

**Vergleichende Untersuchungen
zur Struktur und Expression von Antikörpern
aus *Nicotiana benthamiana* und CHO-Zellen
zum Einsatz in der Krebstherapie**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Susanne Schmitz

aus

Bonn-Duisdorf

Bonn 2011

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Gutachter: Prof. Dr. Uwe Deppenmeier
2. Gutachterin: Priv. Doz. Dr. Gerhild van Echten-Deckert

Tag der Promotion: 22.03.2012

Erscheinungsjahr: 2012

1	Einleitung	1
1.1	Non-Hodgkin-Lymhome	1
1.2	Aufbau von Antikörpern	3
1.3	Therapeutische Antikörper	4
1.3.1	Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper	7
1.4	Plattformen zur Produktion rekombinanter Antikörper	9
1.4.1	Bakterielle Expressionssysteme	9
1.4.2	Säugerzellkultur	10
1.4.3	Pflanzen	10
1.5	Posttranslationale Modifikation von Antikörpern	11
1.5.1	Biosynthese von N-Glykanen	13
1.5.2	N-Glykane in Säugerzellen	14
1.5.3	N-Glykane in Pflanzenzellen	16
1.6	Neue Strategie zur Behandlung des follikulären B-Zell Lymphoms	17
1.6.1	Idiotyp-Vakzinierung	17
1.8	Fragestellung der Arbeit	21
2	Material und Methoden	22
2.1	Chemikalien und Puffer	22
2.1.1	Chemikalien	22
2.1.2	Fertigpuffer	22
2.1.3	Standards	23
2.1.4	Antikörper für Immunofärbung	23
2.1.5	Sonstige Materialien	23
2.2	Probenmaterial	24
2.2.1	Aufgereinigte idiotypische Antikörper ID1-ID7 aus <i>Nicotiana benthamiana</i>	24
2.2.2	Pflanzenmaterial von <i>Nicotiana benthamiana</i> ID2	26
2.2.3	Überstände aus der Fermentation von Antikörper exprimierenden CHO-Zellen	27
2.3	Probenvorbereitung	27
2.3.1	Präparation von gereinigten idiotypischen Antikörpern	27
2.3.2	Präparation von Pflanzenmaterial	27
2.3.3	Isolierung von Antikörpern aus dem Proteom von <i>Nicotiana benthamiana</i>	28
2.3.4	Präparation von Überständen aus der CHO-Zellkultur	29
2.4	Präzipitationsbasierte Proteinextraktion	29
2.4.1	Chloroform/Methanol-präzipitationsbasierte Proteinextraktion	29
2.4.2	TCA/Aceton präzipitationsbasierte Extraktion von Proteinen aus Blättern	29
2.5	Proteinkonzentrationsbestimmung	30

2.6	Elektrophorese	30
2.6.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	30
2.6.2	Erste Dimension der 2D-Elektrophorese – Isoelektrische Fokussierung	31
2.6.2.1	Immobiline DryStrip® 11 cm	31
2.6.2.2	Immobiline DryStrip® 18 cm	32
2.6.3	Äquilibrierung von Immobiline DryStrips®	33
2.6.4	Zweite Dimension der 2D-Elektrophorese - SDS-PAGE	33
2.6.4.1	Immobiline DryStrip® 11 cm	33
2.6.4.2	Immobiline DryStrip® 18 cm	33
2.7	Färbungen	34
2.7.1	Kolloidale Coomassiefärbung	34
2.7.2	Silberfärbung	34
2.8	Auswertung von 2D-Gelen	35
2.9	Immuno- und Lektinblotting	35
2.9.1	Western Blot	35
2.9.2	Immunofärbung	36
2.9.3	Lektinfärbung	36
2.10	Tryptisches „Peptide Mapping“ mit Massenspektrometrie	37
2.10.1	Ausstanzen von Spots	37
2.10.2	Trypsin-Spaltung	37
2.10.3	Messung von Peptiden	38
2.10.4	Prozessierung von LC/MS-ESI-Daten und Datenbanksuche	38
2.11	ESI-MS-Messungen von Antikörpern	39
3	Ergebnisse	40
3.1	Strukturanalysen von idiotypischen Antikörpern	40
3.1.1	Eindimensionale Elektrophorese - SDS-PAGE	40
3.1.2	Nachweis von Kappa Ketten	41
3.1.3	Identifikation der Banden	43
3.1.4	Nachweis von glykosylierten Ketten	44
3.1.5	Zweidimensionale Elektrophorese	46
3.1.6	Vergleich von leichten Ketten in der 2D-Elektrophorese	51
3.1.7	Massenspektrometrische Analyse von idiotypischen Antikörpern	52
3.1.7.1	Native massenspektrometrische Analyse von ID2	53
3.1.7.2	Posttranslationale Modifikationen von nicht-glykosylierten leichten Ketten	54
3.1.7.3	Glykan-Mikroheterogenität der leichten Ketten	58
3.2	Proteomikstudien	62

3.2.1	Vergleichende Proteomanalysen zu verschiedenen Tagen nach Infiltration	63
3.2.1.1	Proteomanalyse nach 2D-Elektrophorese im pH-Bereich 3-10	63
3.2.1.2	Proteomanalyse nach 2D-Elektrophorese im pH-Bereich 4-7	73
3.2.2	Vergleich der Antikörper-produzierenden Pflanze mit dem WT	78
3.2.3	Vergleichende Proteomanalysen von Überständen der CHO_MA1956-Zellkultur	80
3.2.3.1	Eindimensionale Analyse	80
3.2.3.2	Zweidimensionale Analyse	85
3.2.4	Stabilität von Antikörpern aus <i>N. benthamiana</i> und CHO-Zellen	94
3.2.5	Zeitabhängige Veränderung des Glykosylierungsmusters von Antikörpern aus Pflanzen- und CHO-Zellen	98
4	Diskussion	102
4.1	Strukturelle Analyse von idiotypischen Antikörpern	102
4.1.1	Charakterisierung der idiotypischen Antikörper nach eindimensionaler Elektrophorese	102
4.1.2	Charakterisierung nach zweidimensionaler Elektrophorese und der Einfluss von posttranslationalen Modifikationen	106
4.1.3	Glykan-Mikroheterogenität der leichten Ketten	111
4.2	Proteomikstudien	114
4.2.1	Akkumulation und Degradation des Antikörpers innerhalb des pflanzlichen Proteoms und Verbreitung der viralen Vektoren	114
4.2.2	Veränderung des Proteoms im Verlauf des Pflanzenwachstums	117
4.2.3	Proteomanalysen von Fermentationsüberständen der CHO_MA1956-Zellkultur	121
4.2.4	Veränderung des Glykosylierungsmusters von ID2 und MA1956	127
5	Zusammenfassung	131
6	Literaturverzeichnis	132
	Erklärung	141
	Danksagung	142

Abkürzungsverzeichnis

A

AA Aminosäure
ADCC Antibody dependent cell-mediated Cytotoxicity

B

BiP Immunoglobulin Binding Protein
BSA Bovines Serumalbumin

C

CDC Complement dependent Cytotoxicity
CDR Complementary Determing Regions
cDNA Copy Desoxyribonukleinsäure
CHO Chinese Hamster Ovary
CL Konstante Region leichte Kette
CP Coat Protein (Hüllprotein)
CH1 -CH3 Konstante Domänen 1-3 der schwere Kette

D

Da Dalton
DNS Desoxyribonukleinsäure
dpi Day post infiltration

E

et al. und andere
ER Endoplasmatisches Retikulum

F

Fab Fragment antigen-binding
Fc Fragment cristralline

G

Grp Glucose regulated protein

H

H₂ Dimer schwere Kette
HC Schwere Kette
HL Monomer aus einer schweren und einer leichten Kette
H₂L₁ Zwei schwere Ketten und eine leichte Kette
H₂L₂ Heterodimeres Antikörper-Molekül

I

Ig Immunoglobulin

K

kD Kilo Dalton
KLH Keyhole Limpet Hämocyanin

L

LC Leichte Kette
L₂ Dimer der leichten Kette

M

MAK Membrane Attack Complex
MP Movement Protein

N

NHL Non-Hodgkins-Lymphom

P

PDI Proteindisulfidisomerase

R

ROS Reaktive Sauerstoffspezies
RT Raumtemperatur

S

scFv Single chain variable fragment
slg Surface (Oberflächen-) Immunogloblin

T

TGB Triple Gene Block

W

WT Wildtyp

Monosaccharide und Oligosaccharide

Gal Galactose
GlcNAc N-Acetylglucosamin
G0(F) GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂(Fuc)
G1(F) GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂Gal(Fuc)
G2(F) GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂Gal₂(Fuc)
Fuc Fucose

Man-1-Man-9 GlcNAc₂Man₁ - GlcNAc₂Man₉
Xyl Xylose

1 Einleitung

1.1 Non-Hodgkin-Lymphome

Die malignen Lymphome werden in die zwei Hauptgruppen der Hodgkin-Lymphome und der Non-Hodgkin-Lymphome unterteilt. Der britische Arzt und Pathologe Thomas Hodgkin hat die lymphatischen Erkrankungen erstmals 1832 in seinem Artikel „On the morbid appearances of the Adsorbent Glands and Spleen“ (übersetzt: „Über die krankhaften Erscheinungen der absorbierenden Drüsen und der Milz“) beschrieben (Hodgkin, 1832). Während sich die Hodgkin-Lymphome im mikroskopischen Gewebebild durch das Auftreten von mehrkernigen Reed-Sternberg-Zellen auszeichnen, fehlen diese bei den Non-Hodgkin-Lymphomen. Daher werden alle malignen Lymphome, bei denen keine Reed-Sternberg-Zellen nachweisbar sind, als **Non-Hodgkin-Lymphome** oder kurz NHL bezeichnet.

Die NHL bilden eine sehr heterogene Gruppe von Tumorerkrankungen, bei denen sich die lymphatischen Zellen, bestehend aus B- und T-Zellen, unkontrolliert vermehren und in den Lymphknoten oder anderen Geweben ablagern. Die lymphatischen Zellen entstehen im Knochenmark aus den Stammzellen und durchlaufen verschiedene Entwicklungsstadien als Vorläuferzelle über Immunoblasten bis hin zu Lymphozyten. Da aus jeder Stufe des Reifungsprozesses einer B- oder T-Zelle ein NHL hervorgehen kann, verbergen sich nach heutigen Erkenntnissen etwa 40 verschiedene Arten von Lymphomen hinter dem Namen. Bei etwa 85 % der NHL handelt es sich um B-Zell-Lymphome, die klinisch in zwei allgemeine Kategorien unterteilt werden: die indolenten bzw. niedrigmalignen Lymphome, zu denen die langsam wachsenden follikulären Lymphome gehören, und die aggressiven bzw. hochmalignen Lymphome, zu denen die schnell wachsenden diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome gehören. Die aus verschiedenen Reifungsstadien einer B-Zelle hervorgehenden Lymphome sind in Abb. 1 dargestellt.

NHL machen 5 % aller Krebserkrankungen aus und sind die fünfthäufigste Todesursache bei Tumorerkrankungen. Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen lag im Jahre 2008 bei etwa 66000 in den USA, 70000 in Europa und etwa 14000 in Japan. In Deutschland ist die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen seit 2006 von 12760 auf etwa 13400 Fälle gestiegen (Robert Koch-Institut, 2010). Für die Hälfte aller Patienten endet die Krankheit innerhalb von 5-10 Jahren nach Diagnose tödlich.

Zu den weltweit zweithäufigsten Non-Hodgkin-Lymphomen gehören die follikulären Lymphome. Aufgrund des indolenten Verlaufs befinden sich Patienten bei der Erstdiagnose meist schon in einem späteren Stadium der Erkrankung und die Umwandlung in ein hochmalignes Lymphom, wie diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom, ist möglich. Diese gehören mit einer Verteilung von über 30 % zu den häufigsten Non-Hodgkin-Lymphomen.

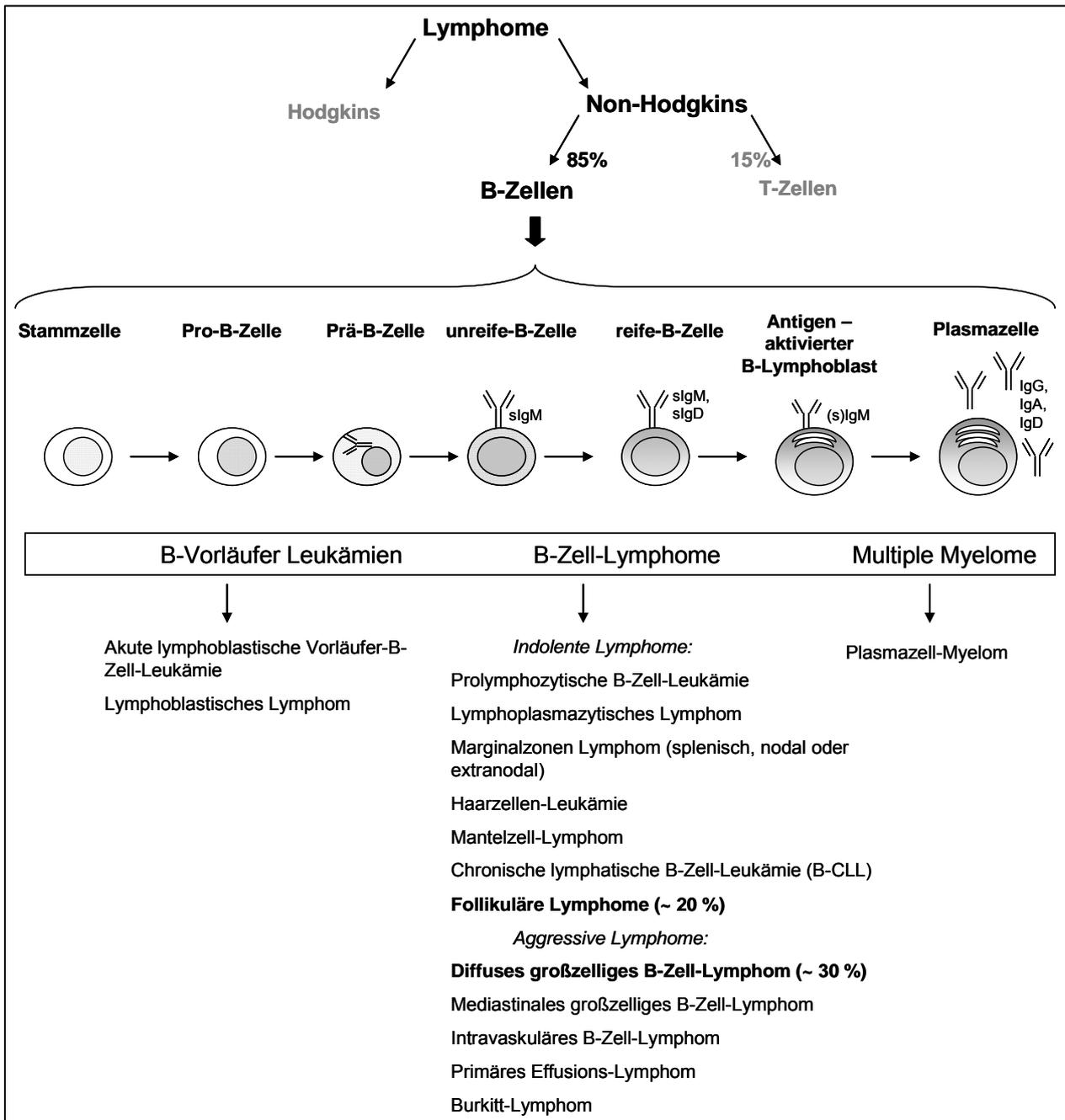


Abb. 1: Einteilung der B-Zell-Lymphome. Ausgehend von der zellulären Herkunft erfolgt die Einteilung der malignen Lymphome gemäß der im Jahre 2001 eingeführten WHO-Klassifikation. Die Einteilung nach einem indolenten oder aggressiven Verlauf ist ein weiterer wichtiger Eckpfeiler in der Klassifikation der Lymphome.

sIgM/D : **surface** Immunglobuline = Oberflächen-Immunglobuline

Quellen: (Stein, 2000 ; Ponz *et al.*, 2009 ; Pileri *et al.*, 2004 ; Coupland *et al.*, 2000)

Bei der Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen steht in der modernen Medizin, neben der herkömmlichen Strahlen- oder Chemotherapie, eine Immunbehandlung zur Verfügung. Dabei wird zwischen aktiver und passiver Immunbehandlung unterschieden. Bei der passiven Immunbehandlung werden monoklonale Antikörper verabreicht, die die Krebszellen gezielt vernichten sollen. Bei der aktiven Immunbehandlung soll das Immunsystem des

Patienten angeregt und die zytotoxischen T-Zellen aktiviert werden, damit es zu einer Lyse der Tumorzellen kommt. Eine Variante der aktiven Immuntherapie ist die Gabe von toten oder attenuierten Tumorzellen.

1.2 Aufbau von Antikörpern

Die Grundstruktur eines Antikörpers lässt sich anhand eines Immunglobulin G, welches im menschlichen Blut am häufigsten vorkommt, erklären.

Ein IgG besteht aus zwei identischen leichten und zwei identischen schweren Ketten, die über Disulfidbrücken zu einer Y-förmigen Struktur miteinander verbunden sind. Jede dieser Ketten besteht aus einer konstanten und einer variablen Region. Jeweils eine variable Region der leichten und eine variable Region der schweren Kette bilden gemeinsam eine Antigenbindestelle. Während die konstante Region der leichten Ketten nur aus einer konstanten Domäne C_L besteht, wird innerhalb der konstanten Region der schweren Kette zwischen drei Domänen C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} unterschieden. Nach proteolytischer Spaltung mit Papain bilden die C_{H1} Domäne und die variable Region V_H der schweren Kette zusammen mit einer leichten Kette ein Fab-Fragment (Fab = fragment antigen-binding). Die C_{H2} und C_{H3} Domänen der schweren Kette bilden ein leicht kristallisierbares Fc-Fragment (Fc = fragment cristalline), welches für die Komplementaktivierung und Bindung an zelluläre Rezeptoren verantwortlich ist.

Die leichte Kette eines IgG kann vom κ - oder λ -Typ sein. Die beiden Isotypen sind in ihrer Sequenz unterschiedlich zueinander, in ihrer Funktion jedoch identisch. Die schwere Kette eines IgG ist immer vom γ -Typ.

Andere Isotypen der schweren Kette, die die Struktur und Funktion des Antikörpers bestimmen, bestehen aus ϵ , δ , α , oder μ Ketten. Je nach Isotyp der schweren Kette handelt es sich um einen Antikörper der IgE-, IgD-, IgA- oder IgM-Klasse.

IgG hat in der C_{H2} Domäne der schweren Kette eine N-gebundene Kohlenhydratkette. Alle anderen Immunglobuline haben mindestens 5 N-gebundene Kohlenhydratketten, die sich über alle C_H -Domänen verteilen.

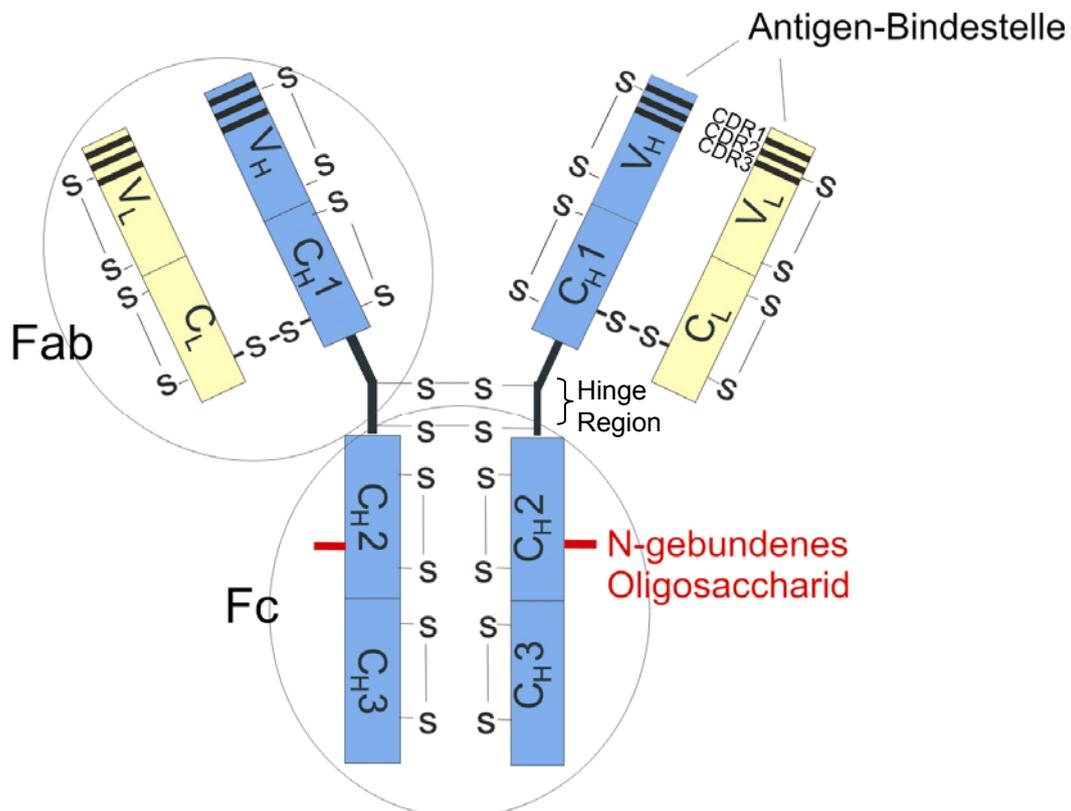


Abb. 2: Schematische Struktur eines IgG1 Antikörper-Moleküls

Die leichten Kette eines IgG-Moleküls, die vom κ - oder λ -Typ sein können, bestehen aus je einer variablen Domäne V_L und einer konstanten Domäne C_L . Die schweren Ketten sind vom γ -Typ und bestehen aus einer variablen Domäne V_H und drei konstanten Domänen C_{H1} - C_{H3} . Die CDR-Regionen in den variablen Regionen von jeweils einer leichten und einer schweren Kette bilden gemeinsam die Antigenbindestelle. Die leichten und schweren Ketten sind über jeweils eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. Die schweren Ketten sind in der flexiblen Hinge Region über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden. In der C_{H2} Domäne besitzen die schweren Ketten an einem konservierten Asparaginrest ein N-gebundenes Oligosaccharid.

1.3 Therapeutische Antikörper

Nach der Entdeckung der Antikörper durch von Behring und Kitasato (1890) wurde das therapeutische Potential von Antikörpern bereits 1908 von dem deutschen Nobelpreisträger Paul Ehrlich als „magic bullets“ beschrieben, welche gezielt Krebszellen und Bakterien erkennen und vom normalen Gewebe unterscheiden können (Ochsenbein, 2008). Ein Meilenstein wurde durch die Entwicklung der Hybridomatechnik durch Köhler und Milstein 1975 erreicht, die mittels dieser Technik die Herstellung von monoklonalen Antikörpern beschrieben. Der erste murine monoklonale Antikörper, der durch die „Food and Drug Administration“ (FDA) 1986 als therapeutischer Antikörper zugelassen wurde, richtete sich gegen den CD3-Rezeptor auf der Oberfläche von T-Lymphozyten zur Behandlung von akuten Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen. Mit der Entwicklung von zell- und molekularbiologischen Methoden, schritt in den folgenden Jahren auch die Entwicklung von monoklonalen Antikörpern voran. Der Durchbruch gelang allerdings erst mit der

Entwicklung eines chimären Antikörpers, bei dem lediglich der variable Teil muriner Herkunft und die konstante Region des Antikörpers humaner Herkunft waren. Diese Antikörpermoleküle ermöglichten erst eine nebenwirkungsarme Anwendung durch Reduktion allergischer Reaktionen und die Verhinderung der Bildung neutralisierender Antikörper (Truica et al., 2006). Nach diesem Prinzip wurde auch der seit 1997 zugelassene monoklonale anti-CD20 Antikörper Rituximab gegen die follikulären Lymphome entwickelt.

Um die Immunogenität weiter zu reduzieren und gleichzeitig die Kinetik zu steigern wurden später humanisierte und vollständig humane Antikörper in die Therapie eingeführt. Bei humanisierten Antikörpern sind alle Aminosäuresequenzen der Maus, bis auf die für die Antigenbildung verantwortlichen *Complementary Determing Regions* (CDR), durch humane Sequenzen ersetzt (Ochsenbein, 2008). Vollständig humane Antikörper können mittels Phage-Display oder transgener Mäuse hergestellt werden.

Dank einer einheitlichen Nomenklatur gibt der Name des Antikörpers Hinweise auf die Indikation und die Spezies, auf der die Sequenz des Antikörpers basiert (Tab.1).

Tab. 1: Nomenklatur monoklonaler Antikörper

Quelle: (World Health Organization, 2009)

Prefix	Mittelteil 1 / Target	Mittelteil 2 / Herkunft	Suffix
unter Berücksichtigung des Namens anderer Antikörper frei verfügbar	-ba- bacterial		
	-ci- cardiovascular		
	-fu- fungal		
	-ki- interleukin	-o- / murin	
	-li- immunomodulating	-zu- / humanisiert	-mab
	-ne- neural	-xi- / chimär	
	-so- bone	-u- / human	
	-tox- toxin		
	-tu- tumour		
-vi- viral			
Beispiel: Ri-tu-xi-mab			

Heute sind monoklonale Antikörper auf vielen Anwendungsgebieten etabliert oder befinden sich in der Entwicklungsphase. Mittlerweile handelt es sich dabei nicht mehr nur um einfache monoklonale Antikörper, sondern auch um Antikörperfragmente oder sogenannte Immunokonjugate, bei denen der Antikörper mit verschiedenen Substanzen gekoppelt ist. Einige in Deutschland zugelassene Antikörper, Antikörper-Fragmente und Immunokonjugate sind in Tab. 2 aufgeführt.

Tab. 2: In Deutschland zugelassene monoklonale Antikörper

Substanz	Indikation	Firma
Abciximab * ¹	Thrombozytenaggregationshemmer	Centocor Inc
Adalimumab	rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn	Abbott Laboratories
Alemtuzumab	NHL	Genzyme
Basiliximab	Abstoßungsreaktionen nach Nieren- und Lebertransplantationen	Novartis
Bevacizumab	Brustkrebs, Darm- und Lungenkrebs	Roche
Canakinumab	Cryopyrin-assoziiertes Periodisches Syndrom	Novartis Pharma
Catumaxomab	maligne Aszites	Fresenius Biotech
Cetuximab	Darmkrebs	Merck
Daclizumab	Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantationen, Multiple Sklerose	Hoffmann-La Roche
Eculizumab	paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie	Lonza
Efalizumab	Schuppenflechte	MerckSerono
Gatumaxomab	maligne Aszites	Fresenius Biotech
Gemtuzumab ozogamicin * ²	akute myeloische Leukämie	Wyeth
Golimumab	rheumatisch-entzündliche Erkrankungen, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	Centocor Inc
Ibritumomab-Tiuxetan * ²	B-Zell-Lymphome	Bayer Schering Pharma
Infliximab	Immunsuppressiva	Centocor Inc
¹³¹ I-Tositumomab * ²	B-NHL	GlaxoSmithKline
Natalizumab	Multiple Sklerose	Elan Pharma International Ltd
Muromonab-CD3	akute Abstoßungsreaktion nach Organtransplantationen	Janssen-Cilag
Ofatumumab	chronische lymphatische Leukämie	GlaxoSmithKline
Omalizuma	Asthma bronchiale	Novartis
Palivizumab	Prophylaxe von Respiratory-Syncytial-Virus (RSV)-Infektionen	MedImmune
Panitumumab	kolorektales Karzinom	Amgen
Ranibizumab	Makuladegeneration	Novartis
Rituximab	NHL	Roche
Trastuzumab	Brustkrebs, Magenkrebs	Roche
Tocilizumab	rheumatoide Arthritis	Hoffmann-La Roche
Ustekinumab	Psoriasis	Janssen-Cilag

¹ Fab-Fragment

² Immunokonjugat

1.3.1 Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper

Die in der Onkologie eingesetzten Antikörper binden mit hoher Spezifität an tumorassoziierte Antigene auf den Tumorzellen. Durch die Bindung des Antikörpers können verschiedene Reaktionsmechanismen in Gang gesetzt werden. Neben den direkten Wirkmechanismen, bei denen die therapeutischen Antikörper durch ihre Bindung an die tumorspezifischen Rezeptoren die Bindung von Wachstumsfaktoren oder die Zell-Zell-Interaktion blockieren und somit die Apoptose induzieren, können die Tumorzellen auch durch indirekte Wirkmechanismen, wie der Antikörper-abhängigen Zell vermittelten Zytotoxizität (ADCC = Antibody dependent cell-mediated Cytotoxicity) oder der komplement-abhängigen Zytotoxizität (CDC = Complement dependent Cytotoxicity), zerstört werden.

Der gegen das Non-Hodgkin-Lymphom zugelassene Antikörper Rituximab ist gegen den CD20-Rezeptor gerichtet, der innerhalb des Reifungsprozesses einer B-Zelle ab der Prä-B Zelle bis hin zur reifen B-Zelle auf dessen Oberfläche gebildet wird. Der genaue Wirkmechanismus von Rituximab ist noch nicht vollständig geklärt, scheint aber sowohl direkte als auch indirekte Reaktionen auszulösen (Abb. 3).

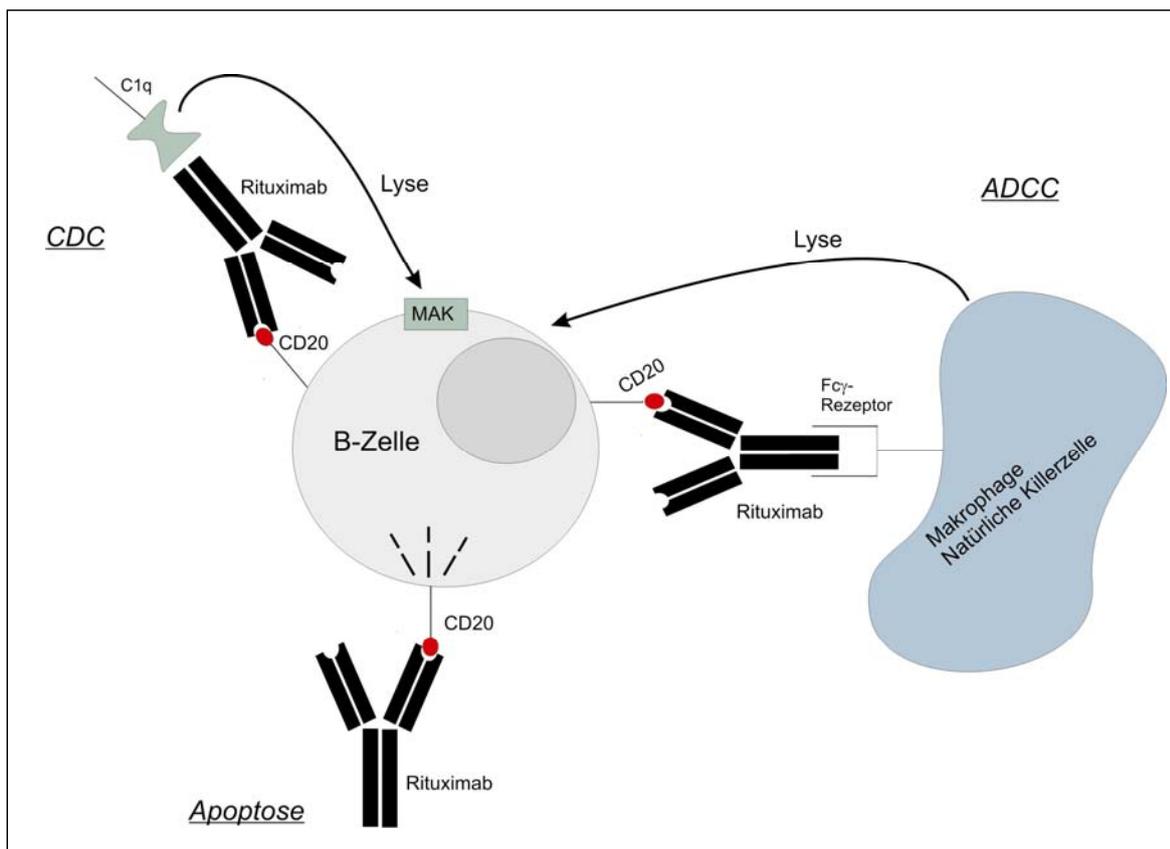


Abb. 3: Wirkmechanismen von Rituximab

Durch die Bindung von Rituximab an den CD20-Rezeptor auf den B-Zellen soll zum einen die intrazelluläre Signaltransduktion geändert und somit der intrinsische Apoptosesignalweg induziert werden (direkter Wirkmechanismus) (Pedersen *et al.*, 2002). Zum anderen sollen Effektorzellen, wie natürliche Killerzellen oder Makrophagen, den Fc-Teil des gebundenen Antikörpers erkennen und einen Lyse-Mechanismus auslösen (ADCC) (Fischer, 2006). Ein möglicher dritter Wirkmechanismus von Rituximab ist die Induktion der CDC, bei dem das Fc-Fragment von Rituximab von der Komplementkomponente C1q erkannt wird (Di Gaetano, 2003). Dadurch wird der sogenannte „Membrane Attack Complex“ (MAK) aktiviert, der die Lyse der Tumorzelle vermittelt.

Um die Effizienz monoklonaler Antikörper zu steigern, können diese auch mit verschiedenen Substanzen beladen werden, sodass sogenannte Immunokonjugate entstehen. Bei der Behandlung mit Immunokonjugaten wird die hohe Spezifität des Antikörpers ausgenutzt, um zytotoxische Wirkstoffe direkt und in höherer lokaler Konzentration zum Tumorgewebe zu bringen, während gesunde Zellen verschont bleiben (Ludwig *et al.*, 2003). So ist zum Beispiel bekannt, dass bei Nierenzellkarzinomen ein bestimmtes Isoenzym der Carboanhydrase gebildet wird, was bei gesunden Zellen nicht der Fall ist. Die Kopplung eines Antikörpers gegen das Isoenzym der Carboanhydrase an ein Konjugat führt zur gezielten Adressierung des zytotoxischen Wirkstoffes an die Tumorzellen. Bei den an den Antikörper gehängten Substanzen kann es sich um Toxine, radioaktive Substanzen, Enzyme oder Zytokine handeln.

Zur Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen werden die Radio-Immunokonjugate Ibritumomab-Tiuxetan und Tositumomab eingesetzt. Beide sind gegen den CD20-Rezeptor gerichtet und an die Radioisotope ⁹⁰Ytrium und ¹³¹Iod gekoppelt (Witzig *et al.*, 1999; Vose *et al.*, 2000). Da der CD20-Rezeptor jedoch nicht nur auf den malignen B-Zellen gebildet wird, werden neben diesen auch die gesunden B-Zellen zerstört.

Ein sogenanntes Antikörper-Drug-Konjugat ist das sich in Phase 3 befindende Inotuzumab-Ozogamicin zur Behandlung von akuten lymphatischen Leukämien (NHL-Subtyp). Der Antikörper richtet sich gegen den CD22-Rezeptor und ist an den zytotoxischen Wirkstoff Calicheamicin gekoppelt, der als Antibiotika Strangbrüche in der DNS induziert und somit die Apoptose der Zielzelle auslöst. Auch der CD22-Rezeptor wird sowohl auf der Oberfläche von malignen als auch auf gesunden B-Zellen gebildet.

1.4 Plattformen zur Produktion rekombinanter Antikörper

Die Produktion von Biopharmazeutika kann in verschiedenen Expressionssystemen erfolgen. Dazu gehören neben den tierischen und mikrobiellen auch die pflanzlichen Produktionsplattformen. Welches für das jeweilige Produkt das erfolgversprechendste ist, hängt neben der Frage, ob ein kompletter Antikörper oder lediglich ein Antikörperfragment hergestellt werden soll, von vielen Faktoren ab:

- korrekte Faltung und Glykosylierung
- Reproduzierbarkeit des Verfahrens
- einfache Handhabung
- hohe Ertragsausbeute
- genetisch und biochemisch charakterisiertes System
- hohe Entwicklungsgeschwindigkeit
- Viren- und Pathogenfreiheit
- standardisierte Reinigung
- niedrige Produktionskosten
- definierter Up- und Downstream Prozess

1.4.1 Bakterielle Expressionssysteme

Der Einsatz von mikrobiellen Expressionssystemen ist aufgrund der fehlenden Glykosylierungsmaschinerie nur dann sinnvoll, wenn lediglich ein kleines Antikörperfragment ohne Effektorfunktion oder mit eingeschränkter pharmakokinetischer Aktivität, wie ein scFv (single chain variable fragment)- oder Fab (fragment antigen binding)-Fragment, bevorzugt wird (Chadd und Chamow, 2001). Ein scFv-Fragment besteht lediglich aus den variablen Regionen eines Antikörpers, die über einen Linker miteinander verbunden sind. Ein Fab-Fragment besteht zusätzlich zu den variablen Regionen aus jeweils einer konstanten Domäne der leichten und schweren Kette.

Trotz der geringen Größe und Komplexität der Fragmente stellt deren korrekte funktionelle Faltung und die Ausbildung der Disulfidbrücken in bakteriellen Systemen ein Problem dar. Nur die Chaperone im periplasmatischen Raum sorgen für eine korrekte Faltung, sodass die Fragmente mit einem Signalpeptid für die Sekretion in den periplasmatischen Raum versehen werden müssen. Ansonsten befinden sich im Periplasma jedoch nur wenig weitere Proteine, was die Aufreinigung der Antikörper-Fragmente aus dem Periplasma erleichtert.

1.4.2 Säugerzellkultur

Trotz hoher Produktions- und Medienkosten sind Säugerzellen aufgrund ihrer Fähigkeit, monoklonale Antikörper mit der erwünschten Faltung und posttranslationalen Modifikation zu bilden, die häufigste verwendete Produktionsplattform. Zu den verwendeten Zelllinien gehören die NS0-Zellen und SP2/0-Zellen muriner Herkunft, sowie die Ovarenzellen des chinesischen Hamsters (CHO = Chinese Hamster Ovary). Etwa 70 % aller rekombinant hergestellten Proteinpharmazeutika werden mittlerweile in CHO-Zellen hergestellt. Diese gelten als sehr anpassungsfähig und können in sehr hoher Zelldichte in Fermentern mit einem Fassungsvermögen von bis zu 10000 L wachsen. Durch eine verbesserte Prozesstechnik und damit verbundene höhere Zelldichten (bis zu 10 Mio Zellen/ml) haben sich die Ausbeuten seit dem ersten pharmazeutischen Protein (t-PA von Genentech, 1986), dass in CHO-Zellen produziert wurde, rasant erhöht. Damals lagen diese noch bei 50 mg/l, 2005 waren es bis zu 4,7 g/l (rekombinanter Antikörper, Lonza) (Voedisch *et al.*, 2005), wobei die Expression jedoch stark von der Proteinstruktur abhängt.

Ein Nachteil ist jedoch der große Zeitaufwand für die Entwicklung einer neuen Zelllinie für die Produktion eines neuen Wirkstoffes. Dieser nimmt, trotz der Etablierung des Systems mehrere Monate in Anspruch.

1.4.3 Pflanzen

Seit der ersten Expression eines funktionellen Antikörpers in Tabak durch Hiatt *et al.* (1989) und Düring *et al.* (1990) werden auch andere Pflanzenarten, wie Mais, Arabidopsis, Tomate oder Soja als „pflanzliche Bioreaktoren“ verwendet.

Aufgrund der Tatsache, dass der pflanzliche sekretorische Pathway zur Faltung, Assemblierung und zum Transport von rekombinanten Pharmazeutika geeignet ist (Frigerio *et al.* 2000) stellen sie im Hinblick auf die steigende Nachfrage an therapeutischen Antikörpern eine kostengünstige Alternative dar. Sie sind in der Lage große Mengen an Protein in kurzer Zeit zu produzieren, denn das System kann durch die Kultivierung zusätzlicher Pflanzen einfach erweitert werden. Daneben stellen Pflanzen ein sicheres System dar, denn die Gefahr der Kontamination durch tierische oder humane Pathogene bzw. Toxine ist gering.

Es stehen zwei Methoden zur Expression von Antikörpern in Pflanzen zur Verfügung: die transgene oder transiente Expression.

Die Entwicklung von stabilen transgenen Pflanzen ist zeitaufwendig und eignet sich für die Herstellung rekombinanter Proteine oder monoklonaler Antikörper. Für die schnelle Produktion von Proben für präklinische Studien ist die Expression in transgenen Pflanzen

allerdings nicht praktikabel (Huang, 2010), da deren Entwicklung mehrere Monate in Anspruch nimmt.

Der Einsatz von viralen Vektoren für die transiente Expression von therapeutischen Proteinen ist dagegen ein nützliches Werkzeug für die schnelle Produktion von vielen verschiedenen Proteinen. Nach dieser Methode wurden in *Nicotiana tabacum* bereits sogenannte „single chain variable fragments“ (scFv), die nur die variablen Domänen der leichten und schweren Kette, aber keine konstanten Domänen enthielten, hergestellt (McCormick *et al.*, 2008). Die Tatsache, dass Viren nicht die Fähigkeit zum Transport von langen Polypeptiden besitzen, machte die transiente Expression von vollständigen IgG-Molekülen bisher nicht möglich.

Eine durch Icon Genetics (Halle, Deutschland) entwickelte Methode, die als „Magniffection Technology“ bezeichnet wird, überwindet die bisher aufgetretenen Probleme der geringen Infektiosität von Viren und deren Unfähigkeit lange Polypeptide zu transportieren, indem es sich zweier nicht kompetitiver Vektoren für die Coexpression der leichten und schweren Kette und der wirksamen systemischen Mechanismen des *Agrobacterium tumefaciens* zum Einschleusen von DNS bedient (Giritch *et al.*, 2006). Die Methode stellt mit der Entwicklung vom Gen bis zum vollständig funktionellen Antikörper innerhalb von 14 Tagen im Vergleich mit anderen Expressionssystemen einen „neuen Schnelligkeits-Rekord“ auf und in Bezug auf die Menge an produziertem Antikörper (0,5 g/kg Blätter) kann diese sogar noch durch Optimierung gesteigert werden (Hiatt und Pauly, 2006).

Tab. 3: Vergleich der verschiedenen Expressionssysteme

Quelle: Hiatt und Pauly, 2006

Expressionssystem	Zeit für mg-Mengen Antikörper	Zeit für g-Mengen Antikörper
Säugerzellen	2-6 Monate	6-12 Monate
Transgene Tiere	> 12 Monate	> 12 Monate
Stabile transgene Pflanzen	12 Monate	> 24 Monate
Magniffection	14 Tage	14-20 Tage

1.5 Posttranslationale Modifikation von Antikörpern

Die posttranslationalen Modifikationen beeinflussen die pharmakokinetischen Eigenschaften, Wirksamkeit, Stabilität und das immunogenische Potential eines therapeutischen Proteins.

Es sind verschiedene chemische Modifikationen von Antikörpern, wie Oxidation, Alkylierung, Zyklisierung, Deamidierung, Isomerisation und proteolytische Spaltung in der Literatur beschrieben, die zum einen eine große Heterogenität hervorrufen und zum anderen die biologische Aktivität des Antikörpers abhängig von der Lokalisation mehr oder weniger beeinflussen können.

Zu den häufigsten posttranslationalen Modifikationen von rekombinanten Antikörpern zählen die Glykosylierung, C-terminale Prozessierung von Lysin und die Bildung von Pyroglutaminsäure aus N-terminalem Glutamin. Während die C-terminale Prozessierung von Lysin der schweren Ketten lediglich eine Ladungs-Heterogenität hervorruft (Harris *et al.* 2001) und keinen Einfluss auf die Stabilität des Antikörpers hat (Liu *et al.*, 2006), scheint die Bildung von Pyroglutaminsäure aus N-terminalem Glutamin eine Rolle in der Stabilität des Antikörpers zu spielen, indem es vor chemischem oder enzymatischem Abbau schützt.

Ein besonderer Fokus liegt auf der Glykosylierung am Asparagin 297 in der Fc-Region der schweren Kette, da diese für die Interaktion mit dem Fc-Rezeptor und somit für die Vermittlung einer Effektor-Funktion essentiell ist. Shinkawa *et al.* (2003) konnten zeigen, dass die Abwesenheit von Fucose oder die Anwesenheit von bisecting N-Acetylglucosamin die Bindung an den Fc γ -Rezeptor positiv beeinflussen und die ADCC verbessern.

Zusätzlich zu der konservierten Glykosylierungsstelle am Asparagin 297, können Antikörper auch N-gebundene Oligosaccharide innerhalb der variablen Region besitzen, wenn die Konsensussequenzen Asn-X-Thr/Ser (X kann jede Aminosäure außer Prolin sein) vorhanden sind. Der Einfluss dieser Glykosylierung auf die Wirkung des monoklonalen Antikörpers ist noch wenig untersucht.

Einen positiven Einfluss hat die Glykosylierung am Asparagin 297 auf die Stabilität des Antikörpers und die Löslichkeit von ungefalteten Proteinintermediaten, wodurch eine mögliche Aggregation verringert wird (Wen *et al.*, 2011). In Bezug auf die Beeinflussung der Serum-Halbwertszeit durch die Glykosylierung gibt es widersprüchliche Aussagen. Während Untersuchungen zeigten, dass die Serum-Halbwertszeit von rekombinanten Antikörpern ähnlich den von aglykosylierten Antikörpern in Mäusen ist, gibt es dagegen auch Hinweise auf eine schnellere Eliminierung von aglykosylierten Antikörpern (Tao und Morrison, 1989). Glykosylierungen sind abhängig vom Expressionssystem und weisen je nach Produktionsplattform mehr oder minder große Unterschiede zu humanen Glykosylierungsmustern auf. Dies kann bei einer Behandlung zu allergischen und/oder immunogenischen Reaktionen führen.

1.5.1 Biosynthese von N-Glykanen

Alle N-gebundenen Oligosaccharide haben eine Kernstruktur bestehend aus zwei N-Acetylglucosaminen und drei Mannoseresten (Man-3 Glykan), gemeinsam und werden in drei Typen unterteilt: High-Mannose Oligosaccharide, hybride Oligosaccharide und komplexe Oligosaccharide. Diese entstehen während des Transportes des glykosylierten Polypeptides entlang des sekretorischen Pathways durch Abspalten und Anfügen von Monosacchariden.

Die Biosynthese von N-Glykanen ist in Abb. 4 dargestellt. Sie ist in Pflanzen und Säugerzellen in der Anfangsphase identisch und beginnt auf der cytosolischen Seite des ER (Endoplasmatisches Retikulum) mit der Bindung von 7 Zuckern (Man₅GlcNAc₂ = Man-5 Glykan) an das in der Membran lokalisierte Trägermolekül Dolicholpyrophosphat (Stanley *et al.* 2009). Man₅GlcNAc₂-PP-Dolichol wird mit Hilfe der Flippase durch die Membran in das ER-Lumen übertragen, wo weitere 4 Mannosen und 3 Glukosen angehängt werden (Stanley *et al.* 2009). Das Vorläufer-Glykan wird durch die Oligosaccharyltransferase auf einen Asparaginrest innerhalb der Konsensussequenz Asn-X-Thr/Ser des Polypeptids übertragen. Noch im ER und weiter im *cis*-Golgi wird das Vorläufer-Glykan durch die Entfernung von Glukose- und Mannoseresten getrimmt. Dadurch entstehen verschiedene High-Mannose Strukturen. Durch das Anhängen von N-Acetylglucosaminen (GlcNAc) mit Hilfe von Glykosyltransferasen und das weitere Abspalten von Mannoseresten entsteht im *medial*-Golgi neben verschiedenen hybriden Oligosacchariden auch die sogenannte G₀-Struktur (Abb. 5). Diese stellt das Grundgerüst für die komplexen Oligosaccharide dar und besteht aus der Kernstruktur mit zwei angehängten GlcNAcs, wobei G₀ die Tatsache beschreibt, dass null Galactosereste gebunden sind.

Ausgehend von G₀ erfolgt die Reifung der Oligosaccharide zu komplexen Strukturen im *trans*-Golgi in 3 Schritten:

1. Anhängen von Monosacchariden an den Kern
2. Verlängerung der terminalen N-Acetylglucosamine
3. *capping* oder *decoration* der verlängerten Zweige

Sie ist aufgrund von verschiedenen Monosaccharidbausteinen in Säuger- und Pflanzenzellen unterschiedlich.

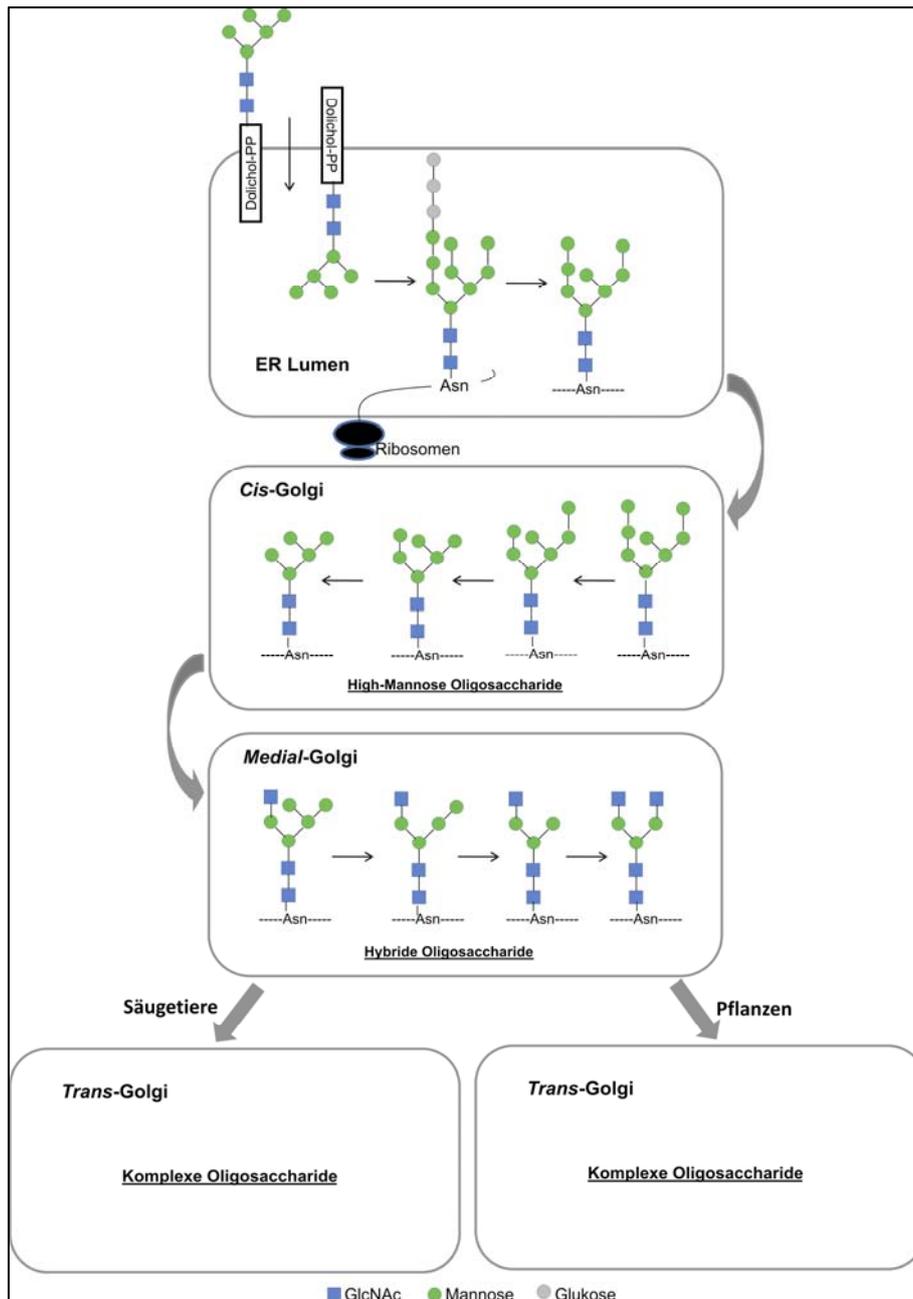


Abb. 4: Biosynthese von N-Glykanen in Säugerzellen und Pflanzenzellen

1.5.2 N-Glykane in Säugerzellen

Ausgehend von der G₀-Struktur werden im *trans*-Golgi die komplexen Oligosaccharide durch Anhängen von Monosacchariden gebildet. Die Hauptstrukturen G₀(F), G₁(F) und G₂(F) sind in allen Säugerzellen, auch in humanen Zellen, gleich (Abb. 5). Das Verhältnis der Hauptstrukturen zueinander ist jedoch individuell unterschiedlich und hängt sowohl vom Organismus als auch von den Kultivierungsbedingungen ab.

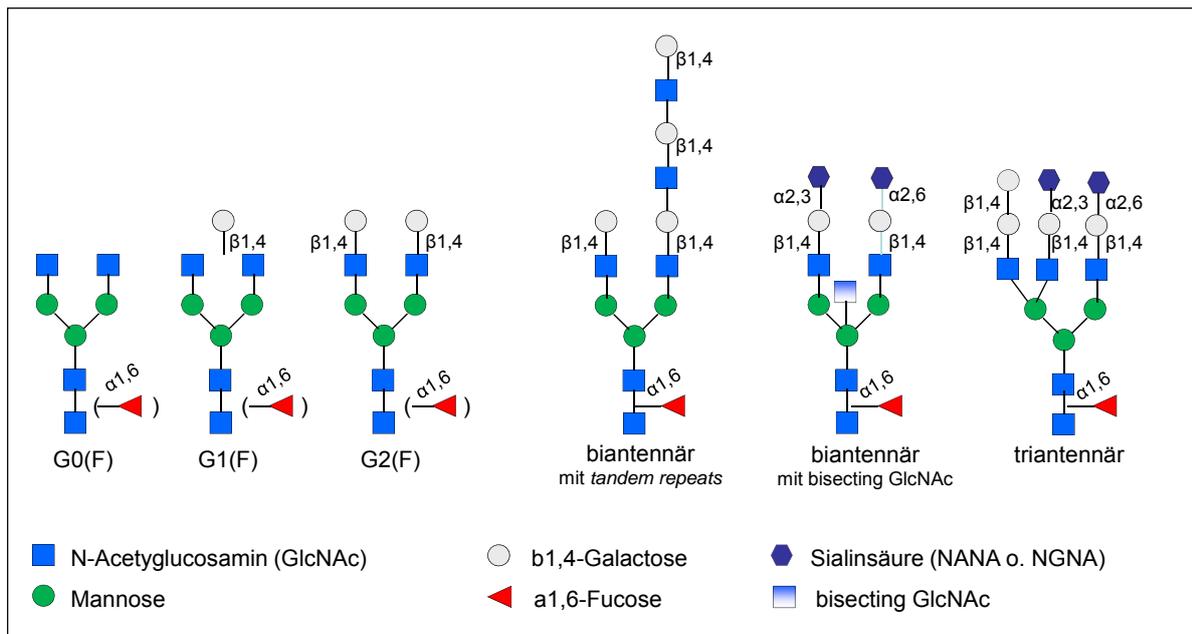


Abb. 5: Komplexe Oligosaccharidstrukturen in Säugetierzellen

Die Reifung zu komplexen Oligosacchariden erfolgt im *trans*-Golgi durch das Anhängen von Monosacchariden an die G0-Struktur. Durch ein oder zwei zusätzliche Galactosen am endständigen GlcNAc entstehen G1 und G2. Die Fucosylierung von G0, G1 und G2 führt zu G0F, G1F und G2F. Weitere bi- oder triantennäre Oligosaccharide entstehen durch das Anhängen von GlcNAcs, Galactosen und Sialinsäuren

An die Hauptstrukturen können zum einen Wiederholungen aus N-Acetylglucosamin und Galactosen angehängt werden, sodass sogenannte Antennen entstehen (tandem repeats). Zum anderen kann die Bildung weitaus komplexerer Strukturen durch das Anhängen weiterer Monosaccharide, wie Sialinsäure, Fucose oder Galactose und einem bisecting GlcNAc an die Kern-Mannose erfolgen. So können unterschiedliche bi- oder triantennäre Oligosaccharidstrukturen entstehen, die zu einer großen Mikroheterogenität der N-gebundenen Oligosaccharidstrukturen eines Proteins führen.

Die angehängten Monosaccharide können sich auch innerhalb der Säugetiere von Art zu Art unterscheiden. So ist bekannt, dass die murinen Zelllinien NS0 und SP2/0 eine extra $\beta 1,3$ -gebundene Galactose an die terminale Galactose und die N-Glykylneuraminsäure (NGNA) statt der N-Acetylneuraminsäure (NANA) anhängen (Raju, 2003; Chartrain *et al.*, 2008). Da sowohl die $\beta 1,3$ -Galactose als auch die N-Glykylneuraminsäure in humanen Oligosacchariden nicht vorkommen, stehen sie im Verdacht allergisches und/oder immunogenes Potential zu besitzen.

Die am häufigsten zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern verwendeten Säugerzellen sind CHO-Zellen. Diese produzieren hauptsächlich Antikörper mit komplexen $\alpha 1,6$ -fucosylierten biantennären Oligosacchariden (G0F-G2F) und sind daher den humanen N-gebundenen Oligosaccharidstrukturen am ähnlichsten. Daneben können CHO-Zellen aber auch Glykane mit $\alpha 2,3$ -gebundenen Sialinsäure-Resten bilden (Raju, 2003; Chartrain *et al.*, 2008), während diese in humanen Oligosacchariden $\alpha 2,6$ -gebunden vorliegen. Die Mengen

dieser nagerspezifischen Oligosaccharide sind zwar sehr gering, haben aber immunogenes Potential und könnten auch allergische Reaktionen beim Patienten auslösen. Dies wird stets in klinischen und toxikologischen Untersuchungen eingehend geprüft.

1.5.3 N-Glykane in Pflanzenzellen

Die komplexen N-Glykane der Pflanzen werden wie bei allen Eukaryoten ausgehend von der G0-Struktur gebildet und sind durch die α 1,3-Fucose und β 1,2-Xylose gekennzeichnet (Abb. 6). Während die Fucose in Säugerzellen α 1,6-glykosidisch an das proximale N-Acetylglucosamin der Kernstruktur gehängt wird, kann sie bei Pflanzen α 1,3-glykosidisch an das proximale oder α 1,4-glykosidisch an das terminale N-Acetylglucosamin gehängt werden. Die β 1,4-Galactose und Sialinsäure am terminalen N-Acetylglucosamin oder das positiv auf die ADCC wirkende bisecting GlcNAc kommen bei komplexen pflanzlichen N-Glykanen nicht vor, stattdessen aber die β 1,3-Galactose. Pflanzen-Glykane sind weniger komplex, als die der Säugerzellen, und die als Lewis A-Formation bezeichnete Struktur mit β 1,4-Galactose und α 1,4-Fucose am terminalen N-Acetylglucosamin ist in Pflanzen die einzig bekannte „outer-chain elongation“ von komplexen Oligosacchariden (Strasser *et al.*, 2007). Dagegen bilden Pflanzen eine größere Menge unterschiedlicher High-Mannose Oligosacchariden.

