröffentlicht).
- He, L.-Z.; Helmholz, H.; Niemeyer, B.; Luo, X.: A Diffusion Model for Affinity Adsorption of Glycoprotein on Immobilized Lectin. In: Bathe, K. J. (Hrsg.) *First MIT Conference on Computational Fluid and Solid Mechanics*. Boston: Elsevier Science, 2001, S. 1232-1235.
- Hugosson, S.; Angström, J.; Olsson, B. M.; Bergström, J.; Fredlund, H.; Olcen, P.; Teneberg, S. (1998): Glycosphingolipid Binding Specificities of *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae*: Detection, Isolation and Characterization of a Binding-Active Glycosphingolipid from Human Oropharyngeal Epithelium. *Journal of Biochemistry*, **124**, 1138-1152.
- Hunter, A. P.; Games, D. E. (1995): Evaluation of Glycosylation Site Heterogeneity and Selective Identification of Glycopeptides in Proteolytic Digest of Bovine  $\alpha_1$ -Acid Glycoprotein by Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **9**, 42-56.
- ICH Steering Committee (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) (Hrsg.): *ICH Harmonised Tripartite Guideline - Validation of Analytical Procedures: Methodology*. 1996.
- Janson, J. C. (1984): Large-Scale Affinity Purification - State of the Art and Future Prospects. *Trends in Biotechnology*, **2**, 31-38.
- Jennissen, H. P. (1995): Cyanogen Bromide and Tressyl Chloride Chemistry Revisited: The Special Reactivity of Agarose as a Chromatographic and Biomaterial Support for Immobilizing Novel Chemical Groups. *Journal of Molecular Recognition*, **8**, 116-124.
- Kakita, H.; Nakamura, K.; Kato, Y.; Oda, Y.; Shimura, K.; Kasai, K. (1991): High-Performance Affinity Chromatography of a Chick Lectin on an Adsorbent Based on Hydrophilic Polymer Gel. *Journal of Chromatography*, **543**, 315-326.

- Kalisz, H. M.; Hecht, H.-J.; Schomburg, D.; Schmid, R. D. (1991): Effects of Carbohydrate Depletion on the Structure, Stability and Activity of Glucose Oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1080**, 138-142.
- Kopitz, J.: Glycolipids: Structure and Function. In: Gabius, H.-J.; Gabius, S. (Hrsg.): *Glycosciences - Status and Perspectives*. Weinheim: Chapman & Hall, 1997, S. 163-189.
- Laine, R. A.; The Information-Storing Potential of the Sugar Code. In: Gabius, H.-J.; Gabius, S. (Hrsg.): *Glycosciences - Status and Perspectives*. Weinheim: Chapman & Hall, 1997, S. 1-11.
- Lakhiari, H.; Jozefonvicz, J.; Muller, D. (1998): Influence of the Nature of Coupling Agents on Insulin Adsorption on Supports Grafted with Sialic Acid for High-Performance Affinity Chromatography. *Journal of Chromatography B*, **706**, 33-41.
- Lakhiari, H.; Legendre, E.; Muller, D.; Jozefonvicz, J. (1995): High-Performance Affinity Chromatography of Insulin on Coated Silica Grafted with Sialic Acid. *Journal of Chromatography B*, **664**, 163-173.
- Larsson, P. O.; Glad, M.; Hansson, L.; Mansson, M. O.; Ohlson, S.; Mosbach, K. (1983): High-Performance Liquid Affinity Chromatography. *Advances in Chromatography*, **21**, 42-85.
- Lasch, J.; Koelsch, R. (1978): Enzyme Leakage and Multipoint Attachment of Agarose-Bound Enzyme Preparations. *European Journal of Biochemistry*, **82**, 181-186.
- Lee, W. C. (1997): Protein separation using non-porous sorbents. *Journal of Chromatography*, **699**, 29-45.
- Leger, R. J. S.; Charnley, A. K.; Cooper, R. M., (1987): Characterization of Cuticle-Degrading Proteases Produced by the Entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **253**, 221-232.
- LeVine, D.; Kaplan M. J.; Greenaway, P. J. (1972): The Purification and Characterization of Wheat-Germ Agglutinin. *Biochemical Journal*, **129**, 847-856.
- Lindhorst, T. K. (2000): Struktur und Funktion von Kohlenhydraten. *Chemie in unserer Zeit*, **34**, 38-52.
- Lis, H.; Sharon, N.: Biological Properties of Lectins. In: Liener, I. E.; Sharon, N.; Goldstein, I. J. (Hrsg.): *The Lectins - Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine*. Orlando: Academic Press, 1986, S. 265-435.
- Mattiasson, B. (1988): Affinity Immobilization. *Methods in Enzymology*, **137**, 647-656.
- Merkle, R. K.; Cummings, R. D. (1987): Lectin Affinity Chromatography of Glycopeptides. *Methods in Enzymology*, **138**, 232-257.

- Mikulski, A. J.; Heine, J. W.; Le, H. V.; Sulkowski, E. (1980): Large Scale Purification of Human Fibroblast Interferon. *Preparative Biochemistry*, **10**, 103-119.
- Mingalyov, P. G.; Orishchenko, N. V.; Fadeev, A. Y. (1997): Study of Correlations Between Fine Structure of Bonded Layer and Affinity Properties of Silicas with Attached Cyclic Oligopeptides. *Journal of Chromatography A*, **777**, 249-259.
- Nagata, Y.; Burger, M. M. (1974): Wheat Germ Agglutinin. Molecular characteristics and Specificity for Sugar Binding. *The Journal of Biological Chemistry*, **249**, 3116-3122.
- Nagata, Y.; Burger, M. M. (1972): Wheat Germ Agglutinin. Isolation and Crystallization. *The Journal of Biological Chemistry*, **247**, 2248-2250.
- Naismith, J. H.; Field, R. A. (1996): Structural Basis of Trimannosid Recognition by Concanavalin A. *The Journal of Biological Chemistry*, **271**, 972.
- Nakamura, K.; Hashimoto, T.; Kato, Y. (1990): Tresyl-Activated Support for High-Performance Affinity Chromatography. *Journal of Chromatography*, **510**, 101-113.
- Nakamura, K.; Toyoda, K.; Kato, Y. (1989): Preparation of Adsorbents for Affinity Chromatography using TSKgel Tresyl-Toyopearl 650M. *Journal of Chromatography*, **478**, 159-167.
- Narayanan, S. R.; Crane, L. J. (1990): Affinity Chromatography Supports: A Look at Performance Requirements. *Trends in Biotechnology*, **8**, 12-16.
- Nau, M.: *Makroporöses Suspensionspolymerisat aus Glycigylmethacrylat und Ethylenglycoldimethacrylat als Trägermaterial für die Affinitätschromatographie*. Hamburg, Universität, Institut für Technische und Makromolekulare Chemie, Dissertation, 2001.
- Nicoud, R. M.; Seidel-Morgenstern, A. (1996): Adsorption Isotherms: Experimental Determination and Application to Preparative Chromatography. *Isolation and Purification*, **2**, 165-200.
- Nilsson, K.; Mosbach, K. (1987): Tresyl Chloride-Activated Supports for Enzyme Immobilization. *Methods in Enzymology*, **135**, 65-78.
- Nilsson, K.; Mosbach, K. (1984): Immobilization of Ligands with Organic Sulfonyl Chlorides. *Methods in Enzymology*, **104**, 56-69.
- Nilsson, K.; Mosbach, K. (1981): Immobilization of Enzymes and Affinity Ligands to Various Hydroxyl Group Carrying Supports Using Highly Reactive Sulfonyl Groups. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **102**, 449-457.
- Nilsson, B.; Norden, N. E.; Svensson, S. (1979): Structural Studies on the Carbohydrate Portion of Fetuin. *The Journal of Biological Chemistry*, **254**, 4545-4553.

