

Etablierung und Anwendung einer analytischen Methode zur Untersuchung der N-Glykosylierung des Influenza-Virus Hämagglutinin

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doktoringenieurin
(Dr.-Ing.)

Dipl.-Ing. (FH) Jana Bohne
geb. am 05.03.1980 in Genthin

genehmigt durch die Fakultät für Verfahrens- und Systemtechnik
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Gutachter:

Prof. Dr. Udo Reichl

Prof. Dr. Christiana Cordes

Dr. Holger Kost

Promotionskolloquium am 06.02.2013

Für Omi und Mama

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all meinen Verwandten, Freunden und Bekannten bedanken, die mich in den Jahren der Erstellung der Dissertation vor allem moralisch unterstützten und somit zum Gelingen beigetragen haben.

Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Udo Reichl bedanken, für die interessante Aufgabenstellung, die weit genug gefaßt war, um mir nicht die Freiheit bei der Ausgestaltung der Arbeit zu nehmen. Zusätzlich danke ich Ihnen, für die Geduld, die Sie mir entgegen brachten und die wertvollen Ratschläge, die für das Gelingen der Arbeit sorgten.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Erdmann Rapp bedanken für die vielfältige Unterstützung durch immerwährende Diskussionsbereitschaft, Anregungen und die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens bin ich Frau Prof. Dr. Christiana Cordes ebenso dankbar wie Herrn Dr. Holger Kost für die Übernahme des Drittgutachtens.

Meinen ehemaligen Kollegen des Max-Planck-Institutes Magdeburg danke ich für die vielen fachlichen und außerfachlichen Diskussion, ihr fundiertes Fachwissen und die vielen Anregungen für meine wissenschaftliche Arbeit. Spezieller Dank geht dabei an die Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik und im Besonderen an Frau Claudia Best für ihre tatkräftige Unterstützung bei den vielen Zellkultivierungen, Infektionen und Virustiterbestimmungen.

Ein besonders großer Dank geht an meine liebe Omi und meine Mama, ohne die ein Studium und eine Doktorarbeit niemals möglich geworden wären. Danke für alles!

Mein Dank gilt auch meinem Ehemann, Christian Bohne, der mich auch in schwierigen Phasen dieser Arbeit unterstützte und mich immer motivierte die Arbeit fertig zu stellen.

Tina Haase danke ich, weil sie die beste Freundin ist, die man sich wünschen kann und die mir seit unserer Schulzeit immer zur Seite stand.

Abschließend danke ich noch Franziska Ansorge, die der Arbeit den letzten Schliff gab.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	8
2.1	Glykosylierung	8
2.1.1	Synthese Asparagin-verknüpfter Glykane	11
2.2	Influenza-Virus	13
2.3	Influenza-Virus-Hämagglutinin.....	16
2.3.1	Glykosylierung des Influenza-Virus-Hämagglutinins	17
2.3.2	Funktionen der HA N-Glykane	19
2.3.3	Mögliche Einflussfaktoren auf die N-Glykosylierung	20
2.4	Stand der Technik und Strategien zur Glykananalytik	23
2.5	Kapillarelektrophorese.....	30
2.5.1	Grundlagen der Kapillarelektrophorese	32
3	MATERIAL UND METHODEN	35
3.1	Chemikalien und Reagenzien	35
3.2	Zellkultur und Virusreplikation	35
3.3	Methoden.....	37
3.3.1	Hämagglutinationstest zur Bestimmung des Gesamtvirusgehalts	37
3.3.2	Aufreinigung und Konzentrierung von Influenza-Virus aus Zellkulturüberstand	39
3.3.3	Proteinbestimmung nach Bradford.....	39
3.3.4	Gelelektrophorese und kolloidale Coomassie-Färbung	40
3.3.5	Proteinidentifizierung mittels LC-MS/MS.....	40
3.3.6	In-Gel-Deglykosylierung und Extraktion der N-Glykane.....	43
3.3.7	Markieren der N-Glykane mit APTS	44
3.3.8	Größenausschlusschromatographie	44
3.3.9	Identifizierung N-glykanhaltiger Fraktionen	45
3.3.10	Kapillargelelektrophorese	46
3.3.11	Strukturaufklärung	48
3.3.12	Datenauswertung.....	49
4	ERGEBNISSE	51
4.1	Aufreinigung und Aufkonzentrierung der Viruspartikel	51
4.2	Identifizierung der Virusproteine mittels LC-MS/MS	53
4.3	Detektionslimit der CGE-LIF	54
4.4	Etablierung der N-Glykananalytik und Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der CGE anhand von bovinem Serum IgG.....	55
4.5	Reproduzierbarkeit der Probenvorbereitung	58
4.6	Charakterisierung der Batch-to-Batch Reproduzierbarkeit	64
4.7	Einfluss der Wirtszelllinie und des Virusstamms auf das N-Glykosylierungsmuster	

des Influenza-Virus HA	66
4.7.1 Einfluss der Wirtszelllinie auf die HA N-Glykosylierung des Influenza-A-Virus H1N1-RKI.....	67
4.7.2 Einfluss der Wirtszelllinie auf die HA N-Glykosylierung des Influenza-A-Virus H3N2	71
4.7.3 Vergleich des HA N-Glykosylierungsmusters der M-Variante verschiedener Virustypen und -subtypen	73
4.7.4 Strukturaufklärung der HA N-Glykane verschiedener Varianten des Influenza-A-Virus H1N1-RKI.....	76
4.7.5 Strukturaufklärung der HA N-Glykane verschiedener Varianten des Influenza-A-Virus H3N2	80
4.7.6 Strukturaufklärung der HA N-Glykane der M-Variante verschiedener Influenza-Virustypen und -subtypen	82
4.7.7 Adaption von Influenza A Viren an eine Vero- und RCar-Zelllinie - Verlauf der HA N-Glykosylierung	85
4.7.7.1 Adaption von Influenza-A-Virus H1N1-NIBSC an eine Vero-Zelllinie	85
4.7.7.2 Adaption von Influenza-A-Virus H3N2 an eine Vero-Zelllinie	87
4.7.7.3 Adaption von Influenza-A-Virus H3N2 an eine RCar-Zelllinie.....	89
4.7.7.4 „Rückwärtsadaption“ von Influenza-A-Virus H1N1-NIBSC an eine MDCK-Zelllinie	91
4.8 Einfluss verschiedener Kultivierungsparameter auf die N-Glykosylierung des Influenza-Virus HA.....	93
4.8.1 Einfluss des Zellkultursystems auf die HA N-Glykosylierung.....	94
4.8.2 Einfluss des Zellkulturmediums auf die HA N-Glykosylierung.....	99
4.8.3 Einfluss der Zelldichte auf die HA N-Glykosylierung.....	104
4.8.4 Einfluss des Sauerstoffgehaltes im Zellkulturmedium auf die HA N-Glykosylierung	106
4.8.5 Einfluss des Erntezeitpunktes auf die HA N-Glykosylierung.....	109
4.8.6 Einfluss der Inaktivierung des Virus mit β -Propiolacton auf die HA N-Glykosylierung	123
5 DISKUSSION	125
5.1 Aufreinigung und Aufkonzentrierung der Viruspartikel und Identifizierung der Virusproteine	127
5.2 Etablierung der N-Glykananalytik und Reproduzierbarkeit der CGE und Probenvorbereitung	128
5.3 Charakterisierung der Batch-to-Batch Reproduzierbarkeit	132
5.4 Einfluss der Wirtszelllinie und Virusstamm auf das N-Glykosylierungsmuster des Influenza-Virus HA.....	133
5.5 Adaption von Influenza-A-Viren an die Vero- und RCar-Zelllinie – Verlauf der HA	

N-Glykosylierung.....	139
5.6 Einfluss verschiedener Kultivierungsparameter auf die N-Glykosylierung des Influenza-Virus HA.....	143
5.6.1 Einfluss von Zellkultursystem, Zellkulturmedium, Zelldichte und Sauerstoffgehalt.....	143
5.6.2 Einfluss von Erntezeitpunkt und Inaktivierung.....	149
6 ZUSAMMENFASSUNG	156
7 AUSBLICK.....	159
8 REFERENZEN.....	163
9 EIGENE ARBEITEN	179
I. ANHANG	CLXXXII
1. Verwendete Chemikalien und biologische Reagenzien	CLXXXII
2. Puffer und Lösungen	CLXXXVIII
3. Geräte und Materialien.....	CXC
4. Arbeitsanweisungen	CXCII
4.1 Hämmagglutinationstest zur Bestimmung des Gesamtvirusgehalts	CXCII
4.2 Proteinbestimmung nach Bradford.....	CXCVII
4.3 Bestimmung des TCID ₅₀	CCII
4.4 Chemische Inaktivierung.....	CCIX
5. Matlab Programm zur Normierung der t _{mig}	CCXX

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2-AA	2-Aminobenzoessäure
2-AB	2-Aminobenzamid
2-AP	2-Aminopyridin
AA	Aminosäure
AB	Applied Biosystems
AGE1.CR	Enten-Zellline
ANTS	2-Aminonaphthalen-1,3,6-Trisulfonsäure
aq	wässrig (aqueous)
Asn	Asparagin
APTS	8-Aminopyren-1,3,6-Trisulfonat
β -PL	β -Propiolacton
BSA	bovines Serumalbumin
CE	Kapillarelektrophorese
CGE	Kapillargelelektrophorese
cIEF	Kapillar-isoelektrische Fokussierung
co-EOF	Trennung mit dem elektroosmotischen Fluss
counter-EOF	Trennung gegen den elektroosmotischen Fluss
CZE	Kapillarzonenlektrophorese
DNA	Desoxyribonucleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DSP	Downstream Processing
DTT	Dithiothreitol
EEL	Euonymous Europaeus Lektin
EPO	Erythropoetin
EOF	Elektroosmotischer Fluss
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray Ionisierung
FDA	Food and Drug Administration
FSH	folikelstimulierendes Hormon
GLC/MS	Gas-Flüssig-Chromatographie-Massenspektrometrie
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
GMEM	Glasgow Minimum Essential Medium
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HA	Hämagglutinin

HA ₀	Hämagglutinin Monomer
HA ₁	Hämagglutinin Untereinheit 1
HA ₂	Hämagglutinin Untereinheit 2
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
hpi	Stunden nach der Infektion (hours post infection)
IAA	Iodacetamid
ID	Innendurchmesser
IGD	In-Gel-Deglykosylierung
IgG	gamma Immunglobulin
LC	Flüssigkeitschromatographie
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie
LIF	Laser induzierte Fluoreszenz
LOD	Limit of Detection (Detektionslimit)
M1	Matrixprotein 1
M2	Matrixprotein 2 (Ionenkanal)
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization)
MDCK	Madin Darby Canine Kidney
MEKC	Mizellar-elektrokinetische-Kapillarchromatographie
MEM	Minimum Essential Medium
MOI	Multiplizität der Infektion (Multiplicity of Infection)
MPI	Max-Planck-Institut
MS	Massenspektrometrie
NA	Neuraminidase
NIBSC	National Institute for Biological Standards and Control, UK
no-EOF	kein elektroosmotischer Fluss
NP	Nukleoprotein
NMR	Kern(spin)resonanzspektroskopie
NP-HPLC	Normalphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (Normal Phase- High Performance Liquid Chromatography)
OD	Außendurchmesser (outer diameter)
PA	Peakanzahl
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PAT	Prozess-Analysen-Technik (process analytical technique)
PBS	wässrige phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PER.C6	humane embryonale Retinazellen (Crucell)
pI	isoelektrischer Punkt
PNGase F	Peptid-N-Glykosidase F
RBS	Rezeptorbindungsstelle (receptor binding site)
RCAr	lektinresistente mutierte MDCK Zelllinie
RKI	Robert Koch Institut, Deutschland
RF	Rollerflasche
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	Größenausschlusschromatographie
SED	sequentieller Exoglykosidase Verdau
Ser	Serin
SOP	Standardarbeitsanweisung (standard operating procedure)
SRID	Single radial immunodiffusion
SRT	Bioreaktor (stirred tank reactor)
TCID ₅₀	Gewebekultur infektiöse Dosis 50% (tissue culture infection dose 50%)
TCK	Trimannosyl-Chitobiose-Kern
Thr	Threonin
tPA	gewebespezifischer Plasminogenaktivator
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
USP	Upstream Processing
Vero-Zellen	African green monkey Kidney-Zellen
α -Gal	α -Galaktosidase
β -Gal	β -Galaktosidase
β -Hex	β -N-Acetylhexosaminidase
α -Man	α -Mannosidase
α -Fuc	α -Fukosidase

FORMELZEICHEN UND EINHEITEN

Å	Ångström
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
Da	Dalton
DP	Datenpunkt
E	elektrische Feldstärke
fmol	Femtomol
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
γ	elektrisches Feld
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
<i>l</i>	effektive Kapillarlänge
L	Gesamtlänge der Kapillare
min	Minute
M	molar
mL	Milliliter
mM	millimolar
mmu	milli mass unit
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
μ	Mobilität der Analyten
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
μS	Mikrosiemens
norm. t_{mig}	normierte Migrationszeit
$p\text{O}_2$	Sauerstoffpartialdruck
psi	Pfund pro Quadratzoll (pound-force per square inch)
RFU	relative Fluoreszenzeinheiten
s	Sekunde
t_{mig}	Migrationszeit
U	Spannung
v/v	Volumen/Volumen

ABBILDUNGSVERZICHNIS

Abbildung 1-1: Ribbon-Darstellung des ungespaltenen HA-Monomers des Influenza-A-Virus (H1N1) von 1918 mit Glykanstrukturen [72]	5
Abbildung 2-1: verschiedene Monomerbausteine von Glykanen (modifiziert nach [98])	9
Abbildung 2-2: Schematische Darstellung eines typischen komplexen N-Glykans.....	10
Abbildung 2-3: Sechs verschiedene Arten von Kernstrukturen (eingerahmt), wie sie in O-Glykanen vorkommen [11]	10
Abbildung 2-4: GPI-Anker aus <i>Leishmania major</i> [100]	11
Abbildung 2-5: Kernstruktur der N-Glykane wie sie ursprünglich im ER über eine N-glykosidische Bindung an das Proteinrückgrat geheftet werden. Durch Glukosidasen werden die Glukose- und Mannoseresiduen im ER abgespalten. Die Symbole der einzelnen Zucker (rechts) werden auch in Abbildung 2-6 verwendet. [56].....	12
Abbildung 2-6: Schematische Darstellung der Synthese von Asparagin gebundenen Glykanen. Die verwendeten Symbole der einzelnen Monomere der N-Glykane sind in Abbildung 2-5 definiert. [56].....	13
Abbildung 2-7: Schematische Darstellung des Replikationszyklus des Influenza-Virus. Die einzelnen Schritte des Zyklus (1-8) sind durchnummeriert. [114].....	16
Abbildung 2-8: Die drei Konformationen des HA (a) ungespaltenes HA ₀ ; (b) HA bei neutralem pH-Wert; (c) gespaltenes HA bei Fusions pH-Wert (pH 5-6); HA ₁ Residuen (blau), HA ₂ Residuen (rot) [118].....	17
Abbildung 2-9: Schematisches Model des HA. Die Stammregion des HA ist jeweils umgeben von neun N-Glykanen. N-Glykane der Kopfreion variieren in Anzahl und Position in Abhängigkeit des Virusstammes [18, 110].	19
Abbildung 2-10: Strategien zur Analyse von freigesetzten Glykanen von Glykoproteinen (modifiziert nach [3])	27
Abbildung 2-11: Reagenzien für das fluoreszente Labeling von Oligosacchariden; ANTS: 2-Aminonaphthalen-1,3,6-Trisulfonsäure; APTS: 8-Aminopyren-1,3,6-Trisulfonat; 2-AA: 2-Aminobenzoesäure [196]	28
Abbildung 3-1: Im Rahmen dieser Arbeit etablierte Methode zur N-Glykananalytik von Virusproteinen.....	38
Abbildung 4-1: kolloidal Coomassie gefärbtes SDS-Gel zur Beurteilung der Aufreinigung von Viruspartikeln (H1N1-RKI; Ernte 72 hpi) aus Zellkulturüberstand (MDCK-Zellen in T175-Zellkulturflaschen) mittels stufenweiser g-Gradienten-Zentrifugation. In allen Fällen wurde die Zentrifugation bei 4°C durchgeführt. (1: Zellkulturüberstand; 2: Pellet nach 100 g; 3: Überstand nach 100 g; 4: Pellet nach 4000 g; 5: Überstand nach 4000 g; 6: Pellet nach 10000 g; 7: Überstand nach 10000 g; 8: Überstand nach 71000 g; 9: Viruspellet nach 71000 g; M: Molekulargewichtsstandard RotiMark).....	52
Abbildung 4-2: SDS-Gel des mittels stufenweiser g-Gradienten-Zentrifugation aus Zellkulturüberstand (MDCK-Zellen in T175-Zellkulturflaschen) aufgereinigten	

Influenza-A-Virus H1N1-RKI (Ernte 72 hpi). Die mittels LC-MS/MS analysierten Banden sind durch die schwarzen Rechtecke gekennzeichnet und die identifizierten Virusproteine beschriftet. (4x NA: Neuraminidase Tetramer; NA: Neuraminidase Monomer; 3 x bzw. 2x HA ₀ : Hämagglutinin Tri- bzw. Dimer; HA ₀ : Hämagglutinin Monomer; NP: Nukleoprotein; M1: Matrixprotein 1).	53
Abbildung 4-3: Elektropherogramme von APTS-konjugierten N-Glykanen des bovinen Serum IgG (A) CGE-LIF-Elektropherogramm nach der in Abbildung 3-1 dargestellten N-Glykananalytik; der mit * markierte Peak wurde für die Beurteilung der Reproduzierbarkeit der CGE-LIF Methode herangezogen, t _{mig} nicht normiert (B) CE-LIF-Elektropherogramm publiziert von Raju <i>et al.</i> 2000 [226]; in beiden Elektropherogrammen vorhandene Signale wurden mit I-IV markiert. Die entsprechenden N-Glykanstrukturen sind in der Tabelle 4-2 dargestellt.	55
Abbildung 4-4: CGE-LIF-Elektropherogramme von APTS-konjugierten N-Glykanen des bovinen Serum IgG gespikt mit der Struktur I (Tabelle 4-2), t _{mig} nicht normiert.....	57
Abbildung 4-5: CGE-LIF-Elektropherogramm von APTS-konjugierten N-Glykanen des bovinen Serum IgG. Die mit Hilfe von Spike-Experimenten identifizierten und aus der Literatur bekannten N-Glykanstrukturen sind mit I-IV und A-G markiert. Die Strukturen der N-Glykane A-G sind in dieser Abbildung aufgeführt. Die Strukturen I – IV sind der Tabelle 4-2 zu entnehmen. t _{mig} nicht normiert	57
Abbildung 4-6: Ausgewählte 96-Well-Klarbodenplatten, eingescannt mit einem Typhoon Laserscanner nach der SEC; Wells, die Fraktionen der Proben 1-3 (Rollerflaschenaliquots 1-3 des H1N1-RKI, repliziert in MDCK-Zellen) enthalten, sind durch die schwarzen Rechtecke markiert. Ein hellgrauer Farbton wie für die Fraktionen F8, 9, 17, 18 und 19 bedeutet, dass keine APTS-konjugierten N-Glykane in diesen Fraktionen enthalten sind. Mit zunehmendem Gehalt an APTS-konjugierten N-Glykanen in den jeweiligen Fraktionen nimmt die Intensität der Graufärbung zu (Fraktionen F12-16). Wells, die nahezu schwarz erscheinen (Platte 12, Fraktionen F28 und F29), enthalten Fraktionen, die fast ausschließlich APTS enthalten am Ende der SEC, wenn der APTS-Überschuss der Labelingreaktion, abgetrennt von den APTS-konjugierten N-Glykanen, eluiert.	60
Abbildung 4-7: geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprints der drei Rollerflaschenaliquots von (A) H1N1-RKI und (B) H3N2 jeweils repliziert in MDCK-Zellen.....	61
Abbildung 4-8: Ausschnitt aus dem HA N-Glykanfingerprint des H1N1-RKI repliziert in MDCK-Zellen (Rollerflaschenaliquot 2); dominante Peaks sind durchnummeriert	62
Abbildung 4-9: Mittelwerte der (A) Peakflächen der dominanten Peaks im HA N-Glykanfingerprint des H1N1-RKI aufgetragen gegen die Peaknummer; (B) relative Peakhöhen der dominanten Peaks im HA N-Glykanfingerprint des H3N2 aufgetragen gegen die Peaknummer	63

Abbildung 4-10: geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprints der drei Proben aus den parallelen T175-Flaschen von (A) H1N1-RKI und (B) H3N2 jeweils repliziert in MDCK-Zellen	65
Abbildung 4-11: SDS-PAGE (Gelspuren von links nach rechts, wobei die erste und letzte Spur der Molekulargewichtsstandard (M) in kDa enthält) der M- (M H1N1), V- (V H1N1), C- (C H1N1), A- (A H1N1) und H- (H H1N1) Variante des human-Influenza-A-Virus H1N1-RKI; M- (M H3N2), V- (V H3N2) und R- (R H3N2) Variante des human-Influenza-A-Virus H3N2 und die M-Variante des human Influenza-Virus B/Mal (M B/Mal); die Rechtecke kennzeichnen die HA ₀ -Banden, die für die N-Glykananalyse ausgeschnitten wurden.	68
Abbildung 4-12: (A) geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprints der M-, V-, C-, A- und H-Variante des human-Influenza-A-Virus H1N1-RKI; t _{mig} ist angegeben in bp (normiert auf den internen Standard = norm. t _{mig}); (B) PA in den HA N-Glykanfingerprints der fünf Varianten in Abhängigkeit der Wirtszelllinie.	69
Abbildung 4-13: (A) geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprints der M-, V- und R-Variante des human Influenza-A-Virus H3N2; t _{mig} ist angegeben in bp (normiert auf den internen Standard = norm. t _{mig}); (B) PA in den HA N-Glykanfingerprints der drei Varianten in Abhängigkeit der Wirtszelllinie.	72
Abbildung 4-14: (A) geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprints der M-Varianten des human Influenza-A-Virus H1N1-RKI, H3N2 und B/Mal; t _{mig} ist angegeben in bp (normiert auf den internen Standard = norm. t _{mig}); (B) PA in den HA N-Glykanfingerprints der M-Varianten des human Influenza-A-Virus H1N1-RKI, H3N2 und B/Mal.....	74
Abbildung 4-15: geshifteter Overlay der Fingerprints sequentiell verdauter HA N-Glykane der M-Variante des human-Influenza-A-Virus H1N1-RKI; α-Galaktosidase = α-Gal, β-Galaktosidase = β-Gal, β-N-Acetylhexosaminidase = β-Hex, α-Mannosidase = α-Man.	77
Abbildung 4-16: geshifteter Overlay der Fingerprints sequentiell verdaute HA N-Glykane der V-Variante des human-Influenza-A-Virus H1N1-RKI; α-Galaktosidase = α-Gal, β-Galaktosidase = β-Gal, β-N-Acetylhexosaminidase = β-Hex, α-Mannosidase = α-Man.	79
Abbildung 4-17: geshifteter Overlay der Fingerprints sequentiell verdauter HA N-Glykane der C-Variante des human-Influenza-A-Virus H1N1-RKI; α-Galaktosidase = α-Gal, β-Galaktosidase = β-Gal, β-N-Acetylhexosaminidase = β-Hex, α-Mannosidase = α-Man.	80
Abbildung 4-18: geshifteter Overlay der Fingerprints sequentiell verdauter HA N-Glykane der R-Variante des human-Influenza-A-Virus H3N2 mit (A) α-Neuraminidase = NA, β-Galaktosidase = β-Gal; (B)) α-Neuraminidase = NA, β-Galaktosidase = β-Gal, β-N-Acetylhexosaminidase = β-Hex, α-Mannosidase = α-Man.	81

Abbildung 4-19: geshifteter Overlay der Fingerprints sequentiell verdauter HA N-Glykane der M-Variante des human-Influenza-Virus B/Mal mit (A) α -Neuraminidase = NA, β -Galaktosidase = β -Gal, β -N-Acetylhexosaminidase = β -Hex, α -Mannosidase = α -Man; (B) α -Galaktosidase = α -Gal, α -Mannosidase = α -Man.	83
Abbildung 4-20: Maximaler Virustiter der vier Passagen der Adaption von human Influenza-A-Virus H1N1-NIBSC (Saatvirus produziert in MDCK-Zellen) an die Vero-Zelllinie..	86
Abbildung 4-21: geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprints der M-Variante des human Influenza-A-Virus H1N1-NIBSC und der V-Variante in den Passagen 1 - 4; t_{mig} ist angegeben in bp (normiert auf den internen Standard = norm. t_{mig}).	87
Abbildung 4-22: Maximaler Virustiter der vier Passagen der Adaption von human-Influenza-A-Virus H3N2 (Saatvirus produziert in MDCK-Zellen) an die Vero-Zelllinie.....	88
Abbildung 4-23: geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprints der M-Variante des human-Influenza-A-Virus H3N2 und der V-Variante in den Passagen 2 - 4; t_{mig} ist angegeben in bp (normiert auf den internen Standard = norm. t_{mig}).	89
Abbildung 4-24: Maximaler Virustiter der vier Passagen der Adaption von human-Influenza-A-Virus H3N2 (Saatvirus produziert in MDCK-Zellen) an die RCAr-Zelllinie	90
Abbildung 4-25: geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprints der M-Variante des human-Influenza-A-Virus H3N2 und der R-Variante in den Passagen 3 und 4; t_{mig} ist angegeben in bp (normiert auf den internen Standard = norm. t_{mig}).	91
Abbildung 4-26: Maximaler Virustiter der vier Passagen der „Rückwärtsadaption“ von human-Influenza- A-Virus H1N1-NIBSC (Saatvirus produziert in Vero-Zellen, Passage 4) an die MDCK-Zelllinie	92
Abbildung 4-27: geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprints der M- und V-Variante des human-Influenza-Virus H1N1-NIBSC und der „rückwärts“ adaptierten M-Variante (Passage 4) ; t_{mig} ist angegeben in bp (normiert auf den internen Standard = norm. t_{mig}).	93
Abbildung 4-28: geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprint eines Rollerflaschenaliquots und einer Probe aus einer T175-Zellkulturflasche der M-Variante des (A) H1N1-RKI und (B) H3N2	95
Abbildung 4-29: geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprint der M-Variante des (A) H1N1-RKI und (B) H3N2 jeweils aus einer Probe aus einem 5 L-Bioreaktor und aus einer T175-Zellkulturflasche.....	97
Abbildung 4-30: geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprint der V-Variante des H1N1-NIBSC einer Probe aus einem 5 L-Bioreaktor und aus einer T175-Zellkulturflasche	99
Abbildung 4-31: geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprint der (A) M-Varianten des H1N1-RKI und (B) V-Varianten des H1N1-NIBSC jeweils kultiviert in serumhaltigem (GMEM) und serumfreiem (Episerf) Zellkulturmedium	101
Abbildung 4-32: relative Peakhöhen in % der Gesamtpeakhöhe aller detektierten Peaks in den HA N-Glykanfingerprint der V-Variante des H1N1-NIBSC produziert in GMEM (rot) und Episerf (schwarz) aufgetragen gegen die Peaknummer	102

Abbildung 4-33: (A) geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprint der H-Variante des H1N1-RKI kultiviert in serumhaltigem MEM- und RPMI-Zellkulturmedium; (B) relative Peakhöhen in % der Gesamtpeakhöhe aller detektierten Peaks in den HA N-Glykanfingerprints der H-Variante des H1N1-RKI produziert in MEM (schwarz) und RPMI (rot) aufgetragen gegen die Peaknummer.....	103
Abbildung 4-34: (A) geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprint der M-Variante des H1N1-NIBSC aus Proben der Perfusionskultur 1 und 2.....	105
Abbildung 4-34: (B) geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprint der M-Variante des H1N1-NIBSC der Probe aus Perfusionskultur 1 im Vergleich zu einer Probe aus einem 5 L-Bioreaktor	106
Abbildung 4-35: (A) geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprint der M-Variante des H1N1-NIBSC aus Proben der Perfusionskultur 1 und 3 (pO ₂ > 150 %; Sauerstoffsonde kalibriert gegen Luft)	107
Abbildung 4-35: (B) geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprint der M-Variante des H1N1-NIBSC aus Proben aus Perfusionskultur 2 (pO ₂ = 40 %) und 3 (pO ₂ > 150 %). 108	
Abbildung 4-36: Verlauf des Virustiters der ZR 1 und 2 von 0 hpi bis 192 hpi (Proben aus den Zellkulturflaschen bei 37°C)	111
Abbildung 4-37: geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprint der M-Variante des H3N2 aus T175-Zellkulturflaschen (37°C) im Verlauf des Zeitreihenversuches 1. Dargestellt sind die aus den Probennahmen 8 hpi, 12 hpi, 30 hpi, 72 hpi, 120 hpi und 192 hpi resultierenden HA N-Glykanfingerprints.....	112
Abbildung 4-38: geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprint der M-Variante des H3N2 aus T175-Zellkulturflaschen (4°C) im Verlauf des Zeitreihenversuches 1. Dargestellt sind die aus den Probennahmen 72 hpi, 120 hpi und 168 hpi resultierenden HA N-Glykanfingerprints.	112
Abbildung 4-39: (A) Gesamtglykanmenge (Summe der Peakhöhen der einzelnen Proben) im Verlauf der ZR 1 der Proben bei 37°C (▲) und 4°C (Δ); (B) Anteil an „kleinen“ (□, norm. t _{mig} < 172 bp) bzw. „großen“ (●, norm. t _{mig} ≥ 172 bp) HA N-Glykanen in den einzelnen Fingerprints in % der Gesamtglykanmenge im Verlauf der ZR 1 (Proben bei 37°C)	114
Abbildung 4-40: (A) Gesamtglykanmenge (▲, Summe der Peakhöhen der einzelnen Proben) zusammen aufgetragen mit dem Virustiter (■)	115
Abbildung 4-40: (B) Gesamtglykanmenge (▲, Summe der Peakhöhen der einzelnen Proben) zusammen aufgetragen mit der Virusmenge in Viruspartikel/mL (○) im Verlauf der ZR 1 der Proben bei 37°C	116
Abbildung 4-41: Verlauf des Virustiters der Zeitreihe im 5 L-Bioreaktor von 0 bis 192 hpi (37°C).....	118
Abbildung 4-42: geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprint der M-Variante des H3N2 aus dem 5 L-Bioreaktor (37°C) im Verlauf der Zeitreihe 5 L. Dargestellt sind die aus den	

Probennahmen 30 hpi, 48 hpi, 96 hpi, 144 hpi und 192 hpi resultierenden HA N-Glykanfingerprints.	118
Abbildung 4-43: geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprint der M-Variante des H3N2 aus Spinnerflaschen (4°C) im Verlauf der Zeitreihe 5 L. Dargestellt sind die aus den Probennahmen 72 hpi, 120 hpi und 192 hpi resultierenden HA N-Glykanfingerprints.	119
Abbildung 4-44: (A) Gesamtglykanmenge (Summe der Peakhöhen der einzelnen Proben) im Verlauf der Zeitreihe 5 L der Proben bei 37°C (▲) und 4°C (Δ); (B) Anteil an „kleinen“ (□, norm. $t_{mig} < 172$ bp) bzw. „großen“ (●, norm. $t_{mig} \geq 172$ bp) HA N-Glykanen in den einzelnen Fingerprints in % der Gesamtglykanmenge im Verlauf der Zeitreihe 5 L (Proben bei 37°C).....	120
Abbildung 4-45: (A) Gesamtglykanmenge (▲, Summe der Peakhöhen der einzelnen Proben) zusammen aufgetragen mit dem Virustiter (■)	121
Abbildung 4-45: (B) Gesamtglykanmenge (▲, Summe der Peakhöhen der einzelnen Proben) zusammen aufgetragen mit der Virusmenge in Viruspartikel/mL (○) im Verlauf der Zeitreihe 5 L der Proben bei 37°C	122
Abbildung 4-46: Gesamtglykanmenge (▲, Summe der Peakhöhen der einzelnen Proben) zusammen aufgetragen mit dem TCID ₅₀ (◇) im Verlauf der Zeitreihe 5 L der Proben bei 37°C.....	123
Abbildung 4-47: geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprints der M-Variante des H1N1-NIBSC aus einer aktiven 5 L-Bioreaktorkultur und einer inaktiven Probe der selben 5 L-Bioreaktorkultur	124

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2-1: Proteine eines Influenza-A-Virus und einige ihrer Funktionen (in Anlehnung an [107]).....	14
Tabelle 2-2: Zusammenfassung der Glykosylierungsfähigkeit verschiedener Zellexpressionssysteme [57]	21
Tabelle 2-3: Zusammenstellung einiger Methoden zu Glykananalytik [3].....	26
Tabelle 3-1: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Zellen, Ursprung, Zellkulturmedien und Zellkulturgefäße	36
Tabelle 3-2: Optimierte Parameter der stufenweisen <i>g</i> -Gradienten Zentrifugation.....	39
Tabelle 3-3: Parameter der ESI	43
Tabelle 3-4: Parameter der CGE-LIF Methode.....	47
Tabelle 3-5: Verdünnungsreihe APTS zur bestimmung des Detektionslimits derverwendeten CGE-LIF Methode	47
Tabelle 3-6: Pipettierschema für den SED eines N-Glykanpools mit den Exoglykosidasen $\alpha(2-3,6,8,9)$ Neuraminidase, β -Galaktosidase, β -N-Acetylhexosaminidase und $\alpha(1-2,3,6)$ -Mannosidase	49

Tabelle 4-1: Mittels LC-MS/MS identifizierte Proteine des pelletierten Influenza-A-Virus H1N1-RKI (repliziert in MDCK-Zellen)	54
Tabelle 4-2: N-Glykanstrukturen des IgG, die identifiziert wurden und mit den Literaturangaben von Raju <i>et al.</i> übereinstimmen [226].....	56
Tabelle 4-3: Vergleich der HA N-Glykanfingerprints der M-, V-, C-, A- und H-Variante des human-Influenza-A-Virus H1N1-RKI; t_{mig} ist angegeben in bp (normiert auf den internen Standard = norm. t_{mig}); die Kreuze geben an, dass ein Peak (der eine bestimmte N-Glykanstruktur repräsentiert) mit seiner spezifischen norm. t_{mig} im jeweiligen Fingerprint vorhanden ist. Kreuze in einer Reihe zeigen identische N-Glykanstrukturen in den Fingerprints der verschiedenen Varianten an.....	70
Tabelle 4-4: Vergleich der HA N-Glykanfingerprints der M-, V- and R-Variante des human Influenza-A-Virus H3N2; t_{mig} ist angegeben in bp (normiert auf den internen Standard = norm. t_{mig}); die Kreuze geben an, dass ein Peak (der eine bestimmte N-Glykanstruktur repräsentiert) mit seiner spezifischen norm. t_{mig} im jeweiligen Fingerprint vorhanden ist. Kreuze in einer Reihe zeigen identische N-Glykanstrukturen in den Fingerprints der verschiedenen Varianten an.....	73
Tabelle 4-5: Vergleich der HA N-Glykanfingerprints der M-Varianten des human-Influenza-A-Virus H1N1, H3N2 und B/Mal; t_{mig} ist angegeben in bp (normiert auf den internen Standard = norm. t_{mig}); die Kreuze geben an, dass ein Peak (der eine bestimmte N-Glykanstruktur repräsentiert) mit seiner spezifischen norm. t_{mig} im jeweiligen Fingerprint vorhanden ist. Kreuze in einer Reihe zeigen identische N-Glykanstrukturen in den Fingerprints der verschiedenen Varianten an.....	75
Tabelle 4-6: Zusammenfassung der Ergebnisse der Abschnitte 4.7.1 – 4.7.3; Einfluss der Wirtszelllinie auf die HA N-Glykosylierung und Vergleich verschiedener Virustypen und Subtypen.....	76
Tabelle 4-7: Zusammenfassung der Ergebnisse der Strukturaufklärung (SED) der HA N-Glykanpools verschiedener Varianten des human-Influenza-A-Virus H1N1-RKI, H3N2 und B/Mal.....	84
Tabelle I-1: Verwendete Chemikalien	CLXXXII
Tabelle I-2: Verwendete biologische Reagenzien.....	CLXXXIII
Tabelle I-3: Für Spike-Experimente verwendete N-Glykane.....	CLXXXIV
Tabelle I-4: Struktur ausgewählter N-Glykane, die für Spike-Experimente verwendet wurden	CLXXXIV
Tabelle I-5: Verwendete Geräte und Materialien.....	CXC

ABSTRACT

Mammalian cell culture processes are commonly used for production of recombinant glycoproteins, antibodies and viral vaccines. For several years there has been an increasing interest in cell culture-based influenza vaccine production to overcome limitations of egg-based production systems, to improve vaccine supply, and to increase flexibility in vaccine manufacturing. With the switch of the production system several key questions concerning the possible impact of host cell lines on antigen quality, passage dependent selection of certain viral phenotypes or changes in hemagglutinin (HA) conformation have to be addressed to guarantee safety and efficiency of vaccines. In contrast to the production of recombinant glycoproteins, comparatively less is known regarding glycosylation of HA derived from mammalian cells. To ensure consisting quality of the corresponding products glycosylation profiles have to be tightly controlled as glycosylation affects important properties of the corresponding proteins, including bioactivity and antigenicity. The present thesis describes the establishment of a method for analyzing N-glycosylation patterns of mammalian cell culture-derived influenza virus. It comprises virus purification directly from cell culture supernatant, protein isolation, deglycosylation, and clean-up steps as well as “fingerprint” analysis of N-glycan pools by capillary gel electrophoresis – laser induced fluorescence (CGE-LIF), using a capillary DNA-sequencer. Reproducibility studies of CGE-LIF, virus purification and sample preparation have been performed. For demonstrating its applicability, the method was used first for monitoring batch-to-batch reproducibility in vaccine production, with respect to the glycosylation pattern of the membrane protein hemagglutinin of two influenza A virus strains (A/PR/8/34 (H1N1) and A/Wisconsin/67/2005 HGR (H3N2)) produced in MDCK cells.

The established method was used for HA N-glycan analysis of three different influenza virus strains, which were replicated in six different cell lines. Obvious differences were already observed by N-glycan fingerprint comparison. Besides these fingerprintings of HA N-glycans structural data were obtained by on-line and off-line spiking experiments as well as by exoglycosidase digestion. Detailed results concerning the influence of the host cell line on complexity and composition of the HA N-glycosylation pattern showed strong host cell but also virus type and subtype dependence of HA N-glycosylation. The structural investigations of the N-glycan pools revealed that host cell dependence of HA N-glycosylation was mainly related to minor variations of the (monomeric) constitution of single N-glycans. To some extent, shifts in the N-glycan pool composition regarding the proportion of different N-glycan types were observed. In contrast to this, a principal switch of the N-glycan type attached to

HA was observed when comparing different virus types (A and B) and subtypes (H1N1 and H3N2).

Moreover, the N-glycan analysis method presented within this work was used to investigate the influence of cell culture conditions on the HA N-glycosylation pattern. Influence of cell culture system, medium, cell density and harvest point were considered. Impact on the HA N-glycosylation differed among the varied cell culture conditions. The adaptation of different virus strains to new host cell systems were assessed over several passages regarding the changes in the HA N-glycosylation pattern as well.

In summary, the method allows direct characterization of variations in protein glycosylation patterns, directly by N-glycan “fingerprint” alignment. It represents a sensitive and robust tool to investigate e.g. variations in the HA N-glycosylation pattern in dependence of cell culture conditions. The combination with spiking experiments and exoglycosidase digestion allowed detailed structural analysis of the obtained N-glycan pools.

1 EINLEITUNG

Glykosylierung als kovalente Proteinmodifikation ist die am häufigsten auftretende posttranslationale Modifikation von Proteinen in eukaryotischen Zellen und hinsichtlich der modifizierten Aminosäuren und Strukturen auch die vielfältigste [1]. Dabei wird angenommen, dass mehr als 50 % aller Proteine glykosyliert sind [2]. Glykoproteine treten in Zellen im Zytoplasma, subzellulären Organellen, in Zellmembranen sowie extrazellulären Flüssigkeiten auf [3].

Die Oligosaccharide sind mit dem Proteinrückgrat entweder über N- (via Asn) oder O- (via Ser/Thr) glykosidische Bindungen angeheftet, wobei die kovalente Anheftung über Asparagin die häufigere Modifikation repräsentiert [4, 5]. Dabei ist über die Rolle der O-Glykane weitaus weniger bekannt als über die der N-Glykane.

Die Kombination von verschiedenen Monosacchariden miteinander in unterschiedlicher Abfolge, Kettenlänge und Anomery, d. h. α oder β - Position der Bindung und Verzweigungspunkte sowie das Vorhandensein von Sulfat-, Phosphat-, Acetyl- und Methylgruppen resultiert in einer strukturellen Vielseitigkeit von einer großen Anzahl verschiedener Glykane mit einer relativ limitierten Anzahl an Monomeren [1]. Die biologische Vielfältigkeit wird dabei von der Spezies, Zellart, Zelltyp und durch die Struktur des Proteins bestimmt. Variationen in der Besetzung von Glykosylierungsstellen (Makroheterogenität) sowie der Zusammensetzung der N-Glykane an einer Glykosylierungsstelle (Mikroheterogenität) führen zur Existenz verschiedener Glykoformen eines Proteins. Diese besitzen unterschiedliche physikalische und biochemische Eigenschaften, was wiederum in einer extrem hohen funktionellen Vielfältigkeit resultiert [1, 6]. Die spezifischen Eigenschaften der Glykane sind meist physiologisch wichtig, aber nicht immer entscheidend für die Funktion des Proteins [7]. Der Einfluss der Glykane auf die beschriebenen Funktionen ist jedoch immer proteinspezifisch [8].

Warum die meisten Oberflächenproteine tierischer Zellen und einiger Viren Kohlenhydrate enthalten ist nicht genau bekannt. Es existiert jedoch eine Vielzahl von Arbeiten, die zeigen, dass die Glykosylierung eines Proteins oder zumindest die Bindung zu einem glykosylierten Protein notwendig ist für z. B. eine erfolgreiche Biosynthese, Faltung, Stabilität und intrazelluläre Migration [7, 9, 10]. Im Allgemeinen nehmen Glykane an einer Vielzahl von biologischen Prozessen teil. Molekulare Erkennung, inter- und intrazelluläre Signalübertragungen, embryonale Entwicklungen, Immunabwehr, Entzündungen, Zell-anheftung und Zellteilung, virale Replikation und parasitäre Infektion sind nur einige Beispiele.

Glykanketten können auch Proteinkonformationen verändern und damit die funktionelle Aktivität des Proteins und die Protein-Protein-Wechselwirkung beeinflussen [10-12]. Sie fungieren ebenfalls als spezifische Strukturen bei der Erkennung und Wechselwirkung mit einer Vielzahl von externen Liganden, zum Schutz vor proteolytischem Abbau sowie bei regulatorischen Prozessen [6, 7, 9, 10, 13-15].

Die Bedeutung der Glykosylierung für bestimmte physikalisch-chemische und biologische Eigenschaften von Proteinen sowie die Veränderung ihrer biologischen Aktivität in Abhängigkeit ihres Kohlenhydrateils wurde auch für virale Glykoproteine beschrieben [16]. Dabei wurden einige der ersten Studien hinsichtlich der biologischen und immunologischen Auswirkungen von Veränderungen von Glykosylierungsstellen für Influenzaproteine durchgeführt [17]. Das Verständnis der Glykosylierung von Viren repräsentierte eine neu auftretende Herausforderung in der Glykobiologie. Dabei spielt gerade die Natur und das Ausmaß der Glykosylierung von Oberflächenproteinen von RNA-Viren eine wichtige Rolle bei phenotypischen Veränderungen. Die Kombination der Plastizität des viralen Genoms und der Wirtszellglykosylierungsmaschinerie ruft eine Population von hochverschiedenen Viren hervor. Diese Vielseitigkeit ist wahrscheinlich verantwortlich für das Überleben dieser Viren in einer Vielzahl biologischer Nischen und für ihre Fähigkeit inhibitorische Effekte von neutralisierenden Antikörpern und antiviralen Agenzien zu überwinden [18].

Des Weiteren ist die Glykosylierung wichtig für die Stabilität der Glykoproteine in der Membran des Influenza-Virus [19, 20] und anderer Viren [21, 22]. D. h. die Veränderungen einer Glykosylierungsstelle können z. B. die Faltung [23] und Konformation [24] eines Proteins beeinflussen. Aber auch die von dem betroffenen Sequon (N-Glykosylierungsstelle) entfernten Teile des Proteins können indirekt beeinflusst werden und dadurch Konformationsänderungen erfahren. Zusammen kann dies die Maskierung bzw. Neutralisierung von Epitopen oder ihre schlechtere Zugänglichkeit bewirken [25].

Da die Glykosylierung so viele Eigenschaften von Proteinen beeinflusst, besteht ein großes Interesse an der Analyse des Glykosylierungsmusters von Proteinen und Antikörpern. Doch gerade die beschriebene Komplexität repräsentiert eine große Herausforderung an Separations- und Detektionstechniken dieser Kohlenhydrate. Aufgrund ihrer stärkeren strukturellen Vielseitigkeit beispielsweise im Vergleich zu Proteinen oder Nukleinsäuren ist die Glykananalytik meist so komplex wie die Glykane selbst [4]. Doch gerade im Bereich der Produktion von rekombinanten Proteinen und Antikörpern in tierischen Zellkulturen ist eine funktionierende Glykananalytik des Produkts erforderlich, da diese meist glykosyliert sind. Sie ist z. B. von entscheidender Relevanz für das therapeutische Profil monoklonaler

Antikörper [26]. Es konnte gezeigt werden, dass die Makro- und Mikroheterogenität der Glykosylierung die Eigenschaften wie Proteinlöslichkeit, strukturelle Stabilität, Resistenz gegenüber Proteasen sowie deren biologische als auch klinische Aktivität beeinflussen kann [27-29].

Routinemäßigen Einsatz finden zellkulturbasierte Prozesse bei der Produktion von Biopharmazeutika, da eukaryotische Zellen die geeignete Maschinerie für post-translationale Modifikationen besitzen [30]. Bereits 2003 gab es bis zu 30 lizenzierte biopharmazeutische Produkte wie z. B. rekombinante Proteine, monoklonale Antikörper und nukleinsäurebasierte Produkte aus tierischen Zellkulturprozessen [31]. Auch für die Influenza-Impfstoffproduktion gewinnen Zellkulturprozesse immer mehr an Bedeutung. Der jährliche Influenza-Impfstoff setzt sich aus zwei Influenza-A- und einem –B-Stamm zusammen. Influenza-A- und –B-Viren repräsentieren die Hauptursache für humane Influenzaepidemien [32], haben in der ganzen Welt bis zu 500.000 Tote pro Jahr zur Folge und bewirken einen wirtschaftlichen Verlust von ca. 167 Milliarden US\$ pro Jahr allein in den USA [33]. Um Limitierungen in der Versorgung mit Influenza-Impfstoff zu überwinden und die Flexibilität zu erhöhen, sind sowohl eibasierte als auch zellkulturbasierte Produktionsprozesse erforderlich. Bebrütete Hühnereier haben sich frühzeitig als nützliches Substrat zur Vermehrung von Influenzaviren erwiesen [34] und werden auch heute noch zur Produktion eines Großteils des verfügbaren Influenzaimpfstoffes eingesetzt. Dennoch erfordern ihre limitierte Verfügbarkeit, ihr Risiko von Allergiereaktionen gegen Proteine aus dem Ei und die Selektion von Sub-Populationen, die sich vom Wildtyp unterscheiden, alternative Wirtszellsysteme [35].

Heutzutage werden hauptsächlich drei kontinuierliche Zelllinien, Madin Darby Canine Kidney-Zellen (MDCK) [36-39], African green monkey Kidney-Zellen (Vero) [40-42] und humane embryonale Retinazellen (PER.C6-Zellen) [43] zur Influenza-Impfstoffproduktion verwendet. Um den Produktionsprozess und die Virusausbeute zu erhöhen, werden als Alternative zu den herkömmlich verwendeten Zelllinien sogenannte Designerzelllinien, z. B. die Enten-Zelllinie AGE1.CR [44] und eine embryonale Stammzelllinie aviären Ursprungs, entwickelt [45].

Allerdings erfordern neue Technologien auch immer die kritische Beurteilung der Risiken, die sie beinhalten. Besonders die detaillierte Charakterisierung der Kultivierungsbedingungen, Wirtszellwachstum, Virusreplikation und auch Antigenzusammensetzung ist erforderlich. Viele dieser Aspekte wurden bereits in verschiedenen Studien berücksichtigt [46-48]. Um eine noch bessere Kontrolle der Produktion von Pharmazeutika und Impfstoffen sowie ihrer Qualität zu gewährleisten, ermutigen Behörden wie die FDA die Entwicklung innovativer

Technologien und Assays [49, 50]. Dabei wird auch der Einsatz von anspruchsvollen Kohlenhydratanalyse-Techniken als Teil von Produkt- oder Prozessvalidierungen [51] gefordert. Im Gegensatz zur Produktion rekombinanter Glykoproteine oder Antikörper [29, 52-55] war die Analyse der Glykosylierung viraler Antigene während der Impfstoffproduktion bisher von geringem Interesse. Als eine Ursache dafür könnte die Komplexität gesehen werden, Analysen von Glykosylierungsmustern eines oder mehrerer viraler Antigene während des Upstream- (USP) und Downstream-Prozesses (DSP) zu ermöglichen. Zusätzlich ist es sehr schwierig, den möglichen Einfluss einer veränderten Glykosylierung auf die Wirksamkeit oder Sicherheit von Impfstoffen einzuschätzen. Trotzdem könnte auch hier die Glykananalytik als Methode dienen, um die Qualität des Produktes sicherzustellen und Einflüsse von Prozessänderungen oder -störungen besser einschätzen zu können. Berücksichtigt werden sollte hierbei, dass die N-Glykanbiosynthese die zelleigene Glykosylierungsmaschinerie mit einbezieht, aber nicht ausschließlich von ihr und der Proteinstruktur abhängt [55, 56]. Vielmehr beeinflusst auch die extrazelluläre Umgebung wie die Kultivierungsbedingungen das Glykosylierungsmuster eines Proteins. Solche Zellkulturparameter schließen Medium, Temperatur, pH-Wert, Begasung, die Versorgung mit Nährstoffen und die Akkumulation von Stoffwechselprodukten wie Ammonium und Laktat mit ein [29, 57].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit stand die Analyse der N-Glykosylierung des Influenza-Virus-Hämagglutinin (HA) im Vordergrund. In beiden Virustypen (Influenza A und B) enthält die Virusoberfläche zwei Membranglykoproteine, das HA und die Neuraminidase (NA) [58]. Dabei repräsentiert HA das Hauptoberflächenantigen und ist verantwortlich für das Anheften des Virus an die Silinsäurereste der Wirtszellrezeptoren sowie für die Membranfusion während des Infektionsprozesses [59].

Das HA-Monomer besitzt 3-9 N-Glykane [60], wobei die Anzahl und Art der angehefteten Oligosaccharide stark abhängig ist vom Virussubtyp [61-63] und vom Virusstamm [64, 65]. Die Abbildung 1-1 zeigt am Beispiel des Influenza-A-Virus (H1N1) von 1918 die Struktur des ungespaltenen HA-Monomers mit Glykanstrukturen.

Es wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass auch die Wirtszelle wesentlichen Einfluss auf die Glykosylierung des Influenza-Virus HA ausübt [59, 66-68]. Obwohl einige Studien zeigten, dass die HA N-Glykane regulatorische Funktionen im viralen Lebenszyklus übernehmen [65] und ihre Anzahl und Struktur an der Rezeptorbindungsstelle die Pathogenizität des Virus mitbestimmen [69, 70], konnte die Funktion dieser Kohlenhydrate am HA bislang nicht bis ins Detail geklärt werden. Bereits 1988 behaupteten Arbatsky *et al.*

[71], dass es wichtig ist, die Funktion, Struktur und Abhängigkeit der HA N-Glykane von Virusstamm und Wirtszelle sowie deren Auswirkungen auf die HA-Aktivität zu kennen, um wirksame Impfstoffe herstellen zu können.

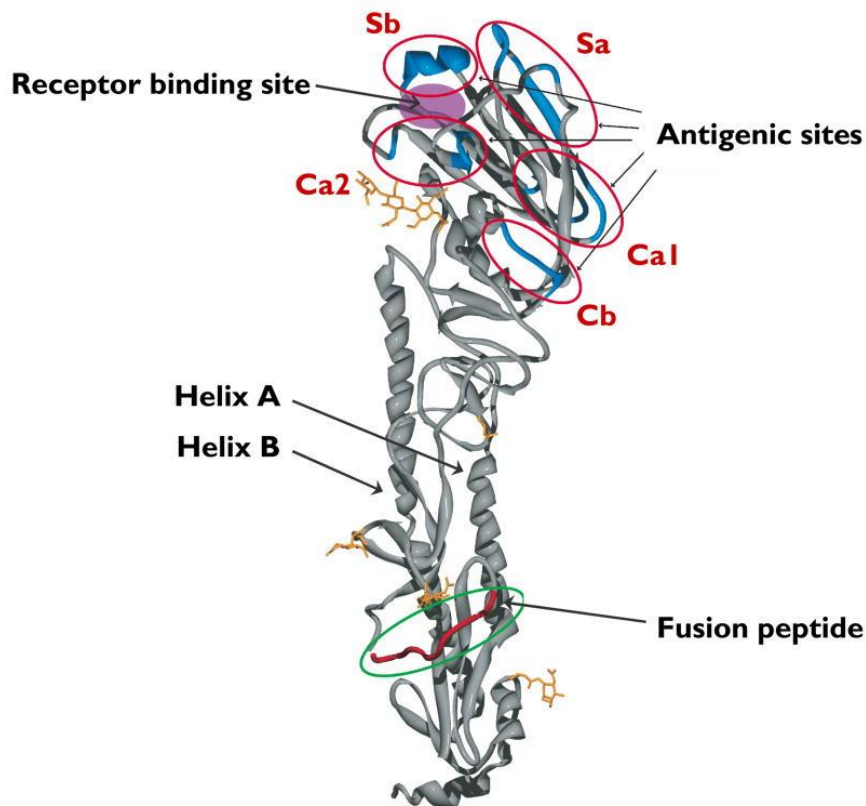


Abbildung 1-1: Ribbon-Darstellung des ungespaltenen HA-Monomers des Influenza-A-Virus (H1N1) von 1918 mit Glykanstrukturen [72]

Wie bereits von der Produktion von Glykoproteinen bekannt ist, repräsentiert die Wirtszelle den entscheidenden Faktor, um die gewünschte Glykosylierung des Produktes zu erreichen, die Wirtszelle mit ihrer spezifischen Glykosylierungsmaschinerie [55, 56]. Diese Wirtszell-abhängigkeit konnte auch für die Glykosylierung des Influenza-Virus HA gezeigt werden [67, 68, 73]. Außerdem wurden auch Unterschiede in der HA N-Glykosylierung verschiedener Virusstämme beobachtet [68, 74]. Diese Studien untersuchten jedoch hauptsächlich Unterschiede zwischen Viren hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Hühnererythrocyten zu agglutinieren nach ihrer Replikation in MDCK- und Vero-Zellen. Die Stammabhängigkeit der HA N-Glykosylierung wurde auch bereits 1978 von Nakamura und Compans gezeigt. Sie beobachteten einen höheren Anteil mannosereiche N-Glykane am HA von H3N2-Isolaten im Vergleich zu H1N1-Isolaten [74]. Sie fanden außerdem Anzeichen dafür, dass die Proteinsequenz des HA den N-Glykantyp mitbestimmt [19].

Jedoch wurden weder die frühen Arbeiten von Nakamura und Compans [19, 74] noch die neueren Studien von Romanova *et al.* [68]. in einer Art und Weise durchgeführt, die

detaillierte Informationen über das HA N-Glykosylierungsmuster selbst liefert.

In den letzten 30 Jahren wurden eine Vielzahl von Strategien und analytischen Methoden zur Analyse intakter Glykoproteine, Glykopeptide und N-Glykane etabliert. Diese beinhalten z. B. zweidimensionale Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (2D-HPLC) -Analysen [75, 76], Massenspektrometrie (MS) [77, 78], Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) [79] und Lektinaffinitätschromatographie [80]. Aufgrund ihrer, im Vergleich zu anderen Trenntechniken in flüssiger Phase, ausgezeichneten Trennleistung und Effizienz werden die Kapillarelektrophorese (CE) [81] und speziell die Kapillargelelektrophorese (CGE) zur Trennung komplexer Kohlenhydratgemische verwendet [82, 83]. Methoden zur automatisierten Darstellung von Kohlenhydratprofilen sind in der Literatur für bioindustrielle Anwendungen unter Verwendung von Instrumenten mit einer Kapillare oder einem 96-Kapillararray beschrieben [84-86].

Um Unterschiede im Glykosylierungsmuster zu analysieren und Informationen über die Struktur der Glykane zu erhalten, werden die genannten Techniken häufig zur Trennung von enzymatisch oder chemisch freigesetzten N-Glykanen verwendet. Diese Freisetzung wird gewöhnlich mit Hilfe von sequentiellen Exoglykosidasebehandlungen realisiert, die von Edge *et al.* beschrieben wurden [87]. Die daraus resultierenden degradierten Glykanstrukturen werden heutzutage entweder mit MS oder NMR [3] analysiert, was in der Regel eine sehr arbeits- und zeitaufwändige Probenvorbereitung und Dateninterpretation erfordert. In vielen Fällen ist allerdings eine N-Glykananalytik erforderlich, die den schnellen Nachweis von Veränderungen in einem Glykosylierungsmuster ohne komplexe Datenauswertung ermöglicht. Eine einfache Methode, die es erlaubt den N-Glykanpool eines Glykoproteins ohne weitere Strukturaufklärung zu visualisieren wäre zum Teil ausreichend und vermeidet damit den Einsatz von teuren und komplexen Geräten wie MS/MS- und NMR-Geräten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst eine Methode entwickelt, die die Darstellung des Glykosylierungsmusters eines beliebigen Glykoproteins erlaubt. Sie beinhaltet Schritte zur Proteinaufreinigung und -trennung sowie Deglykosylierungs- und Aufreinigungsschritte. Die erhaltenen N-Glykanpools werden mit Hilfe der CGE getrennt und mittels Laserinduzierter Fluoreszenzdetektion (LIF) detektiert. Diese Methode ist empfindlich und reproduzierbar genug, um potentielle Veränderungen in einem Glykosylierungsmuster aufzuzeigen. Die Entwicklung der Methode und Untersuchungen zu ihrer Robustheit wurde für das N-Glykosylierungsmuster des Influenza-Virus HA (human Influenza A/PR/8/34 (H1N1) und A/Wisconsin/67/2005 HGR (H3N2)) aus MDCK-Zellen durchgeführt [36, 88, 89]. Damit konnte ein schnelles Verfahren, aus einer Kombination einzelner Methoden, zur Darstellung

von Influenza-Virus HA N-Glykanprofilen aus komplexem Zellkulturüberstand etabliert werden. Nach abgeschlossener Probenvorbereitung wurden HA N-Glykanfingerprints unter Verwendung eines DNA-Sequenzierers generiert in Anlehnung an eine von Callewaert *et al.* publizierte Methode [82, 90, 91]. Die entwickelte Methode erlaubt relativ einfache, robuste und außerdem hochsensitive und reproduzierbare N-Glykananalysen mit hoher Trennleistung [92].

Des Weiteren werden detaillierte Informationen zur Wirtszellabhängigkeit des HA N-Glykosylierungsmusters zweier verschiedener human Influenza-A-Virusstämme (A/PR/8/34 (H1N1) und A/Wisconsin/67/2005 HGR (H3N2)) präsentiert. Die Virusreplikation erfolgte dazu in drei tierischen Zelllinien (MDCK, Vero und AGE1.CR) und zwei humanen Krebszelllinien (A549, HepG2). Zusätzlich wurde eine lektinresistente mutierte MDCK Zelllinie (RCAr) [93] zur Replikation des Influenza-Virus A/Wisconsin/67/2005 HGR (H3N2) verwendet. Neben den Influenza-A-Viren wurden auch ein Influenza-B-Virus (B/Malaysia/2506/2004) in MDCK-Zellen produziert. Die verwendeten Zelllinien wurden unter vergleichbaren Bedingungen zunächst in T175-Zellkulturflaschen kultiviert und infiziert. Die unterschiedlichen Virusvarianten wurden anschließend auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede hinsichtlich der N-Glykantypen und -strukturen, der Anzahl an verschiedenen N-Glykanen und des allgemeinen N-Glykosylierungsmusters (Fingerprint) des jeweiligen HA untersucht. Um detailliertere Strukturinformationen zu erhalten, wurden die HA N-Glykanpools sequentiell mit Exoglykosidasen verdaut.

Weiterhin wurden verschiedene Einflussfaktoren auf die HA N-Glykosylierung untersucht. In der Literatur wird beispielsweise für Influenza-A-Virus H1N1- (A/PR/8/34) und H3N2- (A/Wisconsin/67/2005) Stämme diskutiert, dass durch Adaption über mindestens drei Passagen an Vero-Zellen eine Ausbeuteerhöhung möglich ist [94, 95]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Verlauf einer solchen Adaption verschiedener Virusstämme (A/PR/8/34 und A/Wisconsin/67/2005 HGR) an Vero- und RCar-Zellen hinsichtlich des HA N-Glykosylierungsmusters verfolgt. Zusätzlich wurde die „Rückwärtsadaption“ an MDCK-Zellen analysiert.

Als Kultivierungsbedingungen wurden neben dem Zellkultursystem selbst auch der Einfluss des Zellkulturmediums, der Zelldichte und des Sauerstoffgehalt des Medium auf die Influenza-Virus HA N-Glykosylierung untersucht. Zusätzlich wurde im Rahmen von mehreren Zeitreihenversuchen in T175-Zellkulturflaschen und einem 5 L-Bioreaktor geprüft, inwiefern der Erntezeitpunkt die HA N-Glykosylierung beeinflusst. Abschließend wurde der Effekt der Inaktivierung des Virus mit β -Propiolacton betrachtet.

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

In den folgenden Abschnitten werden die für das Verständnis dieser Arbeit erforderlichen theoretischen Grundlagen in Bezug auf die Glykosylierung von Proteinen, dem Influenza-Virus und dessen Oberflächenprotein HA sowie der Glykananalytik und der CE beschrieben.

2.1 Glykosylierung

Unter den verschiedenen kovalenten Proteinmodifikationen tritt keine so häufig auf wie die Glykosylierung [1]. Als Glykosylierung bezeichnet man dabei die intrazelluläre Anheftung von Oligosacchariden an das Peptidrückgrat von Proteinen. Diese Anheftung kann auf drei unterschiedlichen Wegen erfolgen [96]. Diese sind:

1. N-glykosidische Bindung an eine Seitengruppe des Asparagins, wobei dieses Teil der Aminosäureabfolge Asn-X-Ser/Thr ist. X ist dabei jede beliebige Aminosäure außer Prolin. Ein Sequon wird auch nicht glykosyliert, wenn auf sie Prolin folgt [97].
2. O-glykosidische Bindung an eine Seitengruppe des Serins, Threonins, Hydroxylysins oder Hydroxyprolins.
3. als Teil eines Glykosylphosphatidylinositol (GPI) -Membranankers. Die Oligosaccharide sind hierbei über Ethanolaminphosphat an die C-terminale Aminosäure von Proteinen gebunden [1].

Die auch als Glykane bezeichneten Oligosaccharide bestehen in der Regel aus Monomerbausteinen, die der allgemeinen Summenformel $C_nH_{2n}O_n$ folgen. Jedes dieser Monomere existiert in einer Vielzahl von Isomeren und enthält $n-1$ Hydroxylgruppen sowie eine Aldehyd- oder Ketogruppe. Zusätzliche Vielfalt ergibt sich aus der Modifikation dieser funktionellen Gruppen durch Oxidation, Reduktion, Methylierung oder Ersetzen durch beispielsweise ein Amin. Durch Ringbildung der linearen Formen entsteht ein weiteres anomeres Zentrum und es bilden sich Ringe verschiedener Größe. Diese Ringe können wiederum in zwei verschiedenen Konformationen (Sessel oder Boot) vorliegen. In Abbildung 2-1 ist jeweils ein Isomer verschiedener Monomere dargestellt [98].

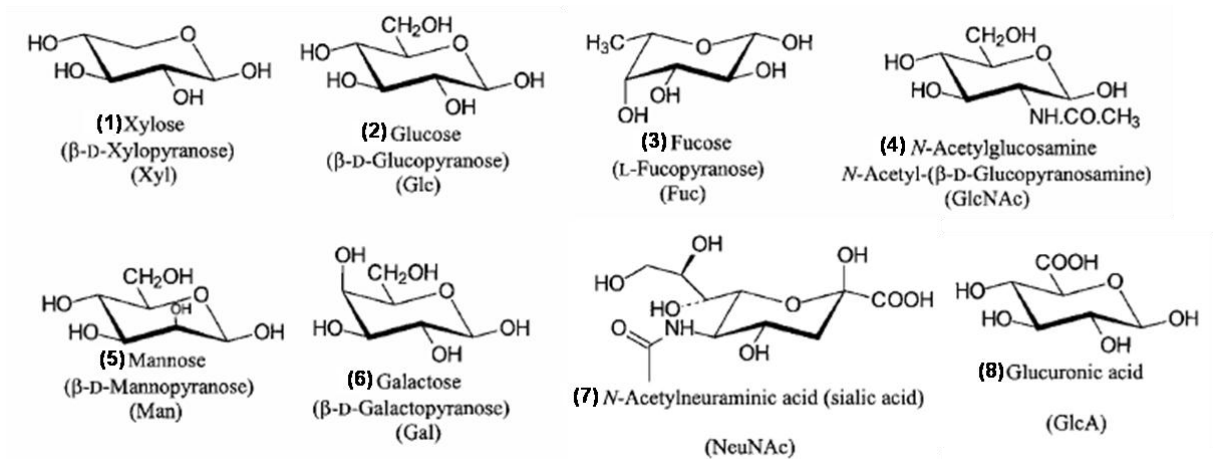


Abbildung 2-1: verschiedene Monomerbausteine von Glykanen (modifiziert nach [98])

Jede potentielle Glykosylierungsstelle in einem Glykoprotein kann (auch teilweise), muss aber nicht, besetzt sein. Dieses Phänomen wird als Makroheterogenität bezeichnet. Ist eine potentielle Glykosylierungsstelle besetzt, so kann an diese eine Vielzahl verschiedener Glykane gebunden sein (Mikroheterogenität). Die durch beide Heterogenitäten bedingten verschieden glykosylierten Formen eines Proteins werden als Glykoformen bezeichnet.

Die N-Glykosylierung repräsentiert die am häufigsten auftretende Form dieser post-translationalen Modifikation von Proteinen eukaryotischer Zellen [4]. Alle N-Glykane enthalten einen Trimannosyl-Chitobiose-Kern (TCK), von dem zwei oder mehr Antennen ausgehen. Die Synthese Asparagin-verknüpfter Glykane wird im Abschnitt 2.1.1 beschrieben. Prinzipiell werden drei Arten von N-Glykanen unterschieden. Sind die Antennen ausschließlich aus Mannosen ((5) in Abb. 2-1) aufgebaut, so bezeichnet man diese N-Glykane als mannosereiche Glykane. N-Glykane des komplexen Typs bestehen aus dem TCK und zwei oder mehr Seitenketten, mit jeweils mindestens einem N-Acetylglucosamin-, einem Galaktose- und eventuell einem terminalem Sialinsäure-Monomer. Die Seitenketten können bi-, tri- oder tetraantennär verzweigt sein. Glykane des Hybrid-Typs bestehen aus einer Seitenkette mit komplexer Struktur und einer oder mehreren Seitenketten des mannosereichen Typs. Ein GlcNAc-Monomer, welches an die β-Mannose des TCK gebunden ist, wird als „bisecting“ GlcNAc bezeichnet [98]. In Abbildung 2-2 ist schematisch die Struktur eines typischen komplexen N-Glykans dargestellt.

des GPI-Ankers, an diese Grundstruktur gebunden sein [100]. In Abbildung 2-4 ist beispielhaft ein GPI-Anker aus *Leishmania major* dargestellt.

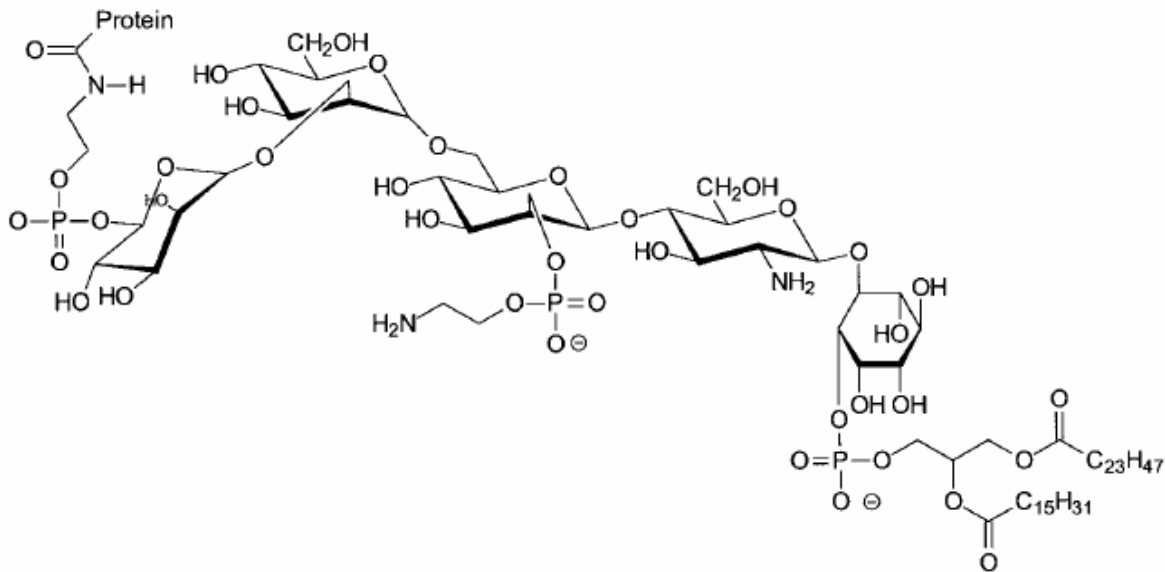


Abbildung 2-4: GPI-Anker aus *Leishmania major* [100]

2.1.1 Synthese Asparagin-verknüpfter Glykane

Wie im Abschnitt 2.1 beschrieben, sind N-Glykane strukturell sehr komplex. Nachdem sie im endoplasmatischen Retikulum (ER) an das entstehende Polypeptid gebunden werden, weisen sie allerdings anfänglich nicht diese Heterogenität auf. Ihr Aufbau ist zunächst homogen und sehr einfach (Abb. 2-5) und beginnt auf der zytosolischen Seite des ER. Monosaccharide werden nacheinander an ein membrangebundenes Dolichylphosphat-Vorläufermolekül gebunden.

Nachdem zwei N-Acetylglukosamine (GlcNAc) und fünf Mannosen enzymatisch angeheftet wurden, erfolgt der Übergang vom Zytosol in das Lumen des ER. Hier erfolgt die Anheftung von sieben weiteren Monomeren (4x Mannose, 3x Glukose). Eine Oligosaccharyltransferase im Lumen ist anschließend verantwortlich für den Transfer dieser aufgebauten Struktur an eine entstehende Polypeptidkette. Dabei erkennt das Enzym die Aminosäureabfolge Asn-X-Ser/Thr und die Anheftung erfolgt durch die Ausbildung einer N-glykosidischen Bindung zu einer Asparaginseitenkette [101]. Durch Variabilität in der Effizienz der Erkennung dieser speziellen Aminosäureabfolge (durchschnittlich 90% werden erkannt und glykosyliert) ergeben sich heterogen glykosylierte Polypeptide [56, 97]. Daraus ergibt sich die Makroheterogenität der Glykoproteine.

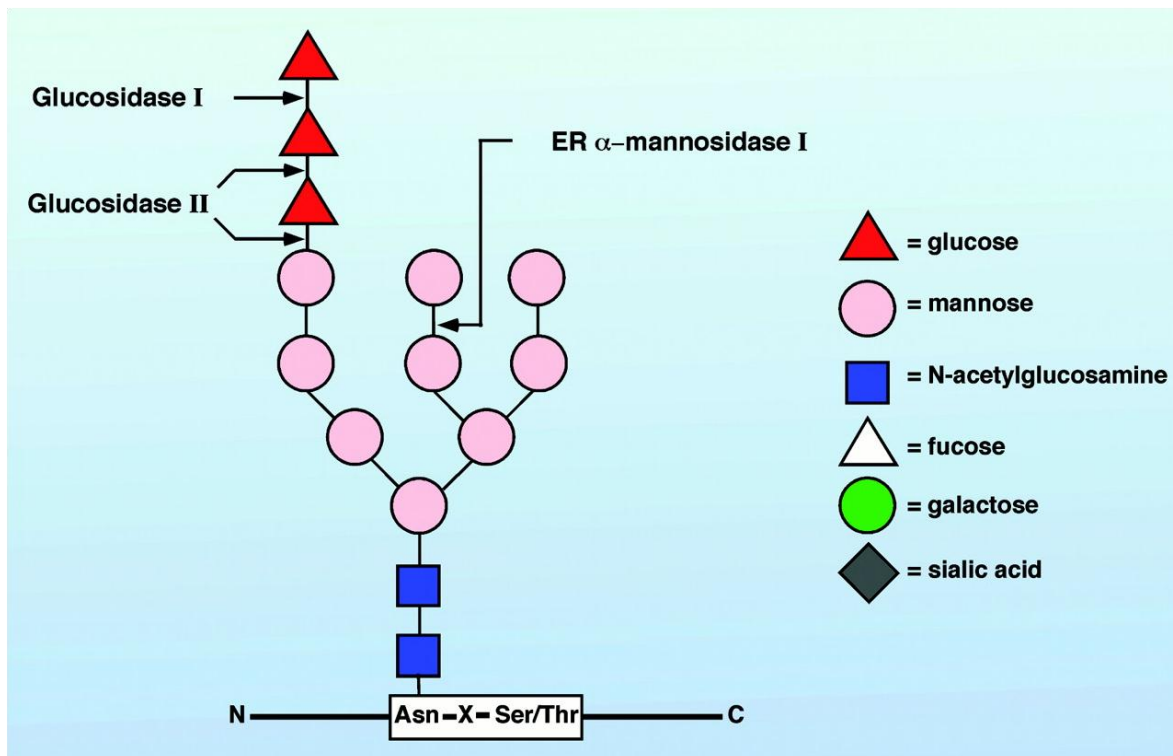


Abbildung 2-5: Kernstruktur der N-Glykane wie sie ursprünglich im ER über eine N-glykosidische Bindung an das Proteinrückgrat geheftet werden. Durch Glukosidasen werden die Glukose- und Mannoseresiduen im ER abgespalten. Die Symbole der einzelnen Zucker (rechts) werden auch in Abbildung 2-6 verwendet. [56]

Die Glukosidasen I und II sowie verschiedene Mannosidasen des ER verdauen zunächst die drei Glukose- und ein Mannosebaustein ab [5]. Durch Glukosyltransferasen kann eine Reglukosylierung und die anschließende Deglukosylierung durch Glukosidase II erfolgen. Dieser Deglukosylierung-Reglukosylierungs-Zyklus steht in engem Zusammenhang mit dem Calnexin-Calretikulin-Zyklus, der die korrekte Faltung des zu bildenden Proteins gewährleistet [10, 56, 102]. Nach korrekter Faltung erfolgt der Übergang in den Golgi-Apparat, wo die Glykanstruktur weiter prozessiert wird. Zunächst werden weitere Mannosen abverdaut, gefolgt von der Anheftung eines GlcNAc und der Abspaltung von zwei weiteren Mannosen. Vom ursprünglichen, aus vierzehn Monomeren bestehenden Glykan, bleiben nur fünf Monomere erhalten. Diese repräsentieren den TCK. Während der anschließenden terminalen Glykosylierung werden Monomere wie GlcNAc, Galaktose, Sialinsäure und Fucose an den TCK angeheftet. Dabei kann sowohl die Anzahl der gebildeten Antennen als auch die Monomerzusammensetzung variieren, woraus die Mikroheterogenität von Glykoproteinen resultiert. Die noch im ER homogenen Glykoformen sind nach durchlaufener Prozessierung im Golgi höchst heterogen und speziesspezifisch [56]. In Abbildung 2-6 ist die Synthese von Asparagin gebundenen Glykanen schematisch dargestellt, wobei der Teil der terminalen Glykosylierung nur eine Möglichkeit repräsentiert.

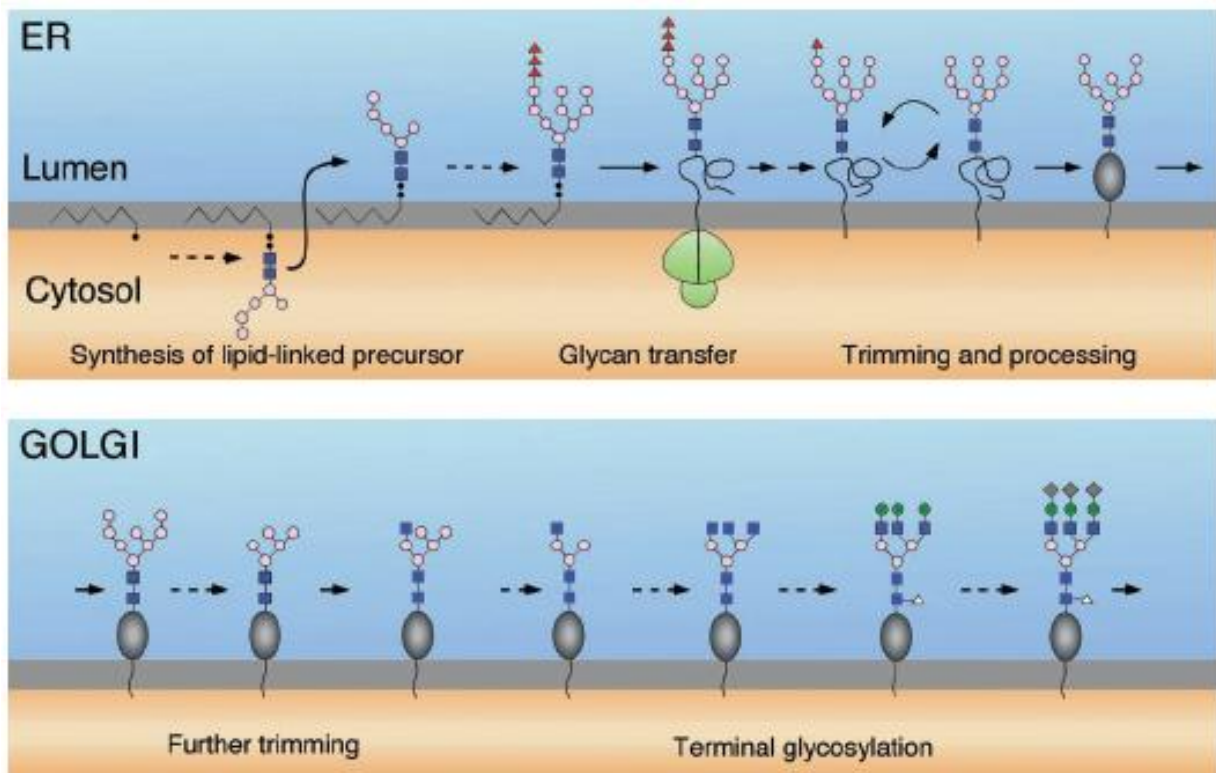


Abbildung 2-6: Schematische Darstellung der Synthese von Asparagin gebundenen Glykanen. Die verwendeten Symbole der einzelnen Monomere der N-Glykane sind in Abbildung 2-5 definiert. [56]

2.2 Influenza-Virus

Influenza ist eine hoch ansteckende Infektionskrankheit der Atemwege. Sie tritt beim Menschen jährlich millionenfach in allen Altersklassen auf, wobei ein Individuum wiederholt infiziert werden kann [103, 104]. Influenza gehört zur Familie der Orthomyxoviridae. Diese zeichnen sich durch ein segmentiertes Genom aus einzelsträngiger RNA mit negativer Polarität aus. Aufgrund genetischer, d. h. einer unterschiedlichen Anzahl von Segmenten, und antigener Unterschiede, sowie verschiedener serologischer Charakteristika der entsprechenden Nukleo- und Matrix-Proteinen, erfolgt die Einteilung in die Influenza-Typen A, B und C [103, 105]. Typ-A-Viren repräsentieren dabei aus klinischer Sicht die bedeutendsten Pathogene, verantwortlich für Epidemien und Pandemien bei Menschen. Des Weiteren tritt dieser Typ auch bei domestizierten Tieren (z. B. Schweine, Pferde) und Vögeln auf [103]. Im Gegensatz dazu zirkulieren die Typen B und C nahezu ausschließlich in Menschen, wobei der Typ B auch aus Robben und der Typ C aus Schweinen isoliert werden konnte [105, 106].

In allen drei Virustypen kodiert das Genom für die viralen Proteine (Typ A und B: 8 Segmente, 11 Proteine; Typ C: 7 Segmente, 9 Proteine) [107], an dessen Segmente ein

Polymerasekomplex aus drei Proteinen (PB1, PB2, PA) gebunden ist. Die mit den Nukleoproteinen (NP) und dem Polymeraseproteinen komplexierte RNA wird als viraler Ribonukleoproteinkomplex (vRNP) bezeichnet [108].

Die segmentierte Genomstruktur von Influenza-Viren ermöglicht den sogenannten *Antigen shift*. In einer mit unterschiedlichen Stämmen (mindestens 2) infizierten Zelle, kann der Austausch von genetischen Informationen (Segmenten) zwischen den verschiedenen Viren erfolgen. Dies bewirkt eine Reassortierung der Segmente des Genoms und kann in einem neuen Subtyp mit neuen Antigenen resultieren. Im Gegensatz dazu bewirkt der *Antigen drift* nur geringfügige Änderungen durch zufällige Punktmutationen in den Antigenen von Viren während ihrer Vermehrung [72].

Weitere Bestandteile des Influenza-Virus sind die Lipidhülle, mit Ursprung in der Wirtszellmembran, und weitere strukturelle Virusproteine. Beispielhaft sind die elf Proteine eines Influenza-A-Virus und einige ihrer Funktionen sind in Tabelle 2-1 aufgeführt.

Tabelle 2-1: Proteine eines Influenza-A-Virus und einige ihrer Funktionen (in Anlehnung an [107])

<i>Segment</i>	<i>Protein</i>	<i>Bezeichnung; Funktion(en)</i>
1	PB2	Untereinheit der viralen RNA Polymerase; „cap-binding“
2	PB1	katalytische Untereinheit der viralen RNA Polymerase
3	PA	Untereinheit der RNA Polymerase
4	HA	Hämagglutinin Oberflächenprotein Rezeptorbindung, Membranfusion
5	NP	Nukleoprotein; Enkapsidierung der viralen genomischen und anti-genomischen RNA
	NA	Neuraminidase
7	M1	Matrixprotein
	M2	Ionenkanalaktivität, Schutz der HA Konformation
8	NS1	post-transkriptionaler Regulator; Inhibierung des pre-mRNA Splicing, Polyadenylierung, PKR Aktivität
	NS2/NEP	Kernexportfaktor

Eine zusätzliche Einteilung in verschiedene Subtypen eines Influenza-A-Virustyps erfolgt nach serologischen Unterschieden der Oberflächenspikeproteine HA und NA. Bisher sind fünfzehn HA- und neun NA-Subtypen bekannt. Von jedem dieser Subtypen existieren dabei verschiedene Virusstämme, die u. a. entsprechend dem Ort ihrer erstmaligen Isolierung und dem Isolierungsjahr benannt werden [107].

Das HA repräsentiert das am häufigsten vorkommende Antigen auf der Virusoberfläche. Es beinhaltet die primären neutralisierenden Epitope für Antikörper [104] und vermittelt den Viruseintritt in die Wirtszelle durch rezeptorvermittelte Endozytose. Dabei erfolgt die Anheftung des HA an Sialinsäure-Residuen von Glykoproteinen oder Glykolipiden auf der Wirtszelloberfläche [109] als erster Schritt der Infektion (Schritt 1 in Abb. 2-7). Anschließend leitet HA die Fusion der Virushülle mit der endosomalen Membran der Zelle ein [58, 110]. Für die Fusionsaktivität des HA ist dabei ein zweiphasiger Aktivierungsprozess nötig. Zuerst erfolgt seine Spaltung durch Wirtszellproteasen in ein amino-terminales Fragment HA₁ und ein carboxyl-terminales Fragment HA₂ [111, 112] (Abb. 2-8). In der sauren Umgebung des Endosoms kommt es danach zu einer irreversiblen Konformationsänderung und zur Fusion von Virus- und Wirtszellmembran. Durch den niedrigen pH-Wert wird außerdem der Ionenkanal M2 des Virus aktiviert. Dieser ermöglicht es dem Virus, Protonen aufzunehmen, wodurch der pH-Wert in dessen Innerem weiter sinkt. Dies führt zu der Dissoziation von M1 vom RNP. Dieser Schritt ist essentiell für das uncoating des Virus (Schritt 2 in Abb. 2-7) und wird gefolgt vom Übergang des viralen Genoms in das Zytoplasma und dessen Transport in den Nukleus [107, 110, 113] (Schritt 3 in Abb. 2-7). Dort findet die Replikation und Transkription der viralen RNA-Segmente statt (Schritt 4 in Abb. 2-7). Die viralen Transkripte werden in das Zytoplasma exportiert und virale Proteine synthetisiert (Schritt 5 in Abb. 2-7). Das Matrixprotein 1 (M1) als Molekülaggregate an die Wirtszellmembran angelagert und HA, NA und Matrixprotein 2 (M2) werden in die Plasmamembran integriert (Schritt 6 in Abb. 2-7). Am Ende des Infektionszyklus verlassen die neu gebildeten viralen Ribonukleoprotein-komplexe (vRNP) den Zellkern und werden umhüllt von einer zellulären Bilipidschicht, die HA, NA und M2 enthält. Damit kommt es zur Knospung neuer Viruspartikel an der Zelloberfläche und deren zweiphasige Freisetzung [103, 107]. Zuerst dissoziiert HA von den Sialoglykanen, die anschließend von durch virale NA gespalten werden [110] (Schritt 7 und 8 in Abb. 2-7). Der Replikationszyklus ist, in Abhängigkeit vom Virusstamm und Zelltyp, in 6 - 16 h abgeschlossen [103]. Der Replikationszyklus des Influenza-Virus ist in Abbildung 2-7 schematisch dargestellt.

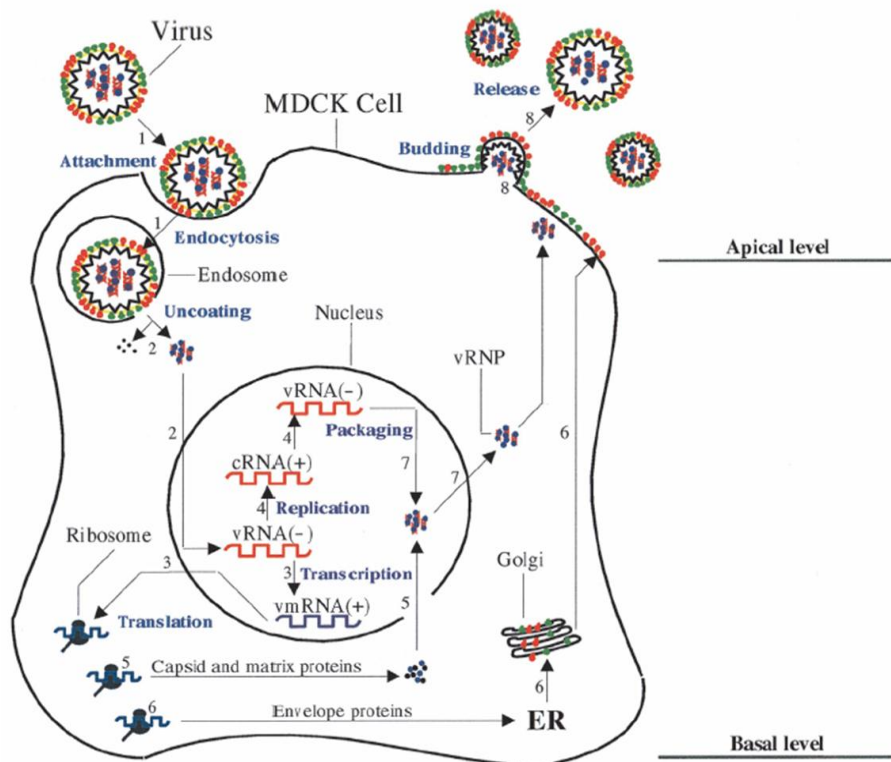


Abbildung 2-7: Schematische Darstellung des Replikationszyklus des Influenza-Virus. Die einzelnen Schritte des Zyklus (1-8) sind durchnummeriert. [114]

2.3 Influenza-Virus-Hämagglutinin

Das Transmembrannglykoprotein (Klasse 1^a) HA repräsentiert das Hauptoberflächenantigen des Influenzavirus und damit die entscheidende virale Zielstruktur für die Erkennung durch das Immunsystem des jeweiligen Wirtes [58, 115]. Die immunologischen Eigenschaften des HA werden dabei hauptsächlich durch die Struktur der Polypeptidkette bestimmt. Änderungen in der primären Aminosäuresequenz resultieren in Veränderungen des antigenen Status des Proteins, d. h. das Auftauchen neuer Virusstämme [116]. Aufgrund des Einflusses auf die Rezeptorbindung, die Fusionsaktivität und der antigenen Eigenschaften des Virus, bestimmt das HA sowohl den Zelltropismus als auch die Verbreitung und die Pathogenität des Virus mit [107].

Das HA existiert als Homotrimer aus nicht kovalent verbundenen Monomeren [58, 117]. Diese Trimere infektiöser Viren haben eine Länge von 135 Å mit variablem Radius von 15-40 Å [118].

^a Transmembranproteine der Klasse 1 sind *single pass* Membranproteine. D. h. sie durchqueren die Membran nur einmal.

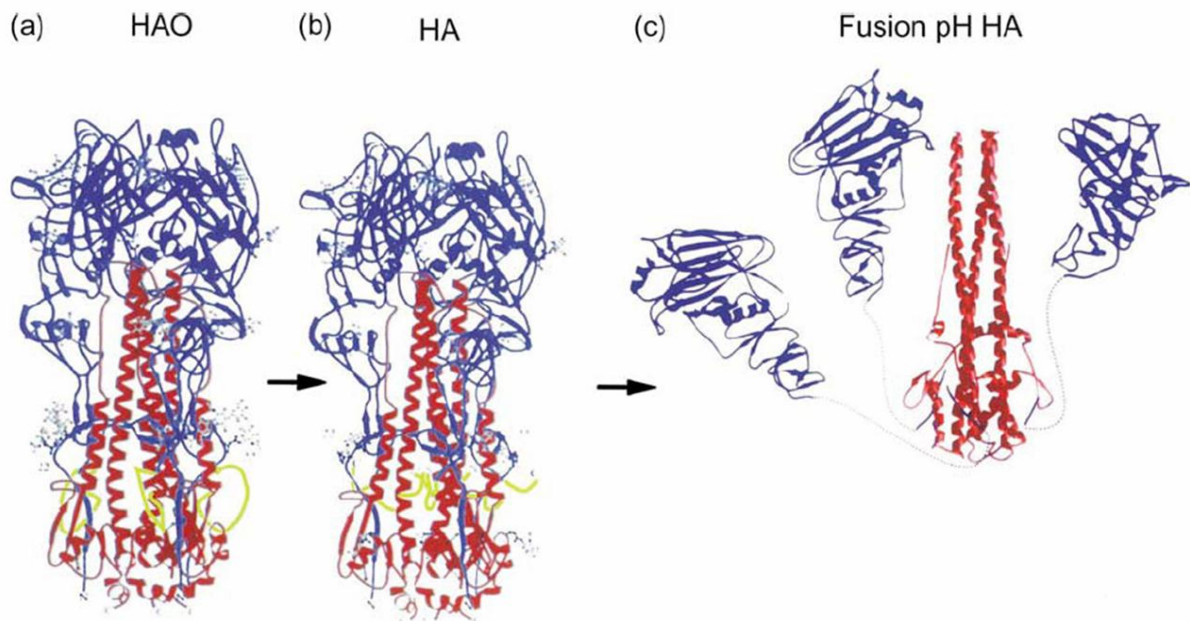


Abbildung 2-8: Die drei Konformationen des HA (a) ungespaltenes HA₀; (b) HA bei neutralem pH-Wert; (c) gespaltenes HA bei Fusions pH-Wert (pH 5-6); HA₁ Residuen (blau), HA₂ Residuen (rot) [118]

Die Monomere des HA sind aus den Untereinheiten HA₁ und HA₂ aufgebaut, verbunden durch kovalente Disulfidbindungen [117]. Dabei besteht die globuläre Kopfregion des HA aus dem Hauptteil der HA₁-Untereinheit. Die Stammregion, überwiegend vom HA₂ gebildet, verankert das HA in der Lipidschicht der Virushülle [110, 115, 119]. Die drei Konformationen des HA sind in Abbildung 2-8 schematisch dargestellt.

2.3.1 Glykosylierung des Influenza-Virus-Hämagglutinins

Das Molekulargewicht des HA wird zu etwa 25% durch Kohlenhydrate bestimmt [117]. Diese sind ausschließlich über N-glykosidische Bindungen an das HA geknüpft [120]. Sowohl die Kopf- als auch die Stammregion des HA sind N-glykosyliert [121], wobei typischerweise drei bis neun N-Glykane an das intakte Proteinrückgrat gebunden sind [60]. Generell sind sowohl die Anzahl als auch der Glykantyp stark abhängig vom Virussubtyp [61-63] und auch vom Virusstamm [64, 65].

Da die Replikation des viralen Genoms ohne Kontrollfunktion (fehleranfällige RNA Polymerase) erfolgt, treten Mutationen in allen viralen Genen sehr häufig auf [122]. Dabei ist es sehr wahrscheinlich, dass Glykosylierungsstellen entfernt bzw. zusätzliche eingefügt werden. Dadurch enthalten Viruspopulationen Mutanten, die sich von der Mehrheit in Anzahl und Positionen von HA N-Glykanen unterscheiden [122]. Aktuell isolierte H1- und H3-Stämme besitzen sieben bis neun N-Glykosylierungsstellen pro HA₀, wobei beispielsweise für

den Subtyp A/H3N2 seit seinem Auftauchen 1968 ein Anstieg in der Anzahl der Glykosylierungsstellen an der Kopfregion zu verzeichnen ist [60].

Trotz Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz von HA₁ und HA₂ bestehen starke Unterschiede im Glykangehalt der Untereinheiten des HA [71]. Diesbezüglich ist außerdem bekannt, dass N-Glykane der Stammregion hoch konserviert sind, während sie an der Spitze des HA (Kopfregion) beträchtlich in Struktur, Position und Anzahl unter verschiedenen Influenza Viren variieren [65]. Das bedeutet beispielsweise, dass die Sequenz und damit auch die Anzahl der Glykosylierungsstellen (3) des Fusionspeptids HA₂ bei verschiedenen Influenza A Viren gleich (konserviert) ist. Diesen Stammglykanen werden daher wichtige biologische Eigenschaften zugeschrieben.