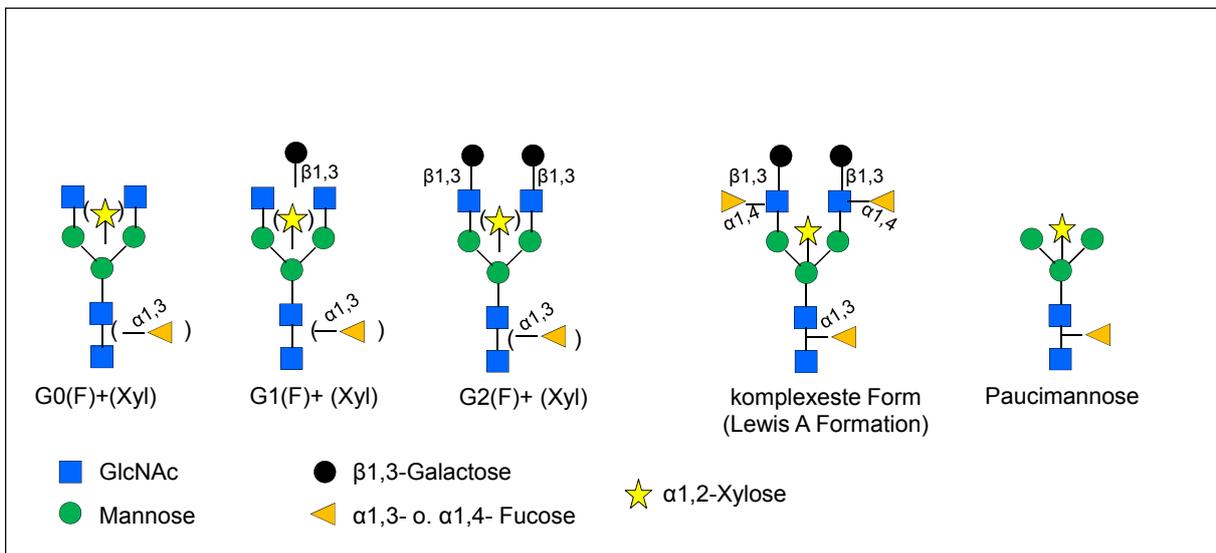


Abb. 6: Komplexe Oligosaccharidstrukturen in Pflanzenzellen

Die Reifung zu komplexen Oligosacchariden erfolgt im *trans*-Golgi durch das Anhängen von Monosacchariden an die G0-Struktur. Durch ein oder zwei zusätzliche Galactosen am endständigen GlcNAc entstehen G1 und G2. Die Fucosylierung von G0, G1 und G2 führt zu G0F, G1F und G2F. Eine weitere Modifikation stellt das Anhängen der pflanzenspezifischen Xylose an die unfucosylierten (G0-G2 + Xylose) oder bereits fucosylierten (G0F-G2F + Xylose) Hauptstrukturen dar. Die komplexeste Oligosaccharidstruktur in Pflanzen wird als Lewis A Formation bezeichnet und zeichnet sich durch zwei zusätzliche Fucose an den endständigen GlcNAcs aus. Die paucimannosidischen Formen zeichnen sich dagegen durch Fucose und/oder Xylose am Kern und das Fehlen der endständigen GlcNAcs aus.

Die Vakuole ist bei Pflanzen Teil des sekretorischen Pathways und viele vakuolische Glyko-Proteine besitzen eine besondere, wenig komplexe Oligosaccharidstruktur: die Paucimannose. Diese einfache Struktur zeichnet sich durch das Fehlen der endständigen GlcNAcs bei gleichzeitiger Anwesenheit der α 1,3-Fucose und β 1,2-Xylose aus. Sie lässt darauf schließen, dass komplexe Oligosaccharide auf dem Weg zur oder in der Vakuole getrimmt werden (Fitchette *et al.*, 1999), denn ein Anhängen der α 1,3-Fucose und β 1,2-Xylose im Golgi-Apparat erfordert die Anwesenheit der endständigen GlcNAcs.

1.6 Neue Strategie zur Behandlung des folliculären B-Zell-Lymphoms

Die konventionellen Methoden zur Behandlung maligner Lymphome, wie Chemo- und Strahlentherapie, führen nur zu unterschiedlich langen progressionsfreien Zeiten. Meist fangen die entarteten B-Zellen erneut an, sich unkontrolliert zu vermehren. Für die passive Immuntherapie mit Rituximab, besonders in Kombination mit vorheriger Chemotherapie, sind deutlich längere progressionsfreie Zeiten bestätigt. Trotzdem kommt es bei einem Teil der Patienten nach Therapie-Ende zu einem Rückfall. Aufgrund der murinen Herkunft, die bei den Patienten zur Bildung von Anti-Maus-Antikörpern und dadurch zum Abbau von Rituximab führt, kann keine erneute Therapie mit Rituximab erfolgen. Etwa 20-30 % aller B-NHL Patienten sprechen aufgrund von primären Resistenzen überhaupt nicht auf die Therapie mit Rituximab an.

Die sogenannte Idiotyp-Vakzinierung scheint als Form der aktiven Immuntherapie eine vielversprechende und nebenwirkungsarme Methode, um bei Patienten nach erfolgreicher Chemotherapie einen Rückfall zu verhindern.

1.6.1 Idiotyp-Vakzinierung

Die hypervariablen Regionen eines Immunoglobulins besitzen neben dem Paratop, das für das Erkennen eines komplementären Epitops verantwortlich ist, Erkennungssequenzen für andere Antikörper. Diese werden auch als Idiotope bezeichnet (Abb. 7). Demnach kann ein Antikörper sowohl andere Epitope erkennen, als auch als Epitop von anderen Antikörpern erkannt werden und eine Immunreaktion auslösen. Die Gesamtheit der hypervariablen Regionen eines Antikörpers wird als Idiotyp bezeichnet.

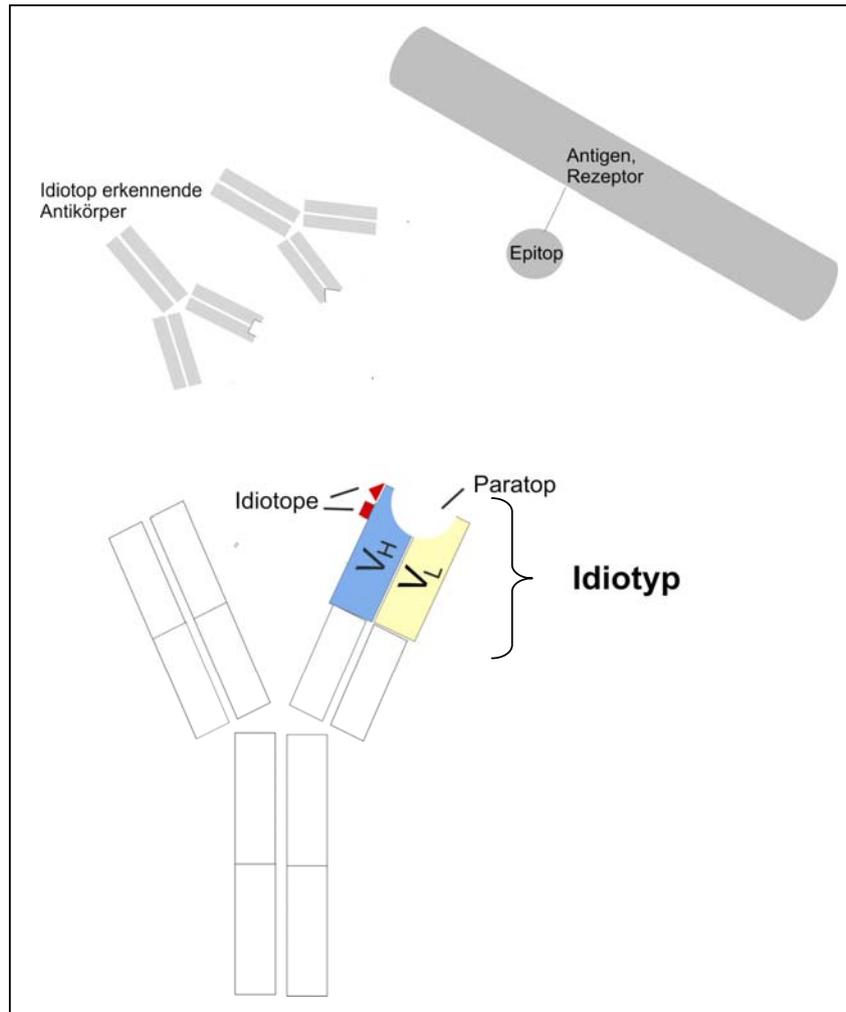


Abb. 7: Antikörper-Idiotyp

Der Idiotyp besteht aus der Gesamtheit der variablen Region einer schweren (V_H) und einer leichten Kette (V_L) mit dem Paratop für die Erkennung eines Epitops und den Idiotope. Die Idiotope können von anderen Antikörpern, die auch als Anti-idiotypische Antikörper bezeichnet werden, erkannt werden. Durch deren Bindung kann eine Immunantwort ausgelöst werden.

Auf dem Prinzip der Idiotyp-Vakzinierung basiert auch die Therapie des follikulären B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphoms mit in *Nicotiana benthamiana* hergestellten idiotypischen Antikörpern.

Die follikulären Lymphome entstehen aus der unkontrollierten Vermehrung einer B-Zelle, die sich in einem Stadium ihrer Differenzierung befindet, in der sie sogenannte Oberflächen-Immunglobuline (slg) exprimiert (vgl. Abb.1). Entartete B-Zellen einer Ausgangszelle tragen demnach Oberflächen-Immunglobuline des gleichen Idiotyps. Diese werden aufgrund der Herkunft von körpereigenen B-Zellen nicht als fremd erkannt, weshalb die körpereigene Immunabwehr versagt. Die Gabe eines biotechnologisch hergestellten Antikörpers, dessen Idiotyp dem des Oberflächen-Immunglobulins entspricht, führt zur Anregung des körpereigenen Immunsystems, wenn der idiotypische Antikörper an ein Verstärkerprotein,

wie das Keyhole-Limpet-Hämocyanin aus der kalifornischen Keyhole-Limpet Schnecke gekoppelt ist und in Verbindung mit dem Wachstumsfaktor GM-CSF verabreicht wird. Die Idiotypen werden nun als fremd erkannt und die vom Immunsystem gebildeten Antikörper gegen den Idiotyp heften sich an diesen als Signal für zytotoxische T-Zellen. Die entarteten B-Zellen werden zerstört.

Da kein Idiotyp dem anderen gleicht und die Oberflächen-Immunglobuline demnach nicht nur tumor-, sondern auch patientenspezifisch sind, muss für jeden Patienten ein personalisierter Impfstoff entwickelt werden. Dadurch erhält der Begriff der „Personalisierten Medizin“ eine Fokussierung. In diesem Fall wird von „**Individualisierter Medizin**“ gesprochen, da sich der Therapieansatz auf das einzelne Individuum bezieht.

Das mögliche Potential einer Idiotyp-Vakzinierung zur Verhinderung eines Rückfalls von NHL-Patienten ist schon lange bekannt und mehrere klinische Studien mit den personalisierten Impfstoffen, in denen eine Immunantwort der Patienten gemessen werden konnte, sind bereits durchgeführt worden. So gelang es erstmals 2006 einer Forschergruppe um M. Bendandi in einer Studie mit Patienten eine Immunantwort gegen den idiotypischen Antikörper zu erlangen (Inogès *et al.*, 2006). Eine Zulassung zur Behandlung von Patienten konnte bislang jedoch in keinem Fall erreicht werden, was mitunter daran lag, dass die idiotypischen Antikörper in Hybridoma-Zellen hergestellt wurden. Deren Handhabung ist kompliziert und zeitaufwendig, sodass die Produktion von patientenspezifischen Antikörpern in klinischen Maßstäben kaum möglich ist.

Die transiente virus-basierte Expression in *Nicotiana benthamiana* ist dagegen mit Hilfe der „Magniflection Technology“ zur schnellen Produktion unterschiedlicher Antikörper in der Lage (siehe Abschnitt 1.4.3). Das Prinzip der Herstellung des patientenspezifischen Impfstoffes ist in Abb. 8 schematisch dargestellt und beginnt mit einer Biopsie. Von jedem Patienten wird Material des entarteten Lymphknotengewebes entnommen. Die Sequenzen der variablen Region des auf der Oberfläche der B-Zellen gebildeten Immunglobulins werden für leichte und schwere Ketten getrennt in zwei unterschiedliche virale Vektoren kloniert, die bereits die konstanten Regionen eines humanen IgG1 enthalten. Die viralen Vektoren sind agrobakterielle Binärvektoren, die Komponenten der Pflanzenviren Tabak-Mosaik-Virus (TMV) und Potato Virus X (PVX) für die Replikation und lokale Ausbreitung in der Pflanze enthalten. Die Vektoren werden in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert und per Unterdruck (Agroinfiltration) in die Blätter von *Nicotiana benthamiana* eingebracht. In den Blättern der Pflanze replizieren sich die Konstrukte in nicht kompetitiver Weise mit Hilfe der viralen Polymerase. Der Antikörper mit der patientenspezifischen idiotypischen variablen Region wird fusioniert auf die konstante Region des humanen IgG1 exprimiert.

Nach 5-10 Tagen wird der Antikörper aus den Blättern extrahiert und gereinigt, an das Keyhole-Limpet-Hämocyanin gekoppelt und kann dem Patienten als Impfstoff verabreicht

werden. Dessen Immunsystem wird angeregt und er bildet Antikörper gegen den idiotypischen Antikörper und somit auch gegen das auf der Oberfläche der malignen B-Zellen exprimierte Immunglobulin. Die übermäßige Bildung neuer maligner B-Zellen wird verhindert.

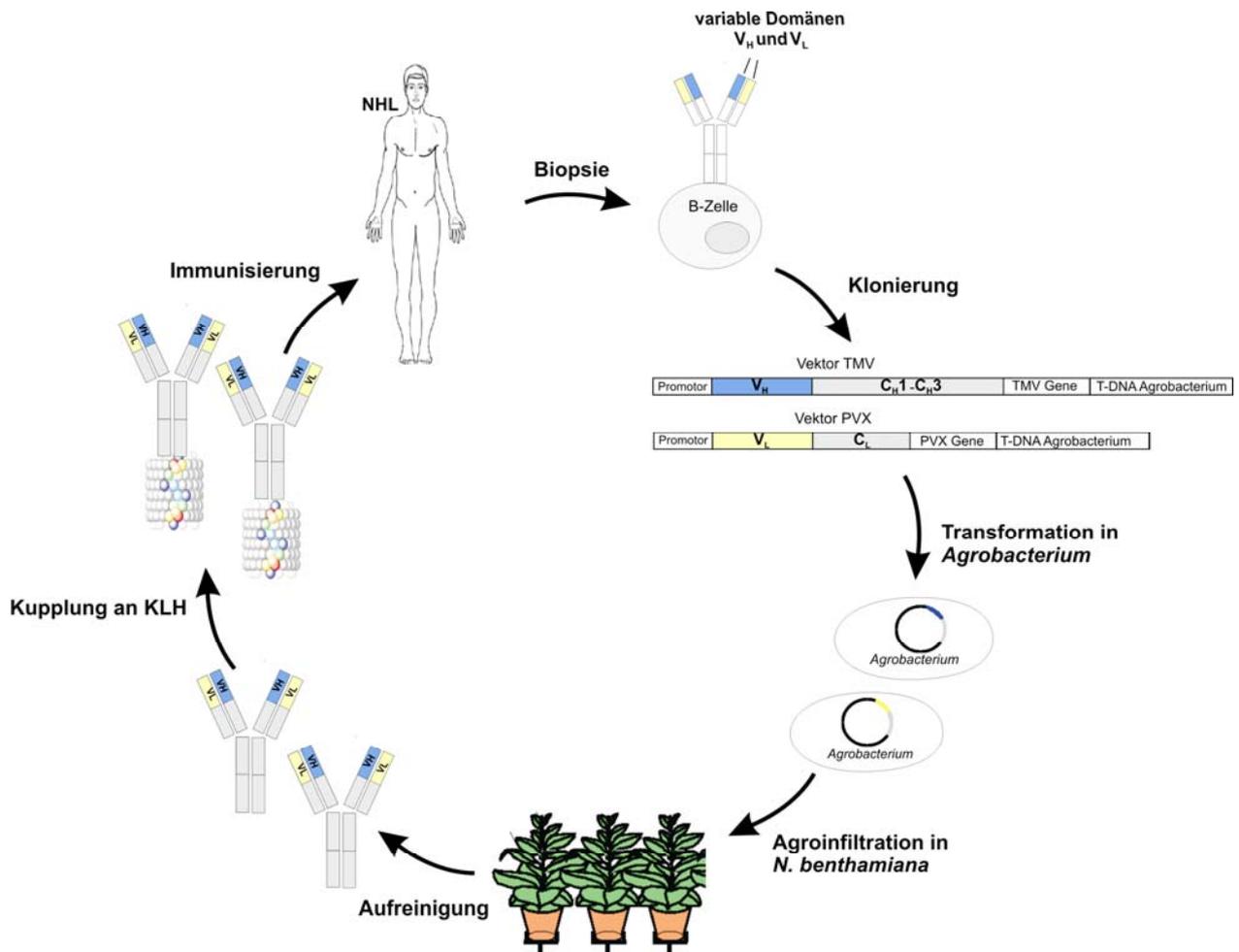


Abb. 8: Prinzip der Antikörperherstellung zur Idiotyp-Vakzinierung

Dem Patienten wird Material aus den entarteten Lymphknoten entnommen. Die variablen Domänen der leichten und schweren Kette (V_L und V_H) des Oberflächen-Immunglobulins der malignen B-Zelle, die den Idiotyp darstellen, werden getrennt in zwei virale Vektoren (TMV-Vektor und PVX-Vektor) kloniert. Auf den Vektoren liegen bereits die konstanten Domänen eines humanen IgG1 vor ($C_{H1-C_{H3}}$ und C_L). Beide Vektoren werden in verschiedene Agrobacteriumstämme transformiert. *N. benthamiana* Pflanzen werden mit beiden *Agrobacterium*-Virus Konstrukten infiltriert. Nach 5-10 Tagen werden die idiotypischen Antikörper aus den Pflanzen aufgereinigt, an das Verstärkerprotein **Keyhole Limpet Hämocyanin** (KLH) gekoppelt und dem Patienten verabreicht.

1.7 Fragestellung der Arbeit

Die Methode der virus-basierten transienten Expression von vollständigen Antikörpermolekülen in Pflanzen ist neu und ermöglicht erstmals die Expression idiotypischer Antikörper innerhalb kürzester Zeit in *Nicotiana benthamiana*. Durch die Expression von monoklonalen Antikörpern in transgenen Pflanzen ist bereits bekannt, dass diese die Fähigkeit zur Assemblierung und Faltung von Antikörpern besitzen. Doch wurde die Expression in Pflanzen zum einen bisher nicht für eine Vielzahl individuell unterschiedlicher Antikörper, zum anderen nicht für transient exprimierte Antikörper untersucht. Unabhängig vom Expressionssystem, ist über die strukturellen Unterschiede idiotypischer Antikörper generell wenig bekannt, obwohl deren Expression in Hybridoma-Zellen etabliert ist.

So sollte in einem ersten Teil der Arbeit die Struktur idiotypischer Antikörper aus *Nicotiana benthamiana* untersucht werden. Es sollte die Frage geklärt werden, ob die Pflanze jeden der idiotypischen Antikörper unter den bekannten strukturellen Aspekten herstellt.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit dem Proteom einer *Nicotiana benthamiana* Pflanze, die einen idiotypischen Antikörper transient exprimierte. Es sollte die Expression des idiotypischen Antikörpers und generelle Veränderungen innerhalb des Proteoms von *Nicotiana benthamiana* über eine Wachstumsperiode mehrerer Tage verfolgt werden. Dabei sollte zum einen die Frage geklärt werden, ob der Antikörper in *Nicotiana benthamiana* abgebaut wird oder dessen Glykosylierungsmuster eine Veränderung erfährt. Zum anderen sollte der Einfluss der Antikörperexpression, sowie der bakteriellen und viralen Infektion auf die Pflanze untersucht werden.

Da die Herstellung von Antikörpern in CHO-Zellen ein standardisiertes Verfahren ist, wurde als Referenz zusätzlich das Proteom des Überstandes einer CHO-Zelllinie untersucht, die einen monoklonalen Antikörper produzierte.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Puffer und Standards

2.1.1 Chemikalien

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien stammen von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland) und Bio-Rad (München, Deutschland). Aus anderen Quellen stammende Chemikalien sind im Folgenden alphabetisch aufgeführt:

<u>Bezeichnung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Acetonitril	Fluka (Buchs, Schweiz)
Agarose	GE Healthcare (Upsalla, Schweden)
Ameisensäure 50% for HPLC	Fluka (Buchs, Schweiz)
Cover Fluid	GE Healthcare (Upsalla, Schweden)
Millipore-Wasser	Millipore (Schwalbach, Deutschland)
Trypsin, Sequencing Grade Modified	Promega (Madison, USA)
Tween	Calbiochem (Darmstadt, Deutschland)
PBS (Phosphate-Buffered Saline)	GIBCOs (Invitrogen)
PNGaseF	New England BioLabs (Schwalbach, Deutschland)
Wasser, LC-MS Chromasolv	Fluka (Buchs, Schweiz)

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien hatten mindestens den Reinheitsgrad p.a.

2.1.2 Fertigpuffer

<u>Bezeichnung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Criterion™ XT MES Running Buffer	Bio-Rad (München, Deutschland)
IPG-Buffer pH 3-10, pH 4-7, pH 6-11	GE Healthcare (Upsalla, Schweden)
Triethylammoniumhydrogencarbonat at Puffer	Fluka (Buchs, Schweiz)
Tris/Glycine/SDS-Buffer	Bio-Rad (München, Deutschland)
XT Sample Buffer (4fach)	Bio-Rad (München, Deutschland)

2.1.3 Standards

Elektrophorese: Bio-Low Marker (Bio-Rad, München, Deutschland)

Prestained Marker (Bio-Rad, München, Deutschland)

Massenspektrometrie: ESI-TOF Tuning Mix (Agilent Technologie, Waldbronn, Deutschland)

2.1.4 Antikörper für Immunofärbung

Anti-mouse IgG, biotinylated (GE Healthcare, Buckimhamshire, UK)

Anti-human IgG, biotinylated (Lifespan Biosciences, Seattle, USA)

2.1.5 Sonstige Materialien

Nab™ Protein A Plus Spin Column (Pierce, Rockford, USA)

Streptavidin-biotinyl. horseradish peroxidase complex (GE Healthcare, Buckimhamshire, UK)

2.2 Probenmaterial

2.2.1 Aufgereinigte idiotypische Antikörper ID1-ID7 aus *Nicotiana benthamiana*

Die Herstellung der *Nicotiana benthamiana* Pflanzen wurde von der Firma Icon Genetics (Halle, Deutschland) für jeden idiotypischen Antikörper separat durchgeführt. Zunächst wurde dafür in einem klinischen Labor eine Biopsie der Lymphknoten der NHL-Patienten und Herstellung einer Single-Zell-Suspension durchgeführt. Von den Tumorzellen eines jeden Patienten wurde anschließend die RNA isoliert und die cDNA synthetisiert. Die variablen Regionen der Oberflächen-Immunglobuline wurden mit einer „anchored PCR“ amplifiziert und die PCR-Produkte, die eine Vielzahl variabler Regionen aller Oberflächen-Immunglobuline des biopsierten Materials enthielten, wurden kloniert. Daraufhin folgte eine Sequenzierung der Klone. Die Grundlage der Identifikation der Tumor-Sequenzen basiert auf der Tatsache, dass Tumor-Zellen und ihr zugehöriges Oberflächen-Immunglobulin in größeren Mengen in dem biopsierten Material vorkommen als gesunde Zellen. Folglich identifiziert die Klonierung der Immunglobulin cDNAs ausgehend von dem biopsierten Material und Sequenzierung einer großen Anzahl der Klone den Idiotypen der malignen Zelle als einzige Sequenz, die mehrere Male vorkommt.

Die variablen Regionen der leichten und schweren Kette des Tumor-Idiotyps wurden getrennt in zwei virale Vektoren kloniert. Die Vektoren basierten auf dem Tabak Mosaik Virus (TMV) und dem Potato Virus X (PVX). Deren unterschiedliche Herkunft ermöglichte die Verbreitung beider Vektoren innerhalb derselben Wirtszelle, weshalb sie als nicht kompetitiv bezeichnet werden. Neben den kodierenden Bereichen für die Replikation und Verbreitung der viralen Vektoren lag auf diesen ebenfalls bereits ein Signalpeptid für die Sekretion in den Apoplasten und die konstante Region eines humanen IgG1 vor. Nach Transformation der TMV und PVX Expressionsvektoren in *Agrobacterium tumefaciens* wurden die *Agrobacterium*-Virus Konstrukte durch eine sogenannte Agroinfiltration per Unterdruck in die Blätter von 6-7 Wochen alten *Nicotiana benthamiana* Pflanzen eingebracht. Anschließend wurden die infiltrierten Pflanzen unter kontrollierten Bedingungen inkubiert. Nach jeweils 7-8 Tagen wurden die *Nicotiana benthamiana* Pflanzen geerntet, homogenisiert und zur Entfernung von grobem Material filtriert. Die Aufreinigung des idiotypischen Antikörpers aus dem Homogenisat wurde über eine Protein A-Affinitätschromatographie durchgeführt, bei der das Protein A spezifisch an die Fc-Region des Antikörpers bindet. Ein zweiter Reinigungsschritt beinhaltete nach der Virus-Inaktivierung durch einen niedrigen pH-Wert eine Size-Exclusion Chromatographie. Eine schematische Darstellung der Arbeitsschritte ist in Abb. 9 dargestellt.

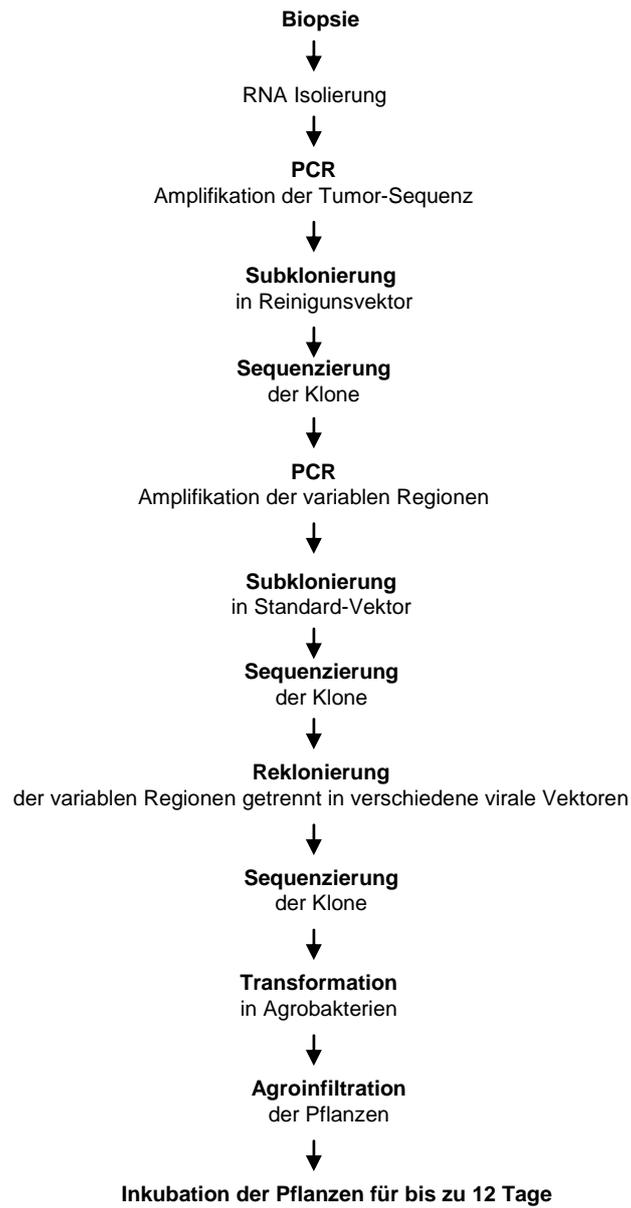


Abb. 9: Schematische Darstellung der Arbeitsabläufe zur Herstellung von idiotypischen Antikörpern

Um sicher zu stellen, dass die korrekte Sequenz identifiziert wird, wird der Prozess in zwei unterschiedlichen Linien mit unterschiedlichen Ansätzen von Reagenzien parallel durchgeführt.

Tab.4: Sequenzen der variablen und konstanten Regionen von idiotypischen Antikörpern ID1-ID7

Idiotyp	Kette	Sequenzen der variablen Regionen mit Glykosylierungssignalen <u>N-X-S/T</u>
ID1	LC	QSALTQPASVSGSAGQSITISCTATSSDFVNYNLVSWYQQHPDKAPKVIIEATKRPSGSSRFSGSTS GKTASLTISGLQAEDEADYCCS NVT GSTSYVLFGGGTKLSVL
	HC	EMQLAESGGGLVQPGRSLRLSCIASGFTFDDYVMHWVRQTPGKGLEWVAN IS WNSGNIGYVDSVKG RFTISRDNNAKSLYLQMNSLRVEDTALYYCAKDKGDYVGSYYFDSWGQGTPTVTVSS
ID2	LC	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSG TEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNWPLTFGGGKVEIK
	HC	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGR FTISRDNANSLYLQMNSLRVEDTAVYYCARGSSVAALRRLFDYWGQGTPTVTVSS
ID3	LC	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASILESGVPSRFSGSGSGT EFTLTISLQPDFFATYYCQQYNSYSFGPGTKVDIK
	HC	ELQLVESGGGLVQPGSLKLSCTASGFN FK SIHWRQASGGLEWIGHIS NK THSYATSYAASVQ GRFTISRDDSK NT YLEMNRKTEDTALYYCRRDVGSDSPGSLWGQGTPTVTVSS
ID4	LC	QSALTQPASVSGSLGQSITITCSGITDINIYNLWYQQHPDKAPKLIIEVNRKPSGVSDFSGSKSG NTASLIISGLQAEDEADYHCCAYGPRSSAVFGGTHLTVL
	HC	QVLLQESGPGLVKPSQTLSLICTVSGGSIHSDDYQWSWIRQPPGQGLEWIG NIS YSGSTYYNPSLKS RVTMSLDTSENHFSLKVTSTAAATAIYYCARVVTCHSRGDCFFSRVDVWGPQTPTVTVSS
ID5	LC	VIVMTQSPATLSVSPGESATLSCRASQTIYNKLAWYQMKPGQTLRLLIYGASTRAAGAPAKFSGSGSG TEFTLSISLQSEDFATYYCQQYSNWPLTFGGGKVEIK
	HC	EVQLLESGGGLVLPGGFLRLSCVSGSFTFR NY TMNWVRQAPGKGLEWVSGISGGGDRTYADSVQ GRFSISRDNNSRNTLFLHMYSLRAEDTALYYCA KNT AAGDCCFFDSWGQALVTVS
ID6	LC	EIALTQSPATLSLSPGERATLSCRASQNVRTSLAWYQQRPGQAPRLLIYDYNRAT NIS RFSGSGSG TDFTLIISLEPEDFAVYYCQQRNNWPWTFGGGKVEIK
	HC	QAHLVESGGDLVQPGGSLRLSCSASGFIFSDYYMSWIRQAAGKGLEWIS NI ISGDSVYYVESVKGRF TISRDNANNTLYLQMNSLRVEDTALYYCATCGGTTLTAAARFEYWGQGTPTVTVSS
ID7	LC	QIVMTQTPLSLSVTPGQPASMSCKSSQSLLSAGK TNLS WYMQVPGQSPQLLIYEVSSRVSGVPNRF NGT SG NT LKISRVEAEDIGIYYCMQYTLRFTFGGKVEII
	HC	EVQFVESGGGLVQPGGSLRLSCVSGSFIYRYSYINWVRQSPKGLEWVSKVSGSGTNYVADSVKGR FTISRDNANNSVYLQMDSLRVDATAIYYCVRDQHDGRGYEPLAIWGQGTMT NV SS
Sequenzen der konstanten Regionen		
LCκ:	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT LTKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC	
LCλ:	GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAACQVTHE GSTVEKTVAPTECS	
HC:	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCTCPPEPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK	

2.2.2 Pflanzenmaterial von *Nicotiana benthamiana* ID2

Die Herstellung von *Nicotiana benthamiana* Pflanzen, die den idiotypischen Antikörper ID2 exprimierten, wurde wie unter 2.2.1 beschrieben von der Firma Icon Genetics (Halle, Deutschland) durchgeführt. Dafür wurde zusätzlich zu den Pflanzen für die Herstellung des aufgereinigten ID2 eine weitere Charge von 8 ID2 exprimierenden *Nicotiana benthamiana*

Pflanzen angezogen. Deren Blätter wurden jeweils an dpi (**d**ay **p**ost **i**nfiltration) 1,2,5,6,7,8,9 und 12 geerntet, zerkleinert und bei -80 °C eingefroren.

2.2.3 Überstände aus der Fermentation von MA1956 exprimierenden CHO-Zellen

Die Kultivierung der CHO-Zellen, die den monoklonalen Antikörper MA1956 exprimierten, erfolgte unter GMP-Bedingungen im Technikum (Bayer, Wuppertal). Dazu wurden die Antikörper exprimierenden Zellen aus der tiefgefrorenen Zellbank in Nährmedium überführt und darin vermehrt. Während des Wachstums wurde die Zellkultur schrittweise in größere Kulturgefäße überführt. Nach einer Vorfermentation in einem 10 L Bioreaktor wurde ein 200 L Bioreaktor mit der Zellsuspension angeimpft. Das Produktionsmedium wurde täglich aufgefüllt, so dass die Zellkonzentration stets über einem Wert von 0,2 Mio Zellen/ml lag. Die Fütterung durch Zugabe von Nährmedium begann, wenn ein Volumen von 120 L erreicht war. Jeden zweiten Tag wurde die Glukosekonzentration durch Zugabe von Nährmedium und Produktionsmedium auf einen Wert von 1,8 -2,1 g/l eingestellt. Die Fermentation wurde nach 17 Tagen beendet, wenn die Lebendzellzahl weniger als 90 % betrug.

Ab dem Tag der ersten Fütterung wurden bis zum Ende der Fermentation an Tag 17 täglich ca. 50 ml entnommen und für die Analysen bei -80 °C eingefroren.

2.3 Probenvorbereitung

2.3.1 Präparation von gereinigten idiotypischen Antikörpern

Die aufgereinigten idiotypischen Antikörper wurden über VivaSpins ankonzentriert. Dazu wurden jeweils 3,5 ml Probe in VivaSpins (10000er Membran, 2 ml Röhrchen) überführt und 20 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Probe mit 2 ml PBS nachgespült (15 min bei 4000 rpm) und das Konzentrat auf ca. 0,5 ml mit PBS aufgefüllt. Etwa die Hälfte des Konzentrates wurde für die 2D-Elektrophorese mit Chloroform/Methanol präzipitiert. Die andere Hälfte des Konzentrates wurde für die SDS-PAGE oder Massenspektrometrie verwendet.

2.3.2 Präparation von Pflanzenmaterial

Je 2-3 Spatel des bei -80 °C gelagerten bereits zerkleinerten Pflanzenmaterials wurden in einen Glaspotter gegeben, zügig mit ca. 2 ml der Fällungslösung überdeckt und mit einem Glaspistill gründlich gemörsert. Unzerkleinertes Pflanzenmaterial wurde scharf

abzentrifugiert, die grüne Flüssigkeit in ein 2 ml Eppendorf Gefäß überführt und in der Fällungslösung direkt für die Präzipitation eingesetzt.

Tab. 5: Bei der Präparation von Pflanzenmaterial verwendete Lösung

Name	Zusammensetzung
Fällungslösung	10 % (w/v) TCA-Lösung 0,07 % (w/v) Mercaptoethanol in Aceton

2.3.3 Isolierung von Antikörpern aus dem Proteom von *Nicotiana benthamiana*

Für die Analyse der Veränderung des Glykosylierungsmusters von ID2 wurde der Antikörper aus dem Proteom von *Nicotiana benthamiana* an verschiedenen Tagen nach Agroinfiltration über eine Protein A Säule aufgereinigt. Dazu wurde von dem gefrorenen Pflanzenmaterial von dpi 1,2,5,7,9 und 12 je ein Spatel in einem Glaspotter mit Lysis-Puffer zerrieben. Unzerkleinertes Material wurde abzentrifugiert und die Überstände eines jeden Tages über je eine Protein A Säule gegeben. Dazu wurde die Säule zunächst mit 8 ml Bindungspuffer gespült. Nach einer 1:1 Verdünnung der Antikörperlösung mit Bindungspuffer wurden jeweils 4 ml dieser auf die Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule, an welcher der Antikörper gebunden vorlag, mit 12 ml Bindungspuffer gespült. Der Antikörper wurde mit 4 ml Elutionspuffer in ein frisches Probengefäß eluiert, in das zuvor bereits 400 µl Neutralisationpuffer vorgelegt worden war. Der gewonnene idiotypische Antikörper der unterschiedlichen Tage nach Infiltration wurde lyophilisiert und bis zur massenspektrometrischen Analyse bei -80 °C gelagert.

Tab. 6: Bei der Isolierung des Antikörpers verwendete Puffer

Name	Zusammensetzung
Lysispuffer	0,2 M Tris pH 7,5 5 mM EDTA
Bindungspuffer	PBS
Elutionspuffer	0,1 M Glycin (pH 2-3)
Neutralisationspuffer	1 M Tris (pH 8-9)

2.3.4 Präparation von Überständen aus der CHO-Zellkultur

Die Überstände eines jeden Tages wurden auf Eis aufgetaut, mit Proteaseinhibitor versetzt und die Zellen vom Überstand getrennt. Der Überstand wurde abgenommen und aufgrund der zu erwartenden sehr großen Menge an Antikörper, welche die anderen Proteine im Überstand in der Proteomik-Studie überdecken würde, wie unter 2.3.3 über eine Protein A-Säule vom Antikörper befreit. Der vom Antikörper befreite Überstand späterer Tage wurde direkt für die Präzipitation eingesetzt, der von früheren Tagen wurde gefriergetrocknet, das Lyophilisat in Millipore-Wasser gelöst und anschließend für die Präzipitation eingesetzt.

Die Antikörper aus jedem Überstand wurden nach Herstellerangaben wieder von der Säule extrahiert, gefriergetrocknet und entweder für die Analyse des Glykosylierungsmusters bei -80 °C gelagert oder für die 2D-Elektrophorese in Millipore-Wasser gelöst und anschließend für die Präzipitation mit Chloroform/Methanol eingesetzt.

2.4 Präzipitationsbasierte Proteinextraktion

2.4.1 Chloroform/Methanol-präzipitationsbasierte Proteinextraktion

Für die auf Wessel und Fugge (1984) basierende Präzipitation wurden 200 µl Probe in ein 2 ml Eppendorf Tube überführt und mit 800 µl Methanol gemischt. Nach der Zugabe von 200 µl Chloroform und 600 µl Millipore-Wasser wurde 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die obere Phase abgenommen und verworfen. Die untere Phase wurde mit 600 µl Methanol gemischt und ein weiteres Mal 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Proteinpellet wurde bei RT an der Luft getrocknet.

Das Pellet wurde anschließend entweder für die 2D-Elektrophorese in 80-100 µl 2D-Puffer oder für die eindimensionale SDS-PAGE in XT Sample Buffer gelöst.

2.4.2 TCA/Aceton präzipitationsbasierte Extraktion von Proteinen aus Blättern

Die vorbereitete grüne Flüssigkeit von *Nicotiana benthamiana* wurde zwei Stunden bei -20 °C in der Fällungslösung gelagert (vgl. 2.3.2). Das durch Zentrifugation (10 min bei 10000 g und 2-4 °C) gewonnene bräunliche Proteinpellet wurde mit Waschlösung gewaschen, mehrere Stunden bei -20 °C gelagert, und erneut für 15 min bei 10000 x g und 2-4 °C zentrifugiert. Der Waschschrift wurde 2-3mal wiederholt, bis das Pellet eine weiße Färbung hatte. Die Waschlösung wurde abgenommen, das Pellet bei RT unter dem Abzug getrocknet und in 80-100 µl 2D-Puffer gelöst.

Tab. 7: Bei der TCA/Aceton präzipitationsbasierten Extraktion verwendete Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
Fällungslösung	10 % (w/v) TCA-Lösung 0,07 % (w/v) Mercaptoethanol in Aceton
Waschlösung	0,07 % (w/v) Mercaptoethanol in Aceton
2D-Puffer	2 M Thioharnstoff 8 M Harnstoff 50 mg CHAPS

2.5 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mittels HCOOH-HPLC (Waters, Typ 510) unter folgenden Bedingungen bestimmt:

Probenschleife: 500 µl

Photometer (Shimadzu): 280 nm

Fließmittel: 90 % (v/v) Ameisensäure

Fließgeschwindigkeit: 1,5 ml/min

Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Dazu wurden jeweils 10 µl und 20 µl nacheinander auf die Säule gespritzt. Aus den erhaltenen Chromatogrammen wurde aus den Peakflächen anhand eines Referenzstandards der Proteingehalt ermittelt. Aus den bestimmten Proteingehalten der Doppelbestimmung wurde der Mittelwert gebildet. Bei zu erwartenden hohen Konzentrationen wurden die Proben mit dem entsprechenden Puffer, in dem die Probe bereits vorlag, 1:10 verdünnt. Als Referenzprobe wurde ein Standard eines monoklonalen Antikörpers (1 mg/ml) eingesetzt. Die Auswertung der Chromatogramme wurde mit Chromeleon™ 6.8 durchgeführt.

2.6 Elektrophorese

2.6.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde mit Criterion™ XT Precast Fertiggelen in einer Criterion™ Kammer (Bio-Rad) durchgeführt. Die Acrylamidkonzentrationen der Gele betragen 12 % unter reduzierenden Bedingungen und 4-12 % unter nicht reduzierenden Bedingungen. Vor dem Auftrag wurden die Proben 1:1 mit 2fach XT Sample Buffer (nicht reduzierend: 50 % XT

Sample Buffer in Millipore-Wasser; reduzierend: 50 % XT Sample Buffer, 20 % DTT-Stammlösung in Millipore-Wasser) versetzt und 10 min bei 70 °C inkubiert. Nach dem Auftragen der Proben erfolgte die Auftrennung im Gel bei einer konstanten Stromstärke von 100 mA bis die Blaufront die untere Gelkante erreichte. Nach dem Lauf wurden die Gele entweder gefärbt oder für einen Western Blot eingesetzt. Das Molekulargewicht der denaturierten Proteine wurde mit Hilfe des parallel aufgetragenen Größenstandards bestimmt.

2.6.2 Erste Dimension der 2D-Elektrophorese – Isoelektrische Fokussierung

2.6.2.1 Immobiline DryStrip® 11 cm

Für die Auftrennung aufgereinigter Antikörper wurden 11 cm Immobiline DryStrip® pH 6-11 NL (GE Healthcare, München, Deutschland) verwendet. Die Probe wurde mit Rehydratisierungspuffer auf ein Volumen von 200 µl aufgefüllt. Je nachdem, ob die 2D-Elektrophorese unter reduzierenden oder nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt werden sollte, wurde Rehydratisierungspuffer mit oder ohne DTT verwendet.

Die Protein-Rehydratisierungslösung wurde in ein Keramik-Schiffchen überführt, der Strip entsprechend der Orientierung (Anode = sauer, Kathode = basisch) mit der Gelseite nach unten gelegt und mit 850 µl DryStrip Cover Fluid (Amersham Pharmacia Biotech, Schweden) überschichtet. Die Rehydratisierung des Strips war Teil des Fokussierungsprogrammes, das in der IPGphor-Kammer (Amersham Pharmacia Biotech, Schweden) nach dem in Tab. 9 aufgeführten Programm durchgeführt wurde. Nach Beenden der isoelektrischen Fokussierung wurden die Strips entweder sofort für die Äquilibration zur Durchführung der zweiten Dimension verwendet oder bei -80 °C in Glasröhrchen gelagert.

Tab. 8: Zusammensetzung des Rehydratisierungspuffers für die zweite Dimension bei 11 cm Strips

Name	Zusammensetzung
Rehydratisierungspuffer, reduzierend	2 M Thioharnstoff 8 M Harnstoff 50 mg CHAPS 0,5 % IPG-Buffer pH 6-11 3 µl einer DTT- Stammlösung (500 mg/ml)
Rehydratisierungspuffer, nicht reduzierend	2 M Thioharnstoff 8 M Harnstoff 50 mg CHAPS 0,5 % IPG-Buffer pH 6-11

Tab. 9: Fokussierungszeiten der ersten Dimension für 11 cm Strips

Strip-Länge	Schritt	Step-n-hold/Gradient	Spannung	Zeit
11 cm	Rehydratisierung	Step-n-hold	30 V	11 h
	1	Step-n-hold	500 V	2 h
	2	Gradient	1000 V	2 h
	3	Gradient	6000 V	2 h
	4	Step-n-hold	6000 V	12 h

2.6.2.2 Immobiline DryStrip® 18 cm

Für die Auftrennung der Proteome wurden 18 cm Immobiline DryStrip® pH 3-10 oder pH 4-7 (GE Healthcare, München, Deutschland) verwendet. Die Probe wurde mit reduzierendem Rehydratisierungspuffer auf ein Volumen von 340 µl aufgefüllt. Die Protein-Rehydratisierungslösung wurde in ein Keramik-Schiffchen überführt, der Strip entsprechend der Orientierung (Anode = sauer, Kathode = basisch) mit der Gelseite nach unten gelegt und mit 1400 µl DryStrip Cover Fluid (Amersham Pharmacia Biotech, Schweden) überschichtet. Die Rehydratisierung des Strips war Teil des Fokussierungsprogrammes, das in der IPGphor-Kammer (Amersham Pharmacia Biotech, Schweden) nach dem in Tab. 5 aufgeführten Programm durchgeführt wurde. Nach Beenden der isoelektrischen Fokussierung wurden die Strips entweder sofort für die Äquilibration zur Durchführung der zweiten Dimension verwendet oder bei -80 °C in Glasröhrchen gelagert.

Tab. 10: Zusammensetzung des Rehydratisierungspuffers für die zweite Dimension bei 18 cm Strips

Name	Zusammensetzung
Rehydratisierungspuffer, reduzierend	2 M Thioharnstoff 8 M Harnstoff 50 mg CHAPS 0,5 % IPG-Buffer pH 3-10, pH 4-7 3 µl einer DTT- Stammlösung (500 mg/ml)

Tab. 11: Fokussierungszeiten der ersten Dimension für 18 cm Strips

Strip-Länge	Schritt	Step-n-hold/Gradient	Spannung	Zeit
18 cm	Rehydratisierung	Step-n-hold	30 V	11 h
	1	Step-n-hold	500 V	1 h
	2	Gradient	1000 V	1 h
	3	Gradient	6000 V	3 h
	4	Step-n-hold	8000 V	9 h

2.6.3 Äquilibrierung von Immobiline DryStrips®

Die Strips wurden nach der ersten Dimension oder nach Auftauen zweimal 20 min in jeweils 20 ml Äquilibrierlösung auf dem Schüttler inkubiert. Wenn die 2D-Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt wurde, wurde bei dem ersten Äquilibrierungsschritt 5 % (w/v) Iodacetamid und bei dem zweiten Äquilibrierungsschritt 2 % DTT (w/v) zugefügt. Anschließend wurden die Strips direkt für die zweite Dimension eingesetzt.

Tab. 12: Zusammensetzung der Äquilibrierlösung

Name	Zusammensetzung
Äquilibrierpuffer	50 ml 0,5 M Tris pH 6,8 180 g Harnstoff 150 ml Glycerin 99% 200 ml Millipore-Wasser 20 g SDS 1 Spatelspitze Bromphenolblau

2.6.4 Zweite Dimension der 2D-Elektrophorese - SDS-PAGE

2.6.4.1 Immobiline DryStrip® 11 cm

Die zweite Dimension wurde für die 11 cm Strips mit Criterion™ XT Fertiggelen (Bio-Rad) 4-12 % bei nicht reduzierenden Bedingungen und 12 % bei reduzierenden Bedingungen in der Criterion™ Kammer (Bio-Rad) durchgeführt. Dazu wurden die Strips nach der Äquilibrierung in der Geltasche platziert und mit 0,1 % Agarose fixiert. Die obere und die untere Kammer wurden mit Criterion™ XT MES Running Buffer (Bio-Rad) gefüllt und die Fokussierung für ca. 2 Stunden bei konstanten 100 V durchgeführt, bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

Nach Beenden der zweiten Dimension wurden die Gele entweder für einen Western Blot weiterverwendet oder für die Färbung in der entsprechenden Fixierlösung aufbewahrt.

2.6.4.2 Immobiline DryStrip® 18 cm

Für die zweite Dimension mit 18 cm Strips wurden 12 % Precast Fertiggele (Jule, Inc., USA) mit einer Größe von 20 x 20 cm² und die Protean II Xi Kammer verwendet. Die Geltaschen der Fertiggele hatte nur eine Länge von 17 cm. Dementsprechend mussten die Enden des 18 cm Strips gekürzt werden. Diese bestanden lediglich aus Plastik ohne Gel, sodass kein

Protein an den Rändern entfernt wurde. Die Strips wurden nach deren Kürzung in der Geltasche platziert und mit 0,1 % Agarose fixiert. Die Elektrophoresekammer wurde mit Tris/Glycin/SDS-Buffer (Bio-Rad) gefüllt. Die Laufbedingungen bei 15 °C mit angeschlossener Kühlung betragen 20 mA/Gel für 1 h, 40 mA/Gel für 1 h, danach wurde die Stromstärke auf 50 mA/Gel erhöht, bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte. Die Gesamtlaufzeit betrug ca. 4 bis 5 h. Nach Beenden der zweiten Dimension wurden die Gele für die Färbung in der entsprechenden Fixierlösung aufbewahrt.

2.7 Färbungen

2.7.1 Kolloidale Coomassiefärbung

Die Fixierung bei dieser Färbung wurde für mindestens 2 Stunden oder über Nacht durchgeführt. Anschließend wurden die Gele für 1 Stunde in Äquibrierlösung auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 0,66 g Coomassie G250 pro Liter Äquibrierlösung-Lösung zugegeben. Die Färbung dauerte in der Regel 3-5 Tage. Sie war beendet, wenn die blaue Coomassie-Lösung wässrig-klar zu werden begann. Nach der Färbung wurden die Gele in Millipore-Wasser gewaschen, bis der Hintergrund klar war, eingescannt und entweder für das Ausstanzen von Spots verwendet oder zwischen Cellophanfolie in einem Gelrockner getrocknet.

Tab. 13: Für die kolloidale Coomassiefärbung verwendete Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
Fixierlösung	2 % (v/v) Phosphorsäure in 50 % (v/v) vergälltem Ethanol
Äquibrierpuffer	17 % (w/v) Ammoniumsulfat ,2 % (v/v) Phosphorsäure in 34 % (v/v) Methanol

2.7.2 Silberfärbung

Die Fixierung der Gele wurde für 20 Minuten auf dem Schüttler durchgeführt. Die Gele wurden anschließend 10 min in Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Gele für 1 min in Färbelösung 1 geschüttelt. Nach zweimaligem Waschen für jeweils 1 min mit Millipore-Wasser wurden die Gele für die Silberimprägnation für 20 min in Färbelösung 2 geschüttelt. Die Gele wurden erneut zweimal für jeweils 1 min mit Millipore-Wasser gewaschen, bevor sie in Entwicklerlösung entwickelt wurden. Färbte sich die Lösung nach einigen Sekunden trübe, wurde er durch frische Lösung ersetzt. Die Entwicklung wurde mit einer Abstopplösung gestoppt, wenn die Proteine eine ausreichende Färbung erreicht hatten.

Tab. 14: Für die Silberfärbung verwendete Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
Fixierlösung	10 % (v/v) Essigsäure in 50 % (v/v) Ethanol-Lösung
Waschpuffer	50 % (v/v) Ethanol
Färbelösung 1	0,02 % (w/v) Natriumthiosulfat
Färbelösung 2	0,1 % (w/v) Silbernitrat-Lösung, Formaldehyd (37 %)
Entwicklerlösung	0,2 % (w/v) Natriumcarbonat, 0,04 % Formaldehyd (37 %)
Abstopplösung	5 % (v/v) Glycin-Lösung

2.8 Auswertung von 2D-Gelen

Nach der kolloidalen Coomassiefärbung wurden die Gele im Durchlichtmodus mit ImageScanner™ eingelesen. Die Ermittlung der Spotintensität und des Spotvolumens, sowie der Vergleich der Gele wurden mittels ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare, Schweden) durchgeführt.

2.9 Immuno- und Lektinblotting

2.9.1 Western Blot

Für einen Western Blot wurden die 1D- oder 2D-Gele im direkten Anschluss an die SDS-PAGE für 15 min in Trans-Blot-Puffer inkubiert. Die Immobilon™ PVDF-Membran (Millipore) wurde zur Aktivierung 1 min in Methanol inkubiert und anschließend bis zur Verwendung in Trans-Blot-Puffer gelagert. Der Zusammenbau der Trans-Blot Einheit erfolgte in einer mit Trans-Blot-Puffer gefüllten Schale luftblasenfrei unter Puffer. Das Blot-Sandwich wurde nach endgültigem Zusammenbau in die bereits mit Trans-Blot-Puffer gefüllte Trans-Blotkammer (Bio-Rad) gestellt, wobei die PVDF-Membran zur Anodenseite und das Gel zur Kathodenseite der Kammer wiesen. Der Transfer erfolgte bei einer Temperatur von 10 °C und 30 V über Nacht. Anschließend wurde die PVDF-Membran für die Immunofärbung oder Lektinfärbung weiterverwendet.

Tab. 15: Für den Western Blot verwendeter Puffer

Name	Zusammensetzung
Trans-Blot-Puffer	10 mM Caps, 10 % Methanol, pH 11

2.9.2 Immunofärbung

Über eine Immunreaktion lässt sich nachweisen, ob Polypeptide vorhanden sind, die mit einem spezifischen Antiserum kreuzreagieren.

Die Blockierung der PVDF-Membran erfolgte für 1 Stunde bei 37 °C in 20 ml 3 % BSA. Nach 2 x 10 min Waschen mit Waschpuffer erfolgte die Inkubation in der primären Antikörperlösung für 1 h auf dem Schüttler. Anschließend wurde die Membran erneut 2 x 10 min in Waschpuffer gewaschen. Beide verwendete Antikörper waren bereits biotinyliert, sodass auf eine zweite Antikörperlösung verzichtet werden konnte und die Membran direkt in Verstärkerlösung für 30 min inkubiert werden konnte. Die Proteine wurden anschließend mit Entwicklerlösung gefärbt. Nach mehrmaligem Waschen der Membran mit Millipore-Wasser wurde die Membran eingescannt.

Tab. 16: Für die Immunofärbung verwendete Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
Waschpuffer	0,1 % Tween-20 in PBS
Antikörperlösung	1 % BSA in PBS 5 ml New Born Calf Serum 25 µl Tween-20 AK-Lösung in einer nach Herstellerangaben entsprechenden Menge
Verstärkerlösung	20 ml 1% BSA in PBS 100 µl Streptavidin-Peroxidasekomplex
Entwicklerlösung	400 ml PBS 240 µl H ₂ O ₂ 240 µg HRP Color Development vorgelöst in 80 ml MeOH

2.9.3 Lektinfärbung

Durch die Spezifität des Lektins Concanavalin A gegenüber Mannose können mit einer Lektinfärbung glykosylierte Proteine detektiert werden.

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde diese für 1 Stunde bei 37 °C in 20 ml 3 % BSA inkubiert. Nach 2 x 10 min Waschen mit Waschpuffer erfolgte die Inkubation in der Lektinlösung für eine Stunde auf dem Schüttler. Danach wurde die Membran erneut 2 x 10 min gewaschen und anschließend in Verstärkerlösung für 30 min auf dem Schüttler inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift (2 x 10 min) erfolgte die die Detektion der glykosylierten Proteine mit Entwicklerlösung. Nach mehrmaligem Waschen der Membran mit Millipore-Wasser wurde die Membran eingescannt.

Tab. 17: Für die Lektinfärbung verwendete Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
Waschpuffer	0,5 % Triton X-100 10 µM CaCl ₂ 10 µM MgCl ₂ in PBS
Lektinlösung	15 µg Biotin-konjugiertes Lektin Concavalin A in 20 ml Waschpuffer
Verstärkerlösung	20 ml 1 % BSA in PBS 100 µl Streptavidin-Peroxidasekomplex
Entwicklerlösung	400 ml PBS 240 µl H ₂ O ₂ 240 µg HRP Color Development vorgelöst in 80ml MeOH

2.10 Tryptisches „Peptide Mapping“ mit Massenspektrometrie

2.10.1 Ausstanzen von Spots

Mithilfe eines Spot Pickers (The Gel Company) wurden die Spots manuell ausgestanzt und entweder direkt mit Trypsin gespalten oder bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

2.10.2 Trypsin-Spaltung

Die ausgestanzten Spots wurden zunächst mittels 50 % Acetonitril in Verdauopuffer entfärbt. Da die Reduktion und Alkylierung unter reduzierenden Bedingungen bereits bei der Äquilibrierung der Strips erfolgte, entfiel dieser Schritt bei der Spaltung und es konnte direkt mit dem Verdau begonnen werden. Dazu wurden die Spots mit Acetonitril geschrumpft, die Lösung abgenommen und die Spots getrocknet. Durch Zugabe 15 µl Trypsinlösung wurden die Spots rehydriert und anschließend für 45 min bei 4°C inkubiert. Die Trypsinlösung wurde anschließend verworfen, durch 20 µl Verdauopuffer ersetzt und über Nacht bei 37°C im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Verdauopuffer

entnommen und in ein frisches Eppendorf Gefäß überführt. Die Spots wurden mit 15µl Extraktionspuffer bedeckt und für 15 min stehen gelassen. Das gleiche Volumen Acetonitril wurde zugegeben und weitere 15 min stehen gelassen. Die Lösung wurde abgenommen und zum dem Verdauopuffer in das frische Eppendorf-Gefäß gegeben. Die Extraktion wurde zweimal mit jeweils 5 % Ameisensäure wiederholt. Die Lösung wurde ebenfalls in das frische Eppendorf-Gefäß überführt. Die Peptide wurden in der Speedvacc getrocknet und bis zur Messung bei 4 °C gelagert.

Tab. 18: Für die Trypsinspaltung verwendete Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
Verdauopuffer	50 mM Triethylammoniumhydrogencarbonat (TEAHC)
Trypsinlösung	50 ng Trypsin / µl Verdauopuffer
Extraktionspuffer	25 mM Triethylammoniumhydrogencarbonat

2.10.3 Messung von Peptiden

Die Peptide wurde in 20 µl 0,1% Ameisensäure, 5% Acetonitril, 95% Wasser gelöst und mit HPLC ESI Q-TOF unter Verwendung einer Cap-LC (Waters, micromass) und dem Q-TOF Ultima™ API (Waters, micromass), ausgestattet mit Instrumentenkontrolle und der Software MassLynx 4.0 sowie Sequest 1.12 für die Datenbanksuche, analysiert. Es wurden 15 µl auf eine Grom-Sil 120ODS-4 HE Säule (Partikelgröße 5 µm, Länge 5 mm, Durchmesser 500 µm, Tempertatur 40°C, Flussrate 2,5 µl/min) injiziert. Die Auftrennung wurde mit folgendem Gradientenprogramm durchgeführt:

Gradient: 23 min 5 % B, 58 min 40 % B, 64 min 95 % B, 74 min 5 % B, 79 min 5 % B.