- Ohlson, S.; Hansson, L.; Larsson, P. O.; Mosbach, K. (1978): High Performance Liquid Affinity Chromatography (HPLAC) and its Application to the Separation of Enzymes and Antigens. *FEBS Letters*, **93**, 5-9.
- Ohlson, S.; Hansson, L.; Glad, M.; Mosbach, K.; Larsson, P.-O. (1989): High Performance Liquid Affinity Chromatography: A New Tool in Biotechnology. *Trends in Biotechnology*, **7**, 179-186.
- Okazaki, I.; Hasegawa, Y.; Shinohara, Y.; Kamasaki, T.; Bhikhabhai, R. (1995): Determination of the Interactions Between Lectins and Glycoproteins by Surface Plasmon Resonance. *Journal of Molecular Recognition*, **8**, 95-99.
- Pedersen, K. O. (1947): Ultracentrifugal and Electrophoretic Studies on Fetuin. *The Journal of Physical and Colloid Chemistry*, **51**, 164-171.
- Pedersen, K. O. (1944): Fetuin, a New Globulin Isolated from Serum. *Nature*, **154**, 575.
- Petritzki, J.-P.: *Untersuchungen an mit Concanavalin A modifizierten Trägermaterialien für die Affinitätschromatographie*. Lübeck, Fachhochschule, Fachbereich Angewandte Naturwissenschaften, Diplomarbeit, 2000 (unveröffentlicht).
- Porath, J.; Axen, R.; Ernback, S. (1967): Chemical Coupling of Proteins to Agarose. *Nature*, **215**, 1491-1492.
- Renauer, D.; Oesch, F.; Kinkel, J.; Unger, K. K.; Wieser, R. J. (1985): Fractionation of Membrane Proteins on Immobilized Lectins by High-Performance Liquid Affinity Chromatography. *Analytical Biochemistry*, **151**, 424-427.
- Rüdiger, H. (1981): Lektine: Vorkommen, Anwendung und Funktion. *Chemie in unserer Zeit*, **5**, 155-162.
- Rutenber, E.; Katzin, B. J.; Ernst, S.; Collins, E. J.; Mlsna, D.; Ready, M. P.; Robertus, J. D. (1991): Crystallographic refinement of ricin to 2.5 Å. *Proteins*, **10**, 240-250.
- Salmon, V.; Legrand, D.; Georges, B.; Slomianny, M. C.; Coddeville, B.; Spik, G. (1997): Characterization of Human Lactoferrin Produced in the Baculovirus Expression System. *Protein Expression and Purification*, **9**, 203-210.
- Sandvig, K.; van Deurs, B. (1999): Endocytosis and Intracellular Transport of Ricin: Recent Discoveries. *FEBS Letters*, **452**, 67-70.
- Sato, T.; Serizawa, T.; Ohtake, F.; Nakamura, M.; Terebayashi, T.; Kawanishi, Y.; Okahata, Y. (1998): Quantitative Measurements of the Interaction Between Monosialoganglioside Monolayers and Wheat Germ Agglutinin (WGA) by a Quartz-Crystal Microbalance. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1380**, 82-92.
- Schwedt, G.: *Chromatographische Trennmethode - Theoretische Grundlagen, Techniken und analytische Anwendungen*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 1994.

- Sharon, N.; Lis, H., Glycoproteins: Structure and Function. In: Gabius, H.-J.; Gabius, S. (Hrsg.): *Glycosciences - Status and Perspectives*. Weinheim: Chapman & Hall, 1997, S. 133-162.
- Sharon, N.; Lis, H.: *Lectins*. London, New York: Chapman and Hall, 1989.
- Sigma (2000): Produkt Information (Sigma-Aldrich, München).
- Smith, D. F.; Torres, V. (1989): Lectin-Affinity Chromatography of Glycolipids and Glycolipid-Derived Oligosaccharides. *Methods in Enzymology*, **179**, 30-45.
- Spiro, R. G. (1960): Studies on fetuin, a Glycoprotein of Fetal Serum. *The Journal of Biological Chemistry*, **235**, 2860-2869.
- Swaminathan, C. P.; Surolia, N.; Surolia, A. (1998): Role of Water in the Specific Binding of Mannose and Mannooligosaccharides to Concanavalin A. *Journal of the American Chemical Society*, **120**, 5153-5159.
- Tamura, K.; Yatsu, T.; Itoh, H.; Motoi, Y. (1989): Isolation, Characterization, and Quantitative Measurement of Serum Alpha 1-Acid Glycoprotein in Cattle. *Nippon Juigaku Zasshi*, **51**, 987-994.
- Torres, B. V.; Smith, D. F. (1988): Purification of Forssmann and Human Blood Group A Glycolipids by Affinity Chromatography on Immobilized *Helix pomatia* Lectin. *Analytical Biochemistry*, **170**, 209-219.
- TosohBiosep (2001): Produkt Information (TosohBiosep, Stuttgart).
- Tsao, D.; Kim, Y. (1981): Separation of Cell Surface Glycoproteins from Glycolipids by *Ricinus communis* Agglutinin-Sepharose. *The Journal of Biological Chemistry*, **256**, 4947-4950.
- Turkova, J.: *Bioaffinity Chromatography*. Amsterdam: Elsevier, 1993.
- Voet, D; Voet, J.G.: *Biochemie*. Weinheim: VCH, 1994.
- Volz, K. O.: *Erfassung der Einsatzparameter und Beurteilung der Wirtschaftlichkeit von Sorptionsverfahren in der Biotechnologie*. Hamburg, Universität der Bundeswehr, Fachbereich Maschinenbau, Studienarbeit, 2001 (unveröffentlicht).
- Walters, R. R. (1985): Affinity chromatography. *Analytical Chemistry*, **57**, 1099-1114.
- Wang, W. C.; Clark, G. F.; Smith, D. F.; Cummings, R. D. (1988): Separation of Oligosaccharides Containing Terminal Alpha-Linked Galactose Residues by Affinity Chromatography on *Griffonia simplicifolia* I Bound to Concanavalin A-Sepharose. *Analytical Biochemistry*, **175**, 390-396.
- Watanabe, K.; Matsuda, T.; Sato, Y. (1981): The Secondary Structure of Ovomuroid and its Domains as Studied by Circular Dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta*, **667**, 242-250.

- Wells, P. A.; Beiderman, B.; Garlick, R. L.; Lyle, S. B.; Martin, J. P.; Herberg, J. T.; Meyer, H. F.; Henderson, S. L.; Eckenrode, F. M. (1993): Large-Scale Immunoaffinity Purification of Recombinant Soluble Human Antigen CD4 From *Escherichia coli* cells. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **18**, 341-357.
- Williams, S. L.; Davies, G. J. (2001): Protein-Carbohydrate Interactions: Learning Lessons from Nature. *Trends in Biotechnology*, **19**, 356-362.
- Winzor, D. J. (1992): Recent Developments in Quantitative Affinity Chromatography. *Journal of Chromatography*, **597**, 67-82.
- Wohlfahrt, G.; Witt, S.; Hendle, J.; Schomburg, D.; Kalisz, H. M.; Hecht, H. J. (1999): 1.8 and 1.9 Å Resolution Structures of the *Penicillium amagasakiense* and *aspergillus niger* Glucose Oxidase as a Basis for Modelling Substrate Complex. *Acta Crystallographica D*, **969**, 55.
- Wright, C. S.; Jaeger, J. (1993): Crystallographic Refinement and structure analysis of the complex of Wheat Germ Agglutinin with a Bivalent Sialopeptide from Glycophorin A. *Journal of Molecular Biology*, **232**, 620-638.
- Wright, C. S. (1984): Structural Comparison of the Two Distinct Sugar Binding Sites in Wheat Germ Agglutinin Isolectin II. *Journal of Molecular Biology*, **178**, 91-104.
- Yet, M. G.; Chin, C. C.; Wold, F. (1988): The Covalent Structure of Individual N-Linked Glycopeptides from Ovomuroid and Asialofetuin. *The Journal of Biological Chemistry*, **263**, 111-117.
- Yoshida, K.; Moriguchi, H.; Sumi, S.; Horimi, H.; Kitahara, S.; Umeda, H.; Ueda, Y. (1999): Alterations of Asparagine-Linked Sugar Chains of N-acetyl- $\beta$ -D-hexosaminidase During Human Renal Oncogenesis: A Preliminary Study Using Serial Lectin Affinity Chromatography. *Journal of Chromatography*, **723**, 75-80.
- Zopf, D.; Ohlson, S. (1990): Weak-Affinity Chromatography. *Nature*, **346**, 87-88.

## 12 Anhang

### 12.1 Strukturformeln

In der Abbildung 12-1 ist ein Überblick über die wichtigsten Saccharid-Bausteine, die in natürlichen Glykokonjugaten vorkommen, dargestellt.