Generell besitzen die meisten HA₁-Untereinheiten eine oder mehrere Glykane nahe der Rezeptorbindungsstelle. Demzufolge besitzt das HA Regionen an denen sich eine Glykosylierung als vorteilhaft bzw. nachteilig erweisen kann. Ein Hinweis darauf ist unter anderem dadurch gegeben, dass trotz des antigenen Drifts bestimmte Regionen des HA keine Glykosylierungsstellen aufweisen [18, 122]. Studien zeigten, dass Glykane an diesen Stellen den Transport des HA zur Zelloberfläche, die strukturelle Stabilität des Proteins sowie seine Funktionen negativ beeinträchtigen [123]. An Regionen, an denen eine Glykosylierung weder „untersagt“ noch erforderlich für die Bildung von funktionellem HA ist, variieren die Glykane in Abhängigkeit von der Umgebung des Virus (z. B. dem Wirt) [122]. Zusätzlich unterscheiden sich HAs verschiedener Stämme in ihrer unterschiedlichen Anforderung an die N-Glykosylierung, wie beispielsweise der Gewährleistung des effizienten Transports des HA zur Plasmamembran [8]. Abbildung 2-9 zeigt ein schematisches Modell des HA und dessen N-Glykane an der Kopf- bzw. Stammregion verschiedener Stämme.

Im Gegensatz zu anderen behüllten Viren besitzen bei Influenza die N-Glykane der Oberflächenglycoproteine keine terminale Sialinsäure aufgrund der Aktivität der viralen NA [124]. Es wurde in diesem Zusammenhang gezeigt, dass sialierte Glykane nahe der Rezeptorbindungsstelle (RBS) die Bindung negativ beeinflussen [125].

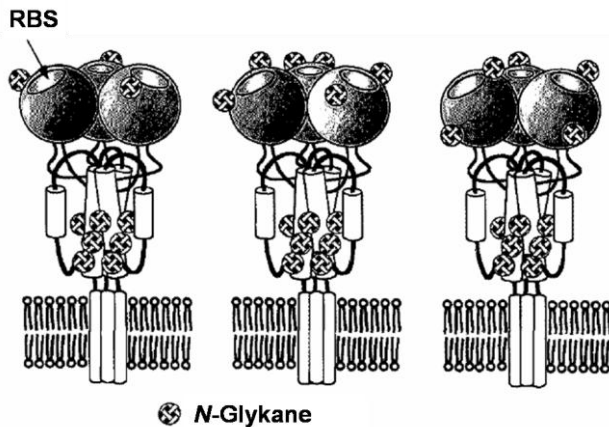


Abbildung 2-9: Schematisches Model des HA. Die Stammregion des HA ist jeweils umgeben von neun N-Glykanen. N-Glykane der Kopfregion variieren in Anzahl und Position in Abhängigkeit des Virusstammes [18, 110].

2.3.2 Funktionen der HA N-Glykane

Auch wenn die Funktionen der HA N-Glykane noch nicht vollständig bekannt sind, werden ihnen jedoch einige bedeutende Eigenschaften zugeschrieben. Generell sind N-Glykane sehr effiziente und vielseitige Regulatoren struktureller und funktioneller Eigenschaften von Virusglykoproteinen und entscheidend für die Aufrechterhaltung ihrer Stabilität durch die Vermittlung des Kontakts mit ihrer wässrigen Umgebung [12, 58]. Es wurde in einer Vielzahl von Studien gezeigt, dass die HA N-Glykane entscheidende Rollen z. B. bei der Freisetzung des Proteins [126], dem Schutz des HA vor proteolytischem Abbau [19, 20], der fehlerfreien Faltung des HA [127, 128] sowie dessen Einbau bzw. der korrekten Orientierung in der Plasmamembran [129] spielen. HA-Glykane beeinflussen außerdem die Virusreplikation [58] und über ihre Position am Proteinrückgrat die Effizienz der Aktivierung des HA^b und damit auch die Virulenz [130].

Zusätzlich zu ihrer stabilisierenden Wirkung auf die Polypeptidkette bestimmen HA N-Glykane auch die antigenen Eigenschaften sowie Affinität und Spezifität zur Wirtszelle mit [112, 131]. Dies geschieht unter anderem durch direktes Interferieren der Glykane nahe oder in Epitopen mit der Bindung von Antikörpern und der Stimulation der zellulären Immunantwort [131, 132]. D. h. die HA-Glykosylierung beeinträchtigt die Wahrnehmung des Virus durch CD4- und T-Zellen des Wirtsimmunsystems [133, 134]. Das geschieht z. B. durch das Abschirmen der antigenen Regionen des HA mit einer bestimmten Oligosaccharid-kette.

Mit Hilfe der HA-Glykane reguliert der Virus seine biologische Aktivität und ermöglicht eine Anpassung an verschiedene Umgebungen (z. B. Wirte) [110]. Außerdem kann die Art und das

^b D. h., dass die Konformationsänderung bei der Aktivierung durch die Glykosylierung beeinflusst werden kann.

Ausmaß der HA-Glykosylierung den Phänotyp^c des Virus ändern. Dies ist wahrscheinlich ein Grund für sein Überleben in vielen biologischen Nischen und seine Fähigkeit, inhibitorische Effekte von neutralisierenden Antikörpern und antiviralen Agenzien zu überwinden. So tragen z. B. die An- bzw. Abwesenheit sowie die Struktur der HA N-Glykane zur Selektion bei, d. h. die Fähigkeit des Virus in Zellen bestimmter Spezies zu wachsen. Mutanten mit angepasster Glykosylierung ersetzen den ursprünglichen Virus durch ihr Wachstum zu höheren Titern [60].

Betrachtet man die Untereinheiten HA₁ und HA₂ getrennt, übernehmen die jeweiligen N-Glykane unterschiedliche Aufgaben. Die konservierten Stammglykane spielen eine wichtige Rolle für den Aufbau und die Faltung des HA, sind effektive Stabilisatoren seiner nativen Konformation und pH-Stabilität, wichtig für eine effiziente Virusreplikation und gewährleisten in erster Linie das Fusionspotential des HA [18, 58, 65, 110].

Im Gegensatz dazu bestimmen die N-Glykane der Kopfregion vor allem die Rezeptorbindungscharakteristika des Influenza-Virus durch ihre Anzahl und Position [16, 69, 70] und auch durch ihre strukturellen Eigenschaften [135]. Die HA N-Glykane der Kopfregion wechselwirken mit den Oberflächenrezeptoren der Wirtszelle. Variationen der Glykane um die RBS können so eine Änderung in der biologischen Aktivität des Virus bewirken. Es werden daher die N-Glykane in diesen nicht konservierten Regionen zur Anpassung an neue Wirtszellen verwendet. Eine veränderte Glykosylierung nahe der RBS kann so beispielsweise eine Verschiebung der Rezeptorspezifität von α -2,6 zu α -2,3 gebundener Sialinsäure verursachen [18, 110, 135].

2.3.3 Mögliche Einflussfaktoren auf die N-Glykosylierung

Im Allgemeinen ist die Glykosylierung eines Proteins sowohl spezies-spezifisch als auch gewebe- und zelltyp-spezifisch innerhalb einer Spezies [5, 6, 136]. Das Glykosylierungsmuster ist dabei abhängig von der Expression verschiedener Glykosyltransferasen im Golgi-Apparat der Zellen. Unterschiede in der relativen Aktivität dieser Enzyme in verschiedenen Zellen kann zu signifikanten Änderungen in der Struktur von Glykanen führen [30]. Tabelle 2-2 gibt einen Überblick über die Glykosylierungsfähigkeit verschiedener Zellexpressionssysteme.

^c D. h. das generelle Erscheinungsbild/Eigenschaften des Virus, erworben durch die geltenden Bedingungen, ohne Einfluss auf die genetische Struktur.

Faktoren außerhalb der jeweiligen Zelle, die Veränderungen in dieser relativen Aktivität der am Aufbau von Oligosaccharidstrukturen beteiligten Enzyme induzieren können, sind z. T. für Variationen des Glykosylierungsmusters verantwortlich [137]. D. h. Agenzien, die inner- und außerhalb der Zelle mit der Umgebung des ER oder Teilen des Golgi-Apparates interferieren, können die Prozessierung der Oligosaccharide beeinflussen, da die dafür verantwortlichen Enzyme pH-Optima besitzen und bestimmte Anforderungen an die Anwesenheit von Kationen stellen [138, 139].

Tabelle 2-2: Zusammenfassung der Glykosylierungsfähigkeit verschiedener Zellexpressionssysteme [57]

Organism	Cell type	Type of Glycosylation				Fucose		Galactose			Sialic acids			Bisecting GlcNAc	Glyco- sidases
		O-linked	Oligo- mannose	Hyper- mannose	Complex	α 1-6 linked	α 1-3 linked	Gal Gal	α 1-3 SO ₂ - GalNAc	α 2,6 linked	α 2,3 linked	NeuGc			
Bacterium	<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?
Yeast	<i>Sacromyces</i>	++	0	++++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?
Plant	Tobacco BY2	?	++	0	?	?	++	?	0	0	0	0	0	0	?
Insect	<i>S. frugiperda</i> Sf9	++	++++	0	D	++	+	0	0	0	0	0	0	0	++
	<i>S. frugiperda</i> Sf21	++	++++	0	D	++	?	?	?	D	D	?	0	0	?
	<i>Trichoplusia ni</i>	?	++	0	++	?	?	?	?	++	++	?	0	0	?
	<i>E. acrea</i> Ea4	?	+++	0	++	++	0	0	0	0	0	0	0	0	?
Hamster	<i>M. brassicae</i>	++	++++	0	0	++	?	?	?	?	?	?	0	0	?
	BHK	++	++	0	++	++	0	+	0	0	++	?	0	0	?
Mouse	CHO	++	++	0	++	++	D	0	0	0	++	+	0	0	++
	Hybridoma	++	++	0	++	++	0	++	0	0	++	+++	0	0	+
	Myeloma	++	++	0	++	++	0	++	0	+	+	+++	0	0	+
	C127	++	++	0	++	++	0	++	++	++	++	+++	0	0	?
	J558L	++	?	0	++	++	0	++	?	++	++	+++	0	0	?
Rat	Transgenic	++	++	0	++	++	0	?	?	+	+	?	?	?	?
	Y0 Myeloma	?	?	0	++	?	0	?	?	+	+	?	++	0	?
Goat & Sheep	Transgenic	?	++	0	++	++	0	?	?	+	+	?	?	?	?
Human	Liver	++	+	0	++	++	0	0	0	++	++	0	0	0	?
	Brain	++	++	0	++	++	++	0	0	++	++	0	+	0	?
	Pituitary	++	++	0	++	++	0	0	+++	+	+	0	++	0	?
	B-lymphocyte	++	0	0	+	++	0	0	0	+	+	0	++	0	?
Human-Mouse	Namalwa	++	++	0	++	++	0	0	0	++	++	?	?	0	?
	Heterohybridoma	?	++	0	++	++	0	0	0	+	+	+	0	0	?

Bemerkung: Einige Studien haben das Glykosylierungsprofil eines Glykoproteins nach Expression in mehr als einem System untersucht. Deshalb können einige Charakteristika proteinspezifisch sein. 0=nicht detektiert; ?= nicht getestet; D= umstritten (widersprüchliche Ergebnisse in verschiedenen Publikationen beschrieben); + bis ++++: eine Abschätzung des Gehaltes an detektierten Oligosacchariden

Diese Abhängigkeiten der Proteinglykosylierung sind bei der Produktion von rekombinanten Glykoproteinen zu berücksichtigen. Somit besitzen rekombinante Proteine zum einen wirtszellabhängige Oligosaccharidstrukturen [140, 141] und die Auswahl des Expressionssystems beeinflusst damit die Glykosylierung des Produktes (Tabelle 2-2). Zum anderen wird die Glykosylierung durch die Fermentationsbedingungen bestimmt. Studien zeigten u. a., dass Zellkulturbedingungen die Mikro- und Makroheterogenität von Oligosacchariden an rekombinanten Glykoproteinen beeinflussen können [140, 142]. Beispielsweise führen Nährstofflimitierungen bei der Produktion rekombinanter Antikörper und Interferon-Gamma zur vermehrten Ausbildung kurzer Glykanstrukturen (hauptsächlich

Man₅GlcNAc₂) [143, 144]. In BHK-21 Perfusionenkulturen zur Produktion von Interleukin-2 bewirkten Nährstofflimitierungen eine kurzfristige Änderung der Makro-, aber nicht der Mikroheterogenität [145]. Insbesondere Glukoselimitierungen können zu deutlich kleineren Vorläufermolekülen während der Glykansynthese führen [146], die Abwesenheit von Glykanstrukturen bewirken [147] und auch den Grad der Glykosylierung (Makroheterogenität) z. B. monoklonaler Antikörper beeinflussen [148]. Des Weiteren wurde in verschiedenen Studien der Effekt von Einflussfaktoren wie beispielsweise der Ammoniumkonzentration [137, 149, 150] und dem Sauerstoffgehalt [151, 152] im Zellkulturmedium, dem pH-Wert [150, 153] und der An- bzw. Abwesenheit von Serum [53, 154] auf die Verteilung von Glykanstrukturen rekombinanter Proteine und Antikörper nachgewiesen.

Die Glykosylierung des Influenza-Virus HA wird, wie bei rekombinanten Proteinen, von verschiedenen Faktoren bestimmt. Bereits in den 70er Jahren wurden Studien zur Aufklärung der Glykosylierung des HA durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass Größe und Art (komplex und mannosereich) der Oligosaccharidketten primär durch die Wirtszelle bzw. deren spezifischen Transferasen bestimmt wird [19, 67, 73, 74]. In späteren Studien wurden diese wirtszellvermittelten Unterschiede näher untersucht. Dabei wurde deutlich, dass es bei der Adaption von Influenza-A- und -B-Viren an neue Wirte häufig zu Mutationen der Glykosylierungssequenzen in der Nähe der RBS kommt. Diese treten z. B. auch bei der Adaption an die Vermehrung in Hühnereiern [155], aber auch bei Adaption an Mäuse [156] und der Passagierung humaner Influenza-Stämme in MDBK- und MDCK-Zellkulturen [47, 157] auf. Die Struktur der Glykane scheint dabei, neben den Glykosyltransferasen und Glykosidasen der entsprechenden Wirtszelle, auch durch ihre Position auf dem HA bestimmt zu sein [158].

Neben der Wirtszellabhängigkeit ist auch die Stammabhängigkeit der HA Glykosylierung hinsichtlich Anzahl und Typ der Glykane nicht zu vernachlässigen [64, 67, 73]. Außerdem treten Unterschiede in der Anzahl und Position der Glykosylierungsstellen in den einzelnen Subtypen des Influenza-Virus auf [61-63]. In beiden Fällen bestehen Unterschiede in der relativen Menge der Glykantypen (komplex, hybrid, mannosereich), die u. a. in der Änderung der Primärstruktur des HA durch Antigen drift bzw. Shift begründet sind. Die Unterschiede in der HA-Glykosylierung zwischen Subtypen sind dabei stärker ausgeprägt als die innerhalb von verschiedenen Stämmen eines Subtyps [159]. D. h. die HAs von Stämmen eines Subtyps können bei der Replikation in dem selben Wirt unterschiedliche Glykosylierungsmuster aufweisen [67].

2.4 Stand der Technik und Strategien zur Glykananalytik

Pharmabehörden wie die FDA fordern die Zunahme von anspruchsvollen Kohlenhydratanalyse-Techniken als Teil von Produkt- oder Prozessvalidierungen [49-51, 160]. Die im Kapitel 2.1 beschriebene Komplexität, Vielseitigkeit und strukturelle Heterogenität von Oligosaccharidstrukturen auf Proteinen repräsentiert eine erhebliche Herausforderung für deren Analytik. Beispielsweise können auf Basis bekannter Glykanstrukturen für ein Protein mit 27-30 kDa aus Scrapie-Prionen mit nur zwei Glykosylierungsstellen ca. 400 verschiedene Glykoformen existieren [161]. Die Trennung dieser einzelnen Glykoformen erweist sich dabei als schwierig, da sie sich nur in Hinsicht auf die Glykane (z. B. nur einem) unterscheiden [1]. Chemische und biochemische Analysen von Glykoproteinen sind, zusätzlich zu der enormen strukturellen Heterogenität der Glykane, oft erschwert durch die geringe Probenmenge. Die Notwendigkeit für hochempfindliche und effiziente Methoden für Trennung, Detektion und strukturelle Analysen ist somit gegeben. Zur Analyse von Glykoproteinen werden verschiedene Strategien verfolgt. Zum einen können Glykoproteine bzw. Glykopeptide direkt und zum anderen ihre Glykane getrennt analysiert werden.

Die Analyse von Glykopeptiden erlaubt die Identifizierung von Glykosylierungsstellen mit spezifischen Eigenschaften. Meist erfolgt der Verdau mit einer Endoproteinase. Der proteolytische Verdau führt zu einem Gemisch aus Peptiden und Glykopeptiden mit intakten Kohlehydratketten. Damit ist das Molekulargewicht der zu analysierenden Moleküle reduziert. Bei stark glykosylierten Proteinen können Probleme der sterischen Behinderung des Enzyms durch Abschirmung der Polypeptidkette durch die Glykane auftreten. Aufgrund der Komplexität des Glykan-Peptidgemisches besteht häufig die Notwendigkeit der Verwendung verschiedener Analysetechniken parallel bzw. nacheinander.

Bei der Analyse intakter Glykoproteine ist die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und 2D-Gelelektrophorese oft der erste Schritt. Dabei führen in der 1D-Gelelektrophorese heterogene Glykosylierungsmuster zu Bandenverbreiterung, was die Trennung erschwert. Auf 2D-Gelen zeigt sich ein für Glykoproteine charakteristisches Muster (Trains), bei dem jeder Spot einen verschiedenen isoelektrischen Punkt und/oder Molekulargewicht der einzelnen Glykoformen repräsentiert [3]. Die Kombination mit Elektro-Blots und spezifischen Lektinen ermöglicht die empfindliche Detektion und Charakterisierung des Glykosylierungsmusters und wurde von Cummings 1994 zur Analyse von Glykokonjugaten beschrieben [162].

Eine Analysemethode mit einem weitaus höheren Potential hinsichtlich der Auflösung ist die CE, die zu der teilweisen oder nahezu kompletten Auflösung von Glykoformen führt. Die CE ist aufgrund der hochpolaren Natur von Kohlenhydraten und deren Fähigkeit, leicht Komplexe mit Borat zu bilden, gut geeignet für ihre Trennung. Diese wurde unter anderem für die Glykoformen von Ribonuklease B in Boratpuffer und rekombinantem humanem Erythropoetin (EPO) beschrieben [163-166].

Die meisten Kohlenhydrate sind spektroskopisch inaktiv bei den üblicherweise verwendeten Wellenlängen und daher spektroskopischen Detektionsarten wie z. B. UV/Vis und LIF unzugänglich. In den meisten Studien werden deshalb Derivatisierungen der Kohlenhydrate mit Fluoreszenz-Farbstoffen vorgenommen. Dies resultiert oft in ausgezeichneten Detektionslimits, wie beispielsweise 2004 gezeigt von Khandurina *et al.* oder Callewaert *et al.* bei der Trennung von Mono- und Oligosacchariden aus enzymatisch verdauter Lignocellulose bzw. der Erstellung eines N-Glykom-Profiles von Serumproteinen [85, 86, 90]. Auch möglich ist die Verwendung von Leitfähigkeitsdetektoren, die in Kombination mit der CE z. B. zur Charakterisierung von Heparin eingesetzt wurde, oder die Kopplung der CE mit der Massenspektrometrie, die hauptsächlich via Elektrosprayionisierung (ESI) realisiert wird [164, 167].

Die MS-Charakterisierung intakter Glykoproteine ist aufgrund der hohen Mikroheterogenität der Kohlenhydratanteile schwieriger als für normale Proteine. Außerdem ist die Ionisierung oft weniger effizient. Zusätzliche Probleme ergeben sich für die Elektrospray-MS, unter anderem wegen der Effizienz der Löslichkeit der Glykoproteine und der sehr komplexen Massenspektren, die in der multiplen Aduktbildung begründet sind [3]. Generell ist die MS-Analyse von Glykan-Peptidgemischen schwierig, da die Spektren (bei ESI-MS) durch Bildung mehrfach geladener Ionen sehr komplex werden und die Glykopeptide meist nur den geringeren Anteil im Gemisch repräsentieren. Ihr MS-Signal ist im Vergleich zu unglykosylierten Peptiden meist kleiner, da das Signal einer Peptidspezies verteilt ist auf eine Population mit verschiedenen Glykanstrukturen. In Gegenwart anderer Peptide werden Glykopeptidsignale meist unterdrückt, besonders wenn die Glykane terminale Sialinsäurereste besitzen [168]. Technische Weiterentwicklungen wie die Nano-Spray-MS führten zur erfolgreichen Analyse einiger hochglykosylierter Proteine wie rekombinaten und intakten Immunoglobulin Antikörpern [169, 170]. Die Analyse von Glykoproteinen mittels MALDI-TOF ist ebenfalls möglich. Allerdings erfolgt die Auflösung der einzelnen Glykoformen nur für kleine Proteine (ca. 40 kDa) mit limitierter Anzahl von Glykanen wie z. B. Ribonuklease B oder lösliches CD 59 [171, 172]. Größere Glykoproteine und solche mit mehreren

Glykosylierungsstellen und heterogeneren Glykosylierungsmustern führen zu breiten, unaufgelösten Peaks und lassen nur auf den durchschnittlichen Kohlenhydratanteil schließen [173].

MS-Techniken werden daher oft kombiniert mit der Anreicherung der Glykopeptide vor der Analyse. Es werden unter anderem Capture-Schritte über Lektinaffinität [174], Größenausschlusschromatographie [175], oder hydrophobe Wechselwirkungs-Chromatographie [176] in Kombination mit MS eingesetzt. Diese Anreicherungstechniken wurden beispielsweise zur Erstellung eines Profils von Glykoproteinen in humanem Blutserum [174] angewandt auf Proben aus humanem Plasma [176]. Alternativ ist die Deglykosylierung der Peptide mit beispielsweise Peptid-N-Glykosidase F (PNGaseF) (nur für N-Glykane) und anschließender MS-Analytik möglich. Anwendung fand diese Kombination z. B. bei der Analyse von Plasmamembranproteinen und Proteinen aus humanem Blutserum [177]. In Kombination mit on-Targetverdau durch Exoglykosidasen und den daraus resultierenden Massenshifts, lassen sich Informationen über die Anzahl der Glykosylierungsstellen und der Glykane gewinnen. Diese Technik wurde beispielsweise zur Analyse viraler Glykoproteine eines Sindbis-Virus eingesetzt [178].

Meist werden jedoch Glykopeptide mittels Umkehr- oder Normalphasen- Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP- oder NP-HPLC) fraktioniert und mittels MS detektiert. In Kombination mit der Deglykosylierung können Elutionsprofile von glykosylierten und deglykosylierten Peptiden verglichen werden, wie z. B. eingesetzt zur Analyse der Meerrettichperoxidase und Ribonuklease B [179, 180]. Die Kopplung von LC mit MS erlaubt die Detektion und Lokalisierung der Glycopeptide mit hoher Empfindlichkeit. Beispielsweise wurden von Wang *et al.* 2003 die N-Glykane eines Maus-Immunglobulins und dessen Glykosylierungsstellen spezifisch charakterisiert [181]. Mit Hilfe von MS/MS Experimenten ist auch die Analyse der Glykanstruktur, der Glykosylierungsstelle und der Peptidsequenz möglich, wie in einem Review von Wuhrer *et al.* zusammengefasst wurde [182].

Die Analyse mit MALDI-MS, beispielsweise off-line gekoppelt mit nano-LC, bietet Vorteile, da nur einfach geladene Ionen des Glykopeptids, wie z. B. gezeigt bei der Trennung eines tryptischen Verdau von 0,3 µg Asialofetuin, auftreten [183]. Wuhrer *et al.* zeigten 2004 anhand der Meerrettichperoxidase, dass mit Hilfe von MALDI-MS/MS die Fragmentierung zur Sequenzierung eines Peptids und des Glykanteils möglich ist [184].

Eine weitere Methode zur Glykancharakterisierung ist die Lektin-Affinitäts-Chromatographie, basierend auf der relativen Affinität der Glykane zu verschiedenen Lektinen [185]. Mit Hilfe von Lektinen breiter Spezifität können damit Pools von Glykoproteinen isoliert werden. Die

anschließende Trennung von solchen Glykoprotein-Pools kann mit spezifischen Lektinen realisiert werden. Beispielsweise zeigten Yang und Hancock die Isolation von Glykoproteinen aus humanem Serum mittels einer multi-Lektin-Affinitätssäule und ihre schrittweise Elution [186]. Die Verwendung von Lektin-Arrays, 2005 beschrieben von Kuno *et al.*, ermöglicht die qualitative und quantitative Analyse von Glykosylierungsmustern schnell, empfindlich und im Hochprobendurchsatz [187].

Zur Charakterisierung von Glykanen selbst existiert eine Vielzahl von Methoden und Strategien mit unterschiedlichen Ansätzen zur Deglykosylierung, Labeling, Fraktionierung und Strukturaufklärung. Die gebräuchlichsten dieser Methoden und Strategien sind in der Tabelle 2-3 und in Abb. 2-10 dargestellt und zusammengefasst. Prinzipiell verlangt die Analyse der Glykane unabhängig vom Protein deren Freisetzung und Wiederfindung. Zur Freisetzung intakter Glykane vom Protein bzw. Peptid können enzymatische oder chemische Methoden mit verschiedenen Vor- und Nachteilen eingesetzt werden.

Tabelle 2-3: Zusammenstellung einiger Methoden zu Glykananalytik [3]

<i> Methode </i>	<i> Strukturdaten </i>	<i> Probenmenge </i>	<i> Labeling nötig? </i>	<i> Vorteile </i>	<i> Nachteile </i>
2D-HPLC Profiling	strukturelle Informationen durch Vergleich zu Referenzsubstanzen	fmol	ja	hoher Probendurchsatz, Quantifizierung	kein direkter Strukturnachweis
MS	Zusammensetzung (Hex, HexNAc, dHex), Sequenz, Verzweigung, z.T. Linkage	fmol – pmol	nein ^a	hoher Probendurchsatz	Quantifizierung schwierig
Exoglykosidasen + HPLC, MS	Sequenz, anomerische Konfiguration, z.T. Linkage	fmol – pmol	ja/nein ^b	schnell, hoher Probendurchsatz möglich	Kombination mit anderen Techniken nötig
Lektinaffinitäts-Chromatographie	Identifizierung struktureller Epitope	fmol – pmol	ja/nein ^b	wertvolle Fraktionierungstechnik, hoher Probendurchsatz möglich	nur teilweise Charakterisierung der Glykanstrukturen
Linkage Analyse	Zusammensetzung, Verzweigung, Linkage, Ringgröße	pmol	no	detaillierte Strukturinformationen	zeitaufwändig, kein hoher Probendurchsatz
NMR	komplette Struktur	nmol	no	zerstörungsfrei (Probe bleibt erhalten)	kein hoher Probendurchsatz

^a Labeling ist nicht erforderlich, aber kann die Ionisierung verbessern

^b Abhängig von der Detektionsmethode

Enzymatische Methoden mit Endoglykosidasen zur Abspaltung von Glykanen von Glykopeptiden und -proteinen, liefern intakte Glykane, aber in Abhängigkeit der Spezifität des Enzyms werden nicht alle Glykanten freigesetzt [188]. PNGaseF wird am häufigsten verwendet, da diese eine Vielzahl von Glykanen abverdaut. Das Enzym hydrolisiert die

GlcNAc-Asparaginbindung direkt am Proteinrückgrat. Anhand von einem Bromelain-Glykopeptid und Meerrettichperoxidase demonstriereten Tretter *et al.*, dass im Gegensatz zu PNGaseA jedoch keine Glykane mit α 1-3 gebundener Fukose am reduzierenden Ende des GlcNAc abgespalten werden [189]. Außerdem werden verschiedene Endo- β -N-Acetylglucosaminidasen verwendet, die sich in ihrer Substratspezifität unterscheiden. Die Spaltung findet hier zwischen den zwei GlcNAc des TCK statt. Dabei verbleibt ein GlcNAc an der (Poly)peptidkette, womit die Informationen über Fukoseresiduen am Kern verloren gehen [190].

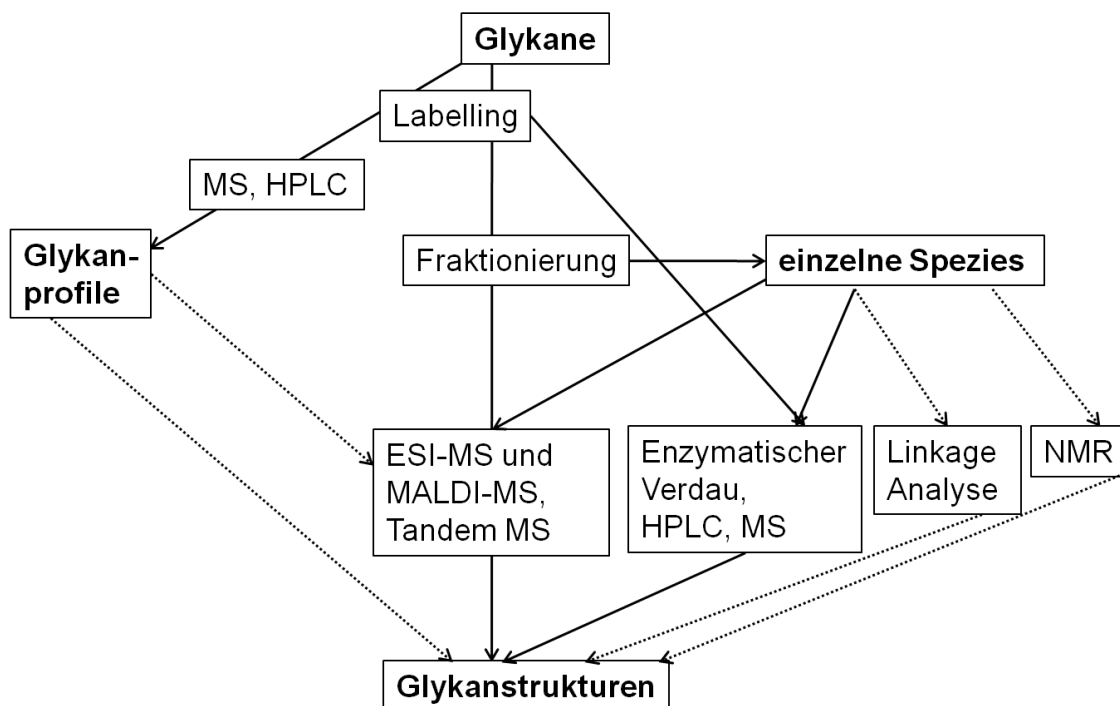


Abbildung 2-10: Strategien zur Analyse von freigesetzten Glykanen von Glykoproteinen (modifiziert nach [3])

Der Verdau mit Endoglykosidasen ist auch möglich nach der Trennung von Glykoproteinen im 1D- oder 2D-Gel, nach dem Blotting oder auf MALDI-Targets. Diese Techniken wurden in der Literatur eingehend unter anderem an den Modellproteinen IgG, Ribonuclease B und Fetuin beschrieben [76, 191, 192].

Es existieren auch einige Endoglykosidasen für O-Glykane. Diese besitzen allerdings eine limitierte Einsatzfähigkeit, da die O-Glykane stark in ihrer Struktur variieren.

Chemische Methoden zur Freisetzung von Glykanen gehen meist einher mit der teilweisen oder kompletten Zerstörung der Polypeptidkette und der Nicht-Kohlenhydrateile. Informationen über das Ausmaß und die Stellen der Glykosylierung gehen daher verloren. Die Hydrazinolyse ist die am häufigsten verwendete Methode, die nicht absolut spezifisch verläuft

und sowohl N- als auch O-glykosidische Bindungen spaltet. Die Reaktion führt zu intakten Glykanen mit freiem, reduzierendem Ende. Zusätzlich werden durch das Hydrazin die Amidbindungen angegriffen und dadurch die Glykane de-N-azethyliert. Oft treten bei O-Glykanen auch Degradierungen auf, aber neuere Modifikationen wie z. B. basischere Bedingungen unter Verwendung von Ammoniumcarbonat verbesserten die Methode [1, 163]. Nach der Freisetzung der Glykane wird deren Fraktionierung und Detektion behindert durch die Umwandlung der α - und β - Anomere der reduzierten Zucker, die Abwesenheit von Chromophoren und die geringe Ionisierungseffizienz der Glykane in der MS. Eine zusätzliche Herausforderung ist durch die oft limitierte Probenmenge gegeben. Zur Überwindung dieser Probleme wurde eine Vielzahl von chemischen Derivatisierungsprozeduren entwickelt, die die Reduktion der endständigen Aldehydgruppe beinhalten. Bei der reduktiven Aminierung werden chromogene oder fluoreszente Label angehängt, die die hoch empfindliche Detektion beispielsweise nach der chromatographischen Trennung erlauben. Das Einbringen von ionisierbaren bzw. geladenen funktionellen Gruppen wie beispielsweise aromatischen Aminen, ermöglicht gleichzeitig die effiziente elektrophoretische Trennung und die Detektion im unteren femtomolaren Bereich [193]. Ein weiterer Vorteil der Derivatisierung am reduzierenden Ende der Glykane ist, dass dadurch die Komplexität von Massenspektren reduziert werden kann.

Die verwendete Trenn- und Analysetechnik bestimmt damit die Wahl des Labels. Einige häufig verwendete Labeling Reagenzien für chromatographisches Profiling von Glykanen sind z. B. 2-Aminopyridin (2-AP) und 2-Aminobenzamid (2-AB). Für die hochauflösende Analyse von Oligosacchariden mittels CE werden häufig 2-Aminonaphthalen-1,3,6-Trisulfonsäure (ANTS), 8-Aminopyren-1,3,6-Trisulfonat (APTS) und 2-Aminobenzoesäure (2-AA) eingesetzt. Die Verwendung dieser Label in Kombination mit der CE als Trenntechnik wurde beispielsweise für die Charakterisierung der Glykane der Ribonuclease B und bovinem Fetuin beschrieben [194, 195].

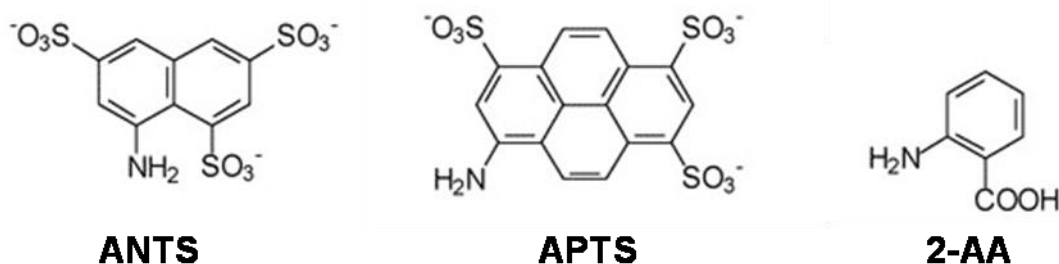


Abbildung 2-11: Reagenzien für das fluoreszente Labeling von Oligosacchariden; ANTS: 2-Aminonaphthalen-1,3,6-Trisulfonsäure; APTS: 8-Aminopyren-1,3,6-Trisulfonat; 2-AA: 2-Aminobenzoesäure [196]

In der CE werden die gelabelten Glykane entsprechend ihrer Migrationsgeschwindigkeit in einem elektrischen Feld getrennt. Der Trennmechanismus ist komplett verschieden von dem der HPLC, bei der Analyten über ihre Wechselwirkung mit einer stationären Phase getrennt werden. CE und HPLC repräsentieren damit zwei komplementäre Techniken [197]. Der Vorteil der CE sind dabei hocheffiziente schnelle Trennungen und die direkte Analyse sulfatierter oder sialierter Glykane. Die Trennung neutraler Glykane erfordert die Umwandlung in geladene Spezies unter anderem durch Labeln oder die Komplexierung mit Borat oder Metallkationen [197]. Eine höhere Ladung des Labels (ANTS, APTS) verkürzt die Analysenzeit und verbessert die Auflösung. Durch Kopplung mit der Massenspektrometrie können auch direkte Rückschlüsse auf die Struktur der Glykane gezogen werden, wie z. B. gezeigt von Gennaro *et al.* mit ANTS gelabelten komplexen N-Glykanen [198].

Die enzymatische Sequenzierung mit hochspezifischen Exoglykosidasen ermöglicht die Bestimmung der Sequenz, der anomeren Bindung und mit einigen Enzymen auch die Ermittlung der Bindungsstelle der einzelnen Monomere. Das Ergebnis des Verdau wird in der Regel erst durch die Analyse der Reaktionsprodukte mit CE, HPLC oder MALDI-MS zugänglich. Der Verdau der Glykane ist dabei sequentiell mit einzelnen Enzymen oder im Array mit Aliquots des Glykangemisches möglich [87, 199]. Allerdings sind nicht für alle Arten von glykosidischen Bindungen spezifische Enzyme verfügbar, sterische Behinderungen der Enzyme können auftreten und eine hohe Reinheit der Exoglykosidasen muss gewährleistet sein.

„Linkage“-Analysen liefern detaillierte strukturelle Informationen über die Zusammensetzung, Verzweigung und Ringgröße der Glykane und ihrer Monomere. Diese Verfahren beinhalten Permethylierungen, die anschließende Hydrolyse der permethylierten Glykane und der Reduzierung von teilweise permethylierten Monosacchariden, die Acetylierung der erhaltenen Alditole und die Identifizierung der teilweise methylierten Alditole-Acetate mit Gas-Flüssig-Chromatographie gekoppelt mit MS (GLC/MS) [200, 201]. „Linkage“-Analysen sind generell sehr zeitaufwändig und damit nicht für den Hochprobendurchsatz geeignet.

Die Kern(spin)resonanzspektroskopie (NMR) ermöglicht eine komplette und eindeutige Zuordnung aller strukturellen Eigenschaften der Glykane, einschließlich der Monosaccharidzusammensetzung, Ringgröße und Anomerie, Art der Bindung der Monosaccharide und Konformationsvorzüge. Die Analyse der Proben ist zerstörungsfrei. Nachteilig für die Analyse von Glykanen, die meist nur physiologischen Menge verfügbar sind, ist die Tatsache, dass für hochauflösende Spektren sehr große Probenmengen (> 100 µg) erforderlich sind [79, 202, 203].

Eine komplette Analyse eines Glykoproteins einschließlich der Identifizierung der Glykosylierungsstellen, deren Heterogenität und einer kompletten Strukturaufklärung jedes einzelnen Glykans verlangt die Freisetzung und Wiederfindung der Glykane rein oder als Glykopeptide und die Trennung in einzelne homogene Verbindungen. Dazu ist in der Regel eine Kombination aus den beschriebenen Methoden nötig.

Um Veränderungen in Glykoformpopulationen festzustellen, ist eine komplette Strukturanalyse der Glykane nicht immer erforderlich. Verschiedene chromatographische Methoden können zum Profiling bzw. Fingerprinting von Glykanen verwendet werden. Die HPLC wird vielfach verwendet und ist sehr gut geeignet, da eine große Auswahl an stationären und mobilen Phasen, schnelle und reproduzierbare Analysen liefern und eine relative Quantifizierung ermöglichen.

Anionenaustauschchromatographie ermöglicht die Trennung nach Anzahl der geladenen Gruppen in den Glykanen. In Abhängigkeit der Bedingungen kann auch die Größe der Glykane einen geringen Einfluss auf die Trennung haben [204]. Die Kopplung der Anionenaustauschchromatographie mit der MS ist aufgrund des hohen Salzgehaltes der Eluenten nicht direkt, aber nach der Entsalzung möglich [205]. Bei der NP-HPLC basiert die Trennung auf der hydrophilen Wechselwirkung der Glykane mit der stationären Phase [75]. Im Gegensatz dazu basiert die Trennung in der RP-HPLC auf der Hydrophobizität der Glykane. Hierfür ist allerdings die Anheftung eines hydrophoben Labels an die Glykane, z. B. 2-AB, erforderlich [76].

2.5 Kapillarelektrophorese

Die Entwicklung der CE begann in den 30er Jahren mit dem Versuch von Tiselius Serumalbumin von α -, β - und γ -Globulin zu trennen [206]. Das war das erste Mal, dass Elektrophorese zur Trennung von biologisch aktiven Substanzen benutzt wurde. Hjerten zeigte 1967 die elektrophoretische Trennung von Proteinen, Nukleinsäuren und anorganischen Ionen in einer Kapillare mit einem Innendurchmesser (ID) von 300 μm und UV-Detektion [207]. In den frühen 80er Jahren veröffentlichten Jorgenson and Lukas die Erfindung eines einfachen CE-Instrumentes [208, 209] und 1989 war das erste CE-Gerät kommerziell erhältlich. Seitdem hat die Anzahl der Publikationen und der Einsatz der CE rapide zugenommen.

Heute repräsentiert die CE eine elektrophoretische Trenntechnik, die u. a. im Rahmen pharmazeutischer Analysen etabliert ist und in mehreren Pharmacopeias empfohlen wird. Die

United States Pharmacopeia beinhaltet beispielsweise seit 2002 ein allgemeines Kapitel zur CE [210] und die britische Pharmacopeia schlägt die Identifizierung von EPO mittels Mizellar-elektrokinetischer-Kapillarchromatographie (MEKC) vor [211].

Die CE besitzt ein hohes Potential für die Lösung anspruchsvoller analytischer Fragestellungen von der Trennung von kleinen Ionen bis hin zu Makromolekülen. Die Verfügbarkeit verschiedener CE-Trennprinzipien ist dabei sehr hilfreich für die Analyse von Arzneimitteln, da Pharmazeutika sehr verschieden in ihrer Struktur und ihren physikochemischen Eigenschaften sind. Sie wird häufig für niedermolekulare Verbindungen in der Routineanalytik eingesetzt, aber auch für Peptide, Proteine, chirale Moleküle, Pflanzenextrakte (flavonoide und alkalische Zucker), DNA und RNA [212]. Im Allgemeinen ist die CE geeignet für die Trennung polarer und schwer flüchtiger Substanzen und stellt dabei keine konkurrierende Technik zur Gaschromatographie dar.

Die Kapillarzonenelektrophorese (CZE) ist beispielsweise weit verbreitet für die Analyse verschiedenster Substanzen einschließlich aktiver pharmazeutischer Bestandteile wie z. B. in Formulierungen oder biologischen Flüssigkeiten und Verunreinigungen. Die chirale CE repräsentiert beispielsweise eine wertvolle Möglichkeit zur Trennung von Enantiomeren und die MEKC spielt eine entscheidende Rolle in der Analyse von kleinen, neutralen Pharmazeutika. Die CE hat sich auch bei der Trennung komplexer Oligosaccharidgemische bewährt. So wird unter anderem mittels CE der Forderung der Behörden nachgekommen, bei der Produktion von Antikörpern in tierischen Zellkulturen die Bestätigung der Konstanz der Glykosylierung auch nach Prozessänderungen zu zeigen. Die Komplexität der Oligosaccharidstrukturen stellt eine Herausforderung für die Analytik dar, der oft durch Einsatz der CE, z. B. zur Qualitätskontrolle pharmazeutischer Antikörper, begegnet wird [213].

Die geringe Empfindlichkeit der CE mit photometrischer Detektion erweist sich als nachteilig bei der Bestimmung von Substanzen, die nur in Spuren (z. B. in biologischen Flüssigkeiten oder bei pharmakokinetischen Studien) vorhanden sind. Dieses Problem kann überwunden werden durch den Einsatz alternativer Detektoren, beispielsweise LIF oder MS, und der Ankonzentrierung von Proben (off-line, on-line, in-line).

Die Kopplung der CE mit der MS ermöglicht so eine hohe Trenneffizienz (Anzahl theoretischer Böden > 10.000) und die gleichzeitige Identifizierung der Analyten [214]. Die Präzision der CE ist mit der der HPLC vergleichbar bei hohem Probendurchsatz und kurzen Analysenzeiten [212]. Die LIF-Detektion nach der elektrophoretischen Trennung bietet eine hohe Empfindlichkeit und Nachweisgrenzen im unteren femtomol-Bereich [215, 216].

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Trennung und Detektion von N-Glykanen die CGE gekoppelt mit einem LIF-Detektor verwendet. Im folgenden Abschnitt werden daher einige Grundlagen der Kapillarelektrophorese beschrieben.

2.5.1 Grundlagen der Kapillarelektrophorese

In der CE werden geladene Teilchen (Ionen) in mit Pufferlösungen gefüllten Kapillaren in einem elektrischen Feld getrennt. Die Kapillaren bestehen aus Quarzglas (amorphes SiO_2) und werden mit einer Länge von 10 - 100 cm und einem ID von 25 - 100 μm eingesetzt. Durch diese geringen ID sind radiale Diffusion und Konvektion reduziert, das Problem des Aufheizens der klassischen Gelelektrophorese wird umgangen und es können Trennungen bei sehr hohen Spannungen und Feldstärken über 100 kV/m durchgeführt werden.

Die Injektion der Proben erfolgt gewöhnlich anodenseitig hydrodynamisch oder elektrokinetisch und resultiert in einer nur wenige mm langen Probenzone. Beide Kapillarenden tauchen in Puffergefäße, um die elektrophoretische Trennung von Molekülen zu ermöglichen. Bei Spannungen von 15 - 35 kV werden Moleküle aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladung und elektrophoretischen Mobilität getrennt. Diese ist abhängig von Größe, Ladung und Grad der Ionisierung der Analyten, sowie der Viskosität, Temperatur und der Dielektrizitätskonstanten des Hintergrundelektrolyten. Die Mobilität μ eines Analyten kann anhand seiner Geschwindigkeit im elektrischen Feld v und der elektrischen Feldstärke E berechnet werden.

(Gleichung 1) $\mu = v/E$

Dabei ergibt sich v aus der Migrationszeit t_{mig} und der effektiven Kapillarlänge l und E ist der Quotient aus der Spannung U und der Gesamtlänge der Kapillare L .

(Gleichung 2) $v = l/t_{mig}$

(Gleichung 3) $E = U/L$

Daraus ergibt sich für μ :

(Gleichung 4) $\mu = l*L/(t_{mig}*U)$

CE Trennungen werden eingeteilt nach dem Elektrolytsystem (kontinuierlich oder diskontinuierlich) oder dem Elektroosmotischen Fluss (EOF) (kein EOF: no-EOF, Trennung der Analyten mit dem EOF: co-EOF, Trennung der Analyten gegen den EOF: counter-EOF). Die CZE und die Kapillar-isoelektrische Fokussierung (cIEF) sind Beispiele für kontinuierliche Systeme wohingegen die CGE ein diskontinuierliches System repräsentiert. Die CGE ist

ebenfalls ein no-EOF System, da hier der EOF unterdrückt wird und die Analyten (meist Peptide oder Proteine) entsprechend ihrer elektrophoretischen Mobilität migrieren. In der CGE basiert die Trennung auch auf dem Größenunterschied der Analyten. Die Kapillaren sind dabei mit einem Polymer oder Gel gefüllt, welches als molekulares Sieb fungiert.

Der EOF resultiert aus der Ionisierung der Silanolgruppen ($pI = 1,5$) ungecoateter Kapillaren bei jedem pH-Wert $> 3,0$ [217]. Diese Silanolgruppen ionisieren in wässrigen Elektrolyten, was zu negativen Ladungen an der inneren Oberfläche der Kapillare führt. Die Trennung in der Kapillare ist zusammengefasst elektrisch neutral. Daher liegt ein Überschuss an Kationen in der Pufferlösung vor. Diese akkumulieren an der negativ geladenen inneren Oberfläche der Kapillare. Bei Anlegen einer Spannung migrieren die Kationen zur Kathode und durch Reibungskräfte wird die Pufferlösung mitgerissen. Der EOF ist abhängig von dem elektrischen Feld, dem pH-Wert und der Konzentration bzw. Ionenstärke des Hintergrundelektrolyten, sowie Additiven, der Temperatur und dem Kapillar-Coating [218].

Die Triebkraft des EOF und Reibungskräfte treten nur an der Kapillarwand auf. Daraus ergibt sich ein sehr flaches Strömungsprofil, welches im Vergleich zu einem parabolischen Strömungsprofil (z. B. in der HPLC) keinen Beitrag zur Peakverbreiterung aufgrund von Radialdiffusion liefert. Dies ist ein Grund, warum im Allgemeinen die CE im Vergleich zur HPLC eine bessere Trenneffizienz aufweist.

Der EOF ermöglicht die parallele Auftrennung von negativen, positiven und neutralen Teilchen. Kationen migrieren zuerst mit der im Vergleich höchsten Geschwindigkeit (v) zur Kathode, getrieben durch die elektrische Anziehung und mit dem EOF (co-EOF; sehr kurze Analysenzeiten). Neutrale Verbindungen migrieren zusammen ausschließlich mit dem EOF und werden als ein Peak detektiert. Anionen migrieren aufgrund des Kraftunterschiedes des EOF zur Kathode und ihrer Anziehung zur Anode in die entgegengesetzte Richtung (counter-EOF) [212, 214].

Die Detektion der Analyten erfolgt meist kathodenseitig direkt in der Kapillare (online mit UV oder LIF-Detektoren) oder extern mit MS. Dabei repräsentiert die LIF-Detektion wahrscheinlich die sensitivste Detektionsmethode nach einer Trennung. Sie ist besonders gut geeignet für die Detektion in kleinen Volumina (z. B. CE und Chip-basierten Trenntechniken), die erhöhte Anforderungen an die Detektionssysteme stellen. Dies gilt speziell, wenn die Analyten in sehr geringen Konzentration in der Probe vorliegen. Nach der Beschreibung von Gassmann, Kuo und Zare 1985 [219] wurde die Sensitivität von Fluoreszenzdetektoren ständig verbessert. Detektionslimits von 100 fM (konzentrationsbezogen) oder von ein paar Dutzend Molekülen (massenbezogen) können

unter optimalen Bedingungen mit geeigneten Fluorophoren erreicht werden. Die LIF-Detektion ist häufig die Methode der Wahl, wenn hohe Empfindlichkeit erforderlich ist und die zu detektierende Substanz selbst fluoreszierende Eigenschaften besitzt oder mit einem fluoreszenten Tag versehen werden kann. Das fluoreszente Signal resultiert aus der Absorption eines Photons und der anschließenden Emission. Das Detektionslimit der LIF-Detektion variiert mit der jeweiligen Trennung, da das Verhalten jedes bestimmten Fluorophors in einem bestimmten System ebenfalls stark variiert [220].

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien, Reagenzien, Medien, Enzyme, Puffer und Lösungen sowie Geräte und Materialien sind im Anhang in den Abschnitten 1 bis 3. aufgeführt.

Für die Herstellung des in vielen Methoden innerhalb dieser Arbeit verwendeten Reinstwassers (Milli-Q™-H₂O) wird Leitungswasser mittels Umkehrosmose in einer Wasserenthärtungsanlage von BWT Wassertechnik (Deutschland) in vollentsalztes Wasser mit 7 µS Leitfähigkeit umgewandelt. Dieses unter UV-Bestrahlung auf Vorrat gehaltene vollentsalztes Wasser kann bei Bedarf aus der Gradient A 10 Anlage von Millipore (USA) entnommen werden, wobei eine weitere Entsalzung auf 1 µS Leitfähigkeit erfolgt.

3.2 Zellkultur und Virusreplikation

Fünf verschiedene adhärente Zelllinien (MDCK, Vero, A549, HepG2, RCAR) und eine Suspensionszelllinie (AGE1.CR) wurden im Rahmen dieser Arbeit in Anlehnung an Genzel *et al.* [36] in Zellkulturflaschen (T75, T175 und Rollerflaschen 850 cm²) und Bioreaktoren (Rührkesselreaktor und Wave) kultiviert und mit verschiedenen human Influenza Stämmen infiziert. Details zur Zellkultivierung sind in der Tabelle 3-1 zusammengefasst.

Zur Infektion der Zellen wurden humaner Influenza A/PR/8/34 (H1N1) (Amp. 3138, Robert Koch Institut (RKI), Deutschland und National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), UK) humaner Influenza A/Wisconsin/67/2005 HGR (H3N2) und B/Malaysia/2506/2004 (beide NIBSC, UK) Virus verwendet. Diese werden im Folgenden als H1N1-RKI, H1N1-NIBSC, H3N2 und B/Mal bezeichnet.

Die konfluenten adhärennten Zelllinien MDCK, Vero, A549, HepG2 und RCAR und die drei Tage kultivierte Suspensionszelllinie AGE1.CR wurden dreimal mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und das Zellkulturmedium durch dessen serumfreies Äquivalent mit den gleichen Zusätzen ersetzt. Zur Infektion der MDCK- und Vero-Zellen wurde dem Medium Trypsin, in einer finalen Konzentration von 5 U/mL, zugesetzt. Kein Trypsin wurde zur Infektion von A549- und HepG2-Zellen zugesetzt. AGE1.CR-Zellen wurden in serumfreiem AEM Medium ohne Medienwechsel kultiviert und infiziert. Die Zellkulturen wurden mit einer Multiplizität der Infektion (MOI, basierend auf dem TCID₅₀/mL) infiziert, die eine optimale Virusreplikation gewährleistet. Diese variieren daher in Abhängigkeit des

Wirtszellsystems und des Virus. Beispielsweise wurden MDCK-Zelle in T175-Zellkulturflaschen mit H1N1-RKI, H1N1-NIBSC und B/Mal mit einer MOI von 0,025 und mit H3N2 mit einer MOI von 0,001 infiziert. Die Infektion der Vero (T175-Zellkulturflasche) und AGE1.CR (T75-Zellkulturflasche) mit H1N1-RKI erfolgte jeweils mit einer MOI von 0,25 und die der beiden humanen Zelllinien mit einer MOI von 1.

Um ein mit MDCK-Zellen vergleichbares Replikationsverhalten und Ausbeuten verschiedener Influenza-A-Virusstämme (H1N1-NIBSC, H1N1-RKI und H3N2) auch in Vero-Zellen zu erzielen, erfolgte die Adaption des Saatvirus an die Vero-Zelllinie durch mehrfache Passagierung. Zusätzlich wurde die Adaption des H3N2 Saatvirus an die RCAR-Zellen durchgeführt. In allen Fällen erfolgte die Adaption über jeweils vier Passagen. Für die erste Passage wurden die Zellen jeweils mit einer MOI von 0,025 infiziert. Virushaltiger Zellkulturüberstand (0,4 mL) wurde 24 h nach der Infektion (hpi) zur Infektion in eine neue T175-Zellkulturflasche überführt. Dieser Vorgang wurde für die dritte und vierte Passage wiederholt.

Zur N-Glykananalyse wurde der Zellkulturüberstand 72 hpi der MDCK-, Vero- und RCAR-Zellen und 40 hpi der AGE1.CR-Zellen geerntet. Aufgrund der langsamer verlaufenden Virusreplikation in den humanen Zelllinien A549 und HepG2 wurde der Zellkulturüberstand hier erst 120 hpi geerntet. Der Überstand der Viruspassagen 4 in Vero- und RCAR-Zellen wurde jeweils 72 hpi geerntet. In allen Fällen wurden 50 mL Probenvolumen gezogen und nach der in den Abschnitten 3.3.2 – 3.3.12 beschriebenen Methode zur N-Glykananalytik prozessiert.

Tabelle 3-1: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Zellen, Ursprung, Zellkulturmedien und Zellkulturgefäße

<i>Zelle</i>	<i>Ursprung</i>	<i>#</i>	<i>Zellkulturmedium und Zusätze</i>	<i>kultiviert in</i>
MDCK	Hund, Niere	ECACC Nr.: 841211903	GMEM ¹ mit 10% FCS, 2 g/L Pepton, 5.5 g/L Glukose; Episerf mit 2 mM L-Glutamin, 2mM Pyruvat, 2M Glukose	T175, RF, 5 L STR
Vero	Grüne Meerkatze, Niere	ECACC No.: 88020401	GMEM ¹ mit 10% FCS, 2 g/L Pepton, 5.5 g/L Glukose; Episerf mit 2 mM Gln, 3 g/L Glukose	T175, RF, 5 L SRT,

A549	Mensch, Lungenkrebszelle	ATCC Nr: CCL-185	MEM ³ mit 10% FCS, 2 mM Gln, 4 g/L Glukose	T75
HepG2	Mensch, Leberkrebszelle	ATCC No: HB-8065	MEM ³ mit 10% FCS, 2 mM Gln, 4 g/L Glukose, 1 mM Na-Pyruvat, 0.1 mM nicht essentielle AA; ⁴ RPMI mit 2,3 mM L-Gln, Glukose, 10 % FCS	T75
AGE1.CR	Ente, Retina	ProBioGen	AEM ² mit 4 mM Gln	T75, RF
RCAr	glykosylierungsdefiziente MDCK Zelle	*	GMEM ¹ mit 10% FCS, 2 g/L Pepton, 5.5 g/L Glukose	T175

* [93, 221]

¹GMEM, Glasgow Minimum Essential Medium; ²AEM, Adenovirus Expression Medium; ³MEM, Minimum Essential Medium; ⁴RPMI, Roswell Park Memorial Institute; AA, Aminosäure; Gln, Glutamin; FCS, fötales Rinderserum; RF, Rollerflasche; 5 L STR, 5 L-Bioreaktor (stirred tank reactor); T75-und T175, Zellkulturflaschen;

3.3 Methoden

3.3.1 Hämmagglutinationstest zur Bestimmung des Gesamtvirusgehalts

Der Hämmagglutinationstest (HA-Test) wurde als Endpunkttitrationsmethode zur Quantifizierung von Influenza-Viruspartikeln im Zellkulturüberstand verwendet. Diese Quantifizierung beruht auf der Fähigkeit des HA, sich an *N*-Acetylneuraminsäure von Oberflächenproteinen von Zellen (hier: Erythrozyten) zu binden. Enthielt eine Probe ausreichend Viruspartikel, verursachte deren Agglutination mit Erythrozyten eine Veränderung in deren Sedimentationsverhalten. D. h. im Gegensatz zu nicht agglutinierten Erythrozyten (sedimentierten) bildeten agglutinierte Erythrozyten mit den Viruspartikeln ein Netz, wodurch deren Sedimentation verhindert wurde. Anhand einer Verdünnungsreihe des virushaltigen Zellkulturüberstandes und einer Lösung mit einer definierten Anzahl an Erythrozyten, konnte über den Grad der Sedimentation der HA-Titer und damit die Viruskonzentration in einer Probe bestimmt werden.

Die Durchführung des HA-Tests erfolgte entsprechend dem in der Arbeitsgruppe

Bioprozesstechnik (MPI Magdeburg) etablierten Verfahren (Arbeitsanweisung HA-Test, Anhang I, Abschnitt 4.1). Die Verdünnungsreihe der Probe wurde in 96-Well-Rundbodenplatten angesetzt. Dazu wurden jeweils 100 µL PBS in die Reihen 2-12 der Platte vorgelegt und jeweils 100 µL Probe in Doppelbestimmung in das 2. Well pipettiert. Durch Pipettieren von jeweils 100 µL verdünnter Probe aus Well 2 in die darauffolgenden Reihen 3 - 12 wurde die Verdünnungsreihe komplettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µL Erythrozytenlösung mit einer definierten Anzahl an Erythrozyten ($1,90 \cdot 10^7$ Erythrozyten/mL) in jedes Well. Nach ca. 2 h wurden die Platten optisch ausgewertet. Die Verdünnungsstufe, die nicht mehr ausreichend Viruspartikel zur Agglutination enthielt, wurde durch das Well definiert, in dem ein vollständiges Pellet der Erythrozyten erkennbar war. Die Verdünnungsstufe in der Reihe davor definierte damit die log-Stufe des HA-Titers/100 µL. Mit Hilfe der Erythrozytenkonzentration wurde die Konzentration des Virus/mL berechnet.

Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte Methode zur Analyse von Virusglykoproteinen ist in Abbildung 3-1 dargestellt. In der folgenden Kapiteln werden die einzelnen Schritte der Probenvorbereitung und Analytik beschrieben.

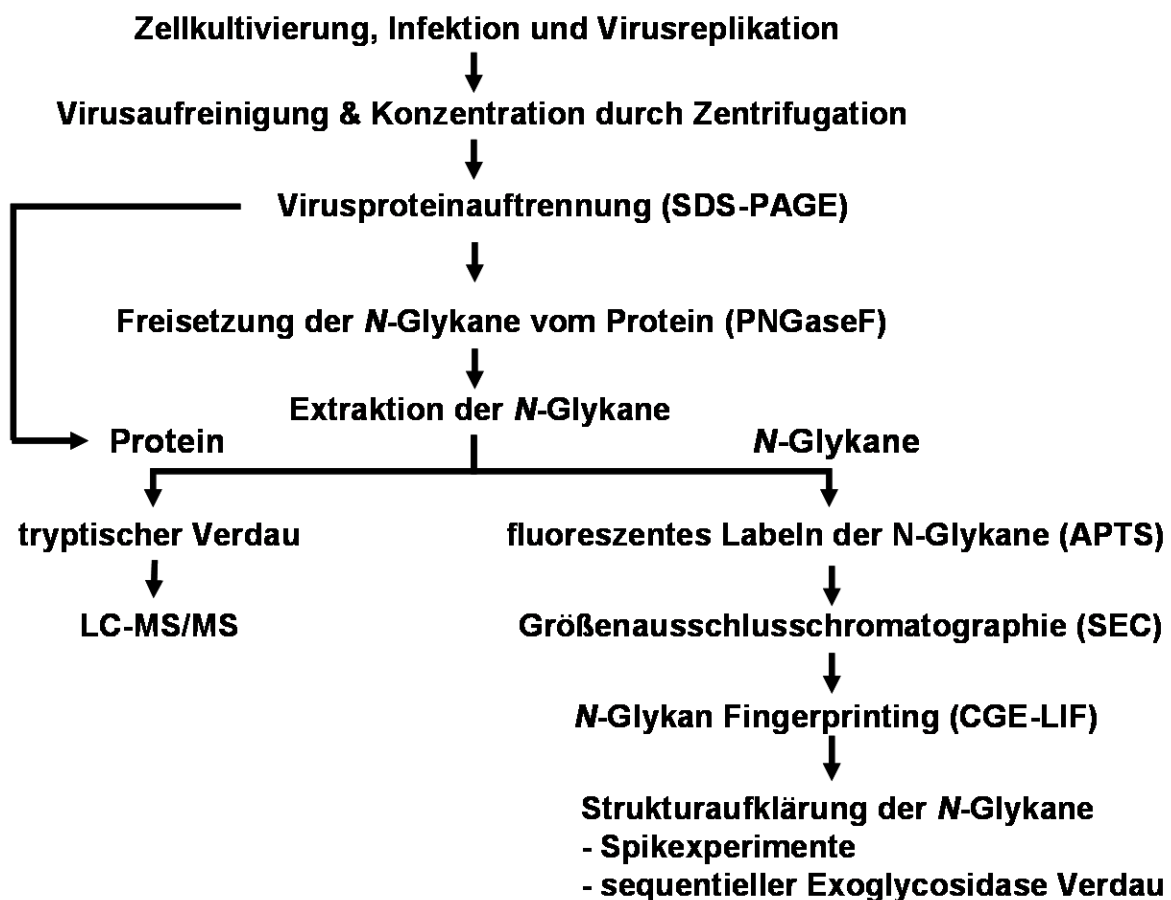


Abbildung 3-1: Im Rahmen dieser Arbeit etablierte Methode zur N-Glykananalytik von Virusproteinen

3.3.2 Aufreinigung und Konzentrierung von Influenza-Virus aus Zellkulturüberstand

Die Virusernte (40-120 hpi) wurde mit Hilfe der entwickelten (Abschnitt 4.1) stufenweisen *g*-Gradienten-Zentrifugation aufgereinigt und konzentriert. Zuerst wurden 50 mL Influenza-Virus enthaltender Zellkulturüberstand stufenweise geklärt. Dabei wurden Zellen sowie große und kleinere Zellbruchstücke durch aufeinanderfolgende Zentrifugationsstufen unter Verwendung einer Heraeus Biofuge primo R (Thermo Electron, Deutschland) abgetrennt. In jeder Stufe wurde der Überstand in ein neues Zentrifugationsgefäß (Falcon™ 50 mL, für 10000 *g* Superclear™ 50 mL, beides VWR, Deutschland) überführt und das Pellet verworfen. Final wurden die Virus-Partikel aus 30 mL geklärtem Zellkulturüberstand (überführt in OptiSeal Tubes, Beckman Coulter, Deutschland) mittels Ultrazentrifugation in einer Optima™ LE-80K Ultrazentrifuge (Beckman Coulter, Deutschland) pelletiert. Anschließend wurden die Pellets in 50-100 µL 100 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris; Ultra Quality, Carl Roth GmbH, Deutschland), pH 7,0 resuspendiert. Die optimierten Parameter der stufenweisen *g*-Gradienten-Zentrifugation sind in der Tabelle 3-2 zusammengefasst. Der Proteingehalt der Virusproben nach der Aufreinigung und Konzentrierung wurde mittels Proteinbestimmung nach Bradford (Abschnitt 3.3.3) ermittelt.

Tabelle 3-2: Optimierte Parameter der stufenweisen *g*-Gradienten Zentrifugation

<i>Rotortyp</i>	<i>Erdbeschleunigung in g</i>	<i>Zeit in min</i>	<i>Temperatur in °C</i>
Ausschwingrotor	100	20	4
Festwinkelrotor	4000	35	4
Festwinkelrotor	10000	45	4
Festwinkelrotor	71000	90	4

3.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford wurde in Anlehnung an die in der Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik (MPI Magdeburg) bestehende Arbeitsanweisung (Arbeitsanweisung Proteinbestimmung, Anhang I, Abschnitt 4.2) in 96-Well-Platten durchgeführt. Die Bestimmung des Proteingehaltes der Proben erfolgte anhand einer 6-Punkt-Kalibriergeraden, einer Verdünnungsreihe von bovinem Serumalbumin (BSA, Sigma-Aldrich, Deutschland) mit Proteinkonzentration von 7 µg/mL bis 43 µg/mL. Als Matrix wurde 100 mM Tris verwendet, da in dieser auch die Proben (die resuspendierten Viruspartikel) vorlagen. Die BSA-Verdünnungsreihe wurde arbeitstäglich frisch angesetzt und jede Konzentration dreifach

bestimmt. Die zu analysierenden Virusproben wurden 1:10 in 100 mM Tris verdünnt (Gesamtvolumen 200 μ L) und in die 96-Well-Platte pipettiert. Aufgrund der limitierten Probenmenge, wurde nur eine Einfachbestimmung der Virusproben durchgeführt. Sowohl zu den Proben als auch den Verdünnungen des Standards wurden jeweils 50 μ L Bradfordreagenz (Bio-Rad, Deutschland) pipettiert und die Platte auf dem Thermomixer (Eppendorf, Deutschland) für 5 min bei Raumtemperatur (RT) mit 1000 rpm geschüttelt. Das Auslesen der Platten erfolgte mit Hilfe eines Tecan-Plattenlesers (TECAN, Deutschland). Anhand der Kalibriergerade wurden die Proteinkonzentrationen der Virusproben berechnet.

3.3.4 Gelelektrophorese und kolloidale Coomassie-Färbung

Zur eindimensionalen Trennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden 10 % Tris-HCl SDS-Gele von Bio-Rad verwendet. Virusproben und bovines Serum gamma-Immunglobulin (IgG; Sigma-Aldrich, Deutschland) mit einem Gesamtproteingehalt von je 10 μ g wurden mit 4x nicht reduzierendem Probenpuffer (Anhang Abschnitt 2) versetzt und für 5 min im siedenden Wasserbad denaturiert. Als Molekulargewichtsmarker wurden pro Gel 5 μ L Roti-Mark Prestained (Carl Roth GmbH, Deutschland) in eine separate Gelspur geladen. Die Gelelektrophorese erfolgte in einer Mini-Protean 3 Zelle (Bio-Rad, Deutschland) bei konstant gehaltener Spannung (20 mA/Gel) für 90 min. Nach beendeter Trennung wurden die Gele 1 h in Fixierlösung (Anhang Abschnitt 2) inkubiert und 2x 10 min in Milli-Q Wasser gewaschen. Die Visualisierung der Proteine erfolgte über Nacht mittels kolloidaler Coomassie-Färbung (Anhang Abschnitt 2). Die gefärbten Gele wurden anschließend 5 min mit Milli-Q Wasser gespült, um Partikel der Färbelösung zu entfernen, und zur Lagerung bei 4°C in Folie eingeschweißt.

3.3.5 Proteinidentifizierung mittels LC-MS/MS

In den folgenden Abschnitten wird die Methode zur Identifizierung der mittels SDS-PAGE getrennten Virusproteine beschrieben. Diese Methode wurde zur Identifizierung aller im SDS-Gel sichtbaren Virusproteinbanden des Influenza-A-Virus H1N1-RKI, repliziert in MDCK-Zellen, angewandt. Für alle anderen untersuchten Kombinationen an Viren und Wirtszellsystemen wurde jeweils nur das HA-Monomer (HA₀) identifiziert.

Tryptischer In-Gelverdau

Nach Trennung der viralen Proteine wurden diese enzymatisch verdaut und mittels nanoHPLC-nanoESI-MS/MS identifiziert. Dazu wurden die Gelbanden ausgeschnitten, zerkleinert und nach der folgenden Prozedur gewaschen: Nach der 10-minütigen Inkubation in 200 μL 25 mM $\text{NH}_4\text{HCO}_3(\text{aq})$ (wässrige Lösung-aq) (Ultra Grade, Sigma-Aldrich, Deutschland) folgte die Inkubation in 200 μL 50 mM $\text{NH}_4\text{HCO}_3(\text{aq})$ – Acetonitril (Merck, Deutschland) bei RT. Beide Schritte wurden zweimal wiederholt. Zur Dehydrierung der Gelstücken folgte ein weiterer Waschschrift mit 400 μL reinem Acetonitril für 10 min bei RT. Danach wurden die Proteine reduziert mit 400 μL 10 mM Dithiothreitol (DTT, Fluka, Deutschland) (gelöst in 50 mM $\text{NH}_4\text{HCO}_3(\text{aq})$) für 30 min bei 56°C und anschließend alkyliert durch Inkubation unter Lichtausschluß mit 400 μL 500 mM Iodacetamid (IAA, SigmaUltra, Deutschland) (gelöst in 50 mM $\text{NH}_4\text{HCO}_3(\text{aq})$) bei RT für 30 min. Die oben beschriebene Waschprozedur wurde wiederholt, die Gelstücken anschließend erneut mit Acetonitril dehydriert und geschrumpft und im Vakuumkonzentrator (SpeedVac SPD121P, Savant, USA) für 10 min bei RT getrocknet. In Abhängigkeit von ihrem ursprünglichen Volumen wurden in die zermörserten Gelbanden 5 - 10 μL eiskalte Proteaselösung (Modifide porcine Trypsin 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ in 25 mM $\text{NH}_4\text{HCO}_3(\text{aq})$) bei 4°C eingequollen. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 37°C.

Probenvorbereitung für die nano-HPLC-nanoESI-MS/MS

Der Verdau wurde gestoppt durch Zugabe von 30 μL 1 % v/v Trifluoressigsäure (TFA, Sigma-Aldrich, Deutschland) in Milli-Q Wasser und Inkubation der Gelstücken für 30 min bei 37°C. Der Überstand dieser ersten Extraktion wurde abpipettiert und bei 4°C aufbewahrt. Für einen zweiten Schritt zur Peptidextraktion wurden 30 μL 1 % v/v TFA in 75 % v/v H_2O / 25 % v/v Acetonitril zugegeben Die dritte Extraktion wurde mit 30 μL 1 % v/v TFA in 50 % v/v H_2O / 50 % v/v Acetonitril durchgeführt. In beiden Schritten wurden die Gelstücken bei 37°C unter Schütteln für 30 min inkubiert und die Überstände mit dem ersten Extrakt vereint. Im nächsten Schritt wurden die Peptidextraktionspools schockgefroren bei -180°C (durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff) und in einem Vakuumkonzentrator auf ein Volumen < 5 μL (nicht bis zur Trockne) eingengt. Die Proben wurden mit einem entsprechenden Volumen 0,1 % v/v $\text{TFA}_{(\text{aq})}$ auf ein Gesamtvolumen von 10 μL aufgefüllt. Anschließend erfolgte direkt die Analyse mittels nano-HPLC-nanoESI-MS/MS oder die Lagerung der Proben bei -80°C bis zur Analyse.

On-line Konzentrierung und Trennung der Peptide

Die in Reihe Schaltung eines Kapillar- und nanoHPLC-Gerätes (1100 Serie, Agilent, Deutschland) erlaubte die vollständig automatisierte on-line Konzentrierung und Trennung der tryptisch verdauten Proben. Mit Hilfe eines gekühlten micro-HPLC Autosamplers (Agilent, Deutschland) wurden 1 - 8 μL jeder Probe in eine C_{18} -Vorsäule (300 μm ID * 5 mm gepackt mit C_{18} -PepMap, 100 Å Porengröße, 5 μm Partikelgröße), zur Konzentrierung auf ein Probenvolumen von 350 nL, injiziert. Dies wurde durch „stacking“ und Entsalzen der Peptide auf der Vorsäule mit einer Flussrate von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 0,05 % v/v $\text{TFA}_{(\text{aq})}$, generiert durch eine Kapillar-HPLC-Pumpe (Agilent, Deutschland), realisiert. Die vorkonzentrierten Peptidgemische wurde von der Vorsäule direkt eluiert und getrennt auf einer nano-Säule durch Switch der Vorsäule von Kapillar-HPLC-Fluss auf nano-HPLC-Fluss (mit MicroValve 2/10; G1163A). Eine nanoHPLC-Pumpe (Agilent, Deutschland) wurde mit einer Flussrate von 300 nL/min benutzt zur Gradientenelution der Proben. Die Trennung erfolgte auf einer C_{18} -nano-Säule (75 μm ID * 150 mm, gepackt mit C_{18} -PepMap 100 Å Porengröße, 3 μm Partikelgröße). Ein Elutionsgradient wurde über 30 min gefahren, ausgehend von 0 % Eluent A (0,1 % v/v Ameisensäure (FA, Sigma-Aldrich, Deutschland) in 98 % v/v H_2O / 2 % v/v Acetonitril (Chromasolv LC-MS grade Sigma-Aldrich, Deutschland)) bis hin zu 50 % FA in 20 % v/v H_2O / 80 % v/v Acetonitril).

On-line Kopplung und Aufnahme von ESI-MS/MS Spektren

Zur Detektion wurde die nanoHPLC on-line mit nanoESI-MS/MS gekoppelt. MS- und MS/MS-Spektren wurden mit Hilfe eines QSTAR XLTM Tandemmassenspektrometers (Applied Biosystems, USA), ausgestattet mit einer on-line nano-Elektrospray Ionenquelle (NanoSpray® II Source) und einem beheizten Interface, generiert. Die Elektrosprayionisation der eluierten Peptide erfolgte on-line über eine Elektrospraynadel (ungecoatete SilicaTipsTM (OD 360 μm / ID 20 μm /TipID 10 μm)). In der Tabelle 3-3 sind die eingestellten ESI Parameter zusammengefasst.

Mit Hilfe der Analyst QS Software (Version 1.1, Applied Biosystems, Deutschland) wurden „full scan“- und „product ion“-Spektren aufgenommen in einem informationsabhängigen Aufnahmemodus (IDA). Die IDA-Modus Einstellungen beinhalteten die kontinuierlichen Zyklen eines kompletten TOF-MS-Scans von 385 - 1610 m/z (1 s) und drei „product ion“-Scans von 150 - 1610 m/m (enhance all, jeweils 1 s). Precursor m/z-Werte wurden aus einer Peakliste ausgewählt, die automatisch von der Analyst QS-Software vom vorherigen TOF-MS-Scan während der Aufnahme, generiert wurde. Es wurden die Parameter „ion state“ 2-4,

„ion cut-off“ > 10 counts und „Ausschließen von Isotopen“ zur Erstellung der Peakliste gesetzt. Dabei erschien das jeweilig intensivste Ion an erster Stelle. Die Kollisionsenergie wurde als „rolling collision energies“ gesetzt in Abhängigkeit des m/z Wertes des Precursor Ions. Zusätzlich wurden die Daten im „profile mode“ aufgenommen und „dynamic exclusion“ wurde verwendet zur Datenaufzeichnung mit einer „exclusion duration“ von 90 s für frühere „target“-Ionen und einer „exclusion mass width“ von $\pm 0,05$ mmu.

Tabelle 3-3: Parameter der ESI

<i>Parameter</i>	<i>Wert</i>
Nadelspannung	2,6 kV
Druck des Ionenquellengas	12 psi
Druck des curtain gas	12 psi
Temperatur des Interface	140°C
declustering potential (2)	15 V
collision gas (dimensionsloser Parameter)	4

Prozessierung und Interpretation der ESI-MS/MS Spektren

Zur automatischen Datenbanksuche der „product-ion“-Spektren der nanoHPLC-nanoESI-MS/MS-Analysen, wurde MASCOTTM [222] (Version 2.2 Matrix Science, UK) zur Identifizierung der entsprechenden Peptide verwendet. Für die jeweiligen Suchen wurde die derzeit nicht redundante NCBI Datenbank herangezogen. Die Suchparameter wurden wie folgt gesetzt: Spezies = Viren; tryptischer Verdau mit einem Maximum von einer „missed cleavage“; keine feste Modifikation; variable Modifikationen = Oxidation des Methionin (M) und Carbaminomethylierung (C) der Cysteine; Peptidmassen wurden als monoisotopisch angesehen; Massentoleranz = 0,1 Da für die Precursor Ionen und 0,07 Da für die „product ions“. Zur endgültigen Identifizierung wurden mindestens zwei Produktionen-Spektren von zwei Peptiden eines identifizierten Proteins manuell bestätigt.

3.3.6 In-Gel-Deglykosylierung und Extraktion der N-Glykane

Zur Freisetzung der N-Glykane wurden die entsprechenden Proteinbanden mit Hilfe des Xtracta Tools (611002, Biozym, Deutschland) aus dem Gel ausgeschnitten. Für die In-Gel-Deglykosylierung (IGD) wurde das Protokoll von [223] adaptiert. Dabei wurden die aus dem SDS-Gel ausgeschnittenen Banden zerkleinert und zweimal 30 min in 20 mM NaHCO₃, pH 7,0 (Sigma-Aldrich, Deutschland) gewaschen. Anschließend wurde die Waschlösung durch 300 μ L frisches 20 mM NaHCO₃, pH 7,0 ersetzt und nach Zugabe von 20 μ L 45 mM DTT bei 60°C für 30 min inkubiert. Nach Abkühlen der Proben auf RT wurden 20 μ L 100 mM IAA, zur Alkylierung für 30 min bei RT unter Lichtausschluss, zupipettiert. Nach

dem Entfernen der reduzierenden und alkylierenden Reagenzien wurden die Gelstücke in einer 1:1 Mischung von Acetonitril und 20 mM NaHCO₃, pH 7,0 für 60 min geschrumpft und anschließend in einem Vakuumkonzentrator komplett getrocknet. Zur Deglykosylierung wurden in die getrockneten Gelstücke 6 µL PNGase F (500 U/mL, Sigma-Aldrich, Deutschland) eingequollen (5 min) und, zur Inkubation über Nacht bei 37°C, mit 124 µL 20 mM NaHCO₃, pH 7,0 bedeckt.

Die bereits einige N-Glykane enthaltende Verdaulösung wurde entfernt und bei 4°C aufbewahrt. Die Extraktion der N-Glykane erfolgte dreimal mit 200 µL Milli-Q Wasser im eisgekühlten Ultraschallbad für jeweils 30 min. Die Extrakte wurden mit der Verdaulösung vereinigt und bis zur Trockne im Vakuumkonzentrator (Integrated SpeedVac System ISS100 Savant, USA) eingeengt. Die getrockneten N-Glykane wurden entweder sofort weiter bearbeitet oder bei -20°C gelagert.

3.3.7 Markieren der N-Glykane mit APTS

Die Markierung der N-Glykane erfolgte durch reduktive Aminierung in Anlehnung an [82] mit dem fluoreszenten Farbstoff 8-Aminopyren-1,3,6-Trisulfonat (APTS, Sigma-Aldrich, Deutschland). Dafür wurden 5 µL 20 mM APTS und 5 µL 1 M NaBH₃CN (Sigma-Aldrich, Deutschland) zu den getrockneten N-Glykanen pipettiert und gemischt. Die Derivatisierung erfolgte über Nacht bei 37°C unter Lichtausschluss.

Die für die zur Strukturaufklärung verwendeten N-Glykanstandards wurden ebenfalls nach dieser Methode mit APTS konjugiert. Dafür wurden die N-Glykane in Milli-Q Wasser gelöst, Aliquots mit definierter Menge des jeweiligen Standards (bis zu 1 µg) im Vakuumkonzentrator (Integrated SpeedVac System ISS100 Savant, USA) eingetrocknet und mit den Reagenzien APTS und NaBH₃CN versetzt. Nach der Inkubation erfolgte die Aufreinigung bzw. Entsalzung mittels Größenausschlusschromatographie (SEC).

3.3.8 Größenausschlusschromatographie

Vor der Injektion der fluoreszent markierten N-Glykane, wurde der Überschuss an nicht abreagiertem APTS und Salzen mittels SEC abgetrennt. Diese Aufreinigung wurde sowohl für die N-Glykane des HA als auch für die zur Strukturaufklärung verwendeten Standards bei 10°C durchgeführt.

Die SEC wurde zunächst optimiert. Dazu wurden verschiedene Größenausschlussmaterialien wie z. B. Sephadex G-10 und G-25 (Sigma-Aldrich, Deutschland), Bio-Gel P-2 Gel (Bio-Rad,

Deutschland) und Toyopearl HW-40 F (Tosoh Corporation, Japan) auf ihre Fähigkeit hin untersucht, eine optimale Trennung der APTS konjugierten N-Glykane von überschüssigem APTS zu gewährleisten. Die Verwendung von Sephadex-Materialien resultierte in einer vergleichsweise hohen Chargenvariation und zusätzlichen Signalen in den Elektropherogrammen (Daten nicht gezeigt). Die besten Ergebnisse hinsichtlich Reproduzierbarkeit und Wiederfindung wurden unter Verwendung des auf modifiziertem Methacrylat-Polymer basierendem Toyopearl HW-40F Material erzielt.

Im Folgenden wird die Durchführung der optimierten SEC mit Toyopearl HW-40F Material in MultiScreen Deep Well Solvint Filter Plates (#MDRL N04, Millipore, Deutschland) beschrieben. Die für den jeweiligen Versuch benötigte Menge an Größenausschlussmaterial (2 mL Slurry/Probe; maximal 20 mL) wurde in 50 mL Zentrifugengefäßen (VWR, Deutschland) sechs mal mit Milli-Q Wasser gewaschen. Dazu wurde das Säulenmaterial mit Milli-Q Wasser auf 50 mL aufgefüllt, aufgeschlämmt und 2 min bei 100 g abzentrifugiert (Heraeus Biofuge primo R, Thermo Electron, Deutschland). Das Milli-Q Wasser wurde abdekantiert, durch frisches Milli-Q Wasser ersetzt und der beschriebene Vorgang fünfmal wiederholt. In die Deep-Well-Platten wurden 2 mL Slurry pro Well gepackt und mit drei Säulenvolumen Milli-Q Wasser gewaschen. Dafür wurden die Platten jeweils 10 s bei 150 – 200 g anzentrifugiert und die Wells anschließend mit Milli-Q Wasser aufgefüllt.

Nach Probenaufgabe erfolgte die Elution bis zum Durchbruch des Überschusses an APTS, durch Zentrifugation mit 50 g/Fraktion. Um ein Trockenlaufen der Säulen zu vermeiden, wurden während des Elutionsvorganges nach jeweils 5 Fraktionen die Wells mit Milli-Q Wasser aufgefüllt. Die Fraktionen wurden in transparenten 96-Well-Mikrotiterplatten mit V-Boden bzw. schwarzen 96-Well-Klarsichtbodenplatten (beide Corning, Deutschland), die unter der Deep-Well-Platte positioniert wurde, aufgefangen. Für jede Probe bzw. jeden Standard ergaben sich dabei ca. 25 Fraktionen mit einem Volumen von durchschnittlich 50 µL. Die Fraktionen wurden direkt im Anschluss auf ihren Gehalt an APTS-konjugierten N-Glykanen untersucht oder bis zur Analyse bei -20°C aufbewahrt. Die Fraktionen 1 - 6 wurden verworfen, da diese ausschließlich Milli-Q Wasser und noch keine APTS-konjugierten N-Glykane enthielten.

3.3.9 Identifizierung N-glykanhaltiger Fraktionen

Die Identifizierung der N-glykanhaltigen Fraktionen erfolgte zunächst mittels CGE-LIF. Dazu wurden die einzelnen Fraktionen, wie in 3.3.10 beschrieben, 1:10 in HiDi Formamide (Applied Biosystems, USA) verdünnt und mittels CGE-LIF analysiert. Anschließend erfolgte

die visuelle Auswertung der Elektropherogramme mit Hilfe der GeneMapper Software. Zeigten sich in den Elektropherogrammen Signale, die N-Glykanen zugeordnet werden konnten, wurden die entsprechenden Fraktionen einer Probe vereint und im Vakkumkonzentrator (Integrated SpeedVac System ISS100, Savant, USA) eingengt. Bei durchschnittlich 25 Fraktionen aus der SEC wurden i. d. R. die Fraktionen 10 - 15 gepoolt. Die N-Glykanpools wurden mit Milli-Q Wasser auf ein Gesamtvolumen von 30 μ L aufgefüllt.

Aufgrund des hohen arbeitstechnischen und zeitlichen Aufwands der Identifizierung der N-glykanhaltigen Fraktionen mittels CGE, wurde eine alternative Methode zur Identifizierung glykanhaltiger Fraktionen entwickelt. Dabei wurden die Fraktionen in schwarzen 96-Well-Klarsichtbodenplatten gesammelt. Die Platten wurden anschließend bei einer Extinktionswellenlänge von 488 nm mit einem Laserscanner des Typs Typhoon TRIO Variable Mode Imager (GE Healthcare, Deutschland) gescannt. Die Emission wurde bei 520 nm normaler Empfindlichkeit gemessen. Die Auswertung der erhaltenen Bilder erfolgte visuell auf ihren Gehalt an APTS-konjugierten N-Glykanen in Bezug auf die Intensität des Fluoreszenzsignals. Im Gegensatz zur CGE konnten so statt vier Proben parallel die jeweiligen Fraktionen aller Proben parallel in kürzerer Zeit analysiert werden. Nach der Auswertung wurden auch hier die N-glykanhaltigen Fraktionen vereint, im Vakkumkonzentrator (Integrated SpeedVac System ISS100, Savant, USA) eingengt und auf ein Gesamtvolumen von 30 μ L aufgefüllt.

Nach beiden Identifizierungsvarianten wurden die N-Glykanpools mittels CGE (Abschnitt 3.3.10) analysiert.

3.3.10 Kapillargelelektrophorese

Die CGE-LIF wurde durchgeführt in Anlehnung an die 2004 von Callewaert publizierte Methode [224]. Es wurde ein DNA-Sequenzierer vom Typ ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA), ausgestattet mit einem Klasse B-Argon-Laser (Emissionswellenlänge 488 nm) und einem 3100-Avant Genetic Analyzer Capillary Array, verwendet. Aufgrund der fixen Gräteeinstellung repräsentierte die Inletseite die Kathode und die Outletseite die Anode. Als Trennmatrix wurde unverdünntes 3100 POP-6 Polymer (Applied Biosystems, USA) verwendet. Vor der elektrokinetischen Injektion wurden alle Proben, Standards und Fraktionen 1:10 in HiDi Formamide Probenpuffer verdünnt und zusätzlich mit einer definierten Menge 1:10 in HiDi verdünnten GeneScan 500 ROX Standard

(Applied Biosystems, USA) versetzt (1 µL Probe + 1 µL GeneScan 500 ROX Standard 1:10 in Hi-Di Formamide + 8 µL Hi-Di Formamide).

Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 15 kV und 30°C für 130 min ohne Veränderung der Hard- und Software. Die Injektions- und Trennparameter sind in Tabelle 3-4 zusammengefasst. Die aus den jeweiligen Trennungen resultierenden Elektropherogramme werden im Folgenden als N-Glykanfingerprints oder vereinfacht als Fingerprints bezeichnet.

Tabelle 3-4: Parameter der CGE-LIF Methode

<i>Parameter</i>	<i>Wert</i>
effektive Kapillarlänge	50 cm
Kapillarbeschichtung	permanentes neutrales Coating (ohne nähere Spezifikation von Applied Biosystems)
Temperatur	30°C
Pre Run Voltage	15 kV
Pre Run Time	600 s
Injektionsspannung	15 kV
Injektionszeit	5 s
Run Voltage	15 kV
Run Time	130 min
Data Delay Time	50 s
Voltage Number of Steps	20 nK
Voltage Step Interval	30

Tabelle 3-5: Verdünnungsreihe APTS zur bestimmung des Detektionslimits der verwendeten CGE-LIF Methode

<i>Volumen APTS Lösung</i>	<i>Volumen 15 % Essigsäure</i>	<i>Resultierende Konzentration APTS</i>
10 µL APTS 20 mM	990 µL	200 µM (1)
10 µL Lösung (1)	990 µL	2 µM (2)
10 µL Lösung (2)	990 µL	20 nM (3)
10 µL Lösung (3)	990 µL	200 pM (4)
10 µL Lösung (4)	990 µL	2 pM (5)
10 µL Lösung (5)	990 µL	20 fM (6)
10 µL Lösung (6)	990 µL	200 aM (7)
10 µL Lösung (7)	990 µL	2 aM (8)
10 µL Lösung (8)	990 µL	0,02 aM (9)

Zur Bestimmung des Detektionslimits (LOD) der verwendeten CGE-LIF Methode wurde eine Verdünnungsreihe des Fluoreszenzfarbstoffes APTS, ausgehend von einer 20 mM Stammlösung bis hin zu Konzentrationen im unteren attomolaren Bereich (Tabelle 3-5), mittels CGE-LIF analysiert. Dabei wurde die selbe Trennmethode wie zur Analyse der N-Glykanproben verwendet. Die Bestimmung des LOD erfolgte in dreifacher Wiederholung.

3.3.11 Strukturaufklärung

Die Strukturaufklärung der N-Glykane erfolgte auf zwei unterschiedlichen Wegen. Zum einen wurden Spike-Experimente mit N-Glykanen mit bekannter Struktur durchgeführt (off-line und on-line). Dieses Vorgehen ist im Abschnitt *Spike-Experimente* beschrieben. Zum anderen wurden die N-Glykane mit spezifischen Exoglykosidasen sequentiell abverdaut. Dieses Vorgehen ist im Abschnitt *Sequentieller Exoglykosidase-Verdau* beschrieben.

Spike-Experimente

Zur Durchführung der Spike-Experimente wurden die in der Tabelle I-3 und I-4 aufgeführten N-Glykane als Standards verwendet. Diese wurden wie im Abschnitt 3.3.7 – 3.3.9 mit APTS konjugiert und aufgereinigt. Spike-Experimente zur Strukturaufklärung der N-Glykane wurden sowohl off-line als auch on-line durchgeführt. Für off-line Spike-Experimente wurden die Elektropherogramme der einzelnen Standards, wie unter 3.3.10 beschrieben, aufgenommen. Zusätzliche bekannte Strukturen für Spike-Experimente wurden mittels sequentielltem Exoglykosidase Verdau (Abschnitt 3.3.12.2) generiert und ebenfalls mittels CGE-LIF analysiert. Die t_{mig} der Signale in den entsprechenden Elektropherogramm wurden anhand des Rox Gene Scan Standards normiert (Abschnitt 3.3.12). Aus den normierten Elektropherogrammen wurden mit den Fingerprints der N-Glykanpools Overlays erzeugt und die t_{mig} der einzelnen Standards mit den Signalen im jeweiligen Fingerprint verglichen. Die Übereinstimmung der t_{mig} sowie das Übereinanderliegen von Signalen mit denen der Standards legten nahe, dass die entsprechende Standardstruktur im N-Glykanpool enthalten war.

Für on-line Spike-Experimente wurden die verwendeten APTS-konjugierten Standards einzeln oder in Kombination in definierter Menge direkt dem N-Glykanpool zugespikt. Die Elektropherogramme der gespikten und ungespikten N-Glykanpools wurden nach Normierung, z. B. durch Overlay, verglichen. Traten in den Elektropherogrammen der gespikten N-Glykanpools zusätzliche Signale auf, waren diese Strukturen nicht im Pool enthalten. Bei Erhöhung der Intensität einzelner Signale, die in ihrer t_{mig} mit denen des gespikten Standards übereinstimmen, war davon auszugehen, dass diese Struktur im N-Glykanpool enthalten war.

Alle N-Glykanstrukturen in dieser Arbeit wurden mit Hilfe von GlykoWorkbench erstellt [225].

Sequentieller Exoglykosidase-Verdau

Zur Strukturaufklärung mittels sequentielltem Exoglykosidase-Verdau (SED), wurden die in der Tabelle I-2 aufgeführten Exoglykosidasen verwendet. Aliquots der APTS-konjugierten N-Glykanpools wurden einzeln oder in Kombination mit spezifischen Exoglykosidasen in einem Reaktionsvolumen von 10 μL über Nacht bei 37°C inkubiert. Der SED wurde dabei nach dem Protokoll des Herstellers der Exoglykosidasen durchgeführt. Es wurden die mit den Enzymen gelieferten 5x konzentrierten Reaktionspuffer verwendet. Beispielhaft ist in der Tabelle 3-7 das Pipettierschema des Verdau mit $\alpha(2-3,6,8,9)$ -Neuraminidase, β -Galaktosidase, β -N-Acetylhexosaminidase und $\alpha(1-2,3,6)$ -Mannosidase eines N-Glykanpools dargestellt. Dabei sind in den einzelnen Reihen und Spalten die Volumina in μL der jeweiligen Reagenzien angegeben. Das Aliquot 0 wurde als Referenz ohne Zugabe von Exoglykosidasen mitgeführt. Nach der Inkubation wurden die Verdau mittels CGE-LIF (Abschnitt 3.3.10) analysiert. Die Verschiebung der t_{mig} von Signalen in den Elektropherogrammen der Aliquots mit Exoglykosidasen lässt auf die Anwesenheit von terminalen Zucker-Monomeren schließen, die durch die entsprechenden Exoglykosidasen abverdaut wurden.

Um die NA-Aktivität im Zellkulturmedium und deren Einfluss auf die N-Glykane bzw. deren terminaler Sialinsäure zu untersuchen, wurde ein Aliquot des APTS-konjugierten biantennären und sialierten N-Glykan A2F mit Zellkulturüberstand 72 hpi bei 37°C inkubiert und mittels CGE-LIF (Abschnitt 3.3.10) analysiert.