Tab. 19: Für die Messung von Peptiden verwendete Lösungsmittel

Laufmittel	Zusammensetzung
A	0,1 % Ameisensäure / 5 % Acetonitril
B	0,1 % Ameisensäure in Acetonitril

2.10.4 Prozessierung der LC/ESI-MS-Daten mit anschließender Datenbanksuche

Die Sequenzabdeckung wurde basierend auf dem Abgleich der erhaltenen MS/MS Massen und den theoretischen Peptidmassen mit dem Suchalgorithmus der Sequest Datenbank oder der Mascot Datenbank generiert. Dazu wurden die MS- und MS/MS-Daten zunächst mit der Sequest-Software prozessiert. Die DTA-Dateien enthielten neben dem Ladungszustand des Vorläuferions, das Molekulargewicht des Peptids und die Intensität kombiniert mit dem m/z-

Verhältnis der Fragmentionen. Diese Dateien wurden für die Datenbanksuche mit Sequest oder Mascot verwendet.

2.11 ESI-MS-Messungen von Antikörpern

Die Analyse der Antikörper und deren Glykosylierungsmuster anhand des Molekulargewichtes erfolgte mit einer Kombination aus HPLC und ESI-Q-TOF, bestehend aus einer Agilent 1200 Series Cap-LC (Agilent) und einem MicroTofQ Massenspektrometer (Bruker Daltonik, Bremen).

Die Massenanalyse wurde entweder nativ und /oder nach Denaturierung und Reduktion durchgeführt.

Für die Analyse der nativen Antikörper wurden 300 pmol Protein mit 1 µl 10 % Ameisensäure sauer gestellt und mit 0,1 % Ameisensäure versetzt, dass eine Konzentration von ca. 2 pmol/µl entstand.

Für die Analyse der reduzierten Antikörper wurden jeweils 10-20 µl der Probe mit 5 M Gu*HCL (Guanidinhydrochlorid in 50mM TEAHC) versetzt, sodass eine Konzentration von ca. 20 pmol/µl vorlag. Die Reduktion erfolgte durch Zugabe von 1 µl 255 mM DTT/µl Protein und Inkubation für 2 h bei 54°C auf dem Thermomixer (Eppendorf). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 10 %ige Ameisensäure abgestoppt und die Probe mit LMA-MW (0,1 % Ameisensäure/ 5 % ACN/ Wasser) auf eine Konzentration von 2 pmol/µl verdünnt.

Es wurden 15 µl auf eine Grom-Sil 300ODS Butyl-1 ST Säule (Partikelgröße 5 µm, Länge 5 mm, Durchmesser 500 µm, Temperatur 70°C, Flussrate 5 µl/min) injiziert. Die Auftrennung wurde mit folgendem Gradientenprogramm durchgeführt:

Gradient: 8 min 22 % B, 10 min 24 % B, 12 min 80 % B, 18 min 95 % B, 27 min 95 % B, 30 min 22 % B, 33 min 22 % B.

Die Auswertung erfolgte mit ESI Compass 1.3 und Maximum Entropy Deconvolution.

Tab. 20: Für ESI-MS-Messungen verwendete Lösungsmittel

Laufmittel	Zusammensetzung
A	0,1 % Ameisensäure / 5 % Acetonitril
B	0,1 % Ameisensäure / 9,9 % Wasser / 10 % Acetonitril / 80 % 2-Propanol

3 Ergebnisse

3.1 Strukturanalysen von idiotypischen Antikörpern

Es wurden aus *Nicotiana benthamiana* aufgereinigte idiotypische Antikörper von verschiedenen NHL-Patienten zu Strukturanalysen zur Verfügung gestellt.

Mit Hilfe von ein- und zweidimensionaler Elektrophorese, sowie verschiedenen Blot-Detektionsverfahren, sollte neben der Feststellung des Molekulargewichtes und des isoelektrischen Punktes, das elektrophoretische Verhalten von patientenspezifischen Idiotypen in Hinblick auf den Einfluss von Ladungsheterogenität und posttranslationalen Modifikationen untersucht werden.

3.1.1 Eindimensionale Elektrophorese - SDS-PAGE

Zur Analyse der idiotypischen Antikörper wurde zunächst eine SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt (Abb. 10). Zusätzlich wurden zwei in CHO-Zellen exprimierte monoklonale Antikörper mit unterschiedlichen Isotypen der leichten Kette aufgetragen. Die leichte Kette des Antikörpers MA1956 war vom κ -Typ, die des MA2063 vom λ -Typ.

Unter reduzierenden Bedingungen wurden die leichten und schweren Ketten getrennt im Gel bei Molekulargewichten um 23 kD und 50 kD dargestellt. Je nach Idiotyp variierten die Molekulargewichte. Die leichten Ketten lagen abhängig von der Sequenz und Glykosylierung in mehreren Banden getrennt vor. Die Idiotypen ID1 und ID6 besaßen jeweils eine theoretische Glykosylierungsstelle in der variablen Region ihrer leichten Kette, wobei sich die leichten Ketten beider Idiotypen als Doppelbande darstellten. ID7 besaß drei theoretische Glykosylierungsstellen in der variablen Region der leichten Kette. Diese stellte sich als Mehrfachbande dar, wobei keine genaue Aussage darüber gemacht werden konnte, um wie viele Banden es sich handelte.

Unter nicht reduzierenden Bedingungen wurden die Idiotypen zusätzlich zu der erwarteten Bande bei ~150 kD, die den Antikörper aus zwei leichten Ketten mit je ~25 kD und zwei schweren Ketten mit je ~50 kD repräsentierte, in mehreren Banden dargestellt. Darunter befanden sich sowohl die Banden im Molekulargewichtsbereich der leichten und schweren Kette, als auch Signale im höheren Molekulargewichtsbereich. Die Banden oberhalb von 150 kD stellten Oligomere dar. Die Banden unterhalb von 150 kD deuteten darauf hin, dass die Disulfidbrücken des Antikörpermoleküls nicht geschlossen waren und es aufgrund der SDS-bedingten denaturierenden Bedingungen zu einem Zerfall in Fragmente aus leichten und schweren Ketten kam. Um diese zu identifizieren, wurden im Anschluss an die Coomassiefärbung weitere Detektionsmethoden durchgeführt.

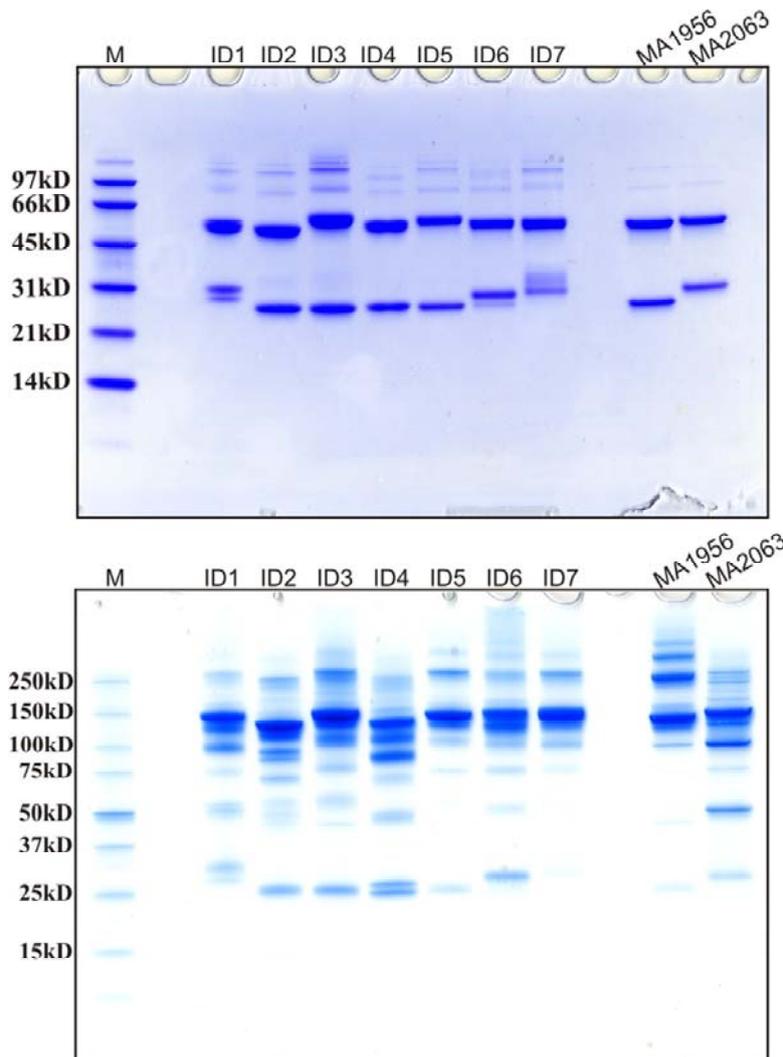


Abb. 10: SDS-PAGE von Idiotypen nach Coomassie-Färbung A) unter reduzierenden Bedingungen auf 12 %-SDS-Gel, B) unter nicht reduzierenden Bedingungen auf 4-12 %-SDS-Gel
M: Marker, **ID1-ID7:** Idiotyp 1-7 je 5 µg; **MA1956:** 5 µg monoklonaler Antikörper vom κ-Typ aus CHO-Zellen;
MA2063: 5 µg monoklonaler Antikörper vom λ-Typ aus CHO-Zellen

3.1.2 Nachweis von κ- Ketten

Die Idiotypen wurden mit einem polyklonalen Anti-Maus Antikörper, der mit der humanen leichten Kette vom κ- Typ reagierte, auf den Isotyp und das Vorhandensein von leichter Kette in verschiedenen Fragmenten unterschiedlichen Molekulargewichtes untersucht. Die untersuchten Idiotypen wiesen alle, außer ID1 und ID4, die Sequenz einer κ- Kette auf. Die leichten Ketten von ID1 und ID4 waren vom λ-Typ.

Abb. 11 zeigt die Reaktion mit dem Antikörper gegen die κ- Kette nach SDS-PAGE und Western Blot unter nicht reduzierenden Bedingungen. Neben den Banden bei ~25 kD, welche die einzelne leichte Kette darstellte, war eine Vielzahl von Fragmenten

unterschiedlicher Molekulargewichte sichtbar. Idiotypen mit leichten Ketten vom λ - Typ wurden erwartungsgemäß nicht angefärbt.

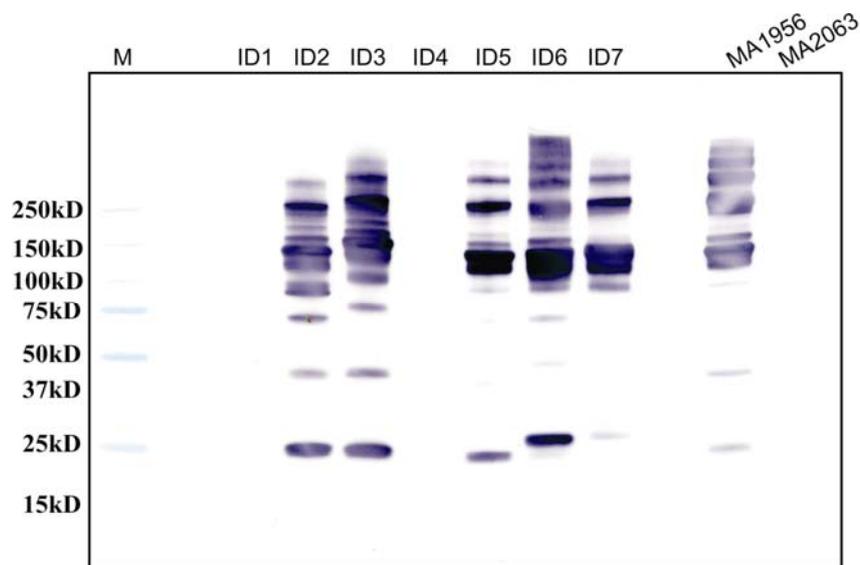


Abb. 11: Färbung der κ -Ketten nach SDS-PAGE und Western-Blot unter nicht reduzierenden Bedingungen auf 4-12 %-SDS-Gel

M: Prestained Marker, **ID1-ID7:** Idiotyp 1-7 je 2 μg ; **MA1956:** 2 μg monoklonaler Antikörper vom κ -Typ aus CHO-Zellen; **MA2063:** 2 μg monoklonaler Antikörper vom λ -Typ aus CHO-Zellen

Die Bande bei 50 kD lag im Molekulargewichtsbereich der schweren Kette. Es konnte sich jedoch dabei nicht um die schwere Kette handeln, denn die Anfärbung war für die κ -Kette spezifisch und eine Kreuzreaktion wurde durch weitere Versuche (nicht dargestellt) ausgeschlossen. Das Dimer einer leichten Kette hatte ebenfalls eine vorausgesagte Masse von ~ 50 kD. Ein weiteres Fragment dieser geringen Größe war nicht bekannt, denn das kleinstmögliche Fragment, das durch Zerfall des Antikörpers in seine Ketten entstehen konnte, bestand aus einer leichten Kette mit einer schweren Kette (HL) und hatte eine vorausgesagte Masse von 75 kD. In diesem Molekulargewichtsbereich konnten auch Signale detektiert werden. Die Signale bei ~ 50 kD wurden demnach von Dimeren der leichten Ketten vom κ - Typ hervorgerufen. ID7 war der einzige untersuchte Antikörper mit drei theoretischen Glykosylierungsstellen in der variablen Region der leichten Kette und zeigte kein Signal in diesem Größenbereich. Eventuell wurde eine Dimerisierung der leichten Kette durch die Oligosaccharidstrukturen sterisch verhindert. Alle anderen Signale mit Molekulargewichten größer als 50 kD mussten von Fragmenten, bestehend aus leichten und schweren Ketten hervorgerufen worden sein und konnten nach weiteren Detektionsmethoden im folgenden Abschnitt identifiziert werden.

3.1.3 Identifikation der Banden

Anhand des idiotypischen Antikörpers ID2 wurden die Banden durch Vergleich verschiedener Detektionsmethoden identifiziert (Abb. 12). Die Coomassiefärbung detektierte alle Fragmente, die κ -Ketten spezifische Anfärbung detektierte nur die leichten Ketten und Fragmente, die mindestens eine leichte Kette besaßen. Concavalin A ist ein für Mannose-spezifisches Lektin und stellt somit glykosylierte Ketten nach einem Western Blot dar. Da ID2 nur eine Glykosylierungsstelle in der konstanten Region der schweren Kette besaß, wurden schlussfolgernd nur diese oder Fragmente mit mindestens einer glykosylierten schweren Kette durch das Lektin angefärbt.

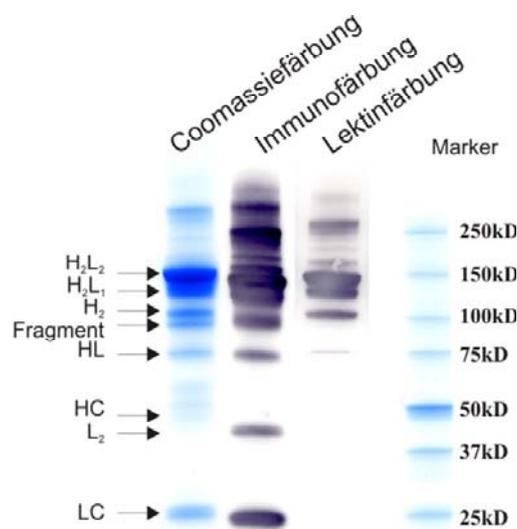


Abb. 12: Vergleich der Detektionsmethoden zur Identifikation der Banden.

ID2 wurde nach der elektrophoretischen Auftrennung durch SDS-PAGE direkt mit Coomassie G250 gefärbt, sowie nach dem Blotting auf eine PVDF-Membran mit einem κ -spezifischen Antikörper (Immunofärbung) und dem Lektin Concavalin A (Lektinfärbung) gefärbt. Die Coomassiefärbung detektierte alle Ketten und Fragmente von ID2, die Immunofärbung die leichte Kette von ID2 und die Lektinfärbung die glykosylierte schwere Kette von ID2. Für die Coomassiefärbung wurden 5 μ g ID2, für Immuno- und Lektinfärbung jeweils 2 μ g ID2 eingesetzt.

LC: Leichte Kette, **L₂:** Dimer der leichten Kette **HC:** Schwere Kette, **H₂:** Dimer der schweren Kette, **H₂L₁:** Zwei schwere Ketten mit einer leichten Kette, **H₂L₂:** vollständiger Antikörper

Während die Banden der leichten Ketten durch die Coomassie- und Immunofärbung detektiert wurden, konnten deren Dimere (L₂) unterhalb von 50 kD nur durch die κ -Ketten spezifische Anfärbung detektiert werden. Die Menge an L₂ war für eine Detektion durch Coomassie scheinbar zu gering. Bei 50 kD waren im Coomassie-gefärbten Gel schwache Signale zu sehen, die weder der leichten Kette, noch der glykosylierten schweren Kette entsprachen. Das Vorhandensein von nicht-glykosylierter schwerer Kette war grundsätzlich möglich, deren Menge schien jedoch ebenfalls sehr gering zu sein. Die Bande bei 75 kD

wurde durch Coomassie und durch die Anfärbung der leichten Ketten, aber auch mit schwacher Intensität durch die Lektinfärbung detektiert. Daher musste es sich um ein Fragment bestehend aus schwerer und leichter Kette handeln. Das Monomer (HL) des heterodimeren Antikörpermoleküls hatte eine vorausgesagte Masse von ~75 kD und entsprach somit der Bande in diesem Molekulargewichtsbereich (Abb. 12). Darüber war zwischen 90-100 kD eine Doppelbande zu sehen. Die untere Bande wurde durch Coomassie und die Immunofärbung detektiert, die obere Bande wurde durch Coomassie und das Lektin Concavalin A gefärbt. Letztere musste das Dimer der schweren Kette (H_2) darstellen, das eine vorausgesagte Masse von ~100 kD hatte. Die untere Bande konnte zu diesem Zeitpunkt noch nicht identifiziert werden, denn rechnerisch konnte auf kein Fragment mit leichten und schweren Ketten voller Länge geschlossen werden. Dementsprechend war die Bande ein möglicher Hinweis auf Fragmente aus unvollständigen Ketten, die nur durch Spaltung der Ketten entstanden sein konnten.

Die Banden zwischen 120-150 kD wurden durch alle Detektionsmethoden angefärbt, sodass es sich auch im Hinblick auf die Molekulargewichte nur um den Antikörper mit einer fehlenden leichten Kette (H_2L_1) und dem kompletten Antikörpermolekül (H_2L_2) handeln konnte.

3.1.4 Nachweis von glykosylierten Ketten

Die Idiotypen hatten neben der konservierten Glykosylierungsstelle am Asn297 der schweren Kette eine unterschiedliche Anzahl theoretischer Glykosylierungsstellen in den variablen Regionen von leichten und schweren Ketten.

Abb. 13 zeigt die Anfärbung mit dem Lektin Concavalin A, das für gebundene Mannosehaltige Oligosaccharidstrukturen spezifisch ist, unter reduzierenden Bedingungen. Dabei wurde erwartungsgemäß die schwere Kette aller Idiotypen mit einem Molekulargewicht von ~50 kD gefärbt. ID3 ist der Antikörper mit den meisten theoretischen Glykosylierungsstellen in der schweren Kette, nämlich vier. Dessen Bande erschien breiter als die der anderen schweren Ketten. Bei starker Vergrößerung (nicht dargestellt) war zu erkennen, dass mehrere Banden mit geringem Unterschied des Molekulargewichtes übereinander lagen, wobei die genaue Anzahl nicht bestimmt werden konnte. Die Färbung mit Concavalin A konnte jedoch zeigen, dass mehrere theoretische Glykosylierungsstellen besetzt waren. Im Gegensatz dazu zeigte sich die schwere Kette von ID2 als einzelne Bande. Dies bestätigte, dass bei diesem Idiotypen neben der konservierten Glykosylierungsstelle keine weiteren Glykosylierungsstellen vorhanden waren.

Theoretische Glykosylierungsstellen in den variablen Regionen der leichten Ketten waren laut Sequenz bei ID1, ID6 und ID7 vorhanden. Dies wurde durch die Untersuchung bestätigt. Die Anzahl der Banden im Lektinblot gab Hinweise auf die Anzahl der tatsächlichen

Besetzung der theoretischen Glykosylierungsstellen. Die glykosylierten leichten Ketten von ID1 und ID6 erschienen gemäß den theoretischen Glykosylierungsstellen, die sich bei beiden Idiotypen auf eine beschränkte, im Lektinblot als einzelne Bande. Das Signal der leichten Kette von ID7 erschien entsprechend der drei theoretischen Glykosylierungsstellen als mehrfach übereinander gelagerte Banden. Die genaue Anzahl war nicht zu bestimmen.

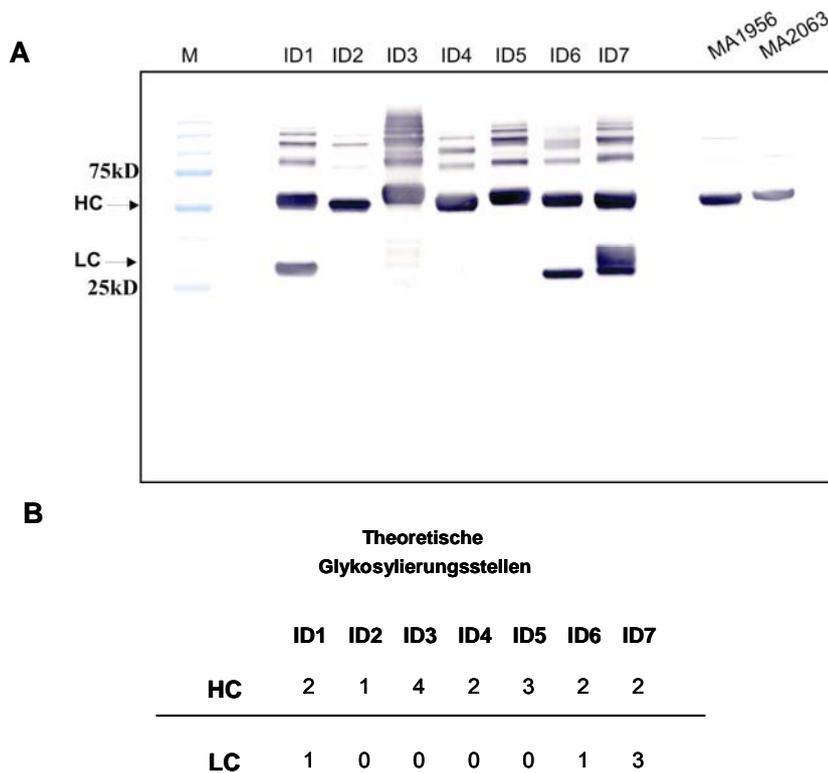


Abb. 13: Lektinblot von idiotypischen Antikörpern ID1 – ID7 unter reduzierenden Bedingungen (A) und deren theoretische Glykosylierungsstellen (B)

Jeweils 2 µg Antikörper wurden in einer SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen auf einem 12 %igen SDS-Gel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet und mit dem Lektin Concanavalin A detektiert.

M: Marker, **ID1-ID7:** Jeweils 2 µg Idiotyp 1-7; **MA1956:** 2 µg monoklonaler Antikörper vom κ-Typ aus CHO-Zellen; **MA2063:** 2 µg monoklonaler Antikörper vom λ-Typ aus CHO-Zellen

Der direkte Vergleich des Lektinblots mit der Coomassiefärbung (Abb. 14) zeigte am Beispiel von ID1 und ID6, dass die Doppelbanden in denen sich deren leichte Ketten darstellten, jeweils der nicht-glykosylierten und der glykosylierten leichte Kette entsprach. Das Verhältnis der Signalintensitäten war dabei unterschiedlich. ID1 zeigte in etwa die gleiche Intensität für die glykosylierte und die nicht-glykosylierte leichte Kette, was vermuten ließ, dass beide Ketten in einem etwa gleich großen Verhältnis in der Probe waren. ID6 zeigte dagegen eine intensivere Anfärbung der glykosylierten Kette im Gegensatz zu einer sehr schwachen Färbung der Bande, welche die nicht-glykosylierte leichte Kette darstellte.

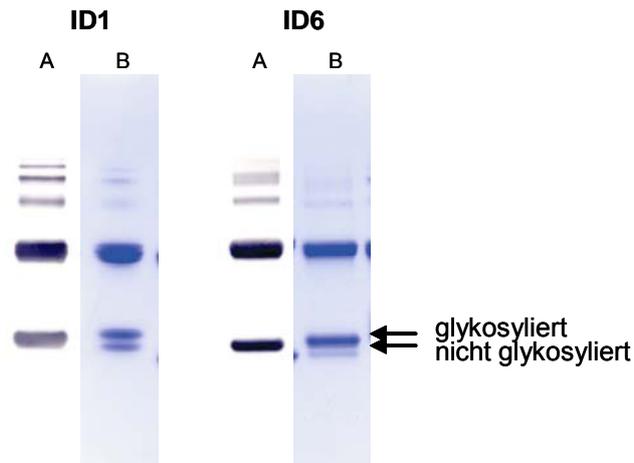


Abb. 14: Vergleich von Lektin- (A) und Coomassiefärbung (B) von Idiotypen ID1 und ID6 nach SDS-PAGE (12 %) und Western-Blot unter reduzierenden Bedingungen

Glykosylierte leichte Ketten schienen demnach in höherem Maße vorzukommen, als nicht-glykosylierte leichte Ketten.

3.1.5 Zweidimensionale Elektrophorese

Bei der zweidimensionalen Elektrophorese werden die Proteine in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt und in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. In der Regel wird diese unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Durch den Harnstoffpuffer werden die Proteine entfaltet, so dass alle ionisierbaren Gruppen exponiert werden. Das im Puffer enthaltene Detergenz CHAPS verhindert die Aggregation von Proteinen durch hydrophobe Wechselwirkung. Durch die Zugabe von DTT werden alle Disulfidbrücken aufgebrochen und die Antikörper liegen in einzelnen Ketten vor. Wird die 2D-Elektrophorese unter nicht reduzierenden Bedingungen im Harnstoffpuffer ohne DTT durchgeführt, bleiben kovalente Bindungen in der Regel erhalten und nur die nichtkovalenten Bindungen werden gelöst. Dadurch denaturieren globuläre Proteine mehr oder weniger zu ungefalteten Zufalls-Konformationen. Manche können eventuell ihre ursprüngliche native Konformation wieder zurückgewinnen, da die Tertiärstruktur die thermodynamisch stabilste Konformation darstellt. Zur Analyse der idiotypbedingten Heterogenität wurde die zweidimensionale Elektrophorese sowohl unter reduzierenden, als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Zusätzlich wurde ein monoklonaler Antikörper vom κ -Typ aus CHO-Zellen (MA1956) unter den gleichen Bedingungen zweidimensional aufgetrennt. Abb. 15 zeigt die Auftrennung der Idiotypen unter reduzierenden Bedingungen. Die Disulfidbrücken wurden aufgebrochen und leichte und schwere Ketten lagen im Gel getrennt bei ~25 kD und ~50 kD vor.

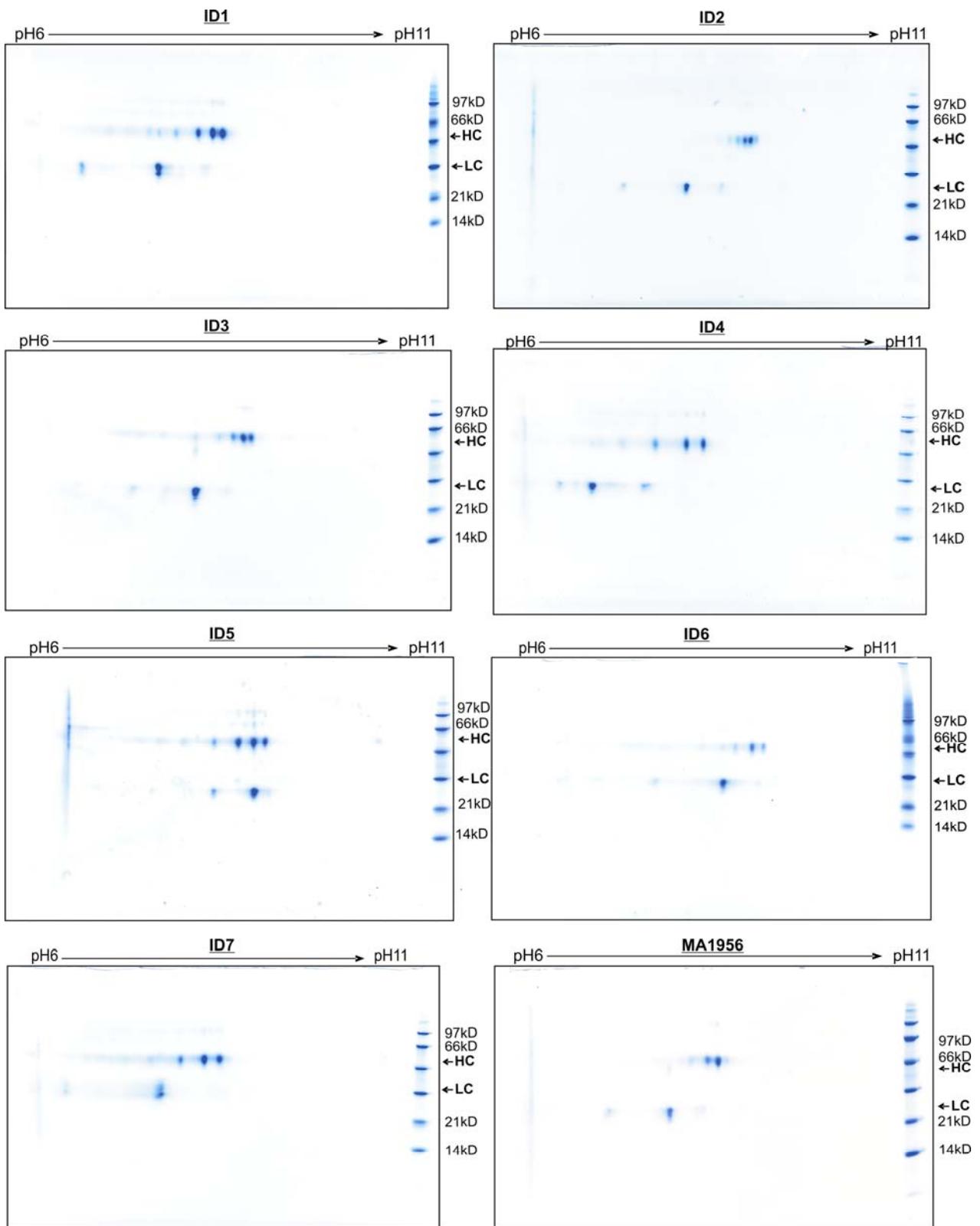


Abb. 15: Antikörper aus *Nicotiana benthamiana* und CHO-Zellen nach zweidimensionaler Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen. Jeweils 7 μ g der idiotypischen Antikörper ID1-ID7 aus *N. benthamiana* und 7 μ g des monoklonalen Antikörpers MA1956 aus CHO-Zellen wurden in der ersten Dimension in einem pH-Bereich von 6-11 nach dem isoelektrischen Punkt und in der zweiten Dimension nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Gele wurden mit Coomassie G250 gefärbt und eingescannt. **LC:** Leichte Kette; **HC:** Schwere Kette

Beide Ketten zeigten eine je nach Idiotyp mehr oder minder große Komplexität, die sich in der Auftrennung der Ketten zu Spots mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten und Molekulargewichten widerspiegelte. Bei den leichten Ketten beschränkte sich die ladungsbedingte Komplexität bei allen Idiotypen auf einen Hauptspot und einen bis zwei weitere schwächer gefärbte Spots mit stark abweichenden isoelektrischen Punkten. Ein Unterschied zwischen κ - oder λ -Typen konnte, wie in der SDS-PAGE, auch hier nicht festgestellt werden. Weitere Unterschiede zwischen den leichten Ketten der idiotypischen Antikörper lagen im N-terminalen Glutamin, welches zu Pyroglutaminsäure zyklisieren und folglich zu einer Veränderung des isoelektrischen Punktes führen kann. N-terminales Glutamin besaßen nur ID1, ID4 und ID7. Diese zeigten jedoch kein anderes Spotmuster der leichten Kette als die übrigen idiotypischen Antikörper oder der MA1956 aus CHO-Zellen.

Von den Antikörpern mit Glykosylierungssignalen in ihren leichten Ketten (ID1, ID6 und ID7), waren nur bei ID1 und ID7 Spots der leichten Kette mit geringem unterschiedlichem Molekulargewicht zu sehen. Diese stellten, wie bereits durch die SDS-PAGE festgestellt, glykosylierte und nicht-glykosylierte leichte Ketten dar. Gleiches wurde in der SDS-PAGE auch für ID6 gezeigt, allerdings war das Signal der nicht-glykosylierten leichten Kette von sehr schwacher Intensität, sodass es in der zweidimensionalen Auftrennung nicht in diesen geringen Mengen nachgewiesen werden konnte.

Das Spotmuster der schweren Ketten aller Idiotypen war in Bezug auf die Ladung deutlich komplexer, als das der leichten Ketten. Eine massenbedingte Heterogenität, hervorgerufen durch Glykosylierungen konnte allerdings aufgrund der geringen Unterschiede des Molekulargewichtes von einfach oder mehrfach glykosylierten schweren Ketten im oberen Molekulargewichtsbereich der Gele nicht beobachtet werden. Die Komplexität des Spotmusters der schweren Ketten bezog sich demnach auf die Ladung. Je nach Idiotyp waren die Spots der schweren Ketten über einen mehr oder minder großen pH-Bereich aufgespalten, wobei die isoelektrischen Punkte der schweren Ketten nicht so stark voneinander abwichen, wie die der leichten Ketten. Das unterschiedliche Spotmuster, in dem sich die schwere Kette eines jeden idiotypischen Antikörpers aufspaltete, waren Hinweise auf eine Vielzahl unterschiedlicher Modifikationen. ID2 und MA1956 besaßen mit nur einer Glykosylierungsstelle in der konstanten Region und einem N-terminalen Glutamin in der schweren Kette sehr ähnliche theoretische Eigenschaften. Scheinbar führte dies zu einem vergleichbaren Migrationsverhalten des ID2 aus Pflanzen und des MA1956 aus CHO-Zellen, denn die Darstellung in der zweidimensionalen Elektrophorese war ähnlich. Weitere ähnliche Eigenschaften wurden für ID4 und ID6 vorausgesagt, denn beide besaßen zwei Glykosylierungssignale und N-terminales Glutamin in der schweren Kette. Abgesehen von dem unterschiedlichen isoelektrischen Punkt zeigten die schweren Ketten beider Idiotypen jedoch auch ein voneinander abweichendes Laufverhalten, was sich in der Aufspaltung der

Spots über den pH-Bereich widerspiegelte. Die Spots der schweren Kette von ID4 spalteten sich über einen größeren pH-Bereich auf, als die der schweren Kette von ID6. Demnach konnten anhand des Spotmusters keine Rückschlüsse auf den Einfluss bestimmter Modifikationen geschlossen werden, da die theoretischen Eigenschaften und das Migrationsverhalten aller Idiotypen sehr unterschiedlich waren.

Die zweidimensionale Auftrennung unter nicht reduzierenden Bedingungen verdeutlichte die Heterogenität der Antikörper und ist in Abb. 16 dargestellt.

Wie in der eindimensionalen SDS-PAGE waren in der zweidimensionalen Elektrophorese unter nicht reduzierenden Bedingungen verschiedene Signale mit unterschiedlichen Molekulargewichten zu beobachten. Die Spots entsprachen den bereits in der SDS-PAGE identifizierten Banden der leichten Ketten (LC) und deren Dimeren (L_2), den schweren Ketten (HC) und deren Dimeren (H_2), sowie dem H_2L_1 -Molekül und dem kompletten Antikörper (H_2L_2). Im Gegensatz zur eindimensionalen SDS-PAGE, bei der die Hauptbande den kompletten Antikörper darstellte, konnte nach der zweidimensionalen Auftrennung ein intensiveres Signal zugunsten der leichten Kette und dem H_2 -Molekül festgestellt werden. Das HL-Molekül konnte nach zweidimensionaler Auftrennung nicht mehr nachgewiesen werden. Die zweidimensionale Elektrophorese läuft unter wesentlich stärker denaturierenden Bedingungen, wie die eindimensionale SDS-PAGE, sodass restlos alle nichtkovalenten Wechselwirkungen aufgelöst werden und der nicht durch Disulfidbrücken verbundene Antikörper in die einzelnen Ketten zerfällt. Da das H_2 -Molekül eines der Hauptsignale darstellte, schien die Disulfidbrücke in der Hinge Region zwischen zwei schweren Ketten meist verbunden zu sein. Die leichten Ketten schienen dagegen in den meisten Fällen nur über nichtkovalente Wechselwirkungen mit der schweren Kette verknüpft zu sein. Unter weniger stark denaturierenden Bedingungen wurden in der SDS-PAGE nicht alle nichtkovalenten Wechselwirkungen gelöst, sodass die Mengen an HL-, H_2L_1 - und H_2L_2 -Molekül in der eindimensionalen SDS-PAGE größer waren, als nach zweidimensionaler Elektrophorese. Hier lösten die starken denaturierenden Bedingungen des Harnstoffs alle nichtkovalent gebundenen leichten Ketten und es entstand hauptsächlich freie leichte Kette und das H_2 -Molekül. Durch den Zerfall des HL-Moleküls konnte nach zweidimensionaler Auftrennung ein stärkeres Signal der schweren Kette beobachtet werden, als nach eindimensionaler SDS-PAGE, bei der das Signal der schweren Kette nach Coomassiefärbung nur zu erahnen war.

Der Vergleich der zweidimensionalen Auftrennung vor und nach Reduktion zeigte Unterschiede in den Signalintensitäten aller leichten Ketten. Diese werden im folgenden Abschnitt (3.1.6) genauer beschrieben.

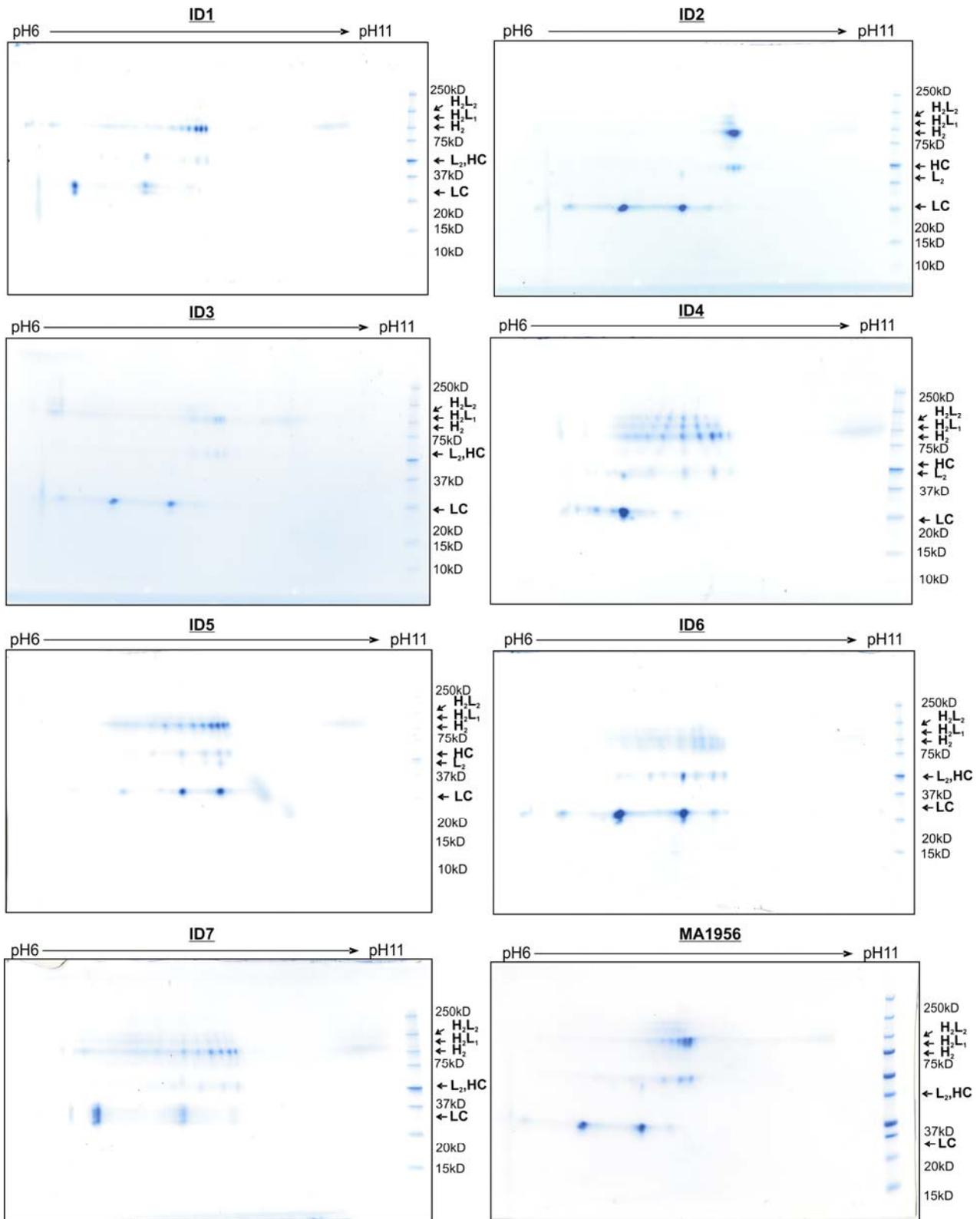


Abb. 16: Antikörper aus *Nicotiana benthamiana* und CHO-Zellen nach zweidimensionaler Elektrophorese unter nicht reduzierenden Bedingungen. Jeweils 7 μ g Antikörperprobe wurde in der ersten Dimension in einem pH-Bereich von 6-11 nach dem isoelektrischen Punkt und in der zweiten Dimension nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Gele wurden mit Coomassie G250 gefärbt und eingescannt. **ID1-ID7:** Idiotypische Antikörper aus *N. benthamiana*, **MA1956:** Monoklonaler Antikörper aus CHO-Zellen, **LC:** Leichte Kette, **L₂:** Dimer der leichten Kette **HC:** Schwere Kette, **H₂:** Dimer der schweren Kette, **H₂L₁:** Zwei schwere Ketten mit einer leichten Kette, **H₂L₂:** vollständiger Antikörper

3.1.6 Vergleich von leichten Ketten in der 2D-Elektrophorese

Die leichten Ketten aller Idiotypen spalteten sich unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen in 2-3 Spot mit unterschiedlichem isoelektrischen Punkt auf. Die isoelektrischen Punkte der Spots waren bei beiden Bedingungen gleich, zeigten aber im Hinblick auf die Anfärbung eine Verlagerung zu dem jeweiligen Spot mit niedrigerem isoelektrischen Punkt. Abb. 17 zeigt den Unterschied des elektrophoretischen Verhaltens der leichten Ketten unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen am Beispiel der Idiotypen ID1 und ID3.

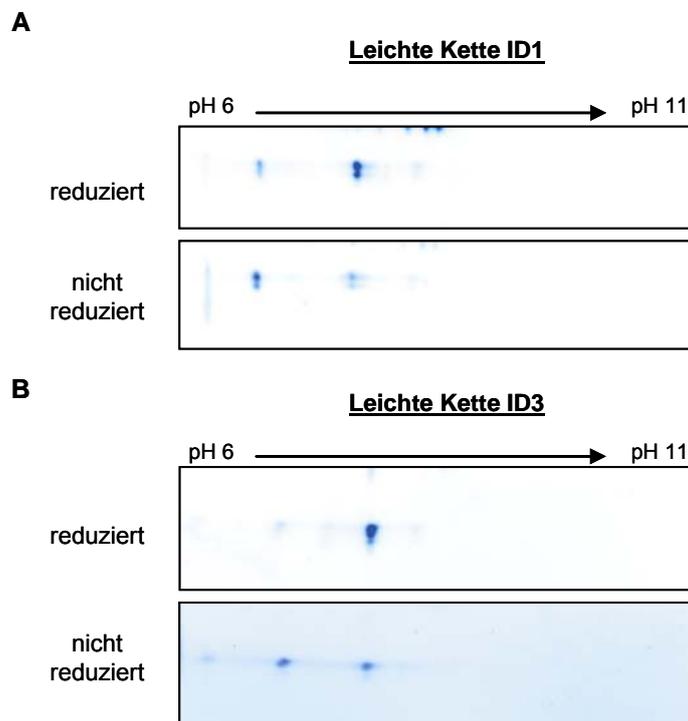


Abb. 17: Vergleich der leichten Ketten nach zweidimensionaler Auftrennung unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen von ID1 (A) und ID3 (B) nach Coomassie-Färbung.

Während unter reduzierenden Bedingungen jeweils der Spot mit höherem isoelektrischen Punkt die stärkere Anfärbung zeigte und der Spot im sauren Bereich als Nebenspot erschienen, wurde unter nicht reduzierenden Bedingungen jeweils der Spot im sauren Bereich stärker oder zumindest gleich dem Spot im basischen Bereich angefärbt. Die Ursache dafür war zu diesem Zeitpunkt noch unklar, deutete aber darauf hin, dass an einigen freien leichten Ketten eine Modifikation vorlag, die durch Reduktion der Cysteine entfernt wurde, was zu einer Verschiebung des isoelektrischen Punktes in einen basischeren Bereich führte.

3.1.7 Massenspektrometrische Analyse von idiotypischen Antikörpern

Bei der Elektrospray-Ionisation kommt es zu einer Bildung von mehrfach geladenen Ionen. Daraus ergibt sich eine statistische Verteilung über die verschiedenen Ladungszustände, die zeigt, dass eine bestimmte Anzahl von Ladungszuständen mit höherer Wahrscheinlichkeit auftreten kann als andere. Da benachbarte Ladungszustände sich um eine Ladung voneinander unterscheiden, kann eine geeignete Software daraus das Molekulargewicht des Moleküls berechnen und es ergibt sich das dekonvolvierte Spektrum.

Um Informationen über die exakte Masse und mögliche posttranslationale Modifikationen der einzelnen Ketten zu erhalten wurden die Idiotypen nativ und reduziert per ESI-Q-TOF gemessen. Für eine Analyse aller posttranslationalen Modifikationen wäre eine Deglykosylierung der Proteine von Vorteil gewesen. So hätten die Antikörper und Glykane separat gemessen werden können. Dies war allerdings nicht möglich. Die PNGase F, die in der Regel für die Deglykosylierung von Proteinen verwendet wird, spaltet keine pflanzenspezifischen Zucker mit α 1,3- Fucose. Eine für pflanzenspezifische Oligosaccharide erhältliche PNGase A spaltet nur nach vorheriger Spaltung der Proteine in Peptide, was eine vorherige Reduktion erfordert. Dadurch wäre ein Vergleich zwischen nativen und reduzierten Ketten nicht möglich gewesen. Die Glykosylierungen beeinflussten die Messungen teilweise erheblich. Zum einen schirmten die Oligosaccharide bei der Ionisierung die zu protonierenden basischen Aminosäuren ab, so dass diese Proteine entweder schlecht oder gar nicht gemessen werden konnten. Zum anderen war die Auswertung der Spektren aufgrund der ausgeprägten Mikroheterogenität (Varianten, in denen ein Glykoprotein auftreten kann, die sich in ein oder mehr Strukturmerkmalen der Glykosylierung unterscheiden) und dem Vorhandensein von mehreren Glykosylierungsstellen schwierig. Massensignale nativer Antikörper im Massenbereich um \sim 150 kD und das Glykosylierungsmuster der schweren Ketten konnten lediglich für ID2 gemessen werden, die der anderen Antikörper konnten nicht zugeordnet werden. Da die Veränderung des Glykosylierungsmusters der schweren Kette von ID2 an verschiedenen Tagen nach Infiltration im zweiten Teil dieser Arbeit ausführlich untersucht werden sollte, wurde hier auf eine Darstellung des Glykosylierungsmusters der schweren Kette verzichtet.

Die Signale der leichten Ketten waren unter nativen und reduzierenden Bedingungen am besten zu identifizieren. Die nicht-glykosylierten leichten Ketten wurden daraufhin in Bezug auf andere posttranslationale Modifikationen und die glykosylierten leichten Ketten in Bezug auf die Glykan-Mikroheterogenität untersucht.

3.1.7.1 Native massenspektrometrische Analyse von ID2

Die Messung der nativen idiotypischen Antikörper sollte Aufschluss über deren tatsächliche Struktur geben, denn in der Elektrophorese stellten die Antikörper sich unter den SDS- und Harnstoff-bedingten denaturierenden Bedingungen als Fragmente, bestehend aus einzelnen oder mehreren Ketten dar.

Für ID2 wurde eine molekulare Masse von 145453,8 Da vorausgesagt. Allerdings besaß ID2 N-terminales Glutamin in der schweren Kette, sowie eine Glykosylierungsstelle am Asn in der konstanten Region. Zusätzlich konnte eine Prozessierung des C-terminalen Lysins, die bei Antikörpern aus Säugerzellen bekannt ist, nicht ausgeschlossen werden. Die Berechnung von ID2 ohne Lysin (DesLys-Form) mit zyklisiertem N-terminalen Glutamin würde eine vorausgesagte Masse von 145163,4 Da ergeben.

Abb. 18 zeigt das Massenspektrum des nativen ID2 mit den dekonvolierten Spektren. Die gefundene Masse von 148455,3 Da zeigte eine Abweichung zu beiden vorausgesagten Massen um etwa 3000 Da. Diese entsprach mit großer Wahrscheinlichkeit den Glykosylierungen an beiden schweren Ketten, sodass das Massensignal mit 148455,3 Da den glykosylierten ID2 darstellte.

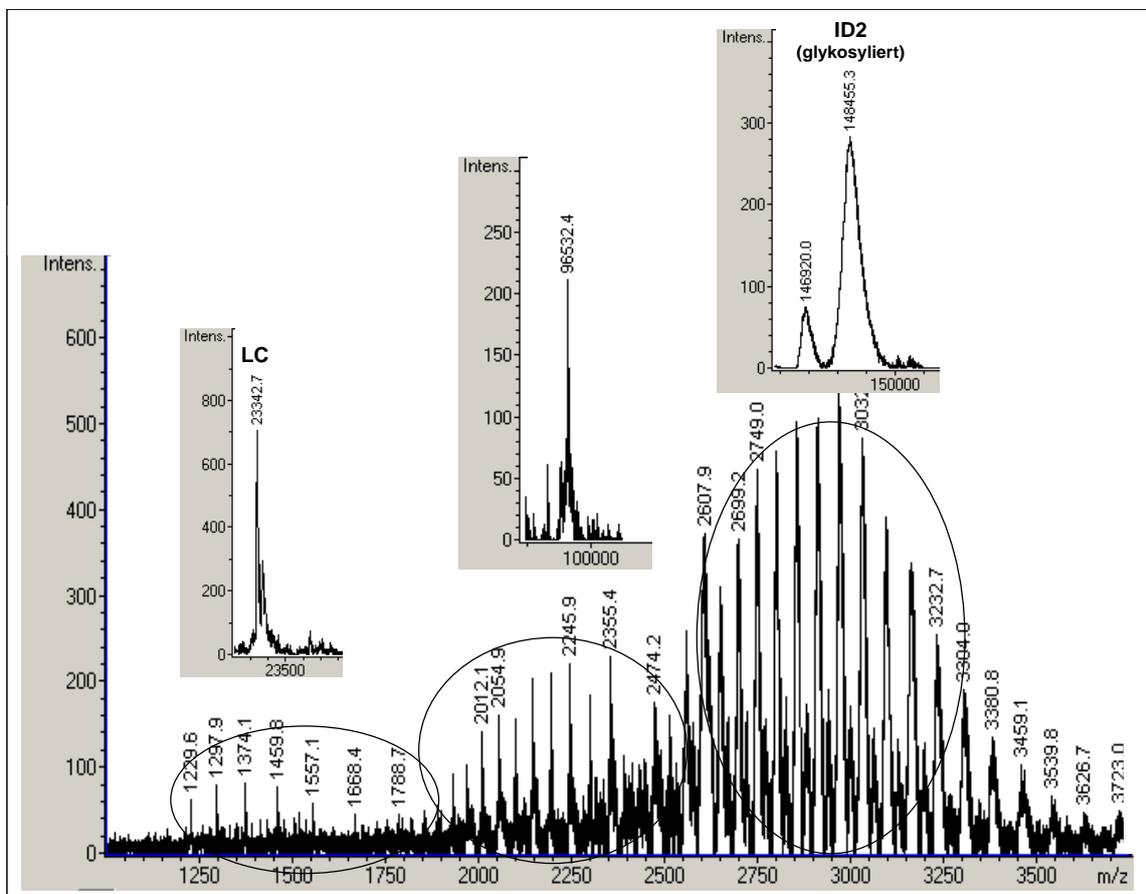


Abb. 18. Massenspektrum des nativ gemessenen idiotypischen Antikörpers ID2

Neben dem nativen ID2 konnte eine Masse von 23342,7 Da identifiziert werden, die mit einem Δ (Delta) von -0,3 Da der leichten Kette als SS-Form entsprach, denn diese hatte eine vorausgesagte Masse von 23343 Da. Eine weitere Masse von 96532,4 Da konnte nicht zugeordnet werden, denn diese war zu klein für ein Dimer der schweren Kette (~ 100 kD) und zu groß für das Monomer aus einer leichten und einer schweren Kette (~75 kD). Im selben Molekulargewichtsbereich wurde bereits eine Bande nach der Auftrennung von ID2 durch die SDS-PAGE detektiert (Abschnitt 3.1.3). Neben der Bande, war die durch die Massenspektrometrie bestimmte Masse von 96532,4 Da ein weiterer Hinweis auf das Vorhandensein von Fragmenten aus gespaltenen Ketten. Weitere Massen, die der Vielzahl von Fragmenten unter den denaturierenden Bedingungen in der ein- oder zweidimensionalen Elektrophorese entsprachen, konnten nicht gefunden werden.

3.1.7.2 Posttranslationale Modifikationen von nicht-glykosylierten leichten Ketten

Zur Analyse der Heterogenität von leichten Ketten wurden diese unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen mit ESI-Q-TOF gemessen. Da die Signale der glykosylierten leichten Ketten andere posttranslationale Modifikationen überdecken konnten, fand die Analyse nur für die nicht-glykosylierten leichten Ketten statt. Die Abb. 19-22 zeigen die dekonvolierten Spektren der nicht-glykosylierten leichten Ketten von ID2, ID3, ID4 und ID5 vor und nach Reduktion.

Die leichte Kette von ID2 bestand aus 215 Aminosäuren mit einer vorausgesagten Masse von 23343 Da als SS-Form und 23347 Da als SH-Form. Die gemessenen Massen von 23342,7 Da vor Reduktion und 23346,9 Da nach Reduktion stimmten mit den berechneten Massen überein (Abb. 19). Das Spektrum der nativen leichten Kette wies zusätzlich Massen

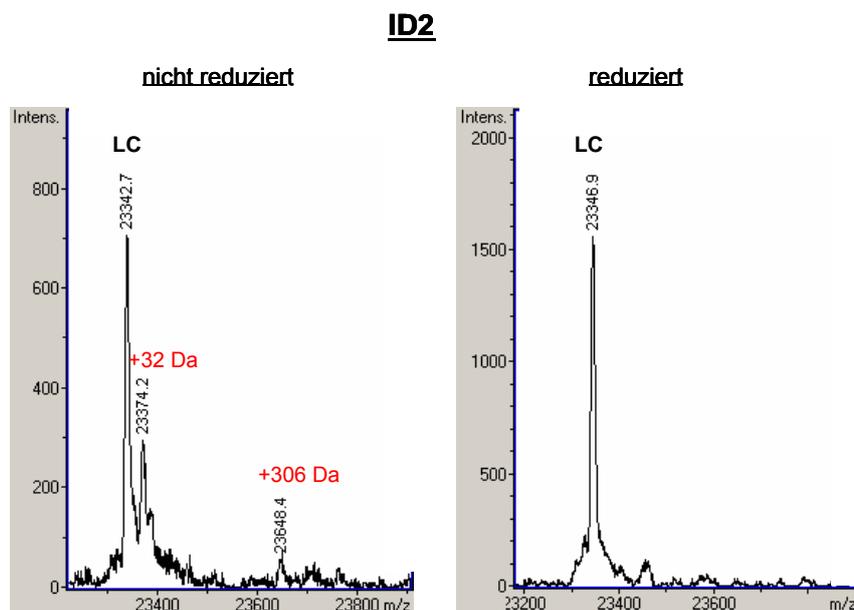


Abb. 19: Dekonvolierte Massenspektren der leichten Kette (LC) von ID2 vor und nach Reduktion

mit einer Differenz von +32 Da und +306 Da auf. Die Oxidation von Methionin oder Tryptophan ruft jeweils eine Differenz von +16 Da hervor. Eine zweifache Oxidation von Methionin zu Sulfon oder die Oxidation zweier verschiedener Aminosäurereste in der Sequenz der leichten Kette würde demnach ein vorausgesagtes Δ von +32 Da erzeugen und folglich der gemessenen Masse von $\sim 23374,2$ Da entsprechen.

Die Modifikation eines Proteins durch Glutathionylierung würde zu einer Differenz von +305 Da führen. Die Differenz entsprach mit einer Abweichung von ~ 1 Da dem schwachen Signal bei 23648,4 Da. Das Fehlen des Signals nach Reduktion verstärkte die Vermutung einer Modifikation durch Glutathion, da die Reduktion der Cysteine zu einer Sulfhydrylgruppe und somit zur Entfernung von Glutathion führt. Desweiteren untermauerte auch die Betrachtung der zweidimensionalen Elektrophorese diese Vermutung, denn die Entfernung des Glutathions durch Reduktion der Cysteine würde zu einer schnelleren Wanderung der leichten Kette in Richtung des basischen Bereiches führen. Demnach würde die leichte Kette, wie in der zweidimensionalen Analyse beobachtet (Abb. 17), unter reduzierenden Bedingungen ein Signal erzeugen, das mehr im basischeren Bereich liegt, als unter nicht reduzierenden Bedingungen.

Das Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse der leichten Kette von ID3 ist in Abb. 20 dargestellt. Die leichte Kette von ID3 zeigte ein ähnliches Massenspektrum nach Dekonvolution, wie die leichte Kette von ID2. Die leichte Kette von ID3 bestand aus 212 Aminosäuren mit einer vorausgesagten Masse von 23173 Da als SS-Form und 23177 Da als SH-Form. Die gemessenen Massen von 23172,3 Da für die SS-Form und 23176,8 Da für die reduzierte leichte Kette stimmten mit den vorausgesagten Massen überein.

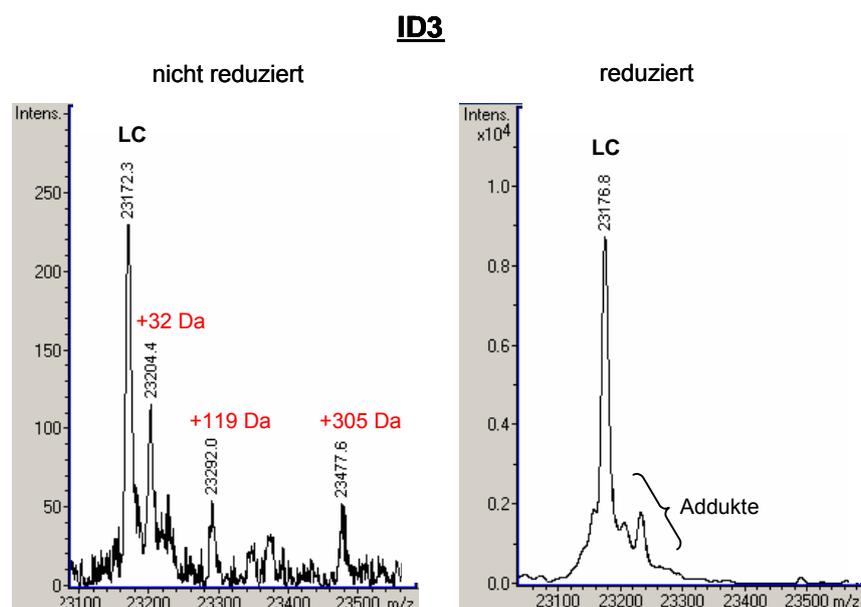


Abb. 20: Dekonvolierte Massenspektren der leichten Kette (LC) von ID3 vor und nach Reduktion

Außer den bereits beschriebenen Massen mit einem Δ von +32 Da und +305 Da zu der SS-Form der leichten Kette, konnte vor Reduktion zusätzlich eine Masse mit einer Differenz von +119 Da identifiziert werden. Unter den bekannten Modifikationen verursacht einzig eine Cysteinylierung eine Differenz von +119 Da. Auch dieses Signal konnte, wie die Signale mit dem Δ von +32 Da und +305 Da, nach Reduktion der Cysteine nicht mehr detektiert werden. Ebenso wie eine Modifikation durch Oxidationen und Glutathionylierung wird auch die Modifikation der Cysteinreste durch Cysteinylierung durch Reduktion entfernt.