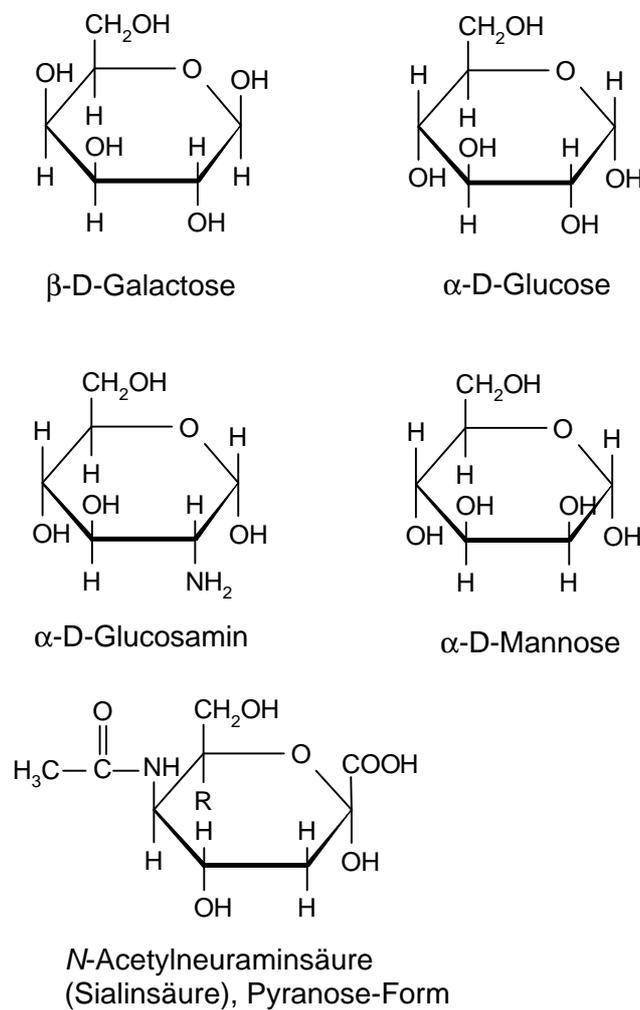


Abb. 12-1: Strukturen der einiger Monosaccharide

## 12.2 Chemikalien

Tabelle 12-1: Chemikalienliste

Substanz	Gefahren- symbol	R-Sätze	S-Sätze	Hersteller
ABTS-Lösung (2,2'-Azinobis(3-ethylbenz- thiazolinsulfonat))	-	36/37/38	26-36	Roche Diagnostics
saures $\alpha_1$ -Glykoprotein (aus Rinderserum)	*	-	-	Sigma-Aldrich
p-Anisaldehyd	Xn	22-36/37/38	26-36	Sigma-Aldrich
Asialofetuin Typ I (aus fetalem Kälberserum)	-	-	-	Sigma-Aldrich
BSA (Bovines Serum Albumin) Fraktion V; N- Gehalt 15,4 %	-	-	-	Sigma-Aldrich
Bradford Reagenz	C	34-20/21/22	24-26-45- 36/37/39	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid Dihydrat	Xn	22-36/37/38	26-36	Sigma-Aldrich
Chloroform	Xn	22-38-40- 48/20/22	36/37	Merck
Coomassie Färbelösung und Entfärbelösung für Gele	F, T	11- 23/24/25- 34-39	7-16-23-26- 36/37/39	BioRad
Concanavalin A Typ V und VI	Xn	20/21/22- 42/43-40	36	Sigma-Aldrich
Concanavalin A Agarose Typ V-B	Xn ****	20/21/22- 42/43-40	36	Sigma-Aldrich
di-Natriumhydrogenphosphat wasserfrei	-	-	-	Fluka
Essigsäure 100%	C	10-35	23-26-45	Merck
Fetales Rinderserum	-	-	-	Sigma-Aldrich
Fetuin (aus fetalem Kälberserum)	-	-	-	Sigma-Aldrich

<b>Substanz</b>	<b>Gefahren- symbol</b>	<b>R-Sätze</b>	<b>S-Sätze</b>	<b>Hersteller</b>
Galactocerebroside Typ I und II aus Rinderhirn	*	-	-	Sigma-Aldrich
Glucocerebroside (aus menschlicher Milz)	Biogefährdung *	-	-	Sigma-Aldrich
Glucose Oxidase	Xi	36/37/38	26-36	Sigma-Aldrich
Guadinin-HCl	Xn	20/21/22	26-36	Sigma-Aldrich
Kaliumdihydrogenphosphat	-	-	-	Merck
Lactoferrin (aus menschlicher Milch)	Biogefährdung *	-	-	Sigma-Aldrich
$\alpha$ -Lactose (Milchzucker)	-	-	-	Sigma-Aldrich
Lactocerebroside (aus Rinderhirn)	*	-	-	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid	Xi	36/37/38	26-36	Sigma-Aldrich
Manganchlorid Tetrahydrat	Xn	22- 36/37/38-40	26-36	Sigma-Aldrich
D-Mannose	-	-	-	Fluka
Methanol zur Analyse	F, T	11- 23/24/25- 39/23/24/25	7-16-36/37- 45	Merck
Monosialogangliosid GM <sub>1</sub> (aus Rinderhirn)	*	-	-	Sigma-Aldrich
N-Acetyl-D-Glucosamin	-	-	-	Sigma-Aldrich
Natriumacetat wasserfrei	-	-	-	Sigma-Aldrich
Natriumazid	T <sup>+</sup>	26/27/28- 32-5	45-36/37/39- 22	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	Xi	36/37/38	26-36	Merck
Natriumhydrogencarbonat	-	-	-	Sigma-Aldrich
Natronlauge 32 %	C	35	2-26-27- 37/39	Merck
p-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid	-	-	-	Sigma-Aldrich

Substanz	Gefahren- symbol	R-Sätze	S-Sätze	Hersteller
p-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid	-	-	-	Sigma-Aldrich
p-Nitrophenyl-β-D-lactopyranosid	T	45- 20/21/22- 36/37/38	45-26- 36/37/39-22	Sigma-Aldrich
p-Nitrophenyl-α-D-mannopyranosid	-	-	-	Sigma-Aldrich
n-Octyl-β-D-Glucopyranosid	Xi	36/37/38	26-36	Sigma-Aldrich
Ovomucoid Typ III-O	-	-	-	Sigma-Aldrich
Peroxidase Typ II	-	-	-	Sigma-Aldrich
<i>Ricinus communis</i> Agglutinin	T <sup>+</sup> *, **, ***	26/27/28- 42/43	45-36	Sigma-Aldrich
<i>Ricinus communis</i> Agglutinin Agarose	T <sup>+</sup> *, **, ***	26/27/28- 42/43	45-36	Sigma-Aldrich
Rinderhirn Extrakt Typ VII	*	-	-	Sigma-Aldrich
Salzsäure 37 %, zur Analyse	C	34-37	26-36/37/39- 45	Merck
Saures α <sub>1</sub> -Glycoprotein	-	-	-	Sigma-Aldrich
Schwefelsäure 96 % Suprapur	C	35	26-30-45	Merck
SDS Natriumdodecylsulfat	Xn	20/22-42- 36/37/38-41	26-36-22	Acros
N-Stearoyl-D,L-Dihydrolactocerebroside	*	-	-	Sigma-Aldrich
Thimerosal	T <sup>+</sup>	26/27/28- 33-42/43- 36/37/38	13-28-26-36- 45	Sigma-Aldrich
Trizma Base, Trizma Hydrochlorid	Xi	36/37/38	26-36	Sigma-Aldrich
Toyopearl AF-Tresyl 650 M	-	-	-	TosohBiosep
<i>Triticum vulgare</i> (Wheat germ) Agglutinin	*	-	-	Sigma-Aldrich
<i>Triticum vulgare</i> (Wheat germ) Agglutinin Agarose	*, ***	-	-	Sigma-Aldrich

\* Nicht vollständig geprüfter Stoff. Mit der entsprechenden Sorgfalt handhaben.

\*\* Extrem gefährliche Substanz. Vor Gebrauch mit Risiken und Sicherheitsmaßnahmen vertraut machen. Sehr giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut; kann allergische Reaktionen des Atemsystems und der Haut bewirken. Einnahme, Einatmen oder Einspritzen auch nur kleiner Mengen kann tödlich sein. Arbeiten nur in geschlossenen Systemen vornehmen (Einwegkleidung).