Tabelle 3-6: Pipettierschema für den SED eines N-Glykanpools mit den Exoglykosidasen $\alpha(2-3,6,8,9)$ Neuraminidase, β -Galaktosidase, β -N-Acetylhexosaminidase und $\alpha(1-2,3,6)$ -Mannosidase

Reagenz	Aliquot	0	1	2	3	4
Reaktionspuffer 5x $\alpha(1-2,3,6)$ -Mannosidase in μL		2	2	2	2	2
$\alpha(2-3,6,8,9)$ Neuraminidase in μL		0	1,5	1,5	1,5	1,5
β -Galactosidase in μL		0	0	1,5	1,5	1,5
β -N-Acetylhexosaminidase in μL		0	0	0	2	2
$\alpha(1-2,3,6)$ -Mannosidase in μL		0	0	0	0	1
N-Glykanpool in μL		2	2	2	2	2
Milli-Q Wasser in μL		6	4,5	3	1	0
Summe in μL		10	10	10	10	10

3.3.12 Datenauswertung

Zur Analyse der Glykanpools, Standards und den Aliquots des SED wurde wie in 3.3.10 beschrieben eine definierte Menge an Gene Scan TM-500 Rox Size Standard zugegeben. Dieser interne Standard enthält 15 DNA-Fragmente definierter Länge (50-500 Basenpaare, bp) und wurde zur Normierung der t_{mig} (polynomialer Fit 2. Ordnung) verwendet. Die

erhaltenen t_{mig} der Fragmente des internen Standards wurden gegen ihre Größe in bp aufgetragen (Daten nicht gezeigt). Die t_{mig} jedes Probenpeaks wurde mit Hilfe der Regressionsgleichung von Datenpunkten (DP)/min in die entsprechende t_{mig} in bp konvertiert. Um diese Berechnungen zur Normierung der t_{mig} und die anschließende Darstellung der N-Glykanfingerprints und Overlays zu vereinfachen, wurde ein Programm mit Hilfe der Software Matlab (Anhang I, Abschnitt 5) erstellt. Die in dieser Arbeit dargestellten N-Glykanfingerprints und Overlays wurden mit Hilfe von OriginLab (Version OriginPro 8) erstellt. Die normierten t_{mig} (Beschriftung x-Achse) wurden der Normierung mit Hilfe des Matlab Programms entnommen. Bei der Angabe der t_{mig} in bp handelt es sich demnach um normierte Werte, während die Werte der t_{mig} in min nicht normiert sind (z. B. t_{mig} in Abb. 4-3 A/B, 4-4 und 4-5).

Zur detaillierten Datenauswertung und Zuordnung von Strukturen wurden in den Elektropherogrammen der N-Glykanfingerprints Signale mit einer Intensität > 20 relativen Fluoreszenz Einheiten (RFU) durchnummeriert. Die Anzahl an Signalen in einem Fingerprint wird im Folgenden als Peakanzahl (PA) bezeichnet. Beim Vergleich von Fingerprints verschiedenen Ursprungs (z. B. HA N-Glykanfingerprints eines Virusstammes nach Replikation in verschiedenen Wirtszellsystemen) repräsentieren identische Peaknummern (Signale mit identischer t_{mig}) wahrscheinlich identische N-Glykanstrukturen.

Daten zur Signalintensität (Peakhöhe) und Peakfläche wurden durch Analyse der Rohdaten mit Hilfe der GenMapper-Software gewonnen. Höhen und Flächen der nummerierten Signale in den Elektropherogrammen wurden aufsummiert und der Wert 100 % gesetzt. Diese Werte werden als Gesamtpeakhöhe bzw. Gesamtpeakfläche bezeichnet. Die Peakhöhen und Peakflächen der betrachteten Signale in einem Fingerprint, sowie die Standardabweichungen wurden in % der Gesamtpeakhöhe bzw. Gesamtpeakfläche berechnet, also als relative Peakhöhen bzw. Peakflächen.

Generell ist für alle Auswertungen in Bezug auf die Peakhöhe und Peakfläche zu beachten, dass Vergleiche dieser Größen in den Fingerprints zwischen zwei Proben nur dann absolut erfolgen konnten, wenn diese innerhalb eines Probenvorbereitungslaufes (beginnend mit der SDS-PAGE) bearbeitet wurden. Zwischen Fingerprints von Proben, die aus verschiedenen Probenvorbereitungen resultierten, erfolgte die Auswertung bzw. der Vergleich der Peakhöhe und Peakfläche nur relativ zueinander.

4 ERGEBNISSE

4.1 *Aufreinigung und Aufkonzentrierung der Viruspartikel*

Die Aufreinigung und Konzentrierung der Influenza-Virus-Partikel erfolgte nach der Ernte (in Abhängigkeit von Zelllinie und Virus im Zeitraum von 40 -120 hpi, Abschnitt 3.2) direkt aus komplexem Zellkulturmedium (ca. 50 mL/Probe). Dazu wurde die Methode der stufenweisen *g*-Gradienten-Zentrifugation für den in MDCK-Zellen replizierten Influenza-A-Virus H1N1-RKI etabliert und optimiert [92]. Die im Abschnitt 3.3.2 beschriebene Reinigung und Aufkonzentrierung des Virus wurde mittels SDS-PAGE geprüft. Die Beurteilung erfolgte in Bezug auf den Anteil an Banden von Wirtszellproteinen und der Intensität der Virusproteinbanden, insbesondere der des HA₀. Die Aufreinigung sollte dabei in einem möglichst hohen Anteil an Virus- und geringen Anteil an Wirtszellproteinen resultieren. Um eine schonende und zerstörungsfreie Abtrennung von intakten Wirtszellen zu gewährleisten und damit die Freisetzung von Wirtszellproteinen und Enzymen zu vermeiden, erfolgte zunächst die Sedimentation der Zellen bei 100 *g*. Anschließend wurden in einem zweiten Schritt Zellbruchstücke durch Zentrifugation bei 4000 *g* aus der Probe entfernt. Erfolgte direkt danach die Pelletierung der Viruspartikel mittels Ultrazentrifugation, zeigte sich auf dem SDS-Gel ein überwiegender Anteil an Wirtszellproteinen. Die Banden der Virusproteine waren durch Überlagerungen und den intensiv gefärbten Hintergrund der Wirtszellproteine nicht eindeutig identifizierbar (Daten nicht gezeigt). Durch Einführung eines zusätzlichen Klärschrittes (10000 *g*) konnte der Anteil an verbleibenden Wirtszellproteinen deutlich reduziert werden. Die besten Ergebnisse wurden bei einer Dauer von 45 min erzielt. Das Pelletieren der Viruspartikel erfolgte zunächst bei 58000 *g* für 90 min. Eine Erhöhung auf 71000 *g* bei gleicher Zentrifugationsdauer resultierte in stabileren Viruspellets.

Die Aufreinigung und Aufkonzentrierung der Viruspartikel mit Hilfe der optimierten stufenweisen *g*-Gradienten-Zentrifugation wurde mittels SDS-PAGE verfolgt. Der Gesamtproteingehalt des ursprünglichen Zellkulturüberstands, der Pellets (resuspendiert in 10 mM Tris) nach jedem Aufreinigungsschritt und der Überstände, wurde, wie im Abschnitt 3.3.3 beschrieben, bestimmt. Es wurden jeweils 10 µg Gesamtprotein bzw. für die Überstände der Klärschritte (sehr geringer Proteingehalt) das maximale Probenvolumen von 30 µL pro Gelspur geladen. In Abbildung 4-1 ist das entsprechende kolloidal Coomassie gefärbte SDS-Gel dargestellt.

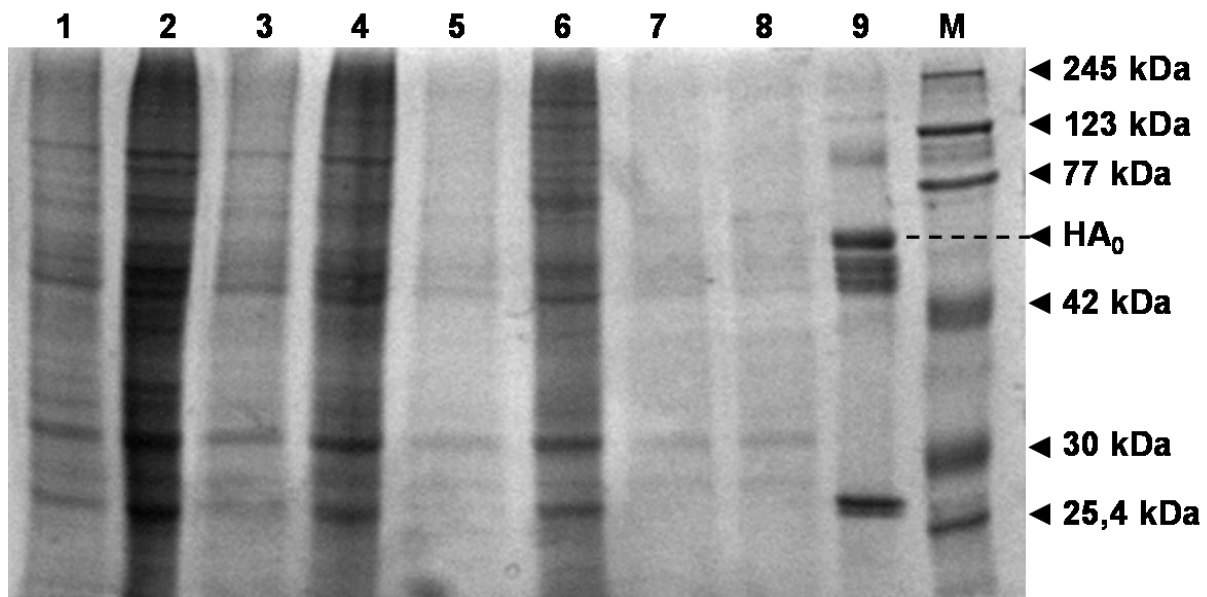


Abbildung 4-1: kolloidal Coomassie gefärbtes SDS-Gel zur Beurteilung der Aufreinigung von Viruspartikeln (H1N1-RKI; Ernte 72 hpi) aus Zellkulturüberstand (MDCK-Zellen in T175-Zellkulturflaschen) mittels stufenweiser *g*-Gradienten-Zentrifugation. In allen Fällen wurde die Zentrifugation bei 4°C durchgeführt. (1: Zellkulturüberstand; 2: Pellet nach 100 g; 3: Überstand nach 100 g; 4: Pellet nach 4000 g; 5: Überstand nach 4000 g; 6: Pellet nach 10000 g; 7: Überstand nach 10000 g; 8: Überstand nach 71000 g; 9: Viruspellet nach 71000 g; M: Molekulargewichtsstandard RotiMark).

Im Zellkulturüberstand (Abb. 4-1, Gelspur 1) und den Gelspuren der resuspendierten Pellets (Abb. 4-1, Gelspuren 2, 4 und 6) waren deutliche Banden über den gesamten Bereich des Molekulargewichtsstandards zu erkennen, von denen keine eindeutig den Virusproteinen zugeordnet werden konnte (überprüft via Molekulargewichtvergleich und LC-MS/MS-Analyse). Für alle drei Pellets der Aufreinigungsschritte zeigte sich ein sehr intensiver Hintergrund, der an Intensität von Stufe 1 zu 3 abnahm. In den Gelspuren 3, 5 und 7 (Abb. 4-1) sind die Überstände der jeweiligen Aufreinigungstufen aufgetragen. Es waren deutlich weniger Banden als im Zellkulturüberstand (Abb. 4-1, Gelspur 1) oder den Pellets (Abb. 4-1, Gelspuren 2, 4, 6) vor einem Hintergrund von geringer Intensität zu erkennen. Einige im Überstand nach 100 g sichtbare Banden konnten in den folgenden Überständen nach 4000 g und 10000 g nicht mehr zugeordnet werden. Weder in den Pellets noch Überständen der Aufreinigungsstufen konnten die Virusproteine eindeutig identifiziert werden (überprüft via Molekulargewichtvergleich und LC-MS/MS-Analyse). Der Überstand nach 71000 g war mit dem Überstand nach 10000 g vergleichbar. In der Gelspur 9 (Abb. 4-1) wurde eine Probe des erhaltenen Viruspellets aufgetragen. Vor einem wenig intensiven Hintergrund waren neben vier intensiven Banden < 77 kDa, vier weniger intensive Banden > 77 kDa zu erkennen. Um die entsprechenden Proteine eindeutig zu identifizieren, erfolgte die in Abschnitt 3.3.5 beschriebene LC-MS/MS-Analytik. Die Ergebnisse dieser Analyse werden im Abschnitt 4.2

beschrieben. Die optimierte stufenweise *g*-Gradienten-Zentrifugation wurde für die Aufreinigung und Aufkonzentrierung aller im Rahmen dieser Arbeit analysierten Zellkulturüberstände angewandt. Die Identifizierung der Virusproteine erfolgte i. d. R. einmalig pro Virusvariante. Dabei lag der Fokus auf der Identifizierung der jeweiligen HA₀-Bande (Abb. 4-1 und Abb. 4-2).

4.2 Identifizierung der Virusproteine mittels LC-MS/MS

Um eine eindeutige Identifizierung der Virusproteine zu gewährleisten, wurde die im Abschnitt 3.3.5 beschriebene LC-MS/MS-Analyse der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Virusproteine des H1N1-RKI, repliziert in MDCK-Zellen, durchgeführt. Die Gelbanden wurden ausgeschnitten und nach tryptischem Verdau der Analyse zugeführt. In Abbildung 4-2 sind den Gelbanden des Viruspellets (H1N1-RKI repliziert in MDCK-Zellen in T175-Zellkulturflaschen) die entsprechenden mittels LC-MS/MS identifizierten Proteine zugeordnet. In der Tabelle 4-1 sind die Ergebnisse der Datenbanksuche mit Hilfe von MASCOT™ zusammengefasst.

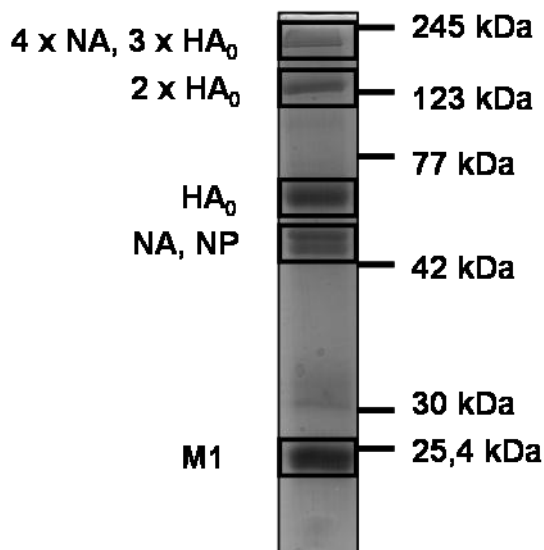


Abbildung 4-2: SDS-Gel des mittels stufenweiser *g*-Gradienten-Zentrifugation aus Zellkulturüberstand (MDCK-Zellen in T175-Zellkulturflaschen) aufgereinigten Influenza-A-Virus H1N1-RKI (Ernte 72 hpi). Die mittels LC-MS/MS analysierten Banden sind durch die schwarzen Rechtecke gekennzeichnet und die identifizierten Virusproteine beschriftet. (4x NA: Neuraminidase Tetramer; NA: Neuraminidase Monomer; 3 x bzw. 2x HA₀: Hämagglutinin Tri- bzw. Dimer; HA₀: Hämagglutinin Monomer; NP: Nukleoprotein; M1: Matrixprotein 1).

Tabelle 4-1: Mittels LC-MS/MS identifizierte Proteine des pelletierten Influenza-A-Virus H1N1-RKI (repliziert in MDCK-Zellen)

<i>Protein</i>	<i>Molekulargewicht in Da⁺ [Angabe aus MASCOT Datenbank]</i>	<i>NCBI Nr Nummer</i>	<i>MASCOT/MOWSE „protein score“^{**}</i>
4x NA	4x 50111	gi 8486128	256
3x HA ₀	3x 63341	gi 8486126	95
2x HA ₀	2x 63341	gi 8486126	126
HA ₀	63341	gi 8486126	174
NA	50111	gi 8486128	205
NP	56134	gi 8486126	252
M1	27875	gi 8486126	467

⁺: Molekulargewichte (komplett inkl. Glykanstrukturen falls vorhanden) veröffentlicht und hinterlegt in MASCOT Datenbank

^{*}: MASCOT/MOWSE score: Angabe des scores bezieht sich auf Wahrscheinlichkeiten bzw. wie unwahrscheinlich ein falsch positives Ergebnis ist. Mit einem Score > 70 ist das Protein sicher identifiziert.

Den in Abbildung 4-2 markierten Banden konnten die in Tabelle 4-1 aufgeführten Virusproteine eindeutig zugeordnet werden. Dabei enthielt die oberste Bande das, aufgrund ihres ähnlichen Molekulargewichts, nicht aufgetrennte NA-Tetramer und das HA₀-Trimer.

Anhand dieser Zuordnung wurde in den darauffolgenden Experimenten mit Hilfe des Molekulargewichtsstandards jeweils die Bande des HA₀ ausgeschnitten und der N-Glykananalytik zugeführt.

Die Identifizierung der aus den untersuchten Kombinationen von verschiedenen Influenza-Viren und Wirtszellen hervorgegangenen HA₀-Banden wurden nach ihrer Deglykosylierung mittels LC-MS/MS analysiert und identifiziert. Damit wurde die Identität des jeweiligen HA₀ bestätigt und die Betrachtung der entsprechenden HA N-Glykane garantiert.

4.3 Detektionslimit der CGE-LIF

Das Detektionslimit und der lineare Bereich der CGE-LIF-Methode zur Auftrennung und Detektion APTS-konjugierter N-Glykane wurde anhand einer Verdünnungsreihe des Fluoreszenzfarbstoffes APTS (Abschnitt 3.3.10) bestimmt (dreifach Wiederholung). Die Analysen wiesen einen linearen dynamischen Bereich über drei Zehnerpotenzen in einer Größenordnung von 2 pmol/L bis 2 nmol/L auf. Das Detektionslimit wurde auf 5 fmol/L bestimmt. Daten von Proben mit einem APTS Gehalt > 5 nmol/L konnten aufgrund von Detektorsättigung ab ca. 9000 RFU nicht ausgewertet werden.

4.4 Etablierung der N-Glykananalytik und Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der CGE anhand von bovinem Serum IgG

Zur Etablierung der Methoden In-Gel-Deglykosylierung, der anschließenden Extraktion der N-Glykane und deren Labelingreaktion mit APTS, sowie die Auftrennung und Detektion der N-Glykane mittels CGE-LIF, wurde bovines Serum IgG in Anlehnung an [223] nach dem in Abbildung 3-1 dargestellten Verfahren prozessiert (Abschnitt 3.3.6 bis 3.3.10). Die extrahierten und APTS-konjugierten N-Glykane wurden mittels SEC entsalzt und der CGE-LIF-Analyse zugeführt. Der daraus resultierende N-Glykanfingerprint des IgG ist in Abbildung 4-3 A dargestellt (t_{mig} nicht normiert und in min) und wurde mit bereits publizierten Daten (Abb. 4-3 B) verglichen. Deutlich waren in beiden Elektropherogrammen vier intensive Signale zu erkennen, die in ihrer Intensität und dem Verhältnis zueinander, vergleichbar waren. Diese vier übereinstimmenden Signale wurden in den jeweiligen Elektropherogrammen (Abb. 4-3A und B) mit I-IV markiert.

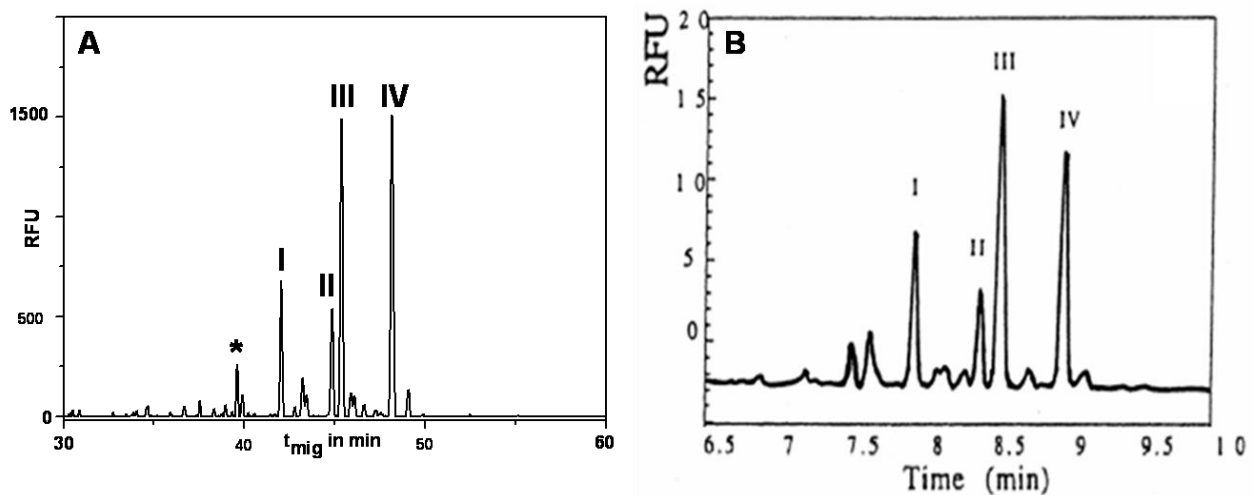
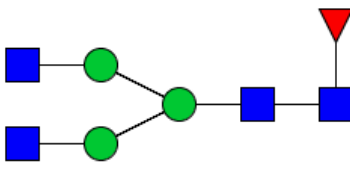
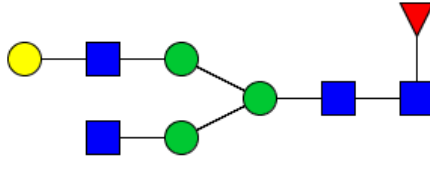
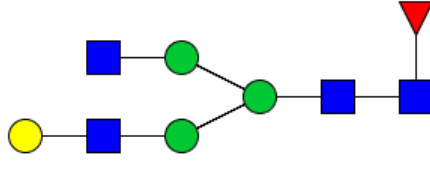
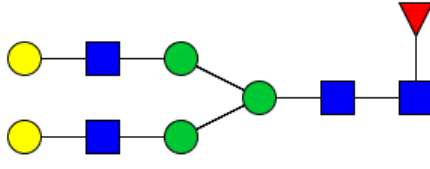


Abbildung 4-3: Elektropherogramme von APTS-konjugierten N-Glykanen des bovinen Serum IgG (A) CGE-LIF-Elektropherogramm nach der in Abbildung 3-1 dargestellten N-Glykananalytik; der mit * markierte Peak wurde für die Beurteilung der Reproduzierbarkeit der CGE-LIF Methode herangezogen, t_{mig} nicht normiert (B) CE-LIF-Elektropherogramm publiziert von Raju *et al.* 2000 [226]; in beiden Elektropherogrammen vorhandene Signale wurden mit I-IV markiert. Die entsprechenden N-Glykanstrukturen sind in der Tabelle 4-2 dargestellt.

Tabelle 4-2: N-Glykanstrukturen des IgG, die identifiziert wurden und mit den Literaturangaben von Raju *et al.* übereinstimmen [226]

<i>Peaknummer</i>	<i>Struktur</i>
I	
II	
III	
IV	

Um die Identität dieser Strukturen zu bestätigen, wurden dem N-Glykanpool des IgG, die von Raju *et al.* identifizierten APTS-konjugierten N-Glykane I und IV einzeln zugespikt (Abschnitt *Spike-Experimente*). Anschließend wurde erneut der Fingerprint des N-Glykanpools mittels CGE-LIF aufgenommen. Bei Übereinstimmung der im N-Glykanpool des IgG enthaltenen Strukturen mit den zugespikten (Strukturen aufgeführt im Anhang Tabelle I-4; Reinheit der Standards mittels CGE-LIF überprüft), sollten sich in den resultierenden Elektropherogrammen die Intensität der entsprechenden Signale erhöhen und keine zusätzlichen Signale erkennbar sein. In Abbildung 4-4 ist das Elektropherogramm des Spike-Experiments mit der Struktur I dargestellt. Die Erhöhung des Signals der entsprechenden Struktur im Vergleich zu der ungespikten Proben (Abb. 4-3 A) war deutlich zu erkennen. Die N-Glykane I-IV, in dem nach der Methode in Abbildung 3-1 erhaltenen N-Glykanpool des IgG, konnten anhand der Spike-Experimente eindeutig identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

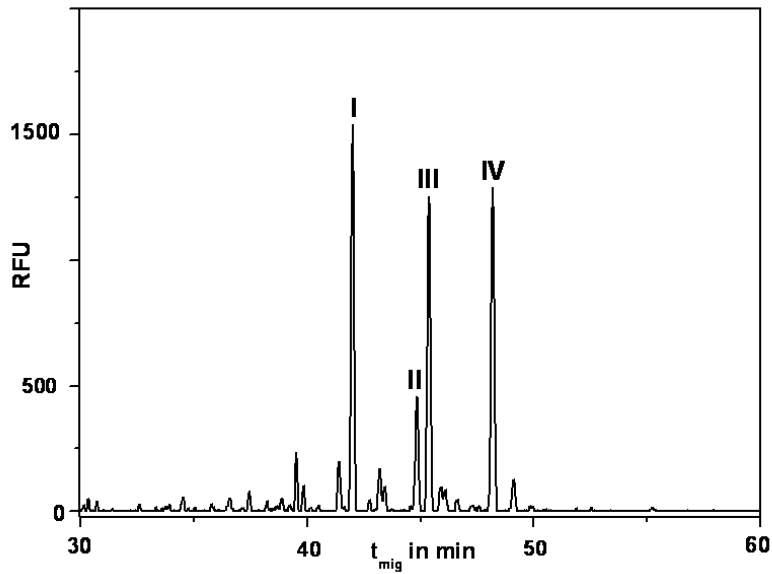


Abbildung 4-4: CGE-LIF-Elektropherogramme von APTS-konjugierten N-Glykanen des bovinen Serum IgG gespikt mit der Struktur I (Tabelle 4-2), t_{mig} nicht normiert

Im Gegensatz zu Raju *et al.* waren weitere Signale im Fingerprint des IgG Basislinien getrennt aufgelöst. Diese konnten mit Hilfe von weiteren Spikeexperimenten (Daten nicht gezeigt) und bereits veröffentlichten Ergebnissen, erhoben mit HPLC-Analysen [76], identifiziert werden. In Abbildung 4-5 ist der Fingerprint der IgG N-Glykane mit den identifizierten Strukturen dargestellt.

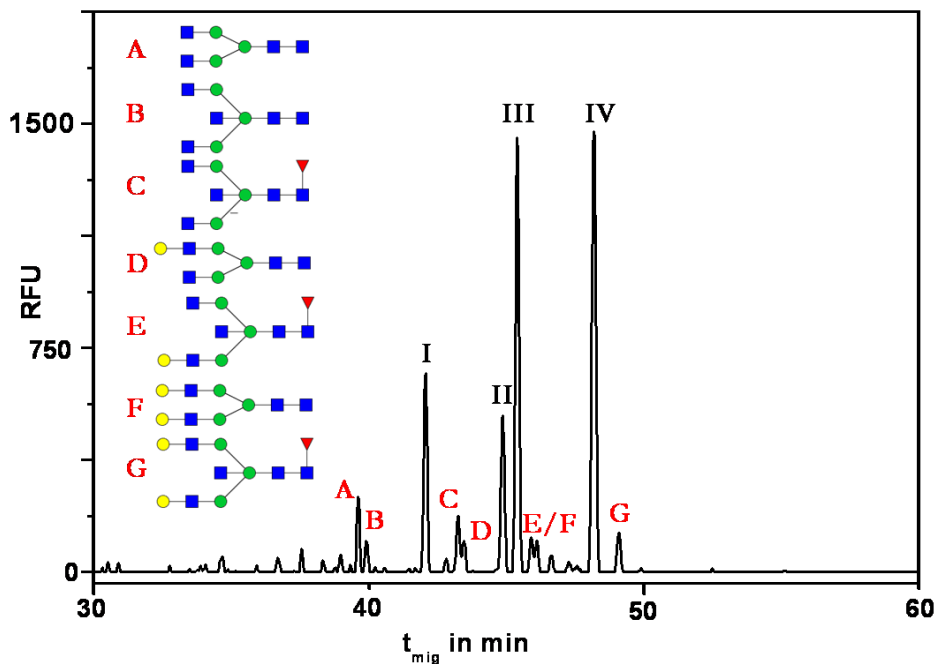


Abbildung 4-5: CGE-LIF-Elektropherogramm von APTS-konjugierten N-Glykanen des bovinen Serum IgG. Die mit Hilfe von Spike-Experimenten identifizierten und aus der Literatur bekannten N-Glykanstrukturen sind mit I-IV und A-G markiert. Die Strukturen der N-Glykane A-G sind in dieser Abbildung aufgeführt. Die Strukturen I – IV sind der Tabelle 4-2 zu entnehmen. t_{mig} nicht normiert

Die CGE-LIF-Methode zur N-Glykananalyse wurde anschließend auf ihre Reproduzierbarkeit hinsichtlich der Signalintensitäten (relative Peakhöhe) und t_{mig} (nicht normiert) untersucht. Dazu wurde ein N-Glykanpool des bovinen Serum IgG dreimal unabhängig voneinander analysiert. Zur Datenauswertung wurden die vier identifizierten Peaks (I-IV) und ein zusätzlicher Peak (Abb. 4-3 A, markiert mit *) seriell nummeriert. Die relativen Peakhöhen dieser fünf berücksichtigten Peaks und ihre Standardabweichungen (SD) wurden in % der Gesamtpeakhöhe (Abschnitt 3.3.12) ermittelt. Dabei ergaben sich für die relativen Peakhöhen SD von 0,3 % bis 1,18 %. Zusätzlich wurde die Reproduzierbarkeit der t_{mig} dieser fünf Peaks bewertet. Hier lagen die SD zwischen 0,0125 min und 0,0296 min. Mit einer durchschnittlichen SD der relativen Peakhöhen von $\pm 0,67$ % und der t_{mig} von $\pm 0,0194$ min konnte eine hohe Reproduzierbarkeit der CGE-LIF gezeigt werden. Dies gilt für Analysen, die mit dem selben Kapillararray durchgeführt wurden.

Bei darauf folgenden Experimenten zur Analyse des N-Glykosylierungsmusters des Influenza-Virus HA wurde zur Kontrolle der Methodendurchführung bovines Serum IgG jeweils einmal mitgeführt. Mit Hilfe der dabei generierten Daten wurde die Langzeitreproduzierbarkeit (über mehrere Monate, berücksichtigt wurden 10 Trennungen von N-Glykanen des bovinen Serum IgG) der CGE-LIF Methode untersucht. Die Analyse der entsprechenden Elektropherogramme ergab für die relativen Peakhöhen der fünf betrachteten Peaks eine SD $< 0,5$ %, für die Peakflächen $< 0,65$ % und für die t_{mig} eine SD $< 0,08$ min. Anhand dieser Ergebnisse konnte, sowohl kurz- als auch langfristig betrachtet, eine hohe Reproduzierbarkeit der CGE-LIF-Methode gezeigt werden.

Die Funktionalität und Reproduzierbarkeit des in Abbildung 3-1 dargestellten Arbeitsablaufes zur N-Glykananalyse konnte somit bestätigt werden. In folgenden Experimenten wurde diese Methode zur Analyse der N-Glykosylierung von zellkulturbasiertem Influenza-Virus HA angewandt. Es wurden unter anderem die Reproduzierbarkeit der Probenvorbereitung und des USP, die Stammspezifität der HA N-Glykosylierung und deren Wirtszellabhängigkeit untersucht.

4.5 Reproduzierbarkeit der Probenvorbereitung

Nach Etablierung der N-Glykananalysemethode mit Hilfe von bovinem Serum IgG wurde die Reproduzierbarkeit der Probenvorbereitung für die Analyse der N-Glykosylierung des Influenza-Virus HA betrachtet. Es wurde dabei die Probenvorbereitung über die gesamte Methode, beginnend bei der stufenweisen g-Gradienten-Zentrifugation untersucht. Dazu

wurden MDCK-Zellen in zwei Rollerflaschen kultiviert und mit human-Influenza-A-Virus H1N1-RKI bzw. H3N2 infiziert (Abschnitt 3.2). Die Virusernte (jeweils 72 hpi) wurde in drei Proben gleichen Volumens (ca. 50 mL) aliquotiert und diese parallel bearbeitet. Die Aufreinigung und Konzentrierung des Virus aus den insgesamt sechs Rollerflaschenaliquots wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Auf den entsprechenden SDS-Gelen zeigte sich sowohl für den H1N1-RKI als auch den H3N2-Virus eine gute Qualität der Aufreinigung (Daten nicht gezeigt), vergleichbar mit der in Abbildung 4-2 dargestellten. Neben einigen Wirtszellproteinen waren in allen Proben dominierende Banden der Virusproteine zu erkennen. Die Aufreinigung und Aufkonzentrierung mittels stufenweiser *g*-Gradienten-Zentrifugation konnte für beide untersuchten Virusstämme als reproduzierbar betrachtet werden.

Die Banden des nicht reduzierten HA₀ des H1N1-RKI wurden über das Molekulargewicht mittels LC-MS/MS zugeordnet (Abb. 4-2 und Tabelle 4-1). Zusätzlich erfolgte nach der Deglykosylierung für eine HA₀-Bande (Rollerflaschenaliquot 2) die LC-MS/MS-Analyse (Abschnitt 3.3.5) zur eindeutigen Identifizierung.

Im Falle des H3N2 wurde aus dem SDS-Gel der drei Aliquots jeweils die dominante Bande zwischen 70 kDa und 100 kDa ausgeschnitten und prozessiert. Nach der Extraktion der N-Glykane erfolgte der tryptische Verdau des im Gel verbliebenen und deglykosylierten Proteins und ebenfalls die Analyse der Peptide mittels LC-MS/MS (Abschnitt 3.3.5). Für alle drei Aliquots wurde das Protein als HA identifiziert. In allen betrachteten Fällen (H1N1-RKI und H3N2) bestätigten die MS/MS-Spektren, dass die deglykosylierten Banden ausschließlich HA enthielten und keine co-migrierenden Wirtszellproteine.

Nach Konjugation der Oligosaccharide mit APTS und deren Aufreinigung mittels SEC erfolgte die Identifizierung der N-glykanhaltigen Fraktionen mit Hilfe des Laserscanners Typhoon TRIO Variable Mode Imager. Anschließend wurden diese Fraktionen gepoolt. Die Identifizierung ist beispielhaft in Abbildung 4-6 für die Identifizierung der N-glykanhaltigen Fraktionen des HA₀ des H1N1-RKI dargestellt.

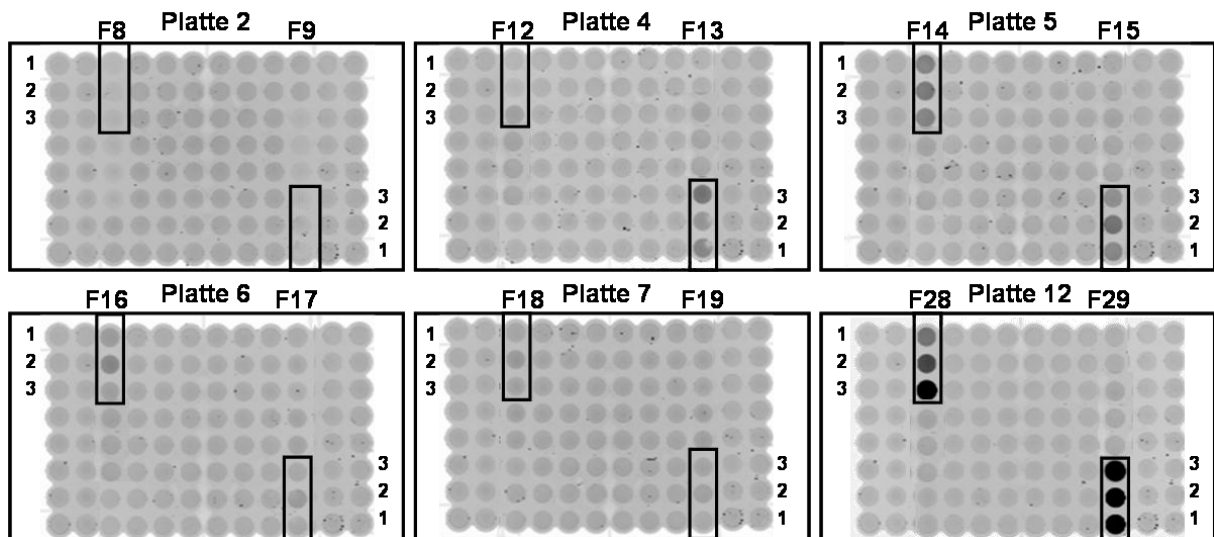


Abbildung 4-6: Ausgewählte 96-Well-Klarbodenplatten, eingescannt mit einem Typhoon Laserscanner nach der SEC; Wells, die Fraktionen der Proben 1-3 (Rollerflaschenaliquots 1-3 des H1N1-RKI, repliziert in MDCK-Zellen) enthalten, sind durch die schwarzen Rechtecke markiert. Ein hellgrauer Farbton wie für die Fraktionen F8, 9, 17, 18 und 19 bedeutet, dass keine APTS-konjugierten N-Glykane in diesen Fraktionen enthalten sind. Mit zunehmendem Gehalt an APTS-konjugierten N-Glykanen in den jeweiligen Fraktionen nimmt die Intensität der Graufärbung zu (Fraktionen F12-16). Wells, die nahezu schwarz erscheinen (Platte 12, Fraktionen F28 und F29), enthalten Fraktionen, die fast ausschließlich APTS enthalten am Ende der SEC, wenn der APTS-Überschuss der Labelingreaktion, abgetrennt von den APTS-konjugierten N-Glykanen, eluiert.

Die aufkonzentrierten HA N-Glykanpools wurden mittels CGE-LIF analysiert. Die Fingerprints der jeweils drei Rollerflaschenaliquots sind mit normierten t_{mig} (norm. t_{mig}) in Abbildung 4-7 A und B dargestellt. Zur Bewertung der Reproduzierbarkeit der Probenvorbereitung wurden Anzahl, Höhe, Fläche sowie die norm. t_{mig} der Peaks in den Fingerprints der jeweils drei Rollerflaschenaliquots herangezogen. Die Werte für die relativen Peakhöhen, -flächen und norm. t_{mig} resultierten aus den Auswertungen der Rohdaten unter Verwendung der GenMapper Software und in Bezug auf den Gene Scan TM-500 Rox Size Standard. Um die Anzahl der Peaks zu ermitteln, wurden die in den Elektropherogrammen des H1N1-RKI dominanten Peaks (RFU > 20) und in denen des H3N2 alle von der Software erfassten Peaks durchnummeriert. Dies ist beispielhaft für Rollerflaschenaliquot 2 des HA N-Glykanfingerprints des H1N1-RKI in Abbildung 4-8 dargestellt.

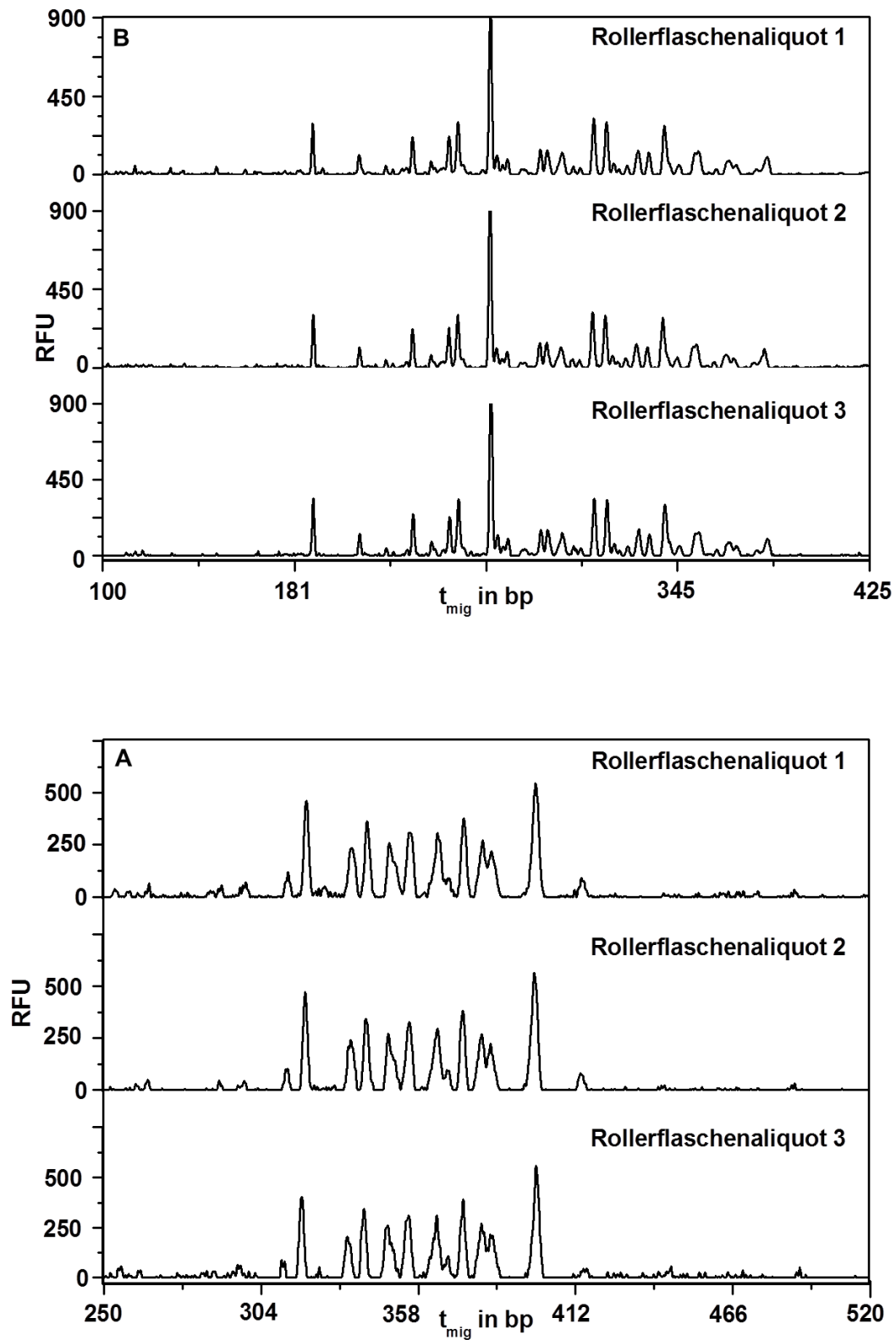


Abbildung 4-7: geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprints der drei Rollerflaschenaliquots von (A) H1N1-RKI und (B) H3N2 jeweils repliziert in MDCK-Zellen

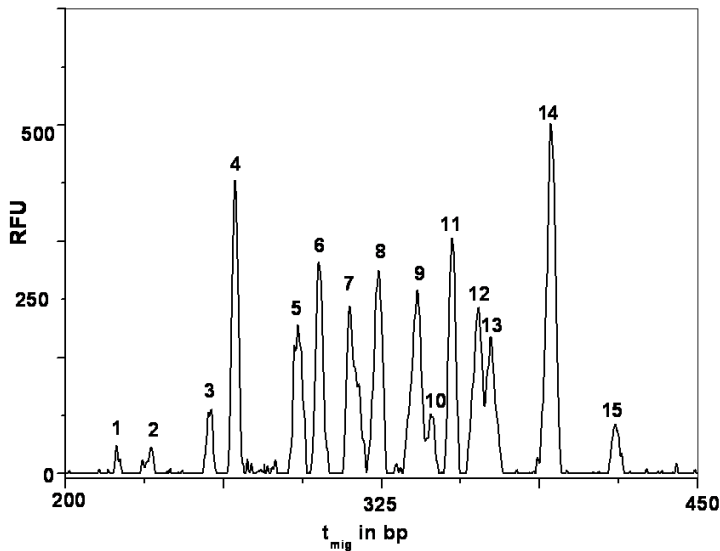


Abbildung 4-8: Ausschnitt aus dem HA N-Glykanfingerprint des H1N1-RKI repliziert in MDCK-Zellen (Rollerflaschenaliquot 2); dominante Peaks sind durchnummeriert

Höhen und Flächen der nummerierten Peaks in den HA N-Glykanfingerprints des H1N1-RKI bzw. H3N2 wurden aufsummiert und als 100 % der Gesamtpeakhöhe bzw. Gesamtpeakfläche gesetzt. Für jeden der einzelnen in den Fingerprints nummerierten Peaks wurde die individuelle Höhe und Fläche in Prozent der Gesamtpeakhöhe bzw. -fläche berechnet. Die Mittelwerte über die jeweils drei Höhen bzw. Flächen der einzelnen Peaks wurde gegen die Peaknummer aufgetragen. Die Fehlerbalken geben dabei die jeweiligen Standardabweichungen der relativen Peakhöhen bzw. -flächen an. In Abbildung 4-9 A und B ist dieses Vorgehen beispielhaft für die Peakflächen des H1N1-RKI und die Höhen des H3N2 dargestellt.

Eine gute Reproduzierbarkeit der Probenvorbereitung konnte für beide Virusstämme in Bezug auf die PA sowie deren Höhen und Flächen gezeigt werden. Die PA war in den jeweils drei Rollerflaschenaliquots des H1N1-RKI bzw. H3N2 identisch. Die mittleren SD (Mittelwert aus den SD der Dreifachbestimmung der einzelnen Peaks) der relative Peakhöhen betragen $\pm 0,35$ % (H1N1-RKI) bzw. $\pm 0,12$ % (H3N2). Für die Peakflächen ergaben sich als mittlere Standardabweichungen $\pm 0,63$ % (H1N1-RKI) bzw. $\pm 0,15$ % (H3N2).

Zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit der t_{mig} , wurden die Rohdaten in Bezug auf den Gene Scan TM-500 Rox Size Standard mit Hilfe linearer Regression (Polynom 2. Ordnung; Abschnitt 3.3.12) normiert. Die t_{mig} der einzelnen HA N-Glykanpeaks in den jeweils drei Fingerprints der Rollerflaschenaliquots des H1N1-RKI bzw. H3N2 wurde in die entsprechende norm. t_{mig} in bp konvertiert (in Bezug auf die lineare Regression). Aus den resultierenden SD für die norm. t_{mig} der einzelnen Peaks des H1N1-RKI wurde eine mittlere SD von $\pm 0,26$ bp und für den H3N2 von $\pm 1,19$ bp berechnet.

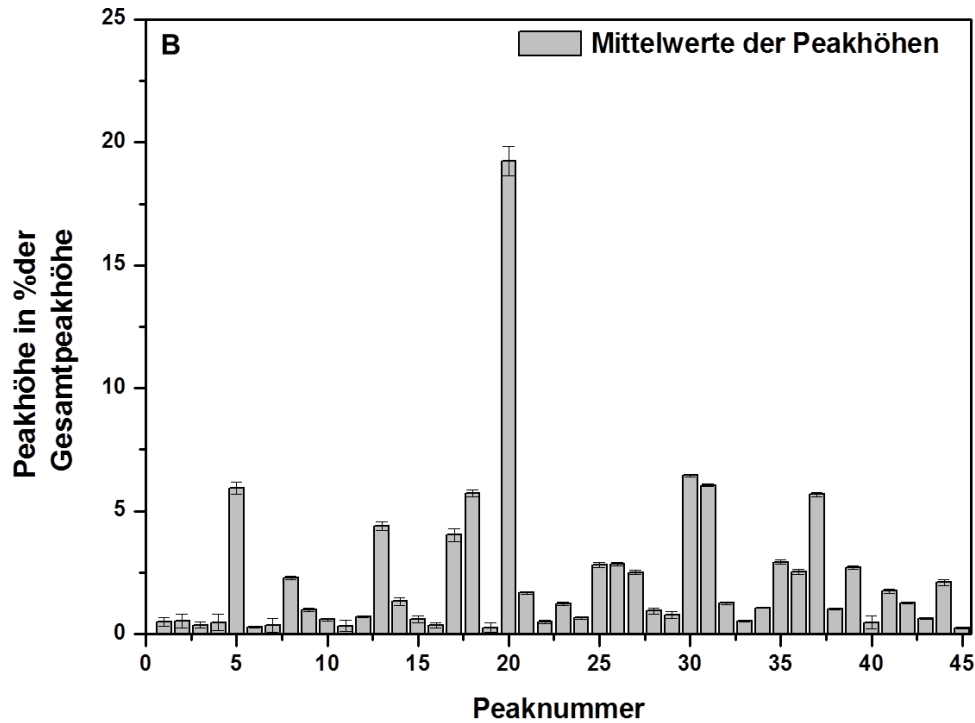
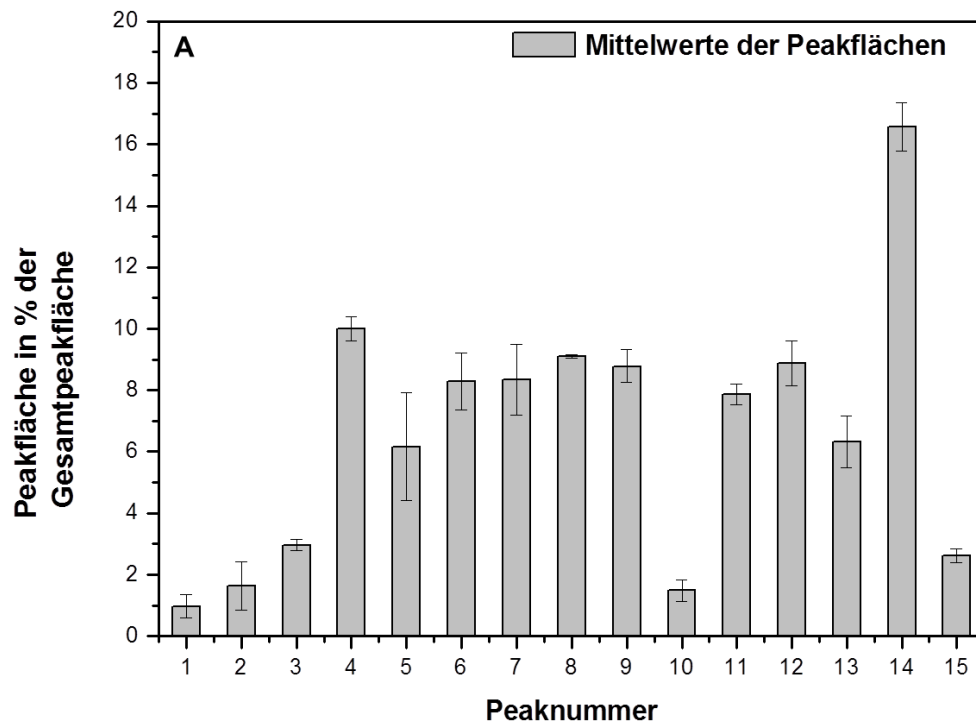


Abbildung 4-9: Mittelwerte der (A) Peakflächen der dominanten Peaks im HA N-Glykanfingerprint des H1N1-RKI aufgetragen gegen die Peaknummer; (B) relative Peakhöhen der dominanten Peaks im HA N-Glykanfingerprint des H3N2 aufgetragen gegen die Peaknummer

Anhand der ermittelten Daten konnte für beide Stämme eine mehr als zufriedenstellende Reproduzierbarkeit der einzelnen Methoden (stufenweise *g*-Gradienten-Zentrifugation, SDS-PAGE, In-Gel-Deglykosylierung, Labeling, SEC, CGE-LIF) innerhalb des entwickelten Workflow zur N-Glykananalytik demonstriert werden. Für den gesamten Workflow konnte ebenfalls für beide Stämme, in Bezug auf PA, norm. t_{mig} sowie relative Höhen und Flächen der betrachteten Peaks, eine hervorragende Reproduzierbarkeit der gesamten Probenvorbereitung und der anschließenden Analytik gezeigt werden. Sowohl für die Peakflächen als auch die relativen Peakhöhen wurde im Vergleich der beiden Stämme eine etwas geringere mittlere SD für die Peaks in den Fingerprints des H3N2 ermittelt. Die mittlere SD der norm. t_{mig} für die Peaks des H1N1-RKI lag deutlich unterhalb der des H3N2.

Nachdem in diesen Fällen jeweils drei Aliquots aus einem Batch verwendet wurden, wurde die entwickelte Methode auf Proben aus drei verschiedenen Batches dieser beiden Virusstämme angewandt. Die Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt beschrieben.

4.6 Charakterisierung der Batch-to-Batch Reproduzierbarkeit

MDCK-Zellen wurden zweimal in jeweils drei T175-Zellkulturflaschen parallel kultiviert und mit Influenza-A-Virus H1N1-RKI bzw. Influenza-A-Virus H3N2 infiziert (Abschnitt 3.2). Für die N-Glykananalytik wurde pro Zellkulturflasche jeweils eine Probe genommen (72 hpi, ca. 50 mL) und nach dem in Abbildung 3.2 (Abschnitt 3.3.2- 3.3.10) dargestellten Workflow prozessiert. Die Aufreinigung und Konzentrierung der Viruspartikel mittels stufenweiser *g*-Gradienten-Zentrifugation, die SDS-PAGE und die Identifikation der N-glykanhaltigen SEC Fraktionen, ergab reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse für die jeweils drei Proben (H1N1-RKI und H3N2), wie sie schon für die jeweiligen drei Rollerflaschenaliquots beobachtet wurden (Daten nicht gezeigt). Mittels CGE-LIF wurden die Fingerprints der jeweils drei HA N-Glykanpools des H1N1-RKI und H3N2 aufgenommen. Wie zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Probenvorbereitung wurden auch zur Charakterisierung der Batch-to-Batch Reproduzierbarkeit die Fingerprints der jeweils drei parallelen Batches (aus T175-Zellkulturflaschen) hinsichtlich der PA, relativen Peakhöhe, relativen Peakfläche und norm. t_{mig} verglichen. Die Datenauswertung erfolgte dabei wie in den Abschnitten 3.3.12 und 4.5 beschrieben. Die entsprechenden Elektropherogramme der jeweils drei Batches sind als geschifteter Overlay in Abbildung 4-10 A und B dargestellt.

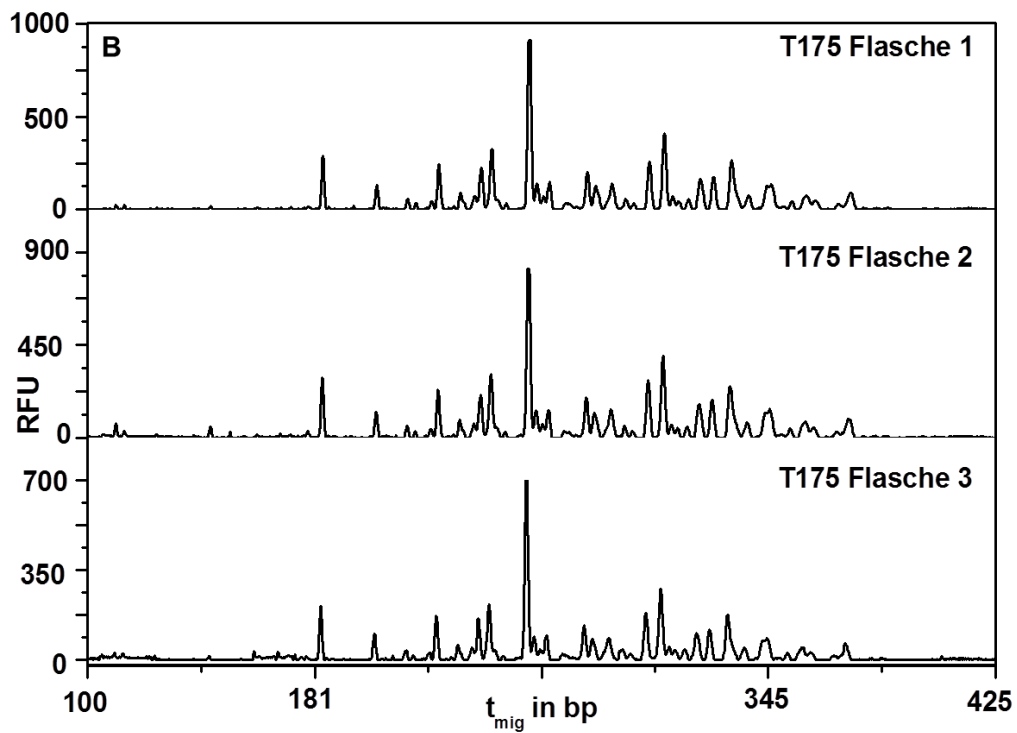
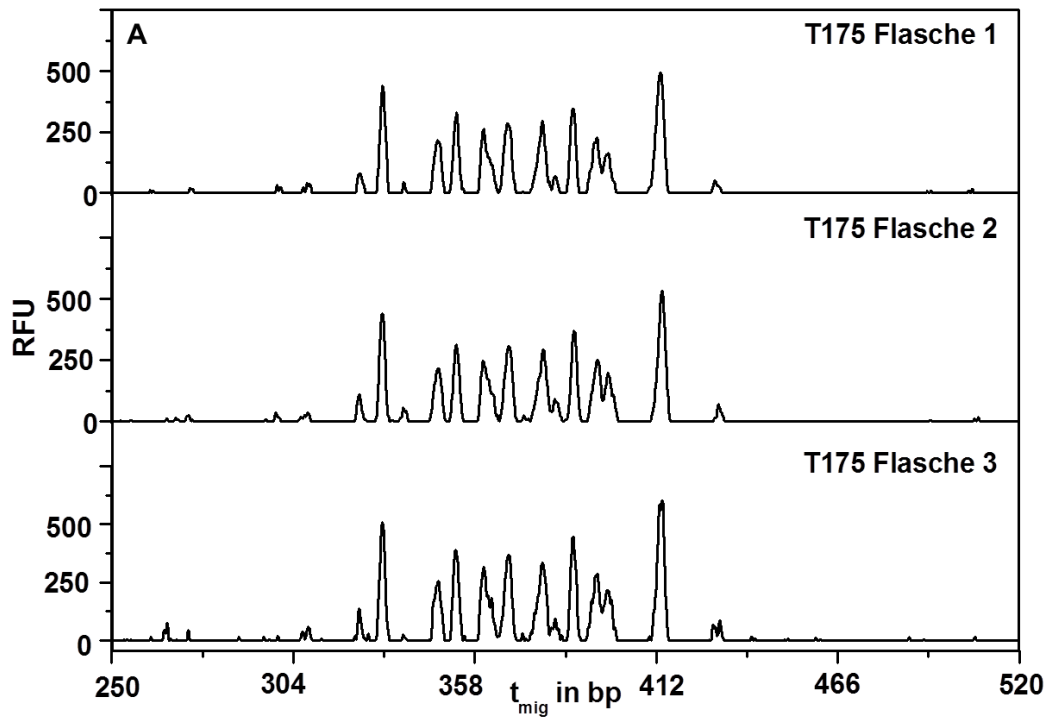


Abbildung 4-10: geschichteter Overlay der HA N-Glykanfingerprints der drei Proben aus den parallelen T175-Flaschen von (A) H1N1-RKI und (B) H3N2 jeweils repliziert in MDCK-Zellen

Es ergab sich für die jeweiligen drei Fingerprints der beiden Virusstämme eine identische PA, die auch in den entsprechenden Rollerflaschenaliquots ermittelt wurde. Wie schon für die Probenvorbereitung wurde auch zwischen den jeweils drei Batches der beide Virusstämme eine gute Reproduzierbarkeit hinsichtlich der relativen Peakhöhen (mittlere SD H1N1-RKI: $\pm 0,47$ % und H3N2: $\pm 0,11$ %) und -flächen (mittlere SD H1N1-RKI: $\pm 0,93$ % und H3N2: $\pm 0,11$ %) berechnet (Daten nicht gezeigt). Eine vergleichbare Reproduzierbarkeit ergab sich für die norm. t_{mig} der Peaks in den jeweiligen Fingerprints beider Stämme mit einer mittleren SD von $\pm 0,19$ bp für den H1N1-RKI und $\pm 0,54$ bp für den H3N2.

Anhand dieser Ergebnisse kann auf eine Reproduzierbarkeit des USP in Bezug auf die N-Glykosylierung geschlossen werden, da in jeweils drei Batches von zwei Virusstämmen vergleichbare Fingerprints mit relativ geringen mittleren SD in Bezug auf relativen Peakflächen, -höhen und deren norm. t_{mig} erhalten wurden. Im Vergleich zu den Ergebnissen, die für die Rollerflaschenaliquots ermittelt wurden, ergaben sich hier ebenfalls etwas geringere mittlere SD für die relativen Peakflächen und -höhen für den H3N2 als für den H1N1-RKI. Die mittleren SD der norm. t_{mig} der Peaks in den Fingerprints des H1N1-RKI lagen, sowohl für die Rollerflaschenaliquots als auch die drei betrachteten Batches in T175-Zellkulturflaschen, unterhalb denen des H3N2.

Die durchgeführten Betrachtungen ergaben weiterhin, dass die Produktion von Influenza-A-Virus (H1N1-RKI und H3N2) mit Hilfe von MDCK-Zellen in Roller- bzw. T175-Zellkulturflaschen hinsichtlich PA, relativen Peakhöhen, relativen Peakflächen und norm. t_{mig} in identischen und reproduzierbaren HA N-Glykanfingerprints resultiert.

4.7 Einfluss der Wirtszelllinie und des Virusstamms auf das N-Glykosylierungsmuster des Influenza-Virus HA

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der verwendeten Wirtszelllinie auf die HA N-Glykosylierung von zwei verschiedenen Influenza-A-Stämmen (H1N1-RKI und H3N2) untersucht. Die Virusreplikation fand dazu in drei verschiedenen tierischen (MDCK (Hund), Vero (Affe) und AGE1.CR (Ente)) Zelllinien und zwei humanen Krebszelllinien (A549 und HepG2) statt. Zusätzlich wurde der H3N2 Virus in lektinresistenten RCAR-Zellen (mutierte MDCK-Zelllinie) [93] repliziert. Diese Zellen tragen einen Defekt im UDP-Galaktose-Transporter im Golgikomplex und sind daher nicht in der Lage, Galaktose und Sialinsäure in Glykane zu integrieren [227].

Des Weiteren wurde der Influenza-B-Virusstamm B/Mal in MDCK-Zellen repliziert, um

einen Vergleich des HA N-Glykosylierungsmusters von Influenza-Viren des Typs A und B zu ermöglichen.

Alle sechs Zelllinien wurden unter vergleichbaren Bedingungen in Zellkulturflaschen (T-Flaschen) kultiviert und infiziert (Abschnitt 3.2). Anschließend wurden jeweils ca. 50 mL Zellkulturüberstand als Probe für die N-Glykananalytik genommen. Der Zeitpunkt der Probenahme nach Infektion war dabei abhängig von der jeweiligen Kombination von Zelllinie und Virus (Abschnitt 3.2). Die Proben wurden nach der in Abbildung 3.2 dargestellten Methodik prozessiert. Die HA N-Glykosylierung der einzelnen Virusvarianten wurde hinsichtlich des allgemeinen N-Glykosylierungsmusters (Fingerprint), der PA verschiedener N-Glykane im Fingerprint sowie Gemeinsamkeiten und Unterschieden in den N-Glykantypen und Strukturen bewertet. Um eine detailliertere Charakterisierung der N-Glykanstrukturen zu ermöglichen, wurden die HA N-Glykanpools sequentiell mit Exoglykosidasen verdaut (Abschnitt *Sequentieller Exoglykosidase-Verdau*).

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

4.7.1 Einfluss der Wirtszelllinie auf die HA N-Glykosylierung des Influenza-A-Virus H1N1-RKI

Der Einfluss der Wirtszelllinie auf das HA N-Glykosylierungsmuster des Influenza-A-Virus H1N1-RKI sollte analysiert werden. Dazu wurde der H1N1-RKI Virus in MDCK-, Vero-, AGE1.CR-, A549-, HepG2-Zellen und RCAR-Zellen repliziert und die HA N-Glykanfingerprints mittels CGE-LIF aufgenommen. Im Folgenden wird der in den verschiedenen Wirtszelllinien replizierte Influenza-A-Virus H1N1-RKI (in folgenden Abschnitten auch Influenza-A-Virus H3N2 und Influenza B/Mal) als Variante in Bezug auf den jeweiligen Wirt, d. h. M-Variante (repliziert in MDCK-Zellen), V-Variante (repliziert in Vero-Zellen), C-Variante (repliziert in AGE1.CR Zellen), A-Variante (repliziert in A549-Zellen), H-Variante (repliziert in HepG2-Zellen) und R-Variante (repliziert in RCAR-Zellen), bezeichnet.

Nach Auftrennung der viralen Proteine mittels SDS-PAGE konnten eindeutige Unterschiede im Molekulargewicht des HA der einzelnen Varianten des H1N1-RKI beobachtet werden (Abb. 4-11). In dieser Abbildung sind neben den Varianten des H1N1-RKI auch die verschiedenen Varianten des H3N2 (M-, V- und R-Variante) und des in MDCK-Zellen replizierten B/Mal dargestellt, deren N-Glykosylierungsmuster in den folgenden Abschnitten betrachtet werden.

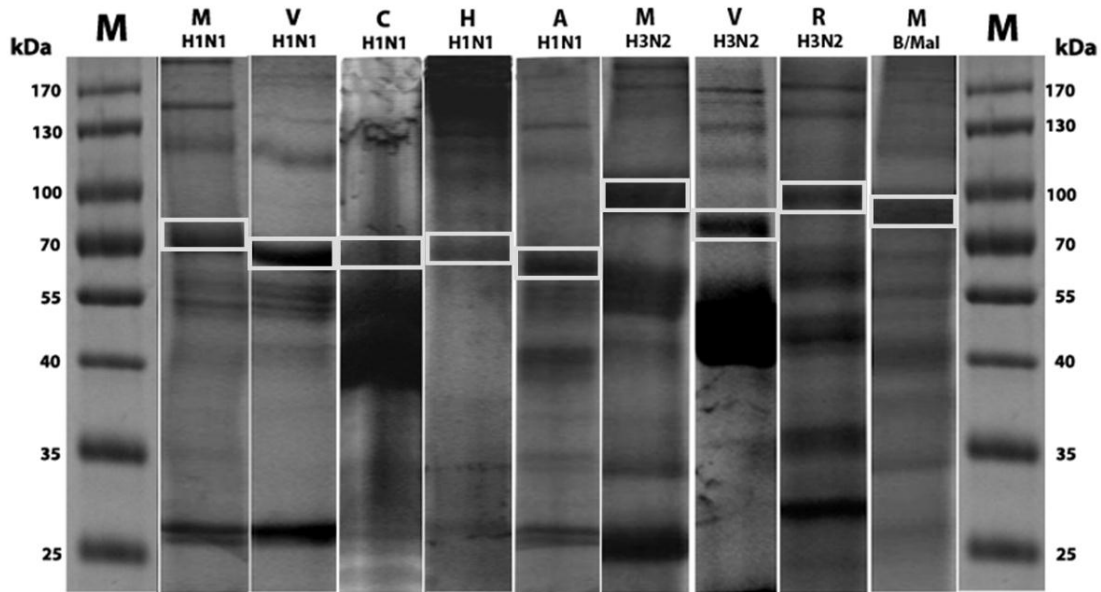


Abbildung 4-11: SDS-PAGE (Gelspuren von links nach rechts, wobei die erste und letzte Spur der Molekulargewichtsstandard (M) in kDa enthält) der M- (M H1N1), V- (V H1N1), C- (C H1N1), A- (A H1N1) und H- (H H1N1) Variante des human-Influenza-A-Virus H1N1-RKI; M- (M H3N2), V- (V H3N2) und R- (R H3N2) Variante des human-Influenza-A-Virus H3N2 und die M-Variante des human Influenza-Virus B/Mal (M B/Mal); die Rechtecke kennzeichnen die HA₀-Banden, die für die N-Glykananalyse ausgeschnitten wurden.

Das HA der M-Variante des H1N1-RKI wies im Vergleich zu den vier anderen H1N1-RKI Varianten das größte Molekulargewicht (79 ± 5^d kDa) auf (Abb. 4-11). Die HAs der V- (68 ± 5 kDa), C- (68 ± 5 kDa) und H- (69 ± 5 kDa) Varianten hatten ungefähr das gleiche Molekulargewicht, während das HA der A-Variante das geringste Molekulargewicht (65 ± 5 kDa) besaß (Abb. 4-11 und Tabelle 4-6).

Die HA₀ Banden wurden aus den Gelen ausgeschnitten, deglykosyliert und Fingerprints der N-Glykanpools generiert. Die HA N-Glykanfingerprints der fünf Varianten des Influenza-A-Virus H1N1-RKI sind in Abbildung 4-12 A dargestellt.

Obwohl das selbe Virus repliziert wurde, waren in den HA N-Glykanfingerprints der Varianten deutliche Unterschiede zu erkennen. Die Fingerprints der A- und H-Variante waren sich relativ ähnlich, obwohl die H-Variante einige zusätzliche N-Glykanpeaks aufwies. Während diese zwei Fingerprints (A und H-Variante) eine gewisse Ähnlichkeit zu dem der V-Variante aufwiesen, unterschieden sie sich komplett vom Fingerprint der M-Variante. Der Fingerprint der C-Variante erschien in gewissem Maße vergleichbar mit dem der V-Variante. Nach weiteren Analysen ergaben sich allerdings leichte Unterschiede in den norm. t_{mig} und der Struktur der N-Glykane (Abschnitt 4.7.4).

^d ± 5 : die Abweichung von ± 5 kDa resultiert aus der Variabilität der verwendeten SDS-Gele. Es handelt sich um einen empirischen Wert.

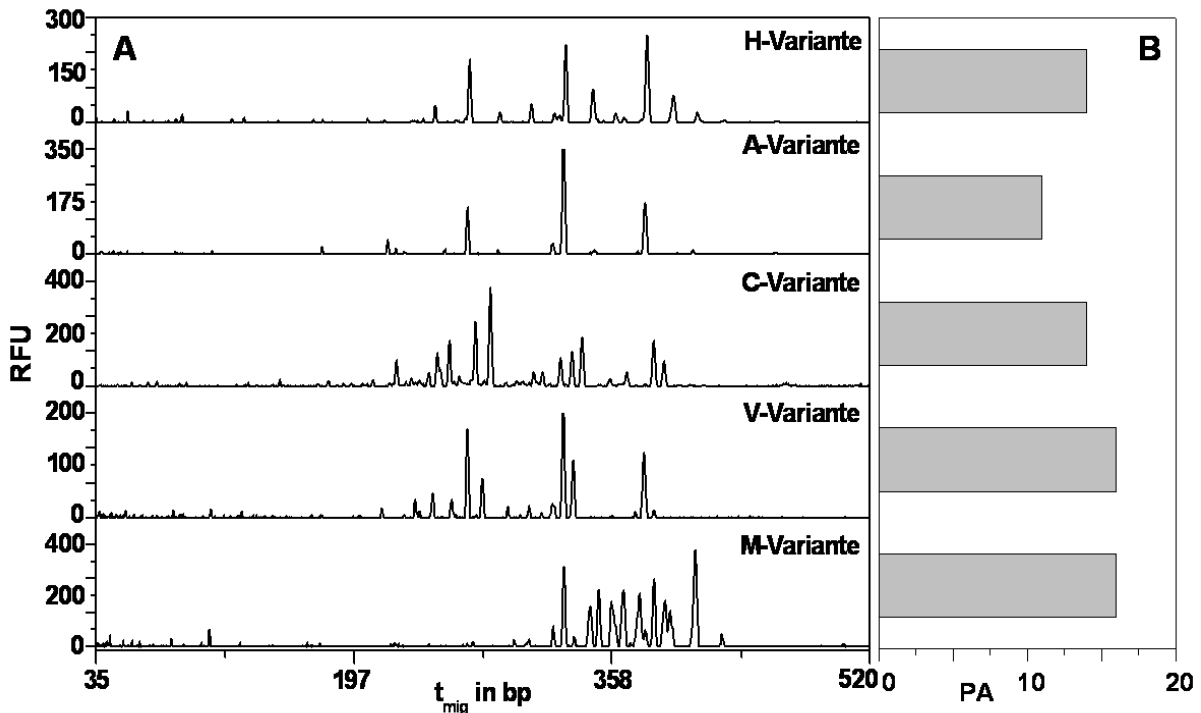


Abbildung 4-12: (A) geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprints der M-, V-, C-, A- und H-Variante des human-Influenza-A-Virus H1N1-RKI; t_{mig} ist angegeben in bp (normiert auf den internen Standard = norm. t_{mig}); (B) PA in den HA N-Glykanfingerprints der fünf Varianten in Abhängigkeit der Wirtszelllinie.

In Abbildung 4-12 B ist die PA in den Fingerprints der verschiedenen Varianten aufgetragen. Sowohl für die M- als auch für die V-Variante des H1N1-RKI ergab sich eine PA von 16. Im Falle der C- und H- Variante wurden nur 14 Peaks gezählt. Mit einer PA von 11 erschien das HA N-Glykosylierungsmuster der A-Variante als am wenigsten komplex.

Die Größenverteilung der N-Glykane des HAs der verschiedenen Varianten wies ebenfalls Unterschiede auf. Beispielsweise erschienen die Hauptpeaks im Fingerprint des HA der M-Variante im Bereich von 320,5 bp bis 426,5 bp (Tabelle 4-3) bei relativ hohen norm. t_{mig} . Diese Peaks repräsentierten, im Vergleich zu den anderen Varianten, die größten nachgewiesenen HA N-Glykane. Die Peaks wiesen generell norm. t_{mig} im Bereich von 214 bp bis 406 bp auf, wobei dominierende Peaks bis maximal 372,5 bp auftraten.

Die Größenverteilung und Anzahl der HA N-Glykane der verschiedenen Varianten des H1N1-RKI korreliert mit den Unterschieden der elektrophoretischen Mobilitäten dieser HAs in der SDS-PAGE. Dort wurde für das HA der M-Variante ein, im Vergleich zu der V-, C-, A- und H-Variante, höheres Molekulargewicht bestimmt (Abb. 4-11). Auch in der N-Glykananalytik ergaben sich für die M-Variante, im Vergleich zu den übrigen Varianten, eine größere PA und der entsprechende Fingerprint (Abb. 4-12 A und B) enthielt hauptsächlich große N-Glykane mit hoher norm. t_{mig} (Tabelle 4-3), woraus in der Regel ein höheres

Molekulargewicht des Proteins resultiert. Mit den größten detektierten HA N-Glykanen unterschied sich die M-Variante deutlich von den anderen betrachteten Varianten des H1N1-RKI.

Im Gegensatz zu der M-Variante, wurde für das HA der A-Variante das niedrigste Molekulargewicht (Abb. 4-11) und die kleinste PA (Abb. 4-12 B) bestimmt. Im entsprechenden Fingerprint traten nur relativ kleine N-Glykane mit kleineren norm. t_{mig} auf (Abb. 4-12 A und Tabelle 4-3).

Um einen Überblick über die HA N-Glykanpeaks in allen Fingerprints der M-, V-, C-, A- und H-Variante des human-Influenza-Virus H1N1-RKI zu ermöglichen, wurden diese jeweils seriell nummeriert und in der Tabelle 4-3 mit ihren norm. t_{mig} in bp aufgeführt. Die Auflistung erfolgte hinsichtlich der Anzahl der verschiedenen N-Glykanstrukturen innerhalb eines N-Glykanpools, der Komplexität des Fingerprints, der Größenverteilung der N-Glykane in den Pools und offensichtlichen strukturellen Homogenitäten zwischen den verschiedenen N-Glykosylierungsmustern.

Tabelle 4-3: Vergleich der HA N-Glykanfingerprints der M-, V-, C-, A- und H-Variante des human-Influenza-A-Virus H1N1-RKI; t_{mig} ist angegeben in bp (normiert auf den internen Standard = norm. t_{mig}); die Kreuze geben an, dass ein Peak (der eine bestimmte N-Glykanstruktur repräsentiert) mit seiner spezifischen norm. t_{mig} im jeweiligen Fingerprint vorhanden ist. Kreuze in einer Reihe zeigen identische N-Glykanstrukturen in den Fingerprints der verschiedenen Varianten an.

	<i>norm. t_{mig} in</i>					
<i>Peak #</i>	<i>bp</i>	<i>M</i>	<i>V</i>	<i>C</i>	<i>A</i>	<i>H</i>
1	214,0		X		X	
2	222,5			X	X	
3	240,9		X			
4	243,0		X			X
5	255,0		X			X
6	256,0			X	X	
7	260,0		X	X		
8	265,3			X		
9	270,0		X		X	X
10	273,3	X		X		
11	278,2		X			
12	280,7			X		
13	284,5				X	X
14	291,0		X			
15	301,5	X	X			X
16	305,0			X		

	<i>norm. t_{mig} in</i>					
<i>Peak #</i>	<i>bp</i>	<i>M</i>	<i>V</i>	<i>C</i>	<i>A</i>	<i>H</i>
17	320,5	X	X		X	X
18	324,0					X
19	329,5	X	X	X	X	X
20	337,0	X	X	X		
21	341,4			X		
22	345,0	X			X	X
23	348,0	X	X			
24	354,5	X				X
25	359,0	X		X		X
26	369,3	X	X		X	
27	372,5	X	X	X	X	X
28	378,3	X	X	X		
29	385,0	X		X		
30	389,5	X				X
31	406,9	X			X	X
32	426,5	X				

4.7.2 Einfluss der Wirtszelllinie auf die HA N-Glykosylierung des Influenza-A-Virus H3N2

Als Beispiel für einen kürzlich in Vakzinen (2007) verwendeten Influenza-Virusstamm wurde die Wirtszellabhängigkeit der HA N-Glykosylierung des H3N2 betrachtet. Die Virusreplikation erfolgte in MDCK-Zellen (als M-Variante), Vero-Zellen (als V-Variante) und in RCar (lektinresistente Mutante der MDCK-Zellen) -Zellen (als R-Variante). Das Molekulargewicht des HA der R-Variante (93 ± 5 kDa) unterschied sich nur wenig von dem der M-Variante (95 ± 5 kDa), während für das HA der V-Variante ein deutlich geringeres Molekulargewicht (81 ± 5 kDa) bestimmt wurde (Abb. 4-11, Tabelle 4-6).

Die HA N-Glykanfingerprints der drei Varianten sind in Abbildung 4-13 A dargestellt. Wie schon für das H1N1-RKI Virus beobachtet, erwies sich auch im Fall des H3N2 der Fingerprint der M-Variante als am komplexesten. Deren Hauptpeaks lagen bei norm. t_{mig} größer 269,7 bp (Tabelle 4-4). Im Gegensatz dazu konnten nur wenige Peaks mit geringer Intensität bei höheren norm. t_{mig} (repräsentieren entsprechend größere N-Glykane) in den Fingerprints der V-Variante detektiert werden. Im Fingerprint des HA der R-Variante fehlten Peaks in diesem Migrationszeitenbereich völlig. In den Fingerprints der M- und V-Variante konnten Peaks mit identischen norm. t_{mig} identifiziert werden, während die meisten Peaks im Fingerprint der R-Variante in ihren norm. t_{mig} nicht mit denen der M- und V-Variante übereinstimmten (Tabelle 4-4). Dies wies auf identische N-Glykanstrukturen am HA der M- und V-Variante, bzw. unterschiedliche am HA der R-Variante, hin.

Unterschiede hinsichtlich der Komplexität der Fingerprints der drei verschiedenen Varianten des H3N2 Virus, spiegelten sich auch in den ermittelten PA wieder. Für den HA N-Glykanfingerprint der R-Variante wurde die niedrigste PA (19) ermittelt, während die entsprechenden Fingerprints der M- und V-Variante mit 34 bzw. 29 deutlich mehr N-Glykanpeaks aufwiesen (Abb. 4-13 B). Wie schon im Falle des H1N1-RKI wurden die größten N-Glykane am HA der M-Variante (norm. t_{mig} im Bereich von 57,9 bp bis 418,0 bp) detektiert, während die Peaks der HA N-Glykane der V-Variante nur im Bereich von 51,8 bp bis 327,5 bp auftraten. Mit Peaks im Bereich von 64,0 bp bis 308,9 bp ergab sich für die R-Variante die engste Größenverteilung der Peaks im HA N-Glykanfingerprint (Tabelle 4-4).

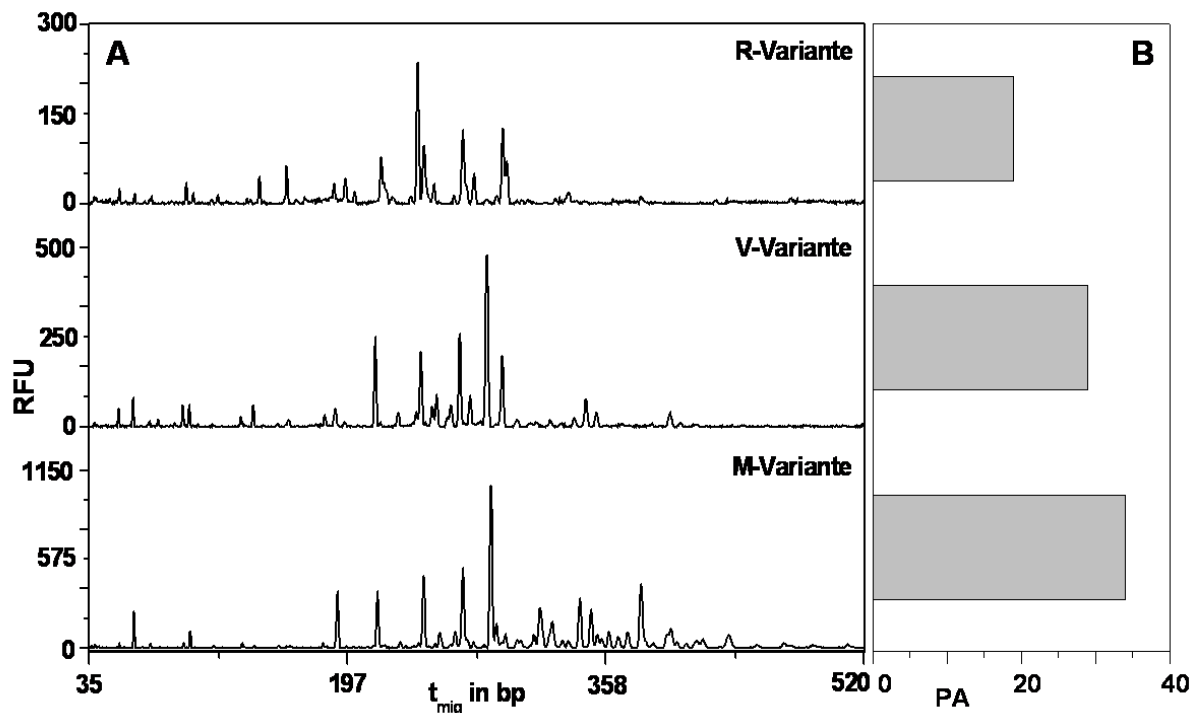


Abbildung 4-13: (A) geschifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprints der M-, V- und R-Variante des human Influenza-A-Virus H3N2; t_{mig} ist angegeben in bp (normiert auf den internen Standard = norm. t_{mig}); (B) PA in den HA N-Glykanfingerprints der drei Varianten in Abhängigkeit der Wirtszelllinie.

Wie bereits für das H1N1-RKI Virus gezeigt wurde, korrelierten für die M- und V-Variante des H3N2 Virus die elektrophoretischen Mobilitäten des HA₀ in der SDS-PAGE mit deren N-Glykosylierungsmustern. Im Vergleich des HA₀ der drei Varianten, wurde für das HA₀ mit dem höheren Molekulargewicht (M-Variante) eine größere PA ermittelt (Abb. 4-13 B) und größere N-Glykane detektiert (Abb. 4-13 A und Tabelle 4-4). Im Gegensatz dazu wies der Hauptanteil der Peaks im HA N-Glykanfingerprint der V-Variante kleinere norm. t_{mig} auf, was auch in ein geringeres Molekulargewicht resultierte. Überraschenderweise, zeigte das HA₀ der R-Variante ein mit dem der M-Variante vergleichbares Molekulargewicht, obwohl deutlich weniger N-Glykane, mit einer sehr engen Größenverteilung bei kleinen norm. t_{mig} , an das HA der R-Variante gebunden waren.

Tabelle 4-4: Vergleich der HA N-Glykanfingerprints der M-, V- und R-Variante des human Influenza-A-Virus H3N2; t_{mig} ist angegeben in bp (normiert auf den internen Standard = norm. t_{mig} ; die Kreuze geben an, dass ein Peak (der eine bestimmte N-Glykanstruktur repräsentiert) mit seiner spezifischen norm. t_{mig} im jeweiligen Fingerprint vorhanden ist. Kreuze in einer Reihe zeigen identische N-Glykanstrukturen in den Fingerprints der verschiedenen Varianten an.

	<i>norm.</i> <i>t_{mig} in</i>					<i>norm.</i> <i>t_{mig} in</i>			
Peak #	bp	M	V	R	Peak #	bp	M	V	R
1	51,8		X		28	254,0	X	X	X
2	57,9	X	X		29	260,6			X
3	64,0	X	X	X	30	264,0		X	
4	82,2	X	X	X	31	266,9	X		
5	86,3	X	X	X	32	269,7	X	X	
6	115,0	X	X		33	273,3	X		X
7	120,5		X		34	280,6	X	X	
8	125,5			X	35	287,0	X		
9	139,9		X	X	36	289,8	X		
10	163,4	X	X		37	295,0	X	X	
11	169,2		X	X	38	306,0	X		
12	171,5	X		X	39	308,9		X	X
13	176,7		X	X	40	315,1	X		
14	181,5			X	41	318,3		X	
15	190,8		X		42	323,5	X		
16	193,0	X			43	328,0	X	X	
17	196,0			X	44	329,5	X		
18	203,0		X	X	45	337,0	X		
19	207,7	X			46	345,0	X		
20	218,3		X	X	47	349,6	X		
21	222,0		X	X	48	364,0	X	X	
22	225,8	X		X	49	372,5	X	X	
23	230,8		X		50	378,3	X		
24	234,5	X	X	X	51	381,2	X		
25	238,2	X			52	399,0	X		
26	244,8		X		53	418,0	X		
27	251,0		X						

4.7.3 Vergleich des HA N-Glykosylierungsmusters der M-Variante verschiedener Virustypen und -subtypen

In einem nächsten Schritt wurde das HA N-Glykosylierungsmuster der M-Variante verschiedener Influenza-Virustypen und -subtypen untersucht. MDCK-Zellen wurden wie in Abschnitt 3.2 beschrieben kultiviert und mit human Influenza-A-Virus (H1N1-RKI und H3N2) und B/Mal infiziert, woraus die M-Varianten dieser drei Virusstämme resultierten. Die HA N-Glykananalyse wurde nach dem in Abbildung 3-1 dargestellten Schema durchgeführt. Wie schon in Abschnitt 4.7.1 und 4.7.2 für die verschiedenen Varianten eines Virusstammes beschrieben, konnten auch hier Unterschiede zwischen den HAs bereits in den verschiedenen

elektrophoretischen Mobilitäten des HA in der SDS-PAGE beobachtet werden (Abb. 4-11). Das größte Molekulargewicht wurde für die M-Variante des H3N2 Virus (95 ± 5 kDa) bestimmt, gefolgt von der des B/Mal (86 ± 5 kDa) und des H1N1-RKI (79 ± 5 kDa) (Abb. 4-11 und Tabelle 4-6).

In Abbildung 4-14 A sind die HA N-Glykanfingerprints dieser drei M-Varianten dargestellt. Deutliche Unterschiede zeigten sich im Vergleich der M-Variante des H1N1-RKI mit den M-Varianten des H3N2 und B/Mal.

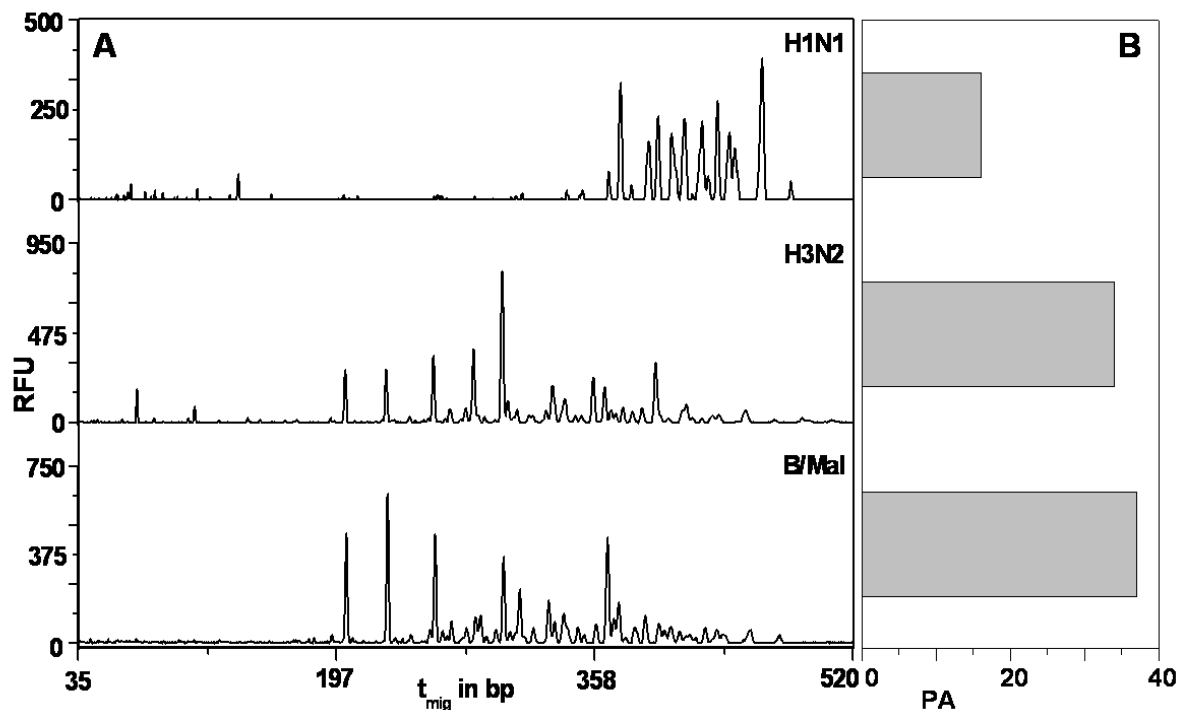


Abbildung 4-14: (A) geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprints der M-Varianten des human Influenza-A-Virus H1N1-RKI, H3N2 und B/Mal; t_{mig} ist angegeben in bp (normiert auf den internen Standard = norm. t_{mig}); (B) PA in den HA N-Glykanfingerprints der M-Varianten des human Influenza-A-Virus H1N1-RKI, H3N2 und B/Mal.

Entsprechend den Molekulargewichten der jeweiligen HAS ähnelte der HA N-Glykanfingerprint des H3N2 dem des B/Mal mehr als dem des H1N1-RKI. Die PA der drei M-Varianten wurde bestimmt. Es ergab sich eine PA von 16 für die des H1N1-RKI (Abschnitt 4.7.1), 34 für die des H3N2 (Abschnitt 4.7.2) und 37 für die des B/Mal (Abb. 4-14 B). Die im Migrationszeitenbereich von 320,5 bp bis 426,5 bp (Tabelle 4-3 und 4-5) detektierten Peaks deuteten darauf hin, dass relativ große N-Glykane an das HA der M-Variante des H1N1-RKI gebunden waren (Abb. 4-12 und 4-14). Die norm. t_{mig} der meisten HA N-Glykane der M-Variante des H3N2 und B/Mal Virus lagen in einem Bereich von 57,9 bp bis 418,0 bp (Tabelle 4-5) und repräsentierten damit kleinere N-Glykane. Allerdings wurden für diese beiden M-Varianten auch einige Peaks mit geringer Intensität im Migrationszeitenbereich der M-Variante des H1N1-RKI detektiert.

Tabelle 4-5: Vergleich der HA N-Glykanfingerprints der M-Varianten des human-Influenza-A-Virus H1N1, H3N2 und B/Mal; t_{mig} ist angegeben in bp (normiert auf den internen Standard = norm. t_{mig}); die Kreuze geben an, dass ein Peak (der eine bestimmte N-Glykanstruktur repräsentiert) mit seiner spezifischen norm. t_{mig} im jeweiligen Fingerprint vorhanden ist. Kreuze in einer Reihe zeigen identische N-Glykanstrukturen in den Fingerprints der verschiedenen Varianten an.

	<i>norm. t_{mig} in</i>			
Peak #	bp	H1N1	H3N2	B/Mal
1	57,9		X	
2	64,8		X	
3	82,2		X	
4	86,3		X	
5	115,7		X	
6	163,5		X	
7	171,5		X	X
8	193,0		X	X
9	207,7		X	X
10	222,0			X
11	225,8		X	X
12	231,5			X
13	234,5		X	X
14	238,2		X	X
15	254,0		X	X
16	256,4			X
17	258,9			X
18	263,6			X
19	266,9		X	X
20	269,7		X	X
21	273,3	X	X	X
22	280,6		X	X
23	287,0		X	X
24	289,8		X	X
25	295,0		X	X
26	301,5	X		X
27	306,0		X	X
28	315,1		X	
29	315,9			X
30	320,5	X		
31	323,5		X	X
32	328,0		X	X
33	329,5	X	X	X
34	337,0	X	X	
35	341,0			X
36	345,0	X	X	X
37	348,0	X		
38	349,6		X	X
39	352,5			X
40	354,5	X		X
41	359,0	X		X
42	364,0		X	X
43	369,3	X		
44	372,5	X	X	X
45	378,3	X	X	X
46	381,2		X	X
47	385,0	X		
48	389,5	X		
49	399,0		X	X
50	406,9	X		
51	418,0		X	X
52	426,5	X		

Die Ergebnisse der Abschnitte 4.7.1 – 4.7.3 sind in der Tabelle 4-6 zusammengefasst. Es wurden sowohl deutliche Unterschiede in der HA N-Glykosylierung des Influenza-A-Virus H1N1-RKI und H3N2 in Abhängigkeit der Wirtszelllinie (Abschnitte 4.7.1 und 4.7.2) als auch zwischen den Subtypen A und B (Abschnitt 4.7.3) beobachtet.

Anhand der Ergebnisse wurde geschlossen, dass Unterschiede in der elektrophoretischen Mobilität des HA der verschiedenen Virusvarianten, mit Unterschieden in ihren entsprechenden HA N-Glykanfingerprints, hinsichtlich Anzahl der N-Glykane als auch ihrer Größenverteilung, korrelieren. Höhere Molekulargewichte wurden für alle Varianten des H3N2 Virus im Vergleich zu den entsprechenden Varianten des H1N1-RKI Virus bestimmt. Die Molekulargewichte der M-Variante des H3N2 und B/Mal Virus waren vergleichbar.

Tabelle 4-6: Zusammenfassung der Ergebnisse der Abschnitte 4.7.1 – 4.7.3; Einfluss der Wirtszelllinie auf die HA N-Glykosylierung und Vergleich verschiedener Virustypen und Subtypen.

