Immunomics:
Entwicklung einer ESI-MS basierten Methodik zur Differenzierung und Quantifizierung von humanen Immunglobulinen und ihrer Glykosylierung

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

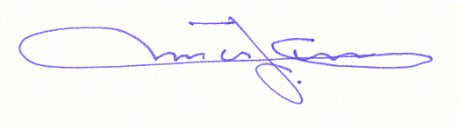
Lejon Martens
aus Bennekom (Niederlanden)

Köln 2003

Berichterstatter: Prof. Dr. Dietmar Schomburg
Prof. Dr. Franz-Josef Marner

Tag der mündlichen Prüfung: 3. November 2003

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung von Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. D. Schomburg betreut worden.



(Lejon Martens)

I. Referent: Prof. Dr. Dietmar Schomburg
II. Referent: Prof. Dr. Franz-Josef Marner

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dietmar Schomburg danke ich für die Vergabe des interessanten Themas, seine stets vorhandene Diskussionsbereitschaft und für die exzellenten technischen Rahmenbedingungen.

Herrn Dr. Axel Römer von der Firma A&M GmbH danke ich für die intensive Einführung in die Geheimnisse des analytischen Denkens, ohne an Optimismus einbüßen zu müssen, und seine Fähigkeit mich stets aufs Neue zu motivieren.

Herrn Prof. Dr. Franz-Joseph Marner danke ich für die Einweisung an den massenspektrometrischen Geräten.

Frau Dr. Antje Sahm von der Firma A&M GmbH danke ich für die zahlreichen wichtigen und sehr hilfreichen Diskussionen.

Herrn Dr. Guido Sonsmann danke ich für die Möglichkeit in Amsterdam am QTOF messen zu können, die verlorenen Sprints und seine Freundschaft.

Herrn Dr. Feser von der Firma A&M GmbH danke ich für die Einführung in die Tiefen des L C Q.

Herrn Dr. Matthias Schäfer danke ich für die Möglichkeit am Voyager messen zu können.

Herrn Dipl.-Chemiker Oliver Martin, der mir beim Kampf gegen die binäre Python zum Sieg verhalf, danke ich für die zahlreichen Trainingsfahrten und die Freundschaft.

Frau Anja Hochheiser danke ich für die zahlreichen Messungen und immer netten Unterhaltungen im Labor.

Herrn Dipl.-Biologe Christian Ebeling danke ich für die Hilfe bei der Lösung von HTML-Problemen.

Ich danke **Herrn Klaus Hoeve**l und **Herrn Dr. Helge Schlieben** für die horizonterweiternden Ausflüge als Trio-Infernale.

Allen meinen **Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises** und auch den **Mitarbeitern der Firma A & M GmbH** danke ich für das freundliche und stets lebendige Arbeitsklima und ihre stets offenen Ohren für die Probleme des Labor- und MS-Alltages. Es war eine schöne Zeit.

Annette Faust, **Mischa Dings**, **Sebastian Horstmann**, **Sergej Strelkov**, **Anneke Borkmann** danke ich für die unermüdliche Jagd auf die Fehlerteufel und die Einführung in die deutsche Sprache.

Abschließend danke ich den wichtigsten Menschen in meinem Leben, **meinen Eltern**, **meinem Bruder Niels**, meiner **Freundin Sandra**, meinen Freunden für ihre Geduld und Fähigkeit mir in schwierigen Situationen zu helfen. Ich hoffe, all dies wieder zurückgeben zu können.

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG 1

1.1 Struktur von Immunglobulinen (Ig) 2

1.2 Diversität von Immunglobulinen – Klassen, Subklassen und Allotypen 3

1.2.1 Immunglobulin G Subklassen – Unterschiede in den physiko-chemischen und biologischen Eigenschaften 4

1.2.2 Besonderheit von humanem IgG4 6

1.2.3 Allotypen – Das Gm-System 7

1.2.4 Allotypenverteilungen in verschiedenen Populationen 9

1.3 Glykosylierung von Immunglobulinen 10

1.3.1 Oligosaccharidstrukturen 10

1.3.2 Funktion und Relevanz 12

1.3.3 Methoden zur Charakterisierung der Glykosylierung 12

1.4 Massenspektrometrie in der Biochemie 13

1.4.1 Elektrospray-Ionisation-MS 14

1.4.2 Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionisation-MS 16

1.4.3 Dekonvolution von ESI-MS-Daten komplexer Proteingemische 16

1.5 Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS bzw. MS^n) 18

1.5.1 Ionenfallen-Analysatoren 18

1.5.2 Flugzeit-Analysatoren 19

1.5.3 Nomenklatur der Peptidfragmentierung 21

1.6 Massenspektrometrie in der Proteomforschung 21

1.6.1 Quantifizierung 24

1.7 Detektion und Quantifizierung von Immunglobulinen 25

1.7.1 Radiale Immunodiffusion 25

1.8 Aufgabenstellung 27

2 MATERIAL UND METHODEN 28

2.1 Verwendete Chemikalien, Materialien, Geräte und Software 28

2.1.1 Chemikalien 28

2.1.2 Proteine und Human-Plasmen 28

2.1.3 Geräte, Materialien und Software 29

2.2 Proteinanalytik 32

2.2.1 Radiale Immunodiffusion 32

2.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford 32

2.2.3 Polyacrylamidgel-Elektrophorese 33

2.2.4 Umpufferung und Konzentrieren von Proteinen ... 33

2.3 Anreicherung von verschiedenen IgG-Subklassen und Fcγ-Fragmenten ... 33
2.3.1 Isolierung von IgG mittels Protein A- oder Protein G-Affinitätschromatographie ... 33
2.3.2 Isolierung von IgG einzelner Individuen mittels DEAE-Chromatographie ... 34
2.3.3 Darstellung von Fcγ1-Fragmenten und Anreicherung von IgG2 ... 34
2.3.4 Isolierung von Fcγ1-Fragmenten einzelner Individuen ... 35
2.3.5 Anreicherung von humanem IgG3 ... 36
2.3.6 Anreicherung von humanem IgG4 ... 36
2.3.7 Darstellung humaner Fcγ4-Fragmente ... 37

2.4 Massenspektrometrische Messungen ... 38
2.4.1 Deglykosylierung von IgG und Fc-Fragmenten ... 38
2.4.2 Reduktion und S-Carboxymethylierung von IgG und Fc-Fragmenten ... 39
2.4.3 V8 Protease- (GluC) und Trypsinverdau von IgG und Fc-Fragmenten ... 39
2.4.4 GluC-Totalverdau von Human-Plasma für die quantitative Analyse ... 39
2.4.5 MALDI-Massenspektrometrie ... 40
2.4.6 Qualitatives Peptide Mapping von IgG mittels LC/ESI-MS ... 41
2.4.7 Quantitatives *Multiple-Reaction-Monitoring* mittels LC/ESI-MS ... 42
2.4.8 Prozessierung der LC/ESI-MS-Daten mit anschließender Datenbanksuche ... 43
2.4.9 ESI-MS-Messungen von Fc-Fragmenten des IgG ... 44
2.4.10 Dekonvolution von ESI-MS-Daten intakter Proteine ... 45

2.5 Erstellung einer Sequenzdatenbank (Ig-DB) für humane Immunglobuline ... 47

2.6 Entwicklung eines Programms (IgPep) zur Erzeugung einer nicht redundanten Peptiddatenbank aus Immunglobulinsequenzen ... 49

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION ... 51

3.1 Reinigung einzelner IgG-Subklassen und Fcγ-Fragmente ... 51
3.1.1 Isolation von IgG aus Human-Plasma mittels Protein A- oder DEAE-Chromatographie ... 53
3.1.2 Isolierung von IgG3 aus Human-Plasma durch kombinierte Protein A- / Protein G-Chromatographie ... 58
3.1.3 Isolierung von IgG2 und Darstellung von Fcγ1-Fragment aus Human-Plasma ... 60
3.1.4 Isolierung von IgG4 und Darstellung von Fcγ4-Fragment aus Human-Plasma ... 63

Teil I – Sequenzvariabilität von IgG

3.2 Entwicklung einer Gesamtstrategie zur Detektion und Quantifizierung von Immun-globulinen mittels LC/ESI-MS/MS ... 65
3.2.1 Erstellung einer Sequenzdatenbank für humane Immunglobuline (Ig-DB) und Entwicklung eines Programms (IgPep) für die Identifizierung von Markerpeptiden ... 65
3.2.2 Darstellung der Gesamtstrategie ... 67

PHASE I

3.3 Identifizierung potentieller Markerpeptide für humanes IgG und dessen Allotypen 69
3.3.1 Potentielle Markerpeptide von IgG1 71
3.3.2 Potentielle Markerpeptide von IgG2 72
3.3.3 Potentielle Markerpeptide von IgG3 73
3.3.4 Potentielle Markerpeptide von IgG4 75
3.3.5 Erstellung eines IgG-Profils kaukasischer Individuen (Phänotypisierung) 76

PHASE II

3.4 Experimentell-qualitative Charakterisierung der Markerpeptide des IgG-Systems mittels LC/ESI-MS/MS 78
3.4.1 Isotypische Markerpeptide G1|3, G2, G4 80
3.4.2 Iso- und allotypische Markerpeptide G1, G3, G2m(n), G2m(-n)|4 82
3.4.3 Allotypische Markerpeptide G1m(x), G1m(-x)|2, G3m(b1) und G3m(g5) 85
3.4.4 Allotypische Markerpeptide G1m(a) und G1m(-a) 87
3.4.5 Allotypische Markerpeptide G4m(V) und G4m(L) 89
3.4.6 Allotypische Markerpeptide G4m(R) und G4m(K) 91

PHASE III

3.5 Erstellung eines IgG-Profils von kaukasischen Individuen 93
3.5.1 Isoallotypische Markerpeptide G1m(-x)|2 und G2m(-n)|4 93
3.5.2 IgG-Profil der Individuen AR und SE 94
3.5.3 Phänotypisierung von kaukasischen Individuen 99

3.6 Vergleichende Quantifizierung der IgG-Subklassen 101

3.7 Quantifizierung der IgG-Subklassen mittels LC/ESI-MS/MS 103
3.7.1 Identifizierung und Charakterisierung eines geeigneten internen Standards 103
3.7.2 Selektivität der SRM-Übergänge für die Markerpeptide G1, G2, G3 und G4 sowie dem internen Standardpeptid 105
3.7.3 Linearität der Markerpeptide G1, G2, G3 und G4 107
3.7.4 Präzision und Richtigkeit der absoluten Quantifizierung 108

3.8 IgG-Subklassen- und Allotypenverteilungen in verschiedenen IVIG-Präparationen 110

Teil II: Charakterisierung der Glykosylierung von IgG

3.9 Glykosylierung von IgG1 und Charakterisierung von Fcγ1-Fragmenten 112
3.9.1 Bestimmung des Glykosylierungsprofils von IgG1 112
3.9.2 Vergleich von verschiedenen Fcγ1-Fragmenten 118
3.9.3 Charakterisierung der Glykosylierung von intaktem Fcγ1-Fragment 123

3.10 Erstellung von Glykosylierungsprofilen humaner Individuen 135

3.11 Glykosylierung von IgG4 und Charakterisierung von Fcγ4-Fragmenten.....137
3.11.1 Bestimmung des Glykosylierungsprofils von IgG4 137
3.11.2 Charakterisierung von Fcγ4-Fragment..... 139

4 ZUSAMMENFASSUNG.....146

4.1 Entwicklung einer Strategie zur Differenzierung und Quantifizierung von Immun-globulinen.....146

4.2 Charakterisierung der Glykosylierung von Ig bis auf die Ebene des intakten Proteins.....147

5 FAZIT.....148

6 ANHANG 151

6.1 Potentielle Markerpeptide humaner Ig-Isotypen und deren Allotypen 151
6.1.1 Potentielle Markerpeptide von IgA 151
6.1.2 Potentielle Markerpeptide von IgM 154
6.1.3 Potentielle Markerpeptide von IgD..... 155
6.1.4 Potentielle Markerpeptide von IgE 155

7 LITERATURVERZEICHNIS.....157

Abkürzungsverzeichnis

Ø Mittelwert
2-DE Zweidimensionale Gelelektrophorese
ADCC Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität
AS Aminosäure
BSA Rinderserumalbumin
CE Kapillarelektrophorese
CHO eng. *Chinese Hamster Ovary*
DB Datenbank
DEAE 2-Diethylamino-ethyl
DNA Desoxy-Ribonukleinsäure
DTT (-)-1,4-Dithio-l-threitol
EI Elektronenstoß-Ionisation
ELISA Enzyme
ESI Elektrospray-Ionisation
HPAEC Anionenaustauschchromatographie bei hohen pH
HPLC *High-performance*-Liquidchromatogaphie
HSA Humanes Serumalbumin
FACE Elektrophorese mit fluorophormarkierten Oligosacchariden
FcγR Fcγ-Rezeptor
FUC Fukose
GPC Gelpermeationschromatographie
IG Immunglobulin
IVIG Intravenöse Immunglobuline
IS Interner Standard
IT Ionenfalle
JES Iodessigsäure
LC Flüssigkeitschromatographie
LIF Kapillarelektrophorese mit laserinduzierter Fluoreszenzdetektion
LOQ Unteres Limit der Quantifizierung
MAB Monoklonaler Antikörper
MALDI eng. *Matrix-assisted-Laser-Desorption/Ionization*
MRM eng. *Multiple Reaction Monitoring*
MS Massenspektrometrie
MS/MS Tandem-Massenspektrometrie
M/Z Masse/Ladung
NAG N-Acetylglucosamin
PAD gepulste amperometrische Detektion
PAGE Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR eng. *Polymerase-Chain-Reaktion*
PPM eng. *Parts per Million*
PSD eng. *Post Source Decay*
QTOF quadropol/TOF
RID Radiale Immundiffusion
RP eng. *Reversed Phase*
RT Retentionszeit
SA Standardabweichung
SDS Sodiumdodecylsulfat
SIA Sialinsäure
SRM eng. *Single Reaction Monitoring*
TOF eng. *Time of Flight*
VK Variationskoeffizient
WHO Weltgesundheitsorganisation

Abbildungsverzeichnis

1-1: Schematischer Aufbau der Struktur eines Immunglobulins 2
1-2: Schematische Darstellung der Genrearrangierung. 3
1-3: Schematische Darstellung der vier IgG-Subklassen 4
1-4: Schematische Darstellung möglicher IgG-Fragmente nach einem Papainverdau. 5
1-5: Struktur des Fc-Teils von IgG und Oligosaccharid-Paarung 10
1-6: Die häufigsten Oligosaccharidstrukturen des humanen IgG 11
1-7: Schematischer Aufbau eines ESI-MS. 14
1-8: Schematische Darstellung des Ionisationsmechanismuses bei der ESI. 15
1-9: ESI-MS-Spektrum des mikroheterogenen Fc-Fragments von IgG. 17
1-10: Aufbau einer Ionenfalle 18
1-11: Schematische Darstellung eines MALDI-TOF-MS 19
1-12: Aufbau eines qTOF-Hybrid-MS-Instruments mit orthogonaler Beschleunigung 21
1-13: Nomenklatur der Peptidfragmentierung nach Roepstorff. 21
1-14: Schematische Darstellung der Proteolyse eines Immunglobulins nach reduktiver Alkylierung 23
1-15: Aufbau eines LC/ESI-MS-Triple-Experiments 23
1-16: Darstellung eines SRM-Experiments 24
2-1: LC-Gradient für das qualtitative Peptide Mapping. 41
2-2: LC-Gradient für die quantitativen MRM-Experimente. 42
2-3: LC-Gradient für die *online* Entsalzung und Konzentrierung von Proteinen. 44
2-4: Darstellung der natürlichen Isotopenbreite in Abhängigkeit vom Molekulargewicht. 46
2-5: Schematische Darstellung des Aufbaus der Immunglobulin-Sequenzdatenbank 47
2-6: Erzeugung möglicher Allotypen ausgehend von gefundenen Varianten in der Swissprot-Datenbank am Beispiel des IgM. 47
2-7: Nomenklatur unter Verwendung von AM-Nummern. 48
2-8: Auszug aus der IgPep-DB 49
2-9: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Programms IgPep. 50
3-1: Schematische Darstellung zur Anreicherung der einzelnen IgG-Subklassen und des Fcγ1-Fragments 51
3-2: Chromatogramm der Reinigung von IgG aus Human-Plasma über Protein A 54
3-3: Nicht-reduzierendes, silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel der über Protein A-Chromatographie gereinigten IgG-Fraktion aus Human-Plasma 54
3-4: MALDI-MS-Spektrum (Biflex III) des über Protein A-Chromatographie gereinigten IgG aus Human-Plasma.. 55

3-5: Chromatogramm einer DEAE-Reinigung von IgG aus Human-Plasma 56

3-6: Nicht-reduzierendes, silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel einer über DEAE gereinigten IgG-Fraktion aus Human-Plasma..... 56

3-7: Nicht-reduzierendes, silbergefärbte SDS-PAGE-Gradientengel von über eine kombinierte Protein A-/ Protein G-Chromatographie gereinigtem IgG3 aus Human-Plasma..... 58

3-8: MALDI-MS-Spektrum (Voyager DE) von über Protein G gereinigtem IgG3 aus Human-Plasma. 59

3-9: Nicht-reduzierendes, silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel der Protein A-Chromatographie zur Trennung von Fc-Fragment vom Fab-Fragment 60

3-10: Chromatogramm der Gelpermeationschromatographie des mit Papain verdauten humanen IgG. 61

3-11: Nicht-reduzierendes, silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel des mit Papain verdauten humanen IgG.61

3-12: MALDI-MS-Spektrum des gereinigten Fcγ1-Fragments aus Human-Plasma 62

3-13: Nicht-reduzierendes, silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel der Protein A-Chromatographie zur Trennung von Fcγ4-Fragment vom Fab-Fragment..... 64

3-14: Prozentuale Sequenzidentitäten der einzelnen Ig-Isotypen untereinander 65

3-15: Schematischer Ablauf zur Identifizierung bis hin zur Quantifizierung spezifischer Markerpeptide 67

3-16: Multiples Alignment des konstanten Bereichs von humanem IgG..... 69

3-17: Auschnitt aus dem Basisionenchromatogramm einer GluC-verdauten IgG-Fraktion..... 78

3-18: MS/MS-Spektrum des isotypischen Markerpeptids G1|3. 80

3-19**:** MS/MS-Spektrum des isotypischen Markerpeptids G2 81

3-20: MS/MS-Spektrum des isotypischen Markerpeptids IgG4 81

3-21: Ionenspurchromatogramm der Markerpeptide G1 und G2m(-n)|4 82

3-22: MS/MS-Spektrum des isotypischen Markerpeptids G1 83

3-23: MS/MS-Spektrum des isotypischen Markerpeptids G3 83

3-24: MS/MS-Spektrum des isotypischen Markerpeptids G2m(n). 84

3-25:MS/MS-Spektrum des isotypischen Markerpeptids G2m(-n)|4..... 84

3-26: MS/MS-Spektrum des isotypischen Markerpeptids G1m(x) 85

3-27: MS/MS-Spektrum des isotypischen Markerpeptids G1m(-x)|2 86

3-28: MS/MS-Spektrum des isotypischen Markerpeptids G3m(b1)..... 86

3-29: MS/MS-Spektrum des isotypischen Markerpeptids G3m(g5)..... 87

3-30: MS/MS-Spektrum des isotypischen Markerpeptids G1m(a)..... 88

3-31: MS/MS-Spektrum des isotypischen Markerpeptids G1m(-a)..... 88

3-32: Vergleich aller in der Ig-DB eingetragenen IgG3- und IgG4-Glykopeptide..... 89

3-33: Ausschnitt aus den einfach geladenen b- und y-Fragmentionenserien der isobaren Glykopeptide des IgG4 und IgG3. 89

3-34: MS/MS-Spektrum des isotypischen Markerpeptids G4m(L) 90
3-35: MS/MS-Spektrum des isotypischen Markerpeptids G4m(V)..... 91
3-36: MS/MS-Spektrum des isotypischen Markerpeptids G4m(R) 92
3-37: MS/MS-Spektrum des isotypischen Markerpeptids G4m(K)..... 92
3-38: Ionenspuren der IgG1-Markerpeptide G1m(a) und G1m(-a) 95
3-39: Ionenspuren der IgG1-Markerpeptide G1m(-x)|2 und G1m(x)..... 95
3-40: Ionenspuren der IgG2-Markerpeptide G2m(-n)|4 und G2m(n). 97
3-41: Ionenspuren der IgG3-Markerpeptide G3m(b1) und G3m(g5). 98
3-42: Ionenspuren der isotypischen Markerpeptide des IgG..……...102
3-43: MS/MS-Spektrum des internen Standardpeptids IS1 aus murinem IgG1. 104
3-44: Ionenspuren der isotypischen Markerpeptide in mit internem Standard (IS) versetztem Leerplasma (LP)..... 106
3-45: Überprüfung der Linearität der isotypischen Markerpeptide 107
3-46: SRM-Spektren der Markerpeptide G1 – G4 bei 10 % der durchschnittlichen Serumkonzentration in 20 µl Plasma..... 108
3-47: Aminosäuresequenz des Glykopeptids aus IgG1 112
3-48: ESI-MS-Spektrum des GluC-Glykopeptids von IgG1. 113
3-49: Ionenspuren der einzelnen Glykospezies des IgG1-Glykopeptids 113
3-50: ESI-MS/MS-Spektrum der G1-Glykospezies des Glykopeptids vom IgG1..... 114
3-51: Basisionenchromatogramm von GluC verdautem EU-Fcγ1-Fragment..... 119
3-52: Postulierter Reaktionsmechanismus zur Bildung des dominanten Fragmentions bei einer Überalkylierung am Methionin. 120
3-53: ESI-MS-Spektren von deglykosyliertem EU-Fcγ1-Fragment und US-Fcγ1-Fragemt..... 121
3-54: Strategie zur wissensbasierten Interpretation dekonvolierter ESI-MS-Daten..... 123
3-55: MaxEnt1 dekonvoliertes ESI-MS-Spektrum vom reduzierten EU-Fcγ1-Fragment. 125
3-56: Manuelle Anpassung simulierter ESI-MS-Daten..... 126
3-57: Wissensbasierte Dekonvolution von reduziertem EU-Fcγ1-Fragment..... 127
3-58: MaxEnt1 dekonvoliertes ESI-MS-Spektrum des reduzierten US-Fcγ1-Fragments. 128
3-59: Verhältnis der dominanten Glykospezies des G1m(f-a-x)-Allotypen beim EU-Fcγ1-Fragment. 129
3-60: MaxEnt dekonvoliertes ESI-MS-Spektrum des intakten US-Fcγ1-Fragments..... 132
3-61: MaxEnt dekonvolierte ESI-MS-Spektren von intakten Fcγ1-Fragment kaukasischer Individuen..... 133
3-62: MaxEnt dekonvoliertes ESI-MS-Spektrum von deglykosyliertem Fcγ4-Fragment..... 139
3-63: Aminosäuresequenz vom Fcγ4-Fragment des Allotypen G4m(RL)..... 140
3-64: MS/MS-Spektrum vom N-terminalen Peptid des Fcγ4-Fragment..... 141

3-66: Wissensbasierte Dekonvolution unter Verwendung verschiedener Peakbreiten auf halber Höhe 144

Tabellenverzeichnis

1-1: Unterteilung der neun Immunglobulinisotypen Subklassen und Subklassen. 3

1-2: Physikochemische und biologische Eigenschaften der vier humanen IgG-Subklassen. 6

1-3: Die 24 bekannten Faktoren (numerische und alphamerische Nomenklatur)..... 7

1-4: Isoallotypie bei Gm-Faktoren. 8

1-5: Gm-Faktoren determinierende Aminosäuren im IgG-Molekül. 8

1-6: Zusammenhang zwischen Gm-Faktoren und dem IgG-Subklassenkonzentrationen 9

1-7: Häufigkeit der Gm Haplotypen in Europa. 9

2-1: Bei der Protein A- und Protein G-Affinitätschromatographie verwendete Puffer, Säulen und Bedingungen. 34

2-2: Bei der Isolierung von IgG aus Seren einzelner Individuen verwendete Puffer, Säulen und Bedingungen (DEAE-Chromatographie)..... 34

2-3: Bei der Papainspaltung verwendete Puffer..... 35

2-4: Bei der Gelpermationschromatographie verwendeter Puffer..... 35

2-5: Verwendete Säulen und Flussraten und Puffer bei der IgG3-Anreicherung..... 36

2-6: Bei der DEAE-Chromatographie verwendete Puffer..... 36

2-7: Verwendete Säulen und Flussraten bei der IgG4-Anreicherung aus Human-Plasma. 37

2-8: Bei der Deglykosylierung verwendete Puffer. 38

2-9: Beim *Peptide Mapping* verwendete Puffer..... 39

2-10: Bei der ZipTip-Probevorbereitung für MALDI-MS benötigte Lösungen. 40

2-11: Verwendete Matrixlösungen für Proteine und Peptide bei der MALDI-Präparation. 40

2-12: Geräteparameter bei MALDI-MS-Messungen. 41

2-13: Beim qualitativen Peptide Mapping verwendete MS-Parameter (LCQ)..... 42

2-14: Für die Prozessierung von MS-Daten verwendete Parameter. 43

2-15: Selbst erstellte Protein-/Peptidsequenzdatenbanken. 43

2-16: Verwendete Parameter des Reportfilters..... 44

2-17: Bei LC/ESI-MS verwendete Puffer, Säule und Bedingungen. 44

2-18: Bei ESI-IT-MS-Messungen (LCQ) intakter Proteine verwendete Parameter..... 45

2-19: Herkunft der vier IgG1-Allotypen in der Ig-DB. 48

3-1: Ergebnisse der Anreicherung einzelner IgG-Subklassen und Fcγ-Fragmente..... 53

3-2: IgG4-Gehalt von IgG-Fraktionen, die über verschiedene DEAE-Materialien gereinigt wurden..... 57

3-3: Zusammenfassung der in der Ig-DB enthaltenen Immunglobulinsequenzen. 66

3-4: Theoretisch mit dem Programm IgPep vorhergesagte isotypische Markerpeptide für IgG 70

3-5: Theoretisch mit dem Programm IgPep vorhergesagte allotypische Markerpeptide von IgG1, die bei Verdau mit den Proteasen GluC und Post-Pro entstehen 71

3-6: Mögliche Phänotypen von IgG1 in der kaukasischen Population und das damit verbundene Auftreten allotypischer Markerpeptide. 72

3-7: Theoretisch mit dem Programm IgPep vorhergesagte allotypische Markerpeptide von IgG2, die bei Verdau mit den Proteasen GluC und Trypsin entstehen 73

3-8: Phänotypen des IgG2 in der kaukasischen Population und das damit verbundene Auftreten allotypischer Markerpeptide. 73

3-9: Theoretisch mit dem Programm IgPep vorhergesagte allotypische Markerpeptide von IgG3, die bei Verdau mit der Protease GluC entstehen. 74

3-10: Übertragung des serologisch definierten G3m-Systems auf ein System allotypischer Markerpeptide. 74

3-11: Theoretisch mit dem Programm IgPep vorhergesagte allotypische Markerpeptide von IgG4, die bei Verdau mit der Protease GluC entstehen 75

3-12: Phänotypen von IgG4 in der kaukasischen Population und das damit verbundene Auftreten allotypischer Markerpeptide. 75

3-13: Theoretisch mögliche Phänotypen bei Kaukasiern, die durch Kombination der Haplotypen dieser Population entstehen können 76

3-14: Theoretisch mit dem Programm IgPep vorhergesagte allotypische Markerpeptide von IgG, die bei Verdau mit der Protease GluC entstehen 77

3-15: Theoretisch mit dem Programm IgPep vorhergesagte isotypische Markerpeptide von IgG, die bei Verdau mit der Protease GluC entstehen. 77

3-16: Charakterisierung der Markerpeptide des IgG-Systems und der selektiven SRM-Übergänge. .. 79

3-17: *Response*-Verhältnisse zur Berechnung des isotypischen Anteils an den isoallotypischen Markern G1m(-x)|2 und G2m(-n)|4 93

3-18: IgG-Profil (Phänotypisierung) der Individuen AR und SE. 94

3-19: Berechnung des IgG2-Anteils an der Peakfläche des isoallotypischen Markerpeptids G1m(-x)|2. 96

3-20: Berechnung des IgG4-Anteils an der Peakfläche des isoallotypischen Markerpeptids G2m(-n)|4. 97

3-21: Phänotypisierung 29 kaukasischer Individuen 99

3-22: Vergleich der Haplotyphäufigkeiten bei Kaukasiern unter Verwendung serologischer Reagenzien und Massenspektrometrie. 100

3-23: Bestimmung der *Response*-Faktoren der isotypischen Markerpeptide von IgG für die „relative“ Quantifizierung. 102

3-24: Präzision und Richtigkeit für die „relative“ Quantifizierung der IgG-Subklassen 103

3-25: Interne Standardpeptide (IS1 und IS2) aus murinem IgG1 zur Quantifizierung der humanen IgG-Subklassen 104

3-26: SRM-Übergänge zur Quantifizierung der IgG-Subklassen.. 105

3-27: Bestimmung von Präzision und Richtigkeit bei der Quantifizierung der IgG-Subklassen 109

3-28: IgG-Subklassen- und Allotypenverteilung von Human-Plasmen im Vergleich zu verschiedenen IVIG-Präparationen 110

3-29: Haplotypenverteilung in der negroiden Population. 111

3-30: Glykospezies von IgG1 115

3-31: Präzision der Quantifizierung der IgG1-Glykospezies 116

3-32: Vergleich verschiedener Methoden zur Quantifizierung der Glykospezies 117

3-33: Identifizierte GluC-Peptide von EU-Fcγ1-Fragment. 119

3-34: Vergleich der theoretischen mit den experimentell bestimmten Molekulargewichte von US-Fcγ1- und EU-Fcγ1-Fragment für die Allotypen G1m(f-a-x), G1m(za-x) und G1m(zax). 122

3-35: Vergleich der prozentualen Verhältnisse der IgG1-Allotypen in europäischem und amerikanischem Human-Plasma 122

3-36: Vergleich der theoretischen mit den experimentell bestimmten Molekulargewichten (M) für die einfach galaktosylierte Glykospezies (G1) des reduzierten US- und EU-Fcγ1-Fragments . 129

3-37: Vergleich der Verhältnisse dominanter Glykospezies des G1m(f-a-x)-Allotpyen beim EU-Fcγ1-Fragment (ESI-qTOF-MS)..... 130

3-38: IgG1-Glykosylierungsprofil von 14 gesunden humanen Individuen im Hinblick auf den Anteil defukosylierter und biverzeigender Glykospezies. 135

3-39: Glykosylierungsprofil des IgG4 im Vergleich zu dem von IgG1 138

3-40: Vergleich der theoretischen mit den experimentell bestimmten Molekulargewichten von Fcγ-Fragmenten der Allotypen des IgG1 und IgG4. 140

3-41: Bestimmung der Allotypenverteilung des IgG4. 141

1 Einleitung

Genomische Informationen beschreiben Zellen, Gewebe oder ganze Organismen statisch. Biologische Prozesse sind dagegen durch dynamische Antworten auf Störungen von außen, seien diese pharmakologisch, pathologisch, ökologisch oder anderweitig gekennzeichnet. Die Möglichkeit diese Änderungen, die durch spezifische Störungen induziert werden, zu detektieren und zu quantifizieren, ist daher von grundlegender Bedeutung für die Studie komplexer biologischer Prozesse, zu denen auch die Immunantwort zählt. **Immunomics** beschäftigt sich daher im Vergleich zu Proteomics ausschließlich mit der Detektion und Quantifizierung immunologisch relevanter Proteine. Dazu gehört sowohl die Änderung des Expressionsniveaus einzelner Proteine, als auch die Charakterisierung posttranslationaler Modifikationen. Die Untersuchung von Immunglobulinen (Ig), die elementare Proteine des Immunsystems und Hauptakteure der humoralen Immunantwort sind[1], ist daher von zentraler Bedeutung.

Bis heute sind verschiedene analytische Verfahren auf der Basis spezifischer monoklonaler und polyklonaler Antikörper zur quantitativen Bestimmung von Immunglobulinen entwickelt worden[2,3], deren Limitierungen maßgeblich aus der Mikroheterogenität der Immunglobuline resultieren[4]. Die Polykonalität sowie die Unterteilung der Ig in Klassen, Subklassen und Allotypen und deren Glykosylierung, die funktionellen Einfluss auf die unterschiedlichen Immunglobuline hat[5], begründen diese Vielfalt.

Die klinische Relevanz der Ig-Analytik zeigt sich in der anomalen Funktion des Immunsystems bei Mangel einzelner Ig-Klassen oder Subklassen[6]. Wiederkehrende Infektionen verschiedener Art und ein erhöhtes Krebsrisiko[7] sind das Resultat. Infektionen mit bekapselten Bakterien[8] wie *Streptococcus pneumonia* oder *Haemophilus influenzae*, Atemwegsinfektionen[9,10], Meningitis, Osteomyelitis seien als Beispiele genannt. Oft ist ein Mangel gleich mehrerer Ig für wiederkehrende Infektionen verantwortlich. So geht bei respiratorischen Beeinträchtigungen oft ein IgG-Subklassenmangel mit einem IgA-Mangel einher[11]. Erhöhte Konzentrationen einzelner Ig können auch pathologisch sein, wie z.B. ein erhöhter IgG4- oder IgE-Gehalt[12] bei allergischen Reaktionen oder der Konzentrationsanstieg eines Ig-Isotypen bei Patienten mit multipler Myeloma[13]. Pharmakologisch ist die Ig-Analytik für die Charakterisierung intravenöser Immunglobulin (IVIG)-Präparationen von Bedeutung[14,15]. Besonders ein nicht ausreichend verstandener Wirkmechanismus bei Autoimmunerkrankungen stellt hier eine Herausforderung dar[16]. Des Weiteren ist die Unterscheidung der Ig-Allotypen von Interesse, weil Normalwerte einzelner IgG-Subklassen[17] allotypenabhängig sind, genauso wie die Produktion körpereigener spezifischer Antikörper[18].

Viele Zusammenhänge zwischen Krankheiten und den damit verbundenen Änderungen im Ig-Profil können nur durch eine umfangreiche Kombination etablierter Assays untersucht werden. Serologisch sind aber bei weitem nicht alle Ig-Allotypen und auch nicht alle Ig-Isotypen standardisiert quantifizierbar.