\*\*\* Enthält Natriumazid oder Thimerosal

## 12.3 Geräte

### Hochleistungsflüssig-Affinitätstrennung (HPLAC)

HPLC-Anlage: Merck Hitachi LaChrom

Gradientenpumpe L-7100

Säulenofen L-7360

Interface D-7000

Dioden Array Detektor L-7450

Auswertesoftware HSM (HPLC System Manager) von Merck Hitachi

### Niederdrucktrennung

Anlage: BioRad

Gradientenpumpe Econo

Detektor Econo UV Monitor Model EM-1 ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ )

Recorder Econo Model 1327

### Proteinbestimmung in Mikrotiterplatten

Anlage: Tecan

Mikrotiterplatten-Reader Tecan Spectra Classic (Filter  $\lambda = 595 \text{ nm}$ )

Software: EasyWIN Screening Version 4.0a

### Gefriertrocknung

Anlage: Christ

Christ L-1 Alpha 2-4

Bestimmung der Enzymaktivität

Photometer von Carl Zeiss Technology

Spekol UV-Vis

Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Anlage: BioRad

Mini-Protean 3 Zelle, Power PAC 300

Bestimmung der Partikelgrößenverteilung

Anlage: Horiba

Laser Scattering Particle Size Distribution Analyzer LA-910

Bestimmung der Dichte

Helium-Pyknometer von Micromeritics

AccuPyc 1330

Weitere Geräte

Laborzentrifuge: Sigma 3K15

pH-Meter: Knick 766 Calimatic

Ultraschallbad: Bandelin Sonorex RK 52

Analysenwaage: Mettler Toledo AG285 (max/min 81/0,00001 g; max/min 210/0,0001g)

## 12.4 Kenndaten der validierten Proteinanalytik

### 12.4.1 Arbeitsvorschrift

Die beschriebene Methode dient zur quantitativen Bestimmung von Proteinen und Glykoproteinen (Standardmaterialien) nach Verwendung als Ligand oder Adsorptiv in der Affinitätstrennung.

#### *Probenahme und -vorbereitung*

Aus dem Reaktionsüberstand der Immobilisierung bzw. den Fraktionen der Affinitätstrennung wird ein Aliquot mittels Kolbenhubpipette abgenommen, und mit Reinstwasser auf eine Proteinkonzentration von 10 µg/ml verdünnt. Bei feinen Trägern oder trüben Lösungen ist eine Zentrifugation der Lösung durchzuführen (Eppendorf-Probengefäß, 2000 U/min, 5 min).

#### *Standardlösung*

Jedes Protein oder Glykoprotein wird über den eigenen Standard quantifiziert. Es wird eine Stammlösung genau eingewogen, ein Aliquot mittels Kolbenhubpipette entnommen und mit Reinstwasser (bzw. Puffer, analog zu den Proben) auf eine Proteinkonzentration von 10 µg/ml verdünnt.

#### *Blindwert*

100 µl Reinstwasser (bzw. Puffer analog zu den Proben) als Blindwert (n = 4).

#### *Kalibrierfunktion*

Aus der Standardlösung 10 µg/ml werden 20 µl, 40 µl, 50 µl, 80 µl, 100 µl in einen Mikrotiterplattenplatz pipettiert und auf 100 µl mit Reinstwasser aufgefüllt (n = 4).

#### *Proben*

Aus der Probenverdünnung ca. 10 µg/ml werden je 100 µl in einen Mikrotiterplattenplatz pipettiert (n = 4).

#### *Reaktion*

Rasche Zugabe von 100 µl Bradford-Reagenz zu Blindwert, Proben und Standards; nach Zugabe Reaktionszeit stoppen (10 min); Schütteln der Mikrotiterplatte im Reader (15 sec).

#### *Messung*

Nach genau 10 min Reaktionszeit wird die Mikrotiterplatte bei  $\lambda = 595$  nm im Mikrotiterplatten-Reader vermessen.

#### *Auswertung*

Der Mittelwert der Extinktionen des Blindwertes wird gebildet. Nach Abzug dieses Mittelwertes von den Extinktionen der Proben und Standards werden die 4 Messungen

ebenfalls gemittelt. Die Kalibrierfunktion wird aufgetragen (Ext. gegen Menge Protein), die Ausgleichsfunktion über lineare Regression gebildet und die Proben innerhalb des Arbeitsbereiches ausgewertet.

### **12.4.2 Analytische Kenndaten**

#### **Standardmaterialien**

Bovines Serum Albumin (BSA)

Concanavalin A Type VI

*Ricinus communis* Agglutinin (RCA)

Asialofetuin (from Fetal Calf Serum) ASF

#### **Spezifität**

Das Ergebnis des Bradford-Assay gibt Auskunft über den Gesamt-Proteingehalt der Probe. Verschiedene Substanzen können den Test stören und ein falsch positives Signal geben: Detergentien, Verbindungen mit basischen Aminosäuren, Peptide. Übliche Puffersubstanzen wie Phosphat, Acetat, Tris, Zucker stören die Bestimmung nicht.

#### **Linearität**

Die Linearität wurde über einen Bereich von 6 Standardkonzentrationen bestimmt und war innerhalb der Kalibrierfunktion über den Arbeitsbereich (Range) von 0,2 – 1,0 µg Protein gegeben. Der Korrelationskoeffizient (Pearson) der linearen Regression betrug:

- 1) BSA:  $R = 0,9955$
- 2) Con A:  $R = 0,9992$
- 3) RCA:  $R = 0,9961$
- 4) ASF:  $R = 0,9977$

#### **Arbeitsbereich**

Der Arbeitsbereich wurde durch optische Auswertung (Empfindlichkeit) und anhand der Präzision auf 0,2 - 1,0 µg Protein festgelegt. Der Arbeitsbereich wurde für jedes Protein im Bereich von 70 % und 130 % der Randwerte überprüft. Es zeigte sich, daß die Präzision und Empfindlichkeit bei den Werten von 70 % der kleinsten Konzentration des Arbeitsbereiches diesem gegenüber gleichbleibend war. Bei der höchsten Proteinkonzentration (130 % der höchsten Konzentration des Arbeitsbereiches) wurde die Empfindlichkeit geringer (Abknicken) und die Präzision der Meßwerte schlechter.

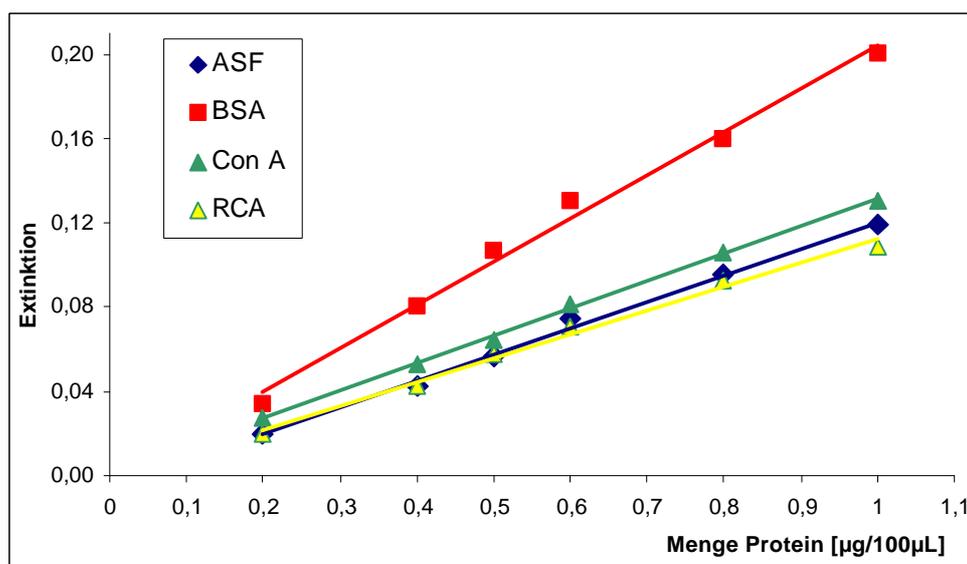


Abb. 12-2: Kalibrierfunktionen der Proteinbestimmung nach Bradford für ASF, BSA, Con A und RCA

