

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.