Massenspektrometrische Methoden, die ihre Leistungsfähigkeit auf dem Gebiet der Proteomforschung zur Lösung komplexer Problemstellungen bereits bewiesen haben[19], können Limitierungen der klassischen Serologie überwinden. Dabei steht die Möglichkeit zur

Generierung eines vollständigen Ig-Profils einzelner Individuen inklusive der funktionell bedeutenden Glykosylierung in einem Schritt in Aussicht, wogegen etablierte Assayverfahren nur die Betrachtung einzelner Ausschnitte aus dem Gesamtbild erlauben.

1.1 Struktur von Immunglobulinen (Ig)

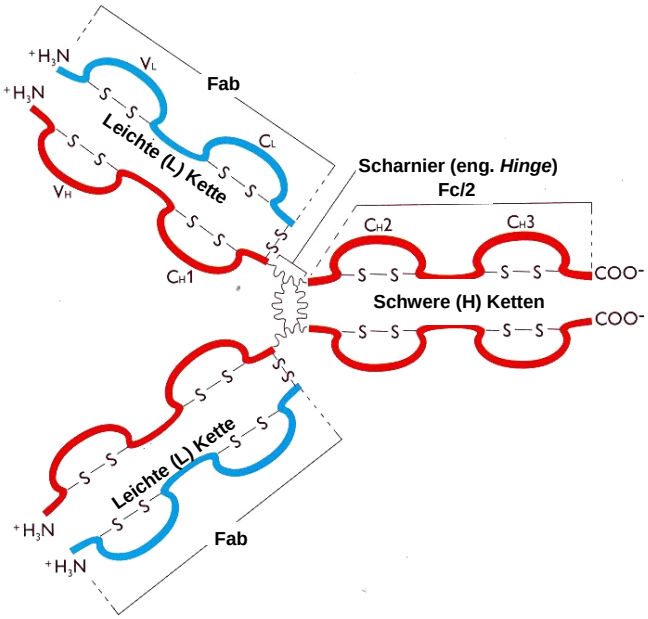


Abbildung 1-1: Schematischer Aufbau eines Immunglobulins; rot – schwere Kette, blau – leichte Kette.

Die Immunglobuline, auch Antikörper genannt, sind eine Gruppe eng verwandter Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von ~ 150 kDa. Das Immunglobulin besitzt eine Y-förmige, symmetrische Struktur aus insgesamt vier Polypeptidketten (Abbildung 1-1). Das Tetramer, welches aus zwei identischen schweren Ketten (H_c) und zwei identischen leichten Ketten (L_c) besteht, wird durch inter- und intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert. Eine Disulfidbrücke innerhalb einer Kette stabilisiert jeweils eine Domäne, die eine Ig-typische ß-*Sandwich*-Faltung besitzt. Aus diesen Domänen ist das gesamte Ig-Molekül aufgebaut. Die beiden N-terminalen Domänen (V_H und V_L) sind durch eine extrem hohe Sequenzvariabilität gekennzeichnet und bilden jeweils gemeinsam die beiden antigenbindenden Bereiche. Der restliche, konstante C-terminale Bereich der schweren und leichten Ketten weist dagegen kaum Sequenzvariabilitäten auf und vermittelt die Effektorfunktionen der Ig. Der konstante Teil der leichten Ketten wird mit C_L bezeichnet, wogegen sich der konstante Bereich der schweren Ketten in die drei Domänen, C_H1, C_H2 und C_H3 und die zwischen der C_H1- und C_H2-Domäne lokalisierte *hinge*-Region unterteilt.
Die weitere Unterteilung des Immunglobulins leitet sich von der möglichen proteolytischen Spaltung der Ig in der *hinge*-Region ab. Dabei entstehen die kristallisierbaren Fc-Fragmente und die den antigenbindenden Bereich enthaltenden Fab-Fragmente.

1.2 Diversität von Immunglobulinen – Klassen, Subklassen und Allotypen

Die größte Heterogenität der Immunglobuline ergibt sich durch die Variabilität der antigenbindenden Bereiche der Immunglobuline. Diese Bereiche werden durch verschiedene Gene, die V_H-, D_H- und J_H-Gene für die schwere Kette und die V_L- und die J_U-Gene für die leichte Kette, kodiert, von denen Vertebraten, wie auch der Mensch, jeweils ein festes Ensemble besitzen. Die vorhandenen multiplen Gene werden somatisch rekombiniert, was die Voraussetzung für mehr als 10^8 mögliche antigenbindende Bereiche bildet. Diese Vielfalt gilt nicht für den konstanten Bereich des Immunglobulins. Für diesen Bereich der schweren Ketten kodieren die C_H-Gensegmente (Cμ, C_{γ} usw.), die zu einer Unterteilung der Immunglobuline in Isotypen führen (Abbildung 1-2).

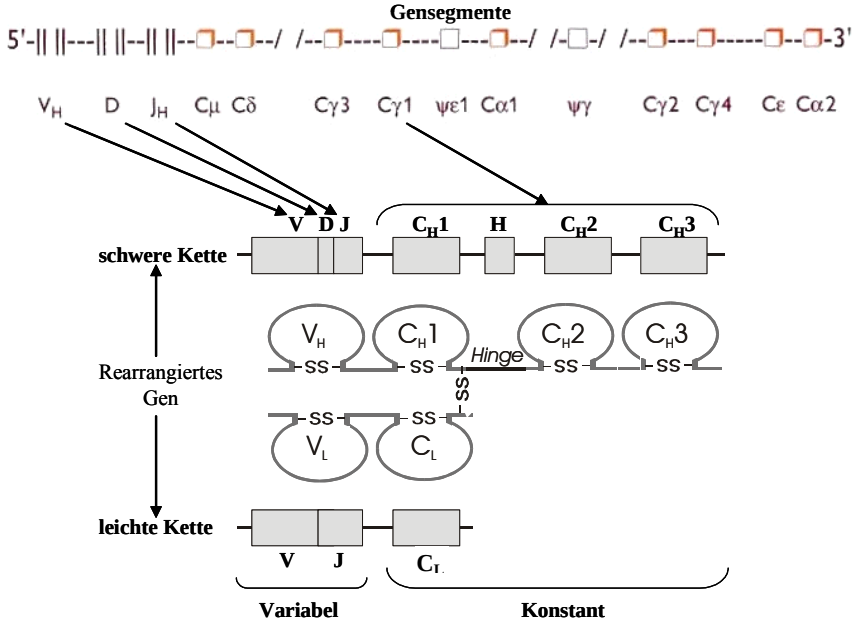


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der Genrearrangierung.

Neun Ig-Isotypen wurden ausgehend von den verschiedenen Gensegmenten im Menschen gefunden: IgM, IgD, IgE und IgG, das sich weiter in die vier IgG-Subklassen, IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 unterteilt, und IgA, das sich weiter in die beiden Subklassen IgA1 und IgA2 unterteilt (Tabelle 1-1). Die Differenzierung spiegelt die Sequenzhomologien der Isotypen untereinander wieder.

Tabelle 1-1: Unterteilung der neun Immunglobulinisotypen Subklassen und Subklassen.

Kassen	IgM	**IgG**	IgD	IgE	**IgA**
Subklassen		IgG1			IgA1
		IgG2			IgA2
		IgG3			
		IgG4			

Eine weitere Ebene der Komplexität entsteht durch die Existenz verschiedener Allotypen für jeden Isotypen. Jeder Mensch besitzt entsprechend seiner genomischen Voraussetzung nur ein bestimmtes Set von Allotypen. Das C_H-Gensegment, das alle für die verschiedenen

Isotypen kodierenden Gene enthält, ist auf dem Chromosom 14 Band q32 lokalisiert, welches jeder Mensch in zweifacher Ausführung besitzt. Die beiden C_H-Gensegmente müssen nicht identisch sein und werden nach dem Mendelschen Schema kodominant vererbt. Jedes der beiden Gensegmente enthält die Gene aller Ig-Isotypen. Die zwei Gencluster eines jeden Segmentes, die für den gleichen Isotypen kodieren, können allel sein. Jeder Mensch kann daher zwei Allotypen eines jeden Isotypen besitzen. Sind beide Gene eines Isotyps identisch, spricht man von Homozygotizität, sind sie verschieden von Heterozygotizität. Während bei Homozygoten nur ein Allotyp eines Isotypen exprimiert wird, bestimmen aufgrund der kodominanten Vererbung bei Heterozygoten zwei Allotypen den Phänotyp.
Da das C_H-Gensegment als Gesamtheit vererbt wird, wird dieses oft auch als Haplotyp bezeichnet. Beide Haplotypen zusammen bilden den Genotyp und finden sich auf Proteinebene im Phänotyp wieder.

1.2.1 Immunglobulin G Subklassen – Unterschiede in den physiko-chemischen und biologischen Eigenschaften

IgG stellt einen wichtigen Effektor der humoralen Immunantwort[1] dar und ist mit einen Anteil von ~ 75 % das häufigste in Human-Serum vorkommende Immunglobulin. Die verschiedenen IgG-Subklassenkonzentrationen im Serum sind wie folgt: IgG1 > IgG2 > IgG3 = IgG4. Die Sequenzhomologie beträgt mehr als 95 %; Sequenzunterschiede sind vorwiegend in der *hinge*-Region lokalisiert, der Region, die dem Immunglobulin seine Flexibilität verleiht. Weitere Unterschiede sind in den C_H2- und C_H3-Domänen zu finden, aber kaum in der C_H1-Domäne, die damit die größte Homologie aufweist. Hervorzuheben ist die unterschiedliche Anzahl von Cysteinen, die in der *hinge*-Region die Disulfidbrücken (S-S) zwischen den Ketten bilden. Insgesamt variieren Länge und Flexibilität dieser Region zwischen den verschiedenen IgG-Subklassen (Abbildung 1-3).

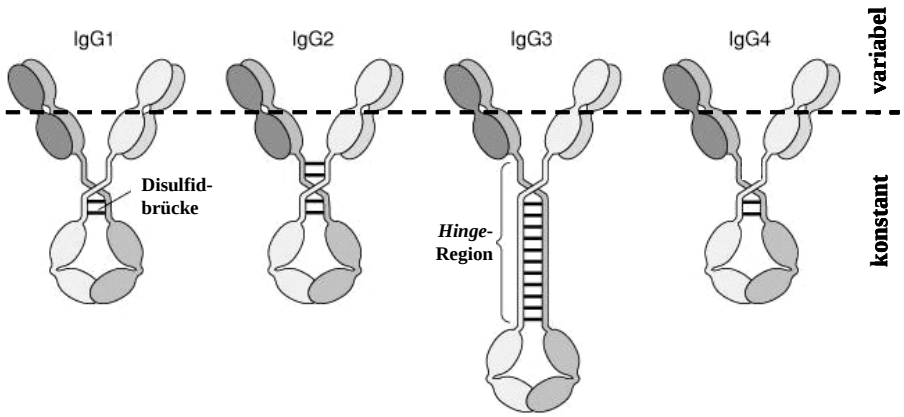


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der vier IgG-Subklassen

Dieses hat zur Folge, dass die Subklassen für proteolytische Enzyme, wie Papain[20] unterschiedlich zugänglich sind. Während IgG2 mit seiner sehr kurzen (12 AS) und rigiden (4 S-S) *hinge*-Region kaum mit Papain gespalten werden kann, verfügt IgG1 mit seiner längeren (15 AS) und flexiblen (2 S-S) *hinge*-Region über eine gute Spaltbarkeit und IgG3

mit seiner extrem langen (62 AS) sogar über eine sehr gute Spaltbarkeit. Die *hinge*-Region von IgG4 ist mit 12 Aminosäuren ebenso kurz, wie die des IgG2, bildet aber nur zwei Disulfidbrücken. Daraus resultiert eine schlechte Spaltbarkeit mit Papain. Gibt man aber eine geringe Menge Cystein oder anderer Thiole zu, so erreicht man eine stark verbesserte Spalteffizienz.

Papain spaltet unter geeigneten Bedingungen Immunglobuline in der *hinge*-Region, was zur Bildung von Fab- und Fc-Fragmenten führt (Abbildung 1-4). Durch Reduktion der Disulfidbrücken zwischen den Ketten mit Hilfe hoher Konzentrationen an Thiolen (z.B. (-)-1,4-Dithio-l-threitol – DTT) kann das intakte Fc-Fragment in die beiden reduzierten Fc/2-Fragmente gespalten werden.

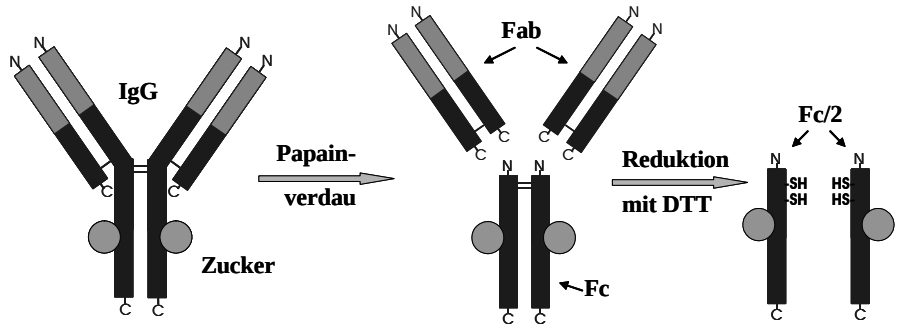


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung möglicher IgG-Fragmente nach einem Papainverdau.

Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit und auch der hohen Sequenzhomologie ist eine Trennung der verschiedenen Subklassen nur schwer möglich. Für eine Trennung der IgG-Subklassen kann neben den leicht unterschiedlichen pI-Bereichen[21] der polyklonalen IgG-Fraktionen noch deren unterschiedliche Affinität zu Protein A und Protein G aus *Staphylococcus aureus* genutzt werden[22].

Auch die biologischen Funktionen der IgG-Subklassen unterscheiden sich deutlich. Die Komplementaktivierung ist eine wichtige Effektorfunktion der IgG[23]. Insgesamt werden dem Komplementsystem mehr als 25 verschiedene Proteine zugerechnet. Durch die Bindung der C1-Komponente des Komplements an den Fc-Teil des humanen IgG wird eine Kaskade initiiert, die letztendlich zur Lyse der Zellen führt, an deren Oberfläche Ig Antigene gebunden haben. Alle IgG-Subklassen mit Ausnahme des IgG4 binden die C1-Komponente, wogegen Antikörper des IgG4 vor den biologischen Effekten der komplementfixierenden Antikörper schützen (Kapitel 1.2.2)[24,25]. Eine weitere Funktion der IgG ist die Fähigkeit zur Bindung verschiedener, an der Zelloberfläche befindlicher Fcγ-Rezeptoren, was die anikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC)[26] auslöst. Einmal an der Oberfläche bestimmter Zelltypen fixiert, kann das IgG sein Antigen binden und so die Beseitigung der Antigene oder Immunkomplexe durch Phagozytose einleiten. Bis heute wurden drei verschiedene Typen von Fcγ-Rezeptoren auf Leukozyten gefunden[27]: Die beiden hochaffinen Rezeptoren FcγRI und FcγRII und der niedrigaffine FcγRIII. Die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der einzelnen Subklassen und somit ihrer biologischen Funktionen sind neben den physikochemischen Eigenschaften in Tabelle 1-2 aufgelistet.

Tabelle 1-2: Physikochemische und biologische Eigenschaften der vier humanen IgG-Subklassen[28].

Subklasse	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Physikochemische Eigenschaften				
Molekulargewicht [kDa]	146	146	170	146
Aminosäuren in der *hinge* -Region	15	12	62	12
Inter-Kettendisulfidbrücken	2	4	11	2
pI-Bereiche	8,6 +/- 0,4	7,4 +/- 0,6	8,3 +/- 0,7	7,2 +/- 0,8
Zugänglichkeit für Proteasen:				
Papain	+	-	+	+/-
Plasmin	+++	+	+++	+
Trypsin	+++	+	+++	+++
Pepsin	+	+	+++	+++
Durchschnittliche Serumkonzentration				
Relativ [%]	60,3 - 71,5	19,4 - 31,0	5,0 - 8,4	0,7 - 4,2
Mittel - Absolut [mg/ml]	8	4	0,8	0,4
Schwankungen [mg/ml]	5 - 12	2 - 6	0,5 - 1	0,2 - 1
Biologische Eigenschaften				
Komplement Aktivierung	++	+	++	0
Immunantwort auf:				
Proteine	++	+/-	++	+/-
Polysaccharide	+	++	-	-
Allergene	+	-	-	++
Affinität zu:				
FcγRI	++	-	+++	+
FcγRII	++	*	+++	-
FcγRIII	++	-	++	-

* Bindung Allotyp abhängig

Dieser Überblick über die unterschiedlichen Effektorfunktionen der vier IgG-Subklassen belegt die Einzigartigkeit jeder Subklasse. Die genaue Bedeutung jeder einzelnen innerhalb der komplexen Immunantwort ist jedoch bis heute offen. Der Anstieg der Konzentration einer Subklasse im Serum unter dem Einfluss bestimmter Antigene (z.B. bakterieller oder viraler Antigene oder Allergene) lässt aber vermuten, dass die Immunantwort durch die variable Kopienanzahl einzelner IgG-Subklassen optimiert wird.

1.2.2 Besonderheit von humanem IgG4

Die Struktur von Immunglobulinen wurde schon oft beschrieben, so dass folgende Grundregeln definiert wurden:

1. Immunglobuline haben zwei **identische** antigenbindende Bereiche (Monovalenz).
2. Antikörper haben eine stabile Struktur.
3. Monoklonales IgG bildet ein gutes Model für natürliches, polyklonales IgG.

Auf IgG4 treffen diese Regeln nicht zu[29]. Während polyklonales IgG4 nicht in der Lage ist zwei Antigene miteinander zu vernetzen, kann monoklonales IgG4 dieses sehr wohl (3.). Außerdem ist auf nicht reduzierenden SDS-Gelen eine Bande von IgG4-Halbmolekülen zu erkennen, die keine Disulfidbrücken zwischen den schweren Ketten besitzen (2.).

IgG4-Antikörper sind also bivalent und nicht monovalent, wie die anderen IgG-Subklassen (1.). Erklärt werden kann dieses durch eine einfache Variation des CPPCP-Motivs in der *hinge*-Region. Durch die sterisch eingeschränkten ϕ/ψ-Winkelkombinationen der Proline ist die Bildung einer intramolekularen Disulfidbrücke nicht möglich. Wogegen dieses durch einen Prolin -> Serin Austausch im IgG4 zum CPSCP-Motiv sterisch ermöglicht wird. Daraus resultieren fehlende intermolekulare Disulfidbrücken bei 25 % bis 75 % der IgG4-Moleküle. Eine Dissoziation der IgG4-Halbmoleküle unter physiologischen Bedingungen ist aufgrund der nichtkovalenten Interaktionen unwahrscheinlich. Aalberse[29] postulierte daher eine Katalyse dieses Austausches durch andere Enzyme, wie der Proteindisulfid-Isomerase.

1.2.3 Allotypen – Das Gm-System

Grubb legte schon im Jahre 1956[30] den Grundstein für das heute etablierte Gm-System zur Erfassung der Ig-Allotypen. Er fand den ersten Gm-Faktor, bei dem es sich um ein Antikörpergemisch handelt und mit dessen Hilfe spezifisch ein allotypisches Epitop des IgG1 serologisch identifiziert werden konnte.
In den folgenden Jahren nahm die Anzahl der bekannten Faktoren beträchtlich zu, so dass das System, mit denen allotypische Epitope der Ig-Klassen A, E und G sowie der leichten Kappa (κ)-Kette bestimmt werden können (Tabelle 1-3), heute 24 Faktoren umfasst[31].

Tabelle 1-3: Die 24 bekannten Faktoren (numerische und alphamerische Nomenklatur)[32].

Schwere Kette					Leichte Kette
γ1	γ2	γ3	α2	ε	κ
G1m	**G2m**	**G3m**	**A2m**	**Em**	**Km**
1 (a)	23 (n)	5 (b1)	1	1	1
2 (x)		6 (c3)	2		2
3 (f)		10 (b5)			3
17 (z)		11 (b0)			
		13 (b3)			
		14 (b4)			
		15 (s)			
		16 (t)			
		21 (g1)			
		24 (c5)			
		26 (u)			
		27 (v)			
		28 (g5)			

Zwischen der Begrifflichkeit des Allotypen und der allotypischen Epitope muss strikt unterschieden werden, weil erst mehrere Faktoren (d.h. allotypische Epitope) einen Allotypen definieren. Beispielsweise bestimmt die Kombination der Faktoren G1m(z), G1m(a) und G1m(x) den seltenen IgG1-Allotypen G1m(zax). Daher ist die Zahl der bekannten Faktoren auch nicht mit der Anzahl der Allotypen gleichzusetzen. Biochemisch betrachtet handelt es sich bei den Faktoren um monoklonale Antikörper (mAb) oder polyklonale Antikörpergemische, die in verschiedenen Assayverfahren zur Detektion der verschiedenen allotypischen Epitope eingesetzt werden.[33]
Aufgrund der hohen Sequenzhomologien zwischen verschiedenen Ig-Subklassen (> 95 %) entsteht das Problem der Isoallotypie (Tabelle 1-4). So wurden mehr als die in Tabelle 1-3

aufgeführten Faktoren gefunden, deren Epitope sich aber nicht nur bei bestimmten Allotypen einer Subklasse, sondern auch bei anderen Subklassen finden[34]. Als Beispiel sei hier der Faktor G4m(a) genannt, der neben einem IgG4-Allotypen auch die Subklassen IgG1 und IgG3 bindet. Daher können isoallotypische Faktoren nur zur Untersuchung isolierter Isotypen verwendet werden.

Tabelle 1-4: Isoallotypie bei Gm-Faktoren.

	Subklasse			
Benennung	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
G1m(-a)	*allo*	iso	iso	-
G1m(-z)	*allo*	-	iso	iso
G2m(-n)	-	*allo*	-	iso
G3m(-g)	-	iso	*allo*	-
G3m(-b0)	iso	iso	*allo*	-
G3m(g5)	-	iso	*allo*	-
G4m(a)	iso	-	iso	*allo*
G4m(b)	-	iso	-	*allo*

Mit der Entwicklung der rekombinanten DNA-Technologien in den 80iger Jahren, im besonderen mit der Entwicklung der PCR (engl. *polymerase chain reaction*) durch Mullis[35], wurde erst sehr viel später eine molekulare Charakterisierung der allotypischen Epitope möglich. Bis heute konnten vielen Faktoren die Epitop determinierenden Aminosäuren zugeordnet werden. Schwierigkeiten bereitet dabei IgG3 aufgrund seines starken Polymorphismus, der sich in 13 bekannten G3m-Faktoren ausdrückt (Tabelle 1-5).

Tabelle 1-5: Gm-Faktoren determinierende Aminosäuren im IgG-Molekül.

Faktor	Aminosäuren	Position
G1m(a)	D, L	356, 358
G1m(-a)	E, M	356, 358
G1m(f)	R	214
G1m(z)	K	214
G1m(x)	G	431
G2m(-n)	P, V	189, 282
G2m(n)	T, M	189, 282
G3m(g1)	L	291
G3m(t)	W	292
G3m(s)	M	379
G3m(c5)	R, V	409, 422
G3m(c3)	E	419
G3m(g5)	R, Y	435, 436

Die treibende Kraft für die Entwicklung dieses komplexen Systems zur serologischen Typisierung der Immunglobuline war ab Anfang der 60er Jahre bis zur Begründung moderner rekombinanter DNA-Techniken die ideale Beschaffenheit dieses Verfahrens für Populationsstudien[36], zur Auffindung von Verknüpfungen zwischen Allotypenverteilungen und Krankheiten[37], für forensische Untersuchungen, Partnerschaftstests und die Auffindung geeigneter Spender für Knochenmarkstransplantationen. Aus einigen dieser Gebiete, z.B. der Forensik, wurde die serlogische Methode vollständig durch rekombinante DNA-Techniken ersetzt.

Die Zusammenhänge, die zwischen Krankheiten und bestimmten Allotypenverteilungen hergestellt wurden, begründen sich alle auf einer verstärkten oder abgeschwächten humoralen Immunantwort auf eine Vielzahl von bakteriellen Pathogenen, Autoantigenen und Tumor-Antigenen[18].

Tabelle 1-6: Zusammenhang zwischen Gm-Faktoren und dem IgG-Subklassenkonzentrationen[39]. Die Konzentrationen liegen in Abhängigkeit vom Gm-Faktor über (+) oder unter (-) den von der *World Health Organisation* (WHO) angegebenen Normalwerten.

Faktoren	Isotyp	Abweichung von Normalwerten
G1m(a)	IgG1	+
G1m(f)	IgG1	-
G2m(n)	IgG2	+
G2m(-n)	IgG2	-
G3m(g*)	IgG3	+
G3m(b*)	IgG3	-

Die Konzentrationen der einzelnen Ig-Isotypen hängen von den vorhandenen Allotypen der entsprechenden Isotypen ab (Tabelle 1-6)[38].

1.2.4 Allotypenverteilungen in verschiedenen Populationen

Eine Erkenntnis der Populationsstudien ist die Verteilung von bestimmten Ig-Haplotypen in verschiedenen Populationen.

Tabelle 1-7: Häufigkeit der Gm Haplotypen in Europa. Die Haplotypen werden mit Hilfe der Gm-Faktoren beschrieben.

Haplotyp			Europa
G1m	G2m	G3m	%
f-a-x	n	b*	45
f-a-x	-n	b*	24,9
za-x	-n	g *	18,7
zax	-n	g *	9,8
za-x	-n	b*	0,4
Sonstige			1,2

Die kaukasische Population, die in Europa vorherrscht, kann mit nur fünf verschiedenen Haplotypen beschrieben werden[31]. Die Tabelle 1-7 zeigt, dass 98,8 % der europäischen Population mit diesen Haplotypen beschrieben werden können. Bei kaukasischen Individuen kommen drei Allotypen für IgG1 (G1m(f-a-x), G1m(za-x) und G1m(zax)), zwei für IgG2 (G2m(n) und G2m(-n)) und zwei für IgG3 (G3m(b*) und G3m(g*)) vor.
Studien anderer Populationen (z.B. negroider) zeigen zumeist eine Verschiebung zugunsten des G1m(za-x)-Allotypen und das Auftreten weiterer G3m-Allotypen[40]. Die 13 G3m-Faktoren definieren auf serologischer Ebene eine größere Anzahl verschiedener IgG3-Allotypen, von denen, neben den IgG3-Allotypen G3m(b*) und G3m(g*), die Allotypen G3m(b0, b1, c3, c5, u), G3m(b0, b1, c3, b4, b5, u, v), G3m(b0, b3, b5, s, v) und G3m(b0, b3, b5, s, t, v) die wesentlichen sind. Letztere werden auch mit G3m(c3c5*), G3m(c3*), G3m(s*) und G3m(st*) abgekürzt[31].

1.3 Glykosylierung von Immunglobulinen

Immunglobuline sind Glykoproteine. Der Gewichtsanteil der Glykane am IgG beträgt bei Säugetieren etwa 2 – 3 %. Beim Menschen ist dieser Anteil auf durchschnittlich 2,8 Glykosylierungsstellen zurückzuführen, von denen zwei hochkonserviert an der Position Asn-297 sind. Die übrigen 0,8 Positionen ergeben sich aus einer Glykosylierung der hypervariablen Regionen. Die Aminosäure Asn-297 befindet sich in der C_H2-Domäne der beiden identischen schweren Ketten (Abbildung 1-5)[41]. Die Oligosaccharide eines IgG-Moleküls liegen in der nativen Struktur gepaart vor und beeinflussen die Tertiärstruktur des Proteins[42]. Veränderungen in der Mikroheterogenität dieser Oligosaccharide stehen dadurch im direkten Zusammenhang mit der über den Fc-Teil vermittelten Effektorfunktion (Kapitel 1.3.2).

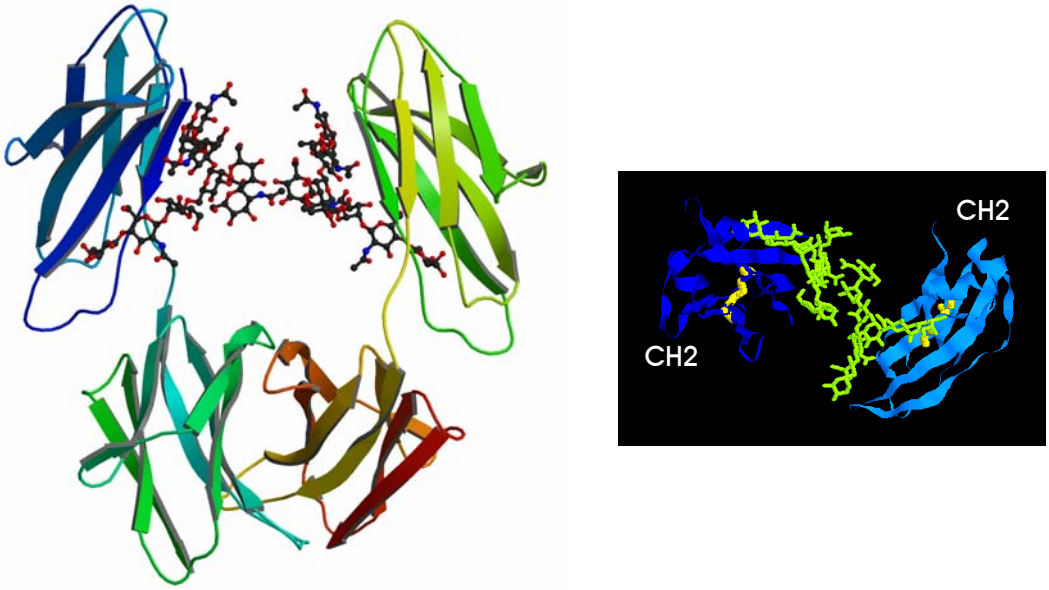


Abbildung 1-5: Links – Struktur des Fc-Teils (PDB-Eintrag: 1FC1) von IgG, die sich symmetrisch aus den beiden konstanten Bereichen der schweren Ketten zusammensetzt. **Rechts –** Oligosaccharid-Paarung zwischen den beiden C_H2-Domänen, die beide an Position Asn-297 glykosyliert sind.

Es ist bekannt, dass die Oligosaccharide des IgG stark mikroheterogen sind. Die Mikroheterogenität der Glykosylierung ist individuell unterschiedlich und hängt vom Organismus[47], pathologischen Zuständen[48] und Kultivierungsbedingungen[49] der IgG produzierenden Zellen ab. So besitzen die Glykane in der Maus kein biverzweigendes N-Acetylglucosamin und sind vollständig fukosyliert. Gleiches gilt auch für Glykane aus CHO-Zellen (engl. *chinese hamster ovary*), in denen die meisten therapeutischen monoklonalen Antikörper exprimiert werden.

1.3.1 Oligosaccharidstrukturen

Die Mikroheterogenität der Ig-Glykosylierung resultiert aus der An- oder Abwesenheit von Fukose (Fuc), eines biverzweigenden (engl. *bisecting*) N-Acetylglucosamins (Nag), Galaktose (Gal) und Sialinsäure (Sia). Parekh et al.[43] fanden mehr als 30 Varianten von Oligosacchariden des komplexen zweiantennigen (engl. *complex biantennary*) Typs an

humanem IgG, von denen der überwiegende Teil eine Fukose an der Oligosaccharidkernstruktur trägt (Abbildung 1-6). Seltener ist das biverzweigende N-Acetylglucosamin als Modifikation der Kernstruktur oder das Fehlen der Fukose zu finden. Somit sind insgesamt vier mögliche Kernstrukturen denkbar: x, x+Nag, x-Fuc, x+Nag-Fuc, wobei x für eine variable Galaktosylierung bzw. Sialysierung steht.

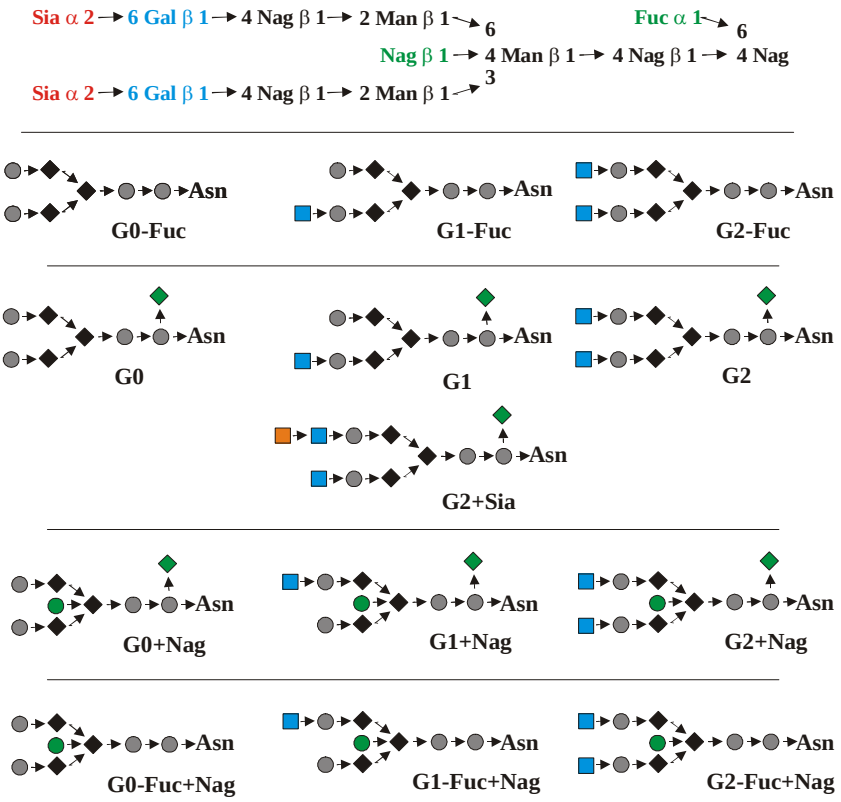


Abbildung 1-6: Die häufigsten Oligosaccharidstrukturen des humanen IgG. Ausgehend von der fukosylierten Kernstruktur werden die neutralen Glykane in drei Typen unterteilt: „**G0**“, „**G1**“ und „**G2**“. Diese sind nicht, einfach oder zweifach galaktosyliert. Die einfache Sialysierung wird durch ein „**+Sia**“ gekennzeichnet. Das Vorhandensein eines biverzweigenden N-Acetylglucosamin wird mit „**+Nag**“ und die Abwesenheit der Kernfukosylierung mit „**-Fuc**“ gekennzeichnet. In der schematischen Darstellung der Oligosaccharide ist Sialinsäure orange, Fukose grün, Galaktose blau, N-Acetylglucosamin grau und Mannose schwarz dargestellt.