## Präzision

Tabelle 12-2: Wiederholpräzision

Proteingehalt [ $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ ] (konventionell wahrer Wert)	0,4 $\mu\text{g}$	0,6 $\mu\text{g}$	0,8 $\mu\text{g}$
MW Quantifizierung für <b>BSA</b> [ $\mu\text{g}$ ]	0,480	0,631	0,832
Standardabweichung der Stichprobe s [ $\mu\text{g}$ ]	0,01583	0,03947	0,01914
Relative Standardabweichung $s_{\text{rel}}$ [%]	3,3	6,3	2,3
Quantifizierung für <b>Con A</b> [ $\mu\text{g}$ ]	0,480	0,603	0,837
Standardabweichung der Stichprobe s [ $\mu\text{g}$ ]	0,02601	0,01128	0,01556
Relative Standardabweichung $s_{\text{rel}}$ [%]	5,4	1,9	1,9
Quantifizierung für <b>RCA</b> [ $\mu\text{g}$ ]	0,424	0,547	0,786
Standardabweichung der Stichprobe s [ $\mu\text{g}$ ]	0,0264	0,0308	0,0543
Relative Standardabweichung $s_{\text{rel}}$ [%]	6,2	5,6	6,9
Quantifizierung für <b>ASF</b> [ $\mu\text{g}$ ]	0,479	0,648	0,882
Standardabweichung der Stichprobe s [ $\mu\text{g}$ ]	0,0070	0,01496	0,0174
Relative Standardabweichung $s_{\text{rel}}$ [%]	1,5	2,3	2,0

## Genauigkeit

*Tabelle 12-3: Wiederfindung der analysierten Proteine*

<b>Proteingehalt [<math>\mu\text{g}/100 \mu\text{L}</math>] (konventionell wahrer Wert)</b>	<b>0,4 <math>\mu\text{g}</math></b>	<b>0,6 <math>\mu\text{g}</math></b>	<b>0,8 <math>\mu\text{g}</math></b>
Quantifizierung für <b>BSA</b> [ $\mu\text{g}$ ]	0,462	0,588	0,854
	0,489	0,638	0,827
	0,490	0,666	0,817
MW Wiederfindung [%]	120,0	105,2	104,1
Genauigkeit [%]	20,0	5,2	4,1
Quantifizierung für <b>Con A</b> [ $\mu\text{g}$ ]	0,481	0,607	0,834
	0,505	0,590	0,853
	0,453	0,611	0,823
MW Wiederfindung [%]	120,0	100,4	104,6
Genauigkeit [%]	20,0	0,4	4,6
Quantifizierung für <b>RCA</b> [ $\mu\text{g}$ ]	0,450	0,560	0,846
	0,426	0,569	0,740
	0,397	0,511	0,771
MW Wiederfindung [%]	106,0	91,1	98,2
Genauigkeit [%]	6,0	8,9	1,8
Quantifizierung für <b>ASF</b> [ $\mu\text{g}$ ]	0,486	0,648	0,863
	0,472	0,664	0,887
	0,478	0,634	0,897
MW Wiederfindung [%]	119,8	108,1	110,3
Genauigkeit [%]	19,8	8,1	10,3

## Empfindlichkeit

Steigung der linearen Kalibrierfunktion  $S$  [ $\text{Ext}/\mu\text{g}$ ]: siehe Tabelle 12-3.

### Nachweisgrenze

Auf der Basis der Standardabweichung  $s$  [Ext] des Blindwert-Signals und der Steigung der Kalibrierfunktion des Proteins  $S$  [Ext/ $\mu\text{g}$ ]

$$\text{NWG } [\mu\text{g}] = 3,3 * s / S \quad [10]$$

Der Blindwert wurde 10 mal bestimmt (je 4 Plätze). Die 4 Einzelmessungen wurden zunächst jeweils gemittelt und dann aus den resultierenden 10 Werten die Standardabweichung  $s$  und die NWG berechnet.

$$s \text{ Blindwert } (n = 10) = 0,00138 \text{ [Ext]}$$

*Tabelle 12-4: Nachweisgrenzen*

<b>Protein</b>	<b>S [Ext/<math>\mu\text{g}</math>]</b>	<b>NWG [<math>\mu\text{g}</math>]</b>
BSA	0,2053	0,022
Con A	0,1299	0,032
RCA	0,1136	0,040
ASF	0,1254	0,036

### Bestimmungsgrenze

Auf der Basis der Standardabweichung  $s$  [Ext] des Blindwert-Signals und der Steigung der Kalibrierfunktion  $S$  [Ext/ $\mu\text{g}$ ]

$$\text{BSG } [\mu\text{g}] = 10 * s / S \quad [11]$$

Der Blindwert wurde 10 mal bestimmt (je 4 Plätze). Die 4 Einzelmessungen wurden zunächst jeweils gemittelt und dann aus den resultieren 10 Werten die Standardabweichung  $s$  und die BSG berechnet.

$$s \text{ Blindwert } (n = 10) = 0,00138 \text{ [Ext]}$$

*Tabelle 12-5: Bestimmungsgrenzen*

<b>Protein</b>	<b>S [Ext/<math>\mu\text{g}</math>]</b>	<b>BSG [<math>\mu\text{g}</math>]</b>
BSA	0,2053	0,067
Con A	0,1299	0,106
RCA	0,1136	0,121
ASF	0,1254	0,110

## 12.5 Trägermaterialien

### 12.5.1 Umrechnungstabelle Masse/Volumen

Tabelle 12-6: Umrechnungstabelle der Trägermaterialien von Masse in Volumen

Träger	Trockenmasse	Festbett - Volumen
Silika P005	1 g	2,90 ml
	0,345 g	1 ml
Silika I005	1 g	2,40 ml
	0,416 g	1 ml
Polymer H20	1 g	4,08 ml
	0,245 g	1 ml
Toyopearl	1 g	4,25 ml
	0,235 g	1 ml

### 12.5.2 Funktionalisierung

Tabelle 12-7: Übersicht über funktionalisierte Trägerchargen

Arbeitskürzel Charge	Träger	Charge HUB	Silanisiert	Spacer	Lagerung
P005 (I)	Silika P005	63-3.1.1.3	MPtMS	+	verd. HCl, 8 °C
I005 (I)	Silika I005	59-1.1	GPtMS	-	verd. HCl, 8 °C
I005 (II)	Silika I005	64-1.1	GPtMS	-	Trocken, -18°C
I005 (III)	Silika I005	79-3.1.1.3	MPtMS	+	verd. HCl, 8 °C
I005 (IV)	Silika I005	80-2.1.1.1	MPtMS	+	verd. HCl, 8 °C
I005 (V)	Silika I005	80-2.1.1.3	MPtMS	+	verd. HCl, 8 °C
H20 (I)	Polymer H20	78-1.1	-	-	verd. HCl, 8 °C
H20 (II)	Polymer H20	81-1.1.1.1	-	+	verd. HCl, 8 °C

Die Trägermaterialien wurden nach einem der folgenden Abläufe funktionalisiert:

A) Silikaträger

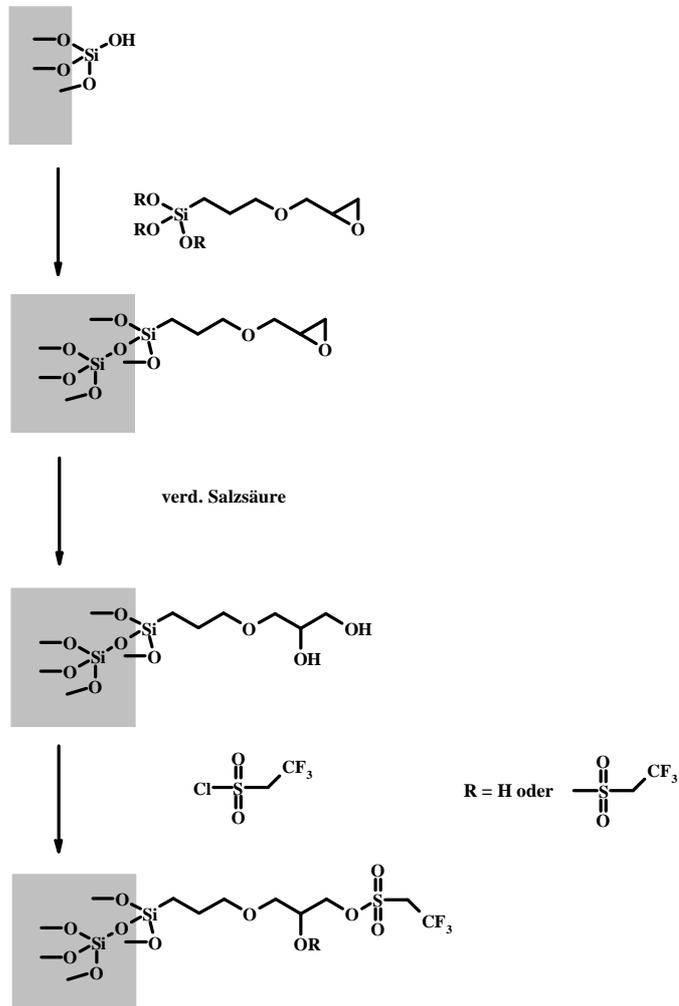


Abb. 12-3: Reaktionsschema der Silanisierung mit GPtMS und Trefluorierung eines Silikaträgers (ohne Spacer-Einbindung)