<i>Variante und Virus</i>	<i>Molekulargewicht des HA (abgeschätzt via SDS-PAGE) in kDa</i>	<i>berechnete Masse des HA via AA¹-Sequenz* in kDa</i>	<i>geschätzte Masse des HA N-Glykanpool in kDa</i>	<i>PA</i>	<i>norm. t_{mig} Bereich der HA N-Glykane in bp</i>
M H1N1	79 ± 5	63,0 ²	16 ± 5 ⁵	16	273,3-426,5
V H1N1	68 ± 5	63,0	5 ± 5	16	214,0-378,3
C H1N1	68 ± 5	63,0	5 ± 5	14	222,5-385,0
H H1N1	68 ± 5	63,0	5 ± 5	14	243,0-406,9
A H1N1	65 ± 5	63,0	2 ± 5	11	214,0-406,9
M H3N2	95 ± 5	62,1 ³	32,9 ± 5	34	57,9-418,0
V H3N2	81 ± 5	62,1	18,9 ± 5	29	51,8-372,5
R H3N2	93 ± 5	62,1	30,9 ± 5	19	64,0-308,9
M B/Mal	86 ± 5	65,6 ⁴	20,4 ± 5	37	171,5-418,0

¹ AA, Aminosäure; ² berechnet anhand der Sequenz veröffentlicht von [228] (Sequenz durch eigene Analysen bestätigt, Daten nicht gezeigt); ³ berechnet anhand der Sequenz veröffentlicht von [229]; ⁴ berechnet anhand der Sequenz veröffentlicht von [230]; * durchschnittliches Molekulargewicht einer AA = 115 Da; ⁵ die Abweichung von ± 5 kDa resultiert aus der Variabilität der verwendeten SDS-Gele. Es handelt sich um einen empirischen Wert.

4.7.4 Strukturaufklärung der HA N-Glykane verschiedener Varianten des Influenza-A-Virus H1N1-RKI

Um detailliertere Informationen hinsichtlich der Unterschiede im HA N-Glykosylierungsmuster der verschiedenen Varianten (M, V, C, A, H und R) zu erhalten, wurden die N-Glykantypen und deren Strukturen bestimmt. Dazu wurden die HA N-Glykanpools mit verschiedenen Exoglykosidasen, einzeln oder im Gemisch, inkubiert (Abschnitt *Sequentieller Exoglykosidase-Verdau*). Dies führte zum sequentiellen Abverdaue der enthaltenen N-Glykane, ausgehend vom terminalen Ende. Als Negativkontrolle des Verdaues diente jeweils ein Aliquot der N-Glykanpools ohne Zugabe von Exoglykosidasen, lediglich versetzt mit Reaktionspuffer und Milli-Q Wasser.

Die Zugabe der Exoglykosidasen und ihrer erforderlichen Reaktionspuffer resultierte in einer höheren Salzkonzentration und einer fünffachen Verdünnung der N-Glykanpools. Das dadurch leicht veränderte Erscheinungsbild der HA N-Glykanfingerprints (besonders im Fall der M-Variante und Vergleich der Negativkontrollen mit den ursprünglichen Fingerprints) ist begründet durch instrumentelle Einschränkungen des verwendeten DNA-Sequenzierers, der nur elektrokinetische Injektionen erlaubte. Dabei wurden bevorzugt hochgeladene kleine Ionen injiziert, wodurch es zu einer Diskriminierung großer N-Glykane bei der Injektion zu Gunsten kleinerer N-Glykane oder Salzionen kam. Dadurch wurden die Konzentrationen

relativ großer N-Glykane, wie sie im HA N-Glykanpool des HA der M-Variante enthalten waren, unterbestimmt. Insbesondere wurde dieses Phänomen beobachtet für Proben mit hoher Salzkonzentration (aus Reaktionspuffern), vielen kleinen N-Glykanen oder einem nicht vollständig abgetrennten Überschuss an APTS.

Außerdem konnten unvollständige Verdaureaktionen mit α -Mannosidase (letzter Schritt des SED) für mannosereiche N-Glykane, sowie der komplette bzw. teilweise Verdau des TCK nach Inkubation mit α -Mannosidase, beobachtet werden.

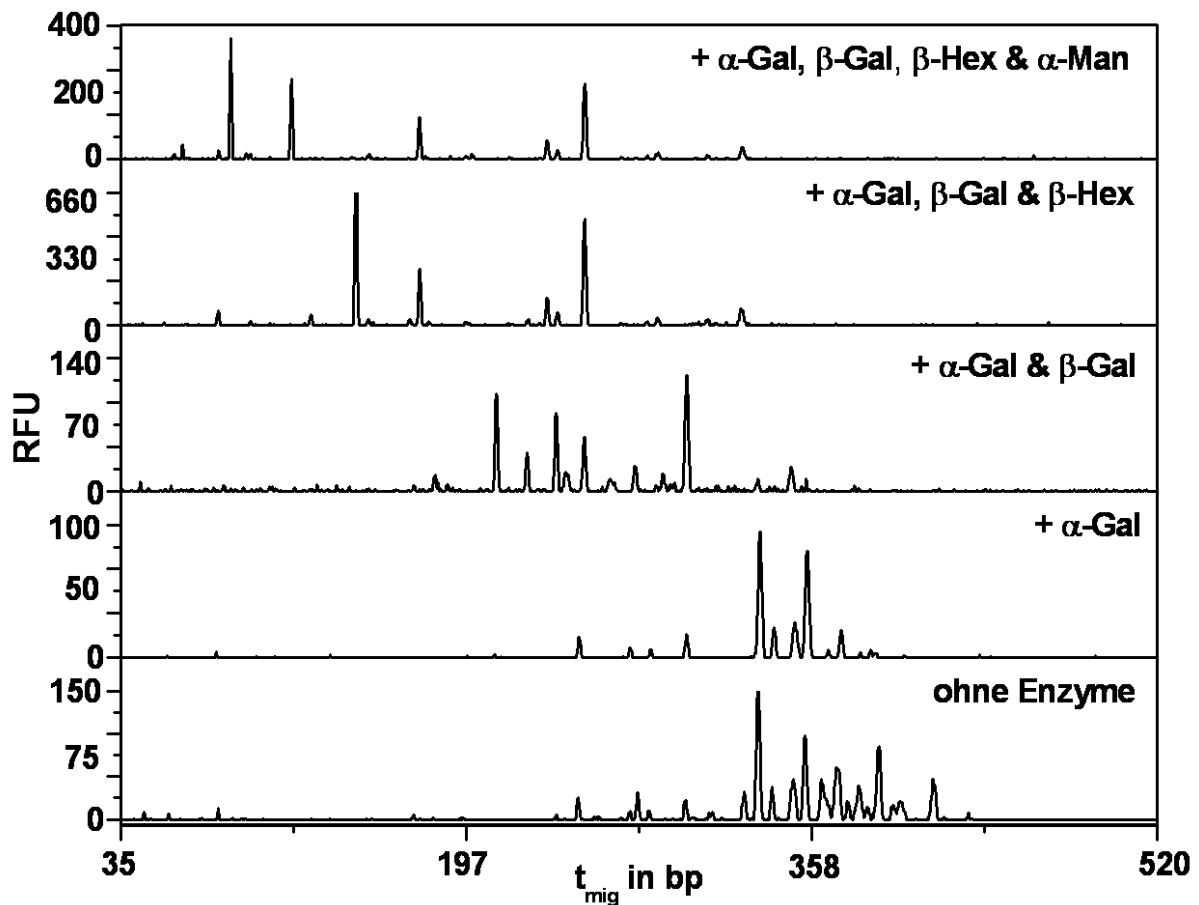


Abbildung 4-15: geshifteter Overlay der Fingerprints sequentiell verdauter HA N-Glykane der M-Variante des human-Influenza-A-Virus H1N1-RKI; α -Galaktosidase = α -Gal, β -Galaktosidase = β -Gal, β -N-Acetylhexosaminidase = β -Hex, α -Mannosidase = α -Man.

Die Elektropherogramme des SED des HA N-Glykanpools der M-Variante des H1N1-RKI sind in Abbildung 4-15 dargestellt. Nach Inkubation mit den Exoglykosidasen α -Neuraminidase bzw. α -Mannosidase (jeweils einzeln), konnten keine Veränderungen in den Fingerprints beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies wies auf die Abwesenheit terminaler Sialinsäure bzw. mannosereicher N-Glykanen hin.

Die Zugabe von α -Galaktosidase resultierte ausschließlich in der Eliminierung langsam migrierender Peaks im Fingerprint (norm. $t_{mig} > 359,0$ bp), was eindeutig den Abverdau von

terminaler α -Galaktose kennzeichnete. Die weitere Inkubation mit β -Galaktosidase, β -N-Acetylhexosaminidase und α -Mannosidase führte zu sequentiell degradierten N-Glykanstrukturen. Dementsprechend erschienen Peaks neuer schneller migrierender N-Glykane (degradierte Formen) im Fingerprint, während die Peaks von langsamer migrierenden N-Glykanen verschwanden (diese wurden abverdaut). Daraus ergab sich, dass ausschließlich unsialierte komplexe N-Glykane an das HA der M-Variante des H1N1-RKI gebunden waren. Diese Strukturen konnten als tri- oder tetraantennär, teilweise mit bisecting GlcNAc, identifiziert werden. Die Zuordnung dieser Strukturen basierte auf dem Vergleich der norm. t_{mig} der HA N-Glykane in den Fingerprints mit N-Glykanen bekannter Struktur und norm. t_{mig} (off-line bzw. on-line Spike-Experimente, Abschnitt 3. Material und Methoden *Spike-Experimente* unter Punkt 3.2.11), wie schon für die Identifizierung der N-Glykane des bovinen Serum IgG (Abschnitt 4.4) gezeigt. Die meisten HA N-Glykane der M-Variante des H1N1-RKI enthielten terminale α -Galaktose und einige terminale β -Galaktose. Der Verdau mit nur α -Fukosidase (Daten nicht gezeigt) führte zur Eliminierung einiger Peaks mit größeren norm. t_{mig} . Die N-Glykane, die von diesen Peaks repräsentiert wurden, konnten somit fukosylierten N-Glykanen zugeordnet werden, die nach Inkubation mit α -Fukosidase mit ihrer unfukosylierten Form (ebenfalls präsent in diesem HA N-Glykanpool) comigrierten. Zusätzlich traten einige Peaks bei niedrigeren norm. t_{mig} auf, die vorher nicht im Fingerprint vertreten waren.

Wie schon für die M-Variante beobachtet, konnten auch für den HA N-Glykanpool der V-Variante des H1N1-RKI keine sialierten N-Glykane identifiziert werden (Abb. 4-16). Im Gegensatz zur M-Variante, deutete der Verdau mit α -Mannosidase bzw. α -Galaktosidase (jeweils einzeln) auf die Anwesenheit einiger wenig abundanter mannosereicher N-Glykane, aber auch auf die Abwesenheit von N-Glykanen mit terminaler α -Galaktose hin (Daten nicht gezeigt).

Der sequentielle Verdau mit β -Galaktosidase, β -N-Acetylhexosaminidase und α -Mannosidase führte zum kontrollierten Abverdau der HA N-Glykanstrukturen der V-Variante bis zum TCK. Anhand dieser Daten repräsentieren die Hauptpeaks im Fingerprint komplexe N-Glykane mit terminaler β -Galaktose. Die Verschiebung von fast allen Peaks zu niedrigeren norm. t_{mig} nach Inkubation mit α -Fukosidase (einzeln), deutete darauf hin, dass es sich bei nahezu allen HA N-Glykanen der V-Variante des H1N1-RKI, um fukosylierte N-Glykane handelte.

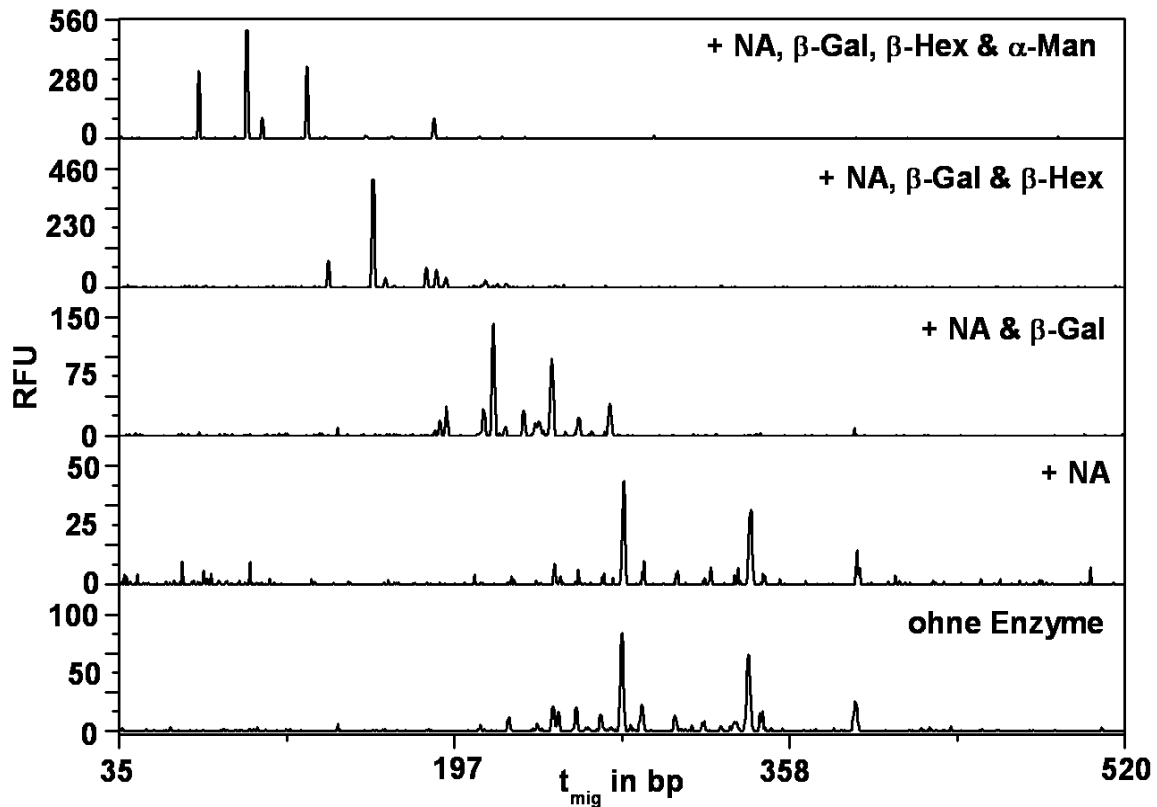


Abbildung 4-16: geshifteter Overlay der Fingerprints sequentiell verdaute HA N-Glykane der V-Variante des human-Influenza-A-Virus H1N1-RKI; α -Galaktosidase = α -Gal, β -Galaktosidase = β -Gal, β -N-Acetylhexosaminidase = β -Hex, α -Mannosidase = α -Man.

Der H1N1-RKI HA N-Glykanpool der C-Variante wurde auf die selbe Art und Weise mit Exoglykosidasen behandelt wie die M- und V-Variante. Erneut konnte keine terminale Sialinsäure gefunden werden. Allerdings deutete der Verdau mit β -N-Acetylhexosaminidase und α -Mannosidase (jeweils einzeln) auf die Anwesenheit einiger Hybrid- und mannosereicher N-Glykane hin (Daten nicht gezeigt). Nach dem sequentiellen Verdau mit β -Galaktosidase, β -N-Acetylhexosaminidase und α -Mannosidase konnte der Schluss gezogen werden, dass die meisten Peaks im Fingerprint der C-Variante komplexe N-Glykane mit terminaler β -Galaktose repräsentierten (Abb. 4-17). Die Fukosylierung nahezu aller dieser N-Glykane konnte durch die Inkubation mit α -Fukosidase (einzeln) nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Auch die H1N1-RKI HA N-Glykanpools der A- und H-Variante wurden mit den selben Exoglykosidasen (einzeln und im Gemisch) behandelt. In beiden Fällen wurde die Abwesenheit von terminaler Sialinsäure, terminaler α -Galaktose und mannosereichen Strukturen festgestellt. Die HA N-Glykane der A- und H-Variante wurden als komplex mit terminaler β -Galaktose identifiziert. Dabei waren die meisten N-Glykane der A-Variante, aber nur einige der H-Variante, fukosyliert (Daten nicht gezeigt).

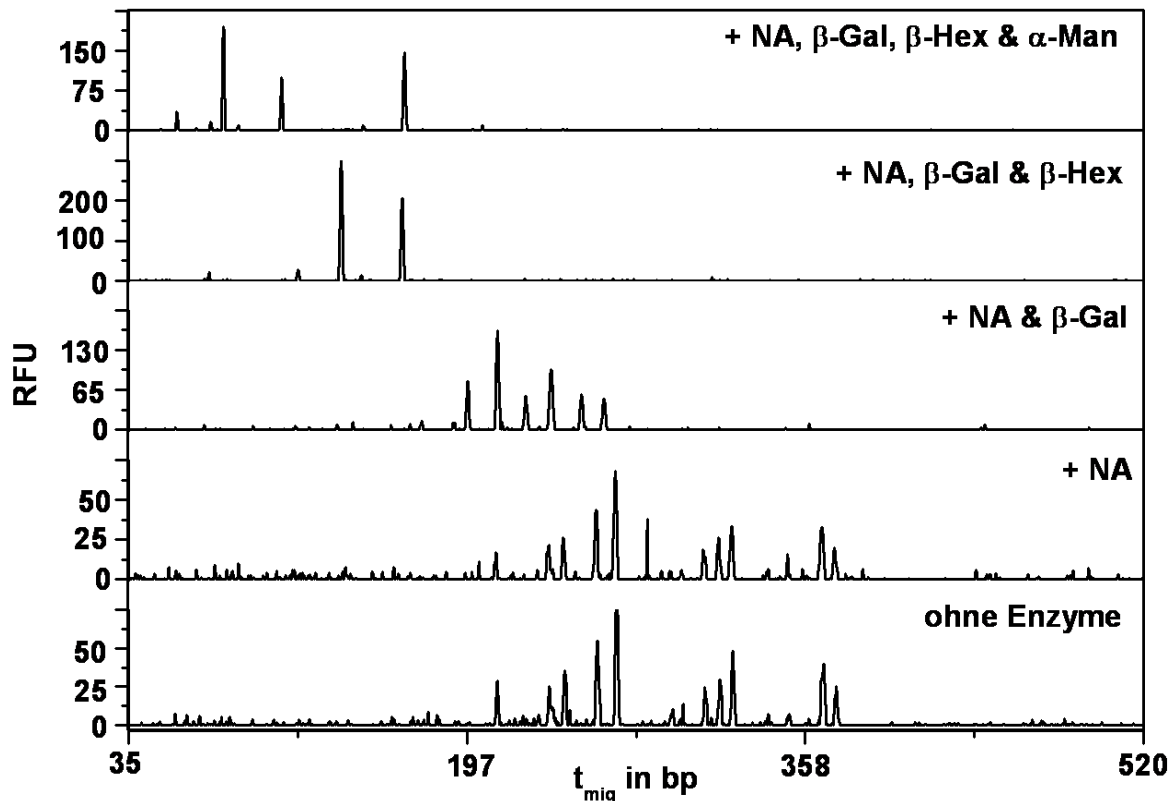


Abbildung 4-17: gestapelter Overlay der Fingerprints sequentiell verdauter HA N-Glykane der C-Variante des human-Influenza-A-Virus H1N1-RKI; α -Galaktosidase = α -Gal, β -Galaktosidase = β -Gal, β -N-Acetylhexosaminidase = β -Hex, α -Mannosidase = α -Man.

4.7.5 Strukturaufklärung der HA N-Glykane verschiedener Varianten des Influenza-A-Virus H3N2

Die H3N2 HA N-Glykanpools der M-, V-, und R-Variante wurden wie in den Abschnitten *Sequentieller Exoglykosidase-Verdau* und 4.7.4 beschrieben mit verschiedenen Exoglykosidasen (einzeln und im Gemisch) inkubiert. Für alle Varianten konnte keine terminale Sialinsäure an den HA N-Glykanen des H3N2 Virus gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Der Verdau mit α -Galaktosidase (einzeln) deutete auf die Anwesenheit einiger weniger abundanter N-Glykane mit terminaler α -Galaktose am HA der M-Variante des H3N2 hin (Daten nicht gezeigt). Nach sequenziellem Abverdau der HA N-Glykanpools konnten nur für die M- und V-Variante einige komplexe N-Glykane (speziell bei größeren norm. $t_{mig} > 289,8$ bp, Tabelle 4-4) nachgewiesen werden. Der Großteil der Peaks in den Fingerprints dieser beiden Varianten repräsentierte mannosereiche N-Glykane. Es konnten keine N-Glykane vom Hybridtyp identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu wurden nur einige wenige mannosereiche N-Glykane am HA der R-Variante des H3N2 Virus gefunden. Die Hauptpeaks im Fingerprint repräsentierte N-Glykane des Hybridtyps mit

terminalem GlcNAc (Abb. 4-18 A und B). Daten hinsichtlich der verschiedenen bzw. identischen N-Glykanstrukturen der M-, V- und R-Variante und ihre norm. t_{mig} sind in der Tabelle 4-4 zusammengefasst.

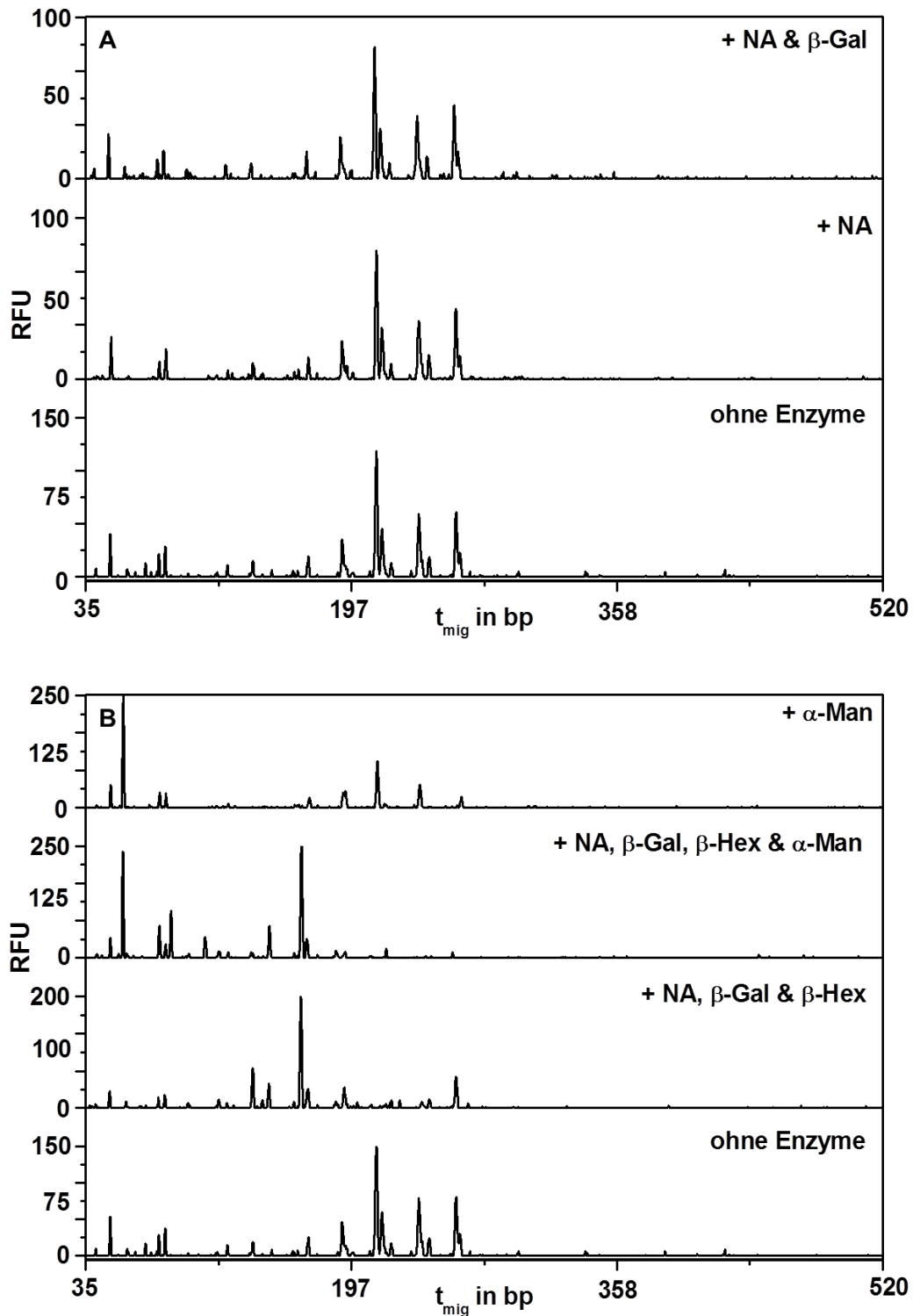


Abbildung 4-18: geshifteter Overlay der Fingerprints sequentiell verdauter HA N-Glykane der R-Variante des human-Influenza-A-Virus H3N2 mit (A) α -Neuraminidase = NA, β -Galaktosidase = β -Gal; (B) α -Neuraminidase = NA, β -Galaktosidase = β -Gal, β -N-Acetylhexosaminidase = β -Hex, α -Mannosidase = α -Man.

4.7.6 Strukturaufklärung der HA N-Glykane der M-Variante verschiedener Influenza-Virustypen und -subtypen

Wie in Abschnitt 4.7.3 beschrieben, konnten deutliche Unterschiede in den Fingerprints der M-Variante des human-Influenza-A-Virus H1N1-RKI, H3N2 und B/Mal beobachtet werden (Abb. 4-14). Die Ergebnisse des SED der HA N-Glykanpools des H1N1-RKI und H3N2 (M-Variante), sind in den Abschnitten 4.7.4 und 4.7.5 beschrieben (Abb. 4-15). Im Gegensatz zum H3N2 Stamm, konnten keine mannosereichen N-Glykane am HA des H1N1-RKI gefunden werden. Für diesen Stamm repräsentierten die Peaks komplexe N-Glykane, zum Großteil mit terminaler α -Galaktose. Im Falle der M-Variante des H3N2 konnten nur einige wenig abundante N-Glykane des komplexen Typs identifiziert werden.

Nach SED des HA N-Glykanpools der M-Variante des B/Mal Virus wurde ebenfalls die Abwesenheit von terminaler Sialinsäure festgestellt (Abb. 4-19 A). Des Weiteren erfolgte die Identifizierung einiger komplexer N-Glykane mit terminaler β -Galaktose. Neben einigen kleineren N-Glykanen mit terminalem GlcNAc konnten die dominantesten Peaks mannosereichen N-Glykanen zugeordnet werden (Abb. 4-19 A und B). Daten hinsichtlich der verschiedenen bzw. identischen N-Glykanstrukturen der M-Varianten des human-Influenza-A-Virus H1N1-RKI, H3N2 und B-Mal und ihre norm. t_{mig} sind in der Tabelle 4-5 zusammengefasst.

Im Allgemeinen wurden eindeutige wirtszellvermittelte strukturelle Unterschiede in der HA N-Glykosylierung des human-Influenza-A-Virus H1N1-RKI und H3N2 beobachtet. Ebenfalls resultierte die Replikation verschiedener Influenza-A-Virusstämme (H1N1-RKI) und eines Influenza-B-Stammes (B/Mal) in MDCK-Zellen in unterschiedlichen HA N-Glykosylierungsmustern. Die Ergebnisse der Strukturaufklärung der verschiedenen Varianten eines Virusstammes (Abschnitt 4.7.4 und 4.7.5) und unterschiedlicher Virustypen und -subtypen einer Variante (Abschnitt 4.7.6) sind in der Tabelle 4-7 zusammengefasst.

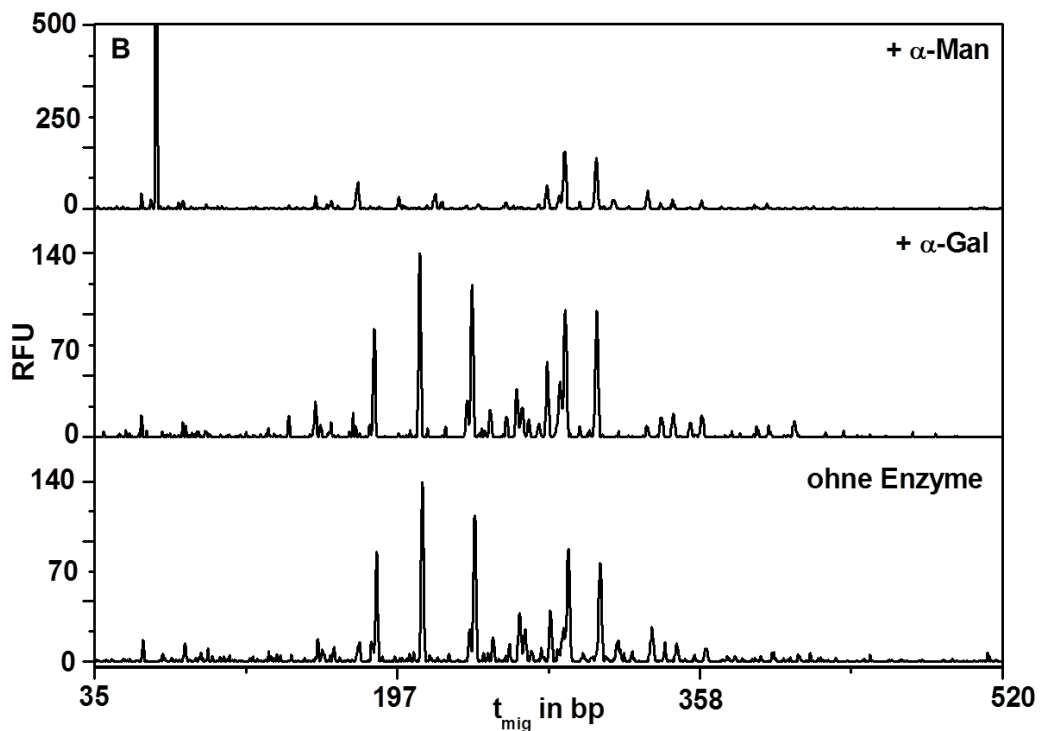
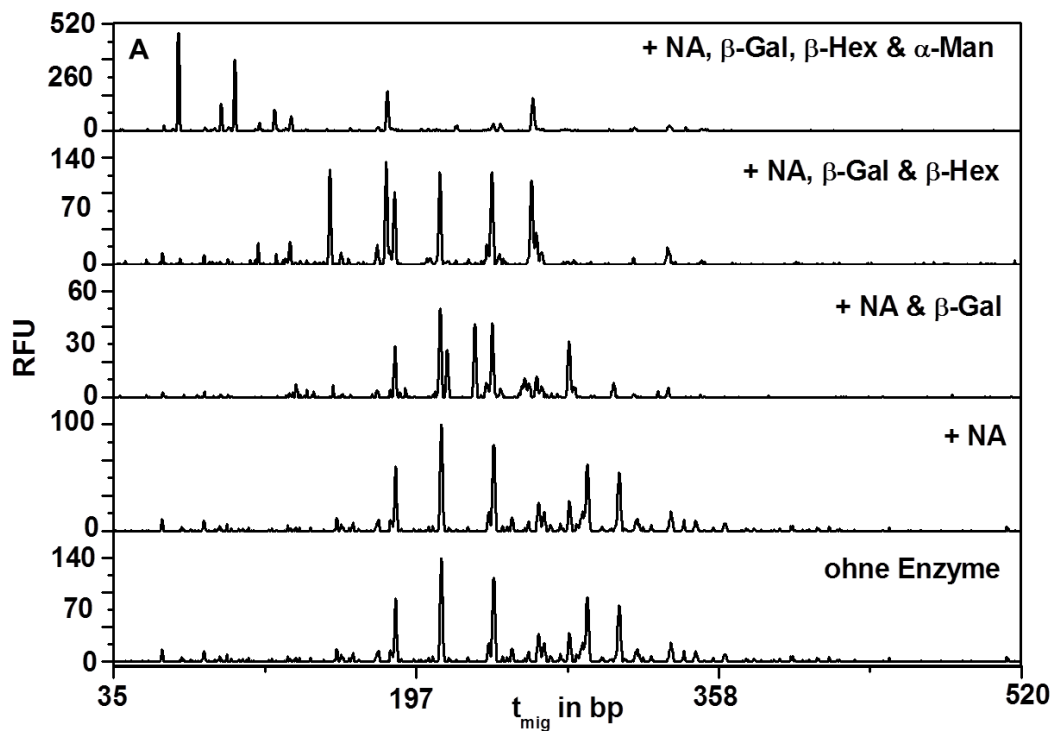


Abbildung 4-19: geshifteter Overlay der Fingerprints sequentiell verdauter HA N-Glykane der M-Variante des human-Influenza-Virus B/Mal mit (A) α -Neuraminidase = NA, β -Galaktosidase = β -Gal, β -N-Acetylhexosaminidase = β -Hex, α -Mannosidase = α -Man; (B) α -Galaktosidase = α -Gal, α -Mannosidase = α -Man.

In keinem HA N-Glykanpool der verschiedenen Varianten des human-Influenza-A-Virus H1N1-RKI, H3N2 und B/Mal konnte terminale Sialinsäure nachgewiesen werden. Es wurde daher angenommen, dass ein Abverdau dieses terminalen Zuckers aufgrund der NA Aktivität im Zellkulturmedium stattfand. Um dies zu prüfen, wurde das biantennäre sialierte N-Glykan A2F (Anhang Tabelle I-4) mit APTS konjugiert (Abschnitt 3.3.7). Ein Aliquot des gelabelten A2F (äquivalent zu der Menge, die im SED eingesetzt wurde) wurde mit virushaltigem Zellkulturüberstand (MDCK-Zellen infiziert mit H3N2, Probenahme 96 hpi) bei 37°C über Nacht inkubiert und anschließend mittels CGE-LIF analysiert. In dem entsprechenden Elektropherogramm (Daten nicht gezeigt) konnte eine deutliche Reduktion der Intensität des A2F-Peaks und das Auftauchen von zwei neuen Peaks beobachtet werden. Diese repräsentierten eine einfach sialierte (A1F, Tabelle I-4) und eine abundantere nicht sialierte (NA2F, Tabelle I-4) Form des A2F. Der Verlust von ein bzw. zwei Sialinsäureresten am A2F (im Vergleich zur unbehandelten Probe), wies deutlich auf NA-Aktivität in virushaltigem Zellkulturüberstand hin und erklärte damit die Abwesenheit von terminaler Sialinsäure an HA N-Glykanen.

Tabelle 4-7: Zusammenfassung der Ergebnisse der Strukturaufklärung (SED) der HA N-Glykanpools verschiedener Varianten des human-Influenza-A-Virus H1N1-RKI, H3N2 und B/Mal

<i>Virus und Variante</i>	<i>komplexer Typ mit terminaler</i>	<i>Fukosylierung</i>	<i>mannosereicher Typ</i>	<i>Hybridtyp</i>
A/PR/8/34 H1N1 (H1N1-RKI)				
M-Variante	alle; α - und β -Galaktose	ja	keine	keine
V-Variante	die meisten; β - Galaktose	ja	einige	keine
C-Variante	die meisten; β - Galaktose	ja	einige	einige
A-Variante	alle; β - Galaktose	ja	keine	keine
H-Variante	alle; β - Galaktose	ja	keine	keine
A/WSN/67/2005 H3N2 (H3N2)				
M-Variante	wenige; α - and β - Galaktose	n.b. ¹	dominante Peaks	keine
V-Variante	einige; β - Galaktose	n.b.	dominante Peaks	keine
R-Variante	keine	n.b.	wenige	dominante Peaks
B/Mal/2506/2004 (B/Mal)				
M-Variante	einige; β - Galaktose	n.b.	dominante Peaks	keine

¹ n.b., nicht bestimmt

4.7.7 Adaption von Influenza A Viren an eine Vero- und RCar-Zelllinie - Verlauf der HA N-Glykosylierung

Vorversuche zur Virusreplikation in Vero- und RCar-Zellen (Saatvirus in MDCK-Zellen produziert) resultierten nur in geringen Virusausbeuten. Der maximale Virustiter wurde, im Vergleich zu MDCK-Zellen, nach relativ langer Zeit post-infection erzielt.

Um ein mit MDCK-Zellen vergleichbares Replikationsverhalten und Ausbeuten verschiedener Influenza-A-Virusstämme (H1N1-NIBSC, H1N1-RKI und H3N2) auch in Vero-Zellen zu erzielen, erfolgte die Adaption des Saatvirus durch mehrfache Passgierung. Ebenfalls erfolgte die Adaption des H3N2 Saatvirus an RCar-Zellen. Die Adaption wurde jeweils wie im Abschnitt 3.2 beschrieben über vier Passagen durchgeführt. Dabei wurden die Passagen 1 - 4 für die Adaption des H1N1-NIBSC an Vero-Zellen und H3N2 an Vero- und RCar-Zellen beprobt. Es wurden für die HA N-Glykananalytik jeweils ca. 50 mL virushaltiger Zellkulturüberstand entnommen und nach der in Abbildung 3-1 dargestellten Methodik prozessiert. Zusätzlich wurde von jeder Passage eine Probe zur Bestimmung des Gesamtvirusgehalts mittels Hämmagglutinationstest (2 mL, Abschnitt 3.3.1) gezogen. Die erste Adaption des H1N1-NIBSC Virus (produziert in MDCK-Zellen, T175-Zellkulturflasche; M-Variante des H1N1-NIBSC) an Vero-Zellen wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Christian Dietzsch [231] durchgeführt. Die Proben für die N-Glykananalytik wurden dabei nach den entsprechenden Passagierungsschritten zur Verfügung gestellt.

4.7.7.1 Adaption von Influenza-A-Virus H1N1-NIBSC an eine Vero-Zelllinie

Der jeweils maximale Virustiter der vier Passagen der Adaption an die Vero-Zelllinie ist in Abbildung 4-20 dargestellt. Es konnte eine deutliche Zunahme des Virustiters von Passage zu Passage beobachtet werden. Dieser stieg von 1,7 HA log Einheiten/100 μ L (Passage 1, 72 hpi) auf 2,7 HA log Einheiten/100 μ L (Passage 3, 72 hpi) an. Passage 4 wies einen veränderten Infektionsverlauf auf. Ein Virustiter $> 2,0$ HA log Einheiten/100 μ L wurde hier erst 192 hpi beobachtet. Die Probenahme erfolgte demnach stark verzögert 192 hpi mit einem Virustiter von 2,3 HA log Einheiten/100 μ L.

Von jeder Passage wurde der HA N-Glykanfingerprint aufgenommen. Diese sind zusammen mit dem Fingerprint des Saatvirus (produziert in MDCK-Zellen, T175-Zellkulturflasche; M-Variante des H1N1-NIBSC) in Abbildung 4-21 dargestellt. Die Passagen 1 bis 4 werden im Folgenden als die jeweiligen V-Varianten in der Passage 1, 2, 3 und 4 bezeichnet. Passage 4 repräsentierte die endgültige V-Variante des H1N1-NIBSC.

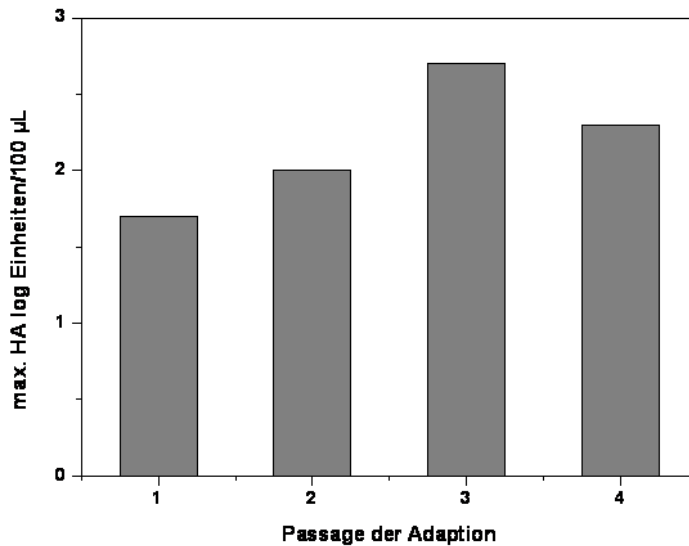


Abbildung 4-20: Maximaler Virustiter der vier Passagen der Adaption von human Influenza-A-Virus H1N1-NIBSC (Saatvirus produziert in MDCK-Zellen) an die Vero-Zelllinie

Wie erwartet und im Abschnitt 4.7.1 für human Influenza-A-Virus H1N1-RKI beschrieben (Abb. 4-12), unterschieden sich die Fingerprints der M- und V-Variante des H1N1-NIBSC (Abb. 4-21). Bereits im Fingerprint der V-Variante Passage 1 und 2 waren die dominierenden Peaks der V-Variante zu erkennen (> 250 bp). Zusätzlich zeigten sich einige Peaks < 250 bp, die im Fingerprint der Passagen 3 und 4 nicht mehr vorhanden waren (Abb. 4-21). Vergleicht man die HA N-Glykanfingerprints der Passagen 3 und 4, konnten keine signifikanten Unterschiede mehr beobachtet werden. Dies deutete darauf hin, dass eine Adaption über vier Passagen eine ausreichende Anpassung des Virus an das neue Wirtszellsystem ermöglichte. Das HA der Passage 4 der V-Variante des H1N1-NIBSC wies dabei ein ähnliches N-Glykosylierungsmuster wie das HA der V-Variante des H1N1-RKI auf (Abschnitt 4.7.1 und 4.7.4, Abb. 4-12 A und 4-16).

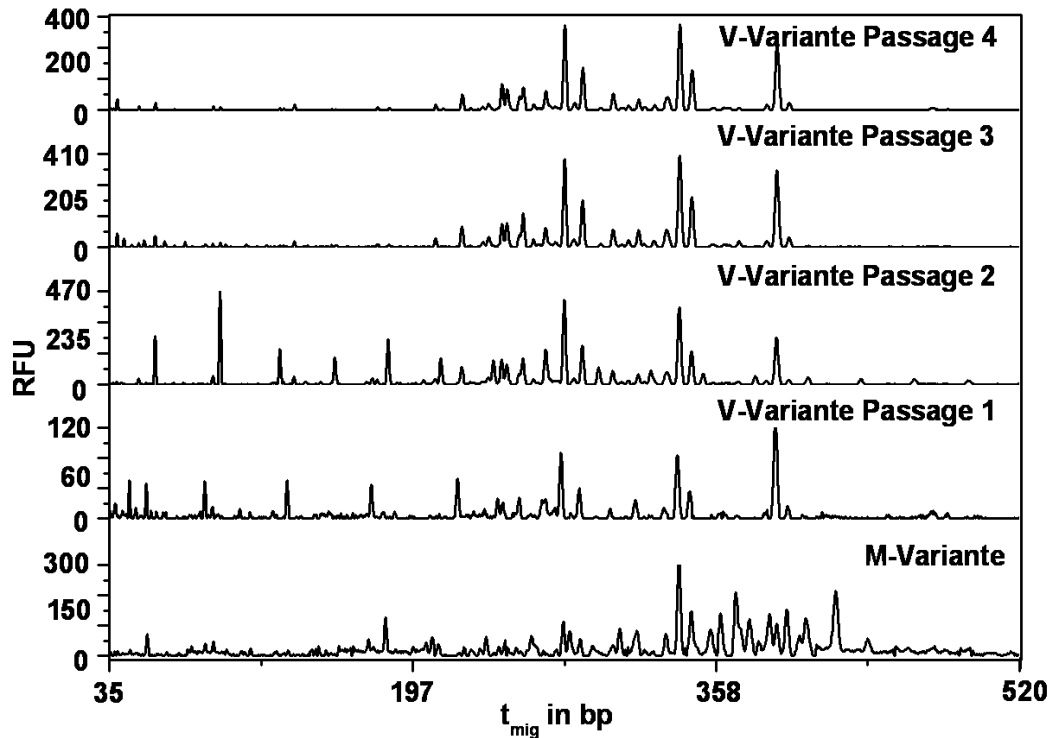


Abbildung 4-21: gestufteter Overlay der HA N-Glykanfingerprints der M-Variante des human Influenza-A-Virus H1N1-NIBSC und der V-Variante in den Passagen 1 - 4; t_{mig} ist angegeben in bp (normiert auf den internen Standard = norm. t_{mig}).

4.7.7.2 Adaption von Influenza-A-Virus H3N2 an eine Vero-Zelllinie

Die Adaption des human-Influenza-A-Virus H3N2 wurde nach dem selben Schema durchgeführt, welches für die Adaption des human-Influenza-A-Virus H1N1-NIBSC angewandt wurde. Es wurden von jeder der vier Passagen Proben für die N-Glykananalytik und die Bestimmung des Virustiters genommen. Die Virustiter der vier Passagen sind in Abbildung 4-22 dargestellt. In der Passage 1 konnte der Gesamtvirusgehalt nicht bestimmt werden (keine Agglutination und demnach Virus nicht nachweisbar). Eine deutliche Zunahme des Gesamtvirusgehalts konnte erst in Passage 4 beobachtet werden.

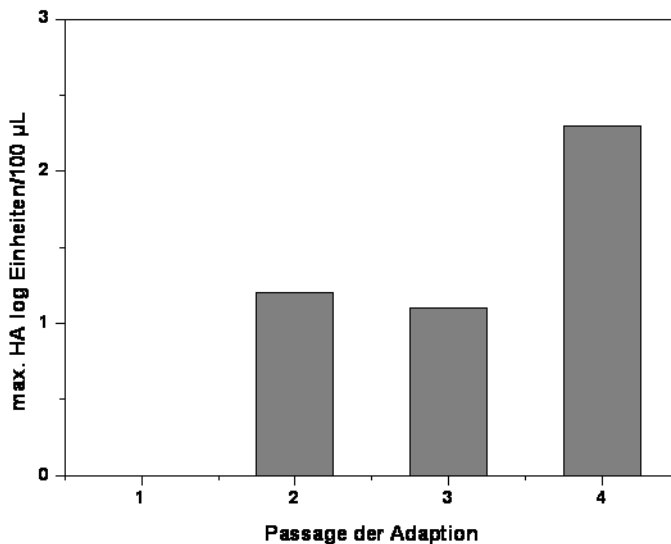


Abbildung 4-22: Maximaler Virustiter der vier Passagen der Adaption von human-Influenza-A-Virus H3N2 (Saatvirus produziert in MDCK-Zellen) an die Vero-Zelllinie

Die Proben für die HA N-Glykananalytik wurden nach dem in Abbildung 3-1 dargestellten Schema prozessiert. Der Verlauf der HA N-Glykanfingerprints über die Adaption des H3N2 Virus an die Vero-Zelllinie ist in Abbildung 4-23, zusammen mit dem Fingerprint der M-Variante des H3N2, dargestellt. Aufgrund der zu geringen Virusmenge in der Passage 1 (Virus nicht nachweisbar), konnte der Virus nicht erfolgreich mittels Ultrazentrifugation pelletiert werden. Die Aufnahme eines HA N-Glykanfingerprints war somit nicht möglich.

Für die Passage 2 und 3 ergaben sich, entsprechend des niedrigen Virustiters (bzw. HA-Gehaltes) von 1,2 HA log Einheiten/100 µL (Passage 2) bzw. 1,1 HA log Einheiten/100 µL (Passage 3), sehr instabile und kleine Viruspellets. Dies spiegelte sich auch auf dem SDS-Gel anhand von sehr schwachen HA₀-Banden wider (Daten nicht gezeigt). Daraus resultierten in den entsprechenden Elektropherogrammen Peaks von sehr geringer Intensität (Passage 3 < 50 RFU). Dennoch konnte auch hier in der Passage 2 der V-Variante der im Fingerprint der Passage 4 dominierende N-Glykanpeak beobachtet werden. Zusätzlich traten in den Fingerprints der Passagen 2 und 3 auch die im Fingerprint der M-Variante beobachteten Peaks > 260 bp auf. Diese waren im Fingerprint der V-Variante des H3N2 (Passage 4) nur noch teilweise vorhanden (vgl. auch Abschnitt 4.7.2 und 4.7.5, Abb. 4-13).

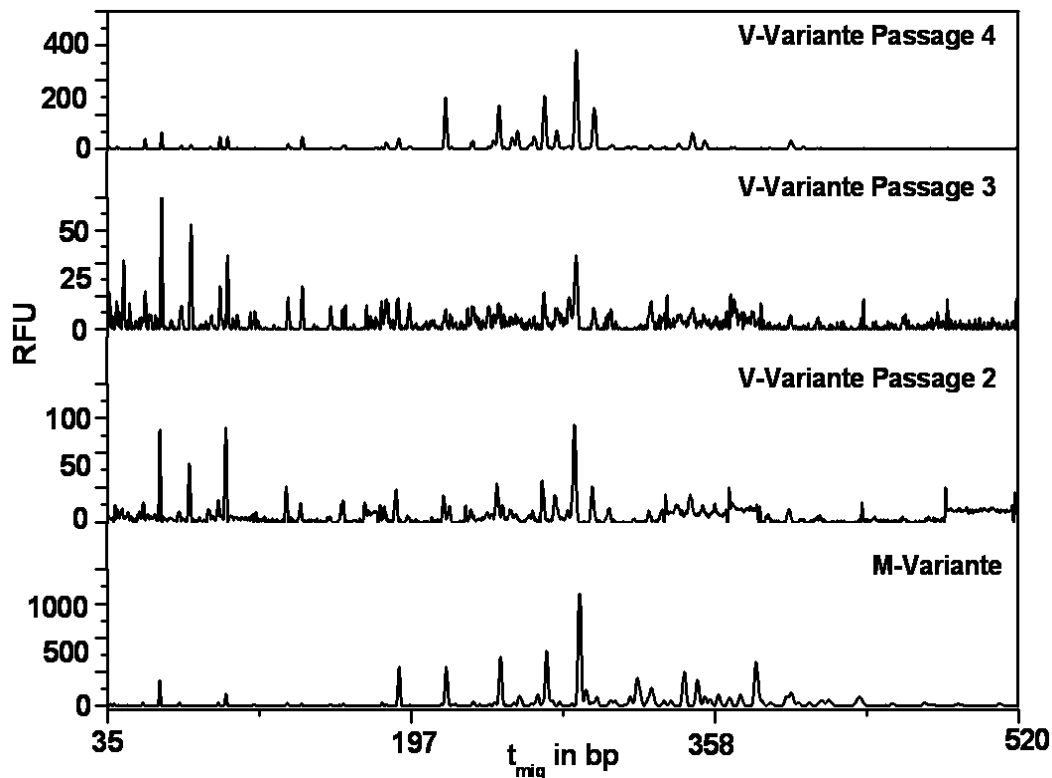


Abbildung 4-23: geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprints der M-Variante des human-Influenza-A-Virus H3N2 und der V-Variante in den Passagen 2 - 4; t_{mig} ist angegeben in bp (normiert auf den internen Standard = norm. t_{mig}).

Die erheblichen Unterschiede in der Virusausbeute in den Passagen 3 und 4, zeigten sich auch in den entsprechenden Fingerprints, im Gegensatz zur Adaption des H1N1-NIBSC. Im Fall des H3N2 Virus waren mindestens vier Passagen zur Anpassung an die neue Wirtszelllinie (Vero) erforderlich. Die bereits in Abschnitt 4.7.2 beschriebenen Unterschiede in den Fingerprints der M- und V-Variante, konnten auch hier bestätigt werden. Die Adaption des human-Influenza-A-Virus H3N2 über vier Passagen an die Vero-Zelllinie resultierte in einen HA N-Glykanfingerprint der V-Variante des H3N2, der mit der V-Variante des H3N2 im Abschnitt 4.7.2 und 4.7.5 (Abb. 4-13) vergleichbar war. Es traten keine signifikanten Unterschiede auf.

4.7.7.3 Adaption von Influenza-A-Virus H3N2 an eine RCar-Zelllinie

Wie unter 4.7.7 einleitend beschrieben, wurde eine Adaption des human-Influenza-A-Virus H3N2 an die lektinresistente RCar-Zelllinie (Mutante der MDCK Zelllinie) durchgeführt. Dabei wurde nach der in Abschnitt 3.2 beschriebenen Methode verfahren. Es erfolgte auch bei dieser Adaption für jede Passage die Probennahme für die HA N-Glykananalytik und die Bestimmung des Gesamtvirusgehalts. Die Virustiter der einzelnen Passagen sind in Abbildung 4-24 dargestellt. Durch die Adaption über vier Passagen wurde nur eine leichte

Zunahme des Gesamtvirusgehalts erzielt. Der Virustiter lag in der vierten Passage bei 1,7 HA log Einheiten/100 μ L.

Für die Passagen 1 und 2 war die Pelletierung des Virus mittels Ultrazentrifugation aufgrund eines zu geringen Gesamtvirusgehalts nicht erfolgreich. Deutliche, aber leicht instabile Pellets wurden für die Passagen 3 und 4 erzielt. Im SDS-Gel konnten die HA₀-Banden in beiden Passagen eindeutig identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). In den entsprechenden Elektropherogrammen wurden Peaks mit einer Intensität von bis zu ca. 300 RFU detektiert (Abb. 4-25).

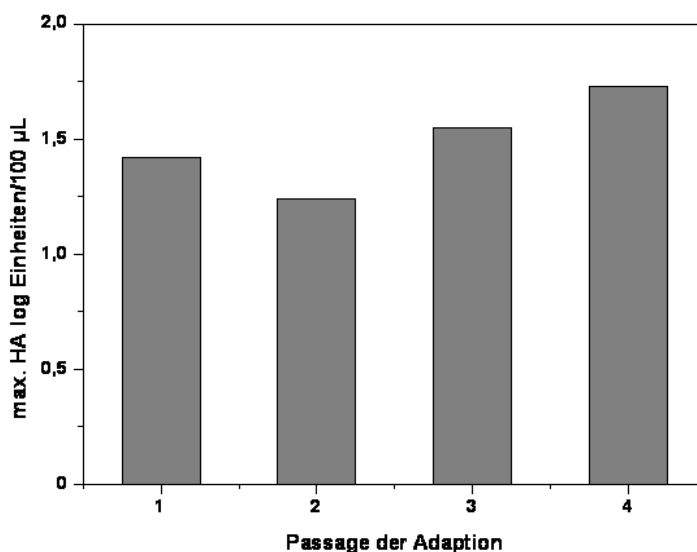


Abbildung 4-24: Maximaler Virustiter der vier Passagen der Adaption von human-Influenza-A-Virus H3N2 (Saatvirus produziert in MDCK-Zellen) an die RCAR-Zelllinie

Die in Abschnitt 4.7.2 beschriebenen Unterschiede in den Fingerprints der M- und R-Variante (Abb. 4-13) (hier Passage 4) wurden während der Adaption bestätigt. Wie für die Adaption des human-Influenza-A-Virus H1N1-NIBSC (Abschnitt 4.7.7.1) konnten zwischen den Fingerprints der Passagen 3 und 4 keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Hinsichtlich des HA N-Glykosylierungsmusters scheint eine Adaption des human-Influenza-A-Virus H3N2 über drei Passagen an die RCAR-Zelllinie hinsichtlich der HA N-Glykosylierung als ausreichend. Ob eine Steigerung der Virusausbeute bei weiterer Passagierung erzielt werden kann, lag nicht im Fokus dieser Arbeit und wurde daher nicht überprüft.

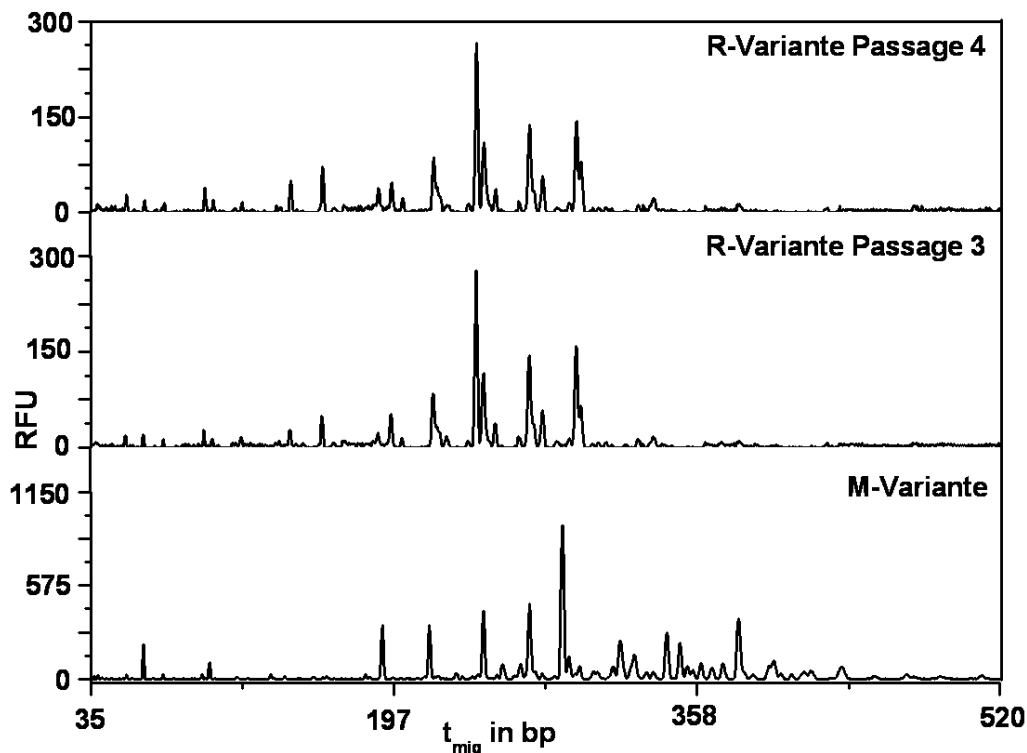


Abbildung 4-25: geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprints der M-Variante des human-Influenza-A-Virus H3N2 und der R-Variante in den Passagen 3 und 4; t_{mig} ist angegeben in bp (normiert auf den internen Standard = norm. t_{mig}).

4.7.7.4 „Rückwärtsadaption“ von Influenza-A-Virus H1N1-NIBSC an eine MDCK-Zelllinie

Nach der Adaption von zwei verschiedenen Influenza-A-Virusstämmen an Vero- bzw. RCar-Zellen, wurde ein verändertes HA N-Glykosylierungsmuster (Abschnitte 4.7.7.1 – 4.7.7.3) spätestens in der vierten Passage beobachtet. Anschließend sollte geklärt werden, ob die umgekehrte Adaption zurück an die MDCK-Zelllinie, wieder in dem ursprünglichen HA N-Glykosylierungsmuster resultiert. Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der „Rückwärtsadaption“ von H1N1-NIBSC Saatvirus (V-Variante Passage 4) an die MDCK-Zelllinie beschrieben. Es wurde dabei nach der im Abschnitt 3.2 beschriebenen Methode vorgegangen. Die Passagen 1 - 4 wurden zur Bestimmung des Gesamtvirusgehalts beprobt. Eine Probe für die HA N-Glykananalytik wurde nur von der Passage 4 genommen und prozessiert.

Die maximalen Virustiter der Passagen 1 - 4 sind in Abbildung 4-26 dargestellt. Ab Passage 3 konnte eine deutliche Zunahme des Gesamtvirusgehaltes beobachtet werden. In der Passage 4 wurde ein Virustiter von 2,6 HA log Einheiten/100 μ L bestimmt. Im Vergleich dazu ergab die direkte Replikation von H1N1-NIBSC Virus (Saatvirus produziert in MDCK-Zellen) einen

Virustiter von 2,0 HA log Einheiten/100 μ L.

In Abbildung 4-27 sind die HA N-Glykanfingerprints der M- und V-Variante des human-Influenza-A-Virus H1N1-NIBSC im Vergleich zum Fingerprint der vierten Passage der „Rückwärtsadaption“ dargestellt.

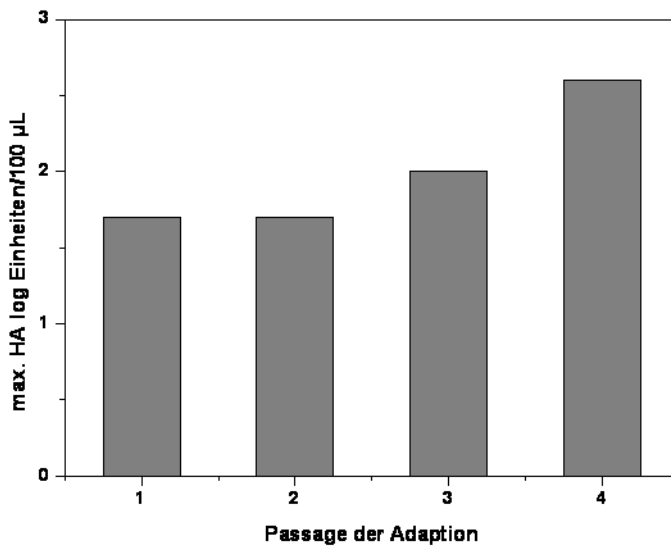


Abbildung 4-26: Maximaler Virustiter der vier Passagen der „Rückwärtsadaption“ von human-Influenza-A-Virus H1N1-NIBSC (Saatvirus produziert in Vero-Zellen, Passage 4) an die MDCK-Zelllinie

Die Unterschiede zwischen den HA N-Glykanfingerprints der M- und V-Variante wurden bereits im Abschnitt 4.7.7.1 betrachtet. Vergleicht man den HA N-Glykanfingerprint der „rückwärts“ adaptierten M-Variante (Passage 4) mit dem der „ursprünglichen“ M-Variante, konnten keine signifikanten Unterschiede (hinsichtlich PA, relativen Peakhöhen und -flächen) im allgemeinen Erscheinungsbild des Fingerprints festgestellt werden. Auffällig war allerdings die deutlich höhere Intensität der Peaks im Fingerprint der „rückwärts“ adaptierten M-Variante (Passage 4; Maximum bei ca. 1100 RFU) im Vergleich zur „ursprünglichen“ M-Variante (Maximum bei ca. 250 RFU). Die „Rückwärtsadaption“ von human-Influenza-A-Virus H1N1-NIBSC (Saatvirus produziert in Vero-Zellen) über vier Passagen an die MDCK Zelllinie resultiert demnach wieder in dem ursprünglichen HA N-Glykosylierungsmuster.

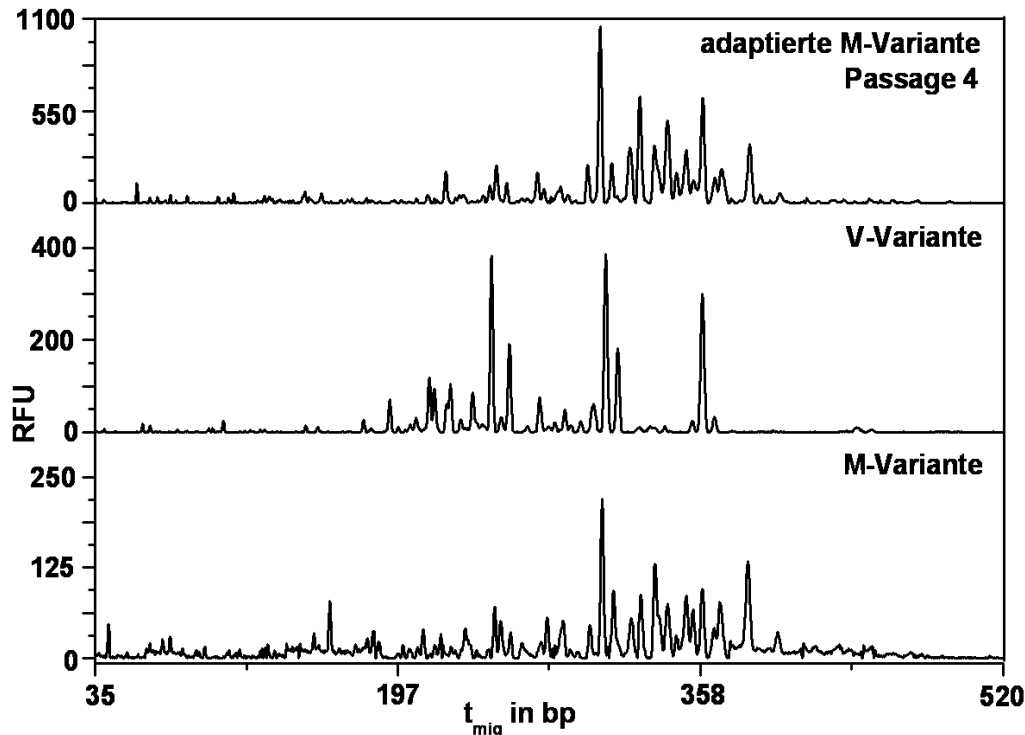


Abbildung 4-27: geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprints der M- und V-Variante des human-Influenza-Virus H1N1-NIBSC und der „rückwärts“ adaptierten M-Variante (Passage 4) ; t_{mig} ist angegeben in bp (normiert auf den internen Standard = norm. t_{mig}).

4.8 Einfluss verschiedener Kultivierungsparameter auf die N-Glykosylierung des Influenza-Virus HA

In den folgenden Abschnitten soll die Auswirkung verschiedener Zellkulturparameter auf das N-Glykosylierungsmuster des HA von Influenza-A-Virusstämmen, H1N1-NIBSC, H1N1-RKI und H3N2 repliziert in verschiedenen Wirtszellsystemen (MDCK, Vero, AGE1.CR und Hep.G2), beschrieben werden. Untersucht wurde u. a. der Einfluss des Zellkultursystems (statisch und dynamisch), des Zellkulturmediums, der Zelldichte, des Sauerstoffgehaltes im Zellkulturmedium und des Erntezeitpunktes. Zusätzlich wurde der Einfluss der Inaktivierung des Virus mit β -Propiolacton (β -PL) betrachtet.

4.8.1 Einfluss des Zellkultursystems auf die HA N-Glykosylierung

MDCK-, Vero- und AGE1.CR-Zellen wurden wie im Abschnitt 3.2 beschrieben in verschiedenen Zellkultursystemen (T175-Zellkulturflaschen - statisches System, 850 cm²-Rollerflaschen - „halb“-statisches System und 5 L-Bioreaktor - dynamisches System) kultiviert und mit human-Influenza-A-Virus (H1N1-RKI, H1N1-NIBSC und H3N2) infiziert. Die Probenahme für die HA N-Glykananalytik fand in Abhängigkeit des Wirtszellsystems und Virus zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion statt (Abschnitt 3.2). Die Proben wurden anschließend nach dem in Abbildung 3-1 dargestellten Schema prozessiert und die HA N-Glykanfingerprints aufgenommen.

Zuerst wurden die HA N-Glykanfingerprints der M-Variante des H1N1-RKI und H3N2 verglichen, nach Replikation des Virus in T175-Zellkulturflaschen und Rollerflaschen (Abschnitte 4.5 und 4.6; Abb. 4-7 und 4-10). Als Zellkulturmedium wurde GMEM verwendet. Vergleicht man die Zellkultursysteme T175-Zellkulturflasche und Rollerflasche konnten keine Unterschiede hinsichtlich PA und Verteilung der Peaks im HA N-Glykosylierungsmuster der M-Variante beider Influenza-A-Virusstämme festgestellt werden (Abb. 4-28 A und B).

Anschließend wurde der HA N-Glykanfingerprint der M-Variante des H1N1-RKI, produziert in einer T175-Zellkulturflasche, mit dem einer Probe dieser M-Variante produziert in einem 5 L-Bioreaktor verglichen (Abb. 4-29 A). Als Zellkulturmedium wurde ebenfalls GMEM verwendet. Die Probenahme für die HA N-Glykananalytik erfolgte in beiden Fällen ca. 72 hpi. Obwohl in diesen beiden HA N-Glykanfingerprints die selben Peaks auftraten und eine identische PA ermittelt wurde (Daten nicht gezeigt), waren deutliche Unterschiede im Fingerprint hinsichtlich der Verteilung der HA N-Glykane (Peakintensitäten) zu erkennen. Peaks mit einer norm. $t_{\text{mig}} > 350$ bp waren im Fingerprint aus der T175-Zellkulturflaschenprobe deutlich intensiver vertreten als in dem der 5 L-Bioreaktorprobe. Im Gegensatz dazu wiesen Peaks mit einer norm. $t_{\text{mig}} < 350$ bp in dem Fingerprint der 5 L-Bioreaktorprobe eine etwas höhere Intensität als die Peaks mit der selben norm. t_{mig} im Fingerprint der Probe aus der T175-Zellkulturflasche auf.

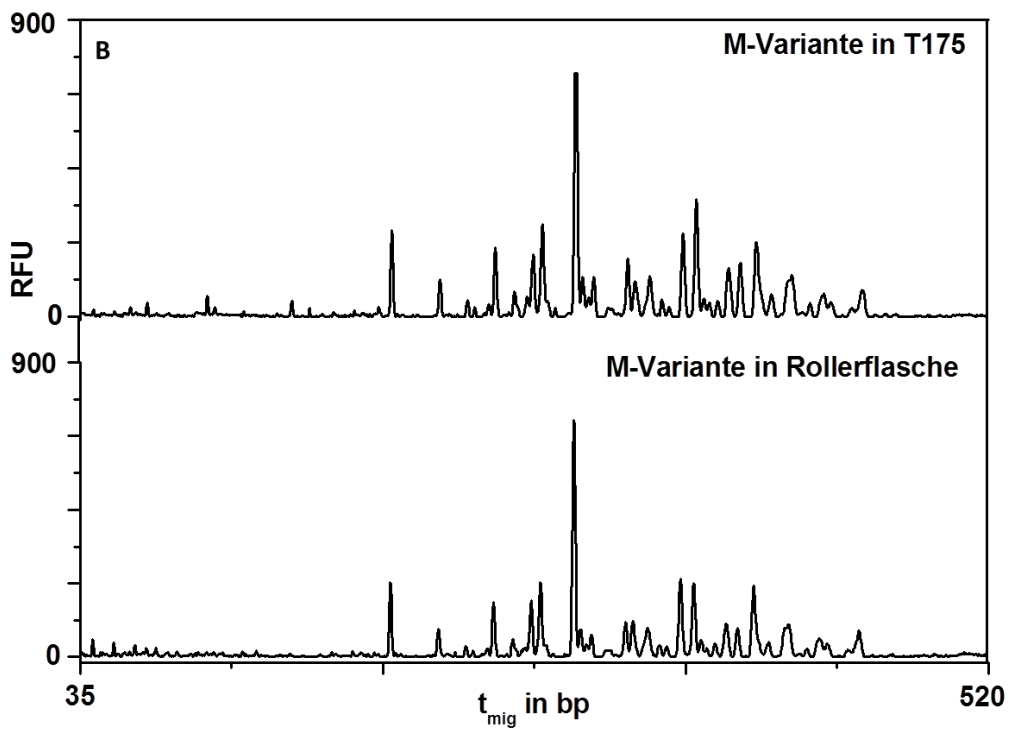
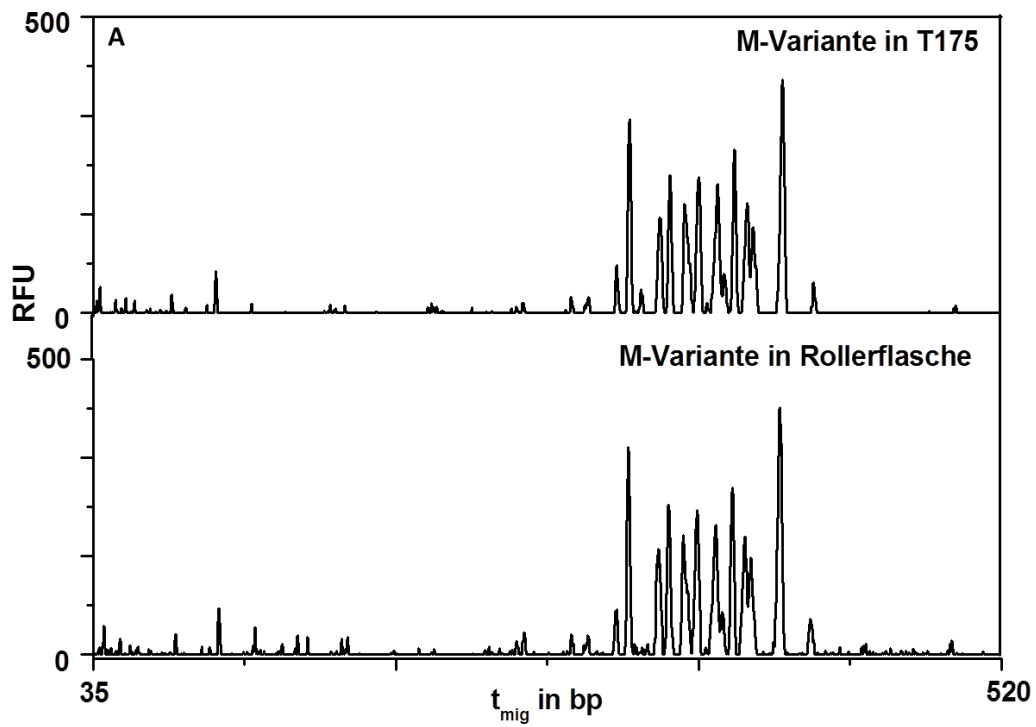


Abbildung 4-28: geschifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprints eines Rollerflaschenliquots und einer Probe aus einer T175-Zellkulturflasche der M-Variante des (A) H1N1-RKI und (B) H3N2

In Abbildung 4-29 B ist der Vergleich des HA N-Glykanfingerprints der M-Variante des H3N2 aus einer T175-Zellkulturflasche mit dem aus einer Probe aus einer 5 L-Bioreaktorkultur verglichen. Die Produktion der M-Variante des H3N2 in einem 5 L-Bioreaktor wurde im Rahmen eines Zeitreihenversuches durchgeführt. Einzelheiten werden im Abschnitt 4.8.5 beschrieben. Die Probenahme zu den dargestellten Fingerprints erfolgte 30 hpi aus der Zellkulturflasche bzw. 48 hpi aus dem 5 L-Bioreaktor. Wie schon für die M-Variante des H1N1-RKI beschrieben, konnte auch für die M-Variante des H3N2 in beiden Proben (T175-Zellkulturflasche und 5 L-Bioreaktor) eine identische PA bestimmt werden (Daten nicht gezeigt).

Die unterschiedliche Verteilung der HA N-Glykane (bezogen auf die Peakintensitäten) war für die M-Variante des H3N2 (im Vergleich zum H1N1-RKI) stärker ausgeprägt. Unterschiede in den Fingerprints des H1N1-RKI (Abb. 4-29 A) konzentrierten sich hauptsächlich auf den Migrationszeitenbereich > 350 bp. Im Gegensatz dazu waren die Unterschiede in der Verteilung der HA N-Glykane der M-Variante des H3N2 über einen weiten Migrationszeitenbereich vorhanden (norm. t_{mig} zwischen 172 bp und 400 bp). Ausgehend vom intensivsten Peak bei 267 bp (Tabelle 4-4) wiesen sowohl Peaks mit kleinerer als auch größerer norm. t_{mig} in der 5 L-Bioreaktorprobe (im Vergleich zur Probe aus der T175-Zellkulturflasche) überwiegend geringere Intensitäten auf (Abb. 4-29 B). Während die Intensität des Peaks bei 172 bp (erster Peak des Hauptglykosylierungsmusters) in beiden Proben vergleichbar war, lag die der Peaks bei 207 bp und 254 bp in der 5 L-Bioreaktorprobe deutlich unter der der Probe aus der T175-Zellkulturflasche. Im Migrationszeitenbereich > 267 bp fielen besonders die Unterschiede der Peakintensität der Peaks bei 295 bp und 350 bp auf (5 L-Bioreaktor $<$ T175-Zellkulturflasche). Anhand der vorliegenden Daten wurde die Verteilung der HA N-Glykane der M-Variante des H1N1-RKI und H3N2 von der Wahl des Zellkultursystems (statisch und „halb“-statisch vs. dynamisch) beeinflusst.

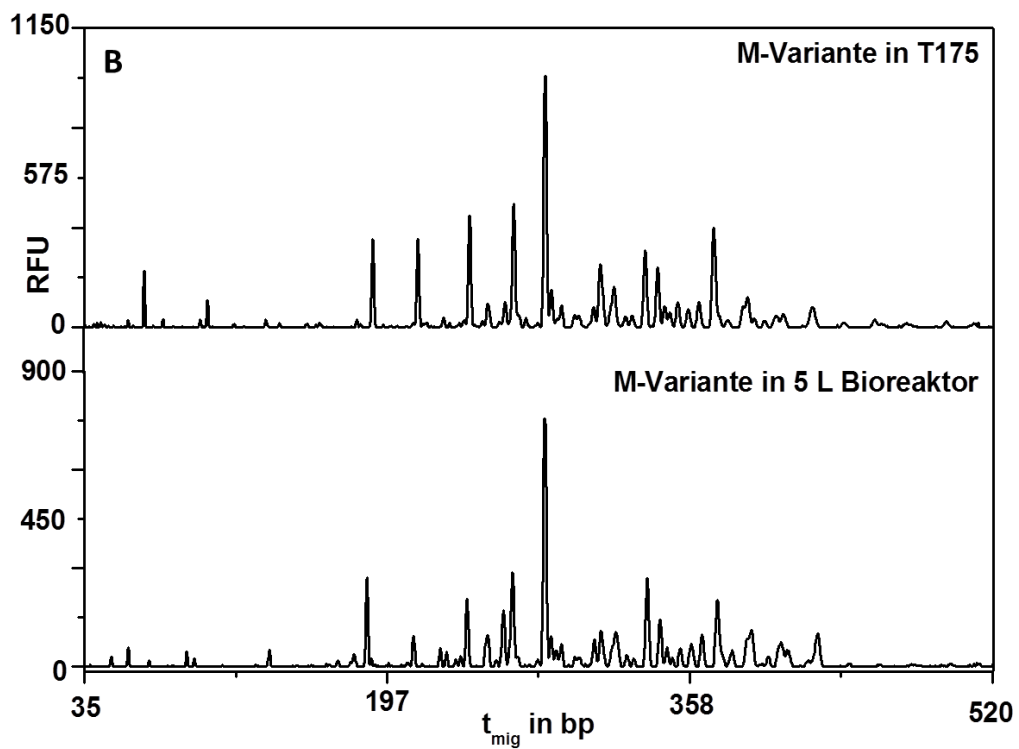
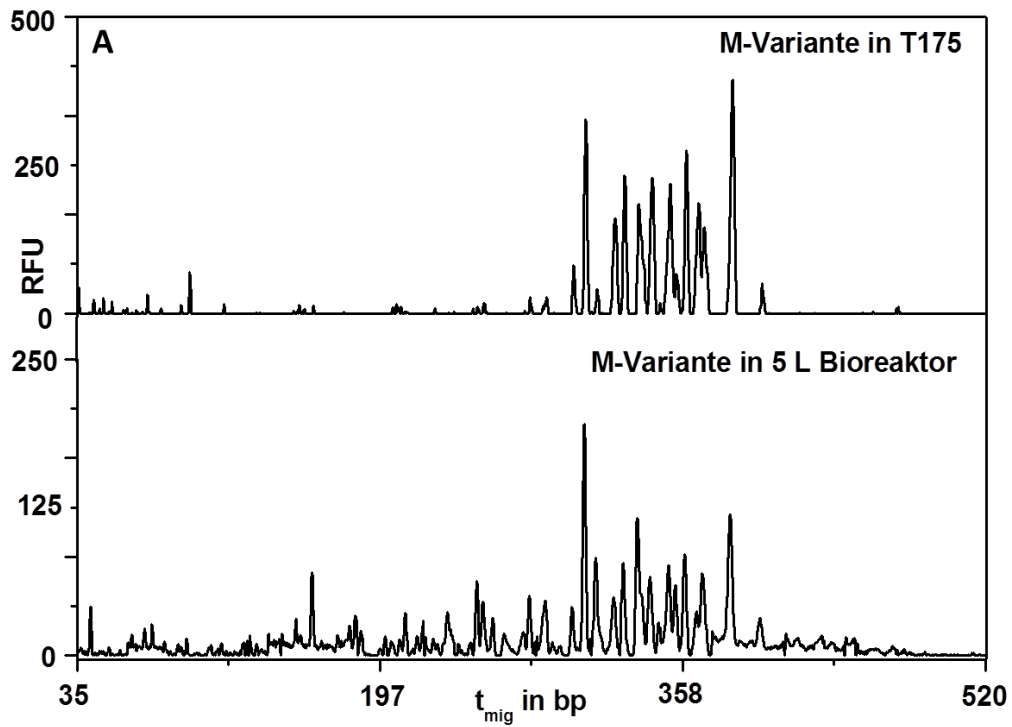


Abbildung 4-29: geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprint der M-Variante des (A) H1N1-RKI und (B) H3N2 jeweils aus einer Probe aus einem 5 L-Bioreaktor und aus einer T175-Zellkulturflasche

Vero-Zellen wurden ebenfalls in T175-Zellkulturflaschen, Rollerflaschen und einem 5 L-Bioreaktor kultiviert und jeweils mit human-Influenza-A-Virus H1N1-NIBSC infiziert. Proben für die HA N-Glykananalytik wurden genommen und nach dem in Abbildung 3-1 dargestellten Schema prozessiert.

Im Vergleich der HA N-Glykanfingerprints der Proben aus T175-Zellkulturflaschen und Rollerflaschen konnten, wie schon für die MDCK-Zellen, keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich PA oder Verteilung der Peaks (Intensitäten), festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz dazu wies der HA N-Glykanfingerprint der V-Variante des H1N1-NIBSC produziert im 5 L-Bioreaktor deutliche Unterschiede zu dem aus der T175-Zellkulturflasche bzw. Rollerflasche auf. In Abbildung 4-30 sind die entsprechenden Fingerprints der V-Variante, produziert im 5 L-Bioreaktor und einer T175-Zellkulturflasche, dargestellt.

Wie schon für die M-Variante des H1N1-RKI beobachtet, wiesen auch im HA N-Glykanfingerprint der Bioreaktorprobe der V-Variante des H1N1-NIBSC, Peaks mit höherer norm. t_{mig} (> 300 bp) eine geringere Intensität als in der T175-Zellkulturflaschenprobe auf. D. h. im Vergleich der beiden Fingerprints war deutlich eine unterschiedliche Verteilung der Peaks (hinsichtlich ihrer Intensitäten) zu erkennen. Bei identischer PA wurde ein höherer Anteil an N-Glykanen mit kleinerer norm. t_{mig} in der Bioreaktorprobe detektiert. Besonders auffällig waren die zwei intensiven Peaks im Fingerprint der Bioreaktorprobe zwischen 35 bp und 100 bp, die nur in sehr geringer Intensität im Fingerprint der T175-Zellkulturflaschenprobe zu beobachten waren. Diese beiden Peaks repräsentieren sehr kleine N-Glykane. Nach Vergleich der norm. t_{mig} mit denen bekannter Strukturen, konnten diese zwei Peaks mit großer Wahrscheinlichkeit fukosylierter Chitobiose (drei Monomere) und fukosylierter Chitobiose mit β -Mannose (vier Monomere) zugeordnet werden.

Demnach resultierte, sowohl im Fall der M-Variante des H1N1-RKI als auch der V-Variante des H1N1-NIBSC, die Produktion von human-Influenza-A-Virus im 5 L-Bioreaktor in einem veränderten HA N-Glykosylierungsmuster (im Vergleich zu Kulturen aus T175- und Rollerflaschen).

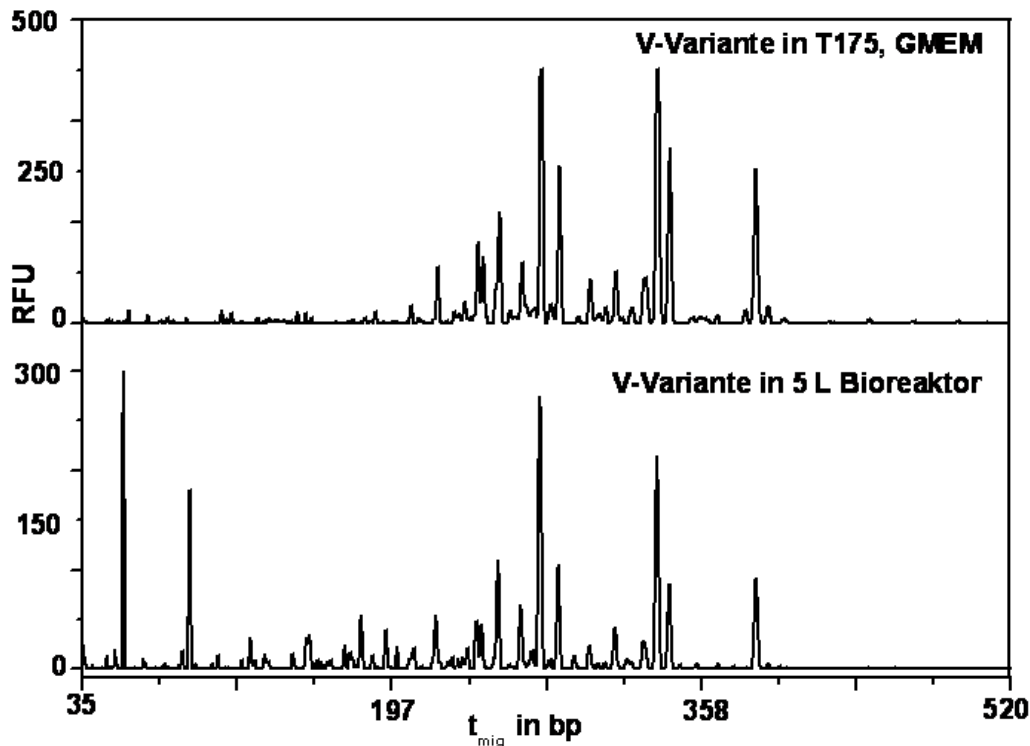


Abbildung 4-30: geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprints der V-Variante des H1N1-NIBSC einer Probe aus einem 5 L-Bioreaktor und aus einer T175-Zellkulturflasche

Abschließend sollten die HA N-Glykanfingerprints der C-Variante des H1N1-RKI, produziert in T175-Zellkulturflaschen und Rollerflaschen (Abschnitt 3.2), verglichen werden. Wie bereits für die M- und V-Varianten des H1N1-RKI bzw. H1N1-NIBSC beschrieben, waren auch hier keine signifikanten Unterschiede in den jeweiligen Fingerprints zu erkennen. Es wurde jeweils eine identische PA bei vergleichbarer Verteilung der Peakintensitäten ermittelt (Daten nicht gezeigt).

Die Produktion von human-Influenza-A-Virus (H1N1-RKI, H1N1-NIBSC und H3N2) in T175-Zellkultur bzw. Rollerflaschen, unter der Verwendung verschiedener Wirtszellsysteme (MDCK, Vero und AGE1.CR), resultierte für die jeweiligen Varianten in identischen HA N-Glykosylierungsmustern und beeinflusste diese damit nicht.

4.8.2 Einfluss des Zellkulturmediums auf die HA N-Glykosylierung

MDCK-, Vero- und HepG2-Zellen wurden jeweils in zwei verschiedenen Zellkulturmedien kultiviert (Abschnitt 3.2) und mit human-Influenza-A-Virus H1N1-RKI (MDCK- und HepG2-Zellen) bzw. H1N1-NIBSC (Vero-Zellen) infiziert. Die Kultivierung der MDCK- und Vero-Zellen erfolgte dabei jeweils in serumhaltigem (GMEM) bzw. serumfreiem (Episerf) Zellkulturmedium. Vero-Zellen wurden in T175-Zellkulturflaschen bzw. Rollerflaschen kultiviert und infiziert (Saatvirus adaptiert an Vero-Zellen). Kultivierung und Infektion der

HepG2-Zellen wurden in zwei verschiedenen serumhaltigen Zellkulturmedien, jeweils in T75-Zellkulturflaschen, durchgeführt (MDCK Saatvirus). Die Infektion und Virusvermehrung fand in allen Fällen in der entsprechenden serumfreien Variante des jeweiligen Zellkulturmediums statt. Die Probenahme für die HA N-Glykananalytik erfolgte in Abhängigkeit von Zelllinie und Zellkulturmedium (Abschnitt 3.2). Die Kultivierung und Infektion der MDCK-Zellen wurde von einem Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik durchgeführt. Zellkultur und Virusvermehrung erfolgte in einem DasGip-Bioreaktorsystem im Maßstab von 1 L. Die Proben wurden anschließend von einem Kollegen der Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik zur Verfügung gestellt.

In Abbildung 4-31 A und B sind die entsprechenden HA N-Glykanfingerprints der M- und V-Variante des H1N1-RKI bzw. H1N1-NIBSC dargestellt. In beiden Fällen waren, bedingt durch die Verwendung der zwei verschiedenen Zellkulturmedien, einige Unterschiede in den jeweiligen Fingerprints zu erkennen. Im Vergleich zu den Fingerprints der beiden in GMEM produzierten Varianten, zeigten sich in den in Episerf produzierten Varianten zwar die selben Hauptpeaks, aber in unterschiedlicher Verteilung (hinsichtlich der Peakintensität).

Peaks, die relativ große HA N-Glykane repräsentierten, wiesen im Fingerprint der Varianten produziert in Episerf eine geringere Intensität auf. Zusätzlich waren hier Peaks mit niedriger norm. t_{mig} (< 250 bp) mit einer höheren Intensität als im Fingerprint der entsprechenden Variante produziert in GMEM vertreten. Um dies zu verdeutlichen, wurden für die jeweiligen M- und V-Varianten, produziert in GMEM und Episerf, die relativen Höhen aller detektierten Peaks (in % der Gesamtpeakhöhe; Summe aller relativen Peakhöhen = 100 %) gegeneinander aufgetragen. Beispielhaft ist dies für die V-Varianten in Abbildung 4-32 dargestellt. Für beide Varianten spiegelten sich dabei sehr deutlich die bereits in den Fingerprints beobachteten Unterschiede in den Peakintensitäten wieder. So zeigten sich in dieser Art der Darstellung teilweise Unterschiede von mehr als 6 % der Gesamtpeakhöhe.

Die Kultivierung und Infektion mit human-Influenza-A-Virus H1N1-RKI der HepG2-Zellen erfolgte in T75-Zellkulturflaschen. Dabei wurden die zwei serumhaltigen Zellkulturmedien MEM und RPMI verwendet (Abschnitt 3.2). Die Probenahme für die N-Glykananalytik nach dem Schema in Abbildung 3-1 erfolgte 40 hpi. Die daraus resultierenden HA N-Glykanfingerprints der H-Variante in MEM und RPMI sind in Abbildung 4-33 A dargestellt. Auf den ersten Blick waren nur wenige Unterschiede bei Peaks mit norm. $t_{\text{mig}} < 200$ bp zu erkennen. Diese zeigten für die in MEM produzierte H-Variante höhere Intensitäten. Um Unterschiede hinsichtlich PA und Intensitäten besser bewerten zu können, wurden die relativen Peakhöhen in % der Gesamtpeakhöhe aller detektierten Peaks aufgetragen (Abb. 4-33 B).

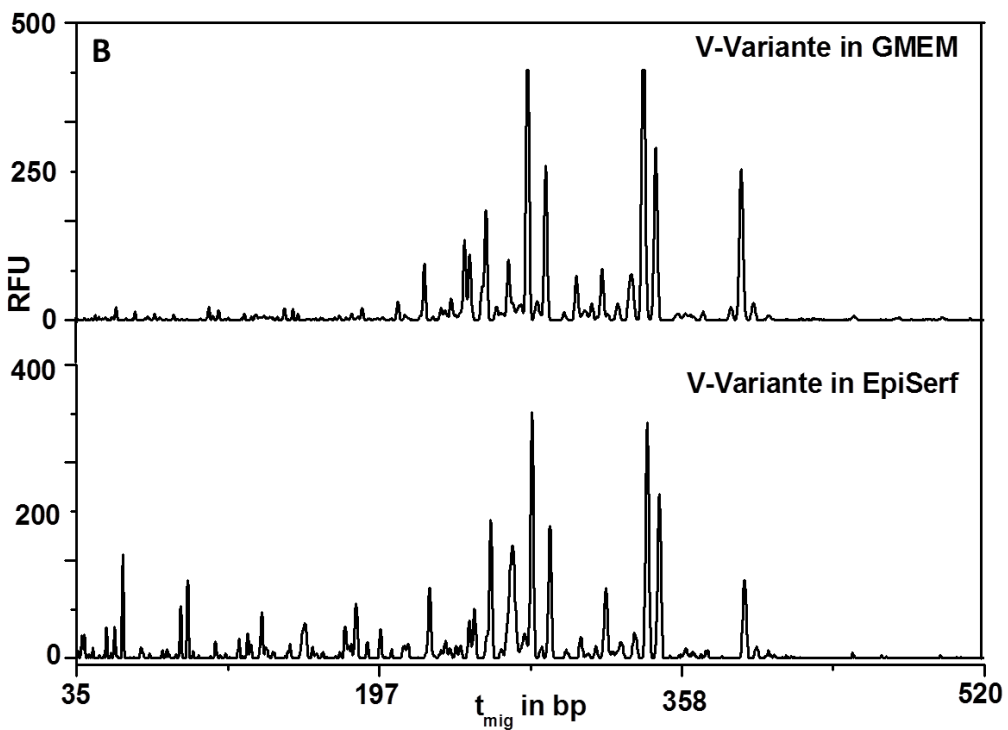
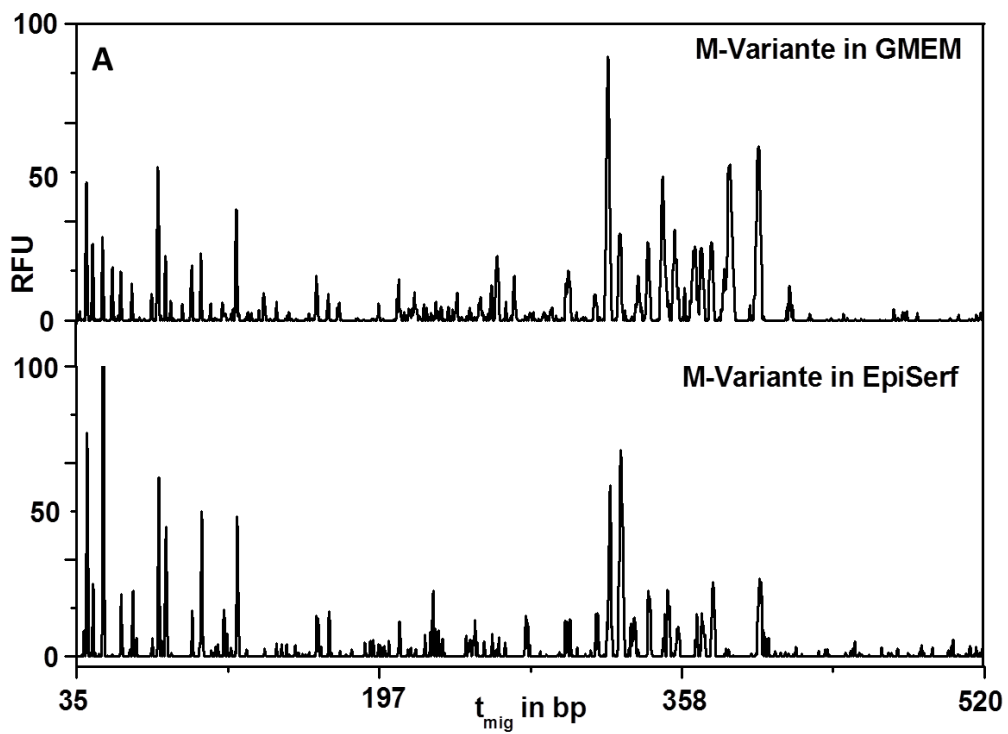


Abbildung 4-31: geschifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprint der (A) M-Varianten des H1N1-RKI und (B) V-Varianten des H1N1-NIBSC jeweils kultiviert in serumhaltigem (GMEM) und serumfreiem (EpiSerf) Zellkulturmedium

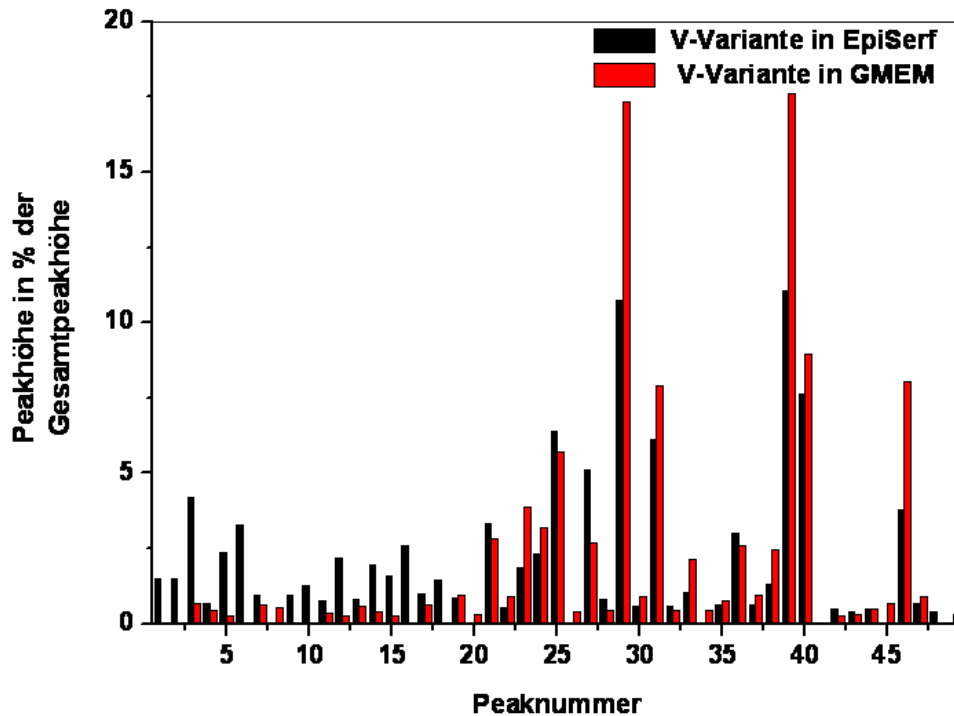


Abbildung 4-32: relative Peakhöhen in % der Gesamtpeakhöhe aller detektierten Peaks in den HA N-Glykanfingerprint der V-Variante des H1N1-NIBSC produziert in GMEM (rot) und EpiSerf (schwarz) aufgetragen gegen die Peaknummer

Im Gegensatz zu den zuvor betrachteten M- und V-Varianten, traten hier nur maximale Unterschiede von ca. 3 % der relativen Peakhöhen auf. Die Unterschiede in der Peakintensität der Peaks mit norm. $t_{\text{mig}} < 200$ bp betragen weniger als 2,5 % der relativen Peakhöhen.