Da zwei der Oligosaccharide, die nicht identisch sein müssen, gepaart im intakten Fc-Teil des IgG-Moleküls vorliegen, ist die mögliche Anzahl von Glykospezies groß. Nimmt man alleine die 16 möglichen neutralen Oligosaccharidstrukturen, führt dies zu 136 Glykoformen im intakten Fc-Teil[44]. Strukturinformationen sind bei massenspektrometrischen Untersuchungen am intakten Fc-Teil nicht direkt zugänglich. Daher werden die Glykoformen in dieser Arbeit als Summenparameter beschrieben. Die Glykoform „G2“ des intakten Fc-Teils kann somit sowohl durch die Paarung zweier einfach galaktosylierter Oligosaccharide (G1 + G1) als auch durch die Kombination eines nicht galaktosylierten mit einem zweifach galaktosylierten Oligosaccharid (G0 + G2) entstehen.

1.3.2 Funktion und Relevanz

Es ist schon seit langem bekannt, dass die konservierte N-Glykosylierung an Asn-297 die Effektorfunktion von IgG beeinflusst[5]. So verlieren deglykosylierte IgG viele ihrer natürlichen Effektorfunktionen[42]. Variationen in der Zusammensetzung der Oligosaccharide zeigen einen Einfluss auf die Affinität von IgG zu den drei Klassen der Fcγ-Rezeptoren (FcγRI, FcγRII und FcγRIII)[50], welche die vom IgG vermittelte Immunantwort mit den zellulären Effektorfunktionen verbinden[51]. Die Oligosaccharide beeinflussen außerdem die Aktivität von IgG in der Komplementaktivierung, welche durch die Bindung von IgG an das Komplementprotein C1q initiiert wird[50]. Außerdem bindet IgG an das *mannose-binding* Protein (MBP)[52], das für die strukturelle Neuordnung von C1q erforderlich ist.

Die Änderungen der Glykosylierung an Position Asn-297 (Abbildung 1-6) wirken sich wie folgt aus: Das Fehlen oder Vorhandensein terminaler Galaktose oder Sialinsäure (Abbildung 1-6; G0 – G2, G1+Sia, G2+Sia) beeinflusst die Funktion von Immunglobulinen[53-55]. Die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC)[56] wird durch ein biverzweigendes N-Acetylglucosamin an der Oligosaccharidkernstruktur verstärkt (Abbildung 1-6; G0+Nag – G2+Nag)[57,58]. Letzteres trifft in weit größerem Maße für die Abwesenheit der Fukose zu (Abbildung 1-6; G0-Fuc – G2-Fuc)[59,60].

Eine veränderte IgG-Glykosylierung wurde auch bei humanen Krankheiten nachgewiesen, wie der geringere Galaktosylierungsgrad bei der *rheumathoiden Arthritis*[43].

An Bedeutung gewinnt auch die steigende Anzahl rekombinanter monoklonaler Antikörper (mAb), die als humane Therapeutika eingesetzt werden[61]. Einige dieser mAbs, die an einen Rezeptor oder dessen Liganden binden, um die Ligand-Rezeptor-Interaktionen zu vermeiden, sind ohne die Fc-Teil vermittelten Effektorfunktionen aktiv. Es ist sogar erwünscht, dass in diesem Fall die IgG typische Effektorfunktion unterbunden wird.

Andere mAbs dagegen sind auf die Aktivierung des Immunsystems angewiesen um die Zielzelle zu zerstören, so z.B. in der Krebstherapie. Unter diesen Umständen, bei der die effektive Aktivierung der Immunantwort mit der therapeutischen Effektivität des mAbs einhergeht, ist eine Optimierung der Glykosylierung des Fc-Teils hilfreich[57-60]. Eine verbesserte Effektorfunktion soll hier durch eine erhöhte Affinität zu den Fcγ-Rezeptoren und/oder dem Komplementsystem erreicht werden.

1.3.3 Methoden zur Charakterisierung der Glykosylierung

Eine große Palette verschiedener Techniken wurde bis heute verwendet, um Informationen über die verschiedenen Glykoformen des Fc-Teils zu erlangen. Der Grad der Galaktosylierung wurde anfangs mittels Blot-Techniken und *Enzym-linked immunosorbent assay* (ELISA) unter Verwendung von Lectinen oder anti-N-Acetylglucosamin-Antikörpern bestimmt[62,63]. Chromatographische Methoden ermöglichten später die Untersuchung einer größeren Anzahl verschiedener Oligosaccharide[48]. Hierzu zählen die Anionenaustausch-Chromatographie bei stark basischem pH gekoppelt mit amperometischer Detektion (HPAEC-PAD) oder auch die Elektrophorese mit fluorophormarkierten Oligosacchariden (FACE), welche die Charakterisierung einer Vielzahl neutraler und sialinsäurehaltiger Oligosaccharide ermöglichen[64].

Erst in den letzten Jahren hat die Einführung der Elektrospray-Ionisation (ESI) und der Matrix-Assisted-Laserdesorption-Ionisation (MALDI) die Möglichkeiten zur strukturellen Charakterisierung von Biomolekülen (Kapitel 1.4), einschließlich des IgG und seiner proteolytischen Fragmente wesentlich erweitert[65]. Informationen über die Mikroheterogenität der Oligosaccharide von IgG wurden bis heute durch ESI-MS-Analysen proteolytischer Glykopeptide[66-68], reduzierter Fc-Teile[69-73] und reduzierter schwerer Ketten[74] des IgG geliefert.
Obwohl die genannten Techniken viel zur Bestimmung von IgG-Glykosylierungsprofilen beigetragen haben, sind die Ergebnisse nicht immer vergleichbar. So entspricht die Menge an G0, welche mit HPLC-Methoden bestimmt wurde, nicht immer der Menge, die mittels ELISA-basierter Methoden unter Verwendung von Anti-N-Acetylglucosamin-Antikörpern ermittelt wurden[75]. Williams und Rademacher erklärten dies mit einer bevorzugten Paarung von Oligosacchariden. Erst eine bestimmte Oligosaccharidpaarung führe somit zur Epitopbildung, die für die Bindung des anti-N-Acetylglucosamin-Antikörpers erforderlich sei. Eine effektive Möglichkeit die Oligosaccharidpaarung des IgG zu charakterisieren, bieten massenspektrometrische Untersuchungen am intakten Fc-Teil von IgG[44].

1.4 Massenspektrometrie in der Biochemie

Die Massenspektrometrie (MS) fand ihren Ursprung am Anfang des 20. Jahrhunderts[76]. Sie etablierte sich aber erst rund 50 Jahre später als Standardverfahren im Bereich der organischen Chemie im Zuge der Fortschritte, die insbesondere auf dem Gebiet der apparativen Auflösung und der Methoden zur Beeinflussung des Fragmentierungsverhaltens – der Basis für eine Strukturermittlung – erzielt wurden[77].
Das Prinzip der Massenspektrometrie beruht darauf, einen Strahl oder Pakete gasförmiger Ionen zu erzeugen, die nach ihrem Masse zu Ladungs-Verhältnis (m/z) getrennt und detektiert werden. Am Anfang steht also die Probenionisierung, für die sich in den siebziger Jahren als Standardverfahren die Elektronenstoß-Ionisation (EI) durchsetzte. Bei diesem Ionisationsverfahren werden die Analyten unzersetzt vor der eigentlichen Ionisierung durch thermische Verdampfung in die Gasphase gebracht. Dadurch beschränkt sich dieses Verfahren auf Substanzen mit niedrigem Verdampfungspotential (z.B. nicht-polare organische Moleküle wie Kohlenwasserstoffe).
Biomoleküle, wie Kohlenhydrate, Nukleinsäuren oder Proteine, sind dagegen schwer flüchtig, weil sie zum einen über polare Gruppen verfügen und zum anderen ein Molekulargewicht von bis zu mehreren hunderttausend Dalton besitzen können. Erst die in den letzten Jahren entwickelten „sanften“ Ionisierungsverfahren, die in homogene und *energy sudden* Methoden unterteilt werden, ermöglichten einen analytischen Zugang für Biomoleküle[65,78,79]. Besonders zwei Ionisierungsverfahren stellen wertvolle Techniken für die strukturelle Charakterisierung von Biomolekülen oder Gemische dieser dar. Diese beiden Techniken sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden:

- ElektroSpray-Ionisation (ESI)
- Matrix-Assisted-Laser-Desorption/ Ionisation (MALDI)

Die Bedeutung dieser Ionisationsverfahren für den Bereich der *life siences* wurde durch die Vergabe des Nobelpreises für Chemie (2002) gewürdigt, der zu einer Hälfte an die Begründer, Koichi Tanaka (MALDI)[80] und John B. Fenn (ESI)[81], für die Entwicklung dieser sanften Desorption/Ionisation-Methoden verliehen wurde. Das ESI Verfahren benötigt zur Überführung der Analyten in die Gasphase keinen extremen Temperaturgradienten und gehört daher, wie auch andere Sprayverfahren (Thermospray, *Atmospheric-Pressure-Chemical-Ionisation* - APCI) zur Gruppe der homogenen Ionisations-verfahren. Im Gegensatz dazu nutzt der MALDI-Prozess als Vertreter der *energy sudden* Methoden gerade einen solchen zeitlich und lokal begrenzten Gradienten, um die Probenmoleküle zu verdampfen.
Beide Verfahren erlauben eine schnelle und exakte Bestimmung des Molekulargewichtes bis hin zu Massen > 100 kD. Weitere Möglichkeiten eröffnen sich durch die Kopplung von ESI-MS mit der Flüssigchromatographie (*High Performance Liquid Chromatography* - HPLC).
Neben der hohen Präzision und Richtigkeit der Messergebnisse ist auch der geringe Substanzverbrauch ein Vorteil der Massenspektrometrie. Moderne MS-Spektrometer erlauben einen Analytnachweis im Pico- bis Attomol-Bereich. Zusätzlich besitzt die Massenspektrometrie alle Voraussetzungen, um ein hohes Maß an Automatisierbarkeit zu erreichen, einer Grundvoraussetzung für eine Hochdurchsatzmethodik, wie sie für die Proteomanalyse (*Proteomics*) benötig wird (Kapitel 1.6).

1.4.1 Elektrospray-Ionisation-MS

Dass bei ESI-MS „nackte“ Ionen von Makromolekülen erzeugt werden können, erkannte erstmals Dole vor mehr als zwanzig Jahren[82]. Aber erst Fenn kombinierte im Jahre 1984 diese Ionisationsmethode mit einem MS-Analysator[81].

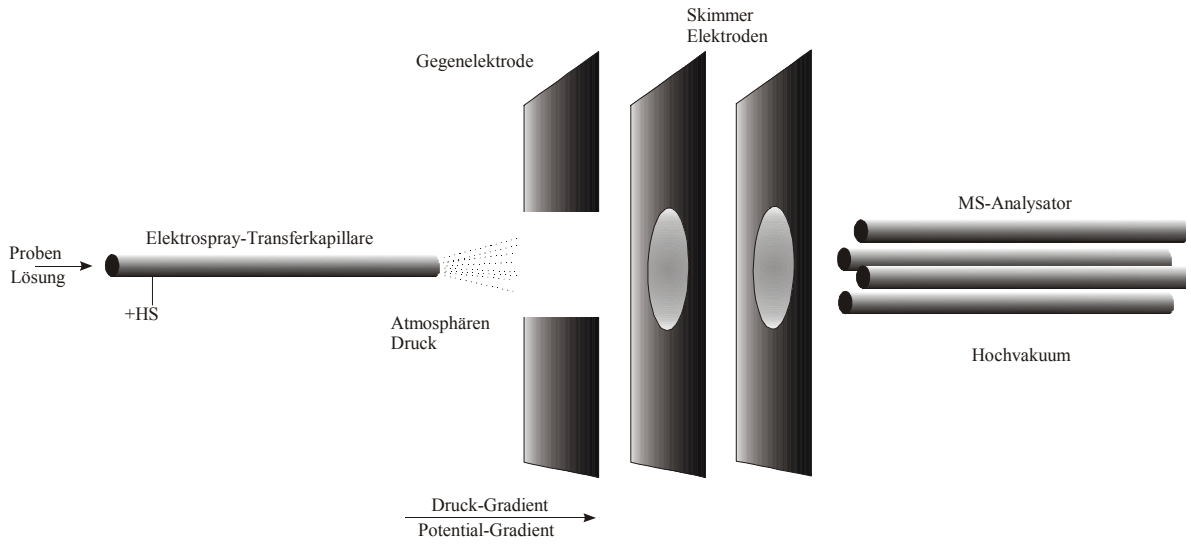


Abbildung 1-7: Schematischer Aufbau eines ESI-MS.

Beim Elektrospray-Prozess passiert eine Analytlösung eine Transferkapillare, an die ein hohes elektrisches Potential angelegt wird. Beim Austritt der Lösung aus der Transferkapillare unter Atmosphärendruck bildet sich durch das starke elektrische Feld ein Nebel aus hoch

geladenen Tröpfchen. Während die Tröpfchen einen Potential- und Druckgradienten auf ihrem Weg zum Analysator überwinden (Abbildung 1-7), reduziert sich der Durchmesser der Tröpfchen durch Verdampfung von Lösungsmittelmolekülen und durch Coulomb-Explosionen (Tropfenteilungen, die durch eine sehr hohe Ladungsdichte hervorgerufen werden). Letztendlich entstehen nach Abgabe aller Lösungsmittelmoleküle völlig desolvatisierte Ionen (Abbildung 1-8).

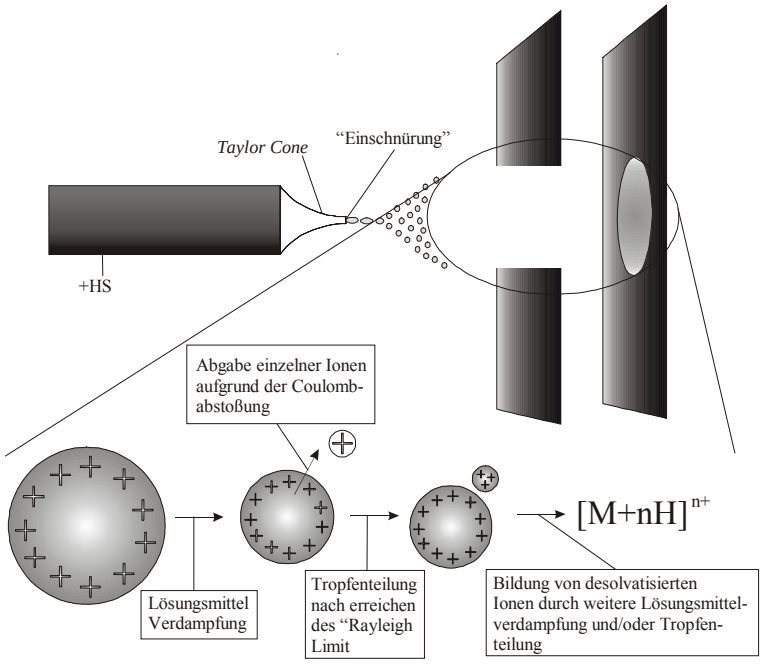


Abbildung 1-8: Schematische Darstellung des Ionisationsmechanismus bei der ESI.

Die Zerstäubung der Lösung beim Austritt aus der Kapillare kann durch verschiedene Methoden erleichtert werden. Die Spraybildung kann durch die Verwendung eines *sheath*-Gases unterstützt werden. Das kontrollierte Aufheizen der Quelle oder die Verwendung eines Badegases bieten alternative Möglichkeiten. Welche, bzw. ob diese Verfahren erforderlich sind, hängt von der verwendeten Flussrate (10 nl/min – 1 ml/min), der Zusammensetzung der Lösung, dem Durchmesser der Kapillaren und der angelegten Spannung (2 – 6 kV) an der Spitze der Kapillaren ab.

Heutzutage ist die Verknüpfung von ESI-Quellen mit nahezu allen MS-Analysatoren möglich. Je nach Anwendungsgebiet findet man daher verschiedene Kombinationen. Zu nennen seien hier qTOF-Hybridinstrumente[83,84], die Fluggzeit- (eng. *Time of flight* - TOF)- und quadrupol-Analysatortechnologien kombinieren und ihre Anwendung vor allem auf dem Gebiet der Proteomanalyse finden. Gleiches gilt für Ionenfallen (*iontrap- IT*)-Analysatoren (Kaptiel 1.5.1), die sich durch ihre Flexibilität und besonders durch ihre MS^n-Fähigkeit auszeichnen[85]. Zuletzt seien noch die weit verbreiteten triple-quadrupol (*triplequad)*-MS-Instrumente[86] genannt, die ihre Anwendung aber hauptsächlich im Bereich der Analytik niedermolekularer Substanzen finden[87]. Die neuen *qtrap*-Hybridgeräte verbinden die Robustheit der *triplequad*-Technologie mit der Flexibilität des Ionenfallen-Analysators. Bei diesen Geräten kommt eine zweidimensionale bzw. lineare Ionenfalle zum Einsatz, die einige Vorteile gegenüber der herkömmlichen Paul´schen Ionenfalle besitzt[88].

1.4.2 Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionisation-MS

Den Anfang der MALDI-MS begründeten im Jahr 1987 Karas und Hillenkamp[89]. Tanaka war jedoch der Erste, der mit Hilfe von Laserdesorptions-Massenspektrometrie große Proteine nachweisen konnte[80]. Sein Verfahren, das auf einer Vermischung von Analytmolekülen mit Glycerol und Laserlicht absorbierenden "Nanopartikeln" beruht, wird jedoch in der Praxis nicht genutzt. Ganz im Gegensatz zur MALDI-MS.

- **MALDI-Prozess und Funktion der Matrix**

Die Ionenquelle basiert auf der Verwendung von niedermolekularen organischen Matrizen, deren Absorptionsmaximum in einem Wellenlängenbereich liegt, in den mit einem gepulsten Laser eingestrahlt wird. Durch die Energieaufnahme kommt es zu einer schlagartigen Verdampfung der Matrixmoleküle, welche kokristallisierte Biomoleküle effizient und intakt in die Gasphase mitreißen. Während dieses Ablationsprozesses werden die Analyten gekühlt und ionisiert. Die Voraussetzung dafür ist, dass bei der Probenpräparation ein Einbau der Analytmoleküle in das Kristallgitter der Matrix erreicht wird. Diese Kokristallisation von Biomolekülen und Matrixmolekülen erfolgt bei einem 10^3 – 10^4 fachen Matrixüberschuss. Die Matrix besitzt bei MALDI-MS Experimenten folgende wichtige Funktionen:

- Die Matrixsubstanz absorbiert die eingestrahlte Laserenergie und schützt aufgrund des Überschusses die Analytmoleküle vor Zersetzung.
- Die Matrixsubstanzen werden durch die Absorption der Laserenergie selbst elektronisch angeregt und stellen die zur Desorption der Analytmoleküle notwendige Energie zur Verfügung.
- Die Matrix wirkt als Brönstedt Säure oder Base: Sie liefert Protonen bzw. abstrahiert diese zur Ionisation des Analyten. Eine Ionisation des Analyten kann zudem durch Elektronenabstraktion in einer Elektronen-Transferreaktion mit einem Matrix-Molekül-Radikalkation erfolgen.
- Die Matrixsubstanz unterbindet Wechselwirkungen der Analytmoleküle untereinander und zwischen Analyt und Probenträger.

Zu den in diesem Zusammenhang am häufigsten verwendeten Techniken der Probenpräparation gehören die Dünnschicht (*dried droplet)*, die *thin layer* und *fast evaporation* Präparation. Die Art der Probenpräparation und die Wahl der Matrix führen bei verschiedenen Biomolekülen zu unterschiedlichen Signalintensitäten und müssen daher individuell angepasst werden.

1.4.3 Dekonvolution von ESI-MS-Daten komplexer Proteingemische

ESI-MS-Daten von Proteingemischen können eine enorme Komplexität erlangen, weil jede Proteinspezies des Gemisches durch eine Serie mehrfach-geladener Molekülionen (M+zH)/z auf einer m/z-Skala repräsentiert wird. Die Ladung z eines 50 kDa Proteins kann dabei 20 – 30 verschiedene Ladungszustände annehmen (Abbildung 1-9).

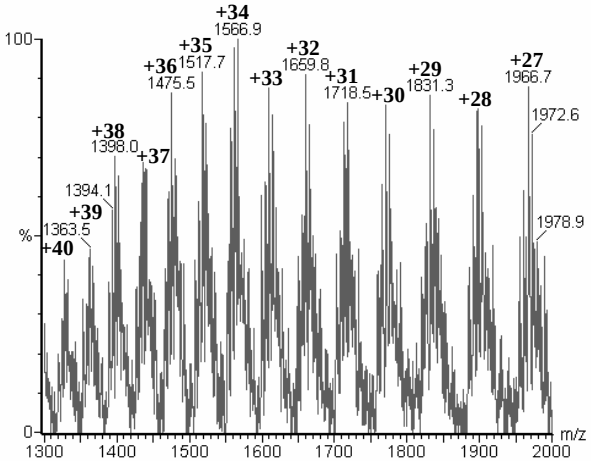


Abbildung 1-9: ESI-MS-Spektrum des mikroheterogenen Fc-Fragments von IgG (~50 kDa).

Um ein Interpretation der Daten zu ermöglichen, ist die Erzeugung eines Null-Ladungsspektrums, in dem die Ionenserien jeder Komponente zu einem Peak tranformiert werden, nötig. Bis vor einigen Jahren wurden hauptsächlich „rückwärts" Methoden für die Dekonvolution benutzt, die meist auf Fourier-Algorithmen basieren. Heute dagegen setzen sich immer mehr „vorwärts" Methoden durch, die *Maximum-Entropy-* bzw. *–Likelihood-*Algorithmen für die Dekonvolution verwenden[90].

Diese Erzeugen ein Null-Ladungsspektrum, in dem sie ESI-MS-Daten unter Zufügen eines Rauschens simulieren (o(m/z)) und diese den experimentellen Daten (y(m/z)) anpassen. Das natürliche Rauschen der MS-Daten setzt sich aus elektronischem (Gauss´sche Fehler Statistik) Rauschen als auch aus Fehlern in der Zählstatistik (Poisson´sche Fehler Statistik) zusammen. Heutige Dekonvolutionsprogramme können sowohl die eine als auch die andere Fehlerstatistik verwenden. Ziel beider Statistiken ist aber ein Maximierung der Wahrscheinlichkeit P(o/y), um so das wahrscheinlichste Spektrum o ausgehend vom experimentellen Spektrum y zu bestimmen.

Unter Verwendung der Gauss Statistik führt dieses zur Maximierung des Logarithmus der Wahrscheinlichkeit, der wie folgt aussieht:

$$\ln P(o/y) = -\sum_i \frac{(y_i - a_i)^2}{\sigma_i^2} + N \ln N - \sum_k o_k \ln \frac{o_k}{Z_k}$$

Dabei entspricht y_i den Originaldaten, o_k den angepassten Daten, a_i den angepassten Daten ohne Fehler und σ_i der Standardabweichung. Diese Formel entspricht einer *Maximum Entropy* Formel, weil sie die Entropieterm enthält:

$$\sum_k o_k \ln \frac{o_k}{Z_k}$$

Vorteil dieser Methode ist das Fehlen einer Basislinie, die bei „rückwärts" Verfahren mit zunehmendem Molekulargewicht der Proteine stark zunimmt, sowie das Ausbleiben von Rechenartefakten, die eine Interpretation der Dekonvolutionsergebnisse erschweren.

1.5 Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS bzw. MS^n)

Ursprünglich stammt der Begriff der Tandem-Massenspektrometrie aus MS-Experimenten, die mit zwei gekoppelten Massenspektrometern durchgeführt wurden. Befindet sich zwischen den beiden Spektrometern im feldfreien Raum eine Kollisionszelle, können mit im ersten Spektrometer selektierte Ionen (Vorläuferionen) darin durch Stöße mit einem Reaktandgas fragmentiert werden und die Fragmentionen mit dem zweiten Spektrometer analysiert werden. Die Auswertung solcher Fragmentionenspektren liefert eine Fülle von strukturellen Informationen.
Heute werden die Selektion des Vorläuferions und die spätere Detektion der Fragmentionen in einem Gerät vereinigt, so dass alle gebräuchlichen MS-Instrumente diese Fähigkeit, wenn man von single-quadrupol-Instrumenten absieht, besitzen.

1.5.1 Ionenfallen-Analysatoren

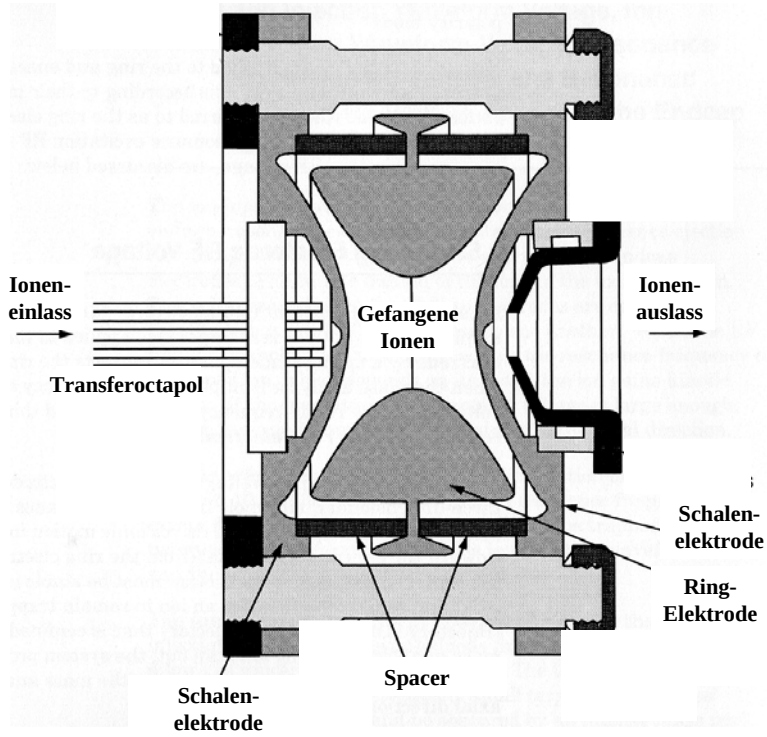


Abbildung 1-10: Aufbau einer Ionenfalle (eng. *Ion Trap* – IT)

In der Arbeit von Paul aus dem Jahre 1959 wurden neben den Grundlagen für die Quadrupol-Analysatoren auch die Grundlagen moderner IT-Analysatoren geschaffen. Für die Begründung und die Weiterentwicklung der Ionenfalle bekam er im Jahre 1989 den Nobelpreis[91].
In der Ionenfalle (Abbildung 1-10), wird ein dreidimensionales quadrupol-Feld erzeugt, mit dem Ionen geringer kinetischer Energie über einen eingeschränkten m/z-Bereich (bis ~4000 bei Routinegeräten) auf einer stabilen Bahn gehalten und dadurch für längere Zeit gespeichert werden können. Dazu wird an eine Ringelektrode eine zumeist positive Gleichspannung angelegt, über die eine Wechselspannung im Bereich der Radiofrequenzen moduliert wird. Als Gegenelektroden dienen zwei hyperbolische Endkappen, die geerdet

werden, damit auch Ionen mit einem minimalen m/z im Feld gespeichert werden können. Der Ein- und Austritt der Ionen in die Ionenfalle wird durch eine Perforierung der Endkappen ermöglicht. Die hohe kinetische Energie, mit der die Ionen aus der Quelle kommen, wird durch Stöße mit einem in der Ionenfalle befindlichen Badegas (meist Helium, $p = 10^{-3}$ Torr) herabgesetzt[92], wodurch die Ionen nach kurzer Zeit im Zentrum der Ionenfalle fokussiert werden. Das Ergebnis ist eine erhöhte Auflösung und Empfindlichkeit. Erst jetzt erfolgt der eigentliche Massens*can*. Indem die Amplitude der Wechselspannung in Abhängigkeit von der Zeit erhöht wird, werden kontinuierlich die Bahnen von Ionen mit größer werdendem m/z-Verhältnis destabilisiert, die dann die Ionenfalle in Richtung Detektor verlassen (Methode der massenselektiven Instabilität). Erst diese von Stafford et al.[93] entwickelte Methode verhalf der Ionenfalle zu ihrer massenspektrometrischen Anwendbarkeit.
Nach einem vergleichbaren Prinzip können auch Ionen mit einem bestimmten m/z isoliert werden, wie es für MS/MS-Experimente nötig ist. Durch Kombination einer zwischen den Ringelektroden angelegten Hochfrequenzspannung und einer zwischen den Endkappen angelegten Wechselspannung gelingt die Selektion einer Ionensorte durch Destabilisierung der übrigen Ionen. Die Fragmentierung selbst wird durch eine resonante Anregung der isolierten Ionen ermöglicht. Die gebildeten Fragmentionen werden nach der oben beschriebenen Methodik stabilisiert und detektiert. Dadurch zeigt sich der Vorteil einer Ionenfalle, die den Vorgang der Isolierung und resonanten Anregung mehrmals bzw. n-fach wiederholen kann, solange sich genügend Ionen in dieser befinden. MS^n-Experimente sind daher zugänglich.

1.5.2 Flugzeit-Analysatoren

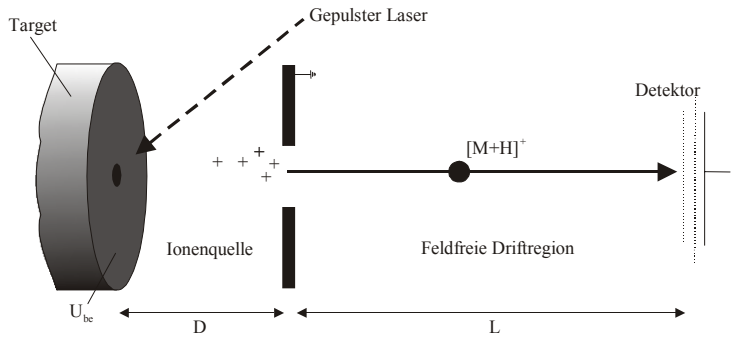


Abbildung 1-11: Schematische Darstellung eines MALDI-TOF-MS

Die Verwendung eines gepulsten Lasers führt zu einem diskontinuierlichen Ionenstrom, dessen Ionen vorwiegend einfach geladen sind. Es bietet sich daher die Kopplung an einen diskontinuierlichen Analysator an. Daher eignet sich die MALDI-Ionenquelle ideal dazu, an einen Flugzeitanalysator (eng. *Time of Flight* - TOF) gekoppelt zu werden. Die Ionen werden durch Anlegen einer Spannung (U_{be} = 15 – 30 kV) im elektrischen Feld beschleunigt und fliegen dann durch die feldfreie Driftzone zum Detektor (Abbildung 1-11). Die benötigte Flugzeit der einzelnen Ionen ist dabei ein Maß für deren Masse/Ladungsverhältnis (m/z). Da

alle Ionen nach der Beschleunigungsphase nahezu die gleiche kinetische Energie besitzen, fliegen Ionen mit kleinem m/z-Verhältnis schneller als solche mit großem.
Bei dauerhaft angelegter Beschleunigungsspannung am TOF-Analysator ist der Ionisationsprozess, zum Beispiel während eines Laserpulses, ein zeitlich ausgedehntes Phänomen, was zur Folge hat, dass die Ionen zeitverzögert beschleunigt werden. Das führt zu einer Signalverbreiterung bei linearen TOF-Massenspektrometern.

- Verbesserte Auflösung und Präzision – *delayed extraction* (DE) und Reflektron

Eine Verbesserung der Auflösung und Präzision der bestimmten Massen mit einem TOF-Analysator erlaubte die 1995 von Brown und Lennon[94] eingeführte zeitverzögerte Ionenextraktion. Dazu werden die Ionen nicht sofort nach ihrer Entstehung im elektrischen Feld beschleunigt, sondern es erfolgt zunächst eine Fokussierung der Teilchenwolke im feldfreien Raum. Erst einige Nanosekunden nach der Ionisation wird das elektrische Feld eingeschaltet. Neben diesem Problem der zeitlichen Unschärfe, besitzen die Ionen mit gleichem m/z-Verhältnis auch eine energetische Unschärfe. Diese kann verringert werden, wenn mit Hilfe eines Reflektors die Ionen fokussiert werden[95]. Dazu werden die Ionen in einem elektrostatischen Feld nach der feldfreien Driftzone reflektiert. Unter Beschreibung einer parabelförmigen Bahn dringen Ionen mit einer höheren kinetischen Energie etwas tiefer in das Reflektorfeld ein als langsamere Ionen mit dem gleichen m/z. Dadurch erreichen sie zum gleichen Zeitpunkt den Detektor.
Der Vorteil des TOF-Analysators liegt dank dieser Verbesserungen in der hohen Auflösung und Präzision. In diesen Punkten ist er alternativen Analysatoren wie den quadrupol-Analysatoren oder auch den Ionenfallen überlegen. Deshalb ist er heute auch vielfach in Kombination mit ESI-Ionenquellen anzutreffen, obwohl diese einen kontinuierlichen Ionenstrom erzeugen. Zu nennen seien hier die schon erwähnten qTOF-Hybridinstrumente, die Auflösungen von mehr als 10000 (V-Optik, Abbildung 1-12) und sogar mehr als 17500 für Analysatoren mit W-Optik (zweifacher Reflexion der Ionen in einem Reflektorfeld) errechen.