## B) Silikaträger

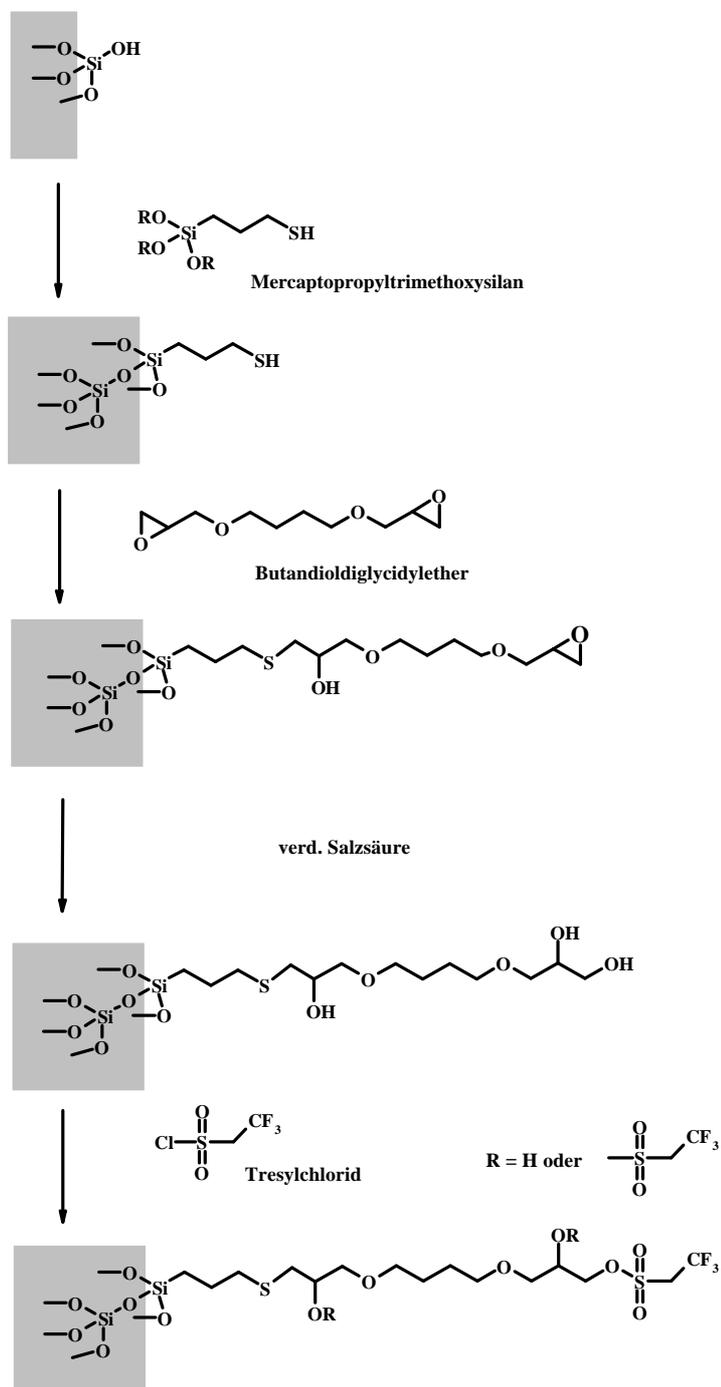


Abb. 12-4: Reaktionsschema der Silanisierung mit MPtMS und Tresylierung eines Silikaträgers (mit Spacer-Einbindung)

## C) Polymer H20

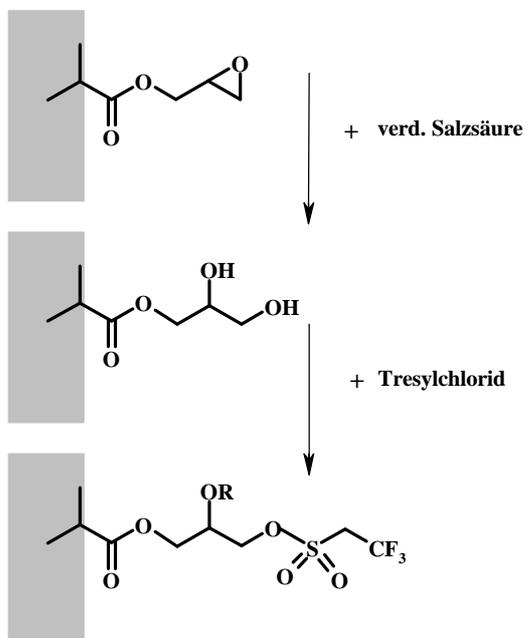


Abb. 12-5: Reaktionsschema der Tresylierung eines G60-H20 Trägers (ohne Spacer-Einbindung)

## D) Polymer H20

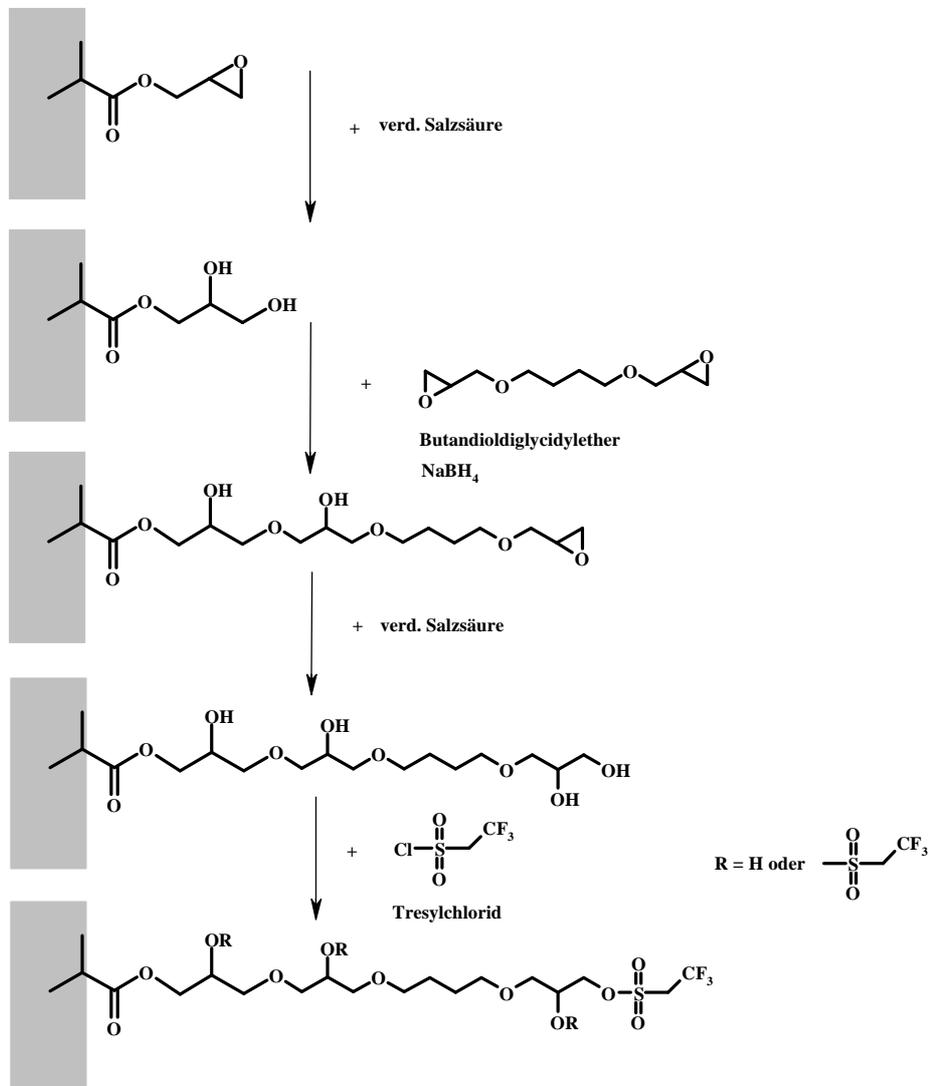


Abb. 12-6: Reaktionsschema der Tresylierung eines G60-H20 Trägers (mit Spacer-Einbindung)