Es wurde für die M- und V-Variante des H1N1-RKI bzw. H1N1-NIBSC gezeigt, dass die Verwendung von serumhaltigen im Vergleich zu serumfreiem Zellkulturmedium in Unterschiede im HA N-Glykanfingerprint (hinsichtlich der Peakintensitäten) resultierte. In serumfreiem Medium wurden deutlich weniger HA N-Glykane mit norm. $t_{\text{mig}} > 250$ bp detektiert. Speziell für die M-Variante waren Peaks mit einer norm. $t_{\text{mig}} > 350$ bp mit signifikant geringer Intensität vertreten. Diese Peaks repräsentierten relativ große komplexe N-Glykane von tri- bzw. tetraantennärer Struktur (Abschnitt 4.7.4).

Im Gegensatz dazu waren die Unterschiede bei der Verwendung zweier verschiedener serumhaltiger Zellkulturmedien (MEM und RPMI) zur Produktion der H-Variante des human-Influenza-A-Virus H1N1-RKI relativ gering.

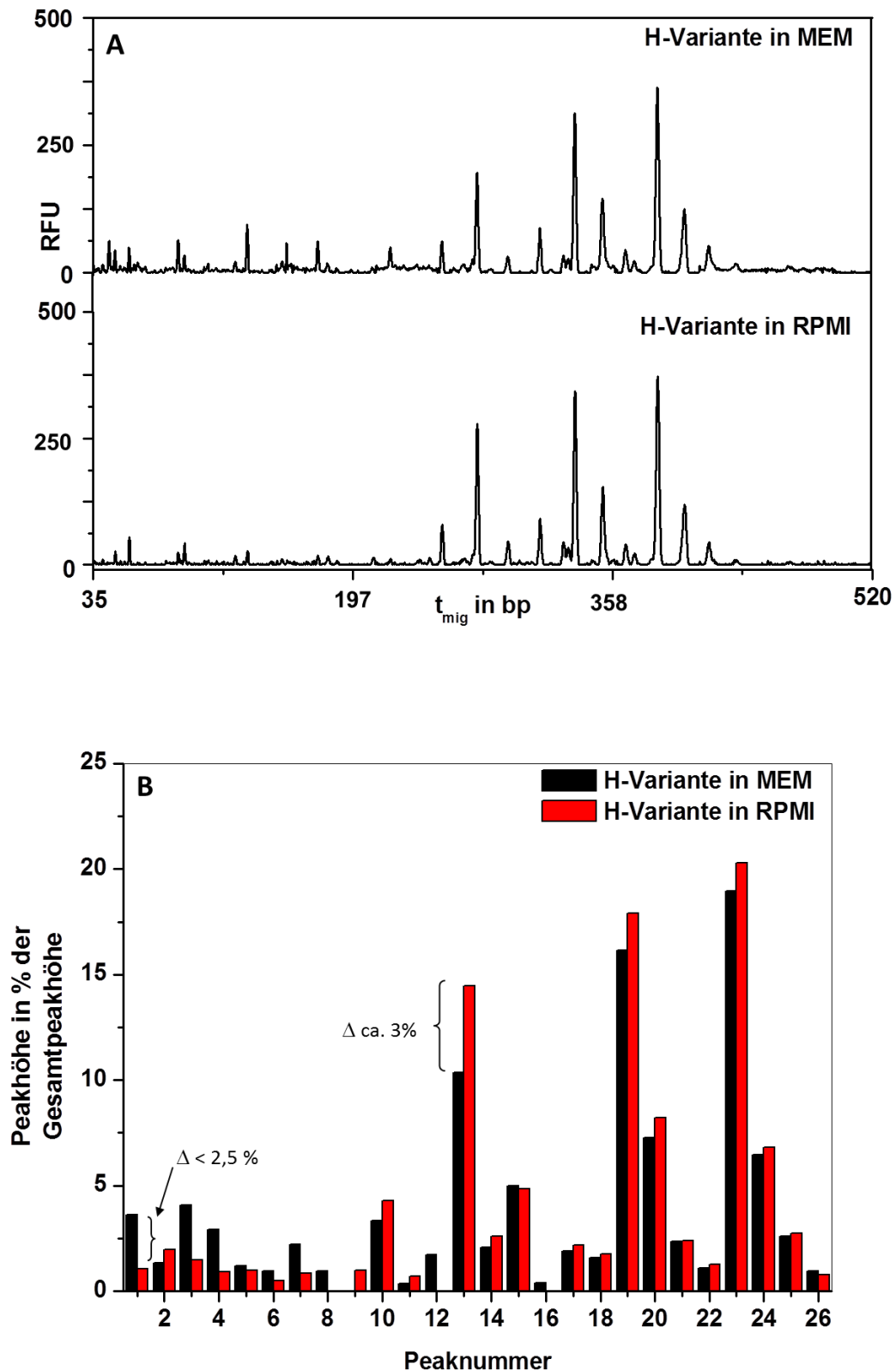


Abbildung 4-33: (A) geschifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprint der H-Variante des H1N1-RKI kultiviert in serumhaltigem MEM- und RPMI-Zellkulturmedium; (B) relative Peakhöhen in % der Gesamtpeakhöhe aller detektierten Peaks in den HA N-Glykanfingerprints der H-Variante des H1N1-RKI produziert in MEM (schwarz) und RPMI (rot) aufgetragen gegen die Peaknummer

4.8.3 Einfluss der Zelldichte auf die HA N-Glykosylierung

Um den Einfluss der Zelldichte auf die Glykosylierung des Influenza-Virus HA zu untersuchen, wurden MDCK-Zellen in einem Volumen von 400 mL im DasGip-System mehrfach kultiviert und anschließend mit human-Influenza-A-Virus H1N1-NIBSC infiziert. Das System wurde dabei jeweils unter Perfusionsbedingungen gefahren. Diese Kultivierungen wurden von einem Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik durchgeführt. Proben für die HA N-Glykananalytik wurden nach Abschluss der einzelnen Versuche von einem Kollegen der Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik zur Verfügung gestellt. Im Folgenden sollen die HA N-Glykanfingerprints aus zwei Perfusionsproben im Vergleich zu dem aus einer Probe aus einem 5 L-Bioreaktor (Standardkultivierung) beschrieben werden. Die Probe aus dem 5 L-Bioreaktor wurde ebenfalls nach abgeschlossener Kultivierung von Kollegen der Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik zur Verfügung gestellt. Im 5 L-Bioreaktor wurde eine Microcarrier-Konzentration von 2 g/L eingesetzt. Es wurde bei einer Zellzahl von $1,9 \cdot 10^6$ Zellen/mL mit human Influenza-A-Virus H1N1-NIBSC infiziert (MOI = 0,025). Die Probenahme für die HA N-Glykananalytik erfolgte 74 hpi. Es wurde ein Virustiter von 2,28 HA log Einheiten/100 μ L bestimmt. Die Perfusionskulturen wurden mit einer Microcarrier-Konzentration von 10 g/L (Perfusion 1) bzw. 12,5 g/L (Perfusion 2) gefahren. Die maximalen Zellzahlen wurden 10 hpi (Infektion mit human-Influenza-A-Virus H1N1-NIBSC) auf $6,3 \cdot 10^6$ Zellen/mL (Perfusion 1) bzw. $9,2 \cdot 10^6$ Zellen/mL (Perfusion 2) bestimmt. Aufgrund der im Vergleich zu den im 5 L-Bioreaktor deutlich höheren Zellzahlen wurden die Perfusionskulturen 1 und 2 als Hochzelldichtekulturen betrachtet. Die Probenahme für die HA N-Glykananalytik erfolgte 47,5 hpi (Perfusion 1) bzw. 67,25 hpi (Perfusion 2) mit einem Virustiter von 3,25 HA log Einheiten/100 μ L (Perfusion 1) bzw. 2,89 HA log Einheiten/100 μ L (Perfusion 2). Die Proben aus dem 5 L-Bioreaktor und den Perfusionen 1 und 2 wurden nach dem Schema in Abbildung 3.2 prozessiert. Dabei wurden während der Aufreinigung und Aufkonzentrierung der Perfusionsproben sehr große Pellets nach den ersten drei Zentrifugationsschritten verworfen, die in der Hochzelldichte begründet waren. Es ergaben sich verhältnismäßig kleine aber stabile Viruspellets nach der Ultrazentrifugation. In Abbildung 4-34 A sind die HA N-Glykanfingerprints der M-Variante des human-Influenza-A-Virus H1N1-NIBSC aus Perfusion 1 und 2 dargestellt. In beiden Fällen war das bereits zuvor beschriebene Glykosylierungsmuster des HA der M-Variante zu erkennen (Abschnitt 4.7.7). Sowohl im Fingerprint der Probe aus Perfusion 1 als auch in dem aus Perfusion 2 waren neben den Hauptpeaks (norm. $t_{mig} > 300$ bp) auch einige Peaks mit norm. $t_{mig} < 250$ bp zu beobachten. Diese traten allerdings zum Teil mit unterschiedlicher Peakintensität auf. Es

wurden keine Unterschiede in der Anzahl der Peaks mit norm. $t_{\text{mig}} > 300$ bp festgestellt. Allerdings waren einige Unterschiede im Vergleich der Peakintensitäten beider Proben zu erkennen (Daten nicht gezeigt), die bereits in den Fingerprints beobachtet werden konnten. Im Allgemeinen sind die HA N-Glykanfingerprints aus den Proben der Perfusion 1 und 2 vergleichbar.

Anschließend wurde der HA N-Glykanfingerprint der M-Variante des human-Influenza-A-Virus H1N1-NIBSC aus der Perfusionskultur 1 (Abb. 4-34 A) mit dem der M-Variante des selben Virus aus einer 5 L-Bioreaktorkultur (Abb. 4-29 A) verglichen (Abb. 4-34 B). Obwohl bei den Hauptpeaks (norm. $t_{\text{mig}} > 300$ bp) kein Unterschied in der PA ermittelt wurde, traten jedoch deutliche Unterschiede in der Peakverteilung (hinsichtlich der Peakintensitäten) auf (Daten nicht gezeigt). Diese waren bereits in den entsprechenden Fingerprints (Abb. 4-34 B) erkennbar. Im Fingerprint der Perfusionsprobe waren Peaks mit einer norm. $t_{\text{mig}} > 350$ bp deutlich intensiver vertreten als in dem der 5 L-Bioreaktorprobe. Sowohl in der Perfusion als auch der 5 L-Bioreaktorprobe waren Peaks mit norm. $t_{\text{mig}} < 250$ bp zu erkennen, allerdings bei verschiedenen norm. t_{mig} in unterschiedlicher Intensität. Besonders in der Probe aus der Perfusionskultur wurden deutliche Peaks bei norm. $t_{\text{mig}} < 150$ bp beobachtet.

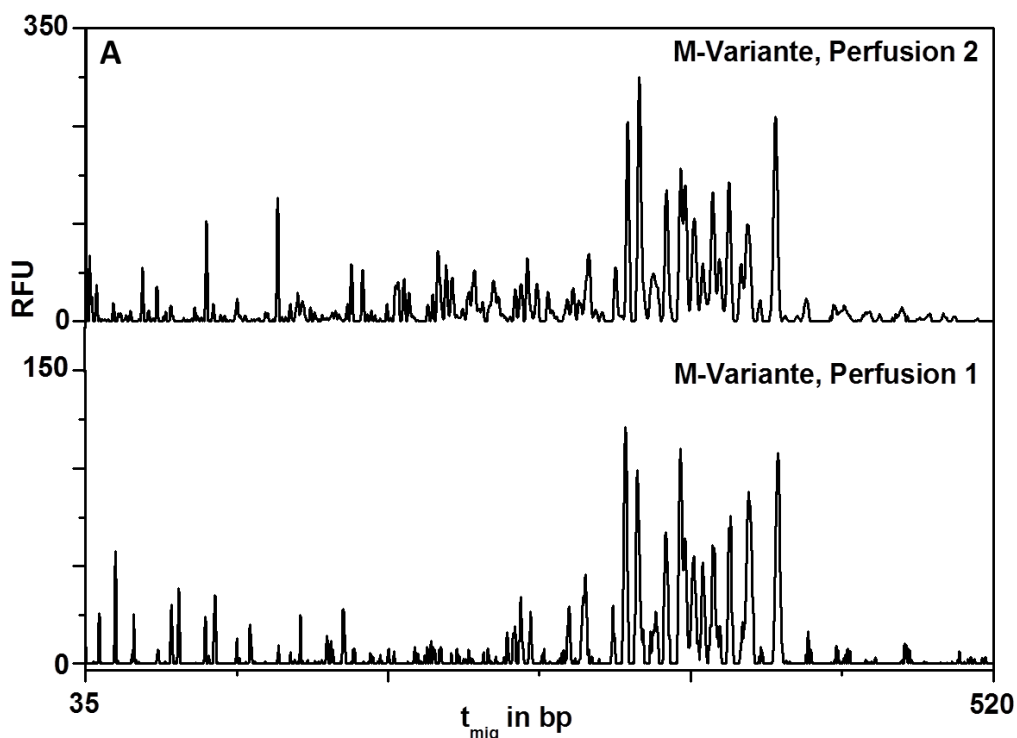


Abbildung 4-34: (A) geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprints der M-Variante des H1N1-NIBSC aus Proben der Perfusionskultur 1 und 2

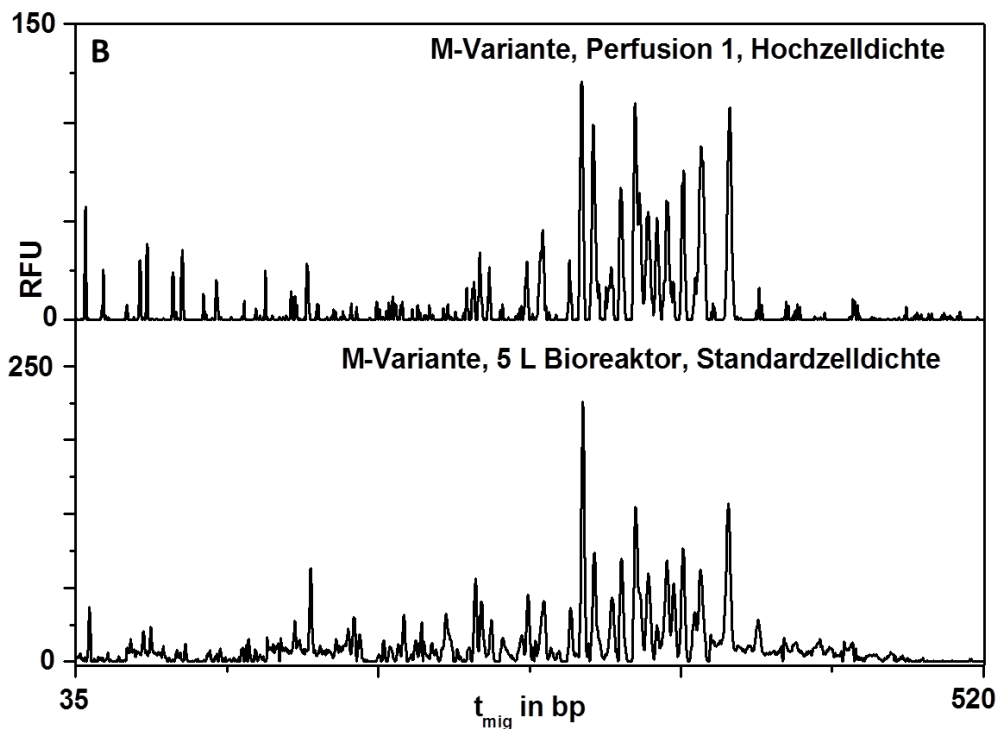


Abbildung 4-35: (B) geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprints der M-Variante des H1N1-NIBSC der Probe aus Perfusionkultur 1 im Vergleich zu einer Probe aus einem 5 L-Bioreaktor

Zusammenfassend waren die HA N-Glykanfingerprints des H1N1-NIBSC aus den betrachteten Perfusionskulturen 1 und 2 vergleichbar. Es zeigten sich einige kleinere Unterschiede in der Peakverteilung. Im Vergleich zu einer Probe aus einem 5 L-Bioreaktor konnten allerdings signifikantere Unterschiede in den Peakintensitäten der Hauptpeaks (norm. $t_{\text{mig}} > 300$ bp) beobachtet werden.

4.8.4 Einfluss des Sauerstoffgehaltes im Zellkulturmedium auf die HA N-Glykosylierung

Der Einfluss des Sauerstoffgehaltes im Zellkulturmedium wurde in Proben aus Perfusionskulturen (Abschnitt 4.8.3) untersucht. Dabei wurden die Perfusionskulturen 1 und 2 aus Abschnitt 4.8.3 und eine dritte Perfusionskultur (Perfusion 3) betrachtet. Auch hier wurden MDCK-Zellen im DasGip-System mit human-Influenza-A-Virus H1N1-NIBSC infiziert. Die maximale Zellzahl in der Perfusionskultur 3 betrug $11,2 \cdot 10^6$ Zellen/mL (10 hpi). Die Ernte für die HA N-Glykananalytik erfolgte 67,25 hpi bei einem Virustiter von 2,82 HA log Einheiten/100 μL . Der Sauerstoffgehalt im Zellkulturmedium (hier GMEM) wurde über den Sauerstoff-Partialdruck ($p\text{O}_2$) bestimmt. Dieser betrug in den

Perfusionskulturen 1 und 3 mehr als 150 % (Sauerstoffsonde kalibriert gegen Luft) und in Perfusionskultur 2 40 %. In Abbildung 4-35 A sind die HA N-Glykanfingerprints der Perfusionskulturen 1 und 3 (pO_2 150 %) dargestellt. Es waren keine Unterschiede in der PA (Peaks mit norm. $t_{mig} > 300$ bp) zu beobachten. Peaks im Migrationszeitenbereich < 200 bp hatten im Fingerprint der Perfusionskultur 1 (im Vergleich zu Perfusion 3) einen etwas höheren Anteil. Dies ist allerdings in den allgemein deutlich intensiveren Peaks (norm. $t_{mig} > 300$ bp) im Fingerprint der Perfusion 3 (RFU_{max} ca. 500) zu begründen (RFU_{max} in Perfusion 1 ca. 150). Im Vergleich der Peaks mit norm. $t_{mig} > 300$ bp, wiesen nur drei Peaks (norm. t_{mig} zwischen 375-400 bp) eine unterschiedliche Verteilung hinsichtlich ihrer Peakintensität auf. Im Allgemeinen konnten die HA N-Glykanfingerprints der Perfusionskulturen 1 und 3 ohne signifikante Unterschiede als vergleichbar angesehen werden.

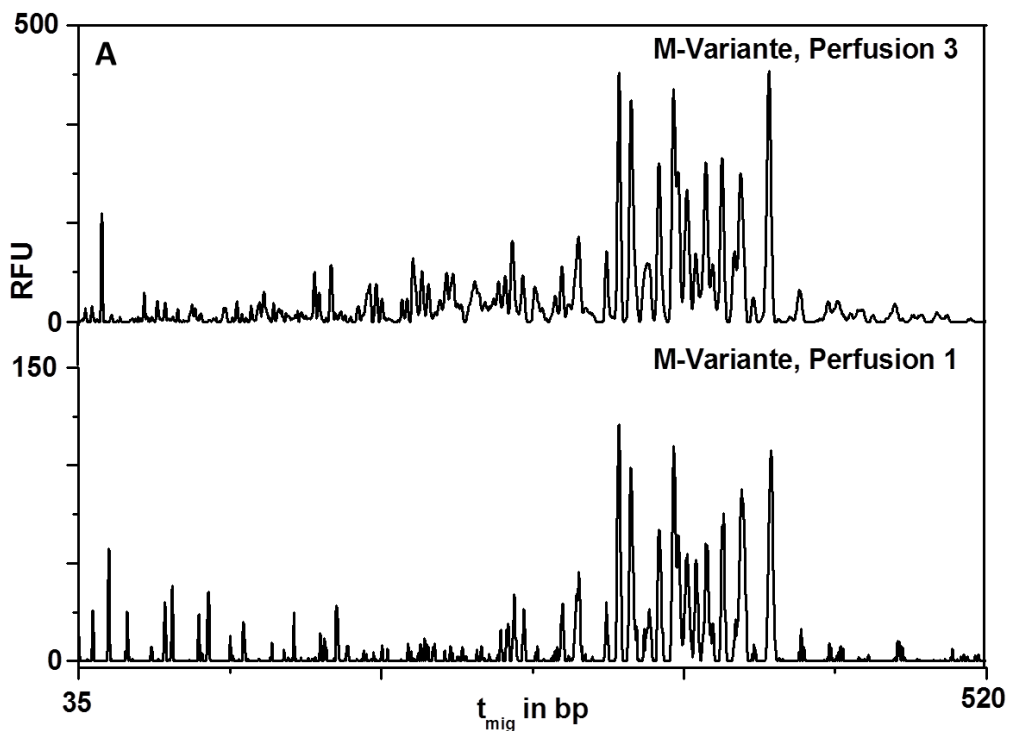


Abbildung 4-36: (A) geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprints der M-Variante des H1N1-NIBSC aus Proben der Perfusionskultur 1 und 3 ($pO_2 > 150$ %; Sauerstoffsonde kalibriert gegen Luft)

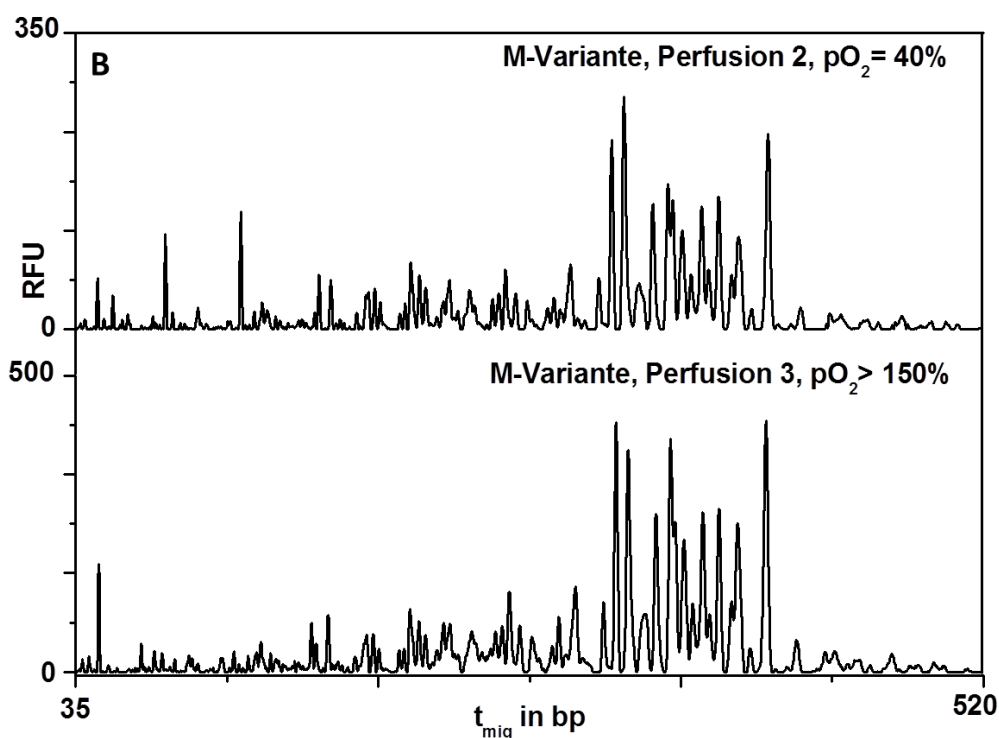


Abbildung 4-37: (B) geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprints der M-Variante des H1N1-NIBSC aus Proben aus Perfusionskultur 2 (pO₂ = 40 %) und 3 (pO₂ > 150 %)

Im Gegensatz dazu konnten zwischen den Fingerprints der Perfusionskulturen 2 (pO₂ = 40 %) und 3 (pO₂ > 150 %) deutliche Unterschiede in der Verteilung der Peaks (in Bezug auf die Peakintensitäten) beobachtet werden (Abb. 4-35 B). Dies war besonders auffällig im Migrationszeitenbereich von ca. 320 bp bis 410 bp. Im direkten Vergleich der einzelnen Peakintensitäten im HA N-Glykanfingerprints der Perfusionskultur 2 und 3 (von ca. 320 bp bis 410 bp), wies nahezu jeder Peak deutliche Unterschiede auf, wobei in diesem Bereich die PA identisch war (Daten nicht gezeigt). Für die Perfusionskultur 2 (pO₂ = 40 %) wurden bei norm. t_{mig} < 250 bp zwei deutliche Peaks detektiert, die im Fingerprints der Perfusionskultur 3 (pO₂ > 150 %) eine sehr geringe Intensität aufwiesen. Es wurden demnach die selben N-Glykanstrukturen am HA bei einem pO₂ von 40 % bzw. > 150 % gefunden. Allerdings führte der erhöhte Sauerstoffgehalt im Zellkulturmedium zu einer Veränderung im Anteil der einzelnen N-Glykane am HA H1N1-NIBSC Virus. Eine wiederholte Produktion der M-Variante des H1N1-NIBSC bei einem pO₂ > 150 % (Perfusion 1 und 3) resultierte in ein vergleichbares Ergebnis hinsichtlich der der HA N-Glykosylierung (Daten nicht gezeigt).

4.8.5 Einfluss des Erntezeitpunktes auf die HA N-Glykosylierung

Ziel dieses Versuches war es, das HA N-Glykosylierungsmuster mittels Fingerprinting im Verlauf der Virusreplikation in MDCK-Zellen zu verfolgen. Dabei sollten ausgehend von einem möglichst frühen Zeitpunkt nach der Infektion (6 hpi) bis zu 192 hpi HA N-Glykanfingerprints generiert werden. Diese Fingerprints sollten anschließend verglichen werden hinsichtlich der PA und der Verteilung der einzelnen N-Glykane. Zusätzlich wurde 48 hpi für einen Teil der betrachteten Kulturen eine Temperatur von 37°C und für den anderen Teil eine Temperatur von 4°C gehalten. Bereits 48 hpi waren einige Zellen lysiert (mikroskopische Beobachtung, Daten nicht gezeigt) und damit wahrscheinlich Proteasen und Glykosidasen der Wirtszellen freigesetzt. Mit diesem Versuch sollte herausgefunden werden, ob diese freigesetzten Enzyme einen Einfluss auf die HA N-Glykosylierung haben. Diese sollten bei 4°C in ihrer Aktivität eingeschränkt und bei 37°C weiter aktiv sein. Der Versuch wurde zunächst mit MDCK-Zellen in parallel angesetzten T175-Zellkulturflaschen in GMEM durchgeführt. Diese wurden mit human-Influenza-A-Virus H3N2 infiziert, da dieser (aus den zur Verfügung stehenden Saatviren) den höchsten TCID₅₀ aufwies[°].

Um möglichst früh einen für die HA N-Glykananalyse ausreichenden Virustiter ($\geq 1,8$ HA log Einheiten/100 μ L) zu erzielen, wurde ein Vorversuch durchgeführt. Dazu wurden drei T175-Zellkulturflaschen der selben Vorkultur nach 48 h, 72 h bzw. 96 h Zellwachstum mit human-Influenza-A-Virus H3N2 mit einer MOI von 13 infiziert. Für die nach 48 h Zellwachstum infizierte MDCK-Zellkultur, konnte bereits 6 hpi ein Virustiter von 1,5 HA log Einheiten/100 μ L bestimmt werden, während die nach 72 h bzw. 96 h infizierten MDCK-Zellen hier erst einen Virustiter von 1,1 HA log Einheiten/100 μ L aufwiesen. Neben dem schnelleren Anstieg des Virustiters in den nach 48 h Zellwachstum infizierten Zellen (Daten nicht gezeigt), wurde auch im Vergleich zu den nach 72 h bzw. 96 h Zellwachstum infizierten Zellen der höchste Virustiter bereits 48 hpi mit 3,0 HA log Einheiten/100 μ L erzielt (72 h und 96 h jeweils 96 hpi: 2,7 HA log Einheiten/100 μ L). Für die folgenden Experimente zur Zeitreihe der HA N-Glykosylierung wurden daher die in T175-Zellkulturflaschen kultivierten MDCK-Zellen nach 48 h Zellwachstum (MOI = 13) mit human-Influenza-A-Virus H3N2 infiziert. Dieser Versuch wurde insgesamt zweimal unter

[°] Tissue Culture Infection Dosis 50%; TCID₅₀ des verwendeten Saatvirus H3N2 = $5,74 \cdot 10^7$ Viren/mL. Die Verwendung eines Saatvirus mit hohem TCID₅₀ diente dazu, dass jede Zelle in der ersten Infektionswelle infiziert wird (Einschrittinfektion) und damit schneller mehr neu gebildete Viren freigesetzt werden (schneller höherer Virustiter im Vergleich zu einer niedrigen MOI). Bei hohem TCID₅₀ ließ sich eine hohe MOI (hier 13) mit niedrigem Infektionsvolumen erreichen.

identischen Bedingungen durchgeführt. Die beiden Versuche werden im Folgenden als Zeitreihe 1 und 2 (ZR 1 und ZR2 2) bezeichnet. Es wurden jeweils 25 T175-Zellkulturflaschen aus einer Vorkultur mit einer Zellzahl von $7,5 \cdot 10^4$ Zellen/cm² eingesät. Die Infektionszellzahl betrug für ZR 1 und 2 $1,88 \cdot 10^6$ Zellen/mL bzw. $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/mL in einem Infektionsvolumen von jeweils 25 mL/T175-Zellkulturflasche. Die Zellkulturflaschen wurden unmittelbar nach der Infektion auf einem Orbital-Schüttler bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das saatvirushaltige Medium abgegossen und durch 50 mL frisches GMEM (ohne FCS) ersetzt. Damit wurde nicht in die Zellen eingedrungener Saatvirus entfernt und damit verhindert, dass dieser zum zu analysierenden HA N-Glykosylierungsmuster der M-Variante des H3N2 über die Zeit beiträgt. Für die HA N-Glykananalytik wurden 6 hpi, 8 hpi, 10 hpi, 12 hpi, 24 hpi, 30 hpi, 36 hpi und 48 hpi jeweils eine T175-Zellkulturflasche als eine Probe geerntet. Zusätzlich wurden bei der Wiederholung des Versuches (ZR 2) 15 hpi und 18 hpi jeweils eine Probe gezogen. Nach der Ernte 48 hpi wurden fünf T175-Zellkulturflaschen bei 4°C bis zu weiteren Erntezeitpunkten aufbewahrt. Die Probennahme 72 hpi, 96 hpi, 120 hpi, 144 hpi, 168 hpi und 192 hpi erfolgte parallel bei 4°C und 37°C. Die Proben wurden jeweils den ersten 3 Zentrifugationsschritten zugeführt (100 g, 4000 g und 10000 g) und anschließend bis zur Pelletierung des Virus mittels Ultrazentrifugation bei 4°C aufbewahrt. Die 4°C Probe 192 hpi der ZR 1 ging während der Probenvorbereitung verloren. Alle Proben der jeweiligen Zeitreihe wurden nach der Pelletierung des Virus bei -80°C aufbewahrt und innerhalb einer Probenvorbereitung (beginnend mit der SDS-PAGE bis hin zur CGE-LIF) gemeinsam bearbeitet.

Parallel zu den jeweiligen Proben für die HA N-Glykananalyse wurden jeweils 2 mL Probe für die Bestimmung des Virustiters genommen. In Abbildung 4-36 sind die Verläufe des Virustiters über die ZR 1 und 2 von 0 bis 192 hpi (Proben aus den Zellkulturflaschen bei 37°C) dargestellt. In der ZR 1 wurde bereits 8 hpi ein für die HA N-Glykananalytik ausreichender Virustiter (1,9 HA log Einheiten/100 µL) bestimmt. Für ZR 2 war theoretisch erst 10 hpi ausreichend Virus (Virustiter = 1,7 HA log Einheiten/100 µL) vorhanden. Es wurden in beiden Zeitreihen vergleichbare Virusausbeuten mit einem maximalen Virustiter von 2,7 HA log Einheiten/100 µL (96 hpi) erzielt. Die Virustiter von 72 hpi bis 192 hpi aus den Zellkulturflaschen bei 4°C zeigten einen mit den entsprechenden Proben aus den Zellkulturflaschen bei 37°C vergleichbarem Verlauf (Daten nicht gezeigt).

Zur Auswertung des Verlaufes des HA N-Glykosylierungsmusters während der Virusreplikation in MDCK-Zellen (bis 192 hpi) wurden zunächst die HA N-Glykanfingerprints generiert. In Abbildung 4-37 und 4-38 sind ausgewählte Fingerprints aus der ZR 1 aus den

Zellkulturflaschen bei 37°C (Abb. 4-37: 8 hpi, 12 hpi, 30 hpi, 72 hpi, 120 hpi und 192 hpi) bzw. 4°C (Abb. 4-38: 72 hpi, 120 hpi und 168 hpi) dargestellt. Der Verlauf der HA N-Glykanfingerprints der ZR 2 war mit den der ZR 1 vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

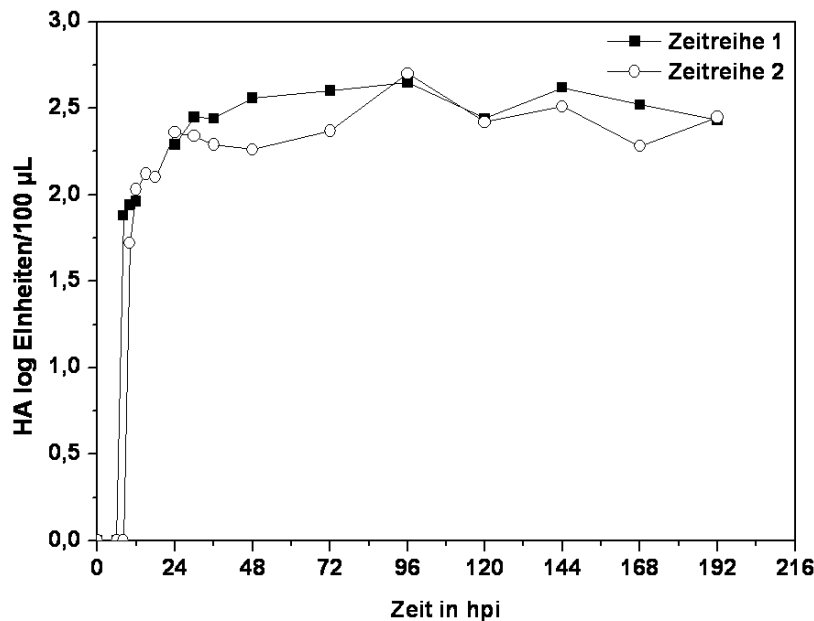


Abbildung 4-38: Verlauf des Virustiters der ZR 1 und 2 von 0 hpi bis 192 hpi (Proben aus den Zellkulturflaschen bei 37°C)

Der erste auswertbare Fingerprint für ZR 1 konnte aus der Probe 8 hpi (RFU_{\max} ca. 150, Peak bei 267 bp) und für die ZR 2 aus der Probe 12 hpi (RFU_{\max} ca. 100, Peak bei 267 bp) generiert werden. Die maximalen Signalintensitäten wurden für beide Zeitreihen in den Proben 30 hpi ermittelt (ZR 1: RFU_{\max} ca. 1150, Peak bei 267 bp, Abb. 4-37; ZR 2: RFU_{\max} ca. 650, Peak bei 267 bp). In allen auswertbaren Proben der ZR 1 und 2 wurde das in Abschnitt 4.7.2 beschriebene HA N-Glykosylierungsmuster (mit der entsprechenden PA und norm. t_{mig}) der M-Variante des human-Influenza-A-Virus H3N2 mit den in Abschnitt 4.7.5 identifizierten Strukturen gefunden. Es ergab sich in beiden Zeitreihen ein bis 192 hpi (Ende der Probenahme) stabiles HA N-Glykosylierungsmuster aus den beprobten T175-Zellkulturflaschen. Mit zunehmender Zeit nach der Infektion konnte zwar für alle Peaks der Fingerprints eine leichte Abnahme der maximalen Signalintensität (RFU , Peak bei 267 bp) beobachtet werden (Abb. 4-37). Allerdings wurden nur in geringem Maße kleine N-Glykanstrukturen (norm. $t_{\text{mig}} < 172$ bp) nachgewiesen, die auf eine Degradation der HA N-Glykane der M-Variante des H3N2 hindeuten würden. Die Proben aus den Zellkulturflaschen bei 4°C (nach der Probenahme 48 hpi) wiesen in beiden Zeitreihen um bis zu 100 RFU höhere maximale Peakintensitäten (Peak bei 267 bp) auf. Im Allgemeinen konnten zwischen den Proben aus den bei 37°C bzw. 4°C (nach der Probenahme 48 hpi) in beiden Versuchen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

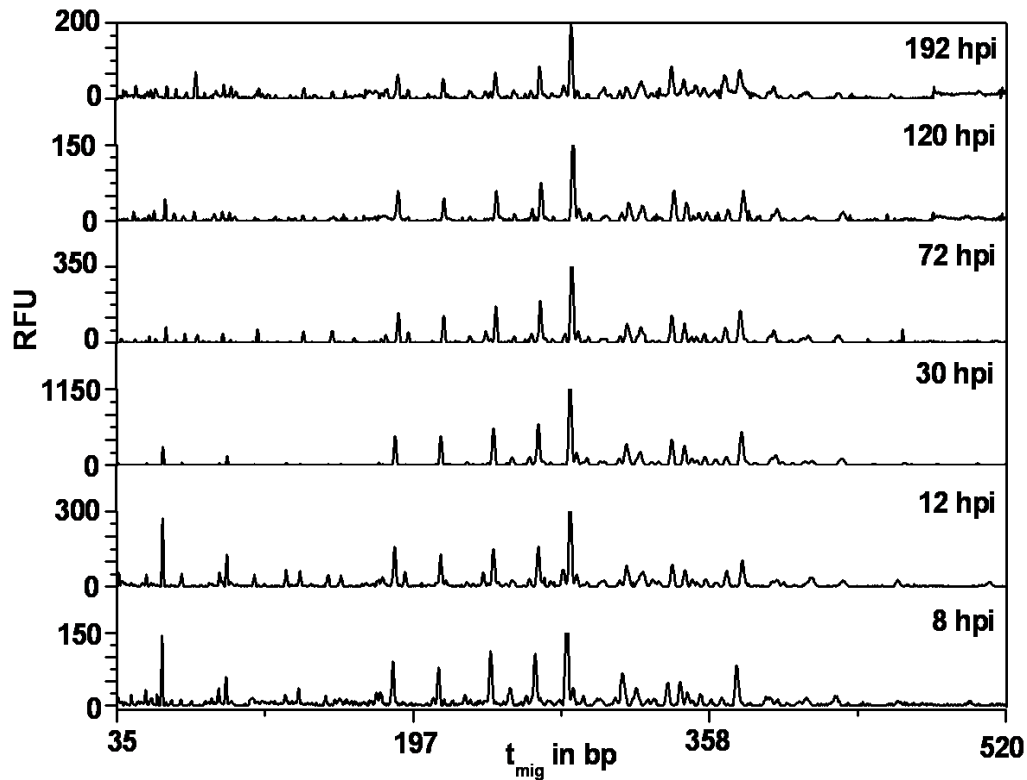


Abbildung 4-39: geschifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprints der M-Variante des H3N2 aus T175-Zellkulturflaschen (37°C) im Verlauf des Zeitreihenversuches 1. Dargestellt sind die aus den Probenahmen 8 hpi, 12 hpi, 30 hpi, 72 hpi, 120 hpi und 192 hpi resultierenden HA N-Glykanfingerprints.

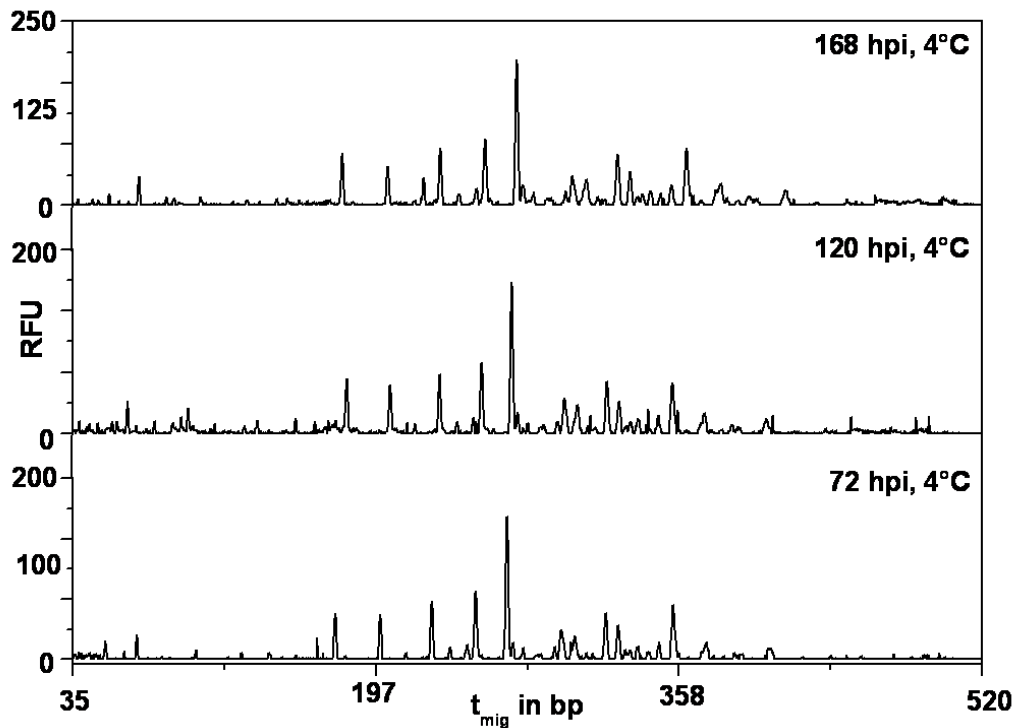


Abbildung 4-40: geschifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprints der M-Variante des H3N2 aus T175-Zellkulturflaschen (4°C) im Verlauf des Zeitreihenversuches 1. Dargestellt sind die aus den Probenahmen 72 hpi, 120 hpi und 168 hpi resultierenden HA N-Glykanfingerprints.

Eine weitere Interpretation, der für die ZR 1 und 2 erhobenen Daten, wurde über die Peakhöhen aller detektierten Peaks ($RFU \geq 15$) in den jeweiligen Fingerprints vorgenommen. Um die Gesamtglykanmenge in der jeweiligen Probe zu ermitteln, wurden diese Peakhöhen in den einzelnen Fingerprints beider Zeitreihen aufsummiert (in RFU). Der Verlauf der Gesamtglykanmenge im Verlauf der ZR 1 ist in Abbildung 4-39 A für die Proben bei 37°C und 4°C dargestellt. Bei beiden Zeitreihen war ein Anstieg der Gesamtglykanmenge (ermittelt anhand der Peakhöhen) über die ersten 30 hpi zu beobachten. Wie bereits in den Fingerprints beobachtet (Abb. 4-37), lag auch das Maximum der Gesamtglykanmenge in beiden Versuchen bei 30 hpi (Abb. 4-39 A). Anschließend nahm die Gesamtglykanmenge bis ca. 96 hpi ab und blieb dann bis zum Ende der Versuchsreihen (192 hpi) konstant. Für die Gesamtglykanmenge ergab sich für die ZR 2 ein mit ZR 1 vergleichbarer Verlauf (Daten nicht gezeigt).

Zusätzlich zum Verlauf der Gesamtglykanmenge über die Zeit nach der Infektion, wurde der Anteil an „kleinen“ und „großen“ HA N-Glykanen in den jeweiligen Fingerprints der ZRn 1 und 2 bewertet. Dazu wurden die Fingerprints bei einer norm. t_{mig} von 172 bp (erster Peak im Hauptglykosylierungsmuster des HA der M-Variante des H3N2; Tabelle 4-4) geteilt. Die Höhen der Peaks mit einer norm. $t_{mig} < 172$ bp wurden zum Anteil an „kleinen“ N-Glykanen und die Höhen der Peaks mit einer norm. $t_{mig} \geq 172$ bp zum Anteil an „großen“ N-Glykanen in einem Fingerprint aufsummiert. Die beiden Anteile wurden anschließend in % der Gesamtglykanmenge (Abb. 4-39 A) über die Zeit aufgetragen (Für ZR 1 (Proben bei 37°C) Abb. 4-39B). Dabei ergaben sich sowohl für die entsprechenden Proben bei 4°C im Vergleich zu den Proben bei 37°C als auch im Allgemeinen für die ZR 1 und 2 vergleichbare Verläufe. Um 30 hpi (Maximum der Gesamtglykanmenge) bzw. 48 hpi war ein Maximum des Anteils an HA N-Glykanen mit einer norm. $t_{mig} \geq 172$ bp zu beobachten. Danach war eine leichte Zunahme des Anteils an „kleinen“ N-Glykanen bis zu 192 hpi zu verzeichnen. Diese Beobachtung korrelierte mit den nur in geringem Maße in den Fingerprints (Abb. 4-37 und 4-38) sichtbaren Peaks mit norm. $t_{mig} < 172$ bp.

Abschließend wurde zur Bewertung der erhobenen Daten geprüft, ob die Gesamtglykanmenge im Verlauf der ZR 1 und 2 mit dem Virustiter korreliert. Dazu wurde die Gesamtglykanmenge zusammen mit dem Virustiter über die Zeit aufgetragen. In Abbildung 4-40 A ist dies beispielhaft für die Proben bei 37°C der ZR 1 dargestellt.

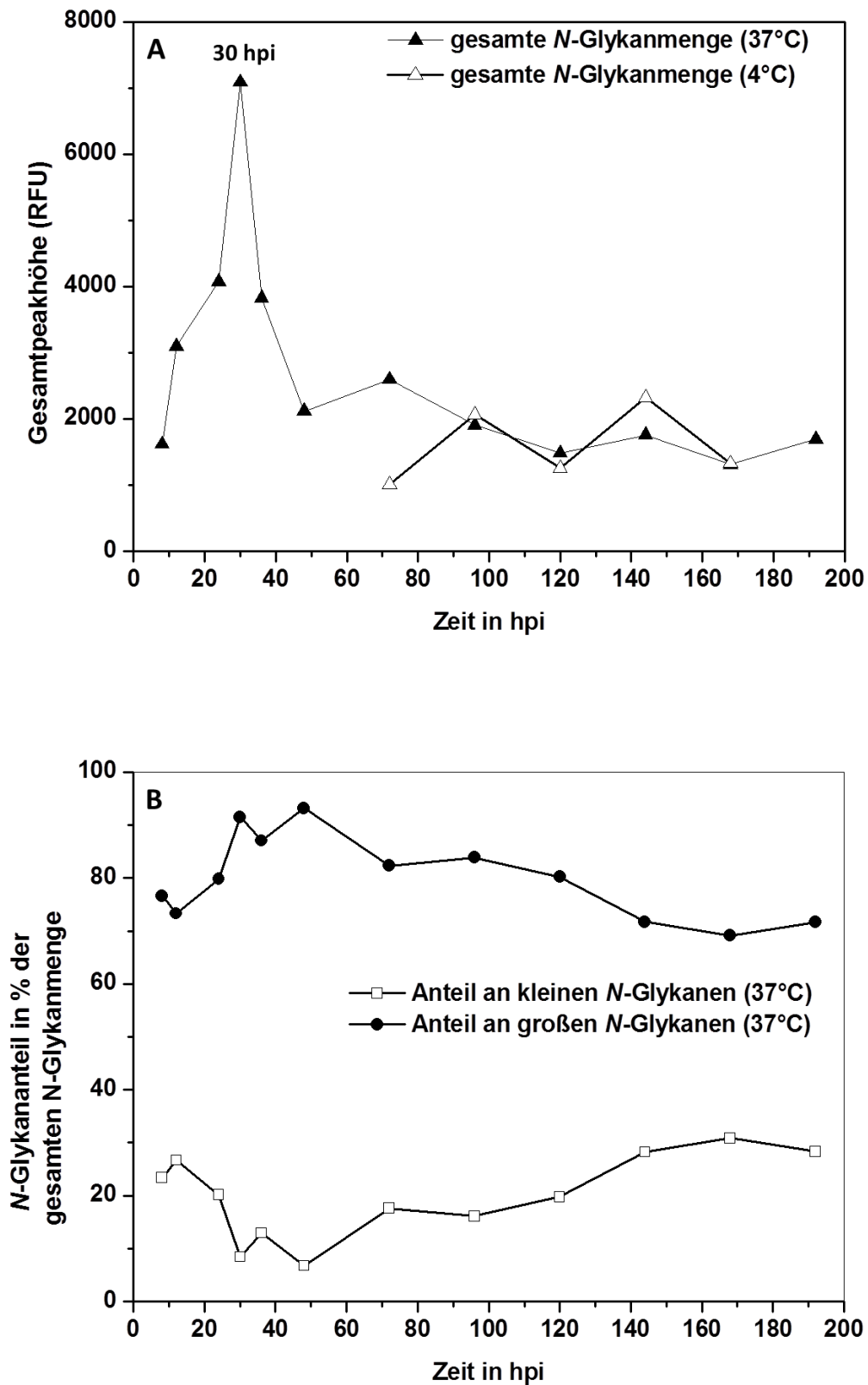


Abbildung 4-41: (A) Gesamtglykanmenge (Summe der Peakhöhen der einzelnen Proben) im Verlauf der ZR 1 der Proben bei 37°C (▲) und 4°C (△); (B) Anteil an „kleinen“ (□, norm. $t_{mig} < 172$ bp) bzw. „großen“ (●, norm. $t_{mig} \geq 172$ bp) HA N-Glykanen in den einzelnen Fingerprints in % der Gesamtglykanmenge im Verlauf der ZR 1 (Proben bei 37°C)

Eine andere Form der Darstellung wurde in Abbildung 4-40 B gewählt. Hier wurde die Virusmenge in Viruspartikel/mL (berechnet aus dem jeweiligen Virustiter, $10^{\text{Virustiter} \cdot 2 \cdot 10^7}$) zusammen mit der Gesamtglykanmenge (ZR 1, Proben bei 37°C) aufgetragen. Da sowohl die Gesamtglykanmenge als auch der Virustiter der Proben bei 4°C ein zu den Proben bei 37°C vergleichbaren Verlauf zeigten, wurden diese hier nicht dargestellt. Für die ZR 1 und 2 ergaben sich vergleichbare Verläufe. Bezogen auf die ZR 1 (Abb. 4-40 A) wurde die maximale Glykanmenge zu Beginn des Plateaus des Virustiters bestimmt. Dennoch konnte anhand der Daten keine direkte Korrelation zwischen dem Verlauf des Virustiters und der Gesamtglykanmenge ermittelt werden.

In Bezug auf das HA N-Glykosylierungsmuster, konnte keine Abhängigkeit vom Erntezeitpunkt aus T175-Zellkulturflaschen festgestellt werden. Die maximalen Peakintensitäten (in RFU, Peak bei 267 bp) bzw. Gesamtglykanmengen wurden in beiden Versuchen bei 30 hpi bestimmt, woraus sich für die HA N-Glykananalytik hier der optimale Erntezeitpunkt (unter den gegebenen Zellkultur- und Infektionsbedingungen) ergab.

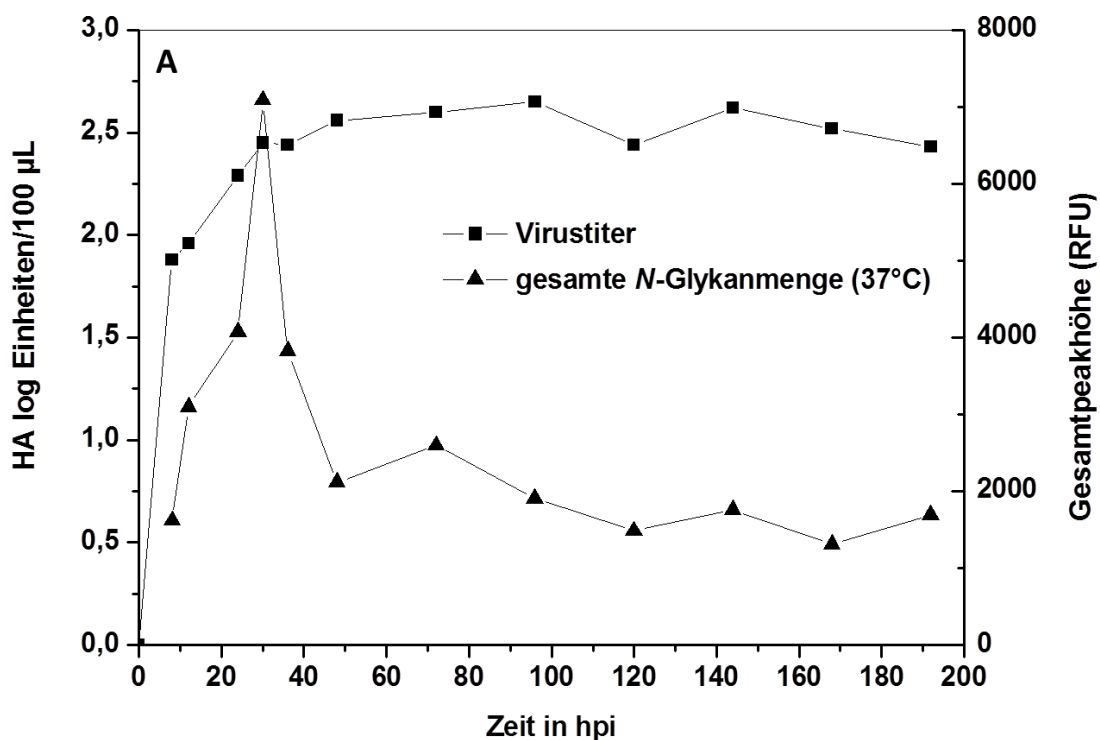


Abbildung 4-42: (A) Gesamtglykanmenge (▲, Summe der Peakhöhen der einzelnen Proben) zusammen aufgetragen mit dem Virustiter (■)

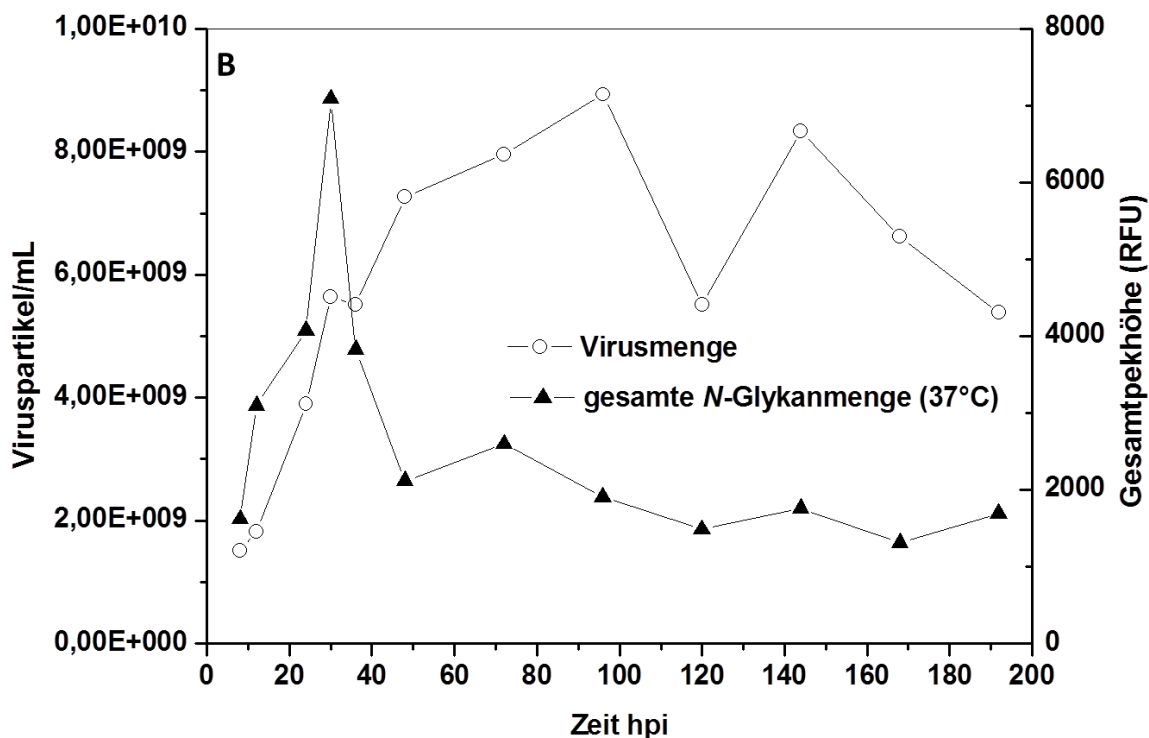


Abbildung 4-43: (B) Gesamtglykanmenge (▲, Summe der Peakhöhen der einzelnen Proben) zusammen aufgetragen mit der Virusmenge in Viruspartikel/mL (○) im Verlauf der ZR 1 der Proben bei 37°C

Aufgrund der gegebenen Inhomogenität der für die ZR 1 und 2 beprobten T175-Zellkulturflaschen, z. B. trotz paralleler Infektion leicht unterschiedlicher Verlauf des Virustiters, wurde der Zeitreihenversuch in einem 5 L-Bioreaktor wiederholt. Dadurch waren einheitliche Ausgangsbedingungen für die Probennahmen über die Zeit nach der Infektion und damit ein einheitlicher Virustiterverlauf gegeben. Variationen aufgrund von verschiedenen Einzelkulturen konnten so ausgeschlossen werden. Es sollte außerdem geprüft werden, ob sich die Verläufe der Gesamtglykanmenge bzw. der Anteil an „kleinen“ und „großen“ N-Glykanen im 5 L-Bioreaktor ähnlich denen in den T175-Zellkulturflaschen verhalten. Diese Zeitreihe wird im Folgenden als Zeitreihe 5 L bezeichnet.

In einen 5 L-Bioreaktor mit einer Microcarrierkonzentration von 2 g/L in 5 L GMEM, wurden MDCK-Zellen mit einer Zellzahl von $2,6 \cdot 10^5$ Zellen/mL eingesät. Ein Medienwechsel zu GMEM ohne FCS und die Infektion mit human-Influenza-A-Virus H3N2 erfolgte nach 96 h Zellwachstum mit einer MOI von 0,025 (Die für die Infektion der T175-Zellkulturflaschen verwendetet MOI von 13 konnte, aufgrund der limitierten Menge an Saatvirus, nicht für den 5 L-Bioreaktor angewandt werden). Daher war hier (im Vergleich zu ZR 1 und 2) durch die wesentlich geringere MOI ein unterschiedlicher bzw. verzögerter Infektionsverlauf zu erwarten. Wie für die Zellkulturflaschen durchgeführt, wurde auch hier 48 hpi die Zellkultur

geteilt und ein Teil bei 37°C bzw. 4°C gefahren. Dazu wurden 600 mL Probe genommen und jeweils 300 mL unter sterilen Bedingungen in zwei Spinnerflaschen (auf einer Rührplatte mit 50 rpm) überführt. Die Probennahme für die HA N-Glykananalytik und die Virustiterbestimmung erfolgte vergleichbar zu den Zeitreihen in den Zellkulturflaschen 24 hpi, 30 hpi, 36 hpi, 42 hpi, 48 hpi, 72 hpi, 96 hpi, 120 hpi, 144 hpi, 168 hpi und 192 hpi. Die geplante Probennahme 18 hpi, konnte aufgrund von Problemen mit dem Probenahmesystem^f nicht durchgeführt werden. Wie schon für die ZR 1 und 2 beschrieben wurden auch hier alle Proben der Zeitreihe nach der Pelletierung des Virus bei -80°C aufbewahrt und innerhalb einer Probenvorbereitung (beginnend mit der SDS-PAGE bis hin zur CGE-LIF) gemeinsam bearbeitet

Zusätzlich wurde zu jedem Zeitpunkt eine Probe (2 mL) zur Bestimmung des TCID₅₀ genommen. Damit sollte geprüft werden, ob zwischen dem TCID₅₀ und der Gesamtglykanmenge eine Korrelation besteht. Die Bestimmung der TCID₅₀ Werte der einzelnen Proben wurden von einer Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik, nach dem dort etablierten Verfahren (Arbeitsanweisung Bestimmung des TCID₅₀, Anhang I, Abschnitt 4.3) durchgeführt.

In Abbildung 4-41 ist der Virustiter im Verlauf der Zeitreihe 5 L dargestellt. Wie erwartet zeigte sich ein im Vergleich zu den Zellkulturflaschen (Abb. 4-36) verzögerter Infektionsverlauf. Zum Zeitpunkt der ersten Probenahme 24 hpi wurde ein Virustiter von 2,3 HA log Einheiten/100 µL ermittelt. Der maximale Virustiter wurde auf 3,1 HA log Einheiten/100 µL in der Probe 72 hpi bestimmt und lag damit deutlich über dem der ZR 1 und 2 (jeweils 2,7 HA log Einheiten/100 µL). Der Verlauf der Proben aus den Spinnerflaschen bei 4°C war mit denen bei 37°C vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

Wie schon für die ZR 1 und 2 erfolgte auch für die Zeitreihe 5 L die erste Auswertung über die Visualisierung der HA N-Glykanfingerprints. Ausgewählte Fingerprints der Zeitreihe 5 L sind in Abbildung 4-42 (Probenahme 30 hpi, 48 hpi, 96 hpi, 144 hpi und 192 hpi, 37°C) und Abbildung 4-43 (Probenahme 72 hpi, 120 hpi und 192 hpi, 4°C) dargestellt.

Im Vergleich zu dem in Abschnitt 4.7.2 beschriebenen HA N-Glykosylierungsmuster der M-Variante des human-Influenza-A-Virus H3N2 (Abb. 4-13) und den aus den ZR 1 und 2 resultierenden Fingerprints zeigte sich für alle Proben der Zeitreihe 5 L ein verändertes Bild. Bei identischer PA (im Vergleich zu Proben aus T175-Zellkulturflaschen) war eine veränderte Verteilung der HA N-Glykane über einen weiten Migrationszeitenbereich (172 bp - 400 bp) zu beobachten. Die durch die Produktion der M-Variante im 5 L-Bioreaktor bedingten

^f starke Verdünnung der Probe durch Kondenswasser

Unterschiede in der HA N-Glykanverteilung wurden in Abschnitt 4.8.1 (Abb. 4-29 B) beschrieben.

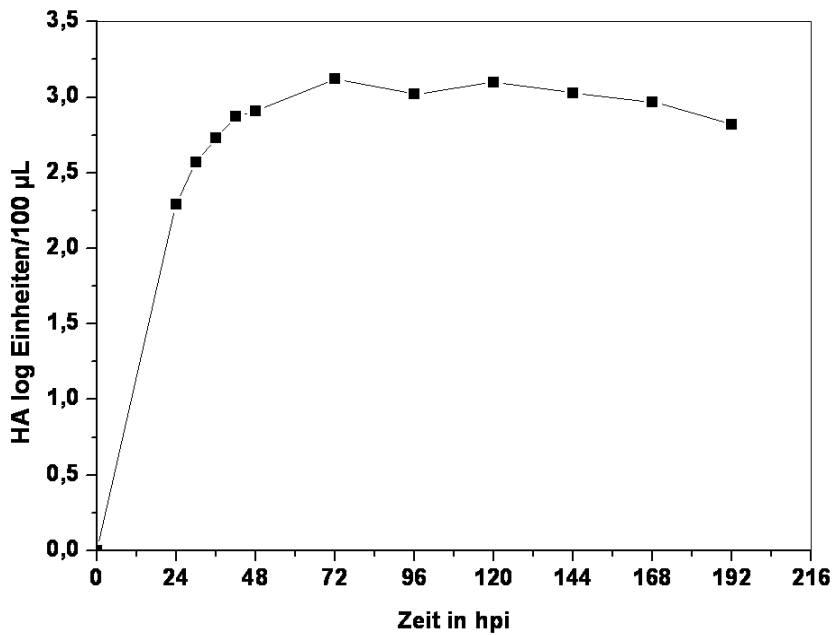


Abbildung 4-44: Verlauf des Virustiters der Zeitreihe im 5 L-Bioreaktor von 0 bis 192 hpi (37°C)

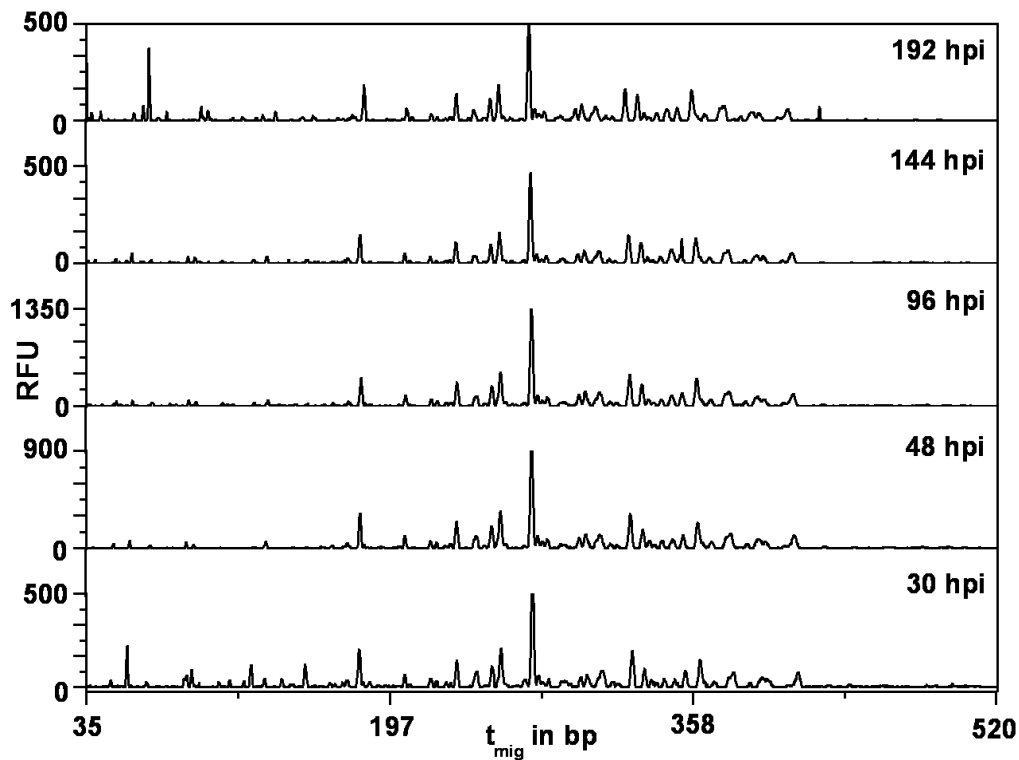


Abbildung 4-45: geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprints der M-Variante des H3N2 aus dem 5 L-Bioreaktor (37°C) im Verlauf der Zeitreihe 5 L. Dargestellt sind die aus den Probenahmen 30 hpi, 48 hpi, 96 hpi, 144 hpi und 192 hpi resultierenden HA N-Glykanfingerprints.

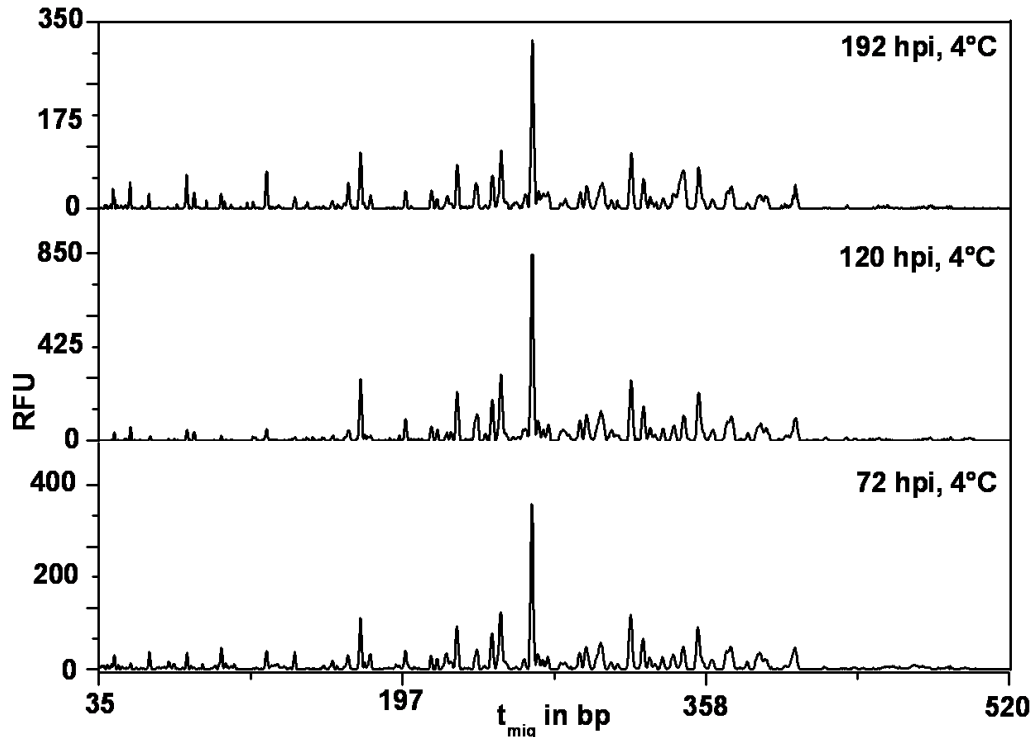


Abbildung 4-46: gestufteter Overlay der HA N-Glykanfingerprints der M-Variante des H3N2 aus Spinnerfaschen (4°C) im Verlauf der Zeitreihe 5 L. Dargestellt sind die aus den Probennahmen 72 hpi, 120 hpi und 192 hpi resultierenden HA N-Glykanfingerprints.

Alle Proben der Zeitreihe 5 L (37°C und 4°C) wiesen, wie auch für die ZR 1 und 2 beobachtet, ein bis 192 hpi stabiles HA N-Glykosylierungsmuster auf. Die erste Probe (24 hpi) lieferte einen auswertbaren Fingerprint mit einer maximalen Peakintensität von 170 RFU (Peak bei 267 bp, Daten nicht gezeigt). Die maximale Peakintensität wurde in der Probe 96 hpi ($\text{RFU}_{\text{max}} = 1350$, Peak bei 267 bp) bestimmt (Abb. 4-42). Die Peakintensitäten zeigten für die bei 37°C und 4°C gezogenen Proben einen ähnlichen Verlauf. Wie bereits für die ZR 1 und 2 beschrieben, wurden auch hier in den bei 4°C gezogenen Proben tendenziell höhere maximale Peakintensitäten beobachtet (Peak bei 267 bp). Bei beiden Temperaturen konnte in den Proben der Zeitreihe 5 L auch mit allgemein abnehmender Peakintensität über die Zeit nur eine geringfügige Zunahme von Peaks mit norm. $t_{\text{mig}} < 172$ bp festgestellt werden.

Zur detaillierteren Auswertung der Peakintensitäten wurden die Peakhöhen aller detektierten Peaks ($\text{RFU} \geq 15$) aufsummiert und gegen die Zeit aufgetragen (siehe auch Auswertung der ZR 1 und 2, Abb. 4-44 A). Bis zum maximalen Wert bei 96 hpi konnte im Vergleich zu den ZR 1 und 2 (Abb. 4-40 A) ein weniger deutlicher Anstieg der Gesamtglykanmenge beobachtet werden. Das Maximum der Gesamtglykanmenge in der Zeitreihe 5 L wurde bereits aus den in Abbildung 4-42 dargestellten HA N-Glykanfingerprints deutlich. Bis zum

Ende des Versuches (192 hpi) war allerdings ebenso deutlich, wie in den Zeitreihen der beprobten Zellkulturflaschen, die Abnahme der Gesamtglykanmenge zu erkennen. Dabei zeigten die bei 37°C bzw. 4°C genommenen Proben einen leicht unterschiedlichen Verlauf.

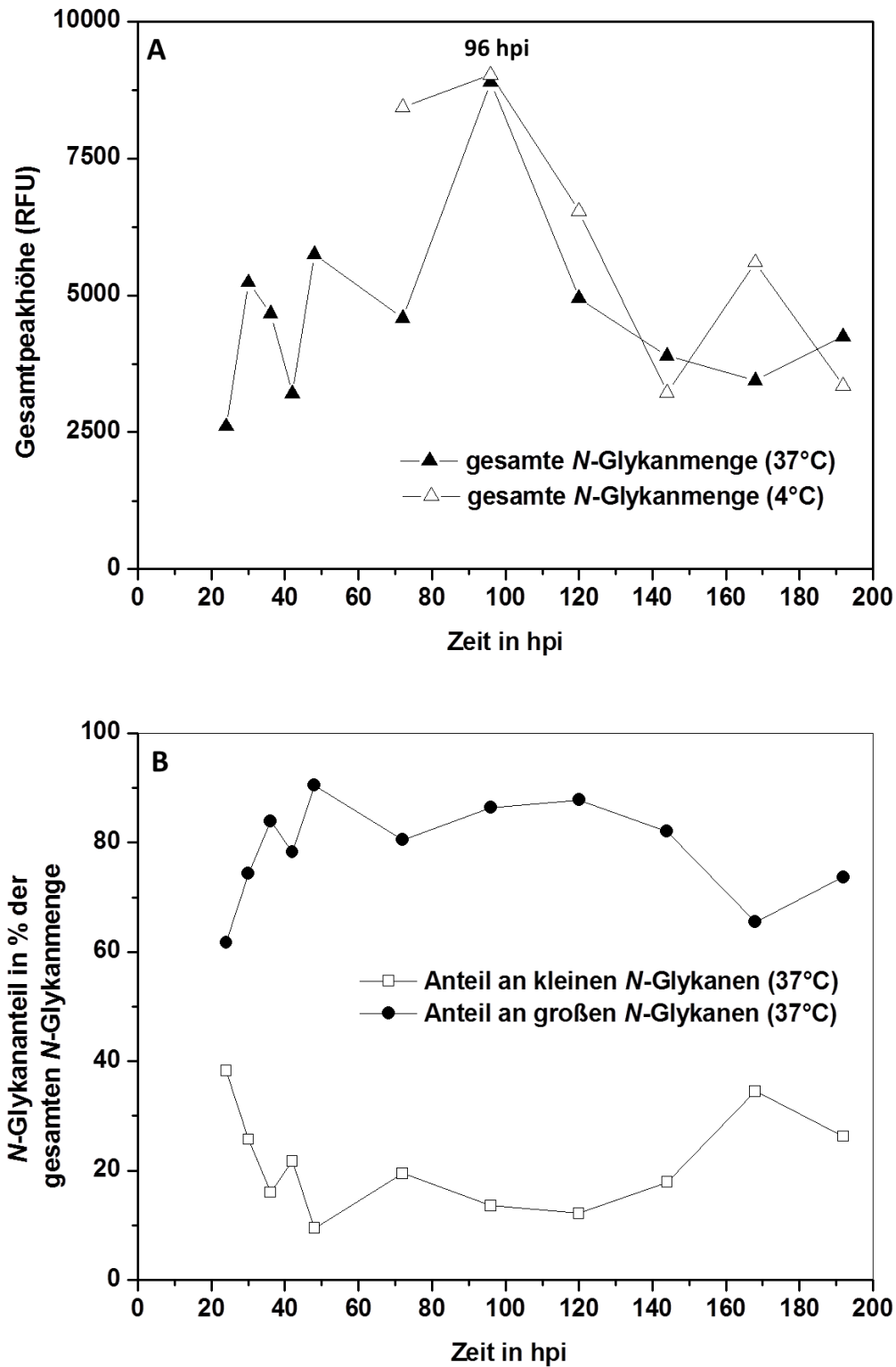


Abbildung 4-47: (A) Gesamtglykanmenge (Summe der Peakhöhen der einzelnen Proben) im Verlauf der Zeitreihe 5 L der Proben bei 37°C (▲) und 4°C (△); (B) Anteil an „kleinen“ (□, norm. $t_{\text{mig}} < 172$ bp) bzw. „großen“ (●, norm. $t_{\text{mig}} \geq 172$ bp) HA N-Glykanen in den einzelnen Fingerprints in % der Gesamtglykanmenge im Verlauf der Zeitreihe 5 L (Proben bei 37°C)

Die Anteile der „kleinen“ (Peaks mit norm. $t_{\text{mig}} < 172$ bp) und „großen“ (Peaks mit norm. $t_{\text{mig}} \geq 172$ bp) HA N-Glykane im Verlauf die Zeitreihe 5 L zeigten im Vergleich zu den ZR 1 und 2 einen ähnlichen Verlauf (Abb. 4-44 B). Das Maximum des Anteils an HA N-Glykanen mit einer norm. $t_{\text{mig}} \geq 172$ bp lag hier bei 42 hpi und damit im Bereich der ZR 1 und 2 (Abb. 4-39 B). Allerdings korrelierte dieses Maximum für die Zeitreihe 5 L nicht mit dem Maximum der Gesamtglykanmenge (96 hpi, Abb. 4-44 A). Die Abnahme des Anteils der N-Glykane mit einer norm. $t_{\text{mig}} \geq 172$ bp bzw. die Zunahme des Anteils der N-Glykane mit einer norm. $t_{\text{mig}} < 172$ bp war, wie schon anhand der Fingerprints erkennbar, eher gering. Dies deutete, wie schon für die ZR 1 und 2 beobachtet, auf eine nur geringfügige Degradation der HA N-Glykane mit einer norm. $t_{\text{mig}} \geq 172$ bp hin. Für die Anteile an „kleinen“ (norm. $t_{\text{mig}} < 172$ bp) und „großen“ (norm. $t_{\text{mig}} \geq 172$ bp) N-Glykanen ergab sich für die bei 4°C gezogenen Proben ein ähnlicher Verlauf wie der der entsprechenden Proben bei 37°C (Daten nicht gezeigt). Wie bereits für die ZR 1 und 2 beschreiben, wurden auch die Daten der Zeitreihe 5 L (Proben bei 37°C) auf Korrelation zwischen Verlauf des Virustiters bzw. Virusmenge und Gesamtglykanmenge geprüft (Abb. 4-45 A u B). Auch hier konnte kein direkter Zusammenhang zwischen den gemessenen Größen festgestellt werden.

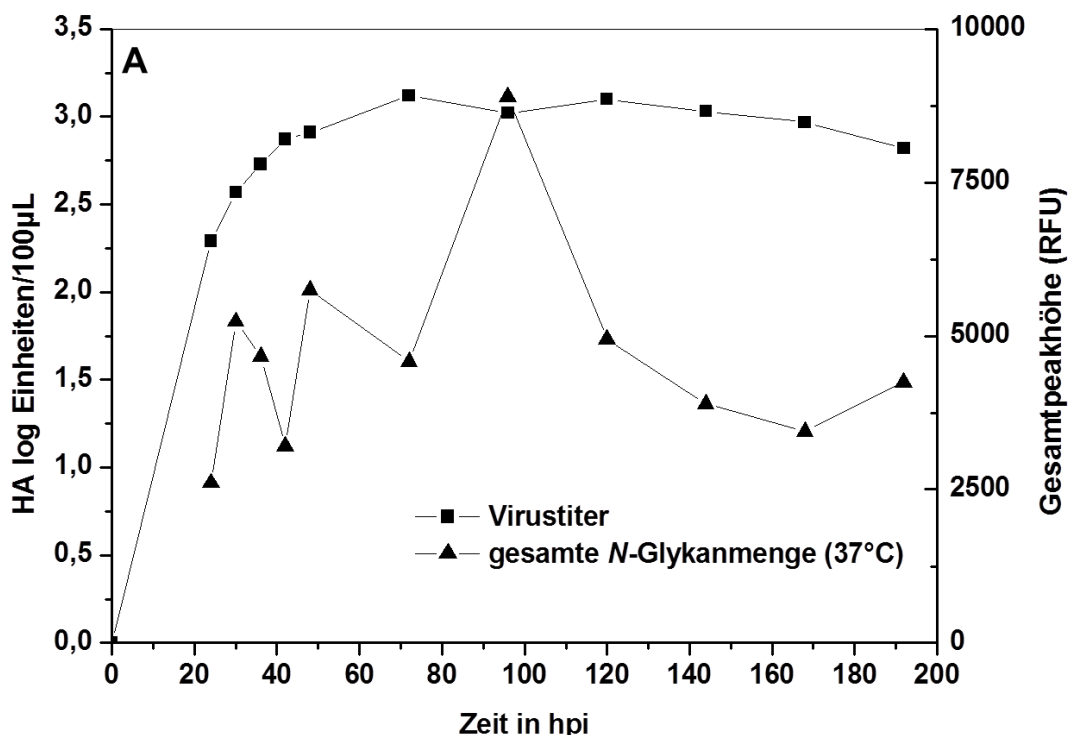


Abbildung 4-48: (A) Gesamtglykanmenge (▲, Summe der Peakhöhen der einzelnen Proben) zusammen aufgetragen mit dem Virustiter (■)

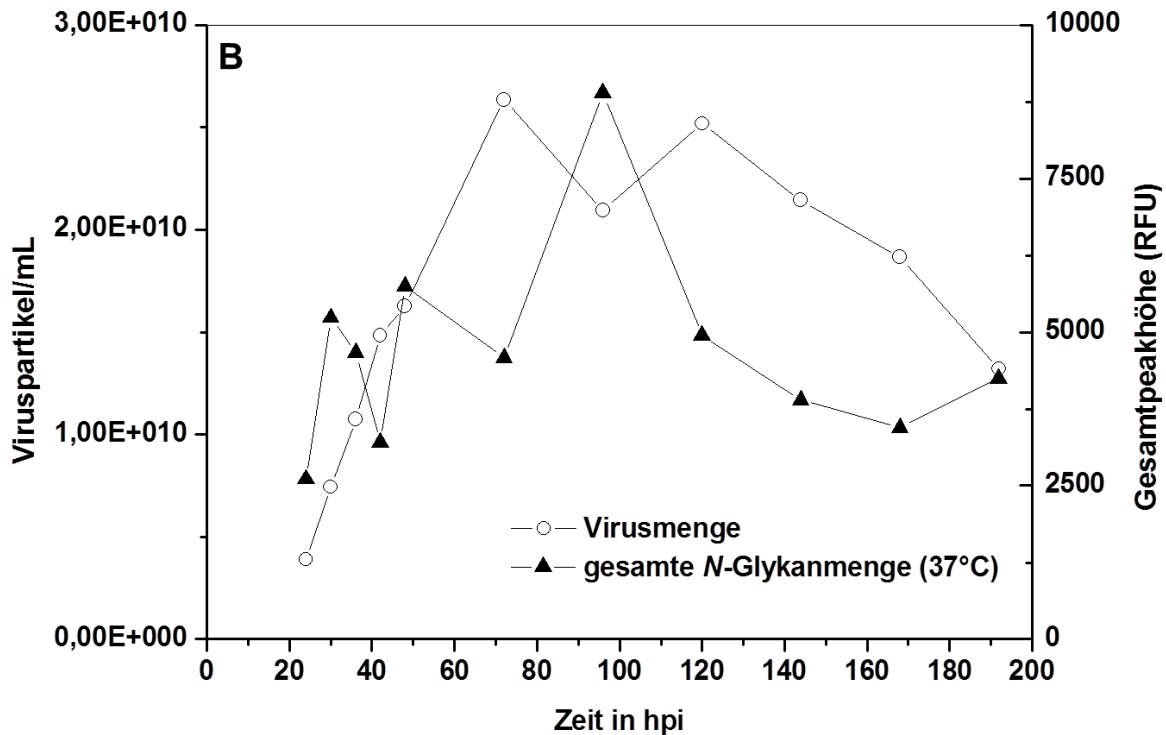


Abbildung 4-49: (B) Gesamtglykanmenge (▲, Summe der Peakhöhen der einzelnen Proben) zusammen aufgetragen mit der Virusmenge in Viruspartikel/mL (○) im Verlauf der Zeitreihe 5 L der Proben bei 37°C

Abschließend erfolgte für die Zeitreihe 5 L die Auswertung der erhobenen TCID₅₀ Daten. Diese sollten auf Korrelation mit der Gesamtglykanmenge im Verlauf der Zeitreihe 5 L geprüft werden. Dazu wurde die Gesamtglykanmenge zusammen mit den erhobenen TCID₅₀ Werten über die Zeit aufgetragen (Abb. 4-46). Nach einem Abfall des TCID₅₀ 30 hpi ($1 \cdot 10^8$ Viren/mL) auf ca. ein Fünftel des ursprünglichen Wertes (24 hpi, $5,6 \cdot 10^8$ Viren/mL) wurde 42 hpi ein erneuter Anstieg auf den etwa 3-fachen Wert ($3,2 \cdot 10^8$ Viren/mL) bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt war auch der Anteil an „großen“ HA N-Glykanen (norm. $t_{\text{mig}} \geq 172$ bp) maximal. Danach fiel der TCID₅₀ stetig im Verlauf der Zeitreihe 5 L bis 168 hpi ($0,0032 \cdot 10^8$ Viren/mL) ab. Der Wert der Probe 192 hpi lag unterhalb der Bestimmungsgrenze. Die TCID₅₀-Werte der bei 4°C gezogenen Proben lagen dabei deutlich über denen der Proben bei 37°C. Beispielsweise wurde in der Probe 72 hpi mit $4,2 \cdot 10^8$ Viren/mL ein 5,5-fach höherer Wert als in der Probe bei 37°C ($0,76 \cdot 10^8$ Viren/mL) bestimmt. Ab 120 hpi blieb der TCID₅₀ in den bei 4°C gezogenen Proben konstant, sodass 192 hpi noch ein Wert von $2,4 \cdot 10^8$ Viren/mL bestimmt wurde. Anhand der erhobenen Daten konnte allerdings keine eindeutige Korrelation zwischen dem TCID₅₀ und der Gesamtglykanmenge festgestellt werden.

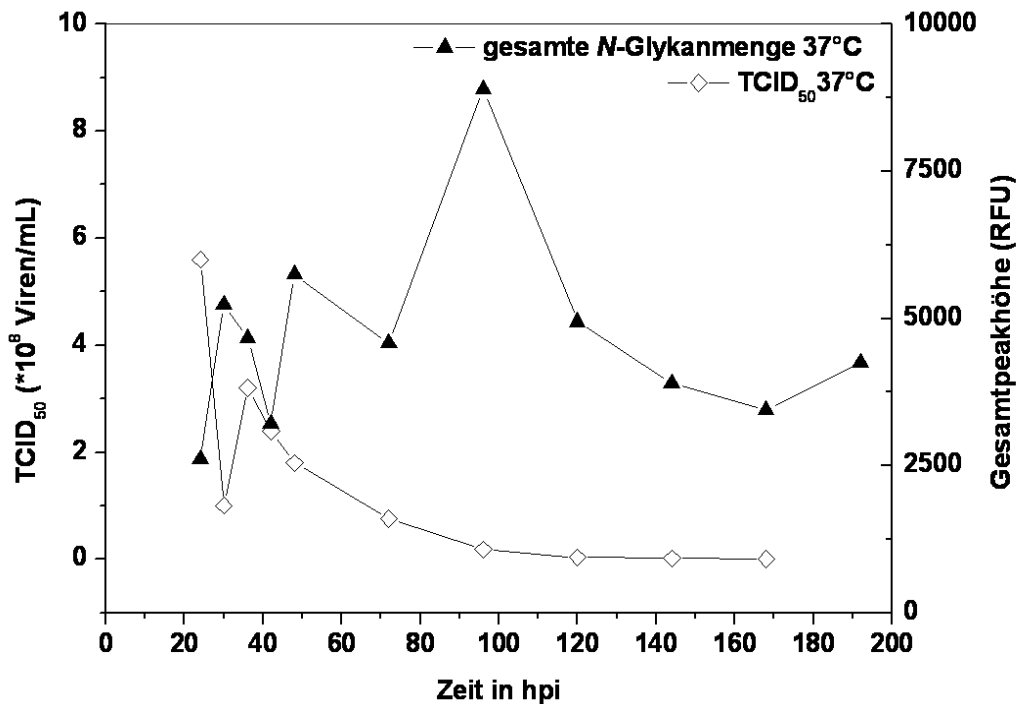


Abbildung 4-50: Gesamtglykanmenge (▲, Summe der Peakhöhen der einzelnen Proben) zusammen aufgetragen mit dem TCID₅₀ (◇) im Verlauf der Zeitreihe 5 L der Proben bei 37°C

4.8.6 Einfluss der Inaktivierung des Virus mit β -Propiolacton auf die HA N-Glykosylierung

Abschließend sollte der Einfluss der Virusinaktivierung mit β -Propiolacton (β -PL) auf die HA N-Glykosylierung des human-Influenza-A-Virus H1N1-NIBSC betrachtet werden. Dazu wurden Proben aus der in Abschnitt 4.8.1 beschriebenen Kultivierung von MDCK-Zellen und deren Infektion mit human-Influenza-A-Virus H1N1-NIBSC im 5 L-Bioreaktor verwendet. Die Probenahme des aktiven Virus erfolgte 74 hpi mit einem Virustiter von 2,28 HA log Einheiten/100 μ L. Anschließend wurde ca. 800 mL der Virusernte nach dem in der Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik etablierten Verfahren mittels β -PL inaktiviert (Arbeitsanweisung chemische Inaktivierung, Anhang I, Abschnitt 4.4). Nach Zugabe des β -PL wurde zunächst nach einer Inkubationszeit von 1 h ein Wechsel des Inaktivierungsgefäßes durchgeführt und die Ernte anschließend 24 h bei 37°C gelagert. Anschließend wurde die Inaktivierung durch Lagerung im Kühlraum (4°C) gestoppt. Der Virustiter betrug nach der Inaktivierung ebenfalls 2,28 HA log Einheiten/100 μ L. Für beide Proben (aktiv und inaktiv) ergaben sich nach der Ultrazentrifugation deutliche und stabile Viruspellets. Die resultierenden HA N-Glykanfingerprints sind in Abbildung 4-47 dargestellt.

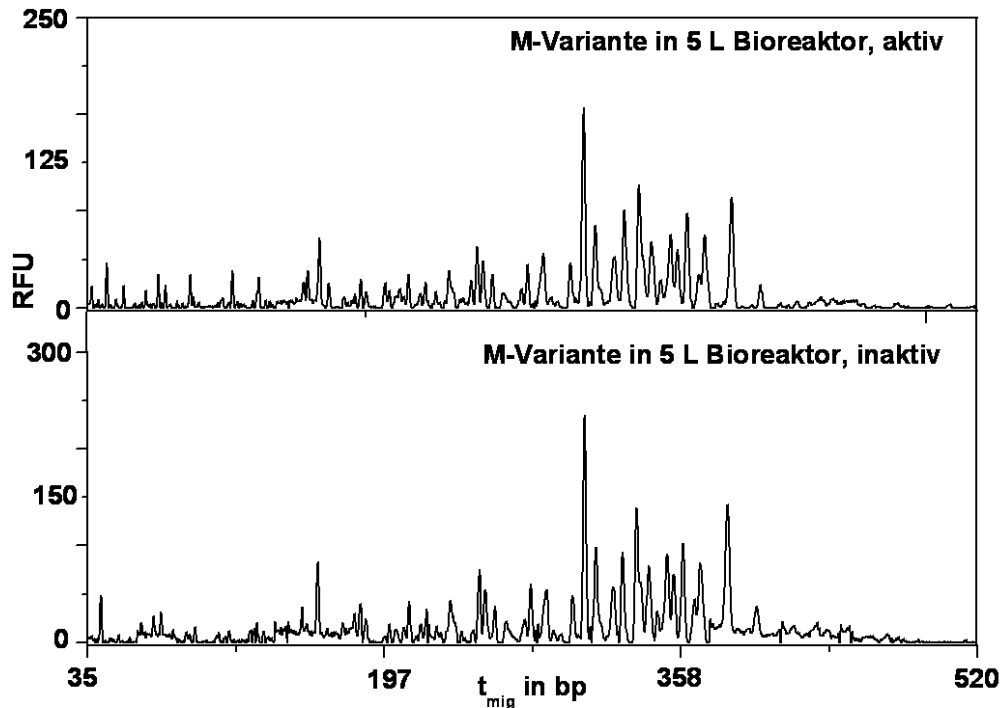


Abbildung 4-51: geshifteter Overlay der HA N-Glykanfingerprints der M-Variante des H1N1-NIBSC aus einer aktiven 5 L-Bioreaktorkultur und einer inaktiven Probe der selben 5 L-Bioreaktorkultur

Es konnten keine Unterschiede in den HA N-Glykanfingerprints der M-Variante des H1N1-NIBSC aus der aktiven und mit β -PL inaktivierten Probe beobachtet werden. Es wurde eine identische PA ermittelt (Daten nicht gezeigt). Weiterhin zeigten sich keine signifikanten Veränderungen in der Verteilung der HA N-Glykane (hinsichtlich der Peakintensität) durch die β -PL-Behandlung (Daten nicht gezeigt). Die Inaktivierung von Virus (hier H1N1-NIBSC) mittels β -PL hatte entsprechend der erhobenen Daten keinen Einfluss auf das N-Glykosylierungsmuster des Influenza-A-Virus HA.