Die Abb. 21 zeigt das dekonvolvierte Spektrum der leichten Kette von ID4. Diese bestand aus 217 Aminosäuren mit einer vorausgesagten Masse von 23020 Da als SS-Form und 23024 Da als SH-Form. Die gemessenen Massen von 23002, 5 Da für die native Form und 23006,1 Da für die reduzierte Form zeigten Abweichungen zu den vorausgesagten Massen. Der Grund dafür lag in der N-terminalen Aminosäure der leichten Kette von ID4, denn diese war Glutamin (Gln). Diese kann zu Pyroglutaminsäure (pGlu) zyklisieren, was zu einer Massendifferenz von -17 Da und somit zu einer vorausgesagten Masse von 23003 Da für die SS-Form und 23007 Da für die SH-Form führte. Die gemessenen Massen stimmten mit den vorausgesagten Massen für die zyklisierte Form überein. Die Zyklisierung des Glutamins muss zum größten Teil stattgefunden haben, denn es konnten keine Masse identifiziert werden, die einer nicht zyklisierten Form entsprachen.

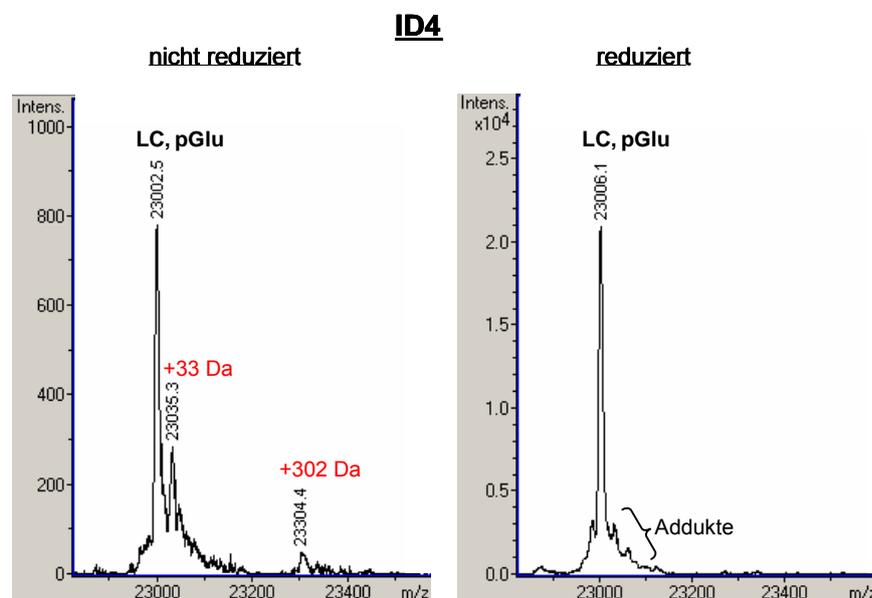


Abb. 21: Dekonvolvierte Massenspektren der leichten Kette (LC) von ID4 vor und nach Reduktion

Zusätzlich zu den Massen der leichten Kette von ID4 konnten auch hier die Massen identifiziert werden, die mit geringen Abweichungen den beschriebenen Oxidationen und Glutathionylierungen entsprachen. Beide Signale konnten nach Reduktion nicht mehr nachgewiesen werden.

Das gleiche galt auch für die leichte Kette von ID5, deren dekonvoliertes Spektrum in Abb. 22 dargestellt ist. Diese hatte eine vorausgesagte Masse von 23378,2 Da für die SS-Form und 23373,2 Da für die SH-Form. Die bestimmten Massen stimmten fast genau mit den vorausgesagten Massen überein. Die Massen mit dem Δ von +31 Da und +306 Da entsprachen bis auf jeweils 1 Da genau den Modifikationen durch Oxidation und Glutathionylierung. Auch hier waren diese Signale, wie bei ID2-ID4, nach Reduktion verschwunden.

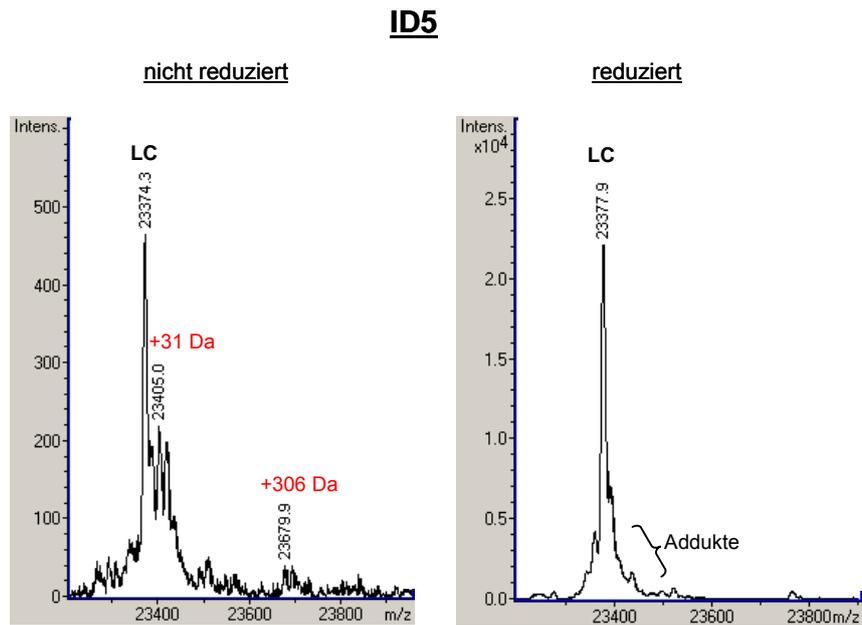


Abb. 22: Dekonvolierte Massenspektren der leichten Kette (LC) von ID5 vor und nach Reduktion

3.1.7.3 Glykan-Mikroheterogenität der leichten Ketten

Die Mikroheterogenität der N-Glykosylierung resultiert aus Variationen der angehängten Monosaccharide an die G0-Struktur (komplexer Typ) und den Oligosacchariden mit variabler Anzahl an Mannose-Resten (High-Mannose Typ). Zur Analyse dieser wurden die Antikörper mit glykosylierter leichter Kette nach Reduktion mittels ESI-Q-TOF gemessen.

Die Abb. 23 zeigt die Glykan-Mikroheterogenität der leichten Kette von ID1, die eine theoretische Glykosylierungsstelle besaß. Die nicht-glykosylierte leichte Kette hatte eine vorausgesagte Masse von 23001,5 Da. Eine Differenz von -17 Da für das N-terminale Glutamin der leichten Kette würde eine vorausgesagte Masse von 22984,5 Da ergeben. Die mit ESI-MS bestimmte Masse von 22984,6 Da stimmte bis auf 0,1 Da genau mit der vorausgesagten Masse für die zyklisierte Form überein. Zahlreiche weitere Massen entsprachen der zyklisierten leichten Kette mit unterschiedlichen N-gebundenen Oligosaccharidstrukturen. Diese waren jedoch alle von geringerer Intensität, als das Signal der nicht-glykosylierten leichten Kette.

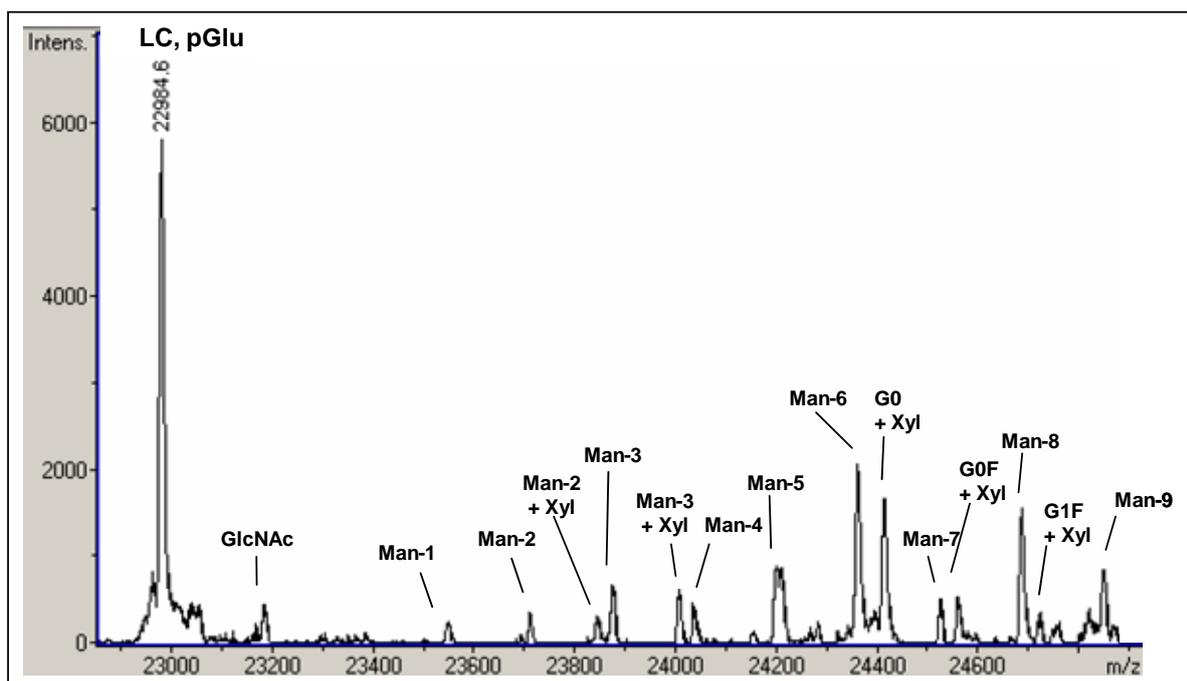


Abb. 23: Dekonvoliertes Massenspektrum der leichten Kette von ID1

Von Mannose-1 (Man-1) bis Mannose-9 (Man-9) konnten alle High-Mannose-Oligosaccharide nachgewiesen werden. Die kleineren High-Mannosen hatten teilweise zusätzlich einen Xylose-Rest (Xyl) gebunden. Eindeutige Signale von leichten Ketten mit komplexen Oligosacchariden konnten nur als G0+Xylose-Form festgestellt werden. Die Signale der komplexeren Formen, wie G0F+Xylose und G1F+Xylose waren von sehr

geringer Intensität. Die vorausgesagten und mit Massenspektrometrie bestimmten Massen der unterschiedlich glykosylierten leichten Kette sind in Tab. 21 zusammengefasst.

Tab. 21: Erwartete und gemessene Größen der leichten Kette von ID1 mit verschiedenen N-gebundenen Oligosacchariden

	Erwartet [Da]	Δ [Da]	Gemessen [Da]
Leichte Kette, N-terminal zyklisiert	22985		22985
+ GlcNAc 	23188	+ 203	23187
+ Man-1 	23553	+ 568	23553
+ Man-2 	23715	+ 730	23714
+ Man-2 + Xyl 	23847	+ 862	23847
+ Man-3 	23877	+ 892	23877
+ Paucimannose 	24009	+ 1024	24008
+ Man-4 	24039	+ 1054	24036
+ Man-5 	24201	+ 1216	24201
+ Man-3 + GlcNAc + Xyl 	24212	+ 1227	24212
+ Man-6 	24363	+ 1378	24362
+ G0 + Xyl 	24415	+ 1430	24415
+ Man-7 	24525	+ 1540	24526
+ G0F + Xyl 	24561	+ 1576	24560
+ Man-8 	24687	+ 1702	24688
+ G1F + Xyl 	24723	+ 1738	24725
+ Man-9 	24849	+ 1864	24852

 GlcNAc
  Mannose
  α 1,2-Xylose
  α 1,3- Fucose
  β 1,3-Galactose

Anhand des Spektrums konnte keine quantitative Bestimmung der verschiedenen Formen der leichten Kette erfolgen, da Glykosylierungen die zu protonierenden basischen Aminosäuren abschirmen können. Die Abschirmung führt zu einer verminderten Beschleunigung im elektrischen Feld. Die im Vergleich zur nicht-glykosylierten leichten Kette schwächeren Signale der glykosylierten Formen spiegelten aber die Ergebnisse der Coomassiefärbung nach eindimensionaler SDS-PAGE wieder, die eine in etwa gleich starke Anfärbung von glykosylierter und nicht-glykosylierter leichter Kette von ID1 zeigte (Abb. 14).

Das dekonvolvierte Spektrum der leichten Kette von ID6 (Abb. 24) zeigte eine geringere Mikroheterogenität der N-gebundenen Glykosylierungen. Im Vergleich zur leichten Kette von ID1 konnten weniger kleine High-Mannose Typen, aber dafür mehr komplexe Oligosaccharide nachgewiesen werden. Die Peakintensität der leichten Kette mit G0F + Xylose war am höchsten.

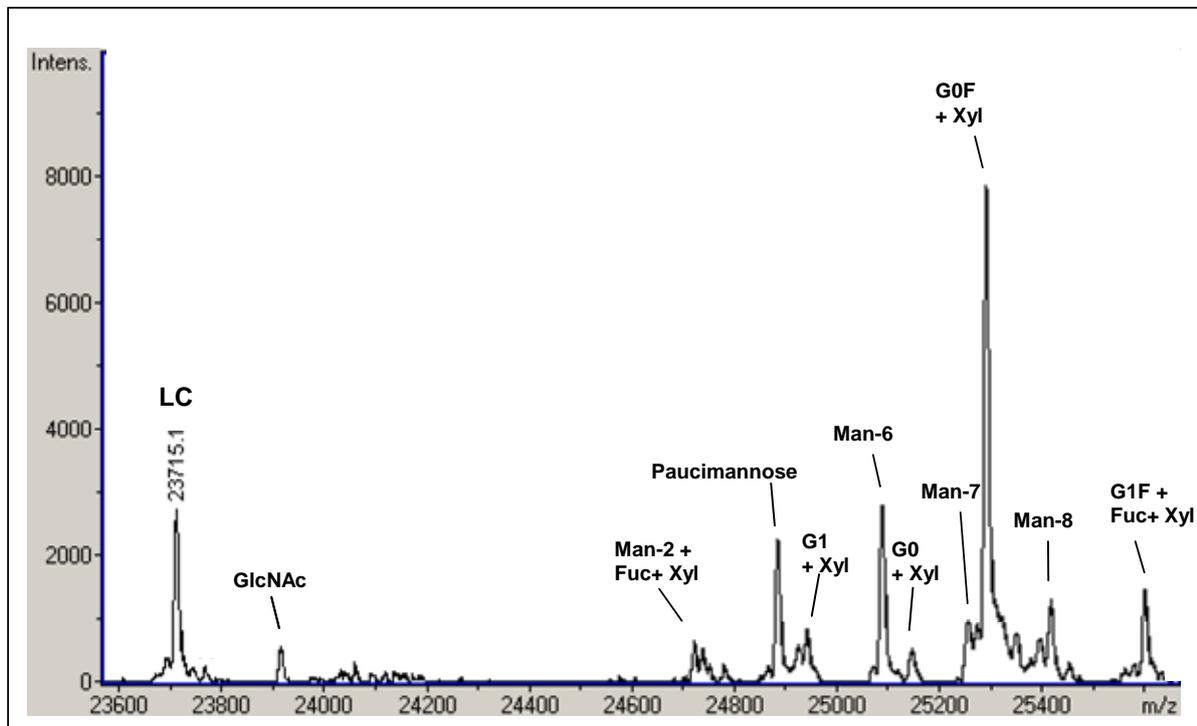


Abb. 24: Dekonvolviertes Massenspektrum der leichten Kette von ID6

Das Signal der nicht-glykosylierten leichten Kette mit einer Masse von 23715,1 Da war im Vergleich zu der glykosylierten leichten Kette mit G0F+Xylose geringer ausgeprägt. Dies korrelierte ebenfalls mit der Coomassiefärbung nach eindimensionaler SDS-PAGE (Abb. 14), bei der die obere Bande im Molekulargewichtsbereich der leichten Kette, die laut Lektinblot die glykosylierte Form widerspiegelte, stärker angefärbt war, als die untere Bande, die die nicht-glykosylierte Form widerspiegelte.

Die leichte Kette von ID7 hatte eine vorausgesagte Größe von 23849 Da, drei theoretische Glykosylierungsstellen und die N-terminale Aminosäure war Glutamin. Es konnten Massen nachgewiesen werden, die der zyklisierten leichten Kette ohne (23833,2 Da) und mit verschiedenen komplexen N-gebundenen Oligosacchariden entsprachen. Das Glykosylierungsmuster der leichten Kette von ID7, das in Abb. 25 dargestellt ist, zeigte eine ähnliche Mikroheterogenität wie die leichte Kette von ID6, die nur eine theoretische Glykosylierungsstelle (Abb. 24) besaß. Der Massenpeak der leichten Kette mit G0F+Xylose

war, wie bei der leichten Kette von ID6, am höchsten. High-Mannose Typen konnten nur als Man-8 nachgewiesen werden.

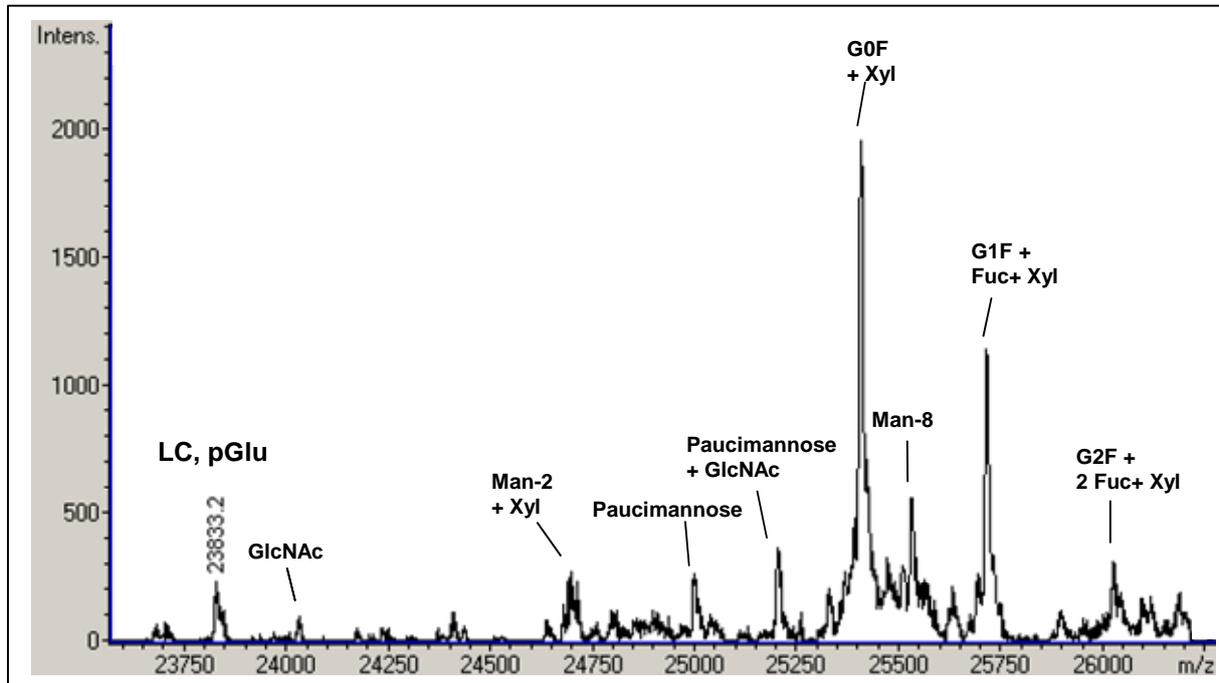


Abb. 25: Dekonvoliertes Massenspektrum der leichten Kette von ID7

Die G2F-Struktur mit zwei weiteren α -1,4 gebundenen Fucosen und einem Xylose-Rest (G2F + 2 Fuc + Xylose) wird als Lewis A-Formation bezeichnet. Diese komplexeste Form der pflanzlichen N-gebundenen Oligosaccharide konnte, im Gegensatz zu allen untersuchten glykosylierten leichten Ketten, als schwaches Signal nur an der leichten Kette von ID7 nachgewiesen werden.

3.2 Proteomikstudien

Antikörper sind sekretorische Proteine, deren Synthese und Assemblierung in Säugetieren bereits untersucht ist. Die Faltung und Glykosylierung der Ketten, sowie die Assemblierung der leichten und schweren Kette zum HL-Molekül erfolgt im endoplasmatischen Retikulum. Die kovalente Verknüpfung zweier HL-Moleküle zum Antikörper-Molekül erfolgt erst, wenn beide Monomere vollständig synthetisiert sind. Erfolgt keine rechtzeitige Ausbildung einer Disulfidbrücke von leichter zu schwerer Kette, so kann die leichte Kette unassembliert aus der Zelle sezerniert werden, die schwere Kette wird hingegen von dem Chaperon BiP (**B**inding **I**mmunoglobulin **P**rotein) gebunden und verbleibt in der Zelle (Haas und Wabl, 1983; Bole *et al.*, 1986). Wenn die leichte Kette in ausreichendem Maße vorhanden ist, lagert sich diese an die schwere Kette, das BiP wird verdrängt und es kommt zur Faltung und Oligomerisierung (Lee *et al.*, 1999). Der gebildete Komplex wird aus der Zelle sezerniert. Neben dem BiP sind eine Reihe anderer Faltungshelfer, wie die Proteindisulfidisomerase und Chaperone der Grp- (**G**lucose **r**egulated **p**rotein) Familie an der Assemblierung von Antikörpern beteiligt.

Die Synthese und Assemblierung von Antikörpern in lymphoidfreien Geweben, wie Pflanzenzellen, ist noch wenig untersucht, scheint aber bei gleichzeitiger Transformation eines entsprechenden Signal-Peptids ähnlich wie bei Säugetieren abzulaufen. Die Verwendung eines Signal-Peptids ist für die Akkumulation eines funktionellen Antikörpers unerlässlich (Smith, 1996) und führt zur Assemblierung des Antikörpers im Lumen des endoplasmatischen Retikulums und anschließender Sekretion in den apoplastischen Raum. Zum besseren Verständnis der Antikörper-Bildung in den Blättern von *Nicotiana benthamiana* wurde das Pflanzenmaterial verschiedener Wachstumsphasen von Tag 1-12 nach Einbringen des *Agrobacterium*-Virus Konstruktes für die Expression eines idiotypischen Antikörpers im Hinblick auf die Veränderung des Proteoms, sowie den zeitlichen Verlauf von Bildung und Abbau des Antikörpers in der Pflanzenzelle untersucht. Das Proteom der Antikörper produzierenden Pflanze wurde anschließend mit dem einer Wildtyp-Pflanze verglichen. Zusätzlich wurde auch das Proteom des Zellkulturüberstandes der MA1956-produzierenden CHO-Zelllinie an verschiedenen Tagen der Fermentation untersucht.

3.2.1 Vergleichende Proteomanalysen zu verschiedenen Tagen nach Infiltration

Für die Analysen wurde *N. benthamiana* ausgewählt, welche den Antikörper ID2 produzierte (*N. benthamiana* ID2). Die theoretischen Daten von ID2 waren mit denen des monoklonalen Antikörpers MA1956 aus CHO-Zellen vergleichbar. Beide hatten nur die konservierte Glykosylierungsstelle in der C_H2 Region der schweren Kette und besaßen N-terminales Glutamin. Das Spotmuster von ID2 und MA1956 in der zweidimensionalen Elektrophorese war ähnlich. Die Anzucht von 8 *N. benthamiana* ID2-Pflanzen wurde durch Icon Genetics (Halle an der Saale, Deutschland) durchgeführt. Jeweils eine der 8 Pflanzen wurde an Tag 1,2,5,6,7,8,9, und 12 nach Agroinfiltration geerntet, in feine Schnipsel zerkleinert, bei -80°C eingefroren und für die Analysen zur Verfügung gestellt.

3.2.1.1 Proteomanalyse nach 2D-Elektrophorese im pH-Bereich 3-10

Die Proteome von *N. benthamiana* ID2 an dpi 1,2,5,6,7,8,9 und 12 (dpi= day post infiltration) wurden zunächst von pH 3-10 aufgetrennt, eindeutig sichtbare Spots aus unterschiedlichen Gelen ausgestanzt und massenspektrometrisch identifiziert. Es konnten 65 Spots eindeutig identifiziert werden. Einige davon gehörten zu ein und demselben Protein, das sich aufgrund von Modifikationen in mehreren Spots mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten darstellte. Dadurch gab es für viele Spots Übereinstimmungen mit anderen Spots. Alle identifizierten Spots sind in Abb. 26 am Beispiel eines Gels des Proteoms von dpi 5 nach zweidimensionaler Auftrennung und anschließender Coomassiefärbung dargestellt. Die zugehörigen Proteinnamen sind in Tab. 22 entsprechend der Spotnummerierung im Gel aufgeführt.

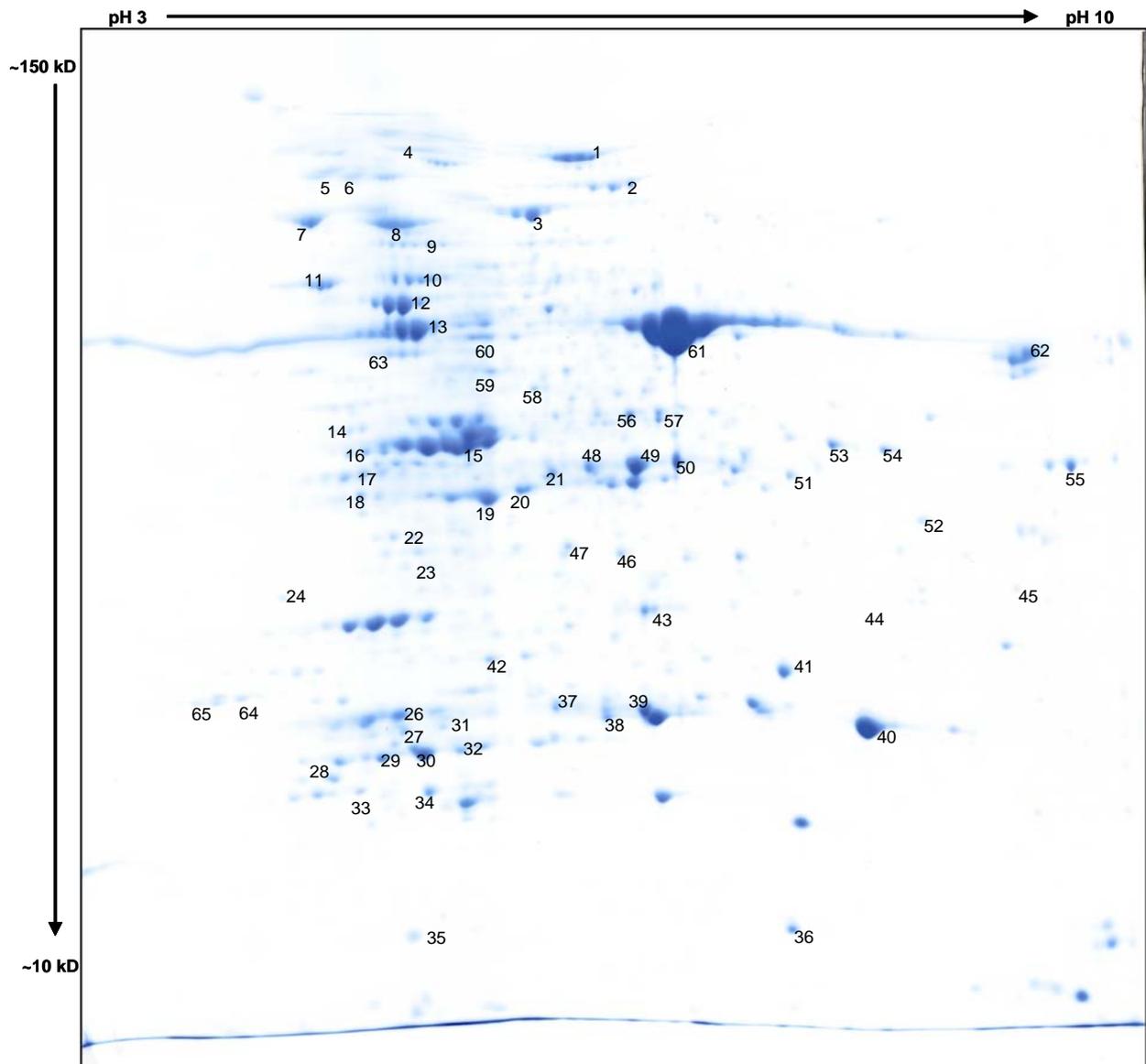


Abb 26: Proteom von *N. benthamiana* ID2 an dpi 5 nach zweidimensionaler Auftrennung. 150 µg Gesamtproteinlysate wurden in der ersten Dimension in einem pH-Bereich von 3-10 nach dem isoelektrischen Punkt und anschließend nach dem Molekulargewicht in der zweiten Dimension aufgetrennt. Nach der Coomassiefärbung wurden die Spots ausgestanzt, tryptisch gespalten und die Peptide mit ESI-Q-TOF bestimmt. Der Abgleich der erhaltenen MS/MS-Spektren wurde mit dem Suchalgorithmus der Sequest Datenbank generiert. Die identifizierten Spots sind in Tab. 22 zusammengefasst.

Tab. 22: Identifizierte Spots des Proteoms von *N. benthamiana* ID2 nach Auftrennung im pH-Bereich 3-10

Spot	Proteinname	ID-Nr	Organismus	MW [Da]	Protein Coverage by AA count [%]
1	Glycine dehydrogenase [decarboxylating] 2, mitochondrial	At4g33010	Arabidopsis thaliana	112834	3.2
2	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransf.	Q42699	Catharanthus roseus	84785	8.2
3	Transketolase, chloropl.	Q43848	Solanum tuberosum	79924	12.8
4	ATP-dep. Clp protease ATP-binding subunit clpA homolog CD4B	P31542	Solanum lycopersicum	102159	9.2
5	Putative heat shock protein HSP90 (Fragments)	P84577	Populus euphratica	5103	59.6
6	Heat shock cognate protein 80	P36181	Solanum lycopersicum	80067	5.7
7	Stromal 70 kDa heat shock-related protein, chloropl.	Q02028	Pisum sativum	75451	9.2
8	Heat shock cognate 70 kDa protein 2	P22954	Arabidopsis thaliana	71324	8.1
	Heat shock cognate 70 kDa protein 1	HSC70-1	Arabidopsis thaliana	71295	7.7
	Luminal-binding protein 1 (BIP)	Q9LKR3	Arabidopsis thaliana	73565	1.8
9	V-type proton ATPase catalytic subunit A	P31405	Gossypium hirsutum	68460	10.1
10	RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta, chloropl.	P21240	Arabidopsis thaliana	63751	11.3
11	RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha, chloropl. (Frag.)	P21239	Brassica napus	57638	15.8
12	ATP synthase subunit alpha, chloropl.	P00823	Nicotiana tabacum	55402	24.7
13	ATP synthase subunit beta, chloropl.	Q8S8W8	Atropa belladonna	53546	47.4
14	Fructose-1,6-bisphosphatase, chloropl.	P25851	Arabidopsis thaliana	45115	11.5
15	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase 2, chloropl.	Q40565	Nicotiana tabacum	48294	38
	Phosphoglycerate kinase, chloropl.	Q42961	Nicotiana tabacum	50127	21.2
16	Phosphoribulokinase, chloroplastic (Fragments)	P85112	Vitis sp.	9808	27.0
17	Phosphoglycerate kinase, chloropl.	Q42961	Nicotiana tabacum	50127	5.2
18	Cysteine synthase, chloroplastic/chromoplastic	P31300	Capsicum annuum	39934	22.5
19	Probable fructose-bisphosphate aldolase 1, chloropl.	Q9SJU4	Arabidopsis thaliana	42885	11.8
20	Fructose-bisphosphate aldolase, chloropl.	Q40677	O. sativa subsp. japonica	41961	9.3
21	Malate dehydrogenase, cytoplasmic 2	P57106	Arabidopsis thaliana	35634	14.8
22	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, acidic isoform GI9	P23547	Nicotiana tabacum	37680	7.9
23	Thiazole biosynthetic enzyme, chloropl.	Q38814	Arabidopsis thaliana	36622	7.7
24	Light-induced protein, chloropl.	O99019	Solanum demissum	35650	8
25	29 kDa ribonucleoprotein A, chloropl.	Q08935	Nicotiana sylvestris	29638	41.8
26	Acidic endochitinase Q	P17514	Nicotiana tabacum	27597	23.3
27	Chlorophyll a-b binding protein 36, chloropl.	P27494	Nicotiana tabacum	28602	27.9
28	Pathogenesis-related protein R major form	P13046	Nicotiana tabacum	24632	14.6
29	Oxygen-evolving enhancer protein 2-2, chloropl.	P18212	Nicotiana tabacum	28525	39.2
30	Oxygen-evolving enhancer protein 2-2, chloropl.	P18212	Nicotiana tabacum	28525	45.7
31	Chlorophyll a-b binding protein 36, chloropl.	P27494	Nicotiana tabacum	28602	7.5
32	Proteasome subunit beta type-6	Q8LD27	Arabidopsis thaliana	25117	11.6
33	2-Cys peroxiredoxin BAS1, chloropl.	Q96291	Arabidopsis thaliana	29055	21.4
34	Oxygen-evolving enhancer protein 2-1, chloroplastic	Q7DM39	Nicotiana tabacum	28616	21.6
35	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit 1, chloropl.	P30361	Nicotiana tabacum	24118	36
36	Photosystem I reaction center subunit IV B, chloropl.	Q41229	Nicotiana sylvestris	15196	28.7
37	TGB1 helicase	P09396	Potato virus	24630	18.6
38	TGB1 helicase	P17780	Potato virus X	24562	55.8
39	TGB1 helicase	P17780	Potato virus X	24562	73.9
40	Ig kappa chain C region	P01834	Homo sapiens	11583	82.1
41	Coat protein	P07699	Potato virus X	25021	41.8
42	Carbonic anhydrase, chloroplastic	P27141	Nicotiana tabacum	34470	20.6
43	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Frag.)	Q31859	Anthocercis viscosa	51815	10.9
44	Endochitinase A	P08252	Nicotiana tabacum	35115	24.3
45	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, basic vacuolar isoform	P23431	Nicotiana plumbaginifolia	39941	15.1
46	Ferredoxin--NADP reductase, leaf-type isozyme, chloropl.	O04977	Nicotiana tabacum	40401	13.5
47	Ferredoxin--NADP reductase, leaf-type isozyme, chloropl.	O04977	Nicotiana tabacum	40401	11.9
48	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A, chloropl. (Frag.)	P09043	Nicotiana tabacum	41818	25.5
49	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A, chloropl. (Frag.)	P09043	Nicotiana tabacum	41818	35.2
50	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic (Frag.)	P09094	Nicotiana tabacum	35493	12.6
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A, chloropl. (Frag.)	P09043	Nicotiana tabacum	41818	21.9

51	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	P25861	Antirrhinum majus	36644	8.6
52	Malate dehydrogenase, mitochondrial	P17783	Citrullus lanatus	36160	11.2
53	Aminomethyltransferase, mitochondrial	P54260	Solanum tuberosum	44230	12.8
54	Aminomethyltransferase, mitochondrial	P54260	Solanum tuberosum	44230	10.3
55	Peroxisomal (S)-2-hydroxy-acid oxidase	P05414	Spinacia oleracea	40242	23
56	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B, chloropl. (Frag.)	P09044	Nicotiana tabacum	47422	19.4
57	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B, chloropl. (Frag.)	P12859	Pisum sativum	48048	14.2
58	Monodehydroascorbate reductase	Q43497	Solanum lycopersicum	46988	12.5
59	S-adenosylmethionine synthase 2	P43281	Solanum lycopersicum	43036	14.5
60	Adenosylhomocysteinase	P68173	Nicotiana tabacum	53051	12.8
61	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Frag.)	Q31951	Capsicum baccatum	51979	14.3
62	Ig gamma-1 chain C region	P01857	Homo sapiens	36065	10.9
63	Tubulin alpha-1 chain OS=Hordeum vulgare	Q43473	Hordeum vulgare	49547	14
64	28 kDa ribonucleoprotein, chloropl.	P19682	Nicotiana sylvestris	30662	10.5
65	V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit c4	P59229	Arabidopsis thaliana	16656	33.1

Die vergleichenden Analysen der Proteome verschiedener Tage wurden zunächst im Hinblick auf signifikante Veränderungen durchgeführt. Eine computerunterstützte Auswertung war nach Auftrennung über den pH-Bereich von 3 bis 10 aufgrund von Spotüberlagerungen nur bei einzelnen Spots sinnvoll. Daher wurde in erster Hinsicht auf die Bildung neuer Spots im Verlauf des Pflanzenwachstums geachtet und die Veränderung des relativen Volumens einzelner Spots verglichen. Eine detaillierte Auswertung wurde im späteren Verlauf der Analysen nach Auftrennung im pH-Bereich von 4 bis 7 durchgeführt (Abschnitt 3.2.1.2).

Das relative Volumen (% Vol) eines Spots ist der normalisierte Wert, der unabhängig von einer abweichenden Proteinbeladung und Färbung der Gele unter Berücksichtigung des totalen Volumens aller Spots im Gel verbleibt und wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ Vol} = \frac{\text{Vol}}{\sum_{S=1}^n \text{Vol}_S} \times 100$$

wobei S das Volumen eines Spots in einem Gel mit n Spots ist

Von den ersten Tagen nach Infiltration standen die Proteome von dpi 1 und dpi 2 zur Verfügung. Die Antikörperbildung war in diesen Tagen aufgrund der geringen Konzentration durch Darstellung nach zweidimensionaler Auftrennung nicht nachzuweisen. Der nächstfolgende Tag, der zur Analyse zur Verfügung stand, war dpi 5, an dem die Signale der leichten und schweren Kette (LC und HC) bereits deutlich zu sehen waren (Abb. 27).

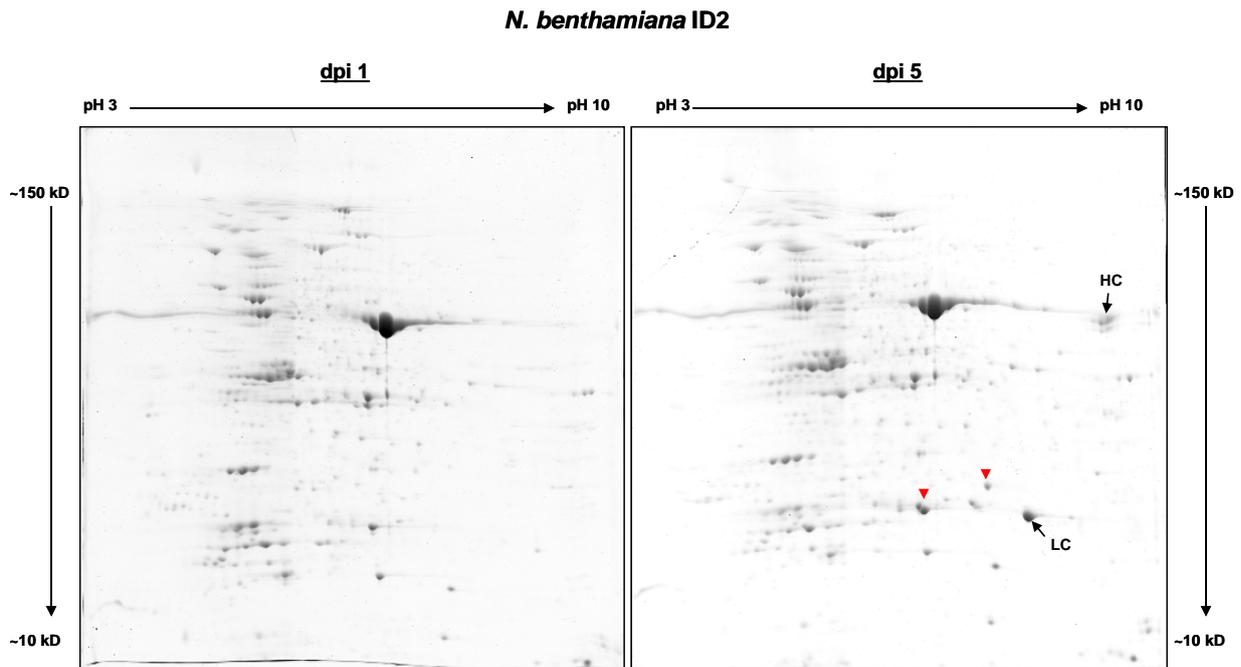


Abb. 27: Vergleich der Proteome von *N. benthamiana* ID2 an dpi 1 und 5. Jeweils 150 µg Gesamtproteinextrakt wurde in einem linearen pH-Gradienten von 3 bis 10 in der ersten Dimension und einem 12%igen SDS-Gel in der zweiten Dimension aufgetrennt. Die Proteine wurden mit Coomassie G250 gefärbt und im Durchlichtmodus eingescannt. **LC:** Leichte Kette, **HC:** schwere Kette, **rote Pfeile:** virale Proteine.

Beim Vergleich der Gele konnten an dpi 5 zusätzlich zu den Spots der leichten und schweren Kette von ID2 weitere Spots (rote Pfeile) beobachtet werden, die im Gel von dpi 1 nicht vorhanden waren. Diese konnten nach massenspektrometrischer Analyse als Coat Protein (Hüllprotein) und TGB Helikase aus *Potato Virus* identifiziert werden. Beides sind Proteine, deren Gene auf dem durch das *Agrobacterium* eingeschleusten viralen Vektor liegen. Das Coat Protein bildet mit der Lipidschicht die äußere Hülle des Virus. Die TGB Helikase gehört zum **Triple Gene Block** des *Potato Virus* und ist für die lokale und systemische Ausbreitung des Virus in der Pflanze essentiell.

Eine softwaregestützte Auswertung ergab für dpi 1 eine Anzahl von 249 Spots und für dpi 5 eine Anzahl von 261 Spots, wobei alle Spots, die außerhalb des linearen Bereiches lagen aus der Bewertung ausgeschlossen wurden. Dieses waren Spots mit einer geringeren Intensität als 0,05 und der überdimensionale Spot der RubisCO large chain (Spot 61 in Abb. 26). Eindeutig zusammengehörende Spots, die zuvor als ein und dasselbe Protein identifiziert worden waren, wurden vereint. Für 172 Spots gab es eine eindeutige Übereinstimmung in beiden Gelen. Aus diesen wurde ein Streudiagramm erstellt und die Korrelation berechnet (Abb. 28).

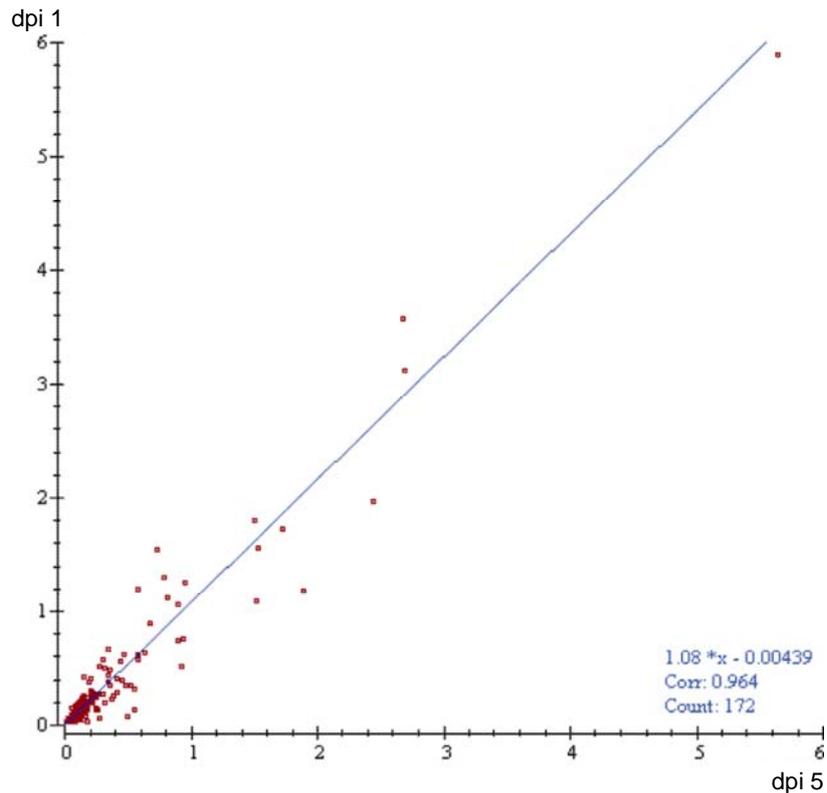


Abb. 28: Streudiagramm der übereinstimmenden Spots des Proteoms von *N. benthamiana* ID2 an dpi 1 und dpi 5

Der lineare Zusammenhang zwischen den Spots beider Gele wurde anhand der Ausgleichsgerade durch die Datenpunkte gemessen und ergab einen Korrelationskoeffizienten von 0,965. Das relative Volumen aller übereinstimmenden Spots, das bei einem positiven Zusammenhang durch den Wert 1 beschrieben wird, war demnach in beiden Gelen nahezu gleich. Auch die visuelle Betrachtung, bei der die Gele direkt nach der Färbung verglichen wurden, ergab außer den Spots der leichten und schweren Kette, sowie der viralen Proteine, keine ersichtlichen Unterschiede.

Im weiteren Verlauf des Wachstums von *N. benthamiana* ID2 schien die Menge und die Intensität vieler Spots von dpi 5 bis dpi 7 visuell betrachtet abzunehmen (Abb. 29). Auch der computergestützte Vergleich der relativen Volumen der Spots ergab für einige Spots des Proteoms an dpi 7 geringere Werte im Vergleich zu dpi 5. Dazu gehörten besonders die Spots im Bereich der Markierung, von denen einige als Ribulosephosphat Carboxylase/Oxygenase Aktivase, Phosphoglycerat Kinase und Phosphoribulokinase identifiziert werden konnten. Eine genaue Auswertung konnte allerdings erst nach einer Auftrennung im pH-Bereich von 4-7 durchgeführt werden, da die Spotüberlagerungen im pH-Bereich von 3-10 zu groß waren.

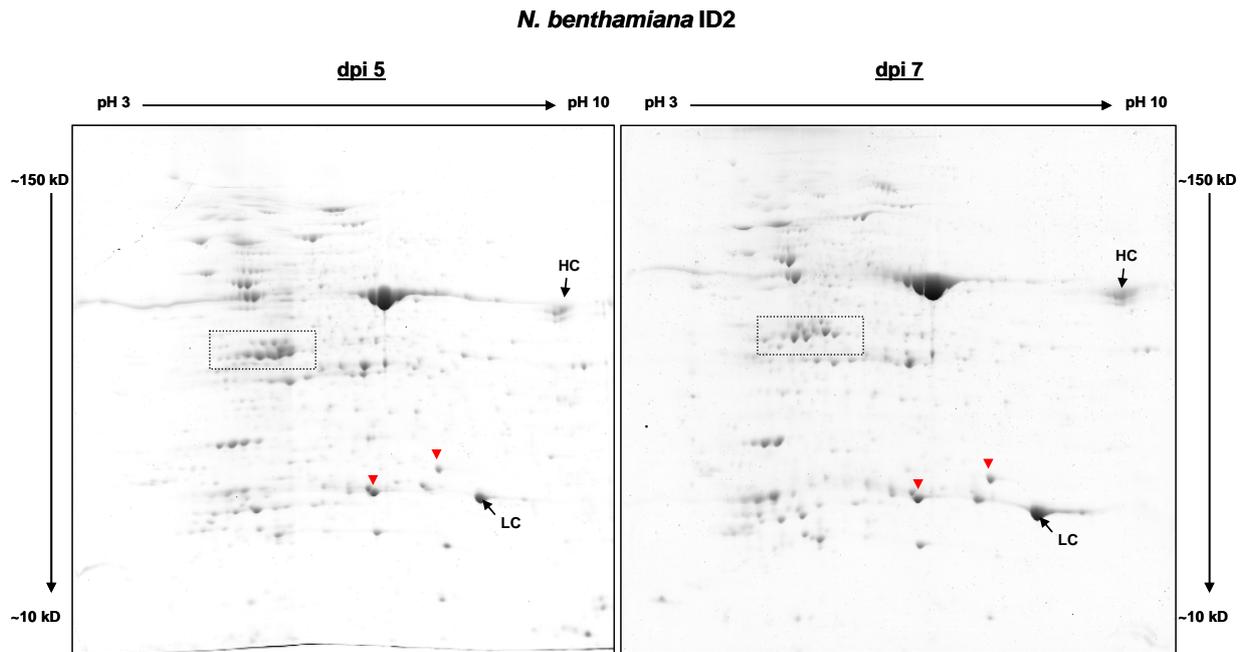


Abb. 29: Vergleich des Proteoms von *N. benthamiana* ID2 an dpi 5 und dpi 7. Jeweils 150 µg Gesamtproteinextrakt wurde in einem linearen pH-Gradienten von 3 bis 10 in der ersten Dimension und einem 12 %igen SDS-Gel in der zweiten Dimension aufgetrennt. Die Proteine wurden mit Coomassie G250 angefärbt und im Durchlichtmodus eingescannt. **LC:** Leichte Kette, **HC:** schwere Kette, **rote Pfeile:** virale Proteine, **Kasten:** signifikante Veränderungen des relativen Volumens

Die Spotintensitäten der Antikörperketten und der viralen Proteine nahm bis dpi 7 zu, wobei dies für die leichte Kette am deutlichsten beobachtet werden konnte. Eine dreidimensionale Ansicht des Spots der leichten Kette an dpi 5 und dpi 7 ist in Abb. 30 vergleichend dargestellt. Die Intensität des Signals der leichten Kette, die durch die z-Achse beschrieben wird, war an dpi 7 um mehr als 15 % höher, als an dpi 5. Auch die Fläche des Spots, die durch die Darstellung der Pixel anhand der x- und y-Achse dargestellt wird, war größer, als an dpi 5. Die Summe aller Pixel entsprach dem Spotvolumen, das die Akkumulation des Proteins repräsentierte. Demnach zeigte das Ergebnis, dass die Akkumulation der leichten Kette an späteren Tagen nach Infiltration, gegenüber den ersten Tagen, in den Blättern von *N. benthamiana* ID2 zunahm. Entsprechend der Zunahme der leichten Ketten sollte auch die Akkumulation des vollständigen ID2 zunehmen. Dies wäre allerdings nur der Fall, wenn die Menge der schweren Kette ebenfalls zunehmen würde. Die Spotvolumen der schweren Kette konnten zwar aufgrund des diffusen Signals nicht genau bestimmt werden, die visuelle Betrachtung deutete jedoch darauf hin, dass deren Akkumulation in geringerem Maße zunahm, als die der leichten Ketten. Die ungleiche Zunahme der Antikörperketten würde für eine Überschussproduktion der leichten Ketten sprechen.

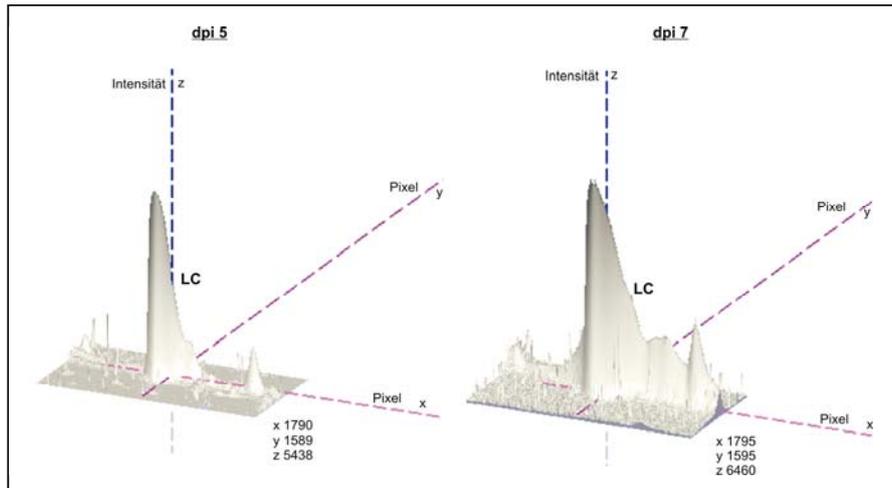


Abb. 30: Dreidimensionale Ansicht der Spotintensität der leichten Kette von dpi 5 und dpi 8

Während die Spotintensitäten der viralen Proteine im weiteren Verlauf des Pflanzenwachstums zunahm, konnte ab dpi 7 eine stetige Abnahme des Antikörpersignals beobachtet werden. Die Abb. 31 zeigt die Proteome von dpi 7 und dpi 12 im direkten Vergleich.

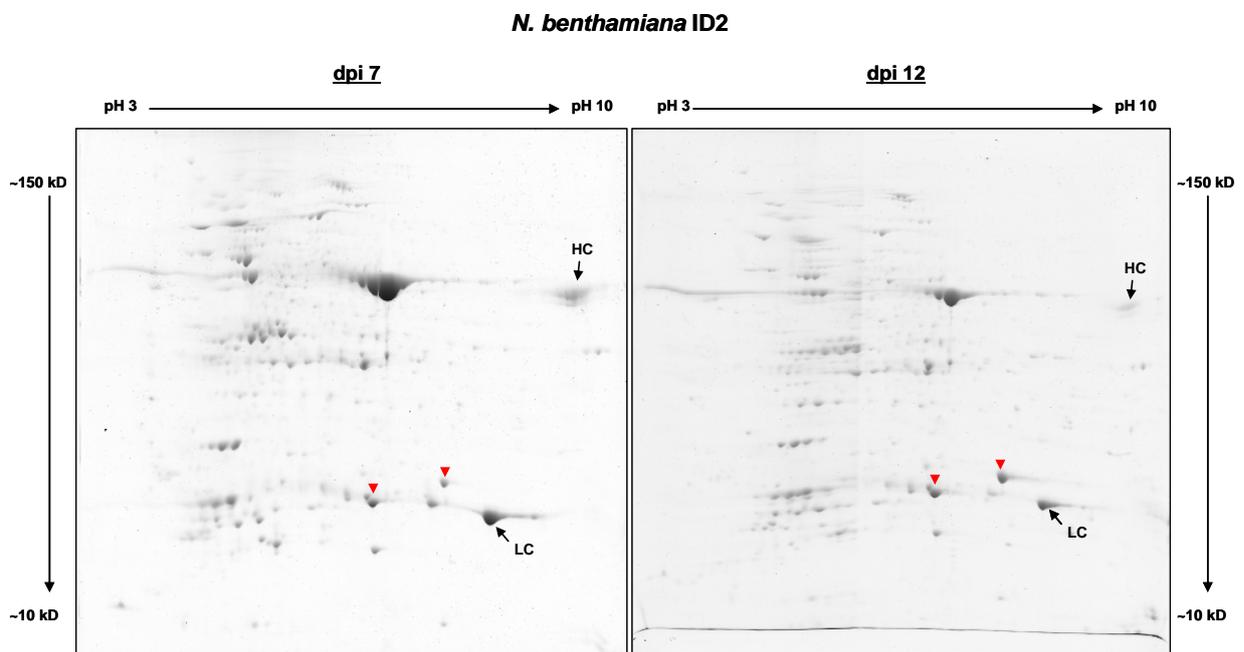


Abb. 31: Vergleich des Proteoms von *N. benthamiana* ID2 an dpi 7 und dpi 12. Jeweils 150 µg Gesamtproteinextrakt wurde in einem linearen pH-Gradienten von 3 bis 10 in der ersten Dimension und einem 12 %igen SDS-Gel in der zweiten Dimension aufgetrennt. Die Proteine wurden mit Coomassie G250 angefärbt und im Durchlichtmodus eingescannt. **LC:** Leichte Kette, **HC:** schwere Kette, **rote Pfeile:** virale Proteine, **Kasten:** signifikante Veränderungen des relativen Volumens

Die visuelle Betrachtung der Gele ergab eine generell geringere Intensität der meisten Signale des Proteoms an dpi 12, was den Anschein erweckte, dass weniger Proteinlysate aufgetrennt wurde. Das gleiche Phänomen konnte jedoch auch bei dpi 8 und dpi 9 beobachtet werden (nicht dargestellt) und änderte sich nach mehrmaligem Wiederholen der Aufarbeitung und zweidimensionaler Auftrennung des Proteoms späterer Tage nicht.

Auf die softwaregestützte Auswertung hatte dies aufgrund der Normalisierung der Werte keinen Einfluss. Diese ergab für dpi 7 eine Anzahl von 224 Spots und für dpi 12 eine Anzahl von 277 Spots, wobei alle Spots mit einer geringeren Intensität als 0,05 und der überdimensionale Spot der RubisCO large chain, der außerhalb des linearen Bereiches lag, aus der Bewertung ausgeschlossen wurden. Eindeutig zusammengehörende Spots wurden vereint. Für 144 Spots gab es eine Übereinstimmung in beiden Gelen.

Nach Erstellung eines Streudiagramms wurde die Korrelation der übereinstimmenden Spots berechnet. Diese ergab einen Wert von 0,837 (Abb. 32). Die Abweichung vom Wert 1, der die beste Korrelation zweier Datenreihen beschreibt, war zum großen Teil auf die stark unterschiedlichen relativen Volumina der leichten und schweren Kette von ID2 sowie der viralen Proteine zurückzuführen. Deren Datenpunkte sind im Streudiagramm beschriftet.