## 12.6 Diagramme

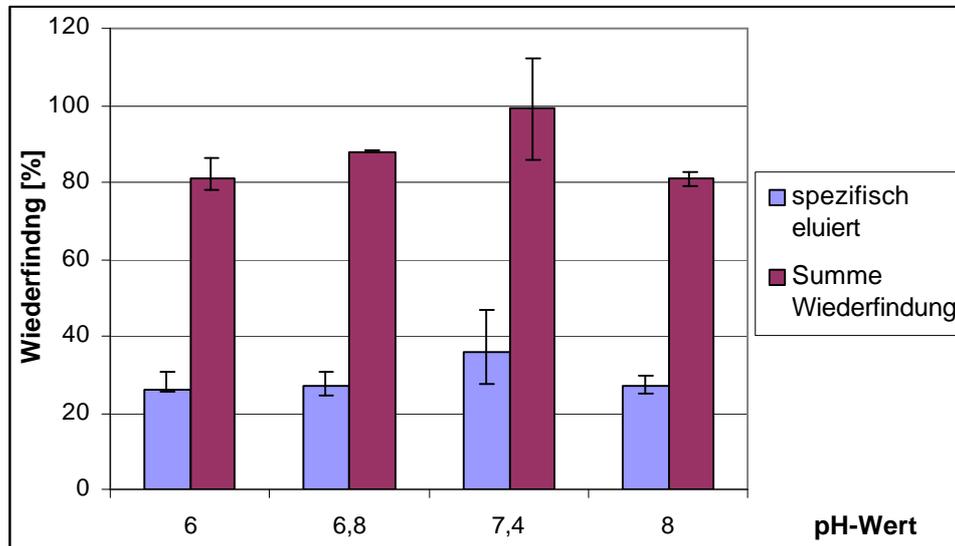


Abb. 12-7: Einfluß des pH-Wertes auf die Affinitätstrennung von Fetuin an WGA Agarose