5 DISKUSSION

Ein Hauptaugenmerk der Impfstoffproduzenten liegt darin, eine hohe Ausbeute, Reinheit, Immunogenität zu erzielen oder, allgemeiner ausgedrückt, die Qualität des Endproduktes zu garantieren. Die Einführung neuer Technologien, wie beispielsweise der Einsatz tierischer Zellkultur zur Herstellung von Influenza Impfstoffen, erforderte die Berücksichtigung verschiedener neuer Aspekte, um die regulatorischen Anforderungen zu erfüllen. Dabei ist besonders ein besseres Verständnis der Wirtszelllinie selbst und der Interaktion des Virus mit dieser entscheidend für die Unterstützung der Produktionsprozessentwicklung. Einen wichtigen Aspekt in der zellkulturbasierten Antigen Produktion repräsentiert die Glykosylierung der Schlüsselproteine. Diese sind bekannt dafür die antigenen Eigenschaften zu beeinflussen [58, 74, 134]. In der Literatur wird diskutiert, inwiefern Veränderungen im Glykosylierungsmuster der Schlüsselproteine, wie sie während des Upstream- und auch Downstreamprozesses auftreten können, die Immunogenität und Wirksamkeit zellkulturbasierter Impfstoffe beeinflussen [58, 65, 130, 232]. Trotzdem wurde bisher in der Impfstoffproduktion dem Glykanprofil viraler Antigene wenig Beachtung geschenkt. Im Gegensatz dazu ist für die Produktion rekombinanter Antikörper und Proteine relativ gut charakterisiert, inwiefern die Auswahl der Wirtszelle und Zellkulturbedingungen das N-Glykosylierungsmuster beeinflusst [29, 54, 55, 57, 145]. Dabei wird die Glykosylierung hauptsächlich durch die Expression verschiedener Glykosyltransferasen im Golgi der jeweiligen Zellen bestimmt. Unterschiede in der Aktivität dieser Enzyme zwischen den Zellen verschiedener Spezies bewirken dabei Veränderungen in der Struktur der Glykane des synthetisierten Proteins [27]. So konnte z. B. die Variation im Anteil von terminaler Galaktose, Fucose und bisecting GlcNAc an IgG unter der Verwendung von dreizehn verschiedenen Zelllinien demonstriert werden [226].

Als Ursache für das Fehlen einer entsprechenden Analytik auf dem Gebiet der Tier- und Humanimpfstoffe kann zu einem gewissen Maße die Komplexität der Impfstoffproduktion herangeführt werden. Hier werden typischerweise ganze Viruspartikel, die das immunologisch wirksame Protein enthalten, produziert und aufgereinigt anstelle von einzelnen rekombinanten Proteinen. Außerdem ist hier die Sicherung einer entsprechenden Immunantwort unter Vermeidung von Nebenwirkungen von entscheidender Bedeutung. Dabei müssen eine Vielzahl von Faktoren berücksichtigt werden, wobei die Glykosylierung der Antigene nur einen Punkt repräsentiert. Allerdings wurden bislang Studien auf diesem Gebiet, in Ermangelung einer einfachen und robusten Methode zur Analyse der N-

Glykosylierung (zur Anwendung in USP und DSP) erschwert.

Die PAT Initiative der FDA [49, 50] ermutigt zur Entwicklung innovativer Technologien zur Qualitätssicherung und Kontrolle der Produktion von Pharmazeutika und Impfstoffen. Hinsichtlich der Einführung der zellkulturbasierten Produktion von Influenzaimpfstoffen sind neue analytische Methoden zur Produktcharakterisierung und Qualitätskontrolle erforderlich und hilfreich. Die Aufzeichnung des Glykosylierungsmusters viraler Antigene, zusätzlich zu allgemeineren Parametern (Antigen- und Proteingehalt, Anteil an Wirtszell DNA), würde es erlauben, die Reproduzierbarkeit der einzelnen Prozessschritte (Upstream und Downstream) oder auch den Einfluss von Prozessmodifikationen auf die Produktqualität besser bewerten zu können.

Zur Analyse der N-Glykosylierung im Allgemeinen ist eine Vielzahl von verschiedenen Strategien (Erstellen von chromatographischen Profilen, Massenspektrometrie, NMR und kapillarbasierte Trenntechniken) etabliert worden [75-83]. Dabei hat jede diese Techniken Vor- und Nachteile. Die Auswahl einer oder mehrerer Techniken in Kombination kann, zur Bearbeitung einer Fragestellung, sehr zeit- und arbeitsintensiv werden. Die NMR liefert beispielsweise detaillierte Strukturinformationen, ist aber relativ unempfindlich (nmol) und kann nicht für einen hohen Probendurchsatz verwendet werden. Die Massenspektrometrie hingegen ist empfindlicher als die NMR (fmol) und durchaus anwendbar für den Probenhochdurchsatz. Allerdings erweist sich hier eine Quantifizierung als schwierig und nur unspezifische Strukturinformationen ohne Hinweis auf die Verlinkung der monomeren Zuckerkomponenten werden erhalten. Beide Techniken erfordern eine aufwendige Probenvorbereitung. Zusätzlich ist die Fraktionierung komplexer Glykangemische vor ihrer Analyse nötig, um die entsprechenden Spektren auswerten zu können.

Die Erstellung von HPLC- und 2D-HPLC-Profilen ist ebenfalls sehr empfindlich (in Abhängigkeit der Detektionsmethode fmol) und die Quantifizierung der Glykane ist ebenso möglich wie ein hoher Probendurchsatz, allerdings ohne direkte Strukturinformationen zu erhalten. Enzymatische Techniken können sehr empfindlich sein und zu detaillierten Strukturinformationen führen, benötigen aber die Kombination mit anderen Methoden wie HPLC oder MS. Weitere Techniken wie Lektin- oder monoklonale Antikörperaffinität liefern nur vorläufige Daten ohne strukturelle Informationen [3, 96].

Die Verwendung von auf der Kapillarelektrophorese basierenden Techniken für die Trennung von Glykanen ermöglicht eine automatisierte Probenbearbeitung, kurze Trennzeiten und eine hohe Auflösung [233]. In Kombination mit der LIF-Detektion fluoreszent gelabelter Glykane scheint die Kapillarelektrophorese durch eine höhere Trenneffizienz, relativ kurze

Analysenzeiten und den Bedarf an geringeren Proben-, Reagenzien und Lösemittelvolumen, der HPLC überlegen zu sein [234, 235]. Diese Vorteile kommen besonders bei CGE Trennungen unter Verwendung eines DNA-Sequenzierers zum Tragen, da diese speziell für Probenhochdurchsatzanalysen mit hoher Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit konstruiert wurden. Darüber hinaus sind diese Instrumente in der Routine relativ einfach zu bedienen und ermöglichen die parallele Analyse von bis zu 96 Proben. Somit kann bei Probenhochdurchsatz, in Abhängigkeit der Trennparameter, eine Analysenzeit von 1 min pro Probe erreicht werden. Der Einsatz eines solchen 96-Kapillaren-DNA-Sequenzierers, basierend auf der CE-LIF-Technik, wurde bereits von Khandurina *et al.* [84, 86] für die Analyse enzymatisch verdauter Cellohexanose und Lignocellulose beschrieben.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, die N-Glykosylierung des Influenza-Virus HA direkt aus dem Zellkulturüberstand über hoch aufgelöste HA N-Glykanfingerprints zu charakterisieren [92]. Die hochauflösende und sensitive Trennung der N-Glykane wurde dabei unter Verwendung der CGE-LIF Technik mit Hilfe eines DNA-Sequenzierers durchgeführt.

Nachdem die Robustheit und Reproduzierbarkeit der Methode gezeigt wurde, wurde als erste Anwendung die Reproduzierbarkeit des Upstreamprozesses, bezogen auf die Batch-to-Batch Reproduzierbarkeit (Abschnitt 4.6) hinsichtlich der Glykosylierung des Influenza-Virus HA betrachtet. Weiterhin wurde sie u. a. benutzt, um den Einfluss des Wirtszellsystems auf die HA N-Glykosylierung zu untersuchen. Es wurden verschiedene Influenza-A und B-Virusstämme in MDCK-Zellen repliziert und hinsichtlich der HA N-Glykanfingerprints und der N-Glykanstrukturen verglichen. Zusätzlich wurde der Verlauf des HA N-Glykanfingerprints während der Adaption an verschiedene Zelllinien analysiert, ebenso wie der Einfluss verschiedener Zellkulturparameter im USP (Zellkultursystem, Medium, Zelldichte, Sauerstoffgehalt im Medium, Erntezeitpunkt). Als Parameter des DSP wurde der Einfluss der Inaktivierung mittels β -PL berücksichtigt.

5.1 Aufreinigung und Aufkonzentrierung der Viruspartikel und Identifizierung der Virusproteine

Um die Analyse und Charakterisierung der Influenza HA N-Glykane zu ermöglichen, wurde zunächst eine schnelle und einfache Methode zur Aufreinigung und Aufkonzentrierung der Viruspartikel direkt aus dem komplexen Zellkulturmedium etabliert. Abbildung 4-1 zeigt den Verlauf dieser Aufreinigung mittels stufenweiser g -Gradienten-Zentrifugation in der SDS-

PAGE. Deutlich war die Abnahme der Komplexität der jeweiligen Pellets bzw. Überstände zu erkennen. Konnte im Zellkulturüberstand keine der Banden eindeutig Virusproteinen zugeordnet werden, waren nach Abreicherung von Zellen und Zellbruchstücken in der Probe des Pellets der UZ nur noch wenige Banden auf dem SDS-Gel sichtbar. Diese konnten eindeutig mittels LC-MS/MS den Virusproteinen zugeordnet werden (Abb. 4-2; Tabelle 4-1). In der Bande des HA-Monomers (HA₀ Bande) wurde neben HA kein weiteres Protein nachgewiesen. Damit konnte u. a. die Identität des jeweiligen HA bestätigt und damit sichergestellt werden, dass die anschließend isolierten N-Glykane ausschließlich von HA stammen.

Reproduzierbarkeitsstudien der Virusaufreinigung und Aufkonzentrierung wurden in Zusammenhang mit der Analyse der Reproduzierbarkeit der gesamten Probenvorbereitung durchgeführt (Abschnitt 4.5). In jedem Fall resultierte die Aufreinigung in der SDS-PAGE in dominanten Banden der Virusproteine neben einigen deutlich weniger abundanten Banden von verbliebenen Wirtszellproteinen. Diese nicht vollständige Abreicherung von Wirtszellproteinen lässt sich höchst wahrscheinlich durch ihre Interaktion mit den Viruspartikeln begründen.

Mit Hilfe der LC-MS/MS konnte ebenfalls gezeigt werden, dass verschiedene deglykosylierte Banden ausschließlich HA und keine co-migrierenden Wirtszellproteine enthielten. Die Funktionalität bzw. Praktikabilität der etablierten stufenweisen *g*-Gradienten-Zentrifugation konnte somit demonstriert werden.

5.2 Etablierung der N-Glykananalytik und Reproduzierbarkeit der CGE und Probenvorbereitung

Das elektrokinetische Trennsystem des ABI PRISM 3100-Avant, der im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, basiert auf einem neutral beschichteten fused-silica Kapillararray (vier Kapillaren parallel), das vor jeder Trennung mit einem linearen Polyacrylamidgel/Boratpuffersystem gefüllt wurde. Darin migrierten die Analyten in Abhängigkeit ihrer elektrophoretischen Mobilität im angelegten elektrischen Feld. In Bezug auf verschiedene Publikationen [160, 236-238] kann über konkurrierende Trennmechanismen in diesem System spekuliert werden. Obwohl dieser Mechanismus dominiert, hängt die Trennung höchstwahrscheinlich nicht ausschließlich vom Masse-zu-Ladungsverhältnis ab. Zusätzlich tragen der Siebeffekt, der Gelmatrix sowie eine Komplexbildung der Glykane mit dem im Puffersystem enthaltenen Borat zur Separation bei. Neben dem Siebeffekt hat auch die

Viskosität des Gels (ansteigend mit dessen Konzentration [239]) einen positiven Einfluss auf die Bandenverbreiterung durch reduzierte Diffusion und Geschwindigkeitsdispersion [160] im Vergleich zu einem „open tube“-System. Das bedeutet, dass in neutral beschichteten und gelgefüllten Kapillaren nahezu keine Verformung der Peaks (Tailing oder Fronting) auftritt. Die Komplexbildung mit Borat verändert die Retention und Migration der Kohlenhydrate [236-238] durch zusätzliche, teilweise negative Ladungen.

All diese Effekte werden klar deutlich durch die Qualität der präsentierten Daten für die N-Glykosylierung des bovinen IgG (Abb. 4-3) im Vergleich zu den von Raju *et al.* [226] publizierten Daten. Speziell niederabundante N-Glykane innerhalb des Glykanpools des bovinen IgG waren, im Gegensatz zu Raju *et al.* [226], deutlich detektierbar. Mit Hilfe von Spike-Experimenten (Daten teilweise gezeigt, Abbildung 4-4) war eine Zuordnung der entsprechenden Strukturen leicht möglich. Die Auswertung der vorliegenden Daten zeigte eine um den Faktor 2,5 erhöhte Peakkapazität (Anzahl der Basislinien-getrennten Peaks innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls) und eine bessere Auflösung der N-Glykane nach der Trennung mittels CGE im DNA-Sequenzierer im Vergleich zu der Trennung mittels CZE durch Raju *et al.* [226].

Domann *et al.* verglichen 2007 die NP Chromatographie mit der CGE [240]. Ihre Erkenntnisse entsprechen allerdings nicht den im Rahmen dieser Arbeit generierten und präsentierten Ergebnissen. Im Gegensatz zu der Arbeit von Domann *et al.* resultierten die hier präsentierte Methode (Abb. 3-1) und die verwendeten Geräte nicht nur in einer höheren Reproduzierbarkeit (hinsichtlich der relativen Peakhöhen, -flächen und norm. t_{mig} - sogar für Realproben), sondern auch in einer besseren Auflösung der Peaks und Empfindlichkeit. Allerdings verwendeten Domann *et al.* ein ProteomLab PA800 CE System und ein „ProteomeLab Carbohydrate Labelling and Analysis Kit“ (beides von Beckman-Coulter; Fullerton, CA, USA) und ihre Proben, einschließlich der gesamten Vorbereitung, unterscheiden sich von den hier präsentierten. Daher sind ihre Ergebnisse mit denen dieser Arbeit nicht direkt vergleichbar.

Im Vergleich zu den Arbeiten von Raju *et al.* und Domann *et al.* erlaubte die Verwendung eines DNA-Sequenzierers die Etablierung einer relativ einfachen, robusten und dabei empfindlichen Methode zur N-Glykananalyse. Diese hohe Empfindlichkeit wurde u. a. durch Kombination mit der LIF-Detektion ermöglicht (Abschnitt 4.3), die bekannt ist für ihre hohe Empfindlichkeit, und Nachweisgrenzen im unteren femtomol-Bereich [215, 216].

Die im Rahmen dieser Arbeit präsentierte Methode zur N-Glykananalytik wurde als Analysewerkzeug zur Qualitätskontrolle glykosylierter viraler Membranproteine entwickelt, um produktionsprozessbedingte Veränderungen in der N-Glykosylierung zu charakterisieren. Neben den Peaks der HA N-Glykane waren in den einzelnen Fingerprints stets zusätzliche Signale von einigen Verunreinigungen (norm. $t_{\text{mig}} < 100$ bp) zu erkennen. Um die HA N-Glykanpeaks eindeutig von den Verunreinigungen unterscheiden zu können, wurde der Hintergrund der CGE-LIF-Trennung durch Injektion von reinem Probenpuffer überprüft. Es konnten keine Signale detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde der Hintergrund der gesamten Probenvorbereitung mittels CGE-LIF aufgezeichnet. Dazu wurden leere SDS-Gelbanden und Banden nahe der HA₀-Bande nach dem in Abbildung 3-1 dargestellten Schema prozessiert. Auch hier waren in den entsprechenden Elektropherogrammen keine Peaks erkennbar, die HA N-Glykanen zugeordnet werden konnten (Daten nicht gezeigt). Obwohl die SEC in Bezug auf die Bettlänge und das Säulenmaterial optimiert wurde, deuten die in diesen Elektropherogrammen vorhandenen Signale darauf hin, dass der Überschuss an APTS nicht komplett entfernt werden konnte. Diese Peaks waren somit vermutlich dem APTS und dessen Verunreinigungen zuzuordnen [4]. Als mögliche Ursachen für die unzureichende Abreicherung des APTS lassen sich Säulengeometrie (quadratische Grundfläche) und eine zu geringe Länge der Trennstrecke anführen. Die Verfügbarkeit von tieferen Wellplatten mit runder Grundfläche und auch SEC Materialien aus kleineren Partikeln und kleineren intrapartikulären Poren (beides erhöht die Trenneffizienz) würde der unvollständigen Trennung entgegenwirken.

Während der Entwicklung der Methode zur HA N-Glykananalytik wurde zunächst die Reproduzierbarkeit der kapillarelektrophoretischen Trennung betrachtet (Abschnitt 4.4). Unter Berücksichtigung von fünf Peaks in Elektropherogrammen des bovinen Serum IgG (Abb. 4-3 A) wurden sowohl für die Kurzzeit- als auch Langzeitstudie nur geringe Standardabweichungen der relativen Peakhöhen (Kurzzeit: SD = +/- 0,67 % bzw. Langzeit: SD < 0,5 %), relativen Peakflächen (Langzeit: SD < 0,65 %) und t_{mig} (Kurzzeit: SD= +/- 0,0194 min bzw. Langzeit: SD < 0,08 min) ermittelt. Die Eigenschaft des verwendeten DNA-Sequenzierers, für die Trennung von DNA-Fragmenten sehr empfindliche und reproduzierbare Ergebnisse zu liefern, konnte somit auf die Trennung von N-Glykanen übertragen werden.

Weiterhin wurde die Reproduzierbarkeit der gesamten Probenvorbereitung mit anschließender kapillarelektrophoretischer Trennung betrachtet (Abschnitt 4.5). Der HA N-Glykanfingerprint der M-Variante des H1N1-RKI und H3N2 aus drei Aliquots einer Rollerflasche wurde dazu

aufgenommen. In der SDS-PAGE zeigte sich dabei für alle Proben eine reproduzierbar gute Qualität der Aufreinigung (Daten nicht gezeigt). Für alle Proben wurden die deglykosylierten HA₀-Banden nach tryptischem Verdau mittels LC-MS/MS analysiert. Diese enthielten außer HA keine co-migrierenden Wirtszellproteine. Die stufenweise *g*-Gradienten-Zentrifugation konnte somit auf beide Stämme angewandt werden und lieferte reproduzierbare Ergebnisse. In den einzelnen Schritten der Probenvorbereitung (IGD, SEC) verhielten sich die Proben vergleichbar, woraus sich auch hier auf eine gute Reproduzierbarkeit schließen lässt. Die Auswertung der Elektropherogramme der jeweils drei Rollerflaschenaliquots (Abb. 4-7) hinsichtlich der PA, der relativen Peakhöhe, -fläche und norm. t_{mig} ergab eine ausgezeichnete Reproduzierbarkeit mit geringfügigen mittleren SD (mittlere SD relative Peakhöhe H1N1-RKI = 0,35 %; H3N2 0,12 %; mittlere SD Peakfläche H1N1-RKI = 0,63 %; H3N2 0,15 %; mittlere SD norm. t_{mig} H1N1-RKI = 0,26 bp; H3N2 1,19 bp).

Wie bereits im Abschnitt zur Datenauswertung beschrieben (Abschnitt 3.3.12) kann die Auswertung hinsichtlich der relativen Peakhöhen und Peakflächen nur innerhalb einer Probenvorbereitung als absolut betrachtet und zwischen mehreren Probenvorbereitungen nur relativ verglichen werden. Als Grund dafür kann vor allem die komplexe Probenvorbereitung selbst, speziell die Virusaufreinigung, angeführt werden. Vor Auftrag der Viruspellets auf das jeweilige SDS-Gel wurde mit Hilfe der Proteinbestimmung nach Bradford die Proteinkonzentration der Probe bestimmt, entsprechend in Probenpuffer verdünnt und so für jede Probe die gleiche Menge an Protein in eine Gelspur aufgetragen. Allerdings wurden Variationen in der Proteinzusammensetzung der einzelnen Proben u. a. in Abhängigkeit der Kultivierungsparameter, der Wirtszelle und des betrachteten Virus im SDS- Gel beobachtet. Es lagen dabei unterschiedliche Mengen an HA im Vergleich zu anderen Proteinen (Wirtszellproteine und andere Virusproteine) vor. Die Menge an HA in der prozessierten Banden aus dem SDS-Gel korrelierte dabei direkt mit der Menge bzw. der Peakintensität der in der CGE-LIF bestimmten HA N-Glykane. Daher konnten insbesondere die relativen Peakhöhen und Peakflächen von HA N-Glykanen unterschiedlicher Varianten eines Virus (Einsatz verschiedener Wirtszellen) nur relativ zueinander betrachtet werden.

Die Proteinzusammensetzung bezogen auf den Anteil des HA im SDS-Gel war dagegen für eine betrachtete Variante (nach Kultivierung unter ähnlichen Bedingungen) auch zwischen mehreren Aufreinigungen vergleichbar, was sich in den entsprechenden Peakintensitäten widerspiegelte. Zusätzlich war zu berücksichtigen, dass das verwendete Trennsystem die Proben elektrokinetisch injiziert. Je nach Salzfracht der Proben und Gehalt an unterschiedlich

großen N-Glykanen wurde die Zusammensetzung der in die Kapillare injizierten Probe beeinflusst und damit ist eine direkte Quantifizierung der N-Glykane nicht möglich.

Die Verwendung eines Laserscanners des Typs Typhoon TRIO Variable Mode Imager ermöglichte eine schnelle und einfache Identifizierung glykanhaltiger Fraktionen in 96-Wellplatten. Da das Gerät ursprünglich zur Visualisierung von 1D und 2D SDS-Gelen ausgelegt ist, ergaben sich allerdings Probleme hinsichtlich der Empfindlichkeit (Tiefe der Wells dicker als ein SDS-Gel). Eine hochempfindliche Abtrennung zwischen APTS-haltiger Fraktionen war so nicht immer möglich.

5.3 Charakterisierung der Batch-to-Batch Reproduzierbarkeit

Um Glykanprofile während des USP in der Impfstoffproduktion aufzuzeichnen und zu interpretieren, muss die Batch-to-Batch Reproduzierbarkeit des USP berücksichtigt werden. Unterschiede im HA Glykosylierungsmuster wären durchaus nach Variationen im Produktionsprozess (z. B. Wirtszellsystem, Kultivierungsbedingungen) zu erwarten. Signifikante Veränderungen im HA N-Glykosylierungsmuster nach Virusreplikation unter vergleichbaren Bedingungen würden zu erheblichen Problemen führen bei der Entscheidung, ob diese Modifikationen der USP-Bedingungen bzw. den Einfluss von fehlerhaften Prozessen reflektieren oder nur als Variationen von Batch-to-Batch entstanden.

Aus diesem Grund wurde die Reproduzierbarkeit der HA N-Glykanfingerprints der M-Variante des H1N1-RKI und H3N2 von Proben aus verschiedenen Kultivierungsbatches (vergleichbare Kultivierungsbedingungen) analysiert (Abschnitt 4.6). Die ersten Schritte der Probenvorbereitung (stufenweise g -Gradienten-Zentrifugation, SDS-PAGE, Identifizierung der HA₀-Bande, SEC) lieferten dabei vergleichbare Ergebnisse für Proben aus jeweils drei T175-Zellkulturflaschen. Im Allgemeinen verhielten sich die Proben ähnlich den Proben aus Rollerflaschenaliquots. Erstaunlicherweise wurde eine sehr gute Reproduzierbarkeit des HA N-Glykosylierungsmusters hinsichtlich PA (identisch für die jeweils drei Proben des H1N1-RKI bzw. H3N2), der relativen Peakhöhen (mittlerer SD H1N1-RKI = 0,47 %; H3N2 = 0,11 %), Peakflächen (mittlere SD H1N1-RKI 0,93 %; H3N2 0,11 %) sowie norm. t_{mig} (mittlere SD H1N1-RKI 0,19 bp; H3N2 0,54 bp) mit sehr geringen mittleren SD beobachtet. Damit konnte die Reproduzierbarkeit des USP (Kultivierung in T175-Zellkulturflaschen) hinsichtlich der HA N-Glykosylierung für zwei Stämme des Influenza-A-Virus gezeigt werden. Zusätzlich ergaben sich für beide betrachtete Stämme untereinander vergleichbare HA N-Glykanfingerprints nach Aufarbeitung der Proben aus der Rollerflasche bzw. den

T175-Zellkulturflaschen (Abschnitt 4.8.1). Dies wird in Abschnitt 5.4.6 erneut aufgegriffen. Aufgrund der hohen Komplexität des zellkulturbasierten Impfstoffproduktionsprozesses wurde diese Konstanz des HA N-Glykosylierungsmusters nicht erwartet. Dadurch war es jedoch erst möglich, weitere Untersuchungen wie z. B. die der Bestimmung des Einflusses der Wirtszelle und verschiedener Zellkulturparameter durchzuführen.

5.4 Einfluss der Wirtszelllinie und Virusstamm auf das N-Glykosylierungsmuster des Influenza-Virus HA

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode wurde benutzt, um hochaufgelöste HA N-Glykanfingerprints zu generieren und damit den Einfluss des Wirtzellsystems auf die HA N-Glykosylierung während der zellkulturbasierten Impfstoffproduktion zu charakterisieren (Abschnitt 4.7.1 und 4.7.2). Des Weiteren wurden verschiedene Influenza-A- und -B-Viren, produziert in adhären MDCK-Zellen, hinsichtlich ihrer HA N-Glykanfingerprints und N-Glykanstrukturen verglichen. Aus der Literatur ist bekannt, dass sich die N-Glykosylierung nahe der RBS und auf der Spitze des HA Spikeproteins oft in Abhängigkeit des Wirtzellsystems verändert [16]. Die Pionierarbeit auf diesem Gebiet leisteten Nakamura und Compans [19, 67, 74]. In diesen Arbeiten wurden gesamte HA Proteine bzw. ihre Untereinheiten mittels Gelchromatographie und SDS-PAGE-basierten Techniken analysiert. Dies führte zu ersten Informationen über die N-Glykosylierung des HA. Es wurde deutlich, dass der N-Glykantyp teilweise von der Wirtszelle abhängt, aber auch die Aminosäuresequenz des HA selbst mitbestimmt, welcher N-Glykantyp an das Protein geheftet wird [19, 74]. In darauf folgenden Studien beschrieben sie, dass bereits geringfügige wirtszellbedingte Veränderungen in der Aminosäuresequenz des HA einer bestimmten Variante eines Influenza-Stammes zu Variationen in dessen N-Glykosylierungsmuster führen können. Es wurden zwei Mechanismen genannt, die die Änderung der Aminosäuresequenz bedingen. Zum einen kann sich die Anzahl der Glykosylierungsstellen ändern. Durch Mutation wird entweder eine neue Glykosylierungsstelle eingefügt oder eine bisher existierende eliminiert. Zum anderen kann eine Änderung in der Primärstruktur zu einer Änderung des Glykantyps an einer bestimmten Glykosylierungsstelle führen. Generell treten Unterschiede in der HA Glykosylierung eher an der Untereinheit HA₁ als an der Untereinheit HA₂ auf [67].

In einer aktuelleren Studie charakterisierten Romanova *et al.* [68] die Zusammensetzung der HA N-Glykosylierung in dem sie Veränderungen im Molekulargewicht des HA vor und nach dem Verdau mit Exoglykosidasen bestimmten. Damit wiesen sie Unterschiede in der N-

Glykanzusammensetzung zwischen der V- und M-Variante eines H1N1 Influenza-A-Virus nach. Beide Varianten besaßen überwiegend komplexe N-Glykane, die an der M-Variante größer waren als an der V-Variante.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten diese Beobachtungen von Romanova *et al.* hinsichtlich der Größenverteilung der HA N-Glykane bestätigt werden. Ebenfalls konnten, wie bei Romanova *et al.* beschrieben, mehr mannosereiche N-Glykane am HA der V- als an der M-Variante gefunden werden. Zusätzlich wurden die Analysen hier auf andere Wirtszellsysteme ausgeweitet (Abschnitte 4.7.1 und 4.7.2; Abbildungen 4-12, 4-13, 4-14) und mit der hier präsentierten Methode detailliertere Informationen in Bezug auf die Größenverteilung, der Menge und des Typs der HA N-Glykane ermittelt. Die Ergebnisse der Abschnitte 4.7.1 – 4.7.3 sind in der Tabelle 4-6 zusammengefasst. Es wurden sowohl deutliche Unterschiede in der HA N-Glykosylierung des Influenza-A-Virus H1N1-RKI und H3N2 in Abhängigkeit der Wirtszelllinie (Abschnitte 4.7.1 und 4.7.2) als auch zwischen den Subtypen A und B (Abschnitt 4.7.3) beobachtet. In allen Fällen korrelierten dabei Unterschiede in der elektrophoretischen Mobilität des HA verschiedener Virusvarianten mit den Unterschieden in den entsprechenden HA N-Glykanfingerprints (hinsichtlich Anzahl und Größenverteilung der N-Glykane). Bereits Compans *et al.* beschrieben 1970 wirtszellabhängige Unterschiede in elektrophoretischer Mobilität von einigen Glykoproteinen, die aber nicht bei Nicht-Glykoproteinen beobachtet wurden [241]. Sie vermuteten somit, dass der Kohlenhydratteil von der Wirtszelle bestimmt wird. Dies wird auch durch die Beobachtungen von Schulze [60] unterstützt. Sie beschrieben, dass die HA N-Glykane eines Virus, der in Zellen verschiedener Spezies repliziert wurde, in HAs mit unterschiedlichem MW resultiert. Basierend auf den Ergebnissen der N-Glykananalyse kann das im Vergleich zu anderen Varianten geringe MW des HA der A-Variante des H1N1-RKI (Abb. 4-11) mit seinem geringeren Grad der Glykosylierung begründet werden (PA = 11).

In Übereinstimmung mit Ergebnissen von Romanova *et al.* [68] wurde für die M- und V-Variante des H3N2 Virus die Wirtszellabhängigkeit der HA N-Glykosylierung bestätigt (Abschnitt 4.7.2; Abbildung -13; Tabelle 4-4). Wie bereits für die Varianten des H1N1-RKI, konnten Unterschiede im MW des HA mit Hilfe der PA in den entsprechenden N-Glykanfingerprints (M-Variante = 34; V-Variante = 29) und der Größenverteilung der N-Glykane erklärt werden (Tabelle 4-4 und 4-6).

Das Verhältnis von mannosereichen zu komplexen HA N-Glykanen des H3N2 Virus wurde in dieser Studie, ebenfalls in Übereinstimmung mit Romanova *et al.* [68] auf circa 67 % : 33 % für die M-Variante and circa 81 % : 19 % für die V-Variante (basierend auf den relativen

Peakhöhen gemäß [92] bestimmt.

Das MW des glykosylierten HA der R-Variante des H3N2 Virus war ähnlich dem der M-Variante (Abb. 4-11; Tabelle 4-6). Diese Ähnlichkeit kann gegebenenfalls damit erklärt werden, dass die RCAR-Zellen von den MDCK-Zellen abstammen. Aus diesem Grund sollten wahrscheinlich keine Änderungen in der Aminosäuresequenz oder dem N-Glykotyp bzw. N-Glykanaufbau auftreten. Da RCAR-Zellen einen Defekt im UDP-Galaktose Transporter besitzen, wurden neben einigen mannosereichen N-Glykanen auch N-Glykane vom Hybridtyp beobachtet, jedoch keine komplexen N-Glykane mit terminaler α - oder β -Galaktose (nach SED, Abbildung 4-18). Das erklärt ebenfalls, warum nur zwei der 19 Peaks im HA N-Glykanfingerprint der R-Variante des H3N2 Virus eine norm. $t_{mig} > 269,7$ bp (Tabelle 4-4) besitzen (N-Glykane mit terminaler α - oder β -Galaktose wiesen deutlich höhere norm. t_{mig} auf). Das gegenüber der M-Variante leicht reduzierte MW des HA der R-Variante war demnach in der geringeren Komplexität der Glykosylierung des HA begründet. Das Grundgerüst der jeweiligen N-Glykane der M- und R-Variante war vergleichbar. Es fehlen lediglich die terminalen α - oder β -Galaktosen, deren Abwesenheit nur eine geringe Differenz im Molekulargewicht bewirkten.

In Bezug auf die Unterschiede im MW des glykosylierten HA der hier betrachteten Varianten des H1N1-RKI und H3N2 Virus bzw. der M-Variante verschiedener Viren (Abb. 4-11; Tabelle 4-6) muss sowohl die Aminosäuresequenz des HA (Tabelle 4-6) als auch die Komplexität dessen Glykosylierung (Tabelle 4-3; 4-4 und 4-5) berücksichtigt werden. Das HA des H1N1-RKI Virus ist aus 548 Aminosäuren [228], das HA des H3N2 Virus aus 540 Aminosäuren [229] und das HA des B/Mal Virus aus 570 Aminosäuren [230] aufgebaut. Berechnet man auf der Basis der Anzahl der Aminosäuren das MW des jeweiligen HA (mittleres MW einer Aminosäure = 115 Da), resultiert dies in nahezu identischen MW (63,5 kDa; Tabelle 4-6). Aufgrund von Veränderungen in der Aminosäuresequenz des HA nach der Virusadaption an verschiedene Wirtszellen [59, 66, 68], sind die genauen HA Aminosäuresequenzen der einzelnen Varianten des H1N1 und H3N2 Virus nicht bekannt. Eine geringe Anzahl an Punktmutationen würde nicht die beobachteten Unterschiede im MW der HAs der einzelnen Varianten (Abb. 4-11; Tabelle 4-6) hervorrufen. Außerdem zeigten deglykosylierte HAs der verschiedenen Viren nahezu identische elektrophoretische Mobilitäten in der SDS-PAGE (Daten nicht gezeigt). Dies unterstützt die Annahme, dass die beobachteten Unterschiede im MW in Zusammenhang mit Unterschieden in der Glykosylierung des HA stehen. Die beobachteten Unterschiede im MW können somit wahrscheinlich mit Hilfe der Anzahl (PA) und Größe (norm. t_{mig}) der verschiedenen N-

Glykane am HA erklärt werden. Beispielsweise besitzt das HA der M-Variante des H1N1-RKI vergleichsweise große N-Glykane (Abb. 4-12; Tabelle 4-3), während alle anderen Varianten dieses Virus, besonders die A-Variante, weniger komplexe HA N-Glykanfingerprints zeigten. Diesen Varianten fehlten hauptsächlich große N-Glykane (gefunden an der M-Variante), die komplexe bi-, tri- und tetraantennäre Glykane mit terminaler α -Galaktose (MW > 2,5 kDa) repräsentierten. Die Abwesenheit von beispielsweise fünf dieser großen N-Glykane würde die beobachtete Massendifferenz von ca. 14 kDa zwischen der M- und A-Variante des H1N1-RKI Virus erklären. Vergleicht man das HA von zwei Varianten mit der selben PA (z. B. die M- und V-Variante des H1N1-RKI), ist die Größenverteilung der N-Glykane entscheidend. Unter Berücksichtigung der norm. t_{mig} der HA N-Glykane dieser Varianten (Tabelle 4-3), besitzt das HA der M-Variante größere N-Glykane, was in einem höheren MW resultiert. Verglichen zu den MWs der Varianten des H3N2 und B/Mal Virus (Abb. 4-11; Tabelle 4-6), kann nur eine geringe Anzahl an N-Glykanen an das jeweilige HA gebunden sein, was sich auch in den ermittelten PAs widerspiegelt.

Vergleicht man die M-Varianten verschiedener Viren, wurde für das glykosylierte HA des H3N2 das höchste MW beobachtet, während das MW des glykosylierten HA des H1N1 deutlich kleiner erschien (Abschnitt 4.7.3; Abbildung 4-11). Diese Beobachtungen korrelierten dabei mit der PA der N-Glykane und ihrer Größenverteilung in den entsprechenden HA N-Glykanfingerprints des H1N1-RKI, H3N2 und B/Mal (Abb. 4-14; Tabelle 4-5). Für die beiden Influenza-A-Stämme H1N1-RKI und H3N2 deckte sich dieses Ergebnis mit Beobachtungen in Studien von Inkster und Mir-Shekari [122, 242]. Sie beschrieben, dass die HA N-Glykane an nicht konservierten Regionen (hauptsächlich der Untereinheit HA₁) in Struktur und Anzahl an verschiedenen Influenza-A-Viren variieren.

Obwohl der selbe Virus (H1N1-RKI, H3N2) repliziert wurde, resultierte die Verwendung von verschiedenen Wirtszellsystemen in unterschiedlichen HA N-Glykanpools, die verschiedene N-Glykane enthielten. Dies ist höchstwahrscheinlich mit Hilfe der zuvor erwähnten wirtszellbedingten Veränderungen in der Aminosäuresequenz (primäre HA Struktur) und deren Einfluss auf die Anzahl der potentiellen Glykosylierungsstellen zu begründen.

Ebenfalls wurden bereits wirtszellvermittelte Unterschiede in der HA N-Glykosylierung eines H3N2 Virus aus Vero- und MDCK-Isolaten auch ohne Amminosäuresubstitutionen in der Untereinheit HA₁ beobachtet [68]. In Übereinstimmung mit Ergebnissen von Kornfeld und Kornfeld [5], Paulson [243] und auch dem Review von Helenius und Aebi [56] bestimmen offensichtlich sowohl Virus als auch der Wirtzelltyp das HA N-Glykosylierungsmuster. Die

hier präsentierten experimentellen Daten weisen darauf hin, dass der Virustyp und -subtyp hauptsächlich den HA N-Glykantyp bestimmt (Abschnitt 4.7.3), während die Wirtszelle hauptsächlich Veränderungen in der monomeren Zusammensetzung der einzelnen N-Glykane sowie Verschiebungen in der Zusammensetzung des N-Glykanpools (hinsichtlich des prozentualen Anteils der N-Glykantypen) bedingt (Abschnitte 4.7.1 und 4.7.2). Deutlich wurde dies in den sequentiellen Exoglykosidaseverdaus (Abschnitt 4.7.4 – 4.7.6). Beispielweise wurden am HA der einzelnen Varianten des H1N1-RKI ausschließlich komplexe N-Glykane gefunden, während die Varianten des H3N2 hauptsächlich mannosereiche HA N-Glykane aufwiesen.

Vergleicht man die HA N-Glykanfingerprints aller H1N1-RKI Varianten, wurden Ähnlichkeiten zwischen der H-, A- und V-Variante, repliziert in taxonomisch eng verwandten Wirtzellsystemen, gefunden (Abb. 4-12; Tabelle 4-4). Diese Beobachtungen stimmen mit in der Literatur beschriebenen Ergebnissen überein. Von Romanova et al. [68] wurde beobachtet, dass das HA N-Glykosylierungsmuster und die Eigenschaften von H3N2-Viren aus Vero-Zellen ähnlich denen aus humanen Nierenzellen sind. Im Gegensatz dazu wiesen die HA N-Glykanfingerprints dieser drei Varianten (H, A und V) klare Unterschiede zu denen der C- und M-Variante auf, deren Wirtszellen einen geringeren taxonomischen Verwandtschaftsgrad aufwiesen. Diese Ergebnisse geben eventuell Grund zu der Annahme, dass sich sowohl taxonomisch eng (z. B. H-, A-, und V-Variante, die aus zwei humanen und einer Affenzelllinie stammen) als auch weniger verwandte Wirtzellsysteme (z. B. M-, R- und C-Variante, die aus zwei Hundezelllinien und einer Entenzelllinie stammen) anhand des HA N-Glykosylierungsmusters (des entsprechenden Virus, der in diesen Zellen repliziert wurde) typisieren lassen.

In den generierten HA N-Glykanfingerprints der Varianten des H1N1-RKI bzw. H3N2 wurden neben den beschriebenen Unterschieden auch einige übereinstimmende Strukturen nachgewiesen (Tabelle 4-3 und 4-4). Dies lässt sich damit begründen, dass z. B. Mutationen (durch verschiedene Wirtzellsysteme), die zum Verlust oder dem Auftreten neuer Glykosylierungsstellen führen, nicht die N-Glykane an den unveränderten bzw. verbliebenen Glykosylierungsstellen verändern [60].

Die HA N-Glykanpools aller H1N1-RKI Varianten enthielten hauptsächlich fukosylierte komplexe N-Glykane (Abschnitt 4.7.4; Tabelle 4-7). Lediglich an komplexen HA N-Glykanen der M-Variante wurde terminale α -Galaktose gefunden (größtenteils fukosyliert, terminale α -Galaktose dominierend, wenige mit terminaler β -Galaktose) (Abb. 4-16; Tabelle

4-7). Diese Ergebnisse korrelieren mit Beobachtungen von Opitz *et al.* aus der Lektin-Affinitäts-Chromatographie [244]. Sie zeigten in ihrer Arbeit, dass sich die M-Variante des H1N1-RKI Virus bevorzugt an das Euonymous Europaeus Lektin (EEL), ein Lektin mit hoher Affinität zu terminaler α -Galaktose, bindet. Nach Jenkins *et al.* [57] ergeben sich deutliche Unterschiede in der Glykosylierung von rekombinanten Proteinen, wenn anstelle der routinemäßig eingesetzten Nagerzelllinien eine humane Gewebezelle verwendet wurde. Da Mäusezellen meist die α 1,3-Galaktosyltransferase besitzen, treten bei ihrem Einsatz terminale Gal α 1,3-Gal β 1,4-GlcNAc an Glykoproteinen auf. Im Gegensatz dazu ist das Gen für diese Transferase durch eine Rastermutation in Menschen, Menschenaffen und Altweltaffen (Meerkatzenverwandte) inaktiviert [245]. Dies kann daher ggf. als Begründung angeführt werden, dass bei den betrachteten Varianten ausschließlich unter der Verwendung von MDCK-Zellen Strukturen mit terminaler α -Galaktose beobachtet wurden.

Das generelle Fehlen terminaler Sialinsäure an den HA N-Glykanen aller hier betrachteten Varianten und Viren kann mit Hilfe der Aktivität viraler NA erklärt werden. Dieses Membranprotein agiert als Exoglykosidase, wie sie auch im SED verwendet wird, die die terminale Sialinsäure vom terminalen Ende der N-Glykane abverdaut. Die Aktivität der NA im Zellkulturüberstand konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Dazu wurde das sialierte N-Glykan A2F mit H3N2-haltigem Zellkulturüberstand unter SED-Bedingungen inkubiert. In den entsprechenden Elektropherogrammen konnte anschließend eine Verschiebung der norm. t_{mig} des A2F-Peaks zu der einfach sialierten (A1F) und unsialierten Form des N-Glykans (NA2F) beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtungen korrelieren mit der Aussage, dass, im Gegensatz zu anderen behüllten Viren, bei Influenza die N-Glykane keine terminale Sialinsäure aufgrund der Aktivität der viralen NA besitzen [124]. Weiterhin zeigten Daten von Ohuchi *et al.* [16, 125], dass nur in Abwesenheit viraler NA sialierte HA N-Glykane existieren. Außerdem beeinflussen HA N-Glykane an der RBS die Affinität zum Rezeptor und das HA bindet nicht an diesen, wenn diese N-Glykane sialiert sind. Direkt bezogen auf virale NA (A/Equi 2/ 1/93 (H3N8) bzw. A/PR/8/34 (H1N1)) in MDCK Zellkulturbrühe konnten sowohl Nayak und Reichl als auch Kalbfuss *et al.* deren Aktivität eindeutig nachweisen [246, 247]. Dabei beobachteten Nayak und Reichl einen deutlichen Anstieg der NA-Aktivität bis 60 hpi [247]. In Bezug auf die hier präsentierten Daten zur Glykosylierung des Influenza Virus Hämagglutinin ist auch mit diesen Studien die Abwesenheit terminaler Sialinsäure bestätigt worden.

5.5 Adaption von Influenza-A-Viren an die Vero- und RCAR-Zelllinie – Verlauf der HA N-Glykosylierung

Zur Produktion von zellkulturbasiertem Influenza-Impfstoff finden verschiedene adhärente (z. B. MDCK-Zellen in Suspension bei Novartis Vaccines & Diagnostics, Vero-Zellen bei Baxter) und Suspensionszelllinien (PER.C6 bei Crucell) Anwendung [39, 40, 43, 248-250]. Meist werden dabei mit unterschiedlichen Wirtszellsystemen auch unterschiedliche Virusausbeuten erzielt. Um mit dem jeweiligen Wirtszellsystem eine entsprechend hohe Ausbeute garantieren zu können, kann die Adaption des Virus an die einzelnen Zelllinien von Vorteil sein. So beschrieben z. B. Govorka *et al.* eine Erhöhung des Virustiter um den Faktor 26 nach der 20-fachen Passagierung des Influenza-A/England/1/53-Virus in Vero-Zellen [94]. Vergleichbare Erfolge wurden auch für MDCK-Zellen beobachtet, wobei hier die Titer in den Passagen 2 bis 5 von verschiedenen H1N1- und H3N2-Virusproben verglichen wurden [251]. Was während dieser Adaptionsprozesse geschieht, ist weitestgehend unklar. Während auf der einen Seite davon ausgegangen wird, dass die Adaption nicht zu Änderungen in der Sequenz des HA₁ führt [94], wurden beispielsweise von Robertson *et al.* und Mochalova *et al.* solche Änderungen in der HA-Sequenz nach Adaption an verschiedene Wirtszellen beschrieben [59, 66]. Die dadurch bedingte Veränderung in der Anzahl der Glykosylierungsstellen wurde ebenfalls in Verbindung mit Unterschieden in der elektrophoretischen Mobilität des HA gesetzt [66, 68]. Auch bei der Adaption klinischer Isolate an Hühnereier wurde der Verlust einer Glykosylierungsstelle regelmäßig beobachtet, während diese allerdings bei der Passagierung in MDCK-Zellen erhalten blieb [59, 252-254].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Adaption verschiedener Influenza-A-Viren (H1N1-NIBSC und H3N2) an die Vero- und RCAR-Zelllinie auf die HA N-Glykosylierung betrachtet. Dabei konnte bei der Adaption beider Virusstämme an Vero-Zellen eine deutliche Zunahme des Virustiters nach der Passagierung erzielt werden. Im Gegensatz zur Adaption des H1N1-NIBSC Virus (deutlich erhöhter Virustiter nach drei Passagen) waren für die Adaption des H3N2 Virus mindestens vier Passagen zur Anpassung an das neue Wirtszellsystem nötig (Abb. 4-20 und 4-22).

Bei der Adaption des H3N2 Virus an die RCAR-Zelllinie konnte über vier Passagen nur eine leichte Zunahme des Gesamtvirusgehalts beobachtet werden (Abb. 4-24). Im Allgemeinen wurden hier sehr geringe Virustiter erzielt, der beispielsweise in Passage 4 auf 1,7 HA log Einheiten/100 µL bestimmt wurde. Influenza-Viren binden über das HA an Sialinsäure, die α -2,3 (charakteristisch für aviäre Zellen) oder α -2,6 (charakteristisch für humane Zellen) an

Galaktose verknüpft ist. Die Speziesbarriere von z. B. aviären oder humanen Influenza-Viren (definiert durch die Spezifität des jeweiligen HA an α -2,3 oder α -2,3 verknüpfte Sialinsäure zu binden) kann jedoch durch Passagierung überwunden werden. Der Virus adaptiert dabei an sein neues Wirtszellsystem durch Mutationen in der RBS des viralen HA [66, 255, 256]. RCAR-Zellen (mutierte MDCK-Zelllinie) [93] sind aufgrund eines Defektes im UDP-Galaktose-Transporter im Golgikomplex nicht fähig, Galaktose und Sialinsäure in Glykane zu integrieren [227]. Dies gilt für alle N-Glykane an Proteinen, die in diesen Zellen synthetisiert werden, d. h. zelleigene und die des Virus. Demzufolge existieren auf der Zelloberfläche nur N-Glykane mit terminaler Mannose oder GlcNAc. Das Anheften des Virus an die Wirtszelle ist somit negativ beeinflusst, da keine Sialinsäuren an Wirtszellproteinen präsent sind. Da für die Bindung des Virus an die Wirtszelle N-Glykane erforderlich sind [257], bindet dieser im Falle der RCAR-Zellen entweder über rudimentäre bzw. mannosereiche oder Hybridglykane ohne Galaktose oder Sialinsäure, oder über einen anderen Mechanismus bzw. Affinität an die Wirtszelle. Im Falle der hier betrachteten Adaption des Virus an die RCAR-Zellen wurden möglicherweise Viren mit einer solchen Fähigkeit selektiert, da nur sie an die Zielzellen binden und sich so vermehren können. Dies würde die geringe Virusreplikation und den über 4 Passagen nur leicht ansteigenden Virustiter in RCAR-Zellen erklären.

In der vorliegenden Arbeit standen bei der Adaption von Influenza-Viren an verschiedene Wirtszellsysteme auftretende Veränderungen in der HA N-Glykosylierung im Fokus. Betrachtet man den Verlauf des HA N-Glykosylierungsmusters des Influenza-A-Virus H1N1-NIBSC (Abb. 4-21) und des H3N2 Virus (Abb. 4-23) während der Adaption von MDCK- an Vero-Zellen konnten von Passage 1 zu Passage 4 deutliche Veränderungen in den HA N-Glykanfingerprints beobachtet werden. Es zeigten sich sowohl Änderungen in der PA als auch der Struktur der N-Glykane (unterschiedliche norm. t_{mig}). Für den H1N1-NIBSC waren, wie schon im Verlauf des Virustiters bei diesen Adaptionen, drei und für den H3N2 Virus vier Passagen zur Anpassung an das neue Wirtszellsystem notwendig. Danach zeigten sich keine Veränderungen im HA N-Glykanfingerprint mehr. Bei der Adaption des H3N2-Virus an die RCAR-Zelle traten zwischen den HA N-Glykanfingerprints der Passage 3 und 4 keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 4-25). Demnach war auch hier hinsichtlich des HA Glykosylierungsmusters eine Adaption über drei Passagen zur Anpassung des H3N2 Virus an die RCAR-Zellen ausreichend. Die Komplexität des Fingerprints reduzierte sich deutlich und die Peaks shifteten zu niedrigeren norm. t_{mig} (Abb. 4-25). In Korrelation mit dem zuvor beschriebenen Defekt der RCAR-Zellen im UDP-Galaktose-Transporter im Golgikomplex repräsentierten diese Peaks Hybrid- und mannosereichen Glykane (Abschnitt 4.7.5).

Zusätzlich wurde die „Rückwertadaption“ des H1N1-NIBSC Virus von Vero-Zellen an MDCK-Zellen betrachtet (Abschnitt 4.7.7.4). Dabei konnte in der Passage 4 ein Virustiter von 2,6 HA log Einheiten/100 μ L erzielt werden. Im Vergleich dazu resultierte die direkte Replikation des H1N1-NIBSC Virus (Saatvirus aus MDCK-Zellen) nur einen Virustiter von 2,0 HA log Einheiten/100 μ L. Im HA N-Glykanfingerprint nach der „Rückwärtsadaption“ über vier Passagen konnten keine signifikanten Unterschiede im allgemeinen Erscheinungsbild zum HA N-Glykanfingerprint des direkt in MDCK-Zellen replizierten H1N1-NIBSC Virus beobachtet werden. Auffällig war jedoch die deutlich höhere Intensität der Peaks nach der „Rückwärtsadaption“ ($RFU_{max} = 1100$; direkt in MDCK-Zellen replizierter H1N1-NIBSC $RFU_{max} = 250$ RFU; relativer Vergleich, Aufreinigung und Proteinzusammensetzung im SDS-Gel vergleichbar). Als mögliche Ursache dafür kann ggf. der ebenfalls deutlich höhere Virustiter angeführt werden. Die „Rückwärtsadaption“ von an Vero-Zellen adaptiertem H1N1-NIBSC Virus über vier Passagen an MDCK resultierte in dem ursprünglichen HA N-Glykosylierungsmuster von direkt in MDCK-Zellen repliziertem H1N1-NIBSC Virus.

Die Herausforderung des neuen Wirtszellsystems (hier MDCK) an den an Vero-Zellen angepassten Virus führte hierbei eventuell zu einer Selektion von in MDCK-Zellen besser replizierenden Viren, als sie im ursprünglichen MDCK-Saatvirus vorlagen. Diese Selektion kann ebenfalls bei der Adaption des H1N1-NIBSC und H3N2 Virus an die Vero-Zelllinie aufgetreten sein. Influenza-Viren treten stets als eine Population aus hochverschiedenen Viren auf. In solch einer Viruspopulation repräsentieren Viren mit veränderten Glykoproteinen eine Minderheit in der Quasi-Spezies-Population. Sie bleiben wahrscheinlich unentdeckt, auch wenn sie sich phenotypisch vom Rest der Population unterscheiden. Die Verteilung der Minderheiten in der Population (Mutationsspektrum) bleibt konstant bis der Selektionsdruck zunimmt und damit die Zusammensetzung der Population beeinflusst. Dabei resultiert die Selektion einer oder mehrerer Minderheiten in einem neuen Mutationsspektrum und dem Auftauchen einer neuen gemeinsamen Sequenz. Umweltfaktoren, die dies bewirken können, sind beispielsweise der bei der Adaption vorgenommene Transfer einiger infektiöser Partikel in ein neues Wirtssystem. Weitere Möglichkeiten sind auch Antikörper (Neutralisierung der dominanten Antigen-Einheiten der Viren in der Population), die substanzielle Reduktion der Größe der Viruspopulation (z. B. durch chemotherapeutische Agenzien), Änderungen in der Rezeptorspezifität des viralen Glykoproteins, Veränderungen in der Verfügbarkeit von Rezeptoren aufgrund von Interspeziestransfer und auch Veränderungen in der Verteilung der Mischpopulation der Wirtszellen durch zellzerstörende Aktivitäten des Virus [18]. Demnach

trat bei den verschiedenen durchgeführten Adaptionen wahrscheinlich die Selektion bestimmter Viren aus der vorhandenen Virusmischpopulation auf, die eine höhere Kompatibilität mit dem neuen Wirtszellsystem besaßen und sich gegenüber den übrigen Viren durchsetzten. Einen Hinweis auf eine stattgefundene Selektion bietet auch der Verlauf des HA N-Glykosylierungsmusters über die einzelnen Passagen (Abb. 4-21; 4-23; 4-25). Es zeigten sich anstelle eines sofort angepassten HA N-Glykosylierungsmusters Übergänge von dem aus der Replikation in MDCK-Zellen resultierenden hin zu dem in den „neuen“ Wirtszellen replizierten Virus. Es lagen hier möglicherweise in den ersten Passagen (1-2 bzw. 1-3) Virusmischpopulationen mit mehreren dominanten Varianten vor, die einen maßgeblichen Beitrag zum erhaltenen HA N-Glykanfingerprint lieferten.

Eine zweite Möglichkeit, die Veränderungen in der HA N-Glykosylierung zu erklären, ist das Auftreten von Mutationen in der HA-Aminosäuresequenz, die eben diese Veränderungen im Glykosylierungsmuster bedingen. Wie in Abschnitt 4.7.7.2 beschrieben und auch von Romanova *et al.* beobachtet, ist eine Passage eines H3N2 Virus aus einem Vero-Isolat in MDCK-Zellen manchmal ausreichend, um das Glykosylierungsmuster des HA zu verändern. Bei weiterer Passagierung kommen dann Mutationen in der Aminosäuresequenz des HA hinzu. Romanova *et al.* verglichen die aus der Replikation in MDCK- und Vero-Zellen resultierenden HA N-Glykosylierungsmuster eines H3N2 Virus mittels Western-Blot-Analysen und Exoglykosidaseverdaus. Zusätzlich zeigten sie, dass ein an Vero-Zellen adaptierter H3N2 Virus nicht mehr fähig ist, Hühnereier zu infizieren oder Hühnererythrozyten zu agglutinieren [68]. Auch bei der Adaption eines Influenza-B-Virus an Hühnereier bzw. MDCK-Zellen wurden Veränderungen im HA N-Glykosylierungsmuster beschrieben, bei gleichzeitigem Auftreten von Änderungen in der Aminosäuresequenz des HA [32].

Ein dritter Faktor, der Veränderungen im HA N-Glykosylierungsmuster bei der Adaption an neue Wirtszellsysteme bedingt, sind die entsprechenden Wirtszellen selbst. Wie in Abschnitt 5.4 beschrieben bestimmen sowohl Virus als auch der Wirtszelltyp das HA N-Glykosylierungsmuster [5, 56, 243]. Dabei repräsentiert bei den durchgeführten Adaptionen der Wirtszelltyp den variierten Faktor. In Abhängigkeit von der in den ursprünglichen und neuen Wirtszellen vorhandenen Glykosylierungsmaschinerie können nur bestimmte Glykane synthetisiert werden. Fehlen in einem Zelltyp z. B. α -Galaktosidase bzw. -transferase, können keine Glykane, die α -Galaktose beinhalten, an zelleigene oder virale Proteine angeheftet werden.

5.6 Einfluss verschiedener Kultivierungsparameter auf die N-Glykosylierung des Influenza-Virus HA

In Abschnitt 4.8 wurden die Ergebnisse aus den Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Kultivierungsparameter wie Zellkultursystem, Zellkulturmedium, Zelldichte, Sauerstoffgehalt, Erntezeitpunkt und Inaktivierung mit β -PL präsentiert. Für einige ist bekannt, dass sie die Makro- und Mikroheterogenität der Glykosylierung rekombinanter Proteine und Antikörper zu beeinflussen [29, 53-55, 57, 140, 142, 258-260].

In den folgenden beiden Abschnitten werden diese Beobachtungen mit den Ergebnissen aus den Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Kultivierungsparameter auf die N-Glykosylierung des Influenza-Virus HA verglichen.

5.6.1 Einfluss von Zellkultursystem, Zellkulturmedium, Zelldichte und Sauerstoffgehalt

Zellkultursystem

MDCK-, Vero- und AGE.CR1-Zellen wurden in verschiedenen Zellkultursystemen (T175-Zellkulturflasche, RF, 5 L-Bioreaktor) kultiviert und anschließend mit Influenza-A-Virus H1N1-RKI bzw. H3N2 infiziert. Die resultierenden HA N-Glykanfingerprints wurden in Abschnitt 4.8.1 verglichen.

Zunächst wurden die M-Varianten des H1N1-RKI bzw. H3N2 aus T175-Zellkulturflaschen und RF hinsichtlich der HA N-Glykosylierung betrachtet. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede in den jeweiligen Fingerprints bezüglich der PA und Verteilung der Peaks (norm. t_{mig} und Intensität) beobachtet (Abb. 4-28 A und B). Ähnliches wurde für die V-Variante des H1N1-NIBSC und die C-Variante des H1N1-RKI beobachtet. Anschließend wurden die HA N-Glykanfingerprints der M-Variante mit den entsprechenden Fingerprints nach Kultivierung und Infektion der MDCK-Zellen in einem 5 L-Bioreaktor verglichen. In beiden Fällen (M-Variante des H1N1-RKI und H3N2) zeigten die Elektropherogramme die selben Peaks bei identischer PA. Allerdings traten deutliche Unterschiede hinsichtlich der Verteilung der Peaks (Intensität) auf (Abb. 4-29 A und B). Dabei waren die Unterschiede in den Peakintensitäten zwischen den HA N-Glykanfingerprints der Rollerflasche und der T175-Zellkulturflasche für die M-Variante des H3N2 stärker ausgeprägt als für die M-Variante des H1N1-RKI. In den HA N-Glykanfingerprints der M-Varianten des H1N1-RKI und H3N2 nach Kultivierung und Infektion im 5 L-Bioreaktor wurden im Vergleich zu solchen aus statischen Kulturen vermehrt kleinere Strukturen (bestehend aus weniger Monomeren) beobachtet (Abb. 4-29A und B). Diese Beobachtungen deckten sich auch mit denen aus

Versuchen mit der V-Variante des H1N1-NIBSC Virus. Auch hier traten im HA N-Glykanfingerprint nach der Virusreplikation im 5 L-Bioreaktor deutliche Unterschiede zum entsprechenden Fingerprint, der aus der Virusreplikation in einer RF bzw. T175-Zellkulturflasche resultierte (Abb. 4-30), auf. Peaks mit einer norm. $t_{\text{mig}} > 300$ bp zeigten für die Probe aus dem 5 L-Bioreaktor eine geringere Intensität als die aus T175-Zellkulturflaschen und RF. Es zeigten sich, wie schon für die M-Variante des H1N1-RKI und H3N2 beobachtet, deutliche Unterschiede in der Verteilung der Peaks (hinsichtlich der Intensitäten) bei identischer PA. Damit ergab sich sowohl für die M-Varianten (H1N1-RKI und H3N2) als auch die V-Variante (H1N1-NIBSC) im Vergleich zu statischen Kulturen (T175-Zellkulturflasche) durch die Kultivierung der Zellen und Infektion im 5 L-Bioreaktor ein verändertes HA N-Glykosylierungsmuster. Anhand der vorliegenden Daten war die PA jedoch unabhängig vom Kultivierungssystem. Im Gegensatz dazu wurde die Verteilung der der HA N-Glykane der betrachteten M- und V-Varianten von der Wahl des Zellkultursystems (statisch = T175-Zellkulturflasche vs. dynamisch = 5 L-Bioreaktor) beeinflusst. Demnach wurde offenbar nicht die Anzahl der Glykoformen beeinträchtigt, sondern der Anteil der einzelnen N-Glykane am Glykanpool. Das ebenfalls dynamische Zellkultursystem RF beeinflusst scheinbar nicht die HA N-Glykosylierung der betrachteten M-, V- und R-Varianten. Als Grund dafür kann wahrscheinlich die nur leichte Rotation der RF (Umdrehungsgeschwindigkeit 0,66 U/min) angeführt werden.

Das vermehrte Auftreten von Peaks mit kleineren norm. t_{mig} nach Replikation der M- und V-Varianten im 5 L-Bioreaktor deutet eventuell auf Degradationen der N-Glykane im dynamischen Zellkultursystem hin. Aufgrund der auftretenden Scherkräfte im 5 L-Bioreaktor kommt es eher zur Lyse/Zerstörung der Zellen als beispielsweise in einer T175-Zellkulturflasche. Dadurch werden vermehrt u.a. Glykosidasen aus den Wirtszellen in das Zellkulturmedium freigesetzt. Parallel kommt es in Zellkulturen auch zur Ausschleusung von Glykosidasen aus unbeschädigten Zellen [261, 262]. Extrazelluläre Modifikationen von Glykanen an Zell- bzw. Virusoberflächen in der Zellkultur sind somit durch diese freien Glykosidasen möglich. Die Aktivität der freien Glykosidasen ist dabei vom Wirtszellsystem abhängig. Zusätzlich werden Degradationen der Glykane durch die intrazelluläre Aktivität, ihr Potential zur Freisetzung in das Medium und ihre Stabilität nach der Freisetzung bestimmt [261, 262].

Zellkulturmedium

Um den Einfluss des Zellkulturmediums auf die N-Glykosylierung des Influenza-Virus HA zu ermitteln, wurden die M- und V-Varianten des Influenza-A-Virus H1N1-RKI bzw. H1N1-NIBSC nach Replikation der Zellen in serumhaltigem (GMEM) und serumfreiem (Episerf) Medium analysiert. Zusätzlich wurde der HA N-Glykanfingerprint der H-Variante des H1N1-RKI nach Replikation der Zellen in zwei verschiedenen serumhaltigen Medien (MEM und RPMI) verglichen. Generell muss berücksichtigt werden, dass auch bei Verwendung von serumhaltigem Zellkulturmedium für die Zellkulturphase ein Austausch zu serumfreiem Medium (GMEM ohne FCS) vor Infektion der Zellen vorgenommen wurde.

Für die HA N-Glykanfingerprints der M- und V-Variante des H1N1-RKI bzw. H1N1-NIBSC wurden einige Unterschiede hinsichtlich der Verteilung der Peaks (Intensität) in Abhängigkeit vom Zellkulturmedium beobachtet (Abb. 4-31 A und B und 4-32). In beiden Fällen wiesen Peaks mit einer norm. $t_{\text{mig}} > 250$ bp eine geringere Intensität auf, wenn Episerf als Zellkulturmedium verwendet wurde. Dieses vermehrte Auftreten von kleineren N-Glykanstrukturen und der gleichzeitig reduzierten Intensität der übrigen Peaks wurde besonders für die M-Variante des H1N1-RKI beobachtet. Hier waren Peaks mit einer norm. $t_{\text{mig}} > 350$ bp mit signifikant geringer Intensität vertreten. Anhand der Ergebnisse aus der durchgeführten Strukturaufklärung (Abschnitt 4.7.4; Tabelle 4-7) wurden demnach in serumfreiem Medium weniger N-Glykane mit terminaler Galaktose (M-Variante: α - und β -Galaktose; V-Variante: β -Galaktose) detektiert.

Im Vergleich dazu werden für die Produktion rekombinanter Glykoproteine und Antikörper der An- bzw. Abwesenheit von Serum im Medium in der Literatur sehr unterschiedliche Effekte in Abhängigkeit von Zelle und Produkt zugeschrieben. Während die Expression von monoklonalem IgG in Maushybridomas in serumfreiem Medium einen höheren Anteil von terminaler Sialinsäure und Galaktose bewirkt als in serumhaltigem [154], wurde für CHO-Zellen eine bessere Galaktosylierung mit Serum erzielt [263]. Im Gegensatz dazu wurde von Moellering *et al.* kein Einfluss von serumfreiem bzw. serumhaltigen Medium auf die Glykosylierung von IgG beobachtet [264]. Bei der Adaption von BHK-21-Zellen zur Produktion eines rekombinanten IL-2-Mutanten von serumhaltigen zu serumfreien Medium traten substantielle Veränderungen in der Glykosylierung, hinsichtlich der Komplexität der Ketten und eines generellen Anstiegs des Glykosylierungslevels, auf [53]. Dabei war ohne Serum der Anteil terminaler Sialierung und α 1-6-Fukose an der Kernstruktur höher. Auch Patel *et al.* beschrieben erheblichen Einfluss auf die Komplexität der Glykosylierung von IgG [154]. Im Fall der N-Glykosylierung des Influenza-Virus HA kann der Einfluss von Serum im

Zellkulturmedium auf die Sialierung nicht bewertet werden, da aufgrund der NA Aktivität keine terminale Sialinsäure an den HA N-Glykanen existiert.

Die Verwendung zweier verschiedener serumhaltiger Medien bewirkte im Falle der H-Variante des H1N1-RKI vernachlässigbare Veränderungen in der HA N-Glykosylierung. Es wurden nur geringfügige Unterschiede in den Intensitäten der Peaks mit einer norm. $t_{mig} < 200$ bp beobachtet (Abb. 4-33 A). Diese wiesen nach Verwendung von MEM etwas höhere Intensitäten (weniger als 2,5 % der Gesamtpeakhöhe, Abbildung 4-33 B) auf.

Zelldichte

In DasGip-Bioreaktoren wurden MDCK-Zellen in Hochzelldichte kultiviert (Perfusion 1: $6,3 \cdot 10^6$ Zellen/mL; Perfusion 2: $9,2 \cdot 10^6$ Zellen/mL) und anschließend mit Influenza-A-Virus H1N1-NIBSC infiziert. Für die daraus resultierenden M-Varianten wurden die HA N-Glykanfingerprints generiert und mit dem entsprechenden Fingerprint aus einer Kultivierung im 5 L-Bioreaktor (Zelldichte $1,9 \cdot 10^6$ Zellen/mL) verglichen. Bei der Probenvorbereitung aus der Perfusionskultur ergaben sich aufgrund der deutlich höheren Zelldichte nach den ersten drei Zentrifugationsschritten jeweils wesentlich größere Pellets als nach Kultivierung in Zellkulturflaschen oder im 5 L-Bioreaktor. Anhand der ermittelten Gesamtvirusmengen (F117: 2,28 HA log Einheiten/100 μ L, Perfusion 1: 3,25 HA log Einheiten/100 μ L; Perfusion 2: 2,89 HA log Einheiten/100 μ L) wurden für die Perfusionskulturen im Vergleich zur F117 wesentlich größere Viruspellets erwartet. Allerdings resultierten aus der Ultrazentrifugation trotz höherer Virustiter im Vergleich zur F117 kleinere, aber beim Dekantieren stabile Viruspellets. Als Ursache könnte hier eine eventuelle Co-Pelletierung des Virus mit Zellen und Zellbruchstücken in den ersten drei Zentrifugationsschritten durch Assoziation der Viruspartikel mit den Zellen angeführt werden. Diese trat wahrscheinlich bei jeder Probenvorbereitung auf, wurde aber vielleicht durch die höheren Zelldichten hier verstärkt.

Es wurden für die Perfusionskulturen 1 und 2 (Hochzelldichte) vergleichbare HA N-Glykanfingerprints der M-Variante des H1N1-NIBSC beobachtet (Abb. 4-34 A). Das bereits zuvor in den Abschnitten 4.7.7 beschriebene Glykosylierungsmuster der M-Variante des H1N1-NIBSC war deutlich erkennbar. Die Hauptpeaks (norm. $t_{mig} > 300$ bp) konnten eindeutig zugeordnet werden, wiesen jedoch im Vergleich zu der aus dem 5 L-Bioreaktor resultierenden Probe Unterschiede in den Intensitäten auf. Zusätzlich traten für die Proben aus den Perfusionskulturen einige deutliche Peaks mit einer norm. $t_{mig} < 250$ bp auf. Im Vergleich zu dem entsprechenden HA N-Glykanfingerprint der F117 (5 L-Bioreaktor, keine Hochzelldichte) konnten deutliche Unterschiede in der Verteilung der Peaks (Intensität)

beobachtet werden (Abb. 4-34 B). Es traten in beiden Fällen (Perfusion und 5 L-Bioreaktor) vermehrt (vgl. zu statischer Kultivierung, Abbildung 4-27) Peaks mit einer norm. $t_{\text{mig}} < 250$ bp auf. Bei den einzelnen norm. t_{mig} zeigten diese allerdings unterschiedliche Intensitäten (Vergleich Perfusion und 5 L-Bioreaktor). Bei den betrachteten Perfusionskulturen im DasGip-System handelte es sich wie bei dem betrachteten 5 L-Bioreaktor um ein dynamisches Kultivierungssystem. Wie bereits für die dynamische Kultur des 5 L-Bioreaktors diskutiert (Abschnitt 5.6.1, Zellkultursystem) traten auch im DasGip-System die angesprochenen Scherkräfte auf. Damit ergab sich auch hier die verstärkte Freisetzung von Glykosidasen aus der Wirtszelle. Die Degradierung der HA N-Glykane durch Wirtszellglykosidasen war somit möglich. Bedingt durch die höheren Zellzahlen der Perfusionskulturen traten die degradierenden Enzyme wahrscheinlich in deutlich höheren Konzentrationen im Zellkulturmedium auf (im Vergleich zur Kultivierung im 5 L-Bioreaktor), was ein unterschiedliches Maß an Degradierungen in der Perfusionskultur bewirkt haben könnte.

Durch den Austausch des Zellkulturmediums in den Perfusionskulturen sollte die kontinuierliche Abreicherung der Nährstoffe und gleichzeitige Akkumulierung von Stoffwechselprodukten verhindert werden. Für beide Phänomene ist aus der Literatur bekannt, dass sie den Grad der Glykosylierung beeinflussen. Es kommt zu Limitierungen im Glykosylierungsprozess und der Umfang der Glykosylierung nimmt (beispielsweise in einer Batchkultivierung) über die Zeit ab [54, 265-267]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass neben der generellen Abnahme des Anteils der Glykosylierung mit einer Abnahme von Glukose im Medium [27] das Abfallen der Nährstoffkonzentrationen unter die kritische Konzentration (für CHO-Zellen 0,7 mM Glukose und 0,1 mM Glutamin) zu einer Reduktion der Sialierung und Zunahme des Anteils an Hybrid- und mannosereichen Strukturen führt.

Eine erhöhte Konzentration von Ammonium im Medium bewirkte bei der Produktion eines rekombinanten Tumornekrosefaktors in CHO-Zellen die Abnahme terminaler Galaktose und Sialinsäure. Der Effekt des Ammoniums war dabei jedoch nicht degradativ, sondern beeinflusste die Biosynthese [268]. Auch Donaldson *et al.* [269] konnten zeigen, dass erhöhte Ammoniumkonzentrationen das Oligosaccharidprofil von Glykoproteinen beeinflussen.

Der pH-Wert des Zellkulturmediums nimmt ebenfalls wesentlichen Einfluss auf die Glykosylierung. Durch ihn kann die Aktivität der an der Glykosylierung beteiligten Enzyme bestimmt und damit die Verteilung der Glykoformen beeinträchtigt sein [270].

Der bereits angesprochene Medien austausch bei den Perfusionskulturen sollte diesen Effekten entgegenwirken. Dennoch kann gerade durch die hohen Zelldichten eine Erschöpfung des

Mediums bei den betrachteten Kultivierungen nicht ausgeschlossen werden. So könnte z. B. auch die Akkumulierung von Ammonium im Medium die vermehrte Anwesenheit von Glykanstrukturen mit geringeren norm. t_{mig} (weniger komplex) und damit ohne terminale Galaktose erklären.

Sauerstoffgehalt

Um den Einfluss des Sauerstoffgehaltes auf die HA N-Glykosylierung zu untersuchen, wurden Perfusionskulturen mit unterschiedlichem Sauerstoff-Partialdruck (Perfusion 1 und 3: $pO_2 > 150\%$ - Sauerstoffsonde kalibriert gegen Luft; Perfusion 2: $pO_2 = 40\%$) betrachtet. Zunächst wurde der HA N-Glykanfingerprint der M-Variante des H1N1-NIBSC aus Proben der Perfusionskulturen 1 und 3 (erhöhter pO_2) verglichen (Abb. 4-35 A). Für Perfusion 1 wurden dabei mehr Peaks mit norm. $t_{\text{mig}} < 250$ bp detektiert als für die Proben aus Perfusionskultur 3. Die Hauptpeaks (norm. $t_{\text{mig}} > 300$ bp) wiesen eine identische PA und keine signifikanten Unterschiede in den Peakintensitäten auf. Die beiden Fingerprints wurden als vergleichbar betrachtet. Die wiederholte Produktion von der M-Variante des Influenza-A-Virus H1N1-NIBSC bei einem $pO_2 > 150\%$ resultierte in einem reproduzierbaren HA N-Glykosylierungsmuster.

Anschließend wurde die Perfusionskultur 2 ($pO_2 = 40\%$) und 3 ($pO_2 > 150\%$) hinsichtlich der HA N-Glykosylierung verglichen (Abb. 4-35 B). Dabei wurden deutliche Unterschiede in der Peakverteilung (hinsichtlich der Intensitäten) beobachtet. Bei einem direkten Vergleich der einzelnen Peaks zwischen 320 bp und 410 bp wiesen nahezu alle (bei identischer PA) unterschiedliche Intensitäten (Peaks aus der Probe der Perfusionskultur 3 tendenziell höher) auf. Demnach verursachte die Erhöhung des Sauerstoff-Partialdruckes auf $> 150\%$ eine Veränderung in der HA N-Glykosylierung der M-Variante des H1N1-NIBSC. Es wurden vermehrt komplexere Strukturen mit terminaler Galaktose (bi-, tri- und tetraantennär) beobachtet.

Vergleicht man diese Beobachtungen mit Ergebnissen aus der Literatur für rekombinante Glykoproteine und Antikörper, wurde ein ähnlicher Effekt auf die Glykosylierung des IgG beschrieben. Mit Abnahme des Sauerstoffgehaltes nahm auch der Anteil an terminaler Galaktose, durch eine Veränderung in der Aktivität des Transferaseenzym, ab [271]. Ebenfalls beeinflusste ein verminderter Sauerstoffgehalt das Glykanprofil von SEAP [269]. Die Limitierung von Sauerstoff zusammen mit anderen Nährstoffen wie Glukose und Aminosäuren führte bei der Produktion eines IL-2-Mutanten in BHK-21-Zellen in Perfusion zu einer Veränderung der Makroheterogenität der Glykane bei nahezu unveränderter

Mikroheterogenität [145]. Ein minimaler Effekt resultierte aus einer milden Hypoxie bei der Produktion von gewebespezifischem Plasminogenaktivator (tPA) in rekombinanten CHO-Zellen [152], beeinflusste jedoch das Level der Sialierung von rekombinantem folikelstimulierendem Hormon (FSH) [151]. Wie bereits in Abschnitt 5.4 diskutiert, treten bei Influenza aufgrund der NA-Aktivität keine sialierten HA N-Glykane auf. Daher kann der Effekt eines erhöhten Sauerstoffgehaltes im Zellkulturmedium auf die Sialierung nicht beurteilt werden.

5.6.2 Einfluss von Erntezeitpunkt und Inaktivierung

Erntezeitpunkt

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte Methode zur N-Glykananalytik wurde angewandt, um das HA N-Glykosylierungsmuster an mehreren aufeinander folgenden Zeitpunkten während der Virusreplikation zu charakterisieren. Insbesondere Unterschiede zwischen HA N-Glykanfingerprints von frühen und späten Zeitpunkten der Virusreplikation wurden ebenso erwartet, wie Unterschiede aufgrund unspezifischer Degradation der Glykane über den Verlauf der Kultivierung. Aufgrund der Tatsache, dass alle Viren bei der Proteinsynthese die Glykosylierungsmaschinerie der Wirtszelle nutzen [18], könnte die Anwesenheit kleiner Oligosaccharide im HA N-Glykanpool auch den Zusammenbruch der N-Glykanbiosynthese der infizierten und gestressten Zelle gegen Ende der Virusproduktion reflektieren.

In diesem Zusammenhang beschrieben Gramer und Goochee [261, 262, 272] die Degradierung von Glykanen durch die Anwesenheit verschiedener Glykosidasen in den Überständen mehrerer Zelllinien. Speziell für Batch-Kulturen wurde die Abnahme des Ausmaßes der Glykosylierung über die Zeit beobachtet [265]. Die kontinuierliche Abreicherung der Nährstoffe und die Akkumulierung von Stoffwechselprodukten führte zu Limitierungen im Glykosylierungsprozess [54, 266, 267]. Beispielsweise bewirkte eine verringerte Glukosekonzentration die Abnahme des Glykosylierungslevels [27]. Für Konzentrationen der Nährstoffe unterhalb eines kritischen Levels (für CHO-Zellen: 0,7 mM Glukose, 0,1 mM Glutamin) wurden ein geringer Sialierungsgrad und vermehrt Hybrid- und mannosereiche Strukturen beobachtet [273]. Im Gegensatz dazu beschrieben Donaldson *et al.* [269] einen erhöhten Anteil einer α -Mannosidase-resistenten Struktur an SEAP zu späteren Erntezeitpunkten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zur Bewertung des Einflusses des Erntezeit-

punktes auf die N-Glykosylierung des Influenza-Virus HA ausschließlich Batch-Kulturen (in T175-Zellkulturflaschen und einem 5 L-Bioreaktor) betrachtet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abschnitt 4.8.5 beschrieben. Jeweils ein Teil der Kultur wurde 48 hpi bei 4°C gelagert. Im Zellkulturüberstand vorhandene Glykosidasen sollten durch die niedrigeren Temperaturen inhibiert werden. Es wurden Unterschiede in den Verläufen der Zeitreihen der Proben bei 4°C und 37°C erwartet.

Zuerst wurden Proben aus zwei Zeitreihen in T175-Zellkulturflaschen (ZR 1 und 2) analysiert. Dabei ergab sich in allen auswertbaren Proben der ZR 1 und 2 der in Abschnitt 4.7.2 beschriebene HA N-Glykanfingerprint der M-Variante des Influenza-A-Virus H3N2 mit den in Abschnitt 4.7.5 identifizierten Strukturen (Abb. 4-37). Beide Zeitreihen waren hinsichtlich der HA N-Glykanfingerprints vergleichbar und wiesen bis zum jeweiligen Ende der Probenahme 192 hpi ein stabiles Glykosylierungsmuster auf. Die maximalen Signalintensitäten (Peak bei 267 bp) wurden in beiden Zeitreihen 30 hpi aufgezeichnet. Mit zunehmender Zeit nach der Infektion konnte nur eine leichte Abnahme der Signalintensitäten der einzelnen Peaks beobachtet werden. Bei späteren Erntezeitpunkten wurden nur in geringem Maße kleinere N-Glykane nachgewiesen, die auf Degradationen hindeuten würden. Diese Beobachtungen korrelierten mit dem Verlauf der Gesamtglykanmenge (Summe der Höhen aller Peaks mit einer RFU ≥ 15) über die Zeit. Für ZR 1 und 2 stieg diese bis 30 hpi an, nahm anschließend bis 96 hpi ab und blieb dann konstant bis zum Ende der PN bei jeweils 192 hpi (Abb. 4-39 A). Gleichzeitig ergab sich 30 hpi (ZR1) bzw. 48 hpi (ZR2) ein Maximum des Anteils an HA N-Glykanen mit einer norm. $t_{\text{mig}} \geq 172$ bp und danach nur eine leichte Zunahme von N-Glykanen mit einer norm. $t_{\text{mig}} < 172$ bp (Abb. 4-39 B).

Proben des Zellkulturüberstandes bei 4°C zeigten eine bis zu 100 RFU höhere maximale Signalintensität (Peak bei 267 bp), aber es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zeitreihen bei 4°C und 37°C hinsichtlich der Verläufe der HA N-Glykanfingerprints und Gesamtglykanmengen.

Es konnte keine Abhängigkeit des HA N-Glykosylierungsmusters vom Erntezeitpunkt aus T175-Zellkulturflaschen festgestellt werden. Die maximalen Peakintensitäten (in RFU, Peak bei 267 bp) bzw. Gesamtglykanmengen wurden in beiden Versuchen (ZR 1 und 2) bei 30 hpi bestimmt, woraus sich für die HA N-Glykananalytik hier der optimale Erntezeitpunkt (unter den gegebenen Zellkultur und Infektionsbedingungen) ergab.

Die erwarteten deutlichen Veränderungen im Verlauf des HA N-Glykanfingerprints über die Zeit konnten nicht beobachtet werden. Im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Degradationen und Veränderungen in Ausmaß und Zusammensetzung der N-Glykane

verschiedener rekombinanter Glykoproteine wurde in T175-Zellkulturflaschen ein bis zu 192 hpi stabiles N-Glykosylierungsmuster des Influenza-A-Virus HA (M-Variante des H3N2) erhalten. Möglicherweise wurden hier im Verlauf der Kultivierung in der statischen Zellkulturflasche nur wenig Glykosidasen oder solche von geringer Aktivität freigesetzt, was nur einen geringen Anteil an degradierten Strukturen bedingte. Die generelle Abnahme der Signalintensität über den Verlauf der Zeitreihe lässt gegebenenfalls auf die in der Literatur beschriebene Abnahme des Glykosylierungslevels bzw. des Ausmaßes der Glykosylierung schließen. Das Glykosylierungsmuster des HA der M-Variante des H3N2 setzt sich hauptsächlich aus mannosereichen Strukturen zusammen (Tabelle 4-7). Eine Zunahme des Anteils dieser Strukturen oder Glykanen vom Hybridtyp konnte nicht beobachtet werden. Dies lässt gegebenenfalls den Schluss zu, dass die zur Degradierung der mannosereichen N-Glykane erforderliche α -Mannosidase in zu geringem Maße bzw. mit zu geringer Aktivität oder gar nicht im Zellkulturüberstand präsent war. Eine Veränderung des Sialierungslevels lässt sich auch hier aufgrund der generellen Abwesenheit von terminaler Sialinsäure nicht beurteilen.

Die Infektion der in T175-Zellkulturflaschen parallel kultivierten MDCK-Zellen konnte in der Praxis nicht genau zeitgleich durchgeführt werden. Daraus resultierten nach nicht komplett identischen einzelnen Kultivierungen auch leicht unterschiedliche Infektionsverläufe in den einzelnen Zellkulturflaschen. Aus diesem Grund wurde ein zusätzlicher Zeitreihenversuch in einem 5 L-Bioreaktor durchgeführt (Abschnitt 4.8.5). Dadurch konnten Inhomogenitäten (durch verschiedene Einzelkulturen) im Ursprung der jeweiligen Proben ausgeschlossen werden. Aufgrund der geringeren MOI zeigte sich ein im Vergleich zu den T175-Zellkulturflaschen verzögerter Infektionsverlauf (Abb. 4-36). Für die HA N-Glykanfingerprints ergab sich ein verändertes, aber bis 192 hpi stabiles Bild, verglichen mit dem in Abschnitt 4.7.2 (Abb. 4-13) und ZR 1 und 2 (Abb. 4-37) beschriebenen Glykosylierungsmuster der M-Variante des H3N2. Die veränderte Verteilung der Peaks bei identischer PA über einen weiten norm. t_{mig} Bereich, bedingt durch das dynamische Kultivierungssystem wurde in Abschnitt 4.8.1 betrachtet und in Abschnitt 5.6.1 diskutiert. Die maximale Peakintensität (Peak bei 267 bp) wurde in der Probe 96 hpi detektiert, wobei sich bei 4°C und 37°C ähnliche Verläufe zeigten. Tendenziell ergaben sich wie schon für die ZR 1 und 2 für die bei 4°C gezogenen Proben höhere maximale Peakintensitäten und damit ein leicht höheres Glykosylierungslevel. Dies lässt darauf schließen, dass möglicherweise durch die niedrigere Temperatur die im Zellkulturüberstand aktiven Glykosidasen inhibiert wurden

und damit weniger Degradationen stattfanden. Ebenfalls ist es denkbar, dass durch die Überführung eines Teiles der Kultur von 37°C hin zu 4°C 48 hpi der weitere Infektionsverlauf verlangsamt und die Glykosylierungsmaschinerie der MDCK-Zellen weniger beeinträchtigt wurde. In allen drei beprobten Zeitreihen (ZR 1, 2 und 5 L) waren jedoch die Verläufe des Virustiters bei 37°C und 4°C vergleichbar (Abb. 4-36 und 4-41). Durch den relativ hohen methodischen Fehler (Wiederholpräzision $< \pm 20\%$) bei der Virustiterbestimmung (Abschnitt 3.3.1) waren allerdings geringe Unterschiede (z. B. durch die geringere Temperatur 4°C) nicht nachweisbar.

Generell zeigte sich auch für die Zeitreihe im 5 L-Bioreaktor mit allgemein abnehmender Peakintensität über die Zeit nur eine leichte Zunahme von Peaks mit einer norm. $t_{\text{mig}} < 172$ bp, was auch hier auf ein geringes Maß an Degradationen durch Glykosidasen im Medium schließen lässt. Um genaueren Aufschluss über Degradationen der N-Glykane durch Glykosidasen zu erhalten, müssten deren Aktivitäten bestimmt werden.

Für die 5 L Zeitreihe zeigte sich im Vergleich zu ZR 1 und 2 (Abb. 4-39 A) ein weniger deutlicher Anstieg der Gesamtglykanmenge bis 96 hpi und ein allgemein weniger klarer Verlauf (im Vergleich zu ZR 1 und 2) (Abb. 4-44 A). Dies kann wahrscheinlich durch eine Verdünnung der Proben durch Kondenswasser bei der Probenahme aus dem 5 L-Bioreaktor begründet werden, die in den T175-Zellkulturflaschen oder der Spinnerflasche nicht auftrat.

Das Maximum der Glykane mit einer norm. $t_{\text{mig}} \geq 172$ bp lag für die ZR 5 L bei 42 hpi (Abb. 4-44 B) und damit im Bereich der ZR 1 und 2 (Abb. 4-39 B). Allerdings korrelierte das Maximum für die ZR 5 L nicht mit dem Maximum der Gesamtglykanmenge bei 96 hpi (Abb. 4-44 A). Um einen möglicherweise existierenden Zusammenhang zwischen der maximalen Gesamtglykanmenge und dem Maximum an großen Glykanen (norm. $t_{\text{mig}} \geq 172$ bp) aufklären zu können, wäre die Analyse weiterer Zeitreihen erforderlich.

Eine mögliche Korrelation zwischen Glykanmenge und Virustiter bzw. Virusmenge konnte auch für die ZR 5 L nicht beobachtet werden (Abb. 4-45 A und B). Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Gesamtglykanmenge und der Infektiosität (TCID_{50}) zeigte sich nicht (Abb. 4-46). Allerdings wurde der TCID_{50} nach einem Anstieg bei 42 hpi auf $3,2 \cdot 10^8$ Viren/mL bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt war auch der Anteil an „großen“ HA N-Glykanen (norm. $t_{\text{mig}} \geq 172$ bp) maximal. Aus der Literatur sind in diesem Zusammenhang keine Daten oder Beobachtungen bekannt. Um anhand der Gesamtglykanmenge bzw. ihrer Größenverteilung auf die Infektiosität Rückschlüsse ziehen zu können, wäre die Betrachtung weitere Kultivierungen und Zeitreihen in Zellkulturflaschen oder im 5 L-Bioreaktor erforderlich.

Inaktivierung mit β -Propiolacton

Als hoch reaktive chemische Verbindung ist β -PL dafür bekannt, inaktivierend auf Bakterien, Pilze und Viren zu wirken [274-278]. Es wurde gezeigt, dass das alkylierende Reagenz β -PL sowohl mit Proteinen als auch mit RNA und DNA reagiert [279]. Dabei öffnet sich der stark gespannte Ring z. B. in Reaktionen mit Aminen [280], Thiolgruppen [281-283], Sulphiden [283, 284], alkoholischen und phenolischen Hydroxylgruppen [285] und Carboxylgruppen [286]. Durch die Verbindung mit Aminosäuren kommt es zur Denaturierung von Proteinen [287].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von β -PL auf die Glykosylierung des Influenza-A-Virus HA bei der Virusinaktivierung analysiert. Die Ergebnisse sind in Abschnitt 4.8.6 beschrieben. Demnach hatte die Inaktivierung des Virus mit β -PL keinen Einfluss auf das N-Glykosylierungsmuster des HA (Abb. 4-47).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Faktoren wie z. B. Wirtszelle, Kultivierungssystem und Erntezeitpunkt auf das N-Glykosylierungsmuster des Influenza-Virus HA betrachtet. In Hinblick auf verschiedene zellkulturbasierte Strategien zur Impfstoffproduktion sollte gerade der Einfluss der Wirtszelle auf die Eigenschaften des Produktes, hier gezeigt für die N-Glykosylierung des Influenza-Virus HA (Abschnitt 4.7.1 und 4.7.2) nicht vernachlässigt werden. Speziell die Auswirkungen einer veränderten HA N-Glykosylierung auf die Effizienz des Vakzins und dessen immunogene bzw. antigene Wirkung sollte detaillierter untersucht werden. Die neue Generation der zellkulturbasierten Impfstoffe muss mit den klassischen Impfstoffen aus bebrüteten Hühnereiern verglichen werden, welche bereits 1943 als ein wertvolles Substrat zur Produktion von Influenza-Impfstoff beschrieben wurden [34]. Bisher wurden nahezu ausschließlich Veränderungen in der HA N-Glykosylierung von Viren produziert in MDCK-Zellen untersucht [47, 59, 253, 288-290]. Nur wenige Studien beschrieben Ergebnisse aus anderen Wirtzelllinien wie beispielsweise Vero-Zellen [68]. Häufig traten Veränderungen in der Aminosäuresequenz des viralen HA auf (oft nur in Form einer einzigen Aminosäuresubstitution in der Kopfreion des HA). Daraus resultiert der Verlust einer spezifischen Glykosylierungsstelle nahe der RBS, z. B. bei der Adaption von klinischen Influenza-A- und -B-Isolaten an Hühnereier. Diese bleibt allerdings bei der direkten Adaption an MDCK-Zellen unverändert [59, 155, 252-254, 288, 290]. Es wurde gezeigt, dass gerade diese Glykosylierungsstelle nahe der RBS die Rezeptorspezifität und -affinität beeinflusst [16, 69] und in Verbindung mit den antigenen

Eigenschaften des Virus steht [32]. Dabei wurde auch ein negativer Effekt auf die Antigenität des Impfstoffes durch Ei-Adaption-bedingte Aminosäuresubstitutionen beschrieben [59]. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass inaktivierte, in Eiern produzierte H1N1 und H3N2 Viren weniger Kreuzreaktionen aufwiesen als dieselben, in MDCK-Zellen produzierten Stämme [289]. Die Autoren brachten dies in Zusammenhang mit der Tatsache, dass die Kopfreion des HA in MDCK-Zellen in einem größeren Ausmaß glykosyliert ist verglichen mit den eibasierten Äquivalenten.

Des Weiteren untersuchten Wood *et al.* [291] die Immunantwort inaktivierter ei- und MDCK-zellbasierter H1N1 Impfstoffe in Frettchen, Meerschweinchen und Hamstern. Sie zeigten, dass der eibasierte Impfstoff ausschließlich stammspezifisch war, während der MDCK-zellbasierte Impfstoff eine breitere Reaktivität aufwies und einen höheren Schutz induzierte. Newman *et al.* [292] behaupteten, dass epidemische Stämme antigenetisch enger mit Zellkulturisolaten verwandt sind. Sie zeigten auch, dass Viren, die nur in einer Aminosäure an kritischen Punkten in der HA-Struktur variieren, eine signifikant unterschiedliche Immunantwort als inaktivierte Vakzine induzieren können. Durch diese Beobachtungen wurden Ergebnisse von Robertson *et al.* und Oxford *et al.* [59, 293] unterstützt. Sie beschrieben 1987, dass Eier für die Impfstoffproduktion aufgrund der beobachteten Unterschiede in den antigenen Eigenschaften eibasierter Viren im Vergleich zu den entsprechenden klinischen Isolaten weniger geeignet sind. MDCK-zellbasierte Viren hingegen verhielten sich hinsichtlich der Antigenität ähnlich den Isolaten und induzierten höhere Titer nach der Infektion in humanem Serum [59, 293].

Weiterhin zeigten Romanova *et al.* [68], dass verozellbasierte H3N2 Viren in Affen eine höhere Immunogenität hervorriefen als entsprechende eibasierte Viren.

All diese diskutierten Ergebnisse weisen stark darauf hin, dass die Zellkultur sich als vorteilhaft für die Influenza-Impfstoffproduktion erweist, da die so produzierten Viren eine höhere Übereinstimmung mit den in Menschen zirkulierenden Wildtypen zeigen. Das bedeutet, dass zellkulturbasierte Viren, die antigenetisch strukturell humanen-Influenza-Viren ähnlich sind, wahrscheinlich effektiver als Impfstoffe sind als einige in Eiern produzierte (und dabei selektierte) Varianten. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die multiple Passagierung eines H1N1-Stammes in Mäusen zur Selektion einer bestimmten Variante führte [294]. Ebenfalls verursachte auch die Isolation und Vermehrung humaner Influenza-Viren in Hühnereiern oder BAK-21-Zellen die Selektion von Varianten, die sich vom Original-Virus unterschieden (AA-Substitutionen nahe der RBS) [253, 288].