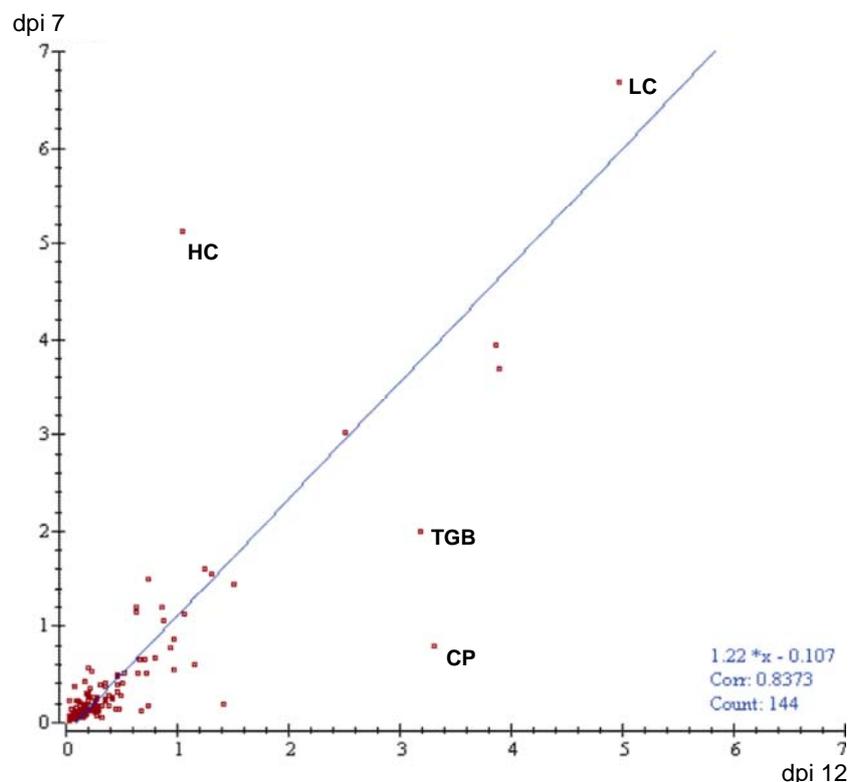


Abb 32: Streudiagramm der übereinstimmenden Spots des Proteoms an dpi 7 und an dpi 12

Die Datenpunkte der schweren Kette (**HC**), der leichten Kette (**LC**), der viralen TGB Helikase (**TGB**) und des viralen Coat Proteins (**CP**) zeigten die größten Abweichungen

Die Spotvolumen der Antikörperketten nahmen von dpi 7 bis dpi 12 ab, während die der viralen Proteine zunahm. Für die Darstellung der Volumenab- und zunahmen wurden jeweils die Spotvolumen der Antikörperketten, die Spotvolumen der viralen Proteine und die aller anderen Proteine zusammengefasst und die prozentuale Verteilung für beide Tage berechnet (Abb. 33). Diese ergab für die Antikörperketten eine Volumenabnahme von 7 % und für die viralen Proteine eine Zunahme von 6 %.

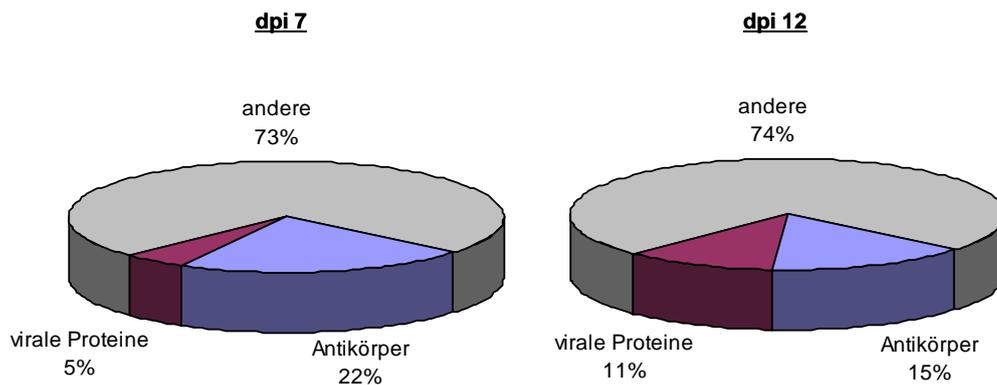


Abb. 33: Prozentuale Verteilung der viralen Proteinen und der Antikörperketten an dpi 7 und dpi 12

Obwohl die lokale und systemische Verbreitung des Potato Virus, die in direktem Zusammenhang mit der Expression der TGB Helikase und des Coat Proteins steht, scheinbar bis zum letzten Tag induziert wurde, nahm die Menge an Antikörper, dessen Sequenz sich ebenfalls auf den viralen Vektoren befand, ab. Dies war ein möglicher Hinweis auf einen Abbau des Antikörpers im Zuge der Pflanzenabwehr.

3.2.1.2 Proteomanalysen nach 2D-Elektrophorese im pH-Bereich 4-7

Da eine ausführliche computergestützte Bildauswertung im pH-Bereich von 3 bis 10 aufgrund der Überlagerungen von Spots nicht möglich war, wurde diese nach Auftrennung der Proteome von dpi 5 und dpi 12 im linearen pH-Bereich von 4 bis 7 durchgeführt. Alle identifizierten Spots dieses Bereiches sind in Abb. 34 dargestellt und in Tab. 23 aufgelistet.

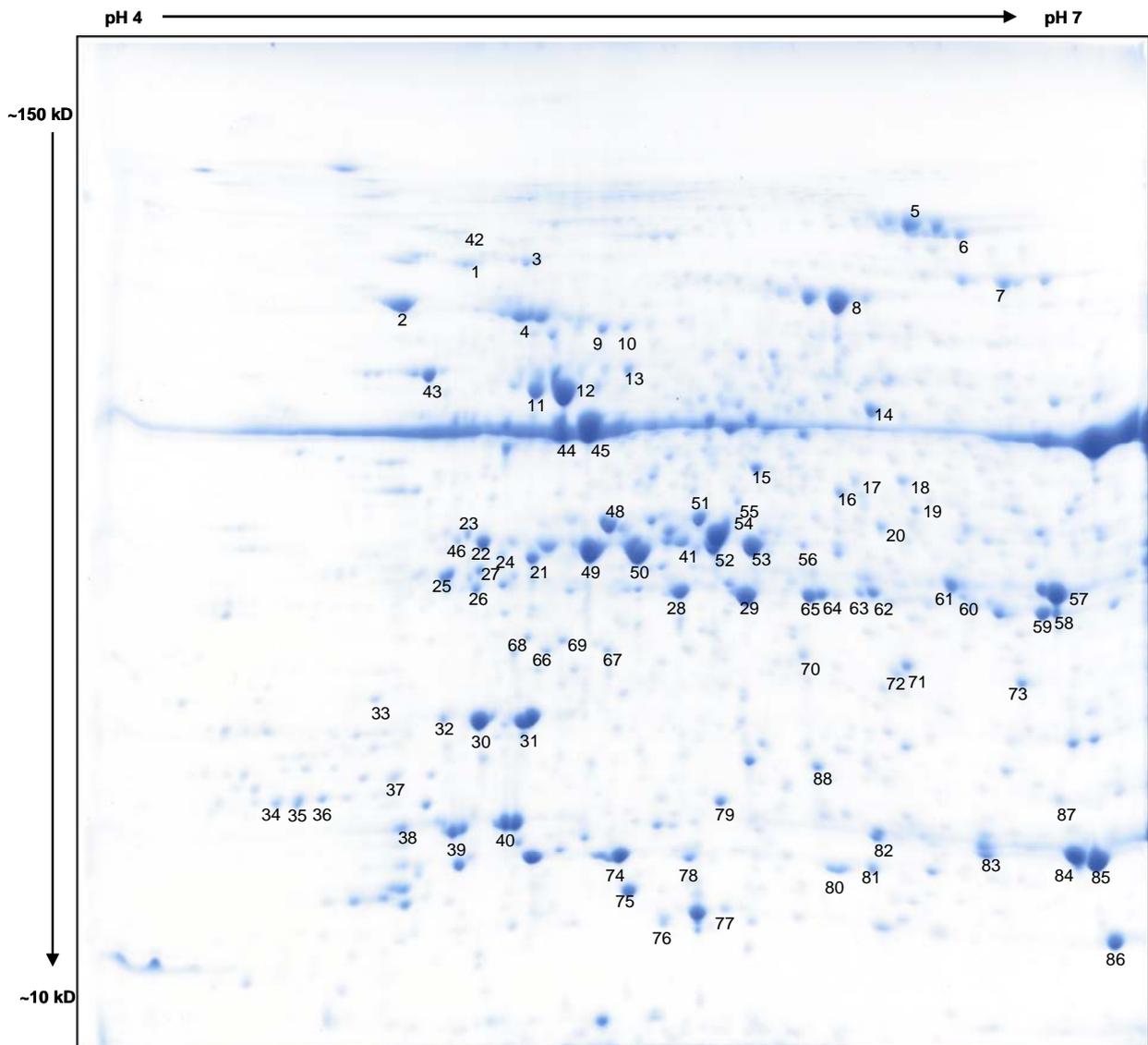


Abb. 34: Proteom von *N. benthamiana* ID2 an dpi 5 nach zweidimensionaler Auftrennung. 300 µg Gesamtproteinlysate wurden in der ersten Dimension in einem pH-Bereich von 4-7 nach dem isoelektrischen Punkt und anschließend nach dem Molekulargewicht in der zweiten Dimension aufgetrennt. Nach der Coomassiefärbung wurden die Spots ausgestanzt, tryptisch gespalten und die Peptide mit ESI-Q-TOF bestimmt. Der Abgleich der erhaltenen MS/MS-Spektren wurde mit dem Suchalgorithmus der Sequest Datenbank generiert. Die identifizierten Spots sind in Tab. 23 zusammengefasst.

Tab. 23: Identifizierte Spots des Proteoms von *N. benthamiana* ID2 nach Auftrennung im pH-Bereich 4-7

Spot	Proteinname	ID-Nr	Organismus	MW [Da]	Protein Coverage by AA count [%]
1	Heat shock cognate protein 80	P36181	Solanum lycopersicum	80067	12.4
2	Stromal 70 kDa heat shock-related protein, chloroplastic (Fragment)	Q08080	Spinacia oleracea	64842	19.0
3	Elongation factor G, chloroplastic	P34811	Glycine max (Soybean)	86884	12.9
4	Heat shock cognate 70 kDa protein 2	P27322	Solanum lycopersicum	70644	37.4
	Heat shock cognate 70 kDa protein 1	P24629	Solanum lycopersicum	71224	22.9
	Luminal-binding protein 1	Q9LKR3	Arabidopsis thaliana	73565	4.3
5	Glycine dehydrogenase [decarboxylating], mitochondrial	O49954	Solanum tuberosum	112823	15.3
6	Elongation factor 2	O23755	Beta vulgaris	93720	9.4
7	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	Q42662	Solenostemon scutellarioides	84518	16.1
8	Transketolase, chloroplastic	Q43848	Solanum tuberosum	79924	21.1
9	V-type proton ATPase catalytic subunit A	P09469	Daucus carota	68773	36.0
	Cell division protease ftsH homolog, chloroplastic	O82150	Nicotiana tabacum	77044	9.0
10	V-type proton ATPase catalytic subunit A	P13548	Phaseolus aureus	68619	19.3
11	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic	P00823	Nicotiana tabacum	55402	35.1
12	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic	P00823	Nicotiana tabacum	55402	41.8
13	RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta, chloroplastic	P21241	Brassica napus	62416	13.3
14	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	P05495	Nicotiana plumbaginifolia	55172	27.1
15	S-adenosylmethionine synthase 2	P43281	Solanum lycopersicum	43036	52.9
	S-adenosylmethionine synthase 1	Q307Y9	Solanum tuberosum	43170	40.2
16	Monodehydroascorbate reductase	Q43497	Solanum lycopersicum	46988	27.3
17	S-adenosylmethionine synthase 1	Q9M7K8	Nicotiana tabacum	42670	32.3
	S-adenosylmethionine synthase 2	Q6SYB9	Nicotiana tabacum	42567	20.8
18	S-adenosylmethionine synthase 1	Q9M7K8	Nicotiana tabacum	42670	23.8
19	GDP-mannose 3,5-epimerase	Q93VR3	Arabidopsis thaliana	42712	20.7
20	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase, chloropl.	P31593	Nicotiana tabacum	50826	33.9
21	Phosphoribulokinase, chloroplastic	P09559	Spinacia oleracea	44960	18.9
22	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase 2, chloropl.	Q40565	Nicotiana tabacum	48294	9.3
23	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase 1, chloropl.	Q40460	Nicotiana tabacum	48704	31.0
24	Phosphoribulokinase, chloroplastic	P26302	Triticum aestivum	45094	12.1
25	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, chloroplastic	P46285	Triticum aestivum	42016	23.7
26	Cysteine synthase, chloroplastic/chromoplastic	O81155	Solanum tuberosum	41000	28.8
27	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, chloroplastic	P46285	Triticum aestivum	42016	18.6
28	Fructose-bisphosphate aldolase 1, chloroplastic (Fragment)	Q01516	Pisum sativum	38614	30.1
29	Fructose-bisphosphate aldolase, chloroplastic	Q40677	Oryza sativa subsp. japonica	41961	11.6
30	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	P23322	Solanum lycopersicum	34907	31.9
31	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	Q40459	Nicotiana tabacum	35188	24.7
32	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	P23322	Solanum lycopersicum	34907	20.4
33	Light-induced protein, chloroplastic	P80471	Solanum tuberosum	35595	12.6
34	29 kDa ribonucleoprotein A, chloroplastic	Q08935	Nicotiana sylvestris	29638	49.1
35	29 kDa ribonucleoprotein A, chloroplastic	Q08935	Nicotiana sylvestris	29638	11.4
36	29 kDa ribonucleoprotein A, chloroplastic	Q08935	Nicotiana sylvestris	29638	45.1
37	29 kDa ribonucleoprotein B, chloroplastic	Q08937	Nicotiana sylvestris	31077	30.9
38	Acidic endochitinase Q	P17514	Nicotiana tabacum	27597	20.2
39	Chlorophyll a-b binding protein 21, chloroplastic	P27493	Nicotiana tabacum	28090	46.0
40	Chlorophyll a-b binding protein 7, chloroplastic	P27491	Nicotiana tabacum	28299	52.4
41	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase 1, chloropl.	Q40460	Nicotiana tabacum	48704	50.7
	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase 2, chloropl.	Q40565	Nicotiana tabacum	48294	39.0
	Phosphoglycerate kinase, chloroplastic	Q42961	Nicotiana tabacum	50127	16.6
42	Endoplasmic reticulum chaperone protein (GRP94)	Q9STX5	Arabidopsis thaliana	94127	6.1
43	RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha, chloropl.(Frag.)	P21239	Brassica napus	57638	14.7
44	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	P17614	Nicotiana plumbaginifolia	59801	39.3

45	ATP synthase subunit beta, chloroplastic	Q8S8W8	Atropa belladonna	53546	62.7
46	Phosphoribulokinase, chloroplastic	P09559	Spinacia oleracea	44960	5.5
48	Actin-51 (Fragment)	Q96483	Solanum lycopersicum	37132	31.0
	Actin-104 (Fragment)	P93375	Nicotiana tabacum	37102	34.8
49	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase 2, chloropl.	Q40565	Nicotiana tabacum	48294	33.7
	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase 1, chloropl.	Q40460	Nicotiana tabacum	48704	30.8
50	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase 2, chloropl.	Q40565	Nicotiana tabacum	48294	52.4
	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase 1, chloropl.	Q40460	Nicotiana tabacum	48704	43.4
	Phosphoglycerate kinase, chloroplastic	Q42961	Nicotiana tabacum	50127	13.3
51	Elongation factor TuB, chloroplastic	Q43364	Nicotiana sylvestris	52636	33.6
52	Phosphoglycerate kinase, chloroplastic	Q42961	Nicotiana tabacum	50127	40.7
	Glutamine synthetase, chloroplastic/mitochondrial	Q43127	Arabidopsis thaliana	47363	10.5
53	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase 1, chloropl.	Q40460	Nicotiana tabacum	48704	43.4
54	Elongation factor TuA, chloroplastic	Q40450	Nicotiana sylvestris	51905	40.0
55	Monodehydroascorbate reductase	Q43497	Solanum lycopersicum	46988	15.2
56	Phosphoglycerate kinase, cytosolic	Q42962	Nicotiana tabacum	42319	26.2
57	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A, chloroplastic (Frag.)	P09043	Nicotiana tabacum	41818	30.1
58	ATP synthase gamma chain, chloroplastic	P29790	Nicotiana tabacum	41402	17.2
59	Uncharacterized protein At1g09340, chloroplastic	Q9SA52	Arabidopsis thaliana	42575	21.4
60	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A, chloroplastic (Frag.)	P09043	Nicotiana tabacum	41818	25.0
61	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A, chloroplastic (Frag.)	P09043	Nicotiana tabacum	41818	21.9
62	Malate dehydrogenase, cytoplasmic 2	P57106	Arabidopsis thaliana	35634	14.8
63	Malate dehydrogenase, mitochondrial	P83373	Fragaria ananassa	35583	17.1
64	Fructose-bisphosphate aldolase, chloroplastic	P16096	Spinacia oleracea	42423	6.9
65	Fructose-bisphosphate aldolase 1, chloroplastic (Fragment)	Q01516	Pisum sativum	38614	14.0
66	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, acidic isoform GI9	P23547	Nicotiana tabacum	37680	14.9
67	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, acidic isoform GI9	P23547	Nicotiana tabacum	37680	7.9
68	60S acidic ribosomal protein P0-1	O04204	Arabidopsis thaliana	33627	8.8
69	60S acidic ribosomal protein P0	P41095	Oryza sativa subsp. japonica	34338	14.7
70	Ferredoxin--NADP reductase, leaf-type isozyme, chloroplastic	O04977	Nicotiana tabacum	40401	11.9
71	Ferredoxin--NADP reductase, leaf-type isozyme, chloroplastic	O04977	Nicotiana tabacum	40401	18.8
72	Ferredoxin--NADP reductase, leaf-type isozyme, chloroplastic	O04977	Nicotiana tabacum	40401	17.4
73	Ferredoxin--NADP reductase, leaf-type isozyme, chloroplastic	O04977	Nicotiana tabacum	40401	27.6
74	Oxygen-evolving enhancer protein 2-2, chloroplastic	P18212	Nicotiana tabacum	28525	44.2
75	Oxygen-evolving enhancer protein 2-1, chloroplastic	Q7DM39	Nicotiana tabacum	28616	18.7
76	Chlorophyll a-b binding protein 6A, chloroplastic	P12360	Solanum lycopersicum	26539	14.6
77	Superoxide dismutase [Fe], chloroplastic (Fragment)	P22302	Nicotiana plumbaginifolia	23009	37.1
78	Chlorophyll a-b binding protein 8, chloroplastic	P27522	Solanum lycopersicum	29326	6.2
79	TGB1 helicase	P09396	Potato virus X	24630	18.6
80	Chlorophyll a-b binding protein 8, chloroplastic	P27522	Solanum lycopersicum	29326	6.2
81	Ribulose-phosphate 3-epimerase, chloroplastic (Fragment)	Q43843	Solanum tuberosum	29844	27.1
82	TGB1 helicase	P09396	Potato virus X	24630	24.8
83	TGB1 helicase	P17780	Potato virus X (strain X3)	24562	60.6
84	Carbonic anhydrase, chloroplastic	P27141	Nicotiana tabacum	34470	30.2
85	TGB1 helicase	P17780	Potato virus X (strain X3)	24562	47.8
86	TGB1 helicase	P17780	Potato virus X (strain X3)	24562	17.7
87	Coat protein	P07699	Potato virus X	25021	23.2
88	Carbonic anhydrase, chloroplastic	P27141	Nicotiana tabacum	34470	12.5

Die Antikörperketten waren aufgrund ihres basischen isoelektrischen Punktes, der für die leichte Kette bei 7,83 und für die schwere Kette bei 8,77 vorausgesagt wurde, nach zweidimensionaler Auftrennung im pH-Bereich von 4-7 nicht zu sehen. Die identifizierten Proteine stammten aus verschiedenen Kompartimenten der Pflanzenzelle (Abb. 35). Mit

einem Anteil von ca. 60 % waren die meisten chloroplastische Proteine. 15 % der Proteine konnten dem Cytoplasma, 8 % den Mitochondrien und 7 % dem Cytosol zugeordnet werden. Proteine des endoplasmatischen Retikulums, deren Änderung der Expression im Zuge der Antikörpersynthese interessant gewesen wäre, konnten nur mit einem Anteil von 3 % identifiziert werden. Ebenfalls 3 % der identifizierten Proteine waren, wie der Antikörper, sekretorische Proteine. Dazu zählten die Glucan Endo-1,3-beta-Glucosidase und die acide Endochitinase.

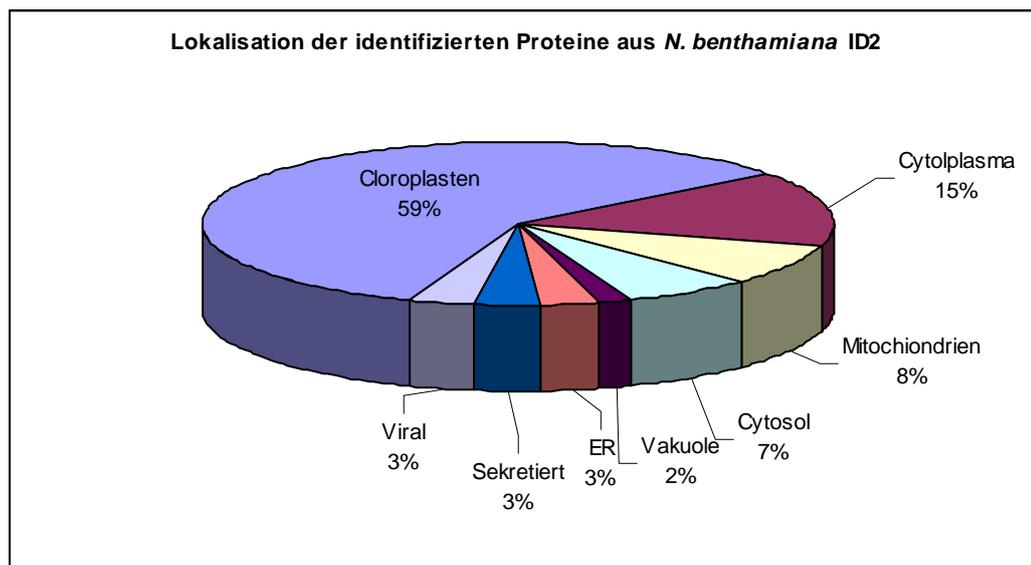


Abb. 35: Lokalisation der identifizierten Proteine aus *N. benthamiana* ID2

Um Veränderungen der biochemischen Prozesse im Verlauf der Wachstumsphase von Antikörper bildenden Pflanzen, die mit einem *Agrobacterium*-Virus Konstrukt infiltriert wurden, zu identifizieren, wurden die 2D-Gele vom 5. und 12. Tag nach Infiltration miteinander verglichen und quantitativ ausgewertet. Die Zahl der detektierten Proteinspots war mit 423 Spots im Gel von dpi 5 und 415 Spots im Gel von dpi 12 fast gleich. Für 346 Spots gab es eine eindeutige Übereinstimmung in beiden Gelen. Proteine, deren Expression im Verlauf von dpi 5 bis dpi 12 heraufreguliert wurde, sind in Abb. 36 mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet. Die Proteine, deren Expression herabreguliert wurde, sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet.

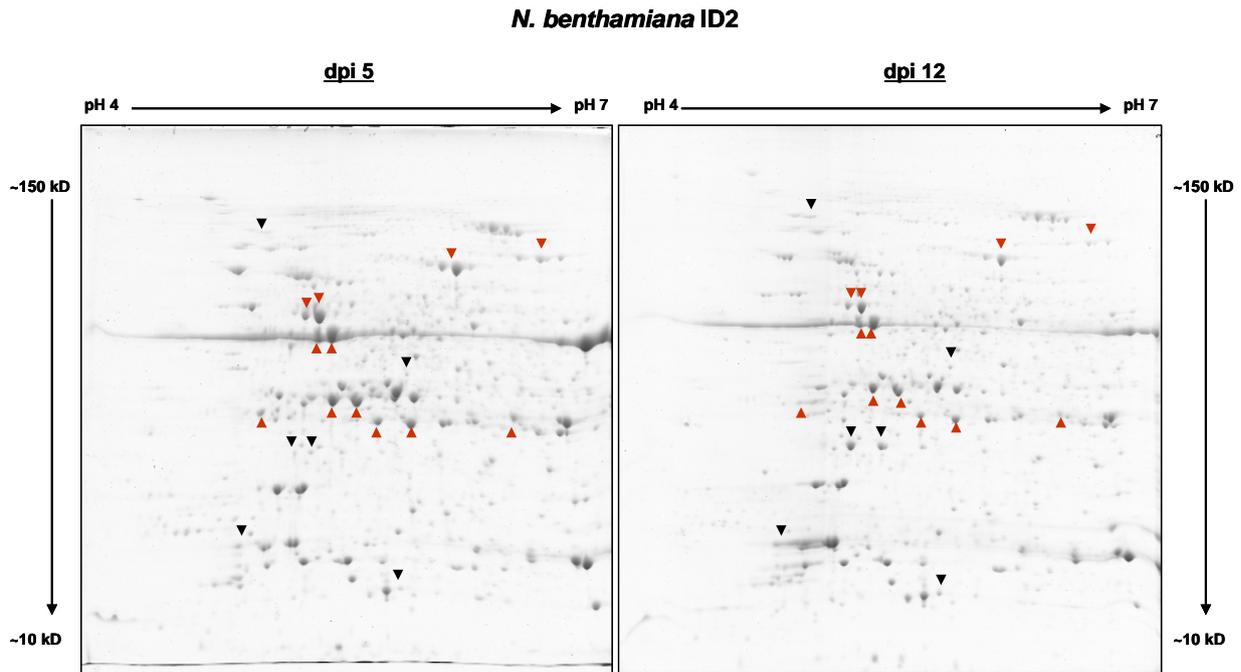


Abb. 36: Vergleich des Proteoms von *N. benthamiana* ID2 an dpi 5 und dpi 12. Jeweils 300 µg Gesamtproteinextrakt wurde in einem linearen pH-Gradienten von 4 bis 7 in der ersten Dimension und einem 12 %igen SDS-Gel in der zweiten Dimension aufgetrennt. Die Proteine wurden mit Coomassie G250 angefärbt und im Durchlichtmodus eingescannt. **Schwarze Pfeile:** Hochregulierte Proteinspots, **rote Pfeile:** Herunterregulierte Proteinspots.

Die quantitativen Veränderungen von dpi 5 bis dpi 12 sind in Tab. 24 dargestellt. Die Spotnummern entsprechen denen aus Abb. 34, sodass die Lokalisation der Proteine anhand dieser nachvollzogen werden kann. Quantitative Änderungen im Hinblick auf eine gesteigerte Proteinexpression vom 5. bis zum 12. Tag nach Einbringen des *Agrobacterium*-Virus Konstruktes konnten besonders für Proteine, die eine Rolle in der pflanzlichen Abwehr spielen, festgestellt werden. Dazu gehörten zum einen Enzyme, die die Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS= **R**eactive **O**xxygen **S**pecies) katalysieren, wie die Superoxiddismutase (Spot 77) und die Monodehydroascorbatreduktase (Spot 55). Zum anderen waren dies PR-Enzyme (PR= **P**athogen **R**elated), die an der Zerstörung von fungalen Zellwänden beteiligt sind, wie die Glukan Endo-1,3-beta-Glucosidase (Spot 66, 67) und die acide Endochitinase (Spot 38). Der Spot der Glukan Endo-1,3-beta-Glucosidase wurde von dpi 5 bis dpi 12 um das 10fache hochreguliert und zeigte demnach die quantitativ größte Veränderung der Proteinexpression. Die Chaperone Grp94 (Endoplasmic homolog) und BiP waren die einzigen Faltungshelfer des endoplasmatischen Retikulums, die identifiziert werden konnten. Eine Quantitative Änderung konnte nur für Grp94 beobachtet werden, das an der frühen Faltung von Proteinen beteiligt ist und dessen Expression im Verlauf der Antikörperbildung scheinbar induziert wurde.

Tab. 24: Zu- und abnehmende Proteinmengen im Verlauf des Pflanzenwachstums von *N. benthamiana* ID2 von dpi 5 bis dpi12. Für die Quantifizierung wurde das relative Volumen (% Vol) der Spots mittels ImageMaster 2D Platinum 7.0 bestimmt. Das relative Volumen ist der normalisierte Wert, der unabhängig von einer abweichenden Proteinbeladung und Färbung der Gele unter Berücksichtigung des totalen Volumens aller Spots im Gel. Die Spotnummern entsprechen den identifizierten Spots aus Abb. 34.

Zunehmende Proteinmengen

Spot	Proteinname	Vol %	
		dpi 5	dpi 12
42	Grp94, Endoplasmin homolog	0.074	0.270
55	Monodehydroascorbate reductase	0.098	0.154
66	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, acidic isoform GI9	0.120	1.238
67	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, acidic isoform GI9	0.099	0.682
77	Superoxide dismutase [Fe], chloroplastic (Fragment)	0.877	1.485
38	Acidic endochitinase Q	0.253	0.488

Abnehmende Proteinmengen

Spot	Proteinname	Vol %	
		dpi 5	dpi 12
7	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	0.705	0.291
8	Transketolase, chloroplastic	3.433	2.387
11	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic	0.899	0.575
12	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic	2.900	1.893
25	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, chloroplastic	0.498	0.160
28	Fructose-bisphosphate aldolase, chloroplastic	0.905	0.634
29	Fructose-bisphosphate aldolase, chloroplastic	1.543	1.340
45	ATP synthase subunit beta, chloroplastic	3.672	3.345
49	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloropl.	2.126	1.746
50	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloropl.	2.476	2.152
61	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A, chloroplastic (Frag.)	0.657	0.297

Die Proteine, deren Mengen von dpi 5 bis dpi 12 abnahmen, entsprachen alle, außer der 5-Methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocystein Methyltransferase, die am Aminosäuremetabolismus beteiligt ist, Proteinen der Photosynthese. Die ATP-Synthase ist in der Membran der Chloroplasten lokalisiert und katalysiert die Umsetzung von ADP zu ATP im Zuge der Lichtreaktion. Die Transketolase, Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, Fructose-bisphosphate Aldolase, Ribulosebisphosphate Carboxylase/Oxygenase Aktivase und Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase katalysieren Reaktionen des Calvin-Zyklus, der Dunkelreaktion der Photosynthese.

3.2.2 Vergleich der Antikörper-produzierenden Pflanze mit dem Wildtyp

Um den Einfluss der Antikörperbildung nach Infiltration mit dem *Agrobacterium*-Virus Konstrukt auf die Pflanze zu untersuchen, wurden die Proteome der infiltrierten Pflanzen mit denen des Wildtyps (WT) von *N. benthamiana* verglichen. Dazu wurden die Wildtyppflanzen

durch Icon Genetics (Halle an der Saale, Deutschland) parallel zu *N. benthamiana* ID2 kultiviert und jeweils an den gleichen Tagen geerntet.

Da besonders die späten Tage nach Infiltration interessant waren und sich das Proteom des Wildtyps innerhalb von 12 Tagen nicht oder vernachlässigbar gering änderte, wurde für eine vergleichende Analyse der 12. Tag nach Infiltration, bzw. der 12. Tag nach vermeintlicher Infiltration gewählt und im pH-Bereich von 3-10 in der ersten sowie nach dem Molekulargewicht in der zweiten Dimension aufgetrennt.

Das Proteom der Wildtyppflanze (WT) am 12. Tag nach dem Zeitpunkt, an dem sie theoretisch infiltrierte worden wäre und das Proteom von *N. benthamiana* ID2 am 12. Tag nach Infiltration (dpi 12) sind in Abb. 37 dargestellt.

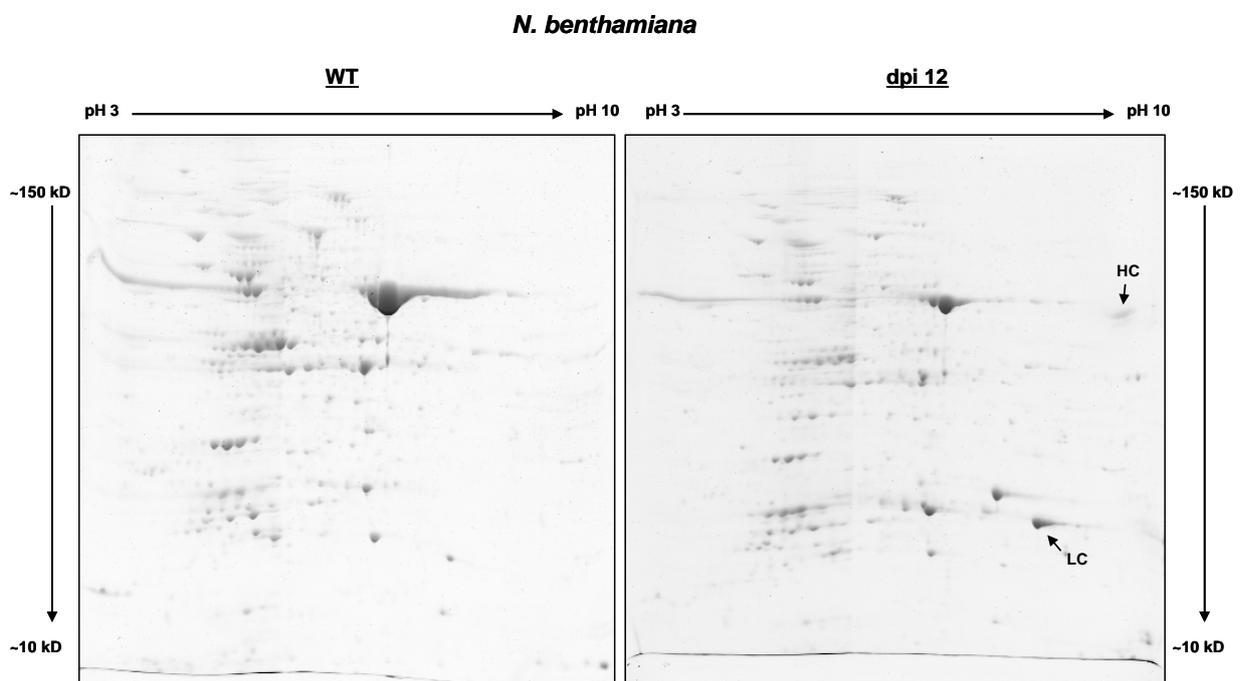


Abb. 37: Vergleich der Proteome des Wildtyps von *N. benthamiana* und der ID2-produzierenden *N. benthamiana*-Pflanze in derselben Wachstumsphase. Jeweils 150 µg Gesamtproteinextrakt wurde in einem linearen pH-Gradienten von 3-10 in der ersten Dimension und einem 12 %igen SDS-Gel in der zweiten Dimension aufgetrennt. Die Proteine wurden mit Coomassie G250 angefärbt und im Durchlichtmodus eingescannt. **LC:** Leichte Kette; **HC:** Schwere Kette

Die Spots des Antikörpers und der viralen Proteine waren im Gel des aufgetrennten Proteoms des WT erwartungsgemäß nicht zu sehen. Da diese im Gel des aufgetrennten Proteoms von dpi 12 bereits 24 % des Gesamtvolumens (relatives Volumen) aller Spots ausmachten, wurden diese Spots bei der Berechnung der relativen Volumen aller anderen Spots nicht berücksichtigt. Trotzdem war ein Vergleich aufgrund der Mengenverhältnisse schwierig und es konnten lediglich Aussagen über signifikante Unterschiede getroffen werden. Diese bezogen sich insbesondere auf die Zunahme der relativen Volumen von

Spots im Gel des aufgetrennten Proteoms der infiltrierten Pflanze. Dabei handelte es sich um die Spots der Glucan Endo-1,3-beta-Glucosidase und der aciden Endochitinase A. Die Spots der Glucan Endo-1,3-beta-Glucosidase waren beim WT nur in Spuren und die Endochitinase A in wesentlich geringerer Menge vorhanden, als bei *N. benthamiana* ID2. Da beide Pflanzen am gleichen Tag ihrer Wachstumsphase geerntet wurden, war die verstärkte Akkumulation beider Enzyme in der infiltrierten Pflanze auf das Einbringen des *Agrobacterium*-Virus Konstruktes, und nicht auf einen möglichen Alterungsprozess der Blätter zurückzuführen. Gleiches galt für die Enzyme der Photosynthese, für die bei der infiltrierten Pflanze an späteren Tagen eine verminderte Akkumulation beobachtet werden konnte (Tab. 24). Eine Abnahme der Proteinmenge von photosynthetischen Enzymen beim WT war nicht nachzuweisen, sodass diese ebenfalls auf die Infektion der Pflanzen und nicht auf die Alterung der Blätter zurückzuführen war.

3.2.3 Vergleichende Proteomanalysen von Überständen der CHO_MA1956-Zellkultur

3.2.3.1 Eindimensionale Analyse

Im Gegensatz zu den Pflanzen wurden die CHO-Zellen stabil transfiziert, wobei die Gene für die leichte und die schwere Kette auf einem Expressionsvektor unter der Kontrolle von starken Promotoren lagen. Die biotechnologische Herstellung therapeutischer Proteine in Säugerzellen ist ein standardisiertes Verfahren und die Ausbeuten haben sich in den letzten Jahren durch den Einsatz von optimierten Expressionsvektoren deutlich verbessert.

Das sogenannte „expression profiling“ mithilfe von Proteomanalysen ist dabei ein nützliches Werkzeug und gibt Aufschluss über den Effekt genetischer Veränderungen. Die Proteomanalyse des Überstandes während des Produktionsprozesses wird erst seit kurzem eingesetzt und erlaubt die Beobachtung und Kontrolle bestimmter Prozessabläufe (Kulturmedien, Fütterung etc). In der vorliegenden Arbeit sollte die Analyse des Überstandes, in dem der sekretierte Antikörper vorlag, als Referenz zu der Antikörperbildung in *N. benthamiana* durchgeführt werden. Für die Analyse des Proteoms von Überständen zu verschiedenen Zeitpunkten der Zellkultur einer CHO-Zelllinie, die den monoklonalen Antikörper MA1956 bildete, standen die Überstände von Tag 1-17 zur Verfügung.

Die Zellkultur wurde unter GMP-Verhältnissen durchgeführt. Die Dauer richtete sich nach der Anzahl der überlebenden Zellen, die einen Wert von 80 % nicht unterschreiten durfte. Die Überlebendzellzahl (Viability) wurde täglich kontrolliert und lag bei Abbruch der Fermentation nach 17 Tagen zwischen 85 und 90 %. Um auch die Produktivität der Zelle zu kontrollieren wurde desweiteren täglich der Gehalt des MA1956 bestimmt. Bis zum Abbruch der Fermentation erreichte dieser eine Konzentration von ~1 mg/ml. Die Überlebendzellzahl und der Gehalt des MA1956 im Verlauf der Zellkultur sind in Abb. 38 graphisch dargestellt.

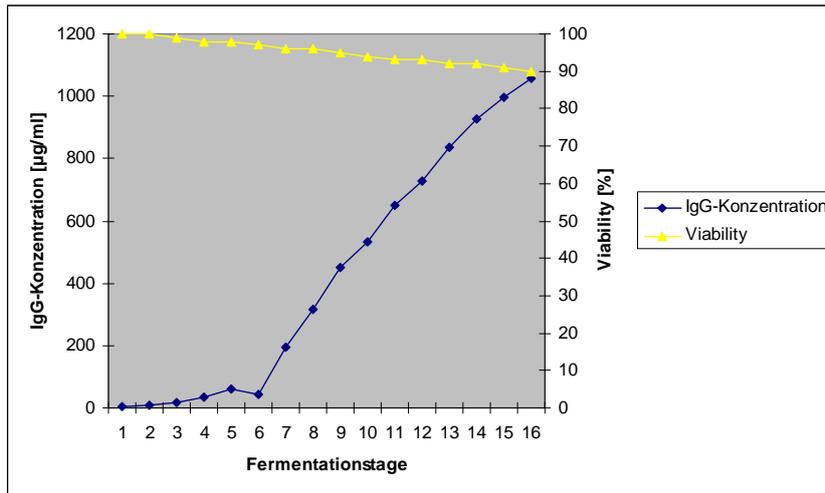


Abb. 38: Überlebenszellzahl (Viability) und IgG-Konzentration im Verlauf der Fermentation

Jeweils 50 ml von jedem Tag der Zellkultur wurden nach Einfrieren bei -80 °C für die Proteomikstudien übergeben. Durch Auftauen und Abzentrifugieren wurden die restlichen sich in der Probe befindenden Zellen vom Überstand getrennt. Die Menge der Zellen wurde visuell abgeschätzt. In den ersten Tagen befanden sich kaum Zellen in den entnommenen Überständen. Die Menge steigerte sich bis Tag 5 ein wenig und blieb ab diesem Tag ungefähr gleich.

Um einen ersten Überblick über das Mengenverhältnis von MA1956 im Vergleich zu den anderen sich in den Überständen befindenden Proteinen zu erhalten wurde von jedem Tag das gleiche Volumen in einer SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt (Abb.39).

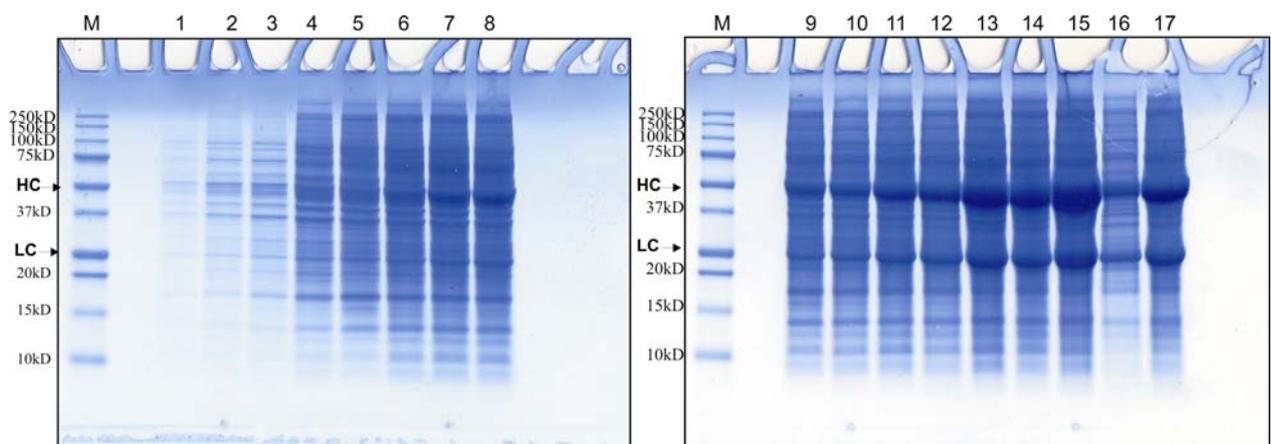


Abb. 39: SDS-PAGE der Zellkultur-Überstände von Tag 1-17 der Fermentation der CHO_MA1956-Zelllinie

Jeweils 20 µl des Überstandes von Tag 1-17 wurden in einem 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt. **Vermerk:** Von Tag 16 (**Line 16**) wurde weniger aufgetragen. **M:** Prestained Proteinmarker, **1-17:** Überstand Tag 1-17 nach Beginn der Fermentation, **HC:** Schwere Kette, **LC:** Leichte Kette

Das zu erwartende Bandenmuster der leichten und schweren Kette war bereits aus den Strukturanalysen der idiotypischen Antikörper (Abschnitt 3.1.1) bekannt, bei denen der aufgereinigte MA1956 vom κ -Typ ebenfalls in der eindimensionalen Elektrophorese aufgetrennt worden war. Am ersten Tag der Fermentation waren nur schwache Signale im Gel zu erkennen, die in den folgenden Tagen immer intensiver wurden. Die Banden der leichten und schweren Kette waren ab Tag 2 bereits deutlich zu sehen. Ab Tag 4 schien die Menge an Proteinen im Überstand parallel zum Antikörper rasant zu steigen.

Die Banden aller Proteine erstreckten sich über den gesamten Molekulargewichtsbereich (10-250 kD), wobei die Banden der leichten und schweren Kette stets von den anderen zu unterscheiden waren, da sie das größte Volumen und die stärkste Intensität hatten. Der Antikörper war demnach das einzige Protein im Überstand dessen Menge bis zum Ende der Fermentation in diesem Maße anstieg.

Unter nicht reduzierenden Bedingungen war eine genaue Zuordnung der Banden des Antikörpers zwischen allen anderen Banden schwierig. Daher wurde nach SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen ein Western Blot mit zwei verschiedenen Detektionsverfahren durchgeführt (Abb. 40). Eine Anfärbung mit einem Anti-Maus-Antikörper, der spezifisch für die κ -Ketten war, detektierte die leichte Kette und Fragmente bestehend aus mindestens einer leichten Kette. Eine Anfärbung mit einem Mannose-spezifischen Lektin detektierte glykosylierte Proteine, wobei darauf zu achten war, dass neben der schweren Kette auch andere glykosylierte Proteine im Proteom des Überstandes vorhanden sein konnten.

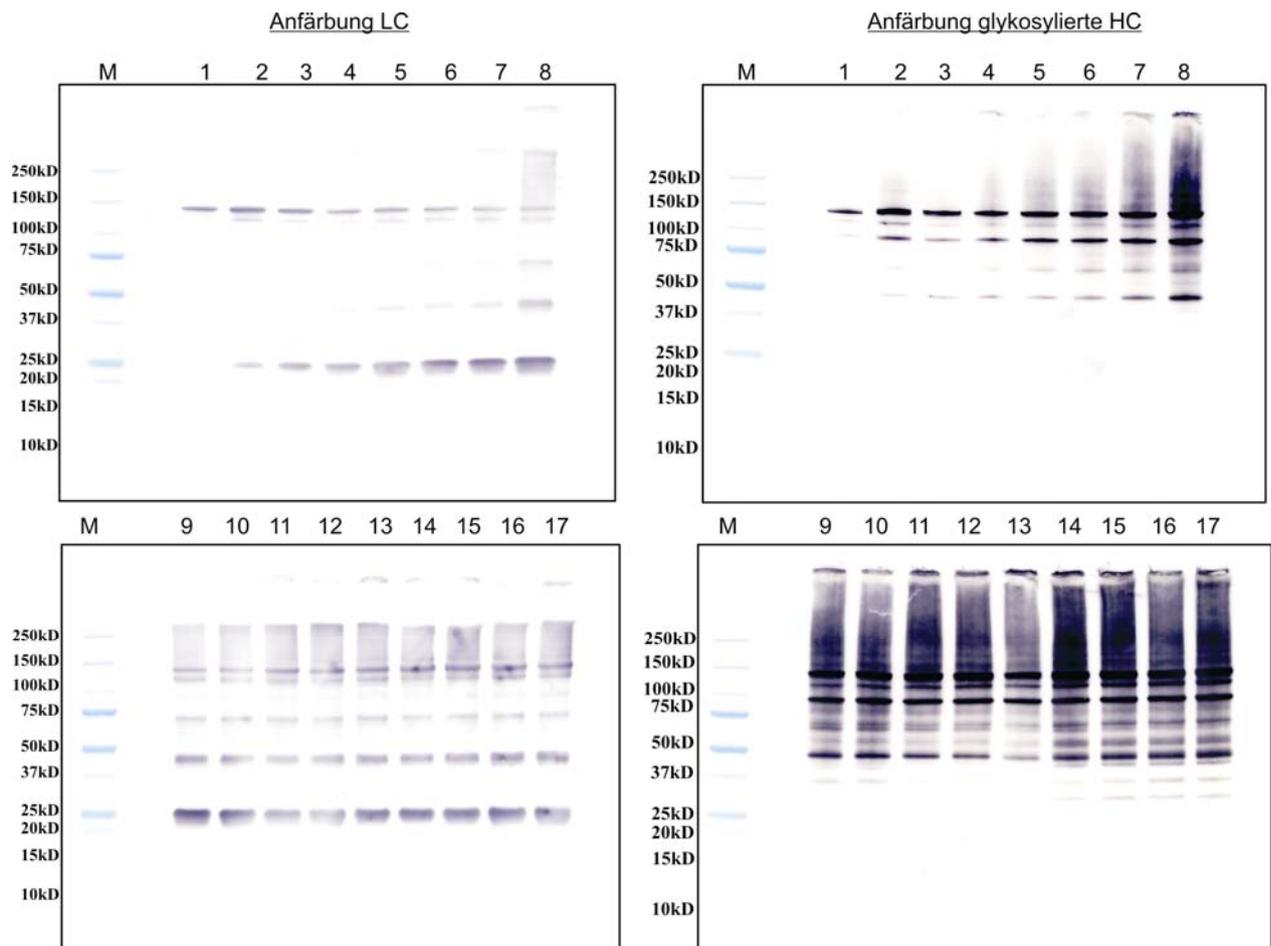


Abb. 40: Anfärbung der leichten Kette (LC) und glykosylierten schweren Kette (HC) im Proteom des Zellkultur-Überstandes von Tag 1-17 der Fermentation.

Jeweils 5 µg Proteingesamtmenge wurden in der SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und nach Western Blot mit einem Anti-Maus-IgG, der für die κ -Kette spezifisch war, und mit Concavalin A, dass für die glykosylierte schwere Kette spezifisch war, angefärbt. **M:** Prestained Proteinmarker, **1-17:** Überstand Tag 1-17 nach Beginn der Fermentation

Zu Beginn der Fermentation wurde durch beide Detektionsverfahren ein Signal unterhalb von 150 kD angefärbt. Im Verlauf der Fermentation kamen weitere Signale dazu, deren Molekulargewichte zu einzelnen leichten und schweren Ketten, sowie verschiedenen Fragmenten aus beiden Ketten passten. Je nachdem, ob Banden nur durch Anfärbung mit dem κ -Ketten-spezifischen Antikörper, nur durch Anfärbung mit dem Mannose-spezifischen Lektin oder durch beide Anfärbungen detektiert wurden, konnten diese unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes durch direkten Vergleich der Western Blots am Beispiel von Tag 7 identifiziert werden (Ab. 41). Banden, die nur im κ -Ketten gefärbten Blot zu sehen waren, entsprachen der freien leichten Kette (LC) und Dimeren (L_2) aus diesen. Banden, die nur im Lektinblot zu sehen waren, entsprachen freien schweren Ketten (HC) und Dimeren (H_2) aus diesen. Banden, die in beiden Blots zu sehen waren, entsprachen Fragmenten aus leichter und schwerer Kette (HL), zwei schweren und einer leichten Kette

(H₂L₁) sowie dem kompletten Antikörper-Molekül (H₂L₂). Eine Identifikation der glykosylierten schweren Ketten war nur von Banden möglich, die bis Tag 8 detektiert wurden. Bei späteren Tagen war nicht mehr sicher gestellt, dass es sich um Banden der schweren Kette und nicht um Banden anderer glykosylierter Proteine handelte.

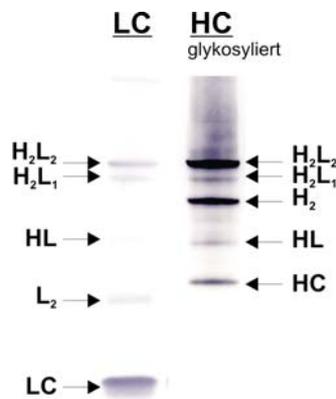


Abb. 41: Identifikation der leichten und schweren Ketten

Jeweils 5 µg des Überstandes von Tag 7 wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran gebロットet. Ein Western Blot wurde mit einem k-Ketten spezifischen Antikörper gefärbt (LC), der zweite Western Blot wurde mit Concavalin A gefärbt (HC).

LC: Leichte Kette, **HC:** Schwere Kette; **HL:** Leichte und schwere Kette, **L₂:** Dimer der leichten Ketten, **H₂:** Dimer der schweren Ketten, **H₂L₁:** Zwei schwere und eine leichte Kette, **H₂L₂:** Kompletter Antikörper

Bereits ab dem ersten Tag der Fermentation wurde der komplette Antikörper in den Überstand sekretiert. Im Verlauf der Fermentation nahm die Intensität der Bande, die den kompletten Antikörper repräsentierte nur geringfügig zu. Dafür steigerte sich die Intensität der Banden, die einzelne Ketten oder Fragmente repräsentierte. Besonders die Intensität der Banden der leichten Kette und dessen Dimere nahm im Vergleich zu allen anderen Banden am deutlichsten zu. Dies war zu erwarten, da zum einen die nichtkovalenten Bindungen durch die SDS-bedingten denaturierenden Bedingungen gelöst werden und aneinander gelagerte Ketten ohne ausgebildete Disulfidbrücken auseinander fallen. Zum anderen ist eine Überschussproduktion von leichten Ketten bekannt, die auch unassembliert in den Überstand sekretiert werden kann. Im Fall der schweren Kette ist eine Sekretion in den Überstand nur in Verbindung mit einer leichten Kette möglich, sodass diese Banden und die von Dimeren der schweren Kette nur durch die denaturierenden Bedingungen hervorgerufen werden konnten.

3.2.3.2 Zweidimensionale Analyse

Die Menge des monoklonalen Antikörpers MA1956 war im Vergleich zu allen anderen Proteinen im Überstand sehr hoch. Dies war aufgrund der Ergebnisse der eindimensionalen Analysen der Überstände zu erwarten und wurde auch durch Vorversuche in der zweidimensionalen Elektrophorese bestätigt, bei der die Signale von leichter und schwerer Kette die der anderen Proteine überdeckte. Daher wurde der Antikörper aus den Überständen verschiedener Tage über eine Protein A-Säule entfernt, bevor das Proteom im pH-Bereich von 3-10 in der ersten Dimension und nach dem Molekulargewicht in der zweiten Dimension aufgetrennt wurden.

Die Spots aus unterschiedlichen Gelen wurden ausgestanzt und massenspektrometrisch identifiziert. Die identifizierten Spots sind in Abb. 42 am Beispiel eines Gels von Tag 5 nach zweidimensionaler Auftrennung und anschließender Coomassiefärbung dargestellt. Die zugehörigen Proteinamen sind in Tab. 25 entsprechend der Spotnummerierung im Gel aufgeführt. An späteren Tagen kamen einige neue Spots hinzu. Diese werden beim Vergleich der Gele zu einem späteren Zeitpunkt beschrieben.

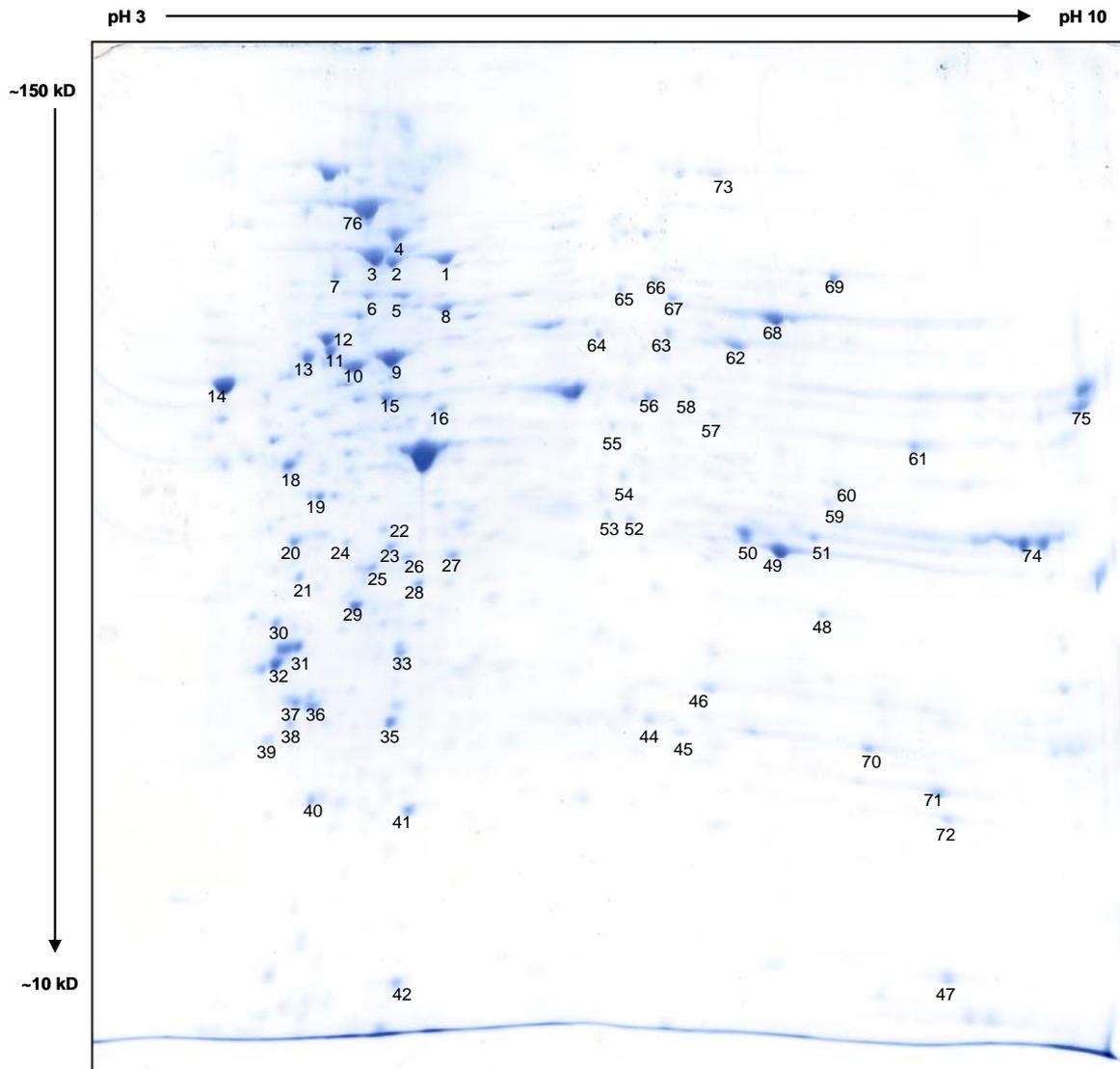


Abb. 42: Proteom vom Überstand der CHO_MA1956-Zellkultur an Tag 5 der Fermentation nach zweidimensionaler Auftrennung. Der Antikörper wurde über eine Protein A-Säule aus der Probe entfernt und 150 µg Gesamtproteinextrakt wurden in einem linearen pH-Gradienten von 3 bis 10 in der ersten Dimension und einem 12 %igen SDS-Gel in der zweiten Dimension aufgetrennt. Die Proteine wurden mit Coomassie G250 angefärbt. Die identifizierten Spots sind in Tab. 25 zusammengefasst.