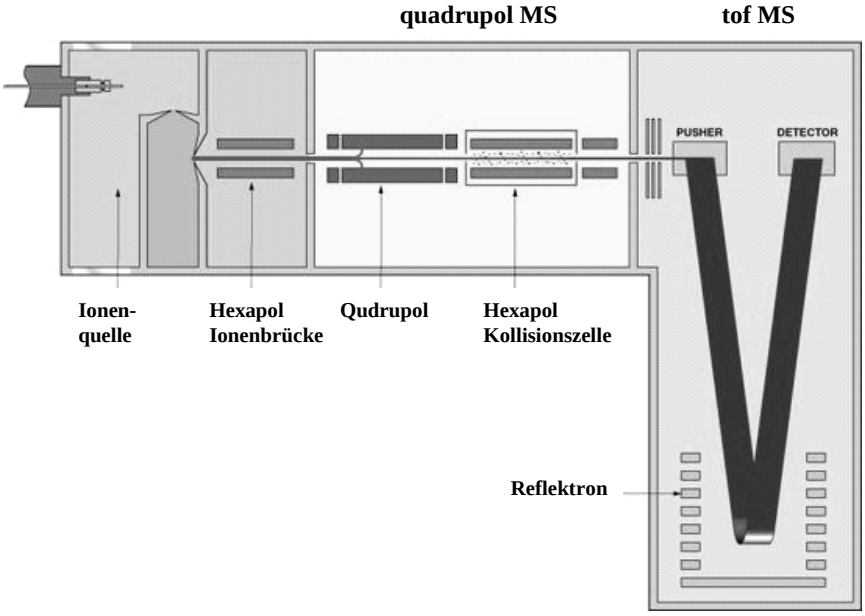


Abbildung 1-12: Aufbau eines qTOF-Hybrid-MS-Instruments mit orthogonaler Beschleunigung (V-Optik).

1.5.3 Nomenklatur der Peptidfragmentierung

Grundlage für die Interpretation von MS/MS-Informationen eines Peptides bildet die Möglichkeit, dessen Fragmentierungsverhalten vorhersagen zu können. Nur so kann ein MS/MS-Spektrum, sei es manuell oder durch eine Datenbanksuche, einem Peptid zugeordnet werden. Wird ein Peptid zur Fragmentierung gebracht, werden unterschiedliche Bindungen gespalten. Hauptsächlich treten Fragmentierungen des Peptidrückgrats auf. Bindungsbrüche im Bereich der Seitenketten sind dagegen selten.

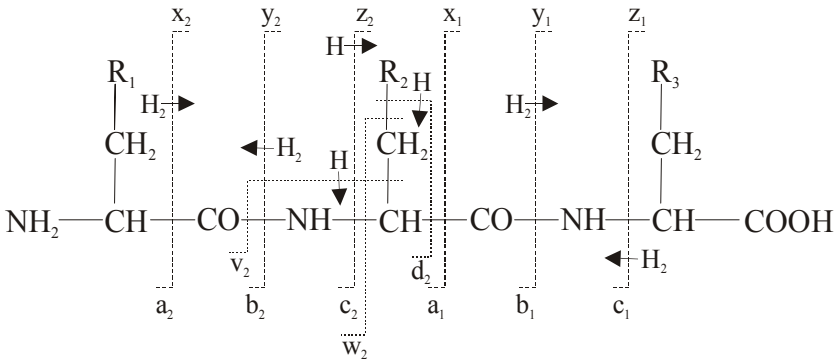


Abbildung 1-13: Nomenklatur der Peptidfragmentierung nach Roepstorff.

Die Nomenklatur[96] (Abbildung 1-13) ist dabei so festgelegt, dass Fragmente, bei denen die Ladungen auf dem N-terminalen Teil verbleiben, mit den Buchstaben a, b und c bezeichnet werden, die C-terminalen Äquivalente dagegen mit den Buchstaben x, y, z. Am intensivsten sind b- und y-Fragmente, die bei einer Spaltung der Peptidbindung entstehen.
Im Idealfall werden nur die Ionen einer vollständigen Serie gebildet, die alle Informationen über die Aminosäuresequenz eines Peptids enthält. Das Fragmentierungsverhalten wird wesentlich durch die Instrumentengeometrie beeinflusst. Bei oben erwähnten qTOF-Hybridanalysatoren kommt das Fragmentierungsverhalten diesem Idealbild nahe. Ionenfallen dagegen erzeugen meist eine Überschneidung mehrerer unvollständiger Fragmentionenserien, wodurch die Spektreninterpretation, besonders im Hinblick auf eine *de novo* Sequenzierung, erschwert wird. Derivatisierungen bestimmter Residuen oder Termini können hier eine Spektrenvereinfachung erbringen oder auch die enthaltenen Sequenzinformationen steigern[97].

1.6 Massenspektrometrie in der Proteomforschung

Mit dem Begriff Proteom werden alle von einem Organismus exprimierten Proteine bezeichnet. Die Analyse des Proteoms wird unter dem Begriff Proteomics zusammengefasst. Dies beinhaltet die Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen[98], ihrer posttranslationalen Modifikationen[19] und auch Proteinkomplexen[99]. Die schnelle und richtige Proteinidentifikation ist in diesem Zusammenhang von zentraler Bedeutung, wofür die Massenspektrometrie die nötigen Voraussetzungen bietet[100]. Die am weitesten verbreitete

Strategie zur Proteomanalyse entspricht einer zweidimensionalen Gelelektrophorese (2-DE) für die Trennung der Proteine kombiniert mit einer MALDI-MS-Analyse für die Proteinidentifikation[101].

Mittels MALDI-MS ist eine eindeutige Proteinidentifizierung anhand einzelner Peptide möglich, die durch verdauen intakter Proteine mit spezifischen Proteasen (z.B. Trypsin) entstehen. Bei komplexen Organismen kann die Identifizierung, trotz der Richtigkeiten moderner MALDI-MS-Instrumente mit Abweichungen von 5 ppm[102], schwierig sein. In Fällen, wo eine eindeutige Identifizierung nicht möglich ist, und weiterführende MS/MS-Experimente für eine Proteinidentifizierung nötig sind, fehlte den MALDI-MS-Instrumenten bis vor einigen Jahren die nötige MS/MS-Fähigkeit. Obwohl mittels der Technik der MALDI-*Post-Source-Defragmentierung* (PSD)[103] schon recht früh die Möglichkeit zur Erzeugung von MS/MS-Daten zur Verfügung stand, hatte diese den Nachteil nicht automatisierbar zu sein und nur MS/MS-Spektren mit geringer Intensität zu erzeugen.

So gewann ESI-MS, aufgrund der Weiterentwicklung dieser Instrumente durch Steigerung von Auflösungsvermögen, Richtigkeit und Empfindlichkeit, immer mehr an Bedeutung. Die Entwicklung der Nano-LC/MS mit Flussraten im nl/min-Bereich trug wesentlich zur Empfindlichkeitssteigerung bei[104], die heute eine Proteinidentifikation von aus Gelstücken gewonnenen Peptiden (Substanzmengen ~ 100 fmol) mittels LC/ESI-MS und LC/ESI-MS/MS erlaubt. Integrierte Strategien, bei der Peptide, die mittels MALDI-MS nicht identifiziert werden, einem parallel laufenden nano-LC/ESI-MS-System zugeführt werden, ermöglichen, dank der ESI-MS/MS-Informationen, eine *de novo* Sequenzierung der Unbekannten.

Um für die *de novo* Sequenzierung benötigte MS/MS-Fähigkeit nicht auf zwei MS-Instrumente angewiesen zu sein, wurden unter Atmosphärendruck arbeitende MALDI-Quellen für ESI-MS-Instrumente entwickelt, die den MALDI-Part ersetzen sollten[105]. Auf der anderen Seite sind heute aber mit der Entwicklung der MALDI-TOF/TOF-Instrumente, die unter Beihaltung aller MALDI-MS Vorteile MS/MS-Fähigkeit besitzen, wieder Systeme im Einsatz, die auf die Integration eines ESI-MS verzichten können[106].

Neue Entwicklungen im Bereich der Proteomics versuchen sich von der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2-DE) zu lösen und setzen auf vollständige LC-Lösungen, die einige der Probleme der 2-DE überwinden[107]:

- Eingeschränkter pI-Bereich
- Mangelnde Auflösung
- Mangelnde Empfindlichkeit bei der Gelfärbung
- Überlagerung von Proteinen geringer Kopienzahl mit Proteinen hoher Kopienzahl
- Löslichkeit von Membranproteinen

Bei diesen Lösungen kommt eine zweidimensionale Chromatographie (Starke Ionenaustausch- in Kombination mit einer *reversed phase* RP-Chromatographie) zum Einsatz, bei der nicht mehr die Proteine, sondern ein durch einen proteolytischen Totalverdau der zu untersuchenden Probe erzeugtes Peptidgemisch getrennt wird, welches dann mittels ESI- oder MALDI-MS charakterisiert wird[108]. Während die direkte Kopplung eines MALDI-MS-Instruments an ein LC-System umständlich ist, bietet ESI-MS für diesen Ansatzt ideale Voraussetzungen. Es wurden aber dennoch Technologien entwickelt, welche auch die

Kopplung von MALDI-MS an ein LC-System (LC-MALDI-prep[109]) ermöglichen. Bei diesen wird das LC-Eluat direkt auf einen speziell vorbereiten Probenhalter gesprüht, der anschließend automatisiert vermessen werden kann.

Der experimentelle Ablauf eines eindimensionalen LC/ESI-MS-Experimentes, wie es in dieser Arbeit für das *Peptide Mapping* von Immunoglobulinen verwendet wurde, wird im Folgenden erläutert.

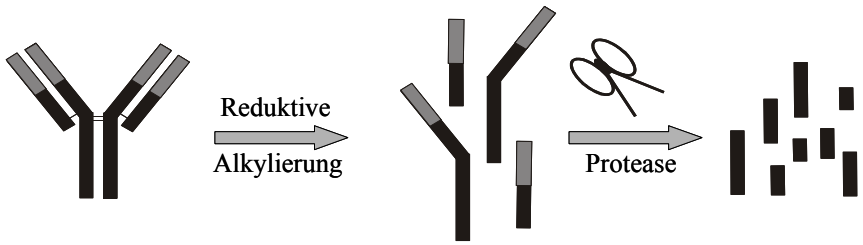


Abbildung 1-14: Schematische Darstellung der Proteolyse eines Immunglobulins nach reduktiver Alkylierung.

Um Proteine für einen proteolytischen Totalverdau zugänglich zu machen, müssen die Disulfidbrücken erst reduktiv gespalten und die frei werdenden Thiolgruppen der Cysteine geschützt werden (Abbildung 1-14).

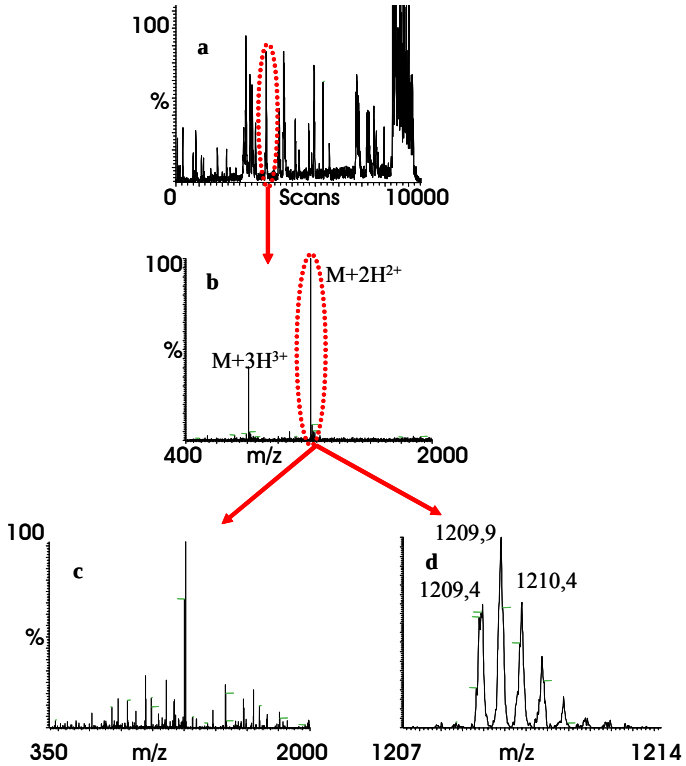


Abbildung 1-15: Aufbau eines LC/ESI-MS-Triple-Experiments: **a** – IonenChromatogrammm; **b** – MS-Modus; **c** – MS/MS-Modus; **d** – hochauflösender MS-Modus.

In einem MS-Experiment wird der so erzeugte Verdau analysiert, indem mittels eines LC/ESI-MS-Triple-Experiments (Abbildung 1-15) ein *Peptide Map* erzeugt wird. Dazu wird das komplexe Peptidgemisch zuerst chromatographisch (a) getrennt. Die einzelnen Peptide

werden dann im Massenspektrometer (b) als Vorläuferion selektiert, so dass nach Ermittlung seines exakten m/z-Verhältnisses und des Ladungszustandes in einem hochauflösenden Modus (d) das exakte Molekulargewicht berechnet werden kann. Diese Information zusammen mit den MS/MS-Daten (c) eines Peptids bilden eine Art Fingerabdruck, der für eine nachfolgende Datenbanksuche verwendet wird. Meist reichen 1-3 Peptide eines Proteins für dessen Identifikation aus.

1.6.1 Quantifizierung

Im Bereich der Proteomics wird, neben der Quantifizierung mit Hilfe interner Standards und Referenzsubstanzen, überwiegend der Weg einer vergleichenden Quantifizierung mit Hilfe isotopenmarkierter Affinitätstags[110] bestritten. Dabei werden vorwiegend verschiedene Zellzustände gegeneinander verglichen (differenzielle Proteomics). Zu diesem Gebiet zählt auch die Suche nach medizinischen Markern für Krankheiten, indem pathogene gegen gesunde Zellzustände verglichen werden[111].
Erst neueste Entwicklungen bemühen sich um eine Quantifizierung mit Hilfe interner Standards und Referenzsubstanzen[112]. Der Vorteil hiervon liegt darin, dass nicht nur Informationen über die Unterschiede der Proteinexpression verschiedener Zellzustände erhalten werden, sondern die Anzahl der Kopien eines Proteins in der Zelle ermittelt wird[113].

- **Quantifizierung mit internem Standard und Referenzsubstanzen**

Der methodische Ablauf, der in dieser Arbeit für die Quantifizierung von Immunglobulinen verwendet wurde, wird im folgendem kurz skizziert.

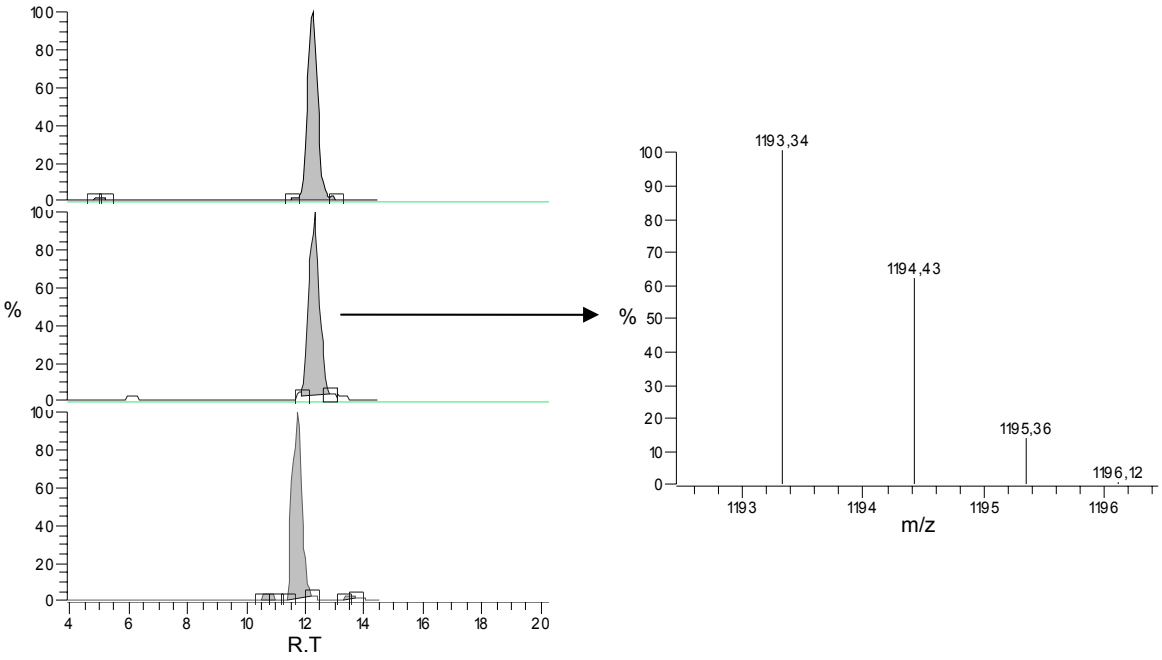


Abbildung 1-16: Darstellung eines SRM-Experiments bei dem drei MS-Übergänge observiert wurden; **links** – Ionenspurchromatogrammm; **rechts** – Detektiertes Fragmention eines Übergang.

Single- bzw. *Multiple-Reaction-Monitoring* (SRM / MRM) sind die geeigneten MS-Experimente für eine „absolute“ Quantifizierung (Abbildung 1-16), welche die nötige Selektivität mit der erforderlichen Empfindlichkeit kombinieren[114]. Bei diesen Experimenten

wird nur der Übergang von einem definierten Vorläuferion auf ein definiertes Fragmention beobachtet. Es gibt nur dann ein Signal, wenn ein passendes Vorläuferion selektiert wird, welches ebenfalls ein passendes Fragmention bildet. Nur letzteres wird detektiert.
Für die „absolute“ Quantifizierung muss im Vergleich zur relativen Quantifizierung der Analyt charakterisiert sein und es werden ein geeigneter interner Standard, eine Leermatrix und Referenzsubstanzen für die Kalibrierung benötigt. Der interne Standard sollte sich ausgehend von der Probenvorbereitung bis hin zur MS-Analyse wie der Analyt verhalten, muss aber eindeutig von diesem unterscheidbar sein. Isotopenmarkierte Analytanaloga, die diese Voraussetzungen erfüllen[115], sind kostspielig.
Die Methoden zur „absoluten“ Quantifizierung werden heute durch die pharmazeutische und Umweltanalytik unter Verwendung von *triplequad*-MS-Instrumenten geprägt[116]. Allerdings wurden auch schon *iontrap*-Geräte für die Quantifizierung von Peptiden mit einem Molekulargewicht von mehr als 1500 Da erfolgreich eingesetzt[117].

1.7 Detektion und Quantifizierung von Immunglobulinen

Im Jahre 1986 wies Jeffris[4] darauf hin, dass qualitative und quantitative Studien humaner Immunglobuline von der Erhältlichkeit spezifischer serologischer Reagenzien abhängen. Heutige Analyseverfahren verwenden für die Detektion der verschiedenen Immunglobulinisotypen sowohl polyklonale[118] als auch monoklonale[2] Antikörper (mAb) mit hoher Spezifität. Polyklonale Reagenzien haben den Nachteil, dass sie zum einen keine ausreichende Spezifität für die Verwendung in empfindlichen Assayverfahren besitzen und zum anderen nicht reproduzierbar hergestellt werden können. Dagegen besitzen mAb diese Nachteile nicht und erlauben die Erstellung reproduzierbarer und standardisierter Assayprotokolle, obwohl Fragen zur Qualitätskontrolle weiterhin existieren[2].
Die heute verwendeten Assayverfahren für die Bestimmung von Isotypkonzentrationen basieren auf Präzipitationsreaktionen und können unterteilt werden in die, in dieser Arbeit verwendete radiale Immunodiffusion, die Laurell Rocket Technik und Lichtstreuungsverfahren, zu denen die Nephelometrie und die Turbidimetrie zählen[119]. Methoden zur qualitativen und semiquantitativen Bestimmung einzelner Ig-Allotypen mittels der verschiedenen Gm-Marker basieren zum Teil noch auf dem Hämaglutination-Inhibitionstest[120], obwohl entsprechende ELISA mittlerweile zur Verfügung stehen[121].

1.7.1 Radiale Immunodiffusion

Mit den Arbeiten von Fahey und McKelvey[122] sowie Mancini et al. [123] wurde die Methode der radialen Immundiffusion (RID) für die quantitative Bestimmung von Immunglobulinen entwickelt. Die Methode basiert auf der Immunpräzipitation, bei der lösliches Antigen mit löslichen Antikörpern quervernetzt werden, bis die sich dadurch ausbildende Polymerstruktur als Niederschlag ausfällt. Die Bildung des Präzipitats erfolgt nur bei einem bestimmten Konzentrationsverhältnis von Antigen zu Antikörper, der Äquivalenz von Para- zu Epitop. Die Präzipitatmenge ist in diesem Bereich am größten. Außerdem ist für die Immunpräzipitation Voraussetzung, dass mehrere antigene Determinanten auf einem Antigen verfügbar sind, damit die oben genannte Quervernetzung erfolgt.

Wird das Antigen in einer Vertiefung eines Gels, in dem der Antikörper gleichmäßig verteilt ist, aufgetragen, so diffundiert dieser radial in das Gel. Die Antigen-Antikörper-Reaktion am Punkt der Paratop-Epitop-Äquivalenz führt dann zur Ausbildung eines Präzipitatrings, dessen Durchmesser von der Konzentration des aufgetragenen Antigens abhängig ist. Damit ist die vom Präzipitatring eingeschlossene Fläche proportional zur Konzentration des aufgetragenen Antigens.

1.8 Aufgabenstellung

Ziel der Arbeit war die Entwicklung einer Strategie basierend auf LC/ESI-MS und LC/ESI-MS/MS zur Differenzierung und Quantifizierung der verschiedenen Ig-Klassen, -subklassen und –allotypen, einschließlich ihrer funktionell bedeutenden Glykosylierung. Um Aussagen über die Oligosaccharidpaarung im Ig treffen zu können, sollte die Glykosylierung bis auf die Ebene intakter Fc-Fragmente bestimmt werden.

Die Strategie sollte am Modellsystem des humanen IgG getestet werden, da IgG den wichtigsten Effektor der humoralen Immunantwort darstellt und das humane IgG-System die größte Komplexität besitzt. Eine Übertragung der Strategie auf andere Klassen oder Organismen sollte damit möglich sein.

Abschließend sollte die Möglichkeit der „absoluten“ Quantifizierung der vier IgG-Subklassen mittels LC/ESI-MS/MS überprüft werden.

Die Methodik soll eine schnelle und automatisierbare Erstellung individueller Ig-Profile inklusive der Glykosylierung erlauben, um die Beantwortung komplexer immunologischer Fragestellungen zu ermöglichen.

Von zentralem Interesse ist dabei IgG4, dessen Allotypen mittels der klassischen Serologie nicht erfasst werden. Diese Subklasse hat aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften (Bivalenz) in jüngster Vergangenheit an Bedeutung gewonnen[29].

Innerhalb der Glykosylierung sind besonders die Glykospezies mit biverzweigendem N-Acetylglucosamin[58] und fehlender Fukose[59,60] von Interesse, da diese zu einer effinzienteren antikörperabhängigen Zytotoxizität führen.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien, Materialien, Geräte und Software

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien hatten p.a.-Qualität und wurden von den Herstellern Biomol, Fluka, Merck, Roth und Sigma-Aldrich bezogen. Das Wasser wurde in einer Reinstwasseranlage aufbereitet und hatte eine Leitfähigkeit von $\Omega^{-1} \leq 50\ \mu S \cdot cm^{-1}$. Sämtliche Pufferlösungen wurden nach Einstellung des pH-Wertes durch eine 0.2 µm-Membran filtriert. Für LC/ESI-MS und MALDI-MS-Versuche wurden ultrareine Lösungsmittel der Firma Merck (LiChrosolv) oder Riedel-de Haen verwendet. Diese umfassen Acetonitril, 2-Propanol, Wasser, Ameisensäure und Trifluoressigsäure. Die MALDI-Matrix trans-3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure (Sinapinsäure - SA) stammte von der Firma Bruker Deltronic.

2.1.2 Proteine und Human-Plasmen

Serumproben gesunder und kranker Individuen mit positivem Befund für multiple Sklerose wurden vom Institut für Psychiatrie und Neurologie der Universitätsklinik Köln zur Verfügung gestellt. Des Weiteren wurde europäisches Human-Plasma vom Deutschen Roten Kreuz und amerikanisches Human-Plasma untersucht. Bei beiden handelte es sich um gepooltes Plasma, das jeweils von mehr als 1000 gesunden Individuen stammte. Die Kontrollseren, deren IgG-Gehalt quantitativ bestimmt war, stammte von der Firma *The Binding Site.* Weitere verwendete Proteine und Plasma werden nachfolgend aufgelistet:

Bezeichnung	**Hersteller**
Intravenöse Immunglobulin (IVIG)-Präparationen	
Hyland Immuno	Baxter
Flebogamma	Grifols
Octagam	Octapharma
Polyglobin	Bayer
Humane Myelomaproteine	
IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4	Sigma-Aldrich
MS-Standards	
Myoglobin	Sigma-Aldrich
C-Peptid	Sigma-Aldrich
Murines Myeloma-IgG1	Sigma-Aldrich
Proteolytische Enzyme	
Papain (Bst.Nr. P-4762)	Sigma-Aldrich
Trypsin (Bst.Nr. T-8658)	Sigma-Aldrich
V8 Protease (GluC – Bst.Nr. 45172)	Fluka

Glykosidase

N-Glykosidase-F (PNGase)	Fluka

Sonstige

Humanes Fc-Fragment	Calbiochem
IgG-defizientes Plasma	Sigma-Aldrich

2.1.3 Geräte, Materialien und Software

Gerät	Hersteller
Massenspektrometrische Geräte	
LCQ (T) (ESI-IT-MS)	ThermoFinnigan, Bremen
Biflex III (MALDI-reTOF)	Bruker Deltronics, Leipzig
Voyager DE (MALDI-reTOF)	Applied Biosystems, Frankfurt
QTOF II (ESI-QTOF-MS)	Micromass, Manchester (England)
QTOF Ultima (ESI-QTOF-MS)	Micromass, Manchester (England)
QuattroLC (ESI-Triplequad-MS)	Micromass, Manchester (England)
HPLC-System für LC-MS Kopplung	
Binäre Pumpe mit Dioden-Arraydetektor	Hewlett Packard, Waldbronn
Online Entgaser Serie HP1100	Hewlett Packard, Waldbronn
Autosampler HP 1100	Hewlett Packard, Waldbronn
Säulenofen HP1100	Hewlett Packard, Waldbronn
FPLC-System zur präparativen Proteintrennung	
Äkta Explorer	Pharmacia, Uppsala (Schweden)
FPLC-System	Pharmacia, Uppsala (Schweden)
Lyophylisator (*SpeedVac*)	
Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugen	
RC 3B Plus und RC 5B Plus	Sorvall, Newtown CT (USA)
5417 C und 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Sonstige Geräte	
Mikroskop Stemi 2000-C	Zeiss, Jena
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
pH-Elektrode Typ Nr. 6280	Schott-Geräte, Hofheim
Phast Elektrophoresesystem	Pharmacia, Uppsala (Schweden)
Reinstwasseranlage	Serlapur
Spektralphotometer Ultrospec 2000	Pharmacia, Uppsala (Schweden)

Analysenwaage FA-210-4	Faust, Köln
Laborwaage SBA 52	Scaltec, Heiligenstadt
Heizblock Unitek HB-130	SEL-Laboratory Products (England)
Pipetten	Eppendorf, Hamburg

Materialien	**Hersteller**
Chromatographie-Säulen und -Materialien	
HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade	Pharmacia, Uppsala (Schweden)
HiPrep 26/10 Desalting	Pharmacia, Uppsala (Schweden)
HiTrap Protein A FF (1 ml und 5 ml)	Pharmacia, Uppsala (Schweden)
HiTrap Protein G FF (1 ml und 5 ml)	Pharmacia, Uppsala (Schweden)
HiTrap DEAE FF (1 ml)	Pharmacia, Uppsala (Schweden)
DE-52 Cellulose (1 ml)	Whatman, Clifton (USA)
HiPrep DEAE FF (20 ml)	Pharmacia, Uppsala (Schweden)
Vydac C18 Mass Spec (238M552, 250mm)	MZ Analysentechnik, Mainz
Borosilicatnadeln (Typ B,D)	Micromass, Manchester (England)
Gelelektrophorese	
PhastGel Gradient 8-25%	Pharmacia, Uppsala (Schweden)
PhastGel Gradient 4-15%	Pharmacia, Uppsala (Schweden)
PhastGel IEF 3-9	Pharmacia, Uppsala (Schweden)
Ultrafiltration	
Centricon-10, -30 und -100 (2 ml)	Millipore, Eschborn
Centriprep-10, -30 und -100 (10 ml)	Millipore, Eschborn
Amicon Ultra 10, 100 (2, 10 ml)	Millipore, Eschborn
Radiale Immunodiffusion	
Human IgG-Subclass SD-Bindarid Kits	The Binding Site, Birmingham (England)
Sonstiges	
Bradford Proteinassay	BioRad, München
Celluloseacetatfilter 0,2 µm	Sartorius, Göttingen
Celluloseacetatfilter 0,02 µm	Whatman, Maidstone (England)
Membranfilter 0,025 µm	Millipore, Eschborn
ZipTip$_{C18}$ 15 µm, 200 Å pore size	Millipore, Eschborn
ZipTip$_{C4}$ 15 µm, 300 Å pore size	Millipore, Eschborn

Software (-Paket)	Beschreibung
Massenspektrometrie	
XCalibur 1.3	Programmpaket zur Datenakquisiton (LCQ).
Sequest	Implementiertes Programm, dass den Sequest-Such-algorithmus für die Identifizierung von Peptiden anhand von MS/MS-Daten verwendet.
BioWorks 2.0	Implementiertes Programmpaket für die Dekonvolution und Konvolution von ESI-MS-Daten
Masslynx 3.5	Programmpaket für die Datenakquisiton (QTOF und Quattro LC).
MaxEnt1	Implementiertes Programmpaket für die Dekonvolution von ESI-MS-Daten mittels eines *Maximum-Likelihood*-Algorithmus.
Databridge	Konvertierung von MS-Daten in unterschiedliche Daten-Formate
XMass 5.0	Auswertungssoftware für MALDI-Spektren des BiflexIII.
GPMAW 5.03	Programm für die Manipulation von Proteinsequenzen unter massenspektrometrischen Gesichtspunkten, wie der Erzeugung theoretischer Fragmentionen.
Lutefisk	Programm zur *de novo* Interpretation von MS/MS-Daten
CIDentify	Programm zur Datenbanksuche mit durch Lutefisk ge-fundenen Sequenzankern.
Sequenzanalyse und Proteomics	
Mascot	Programm zur Identifizierung von Peptiden aus MS/MS-Daten http://www.matrixscience.com
ProteinProspector	Programm zur Identifizierung von Peptiden anhand von MS/MS-Daten. http://prospector.ucsf.edu
Translate	Programm zur Übersetzung von Nukleotid- in Protein-sequenzen. http://www.expasy.org/tools/dna.html
GlycanMass	Programm zur Berechnung des Molekulargewichtes von Glykanen. http://www.expasy.org/tools/glycomod/glycanmass.html
Blast	Programm zur Suche nach homologen Proteinsequen-zen mittels des BLAST-Algorithmus. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
Clustal W	Programm zur Erstellung von multiplen Sequenza-lignments. http://www.ebi.ac.uk/clustalw/

Boxshade	Programm zur Darstellung multipler Sequenzalignments. http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html

Datenbanken

IMGT	Immunogenetics-Nukleotiddatenbank für Sequenzen mit immunologischen Interesse. http://imgt.cines.fr:8104
SWISPROT / Trembl	Proteindatenbank. http://www.expasy.org/sprot
PDB	Protein-Database - Datenbank zur Verwaltung drei dimensionaler biologischer Makromolekül-Struktur-daten. http://www.rcsb.org/pdb

Programmiersprachen und Textbearbeitungsprogramme

Python 2.2 + IDLE	Programmiersprache + Entwicklungsumgebung.
VisualBasic + Editor	Erstellung von Makros in der OfficeXP-Umgebung.

Graphikprogramme

PyMOL	Programm zur Darstellung von Proteinstrukturen.
BRAGI	Programm zur Darstellung von Proteinstrukturen.

Die Literaturrecherche erfolgte hauptsächlich mit Hilfe der Literaturdatenbank PubMed, die im Internet unter folgender Adresse frei zugänglich ist: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

2.2 Proteinanalytik

2.2.1 Radiale Immunodiffusion

Für die Bestimmung der IgG-Subklassenkonzentrationen in Serum oder Plasma wurden RID-Kits der Firma *The Binding Site* gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die Durchmesser der Präzipitatringe wurden nach 72 Stunden ermittelt, so dass die Erstellung einer Kalibrationskurve nicht erforderlich war und die RID-Referenztabelle des Herstellers verwendet werden konnte.
Gereinigte IgG, angereicherte Subklassen oder IgG-Fragmente wurden mit 7 %iger Rinder-Serum-Albumin (BSA)-Lösung verdünnt, so dass im Kalibrationsbereich gemessen werden konnte. Der Durchmesser der einzelnen Präzipitatringe wurde mit einem Lichtmikroskop bestimmt.

2.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Alle Proteinkonzentrationen wurden, wenn nicht anders erwähnt, spektralphotometrisch nach Bradford mit dem Kit von BioRad (München) bei einer Wellenlänge von λ = 595 nm gegen einen BSA-Standard gemessen.

2.2.3 Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurden das Phast System mit vorgefertigten Gradientengelen (8-25%, 4–15% Acrylamid; PHAST-GEL IEF pH 3-9) der Firma Pharmacia verwendet. Für die Unterscheidung der IgG3- von den anderen Subklassen wurden die Gradientengele 4-15% verwendet.
Bei der SDS-PAGE wurde die Proteinlösung mit Wasser auf eine Konzentration von etwa 0.1 mg/ml verdünnt, mit dem Auftragspuffer (3×: 8 ml 60 mM Tris/HCl pH = 8.0, 1 mM EDTA, 1 g SDS, 4 mg Bromphenolblau) gemischt, 5 min bei 95 °C inkubiert, kurz zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Die Trennung wurde nach dem Pharmacia *Separation Technique File No. 110* durchgeführt. Bei der nativen PAGE wurde die verdünnte Proteinlösung sofort auf das Gel aufgetragen und nach dem *Separation Technique File No. 120* getrennt. Bei der isoelektrischen Fokussierung wurde die auf 0.1 mg/ml verdünnte Proteinlösung sofort auf das Gel aufgetragen und nach dem *Separation Technique File No. 100* getrennt. Nach der Trennung wurden die Proteine mit Silber gefärbt (Pharmacia *Development Technique File No. 210*).