Einige Studien zeigten, dass Veränderungen in der Immunantwort, bedingt durch

Glykosylierungsunterschiede, keinen nachweisbaren Einfluss auf die Effizienz des Impfstoffs haben [295, 296]. Es existieren jedoch nur wenige Informationen, ob und in welchem Ausmaß die Unterschiede in der HA N-Glykosylierung die biologischen Eigenschaften wie Wachstum, Antigenität und Immunogenität der Viren beeinflussen. Dass die Antigenität und Immunogenität durch eine veränderte Glykosylierung ebenso wie die Rezeptorbindungseigenschaften des Virus beeinflusst werden, konnte allerdings belegt werden [68]. Da gezeigt wurde, dass neben dem Wirtszellsystem weitere Zellkulturparameter die Glykosylierung des Hautoberflächenantigens (HA) beeinträchtigen können, ist es erforderlich, auch ihren Einfluss auf die Antigenität bzw. Immunogenität der Impfstoffe zu berücksichtigen und zu bestimmen. Generell muss der Einfluss der HA N-Glykosylierung auf die Effizienz des Impfstoffs näher untersucht werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit stand die Etablierung einer robusten und reproduzierbaren analytischen Methode zur Untersuchung der N-Glykosylierung von zellkulturbasiertem Influenza-Virus HA im Vordergrund. Dazu wurden zunächst die Parameter einer stufenweisen g -Gradienten-Zentrifugation ermittelt, um die Viruspartikel aus komplexem Zellkulturüberstand zu isolieren. Die Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE verfolgt (Abschnitt 4.2). Die Identifizierung der Virusproteine erfolgte mittels LC-MS/MS (Abschnitt 4.2). Vor einem geringen Hintergrund konnten den Banden eindeutig die Virusproteine HA (Monomer, Dimer, Trimer), NA (Monomer, Tetramer), NP und M1 zugeordnet werden. Als analytische Methode zur Trennung und Detektion der N-Glykane wurde die CGE-LIF gewählt. Die Nachweisgrenze wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes APTS auf 5 fmol/L bestimmt. Es ergab sich ein linearer Bereich von 2 pmol/L bis 2 nmol/L (Abschnitt 4.3). Zur Etablierung der N-Glykananalytik (Probenvorbereitung, Trennung und Detektion) und für die Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der CGE-LIF wurde bovines Serum IgG verwendet. In Übereinstimmung mit der Literatur wurden vier dominierende N-Glykanstrukturen mit im Vergleich zu den von Raju *et al.* [226] publizierten Daten höherer Auflösung nachgewiesen. Für die norm. t_{mig} und relativen Peakhöhen ergab sich eine hohe Kurz- und Langzeitreproduzierbarkeit (Abschnitt 4.4).

Anschließend wurde die etablierte Methode zur Analyse der N-Glykosylierung von zellkulturbasiertem Influenza-Virus HA angewandt. Dabei wurde zuerst die Reproduzierbarkeit der Probenvorbereitung (Abschnitt 4.5) und des USP (Abschnitt 4.6) für die humanen-Influenza-A-Stämme H1N1-RKI und H3N2 repliziert in MDCK-Zellen betrachtet. Für beide Stämme konnte über den gesamten Workflow bezüglich PA, norm. t_{mig} , sowie Höhen und Flächen der betrachteten Peaks eine hervorragende Reproduzierbarkeit gezeigt werden. Anhand der Ergebnisse zur Charakterisierung der Batch-to-Batch Reproduzierbarkeit wurde auf die Reproduzierbarkeit des USP (hinsichtlich der HA N-Glykosylierung) geschlossen. Es ergaben sich in den einzelnen Batches vergleichbare HA N-Glykanfingerprints mit relativ geringen mittleren SD der Peakflächen, -höhen und norm. t_{mig} . Diese Ergebnisse bildeten Grundlage für die Anwendung der Methode zur Untersuchung der Stammspezifität und Wirtszellabhängigkeit der Influenza-Virus HA N-Glykosylierung (in: MDCK-, Vero-, AGE1.CR-, A549-, HepG2- und RCAr-Zellen). Es wurden sowohl deutliche Unterschiede in der HA N-Glykosylierung des Influenza-A-Virus H1N1-RKI und H3N2 in Abhängigkeit der Wirtszelllinie (Abschnitte 4.7.1 und 4.7.2) als auch zwischen den Subtypen A und B

(Abschnitt 4.7.3) beobachtet. Die anschließende Strukturaufklärung ergab eindeutige wirtszellvermittelte strukturelle Unterschiede in der HA N-Glykosylierung des human Influenza-A-Virus H1N1-RKI und H3N2 (Abschnitte 4.7.4 und 4.7.5). Ausschließlich für die M-Varianten beider Stämme konnte terminale α -Galaktose nachgewiesen werden. Im Allgemeinen dominierten für alle Varianten des H1N1-RKI komplexe N-Glykane die Elektropherogramme, während für alle Varianten des H3N2 hauptsächlich mannosereiche Strukturen beobachtet wurden. Für keine der betrachteten Varianten wurde, aufgrund der NA Aktivität, terminale Sialinsäure an den HA N-Glykanen nachgewiesen.

Im Weiteren wurde der Verlauf der HA N-Glykosylierung bei der Adaption von human Influenza-A-Virus H1N1-NIBSC und H3N2 an eine Vero- und RCAR-Zelllinie aufgezeichnet (Abschnitt 4.7.7). Hier zeigten sich neben einer erhöhten Virusausbeute auch veränderte HA N-Glykanfingerprints über vier Passagen. Die „Rückwärtsadaption“ von Influenza-A-Virus H1N1-NIBSC von Vero- an die MDCK-Zelle resultierte in dem ursprünglichen HA N-Glykosylierungsmuster.

Die Betrachtungen zu der Abhängigkeit der HA N-Glykosylierung von verschiedenen Faktoren wie dem Zellkultursystem, dem Zellkulturmedium, der Zelldichte, dem Sauerstoffgehalt, dem Erntezeitpunkt und der Inaktivierung mit β -PL sind in Abschnitt 4.8 beschrieben. Zwischen statischen bzw. halbstatischen und dynamischen Zellkultursystemen wurde eine veränderte Verteilung der einzelnen N-Glykane (hinsichtlich der Peakintensität) bei identischer PA beobachtet. Aufgrund der An- bzw. Abwesenheit von Serum im Zellkulturmedium variierte ebenfalls die Intensität der Peaks in den jeweiligen Elektropherogrammen der M- bzw. V-Varianten des H1N1-RKI bzw. H1N1-NIBSC. Die Verwendung zweier verschiedener serumhaltiger Zellkulturmedien zur Produktion der H-Variante des human-Influenza-A-Virus H1N1-RKI resultierte in relativ geringen und nicht signifikanten Unterschieden im HA N-Glykanfingerprint.

Der Einfluss der Zelldichte auf die HA N-Glykosylierung wurde mit Hilfe von Hochzelldichtekulturen in Perfusion (DasGip-System) im Vergleich zu einer Kultivierung mit „normaler“ Zelldichte im 5 L-Bioreaktor betrachtet (beides dynamische Zellkultursysteme, Abschnitt 4.8.3). Während die HA N-Glykanfingerprints der Perfusionskulturen 1 und 2 vergleichbar waren, zeigten sich im Vergleich zur Probe aus dem 5 L-Bioreaktor deutliche Unterschiede in den Peakintensitäten der Hauptpeaks (norm. $t_{mig} > 300$ bp).

Ein erhöhter Sauerstoffpartialdruck führte zu einer Veränderung im Anteil der einzelnen HA N-Glykane der M-Variante des H1N1-NIBSC (Abschnitt 4.8.4). Dies spiegelte sich im Elektropherogramm vor allem bei Peaks im Migrationszeitenbereich von 320 bp bis 410 bp

wider. Hier wies nahezu jeder Peak im direkten Vergleich eine unterschiedliche Intensität auf. Für die Analyse des Einflusses des Erntezeitpunktes auf die HA N-Glykosylierung wurden die HA N-Glykanfingerprints der M-Variante des Influenza-A-Virus H3N2 über den Verlauf von drei Zeitreihen (zweimal in T175-Zellkulturflaschen, einmal im 5 L-Bioreaktor) von 6 hpi bis 192 hpi aufgezeichnet. In allen Fällen ergab sich ein stabiles HA N-Glykosylierungsmuster bis zum Ende der Probenahme (192 hpi). Nach Auftragung der Gesamtglykanmenge und der Anteile an „großen“ bzw. „kleinen“ N-Glykanen konnte keine Abhängigkeit des N-Glykosylierungsmusters vom Erntezeitpunkt aus T175-Zellkulturflaschen bzw. dem 5 L-Bioreaktor festgestellt werden. Die maximalen Peakintensitäten (in RFU, Peak bei 267 bp) wurden bei 30 hpi (T175-Zellkulturflaschen; MOI = 13) bzw. 96 hpi (5 L-Bioreaktor; MOI = 0,025) bestimmt, woraus sich für die HA N-Glykananalytik der optimale Erntezeitpunkt (unter den gewählten Zellkultur- und Infektionsbedingungen) ergab. Für alle drei Zeitreihen konnte keine Korrelation zwischen dem Verlauf des Virustiters und der Gesamtglykanmenge festgestellt werden. Im Fall der Zeitreihe 5 L wurde zusätzlich der Verlauf des TCID₅₀ aufgezeichnet. Auch hier ergab sich kein Zusammenhang mit dem Verlauf der Gesamtglykanmenge.

Abschließend wurde der Einfluss der Inaktivierung auf die HA N-Glykosylierung analysiert. Die entsprechenden HA N-Glykanfingerprints vor und nach der Inaktivierung wiesen im Vergleich keine direkten Unterschiede auf.

Zusammenfassend bietet die im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierte Methode eine robuste und reproduzierbare Möglichkeit zur HA N-Glykananalytik aus komplexem Zellkulturmedium. Sie ermöglicht zudem die schnelle und einfache Beurteilung des Einflusses verschiedenster Parameter auf die Influenza-Virus HA N-Glykosylierung.

7 AUSBLICK

Die entwickelte Methode zur HA N-Glykananalyse repräsentiert eine aussagekräftige Analytik, um N-Glykanfingerprints während zellkulturbasierter Impfstoffproduktion aufzuzeichnen. Sie bietet die Möglichkeit, den Einfluss von Prozessfehlern oder Modifikationen im Prozessdesign und Scale-up auf die Produktqualität (hinsichtlich der N-Glykosylierung) zu charakterisieren. Geringfügige Veränderungen in der Probenvorbereitung würden es außerdem erlauben, beispielsweise Proben aus dem DSP der Impfstoffproduktion zu analysieren und dabei die Anwendungsvielfalt der Methode signifikant zu erhöhen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war zunächst die Etablierung einer schnellen, empfindlichen und reproduzierbaren Methode zur Analyse des Influenza-Virus HA aus komplexem Zellkulturmedium. Weitere Optimierungen der Methode z. B. bei der SEC hinsichtlich der Säulengeometrie und des Säulenmaterials sowie bei der Identifizierung glykanhaltiger Fraktionen mit dem Laserscanner des Typs Typhoon TRIO Variable Mode Imager hinsichtlich der verwendeten 96-Wellplatten wären denkbar. Im Rahmen dieser Arbeit bot die Verwendung des Laserscanners einen guten Ansatzpunkt zur schnellen und einfachen Identifizierung glykanhaltiger Fraktionen. Zur Optimierung der Methode müsste hier u. a. auch die Empfindlichkeit des Gerätes bewertet werden. Da dieses ursprünglich für 1D- bzw. 2D-Gele konzipiert ist, ergeben sich hier eventuell Defizite hinsichtlich der Tiefe der Wells.

Um spezifischere und quantitative Aussagen über die Zusammensetzung der einzelnen Glykanfingerprints treffen zu können, ist es vor allem erforderlich, einen internen Standard in der CGE-LIF einzuführen. Die Normierung der Peakhöhen und -flächen auf diesen Standard würde den Vergleich von absoluten Peakhöhen und -flächen sowie deren Quantifizierung ermöglichen.

Die Analysen zur Reproduzierbarkeit der Probenvorbereitung und der Batch-to-Batch Reproduzierbarkeit (Ergebnisse beschrieben in den Abschnitten 4.5 und 4.6) könnten in der Weiterführung dieser Arbeit ebenfalls für andere Zelllinien und in Kombination verschiedener Influenzatyphen und -subtypen durchgeführt werden. Speziell die Reproduzierbarkeit des USP (Batch-to-Batch) sollte hinsichtlich des Einflusses unterschiedlicher Vorkulturen bewertet werden (im Rahmen dieser Arbeit nicht berücksichtigt, verglichen wurden T175-Zellkulturflaschen bzw. RF, die mit identischer Vorkultur angesetzt wurden). Beispielsweise könnten drei T175-Zellkulturflaschen bzw. RF mit jeweils unterschiedlicher Vorkultur hinsichtlich ihrer Batch-to-Batch Reproduzierbarkeit untersucht werden. Zusätzlich sollte diese auch in drei parallelen oder nacheinander gefahrenen 5 L-Bioreaktoren oder

Wavereaktoren bewertet werden. Im Gegensatz zu den Betrachtungen in T175-Zellkulturflaschen bzw. RF käme hier zusätzlich der Effekt von unterschiedlichen Vorkulturen hinzu.

Die nach der Etablierung durchgeführten Analysen und in Abschnitten 4.7 und 4.8 präsentierten Ergebnisse hinsichtlich des Einflusses verschiedener Parameter auf die N-Glykosylierung des Influenza-Virus HA repräsentieren lediglich einen geringen Teil möglicher Untersuchungen. Um den Einfluss der Zellkulturbedingungen genauer zu betrachten, könnte zunächst eine große Vorkultur (beispielsweise im 5 L-Bioreaktor) angelegt werden, um für alle Faktoren einheitliche Voraussetzungen zu schaffen. Diese Vorkultur sollte dann auf mehrere kleinere Systeme verteilt und die jeweiligen Einflussfaktoren (Zellkulturmedium, Kultivierungssystem, Sauerstoffgehalt, pH-Wert, Temperatur etc.) untersucht werden.

Hinsichtlich des Zellkulturmediums sollten weitere Medien herangezogen werden. Das Einbeziehen von anderen serumfreien Medien z. B. auch mit geringem Proteingehalt wäre ebenso denkbar wie Variationen in der Zusammensetzung eines Mediums u. a. hinsichtlich des Aminosäure- oder Glukosegehalts.

Die Versuche zum Verlauf der HA N-Glykosylierung bei der Adaption des Influenza-Virus an verschiedene Zelllinien (Ergebnisse beschrieben in Abschnitt 4.7.7) sollten wiederholt, detaillierter betrachtet und auf andere Zelllinien und Influezatypen und -subtypen ausgeweitet werden. Eventuell wäre so eine Aussage über das generelle Verhalten der HA N-Glykosylierung bei der Adaption an ein neues Wirtssystem möglich. Speziell hier wäre auch die Etablierung eines Verfahrens zur Bestimmung der HA N-Glykosylierungsstellen hilfreich, um auch hier mögliche Variationen aufzudecken.

Um eindeutiger Ergebnisse zum Einfluss des Sauerstoffgehaltes auf die HA N-Glykosylierung zu erhalten, sollten auch diese Versuche (Ergebnisse beschrieben in Abschnitt 4.8.4) wiederholt werden. Zusätzlich könnten hier weitere Zellkultursysteme wie der Wavereaktor und andere Zelllinien sowie Influezatypen und -subtypen mit einbezogen werden.

Zur Betrachtung des Einflusses des Erntezeitpunkts auf die HA N-Glykosylierung wurde nur die M-Variante des humanen-Influenza-Virus H3N2 herangezogen (Ergebnisse beschrieben in Abschnitt 4.8.5). Hier sollten Versuche mit weiteren Zelllinien und Viren angestrebt werden, um eindeutiger Schlussfolgerungen ziehen zu können. Auch um einen möglicherweise existierenden Zusammenhang zwischen der maximalen Gesamtglykanmenge

und dem Maximum an großen Glykanen (norm. $t_{\text{mig}} \geq 172$ bp) aufklären zu können, wäre die Analyse weiterer Zeitreihen erforderlich.

Generell sollten bei allen zukünftigen Analysen zum Einfluss der einzelnen Faktoren detailliertere Strukturbetrachtungen der HA N-Glykane durchgeführt werden. Um eine ausreichende Probenmenge der APTS-konjugierten N-Glykane zu gewährleisten sind hierzu ggf. parallele Mehrfachbestimmungen unter den jeweiligen Bedingungen und das anschließende Vereinen der aufgereinigten Proben erforderlich.

Um Aufschluss über mögliche Degradationen der HA N-Glykane im Zellkulturmedium zu erhalten, sollte versucht werden, die möglicherweise im Zellkulturüberstand existierenden freien zelleigenen Glykosidasen nachzuweisen. Dabei kann sich z. B. an die in der Literatur beschriebenen Verfahren von Gramer und Goochee [261, 262, 272] gehalten werden.

Um Veränderungen in der HA N-Glykosylierung zu forcieren, könnten dem verwendeten Zellkulturmedium bestimmte Glykanprecursor oder Glykosylierungsinhibitoren zugesetzt werden.

Die Analyse der Einflüsse der beschriebenen und weiterer Faktoren auf die HA N-Glykosylierung, kann mit der präsentierten Methodik ebenfalls auf die NA des Influenza-Virus übertragen werden. Hierzu wird in der SDS-PAGE anstelle des HA₀ die Bande der NA ausgeschnitten und anschließend prozessiert. Somit ist die Methode auch generell auf alle in einem SDS-PAGE vorliegenden Glykoproteine übertragbar. Nach geringfügigen Modifikationen der Methodik wäre ebenfalls die Charakterisierung des Glykosylierungsmusters von rekombinanten Glykoproteinen und Antikörpern (rein oder in komplexen Gemischen) möglich.

Auch in anderen Anwendungsbereichen bietet die präsentierte Methode ein großes Potential. Ausgehend von der Trennung von komplexen Proteingemischen mittels 1D/2D SDS-PAGE könnte diese für die N-Glykananalyse eines beliebigen Glykoproteins eingesetzt werden. Darüber hinaus können vorgereinigte Glykoproteine (beispielsweise durch Chromatographie oder Affinitäts-capturing) ebenfalls gehandhabt werden, indem der Schritt der Proteintrennung und IGD durch die Deglykosylierung in Lösung ersetzt wird. Nach erfolgter Protein- und Enzymfällung wäre nach dem Schema in Abbildung 3-1 mit der APTS-Konjugierung und den darauffolgenden Schritten fortzufahren. Damit eröffnet sich auch ein breites Feld für Anwendungen im Bereich der Diagnosemedizin. Beispielsweise wären die Erkennung chronischer Entzündungen oder die Krebsfrüherkennung Möglichkeiten, Veränderungen in der Glykosylierung zu erkennen, die auf starke Anzeichen für das Vorhandensein einer Krankheit hindeuten [297, 298]. In diesem Fall könnten Variationen im N-

Glykosylierungsmuster einfach durch Vergleich der Fingerprints hinsichtlich PA, relativer Peakhöhen, -flächen und norm. t_{mig} verglichen werden. Eine weitere Möglichkeit wäre die Nutzung der Methode (ggf. mit entsprechenden Modifikationen zu Beginn der Probenvorbereitung) zur Generierung von „Glykom-Fingerprints“ analog zu bereits publizierten Methoden im Bereich der Proteomforschung [299-301]. Hier werden Proteine als Krankheitsmarker bei dem Vergleich des Proteoms von Patienten z. B. an aufeinander folgenden Zeitpunkten (vor und nach Auftreten der Krankheit) genutzt. Anstelle dessen könnte so das Glykom analysiert werden, um Krankheiten zu erkennen oder Risikopatienten zu identifizieren.

Die größte Herausforderung von Folgeexperimenten wäre allerdings die, den Einfluss von Veränderungen im HA N-Glykosylierungsmuster auf die Immunogenität der produzierten Impfstoffe zu ermitteln, der noch weitgehend unbekannt ist. An die Studien von Romanova *et al.* [68] anknüpfend sollten diese Einflüsse bewertet werden. Dazu könntebispielsweise ein Influenza-Impfstoff, bei dessen Herstellung Veränderungen in der HA N-Glykosylierung forciert werden (z. B. durch Nährstofflimitierungen oder Glykosylierungsinhibitoren), auf seine Wirksamkeit hin überprüft werden. Dabei sollten sowohl im Labor Potency-Tests wie Single radial immunodiffusion (SRID), als auch Tierexperimente berücksichtigt werden.

8 REFERENZEN

- [1] Lis H, Sharon N. Protein Glycosylation - Structural and Functional-Aspects. *European Journal of Biochemistry* 1993 Nov;218(1):1-27.
- [2] Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta-Gen Subj* 1999 Dec;1473(1):4-8.
- [3] Geyer H, Geyer R. Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation. *BBA-Proteins Proteomics* 2006 Dec;1764(12):1853-69.
- [4] Chen FTA, Evangelista RA. Profiling glycoprotein N-linked oligosaccharide by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 1998 Nov;19(15):2639-44.
- [5] Kornfeld R, Kornfeld S. Assembly of Asparagine-Linked Oligosaccharides. *Annual Review of Biochemistry* 1985;54:631-64.
- [6] Rademacher TW, Parekh RB, Dwek RA. Glycobiology. *Annual Review of Biochemistry* 1988;57:785-838.
- [7] Gahmberg CG, Tolvanen M. Why mammalian cell surface proteins are glycoproteins. *Trends in Biochemical Sciences* 1996 Aug;21(8):308-11.
- [8] Gallagher PJ, Henneberry JM, Sambrook JF, Gething MJH. Glycosylation Requirements for Intracellular-Transport and Function of the Hemagglutinin of Influenza-Virus. *Journal of Virology* 1992 Dec;66(12):7136-45.
- [9] Haltiwanger R. Regulation of signal transduction with glycosylation. *Faseb J* 2004 May;18(8):C114-C.
- [10] Helenius A, Aebi M. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annual Review of Biochemistry* 2004;73:1019-49.
- [11] Dwek RA. Glycobiology: Toward understanding the function of sugars. *Chem Rev* 1996 Mar-Apr;96(2):683-720.
- [12] Varki A. Biological Roles of Oligosaccharides - All of the Theories Are Correct. *Glycobiology* 1993 Apr;3(2):97-130.
- [13] Olden K, Parent JB, White SL. Carbohydrate Moieties of Glycoproteins - a Re-Evaluation of Their Function. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1982;650(4):209-32.
- [14] Slawson C, Housley MP, Hart GW. O-GlcNAc cycling: How a single sugar post-translational modification is changing the way we think about signaling networks. *Journal of Cellular Biochemistry* 2006 Jan;97(1):71-83.
- [15] Zachara NE, Hart GW. The emerging significance of O-GlcNAc in cellular regulation. *Chem Rev* 2002 Feb;102(2):431-8.
- [16] Ohuchi M, Ohuchi R, Feldmann A, Klenk HD. Regulation of receptor binding affinity of influenza virus hemagglutinin by its carbohydrate moiety. *J Virol* 1997 Nov;71(11):8377-84.
- [17] Alexander S, Elder JH. Carbohydrate Dramatically Influences Immune Reactivity of Antisera to Viral Glycoprotein Antigens. *Science* 1984;226(4680):1328-30.
- [18] Schulze IT, Manger ID. Viral Glycoprotein Heterogeneity-Enhancement of Functional Diversity. *Glycoconjugate Journal* 1992 Apr;9(2):63-6.
- [19] Nakamura K, Compans RW. Effects of Glucosamine, 2-Deoxyglucose, and Tunicamycin on Glycosylation, Sulfation, and Assembly of Influenza Viral-Proteins. *Virology* 1978;84(2):303-19.
- [20] Schwarz RT, Rohrschneider JM, Schmidt MF. Suppression of glycoprotein formation of Semliki Forest, influenza, and avian sarcoma virus by tunicamycin. *J Virol* 1976 Sep;19(3):782-91.
- [21] Pizer LI, Cohen GH, Eisenberg RJ. Effect of Tunicamycin on Herpes-Simplex Virus Glycoproteins and Infectious Virus Production. *Journal of Virology* 1980;34(1):142-53.
- [22] Stohrer R, Hunter E. Inhibition of Rous-Sarcoma Virus-Replication by 2-

- Deoxyglucose and Tunicamycin - Identification of an Unglycosylated Env Gene-Product. *Journal of Virology* 1979;32(2):412-9.
- [23] Hebert DN, Zhang JX, Chen W, Foellmer B, Helenius A. The number and location of glycans on influenza hemagglutinin determine folding and association with calnexin and calreticulin. *Journal of Cell Biology* 1997 Nov;139(3):613-23.
- [24] Meunier JC, Fournillier A, Choukhi A, Cahour A, Cocquerel L, Dubuisson J, et al. Analysis of the glycosylation sites of hepatitis C virus (HCV) glycoprotein E1 and the influence of E1 glycans on the formation of the HCV glycoprotein complex. *Journal of General Virology* 1999 Apr;80:887-96.
- [25] Zhang HL, Singh S, Reinhold V. Glycan characterization using a MSn fragment fingerprint library. *Glycobiology* 2004 Nov;14(11):1192-.
- [26] Parekh RB, Dwek RA, Sutton BJ, Fernandes DL, Leung A, Stanworth D, et al. Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature* 1985 Aug 1-7;316(6027):452-7.
- [27] Butler M. Optimisation of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by mammalian cell systems. *Cytotechnology* 2006;50(1-3):57-76.
- [28] Dordal MS, Wang FF, Goldwasser E. The Role of Carbohydrate in Erythropoietin Action. *Endocrinology* 1985;116(6):2293-9.
- [29] Goochee CF. Bioprocess factors affecting glycoprotein oligosaccharide structure. *Dev Biol Stand* 1992;76:95-104.
- [30] Butler M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2005 Aug;68(3):283-91.
- [31] Molowa DT, Mazanet R. The state of biopharmaceutical manufacturing. *Biotechnol Annu Rev* 2003;9:285-302.
- [32] Chen ZY, Aspelund A, Jin H. Stabilizing the glycosylation pattern of influenza B hemagglutinin following adaptation to growth in eggs. *Vaccine* 2008 Jan;26(3):361-71.
- [33] WHO, Fact sheet N°211. 2003 [cited 2008 26.11.2008]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs211/en/>
- [34] Burnet FM, Bull DH. Changes in Influenza Virus Associated with Adaptation to Passage in Chick Embryos. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science* 1943;21:55-69.
- [35] Govorkova EA, Kodihalli S, Alymova IV, Fanget B, Webster RG. Growth and immunogenicity of influenza viruses cultivated in Vero or MDCK cells and in embryonated chicken eggs. *Dev Biol Stand* 1999;98:39-51.
- [36] Genzel Y, Behrendt I, König S, Sann H, Reichl U. Metabolism of MDCK cells during cell growth and influenza virus production in large-scale microcarrier culture. *Vaccine* 2004 Jun;22(17-18):2202-8.
- [37] Gröner A, Vorlop J, inventors; Chiron Behring GmbH & Co. (Marburg, DE), assignee. Animal cells and processes for the replication of influenza viruses patent US 6656720. 2003.
- [38] Halperin SA, Smith B, Mabrouk T, Germain M, Trepanier P, Hassell T, et al. Safety and immunogenicity of a trivalent, inactivated, mammalian cell culture-derived influenza vaccine in healthy adults, seniors, and children. *Vaccine* 2002 Jan;20(7-8):1240-7.
- [39] Kessler N, Thomas-Roche G, Gerentes L, Aymard M. Suitability of MDCK cells grown in serum-free medium for influenza virus production. In: Brown F, Robertson JS, Schild GC, Wood JM, editors. *Inactivated influenza vaccines prepared in cell culture*. Basel, 1999: 13-21.
- [40] Kistner O, Barrett PN, Mundt W, Reiter M, Schober-Bendixen S, Dorner F. Development of a mammalian cell (Vero) derived candidate influenza virus vaccine. *Vaccine* 1998 May-Jun;16(9-10):960-8.
- [41] Kistner O, Barrett N, Mundt W, Dorner F, inventors; Baxter Aktiengesellschaft

- (Vienna, AT), assignee. Production of orthomyxoviruses in monkey kidney cells using protein-free media patent US 6146873. 2000.
- [42] Merten OW, Hannoun C, Manuguerra JC, Ventre F, Petres S. Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation. *Adv Exp Med Biol* 1996;397:141-51.
- [43] Pau MG, Ophorst C, Koldijk MH, Schouten G, Mehtali M, Uytdehaag F. The human cell line PER.C6 provides a new manufacturing system for the production of influenza vaccines. *Vaccine* 2001 Mar 21;19(17-19):2716-21.
- [44] Jordan I, Vos A, Beilfuß S, Neubert A, Breul S, Sandig V. An avian cell line designed for production of highly attenuated viruses *Vaccine* 2008; *in press*.
- [45] Mehtali M, Champion-Arnaud P, Leon A, inventors; Vivalis (Roussay, FR), assignee. Process of manufacturing viral vaccines in suspension avian embryonic derived stem cell lines patent WO/2006/108846. 2006.
- [46] Cell culture as a substrate for the production of influenza vaccines: memorandum from a WHO meeting. *Bull World Health Organ* 1995;73:431-5.
- [47] Robertson JS, Cook P, Attwell AM, Williams SP. Replicative Advantage in Tissue-Culture of Egg Adapted Influenza-Virus over Tissue-Culture Derived Virus - Implications for Vaccine Manufacture. *Vaccine* 1995 Nov;13(16):1583-8.
- [48] Tree JA, Richardson C, Fooks AR, Clegg JC, Looby D. Comparison of large-scale mammalian cell culture systems with egg culture for the production of influenza virus A vaccine strains. *Vaccine* 2001 May;19(25-26):3444-50.
- [49] FDA, Guidance for Industry PAT – A framework for innovative pharmaceutical manufacturing and quality assurance. 2004 [cited 2008 26.11.2008]; Available from: <http://www.fda.gov/cder/guidance/6419fnl.pdf>
- [50] Watts DC. Process Analytical Technology (PAT): What's in a name? 2004 [cited 2008 26.11.2008]; Available from: <http://www.fda.gov/cder/OPS/PATCommissionerSem2004.ppt>
- [51] Geisow MJ. Glycoprotein Glycans - Roles and Controls. *Trends Biotechnol* 1992 Oct;10(10):333-5.
- [52] Butler M, Huzel N, Yang M, Restelli V, Kunkel J. Protein glycosylation is controlled by cell culture conditions. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 2003 Mar;225:U209-U.
- [53] Gawlitzek M, Valley U, Nimitz M, Wagner R, Conradt HS. Characterization of Changes in the Glycosylation Pattern of Recombinant Proteins from BHK-21-Cells Due to Different Culture Conditions. *J Biotechnol* 1995 Sep;42(2):117-31.
- [54] Jenkins N, Curling EMA. Glycosylation of Recombinant Proteins - Problems and Prospects. *Enzyme Microb Technol* 1994 May;16(5):354-64.
- [55] Sheeley DM, Merrill BM, Taylor LCE. Characterization of monoclonal antibody glycosylation: Comparison of expression systems and identification of terminal alpha-linked galactose. *Analytical Biochemistry* 1997 Apr;247(1):102-10.
- [56] Helenius A, Aebi M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 2001 Mar;291(5512):2364-9.
- [57] Jenkins N, Parekh RB, James DC. Getting the glycosylation right: Implications for the biotechnology industry. *Nat Biotechnol* 1996 Aug;14(8):975-81.
- [58] Wagner R, Heuer D, Wolff T, Herwig A, Klenk HD. N-Glycans attached to the stem domain of haemagglutinin efficiently regulate influenza A virus replication. *J Gen Virol* 2002 Mar;83(Pt 3):601-9.
- [59] Robertson JS, Bootman JS, Newman R, Oxford JS, Daniels RS, Webster RG, et al. Structural-Changes in the Hemagglutinin Which Accompany Egg Adaptation of an Influenza-(H1N1) Virus. *Virology* 1987 Sep;160(1):31-7.
- [60] Schulze IT. Effects of glycosylation on the properties and functions of influenza virus hemagglutinin. *J Infect Dis* 1997 Aug;176 Suppl 1:S24-8.
- [61] Gething MJ, Bye J, Skehel J, Waterfield M. Cloning and DNA sequence of double-

- stranded copies of haemagglutinin genes from H2 and H3 strains elucidates antigenic shift and drift in human influenza virus. *Nature* 1980 Sep 25;287(5780):301-6.
- [62] Hiti AL, Davis AR, Nayak DP. Complete sequence analysis shows that the hemagglutinins of the H0 and H2 subtypes of human influenza virus are closely related. *Virology* 1981 May;111(1):113-24.
- [63] Verhoeyen M, Fang R, Jou WM, Devos R, Huylebroeck D, Saman E, et al. Antigenic Drift between the Hemagglutinin of the Hong-Kong Influenza Strains a-Aichi-2-68 and a-Victoria-3-75. *Nature* 1980;286(5775):771-6.
- [64] Schwarz RT, Klenk HD. Carbohydrates of influenza virus. IV. Strain-dependent variations. *Virology* 1981 Sep;113(2):584-93.
- [65] Wagner R, Wolff T, Herwig A, Pleschka S, Klenk HD. Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics. *J Virol* 2000 Jul;74(14):6316-23.
- [66] Mochalova L, Gambaryan A, Romanova J, Tuzikov A, Chinarev A, Katinger D, et al. Receptor-binding properties of modern human influenza viruses primarily isolated in Vero and MDCK cells and chicken embryonated eggs. *Virology* 2003 Sep 1;313(2):473-80.
- [67] Nakamura K, Compans RW. Host-Cell Dependent and Virus Strain-Dependent Differences in Oligosaccharides of Hemagglutinin Glycoproteins of Influenza-a Viruses. *Virology* 1979;95(1):8-23.
- [68] Romanova J, Katinger D, Ferko B, Voglauer R, Mochalova L, Bovin N, et al. Distinct host range of influenza H3N2 virus isolates in Vero and MDCK cells is determined by cell specific glycosylation pattern. *Virology* 2003 Mar;307(1):90-7.
- [69] Deom CM, Caton AJ, Schulze IT. Host Cell-Mediated Selection of a Mutant Influenza a Virus That Has Lost a Complex Oligosaccharide from the Tip of the Hemagglutinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986 Jun;83(11):3771-5.
- [70] Gambaryan AS, Marinina VP, Tuzikov AB, Bovin NV, Rudneva IA, Sinitsyn BV, et al. Effects of host-dependent glycosylation of hemagglutinin on receptor-binding properties of H1N1 human influenza A virus grown in MDCK cells and in embryonated eggs. *Virology* 1998 Aug;247(2):170-7.
- [71] Arbatsky NP, Derevitskaya VA, Zheltova AO, Kochetkov NK, Likhoshestov LM, Senchenkova SN, et al. The Carbohydrate Chains of Influenza-Virus Hemagglutinin. *Carbohydrate Research* 1988 Jul;178:165-81.
- [72] Bouvier NM, Palese P. The biology of influenza viruses. *Vaccine* 2008 Sep;26:D49-D53.
- [73] Schwarz RT, Schmidt MFG, Anwer U, Klenk HD. Carbohydrates of Influenza Virus .1. Glycopeptides Derived from Viral Glycoproteins after Labeling with Radioactive Sugars. *Journal of Virology* 1977;23(2):217-26.
- [74] Nakamura K, Compans RW. Glycopeptide Components of Influenza Viral Glycoproteins. *Virology* 1978;86(2):432-42.
- [75] Guile GR, Rudd PM, Wing DR, Prime SB, Dwek RA. A rapid high-resolution high-performance liquid chromatographic method for separating glycan mixtures and analyzing oligosaccharide profiles. *Analytical Biochemistry* 1996 Sep;240(2):210-26.
- [76] Rudd PM, Colominas C, Royle L, Murphy N, Hart E, Merry AH, et al. A high-performance liquid chromatography based strategy for rapid, sensitive sequencing of N-linked oligosaccharide modifications to proteins in sodium dodecyl sulphate polyacrylamide electrophoresis gel bands. *Proteomics* 2001 Feb;1(2):285-94.
- [77] Mechref Y, Novotny MV, Krishnan C. Structural characterization of oligosaccharides using MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2003 Sep;75(18):4895-903.
- [78] Pfenninger A, Karas M, Finke B, Stahl B. Structural analysis of underivatized neutral human milk oligosaccharides in the negative ion mode by nano-electrospray MSn (Part 2:

Application to isomeric mixtures). *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2002 Nov;13(11):1341-8.

[79] Vliegthart JFG, Dorland L, Vanhalbeek H. High-Resolution, H-1-Nuclear Magnetic-Resonance Spectroscopy as a Tool in the Structural-Analysis of Carbohydrates Related to Glycoproteins. *AdvCarbohydrChemBiochem* 1983;41:209-374.

[80] Geyer H, Wuhrer M, Resemann A, Geyer R. Identification and characterization of keyhole limpet hemocyanin N-glycans mediating cross-reactivity with *Schistosoma mansoni*. *Journal of Biological Chemistry* 2005 Dec;280(49):40731-48.

[81] Chen FTA, Dobashi TS, Evangelista RA. Quantitative analysis of sugar constituents of glycoproteins by capillary electrophoresis. *Glycobiology* 1998 Nov;8(11):1045-52.

[82] Callewaert N, Geysens S, Molemans P, Contreras R. Ultrasensitive profiling and sequencing of N-linked oligosaccharides using standard DNA-sequencing equipment. *Glycobiology* 2001 Apr;11(4):275-81.

[83] Guttman A. High-resolution carbohydrate profiling by capillary gel electrophoresis. *Nature* 1996 Apr 4;380(6573):461-2.

[84] Khandurina J, Anderson AA, Olson NA, Stege JT, Guttman A. Large-scale carbohydrate analysis by capillary array electrophoresis: Part 2. Data normalization and quantification. *Electrophoresis* 2004 Oct;25(18-19):3122-7.

[85] Khandurina J, Blum DL, Stege JT, Guttman A. Automated carbohydrate profiling by capillary electrophoresis: A bioindustrial approach. *Electrophoresis* 2004 Jul;25(14):2326-31.

[86] Khandurina J, Olson NA, Anderson AA, Gray KA, Guttman A. Large-scale carbohydrate analysis by capillary array electrophoresis: Part 1. Separation and scale-up. *Electrophoresis* 2004 Oct;25(18-19):3117-21.

[87] Edge CJ, Rademacher TW, Wormald MR, Parekh RB, Butters TD, Wing DR, et al. Fast Sequencing of Oligosaccharides - the Reagent-Array Analysis Method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992 Jul;89(14):6338-42.

[88] Genzel Y, Fischer M, Reichl U. Serum-free influenza virus production avoiding washing steps and medium exchange in large-scale microcarrier culture. *Vaccine* 2006 Apr;24(16):3261-72.

[89] Genzel Y, Olmer RM, Schafer B, Reichl U. Wave microcarrier cultivation of MDCK cells for influenza virus production in serum containing and serum-free media. *Vaccine* 2006 Aug;24(35-36):6074-87.

[90] Callewaert N, Contreras R, Mitnik-Gankin L, Carey L, Matsudaira P, Ehrlich D. Total serum protein N-glycome profiling on a capillary electrophoresis-microfluidics platform. *Electrophoresis* 2004 Oct;25(18-19):3128-31.

[91] Laroy W, Contreras R, Callewaert N. Glycome mapping on DNA sequencing equipment. *Nat Protoc* 2006;1(1):397-405.

[92] Schwarzer J, Rapp E, Reichl U. N-glycan analysis by CGE-LIF: Profiling influenza A virus hemagglutinin N-glycosylation during vaccine production. *Electrophoresis* 2008 November 2008;29(20):4203-14.

[93] Meiss HK, Green RF, Rodriguez-Boulan EJ. Lectin-resistant mutants of polarized epithelial cells. *Mol Cell Biol* 1982 Oct;2(10):1287-94.

[94] Govorkova EA, Kaverin NV, Gubareva LV, Meignier B, Webster RG. Replication of Influenza-a Viruses in a Green Monkey Kidney Continuous Cell-Line (Vero). *J Infect Dis* 1995 Jul;172(1):250-3.

[95] Ozaki H, Govorkova EA, Li CH, Xiong XP, Webster RG, Webby RJ. Generation of high-yielding influenza A viruses in African green monkey kidney (Vero) cells by reverse genetics. *Journal of Virology* 2004 Feb;78(4):1851-7.

[96] Dwek RA, Edge CJ, Harvey DJ, Wormald MR, Parekh RB. Analysis of Glycoprotein-Associated Oligosaccharides. *Annual Review of Biochemistry* 1993;62:65-100.

[97] Gavel Y, Vonheijne G. Sequence Differences between Glycosylated and

- Nonglycosylated Asn-X-Thr Ser Acceptor Sites - Implications for Protein Engineering. *Protein Engineering* 1990 Apr;3(5):433-42.
- [98] Harvey DJ. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates. *Mass Spectrometry Reviews* 1999 Nov-Dec;18(6):349-450.
- [99] Hounsell EF, Davies MJ, Renouf DV. O-linked protein glycosylation structure and function. *Glycoconjugate Journal* 1996 Feb;13(1):19-26.
- [100] Ferguson MAJ. Lipid anchors on membrane proteins. *Current Opinion Struct Biol* 1991 August;1(4):522-9.
- [101] Silberstein S, Gilmore R. Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase. *Faseb J* 1996 Jun;10(8):849-58.
- [102] Helenius A, Trombetta ES, Hebert DN, Simons JF. Calnexin, calreticulin and the folding of glycoproteins. *Trends in Cell Biology* 1997 May;7(5):193-200.
- [103] Ludwig S, Planz O, Pleschka S, Wolff T. Influenza-virus-induced signaling cascades: targets for antiviral therapy? *Trends in Molecular Medicine* 2003 Feb;9(2):46-52.
- [104] Stevens J, Corper AL, Basler CF, Taubenberger JK, Palese P, Wilson IA. Structure of the uncleaved human H1 hemagglutinin from the extinct 1918 influenza virus. *Science* 2004 Mar;303(5665):1866-70.
- [105] Modrow S, Falke D, Truyen U. *Molekulare Virologie*. 2 ed: Spektrum Verlag, 2006.
- [106] Palese P, Garcia-Sastre A. Influenza vaccines: present and future. *Journal of Clinical Investigation* 2002 Jul;110(1):9-13.
- [107] Ludwig S, Pleschka S, Wolff T. A fatal relationship - Influenza virus interactions with the host cell. *Viral Immunology* 1999;12(3):175-96.
- [108] Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ. *Textbook of Influenza: Blackwell Sciences*, 1998: 34-51.
- [109] Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: The influenza hemagglutinin. *Annual Review of Biochemistry* 2000;69:531-69.
- [110] Ohuchi M, Ohuchi R, Matsumoto A. Control of biological activities of influenza virus hemagglutinin by its carbohydrate moiety. *Microbiology and Immunology* 1999;43(12):1071-6.
- [111] Klenk HD, Garten W. Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends in microbiology* 1994 Feb;2(2):39-43.
- [112] Klenk HD, Wagner R, Heuer D, Wolff T. Importance of hemagglutinin glycosylation for the biological functions of influenza virus. *Virus Research* 2002 Jan;82(1-2):73-5.
- [113] Bullough PA, Hughson FM, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of Influenza Hemagglutinin at the Ph of Membrane-Fusion. *Nature* 1994 Sep;371(6492):37-43.
- [114] Sidorenko Y, Reichl U. Structured model of influenza virus replication in MDCK cells. *Biotechnol Bioeng* 2004 Oct;88(1):1-14.
- [115] Caton AJ, Brownlee GG, Yewdell JW, Gerhard W. The Antigenic Structure of the Influenza-Virus a/Pr/8/34 Hemagglutinin (H-1 Subtype). *Cell* 1982;31(2):417-27.
- [116] Wiley DC, Wilson IA, Skehel JJ. Structural Identification of the Antibody-Binding Sites of Hong-Kong Influenza Hemagglutinin and Their Involvement in Antigenic Variation. *Nature* 1981;289(5796):373-8.
- [117] Gitelman AK, Berezin VA, Kharitonov IG. The Role of Carbohydrate in Determining the Immunochemical Properties of the Hemagglutinin of Influenza-a Virus. *Archives of Virology* 1981;67(3):253-66.
- [118] Skehel JJ, Wiley DC. Influenza haemagglutinin. *Vaccine* 2002 May;20:S51-S4.
- [119] Wilson IA, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of the Hemagglutinin Membrane Glycoprotein of Influenza-Virus at 3-Å Resolution. *Nature* 1981;289(5796):366-73.
- [120] Keil W, Klenk HD, Schwarz RT. Carbohydrates of Influenza-Virus .3. Nature of Oligosaccharide-Protein Linkage in Viral Glycoproteins. *Journal of Virology* 1979;31(1):253-6.

- [121] Keil W, Geyer R, Dabrowski J, Dabrowski U, Niemann H, Stirn S, et al. Carbohydrates of Influenza-Virus - Structural Elucidation of the Individual Glycans of the Fpv Hemagglutinin by Two-Dimensional H-1 Hmr and Methylation Analysis. *Embo J* 1985;4(10):2711-20.
- [122] MirShekari SY, Ashford DA, Harvey DJ, Dwek RA, Schulze IT. The glycosylation of the influenza A virus hemagglutinin by mammalian cells - A site-specific study. *Journal of Biological Chemistry* 1997 Feb;272(7):4027-36.
- [123] Gallagher P, Henneberry J, Wilson I, Sambrook J, Gething MJ. Addition of Carbohydrate Side-Chains at Novel Sites on Influenza-Virus Hemagglutinin Can Modulate the Folding, Transport, and Activity of the Molecule. *Journal of Cell Biology* 1988 Dec;107(6):2059-73.
- [124] Klenk HD, Compans RW, Choppin PW. Electron Microscopic Study of Presence or Absence of Neuraminic Acid in Enveloped Viruses. *Virology* 1970;42(4):1158-&.
- [125] Ohuchi M, Feldmann A, Ohuchi R, Klenk HD. Neuraminidase Is Essential for Fowl Plague Virus Hemagglutinin to Show Hemagglutinating Activity. *Virology* 1995 Sep;212(1):77-83.
- [126] Eylar EH. On the biological role of glycoproteins. *J theor Biol* 1966 January;10(1):89-113.
- [127] Crimmins DL, Schlesinger S. Physical-Properties of the Glycoprotein of Vesicular Stomatitis-Virus Measured by Intrinsic Fluorescence and Aggregation. *Biochemistry* 1982;21(14):3518-24.
- [128] Gibson R, Kornfeld S, Schlesinger S. The Effect of Oligosaccharide Chains of Different Sizes on the Maturation and Physical-Properties of the G-Protein of Vesicular Stomatitis-Virus. *Journal of Biological Chemistry* 1981;256(1):456-62.
- [129] Hughes RC, Meager A, Nairn R. Effect of 2-Deoxy-d-glucose on the Cell-Surface Glycoproteins of Hamster Fibroblasts. *European Journal of Biochemistry* 1977 January;72(2):265-73.
- [130] Deshpande KL, Fried VA, Ando M, Webster RG. Glycosylation Affects Cleavage of an H5n2 Influenza-Virus Hemagglutinin and Regulates Virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987 Jan;84(1):36-40.
- [131] Skehel JJ, Stevens DJ, Daniels RS, Douglas AR, Knossow M, Wilson IA, et al. A carbohydrate side chain on hemagglutinins of Hong Kong influenza viruses inhibits recognition by a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984 Mar;81(6):1779-83.
- [132] Botarelli P, Houlden BA, Haigwood NL, Servis C, Montagna D, Abrignani S. N-Glycosylation of Hiv-Gp120 May Constrain Recognition by Lymphocytes-T. *J Immunol* 1991 Nov;147(9):3128-32.
- [133] Drummer HE, Jackson DC, Brown LE. Modulation of Cd4+ T-Cell Recognition of Influenza Hemagglutinin by Carbohydrate Side-Chains Located Outside a T-Cell Determinant. *Virology* 1993 Jan;192(1):282-9.
- [134] Skehel JJ, Stevens DJ, Daniels RS, Douglas AR, Knossow M, Wilson IA, et al. A Carbohydrate Side-Chain on Hemagglutinins of Hong-Kong Influenza-Viruses Inhibits Recognition by a Monoclonal-Antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 1984;81(6):1779-83.
- [135] Aytay S, Schulze IT. Single Amino-Acid Substitutions in the Hemagglutinin Can Alter the Host Range and Receptor-Binding Properties of H1-Strains of Influenza-a Virus. *Journal of Virology* 1991 Jun;65(6):3022-8.
- [136] Parekh RB, Tse AGD, Dwek RA, Williams AF, Rademacher TW. Tissue-Specific N-Glycosylation, Site-Specific Oligosaccharide Patterns and Lentil Lectin Recognition of Rat Thy-1. *Embo J* 1987 May;6(5):1233-44.
- [137] Yang M, Butler M. Effect of ammonia on the glycosylation of human recombinant erythropoietin in culture. *Biotechnol Prog* 2000 Sep-Oct;16(5):751-9.

- [138] Bendiak B, Schachter H. Control of Glycoprotein-Synthesis - Kinetic Mechanism, Substrate-Specificity, and Inhibition Characteristics of Udp-N-Acetylglucosamine-Alpha-D-Mannoside Beta-1-2 N-Acetylglucosaminyltransferase-II from Rat-Liver. *Journal of Biological Chemistry* 1987 Apr;262(12):5784-90.
- [139] Nishikawa Y, Pegg W, Paulsen H, Schachter H. Control of Glycoprotein-Synthesis .15. Purification and Characterization of Rabbit Liver Udp-N-Acetylglucosamine-Alpha-3-D-Mannoside Beta-1,2-N-Acetylglucosaminyltransferase-I. *Journal of Biological Chemistry* 1988 Jun;263(17):8270-81.
- [140] Goochee CF, Gramer MJ, Andersen DC, Bahr JB, Rasmussen JR. The Oligosaccharides of Glycoproteins - Bioprocess Factors Affecting Oligosaccharide Structure and Their Effect on Glycoprotein Properties. *Bio-Technology* 1991 Dec;9(12):1347-55.
- [141] Goto M, Akai K, Murakami A, Hashimoto C, Tsuda E, Ueda M, et al. Production of Recombinant Human Erythropoietin in Mammalian-Cells - Host-Cell Dependency of the Biological-Activity of the Cloned Glycoprotein. *Bio-Technology* 1988 Jan;6(1):67-71.
- [142] Goochee CF, Monica T. Environmental-Effects on Protein Glycosylation. *Bio-Technology* 1990 May;8(5):421-7.
- [143] Hooker AD, Goldman MH, Markham NH, James DC, Ison AP, Bull AT, et al. N-Glycans of Recombinant Human Interferon-Gamma Change During Batch Culture of Chinese-Hamster Ovary Cells. *Biotechnol Bioeng* 1995 Dec;48(6):639-48.
- [144] Robinson DK, Chan CP, Ip CY, Tsai PK, Tung J, Seamans TC, et al. Characterization of a Recombinant Antibody Produced in the Course of a High-Yield Fed-Batch Process. *Biotechnol Bioeng* 1994 Sep;44(6):727-35.
- [145] Gawlitzek M, Conradt HS, Wagner R. Effect of Different Cell-Culture Conditions on the Polypeptide Integrity and N-Glycosylation of a Recombinant Model Glycoprotein. *Biotechnol Bioeng* 1995 Jun;46(6):536-44.
- [146] Rearick JJ, Chapman A, Kornfeld S. Glucose Starvation Alters Lipid-Linked Oligosaccharide Biosynthesis in Chinese-Hamster Ovary Cells. *Journal of Biological Chemistry* 1981;256(12):6255-61.
- [147] Stark NJ, Heath EC. Glucose-Dependent Glycosylation of Secretory Glycoprotein in Mouse Myeloma Cells. *Arch Biochem Biophys* 1979;192(2):599-609.
- [148] Tachibana H, Taniguchi K, Ushio Y, Teruya K, Osada K, Murakami H. Changes of Monosaccharide Availability of Human Hybridoma Lead to Alteration of Biological Properties of Human Monoclonal-Antibody. *Cytotechnology* 1994;16(3):151-7.
- [149] Andersen DC, Goochee CF, Cooper G, Weitzhandler M. Monosaccharide and Oligosaccharide Analysis of Isoelectric Focusing-Separated and Blotted Granulocyte-Colony-Stimulating Factor Glycoforms Using High-Ph Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection. *Glycobiology* 1994 Aug;4(4):459-67.
- [150] Borys MC, Linzer DIH, Papoutsakis ET. Culture Ph Affects Expression Rates and Glycosylation of Recombinant Mouse Placental-Lactogen Proteins by Chinese-Hamster Ovary (Cho) Cells. *Bio-Technology* 1993 Jun;11(6):720-4.
- [151] Chotigeat W, Watanapokasin Y, Mahler S, Gray PP. Role of Environmental-Conditions on the Expression Levels, Glycoform Pattern and Levels of Sialyltransferase for Hfsh Produced by Recombinant Cho Cells. *Cytotechnology* 1994;15(1-3):217-21.
- [152] Lin AA, Kimura R, Miller WM. Production of Tpa in Recombinant Cho Cells under Oxygen-Limited Conditions. *Biotechnol Bioeng* 1993 Jul;42(3):339-50.
- [153] Matlin KS, Skibbens J, McNeil PL. Reduced Extracellular Ph Reversibly Inhibits Oligomerization, Intracellular-Transport, and Processing of the Influenza Hemagglutinin in Infected Madin-Darby Canine Kidney-Cells. *Journal of Biological Chemistry* 1988 Aug;263(23):11478-85.
- [154] Patel TP, Parekh RB, Moellering BJ, Prior CP. Different Culture Methods Lead to Differences in Glycosylation of a Murine Igg Monoclonal-Antibody. *Biochemical Journal*

1992 Aug;285:839-45.

[155] Robertson JS. Clinical Influenza-Virus and the Embryonated Hens Egg. *Rev Med Virol* 1993 Jun;3(2):97-106.

[156] Shilov AA, Rudneva IA, Obrosovaserova NP. Genetic-Variability of Human Influenza-Virus in the Course of Adaptation to Mice. *Voprosy Virusologii* 1984(4):410-7.

[157] Crecelius DM, Deom CM, Schulze IT. Biological Properties of a Hemagglutinin Mutant of Influenza-Virus Selected by Host-Cells. *Virology* 1984;139(1):164-77.

[158] Keil W, Niemann H, Schwarz RT, Klenk HD. Carbohydrates of influenza virus. V. Oligosaccharides attached to individual glycosylation sites of the hemagglutinin of fowl plague virus. *Virology* 1984 Feb;133(1):77-91.

[159] Basak S, Compans RW. Studies on the role of glycosylation in the functions and antigenic properties of influenza virus glycoproteins. *Virology* 1983 Jul 15;128(1):77-91.

[160] Liu DTY. Glycoprotein Pharmaceuticals - Scientific and Regulatory Considerations, and the United-States Orphan Drug-Act. *Trends Biotechnol* 1992 Apr;10(4):114-20.

[161] Endo T, Groth D, Prusiner SB, Kobata A. Diversity of Oligosaccharide Structures Linked to Asparagines of the Scrapie Prion Protein. *Biochemistry* 1989 Oct;28(21):8380-8.

[162] Cummings RD. Use of Lectins in Analysis of Glycoconjugates. *Guide to Techniques in Glycobiology*, 1994: 66-86.

[163] Huang YP, Mechref Y, Novotny MV. Microscale nonreductive release of O-linked glycans for subsequent analysis through MALDI mass spectrometry and capillary electrophoresis. *Anal Chem* 2001 Dec;73(24):6063-9.

[164] Kraly J, Fazal MA, Schoenherr RM, Bonn R, Harwood MM, Turner E, et al. Bioanalytical applications of capillary electrophoresis. *Anal Chem* 2006 Jun;78(12):4097-110.

[165] Pacakova V, Hubena S, Ticha M, Madera M, Stulik K. Effects of electrolyte modification and capillary coating on separation of glycoprotein isoforms by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2001 Feb;22(3):459-63.

[166] Rudd PM, Scragg IG, Coghil E, Dwek RA. Separation and Analysis of the Glycoform Populations of Ribonuclease-B Using Capillary Electrophoresis. *Glycoconjugate Journal* 1992 Apr;9(2):86-91.

[167] Mikus P, Valaskova I, Havranek E. Analytical characterization of heparin by capillary zone electrophoresis with conductivity detection and polymeric buffer additives. *J Pharm Biomed Anal* 2004 Nov;36(3):441-6.

[168] Annesley TM. Ion suppression in mass spectrometry. *Clin Chem* 2003 Jul;49(7):1041-4.

[169] Dillon TM, Bondarenko PV, Ricci MS. Development of an analytical reversed-phase high-performance liquid chromatography-electro spray ionization mass spectrometry method for characterization of recombinant antibodies. *J Chromatogr A* 2004 Oct;1053(1-2):299-305.

[170] Wilm M, Mann M. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal Chem* 1996 Jan;68(1):1-8.

[171] Sottani C, Fiorentino M, Minoia C. Matrix performance in matrix-assisted laser desorption/ionization for molecular weight determination in sialyl and non-sialyl oligosaccharide proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1997;11(8):907-13.

[172] Wheeler SF, Rudd PM, Davis SJ, Dwek RA, Harvey DJ. Comparison of the N-linked glycans from soluble and GPI-anchored CD59 expressed in CHO cells. *Glycobiology* 2002 Apr;12(4):261-71.

[173] Bonfichi R, Sottani C, Colombo L, Coutant JE, Riva E, Zanette D. Preliminary investigation of glycosylated proteins by capillary electrophoresis and capillary electrophoresis mass spectrometry using electrospray ionization and by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 1995:S95-S106.

[174] Madera M, Mechref Y, Klouckova L, Novotny MV. High-sensitivity profiling of

- glycoproteins from human blood serum through multiple-lectin affinity chromatography and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2007 Jan;845(1):121-37.
- [175] Alvarez-Manilla G, Atwood J, Guo Y, Warren NL, Orlando R, Pierce M. Tools for glycoproteomic analysis: Size exclusion chromatography facilitates identification of tryptic glycopeptides with N-linked glycosylation sites. *J Proteome Res* 2006 Mar;5(3):701-8.
- [176] Hagglund P, Bunkenborg J, Elortza F, Jensen ON, Roepstorff P. A new strategy for identification of N-glycosylated proteins and unambiguous assignment of their glycosylation sites using HILIC enrichment and partial deglycosylation. *J Proteome Res* 2004 May-Jun;3(3):556-66.
- [177] Zhang H, Li XJ, Martin DB, Aebersold R. Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 2003 Jun;21(6):660-6.
- [178] Kim YJ, Freas A, Fenselau C. Analysis of viral glycoproteins by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem* 2001 Apr;73(7):1544-8.
- [179] Wuhrer M, Geyer H, von der Ohe M, Gerardy-Schahn R, Schachner M, Geyer R. Localization of defined carbohydrate epitopes in bovine polysialylated NCAM. *Biochimie* 2003 Jan-Feb;85(1-2):207-18.
- [180] Wuhrer M, Koeleman CAM, Hokke CH, Deelder AM. Protein glycosylation analyzed by normal-phase nano-liquid chromatography-mass spectrometry of glycopeptides. *Anal Chem* 2005 Feb;77(3):886-94.
- [181] Wang F, Nakouzi A, Angeletti RH, Casadevall A. Site-specific characterization of the N-linked oligosaccharides of a murine immunoglobulin M by high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 2003 Mar;314(2):266-80.
- [182] Wuhrer M, Catalina MI, Deelder AM, Hokke CH. Glycoproteomics based on tandem mass spectrometry of glycopeptides. *J Chromatogr B* 2007 Apr;849(1-2):115-28.
- [183] Lochnit G, Geyer R. An optimized protocol for nano-LC-MALDI-TOF-MS coupling for the analysis of proteolytic digests of glycoproteins. *Biomed Chromatogr* 2004 Dec;18(10):841-8.
- [184] Wuhrer M, Hokke CH, Deelder AM. Glycopeptide analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight mass spectrometry reveals novel features of horseradish peroxidase glycosylation. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004;18(15):1741-8.
- [185] Sharon N, Lis H. Lectins as Cell Recognition Molecules. *Science* 1989 Oct;246(4927):227-34.
- [186] Yang ZP, Hancock WS. Approach to the comprehensive analysis of glycoproteins isolated from human serum using a multi-lectin affinity column. *J Chromatogr A* 2004 Oct;1053(1-2):79-88.
- [187] Kuno A, Uchiyama N, Koseki-Kuno S, Ebe Y, Takashima S, Yamada M, et al. Evanescent-field fluorescence-assisted lectin microarray: a new strategy for glycan profiling. *Nat Methods* 2005 Nov;2(11):851-6.
- [188] Maley F, Trimble RB, Tarentino AL, Plummer TH. Characterization of Glycoproteins and Their Associated Oligosaccharides through the Use of Endoglycosidases. *Analytical Biochemistry* 1989 Aug;180(2):195-204.
- [189] Tretter V, Altmann F, Marz L. Peptide-N4-(N-Acetyl-Beta-Glucosaminy)Asparagine Amidase-F Cannot Release Glycans with Fucose Attached Alpha-1-3 to the Asparagine-Linked N-Acetylglucosamine Residue. *European Journal of Biochemistry* 1991 Aug;199(3):647-52.
- [190] O'Neill R. Enzymatic release of oligosaccharides from glycoproteins for chromatographic and electrophoretic analysis. *J Chromatogr A* 1996 January;720(1-2):201-15.
- [191] Mechref Y, Novotny MV. Mass spectrometric mapping and sequencing of N-linked

- oligosaccharides derived from submicrogram amounts of glycoproteins. *Anal Chem* 1998 Feb;70(3):455-63.
- [192] Wilson NL, Schulz BL, Karlsson NG, Packer NH. Sequential analysis of N- and O-linked glycosylation of 2D-PAGE separated glycoproteins. *J Proteome Res* 2002 Nov-Dec;1(6):521-9.
- [193] Anumula KR. Advances in fluorescence derivatization methods for high-performance liquid chromatographic analysis of glycoprotein carbohydrates. *Analytical Biochemistry* 2006 Mar;350(1):1-23.
- [194] Chiesa C, Oneill RA. Capillary Zone Electrophoresis of Oligosaccharides Derivatized with Various Aminonaphthalene Sulfonic-Acids. *Electrophoresis* 1994 Aug-Sep;15(8-9):1132-40.
- [195] Guttman A, Chen FTA, Evangelista RA. Separation of 1-aminopyrene-3,6,8-trisulfonate-labeled asparagine-linked fetuin glycans by capillary gel electrophoresis. *Electrophoresis* 1996 Feb;17(2):412-7.
- [196] www.glycoforum.gr.jp. [cited 2011; Available from:
- [197] Jorgenson JW. Electrophoresis. *Anal Chem* 1986 Jun;58(7):A743-&.
- [198] Gennaro LA, Delaney J, Vouros P, Harvey DJ, Domon B. Capillary electrophoresis/electrospray ion trap mass spectrometry for the analysis of negatively charged derivatized and underivatized glycans. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2002;16(3):192-200.
- [199] Rudd PM, Guile GR, Kuster B, Harvey DJ, Opdenakker G, Dwek RA. Oligosaccharide sequencing technology. *Nature* 1997 Jul;388(6638):205-7.
- [200] Geyer R, Geyer H. Saccharide linkage analysis using methylation and other techniques. *Methods in Enzymology* 1994;230:86-108.
- [201] Hellerqvist CG. Linkage Analysis Using Lindberg Method. *Methods in Enzymology* 1990;193:554-73.
- [202] Duus JO, Gotfredsen CH, Bock K. Carbohydrate structural determination by NMR spectroscopy: Modern methods and limitations. *Chem Rev* 2000 Dec;100(12):4589-+.
- [203] Wormald MR, Petrescu AJ, Pao YL, Glithero A, Elliott T, Dwek RA. Conformational studies of oligosaccharides and glycopeptides: Complementarity of NMR, X-ray crystallography, and molecular modelling. *Chem Rev* 2002 Feb;102(2):371-86.
- [204] Guile GR, Wong SYC, Dwek RA. Analytical and Preparative Separation of Anionic Oligosaccharides by Weak Anion-Exchange High-Performance Liquid-Chromatography on an Inert Polymer Column. *Analytical Biochemistry* 1994 Oct;222(1):231-5.
- [205] Bruggink C, Wuhrer M, Koeleman CAM, Barreto V, Liu Y, Pohl C, et al. Oligosaccharide analysis by capillary-scale high-pH anion-exchange chromatography with on-line ion-trap mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2005 Dec;829(1-2):136-43.
- [206] Tiselius A. A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Trans Faraday Soc* 1937;33:524-31.
- [207] Hjertén S. Free zone electrophoresis. *Chromatograph Rev* 1967;9(2):122-219.
- [208] Jorgenson JW, Lukas KD. Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. *Anal Chem* 1981;53(8):1298-302.
- [209] Jorgenson JW, Lukas KD. Capillary zone electrophoresis. *Science* 1983;222(4621):266-72.
- [210] USP. The US Pharmacopoeia 25. Rockville: United States Pharmacopoeia convention Inc., 2002: 2024-8.
- [211] The British Pharmacopoeia. London: The Stationary Office, The British Pharmacopoeia Commission, 2001: 659-10 and 968.
- [212] Wätzig H, Günther S. Capillary electrophoresis - a high performance analytical separation technique. *Clin Chem Lab Med* 2003 June;41(6):724-38.
- [213] Kamoda S, Kakehi K. Evaluation of glycosylation for quality assurance of antibody pharmaceuticals by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2008 September;29(17):3595-

604.

- [214] Suntornsuk L. Capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis: a survey on recent applications. *J Chromatogr Sci* 2007 October;45(9):559-77.
- [215] Zhang Y, Le X, Dovichi NJ, Compston CA, Palcic MM, Diedrich P, et al. Monitoring biosynthetic transformations of N-acetylglucosamine using fluorescently labeled oligosaccharides and capillary electrophoretic separation. *Analytical Biochemistry* 1995;227(2):368-76.
- [216] Zhao J, Dovichi NJ, Hindsquall O, Gosselin S, Palcic MM. Detection of 100 molecules of product formed in a fucosyltransferase reaction. *Glycobiology* 1994 April;4(2):239-42.
- [217] Righetti PG, Gelfi C, Verzola B, Castelletti L. The state of the art of dynamic coatings. *Electrophoresis* 2001;22(4):603-61.
- [218] Pancorbo AC, Carretro AS, Guiérrez AF. Co-electroosmotic capillary electrophoresis determination of phenolic acids in commercial olive oil. *J Sep Science* 2005;28(9-10):925-34.
- [219] Gassmann E, Kuo JE, Zare RN. Electrokinetic separation of chiral compounds. *Science* 1985 November;230(4727):813-4.
- [220] Johnson ME, Landers JP. Fundamentals and practice for ultrasensitive laser-induced fluorescence detection in microanalytical systems. *Electrophoresis* 2004 November;25(21-22):3513-27.
- [221] Le Bivic A, Garcia M, Rodriguez-Boulan E. Ricin-resistant Madin-Darby canine kidney cells mis-sort a major endogenous apical oligoglycoprotein. *The Journal of biological chemistry* 1993;268:6909-16.
- [222] Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 1999 Dec;20(18):3551-67.
- [223] Kuster B, Wheeler SF, Hunter AP, Dwek RA, Harvey DJ. Sequencing of N-linked oligosaccharides directly from protein gels: In-gel deglycosylation followed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and normal-phase high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* 1997 Jul;250(1):82-101.
- [224] Callewaert N, Van Vlierberghe H, Van Hecke A, Laroy W, Delanghe J, Contreras R. Noninvasive diagnosis of liver cirrhosis using DNA sequencer-based total serum protein glycomics. *Nat Med* 2004 Apr;10(4):429-34.
- [225] Ceroni A, Dell A, Haslam SM. The GlycanBuilder: a fast, intuitive and flexible software tool for building and displaying glycan structures. *Source Code Biol Med* 2007 August;7(2):3.
- [226] Raju TS, Briggs JB, Borge SM, Jones AJS. Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology* 2000 May;10(5):477-86.
- [227] Brandli AW, Hansson GC, Rodriguez-Boulan E, Simons K. A polarized epithelial cell mutant deficient in translocation of UDP-galactose into the Golgi complex. *The Journal of biological chemistry* 1988 Nov 5;263(31):16283-90.
- [228] Winter G, Fields S, Brownlee GG. Nucleotide-Sequence of the Hemagglutinin Gene of a Human Influenza-Virus H-1 Subtype. *Nature* 1981;292(5818):72-5.
- [229] Bragstad K, Nielsen LP, Fomsgaard A. The evolution of human influenza A viruses from 1999 to 2006: A complete genome study. *Virology Journal* 2008 Mar;5.
- [230] Pariani E, Amendola A, Zappa A, Bianchi S, Colzani D, Anselmi G, et al. Molecular characterization of influenza viruses circulating in Northern Italy during two seasons (2005/2006 and 2006/2007) of low influenza activity. *J Med Virol* 2008 November 2008;80(11):1984-91.
- [231] Dietzsch C. Influenza Impfstoffherstellung mit adhärennten Vero Zellen [diploma thesis]. Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme, AG

Bioprozesstechnik, Magdeburg: Technische Universität Dresden 2007.

[232] Gunther I, Glatthaar B, Doller G, Garten W. A H1-Hemagglutinin of a Human Influenza A-Virus with a Carbohydrate-Modulated Receptor-Binding Site and an Unusual Cleavage Site. *Virus Research* 1993 Feb;27(2):147-60.

[233] Guttman A, Cooke N, Starr CM. Capillary electrophoresis separation of oligosaccharides: I. effect of operational variables. *Electrophoresis* 1994 December;15(12):1518-22.

[234] El Rassi Z. Carbohydrate analysis by modern chromatography and electrophoresis. In: El Rassi Z, editor. *Carbohydrate analysis by modern chromatography and electrophoresis*. Amsterdam: Elsevier, 2002: 597-676.

[235] El Rassi Z. Carbohydrate analysis by modern chromatography and electrophoresis. In: El Rassi Z, editor. *Carbohydrate analysis by modern chromatography and electrophoresis*. Amsterdam: Elsevier, 2002: 691-785.

[236] El Rassi Z, Nashabeh W. Carbohydrate analysis: High performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. In: El Rassi Z, editor. *Carbohydrate analysis: High performance liquid chromatography and capillary electrophoresis*. Amsterdam: Elsevier, 1995: 267-360.

[237] Hoffstetter-Kuhn S, Paulus, Gassmann E, Widmer M. Influence of borate complexation on the electrophoretic behavior of carbohydrates in capillary electrophoresis. *Anal Chem* 1991;63(15):1541-7.

[238] Oefner PJ, Chiesa C. Capillary Electrophoresis of Carbohydrates. *Glycobiology* 1994 Aug;4(4):397-412.

[239] Wu D, Regnier FE. Sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis of proteins using non-cross-linked polyacrylamide. *J Chromatogr* 1992 September;608(1-2):349-56.

[240] Domann PJ, Pardos-Pardos AC, Fernandes DL, Spencer DI, Radcliffe CM, Royle L, et al. Separation-based glycoproteomics approaches using fluorescent labels. *Proteomics* 2007 September;7(Suppl. 1):70-6.

[241] Compans RW, Klenk HD, Caliguir La, Choppin PW. Influenza Virus Proteins .1. Analysis of Polypeptides of Virion and Identification of Spike Glycoproteins. *Virology* 1970;42(4):880-&.

[242] Inkster MD, Hinshaw VS, Schulze IT. The Hemagglutinins of Duck and Human H1 Influenza-Viruses Differ in Sequence Conservation and in Glycosylation. *Journal of Virology* 1993 Dec;67(12):7436-43.

[243] Paulson JC. Glycoproteins - What Are the Sugar Chains For. *Trends in Biochemical Sciences* 1989 Jul;14(7):272-6.

[244] Opitz L, Salaklang J, Buttner H, Reichl U, Wolff MW. Lectin-affinity chromatography for downstream processing of MDCK cell culture derived human influenza A viruses. *Vaccine* 2007 Jan;25(5):939-47.

[245] Larsen RD, Rivera-Marrero LK, Ernst RD, Cummings RD, Lowe JB. Frameshift and nonsense mutations in a human genomic sequence homologous to a murine UDP-Gal:beta-D-Gal(1,4)-D-GlcNAc alpha (1,3)-galactosyltransferase cDNA. *The Journal of biological chemistry* 1990;265:7055-61.

[246] Kalbfuss B, Knoechlein A, Kröber T, Reichl U. Monitoring influenza virus content in vaccine production: Precise assays for the quantitation of hemagglutination and neuraminidase activity *Biologicals* 2008;36:145 - 61.

[247] Nayak DP, Reichl U. Neuraminidase activity assays for monitoring MDCK cell culture derived influenza virus. *Journal of Virological Methods* 2004;122:9-15.

[248] Brands R, Visser J, Medema J, Palache AM, van Scharrenburg GJM. Influvac: A safe Madin Darby Canine Kidney (MDCK) cell culture-based influenza vaccine. In: Brown F, Robertson JS, Schild GC, Wood JM, editors. *Inactivated influenza vaccines prepared in cell*

culture. Basel: Karger, 1999: 93-100.

[249] Nakamura K, Homma M. Protein synthesis in Vero cells abortively infected with influenza B virus. 1981;56(Pt 1):199-202. *Journal of General Virology* 1981 September;56(Pt1):199-202.

[250] Sandig V, Jordan I. Immortalized avian cell lines for virus production. Technical Report. Berlin: Probiogen AG; 2005.

[251] Tsai TF, Trusheim H, inventors; Making influenza virus vaccines without using eggs WO2008032219 (A2). 2008.

[252] Katz JM, Wang ML, Webster RG. Direct Sequencing of the Ha Gene of Influenza (H3n2) Virus in Original Clinical-Samples Reveals Sequence Identity with Mammalian Cell-Grown Virus. *Journal of Virology* 1990 Apr;64(4):1808-11.

[253] Robertson JS, Naeve CW, Webster RG, Bootman JS, Newman R, Schild GC. Alterations in the Hemagglutinin Associated with Adaptation of Influenza-B Virus to Growth in Eggs. *Virology* 1985;143(1):166-74.

[254] Robertson JS, Nicolson C, Bootman JS, Major D, Robertson EW, Wood JM. Sequence-Analysis of the Hemagglutinin (Ha) of Influenza-a (H1n1) Viruses Present in Clinical Material and Comparison with the Ha of Laboratory-Derived Virus. *Journal of General Virology* 1991 Nov;72:2671-7.

[255] Connor RJ, Kawaoka Y, Webster RG, Paulson JC. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology* 1994 November;205(1):17-23.

[256] Gambaryan AS, Robertson JS, Matrosovich MN. Effects of egg-adaptation on the receptor-binding properties of human influenza A and B viruses. *Virology* 1999 June;258(2):232-9.

[257] Chu VC, Whittaker GR. Influenza virus entry and infection require host cell N-linked glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004 Dec;101(52):18153-8.

[258] Hotchkiss A, Refino CJ, Leonard CK, O'Connor JV, Crowley C, McCabe J, et al. The influence of carbohydrate structure on the clearance of recombinant tissue-type plasminogen activator. *Thromb Haemost* 1988 October;60(2):255-61.

[259] James DC, Freedmann RB, Hoare M, Ogonah OW, Rooney BC, Larinov OA, et al. N-glycosylation of human interferon-g produced in different animal expression systems. *Bio/Technology* 1995;13:592-6.

[260] Spellman MW, Basa LJ, Leonard CK, Chakel JA, O'Connor JV, Wilson S, et al. Carbohydrate structures of human tissue plasminogen activator expressed in Chinese hamster ovary cells. *Journal of Biological Chemistry* 1989 August;264(24):14100-11.

[261] Gramer MJ, Goochee CF. Glycosidase Activities in Chinese-Hamster Ovary Cell Lysate and Cell-Culture Supernatant. *Biotechnol Prog* 1993 Jul-Aug;9(4):366-73.

[262] Gramer MJ, Goochee CF. Glycosidase Activities of the 293 and Ns0 Cell-Lines, and of an Antibody-Producing Hybridoma Cell-Line. *Biotechnol Bioeng* 1994 Mar;43(5):423-8.

[263] Lively MR, Hale C, Boyce S, Keen MJ, Phillips J. Glycosylation and biological activity of CAMPATH-1H expressed in different cell lines and grown under different culture conditions. *Glycobiology* 1995 December;5(8):813-22.

[264] Moellering RC, et al. Electrophoretic Differences in Mab Expressed in Three Media. *BioPharm* 1990:30-8.

[265] Curling EM, Hayter PM, Baines AJ, Bull AT, Gull K, Strange PG, et al. Recombinant human interferon-gamma. Differences in glycosylation and proteolytic processing lead to heterogeneity in batch culture. *Biochemical Journal* 1990 December;272(2):333-7.

[266] Hayter PM, Curling EM, Baines AJ, Jenkins N, Salmon I, Strange PG, et al. Glucose-limited chemostat culture of Chinese hamster ovary cells producing recombinant human interferon-gamma. *Biotechnol Bioeng* 1992 February;39(3):327-35.

[267] Nyberg GB, Balcarcel RR, Follstad BD. Metabolic effects on recombinant interferon-

gamma glycosylation in continuous culture of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* 1999;62(3):336-47.

[268] Gawlitzek M, Ryll T, Lofgren J, Sliwkowski MB. Ammonium alters N-glycan structures of recombinant TNFR-IgG: degradative versus biosynthetic mechanisms. *Biotechnol Bioeng* 2000 June;68(6):637-46.

[269] Donaldson M, Wood HA, Kulakosky PC. Glycosylation of a recombinant protein in the Tn5B1-4 insect cell line: Influence of ammonia, time of harvest, temperature, and dissolved oxygen. *Biotechnol Bioeng* 1999;63(3):255-62.

[270] Rothman RJ, Warren L, Vliegenthart JF, Härd KJ. Clonal analysis of the glycosylation of immunoglobulin G secreted by murine hybridomas. *Biochemistry* 1989 (); February;28(3):1377-84.

[271] Kunkel JP, Jan DC J, Jamieson JC, Butler M. Dissolved oxygen concentration in serum-free continuous culture affects N-linked glycosylation of a monoclonal antibody. *J Biotechnol* 1998 Jun 62(1):55-71.

[272] Gramer MJ, Goochee CF, Chock VY, Brousseau DT, Sliwkowski MB. Removal of Sialic-Acid from a Glycoprotein in Cho Cell-Culture Supernatant by Action of an Extracellular Cho Cell Sialidase. *Bio-Technology* 1995 Jul;13(7):692-8.

[273] Wong DCF, Wong KTK, Lin Tang Goh LT, Heng CK, Yap MGS. Impact of dynamic online fed-batch strategies on metabolism, productivity and N-glycosylation quality in CHO cell cultures. *Biotechnol Bioeng* 2005;89(2):164-77.

[274] Budowsky EI, Friedman EA, Zheleznova NV, Noskov FS. Principles of selective inactivation of viral genome. VI. Inactivation of the infectivity of the influenza virus by the action of beta-propiolactone. *Vaccine* 1991 June;9(6):398-402.

[275] LoGrippo GA. Investigations of Use of Beta-Propiolactone in Virus Inactivation. *Ann NY Acad Sci* 1960 January;83:578-94.

[276] LoGrippo GA. Investigations of the use of beta-propiolactone in virus inactivation. *Ann N Y Acad Sci* 1960 January;83:578-94.

[277] LoGrippo GA, Hartman FW. Antigenicity of beta-propiolactone-inactivated virus vaccines. *Journal of Immunology* 1955 August;75(2):123-8.

[278] Sever JL, Castellano GA, Pelon W, Huebner RJ, Wolman F. Inactivation of the infectivity of viral hemagglutinating antigens with the use of betaprone. *J Lab Clin Med* 1964 December;64:983-8.

[279] Colburn NH, Boutwell RK. The in vivo binding of beta-propiolactone to mouse skin DNA, RNA, and protein. *Cancer Res* 1968 April;28(4):642-52.

[280] Gresham TL, Jansen JE, Shaver FW, Bankert RA, Fiedorek FT. β -Propiolactone. XI. Reactions with Ammonia and Amines. *Journal of the American Chemical Society* 1951 July;73(7):3168-71.

[281] Gresham TL, Jansen JE, Shaver FW. β -Propiolactone. III. Reactions with Dithiocarbamic Acids, their Salts and Thiourea. *Journal of the American Chemical Society* 1948 March;70(3):1001-2.

[282] Gresham TL, Jansen JE, Shaver FW, Frederick MR, Fiedorek FT, Bankert RA, et al. β -Propiolactone. XIII. Reactions with Sodium Nitrite, Sodium Dithionite, Sodium Cyanide, Sodium Thiocyanate, Sodium Succinimide and Aryl Sulfinic Acids and Their Salts¹. *Journal of the American Chemical Society* 1952 March;74(5):1323-5.

[283] Gresham TL, Jansen JE, Shaver FW, Gregory JT. β -Propiolactone. II. Reactions with Salts of Inorganic Acids. *Journal of the American Chemical Society* 1948 March;70(3):999-1001.

[284] Wood LJ, Breithaupt Jr LJ. Reactions Between Dry Inorganic Salts. VIII. A Refractive Index Study of Solid Solutions Formed by the Reciprocal System $RbCl + KBr$ & $RbBr + KCl$. *Journal of the American Chemical Society* 1952 May;74(9):2355-9.

[285] Gresham TL, Jansen JE, Shaver FW, Bankert RA, Beears WL, Prendergast MG. β -

- Propiolactone. VI. Reactions with Phenols, Thiophenols and their Salts. *Journal of the American Chemical Society* 1949;71(2):661-3.
- [286] Gresham TL, Jansen JE, Shaver FW. β -Propiolactone. IV1,2 Reactions with Salts of Carboxylic Acids. *Journal of the American Chemical Society* 1948 March;70(3):1003-4.
- [287] Stephan W, Haug E. Unterschiedliche Wirksamkeit von 8-Propiolacton bei der Sterilisation von esterase-aktiven und -inaktiven Seren und Plasmen. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd InfektionskrHyg Abt 1* 1970;215:381-5.
- [288] Katz JM, Naeve CW, Webster RG. Host Cell-Mediated Variation in H3n2 Influenza-Viruses. *Virology* 1987 Feb;156(2):386-95.
- [289] Katz JM, Webster RG. Efficacy of Inactivated Influenza-a Virus (H3n2) Vaccines Grown in Mammalian-Cells or Embryonated Eggs. *J Infect Dis* 1989 Aug;160(2):191-9.
- [290] Rajakumar A, Swierkosz EM, Schulze IT. Sequence of an influenza-virus hemagglutinin determined directly from a clinical-sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990 June;87:4154-8.
- [291] Wood JM, Oxford JS, Dunleavy U, Newman RW, Major D, Robertson JS. Influenza-a (H1n1) Vaccine Efficacy in Animal-Models Is Influenced by 2 Amino-Acid Substitutions in the Hemagglutinin Molecule. *Virology* 1989 Jul;171(1):214-21.
- [292] Newman RW, Jennings R, Major DL, Robertson JS, Jenkins R, Potter CW, et al. Immune-Response of Human Volunteers and Animals to Vaccination with Egg-Grown Influenza-a (H1n1) Virus Is Influenced by 3 Amino-Acid Substitutions in the Hemagglutinin Molecule. *Vaccine* 1993 Mar;11(4):400-6.
- [293] Oxford JS, Corcoran T, Knott R, Bates J, Bartolomei O, Major D. Serological studies with influenza-A(H1N1) viruses cultivated in eggs or in a canine kidneycell line (MDCK). *BullWorld Health Organ* 1987;65(2):181-7.
- [294] Gitelman AK, Kaverin NV, Kharitonov IG, Rudneva IA, Sklyanskaya EL, Zhdanov VM. Dissociation of the Hemagglutination Inhibition and the Infectivity Neutralization in the Reactions of Influenza a-Ussr-90-77 (H1n1) Virus Variants with Monoclonal-Antibodies. *Journal of General Virology* 1986 Oct;67:2247-51.
- [295] Alymova IV, Kodihalli S, Govorkova EA, Fanget B, Gerdil C, Webster RG. Immunogenicity and protective efficacy in mice of influenza B virus vaccines grown in mammalian cells or embryonated chicken eggs. *Journal of Virology* 1998 May;72(5):4472-7.
- [296] Saito T, Nakaya Y, Suzuki T, Ito R, Saito T, Saito H, et al. Antigenic alteration of influenza B virus associated with loss of a glycosylation site due to host-cell adaptation. *J Med Virol* 2004 Oct;74(2):336-43.
- [297] Dube DH, Bertozzi CR. Glycans in cancer and inflammation--potential for therapeutics and diagnostics. *Nat Rev Drug Discov* 2005 June;4(6):477-88.
- [298] Kobata A, Amano J. Altered glycosylation of proteins produced by malignant cells, and application for the diagnosis and immunotherapy of tumours. *Immunol Cell Biol* 2005 August;83(4):429-39.
- [299] Agranoff D, Fernandez-Reyes D, Papadopoulos MC, Rojas SA, Herbst M, Loosemore A, et al. Identification of diagnostic markers for tuberculosis by proteomic fingerprinting of serum. *Lancet* 2006 September;368(9540):1012-21.
- [300] Kang X, Xu Y, Wu X, Liang Y, Wang C, Guo J, et al. Proteomic fingerprints for potential application to early diagnosis of severe acute respiratory syndrome. *Clin Chem* 2005 January;51(1):56-64.
- [301] Keidel E, Brunner A, Halder T, Suckau D, Martin S, Kellermann J, et al. P162-T Plasma Proteomics of Colon Cancer Patients—The Individual Regulation of Protein Isoforms Identified by the ICPL-Technology. *J Biomol Tech* 2007 February;18(1):56-7.

9 EIGENE ARBEITEN

Publikationen

- 1) Schwarzer, J.; Rapp, E.; Reichl, U. (2008), N-Glycan Analysis by Capillary Gel Electrophoresis – Profiling Influenza A Virus Hemagglutinin N-Glycosylation during Vaccine Production; *Electrophoresis*, Vol. 29 (20), 4203-4214
- 2) Schwarzer, J.; Rapp, E.; Hennig, R.; Genzel, Y.; Jordan, I.; Sandig, V.; Reichl, U. (2009), Glycan analysis in cell culture-based influenza vaccine production : Influence of host cell line and virus strain on the glycosylation pattern of viral hemagglutinin, *Vaccine*, Vol. 27 (32), 2712-2722
- 3) Genzel, Y.; Dietzsch, C.; Rapp, E.; Schwarzer, J.; Reichl, U. (2010), MDCK and Vero cells for influenza virus vaccine production: a one-to-one comparison up to lab-scale bioreactor cultivation; *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 88 (2), 461-475
- 4) Bock, A.; Schulze-Horsel, J.; Schwarzer, J.; Rapp, E.; Genzel, Y.; Reichl, U. (2010) High-density Microcarrier Cell Cultures for Influenza Virus Production, *Biotechnology Progress*, in press

Proceedings

- 1) Schwarzer, J.; Rapp, E. & Reichl, U.; "Glycosylation of Influenza A Virus Hemagglutinin" in Proceedings from the 20th ESACT meeting: Cells & Culture in June 2007, Dresden, Germany. Ed.: T. Noll; Springer. 2010, pp. 621-623.