Tab. 25: Identifizierte Spots des Proteoms vom Überstand der CHO_MA1956-Zellkultur nach Auftrennung im pH-Bereich 3-10

Spot	Proteinname	ID-Nr	Organismus	MW [Da]	Protein Coverage by AA count [%]
1	Heat shock cognate 71 kDa protein	P19378	Cricetulus griseus	70743	25.4
2	Protein disulfide-isomerase A4	P38659	Rattus norvegicus	72656	5.9
3	78 kDa glucoes-regulated protein	P07823	Mesocricetusmauratus	72316	31.2
4	Dipeptidyl peptidase	Q99KK7	Mus musculus	82841	14.8
	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	P21981	Mus musculus	76994	13.4
5	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	Q01853	Mus musculus	89247	18.5
6	Ser/thr-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	Q76MZ3	Mus musculus	65263	23.8
7	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP9	Q66H94	Rattus norvegicus	63068	10.9
8	T-complex protein 1 subunit epsilon	P80316	Mus musculus	59567	18.3
9	Tubulin alpha-1C chain	P68365	Cricetulus griseus	49859	49.7
10	Tubulin beta-2C chain	P68372	Mus musculus	49781	32.1
11	Endoplasmin	P08113	Mus musculus	92400	20.2
12	Protein disulfide-isomerase	Q8R4U2	Cricetulus griseus	56956	36
13	Endoplasmin	P08113	Mus musculus	92400	22.3
14	Calreticulin	Q8K3H7	Cricetulus griseus	48194	41.2
15	Protein disulfide-isomerase A6	P38660	Mesocricetus auratus	48113	24.1
16	Eukaryotic initiation factor 4A-I	P60843	Mus musculus	46106	30.3
18	Heat shock protein HSP 90-beta	P11499	Mus musculus	83255	9.8
19	40S ribosomal protein SA	P38982	Cricetulus griseus	32842	42.4
20	Endoplasmin	P08712	Mesocricetus auratus	46746	25
21	Heat shock cognate 71 kDa protein	P19378	Cricetulus griseus	70743	7.6
22	Protein SEC13 homolog	Q5XFW8	Rattus norvegicus	35507	13
23	Heat shock protein HSP 90-beta	P34058	Rattus norvegicus	83211	13.3
24	Heat shock cognate 71 kDa protein	P63018	Rattus norvegicus	70809	7.3
25	Thioredoxin-like protein 1	Q920J4	Rattus norvegicus	32210	13.1
26	Heat shock protein HSP 90-alpha	P46633	Cricetulus griseus	84777	9.4
27	Tubulin beta-5 chain	P69893	Cricetulus griseus	49620	28.2
28	Inorganic pyrophosphatase	Q9D819	Mus musculus	32628	24.2
29	Annexin	P48036	Mus musculus	35712	21.6
30	Proliferating cell nuclear antigen	P57761	Cricetulus griseus	28758	42.5
31	Tropomyosin alpha-4 chain	P09495	Rattus norvegicus	28474	18.5
32	14-3-3 protein epsilon	P62259	Mus musculus	29137	49
33	Chloride intracellular channel protein 1	Q9Z1Q5	Mus musculus	26977	39.4
35	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	Q99PT1	Mus musculus	23374	39.2
36	14-3-3 protein beta/alpha	Q9CQV8	Mus musculus	28050	36.6
37	14-3-3 protein zeta/delta	P63101	Mus musculus	27735	30.6
38	Proteasome subunit alpha type-5	Q9Z2U1	Mus musculus	26376	40.7
39	Eukaryotic translation initiation factor 6	O55135	Mus musculus	26476	51
40	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K	Q9DBZ5	Mus musculus	25052	12.4
41	Peroxiredoxin-2	Q8K3U7	Cricetulus griseus	21781	56.6
42	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	Q3T1J1	Rattus norvegicus	16803	43.5
44	Triosephosphate isomerase (Fragments)	P86216	Mesocricetus auratus	20276	29.3
45	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	P00494	Cricetulus griseus	24609	22.5
46	Phosphoglycerate mutase 1	P25113	Rattus norvegicus	28795	47.6
47	Cofilin-1	P45592	Rattus norvegicus	18502	62.7
48	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	P68040	Mus musculus	35036	18
49	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P17244	Cricetulus griseus	35707	44.4
50	L-lactate dehydrogenase A chain	P06151	Mus musculus	36457	22.3
51	Annexin A2	P07356	Mus musculus	38633	32.2

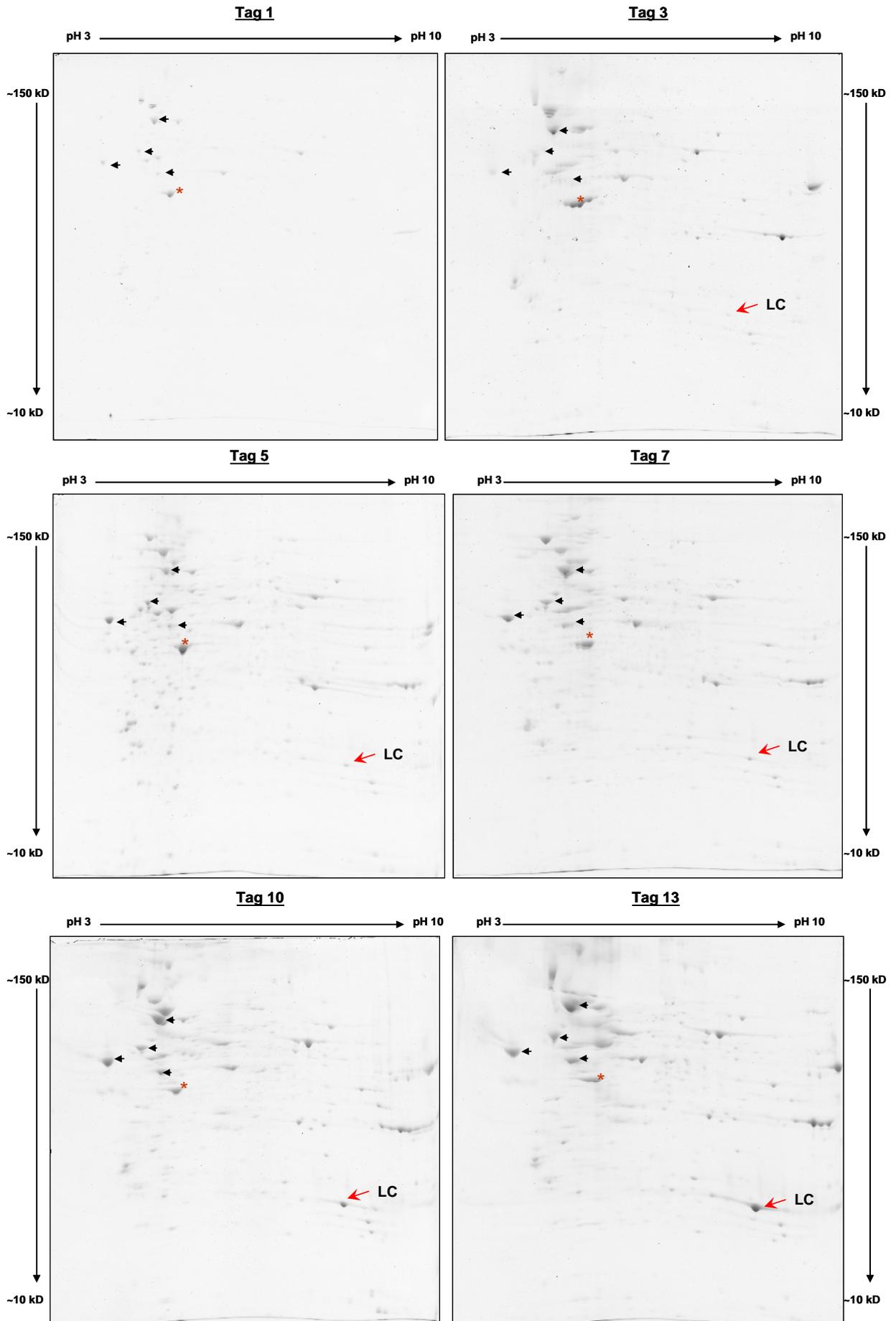
52	Aldose reductase-related protein 2	O08782	Cricetulus griseus	36298	26.3
54	Protein disulfide-isomerase A6	P38660	Mesocricetus auratus	48113	12.3
55	Adenosylhomocysteinase	P10760	Rattus norvegicus	47489	10.4
56	Elongation factor 1-gamma	Q68FR6	Rattus norvegicus	50011	25.4
57	Multifunctional protein ADE2	Q9DCL9	Mus musculus	47022	8.7
58	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	Q9DCD0	Mus musculus	53195	11
59	Phosphoserine aminotransferase	Q99K85	Mus musculus	40428	12.7
60	Alcohol dehydrogenase class-3	P28474	Mus musculus	39504	8.8
61	Phosphoglycerate kinase 1	P50310	Cricetulus griseus	44516	42
62	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	Pkm2	Mus musculus	57790	19.8
63	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	Q61753	Mus musculus	56531	6.4
64	T-complex protein 1 subunit beta	Q5XIM9	Rattus norvegicus	57404	22.8
65	T-complex protein 1 subunit gamma	P80318	Mus musculus	60573	9.5
66	Stress-induced-phosphoprotein 1	Q60864	Mus musculus	62524	10.7
67	T-complex protein 1 subunit zeta	P80317	Mus musculus	57949	14.3
68	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	P11980	Rattus norvegicus	57762	21.8
69	Transketolase	P40142	Mus musculus	67569	18
70	Ig kappa chain C region	P01834	Homo sapiens	11583	67
71	Glutathione S-transferase P	P46424	Cricetulus longicaudatus	23605	39.5
72	Peroxiredoxin-1	Q9JKY1	Cricetulus griseus	22230	23.1
73	Elongation factor 2	P09445	Cricetulus griseus	95217	5.8
74	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P17244	Cricetulus griseus	35707	25,5
75	Elongation factor 1-alpha 1	P62629	Cricetulus griseus	50064	34.4
76	Hypoxia up-regulated protein 1	Q60432	Cricetulus griseus	111184	21.6

Die vergleichenden Analysen der Proteome von Überständen der CHO_MA1956-Zellkultur verschiedener Tage wurde entsprechend der Analysen des Proteoms von *N. benthamiana* ID2 im Hinblick auf signifikante Veränderungen durchgeführt. Eine Menge von 150 µg Gesamtproteinlysate ergab in Vorversuchen das beste Ergebnis und wurde als Einsatzmenge für die Auftrennung aller Überstände gewählt. Aus den Überständen der ersten beiden Tagen konnten jedoch keine 150 µg Gesamtprotein gewonnen werden, sodass die Einsatzmenge bei Tag 1 und 2 nur 120 µg Gesamtproteinlysate betrug.

Abb. 43 zeigt das Proteom des CHO_MA1956-Zellkultur-Überstandes an den Tagen 1, 3, 5, 7, 10, 13 und 16 der Fermentation.

Im Gel des Überstandes an Tag 1 der Fermentation befanden sich nur wenige Spots. Zu den identifizierten darunter gehörten die Chaperone des endoplasmatischen Retikulums Grp170, Grp78, Calreticulin, Calnexin und verschiedene Proteindisulfidisomerasen. All diese Proteine sind an der Faltung des naszierenden Polypeptids beteiligt. GRP78 ist auch unter dem Namen Binding Immunoglobulin Protein (BiP) bekannt und liegt im Komplex mit der schweren Kette im ER vor, solange keine leichte Kette an diese gebunden ist. Weitere Spots repräsentierten das Heat Shock Cogenate 71 kD Protein (HSC70), das Pyruvat Kinase Isoenzym, Aktin und Tubulin. Das HSC70 zählt ebenfalls zu den Chaperonen und ist an der späten Faltung im Cytosol beteiligt.

Überstände CHO_MA1956 - Zellkultur



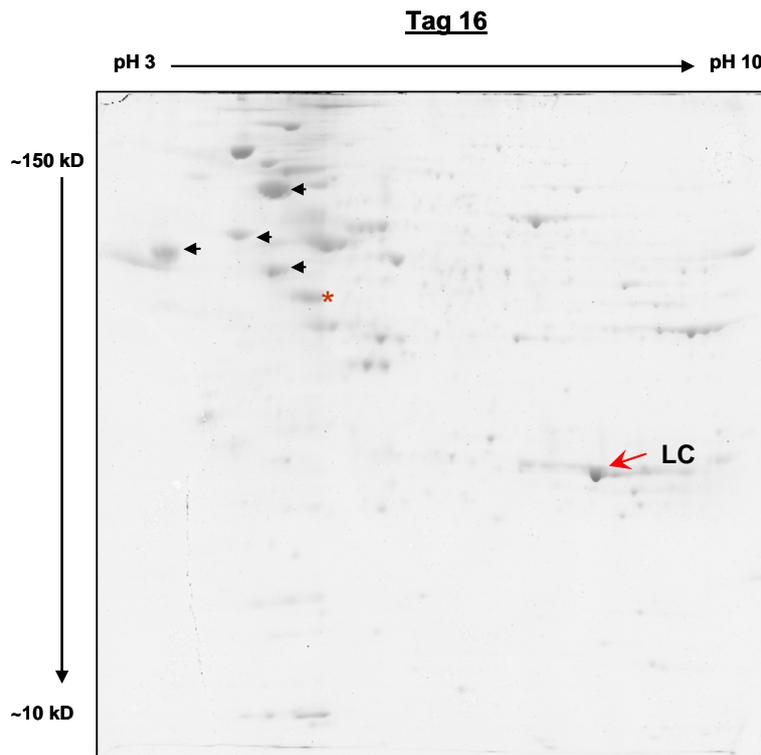


Abb. 43: Proteom der Überstände von Tag 1,3,5,7,10,13 und 16 der CHO_MA1956-Zellkultur

Der monoklonale Antikörper wurde mit Protein A aus den Überständen entfernt und jeweils 150 µg Proteinlysate wurden im Bereich von pH 3-10 in der ersten und nach dem Molekulargewicht in der zweiten Dimension aufgetrennt. Bei Tag 1 konnten nur 120 µg Gesamtprotein aus dem Überstand gewonnen und aufgetrennt werden. **Roter Stern (*)**: Aktin = „housekeeping protein“, **Schwarze Pfeilspitzen**: Faltungshelfer BiP, PDI A6, PDI und Calreticulin, **roter Pfeil**: Leichte Kette (LC)

An späteren Tagen kamen weitere Spots hinzu, von denen die meisten zelluläre Proteine, wie Faltungshelfer oder metabolische Enzyme, repräsentierten. Ab Tag 3 war auch der Spot der leichten Kette zu sehen, der an späteren Tagen deutlich an Volumen zunahm. Die Detektion dieser, trotz vorheriger Entfernung des Antikörpers, bestätigte eine Überschussproduktion der leichten Kette, die unassembliert in den Überstand sekretiert wird. Weitere sekretorische Proteine konnten erst im Überstand späterer Fermentationstage als die zur Familie der Proteasen gehörenden Cathepsine identifiziert werden.

Der Vergleich des Proteoms der Überstände verschiedener Fermentationstage zeigte eine Zunahme aller Spotintensitäten, besonders jedoch der Faltungshelfer. Dies führte dazu, dass die Auftrennung im hohen Molekulargewichtsbereich zwischen pH 3-5 an späteren Tagen schlechter wurde. Auch der Spot des Aktins nahm an Volumen und Intensität zu. Da das Gen des Aktins jedoch zu den sogenannten „housekeeping“ Genen gehört, die in den Zellen konstant exprimiert werden, war die Zunahme des Signals nicht auf eine verstärkte Expression, sondern auf das vermehrte Vorkommen beschädigter Zellen im Überstand

zurückzuführen. Eine größere Anzahl beschädigter Zellen bedeutete auch eine Zunahme aller anderer zellulärer Proteine im Überstand.

Da in jedem Überstand eine unterschiedliche Zahl beschädigter Zellen möglich war und an den späteren Tagen zusätzlich die Zahl der apoptotischen Zellen während der Zellkultur stieg, konnte eine Auswertung dementsprechend nur in Bezug auf eine Veränderung des „housekeeping proteins“ Aktin vorgenommen werden.

Um die Qualität des Aktins als „housekeeping protein“ zu untersuchen, wurde zunächst das Verhältnis der Spotvolumen der leichten Kette zu dem Spotvolumen des Aktins zu verschiedenen Tagen gebildet. Der Anstieg des Verhältnisses von LC/Aktin wurde daraufhin mit dem Anstieg der gesamten IgG-Konzentration, die bereits während der Fermentation an jedem Tag mittels ELISA bestimmt wurde, verglichen (Abb. 44).

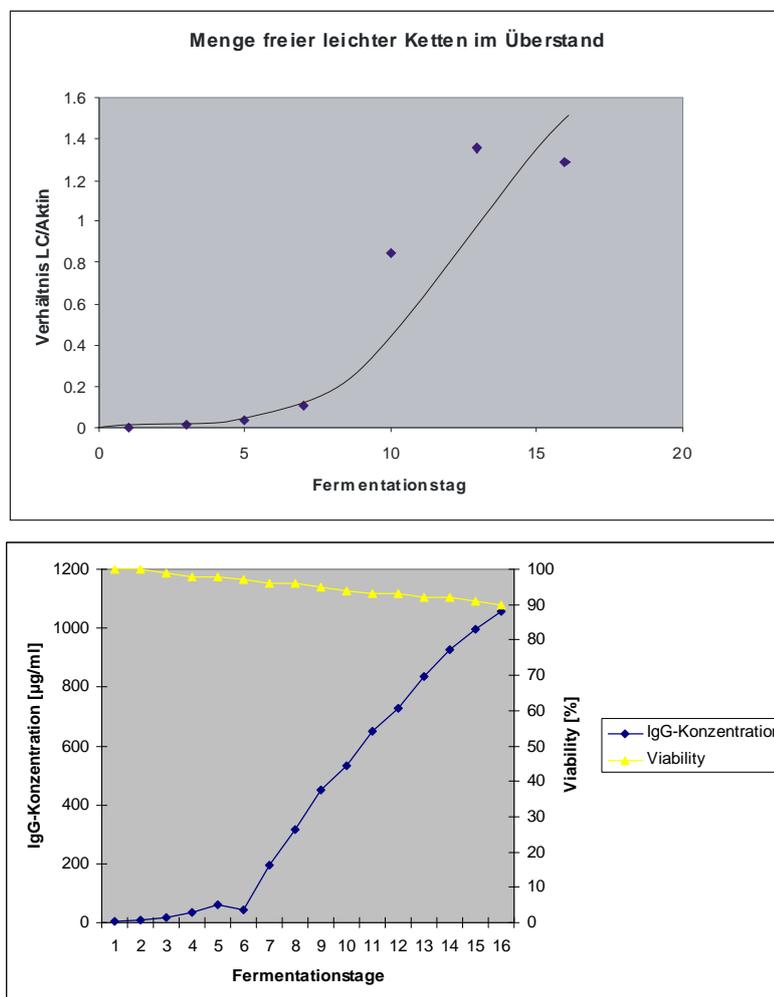


Abb. 44: Vergleich des Verhältnisses der freien leichten Kette zu Aktin mit der IgG-Konzentration im Überstand

Aus den 2D-Gelen der Tage 1,3,5,7,10,13 und 16 wurde das Verhältnis der Spotvolumen der leichten Kette (LC) zum dem des Aktins bestimmt. Das Verhältnis LC/Aktin wurde gegen die Tage aufgetragen. Die IgG-Konzentration (blaue Kurve) wurde während der Fermentation an jedem Tag mittels ELISA bestimmt.

Im Zuge einer stetigen Überschussproduktion der leichten Ketten, die neben dem kompletten Antikörper unassembled ins Medium sekretiert werden, war zu erwarten, dass die Konzentration der freien leichten Kette in gleichem Maße anstieg, wie die des kompletten Antikörpers.

Beide Kurven zeigten einen exponentiellen Verlauf. Die Konzentration des MA1956 (IgG-Konzentration) stieg bis Tag 7 nur langsam und dann rasant an. Gleiches konnte für das Verhältnis der leichten Kette von MA1956 zum Aktin festgestellt werden, denn dieses stieg bis Tag 7 ebenfalls langsam und ab diesem Zeitpunkt rasant an. Die Übereinstimmung beider Kurven zeigte, dass Aktin durch die konstante Expression des Gens als „housekeeping protein“ zum Vergleich von 2D-Gelen durchaus geeignet war.

Dementsprechend wurde an den verschiedenen Tagen jeweils das Verhältnis der Spotvolumen von ausgewählten Proteinen zu dem des Aktins berechnet und die Steigung der Geraden, die durch diese Punkte verlief, ermittelt (Abb. 45). Da die Veränderung der Expression von Faltungshelfern von besonderem Interesse war, wurden repräsentativ für diese BiP, PDI A6, PDI und Calreticulin ausgewählt.

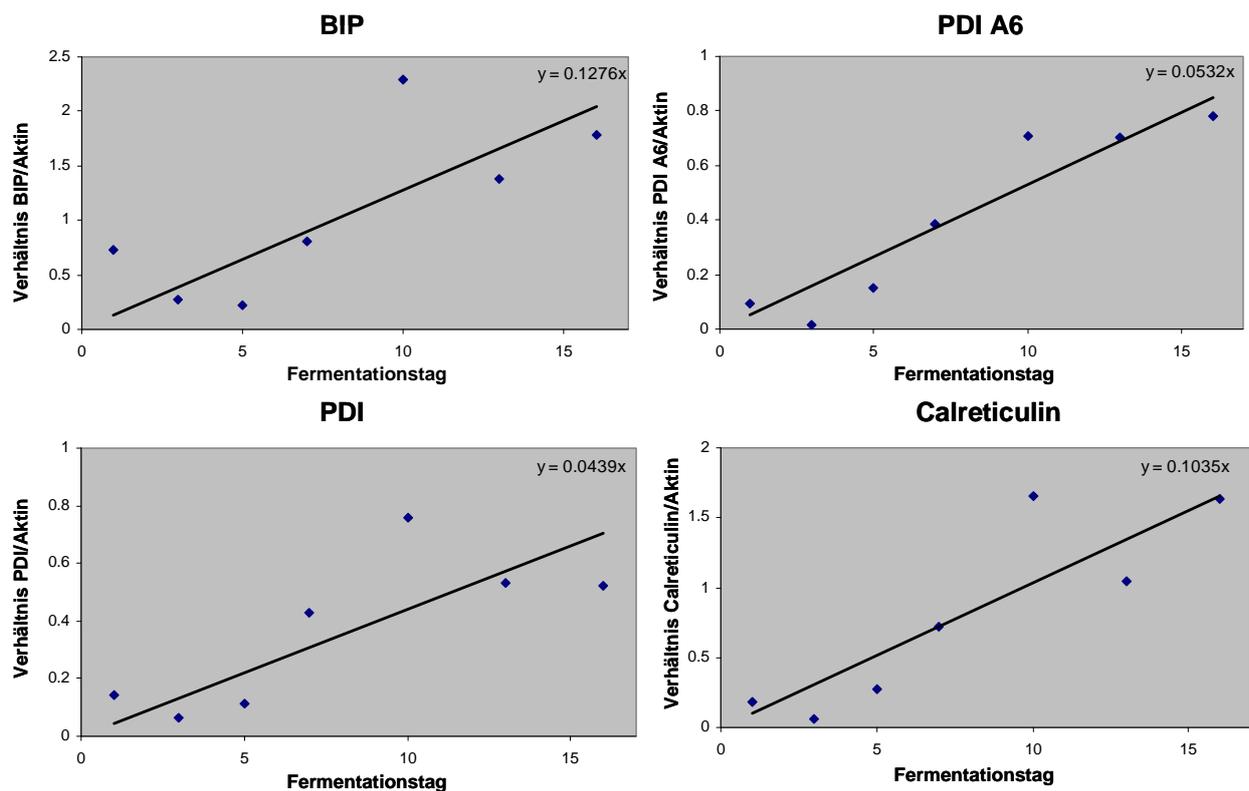


Abb. 45: Menge der Faltungshelfer BiP, PDI A6, PDI und Calreticulin im Verhältnis zu Aktin in den Überständen von Tag 1-16 der CHO_MA1956-Zellkultur

Aus den 2D-Gelen der Tage 1,3,5,7,10,13 und 16 wurde das Verhältnis der Spotvolumen von Faltungshelfern zum dem des Aktins bestimmt. Das Verhältnis Faltungshelfer/Aktin wurde gegen die Tage aufgetragen und die Steigung ermittelt.

Das Verhältnis der untersuchten Faltungshelfer zu Aktin stieg von Tag 1 bis Tag 16 an. Abweichungen waren auf schlechte Auftrennungen im Gel zurückzuführen, beeinflussten den generellen Trend der Verhältnisse der Faltungshelfer zu Aktin aber nicht. Die größte Steigung konnte bei BiP und Calreticulin beobachtet werden. Während Aktin im Vergleich zu beiden Chaperonen zu Beginn der Zellkultur noch in viel größeren Mengen vorlag, schien die Expression der Chaperone im Verlauf der Fermentation zu steigen. An Tag 16 waren beide Faltungshelfer in der anderthalben bis zweifachen Menge gegenüber Aktin im Überstand zu finden. Unter der Voraussetzung, dass Aktin konstant exprimiert wurde, bedeutete dies eine 10-12fache gesteigerte Expressionsrate beider Chaperone von Tag 1-16 der Zellkultur. Das Verhältnis der Proteindisulfidisomerasen zu Aktin stieg im Verlauf der Fermentation ebenfalls an, allerdings in geringerem Maße als das Verhältnis von BiP und Calreticulin zu Aktin. Trotzdem war die Expressionsrate an Tag 16 um das 4-5fache höher, als am ersten Tag der Fermentation.

3.2.4 Stabilität von Antikörpern aus *N. benthamiana* und CHO-Zellen

Um die Stabilität von Antikörpern in Pflanzen zu untersuchen, wurden die Proteome unter nicht reduzierenden Bedingungen an verschiedenen Tagen nach Infiltration zweidimensional im linearen pH-Bereich von 6-11 in der ersten Dimension und anschließend in der SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Blotten der Proteine auf eine PVDF-Membran wurde der Antikörper durch Anfärbung mit einem polyklonalen anti-human IgG nachgewiesen. Nach diesem Verfahren wurden als Vergleich auch die Proteome der Überstände der CHO-Zellkultur analysiert. Um in beiden Organismen auch geringe Mengen möglicher Fragmente zu identifizieren, wurden sowohl die Proteinlysate als auch der für die Anfärbung eingesetzte anti-human IgG im Überschuss aufgetragen.

Die Abb. 46 zeigt die Anfärbung von ID2 innerhalb der Proteoms von *N. benthamiana* an Tag 1,2,5,9 und 12 nach Infiltration.

Im Gegensatz zu den auf der Coomassiefärbung basierenden Proteomanalysen (Abschnitt 3.2.1.1) konnte der Antikörper an den Tagen 1 und 2 durch eine Überbeladung der Gele und Anfärbung mit einem IgG-spezifischen Antikörper teilweise detektiert werden. An dpi 1 waren schwache Signale im Molekulargewichtsbereich bei ~100 kD, die zum Dimer der schweren Kette (H_2) passten, und an dpi 2 zusätzliche Signale im Molekulargewichtsbereich der leichten Kette bei ~25 kD zu erkennen. Ab dpi 5 war das Spotmuster des Antikörper innerhalb des Proteoms mit dem des aufgereinigten ID2 nach zweidimensionaler Auftrennung (Abschnitt 3.1.5) vergleichbar mit. Dieses repräsentierte die leichte Kette bei ~25 kD (LC), Dimere der leichten Kette unterhalb von ~50 kD (L_2), die schwere Kette oberhalb von ~50 kD (HC), Dimere der schweren Kette bei ~ 100 kD (H_2), sowie H_2L_1 und H_2L_2 oberhalb von 100 kD. An den späteren Tagen nach Infiltration (dpi 9 und 12) wurde eine Verlagerung der Spotintensitäten von H_2 , H_2L_1 und H_2L_2 zugunsten den Signalen der leichten Ketten und deren Dimere beobachtet, sodass diese das Bild dominierten. Der Grund dafür konnte in der vermehrten Sekretion von freien leichten Ketten oder in einer verminderten Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen leichten und schweren Ketten liegen. Zusätzlich war jedoch auch ein Abbau des Antikörpers möglich, der zu Fragmenten mit Molekulargewichten führte, die den leichten Ketten und deren Dimeren ähnlich waren. Das schwache Signal der schweren Kette von dpi 5 bis dpi 7 zeigte dagegen, dass die Menge an einzeln vorliegender schwere Kette stetig gering bleibt. Demzufolge waren die beiden Disulfidbrücken in der Hinge Region zwischen zwei schweren Ketten in der Regel immer vollständig ausgebildet wird, sodass diese nicht durch stark denaturierende Bedingungen auseinander fallen konnten.

ID2 im Proteom von *N. benthamiana*

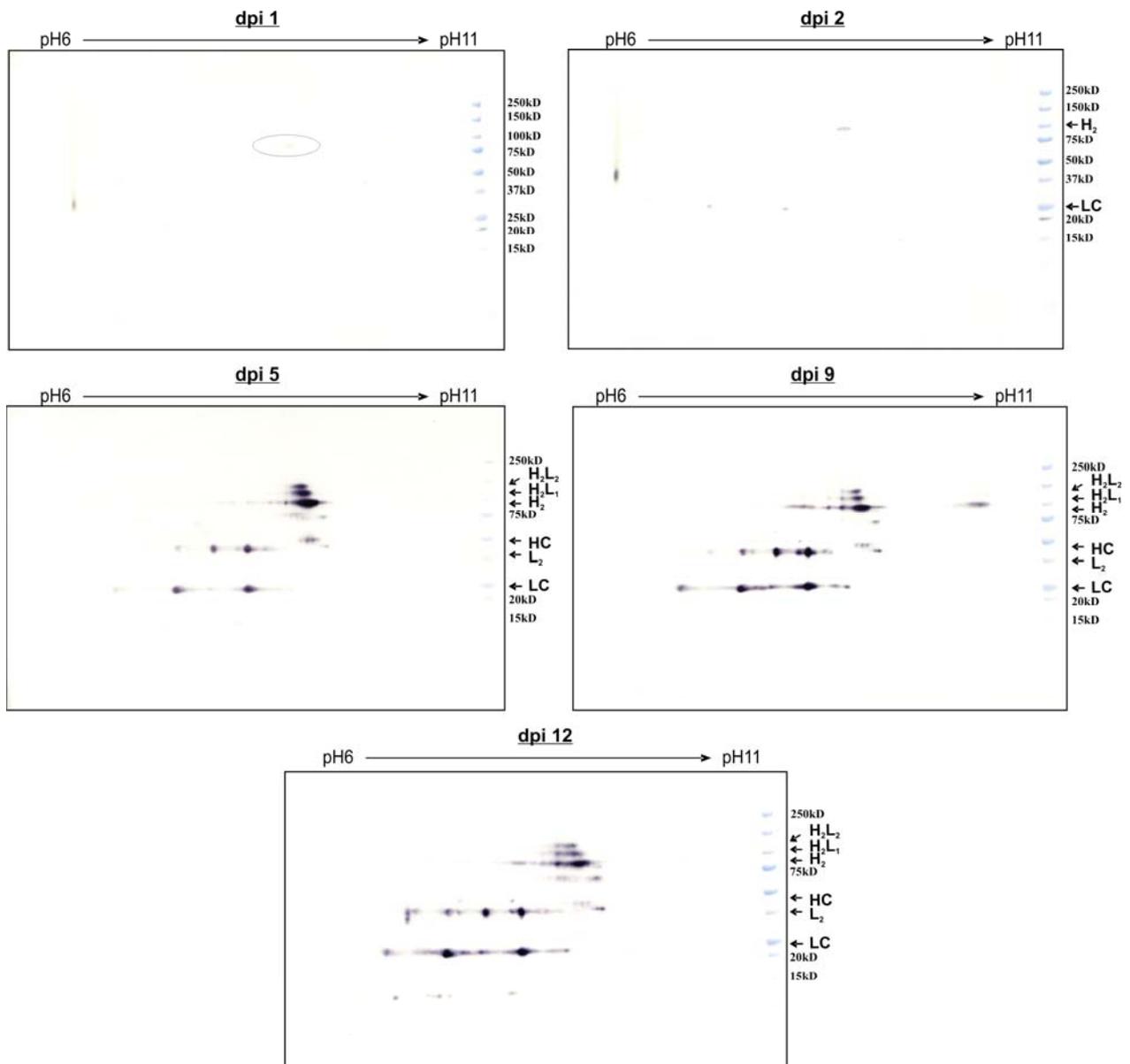


Abb. 46: Anfärbung des Antikörpers ID2 innerhalb des Proteoms von *N. benthamiana* an Tag 1,2,5,9 und 12 nach Infiltration. Jeweils 120 µg Gesamtproteinlysat von dpi 1,2,5,9 und 12 wurden in der ersten Dimension von pH 6-11 nach dem isoelektrischen Punkt und in der zweiten Dimension nach dem Molekulargewicht unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach dem Western-Blot auf eine PVDF-Membran wurde der Antikörper und Antikörper-Fragmente mit einem polyklonalen anti-human IgG angefärbt. **LC:** Leichte Kette; **HC:** Schwere Kette; **L₂:** Dimer der leichten Kette, **H₂:** Dimer der schweren Kette; **H₂L₁:** Zwei schwere, eine leichte Kette; **H₂L₂:** Komplettes Antikörper-Molekül

Zusätzlich zu den beschriebenen Spots wurden ab dpi 5 weitere Spots unterhalb von H₂ schwach angefärbt. Ähnliche Signale konnten bereits in den eindimensionalen Strukturanalysen des aufgereinigten ID2 als Banden unterhalb von H₂ beobachtet werden, die durch Coomassie und eine κ-Ketten-spezifische Anfärbung detektiert wurden (Abschnitt

3.1.3). Desweiteren ergab auch die massenspektrometrische Analyse des nativen ID2 (Abschnitt 3.1.7.1) neben den Massen der leichten Kette und des kompletten ID2 ein Signal mit einer Masse von 96532,4 Da, das größtmäßig zu den Banden und Spots unterhalb des H₂-Moleküls passen könnte. Weitere bisher nicht identifizierte Spots an dpi 12 unterhalb von 15 kD und im Bereich von L₂ implizierten einen Zerfall des Antikörpers in kleinere Fragmente an späteren Tagen nach Infiltration.

Eine Zuordnung der bisher nicht identifizierten Signale war erst nach der massenspektrometrischen Analyse des Glykosylierungsmusters (Abschnitt 3.2.5) möglich. Denn dabei fielen Massensignale im dekonvolvierten Spektrum auf, die nicht zu einer Glykosylierung passten (Abb.47). Die Abstände der Signale entsprachen den Molekulargewichten der Aminosäuren Ala, Pro, Glu und Leu. Diese Aminosäureabfolge stimmte mit der Aminosäuresequenz der schweren Kette von ID2 von Position 235 bis 239 in der Nähe der Hinge Region überein (Abb. 47). Die Berechnung von Position 1-235 der N-terminal zyklisierten schweren Kette ergab ein theoretisches Molekulargewicht von 24929 Da und entsprach mit einem Δ von 0,5 Da der gemessenen Masse von 24928,5 Da, die das Hauptsignal im Spektrum darstellte.

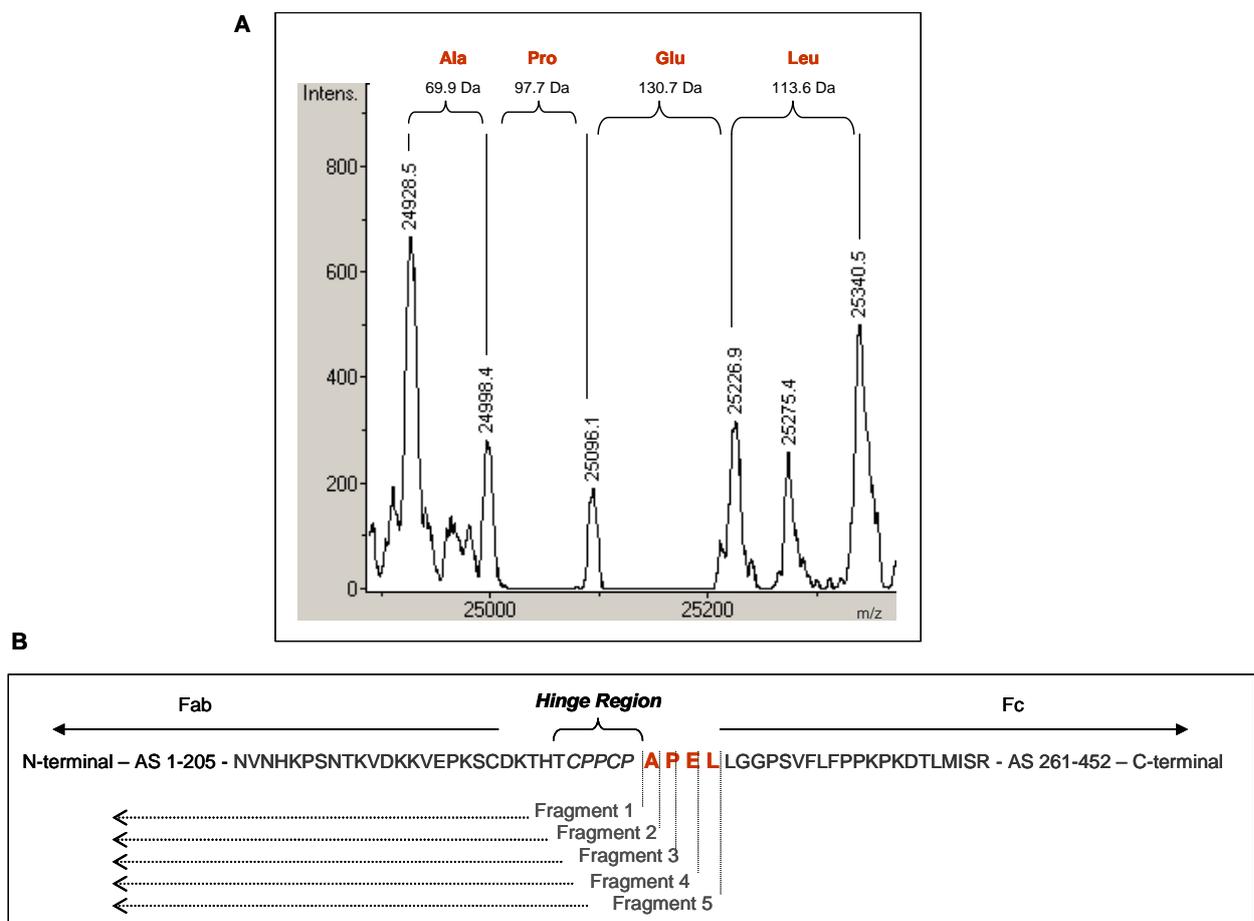


Abb. 47: Dekonvolviertes Spektrum (A) und Spaltstellen (B) in der Sequenz der schweren Kette von ID2 aus *N. benthamiana*

Die Spaltung eines Antikörpers in der Hinge-Region spaltet den Antikörper in ein Fab-Fragment, das den N-terminalen Bereich von der Spaltstelle beschreibt, und ein Fc-Fragment, das den C-terminalen Bereich von der Spaltstelle beschreibt. Bei den gefundenen Fragmenten der schweren Kette handelte es sich demnach um Fab-ähnliche Fragmente. Da die Analyse des Glykosylierungsmusters nach Reduktion des Antikörpers durchgeführt wurde, spiegelten die gefundenen Fragmente der schweren Kette möglicherweise nicht das Auftreten der Fragmente unter nicht reduzierenden Bedingungen wieder. Unter nicht reduzierenden Bedingungen konnten die gefundenen Fragmente der schweren Kette auch mit einer leichten Kette (Fab-Fragment), als Dimer, als Dimer mit einer leichten Kette oder als (Fab)₂-Fragment, bestehend aus zwei Fragmenten mit zwei leichten Ketten, vorliegen. Das Fab-Fragment hätte eine vorausgesagte Masse von 48268 Da und konnte im Western Blot das Signal direkt unterhalb der schweren Kette bei etwa 50 kD darstellen. Für die Berechnung des Dimers des gefundenen Fragmentes mussten die sechs Disulfidbrücken berücksichtigt werden. Abzüglich der 12 H⁺ für diese hätte das Dimer eine vorausgesagte Masse von 49846 Da und konnte somit ebenfalls dem Signal unterhalb der schweren Kette bei etwa 50 kD entsprechen. Das Dimer des Fragmentes der schweren Kette mit einer leichten Kette hätte eine vorausgesagte Masse von 73188 Da und würde somit im selben Molekulargewichtsbereich wie das Monomer HL (~75 kD) liegen. Das (Fab)₂-Fragment hätte eine vorausgesagte Masse von 96531 Da und entsprach bis auf 1,4 Da genau der gefundenen Masse von 96532,4 Da nach massenspektrometrischer Analyse des nativen ID2 (Abschnitt 3.1.7.1)

Die Untersuchung des Abbaus des monoklonalen Antikörpers in den Überständen der CHO_MA1956-Zellkultur führte im Vergleich zum Abbau in *N. benthamiana* zu einem anderen Ergebnis. Die Detektion des Antikörpers im Proteom der Zellkultur-Überstände ist in Abb. 48 dargestellt. Beim Vergleich der Spotmuster konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem Spotmuster des Antikörper aus dem Überstand an Tag 2 und dem aus Tag 12 der Fermentation festgestellt werden. Neben dem Spotmuster änderten sich auch die Signalintensitäten von H₂, H₂L₁ und H₂L₂ nicht. Lediglich die Signale von L₂ und Signale unterhalb von H₂ nahmen von Tag 2 bis Tag 12 geringfügig an Intensität zu. Da außerdem jedoch keine Veränderungen zu beobachtet waren, konnte die geringe Intensitätssteigerung auch auf geringfügig unterschiedlich aufgetragene Mengen in der SDS-PAGE zurückzuführen sein. Ein deutlicher Abbau des MA1956 konnte demnach in den Überständen der Zellkultur nicht, wie in den Blättern von *N. benthamiana*, beobachtet werden.

MA1956 im Proteom des Zellkultur-Überstandes

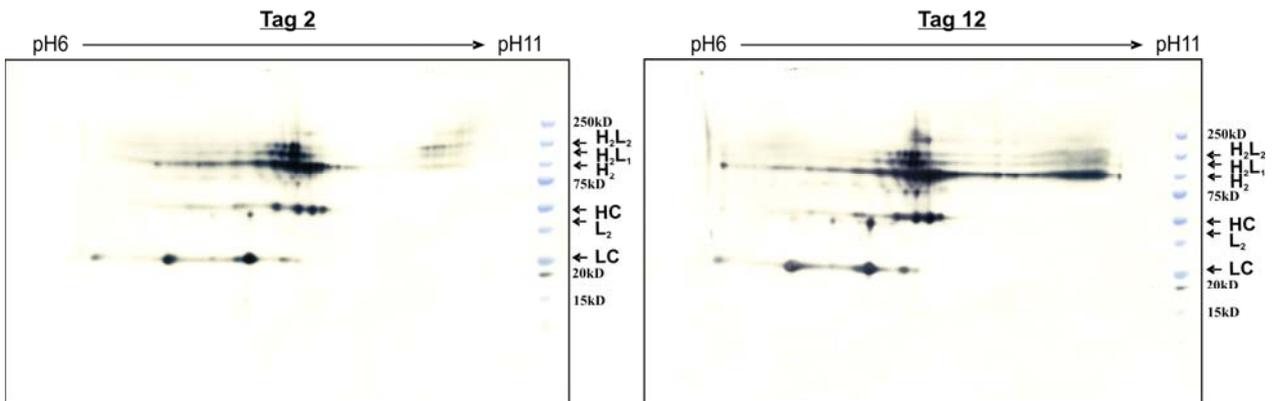


Abb. 48: Anfärbung des monoklonalen Antikörpers MA1956 innerhalb des Proteoms des Zellkultur-Überstandes an Tag 2 und 12 der Fermentation. Jeweils 50 µg Gesamtproteinlysat von Tag 2 und 12 wurden in der ersten Dimension von pH 6-11 nach dem isoelektrischen Punkt und in der zweiten Dimension nach dem Molekulargewicht unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach dem Western-Blot auf eine PVDF-Membran wurden der Antikörper und Antikörper-Fragmente mit einem polyklonalen anti-human IgG angefärbt. **LC:** Leichte Kette; **HC:** Schwere Kette; **L₂:** Dimer der leichten Kette, **H₂:** Dimer der schweren Kette; **H₂L₁:** Zwei schwere, eine leichte Kette; **H₂L₂:** Komplettes Antikörper-Molekül

3.2.5 Zeitabhängige Veränderung des Glykosylierungsmusters von Antikörpern aus *N. benthamiana* und CHO-Zellen

Um eine mögliche Veränderung des Glykosylierungsmusters von Antikörpern während der Kultivierung von *Nicotiana benthamiana* und der Fermentation von CHO-Zellen zu untersuchen, wurden die Antikörper aus den Proteomen verschiedener Tage über eine Protein A-Säule aufgereinigt, reduziert und die Molekulargewichte der glykosylierten schweren Ketten massenspektrometrisch bestimmt.

In Abb. 49 sind die Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmung der schweren Ketten von ID2 aus *Nicotiana benthamiana* an verschiedenen Tagen nach Infiltration dargestellt. An den ersten beiden Tagen (dpi 1 und 2) nach Infiltration konnten neben den Signalen der leichten Kette keine Massen gefunden werden, die der schweren Kette von ID2 mit oder ohne Glykosylierung entsprach. Der nächste für die Analysen zur Verfügung stehende Tag, war der 5. Tag nach Infiltration (dpi 5), an dem die nicht glykosylierte N-terminal zyklisierte schwere Kette mit und ohne C-terminalem Lysin detektiert werden konnte. Weitere Massenpeaks entsprachen der schweren Kette mit verschiedenen N-gebundenen Oligosacchariden. Für einige dieser Massenpeaks ergaben sich rechnerisch zwei Varianten glykosylierter schwerer Kette, je nachdem, ob von der N-terminal zyklisierten Lys- (in grün dargestellt) oder DesLys-Form (in blau dargestellt) der schweren Kette ausgegangen wurde.

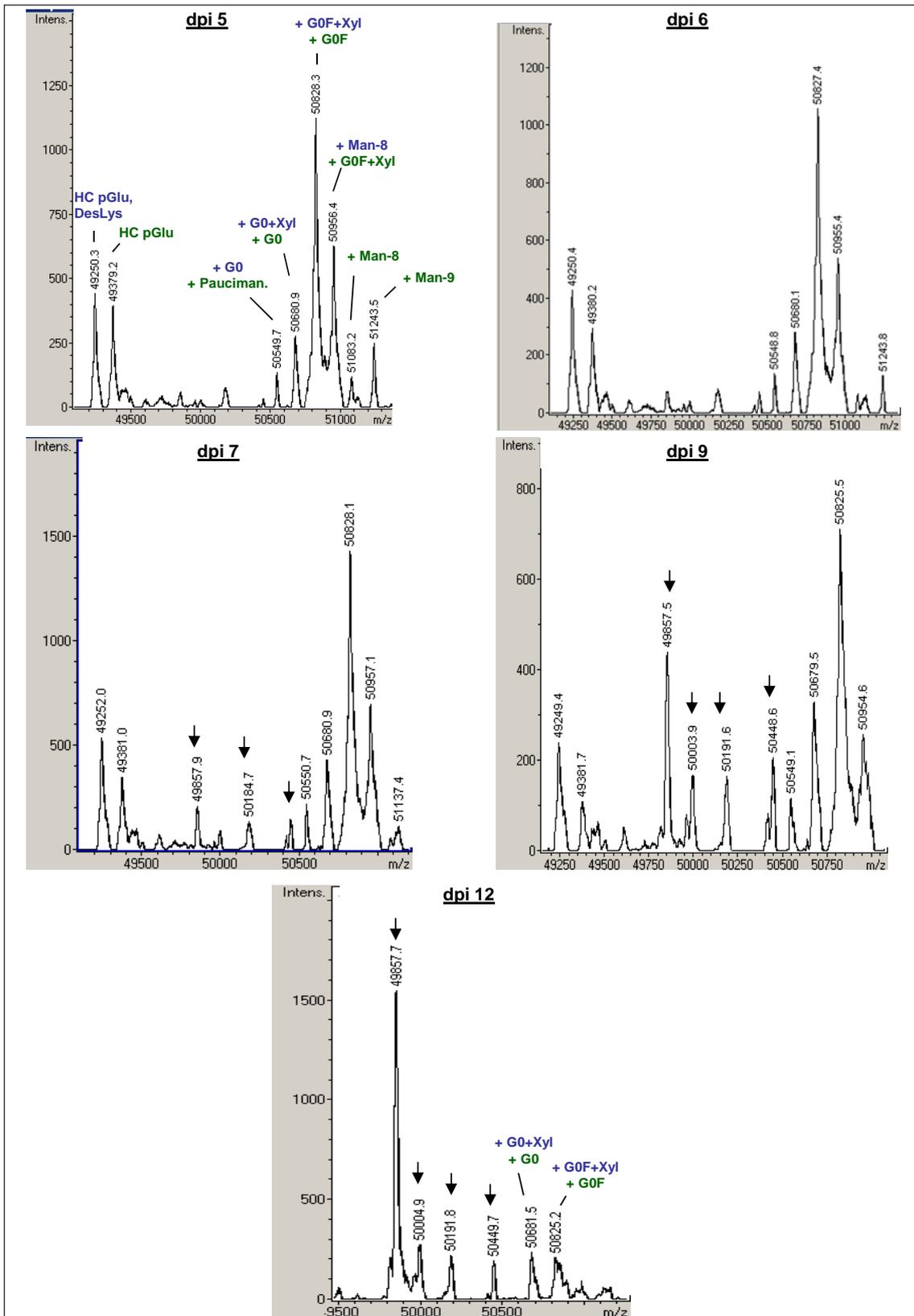
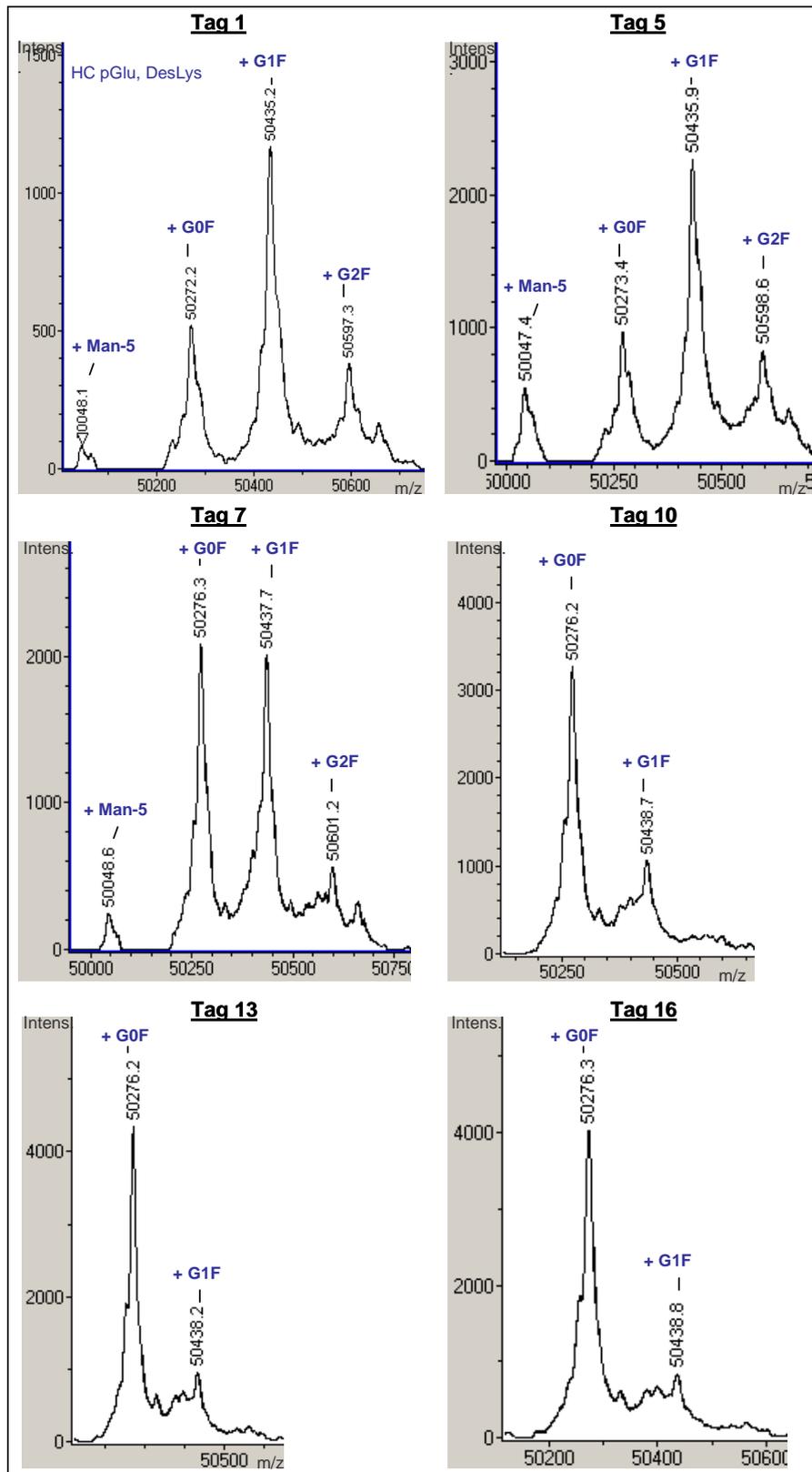


Abb. 49: Dekonvolvierte Massenspektren der glykosylierten schweren Kette aus *N. benthamiana* ID2 an verschiedenen Tage nach Infiltration. Die Antikörper wurden aus dem Pflanzenmaterial der Tage 5,6,7,9 und 12 nach Infiltration über eine Protein A-Säule aufgereinigt und nach Reduktion mit ESI-Q-TOF gemessen. **Blau:** Berechnung mit der pGlu-Form ohne Lysin (HC pGlu, DesLys), **grün:** Berechnung mit der pGlu-Form (HC pGlu), **schwarze Pfeile:** Dimer-Rechnung der Fragmente der schweren Kette (siehe Abb. 47)

Das Grundmuster der Glykosylierung, bei dem die G0F-Struktur mit oder ohne Xylose die Hauptform und weitere G0-Varianten Nebenformen zu sein schienen, blieb bis einschließlich dpi 9 bestehen. Lediglich die Massen der zyklisierten schweren Kette (HC pGlu) mit den High-Mannosen Man-8 und Man-9 konnten ab dpi 6 nicht mehr nachgewiesen werden. Die zusätzlichen Signale ab dpi 7 entsprachen den Fragmenten der schweren Kette, die bereits in Abschnitt 3.2.4 beschrieben wurden, nach Dimer-Rechnung. Am 12. Tag nach Infiltration waren keine Massen mehr nachzuweisen, die der nicht glykosylierten schweren Kette entsprachen. Dies sprach einerseits für eine vollständige Glykosylierung im Verlauf des Pflanzenwachstums, andererseits waren aber auch die Massen des Glykosylierungsmusters nur noch als schwache Signale detektierbar. Stattdessen waren die Massen der bereits in Abschnitt 3.2.4 beschriebenen Fragmente der schweren Kette von Position 1-235 bzw. 1-239 nach Dimer-Rechnung das Hauptsignal. Da die Glykosylierung der schweren Kette mit den verschiedenen Varianten von G0 bis dpi 9 stabil war, schien kein Abbau dieser stattzufinden. Stattdessen deutete die Zunahme des Signals der Fragmente ab dpi 7 auf einen fortschreitenden Abbau der schweren Kette durch Spaltung in der Hinge-Region.

Das Glykosylierungsmuster des monoklonalen Antikörpers MA1956 aus CHO-Zellen zeigte im Gegensatz zu ID2 aus *N. benthamiana* neben der G0F-Form bereits zu Beginn der Fermentation auch komplexere Oligosaccharidstrukturen (Abb. 50). Bereits an Tag 1 der Fermentation konnte die schwere Kette mit G0F, G1F und G2F nachgewiesen werden, wobei die schwere Kette mit G1F das Hauptsignal war. Nicht fucosylierte Formen waren nicht vorhanden und die einzige nachweisbare High-Mannose-Form war Man-5. Schwere Ketten ohne Glykosylierung konnten ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Die Glykosylierung der schweren Kette schien bereits zu Beginn der Fermentation vollständig ausgebildet zu sein. Ab Tag 7 der Fermentation traten Veränderungen in den Signalintensitäten auf. Diese verlagerten sich vom Hauptsignal der schweren Kette mit G1F zum Signal der schweren Kette mit G0F. Die Verlagerung schritt bis Tag 16 der Fermentation fort, sodass das Signal der schweren Kette mit G1F nur noch mit schwacher Intensität vorhanden war und die Masse der schweren Kette mit G0F als Hauptpeak erschien. Massen, die der schweren Kette mit Man-5 und G2F entsprachen, konnten ab dem 10. Tag der Fermentation nicht mehr nachgewiesen werden.

Da nur die Signale der schweren Kette mit G1F und G2F abnahmen, das Signal der schweren Kette mit G0F dagegen aber zunahm, schien es sich hierbei nicht um einen Abbau der Glykosylierung, sondern lediglich um ein Trimmen komplexer Formen zur Hauptstruktur G0F zu handeln.



Ab. 50: Dekonvolvierte Massenspektren der glykosylierten schweren Kette aus der CHO_MA1956-Zellkultur von verschiedenen Tagen der Fermentation. Die Antikörper wurden aus den Überständen der Fermentationstage 1,5,7,10,13 und 16 über eine Protein A-Säule aufgereinigt und nach Reduktion mit ESI-Q-TOF gemessen. Die N-gebundenen Oligosaccharide wurden von der N-terminal zyklisierten schweren Kette ohne Lysin (HC pGlu, DesLys) berechnet.

4 Diskussion

4.1 Strukturelle Analyse von idiotypischen Antikörpern

Im ersten Teil dieser Arbeit sollten sieben in *Nicotiana benthamiana* exprimierte Antikörper verschiedenen Idiotyps strukturell untersucht werden. Das Interesse war in der Tatsache begründet, dass die transiente Expression in Pflanzen eine neue Methode zur Herstellung patientenspezifischer Antikörper darstellt. Die Fähigkeit von Pflanzen humane Antikörper zu bilden wurde zwar bereits in der Literatur beschrieben (Hiatt *et al.*, 1989), unklar ist bislang jedoch, ob diese Fähigkeit der Pflanze für jeden beliebigen idiotypischen Antikörper gilt oder sequentielle Unterschiede des Idiotyps die Faltung, Assemblierung und Glykosylierung in der Pflanze beeinflussen. Desweiteren sind Informationen über strukturelle Unterschiede für künftige Vorhersagen über die Struktur eines Antikörpers anhand dessen theoretischer Eigenschaften von Bedeutung.

4.1.1 Charakterisierung der idiotypischen Antikörpern nach eindimensionaler Elektrophorese

In der eindimensionalen Strukturanalyse (Abschnitt 3.1) ist die Diversität der idiotypischen Antikörper ID1-ID7, die lediglich durch die variablen Regionen hervorgerufen wurde, bereits in der SDS-PAGE durch unterschiedliche Laufverhalten und Darstellung in einer unterschiedlichen Anzahl der Banden sichtbar geworden. Unter reduzierenden Bedingungen wurden die leichten und schweren Ketten entsprechend ihrer Molekulargewichte in der SDS-PAGE bei ~25 kD und ~ 50 kD dargestellt. Unterschiedlich lange Laufstrecken der Banden deuteten auf die unterschiedlichen Molekulargewichte der Ketten eines jeden idiotypischen Antikörpers hin. Mehrfachbanden gaben besonders im Fall der leichten Ketten Hinweise auf die Anzahl von tatsächlich besetzten theoretischen Glykosylierungssignalen. Der Lektinblot zeigte, dass Ketten von Antikörpern aus *N. benthamiana*, die das Signal Asn-X-Ser/Thr für die N-Glykosylierung besitzen, in der Regel glykosyliert sind. O-Glykosylierungen konnten nicht gefunden werden, sodass sich alle weiteren Erläuterungen nur auf die N-Glykosylierung beziehen.

Durch direkten Vergleich des Lektinblots mit der Coomassiefärbung (Abb. 14) konnte am Beispiel von ID1 und ID6 gezeigt werden, dass neben den glykosylierten Ketten auch unglykosylierte vorliegen können. Das Verhältnis von glykosylierter zu nicht glykosylierter leichter Kette schien dabei von Idiotyp zu Idiotyp unterschiedlich zu sein, denn die Intensitäten der Banden von glykosylierten und nicht glykosylierten Ketten von ID1 und ID6 zeigten ein voneinander abweichendes Verhältnis. Bei ID1 war das Verhältnis von glykosylierter zu nicht glykosylierter leichter Kette in etwa gleich. Im Fall von ID6 schien die nicht glykosylierte leichte Kette dagegen in deutlich geringerem Maße vorzuliegen, als die

glykosylierte leichte Kette. Diese Vermutung wurde durch die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse beider leichten Ketten (Abschnitt 3.1.4) gestützt, in der die Verhältnisse der Signalintensitäten von nicht glykosylierten zu glykosylierten leichten Ketten sowohl bei ID1 als auch bei ID6 mit der Anfärbung der Banden in der SDS-PAGE korrelierten.