2.2.4 Umpufferung und Konzentrieren von Proteinen

Alle Proben wurden, wenn nicht anders erwähnt, durch Ultrafiltration umgepuffert und konzentriert. Um Konservierungsstoffe (z.B. Glycerin) aus der Ultrafiltrationsmembran zu entfernen, wurden alle Ultrafiltrationseinheiten für 2 min mit 5 ml Wasser gespült. Zur Umpufferung oder Konzentrierung von IgG wurden Membranen mit einer Ausschlussgrenze von 100 kDa verwendet und für Fc-Fragmente eine Ausschlussgrenze von 10 kDa. Beim Umpuffern wurden die Proben dreimal mit dem jeweiligen Zielpuffer 1:10 verdünnt und wieder konzentriert. Serum- oder Plasmaproben wurden entsprechend umgepuffert.

2.3 Anreicherung von verschiedenen IgG-Subklassen und Fcγ-Fragmenten

2.3.1 Isolierung von IgG mittels Protein A- oder Protein G-Affinitäts-chromatographie

Humanes IgG wurde aus gepooltem Human-Plasma mittels Protein A- oder Protein G-Affinintätschromatographie gewonnen. Dazu wurden 0,5 ml Plasma 1:2 in Bindungspuffer (Tabelle 2-1) verdünnt und nach 15 min Zentrifugation bei 10000 g auf eine Protein A- oder Protein G-Säule aufgetragen. Gebundenes IgG wurde mit Elutionspuffer eluiert. Die IgG-enthaltenden Fraktionen wurden in je 100 µl Neutralisationspuffer pro ml Eluat gesammelt, um sofort den sauren pH-Wert zu neutralisieren. Die vereinigten Fraktionen wurden auf eine Endkonzentration von 5 – 10 mg/ml konzentriert. So erhaltene Proben konnten bei –20 °C gelagert werden.
Eine durch Protein G-Affinitätschromatographie gereinigte IgG-Fraktion enthielt alle Subklassen (IgG1 – 4). Die Protein A gereinigten Fraktionen dagegen nur die Subklassen IgG1, 2 und 4.

Tabelle 2-1: Bei der Protein A- und Protein G-Affinitätschromatographie verwendete Puffer, Säulen und Bedingungen.

Puffername	Zusammensetzung
Bindungspuffer	20 mM Kaliumphosphat (pH 7,0)
Elutionspuffer	100 mM Glycin-HCl (pH 2,7)
Neutralisationspuffer	1 M Tris/HCl (pH 9,0)

Säule:	HiTrap rProtein A FF (1 ml)
	HiTrap Protein G FF (1 ml)
Flussrate:	1 ml/min

2.3.2 Isolierung von IgG einzelner Individuen mittels DEAE-Chromatographie

100 µl Human-Serum einzelner Individuen wurde 1:10 mit Bindungspuffer (Tabelle 2-2) verdünnt und 5 min bei 8000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine mit Bindungspuffer äquilibrierte DEAE-Säule aufgetragen und die Säule mit weiteren 2 ml Bindungspuffer gewaschen. Der Durchlauf und die Waschfraktion wurden vereinigt. Die so erzeugten IgG-Proben konnten bei -20 °C gelagert werden. Für die spätere reduktive S-Carboxymethylierung wurden je 750 µl (~250 µg IgG) lyophilisiert und anschließend in 50 µl Puffer A aufgenommen. Die Säulen wurden mit je 2x 2 ml Elutionspuffer gereinigt.

Tabelle 2-2: Bei der Isolierung von IgG aus Seren einzelner Individuen verwendete Puffer, Säulen und Bedingungen (DEAE-Chromatographie).

Puffername	Zusammensetzung
Bindungspuffer	20 mM Kaliumphosphat (pH 7,0)
Elutionspuffer	20 mM Kaliumphosphat (pH 7,0), 300 mM NaCl
Puffer A	50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 8 M Harnstoff

Säule:	HiTrap DEAE FF (1 ml)
	DE-52 (1 ml)
Flussrate:	1 ml/min

2.3.3 Darstellung von Fcγ1-Fragmenten und Anreicherung von IgG2

- **Spaltung von IgG1 mit Papain**

Intakte Fcγ1-Fragmente wurden durch Proteolyse von humanem IgG1 mit Papain erzeugt. Als Ausgangsmaterial dienten isolierte humane IgG-Fraktionen (Kapitel 2.3.1, 5 – 10 mg/ml) oder 1:10 in Verdaupuffer (Tabelle 2-3) verdünnte IVIG Präparationen (5 – 10 mg/ml). Der kommerziell erhältliche monoklonale Antikörper (66 mg/ml) wurde ebenfalls 1:10 verdünnt mit Verdaupuffer eingesetzt. So vorbereitete Proben wurden in Anwesenheit von 0,6 % (w/w) Papain bei 37 °C in Verdaupuffer für 4 Stunden inkubiert. Aufgrund der geringen Löslichkeit des Papains mussten alle Lösungen RT besitzen. Das Produkt konnte nach Abstoppen der

Reaktion durch Zugabe von 10 mM Iodacetamid bei – 20 °C gelagert werden, falls das Papain nicht sofort mittels der, im Folgenden beschriebenen, Protein A-Chromatographie abgetrennt wurde.

Tabelle 2-3: Bei der Papainspaltung verwendete Puffer.

Puffername	Zusammensetzung
Verdaupuffer	75 mM Kaliumphosphat (pH 7,0), 75 mM NaCl, 2 mM EDTA

- **Isolierung von Fcγ1-Fragmenten und Anreicherung von IgG2**

Fcγ1-Fragmente und ungespaltenes humanes IgG-Protein wurde von den Fabγ1-Fragmenten mittels Protein A-Affinitätschromatographie abgetrennt. Die Trennung wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, wie die Isolierung humanen IgG aus Plasma (Kapitel 2.3.1). Je 1 ml des Reaktionsproduktes wurde auf eine Protein A-Säule aufgetragen. Im Vorlauf befanden sich die Fabγ1-Fragmente, im Nachlauf dagegen die ungespaltenen IgG Proteine, bei denen es sich hauptsächlich um IgG2 handelte, und die Fcγ1-Fragmente. Diese Fraktionen konnten bei – 20 °C zwischengelagert werden.
Die Fcγ1-Fragmente (~50 kDa) wurden anschließend mittels einer Gelpermeations-chromatographie von der angereicherten IgG2-Fraktion (~150 kDa) abgetrennt. Dazu wurde das im Lyophilisator bei RT auf 1 ml eingeengte Eluat auf eine zuvor mit Laufpuffer (Tabelle 2-4) äquilibrierte Gelfiltrations-Säule aufgetragen. Die Fraktionen des angereicherten IgG2, wie auch die der reinen Fcγ1-Fragmente wurden jeweils auf 1 - 5 mg/ml konzentriert und konnten bei -20 °C gelagert werden.

Tabelle 2-4: Bei der Gelpermationschromatographie verwendeter Puffer.

Puffername	Zusammensetzung
Laufpuffer	50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 200 mM NaCl

Säule:	HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade
Flussrate:	1 ml/min

2.3.4 Isolierung von Fcγ1-Fragmenten einzelner Individuen

Für die Isolierung der Fcγ1-Fragmente einzelner humaner Individuen standen nur geringe Mengen an Serum oder Plasma zur Verfügung. Nur 100 µl Plasma oder Serum wurden daher in 1 ml Verdaupuffer (Tabelle 2-3) verdünnt und anschließend verdaut. Nach der Verdünnung wurde die Proteinkonzentration (Bradford) der Serum- oder Plasmaprobe eines jeden Individuums bestimmt, um diese dann mit 0,6 % (w/w) Papain für 4 Stunden bei 37 °C zu verdauen (Kapitel 2.3.3). Je 1 ml des Reaktionsprodukts wurde anschließend auf eine Protein A-Säule aufgetragen, um ungespaltenes IgG und die Fcγ1-Fragmente von den übrigen Serumproteinen und den Fabγ1-Fragmenten abzutrennen. Die Protein A-

Chromatographie und die übrigen Schritte zur Isolierung des Fcγ1-Fragments erfolgten wie unter Punkt 2.3.3 beschrieben.

2.3.5 Anreicherung von humanem IgG3

Für die Anreicherung von humanem IgG3 aus Plasma oder IVIG-Präparationen wurden die verschiedenen Bindungsaffinitäten der einzelnen humanen IgG-Subklassen zu Protein A bzw. Protein G ausgenutzt. IVIG-Präparationen wurden 1:10 und Human-Plasma 1:2 in Bindungspuffer (Tabelle 2-5) verdünnt und einer Protein A-Chromatographie (Kapitel 2.3.1) unterworfen. Der IgG3 enthaltende Vorlauf der Protein A-Chromatographie wurde direkt über eine Protein G-Säule geleitet. Nach 5 Läufen wurde das auf der Protein G-Säule angereicherte IgG3 mit Elutionspuffer eluiert. Die IgG3-enthaltende Fraktion wurde mit Neutralisationspuffer (Tabelle 2-1) neutralisiert. Der gesammelte Nachlauf wurde auf eine Endkonzentration von 1 – 5 mg/ml konzentriert und konnte bei –20 °C gelagert werden.

Tabelle 2-5: Verwendete Säulen und Flussraten und Puffer bei der IgG3-Anreicherung.

Puffername	**Zusammensetzung**
Bindungspuffer	50 mM Natrimacetat (pH 5,0), 200 mM NaCl
Elutionspuffer	200 mM Glycin/HCl (pH 2,7)

Säule	**Flussrate**
HiTrap Protein G FF (1 ml)	1 ml/min
HiTrap rProtein A FF (5 ml)	1 ml/min

2.3.6 Anreicherung von humanem IgG4

- **Aus IVIG-Präparationen**

Zur Anreicherung von humanem IgG4 wurde der leicht kleinere pI-Wert des IgG4 im Vergleich zu den anderen Subklassen ausgenutzt (Tabelle 1-2). Dazu wurden 2,5 ml einer IVIG Präparation (100 mg/ml) 1:10 mit Laufpuffer (Tabelle 2-6) verdünnt und anschließend auf eine schwache Anionenaustauscher-Säule aufgetragen. Gebundenes IgG wurde mit Elutionspuffer von der Säule eluiert. Während der Vorlauf vorwiegend die nichtbindenden Subklassen IgG1, IgG2 und IgG3 enthielt, war im Nachlauf die Subklasse IgG4 angereichert.

Tabelle 2-6: Bei der DEAE-Chromatographie verwendete Puffer.

Puffername	**Zusammensetzung**
Laufpuffer	20 mM Kaliumphosphat (pH 7,0)
Elutionspuffer	20 mM Kaliumphosphat (pH 7,0), 300 mM NaCl

Säule:	1 ml HiTrap DEAE FF
Flussrate:	1 ml/min

- **Aus Human-Plasma**

Um eine vergleichbar angereicherte IgG4-Fraktion aus Human-Plasma zu erhalten, wurde eine DEAE-Chromatographie mit einer Protein A-Chromatographie kombiniert. Je 10 ml Plasma wurden zuerst in Laufpuffer umgepuffert. Dazu wurden 10 ml Plasma 1:2 mit Laufpuffer verdünnt und je 10 ml wurden in zwei Läufen auf eine mit Laufpuffer (Tabelle 2-6) äquilibrierte Entsalzungssäule aufgetragen. Die Protein-Fraktionen wurden auf ihr Ausgangsvolumen konzentriert. Das umgepufferte Plasma aus beiden Läufen wurde vereinigt und auf eine schwache Anionenaustausch-Säule unter Verwendung von Laufpuffer aufgetragen. Gebundenes IgG und die übrigen Plasmaproteine wurden mit Elutionspuffer von der Säule eluiert und direkt über eine 1 ml Protein A-Säule geleitet, um die restlichen Plasmaproteine von der IgG4 angereicherten Fraktion zu entfernen. Während das Auftragen der Probe auf die DEAE-Säule mit 5 ml/min erfolgte, musste die Flussrate bei der Elution auf 2 ml/min reduziert werden, um eine optimale Bindung der IgG-Moleküle an die Protein A-Säule zu gewährleisten. Diese wurden in einem letzten Schritt mit 200 mM Glycin/HCl (pH 2,7)-Puffer von der Protein A-Säule eluiert und mussten, wie zuvor in Kapitel 2.3.1 beschrieben, sofort neutralisiert werden.
Die IgG4-angereicherten Fraktionen (IVIG-Material oder Plasma) wurden auf eine Endkonzentration von 1 – 5 mg/ml konzentriert und konnten bei -20 °C gelagert werden.

Tabelle 2-7: Verwendete Säulen und Flussraten bei der IgG4-Anreicherung aus Human-Plasma.

Säule	Flussrate
HiPrep 26/10 Desalting (15 ml)	10 ml/min
HiPrep DEAE FF (20 ml)	5 ml/min
HiTrap rProtein A FF (1 ml)	2 ml/min

- **Präparative Darstellung von humanem IgG4**

Die präparative Isolierung einer humanen IgG4-angereicherten Präparation (1 g) wurde durch Anpassung der oben beschriebenen Methode zu Gewinnung der angereicherten humanen IgG4-Fraktion aus IVIG-Material erreicht. Es wurde in 5 Läufen je 1000 ml des 1:10 mit Laufpuffer (Tabelle 2-6) verdünnten IVIG-Materials nach Filtration durch eine 0,2 µm Membran auf eine DEAE-Säule (20 ml) aufgetragen. Die IgG4 angereicherte Fraktion wurde mit Elutionspuffer eluiert. Die erhaltene Fraktion wurde dann für weitere Verwendungen in 200 mM Glycin/HCl, pH 4,25 umgepuffert und auf eine Konzentration von 50 – 100 mg/ml konzentriert. Nach Sterilfiltration durch eine 0,2 µm-Membran wurden die Proben in autoklavierte Vials abgefüllt. Diese Proben konnten bei 4 °C gelagert werden.

2.3.7 Darstellung humaner Fcγ4-Fragmente

- **Darstellung einer IgG4 reichen Fraktion**

Als Ausgangsmaterial für die Darstellung humaner Fcγ4-Fragmente dienten die präparativ aus IVIG hergestellten, angereicherten IgG4 Fraktionen (Kaptiel 2.3.6, 50 – 100 mg/ml). Im ersten Schritt konnte der IgG1-Anteil mit Hilfe einer sanften Papainspaltung weiter verringert

werden. Dabei wurden 200 µl der IgG4 angereicherten Fraktion 1:10 in Verdaupuffer (Tabelle 2-3) verdünnt und nach dem Protokoll zur Spaltung des IgG1 mit Papain verdaut (Kaptiel 2.3.3). Allerdings wurde keine Protein A-Chromatographie zur Abtrennung der Fabγ1-Fragmente durchgeführt, sondern je 1 – 2 ml des Reaktionsprodukts wurden direkt auf eine äquilibrierte Gelfiltrationssäule aufgetragen, um die Spaltprodukte des IgG1 von der ungespaltenen, IgG4-reichen Fraktion abzutrennen. Die IgG4-reichen Fraktionen wurden vereinigt, auf eine Endkonzentration von 5 – 10 mg/ml konzentriert und konnten bei – 20 °C gelagert werden.

- **Darstellung von humanen Fcγ4-Fragmenten**

Die Darstellung der humanen Fcγ4-Fragmente erfolgte aus 2 mg der IgG4-reichen Probe. Dazu wurde erst eine aktivierte Papainlösung hergestellt, indem 1 mg Papain bei RT in 10 µl Wasser vorgelöst und mit 90 µl Verdaupuffer (Tabelle 2-3) verdünnt wurde. Nach Zugabe von Cystein auf eine Endkonzentration von 10 mM wurde das Papain für 5 min bei 37 °C aktiviert, mit Verdaupuffer 1:10 verdünnt und anschließend bei 8000 g für 5 min zentrifugiert. Die Konzentration dieser aktivierten Papainlösung wurde mittels Bradford bestimmt.
Die IgG4-reiche Probe (2 mg) wurde dann durch Zugabe von 0,1 % (w/w) des aktivierten Papains und 1 mM Cystein für 4 Stunden bei 37 °C verdaut. Jeweils 1 ml des Reaktionsprodukts wurde sofort auf eine Protein A-Säule aufgetragen (Kapitel 2.3.3), um das Papain und die Fabγ-Fragmente vom ungespaltenen IgG und den Fcγ-Fragmenten abzutrennen. Die anschließende Gelpermeationschromatographie zur Abtrennung der Fcγ4-Fragmente von den ungespaltenen IgG-Proteinen wurde ebenfalls, wie unter Kapitel 2.3.3 beschrieben, durchgeführt. Die Fcγ-Fragmente enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, auf eine Konzentration von 1 – 5 mg/ml konzentriert und konnten bei – 20 °C gelagert werden.

2.4 Massenspektrometrische Messungen

2.4.1 Deglykosylierung von IgG und Fc-Fragmenten

Alle Proteine wurden entsprechend der Anzahl der vorhandenen N-Glykosylierungsstellen pro mg Protein mit N-Glykosidase F (PNGase) deglykosyliert.
Bei den Fc-Fragmenten der Subklassen IgG1 und IgG4 (2 - 5 mg/ml) entsprach dieses 1,5 U der PNGase pro 100 µg Protein, wogegen beim intakten IgG (1 – 10 mg/ml) 0,5 U pro 100 µg Protein ausreichten. Eine vollständige Deglykosylierung lag nach 18 h bei 37 °C in Deglykosylierungspuffer (Tabelle 2-8) vor, in den die Proben bei Bedarf umgepuffert wurden.

Tabelle 2-8: Bei der Deglykosylierung verwendete Puffer.

Puffername	Zusammensetzung
Deglykosylierungspuffer	50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 200 mM NaCl, 2 mM EDTA

2.4.2 Reduktion und S-Carboxymethylierung von IgG und Fc-Fragmenten

- **Für das *Peptide Mapping***

Harnstoff wurde zur Entfaltung des Proteins mit einer Konzentration von 8 M in einer Probe (1 – 100 mg/ml Protein) gelöst, die 250 µg IgG oder Fc-Fragment in 50 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl (pH 8,0) enthielt. Diese Probe wurde wenn nötig mit Puffer A (Tabelle 2-8) auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von DTT (DTT-Lösung) in einem dreifachen molaren Überschuss bezogen auf die Anzahl der Cysteine pro Mol Protein wurden die Proben für 30 min bei 60 °C inkubiert. Nach Abkühlen der Lösung auf RT wurde Iodessigsäure (JES-Lösung) in einem 2,5-fachen Überschuss bezogen auf DTT zugegeben und die Probe für 15 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Zum Abstoppen der Alkylierung wurde die Probe in NH_4HCO_3-Lösung umgepuffert.

Tabelle 2-9: Beim *Peptide Mapping* verwendete Puffer.

Puffername	Zusammensetzung
Puffer A	50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 8 M Harnstoff
DTT-Lösung	100 mM DTT in Puffer A
JES-Lösung	100 mM Iodessigsäure in 50 mM Tris/HCl (pH **9,0**), 8 M Harnstoff
NH_4HCO_3-Lösung	50 mM Ammoniumhydrogencarbonat (pH 8)

- **Für LC/ESI-MS-Messungen intakter Proteine**

Proben intakter Fc-Fragmente (1 – 5 mg/ml in 50 mM Tris/HCl (pH 8), 200 mM NaCl) wurden ohne 8 M Harnstoff in 50 mM DTT für 30 min bei 60 °C zu Fc/2-Fragmenten reduziert. Falls diese Bedingungen nicht zu einer vollständigen Spaltung der Disulfidbrücken führten, wurde die Reduktion bei 37 °C über Nacht fortgesetzt.

2.4.3 V8 Protease- (GluC) und Trypsinverdau von IgG und Fc-Fragmenten

V8 Protease- und Trypsin-Verdaue der reduzierten und S-carboxymethylierten IgG und Fc-Fragmente (100 – 300 µg) in 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat (pH 8) wurden mit 2 % (w/w) der Protease für 5 h bei 37 °C durchgeführt. Die Hydrolyse wurde durch Zugabe von 1 % TFA (pH-Wert < 3) gestoppt.

2.4.4 GluC-Totalverdau von Human-Plasma für die quantitative Analyse

20 µl Human-Plasma wurden mit 4 µl einer murinen IgG1-Lösung (5 mg/ml) und 100 µl Puffer A (Tabelle 2-9) gemischt und mit 30 µl der DTT-Lösung für 30 min bei 60 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Proben nach Inkubation mit 75 µl der JES-Lösung für 15 min bei 37 °C in Ultrafiltrationseinheiten mit einer Ausschlussgrenze von 100 kDA übertragen. Die Proben wurden in NH_4HCO_3-Lösung umgepuffert, auf ~200 µl konzentriert und daraufhin für 5 h mit 1:100 (w/w) GluC bei 37 °C verdaut. Die Proteolyse

wurde mit 10 µl 10 %iger Ameisensäure abgestoppt. Diese Proben konnten bei 4 °C gelagert werden.

2.4.5 MALDI-Massenspektrometrie

- **Probenvorbereitung**

Die Proteinproben wurden mit Hilfe von ZipTip-Pipettenspitzen, die 0,6 µl einer RP-Phase enthalten, entsalzt und konzentriert. Für Proteinproben wurde dabei eine C_4-Phase und für Peptidproben eine C_{18}-Phase verwendet. Im ersten Schritt wurde die feste Phase durch zweimaliges Spülen mit 10 µl Hydrierlösung aktiviert und durch anschließendes zweimaliges Spülen mit 10 µl Waschlösung äquilibriert. Durch langsames Auf- und Abpipettieren der Proben (5 – 6 Wiederholungen) wurden die Proteine oder Peptide auf die RP-Phase geladen. Salze wurden anschließend durch Waschen mit 10 µl der Waschlösung (5 - 7 Wiederholungen) entfernt. Die Elution erfolgte mit 2,5 µl der entsprechenden Elutionslösung. Wie beim Waschen wurde dieser Schritt 3 - 4-mal mit demselben Aliquot der Elutionslösung wiederholt. Es wurde während aller Schritte darauf geachtet, dass keine Luft in das Säulenmaterial eindrang.

Tabelle 2-10: Bei der ZipTip-Probevorbereitung für MALDI-MS benötigte Lösungen.

Name	Zusammensetzung
Hydrier-Lösung	50:50 (v/v) Acetonitril/0,1 % Trifluoressigsäure
Waschlösung	0,1 % Trifluoressigsäure
Elutionslösung	60:40 (v/v) Acetonitril/0,1 % TFA **(Peptide)**
	75:25 (v/v) Acetonitril/0,1 % TFA **(Proteine)**

- **Probenanalyse**

Die Spots des MALDI-Probenträgers wurden durch Auftragen von 0,2 µl Dünnschichtlösung mit einer fein-kristallinen Schicht aus Matrixkristallen überzogen. Die 2,5 µl Eluat wurden mit 2 µl Matrixlösung gemischt und je 0,8 µl des Eluat-Matrix-Gemisches wurden auf die Dünnschicht präpariert, so dass der Analyt durch Trocknen der Matrix an der Luft bei RT kokristallisierte.

Tabelle 2-11: Verwendete Matrixlösungen für Proteine und Peptide bei der MALDI-Präparation.

Name	Zusammensetzung
Matrixlösung	Matrix gesättigt in 30:70 (v/v) Acetonitril:0,1 % TFA
Dünnschichtlösung	Matrix gesättigt in Ethanol
Proteine	Matrix : 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure (SA)
Peptide	Matrix : α-Cyano-4-hydroxyzimtsäure (CCA)

Die Geräteparameter wurden abhängig von der Größe des zu messenden Moleküls gewählt. Die Differenz zwischen den beiden Spannungen IS1 und IS2 bestimmte das Beschleunigungs-Potential. Mit zunehmender Größe der Beschleunigungsspannung konnten größere Proteine gemessen werden. Durch die Einstellung der Ausschlussgrenze konnten die

Signale der Matrix-Moleküle im unteren Bereich des Spektrums minimiert werden. In der folgenden Tabelle sind die wichtigsten Geräteparameter bei MALDI-Messungen für verschiedene Proteinmessungen angegeben.

Tabelle 2-12: Geräteparameter bei MALDI-MS-Messungen.

Parameter	Ig	Fc-Fragment
Modus	linear	linear
Time base [ns]	4	2
Delay [ns]	80000	75000
Cut off [Da]	8000	5000
IS1 [kV]	19	19
IS2 [kV]	12,5	12,5
PIE	medium	short

Die Laserleistung (N_2-Laser, 337 nm) wurde für jede Probe individuell angepasst, so dass die Signalintensität stets knapp über dem Schwellenwert (*threshold*) lag, um ein maximales Signal/Rausch-Verhältnis zu erreichen.

2.4.6 Qualitatives Peptide Mapping von IgG mittels LC/ESI-MS

Je 50 µg der Peptide der Protease-Verdaue (Kapitel 2.4.3) wurden auf einer RP-Säule (Vydac C_{18}) getrennt und mit einem ESI-MS (LCQ)-Instrument detektiert.

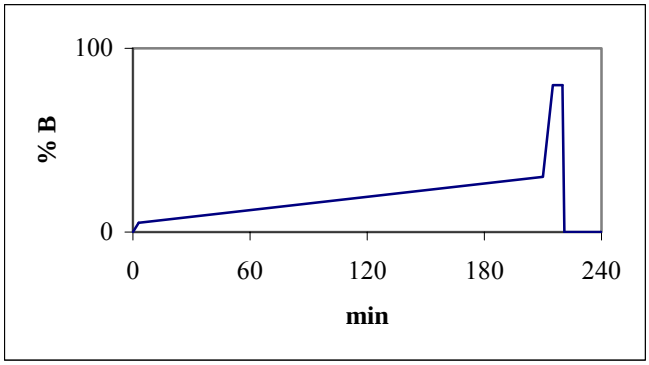


Abbildung 2-1: LC-Gradient für das qualtitative Peptide Mapping.

Die Analyten wurden mit einem binären Gradienten (200 µl/min) eluiert, indem Teilgradienten von 0 bis 5 % Laufmittel B innerhalb von 3 min, von 5 % bis 30 % innerhalb von 207 min und 30 % bis 80 % innerhalb von 5 min kombiniert wurden (Abbildung 2-1).
Während des LC-Laufs wurde ein Triple-MS-Experiment (Abbildung 1-15) durchgeführt, bei dem ESI-IT (LCQ)-MS-, hochaufgelöste MS- und MS/MS-Daten im automatisierten Modus erzeugt wurden. Dabei wurde nach jedem MS-Scan das intensivste Ion mit einem Schwellenwert > 50000 und einer Isolationsbreite von 4 amu selektiert und anschließend mit einer normalisierten Kollisionsenergie von 23 % fragmentiert. Der Ladungszustand des Vorläuferions wurde im hochauflösenden Zoomscan-Modus bestimmt.
Die Signalintensität für Peptide wurde unter Simulation der LC/MS-Bedingungen (10 % Laufmittel B, 200 µl/min) zuvor im automatischen Tune-Modus auf das $[M+2H]^{2+}$-Ion des C-Peptids maximiert. Die MS-Parameter sind in Tabelle 2-13 aufgelistet.

Tabelle 2-13: Beim qualitativen Peptide Mapping verwendete MS-Parameter (LCQ).

Parameter	Wert
Sprayspannung	4,25 kV
Sheathgas	80 dl/min
Badegas	20 dl/min
Kapillartemperatur	220 °C

Die Kapillarspannung (Abweichung) wurde manuell auf 26 und die *Tube lens* (Abweichung) auf -35 gesetzt, um ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis zu erreichen und die *Insource*-Fragmentierung zu minimieren. Es wurde nur jeweils ein Mikroscan pro Makroscan mit einer Injektionszeit von 400 ms durchgeführt. Der m/z-Bereich betrug 150 – 2000.

2.4.7 Quantitatives *Multiple-Reaction-Monitoring* mittels LC/ESI-MS

Je 50 µl des GluC-Totalverdaus von Human-Plasma (Kapitel 2.4.4) wurden auf einer RP-Säule (Vydac C_{18}) getrennt und mit einem ESI-MS (LCQ)-Instrument detektiert. Während des Probenauftrags wurde die Säule isokratisch für 0,5 min mit 0 % Laufmittel B gespült.

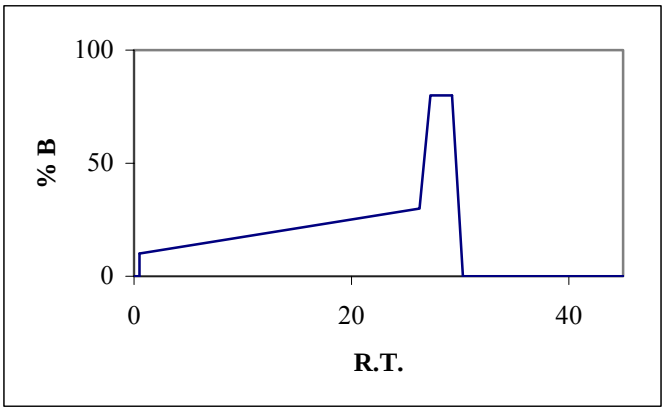


Abbildung 2-2: LC-Gradient für die quantitativen MRM-Experimente.

Die Analyten wurden mit einem binären Gradienten (200 µl/min) eluiert, indem Teilgradienten von 10 % bis 30 % Laufmittel B innerhalb von 26 min und von 30 % auf 80 % B innerhalb von 1 min miteinander kombiniert wurden (Abbildung 2-2). Die Reäquilibrierung wurde mit 400 µl/min durchgeführt. Während der ersten 5 min und der Reäquilibrierungsphase wurde der Fluss vom ESI-MS getrennt. Die Gesamtdauer des Laufs betrug 46 min. Für die MRM-Übergänge wurde eine Isolationsbreite der Vorläufer- und Fragmentionen in Abhängigkeit von deren Ladungszustand gewählt. Diese betrug für zwei- und dreifachgeladene Peptide 3.0 amu und für einfachgeladene 4.0 amu. Die normalisierte Kollisionsenergie war 23 %. Die LCQ-Parameter entsprachen den in Kapitel 2.4.6 aufgeführten. Allerdings wurden aufgrund der stark verkürzten Laufzeit (46 min) jeweils 2 Mikroscans pro Makroscan mit einer Injektionszeit von 300 ms durchgeführt, um eine ausreichende Anzahl von Datenpunkten pro Elutionspeak zu erzeugen.

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

Die MS- und MS/MS-Daten des Triple-Experiments wurden anschließend mit der Sequest-Software der Firma ThermoFinnigan prozessiert, unter Verwendung der in Tabelle 2-14 aufgelisteten Parameter.

Tabelle 2-14: Für die Prozessierung von MS-Daten verwendete Parameter.

Parameter	Wert
Schwellenwert	$5*10^6$
Fehler Vorläuferion	1,4 amu
Gruppenscan Toleranz	3

Die übrigen Werte entsprachen den Voreinstellungen. Die so erzeugten DTA-Dateien enthielten neben dem Ladungszustand des Vorläuferions, das Molekulargewicht des Peptids und die Intensität kombiniert mit dem m/z-Verhältnis der Fragmentionen. Diese Dateien konnten für die nachfolgende Datenbanksuche mit Sequest oder Mascot, sowie bei der *de novo*-Sequenzierung mit Lutefisk verwendet werden.

- **Datenbanksuche mit Sequest**

Sequest wurde für die Protein-/Peptididentifizierung anhand von MS/MS-Daten (DTA-Dateien) unter Verwendung der selbst erstellten Sequenzdatenbanken verwendet (Tabelle 2-15).

Tabelle 2-15: Selbst erstellte Protein-/Peptidsequenzdatenbanken.

Datenbank	Protein-/Peptidsequenzen
Ig-DB	Immunglobuline (Iso- und Allotypen)
IgPep-DB	Immunglobulinpeptide

Die Erstellung der jeweiligen Datenbank wird im Kapitel 2.5 und 2.6 beschrieben. Bei der Suche wurde ein unspezifischer Verdau definiert, da die benötigte Zeit für die Datenbanksuche in den selbst erstellten Datenbanken keine kritische Größe darstellte, der Toleranzwert der Fragmentionen wurde auf null gesetzt, was bei dem verwendeten Integersystem von Sequest einem realen Fehler von ± 0,8 amu entspricht. Für Vorläufer- und Fragmentionen wurden bei Peptiden < ~1500 Da von monoisotopischen und bei Peptiden > ~1500 Da von mittleren Molekulargewichten ausgegangen. Es wurde gegen Ionen aus der y- und der b-Ionenserie verglichen. Das Molekulargewicht des Cysteins wurde entsprechend der S-Carboxymethylierung um +58 Da modifiziert und es wurde eine variable Modifikation von Glutamat zu Pyroglutamat zugelassen (-17 Da).
Die iterativ bestimmten Schranken des Reportfilters, von denen mindestens vier erfüllt sein mussten, sind in Tabelle 2-16 aufgelistet.

Tabelle 2-16: Verwendete Parameter des Reportfilters

Parameter	Wert
Xcorr	> 2,5
DelCN	> 0,45
SP	> 100
RSP	< 2
Anzahl Fragmentionen	> 10%

2.4.9 ESI-MS-Messungen von Fc-Fragmenten des IgG

- **LC/ESI-MS (LCQ und Quattro LC)**

Myoglobinstandard (100 pmol), intakte (2 µmol) oder deglykosylierte Fc-Fragmente (100 pmol) sowie reduzierte Fc/2-Fragmente (1 µmol) der Subklassen IgG1 und IgG4 wurden für eine *online*-Entsalzung und Konzentrierung auf eine RP-Säule aufgetragen. Die Entsalzung wurde durch isokratisches Spülen der Säule mit 100 % des Laufmittels A für die ersten 7 min erreicht. Während der ersten 5 min wurde das Eluat von der ESI-Quelle getrennt, um eine Kontamination der Ionenquelle mit Salzen zu vermeiden. Anschließend wurde das Protein mittels eines linearen Gradienten von 0 % bis 100 % des Laufmittels B innerhalb von 5 min eluiert. Um eine vollständige Elution des Proteins zu gewährleisten, wurde die Säule für 5 min mit 100 % B gespült.

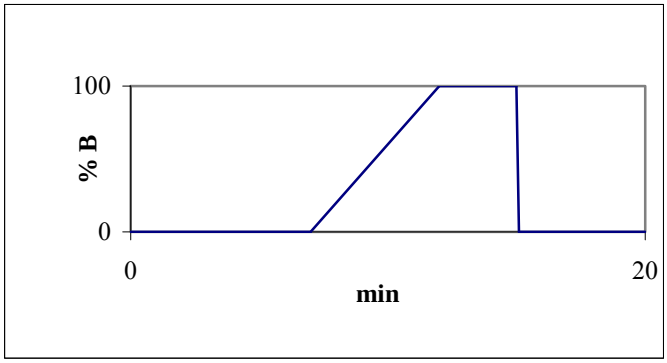


Abbildung 2-3: LC-Gradient für die *online* Entsalzung und Konzentrierung von Proteinen.