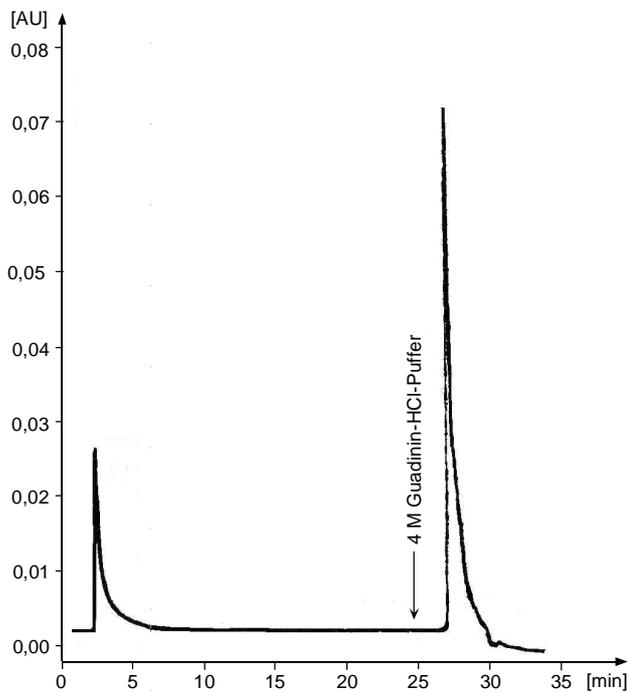


Abb. 12-8: Unspezifische Elution von Fetuin an WGA Toyopearl mit Guanidin-HCl

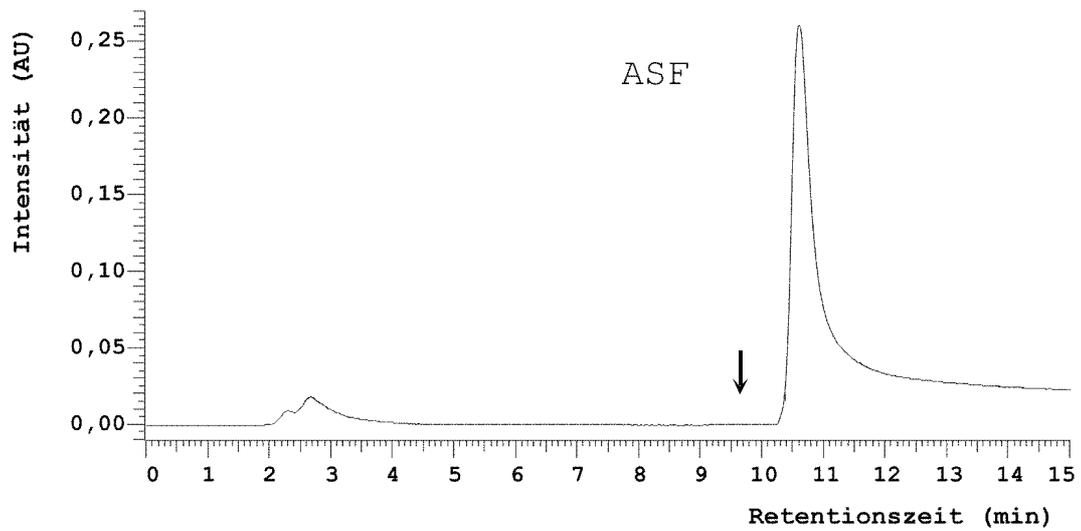


Abb. 12-9: HPLAC von Asialofetuin an RCA TSKgel

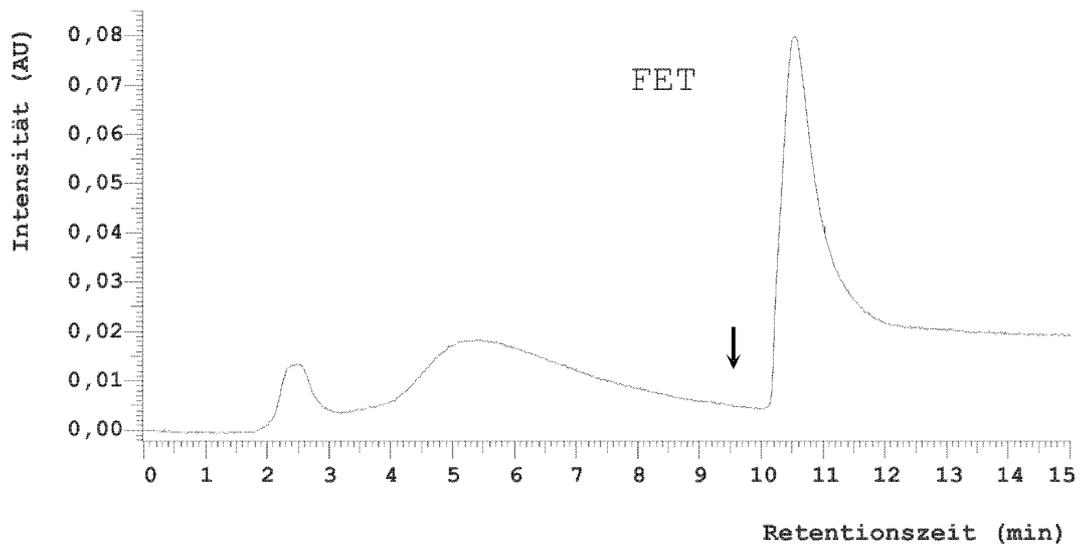


Abb. 12-10: Affinitätstrennung von Fetuin an RCA TSKgel

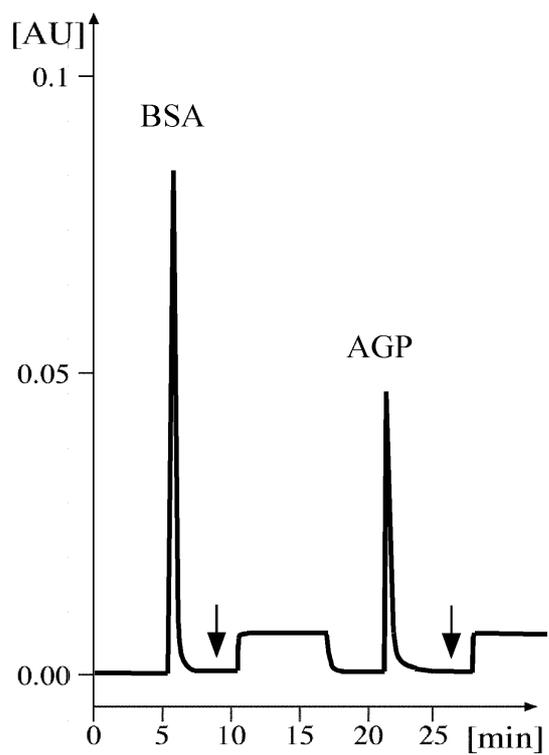


Abb. 12-11: Affinitätstrennung von AGP und BSA an WGA Toyopearl

## 12.7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Schematischer Aufbau einer eukaryontischen Zellmembran	2
Abb. 2-1: Prozeß der Affinitätstrennung (nach Turkova, 1993)	5
Abb. 2-2: Ricin, A- und B-Kette	11
Abb. 2-3: Schematische Darstellung eines immobilisierten Lektins	12
Abb. 3-1: Räumliche Struktur von Con A mit gebundenen Trimannosiden	14
Abb. 3-2: Von Con A gebundene Oligosaccharid-Strukturen (aus Cummings, 1997)	14
Abb. 3-3: Räumliche Struktur von WGA mit gebundenen Saccharidstrukturen von Sialopeptiden	16
Abb. 3-4: Core-Region der N-Glykane von Glykoproteinen	18
Abb. 3-5: Struktur eines triantennären N-Glykans von Asialofetuin	19
Abb. 3-6: Glucose Oxidase; hellblau: FAD, gelb: Trimannosid, grün: GlcNAc	21
Abb. 3-7: Struktur eines Galactocerebrosids (grau: N-Acyl-sphingosin, Ceramid)	22
Abb. 4-1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von XWP I005	26
Abb. 4-2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Toyopearl	28
Abb. 5-1: Wiederfindungen der analysierten Proteine	34
Abb. 5-2 : Waschbeständigkeit von immobilisiertem Con A	37
Abb. 6-1: Immobilisierung von Con A an einen tresylierten Silika-Träger	40
Abb. 6-2 : Kinetik der Immobilisierung für RCA	43
Abb. 6-3: Kinetik der Immobilisierung für Con A	43
Abb. 6-4: Einfluß des Angebots an RCA auf die Ausbeute der Immobilisierung und die Oberflächenbelegung	46
Abb. 6-5 Einfluß des Angebots an WGA auf die Ausbeute der Immobilisierung und die Oberflächenbelegung	47
Abb. 6-6: Einfluß der RCA-Konzentration auf die Ausbeute der Immobilisierung	48
Abb. 6-7: Einfluß der Pufferzusammensetzung auf die Ausbeute der Immobilisierung	49
Abb. 7-1: Adsorptionskinetik von Glucose Oxidase an Con A Adsorbentien	53
Abb.7-2: Adsorptionsisotherme an Con A Toyopearl	56

Abb. 7-3: Scatchard Plot der Adsorptionsisotherme an Con A Toyopearl	56
Abb. 7-4: Adsorptionsisotherme an Con A Silika	57
Abb. 7-5: Adsorptionsisotherme an Con A Agarose	58
Abb. 7-6: Trennsäule zur Niederdruck-Affinitätstrennung	59
Abb. 7-7: Affinitätstrennung von Asialofetuin an RCA Toyopearl	61
Abb. 7-8: Affinitätstrennung von Peroxidase an Con A Silika	61
Abb. 7-9: Affinitätstrennung von Fetuin an WGA Toyopearl	62
Abb. 7-10: Einfluß des pH-Wertes auf die Affinitätstrennung an RCA Toyopearl	63
Abb. 7-11: Einfluß des pH-Wertes auf die Affinitätstrennung an WGA Toyopearl	64
Abb. 7-12: Einfluß des pH-Wertes auf die Affinitätstrennung an Con A Toyopearl	65
Abb. 7-13: Fraktionierung von Fetuin an verschiedenen WGA Adsorbentien	68
Abb. 7-14: Fraktionierung von ASF an verschiedenen RCA Adsorbentien	69
Abb. 7-15: Ausnutzung der Bindungsstellen verschiedener WGA Adsorbentien	71
Abb. 7-16: Langzeitstabilität von RCA Adsorbentien	72
Abb. 7-17: Langzeitstabilität von Con A Adsorbentien	73
Abb. 7-18: Langzeitstabilität von WGA Adsorbentien	73
Abb. 7-19: Strukturspezifische Trennung von Sacchariden an RCA TSKgel	74
Abb. 7-20: Strukturspezifische Trennung von Sacchariden an RCA TSKgel mit Lactose-Gradient	75
Abb. 8-1: Affinitätstrennung von Glykoproteinen an WGA Agarose	77
Abb. 8-2: Affinitätstrennung von Glykoproteinen an Con A Toyopearl	79
Abb. 8-3: Affinitätstrennung von Ovomuroid mittels HPLAC an RCA TSKgel	79
Abb. 8-4: Affinitätstrennung von AGP mittels HPLAC an RCA TSKgel	80
Abb. 8-5: Aufreinigung von Peroxidase an Con A Silika	81
Abb. 8-6: Aufreinigung von Peroxidase an Con A Agarose	82
Abb. 8-7: Affinitätstrennung von BSA und AGP an RCA TSKgel	83
Abb. 8-8: Affinitätstrennung von FET, POD und Nitrophenyl-Sacchariden an SigmaChrom AF-Con A	84
Abb. 8-9: Affinitätstrennung von fetalem Rinderserum (FBS) an WGA Toyopearl	86
Abb. 8-10: SDS PAGE Analytik von fetalem Rinderserum und Serumproteinen	87
Abb. 8-11: Ausbeute der Aufreinigung von Fetuin aus Serum in Abhängigkeit von der Aufgabemenge	88

---

Abb. 8-12: Affinitätstrennung eines Glykolipid-Extraktes an RCA Toyopearl	89
Abb. 8-13: Dünnschichtchromatographie von Glykolipiden	90
Abb. 8-14: Dünnschichtchromatographie eines Glykolipid-Extraktes nach Affinitätstrennung an RCA Toyopearl	91
Abb. 9-1: Materialkosten für die Herstellung von 1 g RCA Toyopearl in Abhängigkeit von der Ligandendichte	94
Abb. 9-2: Materialkosten für die Herstellung von 1 g WGA Toyopearl in Abhängigkeit von der Ligandendichte	95
Abb. 12-1: Strukturen der einiger Monosaccharide	116
Abb. 12-2: Kalibrierfunktionen der Proteinbestimmung nach Bradford für ASF, BSA, Con A und RCA	124
Abb. 12-3: Reaktionsschema der Silanisierung mit GPtMS und Tressylierung eines Silikatträgers (ohne Spacer-Einbindung)	128
Abb. 12-4: Reaktionsschema der Silanisierung mit MPtMS und Tressylierung eines Silikatträgers (mit Spacer-Einbindung)	129
Abb. 12-5: Reaktionsschema der Tressylierung eines G60-H20 Trägers (ohne Spacer-Einbindung)	130
Abb. 12-6: Reaktionsschema der Tressylierung eines G60-H20 Trägers (mit Spacer-Einbindung)	131
Abb. 12-7: Einfluß des pH-Wertes auf die Affinitätstrennung von Fetuin an WGA Agarose	132
Abb. 12-8: Unspezifische Elution von Fetuin an WGA Toyopearl mit Guanidin-HCl	132
Abb. 12-9: HPLAC von Asialofetuin an RCA TSKgel	133
Abb. 12-10: Affinitätstrennung von Fetuin an RCA TSKgel	133
Abb. 12-11: Affinitätstrennung von AGP und BSA an WGA Toyopearl	134

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Simone Maria Cartellieri  
Geburtsdatum: 05.04.1973

### Schulausbildung

08.1979 - 07.1985 Grundschule und Orientierungstufe in Lemwerder  
08.1985 - 04.1992 Allgemeinbildendes Gymnasium Delmenhorst, Abschluß: Abitur

### Hochschulausbildung

04.1993 - 10.1997 Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Hamburg  
08.1996 - 05.1997 Diplomarbeit: „Methodenentwicklung zur Analytik von stickstoffhaltigen Polyaromaten in teerölkontaminierten Böden“  
14.10.1997 Abschluß des Studiums mit der Ersten Lebensmittelchemischen Staatsprüfung und dem Diplom in Lebensmittelchemie  
18.04.2002 Abschluß der Promotion: Disputation an der Universität Hamburg

### Berufstätigkeit

11.1997 - 08.1998 CSL Food Science Laboratory in Norwich, Großbritannien  
08.1998 – 02.1999 Forschungszentrum Borstel  
03.1999 – 02.2002 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im GKSS-Forschungszentrum Geesthacht GmbH. Anfertigung der Dissertation „Entwicklung eines biospezifischen Trennverfahrens für die Fraktionierung und Aufreinigung von Glykokonjugaten“