Die N-Glykosylierung und Faltung von Proteinen ist ein cotransationaler Prozess, der während der Translokation des naszierenden Proteins in das ER stattfindet (Glabe *et al.*, 1980; Kelleher *et al.*, 1992). Zunächst wird ein Vorläufer-Glykan aus einem Man-9 Oligosaccharid mit 3 Glukoseresten durch die membranständige Oligosaccharyltransferase (OST) auf einen Asparaginrest innerhalb der Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr übertragen (Stanley *et al.*, 2009). Dabei ist die Effizienz der N-Glykosylierung abhängig von den Positionen +1 und +2 von Asn. Für die Position +2 von Asn ist eine eindeutige Präferenz zugunsten von Thr bekannt, denn Ser-haltige Konsensussequenzen werden deutlich weniger häufig besetzt (Shelikoff *et al.*, 1996; Petrescu *et al.*, 2003). Dies konnte hier allerdings nicht der Grund für die unterschiedliche Besetzung der Glykosylierungssignale beider leichten Ketten sein, denn die Konsensussequenz der leichten Kette von ID1 war Asn-Val-Thr und enthielt somit das bevorzugte Thr in der Position +2 von Asn. Die Konsensussequenz der leichten Kette von ID6 enthielt dagegen das weniger bevorzugte Ser, denn das Signal war Asn-Ile-Ser. Demnach wäre eine häufigere Besetzung der leichten Kette von ID1 zu erwarten gewesen.

Nilsson und Heijne (2000) beschrieben eine zunehmend schlechtere Glykosylierungseffizienz, je näher das Asn-X-Ser/Thr Signal am C-Terminus liegt. Dies konnte aber nur für einige Proteine, deren Glykosylierungssignale innerhalb von 60 Aminosäuren des C-Terminus lagen, bestätigt werden (Walmsley *et al.*, 2003). Die Glykosylierungssignale der untersuchten leichten Ketten lagen ausschließlich in den variablen Regionen und somit deutlich weiter entfernt als 60 Aminosäuren vom C-Terminus.

Unabhängig von den Aminosäuren innerhalb des Signals kann eine Übertragung des Vorläufer-Glykans nur erfolgen, wenn die Konformation des Proteins den Kontakt mit der OST erlaubt (Kowarik *et al.*, 2006). Zum einen bildet sich aufgrund von hydrophoben Gruppen direkt nach Verlassen des Ribosoms eine spontane Konformation, zum anderen beginnt die Faltung durch Chaperone und Proteindisulfidisomerasen bereits am naszierenden Protein. Das Glykosylierungssignal der leichten Kette von ID1 lag in unmittelbarer Nähe des Cysteins, das an der Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke zu einem weiteren Cystein in der variablen Region beteiligt war (YCSSNVTG) und wurde weniger effizient besetzt. Das Glykosylierungssignal der leichten Kette von ID6 war dagegen mittig in der variablen Region, weit entfernt von Disulfidbrücken bildenden Cysteinen, positioniert und wurde zum größten Teil besetzt. Schlussfolgernd muss die

Position der Konsensussequenz für die Effizienz der Glykosylierung von Bedeutung sein. Die mit der Ausbildung von Disulfidbrücken einhergehende Konformationsänderung resultiert in einer schlechten Zugänglichkeit von benachbarten Glykosylierungssignalen durch die OST. Dies führt zu größeren Mengen nicht glykosylierter Ketten im Vergleich zu Ketten, deren Glykosylierungssignale weiter von Cysteinen entfernt positioniert sind.

Der Einfluss der Glykosylierung in den variablen Domänen von Antikörpern ist bislang kaum untersucht. Für die Glykosylierung in der variablen Region der schweren Kette eines murinen Antikörpers gegen α -(1-6)Dextran wurde ein positiver Effekt festgestellt, denn diese steigerte die Affinität für Dextran (Wallick *et al.*, 1988; Wright *et al.*, 1991). Es ist demnach durchaus vorstellbar, dass die Glykosylierung in der variablen Region für die Bindung eines Anti-idiotypischen Antikörpers von Bedeutung ist. Fest steht jedoch, dass das Vorkommen von glykosylierten und nicht glykosylierten Ketten zu einer größeren Heterogenität führt. Diese ist allerdings nicht nur für den biotechnologisch hergestellten idiotypischen Antikörper, sondern möglicherweise auch für das Oberflächen-Immunoglobulin auf den entarteten B-Zellen zu erwarten, denn deren Idiotypen sind identisch.

Unter nicht reduzierenden Bedingungen konnten neben dem intakten Antikörper viele Banden mit geringerem Molekulargewicht beobachtet werden. Dieses Migrationsverhalten in der nicht reduzierenden SDS-PAGE ist ein allgemeines Charakteristika aller IgG-Moleküle. Das Disulfide Scrambling, bei dem sich die Disulfidbrücken öffnen und die Cysteine mit anderen Cysteinen neue Disulfidbrücken bilden und die β -Elimination, bei der die Disulfidbrücken gespalten werden, wurden von Liu *et al.* (2007) als Ursachen für die Bildung von Antikörper-Fragmenten beschrieben. Innerhalb dieser Arbeit wurden jedoch durch die zweidimensionale Elektrophorese und die Massenspektrometrie Hinweise auf eine Blockierung des C-terminalen Cysteins der leichten Kette durch Glutathion oder eines freien Cysteinrestes gefunden. Dadurch kann die Disulfidbrücke zwischen leichter und schwerer Kette nicht gebildet werden. Die Entstehung dieser Modifikationen der leichten Ketten wird zu einem späteren Zeitpunkt diskutiert (Abschnitt 4.1.2). Wie auch immer, das Migrationsverhalten der Antikörper unter nicht reduzierenden Bedingungen deutete auf gespaltene oder nicht ausgebildete Disulfidbrücken hin. Denn fehlende Disulfidbrücken führen unter SDS-bedingten denaturierenden Bedingungen zum Zerfall der lediglich durch kovalente Wechselwirkungen aneinander gelagerten Ketten. Es entstehen Antikörper-Fragmente mit einer fehlenden leichten Kette (H_2L_1), 2 fehlenden leichten Ketten (H_2), fehlender leichter und schwerer Kette (HL), sowie freie leichte (LC) und schwere Ketten (HC). Die Tatsache, dass die idiotypischen Antikörper durch eine Protein A-basierte Chromatographie aus dem Pflanzenmaterial aufgereinigt wurden, bei der das Protein A spezifisch an eine Stelle in der Fc-Region der schweren Kette bindet, verdeutlicht, dass sich keine freien leichten Ketten und deren Dimere in den aufgereinigten Proben befinden

konnten. Die Sekretion von unassemblierten leichten Ketten als Monomer oder Dimer in Säugerzellen (Leitzgen *et al.*, 1997) und Pflanzenzellen (Hadlington *et al.*, 2003) ist zwar bekannt, diese werden jedoch nicht bei der Aufreinigung durch Protein A spezifisch gebunden. Die Entstehung freier leichter Ketten und deren Dimere sind demnach definitiv auf einen Zerfall des IgG-Moleküls durch die denaturierenden Bedingungen zurückzuführen. Während die leichten Ketten auch unassembliert aus der Zelle sezerniert werden und somit als freie leichte Ketten im Apoplasten vorliegen können, ist die Sekretion der schweren Ketten nur in Verbindung mit einer leichten Kette möglich. Ohne die Bindung einer leichten Kette verbleiben sie gebunden an das BiP im ER (Nuttall *et al.*, 2002). Demnach konnten auch die freien schweren Ketten, deren Dimere und das H₂L₁-Fragment erst durch den Einsatz der denaturierenden Agenzien entstanden sein. Einzig das HL-Molekül könnte bereits in der Pflanze in dieser Form vorgelegen haben, obwohl innerhalb der Arbeit anhand der schwachen Signale von einzelnen schweren Ketten auch festgestellt werden konnte, dass die Disulfidbrücken zwischen zwei schweren Ketten in der Regel immer ausgebildet werden.

Neben den Banden der beschriebenen Fragmente wurde im Fall von ID2 eine weitere bis dahin nicht identifizierte Bande unterhalb des Signals von H₂ bei etwa ~100 kD festgestellt (Abschnitt 3.1.3, Abb. 12). Ein entsprechendes Massensignal von 96532,4 Da konnte auch durch die massenspektrometrische Analyse des nativen ID2 festgestellt werden (Abschnitt 3.1.7.1, Abb. 18). Zu diesem Zeitpunkt der Analysen war unklar, welchem Fragment diese Bande entsprechen könnte, denn weitere Fragmente aus leichten und schweren Ketten, die allein durch den SDS-bedingten Zerfall des IgG-Moleküls entstehen konnten sind nicht bekannt. Zusätzlich können Fragmente aber auch durch proteolytische Spaltung entstehen. Dazu zählen neben Teilen einzelner Ketten auch die durch Spaltung mit Papain entstehenden Fab- und Fc-Fragmente. Papain ist eine Cystein Protease, die in hoher Konzentration in der Papaya vorkommt. Gilroy *et al.* (2007) beschrieben das Cathepsin B aus *N. benthamiana* als eine Papain-ähnliche Cystein Protease, die im Apoplasten lokalisiert und am „disease resistance hypersensitive response“ der Pflanze beteiligt ist (Gilroy *et al.* 2007). Das Vorliegen von Fab- Fragmenten in den aufgereinigten Proben wurde zu diesem Zeitpunkt noch ausgeschlossen, da diesen der Fc-Teil für die Bindung des Proteins A fehlt. Fc-Fragmente passten aufgrund des geringen Molekulargewichtes von ~50 kD nicht zu der zu identifizierenden Bande.

Erst durch die massenspektrometrische Analyse von ID2 aus dem Proteom der Pflanze an verschiedenen Tagen nach der Infiltration, die im zweiten Teil dieser Arbeit durchgeführt worden ist, konnten nach Reduktion einige Fragmente der schweren Kette identifiziert werden (Abschnitt 3.2.4), die zusammen mit einer leichten Kette Fab-ähnliche Fragmente ergeben würden. Ein Molekül aus zwei solcher Fab-Fragmente ((Fab)₂-Fragment), die in der

Hinge-Region über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, würde eine Masse von 96531 Da besitzen und somit bis auf wenige Dalton der gefundenen Masse entsprechen. Der Abbau von ID2 wird in Abschnitt 4.2.1 diskutiert.

4.1.2 Charakterisierung nach zweidimensionaler Elektrophorese und der Einfluss von posttranslationalen Modifikationen

Die 2D-Gelelektrophorese, bei der die Proteine erst nach ihrem isoelektrischen Punkt und anschließend nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden, ist die Methode mit dem höchsten Auflösungsvermögen und wird in der Regel für die Trennung komplexer Proteingemische verwendet. Aufgrund der Heterogenität von Antikörpermolekülen, hervorgerufen durch posttranslationale Modifikationen, wurde diese Technik in dieser Arbeit neben den Proteomanalysen auch für die Analyse der aufgereinigten idiotypischen Antikörper aus *N. benthamiana* und des MA1956 aus CHO-Zellen verwendet. Dadurch wurde die bereits in der eindimensionalen Analyse dargestellte Diversität der Idiotypen noch stärker verdeutlicht. ID2 aus *N. benthamiana* und MA1956 aus CHO-Zellen zeigten dagegen ein vergleichbares Migrationsverhalten, denn deren theoretische Eigenschaften waren mit nur einer Glykosylierungsstelle und dem N-terminalen Glutamin in der schweren Kette im Vergleich zu allen anderen Idiotypen am ähnlichsten.

Unter reduzierenden Bedingungen stellten sich die leichten und schweren Ketten der Idiotypen und des MA1956 entsprechend ihrer Molekulargewichte als Spotreihen mit verschiedenen isoelektrischen Punkten dar. Dabei war die ladungsbedingte Migration aller leichten Ketten, die in 2-3 Spots mit weit auseinander liegenden isoelektrischen Punkten resultierte, ähnlich. Der basischere Spot aller leichten Ketten war am stärksten angefärbt. Zu den bekannten Modifikationen von Antikörpern, die zu einer ladungsbedingten Heterogenität führen, zählen unter anderem Glykosylierungen, die N-terminale Zyklisierung von Glutamin, die Deamidierung und die C-terminale Prozessierung von Lysin. Leichte Ketten besaßen kein C-terminales Lysin und die Glykosylierung kann lediglich bei der Anwesenheit von Sialinsäuren in der Oligosaccharidstruktur zu einer direkten ladungsbedingten Heterogenität führen, da nur diese unter allen Monosacchariden eine Ladung besitzen. Pflanzen bilden jedoch keine Sialinsäuren. Die Glykosylierung kann aber auch einen indirekten Einfluss auf die Ladung eines Proteins ausüben, indem sie die Oberflächenladung eines Proteins abschirmt. Nur die leichten Ketten von ID1, ID6 und ID7 besaßen Glykosylierungssignale in den variablen Regionen. Diese waren dabei an unterschiedlichen Positionen in den variablen Regionen lokalisiert. Alle drei idiotypischen Antikörper zeigten jedoch das gleiche Migrationsverhalten untereinander und gegenüber den nicht glykosylierten leichten Ketten. Daher konnte die Glykosylierung nicht für die ladungsbedingte Heterogenität, sondern

lediglich für eine größenbedingte Heterogenität der leichten Ketten verantwortlich sein, die sich in Spots mit geringem unterschiedlichem Molekulargewicht, ähnlich den Banden in der eindimensionalen SDS-PAGE, widerspiegelte. Die N-terminale Zyklisierung von Glutamin (Gln) zu Pyroglutaminsäure (pGlu) wurde bei allen leichten Ketten, die N-terminales Glutamin besaßen (ID1, ID4 und ID7), mithilfe der Massenspektrometrie nachgewiesen (Abschnitt 3.1.7.2). Die Zyklisierung des N-terminalen Glutamins verursacht neben einer Massendifferenz von -17 Da den Verlust des positiv geladenen Amins, was zu acideren Formen des Antikörpers führt (Liu *et al.* 2008). Das Vorkommen leichter Ketten mit und ohne pGlu in einer Probe würde demnach zu zwei Spots mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkt führen. Da jedoch keine leichten Ketten ohne zyklisiertes N-terminales Glutamin in der massenspektrometrischen Analyse identifiziert werden konnten, scheint die Zyklisierung in *N. benthamiana* zu 100% stattzufinden, sodass sich diese Modifikation nur in einem Spot widerspiegelt konnte. Außerdem zeigten die leichten Ketten von ID3, ID5 und ID6, die kein N-terminales Glutamin besaßen, eine ähnliche ladungsbedingte Heterogenität, wie die leichten Ketten mit N-terminalem Glutamin.

Deamidierungen von Glutamin- und Asparaginresten sind nach Inkubation unter basischen Bedingungen nicht selten und waren durchaus möglich. Da aber große Sequenzunterschiede und somit auch in der Menge an Glutamin und Asparagin bestanden, konnten mögliche Deamidierungen nicht zu demselben Migrationsverhalten aller leichter Ketten in der zweidimensionalen Elektrophorese führen.

Einen entscheidenden Hinweis auf die Modifikation der leichten Ketten lieferte die zweidimensionale Auftrennung unter nicht reduzierenden Bedingungen. Das Spotmuster der leichten Kette war hierbei zwar ähnlich wie das Spotmuster unter reduzierenden Bedingungen, ein Unterschied bestand allerdings in der Intensität der Anfärbung. Unter reduzierenden Bedingungen war der basischere Spot der leichten Kette am stärksten angefärbt, während unter nicht reduzierenden Bedingungen der acidere Spot oder alle gleich stark gefärbt waren. Dies sprach für eine Modifikation der leichten Kette, die durch Reduktion eine Veränderung erfuhr. Zu den mehrfach in der Literatur beschriebenen Modifikationen monoklonaler Antikörper zählt dazu die Oxidation von Methionin (Roberts *et al.*, 1995; Matamoros Fernandez *et al.*, 2001). Matamoros Fernandez *et al.* (2001) beschrieben zusätzlich die Oxidation von Tryptophanresten. Die Differenz der Massen in der massenspektrometrischen Analyse von +16 bzw. +32 Da unter nativen Bedingungen und das Fehlen dieser Signale nach Reduktion deutete zwar auf Oxidationen hin, doch eine Reduktion führt zu einer zusätzlichen negativen Ladung, wodurch der isoelektrische Punkt acider und nicht, wie in den zweidimensionalen Strukturanalysen beobachtet, basischer wird. Weitere gefundene Massen mit einem Unterschied von ~119 Da und ~305 Da waren Hinweise auf Modifikationen durch Cystein und Glutathion. Freies Cystein oder das Cystein

des Tripeptids Glutathion, bestehend aus den Aminosäuren Glu-Cys-Gly sind dabei über eine Disulfidbrücke mit einem freien Cystein des Proteins verbunden und stellen demnach weitere Modifikationen dar, die durch Reduktion eine Veränderung erfahren.

Glutathion ist ein in eukaryotischen und prokaryotischen Zellen vorkommendes Antioxidans und sorgt für den Schutz der Zellen gegen oxidativen Stress, der durch freie Radikale hervorgerufen wird. Bei oxidativem Stress können Thiolgruppen irreversibel zu Sulfin- oder Cysteinsäuren oxidiert werden, was zum proteolytischen Abbau des Proteins führt. Die Glutathionylierung der freien SH-Gruppe stellt dagegen eine reversible Oxidation von Cysteinresten dar, die eine weitere irreversible Oxidation verhindern kann (Lii *et al.*, 1994; Hamann *et al.*, 2002). Auch die Cysteinylierung von Proteinen wurde in der Literatur als Mechanismus für den Schutz der Thiolgruppen nach oxidativem Stress beschrieben (Hochgräfe *et al.* 2007). Neben der Kontrolle des Redoxstatus und Schutz gegen biotischen und abiotischen Stress ist Glutathion zusammen mit den Proteindisulfidisomerasen im ER aller eukaryotischer Zellen an der Regulation der Disulfidbrückenbildung von sekretorischen Proteinen beteiligt (Chakravarthi *et al.*, 2006; Chakravarthi *et al.*, 2004). Dabei wird die Bildung von Disulfidbrücken durch das oxidierende Milieu des ER gefördert, das durch einen hohen Anteil an oxidiertem Glutathion (GSSG) gegenüber reduziertem Glutathion (GSH) aufrechterhalten wird. Desweiteren diskutierten Chakravarthi *et al.* (2006) die Rolle des Glutathions in der Entfernung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) im ER, die durch die Oxidation des PDI-Helferproteins ERO1 (**E**ndoplasmic **R**eticulum **O**xidoreductase) entstehen. Oxidiertes ERO1 ist für die nachfolgende Oxidation der Proteindisulfidisomerase und somit für die Disulfidbrückenbildung essentiell.

Aufgrund des Vorkommens von Glutathion und freiem Cystein im ER erscheint eine Cysteinylierung oder Glutathionylierung eine durchaus mögliche Modifikation von Antikörperketten zu sein. Bereits frühere Untersuchungen von rekombinanten Antikörpern aus CHO-Zellen mit biotechnologisch hergestellten ungepaarten Cysteinresten an den schweren Ketten zeigten, dass die Ausbildung einer Disulfidbrücke der freien Thiolgruppen zu Cystein, Glutathion oder einer freien leichten Kette möglich ist (Chen *et al.*, 2009). Gadgil *et al.* (2006) beschrieben ebenfalls eine Cysteinylierung von freien Cysteinresten innerhalb der Fab-Region eines rekombinanten monoklonalen IgG1.

Die leichten Ketten eines IgGs besitzen fünf Cysteine, von denen vier intramolekulare Disulfidbrücken und das C-terminale Cystein eine intermolekulare Disulfidbrücke mit einem Cystein der schweren Kette ausbilden. Theoretisch könnte jedes dieser Cysteine glutathionyliert oder cysteinyliert werden. Der Zerfall von leichter und schwerer Kette durch die SDS- oder Harnstoff-bedingten denaturierenden Bedingungen ohne den Einsatz von reduzierenden Agenzien während der Elektrophorese deutet jedoch darauf hin, dass diese

Art der Modifikation vermutlich hauptsächlich das C-terminale Cystein betrifft, welches dadurch keine Disulfidbindung mit dem Cystein der schweren Kette eingehen kann.

Reddy et al. (1996) stellten nach der Identifikation von Cysteinylierungen der leichten Kette durch Massenspektrometrie die Vermutung auf, dass die benachbarten Aminosäuren des C-terminalen Cysteins die Disulfidbrückenbildung zu einem freien Cystein eher fördern, als zum Cystein der schweren Kette. Da oxidiertes Glutathion im ER in höherem Maße vorkommt als reduziertes Glutathion schlossen die Autoren daraus, dass zunächst eine Bindung zu einem freien Cystein stattfindet, das dann extrazellulär gegen Glutathion ausgetauscht werden kann (Reddy et al., 1996).

Die Tatsache, dass Glutathionylierungen durch die massenspektrometrische Analyse bei den leichten Ketten der idiotypischen Antikörper deutlich häufiger identifiziert werden konnten, als Cysteinylierungen, stützt die Vermutung eines späteren Austausches. Dieser muss entsprechend des Sekretionsortes in CHO-Zellen extrazellulär und in *N. benthamiana* im apoplastischen Raum erfolgen. Das Vorkommen von Glutathion im Apoplasten wurde von Vanacker *et al.* (1998) bestätigt, die eine Anhäufung des Tripeptids im Apoplasten nach Beimpfung von Gerste mit Mehltau feststellten.

In Bezug auf die schweren Ketten war deren Migrationsverhalten in der zweidimensionalen Elektrophorese von Idiotyp zu Idiotyp unterschiedlich. Dabei war sowohl die Anzahl der Spots in denen sich die schweren Ketten darstellten als auch deren Abstände über den aufgetrennten pH-Bereich von Antikörper zu Antikörper verschieden. Lediglich die schweren Ketten von ID2 und des MA1956 aus CHO-Zellen zeigten ein ähnliches Laufverhalten, was auf die bereits erwähnten ähnlichen theoretischen Eigenschaften zurückzuführen war. Modifikationen, die zu einer ladungsbedingten Heterogenität führen können, wurden bereits beschrieben. Neben der Abschirmung der Oberflächenladung durch Glykosylierungen, von denen die schweren Ketten je nach Antikörper eine bis vier besitzen konnten und einer Zyklisierung von N-terminalem Glutamin, war die Prozessierung des C-terminalen Lysins eine mögliche Ursache für die Heterogenität. Diese führt neben der Minderung des Molekulargewichtes um 128 Da auch zum Verlust einer positiven Ladung. In der massenspektrometrischen Analyse des Glykosylierungsmusters konnten am Beispiel von ID2 die schweren Ketten mit und ohne C-terminales Lysin nachgewiesen werden. Die partielle Entfernung des Lysins würde in der zweidimensionalen Elektrophorese zu zwei Spots mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten und Molekulargewichten führen. Letzteres war aufgrund der geringen Laufstrecke im Gel nicht ersichtlich und die Anzahl der Spots mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten war bei allen idiotypischen Antikörpern größer als zwei, sodass die C-terminale Prozessierung von Lysin nicht die einzige mögliche Ursache für das Migrationsverhalten der schweren Kette sein konnte. Weitere Hinweise auf Modifikationen der schweren Ketten konnten jedoch aufgrund der Mehrfachglykosylierungen,

die die Zuordnung einzelner Peaks in den Massenspektren erschwerten, nicht gefunden werden.

Unter nicht reduzierenden Bedingungen konnten die einzelnen schweren Ketten nur als schwache Signale im Gel identifiziert werden, wobei die Spots jedoch das gleiche Muster, wie unter reduzierenden Bedingungen aufwiesen. Dagegen konnte ein intensiveres Signal zugunsten der Dimere der schweren Ketten beobachtet werden, die ein geringfügig anderes ladungsbedingtes Migrationsverhalten zeigten, als die einzelnen schweren Ketten. Dies ist auf die höhere Anzahl posttranslationaler Modifikationen zweier schwerer Ketten im Gegensatz zu einer einzelnen schweren Kette und der Bildung von Kombinationen aus unterschiedlich modifizierten schweren Ketten zurückzuführen. Dazu zählen zum Beispiel Kombinationen aus einer schweren Kette mit und einer schweren Kette ohne C-terminales Lysin neben zwei schweren Ketten mit Lysin oder zwei schweren Ketten ohne Lysin.

Die größere Menge an Dimeren der schweren Kette gegenüber allen anderen Fragmenten, sowie die geringe Menge einzelner schwerer Ketten sind Hinweise auf die Stabilität der Disulfidbrücken zwischen zwei schweren Ketten in der Hinge-Region. Wie bereits erwähnt, entstehen die verschiedenen Fragmente des Antikörpers bedingt durch die denaturierenden Bedingungen, unter denen die lediglich durch nichtkovalente Wechselwirkungen aneinandergelagerten Ketten auseinanderfallen. Bei leichter und schwerer Kette ist die fehlende Ausbildung der intermolekularen Disulfidbrücke auf eine mögliche Blockierung des C-terminalen Cystein der leichten Kette durch eine Cysteinylierung zurückzuführen. Dies scheint bei der schweren Kette nicht der Fall zu sein. Auch scheinen die Disulfidbrücken in der Hinge-Region weniger häufig von Disulfide Scrambling oder β -Elimination betroffen zu sein. Dementsprechend können selbst die starken Denaturierungsmittel in der zweidimensionalen Elektrophorese, wie Harnstoff und Thioharnstoff, zu keinem Zerfallen der schweren Ketten führen.

Das identische Migrationsverhalten von Antikörpern mit ähnlichen theoretischen Eigenschaften aus *N. benthamiana* und CHO-Zellen deutet darauf hin, dass im Hinblick auf die Faltung und Assemblierung zum funktionellen Antikörper kein Unterschied besteht. Antikörper aus beiden Expressionssystemen scheinen zum größten Teil durch nichtkovalente Wechselwirkungen miteinander verbunden zu sein. Die fehlende Ausbildung der Disulfidbrücken zwischen leichten und schweren Ketten ist auf eine Blockierung der leichten Kette durch Cystein oder Glutathion zurückzuführen.

An dieser Stelle muss darauf hingewiesen werden, dass nichtkovalente Wechselwirkungen unter neutralen Pufferbedingungen sehr stabil sind, sodass schwere und leichte Ketten trotz der fehlenden kovalenten Bindungen zu einem vollständigen funktionellen Antikörper miteinander verbunden sind. Dies zeigte auch die ESI-MS-Messung des nativen ID2, bei der

das Hauptsignal neben schwachen Signalen der freien leichten Kette und einem Fragment mit einem Molekulargewicht von 96532,7 Da dem vollständigen Antikörpermolekül entsprach (Abb. 18).

4.1.3 Glykan-Mikroheterogenität der leichten Ketten

Nachdem die eindimensionale Elektrophorese durch die Anfärbung von glykosylierten und nicht-glykosylierten leichten Ketten bereits Hinweise auf eine für die Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr positionsabhängige Effizienz der Glykosylierung lieferte (Abschnitt 3.1.4), wurde das Glykosylierungsmuster der leichten Ketten durch die Massenspektrometrie analysiert (Abschnitt 3.1.7.3).

Das heterogene Glykosylierungsmuster der leichten Kette von ID1 bestand aus einer Vielzahl wenig komplexer, scheinbar unreifer N-gebundener Oligosaccharide. Die ungünstige Positionierung des Glykosylierungssignals in direkter Nähe des Disulfidbrücken bildenden Cysteins, die zu einer geringeren Glykosylierungseffizienz führt, wurde bereits in Abschnitt 4.1.1 beschrieben. Das Ergebnis zeigt, dass eine ungünstige Lokalisation des Glykosylierungssignals nahe eines Cysteins nicht nur die Übertragung des Vorläufer-Glykans zum Teil verhindert, sondern scheinbar auch eine Prozessierung durch die Enzyme der Glykosylierungsmaschinerie nur bedingt erfolgen kann. Nach der Übertragung des Vorläufer-Glykans werden die endständigen Glucosereste noch im ER durch Glucosidasen abgespalten. Es wurde auch über eine ER-Mannosidase berichtet, die bereits im ER einen endständigen Mannoserest abspaltet (Liebminger *et al.*, 2009), sodass das Glykoprotein den Sekretionsweg über den Golgi-Apparat entweder mit einem Man-9 oder einem Man-8 Oligosaccharid antritt. Im Golgi-Apparat wird dann über die endgültige Struktur als Komplex-, Hybrid- oder Highmannose-Typ entschieden. Die Prozessierung beginnt mit dem Abspalten von vier Mannoseresten durch die α -Mannosidase, sodass nacheinander Man-8 bis Man-5 Glykane entstehen. Es folgt das Anhängen des ersten GlcNAcs an einen Mannoserest durch die N-Acetylglucosaminyltransferase. Nach dem Abspalten weiterer 3 Mannosereste wird das zweite GlcNac angehängt und es entsteht die G0-Struktur. Komplexere Strukturen entstehen daraufhin durch das Anhängen von Fucose-, Xylose- und Galactose-Resten. Die positionsbedingte schlechte Zugänglichkeit des Vorläufer-Glykans im gefalteten Protein für die an der Prozessierung beteiligten Enzyme würde demnach in einer verlangsamten Reifung der N-gebundenen Oligosaccharide resultieren. Folglich wären die Mengen an unreifen Oligosacchariden gegenüber den komplexen Oligosacchariden, wie bei der leichten Kette von ID1 festgestellt, größer.

Die mittige Position des Glykosylierungssignals in der variablen Region der leichten Kette von ID6 zeigte dagegen ein Glykosylierungsmuster mit komplexen N-gebundenen Oligosacchariden. Einfache High-Mannose Strukturen konnten nur als Man-6, Man-7 und

Man-8 detektiert werden. Eine zentrale Position des Glykosylierungssignals in der variablen Region der leichten Kette führt demnach nicht nur zu einer häufigeren Glykosylierung, sondern auch zu komplexeren Strukturen. Dies lässt sich auf eine bessere Zugänglichkeit für die Enzyme der Glykosylierungsmaschinerie zurückführen, die in diesem Fall nicht durch die Konformation des Proteins behindert wurden.

Eine Aussage über die Quantität von verschiedenen Formen eines Glykoproteins kann in der Massenspektrometrie nur in Relation zu anderen Formen des Proteins und unter Berücksichtigung der Oligosaccharidstruktur gemacht werden, denn die Glykosylierung eines Proteins kann bei der Ionisierung die zu protonierenden basischen Aminosäuren abschirmen. Komplexere Oligosaccharidstrukturen können zu einer größeren Abschirmung der Aminosäuren führen als kleine Oligosaccharide, wodurch das Protein mit der komplexeren Struktur schlechter beschleunigt werden kann und dementsprechend zu einem kleineren Signal führt. Wenn jedoch nicht glykosylierte Proteine, wie im MS-Spektrum der leichten Kette von ID6, ein schwächeres Signal erzeugen, als Proteine mit komplexen Oligosaccharidstrukturen, kann eine ungefähre Aussage über die Mengenverhältnisse getroffen werden. Demnach kann die leichte Kette mit G0F+Xylose, welche im Vergleich das weitaus größte Signal lieferte, als Hauptform identifiziert werden. Strukturen mit einer größeren Komplexität als G0F+Xylose scheinen in *N. benthamiana* nur bedingt gebildet zu werden.

Interessant war, dass die leichte Kette von ID7, die drei theoretische Glykosylierungsstellen besaß, ein ganz ähnliches Glykosylierungsmuster zeigte, wie die leichte Kette von ID6. In der SDS-PAGE stellte diese sich als kaum zu differenzierende Mehrfachbande dar (Abb. 10), was zunächst auf ein sehr heterogenes Glykosylierungsmuster deutete. Die Menge an Glykosylierungsstellen scheint jedoch in keinem Zusammenhang mit einer größeren Heterogenität zu stehen. Viel eher ist die Position der Glykosylierungssignale von größerer Bedeutung, denn diese lagen ausnahmslos mittig in der variablen Region in keiner direkten Nähe zu einem Cystein. Dementsprechend konnte die Prozessierung der Oligosaccharide zur Hauptform G0F-Xylose, ähnlich wie bei ID6, ungehindert stattfinden.

Darüber hinaus scheint eine größere Menge an Glykosylierungsstellen in einer häufigeren Übertragung des Vorläufer-Glykans durch die OST zu resultieren, denn die nicht glykosylierten leichten Ketten von ID7 kamen in nur geringem Maße vor.

Insgesamt zeigte die Analyse der Glykosylierungsmuster der leichten Ketten, dass *N. benthamiana* bei optimaler Zugänglichkeit des Glykosylierungssignals die Glykoform mit G0F+Xylose neben weiteren High-Mannosen und pflanzenspezifischen komplexen Oligosacchariden als Hauptform bildet. Die Identifizierung von paucimannosidischen Formen, Strukturen mit Fucose und/oder Xylose aber ohne endständiges GlcNAc, deutet daneben auch auf eine post-Golgi Prozessierung der Oligosaccharide hin, denn das

Anhängen von Fucose und Xylose im Golgi-Apparat erfordert die Anwesenheit des endständigen GlcNAcs (Rayon *et al.*, 1998). Komplexe Oligosaccharide verlassen den Golgi-Apparat folglich immer mit endständigem GlcNAc. Gomord *et al.* (2010) beschrieben diese spezielle Oligosaccharidstruktur mit Fucose und/oder Xylose ohne die endständigen GlcNAcs bei vakuolären oder Speicher-Glyko-Proteinen. Dies würde einerseits auf einen Sekretionsweg der idiotypischen Antikörper über die Vakuole deuten. Eine entsprechende vakuoläre Acetylhexosaminidase 1 (HEXO1) wurde bei Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation in *N. benthamiana* durch Strasser *et al.* (2007) identifiziert. Andererseits identifizierten die Autoren jedoch auch zwei weitere Acetylhexosaminidasen (HEXO2 und HEXO3), die hauptsächlich in der Plasmamembran lokalisiert und somit mit großer Wahrscheinlichkeit an der Prozessierung von N-Glykanen sekretorischer Proteine beteiligt sind (Strasser *et al.* 2007). Elbers *et al.* (2001) konnten zeigen, dass die Menge der paucimannosidischen Formen von Antikörpern aus Tabak mit der Reifung der Blätter zunimmt. Die verkürzten Formen der N-gebundenen Oligosaccharide sind pflanzenspezifisch und kommen in Säugerzellen nicht vor. Möglicherweise beeinflussen die fehlenden endständigen GlcNAcs die biologische Aktivität oder Stabilität von Antikörpern aus pflanzlichen Expressionssystemen. Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Mengen der paucimannosidischen Formen waren allerdings gering.

4.2 Proteomikstudien

Für die Proteomanalysen einer Antikörper-produzierenden *Nicotiana benthamiana* Pflanze wurde eine Pflanze ausgewählt, die den idiotypischen Antikörper ID2 bildete. ID2 besaß neben der konservierten Glykosylierungsstelle keine weiteren theoretischen Glykosylierungsstellen und erschien somit aufgrund der geringen Mikro-Heterogenität am besten geeignet, den Verlauf der Antikörperbildung innerhalb des pflanzlichen Proteoms zu verfolgen. Zusätzlich zeigte ID2 ein vergleichbares Migrationsverhalten zu einem monoklonalen Antikörper MA1956 aus CHO-Zellen, dessen Bildung im Verlauf der CHO-Zellkultur ebenfalls verfolgt werden sollte.

4.2.1 Akkumulation und Degradation des Antikörpers innerhalb des pflanzlichen Proteoms und Verbreitung der viralen Vektoren

Der zeitliche Verlauf der Bildung von ID2 in *Nicotiana benthamiana* konnte aufgrund des basischen isoelektrischen Punktes von leichter und schwerer Kette nur in einem pH-Bereich von 3-10 beobachtet werden. Dadurch wurden alle anderen Proteine des pflanzlichen Proteoms nur geringfügig aufgetrennt, es kam zu Spotüberlagerungen vieler Proteine und die Veränderungen des Spotmusters innerhalb dieses pH-Bereiches konnten folglich nur oberflächlich betrachtet werden. Eine genauere Analyse der Veränderung des Spotmusters fand daher in einem pH-Bereich von 4-7 statt. Die Akkumulation der leichten und schweren Kette war in den ersten beiden Tagen nach Infiltration im zweidimensional aufgetrennten Proteom von *N. benthamiana* ID2 nicht nachzuweisen. Der nächste zur Verfügung stehende Tag war der fünfte Tag, an dem die Akkumulation beider Ketten bereits deutlich festzustellen war, wobei die der leichten Kette scheinbar höher, als die der schweren Kette, war. Die Bildung eines vollständigen IgG-Antikörpers in *N. benthamiana* beruht auf der synchronen Coinfektion und Coreplikation von zwei viralen Vektoren, auf denen je eine Sequenz einer Antikörperkette kloniert vorliegt. Für eine effiziente Expression müssen die Vektoren unterschiedlicher viraler Herkunft und somit zu einer Coinfektion derselben Zelle in der Lage, also nicht-kompetitiv, sein. Giritch *et al.* (2006) untersuchten verschiedene Kombinationen zweier Vektoren basierend auf dem Tabak-Mosaik-Virus (TMV) und dem Potato Virus (PVX) und erzielten mit der Kombination leichte Kette - PVX und schwere Kette - TMV eine etwa doppelt so hohe Ausbeute, als mit der umgekehrten Kombination. Dementsprechend wurden die leichte Kette vom PVX-Vektor und die schwere Kette vom TMV-Vektor exprimiert. Der Grund für die höheren Ausbeuten in dieser Kombination könnte auf eine bessere Replikation und/oder Verbreitung des TMV-Vektors zurückzuführen sein, da diese als die effizientesten unter den für Pflanzen entwickelten viralen Vektoren gelten (Escobar *et al.*, 2003). Für die

Bildung der größeren schweren Kette im Vergleich zur leichten Kette ist die Effizienz des TMV-Vektors von Vorteil.

Die identifizierten viralen Proteine, deren Signale ebenfalls ab dpi 5 deutlich zu sehen waren, waren lediglich Proteine des PVX. Das CP bildet die Virushülle und ist für den Zell zu Zell Transport des Vektors essentiell. Es macht den größten Teil des Virus aus, sodass ein intensives Signal bei effektiver Ausbreitung des viralen Vektors in der Pflanze zu erwarten war. Auf dem TMV-Vektor war kein für CP kodierender Bereich, da dieser auch ohne CP zum Transport von Zelle zu Zelle in der Lage ist und zudem eine Expression vom TMV-Vektor ohne den kodierenden Bereich für CP zu höheren Expressionsraten führt (Giritch *et al.*, 2006). Zum Triple Gene Block des PVX gehören drei Movement Proteine (TGBp1-TGBp3), die für die lokale und systemische Verbreitung des Vektors verantwortlich sind. Ein entsprechendes Movement Protein (MP) war auch auf dem TMV-Vektor. Das 30 kD MP akkumuliert bei viraler Infektion normalerweise im Plasmodesmata (Escobar *et al.*, 2003), konnte innerhalb des Proteoms von *N. benthamiana* ID2 jedoch nicht identifiziert werden. Der Grund dafür ist unklar, da die Menge der schweren Kette auf eine effiziente Replikation und Verbreitung des Vektors schließen ließ. Einen Hinweis lieferten Chen *et al.* (2000; 2005), die eine Interaktion des MP von TMV mit Calreticulin oder der Pektin Methylsterase in *Nicotiana tabacum* beschrieben. Ein solcher Komplex würde bei dem tryptischen Peptidmapping und ESI-MS-Messungen nicht zu eindeutigen Ergebnissen führen und konnte daher nicht identifiziert werden.

Die Akkumulation des CP und der TGB-Helikase aus Potato Virus nahm stetig zu, was auf eine rasche Verbreitung der Vektoren innerhalb der Pflanze schließen ließ. Gleichzeitig zeigte sich hier ein effizienter Weg für die Produktion von Antikörpern, denn auch die Akkumulation der Antikörperketten nahm parallel deutlich zu. Dies konnte jedoch nur bis dpi 7 beobachtet werden. Ab diesem Zeitpunkt nahm die Menge der leichten und schweren Kette, trotz der Zunahme der viralen Proteine, langsam ab. Da eine weitere Replikation und Verbreitung der Vektoren normalerweise mit einer weiteren Akkumulation der Antikörperketten einhergeht, muss die Abnahme der Antikörperketten folglich auf einen Abbau dieser zurückzuführen sein. Durch die Identifikation von Fragmenten der schweren Kette durch die massenspektrometrische Analyse konnte ein Abbau des Antikörpers bestätigt werden. Die Fragmente stellten N-terminale Peptide der schweren Kette mit einer Größe von ~25 kD dar, wobei jedes Fragment um nur eine Aminosäure am C-terminalen Ende verkürzt war. Die Spaltstellen befanden sich direkt hinter der für die Hinge-Region typischen Sequenz CPPCP, sodass es sich um Fab-ähnliche Fragmente handelte (Abb. 47). Der Abbau von Antikörpern aus Pflanzen über Fab-Fragmente wurde bereits früher nach in vitro Untersuchungen zur Stabilität von Antikörpern aus transgenen Tabak festgestellt, bei

denen der Antikörper im Proteinextrakt der Blätter bei pH 4-7 inkubiert wurde. In der SDS-PAGE zeigte das Signal der schweren Kette eine zunehmende Verlagerung zu einem Signal im Molekulargewichtsbereich der leichten Kette. Die Autoren schlussfolgerten nach diversen Anfärbungen, dass die schwere Kette über stabile Intermediate, wie Fab-ähnliche Fragmente, abgebaut wird (Stevens *et al.*, 2000). Auch van Engelen *et al.* (1994) identifizierten Fab-ähnliche Fragmente aus transgenem Tabak durch Immunoblotting.

In dieser Arbeit konnte der Abbau, sowohl durch elektrophoretische Verfahren, aber auch eindeutig durch die Massenspektrometrie identifiziert werden.

Durch die Identifikation der Fragmente konnte daraufhin auch das Signal in der eindimensionalen und zweidimensionalen SDS-PAGE unterhalb des Dimers der schweren Kette (H_2) als $(Fab)_2$ -Fragment, bestehend aus zwei unvollständigen schweren Ketten und zwei leichten Ketten, identifiziert werden, dessen Molekulargewicht zu der in der massenspektrometrischen Analyse gefundenen Masse von 96532,7 Da passte. Überraschend war, dass sich die Fab-Fragmente auch in den aufgereinigten Proben von ID2 befanden, obwohl die Aufreinigung mit Protein A durchgeführt wurde, das spezifisch im Fc-Teil der schweren Kette bindet. Qi *et al.* untersuchten die Photodegradation eines humanen monoklonalen IgG1 Antikörpers während der Lagerung und beschrieben unter anderem Fragmentierungen in der Hinge-Region (Qi *et al.*, 2009). Die Proben von ID2 waren jedoch keinen starken Lichtverhältnissen ausgesetzt und selbst wenn ein lagerungsbedingter Abbau für den aufgereinigten ID2 in Frage kommen konnte, so war dies jedoch nicht für den ID2 innerhalb des Proteoms von *N. benthamiana* möglich. Denn die Auftrennung dieses wurde im direkten Anschluss an die Aufarbeitung ohne Zwischenlagerung der Probe durchgeführt, ebenso wie die massenspektrometrische Analyse von ID2 aus den Proteomen verschiedener Tage. Schlussfolgernd konnten nur unspezifische Bindungen von Protein A der Grund für die Fab-ähnlichen Fragmente in den Proben sein.

Wenn der lagerungsbedingte Abbau des Antikörpers auszuschließen war, konnten die Fragmente nur im apoplastischen Raum von *N. benthamiana* entstanden sein, in den der Antikörper durch die Sequenz eines ER-gerichteten Signalpeptides sezerniert wird. Außer der aciden Endochitinase und der Glucan Endo-1,3-beta-Glucosidase, die am Abwehrmechanismus der Pflanze beteiligt sind, konnten keine apoplastischen Proteine identifiziert werden. Goulet *et al.* (2010) erstellten eine 2D-Proteomkarte für den Apoplasten der Blätter von *N. benthamiana* und identifizierten neben weiteren am Abwehrmechanismus beteiligten Proteinen auch eine Reihe von Proteasen als Subtilase, Cysteinprotease, Aspartatprotease und Carboxypeptidase. Bei den Subtilasen und Aspartatproteasen handelt es sich um Endopeptidasen, die Peptidbindungen an spezifischen Stellen innerhalb des Proteins spalten. Die Carboxypeptidase zählt zu den Exopeptidasen, die Peptidbindungen vom C-terminalen Ende aus spaltet. Die Papain-ähnliche Cysteinprotease Cathepsin B aus

dem apoplastischen Raum von *N. benthamiana* (Gilroy *et al.* 2007) wurde bereits beschrieben (Abschnitt 4.1.1). Papain spaltet in der Hinge-Region der schweren Kette bevorzugt hinter Arg oder Lys, über die bevorzugte Spaltstelle von Cathepsin B ist noch wenig bekannt. Sie sollte aber der von Papain und Cysteinproteasen sehr ähnlich sein. Generell spalten Cysteinproteasen bevorzugt hinter Asp. Eines der identifizierten Fragmente wies eine Spaltstelle hinter Asp₂₃₆ auf, was demnach auf eine Spaltung durch eine Cysteinprotease hinwies. Weitere Fragmente zeigten allerdings auch Spaltstellen hinter Pro, Glu und Leu, sodass letztendlich nicht zu klären ist, auf welche Art von Protease die Spaltung zurückzuführen ist. Ein Zusammenspiel von Endo- und Exopeptidasen ist jedoch wahrscheinlich.

Weitere Fragmente konnten nicht identifiziert werden, was auch auf die auf Protein A-basierende Aufreinigung zurückzuführen war, bei der das Protein A spezifisch an eine Stelle innerhalb der Fc-Region der schweren Kette bindet. Unspezifische Bindungen, wie am (Fab)₂-Fragment sind zufällig.

Bei der Herstellung des patientenspezifischen Antikörpers werden die Pflanzen zwischen Tag 7 und 8 geerntet und weiterverarbeitet. Die erhobenen Ergebnisse zeigen, dass der Zeitpunkt der Ernte nicht später gewählt werden sollte, da an späteren Tagen nach Infiltration eine vermehrte proteolytische Degradation des Antikörpers stattfindet. Dadurch ist der Antikörper der Aufarbeitung nicht mehr zugänglich und die Ausbeuten werden an späteren Tagen geringer.

4.2.2 Veränderung des Proteoms im Verlauf des Pflanzenwachstums

Bei der Analyse des Proteinmusters nach zweidimensionaler Auftrennung des Proteoms von *N. benthamiana* an dpi 5 und dpi 12 im Bereich von pH 4-7 konnten verschiedene Proteine identifiziert werden, die im Verlauf des Pflanzenwachstums erhöht oder vermindert gebildet wurden. Zu den am stärksten hochregulierten Proteinen gehörten die bereits erwähnten Enzyme acide Endochitinase und die Glucan Endo-1,3-beta-Glucosidase der pflanzlichen Abwehr. Beides sind hydrolytische Enzyme, deren Expression im Zuge der fungalen, bakteriellen und viralen Abwehr induziert wird (Mertraux *et al.*, 1986; Meins *et al.*, 1989). Die Glucan Endo-1,3-beta-Glucosidase wurde bis dpi 9 (nicht gezeigt) in geringen Mengen exprimiert und zeigte erst an dpi 12 eine um das 10fache erhöhte Induktion der Expression. Weitere verstärkt gebildete Proteine waren die Superoxiddismutase und die Monodehydroascorbatreductase, deren Expression im Zuge von oxidativem Stress induziert werden. Die Superoxiddismutase katalysiert die erste Reaktion zur Eliminierung des cytotoxischen Superoxidanions und die Monodehydroascorbatreduktase ist eine Komponente des Glutathion-Ascorbat-Zyklus, dem größten antioxidativen System in Pflanzen. Fodor *et al.* (1997) postulierten, dass die antioxidativen Prozesse einen Beitrag zur

Unterdrückung von nekrotischen Symptomen in den Blättern TMV-infizierter Tabakpflanzen leisten. Die Blätter der mit dem Agrobakterium-Virus Konstrukt infiltrierten *N. benthamiana* ID2 zeigten kaum nekrotische Symptome, was auch die späte Induktion des Abwehrsystems erklärt.

Das einzige verstärkt gebildete Protein, das im Zusammenhang mit der Antikörperbildung steht, war Grp94 (Endoplasmin homolog). Das Chaperon ist neben dem BiP und verschiedenen Proteindisulfidisomerasen an der Faltung von Antikörperketten im ER beteiligt. Die Zunahme der Proteinmenge, die anhand des relativen Volumens des Spots gemessen wurde, war jedoch gering und unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Expression von Grp94 auch im Zuge von Stress induziert wird (Gupta *et al.*, 2011), kann kein Zusammenhang zwischen der leicht vermehrten Expression von Grp94 und der Antikörperfaltung gesehen werden. Eine gesteigerte Akkumulation des BiP, dass die schwere Kette im ER solange bindet, bis eine leichte Kette zur Verfügung steht, konnte nicht beobachtet werden. Ein Grund dafür war möglicherweise eine Spotüberlagerung des BiP und des Heat shock cognate 70 kD protein 1 und 2, da der Spot eine Übereinstimmung mit beiden Proteinen zeigte. Dadurch war die Feststellung einer eventuellen Volumenänderung nicht möglich. Proteindisulfidisomerasen konnten in keinem Fall identifiziert werden. Demnach scheint die Pflanze nicht mit einer gesteigerten Synthese der für die Antikörperfaltung und Assemblierung benötigten Proteine zu reagieren, was sich auch in den Mengen der akkumulierten Antikörperketten widerspiegelte. Diese waren relativ gering und zu keinem Zeitpunkt in höherem Maße vorhanden, als andere Proteine. Zur Zeit liegen die Mengen an vollständig assembliertem Antikörper aus *N. benthamiana*, hergestellt durch die „Magniflection Technology“, bei ~0,5 g/kg. Bei der Herstellung bakterieller Antigene durch die „Magniflection Technology“ konnten bereits Mengen von ~5 g/kg erzielt werden (Gleba *et al.*, 2005). Die Möglichkeiten zur Optimierung auf Prozessebene sind bei Pflanzen im Gegensatz zu Säugetierzellen, bei denen Veränderungen der Kultivierungsbedingungen einen erheblichen Einfluss auf die Ausbeute haben, relativ gering. Bei der Kultivierung von Säugetierzellen spielt besonders die Zusammensetzung der Nährmedien eine erhebliche Rolle. Die Möglichkeiten zur Optimierung der Ausbeute in Pflanzen liegen eher auf molekularer Ebene und könnten zum Beispiel die Steigerung der Expression von Faltungshelfer, die in direktem Zusammenhang mit der Antikörperfaltung stehen, beinhalten (Nuttall *et al.*, 2002).

Zu den Proteinen, die im Verlauf der Wachstumsperiode vermindert gebildet wurden, gehörten Proteine, die im Zusammenhang mit der Dunkelreaktion der Photosynthese stehen. Im Calvin-Zyklus, der auch als reduktiver Pentosephosphatzyklus bezeichnet wird, wird das in der Lichtreaktion gebildete ATP und NADPH genutzt, um aus CO₂ Triosephosphat zu

bilden. Triosephosphat dient einerseits als Ausgangsprodukt für Biosynthesezwecke und wird andererseits genutzt um Ribulosebisphosphat zu regenerieren, sodass der Calvin-Zyklus erneut ablaufen kann. Die Zwischenprodukte des Calvin-Zyklus dienen als Ausgangskomponenten für die Stärke, die im Stroma abgelagert und bei Bedarf in Saccharose umgesetzt werden kann. Die RubisCO, Sedoheptulose-1,7-bisphosphat und Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase gehören zu den Schlüsselenzymen des Calvin-Zyklus und werden unter anderem auch durch das Angebot an Effektormetaboliten ATP und NADPH kontrolliert, die durch die Lichtreaktion der Photosynthese unter Beteiligung der ATP-Synthase, bereitgestellt werden. Die RubisCO Aktivase ist ein weiterer Kontrollfaktor der CO₂-Fixierung. Sie aktiviert in einer ATP-abhängigen Reaktion die RubisCO, die erst dann zur CO₂-Fixierung fähig ist und den ersten Schritt des Calvin-Zyklus einleitet. Reinero und Beachy (1989) beschrieben eine Hemmung der Photosystem II Aktivität als Reaktion der Akkumulation des Coat Proteins nach TMV-Infektion von *N. tabacum*. Zwar war auf dem TMV-Vektor kein kodierender Bereich für das CP, eine Hemmung könnte hier jedoch durch das CP des PVX hervorgerufen worden sein, denn auf dem PVX-Vektor lag der kodierende Bereich für das CP vor.

Desweiteren sahen Bilgin *et al.* (2010) einen direkten Zusammenhang zwischen der Herabregulation von Photosynthesegenen und biotischem Stress. Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass ein verlangsamter Umsatz photosynthetischer Proteine der Pflanze die Ressourcenbereitstellung für die unmittelbare Abwehr erlaubt.

Ein Schlüsselenzym des pflanzlichen Metabolismus, das sowohl an der photosynthetischen CO₂-Assimilation, als auch an der Ressourcenbereitstellung für die Abwehr beteiligt ist, ist die Transketolase. Sie katalysiert Reaktionen im Calvin-Zyklus und im oxidativen Pentosephosphatweg. Eine Herabregulation der Transketolase bedeutet demnach zum einen eine Hemmung des Calvin-Zyklus und somit eine verminderte Bereitstellung von Speicherstoffen, andererseits aber auch eine verminderte Bereitstellung von NADPH, das bei der pflanzlichen Abwehr eine Rolle spielt. In beiden Reaktionswegen entsteht als Nebenprodukt Erythrose-4-Phosphat, das als wichtiger Ausgangsstoff für den Shikimatweg dient. Dessen Produkt Phenylalanin stellt die wichtigste Verbindung zwischen dem primären und sekundären Stoffwechsel in Pflanzen dar. Ausgehend von Phenylalanin werden über den Phenylpropanstoffwechsel verschiedene PR- (pathogen related) Proteine und auch Salicylsäure gebildet (Heldt und Piechulla, 2008). Die Salicylsäure ist eine wichtige Signalsubstanz zur Auslösung von Abwehrreaktion, woraufhin auch die in dpi 12 erhöht vorkommende Superoxiddismutase und Monodehydroascorbat Reduktase exprimiert werden.

In Antisense-Transformanten von Tabak wurde die verminderte Expression der Transketolase als Ursache für eine Hemmung der Photosynthese und einer Verringerung der

Mengen an Aminosäuren, Lignin und Ribulose-1,5-Bisphosphat beschrieben. Im Gegensatz dazu wurde der oxidative Pentosephosphatweg jedoch nicht durch die verminderte Transketolase-Aktivität inhibiert. Die Autoren schlossen aus den Ergebnissen, dass bei Bedarf die im primären Metabolismus gebildeten Vorstufen in den Shikimatweg und den Phenylpropanstoffwechsel einfließen (Henkes et al., 2001).

Eine Hemmung der energieverbrauchenden Bildung des Speicherstoffes Stärke im Calvin-Zyklus stellt demnach eine Reaktion der Pflanze auf den Pathogenbefall, bestehend aus dem *Agrobacterium*-Virus Konstrukt, dar. Die im reduktiven und oxidativen Pentosephosphatweg gebildeten Zwischenprodukte werden stattdessen für die Bildung von Abwehrstoffen verwendet.

Neben den Enzymen der Photosynthese war auch eine Hemmung der 5-Methyltetrahydropteroyltriglutamatehomocystein Methyltransferase festzustellen. Diese ist am Aminosäuremetabolismus beteiligt und katalysiert die Bildung von L-Methionin. Methionin steht im Verdacht eine Rolle in der pflanzlichen Infektion zu spielen, da Mutationen im Methioninmetabolismus von pflanzenpathogenen Pilzen zu einer reduzierten Virulenz dieser (Seong et al., 2005; Balhadere et al., 1999) oder sogar zum Verlust der Pathogenität führten (Pascon et al., 2004).

Der Vergleich mit der WT-Pflanze, dessen Anzucht parallel zur infiltrierten Pflanze erfolgte, zeigte, dass die induzierte Synthese der Glucan Endo-1,3-beta-Glucosidase eindeutig auf die virale und bakterielle Infektion und nicht auf einen Alterungsprozess oder abiotische Stressfaktoren zurückzuführen war, da die WT-Pflanze kaum Glucan Endo-1,3-beta-Glucosidase bildete. Auch die Endochitinase war beim WT in geringeren Mengen vorhanden, als in der infiltrierten Pflanze.

Ein deutlicher Unterschied konnte auch in Bezug auf die RubisCO festgestellt werden. Diese wurde im WT deutlich höher exprimiert als in der Antikörper-produzierenden Pflanze. Dies war ein weiterer Hinweis auf eine Hemmung der CO₂-Fixierung im Zuge der viralen/bakteriellen Infektion. Zwar war ein Großteil der aufgetragenen Proteinmenge des Proteoms der Antikörper-produzierenden Pflanze bereits den Antikörperketten und viralen Proteinen mit etwa 24 % des Gesamtvolumens zuzuordnen, sodass die Menge der anderen Proteine generell weniger war, doch wurden die Volumen der Spots unter Berücksichtigung der insgesamt aufgetragenen Menge berechnet. Außerdem war das Spotvolumen der RubisCO im WT um deutlich mehr als 24 % größer als in der Antikörper-produzierenden Pflanze. Auch andere Enzyme des Calvin-Zyklus schienen höher exprimiert zu werden, obwohl die Unterscheidung der Spots aufgrund von Überlagerungen in einigen Bereichen keine genaue Auswertung zuließ.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die transformierte Pflanze, die den Antikörper ID2 bildete, wie erwartet mit der Synthese von Abwehrproteinen reagierte. Generell schien die Pflanze jedoch nur in geringem Maße durch die bakterielle und virale Infektion sowie durch die Bildung von ID2 belastet zu sein, da ansonsten keine weiteren pathogen- oder stressbezogenen Proteine identifiziert werden konnten. Die Hemmung der Photosynthese scheint in *N. benthamiana* eine erste Reaktion auf die Infektion zu sein und spielt demnach eine wichtige Rolle in der Pflanzenabwehr.

Hierbei ist allerdings zu beachten, dass die Reaktion der Pflanze sehr wahrscheinlich von dem zu produzierenden Antikörper abhängig ist. *N. benthamiana* Pflanzen, die einen anderen idiotypischen Antikörper bildeten, zeigten schon nach 5-7 Tagen starke äußerliche nekrotische Symptome, während wiederum die Bildung anderer idiotypischer Antikörper auch zwei Wochen nach Infiltration zu keinen nekrotischen Symptomen von *N. benthamiana* führte (persönliche Mitteilung Icon Genetics, Halle an der Saale, Deutschland). Hier sind zukünftig weitere Untersuchungen notwendig, um einen möglichen Zusammenhang zwischen sequentiellen Unterschieden der idiotypischen Antikörper und dem Verhalten der *Nicotiana*-Pflanzen zu erhalten.

4.2.3 Proteomanalysen von Fermentationsüberständen der CHO_MA1956-Zellkultur

Die Fähigkeit zur korrekten Faltung, Assemblierung und Bildung komplexer posttranslatiionaler Modifikationen machen Säugerzellen zu den am meisten verwendeten Expressionsplattformen für rekombinante Antikörper. Zu den bevorzugten Expressionssystemen gehören die Ovarenzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen), die zuerst von Puck im Jahre 1958 aus einer Biopsie des Eierstocks eines weiblichen chinesischen Hamsters kultiviert wurden. Aus diesen Zellen wurde die kontinuierliche CHO K1 Zelllinie hergestellt, die aufgrund eines Stoffwechseldefektes Prolin zum Wachstum benötigt.