Tabelle 2-17: Bei LC/ESI-MS verwendete Puffer, Säule und Bedingungen.

Name	Zusammensetzung
Laufmittel A	0,2 % HCOOH und 5 % Acetonitril in Wasser
Laufmittel B	0,2 % HCOOH, 5 % Wasser in 1:1 (v/v) Isopropanol/Acetonitril

Säule: Protein MicroTrap
Flussrate: 200 µl/min

- **Parameter LCQ**

Die Signalintensität wurde unter Simulation der LC/MS-Bedingungen (50 % Laufmittel B, 200 µl/min) zuvor im automatischen Tune-Modus auf das $[M+17H]^{17+}$-Ion (m/z 1060,7) des Myoglobins maximiert. Die verwendeten MS-Parameter sind in Tabelle 2-18 angegeben.

Tabelle 2-18: Bei ESI-IT-MS-Messungen (LCQ) intakter Proteine verwendete Parameter.

Parameter	Wert
Sprayspannung	4,25 kV
Sheathgas	80 dl/min
Badegas	20 dl/min
Kapillartemperatur	220 °C
Mikroscans	3
Injektionszeit	200 ms

Die Kapillarspannung (Abweichung) wurde manuell auf 11 und die *Tube lens* (Abweichung) auf -10 gesetzt, um ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis zu erreichen und die *Insource*-Fragmentierung zu minimieren. Der m/z-Bereich betrug 300 – 2000 für Myoglobin und deglykosylierte Fc-Fragmente, 800 – 2000 für reduzierte Fc/2- und 1000 – 2000 für intakte Fc-Fragmente.

- **Nano-Fluss ESI-MS (QTOF 2 und QTOF Ultima API)**

Proteinlösungen (1 – 5 mg/ml) des Myoglobinstandards, intakter oder deglykosylierter Fc-Fragmente sowie reduzierter Fc/2-Fragmente der Subklasse IgG1 wurden mit ZipTip-Pipettenspitzen (C_4-Phase), die 0,6 µl einer C_4-Phase enthielten, entsalzt und konzentriert (Kapitel 2.4.5). Die 2 µl des Eluats in 50 % 1:1 (v/v) Isopropanol/Acetonitril, 0,2 % HCOOH wurden in eine mit Gold beschichtete Borosilicatnadel überführt, die auf einem Nanofluss-Probenhalter montiert wurde. Durch Anlegen einer Kapillarspannung von 1 – 1,8 kV wurde ein Elektrospray mit einer Flussrate von 20 – 50 nl/min erzeugt. Unter Anlegen einer Spannung von 9,1 kV wurden die Ionen im orthogonalen TOF-Analysator beschleunigt und ein- (V-Optik) bis zweifach (W-Optik) reflektiert. Die Geräte wurden mit einer 1:1 Myoglobin/Trypsinogen-Lösung (je 5 pmol in 1:1 (v/v) 0,2 % Ameinsensäure:Acetonitril) für den Massenbereich bis 1500 kDa kalibriert.

2.4.10 Dekonvolution von ESI-MS-Daten intakter Proteine

- **ESI-MS-Datenprozessierung**

LCQ-MS-Daten der mehrfach geladenen Ionen wurden mit Hilfe des DATABRIDGE-Programmes in das MassLynx-Sofwarepaket importiert. Bei allen Spektren wurde durch Subtraktion von 10 – 30 % unterhalb des Signals mit einem Polynom 5. Ordnung und einer Toleranz von 0,010 das Signal/Rausch-Verhältnis verbessert.

- **Dekonvolution mit MAXENT1**

Alle ESI-MS-Spektren (QTOF2, QTOF Ultima, Quattro LC und LCQ) wurden mit MAXENT1 dekonvoliert. Prozessierte Spektren wurden mit einer Auflösung von 0,5 und einer Gauss´schen Fehlerstatistik unter Verwendung von 5 – 8 Ladungszuständen in 10 – 15 Iterationsschritten dekonvoliert. Neben der Auswahl geeigneter Ladungszustände (Signal/Rausch-Verhältnis) war die Einstellung des richtigen σ-Wertes (Peakbreite auf halber Höhe) entscheidend. Dieser hängt neben der natürlichen Isotopenbreite und dem Ladungszustand vom Auflösungsvermögen des MS-Instruments ab. Für die Bestimmung des σ-Wertes zur Dekonvolution der ESI-MS Spektren der intakten Fc-Fragmente und der reduzierten Fc/2-Fragmente des IgG1 und IgG4 wurde Myoglobin (MW 16951,5 Da) als Kalibrierstandard verwendet. Bei Verwendung identischer ESI-MS-Bedingungen wurde der σ-Wert (w_c) des Ladungszustandes n_c = 14 (m/z = 1212) gemessen. Die σ-Werte (w_s) der Fc- und Fc/2-Fragmente wurden dann mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$w_s^2 = w_c^2 + \left(\frac{W_s}{n_s}\right)^2 - \left(\frac{W_c}{n_c}\right)^2$$

$W_{c,s}$ (c – Myoglobin; s – Analyt) entspricht dabei der natürlichen Isotopenverteilung der jeweiligen Proteine und wurde mit der in Abbildung 2-4 dargestellten Funktion ermittelt. Der Ladungszustand n_s des Analyten wurde für das m/z-Verhältnis des Standards berechnet und betrug für intakte Fc-Fragmente n_s = 45 und für reduzierte Fc/2-Fragmente 25.

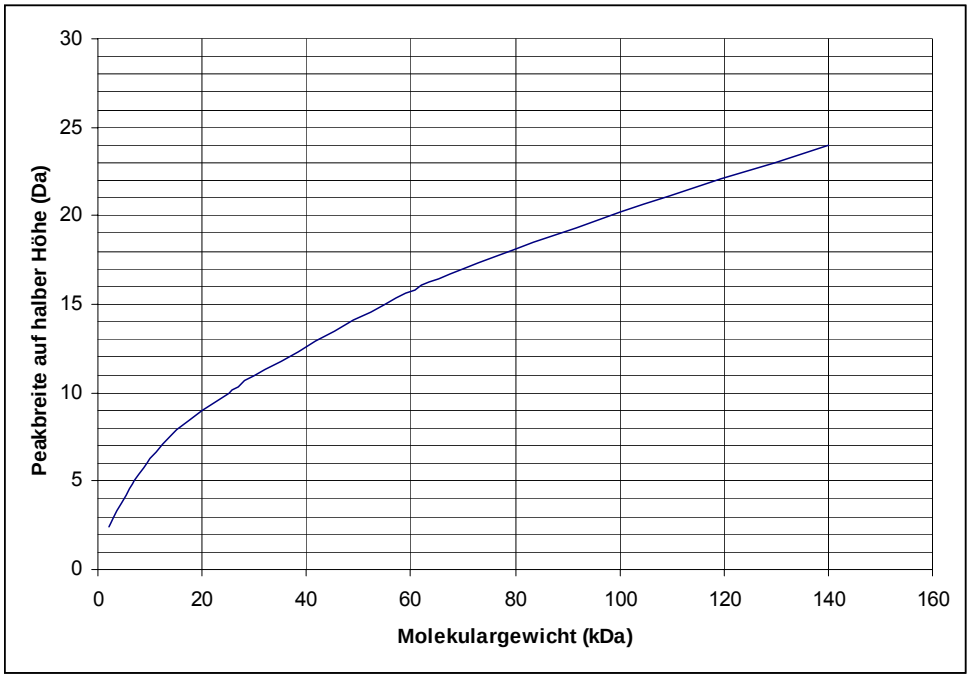


Abbildung 2-4: Darstellung der natürlichen Isotopenbreite in Abhängigkeit vom Molekulargewicht.

2.5 Erstellung einer Sequenzdatenbank (Ig-DB) für humane Immunglobuline

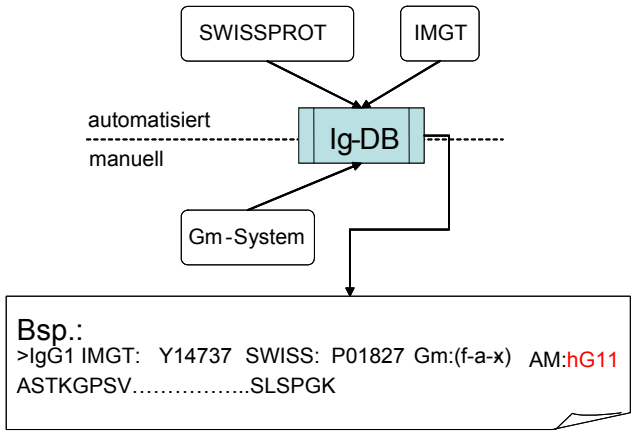


Abbildung 2-5: Schematische Darstellung des Aufbaus der Immunglobulin-Sequenzdatenbank

Für die Erstellung der Sequenzdatenbank wurden Proteinsequenzen humaner Immunglobuline aus der Nukleinsäuredatenbank IMGT mit denen der Proteindatenbank SWISSPROT kombiniert und mit Ergebnissen des Gm-Systems erweitert (Abbildung 2-5). Die allelen IGHC-Gene jedes humanen Ig-Isotyps, die in der IMGT-Datenbank durch Sequenzalignments repräsentiert werden, wurden ausgelesen. Aus der SWISSPROT wurden anschließend alle Proteinsequenzen übernommen, die humanen Ursprungs waren und das Schlüsselwort „Immunoglobulin C region“ enthielten. Die SWISSPROT-Datenbank enthält zudem Informationen über bekannte Sequenzkonflikte und –varianten. Führen die Varianten zu verschiedenen Allotypen eines Proteins, so beschreiben die Konflikte nur widersprüchliche Sequenzpositionen, die in verschiedenen Arbeiten unterschiedlich bestimmt wurden. Durch Berücksichtigung der Varianten und Konflikte wurden die verschiedenen allelen Protein- und Konfliktsequenzen erzeugt. Waren mehrere Varianten für einen Isotyp angegeben, wurden durch Kombinatorik mögliche Sequenzvarianten (Allotypen) abgeleitet (Abbildung 2-6).

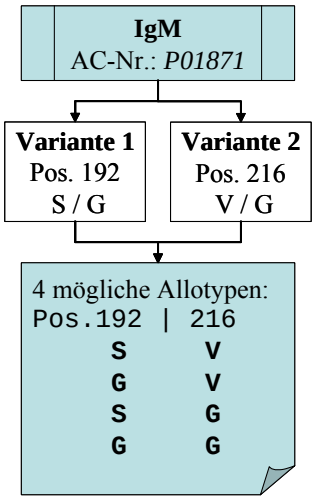


Abbildung 2-6: Erzeugung möglicher Allotypen ausgehend von gefundenen Varianten in der Swissprot-Datenbank am Beispiel des IgM.

Konfliktsequenzen wurden durch Zusammenfassung von Konflikten mit identischen Literaturverweisen zu einer Sequenz erstellt.
Die erzeugten Original-, Konflikt und Variantsequenzen wurden mit denen der IMGT-Datenbank zusammengeführt, indem identische Sequenzen vereint wurden.
Die gesammelten Sequenzinformationen wurden mit den Sequenzinformationen, die aus der Anwendung des Gm-Systems zur serologischen Typisierung der Immunglobuline stammen, erweitert. Dieses geschah durch Zuweisung der Gm-Faktoren zu den einzelnen Sequenzen entsprechend ihres allotypischen Epitops, sofern dieses für die einzelnen Gm-Faktoren bekannt war. Fehlende Allotypen, die durch noch nicht vorhandene Gm-Kombinationen definiert werden, wurden ergänzt.

Tabelle 2-19: Herkunft der vier IgG1-Allotypen in der Ig-DB.

Ig-DB	**Gm-System**	**Gm-Faktoren**				**SWISSPROT**	**IMGT**
AM-Nummer		**f**	**z**	**a**	**x**	AC-Nummer	Nummer
hG11	G1m(f-a-x)	x	-	-	-	P01857	Y14737
hG12	G1m(za-x)	-	x	x	-	P01857	J00228
hG13	**G1m(zax)**	**-**	**x**	**x**	**x**	-	-
hG14	**G1m(fa-x)**	**x**	**-**	**x**	**-**	-	-

Als Beispiel seien hier die IgG1-Allotypen G1m(zax) und G1m(fa-x) genannt, die zum jetzigen Zeitpunkt in keiner der Datenbanken eingetragen sind (Tabelle 2-19). Die Sequenzen wurden abschließend durch Vergabe einer AM-Nummer gekennzeichnet. Die Nomenklatur der AM-Nummern ist in Abbildung 2-7 erklärt.

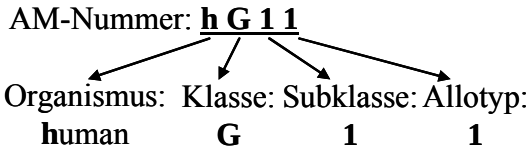


Abbildung 2-7: Nomenklatur unter Verwendung von AM-Nummern.

2.6 Entwicklung eines Programms (IgPep) zur Erzeugung einer nicht redundanten Peptiddatenbank aus Immunglobulinsequenzen

Ausgehend von der Sequenzdatenbank für humane Ig (Kapitel 2.5), die aufgrund ihrer Beschaffenheit eine hohe Redundanz besitzt, wurde ein Programm (IgPep) entwickelt, welches durch Simulation eines proteolytischen Verdaus eine nicht redundante Peptiddatenbank (IgPep-DB) aus allen Immunglobulinsequenzen erzeugt. Jedem Peptid werden dabei alle Ig-Iso- und Allotypen zugewiesen, die dieses Peptid erzeugen (Abbildung 2-8).

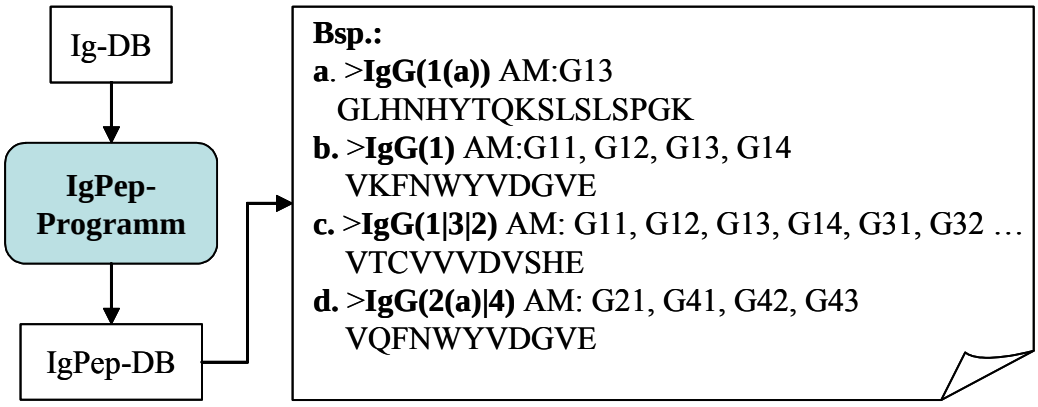


Abbildung 2-8: Auszug aus der IgPep-DB; **a** – Allotypisches Markerpeptid, **b** – Isotypischer Marker, **c** – Marker für die IgG-Subklassen 1-3, **d** - Marker für IgG4 und den Allotypen G21 der Subklasse IgG2.

Das Programm IgPep-DB beinhaltet fünf Prozeduren. Die Sequenzen aus der Ig-DB werden unter Berücksichtigung angegebener Restriktionen eingelesen. Für eine gewählte Protease wird der Verdau simuliert, die entstehenden Peptide werden auf Redundanz geprüft und zusammengefasst. Die resultierende nicht-redundante Peptidstruktur wird im *fasta*-Format ausgegeben (Abbildung 2-9).

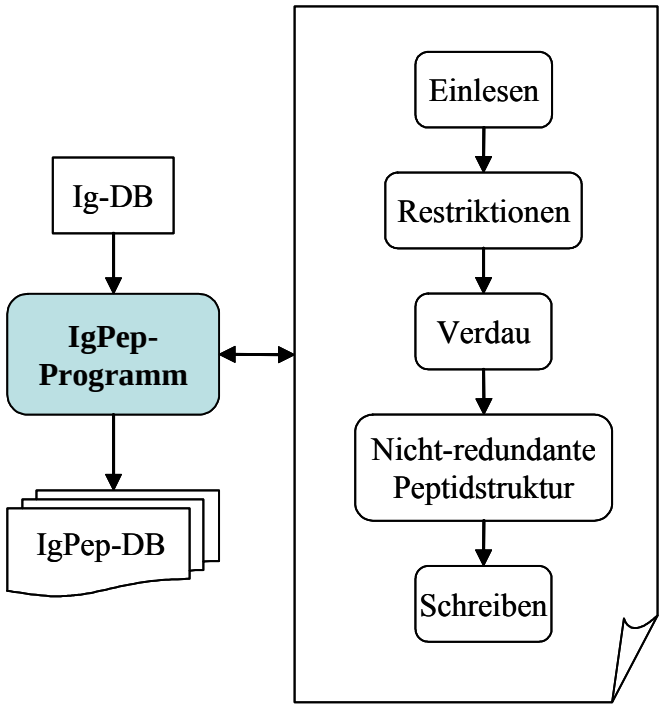


Abbildung 2-9: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Programms IgPep.

Durch die Implementierung von Restriktionen ist eine leichtere Auswertung der resultierenden IgPep-DB möglich. So kann beispielsweise als Restriktion angegeben werden, dass nur die Ig-Klasse G berücksichtigt werden soll, so dass die IgPep-DB nur Peptide des IgG enthält. Kombinationen bestimmter Isotypen sind ebenfalls möglich.
Die Proteasen wurden im Hinblick auf kommerzielle Verfügbarkeit und Spezifität ausgewählt. Folgende Proteasen erfüllen diese Kriterien:

- **Trypsin**
- **LysC**
- **GluC**
- **ArgC**
- **BrCN**
- **AspN**
- **Chymotrypsin**

Die Anzahl möglicher fehlender Proteaseschnitte kann ebenfalls definiert werden. Unter Verwendung gleicher Restriktionen und der Anzahl möglicher Fehlschnitte, kann das Programm IgPep ausgehend von den sieben verschiedenen Proteasen sieben verschiedene IgPep-DB erzeugen.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Reinigung einzelner IgG-Subklassen und Fcγ-Fragmente

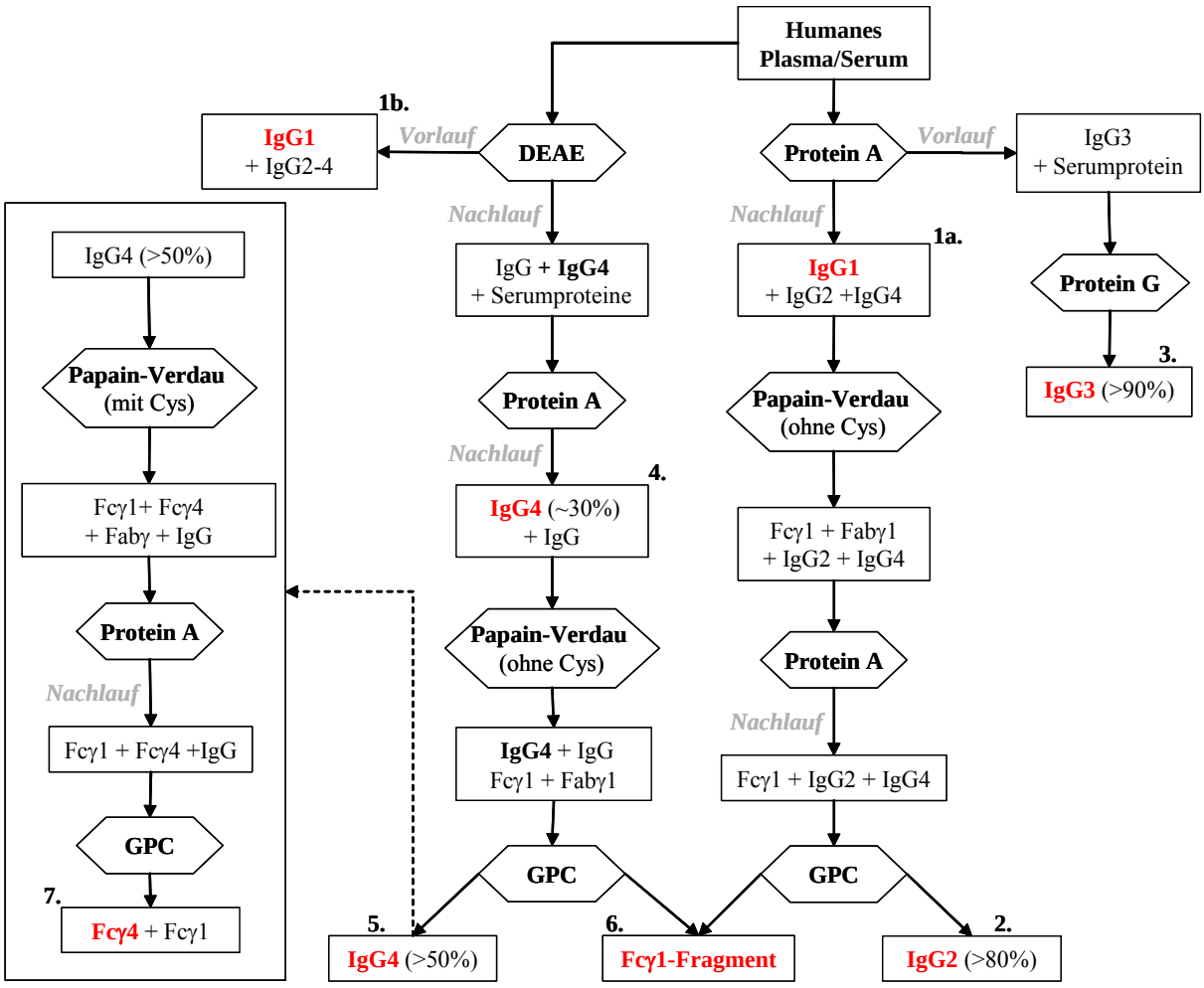


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung zur Anreicherung der einzelnen IgG-Subklassen und des Fcγ1-Fragments; wichtige Fraktionen sind rot hervorgehoben und numerisch gekennzeichnet. Die Nummerierung entspricht der in Tabelle 3-1.

Das im Verlauf dieser Arbeit entwickelte Reinigungsprotokoll zur Anreicherung der einzelnen IgG-Subklassen und der Fcγ-Fragmente ausgehend von Human-Plasma oder Serum ist in Abbildung 3-1 schematisch dargestellt.

- **IgG (Proben 1a und 1b)**

Humanes IgG konnte affinitätschromatographisch über Protein A (Probe 1a.) oder Protein G sowie über eine schwache Ionenaustauschchromatographie mit 2-Diethylamino-ethyl (DEAE) als funktioneller Gruppe (Probe 1b.) aus Human-Plasma isoliert werden. Die Bedingungen zur Reinigung wurden in der Literatur ausführlich besprochen[22,48,124,125].

- **IgG3 (Probe 3)**

Humanes IgG3 konnte durch eine Kombination aus Protein A- und Protein G-Chromatographie isoliert werden, indem der IgG3-enthaltende Vorlauf der Protein A-Chromatographie direkt über eine Protein G-Säule geleitet wurde. Ein vergleichbares Protokoll wurde während dieser Arbeit von Amaral et al. veröffentlicht[126].

- **IgG2 (Probe 2) und das Fcγ1-Fragment (Probe 6)**

Jeffris et al. zeigten, dass die unspezifische Sulfhydryl-Protease Papain eine unterschiedliche Spezifität bezüglich der verschiedenen IgG-Subklassen besitzt[127]. Demnach spaltet Papain ohne Anwesenheit von Cystein weder IgG2 noch IgG4. Diese Tatsache wurde für die Darstellung von humanem Fcγ1-Fragments (Probe 6.) und einer angereicherten IgG2-Fraktion (Probe 2.) ausgenutzt. Als Ausgangsmaterial diente über Protein A-Chromatographie gereinigtes IgG, welches kein IgG3 mehr enthielt. Dadurch war die alleinige Spaltung des IgG1 mit Papain möglich. Nach der Abtrennung des Fab-Fragments über Protein A-Chromatographie konnten das Fc-Fragment und das ungespaltene IgG mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) getrennt werden. Obwohl die Darstellung des Fc-Fragments der IgG mehrfach beschrieben wurde[44,128], ist diese Methode zur Darstellung von polyklonalen IgG2 bisher unberücksichtigt geblieben.

- **IgG4 (Proben 4 und 5)**

Dass ein Teil des polyklonalen IgG an DEAE bindet, besonders das IgG4, welches im Vergleich zu den anderen Subklassen einen etwas niedrigeren pI-Bereich besitzt, wurde schon in der Literatur erwähnt[129]. Aber erst der in dieser Arbeit gemachte Befund, dass IgG4 wesentlich stärker an DEAE-Sepharose (Kapitel 3.1.1 – DEAE-Chromatographie) als an DEAE-Cellulose band, ermöglichte eine effektive Anreicherung dieser Subklasse (Probe 4.) mittels DEAE-Chromatographie. Bei der Herstellung einer IgG4-reichen Fraktion (Probe 5.) wurde das oben genannte Spaltverhalten des Papains ohne Cystein ausgenutzt, um IgG1 in der angereicherten IgG4-Probe weiter zu reduzieren. Mit der Entwicklung dieser Methode wurde eine Alternative zur Isolierung von polyklonalem IgG4 aus Human-Plasma etabliert, ohne kostenintensive anti-IgG4-mAbs für eine affinitätschromatographische Reinigung zurückgreifen zu müssen, bei denen eine selektive Bindung der verschiedenen IgG4-Allotypen zudem nicht ausgeschlossen werden kann.

- **Fcγ4-Fragment (Probe 7)**

In dieser Arbeit gelang erstmals die Darstellung von polyklonalem Fcγ4-Fragment (Probe 7.), indem IgG4 unter Anwesenheit von 1 mM Cystein mit Papain gespalten wurde. Dadurch wurden die Disulfidbrücken von IgG4 zwischen den schweren Ketten in der *hinge*-Region reduziert, was den sterischen Angriff der Protease Papain ermöglichte. Die weitere Isolierung von Fcγ4-Fragment erfolgte entsprechend der von Fcγ1-Fragment.

Zusammenfassend wurde die Anreicherung der einzelnen IgG-Subklassen mit folgenden Methoden erreicht: Protein A-, Protein G- und Gelpermeationschromatographie (GPC), sowie Papainspaltungen unter variierenden Bedingungen. Dabei wurden die fehlende Bindungsaffinität von IgG3 zu Protein A[125], der höhere pI-Wert des IgG4 im Vergleich zu den anderen Subklassen[130] und die unterschiedliche Spalteffizienz des Papains bezüglich der IgG-Subklassen[4] ausgenutzt. Das Ergebnis der Reinigung ist in Tabelle 3-1 dargestellt.

Tabelle 3-1: Ergebnisse der Anreicherung einzelner IgG-Subklassen und Fcγ-Fragmente mittels radialer Immunodiffusion (RID). Der Variationskoeffizient der Methode wird vom Hersteller mit 10 % angegeben. Die Richtigkeit der Methode wurde bei jeder Messung durch Bestimmung der Abweichung der experimentellen von den Sollwerten eines Kontrollserums *(The Binding Site)* für alle IgG-Subklassen bestätigt und lag unter ± 15 %. Der jeweils größte Subklassenanteil einzelner Fraktionen ist hervorgehoben.

Nr.	Fraktion	RID-Messung [%] - (± 10 %)			
		IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
1a	IgG (Protein A)	**63**	33	0	4
1b	IgG (DEAE)	**64**	30	5	2
2	IgG2 reich	9	**83**	0	9
3	IgG3 reich	9	0	**91**	0
4	IgG4 angereichert	55	17	4	24
5	IgG4 reich	11	29	1	**59**
6	Fcγ1-Fragment	**100**	0	0	0
7	Fcγ4-Fragment	41	0	0	**59**

Alle IgG-Subklassen konnten reproduzierbar auf einen Anteil von mehr als ~ 60 % angereichert werden. Das Reinigungsprotokoll wird nachfolgend im Einzelnen erläutert, um die Fraktionen genauer zu charakterisieren und die Problematik der Mikroheterogenität der Immunglobuline zu verdeutlichen.

3.1.1 Isolation von IgG aus Human-Plasma mittels Protein A- oder DEAE-Chromatographie

- **Protein A-Affinitätschromatographie**

Ein Chromatogramm der Protein A-Affinitätsreinigung ist in Abbildung 3-2 dargestellt. Eine optimale Trennung der IgG-Fraktion von den übrigen Plasmaproteinen wurde durch Verwendung eines salzfreien Puffers (20 mM Kaliumphosphat) bei einem pH-Wert von 7,0 erreicht. Ein geringerer pH-Wert oder die Zugabe von NaCl zur Minimierung unspezifischer Wechselwirkungen, wie dieses für Protein G empfohlen wird[22], war nicht erforderlich.

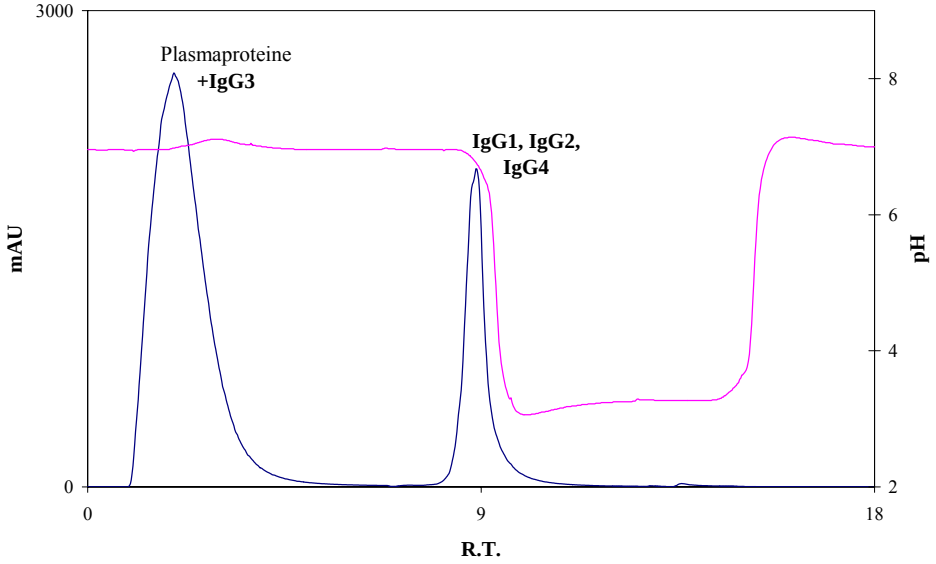


Abbildung 3-2: Chromatogramm der Reinigung von IgG aus Human-Plasma über Protein A. Blau – UV-Absorption in mAU, Magenta – pH-Wert.

Der Literatur entsprechend sollte der Vorlauf, neben den übrigen Plasmaproteinen, auch den überwiegenden Teil von IgG3 enthalten, wogegen der Nachlauf die übrigen IgG-Subklassen enthalten sollte[131]. Die RID-Messungen bestätigten dies. Im Nachlauf wurden alle IgG-Subklassen außer IgG3 nachgewiesen (Tabelle 3-1). Nur bestimmte Allotypen von IgG3 binden an Protein A. Dafür ist ein Histidin an Position 435 beim IgG erforderlich[125]. Dieses ist bei allen Allotypen der Subklassen IgG1, IgG2 und IgG4 sowie bei den IgG3-Allotypen G3m(s*) und G3m(st*) vorhanden. Die letzteren Allotypen des IgG3 sind aber im verwendeten europäischen Poolplasma (*Deutsches Rotes Kreuz*), welches vornehmlich aus Plasma kaukasischer Individuen besteht, nicht nachweisbar.

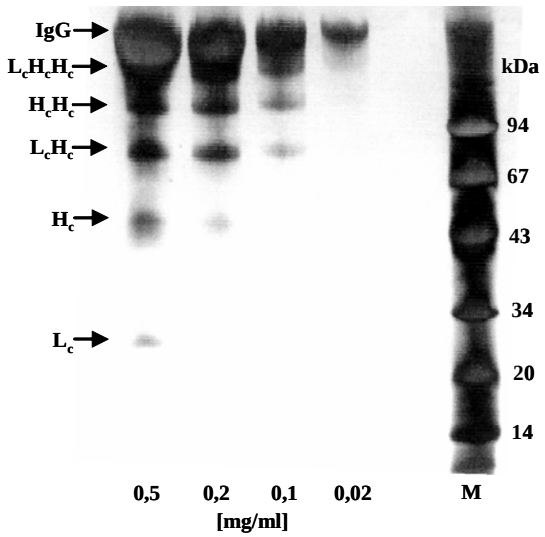


Abbildung 3-3: Nicht-reduzierendes, silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel der über Protein A-Chromatographie gereinigten IgG-Fraktion aus Human-Plasma bei verschiedenen Proteinkonzentrationen; M - Proteinmarker.

Auf dem nicht-reduzierenden SDS-PAGE-Gel (Abbildung 3-3) ist bei einer Konzentration von 0,02 mg/ml nur eine Bande zu erkennen, die mit einem Molekulargewicht von ~150 kDa dem IgG entspricht. Bei höheren Konzentrationen werden auch Nebenkomponenten mit ihren apparenten Molekulargewichten sichtbar.
Die Nebenkomponenten im SDS-PAGE-Gel von IgG lassen vermuten, dass sich ein Gleichgewicht zwischen offenen und geschlossenen Disulfidbrücken einstellt. Unter nativen Bedingungen sollten die nichtkovalenten Wechselwirkungen zwischen den schweren ($\mathbf{H_c}$) und den leichten ($\mathbf{L_c}$) Ketten der offenen Formen zur Stabilisierung der tetrameren Struktur ($\mathbf{L_cH_cH_cL_c}$ – IgG) ausreichen, so dass es nicht zu einem Zerfall der Fragmente oder halben IgG ($\mathbf{L_cH_c}$) kommen kann. Bei Erhitzung des IgG mit SDS auf 95 °C werden nichtkovalente Wechselwirkungen allerdings zerstört, so dass die einzelnen Fragmente in höheren Konzentrationen auf dem SDS-PAGE-Gel sichtbar werden. Die MALDI-MS-Experimente (Abbildung 3-4) zeigen ein entsprechendes Fragmentionen-Muster.