Vorträge

- 1) Wolff, M. W.; Salaklang, J.; Opitz, L.; Schwarzer, J.; Rapp, E.; Kalbfuss, B.; Reichl, U. (2005), Development of a lectin-affinity chromatography step for the downstream processing of influenza virus vaccines; 30.10.-04.11.2005 AICHE Annual Meeting 2005 in Cincinnati, Ohio, USA
- 2) Rapp, E.; Schwarzer, J.; Reichl, U. (2007), Elucidation of the Influenza A Virus Glycosylation Patterns with Respect to Vaccine Production Down to the Lower Zeptomolar Range; 14.01.-18.01.2007 21st International Symposium on MicroScale Bioseparations (MSB) in Vancouver, BC, Canada
- 3) Rapp, E.; Schwarzer, J.; Reichl, U. (2007), Characterisation of Glycosylation Patterns Utilizing a DNA-Sequencer and a MALDI-TOF Mass Spectrometer; 22.04.2007-25.04.2007 7th Carbohydrate Bioengineering Meeting (CBM7) in Braunschweig, Germany
- 4) Rapp, E.; Schwarzer, J.; Reichl, U. (2007), Characterisation of Glycosylation Patterns Utilizing a DNA-Sequencer and Mass Spectrometry; 02.09.-07.09.2007 14th

European Carbohydrate Symposium, Lübeck, Germany

- 5) Genzel, Y.; Bock, A.; Schwarzer, J.; Dietzsch, C.; Reichl, U. (2007), Implementation of analytical methods during upstream processing for an influenza A virus production process; 04.12.-05.12.2007 Vaccine Production: Analytical Methods, Characterisation, Scale-up and Manufacturing in Cologne, Germany
- 6) Schwarzer, J.; Rapp, E.; Reichl, U. (2007) N-glycan analysis method for cell culture derived influenza virus hemagglutinin; 04.11.-06.11.2007 Joint Meeting 2007 in Lille, France
- 7) Rapp, E.; Schwarzer, J.; Reichl, U. (2008), Characterization of the Influenza A Virus Hemagglutinin Glycosylation Pattern with Respect to Vaccine Production - Utilizing Capillary Gel Electrophoresis with Laser Induced Fluorescence Detection, 27.07.-01.08.2008 24th International Carbohydrate Symposium (ICS) in Oslo Norway

Posterpräsentationen

- 1) Schwarzer, J.; Wolff, M. W.; Rapp, E.; Schmidt, J. K.; Opitz, L.; Reichl, U. (2004), Glycosylation of Influenza A Virus Hemagglutinin; 07.03.-12.03.2004 CCE IX (Cell Culture Engineering IX) 2004 in Riviera Maya, Cancun, QR, Mexico
- 2) Schwarzer, J.; Wolff, M. W.; Rapp, E.; Schmidt, J. K.; Reichl, U. (2005), Glycosylation of Influenza A Virus Hemagglutinin, 30.10.-04.11.2005 AICHE Annual Meeting 2005 in Cincinnati, Ohio, USA
- 3) Schwarzer, J.; Rapp, E.; Schmidt, J. K.; Reichl, U. (2006), Glycosylation of Influenza A Virus Hemagglutinin; 27.08.-30.08.2006 6th European Symposium on Biochemical Engineering Science (ESBES) in Salzburg, Austria
- 4) Schwarzer, J.; Rapp, E.; Reichl, U. (2007), Analysis of Influenza A Virus Hemagglutinin (HA) Glycosylation by Capillary Gel electrophoresis – Laser induced Fluorescence; 14.01.-18.01.2007 21st International Symposium on MicroScale Bioseparations (MSB) in Vancouver, BC, Canada
- 5) Rapp, E.; Schwarzer, J.; Reichl, U. (2007), Elucidation of the Influenza A Virus Glycosylation-Patterns with Respect to Vaccine-Production Down to the Zeptomolar Range; 22.02.-23.02.2007 3rd Glycan Forum Berlin in Berlin-Dahlem, Germany
- 6) Schwarzer, J.; Rapp, E.; Reichl, U. (2007), Glycosylation of Influenza A Virus Hemagglutinin; 30.05.-01.06.2007 BioPerspectives 2007 in Köln, Germany
- 7) Schwarzer, J.; Rapp, E.; Reichl, U. (2007), Glycosylation of Influenza A Virus Hemagglutinin; 22.04.2007-25.04.2007 7th Carbohydrate Bioengineering Meeting (CBM7) in Braunschweig, Germany
- 8) Schwarzer, J.; Rapp, E.; Reichl, U. (2007), Glycosylation of Influenza A Virus Hemagglutinin; 17.06.-20.06.2007 20th ESACT in Dresden, Germany
- 9) Schwarzer, J.; Rapp, E.; Reichl, U. 2007 Glycosylation of Influenza A Virus Hemagglutinin; 15.07.-19.07.2007 Biochemical Engineering XV in Québec City,

Canada,

- 10) Schwarzer, J.; Rapp, E.; Reichl, U. (2007), Analysis of Influenza Virus Hemagglutinin N-Glycosylation - Influence of Upstream Process Conditions; 09.12.-11.12.2007 Vaccine Congress in Amsterdam, The Netherlands
- 11) Bock, A.; Schulze Horsel, J.; Schwarzer, J.; Genzel, Y.; Reichl, U. (2008), The influence of elevated oxygen partial pressure on specific virus productivities in an influenza vaccine process; 01.06.-06.06.2008 Vaccine Technology II in Albufeira, Portugal
- 12) Schwarzer, J.; Rapp, E.; Reichl, U. (2008), Influence of Upstream Process Conditions on Influenza A Virus Hemagglutinin N-Glycosylation Pattern during Vaccine Production; 22.05.-24.05.2008 4th Glycan Forum in Berlin, Germany
- 13) Rath, A.; Lohr, V.; Genzel, Y.; Schwarzer, J.; Rapp, E.; Sandig, V.; Jordan, I.; Reichl, U. (2008), Influenza and modified vaccinia Ankara (MVA) production in avian designer cells; 09.10.2008 Bioprospectives in Hannover, Germany,
- 14) Roedig, J.; Rapp, E.; Hennig, R.; Schwarzer, J.; Reichl, U. (2009), Optimized CGE-LIF-based glycan analysis for high-throughput applications; 07.06.-10.06.2009 21st ESACT in Dublin, Ireland
- 15) Roedig, J.; Rapp, E.; Schwarzer, J.; Genzel, Y.; Reichl, U. (2009), Impact of viral adaptation on the N-glycosylation pattern of Influenza A hemagglutinin, 08.09.-10.09.2009 Dechema 2009 in Mannheim, Germany

I. ANHANG

1. Verwendete Chemikalien und biologische Reagenzien

Tabelle I-1: Verwendete Chemikalien

<i>Chemikalie</i>	<i>Lieferant</i>	<i>Best.-Nr.</i>
3100 POP-6	Applied Biosystems, USA	4316357
8-Amino-1,3,6-Pyrenetrisulfsäure (APTS)	Sigma-Aldrich, Deutschland	A7222
Acetonitril (ACN)	Merck, Deutschland	1.000.031.000
Acetonitril Chromasolv LC-MS grade	Sigma-Aldrich, Deutschland	34967
Ameisensäure (FA)	Sigma-Aldrich, Deutschland	56302
Ammoniumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, Deutschland	28,509-9
Ammoniumhydrogencarbonat (NH ₄ HCO ₃) Ultra grade	Sigma-Aldrich, Deutschland	09830
Ammoniumsulfat	Merck, Deutschland	1.012.111.000
Bio-Gel P-2 Gel	Bio-Rad, Deutschland	150-4114
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Deutschland	B0126
Coomassie Brilliant Blau G250	Merck, Deutschland	1.154.440.025
Di-Kaliumhydrogenphosphat	SigmaUltra, Deutschland	P2222
Dithiothreitol (DTT)	Fluka, Deutschland	43817
Essigsäure 99-100 %	Merck, Deutschland	8.18755.2500
Ethanol (reinst)	AppliChem, Deutschland	A4885
Gene Scan TM-500 Rox Size Standard	Applied Biosystems, USA	401734
Glycerin	AppliChem, Deutschland	A1123,2500
Glycin	AppliChem, Deutschland	A1067,5000
Harnstoff	AppliChem, Deutschland	A1049,1000
HiDi Formamide	Applied Biosystems, USA	4311320
Iodacetamid (IAA)	SigmaUltra, Deutschland	I1149-5 g
Laufpuffer CGE 10x mit EDTA	Applied Biosystems, USA	402824
Kaliumchlorid	SigmaUltra, Deutschland	P9333
Kaliumdihydrogenphosphat	SigmaUltra, Deutschland	P5655
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Deutschland	S7653
Natriumcyonoborhydrid	Sigma-Aldrich, Deutschland	15.615-9

(NaBH ₃ CN)		
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich, Deutschland	S6297-1 kg
Natriumhydroxid	Merck, Deutschland	1.06482.1000
Mercapto-2-Ethanol	Merck, Deutschland	1.154.330.100
Methanol	Carl Roth GmbH, Deutschland	4627.2
ortho-Phosphorsäure 85 %	Merck, Deutschland	100573
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich, Deutschland	26641
Sephadex G-10	Sigma-Aldrich, Deutschland	G10120
Sephadex G-25	Sigma-Aldrich, Deutschland	G-2580
SDS	AppliChem, Deutschland	A1112,1000
Toyopearl HW-40F	Tosoh Corporation, Japan	19808
Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma-Aldrich, Deutschland	40967
Tris	Carl Roth GmbH, Deutschland	5429.3
Wasser Chromasolv LC-MS grade	Sigma-Aldrich, Deutschland	39253

Tabelle I-2: Verwendete biologische Reagenzien

<i>Reagenz</i>	<i>Lieferant</i>	<i>Best.-Nr.</i>
10% Tris-HCl SDS-Gele	Bio-Rad, Deutschland	161-1101EDU
α(1-2,3,6)-Mannosidase	Glyko, UK	GKX-5010
α(1-3,4,6)-Galaktosidase	Glyko, UK	GKX-5007
α(2-3,6,8,9) Neuraminidase	Sigma-Aldrich, Deutschland	N-3786
α-Fukosidase	Glyko, UK	GKX-5006
AEM	Gibco, UK	12582
β-Galaktosidase	Glyko, UK	GKX-5012
β-N-Acetylhexosaminidase	Glyko, UK	GKX-5003
Bovines Serum IgG	Sigma-Aldrich, Deutschland	I-9640
Bradfordreagenz	Bio-Rad, Deutschland	500-0006
BSA	Sigma-Aldrich, Deutschland	A3912- 100 g
Episerf	Gibco, UK	10732022
FCS	Gibco, UK #10270-106	3302P250922
GMEM Pulvermedium	Gibco, UK	22100-093
Glukose-Monohydrat	Sigma-Aldrich, Deutschland	49158
Glykan A2F	Glyko, UK	GKO-224301

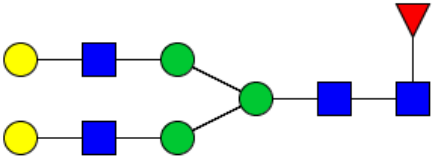
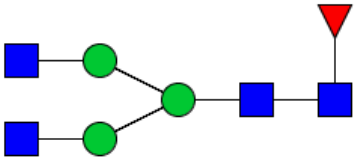
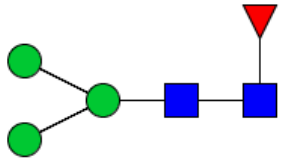
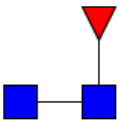

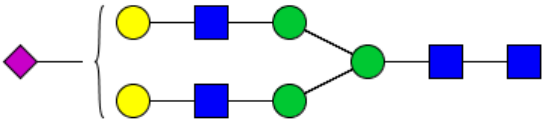
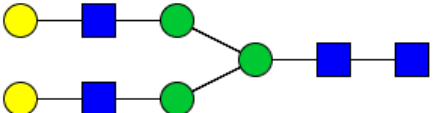
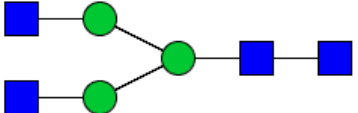
Glykan NA2	Glyko, UK	GKO-024300
Maltooligosaccharide	Sigma-Aldrich, Deutschland	M3639
MEM	Sigma-Aldrich, Deutschland	M2279
N-Acetyl-D-Glukosamine	Sigma-Aldrich, Deutschland	A-8625
N,N-Diacetylchitobiose	Sigma-Aldrich, Deutschland	D-1523
Pepton	International Diagnostics Group	MC33
PNGase F	Sigma-Aldrich, Deutschland	P7367-50UN
Roti-Mark Prestained (RotiMark)	Carl Roth GmbH, Deutschland	T852.1
RPMI	Sigma-Aldrich, Deutschland	R0883
Trypsin (Zellkultur)	Gibco, UK	27250-018
Trypsin (modified porcine) Sequencing grade	Promega, Deutschland	V5113

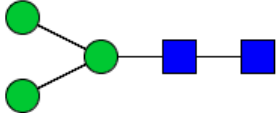


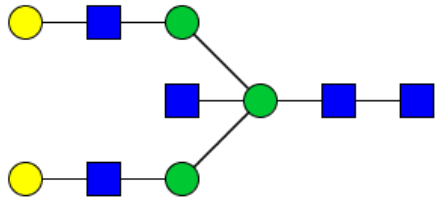
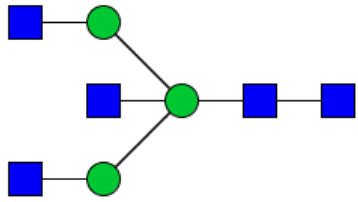
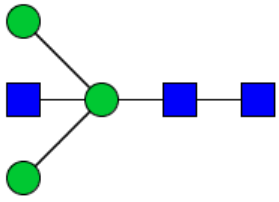
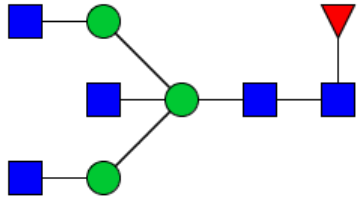
Tabelle I-3: Für Spike-Experimente verwendete N-Glykane

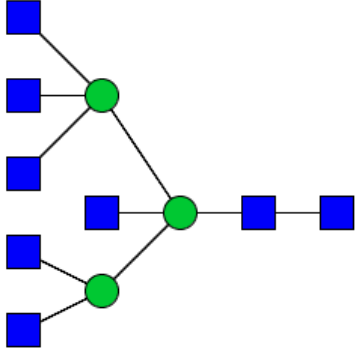
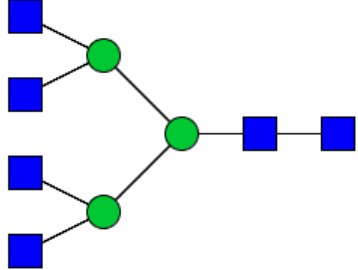
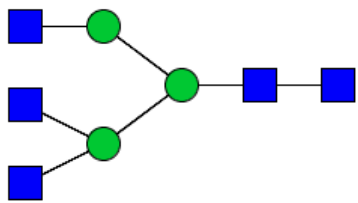
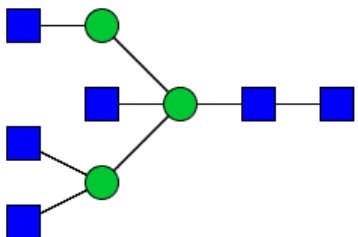
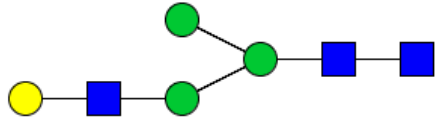
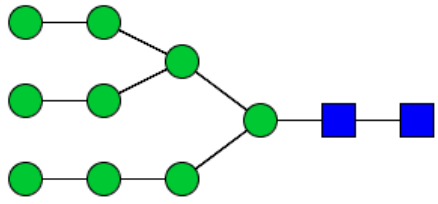
<i>Bezeichnung</i>	<i>Lieferant</i>	<i>Bestellnummer</i>
A2F	Sigma-Aldrich, Deutschland	M2800
A1	Ludger Glycotechnology, UK	CN-A1-10U
hybrid mit bisecting GlcNAc	Dextra-Laboratories, UK	MC0941
Man-7D ₃	Dextra-Laboratories, UK	MC0932
Man-9-Glykan	Sigma-Aldrich, Deutschland	M-9037
NA1(1-3)	Dextra-Laboratories, UK	C0740
NA2	Sigma-Aldrich, Deutschland	M5925
NA2B	Sigma-Aldrich, Deutschland	M2300
NGA2FB	Dextra-Laboratories, UK	C0980
NGA3	Dextra-Laboratories, UK	C0820
NGA3B	Dextra-Laboratories, UK	C0960
NGA4	Dextra-Laboratories, UK	C0940
NGA5B	Dextra-Laboratories, UK	C1160

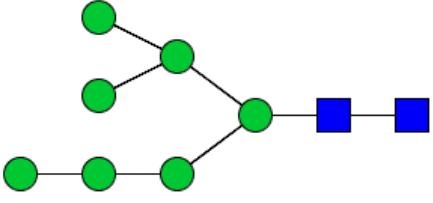
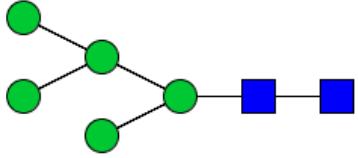
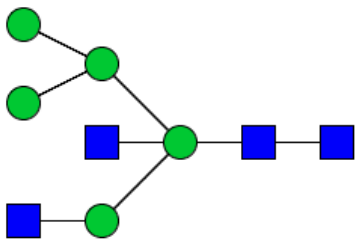
Tabelle I-4: Struktur ausgewählter N-Glykane, die für Spike-Experimente verwendet wurden

<i>Bezeichnung</i>	<i>Struktur</i>
A2F	

NA2F*	
NGA2F*	
fukosylierter Chitobiose-Kern*	
fukosylierte Chitobiose*	
fukosyliertes GlcNAc*	
A1	
NA2	
NGA2*	

Chitobiose-Kern *	
Chitobiose**	
GlcNAc**	
NA2B	
NGA2B*	
Chitobiose-Kern mit bisecting GlcNAc*	
NGA2FB	

<p>NGA5B</p>	
<p>NGA4</p>	
<p>NGA3</p>	
<p>NGA3B</p>	
<p>NA1(1-3)</p>	
<p>Man-9-Glykan</p>	

Man-7D ₃	
Man-5-Glykan	
hybrid mit bisecting GlcNAc	

* Strukturen wurden mit Hilfe des SED aus komplexeren Strukturen erzeugt

** Strukturen wurden mit Hilfe des SED aus komplexeren Strukturen erzeugt und auch von Sigma-Aldrich, Deutschland bezogen

2. Puffer und Lösungen

kolloidale Coomassie-Färbelösung

Coomassie Brilliant Blau Stammlösung (A)

- 5 g Coomassie Brilliant G-250
- 100 mL Milli-Q Wasser

kolloidale Coomassie Färbe-Stammlösung (B)

- 50 g Ammoniumsulfat
- 6 mL 85 % ortho-Phosphorsäure
- mit Milli-Q Wasser auf 490 mL auffüllen
- 10 mL Lösung (A) dazugeben

kolloidale Coomassie Färbelösung (C)

- 200 mL Lösung (B)
- 50 mL Methanol direkt vor Gebrauch der Lösung dazugeben

Fixierlösung

- 400 mL Ethanol (reinst)
- 75 mL Eisessig
- mit Milli-Q Wasser auf 1 L auffüllen

Laufpuffer SDS-PAGE (5x)

- 15,1 g Tris
- 72 g Glycin
- 5 g SDS
- mit Milli-Q Wasser auf 1 L auffüllen
- vor Gebrauch 1:5 mit Milli-Q Wasser verdünnen

PBS

- 40 g Natriumchlorid
- 1 g Kaliumchlorid
- 1 g Kaliumdihydrogenphosphat
- 5,75 g Di-Kaliumhydrogenphosphat
- mit Milli-Q Wasser auf 5 L auffüllen
- im Autoklaven (121°C, 20 min) sterilisieren

Probenpuffer nicht reduzierend 4x (für SDS-PAGE)

- 1 mL 1M Tris (finale Konzentration 125 mM)
- 3,2 mL SDS 10 % (final 4 %)
- 1,6 mL Glycerin (final 20 %)
- mit Milli-Q Wasser auf 8 mL auffüllen
- 3,84 g Harnstoff (finale Konzentration 8M)

Für reduzierenden Probenpuffer werden dem 4x nicht reduzierendem Probenpuffer 2 % Mercapto-2-Ethanol zugegeben.

3. Geräte und Materialien

Tabelle I-5: Verwendete Geräte und Materialien

<i>Gerät/Material</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Modell</i>
Autoklav	Thermo Scientific, USA	VARIOCLAV Typ 500 EP-Z
Autosampler	Agilent, Deutschland	micro-HPLC 1100 Series microWPS G1377A
Deep Well Platten	Millipore, Deutschland	MultiScreen Deep Well Solvinert Plate
DNA-Sequenzierer	Applied Biosystems, USA	Genetic Analyzer ABI PRISM 3100
Elektrospraynadel	New Objective, USA	ungecoatete SilicaTip™ (OD 360 µm / ID 20 µm/Tip ID 10 µm
HPLC Säule	Dionex, Deutschland	C ₁₈ -PepMap (75 µm ID * 150 mm)
HPLC Ventil	Agilent, Deutschland	MicroValve 2/10 G1163A
Kamera	Herolab, Deutschland	E.A.S.Y. 429K
Kapillar-HPLC	Agilent, Deutschland	1100 Series
Kapillar-HPLC Pumpe	Agilent, Deutschland	1100 Series CapPump, G1376A
Laserscanner	GE Healthcare, Deutschland	Typhoon TRIO Variable Mode Imager
Leuchtplatte	Raiser, Deutschland	prolite basic
Massenspektrometer	Applied Biosystems, USA	QSTAR XL™ (QqTOF)
Mikropipetten	Eppendorf, Deutschland	10 µL, 100 µL, 200 µL, 1 mL, 5 mL
Mikropipettenspitzen	Eppendorf, Deutschland	10 µL, 100 µL, 200 µL, 1 mL, 5 mL
Mikrotiterplatten	Corning, Deutschland	96 Well, transparent, V- Boden
Mikrotiterplatten	Greiner bio-one, Deutschland	96 Well, transparent, U- Boden
Mikrotiterplatten	Corning, Deutschland	96 Well, Klarbodenplatte, schwarz
MilliQ Anlage (Reinstwasseranlage)	Millipore, USA	Gradient A 10 Anlage
nanoHPLC	Agilent, Deutschland	1100 Series
nanoHPLC Pumpe	Agilent, Deutschland	1100 Series nanoPump, G2226A
Orbital-Schüttler	Heidolph Instruments, Deutschland	Polymax 1040
Pipetten	Eppendorf, Deutschland	1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Deutschland	Pipetus®
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Deutschland	0,5 mL, 1,5 mL
Reaktionsgefäße	Corning, Deutschland	1,5 mL, 2,2 mL

Rollerflaschen	Greiner bio-one, Deutschland	850 cm ²
Sterilbank	Heraeus, Deutschland	Herasafe
Stromversorgungsgerät	Bio-Rad, Deutschland	PowerPac
Thermomixer	Eppendorf, Deutschland	Thermomixer comfort
Ultraschallbad	VWR, Deutschland	Ultrasonic cleaner, USC6000
Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, Deutschland	Optima™ LE-80K
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman Coulter, Deutschland	OptiSeal Tube
Vakuumkonzentrator	Savant, USA	SpeedVac SPD121P
Vakuumkonzentrator	Savant, USA	Integrated SpeedVac System ISS100
Vorsäule HPLC	Dionex, Deutschland	C ₁₈ -PepMap (300 µm ID * 5 mm)
Xtracta	Biozym, Deutschland	#611002 Generation I und II
Zellkulturflaschen	Greiner bio-one, Deutschland	Cellstar [®] 75 cm ² , 175 cm ²
Zentrifuge	Thermo Electron, Deutschland	Heraeus Biofuge primo R
Zentrifugen- und Reaktionsgefäß	VWR, Deutschland	Falcon™, 50 mL
Zentrifugen- und Reaktionsgefäß	VWR, Deutschland	Superclear™, 50 mL

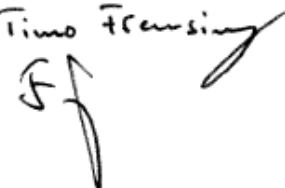
4. Arbeitsanweisungen

4.1 Hämmagglutinationstest zur Bestimmung des Gesamtvirusgehalts

SOP V/05 HA-Assay

Version: 2.2 (20.01.2011) Author: Verena Lohr

Approved:

Timo Freising


Hemagglutination assay (HA assay)

This SOP is based on the SOP written by Bernd Kalbfuß, Version 2.1 (04.12.2006)

1. Introduction

The HA assay is used to detect influenza virus particles (infectious and non-infectious). Influenza viruses carry the protein hemagglutinin (HA) on their surface which binds to specific glycosylation patterns on proteins which are located on the outer membrane of a cell. Thus, virus particles bind to cells and by using erythrocytes as cell system, influenza virus particles can cross-link erythrocytes with each other. This agglutination of erythrocytes can be observed in wells of a round bottom well plate as agglutinated erythrocytes sediment like a carpet at the bottom of the well instead of a point-like sedimentation.

By titrating the virus containing sample, one can determine a critical concentration of the sample at which this switch in sedimentation behaviour occurs. The negative logarithm of this dilution has been defined as the logarithmic HA titer (or simply log-titer) and is a measure for the concentration of influenza virus particles in the sample. The inverse of the dilution has been termed HA activity with units HAU/100 µL and is also supposed to be proportional to the number of virions in the sample.

There are two ways in which one can analyze the HA assay (procedure of pipetting is the same for both methods):

- i) a classical analysis in which the experimenter visually evaluates the HA titer
- ii) a photometric analysis which uses an automated procedure in order to minimize subjectivity and which includes an additional dilution step that increases sensitivity and reduces the error of the method

2. Materials

- Protective clothing: lab coat, protective gloves (Nitrile)
- Centrifuge (e.g. Primo R, Hera, N1.06)
- Sterile kryotubes
- Influenza virus samples (active or chemically inactivated)
- Internal HA standard (= control which is a chemically inactivated influenza virus sample with defined HA titer, stored at -80°C in N1.11, produced as described in SOP HA assay from Bernd Kalbfuß, Version 2.1 (04.12.2006))
- Erythrocyte suspension (conc. approximately 2.0×10^7 erythrocytes/mL, stored at 4 °C in N1.06, produced as described in SOP V/07 from Claudia Best (07.06.2007))

- Unsterile phosphate buffered saline, PBS (stored in N1.06, produced as described in SOP M/01 from Claudia Best (26.09.2007))
- Unsterile transparent 96well round bottom microtiter plates (stored in N1.06, e.g. Greiner Bio-One, Cat.No. 650101) + transparent disposable lids (stored in N1.06, e.g. Greiner Bio-One, Cat.No. 656101)
- 100 μ L micropipette + disposable tips
- 8x100 μ L or 8x300 μ L multichannel micropipette + disposable tips
- Electronic 8x1200 μ L multichannel pipette + 1250 μ L disposable tips
- 2 reservoirs for multichannel micropipette (PBS, erythrocyte suspension)
- Plate photometer (e.g. Tecan spectra, Tecan Instruments, N1.07)

3. Sample preparation

Infected cell culture with cells and without microcarrier should be filled directly into sterile kryotubes or other sterile tubes and centrifuged at 300xg for 5 min at 4 °C. If cells can not be settled at this g force, choose an appropriate centrifugation setting. After the centrifugation step transfer the supernatant into a new sterile kryotube and freeze at -80 °C.

4. Assay procedure

It is absolutely necessary to pipet exactly in this assay!!

Active samples have to be handled under S2 work bench! For handling outside the safety hood (e.g. when scanning the microtiter plate with the spectrometer), keep disinfectant or citric acid ready in case of accidental spillage!

4.1 Classical method

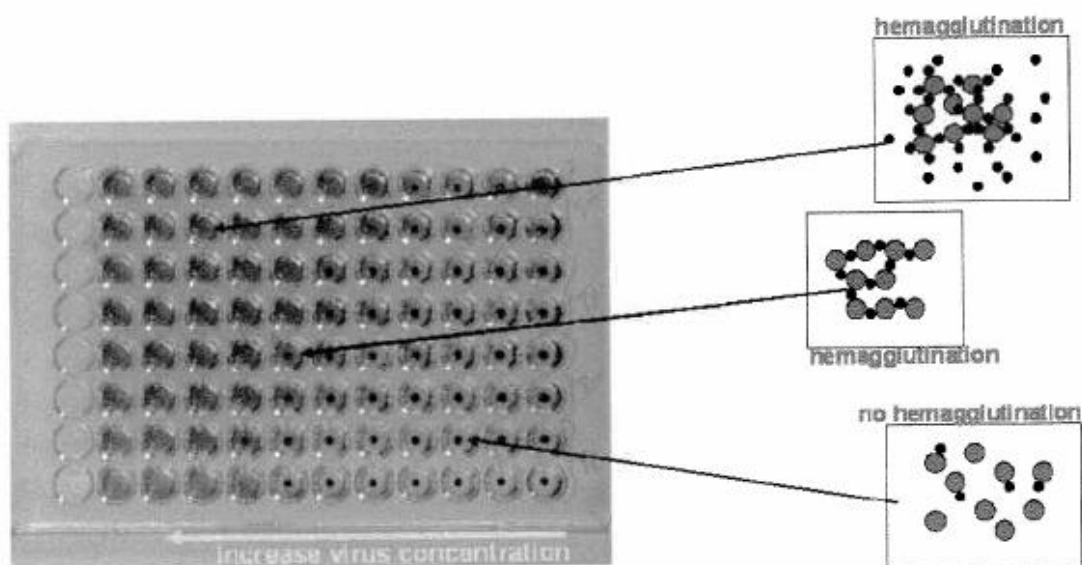
The titration of influenza virus by the classical method is based on the method described by Mahy and Kangro [1].

1. Pre-dilute samples which are known to be highly concentrated in PBS (all samples which have a HA activity above 3.0 log HA units/100 μ L should be diluted). Typically, a 1:10 pre-dilution is sufficient. Samples from cell culture normally do not require this pre-dilution. However, this has to be decided from the assay performer.
2. Fill the wells of column 2-12 with 100 μ L PBS each. Wells B, D, F and H of column 1 and 2 are filled with 29.3 μ L PBS.
3. Perform the following steps with a 100 μ L pipette under S2 work bench! Don't spray disinfectant onto reservoirs and microtiter plates.
The wells 1 and 2 of row A are filled with 100 μ L of internal HA standard. Beneath these, a pre-dilution of internal HA standard is prepared by adding 70.7 μ L of HA standard to wells 1 and 2 of row B. These 4 wells are prepared accordingly for the samples in rows 3 to 8. This means that on each plate 3 samples can be prepared. If there are more samples, an additional plate is necessary. Standard is necessary on every second plate.

Pipetting scheme for pipetting internal HA standard and samples onto microtiter plate

	1	2	3
A	100 μ L HA standard	100 μ L HA standard	...
B	70.7 μ L HA standard 29.3 μ L PBS	70.7 μ L HA standard 29.3 μ L PBS	...
C	100 μ L sample 1	100 μ L sample 1	...
D	70.7 μ L sample 1 29.3 μ L PBS	70.7 μ L sample 1 29.3 μ L PBS	...
E

- Mix column 2 three times with a multichannel pipette and transfer 100 μ L of column 2 to column 3. Empty the pipette tips completely once before the transfer. Mix again three times and continue the serial dilution until the end of the plate (column 12). The remaining 100 μ L should be disposed. Each well has to be filled with 100 μ L after finishing these steps. Add 100 μ L of erythrocyte suspension into each well by using an electronic multichannel pipette. Mix the suspension well before you start! Start pipetting at the column with the highest dilution (column 12). *For each plate new tips have to be used!*
- Each well which has been pipetted faulty should be marked as the values from these wells need to be eliminated during assay evaluation!
- Incubate the plates for at least 3 hours under the work bench. If the assay is not analyzable, incubation must be prolonged (over night if necessary).
- Evaluate the results visually. Therefore, mark every well which shows a perfect erythrocyte dot with a (●) and each imperfect dot with a (○). Record your findings by taking the document "AB-HA_Testauswertung_3.pdf". The last dilution with an imperfect dot is the end point of the titration and is expressed as log HA units per test volume (100 μ L). The inverse of this dilution gives the HA activity [HAU/100 μ L].
- Compare the measured titer of the internal standard with its nominal titer. The difference (*nominal-measured*) has to be added to the titer of each sample. If two or more standards were analyzed (e.g. because 3 plates were assayed) use the mean difference. If the measured titer of internal standard is more than 0.3 log HAU/100 μ L different from its nominal titer, re-do the whole assay!
- After evaluation of the titer microtiter plates scan them (see section 4.1) or dispose them into S2 waste!!



Scheme for determination of HA titers in micro titer plate (example shows HA titers from 1.2-2.1 log HA units/100 μ L in double determination)

Overview on dilutions and resulting HA titers (log HA units/100 μ L)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Dilution	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048
HA titer (100 μ L sample)	0	0.3	0.6	0.9	1.2	1.5	1.8	2.1	2.4	2.7	3.0	3.3
HA titer (70.7 μ L sample)	0.15	0.45	0.75	1.05	1.35	1.65	1.95	2.25	2.55	2.85	3.15	3.45

4.1.1 Points to consider

- The detection limit of this assay is 0.15 log HAU/100 μ L. This corresponds to approximately 2.0×10^7 virions/mL; assuming that the number of erythrocytes is proportional to the number of virus particles (each virus particle binds to one erythrocyte).
- The assay has been validated with a standard deviation of ± 0.03 log HAU/100 μ L which is the dilution error.
- The confidence interval for HA activity was determined to be $\pm 15\%$ (with a confidence level of 95 %).
- The validation has been made for the assay procedure which is described here. If you change singular steps in your procedure, be aware that validation is not valid then.
- Before you start with serious analyses, train yourself in pipetting accurately and precisely, e.g. by measuring standard samples several times.
- HA activity may suffer depending on sample treatment and storage conditions. Thus, do not freeze a measured sample and re-thaw it. Probably, HA titer has then been changed.

4.2 Photometric analysis

In order to minimize subjectivity (dependence on the experimenter), the titration result is evaluated photometrically using an automated procedure. However, this evaluation is restricted to samples with titer > 1.0 log HAU/100 μ L. Otherwise, sample titers have to be evaluated with the classical method.

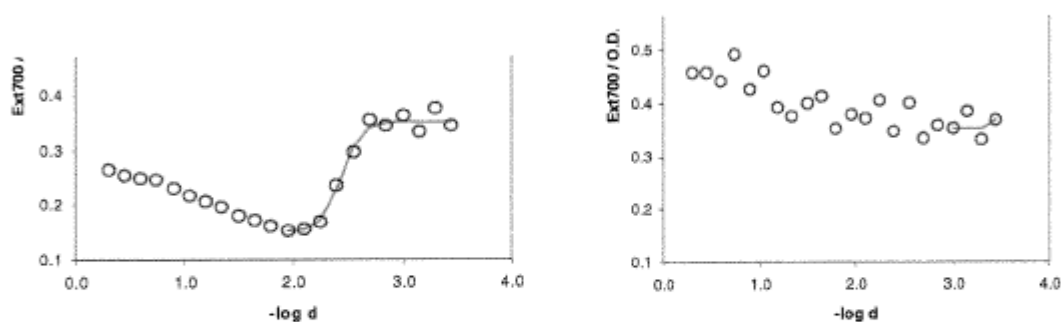
4.2.1 Measurement of extinction

1. Perform all steps which are described for the classical method.
2. Cover microtiter plates containing active virus samples with an appropriate lid.
3. Make sure that Tecan photometer is switched on. Open the software "iControl" and choose "HA protocol" from the list of used protocols. The settings should be defined as follows: Messfilter 700 nm, Referenzfilter none, 10 Blitze, Temperatur 0.0 $^{\circ}$ C, Schüttelmodus none. (Changes can be made by clicking on button "Messparameter definieren", but should not be done for standard HA protocol.)
4. After having inserted the plate into the reader, click the button "Messung starten". You will be asked for a file name first and to put your plate onto the tray afterwards. The measurement will be carried out immediately afterwards.
It is of utmost importance to remove either the lid before scanning and to remove any condensed water from the bottom of a microtiter plate before scanning!!
5. Save extinction data as Excel-file in the folder "/bpt/data/Tecan/HA_assay/2010/..." using the file name pattern "<Number>-<Date>-<Experimenter>.xls" (e.g. 145_10-03-31_CB). If more than one plate will be measured, let the excel file from the first plate open. Then, the results from the following plate will be saved as a new sheet in this file. You have to rename the sheets after your measurement in order to document which sheet belongs to which plate.
6. Repeat step 4 and 5 for each plate of the assay run.

4.2.2 Evaluation of HA titers

A data evaluation template (Excel-file) has been prepared. The evaluation procedure is described in the following. You have to enable macros for the sheet to work properly!

7. Open the data evaluation template ("bpt/Labor/HA_neu/Data_Evaluation_Template.xls") and save a **copy** in the appropriate folder (/bpt/usp/Labor/HA_neu/data/2010/...).
8. Import your extinction data. Therefore, copy all values and paste them into data-sheet. Delete extinction values of all wells that suffered from erroneous pipetting! As long as affected wells are not within the zone of transition, the assay result may be unaffected.
9. Adjust the sample names and dilutions in the "Report" sheet. Fill all empty header fields and transfer the remarks from the run protocol. Specify the internal standard used and the position of the internal standard (normally, position 1 and 9). If only one standard was measured, specify the same position twice.
10. Click "Evaluate" to start HA titer evaluation.
11. Check difference between nominal titer of the standard and the evaluated titer. Re-do the assay if both values differ more than 0.3 log HAU/100 μ L.
12. Check all fitted curves in the "Evaluation" sheet. If fitting of extinction values has not been made by a sigmoidal curve, then re-analyze the sample. Be careful, if this maybe is due to a low titer of the sample. Then take titers evaluated by the classical method.



Evaluation of the transition point by a Boltzmann function. Left: correct fitting, right: erroneous fitting which would lead to high titer evaluation if curve is not checked and rejected

13. Compare the evaluated titers with the results obtained by the classical method. The discrepancy should be less than 0.3 log HAU/100 μ L.
14. Save the document and make at least one hardcopy of the "Report" and "Evaluation" sheets. Documents are collected in a folder located in N1.07 and N0.13.

5. Sample storage

If samples are kept at below -70 °C, they can be stored up to five years without loss of HA activity. Anyway, this holds true for samples which have been prepared as described in this document (see sample preparation). After this period, it cannot be guaranteed that measured HA activities resemble the original values.

4.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Protein Estimation in Microtiter Plates

Standard Operating Procedure

Author: Bernd Kalbfuß (V 2.1)

Modifications: Lars Opitz, V 2.2

Version: 2.2 (07.03.08)

1 Introduction

The protein assay described in this SOP is based on the Coomassie dye-binding assay reported by Bradford [1] for the first time. Coomassie dye (Brilliant blue G250) binds to proteins via cationic (arginine, lysine side chains) and hydrophobic interactions. The formation of the dye-protein complex is accompanied by a shift in the absorption spectrum of the dye that can be observed as a change in colour from yellowish to blue. The sensitivity of the Bradford assay is considered somewhat higher than for other routine protein assays (Lowry, Hartree-Lowry or BCA assay) [2]. Like most protein assays it is highly subjective as dye-binding depends on functional groups/domains. The interference of many chemicals that are common to biological solutions and buffer systems has been well described [3]. The non-linear behaviour, however, requires adequate calibration. The dye reagent used in this protocol is purchased from Bio-Rad. The assay is performed according to their micro assay procedure. The reader is referred to the Bio-Rad instruction manual [3] for further information upon the assay.

2 Points to consider

- This procedure was developed for the quantitation of protein content in downstreamprocessing of influenza virus cultures. Feel free to adapt the procedure to your needs whenever this is necessary. But be aware, that the validation of this assay applies only to the procedure described in this document.
- The material samples are stored or prepared in matters. Common plastics like PE or PP show almost no adsorption of most proteins. Avoid glass whenever possible! The lower the concentration to detect and the lower the volume to surface ratio, the more you should care about surface adsorption.
- Similar assays with quantitation ranges of 0.04..0.09 mg ml⁻¹ and 0.2..0.7 mg ml⁻¹ have been established in this group and should be considered if only small amounts of sample are available.
- Some matrices used for standard preparation contain protein by themselves. If the protein concentration of a sample drops below this basic content, it can be estimated by extrapolation only.

3 Materials

The following instruments and supplies are required for the preparation of standard solutions and protein estimation according to the procedure described.

- Microtiter plate photometer „Tecan Spectra“ from Tecan Instruments
- Microtiter plate incubator „Thermomixer comfort“ from Eppendorf
- Protein Assay Dye Reagent Concentrate from Bio-Rad, Catalog #500-0006
- BSA, 95% from Sigma, Catalog #A-7906
- Transparent 96-well microtiter plates with flat bottom from Greiner, Catalog #655201
- PBS prepared according to current version of SOP
- 1.5 ml Eppendorf tubes

4 Preparation of Standard Solutions

The assay was found to allow for precise quantitation in the range of 5..40 $\mu\text{g ml}^{-1}$. An equidistant standard of 8 solutions is used for calibration. BSA was chosen as the standard protein, dissolved in the same matrix as the samples. If samples dissolved in Ex-Cell MDCK or GMEM have to be measured, they need to be pre-diluted 1:10 in PBS due to matrix interference. In this case the standard solutions have to be prepared in a 1:10 dilution with PBS of the same media.

The standard solutions need to be prepared freshly every time. **Do not freeze and reuse the standard solutions!** The preparation is described in the following:

1. The BSA stock solution may always be prepared in PBS and can be used for several standards dissolved in different matrices. Weigh the BSA and PBS into a beaker, immerse the weigh boat completely and stir the solution using a magnetic stirrer for at least 5 minutes.

BSA stock solution, 1 mg ml⁻¹	
BSA	100 mg
PBS	100 g

2. Prepare the first standard solution by diluting the stock on the balance.

Std-1, 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$	
BSA stock solution, 1 mg ml ⁻¹	2.5 g
Matrix	47.5 g

3. Every other standard solution is prepared starting from the first standard solution. Use a 5 ml micro pipette to transfer the specified volumes, mix well by inverting the tubes (**do not shake!**)

Std	c / $\mu\text{g ml}^{-1}$	V _{Std-1} / μl	V _{Matrix} / μl
Std-2	43.0	4300	700
Std-3	35.5	3550	1450
Std-4	28.5	2850	2150
Std-5	21.5	2150	2850
Std-6	14.5	1450	3550
Std-7	7.0	700	4300
Std-8	0	0	5000

The procedure results in 5 ml of each standard solution. Keep the solutions on ice or at 4 °C until they are used (**up to 2 days maximum!**)

5 Spiking of Samples

Although matrix interference is partially compensated by the concentration standard, every measurement in a badly defined matrix is prone to higher uncertainty. In order to increase the confidence in your measurements, it is sometimes useful to increase the concentration of the analyte artificially by a certain amount (called „spiking“). A second measurement should then result in the previous concentration plus the concentration increase due to the spike.

In general the spike volume should be kept as small as possible. As a rule of thumb, no more than 5% (v/v) of spike should be added to the sample. The difference in concentrations should be significant in terms of precision (so it can be measured) but the final concentration may not exceed the range of quantitation. If possible, approximately double the concentration of your sample. For convenience a set of standard spikes can be prepared in analogy to standard solutions. Use a 5 ml micro pipette to prepare standard spikes from the BSA stock solution. Prepare only the spikes you need.

Std	c / $\mu\text{g ml}^{-1}$	V _{Stock} / μl	V _{PBS} / μl
Spike-1	860	4300	700
Spike-2	710	3550	1450
Spike-3	570	2850	2150
Spike-4	430	2150	2850
Spike-5	290	1450	3550
Spike-6	140	700	4300

6 Assay Procedure

1. If frozen, thaw the samples at 37 °C in a water bath. Remove the tubes right before the liquid is thawed completely and store the solutions on ice. Alternatively, keep the samples at room temperature if the protein concentration is known to be stable and the samples are not used for further analysis.

1. The primary quantitation range of this assay was found to be 5...40 µg ml⁻¹ . Samples at higher concentrations need to be pre-diluted according to the table below. Predilution will be done in a working volume of 1ml in Eppendorf tubes using 200 µl and 1000 µl micropipettes . A diluent as close to the sample matrix as possible needs to be used. Samples in Ex-Cell MDCK or GMEM need to be pre-diluted 1:10 with PBS due to strong interference of medium components. The diluents have to be at the **same temperature** as the samples.

Dilution	Range / µg ml ⁻¹	V _{Sample} / µl	V _{Diluent} / µl
1 : 5	20 ... 250	200	800
1 : 10	40 ... 500	100	900
1 : 20	80 ... 1000	50	950

2. Write down the order of the samples and standard solutions in your hardcopy of the assay run protocol (see scheme below). Transfer 3 x 200 µl of each sample or standard solution to their designated wells in the microtiterplate. Use a 200 µl micropipette for the transfer. Make sure the solutions are homogeneous by inverting the tubes a couple of times first. For highly viscous samples it may be necessary to vortex (slow speed – avoid foam). Samples and standard solutions have to be at the **same temperature** before being transferred to the microtiter plate.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std-1	Std-1	Std-1	Sample-1	Sample-1	Sample-1						
B	Std-2	Std-2	Std-2	Sample-2	Sample-2	Sample-2						
C	Std-3	Std-3	Std-3						
D	Std-4	Std-4	Std-4									
E	Std-5	Std-5	Std-5									
F	Std-6	Std-6	Std-6									
G	Std-7	Std-7	Std-7									
H	Std-8	Std-8	Std-8									

3. Add 50 µl of Bradford dye solution to each well using a 5 ml multipette. Incubate the plates for 5 minutes at RT in an Eppendorf thermomixer comfort at 1000 rpm. The shaking was found sufficient to homogenate the reaction for viscosities close to that of water. For highly

viscous samples additional mixing using a pipette may be necessary.

4. Measure the absorption of light at a wavelength of 595 nm immediately afterwards. See the next section for instructions.

7 Measurement of Absorption

1. Make sure the Tecan photometer is switched on, then open the photometer application „easyWin basic“. Click the button „Messparameter definieren“ in the tool bar and change to the settings in the table below.

Meßfilter	595 nm
Referenzfilter	none
Temp.	0.0 °C
Schüttelmodus	High (outside)
Schüttelzeit	5 s

2. Click the button „Messung starten“. You will be asked for a name first and then to put your plate onto the tray. The plate will be shaken for 5 s and the measurement will be carried out immediately afterwards.

3. Export the data as ASCII-file by selecting the item „Exportieren“ in the menu „Datei“. Make sure that the values are separated by TAB and a decimal point (not a German comma) is used under „Optionen“. Save the result file into the folder “<flu_dir>/dsp/chemical analysis/data/protein” using the file name pattern “<Number>_<Date>_<Experimenter>.csv” (e.g. “001_02-04-04_Bernd Kalbfuss.asc”).

8 Evaluation of Experimental Data

A data evaluation template has been prepared using Microsoft Excel. The evaluation procedure is described in the following:

1. Open the data evaluation template (“<flu_dir>/dsp/templates/Protein Estimation – Data Evaluation Template.xls”) and save it into the folder “<flu_dir>/dsp/chemical analysis/data/protein” using the file name pattern

“<Number>_<Date>_<Experimenter>.xls” (e.g. “001_02-04-04_Bernd Kalbfuss.xls”).

2. Import your result file into Excel. Copy all values and paste them into the “Data” sheet using “Edit->Paste Special” with “Values” only checked.

3. Adjust sample names and dilutions in the “Report” sheet. Fill in the fields in the “Calibration” sheet and transfer the remarks from the run protocol. Select the proper sample matrix and specify the column that contains the standard (typically column 1). Click the button “Calibrate” to start parameter estimation. Check the “Curve Fit” and “Residuals”

charts whether optimization was successful and the residuals scatter evenly.

4. Save the document and make at least one hardcopy of the “Report” and “Calibration” sheets. Hardcopies and the run protocol are collected in the folder “DSP – Analytik” located in room N 0.13.

5. Add an entry to the control card located at “<flu_dir>/dsp/chemical analysis/control cards/Protein Estimation.xls”. Compare the parameters with those from previous runs and check whether they are reasonable.

It is planned to have automatic statistical checking in the future. This feature, however, has not been implemented yet.

9 References

1. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. (1976) 72:248-254.
2. Instruction Manual, Bio-Rad Protein Assay. Bio-Rad, <http://www.biorad.com>.
3. Coligan JE. Current Protocols in Protein Science, Assays for Total Protein (Unit 3.4). Wiley, Brooklyn NY (1995).

4.3 Bestimmung des TCID₅₀

Arbeitsanweisung V/08 Version 2.1

Datum: 2.06.08

Autor: Iona Behrendt

geprüft:

geändert: 26.09.2011

Autor: Britta Isken

geprüft:

Bestimmung des TCID₅₀

1.0 Ziel

Bestimmung der Virusverdünnung, bei der 50% der adhärennten Zellen infiziert werden.

2.0 Material

2.1. Zellanzucht und Virusvermehrung

- 4-8 Tage alte konfluente MDCK-Zellen aus Zellkulturflaschen (T175 oder RF)
- PBS steril (Arbeitsanweisung Nr. M/01)
- Trypsin 10000 BAEE / mL in Milli-Q-Wasser, sterilfiltriert (Trypsin, Sigma, Bestell-Nr. T-7409) Lagerung bei -70 °C für Virusinfektion

- Zellkulturmedium (GMEM + 1% Lab-M-Pepton + 10% FCS) siehe Arbeitsanweisung Nr. M/04
- Virusmedium (GMEM + 1% Lab-M-Pepton) siehe Arbeitsanweisung Nr. M/04
- Gentamicin 10 mg / mL (Invitrogen, Bestell-Nr. 11130-036) Lagerung: Raumtemperatur
- 96-Wellplatten 400 µL Inhalt steril mit flachem Boden mit Deckel (für Zellkultur) (Cellstar, Greiner bio-one, Bestell-Nr. 655180)
(für jede Probe wird eine Wellplatte benötigt)
- Reaktionsgefäße 1,5 mL, sterilisiert für Verdünnungsreihen
- sterile Pipetten, Pipettierhilfe
- 100 µL Pipette
- Elektronische Einkanalpipette 1 mL (Eppendorf)
- Elektronische Mehrkanalpipette 1250 µL (Eppendorf)
- Pipettenspitzen 100 µL (Plastibrand, steril)
- Pipettenspitzen 1250µL (Eppendorf, steril)
- Multipette mit Combitips 10 ml (Eppendorf, Combitips plus biopure)
- 1 sterile Schottflaschen (250 oder 500 mL)
- 4 Pipettierbehälter, sterilisiert
- 2 kleine Laborschalen, sterilisiert
- Warnhinweisaufkleber: Biogefährdend

2.2. Fixierung und Färbung

- 80%ige Acetonlsg. in Wasser (Aceton, p.A.)
- Primärantikörper entsprechend dem zu testenden Virus
z. B. - (Equine Influenza A Ziegenserum, final bleed, goat 613, vom 2.08.01, nano Tools)(1:100 mit PBS verdünnt)
 - Influenza Anti A/Wisconsin/67/2005 H₃N₂ (HA Serum sheep) von NIBSC
 - Influenza Anti B/Malaysia/2506/2004 (HA Serum sheep) von NIBSC
 - Influenza Anti A/PR/8/34 H₁N₁ (HA Serum sheep) von NIBSC
- PBS steril (Arbeitsanweisung Nr. M/01)
- konfluent bewachsene Zellkulturflaschen (T75 oder RF)
- Sekundärantikörper (Invitrogen, Bestellnr.: A-11015)
- 100 µL 8-Kanal-Pipette mit Pipettenspitzen
- Laborschale
- 3 Pipettierbehälter
- Entsorgungsbehälter Aceton

3.0 Methode

Anmerkung zur Generierung der Proben: Standardmäßig wird der Infektionsüberstand vor dem Wegfrieren nicht zentrifugiert, in Ausnahmefällen (wie MDCK.SUS2 Zellen) kann eine Zentrifugation bis 5000 x g durchgeführt werden, da sie keinen Einfluss auf den TCID₅₀ Wert hat.

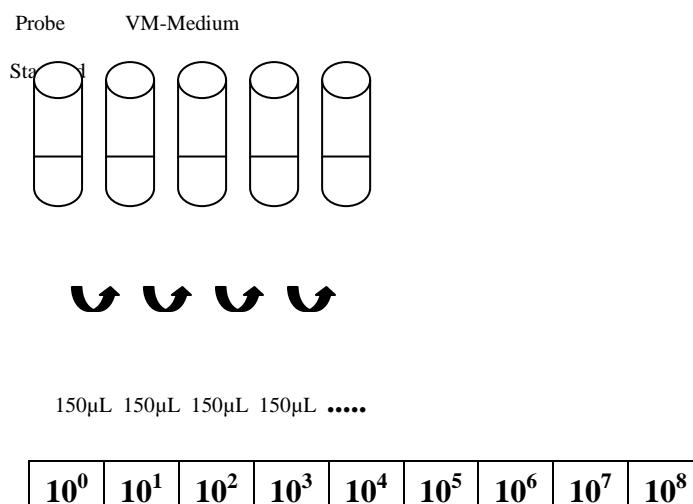
3.1 Zellanzucht und Virusvermehrung

A) Zellanzucht

- konfluente MDCK-Zellen aus Zellkulturflaschen 3-mal mit PBS waschen und mit der vorgeschriebenen Menge Trypsin (1 mg/mL) 20 min bei 37 °C abtrypsinieren, mit Z-Medium abstoppen (siehe Arbeitsanweisung Nr. Z/04)
- Zellkulturmedium mit Gentamicin vermischen (100 mL Zellkulturmedium mit 1 mL Gentamicin)
- abtrypsinierete Zellen mit angesetztem Zellkulturmedium auf eine Zellzahl von $4 - 5 \cdot 10^5$ Zellen / mL verdünnen (siehe Arbeitsanweisung Zellzahlbestimmung)
- 10 mL der Zellsuspension werden ca. für eine Zellkulturplatte benötigt
- je 100 μ L der Zellsuspension werden mit der Elektronischen 8-Kanalpipette in jedes Well der Zellkulturplatte pipettiert
- die Zellen 1 - 2 Tage bei 37 °C mit 5 % CO₂ inkubieren (mikroskopische Beurteilung der Konfluenz der Zellen → müssen dicht bewachsen sein – wenn dies nicht der Fall sein sollte, ist der Versuch hier abzubrechen)

B) Herstellen der Virusverdünnung

- Virusmedium mit Trypsin und Gentamicin versetzen, 100 mL Medium + 20 μ L Trypsin + 1,0 mL Gentamicin (100 mL VM reichen für ca. 10 Verdünnungsreihen) → VM
- Je 900 μ L des Virusmediums in 8 – 10 Eppendorfcups (je nach benötigter Verdünnungsstufen) pipettieren. Virusverdünnung nach dem folgenden Schema in Eppendorfcups herstellen: mit einer Eppendorfpipette 100 μ L aus der zu bestimmenden Probe oder dem Standard entnehmen und in das erste Eppendorfcup geben, 5 mal durch auf- und abpipettieren mischen, mit einer neuen Pipettenspitze 100 μ L in das nächste Eppendorfcup geben, fortfahren bis zum Ende.



C) Virusvermehrung

- die Zellkulturplatten 2 mal mit je 100 μ L PBS je Well mit der Elektronischen 8-Kanalpipette waschen (entleeren: in Laborschale ausschütten)

- mit einer Eppendorfpipette je 100 µL der Virusverdünnung auf je 8 Wells der Zellkulturplatte geben (mit der höchsten Verdünnungsstufe beginnen)
- in die Reihen 1, 2, 11 und 12 werden nur je 100 µL Virusmedium (mit Trypsin + Gentamicin) je Well gegeben (diese Wells dienen als Nullkontrolle, Randeffekte können dann ausgeschlossen werden)
- einzusetzende Verdünnungsstufen:
 bei einem HA über 2,7: $10^3 - 10^{10}$
 bei einem HA von 2,1 bis 2,7 (Standard, Saatvirus für Fermentationen) : $10^1 - 10^8$
 bei einem HA unter 2,1: $10^0 - 10^7$

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Virus-Medium	Virus-Medium	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	Virus-Medium	Virus-Medium
B	Virus-Medium	Virus-Medium	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	Virus-Medium	Virus-Medium
C	Virus-Medium	Virus-Medium	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	Virus-Medium	Virus-Medium
D	Virus-Medium	Virus-Medium	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	Virus-Medium	Virus-Medium
E	Virus-Medium	Virus-Medium	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	Virus-Medium	Virus-Medium
F	Virus-Medium	Virus-Medium	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	Virus-Medium	Virus-Medium
G	Virus-Medium	Virus-Medium	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	Virus-Medium	Virus-Medium
H	Virus-Medium	Virus-Medium	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	Virus-Medium	Virus-Medium

- die Platten mit Virus mit einem Warnhinweis versehen und 1 Tag bei 37 °C mit 5 % CO₂ inkubieren

D) Trypsinzugabe

- Virusmedium mit Trypsin und Gentamicin versetzen (100 mL Medium + 40 µL Trypsin + 1 mL Gentamicin)
- Je 100 µL dieses Mediums in jedes Well pipettieren – Elektronische 8-Kanalpipette, darauf achten dass kein Virus verschleppt wird (von rechts nach links – von der höchsten Verdünnungsstufe zur niedrigsten pipettieren, Reihe für Reihe) nach jeder Platte die Pipettenspitzen werfen
- die Virusplatten nochmals 1 Tag bei 37 °C mit 5 % CO₂ inkubieren

3.2 Fixierung und Färbung

- A) Vorbereitung des Primärantikörpers (nur bei dem Equine Influenza A Ziegenserum notwendig, wenn kein gereinigter Antikörper mehr vorhanden ist)
- der Primärantikörper für Equine Influenza A Ziegenserum ist ein polyklonaler Antikörper gegen den Pferdeinfluenza-Virus, aber auch gegen Zellbestandteile, deshalb müssen die Antikörper gegen die Zellen vorher absorbiert werden, sonst überdecken sie die Fluoreszenz der mit Viren infizierten Zellen
 - 1 – 2 Tage alte konfluent bewachsene Zellkulturflasche dreimal mit PBS waschen
 - auf eine T25 – Flasche 1 mL, auf eine T75 – Flasche 3 mL des verdünnten Primärantikörpers geben und 30 min bei 37 °C inkubieren (1 mL 1:100 verdünntes Serum reicht für eine Zellkulturplatte – dementsprechende Menge inkubieren)
 - der gereinigte Primärantikörper kann bei –20 °C eingefroren werden

B) Fixierung

- Medium in Laborschale mit vorgelegter 2%iger Essigsäure in der Sterilbank abgießen und virusgerecht entsorgen
- auf jedes Well 100 µL eiskalte 80 %ige Acetonlösung pipettieren (Acetonlsg.in Eisbehälter stellen – nicht in den Kühlschrank → Kühlschränke sind nicht Ex geschützt)
- die Zellkulturplatten 30 min zum fixieren auf Eis oder in den Kühlraum stellen → Virus inaktiviert (die weiteren Schritte können außerhalb der Sterilbank durchgeführt werden)
- Zellkulturplatten 2 mal mit PBS spülen – (Aceton-PBS-Gemisch in Abfallbehälter sammeln- zur Entsorgung –Herrn Schäfer geben)

C) Färbung

- gereinigten Primärantikörper für Equine Influenza A Ziegenserum 1 : 100 mit PBS verdünnen, alle anderen Primärantikörper werden 1 : 200 verdünnt
- je 50 µL davon auf jedes Well mit Elektronischer 8-Kanalpipetten geben und 60 min bei 37 °C inkubieren
- nach dieser Zeit 2-mal mit PBS waschen
- den Sekundärantikörper 1 :500 mit PBS verdünnen
- wieder je 50 µL davon auf jedes Well pipettieren und 60 min bei 37 °C inkubieren
- 2 mal mit PBS waschen, nach dem letzten Waschschrift 100 µL PBS auf jedes Well geben

4.0 Auswertung und Berechnung

- die Auswertung erfolgt an einem Fluoreszenzmikroskop
- jedes Well in dem Virus gefunden wird (fluoreszierende Zellen) wird als positiv gewertet (1), jedes Well ohne fluoreszierende Zellen als negativ (0) und in das Arbeitsblatt eingetragen
- die Berechnung erfolgt nach der Gleichung von Spearman und Kärber:

$$\text{kumulativ 100 \%} \\ (\log \text{ Virus } 100\%) + (0,5) - \frac{\text{Anzahl Tests (pro Verdünnung)}}{\text{Anzahl Tests (pro Verdünnung)}} = \log \text{ Virus} / 100 \mu\text{L}$$

Beispiel:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
B	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
C	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
D	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
E	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
F	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
G	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
H	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0

0	0	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	0	0
---	---	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	---	---

0: kein Virus, negatives well; 1: Virus, positives well

Verdünnungsstufe	Anzahl positive wells / Gesamtzahl wells	Anzahl positiver wells kumulativ
10 ⁻⁵	8 / 8	19
10 ⁻⁶	7 / 8	11
10 ⁻⁷	4 / 8	4
10 ⁻⁸	0 / 8	0

Beispielrechnung:

$$(-5) + 0,5 - 19/8 = - 6,875 = y ; 10^{6,875} \text{ Viren}/100\mu\text{L} = 10^{7,875} \text{ V/mL} = 7,50 \times 10^7 \text{ Viren/mL}$$

5.0 Festlegung des Referenzwertes

Für jeden neu hergestellten Standard wird von mindestens 2 Personen je zweimal eine Sechsfachbestimmung durchgeführt. Daraus wird der Mittelwert für den jeweiligen Standard berechnet, der als Referenzwert verwendet wird.

Auswertungsblatt TCID₅₀

Probenbezeichnung:

Bearbeitet von:

Ausgewertet von:

Daten Zellanzucht, Virusvermehrung, Fixierung und Färbung

Datum Start :

Medium Zellanzucht:

Herstellungsdatum:

Zellpassage:

vom:

Zellzahl: x 10⁵ Zellen/mL

Dauer Zellanzucht: Tag

Virusmedium:

Herstellungsdatum:

Trypsin: 10000 BAEE

Herstellungsdatum:

Aufgetragene Virusverdünnungen:

Fixierungsmethode: 80%ige Acetonlösung

Färbung:

Primärantikörper:

Verdünnung:

Sekundärantikörper: Alexa Fluor 488 donkey anti-sheep IgG Verdünnung: 1 :500

Auswertung und Berechnung

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

0	0	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	0	0
---	---	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	---	---

log Virus	infected cells	cumulativ	non infectet	ratio	prozent
10 ⁻					
10 ⁻					
10 ⁻					
10 ⁻					

$$- + 0,5 - \text{---} = - = 10 \text{ Viren} / 100 \mu\text{L} = 10 \text{ Viren} / \text{mL}$$

4.4 Chemische Inaktivierung

Arbeitsanweisung

Autoren: Bernd Kalbfuß, Yvonne Genzel

Version: 1.1 (26.10.06)

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Die chemische Inaktivierung von Viren mit Formaldehyd hat eine lange Geschichte und wurde bereits im Jahre 1923 berichtet (Glenny et al., 1923). Aufgrund mehrerer Zwischenfälle und einer nachgewiesenen Unsicherheit der Formaldehyd-Inaktivierung wurde das Agens in der Impfstoffherstellung mittlerweile weitläufig durch Aziridin-Derivate oder das Lacton der β -Propionsäure (Brown et al., 2001; Budowsky et al., 1991) ersetzt. Neben einer effizienteren Inaktivierung besitzen beide Agenzien den Vorteil, dass der Mechanismus der Inaktivierung wahrscheinlich ausschließlich auf der Modifizierung des Erbguts beruht. Die Abwesenheit von Modifikationen der Oberflächenantigene, wie sie für Formaldehyd berichtet wurden, lassen prinzipiell eine verbesserte immunstimulierende Wirkung des Impfstoffs erwarten.

In dieser Arbeitsanweisung wird die Verwendung von „binärem“ Ethylenimin (BEI) und β -Propiolacton (β -PL) zur Inaktivierung von Influenzavirus-haltigen Zellkulturbrühen beschrieben.

Für jedes der Agenzien existiert zusätzlich ein Laufprotokoll, mit dem die durchgeführten Inaktivierungen zu dokumentieren sind. Beide Agenzien sind als extrem giftig eingestuft und können zu tödlichen Spätfolgen führen. Es ist daher unbedingt erforderlich, sich vor dem Einsatz mit den Sicherheitsvorschriften vertraut zu machen. Ferner ist eine persönliche Belehrung durch Dr. Yvonne Genzel erforderlich. Die erfolgte Belehrung ist vom Belehrteten schriftlich zu quittieren.

1.2 Zyklisierung von Bromoethylamin

Aufgrund ihrer Reaktivität sind Aziridine sehr instabil und schlecht zu lagern. Um dieses Problem zu umgehen, kann Ethylenimin direkt aus dem in Pulverform stabilen 2-Bromoethylamin (BEA) synthetisiert werden (Bahnemann, 1990). Die Zyklisierungsreaktion ist Laugen-katalysiert. Um das auf diese Weise gewonnene Ethylenimin von reinem Ethylenmin abzugrenzen, wurde der Kunstbegriff „binary ethylenimine (BEI)“ geprägt. Die Ringbildung erfolgt nach spontaner Dissoziation von Bromid über einen Übergangszustand mit Carbeniumion. Bei der Reaktion entsteht formal Bromwasserstoff (siehe Illustration 1). Der Reaktionsweg ist reversibel (nicht dargestellt) und das Gleichgewicht kann über den pH-Wert eingestellt werden. Ein alkalischer pH-Wert begünstigt die Ringbildung, da bei der Hinreaktion Protonen freigesetzt werden.

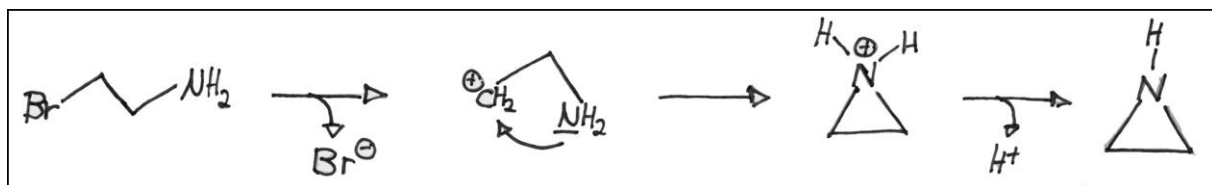


Illustration 1. Zyklisierung von 2-Bromoethylamin zu Ethylenimin.

1.3 Nukleophile Ringöffnung

Aufgrund ihrer Ringspannung sind Ethylenimin und β -Propiolacton extrem reaktiv. Die Art der Reaktion wird als nukleophile Ringöffnung bezeichnet (Vollhardt und Shore, 1999). Die in Illustration 2 gezeigten Reaktionsmechanismen wurden in Analogie zur im Detail beschriebenen nukleophilen Ringöffnung von Oxacyclopropan hergeleitet.

Obwohl der Mechanismus der Reaktionen von Ethylenimin und β -Propiolacton identisch ist, muss dies nicht für die Selektivität der Reaktionen gelten. Gemäß einer Übersicht von Brown (2002) gibt es viele Hinweise, dass Ethylenimin und seine Derivate fast ausschließlich mit Nukleinsäuren reagieren. Lediglich in einer Studie wurde von einer Dosis abhängigen Modifikation viraler Proteine berichtet. Käsermann et al. (2001) konnten jedoch zeigen, dass trimeres Ethylenimin abhängig vom pH-Wert mit Testproteinen reagierte. Die modifizierten Proteine zeigten Verschiebungen im pI und in ihrer Masse.

Die Reaktion von β -Propiolacton mit Guanosine, Deoxyguanosin und RNA wurde von Roberts JJ und Warwick GP (1963) berichtet. In einer Studie von Budowsky et al. (1993) werden mehrere Studien zitiert, die eine Reaktion von β -Propiolacton mit Aminosäuren belegen. Die Thematik der Selektivität wurde von den Verfassern dieser Arbeitsanweisung noch nicht ausführlich recherchiert. Prinzipiell lässt sich jedoch aussagen, dass die Selektivität stark vom Reaktionsumfeld abhängen wird, also neben Parametern wie der Temperatur, dem pH-Wert und der Konzentration des Agenz vor allem von der Zusammensetzung der zu inaktivierenden Brühe.

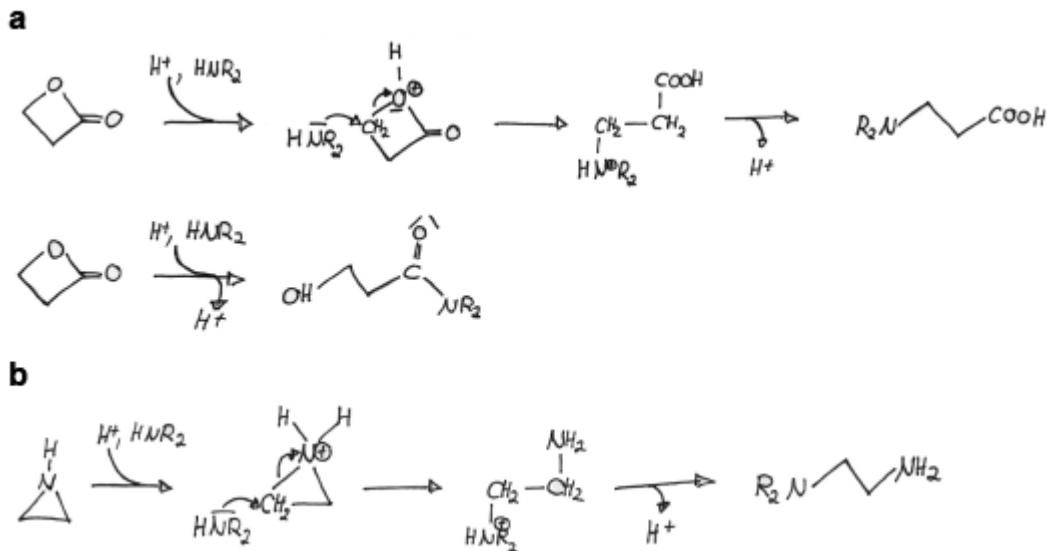


Illustration 2. Reaktion von β -Propiolacton mit einem sekundären Amin. Es entstehen zwei mögliche Produkte (a). Reaktion von Ethylenimin mit einem sekundären Amin (b).

1.4 Spontaner Zerfall und Polymerisation

Beide Agenzien zerfallen in wässriger Lösung spontan (Illustration 3). Die Zerfallsreaktionen sind Säure katalysiert. Ausgehend von den Zerfallsprodukten oder funktionell ähnlichen Molekülen kann eine Polymerisierung einsetzen. Das Polymer des β -Propiolactons ist ein linearer Ester. Im Fall des Ethylenimins kommt es bei der Polymerisation zusätzlich zu einer starken Verzweigung an der Aminofunktion (nicht dargestellt).

Der Säure katalysierte Zerfall ist die rationale Grundlage für die Zugabe von Zitronensäure vor der Entsorgung. Bei ausreichender Reaktionszeit passivieren sich beide Agenzien von selbst. Zu den exakten Kinetiken der Zerfallsreaktionen konnten die Verfasser bisher jedoch noch keine Literatur finden.

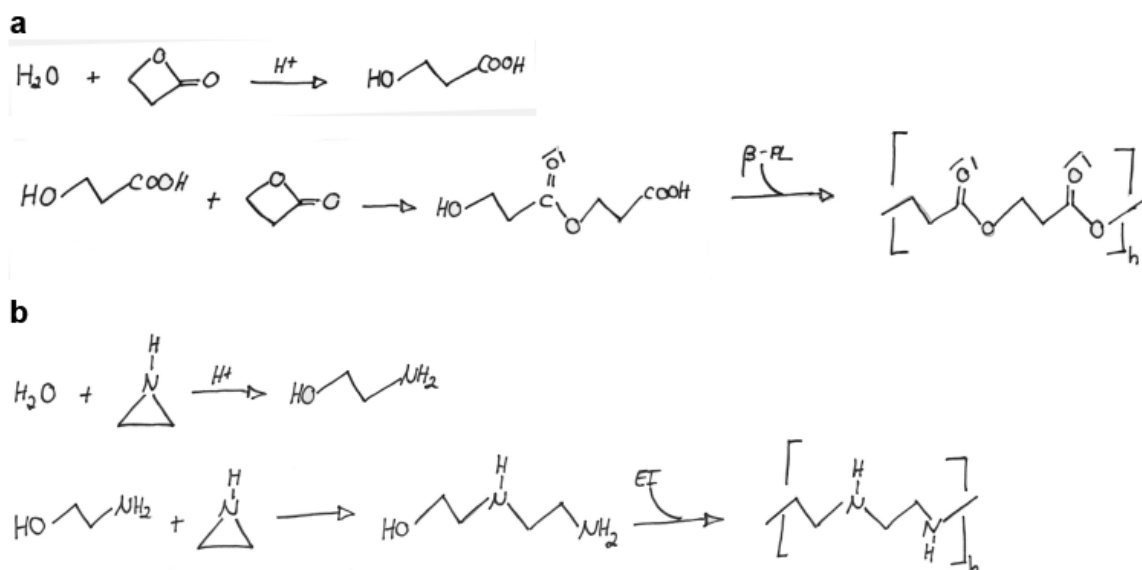


Illustration 3. Hydrolyse von β -Propiolacton zu 3-Hydroxypropionsäure und Polymerisation

zu Poly-3-Hydroxypropionsäureester. (a). Hydrolyse von Ethylenimin zu 3-Hydroxyaminoethan und Polymerisation zu Polyethylenimin. Es ist nur die lineare Form des Polymers dargestellt (b).

1.5 Inaktivierungskinetik

Die Kinetik der Inaktivierung von Influenzavirus mit β -Propiolacton wurde im Detail von Budowsky et al. (1991a) untersucht. Die Influenza-Stämme A/Leningrad/385 (H3N2) und B/Leningrad/489/80 wurden hierzu in Eierkulturen vermehrt. Es wurden Kinetiken der Inaktivierung direkt in der Allantoinflüssigkeit und für aufgereinigten Virus aufgenommen. Die publizierten Reaktionskonstanten wurden genutzt um eine pessimistische Abschätzung der Virusabreicherung und Endkonzentration von β -Propiolacton als Funktion der Einsatzkonzentration und Inkubationszeit durchzuführen (Illustration 4). Bei einer Einsatzkonzentration vom 3 mM β -Propiolacton und einer Inkubationszeit von 24 h kann entsprechend der Abschätzung eine Abreicherung um 15 Größenordnungen erwartet werden. Die Endkonzentration des Agens sollte am Ende nur noch bei etwa 10 μ M liegen. Für die Inaktivierung mit BEI liegen den Verfassern keine kinetischen Daten vor. Die empfohlene Einsatzkonzentration vom 1.5 mM ist ein reiner Erfahrungswert.

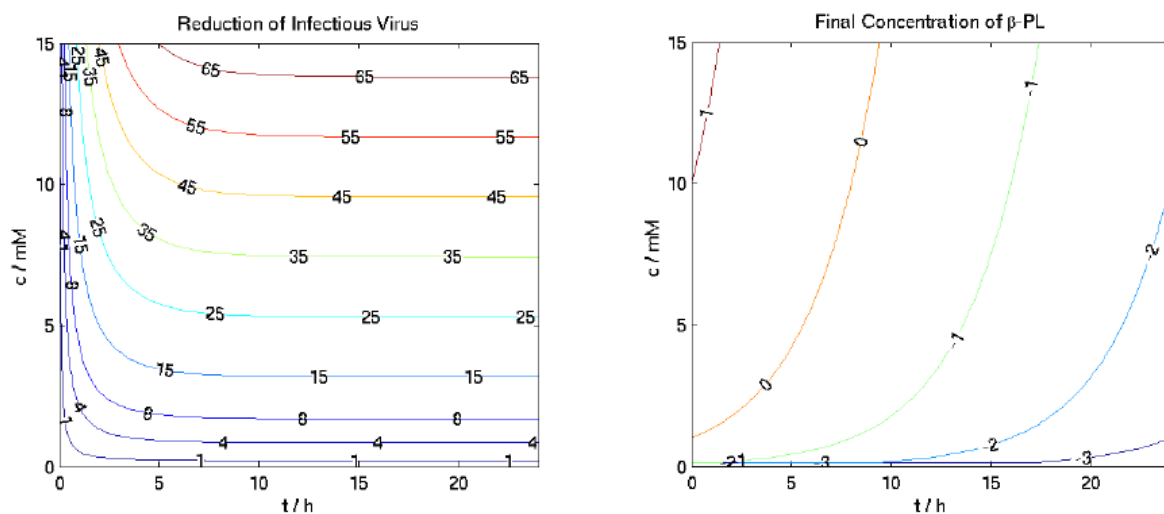


Illustration 4. Log-Abreicherung des aktiven Virus (a) und logarithmierte Endkonzentration von β -Propiolacton in mmol l⁻¹ (b) in Abhängigkeit der Einsatzkonzentration und Inkubationszeit.



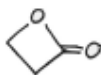
2 Sicherheitsmaßnahmen

Sowohl bei Ethylenimin als auch β -Propiolacton handelt es sich um extrem gefährliche Chemikalien. Beide Substanzen wurden als sehr giftig (T+) und mutagen eingestuft und sind nachweislich Krebs erregend (s. Sicherheitsdatenblätter der Firmen Sigma-Aldrich GmbH und Serva Electrophoresis, Roempp Online-Lexikon). Im Fall von Ethylenimin kann es bei direktem Kontakt zusätzlich zu schweren Verätzungen der Haut und Augen kommen. Die

wichtigsten Eigenschaften der Substanzen sind in Table 1 zusammengestellt.

Alle Lösungen, die eine dieser Substanzen enthalten, sind ausschließlich unter dem Abzug anzusetzen. Bei der Handhabung ist neben der regulären Schutzausrüstung (Laborkittel und Handschuhe aus Butylkautschuk) eine Vollsichtbrille und bei der Einwaage von BEA ein Mundschutz (P2) zu tragen. Die Ansatzgefäße sind gegen Umfallen zu sichern. Sie können entweder direkt mit einem Stativ fixiert werden oder indirekt durch Fixierung eines passenden Gefäßständers (z. B. 50 ml Falcons). Es empfiehlt zusätzlich eine Plastikwanne unterzulegen. Beide Substanzen sind flüchtig und dampfen aus wässrigen Lösungen aus. Die Gefahr einer Vergiftung durch die Atemwege steigt mit der Konzentration. Der Abluftvolumenstrom des Abzugs ist deshalb auf maximal zu stellen. Betroffene Gefäße sollten nur wenn notwendig geöffnet werden. Während der Handhabung von reinem β -Propiolacton ist das Labor zu räumen. Die Türen müssen entweder abgeschlossen oder durch weitere Personen überwacht werden. Der Vorgang ist von mindestens einer weiteren Person durch die Türfenster zu beobachten, um im Gefahrfall eingreifen zu können. Diese Person hat eine Atemschutzmaske mit Aktivkohlefilter vom Typ A2B2E2K2 bei sich zu führen (Verfallsdatum des Filters beachten!). Im Fall einer unbeabsichtigten Freisetzung sind die Arbeitskollegen unverzüglich zu informieren und das Labor ist zu räumen. Kam es zu einem direkten Kontakt, sind die betroffenen Hautstellen gründlich mit 2% Zitronen-/Essigsäure (außer Gesicht und Augen), danach mit Wasser zu spülen und die betroffene Person ist verpflichtet, einen Arzt aufzusuchen. Bevor das Labor wieder betreten werden kann, muss die Flüssigkeit mit einem bindendem Material (Chemizorb) aufgenommen und entsorgt werden. Der Vorgang ist von mindestens einer weiteren Person durch die Türfenster zu beobachten. Diese Person hat eine Atemschutzmaske mit Aktivkohlefilter vom Typ A2B2E2K2 bei sich zu führen (siehe oben).

Table 1. Zusammenstellung der wichtigsten Eigenschaften von 2-Bromoethylamin, Ethylenimin und β -Propiolacton.

Name	2-Bromoethylamin (BEA)	Ethylenimin (EI)	β -Propiolacton (β -PL)
Struktur			
Synonyme		Aziridin, Azacyclopropan	3-Hydroxypropionsäurelacton, Propano-3-lacton, 3-Propanolid, 2-Oxetanon
CAS-Nr.	2576-47-8	151-56-4	57-57-8
Gefahrenbezeichnung	gesundheitsschädlich (Xi)	entzündbar (F), sehr giftig (T+)	sehr giftig (T+)
R-Sätze	Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut (20/21/22). Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut (36/37/38). Irreversibler Schaden möglich (R40)	n.b.	Kann Krebs erzeugen. (45) Auch sehr giftig beim einatmen. (26) Reizt die Augen und die Haut. (36/38)

Name	2-Bromoethylamin (BEA)	Ethylenimin (EI)	β -Propiolacton (β -PL)
S-Sätze	Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen (36/37/39). Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen). (45)	n.b.	Exposition vermeiden – vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. (53) Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen). (45)
WGK	n.b.	stark wassergefährdend (3)	stark wassergefährdend (3)
Mutagen	möglicherweise	erwiesen (M2)	erwiesen
Cancerogen	n.b.	erwiesen (C2)	erwiesen (C2)
Toxizität	LD ₅₀ 105 mg/kg	LD ₅₀ (Ratte oral) 15 mg/kg	n.b.

3 Dokumentation

Es wurden vorgeschriebene Laufprotokolle für die Inaktivierung mit Ethylenimin und β -Propiolacton erstellt. Die Vorlagen sind in Unterverzeichnissen des Verzeichnisses “<flu_dir>/dsp/operations” abgelegt. Eine Übersicht über die relevanten Dokumente gibt Table 2. Jede Inaktivierung ist in Form dieser Protokolle zu dokumentieren. Abweichungen von der empfohlenen Prozedur sind im Bemerkungsfeld einzutragen. Eventuelle Fehler in den Dokumenten sind den entsprechenden Verfassern mitzuteilen. Ausgefüllte Protokolle sind zum Nachweis der Inaktivierung aufzubewahren.

Table 2. Übersicht über die für die chemische Inaktivierung relevanten Dokumente.

Typ	Verzeichnis	Name
Arbeitsanweisung	sops	Chemische Inaktivierung - Arbeitsanweisung
Laufprotokoll für BEI	templates	Inaktivierung mit BEI - Laufprotokoll
Laufprotokoll für β -PL	templates	Inaktivierung mit β -PL - Laufprotokoll

4 Vorbereitung der Brühe

Prinzipiell kann die Inaktivierungsprozedur auf beliebige Brühen angewendet werden. Es ist jedoch zu beachten, dass die empfohlenen Konzentrationen für Ethylenimin (1.5 mM) und β -Propiolacton (3 mM) sich auf geklärte Brühen, d. h. Brühen ohne größere Anteile an Zelltrümmern beziehen. Sollen ungeklärte Brühen inaktiviert werden, so ist zum einen für

eine ausreichende Durchmischung zu sorgen (z. B. mit einem Magnetrührer), da sich größere Partikel sonst am Boden ablagern und eventuell eine für das Agenz undurchdringliche Schicht bilden. Zum andern muss die Konzentration des Agenz angepasst werden. Über die notwendigen Konzentrationen liegen noch keine zuverlässigen Daten vor. Es wurden jedoch schon ungeklärte Brühen erfolgreich mit 1.5 mM Ethylenimin und 12 mM β -Propiolacton inaktiviert.

5 Inaktivierung

1. Zur Stabilisierung des pH-Werts über den Zeitraum der Inaktivierungsreaktion wird HEPESPuffer[§] zugesetzt. Die Lösung ist vor der Benutzung steril zu filtrieren. Der Puffer kann in größeren Mengen hergestellt und im sterilen Zustand gelagert werden.

HEPES, pH 7.5	c / M	Menge
HEPES, 238.3 g mol ⁻¹	0.5	59.6 g
H ₂ O		0.5 L

Die Einstellung des pH-Werts erfolgt mit NaOH (aq).

2. Bevor begonnen wird mit den giftigen Agenzien zu hantieren, sollte die Entsorgung vorbereitet werden. Es wird ein Abfallbeutel für den Feststoffmüll benötigt, der entsprechend beschriftet sein muss. Für die Passivierung der Inaktivierungsagenzien muss 2% Zitronensäure vorhanden sein. Am Abzug ist ein Hinweis auf die Lagerung gefährlicher Substanzen anzubringen. Der Abfallbeutel, das zu verwendende Reaktionsgefäß und das Gefäß für den Ansatz der Agenz sind außerdem mit dem Gefahrenzeichen „sehr giftig (T+)“ zu kennzeichnen, das Reaktionsgefäß zusätzlich mit dem Gefahrenzeichen „Biogefährdung“.

3. Vor dem Ansatz der Inaktivierung muss eine Arbeitslösung des zu verwendenden Inaktivierungsagenz hergestellt werden. Es wird nur ein Agenz benötigt (Ethylenimin oder β -Propiolacton). Beim Ansetzen der Arbeitslösung sind unter allen Umständen die **Sicherheitsmaßnahmen** einzuhalten (siehe oben). Der Ansatz muss **im Abzug** erfolgen. Es sollte nicht mehr Agenz als notwendig angesetzt werden. Die Öffnung des verwendeten Gefäßes muss ausreichend weit sein, um den Zugang mit einer Spritze zu ermöglichen. Es dürfen nur Gefäße verwendet werden, die sich sicher verschließen lassen. Die in den Rezepten angegebenen Volumina beziehen sich auf die Inaktivierung von 1 L vorgeklärter Brühe. Die tatsächlich benötigte Menge kann per Dreisatz berechnet werden. Die Ethylenimin-Arbeitslösung ist nach dem Ansatz für mindestens 1 h bei 37 °C zu inkubieren

[§] Ursprünglich wurde Phosphat-Puffer für die Stabilisierung verwendet. Da es bei unvollständiger Komplexierung von 2-wertigen Metallionen (Mg²⁺, Ca²⁺) jedoch zu Ausfällungen kommen kann, wurde auf HEPES-Puffer umgestellt.

(Ringbildung). **Die Lösungen sind für jede Inaktivierung frisch anzusetzen.**

Die genaue Haltbarkeit der Arbeitslösungen ist unbekannt. Beide Agenzien können in wässriger Lösung spontan zerfallen und auspolymerisieren. Es wird deshalb empfohlen, die Lösungen so schnell wie möglich zu verwenden.

BEI, 0.5 M	Menge
BEA HBr, 204.9 g mol ⁻¹	0.41 g
NaOH, 1 M	4 ml
	<hr/> 4 ^a ml

β-PL, 0.5 M	V / ml
β-PL, 99%, 15.74 M	0.254
PBS	7.75
	<hr/> 8 ^a ml

^a Das Volumen des gelösten Agenz bzw. die Volumenänderung bei der Mischung verschiedener Flüssigkeiten wurde nicht berücksichtigt. Das Gesamtvolumen ist folglich nur eine Näherung.

4. Vor dem Beginn der Inaktivierung können optional Proben von der Brühe für die Analytik genommen werden. Es empfiehlt sich außerdem, Steriltests in Casos anzusetzen.

5. Unter der **Virusbank** die Brühe vorlegen und den HEPES-Puffer zugeben (siehe Tabelle unten). Den Gefäßinhalt durch sanfte Rotation vermischen (Schaumbildung vermeiden).

6. Im **Abzug** das Agenz mit einer Spritze aufziehen und direkt durch einen 0.2 µm Sterilfilter in das Reaktionsgefäß träufeln. Die Dosierung sollte so genau wie möglich sein, im Zweifelsfall ist leicht überzudosieren. Die in den Rezepten angegebenen Volumina beziehen sich auf die Inaktivierung von 1 L vorgeklärter Brühe. Die tatsächlich benötigte Menge kann per Dreisatz berechnet werden. Nach der Zugabe die Reaktion durch sanfte Rotation gut mischen (Schaumbildung vermeiden). Optional kann der pH-Wert mit einem Indikatorstreifen überprüft werden. Er sollte nicht mehr als 0.5 pH-Einheiten von 7.5 abweichen.

Die Arbeit unter dem Abzug stellt ein gewisses Sterilitätsrisiko dar. Aus Sicherheitsgründen wurde jedoch darauf verzichtet, den Ansatz unter einer Sterilbank durchzuführen. Um das Risiko einer Kontamination gering zu halten, sollte das Gefäß mit der Brühe nur so lange wie nötig geöffnet werden. Der direkte Kontakt unsteriler Elemente (Hände, unsterile Pipette, Indikatorstreifen) muss in jedem Fall vermieden werden.

Inaktivierungsreaktion	c / mM	BEI V / ml	β -PL V / ml
Brühe		1000	1000
HEPES-Puffer, 0.5 M	25 mM	53	53
BEI, 0.5 M	3 mM	3,2	-
β -PL, 0.5 M	1.5 mM	-	6,4
		1056	1059

7. Das Gefäß mit der Lösung des Agenz mit 2% Zitronensäure fluten und sicher verschließen, den Feststoffmüll in dem dafür vorgesehenen Müllbeutel sicher verstauen. Der Müll ist unter einem gekennzeichneten Abzug zwischenzulagern. Die Vorschriften für die Entsorgung sind einzuhalten (siehe unten).

8. Die angesetzte Inaktivierungsreaktion etwa eine Stunde ruhen lassen und danach unter der **Virusbank** in ein frisches steriles Gefäß überführen. Das neue Gefäß ist mit den Gefahrensymbolen „sehr giftig“ und „Biogefährdung“ zu kennzeichnen. Außerdem sollte der Typ und die verwendete Menge des Agenz sowie der Zugabezeitpunkt auf dem Gefäß vermerkt werden. Volumina bis zu 2 L dürfen umgeschüttet werden. Größere Volumina müssen umgepumpt oder vorsichtig abgedrückt werden. Die hierzu notwendigen Schläuche und Flaschenaufsätze sind vor und nach der Benutzung zu autoklavieren.

Der Transfer in ein frisches Gefäß entspricht dem obligatorischen Tanktransfer in der Produktion. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass die gesamte Brühe mit dem Agenz in Berührung kommt.

9. Optional können wieder Proben für die Analytik genommen und Steriltests in Casos angesetzt werden.

10. Die Inaktivierungsreaktion ist für mindestens 24 h bei 37 °C zu lagern. Die minimale Inkubationszeit ist unbedingt einzuhalten, damit die Inaktivierungsagenzien vollständig abreagieren können. **Die Lagerung muss im S2-Bereich erfolgen.** Danach kann die Lagerung den jeweiligen Anforderungen angepasst werden (z. B. 4 °C im Kühlraum). Eine Überführung in den S1-Bereich ist jedoch erst nach dem erfolgreichen Abschluss der Inaktivierungstests zulässig.

6 Inaktivierungstest

1. Für die Durchführung der Inaktivierungstests werden sechs konfluente T75-Flaschen mit MDCK-Zellen in Z-Medium benötigt. Die Zellen sind gemäß der aktuellen Arbeitsanweisung zu kultivieren (Kiesel *et al.*, 2000). Es werden jeweils drei Flaschen im Abstand von drei Tagen benötigt. Die Zellen sind so einzusäen, dass sie zum jeweils benötigten Zeitpunkt konfluent und noch vital sind. Die Morphologie ist vor der Verwendung unter dem Mikroskop zu überprüfen.

2. Eine der Flaschen ist mit der inaktivierten Brühe zu infizieren. Die Flasche wird hierzu

entleert und 3 mal mit etwa 50 ml PBS gewaschen. Danach wird die Flasche mit 50 ml frischem V-Medium und 10 µg/ml Trypsin befüllt sowie mit 1 ml der zu testenden Brühe beimpft. Zur Sicherheit ist nach dem gleichen Schema eine Positivkontrolle mit TCID50-Standard und eine Negativkontrolle (Mock-Infektion) parallel anzusetzen. Die erste Passage des Inaktivierungstests wird für 3 Tage ausgetragen, danach ist mit den Überständen eine weitere Passage nach der selben Prozedur durchzuführen. Die Flaschen sind jeweils direkt nach der 3-tägigen Inkubation in den Kühlraum zur Lagerung bei 4 °C zu stellen.

3. Die HA-Titer der gelagerten Flaschen sind gemäß der aktuellen Arbeitsanweisung (Kiesel *et al.*, 2004) zu bestimmen. Nach erfolgreicher Inaktivierung muss die HA-Aktivität der ersten Passage der Verdünnung der Brühe entsprechen (ca. 1:50). In der zweiten Passage darf keine HA-Aktivität mehr nachweisbar sein. Gleichzeitig müssen beide Positiv-Kontrollen eine HAAktivität (log-Titer > 1.5) und die Zellen der Negativkontrolle einen intakten Zellrasen aufweisen. **Sind diese Bedingungen nicht erfüllt, dann muss die Inaktivierung wiederholt werden!**

4. Die Gefahrenzeichen auf dem Reaktionsgefäß sind zu entfernen. Die Beschriftung ist zusätzlich um das Wort „inaktiv“ zu ergänzen.

7 Entsorgung

Der anfallende Feststoffmüll und das überschüssige Agens sind unter einem gekennzeichneten Abzug zu lagern. Für die Entsorgung des Feststoffmülls ist Herr Jan Schaefer (Tel. 185) zuständig. Das überschüssige Agens muss mindestens eine Woche gelagert werden, um eine vollständige Polymerisation zu gewährleisten. Danach kann die Lösung im Ausguss entsorgt werden. Der direkte Kontakt mit der Flüssigkeit sollte dennoch vermieden werden. Das zugehörige Gefäß ist gründlich mit Wasser zu spülen, bevor es in die Spülküche gegeben wird. Die Gefahrenzeichen sind vorher zu entfernen.

8 Referenzen

Bahnemann HG. 1990. Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine. *Vaccine* (1990), 8: 299-303.

Brown F. 2002. Inactivation of viruses by aziridines. *Vaccine* (2002), 20: 322-327.

Budowsky EI, Friedman EA, Zheleznova NV, Noskov FS. 1991a. Principles of selective inactivation of viral genome. VI. Inactivation of the infectivity of the influenza virus by the action of β-propiolactone. *Vaccine* (1991), 9: 398-402

Budowsky EI, Zalesskaya MA. 1991b. Principles of selective inactivation of a viral genome. V. Rational selection of conditions for inactivation of the viral suspension infectivity to a given extent by the action of β -propiolactone. *Vaccine* (1991), 9: 319-325.

Budowsky EI, Smirnov YA, Shenderovich SF. 1993. Principles of selective inactivation of viral genome. VIII. The influence of β -propiolactone on immunogenic and protective activities of influenza virus. *Vaccine* (1993), 3: 343-348.

Glenny AT, Hopkins BE. 1923. Diphteria toxoid as an immunizing agent. *Br. J. Exp. Path.* (1923), 26: 39-47.

Käsermann F, Wyss K, Kempf C. 2001. Virus inactivation and protein modifications by ethyleneimines. *Antiviral Research* (2001), 52: 33-41.

Kiesel A, Behrendt I, Best C. 2004. Hämagglutinationstest - Arbeitsanweisung Nr. V/01. MPIMagdeburg, Bioprozesstechnik.

Kiesel A. 2000. Passagieren von MDCK-Zellen - Arbeitsanweisung Nr. Z/03. MPI-Magdeburg, Bioprozesstechnik.

Roberts JJ, Warwick GP. 1963. The reaction of β -propiolactone with guanosine, deoxyguanylic acid and RNA. *Biochemical Pharmacology* (1963), 12: 1441-1442.

Vollhardt KPC, Schore NE. 1999. Organische Chemie, Abschnitt 9.9: Reaktionen von Oxacyclopropanen, Abschnitte 25: Heterocyclen. Wiley-VCH (1999), ISBN 3-527-29819-3.

5. Matlab Programm zur Normierung der t_{mig}

```
function glyc_comp(varargin)

    if isempty(gcbo),
        glyc_comp_0(varargin)
    else
        cb_glyc_comp(varargin);
    end;

function cb_glyc_comp(txt)

    fprintf('This is cb_glyc_comp(%s)\n', txt);

    % we have some non-empty gcbo...
    if isequal(get(gcbo,'type'),'uicontrol') ...
        & isequal(get(gcbo,'style'),'edit'),
```

```

    fprintf('You entered "%s", what d'you mean?\n',get(gcbo,'string'));
end

function glyc_comp_0(varargin)

    cd(fullfile(getenv('HOME'),'m/sandbox1'));
    wd = pwd; % save old working directory
    % cd(fullfile(getenv('HOME'),'Doktor/Projekt_HA/scf_files'));

    src_file1 = '*.txt';
    [src_file1, p1] = uigetfile(src_file1); %user input
    if isequal(src_file1, 0) return; end;
    [A1,C1,G1,T1]=textread(fullfile(p1,src_file1),'%d %d %d
%d','headerlines',1);

    src_file2 = '*.txt';
    [src_file2, p2] = uigetfile(src_file2); %user input
    if isequal(src_file2, 0) return; end;
    [A2,C2,G2,T2]=textread(fullfile(p2,src_file2),'%d %d %d
%d','headerlines',1);

    src_file3 = '*.txt';
    [src_file3, p3] = uigetfile(src_file3); %user input
    if isequal(src_file3, 0) return; end;
    [A3,C3,G3,T3]=textread(fullfile(p3,src_file3),'%d %d %d
%d','headerlines',1);

    linecolor1 = [0.1 0.1 0.1];
    linecolor2 = [0.8 0.1 0.1];
    linecolor3 = [0.2 0.2 1.0];

    ROXLadder=[50 75 100 125]; % prototype alles auf einen standart nicht auf
    % die erste datei normiert

    N1 = size(C1);
    N2 = size(C2);
    N3 = size(C3);
    Cm1 = max1(C1, 1000);
    Cm2 = max1(C2, 1000);
    Cm3 = max1(C3, 1000);
    Cme1 = maxend(C1, 5000);
    Cme2 = maxend(C2, 5000);
    Cme3 = maxend(C3, 5000);
    Cme1(1) = Cm1;
    Cme2(1) = Cm2;
    Cme3(1) = Cm3;

    maxC = max(max(Cme1), max(max(Cme2), max(Cme3)));
    maxC = 1000*ceil(maxC/1000);

    % Time scaling
    k = 0.4567/60; % (?)
    t1 = (1:1:N1(1))' * k;
    t2 = (1:1:N2(1))' * k;
    t3 = (1:1:N3(1))' * k;
    maxC = maxC * k;
    Cme1 = Cme1 * k;
    Cme2 = Cme2 * k;
    Cme3 = Cme3 * k;

    % polynomorder 2 liefert meisst gute ergebnisse
    order=2;

```



```

% order nicht hoeher als 3 waehlen verzerrungen am rand
% t1 = polyfilt(Cme3, Cme1, order, maxC, t1, t3);

t2 = polyfilt(Cme2, Cme1, order, maxC, t1, t2);
% t2 = polyfilt(Cme2, Cme1, order, maxC, t1, t2);

t3 = polyfilt(Cme3, Cme1, order, maxC, t1, t3);
% t3 = polyfilt(Cme3, Cme1, order, maxC, t1, t3);

figure(1); set(1, 'pos',[0 820 1590 300]);
clf;

axes('pos', [0.09 0.1 0.90 0.84]);
hl11=line(t1, C1, 'color', linecolor1 );
hl12=line(t2, C2, 'color', linecolor2 );
hl12=line(t3, C3, 'color', linecolor3 );
title('Rox Standard')
hl=legend(src_file1, src_file2, src_file3);
set(findobj(hl,'type','text'), 'interpreter','none')
axis tight; xlim([0, maxC]);
set(gca, 'xtick', ([0 10 20 30 40 50 60]));
set(gca, 'ytick', ([0 4000 8000 12000 16000 20000 24000]));
ylabel('RFU');
xlabel('time (min)');

linecolor1 = uisetcolor( linecolor1, 'Set Text Color');
linecolor2 = uisetcolor( linecolor2, 'Set Text Color');
linecolor3 = uisetcolor( linecolor3, 'Set Text Color');

figure(2); set(2, 'pos',[0 50 1590 900]);
clf;

ax2=axes('pos', [0.09 0.07 0.90 0.88]);
%line(t1, G1, 'color', [0.2 0.9 0.0], 'linewidth',2);
line(t1, G1, 'color', linecolor1, 'linewidth',2);
line(t2, G2, 'color', linecolor2, 'linewidth',2);
line(t3, G3, 'color', linecolor3, 'linewidth',2);
title('plot title')
% hl=legend(src_file1, src_file2, src_file3);
set(findobj(hl,'type','text'), 'interpreter','none')
axis tight; xlim([0, maxC]);
axis tight; ylim([0, 40000]);
ylabel('RFU');
xlabel('time (min)');
set(gca, 'xtick', ([0 10 20 30 40 50 60]));
set(2, 'keypressfcn','FigureKeyPress')

propedit(ax2);
% wait for property editor to close, then switch plottedit toolbutton off
uiwait(gcf); plottedit off;
set(gca, 'xtick', ([0 10 20 30 40 50 60]));
set(gca, 'ytick', ([0 4000 8000 12000 16000 20000 24000 28000 32000
36000]));

% linecolor1 = uisetcolor( linecolor1, 'Set Text Color');
% linecolor2 = uisetcolor( linecolor2, 'Set Text Color');
% linecolor3 = uisetcolor( linecolor3, 'Set Text Color');

line(t1, G1, 'color', linecolor1, 'linewidth',2);
line(t2, G2, 'color', linecolor2, 'linewidth',2);
line(t3, G3, 'color', linecolor3, 'linewidth',2);
% legend off;

```

```

hl=legend(src_file1, src_file2, src_file3);
set(findobj(hl,'type','text'),'interpreter','none')

function posC1MAX=max1(CC, level)

N = size(CC);
for i = 1:N(1),
    if CC(i) > level
        if CC(i) < CC(i-1)
            posC1MAX = i;
            break
        end
    end
end

function posCendMAX = maxend(CC, level)

N = size(CC);
nextmax = 0;

for ii = 17:-1:1,
    for i = N(1) - nextmax: -1: 1
        if CC(i) > level
            if CC(i) > CC(i-1)
                posCendMAX(ii) = i;
                nextmax = N(1) - i + 10;
                break
            %i=2;
        end
    end
end
end

% fkt bestimmt güte des polynoms & filtert Verunreinigungen im ROX standart
% & plotet kontrollfunktion

function t_poly = polyfilt(Cme2, Cme1, order, maxC, t1, t2)
    for i=16:-1:5
        cm2 = Cme2(17-i:17);
        cm2(1) = Cme2(1);
        cm1 = Cme1(17-i:17);
        cm1(1) = Cme1(1);
        [P,S] = polyfit(cm2, cm1, order);
        if S.normr < 0.2
            break
        end
    end

    t_poly = polyval(P, t2);

    figure(3);
    if size(t1) == size(t2)
        plot(cm2, cm1, 'bo', t1, t_poly, 'r-')
    elseif size(t1) > size(t2)
        plot(cm2, cm1, 'bo', t1(1:size(t_poly)), t_poly, 'r-')
    elseif size(t1) < size(t_poly)
        plot(cm2, cm1, 'bo', t1, t_poly(1:size(t1)), 'r-')
    end

    xlim([0, maxC]);
    title(sprintf('t fit order=%d', order))

```