Die Entwicklung von Zelllinien zur Produktion des gewünschten Produktes ist zeitaufwendig und unterliegt einer Reihe von Optimierungsprozessen. Die Produktivität der Zelle ist dabei sowohl vom Vektorkonstrukt und dessen Expressionskassette, als auch von der Anzahl der Transgen-Integrate und in besonderem Maß von der genomischen Position des Transgens und dessen Umfeld abhängig (Hoch, 2010). Weitere Aspekte für das Erreichen optimaler Expressionsraten sind die komplexen meist kostenintensiven Kultivierungsmedien, die eine feine Abstimmung auf die entsprechende Zelllinie erfordern, sowie die Prozessentwicklung. Für die Herstellung eines einzelnen therapeutischen Antikörpers stellen Säugerzellen nach der zeit- und kostenintensiven Optimierung ein stabiles System dar, dessen Ausbeuten für den industriellen Maßstab hervorragend geeignet sind. Doch sind sie trotz diverser Automatisierungsprozesse für die kostengünstige Herstellung patientenspezifischer

Antikörper ungeeignet. Diese müssen innerhalb kürzester Zeit nach erfolgreicher Chemotherapie für die Behandlung des Patienten zur Verfügung stehen. Während die Umsetzung des Antikörperproduktionsprozesses in Säugerzellen mehrere Monate in Anspruch nimmt, stellen pflanzliche Systeme dagegen ein schnelles und wenig kostenintensives System zur Produktion von unterschiedlichen Proteinen dar. Jedoch ist die Biosynthese von Antikörpern in Pflanzen noch wenig untersucht und die Ausbeuten könnten durch Optimierung auf molekularer Ebene noch verbessert werden.

Die Analyse des Proteoms des Zellkulturüberstandes zu verschiedenen Zeitpunkten der Fermentation sollte einen Einblick in die Unterschiede zwischen den beiden Expressionssystemen geben. Dabei galt das Interesse Proteinen, deren Synthese sich im Zuge der hohen Antikörperexpressionsraten in CHO-Zellen in besonderem Maße veränderte und dabei in direktem Zusammenhang zur Antikörperbildung stand. Da neben dem Antikörper jedoch kaum Proteine in den Überstand sekretiert, die in direktem Zusammenhang mit der Faltung, Assemblierung oder einem möglichen Abbau des Antikörpers stehen, wurde ein Anstieg zellulärer Proteine im Überstand nicht explizit verhindert. Zum einen stieg die Menge zellulärer Proteine im Fermentationsverlauf durch die zunehmende Anzahl apoptotischer Zellen generell an, zum anderen förderte das Einfrieren und Auftauen den Aufschluss der Zellen, die im Zuge der Probenentnahme in die Überstände gelangt waren.

Die Antikörper-Konzentration, die mittels ELISA an jedem Tag der Fermentation von CHO-Zellen bestimmt wurde, stieg im Verlauf der Fermentation bis auf 1 mg/ml an. Während in *N. benthamiana* ab dpi 7 ein Abbau des Antikörpers sowohl in der zweidimensionalen, als auch in der massenspektrometrischen Analyse festgestellt werden konnte, war ein solcher bei dem Antikörper aus CHO-Zellen aufgrund der steigenden IgG-Konzentrationen von vorn herein nicht zu vermuten. Dargestellt durch die eindimensionale Analyse zeigten die Antikörperketten aus CHO-Zellen die größte Zunahme im Vergleich zu allen anderen Proteinen und machten dabei stets die größte Menge innerhalb des Proteoms der Überstände aus. Die Anfärbung der leichten Kette und der glykosylierten schweren Kette zeigte, dass die Menge an komplettem Antikörper mit allen intermolekular ausgebildeten Disulfidbrücken im Verlauf der Fermentation kaum zunahm. Dagegen konnte aber eine Zunahme der einzelnen schweren und leichten Ketten, Dimere dieser Ketten, des Monomers (HL) und des H₂L-Molekül festgestellt werden. Eine gesteigerte Synthese der Ketten geht demnach nicht mit einer gesteigerten Bildung von Disulfidbrücken zwischen leichter und schwerer Kette einher. Dies führt zur Sekretion von unvollständig assembliertem Antikörper, wobei die Ketten durch nichtkovalente Wechselwirkungen, aber nicht durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Diese zusammengelagerten Ig-Moleküle sind unter normalen pH-Bedingungen stabil, fallen aber durch die denaturierenden Bedingungen in der SDS-

PAGE auseinander. Zusätzlich treten vermehrt leichte Ketten als Monomere (LC) oder Dimere (L₂) den Sekretionsweg an. Schwere Ketten werden in der Regel nicht als Monomere, sondern zusammen mit mindestens einer leichten Kette sekretiert. Die Wechselwirkungen zwischen zwei schwere Ketten dürften zu stark sein, als dass diese durch SDS auseinanderfallen. Das Signal der einzelnen schweren Kette musste demnach von dissoziierten HL-Molekülen stammen. Die von Beginn bis Abbruch der Fermentation in etwa gleichbleibende Menge des Antikörpers mit vollständig ausgebildeten Disulfidbrücken spricht dafür, dass das Potential der Disulfidbrücken-Maschinerie, im endoplasmatischen Retikulum mit einer bestimmten Menge an synthetisierten Ketten ausgeschöpft ist. Bis auf einige überschüssige leichte Ketten werden alle weiteren gebildeten Ketten im Wesentlichen nur durch nicht kovalente Wechselwirkungen verbunden. Die Disulfidbrückenverknüpfung ist für die Sekretion als funktioneller Antikörper nicht notwendig.

Die Bildung der Faltungshelfer des ER wurden nach der zweidimensionalen Auftrennung des Proteoms analysiert. Da der Antikörper aufgrund der hohen Expressionsrate der CHO-Zelllinie die größte Menge innerhalb des Proteoms der Fermentationsüberstände ausmachte und deren Spots demnach die der anderen Proteine überdecken würden, wurde der Antikörper vorher über eine Protein A-basierte Affinitätschromatographie entfernt. Dadurch wurden alle Fragmente entfernt, die mindestens eine schwere Kette besaßen, an die das Protein A binden konnte. Nach zweidimensionaler Auftrennung konnte in den Überständen die leichte Kette des monoklonalen Antikörpers identifiziert werden, deren Menge im Verlauf der Fermentation stark anstieg. Die Beobachtung bestätigt die Annahme, dass ein Teil der leichten Kette weder über kovalente, noch über nichtkovalente Wechselwirkungen mit dem Antikörper verbunden war. Die unassemblierte leichte Kette wird entweder als Monomer gepaart mit einem freien Cystein (Reddy *et al.*, 1996) oder als Dimer gepaart mit einer weiteren leichten Kette (Leitzgen *et al.*, 1997) aus der Zelle sekretiert. Die Cysteinylierung und Glutathionylierung der leichten Ketten, die für die nicht ausgebildeten Disulfidbrücken verantwortlich sein könnten, wurde bereits im Rahmen der Strukturanalysen (Abschnitt 4.1.2) diskutiert.

Es ist bekannt, dass schwere Ketten langsamer als leichte Ketten synthetisiert werden. Neben der doppelten Länge der schweren Kette im Vergleich zur leichten Kette könnte ein Grund dafür auch in der Glykosylierung der schweren Ketten liegen (Bergman *et al.*, 1981), die bereits cotranslational am naszierenden Protein beginnt (Glabe *et al.*, 1980; Kelleher *et al.*, 1992). In Berichten über das optimale Verhältnis zwischen beiden Ketten wurde jedoch gezeigt, dass bereits die mRNA der leichten Ketten in höherem Maße vorliegt, als die der schweren Kette (Schlatter *et al.*, 2005). Die Autoren fanden heraus, dass ein Überschuss an freier leichter Kette für eine optimale Faltung und Assemblierung vonnöten ist. Dabei scheint

das optimale Verhältnis zwischen schwerer und leichter Kette zu variieren, je nachdem ob transient oder stabil exprimiert wird (Schlatter *et al.*, 2005). Neben dem optimalen Verhältnis der Ketten zueinander ist die Assemblierung zum vollständigen IgG-Molekül von der Faltungsmaschinerie abhängig. Die Korrelation zwischen der Antikörperproduktion und der Expression von Chaperonen des ER, wie BiP, Endoplasmin und PDI wurden in der Literatur bereits oft beschrieben (Smales *et al.*, 2004). Die Proteomanalysen zeigten, dass die Menge der Faltungshelfer bis zum letzten Tag der Fermentation anstieg. Da jedoch nicht klar war, in wie weit dieser Anstieg auf das vermehrte Vorkommen apoptotischer und geplatzter Zellen zurückzuführen war, wurde das Spotvolumen der zu quantifizierenden Proteine nicht auf die Gesamtproteinmenge, sondern auf das Spotvolumen des Aktins normalisiert. Das Gen des Aktins wird in Zellen relativ konstant exprimiert und zählt somit zu den sogenannten „housekeeping“ Genen. Die Qualität des Aktins als interner Standard für die zweidimensionale Elektrophorese wurde anhand der zunehmenden Menge der leichten Kette, die mit der durch ELISA bestimmten zunehmenden IgG-Konzentration korrelierte, bestätigt.

Im Vergleich zu *N. benthamiana ID2* zeigte das Proteom der Zellkultur-Überstände der MA1956 produzierenden CHO-Zelllinie ein ganz anderes Bild. Während im Proteom von *N. benthamiana ID2* kaum Faltungshelfer identifiziert werden konnten und ansonsten nur geringe Veränderungen in der Akkumulation der Proteine festgestellt werden konnten, dominierten im Proteom der Überstände die Spots der Faltungshelfer ab dem ersten Tag der Fermentation. Aufgrund der Menge der Faltungshelfer, die bis zum Ende der Fermentation signifikant zunahm, war eine Veränderung metabolischer oder stressinduzierter Proteine nicht zu beobachten.

Stellvertretend für die Faltungshelfer des endoplasmatischen Retikulums wurden BiP, Calreticulin, PDI und PDI A6 auf Aktin normalisiert und die Steigung der Synthese im Verlauf der Fermentation bewertet. Die größte Veränderung war mit einer Steigung um die 10fache Menge für das BiP aus der Familie der HSP70 Chaperone festzustellen. Bindestellen für BiP wurden innerhalb der C_H1-Domäne (Hendershot *et al.*, 1987), der C_H3-Domäne und der variablen Region der schweren Kette (Knarr *et al.*, 1995) beschrieben. Zusätzlich soll BiP innerhalb der variablen Region der leichten Kette binden (Davis *et al.*, 1999) und somit an der Assemblierung beider Ketten beteiligt sein. Die Bindung und Freisetzung von BiP ist dabei ATP-abhängig (Hendershot *et al.*, 1996).

Pascoe *et al.* (2007) untersuchten die Proteome zweier CHO-Zelllinien mit unterschiedlichen metabolischen Profilen und stellten eine Volumenzunahme des BiP repräsentierenden Spots im Proteom einer laktatverwertenden Zelllinie im Gegensatz zu einer Zelllinie, die kein Laktat verwertete, fest. Interessant war allerdings, dass dies nicht im Zusammenhang mit einer

gesteigerten Antikörperproduktion stand, da die Autoren eine Abnahme dieser im Laufe der Fermentation beschrieben (Pascoe *et al.*, 2007).

Dies stimmt mit dem Bericht von Borth *et al.* (2005) über den Effekt der erhöhten Expression von PDI und BiP auf die Sekretion des Antikörpers in rekombinanten CHO-Zellen überein, in dem eine Überexpression von BiP zu einer verminderten Sekretionsrate führte. Eine Abnahme der Antikörperkonzentration im Überstand konnte im Verlauf der Fermentation zwar nicht festgestellt werden, jedoch scheint eine erhöhte Expression von BiP nicht zwangsläufig in gesteigerten Produktionsraten zu resultieren, denn die Expression von BiP wird laut Baumeister *et al.* (2005) auch infolge einer Akkumulation von ungefalteten Proteinen im Zuge von ER-Stress induziert. Die Anhäufung von BiP-Protein-Komplexen im ER soll mit dem negativen Effekt von BiP im Zuge der Proteinsekretion korrelieren (Dorner *et al.*, 1992). Dorner und Kaufman (1994) schrieben dem BiP daraufhin eine Art Korrekturfunktion zu, wobei das BiP nicht an der Faltung und Sekretion, sondern an der Bindung und Fixierung von fehlgefalteten Proteinen eine Rolle spielt. Eine Fixierung von un- oder fehlgefalteten schweren Ketten durch BiP im ER, hervorgerufen durch die Stressbedingungen oder eine nicht ausreichende Leistung der Faltungsmaschinerie, könnte die beobachtete zunehmende Sekretion von leichten Ketten als Monomer oder Dimer erklären. Durch die Fixierung würden die schweren Ketten nicht für eine Assemblierung mit den leichten Ketten zu Verfügung stehen, weshalb die leichten Ketten unassembliert sekretiert werden könnten. Gleichzeitig könnte aber auch eine vermehrte Blockierung des C-terminalen Cysteins der leichten Kette durch Glutathion ein Grund für die zunehmende Sekretion von unassemblierten leichten Ketten sein, denn es wird vermutet, dass Glutathion neben der Disulfidbrückenbildung auch eine Rolle im ER-Stress spielt (Chakravarthi *et al.*, 2006). Dementsprechend würde auch die leichte Kette nicht mehr für eine Verknüpfung der Ketten durch Disulfidbrücken zur Verfügung stehen, sondern entweder vermehrt unassembliert aus der Zelle sekretiert oder nur durch nichtkovalente Bindungen an eine schwere Kette gebunden werden.

Für die vollständige Faltung der Ketten könnte Grp94 (Endoplasmin) verantwortlich sein, dem eine Schlüsselrolle in der Faltung von neu synthetisierten Proteinen oder der Stabilisierung und Rückfaltung von Proteinen im Zuge von Stress zugesprochen wird. Untersuchungen zur Interaktion von Chaperonen mit Antikörperketten im ER zeigten eine spätere und wesentlich länger anhaltende Bindung von Grp94 im Vergleich zu BiP (Melnick *et al.*, 1994).

Interessanterweise konnte allerdings keine verstärkte Akkumulation von Grp94 im Proteom der Fermentationsüberstände festgestellt werden. Die Spotvolumen waren vom ersten bis zum letzten Tag im Vergleich zu anderen Faltungshelfern sehr gering. Dies lässt vermuten, dass die geringe Expression von Endoplasmin einen limitierenden Faktor in der Höhe der

Produktionsraten darstellt und eine Steigerung der Expression von Endoplasmin zu höheren Produktionsraten führt. Diese Vermutung wird durch Smales *et al.* (2004) untermauert, die eine Korrelation zwischen der erhöhten Expression von Grp94 und der erhöhten Produktion von einem rekombinanten monoklonalen Antikörper in murinen Myelomzellen (NS0) beschrieben.

Die zweitgrößten Zunahme der Proteinmenge im Verlauf der Fermentation konnte für Calreticulin festgestellt werden. Calreticulin ist ebenfalls im Lumen des ER lokalisiert und bindet spezifisch an glykosylierte Proteine. Es wurde zuletzt als stressinduziertes Protein beschrieben, dass fehlgefaltete schwere Ketten von MHC-Antigenen erkennt und deren thermale Aggregation verhindert (Mancino *et al.*, 2002). Über eine direkte Beteiligung von Calreticulin an der Faltung und Assemblierung von Antikörpern in Säugerzellen ist wenig bekannt und in transgenem Tabak konnte keine Beteiligung von Calreticulin an dieser bestätigt werden (Nuttall *et al.*, 2002). Wenn Calreticulin jedoch im Zuge von Stress exprimiert wird und somit vermehrt an die schweren Ketten bindet um diese vor einer Aggregation zu schützen, könnte eine Herabregulation von Calreticulin folglich zu einer höheren Antikörper-Sekretionsrate führen. Hier sind in der Zukunft weitere Untersuchungen zur Akkumulation von schweren Ketten innerhalb des ER infolge einer stressinduzierten Expression von Calreticulin und BiP erforderlich.

Im Vergleich zu BiP und Calreticulin wurde für zwei untersuchte Proteindisulfidisomerasen (PDI und PDI A6) eine nur halb so große Steigung der Expression im Verlauf der Fermentation festgestellt. Proteindisulfidisomerasen sind für die Bildung von Disulfidbrücken im ER essentiell. In Bezug auf die großen Mengen an Ketten, die nicht durch Disulfidbrücken miteinander verbunden waren, erweckt dies den Verdacht, dass eine höhere Expression der PDI zu einer größeren Menge an Antikörpern führen muss, die durch kovalente Bindungen miteinander verbunden sind. In der Literatur beschriebene Untersuchungen zur Überexpression von PDI führten jedoch zu unterschiedlichen Ergebnissen. Eine 3-4fache Überexpression von PDI in rekombinanten CHO-Zellen, die Interleukin-15 produzierten, beeinflusste die Produktion nicht, während die Überexpression im Fall eines Tumor Necrosis Faktor:Fc Fusionsproteins einen negativen Einfluss zeigte (Davis *et al.*, 2000). In einer Antikörper-produzierenden CHO-Zelllinie stellten Borth *et al.* (2005) dagegen einen positiven Effekt für die Sekretion von Antikörpern fest, denn die Überexpression der PDI führte zu einer erhöhten Sekretionsrate. Interessant war allerdings, dass keine erhöhte Sekretionsrate festgestellt werden konnte, wenn die Überexpression von PDI mit einer gleichzeitigen Überexpression von BiP einherging (Borth *et al.* 2005). Der Einfluss der PDI scheint demnach sowohl abhängig vom Protein und der Zelllinie, als auch von der Expression von anderen Chaperonen zu sein. Desweiteren ist die Disulfidbrückenbildung nicht allein von der PDI, sondern in entscheidendem Maße auch von dessen Helferprotein ERO1

(Endoplasmatische Retikulum Oxidoreduktase) abhängig, das die PDI zusammen mit dem Glutathion-Redox-System in einem oxidierten Stadium hält (Frand und Kaiser, 2000; Polland *et al.*, 1998). Ein positiver Effekt der PDI muss demnach mit hohen Konzentrationen von ERO1 im ER zusammenhängen. Dies konnte bisher jedoch nicht bestätigt werden, da eine stabil induzierte Co-Überexpression von PDI und ERO1L in Antikörper produzierenden CHO-Zellen keinen Effekt zeigte (Mohan *et al.*, 2010). In der vorliegenden Arbeit konnte das Helferprotein ERO1 nicht identifiziert werden, sodass hier keine Aussage darüber getroffen werden kann und in Zukunft weitere Versuche zum Zusammenhang zwischen der Bildung von Disulfidbrücken, PDI und ERO1 notwendig sind. Die Ergebnisse über die fehlenden Verknüpfungen durch Disulfidbrücken und die im Vergleich zu BiP und Calreticulin geringere Steigung der Expression von PDI weisen jedoch darauf hin, dass die PDI wohlmöglich einen limitierenden Faktor für die Assemblierung zum vollständigen Antikörper-Molekül darstellt.

4.2.4 Veränderung des Glykosylierungsmusters von ID2 und MA1956

Der Vergleich der Glykosylierungsmuster von Antikörpern aus *N. benthamiana* und CHO-Zellen zeigte, dass die Reifung der N-gebundenen Oligosaccharide in den Expressionssystemen unterschiedlich abläuft.

Bei ID2 aus *N. benthamiana* konnte das Glykosylierungsmuster aufgrund der nicht detektierbaren Signale an den ersten Tagen nach Infiltration erst ab dpi 5 untersucht werden. Neben den glykosylierten Formen waren auch nicht glykosylierte schwere Ketten vorhanden, die als N-terminal zyklisierte Form entweder mit oder ohne Lysin vorlagen. Da beide Formen auch glykosyliert nebeneinander vorliegen konnten ergaben sich rechnerisch für einige Peaks zwei Möglichkeiten einer Glykoform. Die komplexen Oligosaccharide waren G0-Varianten, wobei die Hauptform die G0F-Form mit oder ohne Xylose war. Ein Signal passte neben der Glykoform mit G0 auch gleichzeitig zu der mit Paucimannose. Die Paucimannosen, die durch Entfernung der endständigen GlcNAcs aus G0-Varianten entstehen, wurden bereits in Abschnitt 4.1.3 diskutiert. Die Prozessierung von G0-Varianten zu Paucimannosen würde im Zuge einer katalytischen Aktivität von Hesosaminidasen im Apoplasten oder auf dem sekretorischen Weg des Proteins mit steigender Akkumulation des Antikörpers entsprechend zunehmen und demnach an späteren Tagen zu gesteigerten Mengen Paucimannosen im Vergleich zu G0-Formen führen. Dies war jedoch nicht der Fall, das Signal blieb bis einschließlich dpi 9 unverändert. Schlussfolgernd repräsentierte das Signal mit höherer Wahrscheinlichkeit die Glykoform mit G0 statt der mit Paucimannose.

Neben den komplexen Oligosacchariden konnten auch High-Mannose-Formen nachgewiesen werden. Die Reifung von N-gebundenen Oligosacchariden geschieht auf dem Sekretionsweg über den Golgi-Apparat. Ausgehend von einem Man-9-Glykan werden durch prozessierende Enzyme kleinere High-Mannosen und schließlich durch Anhängen von

GlcNAcs, Fucosen, Xylosen und endständigen Galactosen komplexe Oligosaccharidstrukturen gebildet. Da an späteren Tagen die Signale der N-terminal zyklisierten Lysin-Form der schweren Kette mit Man-8 und Man-9 nicht mehr detektiert werden konnten, das restliche Glykosylierungsmuster jedoch kaum verändert war, scheint eine stetige Reifung der N-gebundenen Oligosaccharide zu den G0-Varianten stattzufinden. Demnach stellte das Signal, dass sowohl zur Lys-Form der schweren Kette mit Man-8 oder der DesLys-Form der schweren Kette mit G0F+Xylose passte, vermutlich hauptsächlich Letzteres dar.

Die Signale des Dimers der bereits beschriebenen Fab-ähnlichen Fragmente der schweren Kette nahmen im Verlauf des Pflanzenwachstums stetig zu und stellten bei der Analyse des Glykosylierungsmusters an dpi 12 das Hauptsignal dar. Daneben konnten nur noch schwache Signale der glykosylierten Kette detektiert werden. Die Beständigkeit des Glykosylierungsmusters mit den verschiedenen G0-Varianten bis einschließlich dpi 9 deutete jedoch nicht auf einen Abbau der N-gebundenen Oligosaccharide hin. Stattdessen waren die verschwundenen Signale der Glykoformen auf die zunehmende Spaltung der schweren Kette in der Hinge-Region zurückzuführen. Diese führt zu zwei Fragmenten, eines bestehend aus dem Fc-Teil der schweren Kette mit der konservierten Glykosylierungsstelle und eines bestehend aus dem Fab-Teil der schweren Kette. Die vermehrte Spaltung der schweren Ketten resultierte demnach in verkürzten glykosylierten Ketten und dem Verlust der Signale von glykosylierten schweren Ketten vollständiger Länge in der Massenspektrometrie.

Studien belegten bereits früh die Fähigkeit von CHO-Zellen IgG-Antikörper mit N-gebundenen G0F und G1F Glykanen zu bilden, die identisch mit den Hauptformen von polyklonalen humanen IgGs sind (Millward *et al.*, 2008). Unter nicht optimalen Bedingungen können CHO-Zellen jedoch auch eine Reihe von Oligosacchariden bilden, die entweder zu einer verminderten Effizienz des Antikörpers führen oder durch die Anwesenheit von der für humane Glykoproteine untypischen N-Glykolyneuraminsäure für den Patienten immunogen sind. Dies war bei der untersuchten MA1956-produzierenden CHO-Zelllinie nicht der Fall. Das Glykosylierungsmuster bestand ab dem ersten Tag der Fermentation aus den komplexen Oligosacchariden G0F, G1F und G2F und geringen Mengen des High-Mannose Oligosaccharids Man-5. Dies stimmt mit van Berkel *et al.* (2009) überein, die für rekombinante Antikörper aus Säugerzellen die gleichen Hauptformen und einen unter 5 % liegenden Anteil an High-Mannose-Formen beschrieben. Im Laufe der Fermentation fand jedoch eine stetige Verlagerung der Glykoformen G1F und G2F zur Glykoform G0F statt, die am Ende der Fermentation die Hauptform neben Resten der G1F-Struktur darstellte. Die G0F-Form unterscheidet sich von den G1F- und G2F-Formen in dem Fehlen von einem oder zwei endständigen Galactoseresten. Da eine Reifung der komplexen Oligosaccharide stets durch Anhängen von Monosacchariden, aber niemals durch Abspalten dieser erfolgt, muss

die Bildung der G0F-Form zur Hauptform auf die Prozessierung der G1F und G2F-Formen im Überstand durch Entfernung der endständigen Galactose-Reste zurückzuführen sein. Gestützt wird die Vermutung durch Gramer und Goochee (1993), die die Aktivität von Sialidase, β -Galactosidase, β -Hexosaminidase und Fucosidase in CHO-Zelllysaten untersuchten und eine entsprechende Aktivitäten auch im Überstand der CHO-Zellkultur feststellten.

Die Analyse des Glykosylierungsmusters von Antikörper aus beiden Expressionssystemen zeigte, dass die G0-Varianten scheinbar in beiden Expressionssystemen die Hauptform darstellen. Die Beständigkeit dieser in beiden Systemen zeigt auch, dass diese nicht von einem Abbau betroffen sind und somit eine stabile N-gebundene Oligosaccharidstruktur darstellen. Die Glykosylierung nimmt unter anderem auch Einfluss auf die Halbwertszeit eines Antikörpers, denn für glykosylierte Antikörper sind längere Halbwertszeiten beschrieben als für nicht-glykosylierte Antikörper. Die Halbwertszeit kann auch von der Oligosaccharidstruktur abhängig sein. Bereits Newkirk et al. (1995) beschrieben in Bezug auf die Glykosylierung in der Fc-Region eine längere Serum-Halbwertszeit für IgG1-Antikörper mit G0-Oligosacchariden in Mäusen gegenüber Antikörpern mit G1- und G2-Oligosacchariden. Allerdings sind in der Literatur auch gegensätzlich Aussagen zu finden, denn Wright und Morrison (1994) stellten dagegen keinen Unterschied zwischen G0, G1 und G2 Formen, stattdessen aber eine kürzere Halbwertszeit für High-Mannose-Oligosaccharide fest. Untersuchungen zur Pharmakokinetik therapeutischer Antikörper in Mäusen zeigten im Gegensatz zu Newkirk et al. (1995) und Wright et al. (1994) keinen Unterschied zwischen komplexen und High-Mannose Oligosacchariden in der Halbwertszeit (Millward et al., 2008).

Neben der Halbwertszeit hat die Glykosylierung auch einen erheblichen Einfluss auf die Interaktion mit dem Fc-Rezeptor und somit auf die Fc-Rezeptor-vermittelten Effektorfunktionen, wie ADCC und CDC (Dwek 1995; Feffris 2005). Dies spielt bei den untersuchten Antikörpern lediglich für den MA1956 eine Rolle, der gegen einen Subtyp der Carboanhydrase auf der Oberfläche bestimmter Krebszellen gerichtet ist. Nach Bindung des MA1956 an den entsprechenden Rezeptor sollen entsprechende Wirkmechanismen induziert werden. Die therapeutische Wirkung der idiotypischen Antikörper aus *N. benthamiana* liegt dagegen in der Steigerung der Immunabwehr, indem diese das tumorspezifische Oberflächenantigen von malignen B-Zellen imitieren. Durch die Kopplung an ein Verstärkerprotein (KLH) und gleichzeitige Gabe eines Wachstumsfaktors soll das körpereigene Immunsystem den Idiotyp des Antikörpers und somit gleichzeitig den Idiotyp des Oberflächenantigens der malignen B-Zelle als fremd erkennen. Als Immunantwort soll der Patient folglich selbst Antikörper gegen das Oberflächenantigen auf der malignen B-Zelle bilden.

Aus demselben Grund könnten auch die pflanzenspezifischen Oligosaccharide mit der human-untypischen $\alpha(1-3)$ -Fucose und $\beta(1-2)$ -Xylose, deren immunogenes Potential bereits mehrfach beschrieben worden ist, unproblematisch sein. Die Auslösung einer Immunreaktion als Antwort auf den idiotypischen Antikörper ist erwünscht und könnte durch die pflanzenspezifischen Monosaccharide positiv verstärkt werden. Letztendlich müssen die Auswirkungen der pflanzenspezifischen Oligosaccharide jedoch in einer klinischen Studie geklärt werden.

Fest steht aber, dass die Beschränkung auf G0-Varianten in beiden Expressionssystemen die Mikroheterogenität reduziert. Dies ist sowohl für die Wirksamkeit eines Antikörpers, die je nach Isoform variieren kann, als auch für einheitliche Ergebnisse in den klinischen Studien von Vorteil. Zusammen mit der vollständigen Glykosylierung aller schwerer Ketten und der vollständigen Entfernung des C-terminalen Lysins resultiert die Beschränkung auf die G0F-Variante bei Antikörpern aus CHO-Zellen in der kleinstmöglichen Mikroheterogenität. Antikörper aus *N. benthamiana* sind dagegen trotz der Beschränkung auf G0-Varianten heterogener. Der Grund dafür liegt zum einen in der zusätzlichen Xylose, die bei Säugerzellen nicht vorkommt. Dadurch sind generell mehr G0-Varianten möglich. Zum anderen scheint die Pflanze das N-terminale Glutamin zwar ebenso wie die CHO-Zelle vollständig zu zyklisieren, das C-terminale Lysin wird in *N. benthamiana* scheinbar jedoch weniger häufig entfernt. Dies führt zu N-terminal zyklisierten schweren Ketten sowohl mit als auch ohne Lysin. Außerdem werden in *N. benthamiana* die schweren Ketten nur teilweise glykosyliert, was bereits vorher durch Lektinanfärbungen in den eindimensionalen Strukturanalysen bestätigt wurde.

5 Zusammenfassung

Die Non-Hodgkin-Lymphome bilden eine sehr heterogene Gruppe von Tumorerkrankungen, bei denen sich die lymphatischen Zellen unkontrolliert vermehren. Die meisten Unterarten gehen, wie auch die indolent verlaufenden follikulären Lymphome, von den B-Zellen aus. Die Standardtherapie der follikulären Lymphome besteht aus einer Kombination aus Chemo- und Immuntherapie mit dem monoklonalen Antikörper Rituximab und führt nach unterschiedlich langen progressionsfreien Zeiten zu Rückfällen. Mit der Idiotyp-Vakzinierung, bei der die Behandlung mit einem für jeden Patienten individuell hergestellten Antikörper erfolgen soll, sollen Rückfälle nach erfolgreicher Chemotherapie verhindert werden. Die idiotypischen Antikörper werden dafür innerhalb kürzester Zeit nach der Entnahme von entartetem Lymphknotenmaterial des Patienten durch die „Magniflection“ Technologie, die erstmals die virus-basierte transiente Expression von Antikörpern in Pflanzen erlaubt, in *Nicotiana benthamiana* hergestellt. Ob die Fähigkeit der Pflanze humane Antikörper zu bilden für jeden beliebigen idiotypischen Antikörper gilt oder sequentielle Unterschiede des Idiotyps die Faltung, Assemblierung und Glykosylierung in der Pflanze beeinflussen, war bisher nicht bekannt. Eine Strukturanalyse von sieben idiotypischen Antikörpern aus *Nicotiana benthamiana* konnte zeigen, dass diese nach den bekannten strukturellen Aspekten als heterodimeres Molekül in der Pflanze hergestellt werden. Dabei ist das heterodimere Molekül durch nichtkovalente Wechselwirkungen verknüpft, die Disulfidbrücken zwischen leichten und schweren Ketten werden in der Regel nicht vollständig ausgebildet. Die posttranslationalen Modifikationen von Antikörpern aus *Nicotiana benthamiana* sind mit denen von Antikörpern aus CHO-Zellen vergleichbar. Die N-Glykosylierung ist dagegen aufgrund der pflanzenspezifischen Oligosaccharide im Vergleich zu der von Antikörpern aus CHO-Zellen heterogener.

Bislang konnten nur Antikörperfragmente, aber keine vollständigen Antikörpermoleküle durch die virus-basierte transiente Expression in Pflanzen hergestellt werden. Die Untersuchung des pflanzlichen Proteoms über eine Wachstumsperiode mehrerer Tage zeigte, dass die neue Methode der virus-basierten transienten Expression in *Nicotiana benthamiana* ein effizienter Weg für die Produktion von idiotypischen Antikörpern ist, denn die Akkumulation eines Antikörpers, sowie die erfolgreiche Verbreitung und Replikation der viralen Vektoren konnten festgestellt werden. Gleichzeitig konnte jedoch auch erstmals eindeutig der Abbau des Antikörpers in der Pflanze über Fab-ähnliche Fragmente belegt werden, der im Verlauf des pflanzlichen Wachstums begann. Auf die Bildung des Antikörpers sowie die virale/bakterielle Infektion reagierte *N. benthamiana* mit der Bildung von Abwehrproteinen und einer Hemmung der Photosynthese. Insgesamt wurde der metabolische Stoffwechselweg jedoch nur geringfügig beeinflusst. Eine erwartete gesteigerte Expression von Faltungshelfern, wie bei CHO-Zellen, blieb aus.

6 Literaturverzeichnis

Balague-Ponz O, Ott G, Hasserjian RP, Elenitoba-Johnson KSL, de Leval L, de Jong D. 2009. Commentary on the WHO classification of tumors of lymphoid tissues (2008): aggressive B-cell Lymphomas. *J Hematopathol* 2: 83-87

Balhadere PV, Foster AJ, Talbot NJ. 1999. Identification of pathogenicity mutants of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* by insertional mutagenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 129-142

Baumeister P, Luo S, Skarnes WC, Sui G, Seto E, Shi Y, Lee AS. 2005. Endoplasmic Reticulum Stress Induction of the Grp78/BiP Promoter: Activating Mechanisms Mediated by YY1 and Its Interactive Chromatin Modifiers. *Mol Cell Biol*. 25: 4529–4540

Bergman LW, Harris E, Kuehl WM. 1981. Glycosylation causes an apparent block in translation of immunoglobulin heavy chain. *J. Biol. Chem.* 256: 701-706

Bole DG, Hendershot LM, Kearney JF. 1986. Posttranslational association of immunoglobulin heavy chain binding protein with nascent heavy chains in nonsecreting and secreting hybridomas. *J. Cell Biol.* 102: 1558–1566

Borth N, Mattanovich D, Kunert R, Katinger H. 2005. Effect of Increased Expression of Protein Disulfide Isomerase and Heavy Chain Binding Protein on Antibody Secretion in a Recombinant CHO Cell Line. *Biotechnology Progress* 21: 106-111

Bertolotti-Ciarlet A, Wang W, Lownes R, Pristatsky P, Fang Y, McKelvey T, Li Y, Li Y, Drummond J, Prueksaritanont T, Vlasak J. 2009. Impact of methionine oxidation on the binding of human IgG1 to Fc Rn and Fc gamma receptors. *Mol Immunol* 46: 1878-82

Bilgin DD, Zavala JA, Zhu J, Clough SJ, Ort DR, DeLucia EH. 2010. Biotic stress globally downregulates photodynthesis genes. *Plant, Cell and Environment* 33: 1597-1613)

Chadd HE, Chamow SN. 2001. Therapeutic antibody expression technology. *Curr Opin Biotechnol* 12: 188-94

Chakravarthi S, Bulleid NJ. 2004. Glutathione Is Required to Regulate the Formation of Native Disulfide Bonds within Proteins Entering the Secretory Pathway. *J Biol Chem.* 279:39872-9

Chakravarthi S, Jessop CE, Bulleid NJ. 2006. The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. *EMBO Rep.* 7: 271-5.

Chartrain M, Chu L. 2008. Development and Production of Commercial Therapeutic Monoclonal Antibodies in Mammalian Cell Expression Systems: An Overview of the Current Upstream Technologies. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 9: 447-467

Chen MH, Sheng J, Hind G, Handa A, Citovsky V. 2000. Interaction between the tobacomosaic virus movement protein and host cell pectin methylesterases is required for viral cell-to-cell movement. *EMBO J* 19: 913–920

- Chen MH, Tian GW, Gafni Y, Citovsky V. 2005. Effects of Calreticulin on Viral Cell-to-Cell Movement. *Plant Physiology* 138: 1866–1876
- Chen XN, Nguyen M, Jacobson F, Ouyang J. 2009. Charge-based analysis of antibodies with engineered cysteines: from multiple peaks to a single main peak. *MAbs* 1: 563-71
- Coupland SE, Hummel M, Stein H. 2000. Lymphatisches System und Differenzierung von B- und T-Lymphozyten. *Pathologe* 21: 106-112
- Davis R, Schooley K, Rasmussen B, Thomas J, Reddy P. 2000. Effect of PDI overexpression on recombinant protein secretion in CHO cells. *Biotechnol. Prog.* 16: 736-743
- Di Gaetano N. 2003. Complement Activation Determines the Therapeutic Activity of Rituximab In Vivo. *J Immunol* 171: 1581-1587
- Düring K, Hippe S, Kreuzaler F, Shell J. 1990. Synthesis and self-assembly of a functional monoclonal antibody in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol. Biol.* 15: 281-293
- Dwek RA. 1995. Glycobiology: more functions for oligosaccharides. *Science* 269: 1234-1235
- Elbers IJ, Stoop GM, Bakker H, Stevens LH, Bardor M, Molthoff JW, Jordi WJ, Bosch D, Lommen A. 2001. Influence of growth conditions and developmental stage on N-glycan heterogeneity of transgenic immunoglobulin G and endogenous proteins in tobacco leaves. *Plant Physiol.* 126:1314-22
- Escobar NM, Haupt S, Thow G, Boevink P, Chapman S, Oparka K. 2003 High-throughput viral expression of cDNA –green fluorescent protein fusions reveals novel subcellular addresses and identifies unique proteins that interact with plasmodesmata. *Plant Cell* 15: 1507-1523
- Feffris R (2005) Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 8:226-234
- Fischer L. 2006. The anti-lymphoma effect of antibody-mediated immunotherapy is based on an increased degranulation of peripheral. *Experimental. Hematology* 34: 753–759
- Fitchette AC, Cabanes-Macheteau M, Marvin L, Martin B, Satiat-Jeunemaitre B, *et al.* 1999. Biosynthesis and Immunolocalization of Lewis a-Containing N-Glycans in the Plant Cell. *Plant Physiology* 121: 333–343
- Fodor J, Gullner G, Ádám AL, Barna B, Komives T, Kiraly Z. 1997. Local and Systemic Responses of Antioxidants to Tobacco Mosaic Virus Infection and to Salicylic Acid in Tobacco. *Plant Physiol.* 114: 1443-1451
- Frand AR, Kaiser CA. 2000. Two pairs of conserved cysteines are required for the oxidative activity of Ero1p in protein disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell.* 11: 2833-43

- Gadgil HS, Bondarenko PV, Pipes GD, Dillon TM, Banks D, Abel J, Kleemann GR, Treuheit MJ.** 2006. Identification of cysteinylated free cysteine in the Fab region of a recombinant monoclonal IgG1 antibody using Lys-C limited proteolysis coupled with LC/MS analysis. *Anal Biochem.* 355: 165-74
- Giddings G.** 2001. Transgenic plants as protein factories. *Curr Opin Biotechnol.* 12: 450–454
- Gilroy EM, Hein I, van der Hoorn R, Boevink PC, Venter E, et al.** 2007. Involvement of cathepsin B in the plant disease resistance hypersensitive response. *Plant J.* 52: 1–13
- Giritch A, Marillonnet S, Engler C, van Eldik G, Botterman J, et al.** 2006. Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 14701–14706
- Glabe CG, Hanover JA, Lennarz WJ.** 1980. Glycosylation of ovalbumin nascent chains. The spatial relationship between translation and glycosylation. *J Biol Chem.* 255: 9236-42
- Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S.** 2005. Magniffection—a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine* 23: 2042-2048
- Gomord V, Fitchette AC, Menu-Bouaouiche L, Saint-Jore-Dupas C, Plasson C, Michaud D, Faye L.** 2010. Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. *Plant Biotechnology* 8: 564–587
- Goulet C, Goulet C, Goulet MC, Michaud D.** 2010. 2-DE proteome maps for the leaf apoplast of *Nicotiana benthamiana*. *Proteomics* 20: 2536-2544
- Gramer MJ, Goochee CF.** 1993. Glycosidase activities in Chinese hamster ovary cell lysate and cell culture supernatant. *Biotechnol Prog.* 9:366-73
- Gupta D, Tuteja N.** Chaperones and foldases in endoplasmic reticulum stress signaling in plants. *Plant Signal Behav.* 6: 232-6
- Haas IG, Wabl M.** 1983. Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature* 306: 387–389
- Hamann MW, Zhang T, Hendrich S, Thomas JA.** 2002. A method for quantitation of protein sulfenic and sulfonic acid, irreversibly oxidized protein cystine sites in cellular proteins. *Methods Enzymol.* 348: 146-156
- Harris RJ, Kabakof B, Macchi FD, Shen FJ, Kwong M, et al.** 2001. Identification of multiple sources of charge heterogeneity in a recombinant antibody. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 752: 233-24
- Heldt HW, Piechulla B.** 2008. Pflanzenbiochemie. Spektrum Akademischer Verlag pp. 413-430
- Hendershot L, Wei J, Gaut J, Melnick J, Aviel S, Argon Y.** 1996. Inhibition of immunoglobulin folding and secretion by dominant negative BiP ATPase mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5269-5274

- Henkes S, Sonnewald U, Badur R, Flachmann R, Stitt M. 2001. A small decrease of plastid transketolase activity in antisense tobacco transformants has dramatic effects on photosynthesis and phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 13: 535-551
- Hiatt A, Cafferkey R, Bowdich K. 1989. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* 342: 76-78
- Hiatt A, Pauly M. 2006. Monoclonal antibodies from plants: A new speed record. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 14645-14646
- Hoch ASH. 2010. Entwicklung eines Expressionssystems für rekombinante Antikörper in mammalischen Zellen. Dissertation, Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, http://rzbl04.biblio.etc.tubs.de:8080/docportal/receive/DocPortal_document_00033488
- Hochgräfe F, Mostertz J, Pöther DC, Becher D, Helmann JD, Hecker M. 2007. S-cysteinylation is a general mechanism for thiol protection of *Bacillus subtilis* proteins after oxidative stress. *J Biol Chem.* 282: 25981-5
- Hochstenbach F, David V, Watkins S, Brenner MB. 1992. Endoplasmic reticulum resident protein of 90 kilodaltons associates with the T- and B-cell antigen receptors and major histocompatibility complex antigens during their assembly. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89: 4734-4738
- Hodgkin T. 1832. On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. *Med Chir Trans.* 17: 68-114
- Huang Z. 2010. High-level rapid production of full-size monoclonal antibodies in plants by a single-vector DNA replicon system. *Biotechnol Bioeng.* 106: 9-17
- Inogès S, Rodríguez-Calvillo M, Zabalegui N, López-Díaz de Cerio A, Villanueva H, Soria E, et al. 2006. Clinical benefit associated with idiotypic vaccination in patients with follicular lymphoma. *J Natl Cancer Inst.* 98:1292-301
- Kayser V, Chennamsetty N, Voynov V, Forrer K, Helk B, Trout BL. 2011. Glycosylation influences on the aggregation propensity of therapeutic monoclonal antibodies. *Biotechnol. J.* 6: 38-44
- Kelleher DJ, Kreibich G, Gilmore R. Oligosaccharyltransferase activity is associated with a protein complex composed of ribophorins I and II and a 48 kd protein. *Cell* 69: 55-65
- Köhler G, Milstein C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-7
- Kowarik M, Numao S, Feldman MF, Schulz BL, Callewaert N, Kiermaier E, Catrein I, Aebi M. 2006. N-linked glycosylation of folded proteins by the bacterial oligosaccharyltransferase. *Science* 314: 1148-50
- Lee YK, Brewer JW, Hellman R, Hendershot LM. 1999. BiP and immunoglobulin light chain cooperate to control the folding of heavy chain and ensure the fidelity of immunoglobulin assembly. *Mol Biol Cell.* 10: 2209-19

- Leitzgen K, Knittler MR, Haas IG. 1997. Assembly of immunoglobulin light chains as a prerequisite for secretion. A model for oligomerization-dependent subunit folding. *J Biol Chem.* **272**(5): 3117-3123
- Liebming E, Hüttner S, Vavra U, Fischl R, Schoberer J, Grass J, Blaukopf C, Seifert GJ, Altmann F, Mach L, Strasser R. Class I alpha-mannosidases are required for N-glycan processing and root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 21: 3850-67
- Lii CK, Chai YC, Zhao W, Thomas JA, Hendrich S. 1994. S-thiolation and irreversible oxidation of sulfhydryls on carbonic anhydrase III during oxidative stress: a method for studying protein modification in intact cells and tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 308: 231-239
- Liu H, Bulseco GG, Sun J. 2006. Effect of posttranslational modifications on the thermal stability of a recombinant monoclonal antibody. *Immunology Letters* 106: 144–153
- Liu H, Gaza-Bulseco G, Faldu D, Chumsae C, Sun J. 2008. Heterogeneity of Monoclonal Antibodies. *J Pharm Sci.* 97: 2426-47
- Liu H, Gaza-Bulseco G, Chumsae C, Newby-Kew A. 2007. Characterization of lower molecular weight artifact bands of recombinant monoclonal IgG1 antibodies on non-reducing SDS-PAGE. *Biotechnol Lett* 29:1611-1622
- Ludwig DL, Pereira DL, Zhu Z, Hicklin DJ, Bohlen P. 2003. Monoclonal antibody therapeutics and apoptosis. *Oncogene* 22: 9097–9106
- Mancino L, Rizvi SM, Lapinski PE, Raghavan M. 2002. Calreticulin recognizes misfolded HLA-A2 heavy chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 5931-6.
- Matamoros Fernández LE, Kalume DE, Calvo L, Fernández Mallo M, Vallin A, Roepstorff P. 2001. Characterization of a recombinant monoclonal antibody by mass spectrometry combined with liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 752: 247-61
- McCormick AA, Reddy S, Reinl SJ, Cameron TI et al. 2008. Plant-produced idiotypic vaccines for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: Safety and immunogenicity in a phase I clinical study. *PNAS* 105: 10131–10136
- Meins F, Ahl P. 1989. Induction of chitinase and β -1,3-glucanase in tobacco plants infected with *Pseudomonas tabaci* and *Phytophthora parasitica* var. *Nicotianae*. *Plant Science* 61: 155-16
- Melnick J, Dul JL, Argon Y. 1994. Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum. *Nature* 370: 373-375
- Mertraux JP, Boller TH. 1986. Local and systemic induction of chitinase in cucumber plants in response to vital bacterial and fungal infections. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 28: 161-169
- Millward TA, Heitzmann M, Bill K, Längle U, Schumacher P, Forrer K. 2008. Effect of constant and variable domain glycosylation on pharmacokinetics of therapeutic antibodies in mice. *Biologicals* 36: 41-7

- Munk Pedersen I, Mette Buhl A, Klausen P, Geisler CH, Jurlander J.** 2002. The chimeric anti-CD20 antibody rituximab induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells through a p38 mitogen activated protein-kinase-dependent mechanism. *BLOOD* 99: 1314-1319
- Mohan C, Lee GM.** 2010. Effect of inducible co-overexpression of protein disulfide isomerase and endoplasmic reticulum oxidoreductase on the specific antibody productivity of recombinant Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng.* 107:337-46.
- Montaño RF, Morrison SL.**2002. Influence of the isotype of the light chain on the properties of IgG. *J Immunol* 168: 224-31
- Newkirk MN, Novick J, Stevenson MM et al.** 1995. Differential clearance of Glycoforms of IgG in normal and autoimmune-prone mice. *Clin Exp Immunol* 106: 259-264
- Nilsson I, von Heijne G.** 2000. Glycosylation efficiency of Asn-Xaa-Thr sequons depends both on the distance from the C terminus and on the presence of a downstream transmembrane segment. *J Biol Chem.* 275: 17338-43
- Nuttall J, Vine N, Hadlington J L, Drake P.** 2002. ER-resident chaperone interactions with recombinant antibodies in transgenic plants. *Eur. J. Biochem.* 269: 6042-6051
- Ochsenbein AF.** 2008. Monoklonale Antikörper – «magic bullets»? *Schweiz Med Forum* 8: 139
- Ochsenbein AF.** 2008. Monoklonale Antikörper als therapeutische Substanzen. *Schweiz Med Forum* 8: 140-14
- Otteken A, Moss B.** 1996. Calreticulin interacts with newly synthesized human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein, suggesting a chaperone function similar to that of calnexin. *J Biol Chem* 271: 97-103.
- Park BJ, Lee DG, Yu JR, Jung SK, Choi K, Lee J, Lee J, Kim YS, Lee JI, Kwon JY, Lee J, Singson A, Song WK, Eom SH, Park CS, Kim DH, Bandyopadhyay J, Ahnn J.** 2001. Calreticulin, a calcium-binding molecular chaperone, is required for stress response and fertility in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell.* 12: 2835-4
- Pascoe DE, Arnott D, Papoutsakis ET, Miller WM, Andersen DC.** 2007. Proteome Analysis of Antibody-Producing CHO Cell Lines With Different Metabolic Profiles. *Biotechnology and Bioengineering* 98: 391-410
- Pascon RC, Ganous TM, Kingsburry JM, Cox GM, McCusker JH.** 2004. *Cryptococcus neoformans* methionine synthase: Expression analysis and requirement for virulence. *Microbiology* 150: 3013-3023
- Pileri SA.** 2004. Indolent Lymphoma: the pathologist's viewpoint. *Annals of Oncology* 15: 12-18
- Pollard MG, Travers KJ, Weissman JS.** 1998. Ero1p: a novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell.* 1: 171-82

- Qi P, Volkin DB, Zhao H, Nedved ML. 2009. Characterization of the Photodegradation of a Human IgG1 Monoclonal Antibody Formulated as a High-Concentration Liquid Dosage Form. *J Pharm Sci*. 98: 3117-3130
- Raju TS. 2003. Glycosylation variations with expression systems and their impact on biological activity of therapeutic immunoglobulins. *BioProcess International* 44-53
- Rayon C, Lerouge P, Faye L. 1998. The protein N-glycosylation in plants. *Journal of Experimental Botany* 49: 1463–1472
- Reddy P, Sparvoli A, Fagioli C, Fassina G, Sitia R. 1996. Formation of reversibel disulfide bonds with the protein matrix of the endoplasmatic reticulum correlates with the retention of unassembled Ig light chains. *The EMBO Journal* 15: 2077-2085
- Reinero A, Beachy RN. 1989. Reduced Photosystem 11 Activity and Accumulation of Viral Coat Protein in Chloroplasts of Leaves Infected with Tobacco Mosaic Virus. *Plant Physiol.* 89: 111-116
- Roberts GD, Johnson WP, Burman S, Anumula KR, Carr SA. 1995. An integrated strategy for structural characterization of the protein and carbohydrate components of monoclonal antibodies: application to anti-respiratory syncytial virus MAb. *Anal Chem*. 67: 3613-3622
- Schlatter S, Stansfield SH, Dinnis DM, Racher AJ, Birch JR, James DC. 2005. On the optimal ratio of heavy to light chain genes for efficient recombinant antibody production by CHO cells. *Biotechnol Prog* 21: 122-133
- Seong, K, Hou Z, Tracy M, Kistler H C, Xu JR. 2005. Random insertional mutagenesis identifies genes associated with virulence in the wheat scab fungus *Fusarium graminearum*. *Phytopathology* 95: 744-750
- Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, et al. 2003. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem* 278: 3466–3473
- Smales CM, Dinnis DM, Stansfield SH, Alete D, Sage EA, Birch JR, Racher AJ, Marshall CT, James DC. 2004. Comparative proteomic analysis of GS-NS0 murine myeloma cell lines with varying recombinant monoclonal antibody production rate. *Biotechnol Bioeng*. 88: 474-88.
- Smith MD. 1996. Antibody production in plants. *Biotechnol Adv*. 14: 267-81
- Stein H. 2000. Die neue WHO-Klassifikation der malignen Lymphome, *Pathologe* 21: 101-105
- Stanley P, Schachter H, Taniguchi N. 2009. N-Glycans. In: *Essentials of Glycobiology*. Varki A, Cummings RD, Esko J, Freeze HH, Hart G, Marth J. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition
- Stevens LH, Stoop GM, Elbers IJW. 2000. Effect of Climate Conditions and Plant Developmental Stage on the Stability of Antibodies Expressed in Transgenic Tobacco. *Plant Physiology* 124: 173-182

- Strasser R, Bondili JS, Schoberer J, Svoboda B, Liebming E, Glössl J, Altmann F, Steinkellner H, Mach L.** 2007. Enzymatic properties and subcellular localization of Arabidopsis beta-N-acetylhexosaminidases. *Plant Physiol.* 145(1):5-16
- Strasser R, Bondili JS, Vavra U, Schoberer J, Svoboda B, et al.** 2007. A Unique b1,3-Galactosyltransferase Is Indispensable for the Biosynthesis of N-Glycans Containing Lewis a Structures in Arabidopsis thaliana. *The Plant Cell* 19: 2278–2292
- Tao MH, Morrison SL.** 1989. Studies of aglycosylated chimeric mouse-human IgG. Role of carbohydrate in the structure and effector functions mediated by the human IgG constant region. *J. Immunol.* 143: 2595-2601
- Truica CI, Rouch D and Arteaga CL.** 2006. Antibody therapy for solid tumors. In: Immunotherapy of cancer. Disis ML. 2006. *Humana Press* pp. 433-444
- Vanacker H, Carver TL, Foyer CH.** 1998. Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. *Plant Physiol.* 117: 1103-14.
- van Berkel PH, Gerritsen J, Perdok G, Valbjorn J, Vink T, van de Winkel JG, Parren PW.** 2009. N-linked glycosylation is an important parameter for optimal selection of cell lines producing biopharmaceutical human IgG. *Biotechnol Prog* 25: 244–251
- Voedisch B, Menzel C, Jordan E, El-Ghezal A, Schirrmann T, et al.** 2005. Heterologe Expression von rekombinanten Proteinpharmazeutika. *Laborwelt* 3: 31-35
- Vose JM, Wahl RL, Saleh M, Rohatiner AZ, Knox SJ, et al.** 2000. Multicenter Phase II Study of Iodine-131 Tositumomab for Chemotherapy-Relapsed/Refractory Low-Grade and Transformed Low-Grade B-Cell Non-Hodgkin's Lymphomas. *J Clin Oncol* 18: 1316-1323
- Von Behring E, Kitasato S.** 1890. Über das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität and der Tetanus-Immunität bei Thieren. *Dtsch Med Wochenschr* 16: 1113-1114
- Wallick S C, Kabat E A, Morrison S L.** 1988. Glycosylation of a VH residue of a monoclonal antibody against alpha (1---6) dextran increases its affinity for antigen, *J. Exp. Med.* 168:1099-1109
- Walmsley AR, Hoopé NM.** 2003. Glycosylation efficiency of Asn-Xaa-Thr sequons is independent of distance from the C-terminus in membrane dipeptidase. *Glycobiology* 13: 641- 646
- Wen J, Jiang Y, Nahri L.** 2011. Effect of Carbohydrate on Thermal Stability of Antibodies, *American Pharmaceutical Review* pp 1-5
- Wessel D, Fugge UI.** 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical Biochemistry* 138: 141-143
- Witzig TE, White CA, Wiseman GA, Gordon LI, Emmanouilides C, et al.** 1999. Phase I/II Trial of IDEC-Y2B8 Radioimmunotherapy for Treatment of Relapsed or Refractory CD20 B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *J Clin Oncol* 17: 3793-3803

World Health Organization. 2009. International Nonproprietary Names (INN) Working Group Meeting on Nomenclature for Monoclonal Antibodies (mAb). Meeting report, INN Working Document 09.251

Wright A, Morrison SL. 1994. Effect of altered CH2-associated carbohydrate structure on the functional properties and in vivo fate of chimeric mouse-human immunoglobulin G1. *J Exp Med.* 180: 1087–1096

Wright A, Tao MH, Kabat EA, Morrison SL. 1991. Antibody variable region glycosylation: position effects on antigen binding and carbohydrate structure. *EMBO J.* 10: 2717–2723

Zhang MY, Bourbonloux A, Cagnac O, Srikanth CV, Rentsch D, Bachhawat AK, Delrot S. 2004. A novel family of transporters mediating the transport of glutathione derivatives in plants. *Plant Physiol.* 134: 482-91

Erklärung

An Eides statt versichere ich, dass

die vorgelegte Arbeit – abgesehen von den ausdrücklich bezeichneten Hilfsmitteln – persönlich, selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde,

die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht sind,

die vorgelegte Arbeit oder ähnliche Arbeiten nicht bereits anderweitig als Dissertation eingereicht worden ist bzw. sind,

für die Erstellung der vorgelegten Arbeit keine fremde Hilfe, insbesondere keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberatern / -vermittlern oder anderen Personen) in Anspruch genommen wurde,

keinerlei Dritte vom Doktoranden unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Tätigkeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Arbeit stehen,

die vorgelegte Arbeit weder vollständig noch auszugsweise veröffentlicht worden ist.

.....

Danksagung

Dr. Werner Schröder danke ich dafür, dass er mir mit der hervorragenden Auswahl des Themas den Weg für dieses Projekt geebnet hat. Außerdem bedanke ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die wissenschaftlichen Anregungen und die ständige Diskussionsbereitschaft. Ganz besonders möchte ich mich für die stetigen Ermutigungen sowie die unfassbare Geduld und Ruhe bedanken, die mir stets selbst zu einer gewissen Gelassenheit verholfen haben.

Bei Herrn Prof. Dr. Deppenmeier bedanke ich mich für das Wagnis eine Dissertation außerhalb der Universität zu betreuen und das Interesse an der regelmäßigen Berichterstattung zum Fortschritt meiner Arbeit. Ebenso bedanke ich mich für das Vertrauen, das dazu geführt hat, dass er sich manchmal nur auf das gesprochene als auf das geschriebene Wort verlassen hat.

Bei Frau Dr. Gerhild van Echten-Deckert möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferates, die stetige Bereitschaft meinen Vorträgen beizuwohnen sowie das Interesse an dem Thema bedanken.

Bayer Innovation/ Icon Genetics danke ich für die Überlassung des Themas, die Anzucht der Pflanzen, das geduldige Beantworten meiner Fragen und die Diskussionsbereitschaft während meiner Besuche in Halle. Besonders danke ich Dr. John-Edward Butler-Ransohoff für die unkomplizierte Handhabung in Bezug auf die Veröffentlichung.

Bei allen Mitgliedern der Quality Unit der Bayer Pharma AG in Wuppertal Elberfeld bedanke ich mich für das kollegiale Umfeld innerhalb und außerhalb der Arbeitszeiten, das dafür gesorgt hat, dass ich mich von Anfang an wohl gefühlt habe. Mein Dank geht auch an den Abteilungsleiter Dr. Frank-Andreas Gunkel für den Glauben an mich und seinen Einsatz für meine Übernahme in seine Mannschaft.

Allen Mitgliedern des Labors Dr. Schröder danke ich für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Alexandra Lenzen für die angenehme Arbeitsatmosphäre in unserem Schreibraum und den unkomplizierten Umgang bedanken.

Mein Dank geht auch an Simone Greven und Daniela Grab, die mich in die Geheimnisse der Massenspektrometrie eingewiesen haben. Vielen Dank auch für die oft schnelle Bereitstellung der Geräte und die unermüdliche Hilfsbereitschaft, wenn ich mal wieder mit 100 Proben vor der Tür stand.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Dr. Schneider für die Bereitstellung der Zellkultur-Überstände und bei Dr. Jürgen Lenz für die Aufreinigung von Antikörpern aus den Pflanzen und die Beantwortung meiner Fragen.

Vielen Dank auch an die Mitglieder des Labors Dr. Frank Tiemann für die Hilfe bei kleinen und großen Problemen, sowie die stets angenehme Atmosphäre auf der oberen Etage.

Mein herzlichster Dank geht an Doris und Hans Willi Trost für die Unterstützung in allen Lebenslagen und den moralischen Beistand.