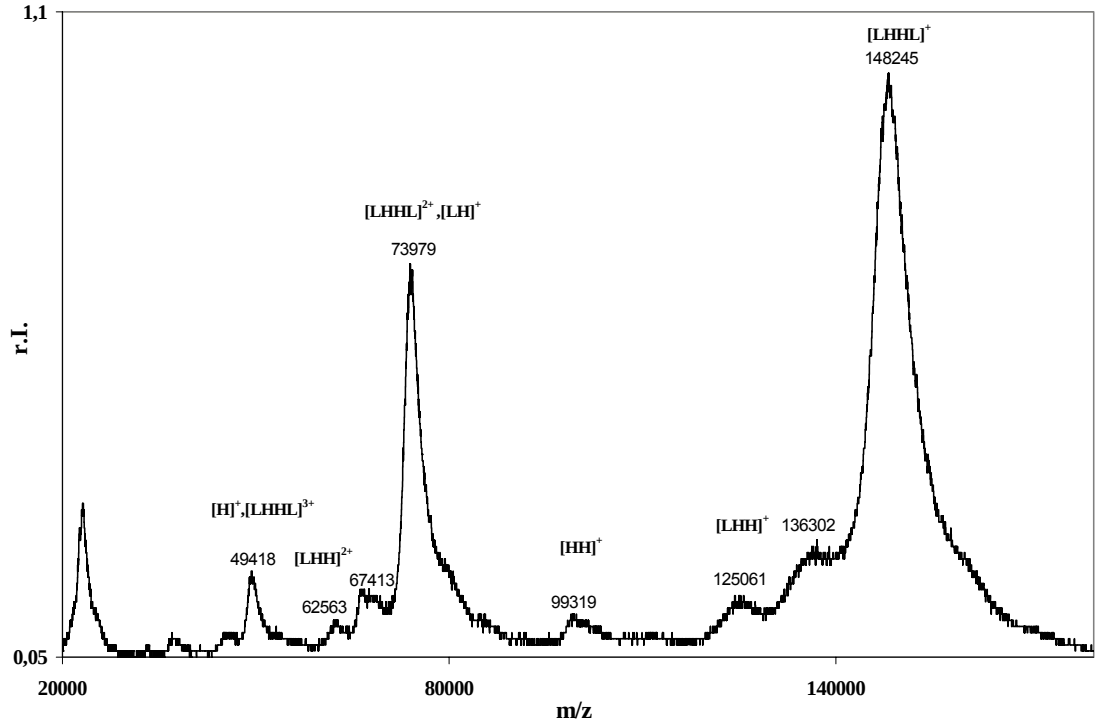


Abbildung 3-4: MALDI-MS-Spektrum (Biflex III) von über Protein A-Chromatographie gereinigtem IgG aus Human-Plasma. Es wurde ein m/z-Bereich zwischen 40000 und 135000 mit den Proteinen Enolase und Bovine Serum Albumin kalibriert. Der mittlere Fehler der Kalibrierung betrug ± 0,1 %. Das Ausschlussmolekulargewicht lag bei 23 kDa.

Im Spektrum sind neben dem LHHL-Molekülion vom IgG ebenfalls die einfach- und zweifach geladenen Ionen der Fragmente H (~50 kDa), LH (~75 kDa), HH (~100 kDa) und LHH (~125 kDa) zu erkennen. Die leichte Kette (L – ~24 kDa) kann aufgrund eines Ausschluss-molekulargewichts von 23 kDa nicht zugeordnet werden. Zur Molekulargewichtsbestimmung von IgG wurde das $[M+2H]^{2+}$-Molekülion herangezogen. Daraus errechnete sich für IgG ein Molekulargewicht von **148 kDa**. Da IgG1 einen Anteil von ~65 % in der Probe hatte, entspricht dieses Molekulargewicht dem von IgG1. Es ergibt sich somit eine Differenz zu dem in der Literatur[28] angegebenen Molekulargewicht (146 kDa) von 2 kDa.

Die Bestätigung des mit SDS-PAGE beobachteten Fragmentionenmusters mit MALDI-MS lässt vermuten, dass die beobachteten IgG-Fragmente kein Messartefakt sind, sondern schon nativ existieren. Das Ionisierungspotential beim MALDI-Prozess ist kleiner als die Bindungsenthalpie einer Disulfidbrücke, wodurch deren Spaltung beim Ionisierungsprozess unwahrscheinlich ist.

- **DEAE-Chromatographie**

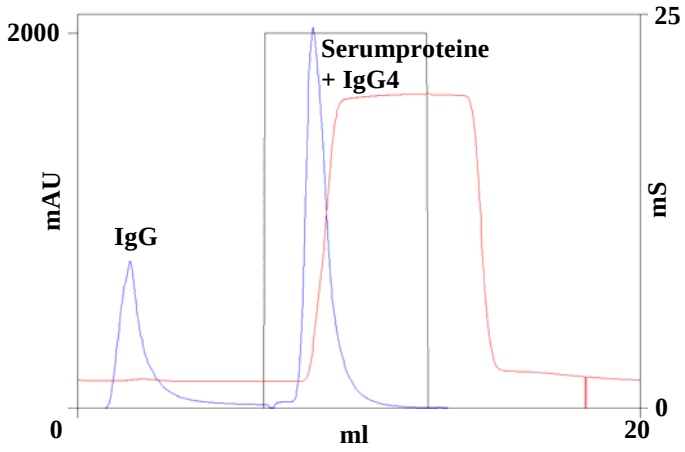


Abbildung 3-5: Chromatogramm einer DEAE-Reinigung von IgG aus Human-Plasma. Blau – UV-Absorption in mAU, Rot – Leitfähigkeit in mS.

Das in Abbildung 3-5 dargestellte Chromatogramm einer DEAE-Chromatographie zeigt einen Vorlaufpeak, der überwiegend IgG enthielt, und einen Nachlaufpeak, in dem sich die übrigen Plasmaproteine und ein Rest des IgG befanden. Die Zusammensetzung des Vorlaufs wurde durch RID-Messungen (Tabelle 3-1) ermittelt.

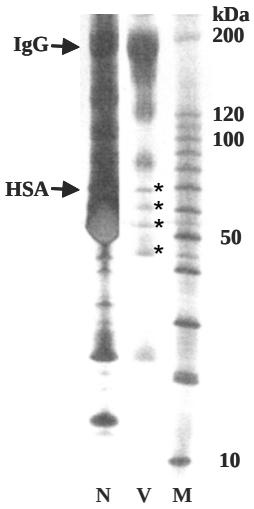


Abbildung 3-6: Nicht-reduzierendes, silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel einer über DEAE gereinigten IgG-Fraktion aus Human-Plasma; N – Nachlauf, V – Vorlauf, M - Marker. Verunreinigungen der IgG-Fraktion sind mit * markiert.

Im nicht-reduzierenden SDS-PAGE-Gel bestätigen sich die oben dargelegten Aussagen. Das Humane Serumalbumin (HSA) befand sich fast ausschließlich im Nachlauf (N),

wogegen der Vorlauf (V) den überwiegenden Teil des IgG enthielt. Dieses deckt sich mit den Ergebnissen der RID-Messungen (Tabelle 3-1).
Die Verwendung zweier unterschiedlicher DEAE-Materialien im Verlauf der Arbeit ergab, dass die Bindungseigenschaften der verschiedenen Materialien bezüglich der IgG-Subklassen unter gleichen Bedingungen unterschiedlich waren. Während der Arbeit zeigte sich, dass IgG4 deutlich besser an DEAE-Sepharose als an vergleichbares Cellulose-Material band. Der mittels einer relativen Quantifizierung (Kapitel 3.6) der IgG-Subklassen bestimmte IgG4-Anteil am gesamten IgG betrug für DEAE-Cellulose gereinigte Fraktionen durchschnittlich 4 %. Bei Reinigung über DEAE-Sepharose konnte der IgG4-Anteil aufgrund der zu geringen Empfindlichkeit der Messmethode hingegen kaum bestimmt werden (Mittelwert: 0,3 % - Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2: IgG4-Gehalt von IgG-Fraktionen, die über verschiedene DEAE-Materialien gereinigt wurden, im Vergleich zum normalen IgG4-Anteil in Human-Plasma. Der IgG4-Anteilwurde mittels relativer Quantifizierung (LC/ESI-MS) bestimmt. Der IgG4-Anteil wurde für die Reinigung von IgG mit DEAE-Sepharose aus 13 und mit DEAE-Cellulose aus 9 Individualproben gemittelt.

Material	IgG4-Anteil [%]	± VK [%]
DEAE-Sepharose	0,4	0,1
DEAE-Cellulose	4,3	1,2
Normalwert	3,0	

Der mittlere IgG4-Anteil am gesamten IgG wird von der *World Health Organization* mit 3,0 % angegeben. Im Vergleich dazu wird deutlich, dass IgG4 bei Verwendung von DEAE-Sepharose (0,4 %) deutlich abgereichert wurde. Bei der Verwendung von DEAE-Cellulose (4,3 %) wurde IgG4 dagegen kaum zurückgehalten. Die geringe Stichprobengröße von < 15 Individualproben pro DEAE-Säulenmaterial lässt Abweichungen von diesen Werten zu. Die Tendenz ist aber aussagekräftig.
Die Reinigung des IgG mittels DEAE-Chromatographie wird meist mit einer vorherigen Ammoniumsulfat-Fällung kombiniert[132], was aber im Rahmen dieser Arbeit nicht nötig war, da eine Reinheit von >90 % (SDS-PAGE-Gel) ausreichend war.
Die unterschiedliche Bindungsaffinität von IgG4 zu den Trägermaterialien DEAE-Cellulose und DEAE-Sepharose ist von Interesse, weil in den älteren Arbeiten vornehmlich DEAE-Cellulose zur IgG-Reinigung verwendet wurde[127,128,132], wogegen in neueren Arbeiten oft DEAE-Sepharose[133-135] eingesetzt wird. Des Weiteren wird die DEAE-Chromatographie auch als Reinigungsschritt zur Virusinaktivierung bei der Herstellung von IVIG-Präparationen verwendet[136]. Dies könnte zu einem geringeren IgG4-Gehalt in IVIG-Präparationen im Vergleich zur normalen IgG4-Konzentration im Human-Plasma führen, wie er in einigen IVIG-Präparationen bereits beobachtet wurde[137].

3.1.2 Isolierung von IgG3 aus Human-Plasma durch kombinierte Protein A- / Protein G-Chromatographie

Um IgG3 mit der kombinierten Protein A/ Protein G-Chromatographie ohne Verunreinigungen mit den übrigen Subklassen zu erhalten, wurde im Gegensatz zur vorher beschriebenen Protein A-Chromatographie ein 200 mM NaCl enthaltender 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,5) verwendet. Akerstrom et al. zeigten, dass bei diesem pH-Wert die Bindungsaffinität von IgG zu Protein G am höchsten ist[22]. Gleichzeitig wurde die durch den Fc-Teil vermittelte Bindung von IgG1, IgG2 und IgG4 zu Protein A durch Zugabe von 200 mM NaCl erhöht, während der alternative Bindungsmechanismus über den Fab-Teil unterdrückt wurde.

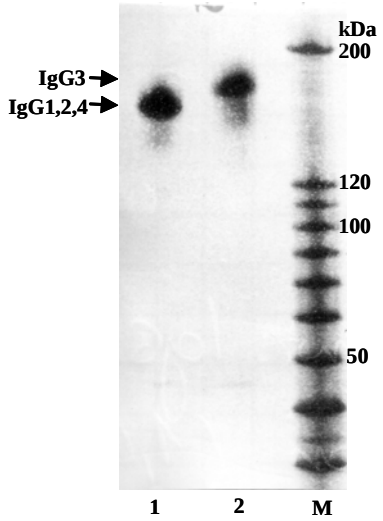


Abbildung 3-7: Nicht-reduzierendes, silbergefärbte SDS-PAGE-Gradientengel (4-15 %) von über eine kombinierte Protein A-/ Protein G-Chromatographie gereinigtem IgG3 aus Human-Plasma; 1 – Nachlauf der Protein A- , 2 – Nachlauf der Protein G-Chromatographie, M – Proteinmarker.

Unter den gewählten Bedingungen wurde eine homogene IgG3-Fraktion erhalten, in der auf einem nicht-reduzierenden SDS-PAGE-Gel keine Verunreinigungen durch die übrigen Subklassen erkennbar waren.

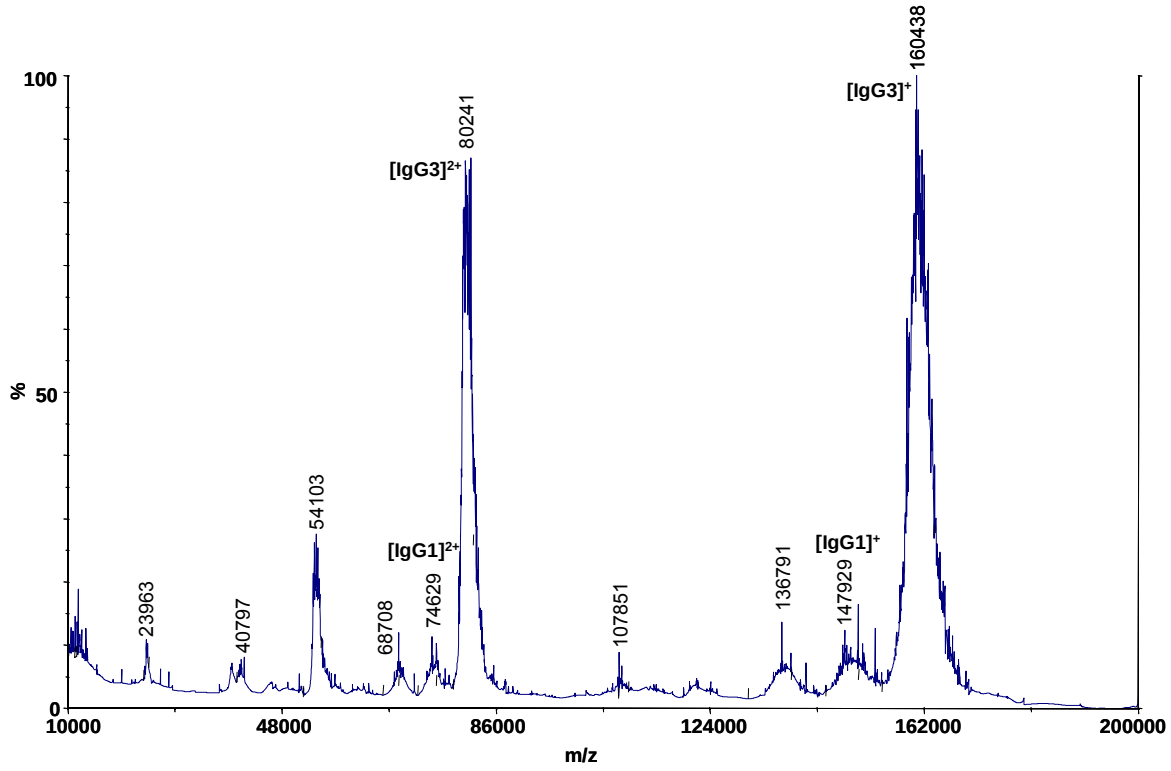


Abbildung 3-8: MALDI-MS-Spektrum (Voyager DE) von über Protein G gereinigtem IgG3 aus Human-Plasma. Es wurde ein m/z-Bereich zwischen 40000 und 135000 mit den Proteinen Enolase und Bovine Serum Albumin kalibriert. Der mittlere Fehler der Kalibrierung betrug ± 0,1 %. Das Ausschlussmolekulargewicht lag bei 10 kDa.

Ein exaktes Molekulargewicht von IgG3 wurde mittels MALDI-MS (Abbildung 3-8) ermittelt. Neben den Molekülionen des IgG3 ist noch eine IgG1-Verunreinigung erkennbar, die durch die RID-Messungen (Tabelle 3-1 – IgG1-Anteil 9 %) bestätigt wurde. Die weiteren Peaks können entsprechend der Abbildung 3-4 Fragmenten zugeordnet werden. Das Molekulargewicht des IgG3 wurde aus dem $[IgG3]^{2+}$-Ion mit **160 kDa** bestimmt. Dieses entspricht innerhalb des Messfehlers (± 0,1 %) nicht den Literaturdaten. Dort sind verschiedene Angaben zum Molekulargewicht von IgG3 zu finden. Wurde das Molekulargewicht von IgG3 in früheren Publikationen mit 175 kDa angegeben, ist dieser Wert in neueren Veröffentlichungen auf 170 kDa korrigiert worden[28].

Dieses Molekulargewicht ist im Vergleich zu den gemessenen Daten noch immer ~ 10 kDa schwerer. Bedenkt man, dass der einzige relevante Unterschied von IgG3 zu den anderen Subklassen in der um ~ 50 Aminosäuren längeren *hinge*-Region besteht, so lässt sich daraus ein theoretischer Unterschied des Molekulargewichts berechnen. Ausgehend von durchschnittlich 110 Da pro Aminosäure und den 50 zusätzlichen Aminosäuren in der *hinge*-Region von IgG3, sollte das Molekulargewicht um 5,5 kDa pro schwerer Kette bzw. um 11 kDa für das intakte IgG3-Molekül größer sein als das der anderen Subklassen. Unter Berücksichtigung des gemessenen Molekulargewichts für IgG1 von 148 kDa stimmt somit das gemessene Molekulargewicht von IgG3 (160 kDa) innerhalb des Messfehlers (± 0,1 %) mit dem theoretisch berechneten (159 kDa) überein.

3.1.3 Isolierung von IgG2 und Darstellung von Fcγ1-Fragment aus Human-Plasma

- **Papainspaltung von humanem IgG1**

Um die Fc-Fragmente massenspektrometrisch untersuchen zu können (s Kapitel 3.9.3), mussten nicht nur Bedingungen für eine selektive, sondern auch für eine homoge Papainspaltung von IgG1 gefunden werden. Nach Optimierung der Papainkonzentration und der Spaltdauer wurde dieses mit 0,6 % (w/w) Papain für 4 h bei 37 °C ohne vorherige Cysteinaktivierung erreicht. Die Spaltdauer konnte zwar durch Aktivierung von Papain mit 10 mM Cystein nach Bennet et al.[71] reduziert werden, führte allerdings auch zu weiteren Fragmenten. Die Verwendung anderer Proteasen, wie Pepsin oder Trypsin führte nicht zu einheitlichen Spaltprodukten.

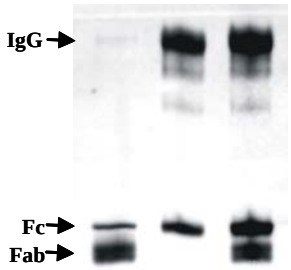


Abbildung 3-9: Nicht-reduzierendes, silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel der Protein A-Chromatographie zur Trennung von Fc-Fragment vom Fab-Fragment; 1 – Vorlauf der Protein A-Chromatographie, 2 – Nachlauf der folgenden Protein A-Chromatographie, 3 – Reaktionsprodukt des Papainverdaus.

Das nicht-reduzierende SDS-PAGE-Gel (Abbildung 3-9) zeigt, dass ein Anteil von IgG bei Verwendung obiger Spaltbedingungen in zwei Fragmente gespalten wurde (Spur 3). Neben diesen Fragmenten, bei denen es sich nach weiteren Untersuchungen um Fc- und Fab-Fragment von IgG1 handelte, sind keine Banden weiterer Fragmente zu erkennen. Durch die anschließende Protein A-Chromatographie konnte das Fab- vom Fc-Fragment und dem nichtgepaltenen IgG getrennt werden (Spur 2 und 1). Ein Teil des Fc-Fragments bindet aber nicht an Protein A, wodurch eine dem Fc-Fragment entsprechende Bande im Vorlauf (Spur 1) erkennbar war.

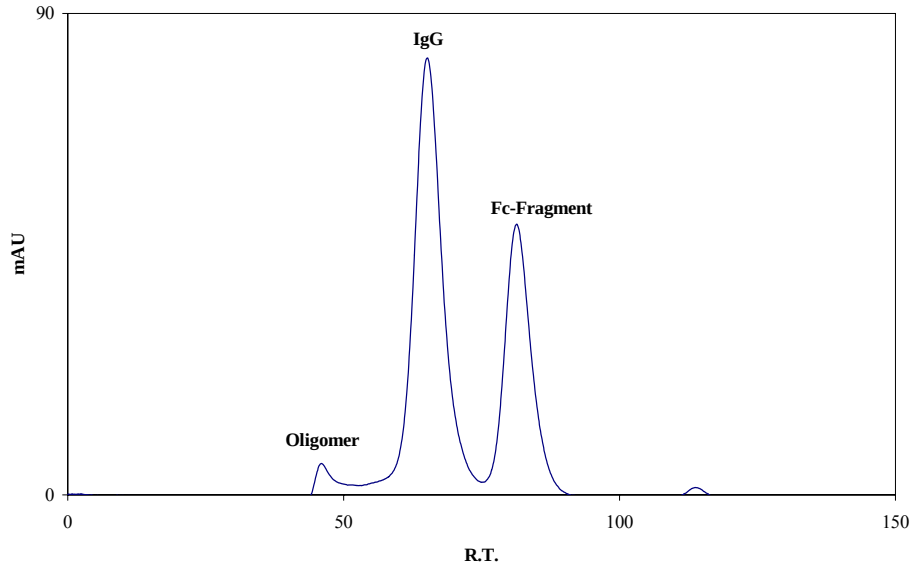


Abbildung 3-10: Chromatogramm der Gelpermeationschromatographie des mit Papain verdauten humanen IgG; blau – UV-Absorption in mAU.

Das Fc-Fragment wurde von ungespaltenem IgG mittels GPC getrennt (Abbildung 3-10). Das Chromatogramm zeigt außerdem noch einen geringen Oligomeranteil, der auch auf dem nicht-reduzierenden SDS-PAGE-Gel (Abbildung 3-11) zu erkennen ist.

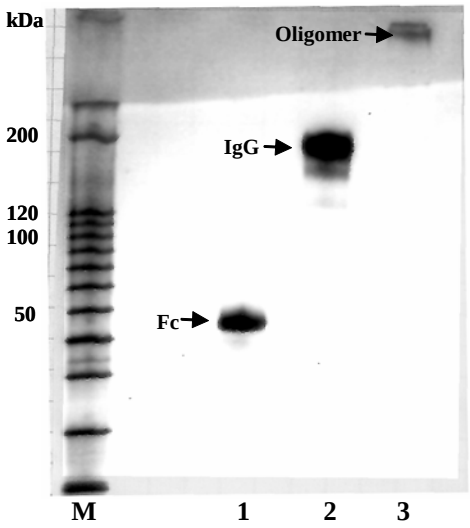


Abbildung 3-11: Nicht-reduzierendes, silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel des mit Papain verdauten humanen IgG ; 1 – Fraktion des Fc-Fragments, 2 – IgG-Fraktion der GPC, 3 – Oligomer-Fraktion der GPC, M - Markerspur.

Das nicht-reduzierende SDS-PAGE-Gel belegte, dass das Fc-Fragment (Spur 1) vom ungespaltenen IgG (Spur 2) getrennt wurde.
Die RID-Messungen (Tabelle 3-1) von ungespaltenem IgG und vom Fc-Fragment zeigten, dass es sich um IgG2-angereichertes IgG und das Fcγ1-Fragment handelt. Die MALDI-MS-Messung von IgG2 ergab ein Molekulargewicht von **148 kDa.** Dies entspricht dem von IgG1 und stimmt mit der Theorie überein, da IgG2 ein nur um drei Aminosäuren kürzere *hinge*-Region im Vergleich zu IgG1 besitzt.

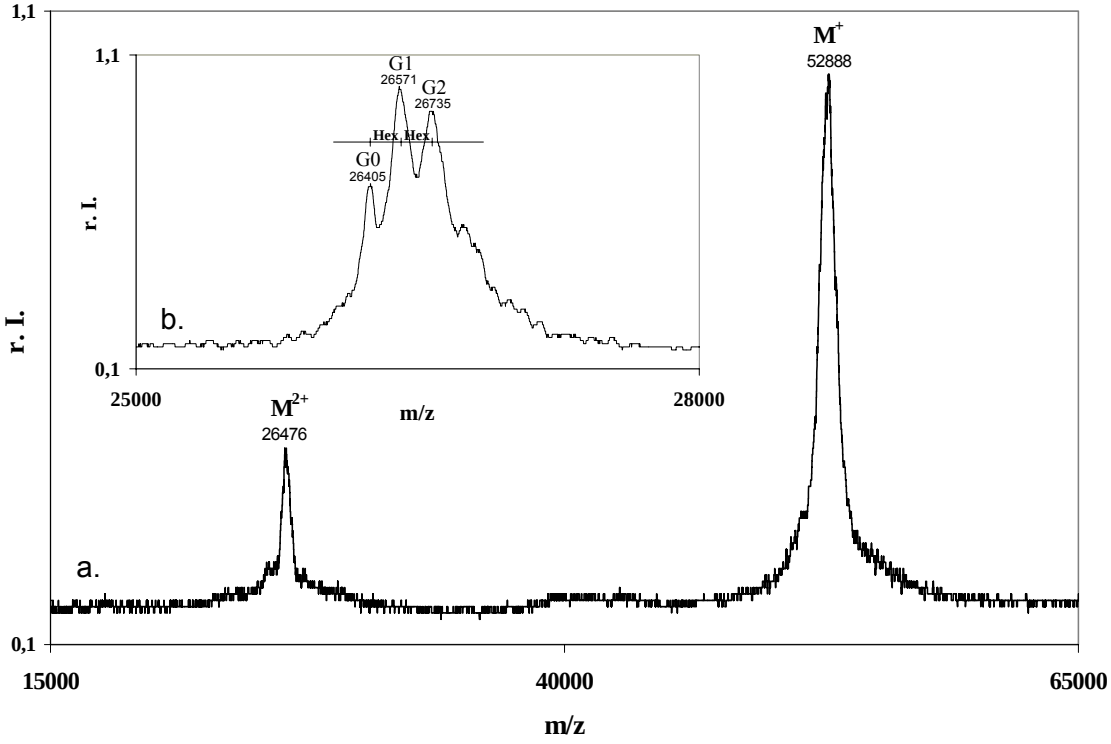


Abbildung 3-12: MALDI-MS-Spektrum des gereinigten Fcγ1-Fragments aus Human-Plasma; **a** – Intaktes Fc-Fragment, **b** – Reduziertes Fc-Fragment (Spektrenausschnitt). Es wurde ein m/z-Bereich zwischen 20000 und 70000 mit den Proteinen Trypsinogen, Enolase und Bovine Serum Albumin kalibriert. Der mittlere Fehler der Kalibrierung betrug ± 180 ppm. Das Ausschlussmolekulargewicht lag bei 10 kDa.

Das MALDI-Spektrum (Abbildung 3-12) von Fcγ1-Fragment bestätigt die Ergebnisse der SDS-PAGE. Es sind keine Verunreinigungen zu erkennen. Der Spektrenausschnitt vom reduzierten Fc-Fragment zeigt die Mikroheterogenität der Fraktion, obwohl die Auflösung nicht ausreicht eine genaue Molekulargewichtsbestimmung durchzuführen. Der Fehler der Kalibrierung betrug < 200 ppm. Die Zuordnung der Peaks des reduzierten Fc-Fragments erfolgte in Übereinstimmung mit den ESI-MS-Ergebnissen (Abbildung 3-55). G0 entspricht dem nichtgalaktosylierten Fc-Fragment des G1m(f-a-x)-Allotypen, der ein theoretisches Molekulargewicht von 26416 Da besitzt. G1 und G2 entsprechen den einfach und zweifach galaktosylierten Glykospezies des Fcγ1-Fragments. Mit einer Abweichung von 12 Da (G0) liegt der Fehler bei 450 ppm und somit oberhalb des Messfehlers.
Weitere Glykospezies und Allotypen von IgG1 waren aufgrund der komplexen Bandenmuster im IEF- und nativen PAGE-Gel von Fcγ1-Fragment zu erwarten. Die mikroheterogene Struktur des Fcγ1-Fragments konnte mit MALDI-MS somit nicht aufgelöst werden.

3.1.4 Isolierung von IgG4 und Darstellung von Fcγ4-Fragment aus Human-Plasma

- **Anreicherung von IgG4**

Im Verlauf dieser Arbeit wurde festgestellt, dass besonders die Subklasse IgG4 stark an den schwachen Anionenaustauscher DEAE-Sepharose bindet (Kapitel 3.1.1 – DEAE-Reinigung von IgG). Daher wurde unter Verwendung von DEAE-Sepharose ein optimiertes Protokoll entwickelt, um eine maximale Anreicherung des IgG4 gegenüber den anderen Subklassen zu erreichen. Nach Variation der Puffer- und Salzkonzentration sowie des pH-Wertes wurde mit einem salzfreien 20 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0) eine Anreicherung des IgG4 auf bis zu 30 % erreicht (Tabelle 3-1). Eine Anreicherung auf > 50 % (Tabelle 3-1) wurde durch eine selektive Spaltung von IgG1-Verunreinigung entsprechend der Darstellung von Fcγ1-Fragment erzielt. Die Fc- und Fab-Fragmente wurden mittels GPC von der IgG4-reichen Fraktion getrennt.
Die Molekulargewichtsbestimmung mit MALDI-MS der IgG4-reichen Fraktion ergab ein Molekulargewicht von **148 kDa**. Da IgG4 (59 %) hier neben IgG1 und IgG2 (40 %) den größten prozentualen Anteil hatte, kann dieses Molekulargewicht mit dem von IgG4 gleichgesetzt werden. Eine Differenzierung der polyklonalen IgG-Subklassen 1, 2 und 4 mittels MALDI-MS war nicht möglich, aufgrund der geringen Sequenzunterschiede aber auch nicht zu erwarten.

- **Darstellung des Fcγ4-Fragments**

Der Verdau von IgG4 mit 0,1 % (w/w) aktiviertem Papain führte unter Anwesenheit von 1 mM Cystein bei 37 °C für 4 h zu einer homogen Spaltung in Fc- und Fab-Fragmente. Höhere Papain- und/oder Cysteinkonzentrationen oder eine längere Spaltdauer führten immer zur Bildung zusätzlicher Fragmente. Gleiches galt auch für Spaltbedingungen, die zur Darstellung des Fcγ4-Fragments aus monoklonalem Myeloma-IgG4 formuliert wurden. Diese waren nicht auf die Spaltung von polyklonalen IgG4 übertragbar.
Die gewählten milden Spaltbedingungen verhinderten zudem eine Spaltung von IgG2, für dessen Reduktion der Disulfidbrücken zwischen den schweren Ketten höhere Thiolkonzentrationen benötigt werden.

Das in Abbildung 3-13 dargestellte nicht-reduzierende SDS-PAGE-Gel zeigt, dass mit oben genannten Spaltbedingungen eine homogene Fragmentbildung erreicht wird. Nach Abtrennung der Fab-Fragmente von IgG1 und IgG4 mittels Protein A ist neben einer Bande des ungespaltenen IgG nur eine Bande auf der Höhe des Fc-Fragments erkennbar. Weitere Banden die bei höheren Konzentrationen sichtbar wurden, entsprechen den typischen IgG-Fragmenten (Kapitel 3.1.1). Der in Spur 4 erkennbare Fab-Anteil konnte mittels Protein A-Chromatographie abgetrennt werden.

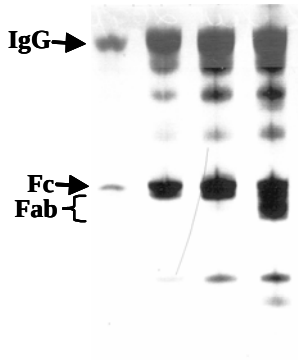


Abbildung 3-13: Nicht-reduzierendes, silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel der Protein A-Chromatographie zur Trennung von Fcγ4-Fragment vom Fab-Fragment; 1 - 3 – Nachlauf der Protein A-Chromatographie von 4 (2 – 0,01 mg/ml, 3 – 0,05 mg/ml, 4 – 0,1 mg/ml), 4 – IgG4-reiche Probe nach Papainspaltung.

Die Fc-Fragmente wurden mittels GPC entsprechend der Darstellung des Fcγ1-Fragments (Abbildung 3-10) vom ungespaltenen IgG getrennt. Dass es sich bei den Fc-Fragmenten um ein Gemisch der Subklassen IgG1 und IgG4 handelte, zeigten die RID-Messungen (Tabelle 3-1).

Teil I – Sequenzvariabilität von IgG

3.2 Entwicklung einer Gesamtstrategie zur Detektion und Quantifizierung von Immunglobulinen mittels LC/ESI-MS/MS

3.2.1 Erstellung einer Sequenzdatenbank für humane Immunglobuline (Ig-DB) und Entwicklung eines Programms (IgPep) für die Identifizierung von Markerpeptiden

Das Auffinden **spezifischer Markerpeptide** ist für die Detektion und Quantifizierung von Immunglobulinen mittels Massenspektrometrie von zentraler Bedeutung. Peptide, die beim proteolytischen Verdau unterschiedlicher Immunglobuline entstehen, können spezifisch für bestimmte Ig-Isotypen, wie z.B. IgA1, IgG4, oder für einzelne Allotypen eines Isotyps sein, wie z.B. für den hG11-Allotypen des IgG1 oder hG42- des IgG4 (AM-Nomenklatur). Im Folgenden wird daher zwischen zwei Arten von Markerpeptiden unterschieden:

- **Isotypische Markerpeptide**
- **Allotypische bzw. isoallotypische Markerpeptide**

Ist ein Peptidmarker für einen Isotyp spezifisch, muss er in allen Allotypen dieses Isotyps vorkommen. Er darf aber nicht gleichzeitig Bestandteil nur eines weiteren Allotypen eines anderen Isotyps sein. Das Problem, welches bei der Identifikation solcher Marker auftritt, ergibt sich aus der Diversität der Immunglobuline in Verbindung mit Sequenzhomologien der Ig-Subklassen von mehr als 90 % (Abbildung 3-14). Die etwas geringere Sequenzhomologie des IgG3 zu den übrigen Subklassen (79 - 84 %) des IgG lässt sich mit einer verlängerten *hinge*-Region erklären (Abbildung 3-16), die durch ein sich wiederholendes Sequenzmotiv gebildet wird.

	IgA1	**IgA2**	**IgM**	**IgG1**	**IgG3**	**IgG4**	**IgG2**	**IgE**	**IgD**
IgA1	**----**	**92.1**	37.5	30.8	30.4	31.1	31.0	26.9	28.9
IgA2	**91.2**	**----**	36.2	31.4	29.4	31.3	31.2	25.8	28.4
IgM	28.3	27.9	----	29.5	31.4	29.3	29.7	31.5	28.5
IgG1	22.7	23.0	19.4	**----**	**84.1**	**92.7**	**93.1**	32.9	26.8
IgG3	22.7	21.7	21.4	**82.0**	**----**	**81.2**	**81.4**	35.7	28.7
IgG4	22.6	22.6	19.7	**90.6**	**79.3**	**----**	**93.3**	32.9	26.0
IgG2	22.8	22.7	20.5	**90.3**	**79.8**	**92.1**	**----**	34.0	26.8
IgE	20.3	20.0	21.7	24.2	26.1	24.0	24.5	----	26.5
IgD	22.5	21.7	18.3	19.3	20.0	19.3	19.8	18.7	----

Abbildung 3-14: Prozentuale Sequenzidentitäten der einzelnen Ig-Isotypen untereinander. Die Subklassen einer Klasse sind hervorgehoben. Die Werte basieren auf dem mit ClustalW erstellten multiplen Sequenzalignment (Abbildung 3-16) und wurden mit dem Programm Boxshade berechnet.

Neben den Ig-Isotypen tragen die Allotypen ebenfalls zur Diversität der Ig bei. Das Kriterium der Spezifität ist deshalb nur für wenige Peptide eines proteolytischen Verdaus gegeben. Im Besonderen gilt dieses, neben IgA, für humanes IgG, welches sich in vier weitere Subklassen unterteilt. Die Unterschiede in den konstanten Bereichen der Subklassen sind

demnach nur durch wenige Sequenzunterschiede definiert. Allotypen eines Isotyps unterscheiden sich häufig nur durch den Austausch einzelner Aminosäuren voneinander.
Als Grundlage für das Auffinden von Markerpeptiden wurde eine Sequenzdatenbank (Ig-DB) erstellt, die alle bekannten Ig-Sequenzen vereint (Kapitel 2.6). Eine Zusammenfassung der 54 in der Ig-DB enthaltenen Sequenzen ist in Tabelle 3-3 dargestellt. Die Aminosäuresequenzen verschiedener Iso- und Allotypen stammen aus der IMGT- und der SWISSPROT-Datenbank und wurden mit den Erkenntnissen aus dem serologischen Gm-System vereint.

Tabelle 3-3: Zusammenfassung der in der Ig-DB enthaltenen Immunglobulinsequenzen. Die Anzahl der in der Ig-DB enthaltenen Sequenzen ist kein Summenparameter, da die Sequenzen in den verschiedenen Datenbanken übereinstimmen können.

Isotyp	IgA1	IgA2	IgM	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgE	IgD
SWISSPROT	4	2	4	2	3	3	1	2	1
IMGT	1	3	3	3	5	19	3	3	2
Gm-System	0	2	0	4	2	6	2	2	0
Ig-DB	**4**	**3**	**7**	**4**	**5**	**22**	**3**	**4**	**2**

Ist die Anzahl der enthaltenen Sequenzen einer Ig-Klasse auf den ersten Blick noch überschaubar, erweist sich das Muster auf Peptidebene als zu komplex, um manuell effektiv Markerpeptide identifizieren zu können. So führt der tryptische Verdau des konstanten Bereichs eines Ig-Allotypen durchschnittlich zu **39** verschiedenen Peptiden, von denen jedes durch Vergleich gegen alle anderen Allotypen der gleichen Ig-Klasse auf seine Spezifität hin überprüft werden muss. Bei einem tryptischen Verdau entsteht so ein System von **1248** Peptiden für humanes Ig. Es ist durchaus möglich, dass ein geeigneter Peptidmarker bei Verwendung von Trypsin nicht gefunden wird, so dass die Suche nach Markerpeptiden mit weiteren Proteasen notwendig wird. Durch die Einbeziehung von sieben kommerziell erhältlichen und spezifisch spaltenden Endoproteasen erhöht sich die Gesamtzahl der Peptide auf **8736**. Dies war der Grund für die Entwicklung des Programms IgPep, welches aus der Ig-DB unter Spezifizierung einer Endoprotease eine nicht-redundante Peptiddatenbank erstellt. In der Peptiddatenbank können Markerpeptide für einen Ig-Isotypen oder -Allotypen schnell identifiziert werden.

3.2.2 Darstellung der Gesamtstrategie

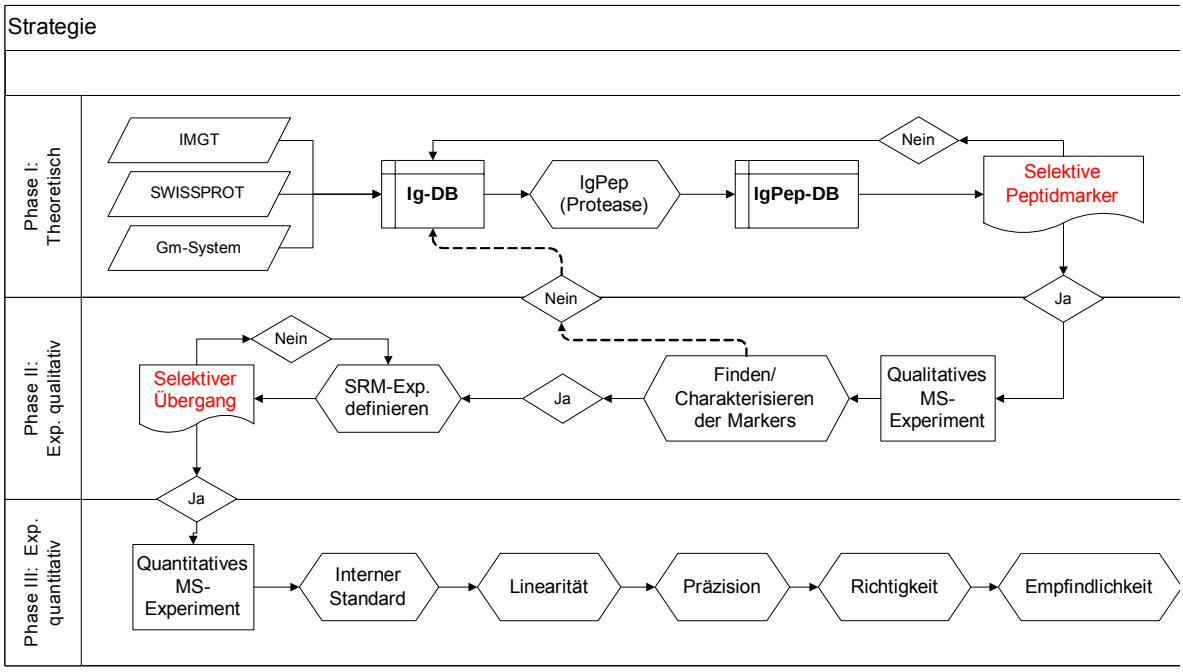


Abbildung 3-15: Schematischer Ablauf zur Identifizierung bis hin zur Quantifizierung spezifischer Markerpeptide. Schlüsselpunkte sind rot markiert.

Zur Überprüfung geeigneter Markerpeptide für die Massenspektrometrie wurde eine Strategie bis hin zur Quantifizierung der Ig entwickelt. Diese unterteilt sich in drei Phasen (Abbildung 3-15). In der theoretischen Phase werden potentielle isotypische und allotypische Markerpeptide, die dem Spezifitätskriterium entsprechen mit Hilfe des Programms IgPep identifiziert. Diese werden in der experimentell-qualtitativen Phase mit Hilfe eines LC/MS-Experimentes nachgewiesen und charakterisiert. Ausgehend von den MS/MS-Spektren der Peptide werden dann massenspektrometrische Übergänge von den Vorläuferionen auf die Fragmentionen (*Single Reaction Monitoring* (SRM)-Experiment) definiert und auf ihre Selektivität für das Markerpeptid im Totalverdau von Human-Plasma überprüft. Die selektiven Übergänge einzelner Markerpeptide werden in der letzten Phase für die Quantifizierung einzelner Ig verwendet.

- **Theoretische Phase**

Den Kern der ersten Phase bildet das IgPep-Programm (Kapitel 2.6). Dieses ermöglicht die Identifizierung von Markerpeptiden unter Berücksichtigung der zuvor erstellten Ig-DB und dem Verdau mit verschiedenen Proteasen. Bei der Auswahl der Markerpeptide wurden folgende Kriterien berücksichtigt:

- Hydrophobizität der Peptide

Die LC-Kompatibilität wird über eine mit dem Programm GPMAW berechnete theoretische HPLC-Retentionszeit (R.T.) definiert, die sich additiv aus den Hydrophobizitätswerten der einzelnen Aminosäuren eines Peptids ergibt. Im Laufe der Arbeit zeigte sich, dass nur Peptide mit R.T.-Werten zwischen 10 und 30 chromatographisch geeignet waren. Peptide

mit einem R.T.-Wert kleiner als 10 banden unter den definierten LC-Bedingungen nicht an das C_{18}-Material und eluierten zeitgleich mit Salzen und Detergenzien. Dadurch wurde ihr Signal deutlich oder sogar vollständig im Massenspektrometer unterdrückt. Peptide mit einem R.T.-Wert größer als 30 eluierten dagegen zusammen mit Proteinfragmenten, wodurch sich ihr Signal/Rausch-Verhältnis deutlich verschlechterte.

- Peptidlänge

Peptide mit einer Länge unter acht Aminosäuren waren wenig charakteristisch im MS/MS, da diese meist nur wenige, einfach geladene Fragmentionen bilden.

- Posttranslationale Modifikationen

Glykopeptide sind aufgrund ihrer Mikroheterogenität nicht ohne Deglykosylierung für die Quantifizierung geeignet.

- Reaktive Aminosäuren (Met, Cys, Trp, Asn, Gln) im Peptid

Die Aminosäuren Cystein, Tryptophan, Methionin, Glutamin und Asparagin werden als reaktiv eingestuft. Oxidationsprozesse wurden bei den schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin beobachtet. Glutamin und Asparagin hingegen waren aufgrund ihrer Fähigkeit zur Deamidierung von Nachteil. Die reaktiven Aminosäuren konnten aber nicht vollständig bei der Auswahl der Markerpeptide vermieden werden, weil oftmals keine spezifischen Markerpeptide ohne reaktive Aminosäuren vorhanden waren.

- **Qualitativ-experimentelle Phase**

In dieser Phase werden die theoretisch vorhergesagten Markerpeptide experimentell bestätigt und hochwertige MS/MS-Spektren der Peptide erzeugt, um geeignete Übergänge für qualitative und quantitative SRM-Experiment zu definieren. Ist es nicht möglich ein Markerpeptid zu identifizieren oder selektive SRM-Übergänge zu finden, muss wieder in die theoretische Phase zurückgekehrt werden, um alternative Marker zu finden.

- **Quantitativ-experimentelle Phase**

Nachdem ein selektiver Übergang für ein Markerpeptid gefunden ist, wird nach einem geeigneten internen Standard gesucht. Zusammen mit diesem können dann die verschiedenen Kriterien, die eine Quantifizierung erfordert, überprüft werden. Linearität, Richtigkeit und Präzision sind hier die wichtigsten Kriterien.

- PHASE I -

3.3 Identifizierung potentieller Markerpeptide für humanes IgG und dessen Allotypen

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der theoretischen Phase (Abbildung 3-15) für das humane IgG dargestellt. Die Ergebnisse zur Identifizierung von Markerpeptiden anderer Isotypen finden sich im Anhang (Kapitel 6.1).

```
IgG2     1 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
IgG4     1 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
IgG1     1 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
IgG3     1 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSEVHTFPAVLQSS

IgG2    61 GLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVER------------------
IgG4    61 GLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES------------------
IgG1    61 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE------------------
IgG3    61 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSC

IgG2   101 ------------------------------KCVKECPPCPAPPVAG-PSVFLFPPKPKDT
IgG4   101 ------------------------------KYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDT
IgG1   100 --------------------------PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
IgG3   121 DTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT

IgG2   130 LMISRTPEVTVKVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVH
IgG4   131 LMISRTPEVTVKVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
IgG1   134 LMISRTPEVTVKVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
IgG3   181 LMISRTPEVTVKVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLH

IgG2   190 QDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
IgG4   191 QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
IgG1   194 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
IgG3   241 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK

IgG2   250 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
IgG4   251 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE
IgG1   254 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
IgG3   301 GFYPSDIAVEWESSGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHE

IgG2   310 ALHNHYTQKSLSLSPG
IgG4   311 ALHNHYTQKSLSLSLG
IgG1   314 ALHNHYTQKSLSLSPG
IgG3   361 ALHNRFTQKSLSLSPG
```

Abbildung 3-16: Multiples Alignment des konstanten Bereichs von humanem IgG basierend auf den Ig-DB-Einträgen hG12 (IgG1), hG22 (IgG2), hG31 (IgG3) und hG41 (IgG4); rot – variante Positionen, die verschiedene Allotypen einer Subklasse definieren; blau – Glykosylierungsstellen.

Die varianten Aminosäurepositionen der einzelnen Subklassen, die verschiedene Allotypen einer Subklasse definieren, sind in Abbildung 3-16 gekennzeichnet. Die Ig-DB enthält, wie in Tabelle 3-3 zusammengefasst, 54 Primärsequenzen, von denen 34 das humane IgG-System mit seinen vier Subklassen und Allotypen beschreiben. Die 34 Sequenzen unterteilen sich in vier Allotypen des IgG1, fünf des IgG2, 22 des IgG3 und drei des IgG4.
Die Suche nach isotypischen Markern für die einzelnen IgG-Subklassen mit Hilfe des IgPep-Programms zeigte, dass die Proteasen GluC und Trypsin geeignete Markerpeptide für alle IgG-Subklassen erzeugen, die dem Spezifitätskriterium entsprechen und massenspektrometrisch zugänglich sind. Diese isotypischen Markerpeptide sind in Tabelle 3-4 zusammengefasst. Sie sind spezifisch für alle Allotypen einer Subklasse und finden sich in keinem Allotypen einer anderen Subklasse wieder.

Tabelle 3-4: Theoretisch mit dem Programm IgPep vorhergesagte **isotypische Markerpeptide für IgG**, die bei Verdau mit den Proteasen Trypsin und GluC für die verschiedenen Subklassen von IgG entstehen. Grundlage waren die IgG-Sequenzen der Ig-DB. Die Markerpeptide G1 – G4 stehen für die Subklassen IgG1 – IgG4. Angegeben sind die monoisotopischen m/z-Verhältnisse.

Marker	Von - Bis	$[M+H]^+$	$[M+2H]^{2+}$	$[M+3H]^{3+}$	R.T.-Wert	Sequenz
Trypsin						
G1	5-16	1187,4	594,2	396,5	18,0	GPSVFPLAPSSK
	158-171	1678,8	839,9	560,3	18,4	FNWYVDGVEVHNAK
G2	206-213	825,0	413,0	275,7	15,6	GLPAPIEK
G3	102-113	1357,5	679,3	453,2	16,3	TPLGDTTHTCPR
G4	207-214	831,0	416,0	277,7	14,9	GLPSSIEK
	225-240	1878,1	939,6	626,7	19,1	EPQVYTLPPSQEEMTK
	320-326	676,8	338,9	226,3	17,7	SLSLSLG
GluC						
G1	156-166	1356,5	678,8	452,9	19,2	VKFNWYVDGVE
G2	198-212	1704,9	853,0	569,0	19,7	YKCKVSNKGLPAPIE
G3	203-213	1370,6	685,8	457,5	20,8	VQFKWYVDGVE
G4	100-113	1549,7	775,4	517,3	21,0	SKYGPPCPSCPAPE
	139-149	1236,4	618,7	412,8	14,7	VTVKVVDVSQE
	199-213	1712,0	856,5	571,3	19,2	YKCKVSNKGLPSSIE
	311-326	1770,0	885,5	590,7	21,2	ALHNHYTQKSLSLSLG

Aufgrund der geringen Anzahl spezifischer, isotypischer Markerpeptide, konnten nicht alle Auswahlkriterien berücksichtigt werden. Nahezu alle Markerpeptide besitzen reaktive Aminosäuren (C, M, W, N und/oder Q). Einzelne tryptische Markerpeptide entsprachen hinsichtlich ihrer Länge nur der definierten Minimallänge (> 8 AS) oder unterschritten diese sogar. Daher wird das GluC-System bevorzugt.

Im Folgenden wird ein, dem serologischen Gm-System äquivalentes, Markersystem basierend auf allotypischen Markerpeptiden vorgestellt. Dazu werden die einzelnen Subklassen nacheinander behandelt. Gm-Faktoren, deren allotypische Epitope bekannt waren, konnten durch allotypische Peptidmarker repräsentiert werden, die das Epitop enthalten. Das Problem der Isoallotypie (Kapitel 1.2.3) einiger Gm-Faktoren konnte durch das Auffinden von Markerpeptiden, die das allotypische Epitop isoallotypischer Gm-Faktoren enthalten, aber keine Spezifität für weitere Subklassen besitzen, überwunden werden.

3.3.1 Potentielle Markerpeptide von IgG1

Es existieren vier Allotypen des IgG1, die mit Hilfe der serologischen G1m-Faktoren G1m(f), G1m(z), G1m(a) und G1m(x) eindeutig beschrieben werden können. Nur die zwei Allotypen G1m(f-a-x) und G1m(za-x) sind bis heute vollständig sequenziert und in der IMGT-Datenbank[138] aufgenommen. Die beiden Allotypen G1m(zax) und G1m(fa-x) sind nur serologisch beschrieben[139]. Die allotypischen Epitope, die von den Gm-Faktoren gebunden werden, sind bekannt[39], so dass eine Übertragung auf entsprechende Markerpeptide möglich war. Die G1m-Faktoren G1m(f) und G1m(z) sind komplementär zueinander und können somit nicht zusammen auftreten[140]. Der Gm-Faktor G1m(–a) ist ein isoallotypischer Marker, der ebenfalls die Subklassen IgG2 und IgG3 bindet[141].

Tabelle 3-5: Theoretisch mit dem Programm IgPep vorhergesagte **allotypische Markerpeptide von IgG1**, die bei Verdau mit den Proteasen GluC und Post-Pro entstehen; die varianten Positionen, die verschiedene Allotypen von IgG1 definieren, sind rot markiert. Grundlage waren die IgG-Sequenzen der Ig-DB. Angegeben sind die monoisotopischen m/z-Verhältnisse.

Marker	Von - Bis	$[M+H]^+$	$[M+2H]^{2+}$	$[M+3H]^{3+}$	R.T.-Wert	Sequenz
GluC						
G1m(x)	314-329	1738,9	870,0	580,3	19,8	**G**LHNHYTQKSLSLSPG
G1m(-x)|2	314-329	1752,9	877,0	585,0	19,6	**A**LHNHYTQKSLSLSPG
G1m(a)	217-240	2725,5	1363,2	909,2	20,9	KTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**D**E
G1m(-a)	217-240	2739,5	1370,2	913,8	21,2	KTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**E**E
Post-Pro						
G1m(z)	90-100	1244,7	622,9	415,6	6,5	SNTKVDK**K**VEP
G1m(f)	90-100	1272,7	636,9	424,9	7,2	SNTKVDK**R**VEP

Die Gm-Faktoren G1m(a), G1m(–a) und G1m(x) können durch allotypische Markerpeptide repräsentiert werden (Tabelle 3-5). Das Markerpeptid G1m(–x) ist isoallotypisch, da es ebenfalls in der Subklasse IgG2 enthalten ist. Serologisch ist bis heute kein vergleichbarer isoallotypischer Gm-Faktor beschrieben worden. Schwierigkeiten beim Auffinden äquivalenter Markerpeptide bereiten die beiden Gm-Faktoren G1m(f) und G1m(z), deren allotypisches Epitop in der C_H1-Domäne lokalisiert ist[140]. Aufgrund fehlender Proteaseschnittstellen in diesem Sequenzbereich ist eine Bildung geeigneter Markerpeptide, die die Variante R/K an Position 214 enthalten, durch Verwendung gängiger Proteasen nicht möglich. Nur die Verwendung der Prolyl-Endoprotease führt zu spezifischen Markerpeptiden. Diese sind aber mit einem R.T.-Wert unter 10 sehr hydrophil und werden daher bei LC-Läufen kaum durch die C_{18}-Phase zurückgehalten.

Von den vier IgG1-Allotypen G1m(f-a-x), G1m(fa-x), G1m(za-x) und G1m(zax) können durch die mit der Protease GluC erzeugten allotypischen Markerpeptide G1m(a), G1m(-a), G1m(x) und G1m(-x) die beiden IgG1-Allotypen G1m(za-x) und G1m(fa-x) nicht voneinander unterschieden werden. Dies gilt auch unter Berücksichtigung der intakten Fc-Fragmente des IgG1, da der Papainschnitt in der *hinge*-Region lokalisiert ist und das Fc-Fragment die C_H1-Domäne somit nicht erfasst. Allerdings findet sich der Allotyp G1m(fa-x) nur in asiatischen Populationen[31] und ist damit für Untersuchungen der europäischen bzw. amerikanischen Population nicht von Bedeutung. Bei Individuen der kaukasischen Population kann daher bei einer Bestimmung des Phänotyps mittels der oben genannten Markerpeptide eindeutig auf

den Genotyp und somit auf die vorhandenen IgG1-Allotypen geschlossen werden (Tabelle 3-6).

Tabelle 3-6: Mögliche Phänotypen von IgG1 in der kaukasischen Population und das damit verbundene Auftreten allotypischer Markerpeptide.

Phänotyp	**Genotyp**		**allotypische Markerpeptide**			
	Haplotyp I	Haplotyp II	a	-a	x	-x
G1m(f-a-x)	G1m(f-a-x)	G1m(f-a-x)		x		x
G1m(fza-a-x)	G1m(f-a-x)	G1m(za-x)	x	x		x
G1m(fza-ax-x)	G1m(f-a-x)	G1m(zax)	x	x	x	x
G1m(za-x)	G1m(za-x)	G1m(za-x)	x			x
G1m(zax-x)	G1m(za-x)	G1m(zax)	**x**		**x**	x
G1m(zax)	G1m(zax)	G1m(zax)	**x**		**x**	

Jeder Genotyp kann durch eine einzigartige Markerkombination beschrieben werden. Die beiden Genotypen G1m(zax):G1m(zax) und G1m(za):G1m(zax) können nur mittels des G1m(-x)-Markers unterschieden werden. Dieser wird im GluC-Markersystem durch das isoallotypische Markerpeptid G1m(-x)|2 repräsentiert, das auch in der Sequenz des IgG2 enthalten ist. Der IgG2-Anteil an der Gesamtpeakfläche des Markers muss daher bei LC/ESI-MS-Experimenten für dessen Verwendung bestimmt werden (Kapitel 3.5.1). Eine Überprüfung der Ergebnisse ist bei Individuen der kaukasischen Population anhand ihrer Fc-Fragmente möglich, weil die drei IgG1-Allotypen G1m(f-a-x), G1m(za-x) und G1m(zax) in dieser Population zu unterschiedlichen Fc-Fragmenten führen.

3.3.2 Potentielle Markerpeptide von IgG2

Im Jahre 2001 zeigten Hougs et al., dass in der kaukasischen Population zwei IgG2-Allotypen vorherrschen[142], die im Folgenden G2m(n) und G2m(-n) genannt werden. Beide unterscheiden sich in den Aminosäurepositionen 68 in der C_H1- und 161 in der C_H2-Domäne. Während der G2m(n)-Allotyp durch die Aminosäuren Threonin und Methionin an diesen Positionen charakterisiert wird, hat der G2m(-n)-Allotyp hier die Aminosäuren Prolin und Valin. Brusco et al. zeigten, dass das allotypische Epitop des G2m(n)-Faktors das Methionin an Position 161 trägt[143]. Bei dem G2m(-n)-Faktor handelt es sich um einen isoallotypischen Faktor, weil durch Austausch des Methionins gegen Valin ein Epitop entsteht, welches ebenfalls in der IgG4-Subklasse enthalten ist. Serologisch kann somit nicht direkt zwischen hetero- G2m(n):G2m(-n) und homozygoten G2m(n):G2m(n) unterschieden werden[144].

Tabelle 3-7: Theoretisch mit dem Programm IgPep vorhergesagte **allotypische Markerpeptide von IgG2**, die bei Verdau mit den Proteasen GluC und Trypsin entstehen; die varianten Positionen, die verschiedene Allotypen von IgG2 definieren, sind rot markiert. Grundlage waren die IgG-Sequenzen der Ig-DB. Angegeben sind die monoisotopischen m/z-Verhältnisse.

Marker	Von - Bis	$[M+H]^{+}$	$[M+2H]^{2+}$	$[M+3H]^{3+}$	R.T.-Wert	Sequenz
GluC						
G2m(n)	152-162	1387,6	694,3	463,2	20,7	VQFNWYVDG**M**E
G2m(-n)|4	152-162	1355,6	678,3	452,6	19,8	VQFNWYVDG**V**E
Trypsin						
G2m(n)	135-167	3830,7	1915,9	1277,6	25,9	TPEVTVKVVDVSHEDPEVQFN WYVDG**M**EVHNAK
G2m(-n)	135-167	3798,8	1899,9	1266,9	25,3	TPEVTVKVVDVSHEDPEVQFN WYVDG**V**EVHNAK

Die Zusammenstellung potentieller Markerpeptide in Tabelle 3-7 zeigt, dass das Problem der Isoallotypie durch einen tryptischen Verdau überwunden werden kann. Das tryptische G2m(-n)-Markerpeptid besitzt keine Spezifität für andere IgG-Subklassen. Allerdings ist es mit einer Länge von 33 Aminosäuren nur eingeschränkt für LC/MS-Experimente geeignet. Das vergleichbare G2m(-n)|4-Markerpeptid eines GluC-Verdaus ist, ebenso wie der G2m(-n)-Faktor, ein isoallotypischer Marker für G2m(-n) und IgG4. Eine Verwendung dieses Markerpeptids ist aber nach der Bestimmung des IgG4-Anteils an der Gesamtpeakfläche im LC/ESI-MS-Experiment des Markpeptids möglich (Kapitel 3.5.1). Dass der durchschnittliche IgG4-Gehalt (0,4 mg/ml) im Serum gesunder Individuen nur 1/10 vom IgG2-Gehalt (4 mg/ml) beträgt, verringert zudem den Fehler des berrechneten G2m(-n)-Peakflächenanteils. Der Flächenanteil des IgG4 an der Gesamtpeakfläche des G2m(-n)|4-Markerpeptids ist im Normalfall nur gering.

Tabelle 3-8: Phänotypen des IgG2 in der kaukasischen Population und das damit verbundene Auftreten allotypischer Markerpeptide.

Phänotyp	**Genotyp**		**Markerpeptid**	
	Haplotyp I	Haplotyp II	n	-n
G2m(n)	G2m(n)	G2m(n)	x	
G2m(n-n)	G2m(n)	G2m(-n)	x	x
G2m(-n)	G2m(-n)	G2m(-n)		x

Aus Tabelle 3-8 ist ersichtlich, dass eine Zuordnung des Genotyps nur mit beiden Markerpeptiden G2m(n) und G2m(–n) möglich ist. Für die Bestimmung des Genotyps und somit der vorhandenen IgG2-Allotypen bei kaukasischen Individuen können die GluC-Markerpeptide G2m(-n)|4 und G2m(n) verwendet werden.

3.3.3 Potentielle Markerpeptide von IgG3

Humanes IgG3 nimmt aufgrund seines hohen Sequenzpolymorphismus eine Sonderrolle innerhalb der IgG ein. Erst 2001 wurde von Dard et al.[145] gezeigt, dass 17 Positionen der IgG3-Sequenz variabel sind. Zehn dieser Positionen werden durch 11 der 13 serologischen G3m-Faktoren erfasst. Aufgrund der Komplexität des IgG3-Polymorphismus wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Markersystem zur Unterscheidung der serologisch

definierten IgG3-Allotypen erstellt. Es wurde aber gezeigt, dass es sich bei diesen serologisch definierten Allotypen vielmehr um Gruppen verschiedener Allotypen handelt, die durch weitere Sequenzunterschiede gekennzeichnet sind. Diese zusätzlichen Variationen betreffen zwar den G3m(b*)-Allotypen, traten aber ausschließlich bei der Studie negroider Populationen auf.

Tabelle 3-9: Theoretisch mit dem Programm IgPep vorhergesagte **allotypische Markerpeptide von IgG3**, die bei Verdau mit der Protease GluC entstehen; die varianten Positionen, die verschiedene Allotypen von IgG3 definieren, sind rot markiert. Grundlage waren die IgG-Sequenzen der Ig-DB. Angegeben sind die monoisotopischen m/z-Verhältnisse.

Marker	Von - Bis	$[M+H]^{+}$	$[M+2H]^{2+}$	$[M+3H]^{3+}$	R.T.-Wert	Sequenz
GluC						
G3m(b1)	361-376	1755,95	878,48	585,99	20,35	ALHNR**F**TQKSLSLSPG
G3m(g5)	361-376	1771,95	886,48	591,32	19,43	ALHNR**Y**TQKSLSLSPG
G3m(g1)	214-224	1324,73	662,87	442,25	9,98	VHNAKTK**LR**EE
G3m(t)	214-224	1338,68	669,84	446,9	13,22	VHNAKTK**PW**EE
G3m(s)	288-310	2633,27	1317,14	878,43	26,27	MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA**M**E
G3m(c3)	319-349	3667,77	1834,39	1223,26	28,6	NNY**K**TTPP**M**LDSDGSFFLYS**K**LT VDKSRWQ**E**
G3m(c3c5)	319-349	3649,76	1825,38	1217,26	27,74	NNY**N**TTPP**V**LDSDGSFFLYS**R**LT VDKSRWQ**E**

Durch Verwendung der Protease GluC wird ein System von allotypischen Markerpeptiden erzeugt, welches dem serologischen System der G3m-Faktoren äquivalent ist (Tabelle 3-9). Mit den Markerpeptiden G3m(g5), G3m(g1), G3m(b1), G3m(s), G3m(t), G3m(c3) und G3m(c3c5) können alle serologisch definierten IgG3-Allotypen beschrieben werden (Tabelle 3-10). Eine Besonderheit bildet dabei der G3m(c3c5) Marker, weil dieses Peptid sowohl das allotypische Epitop des G3m(c3)- als auch das des G3m(c5)-Faktors enthält.

Tabelle 3-10: Übertragung des serologisch definierten G3m-Systems auf ein System allotypischer Markerpeptide. Die IgG3-Allotypen kaukasischer Individuen sind hervorgehoben.

IgG3-Allotypen	**allotypische Markerpeptide**					
	b1	g5	c3	c3c5	s	t
G3m(b*)	**x**					
G3m(g*)		**x**				
G3m(c3*)	x		x			
G3m(c3c5*)	x			x		
G3m(s*)					x	
G3m(st*)					x	x

Das Markerpeptid G3m(b1) ist nicht nur im G3m(b*)-Allotypen, sondern auch in den G3m(c3*)- und G3m(c3c5*)-Allotypen enthalten (Kapitel 1.2.4). Letztere Allotypen haben aber in kaukasischen Populationen keine Bedeutung. Daher können die beiden IgG3-Allotypen G3m(b*) und G3m(g*), ohne die entsprechenden Markerpeptide G3m(c3) und G3m(c3c5) massenspektrometrisch zu charakterisieren, mit den beiden Markerpeptiden G3m(b1) und G3m(g5) unterschieden werden.

3.3.4 Potentielle Markerpeptide von IgG4

Brusco et al. fanden 1998 bei der Untersuchung von 141 kaukasischen Individuen drei IgG4-Allotypen[146]. Serologisch konnten schon früher zwei IgG4-Allotypen mittels der isoallotypischen Faktoren G4m(a) und G4m(b) unterschieden werden. Aufgrund der Isoallotypie (Tabelle 1-4) konnten die Faktoren aber nur in gereinigten IgG4-Proteinen verwendet werden. Die allotypischen Epitope der beiden Faktoren wurden von Brusco et al. den Varianten V/L an Position 309 zugeordnet. Die zweite von Ihnen genannte Variante K/R an Position 409 konnte bis heute nicht serologisch erfasst werden.

Tabelle 3-11: Theoretisch mit dem Programm IgPep vorhergesagte **allotypische Markerpeptide von IgG4**, die bei Verdau mit der Protease GluC entstehen; die varianten Positionen, die verschiedene Allotypen von IgG4 definieren, sind rot und Glykosylierungen blau markiert markiert. Grundlage waren die IgG-Sequenzen der Ig-DB. Angegeben sind die monoisotopischen m/z-Verhältnisse.

Marker	Von - Bis	$[M+H]^+$	$[M+2H]^{2+}$	$[M+3H]^{3+}$	R.T.-Wert	Sequenz
GluC						
G4m(K)	269-299	3635,8	1818,4	1212,6	28,1	NNYKTTPPVLDSDGSFFLYS**K**LTVD KSRWQE
G4m(R)	269-299	3663,8	1832,4	1221,9	28,3	NNYKTTPPVLDSDGSFFLYS**R**LTVD KSRWQE
G4m(L)	175-198	2833,5	1417,2	945,2	25,4	QF**N**STYRVVSVLTV**L**HQDWLNGKE
G4m(V)	175-198	2819,5	1410,2	940,5	24,1	QF**N**STYRVVSVLTV**V**HQDWLNGKE

Im Gegensatz zu den serologischen Gm-Faktoren war es möglich, allotypische Markerpeptide für die beiden IgG4-Varianten zu definieren, so dass die drei auf Nukleinsäureebene beschriebenen IgG4-Allotypen G4m(LR), G4m(VR) und G4m(LK) mit diesem Markersystem auf Proteinebene identifiziert werden können. Nur die Protease GluC erzeugt spezifische Markerpeptide. Da das allotypische Epitop für die beiden G4m(a)- und G4m(b)-Faktoren nicht sicher zugeordnet werden konnte, werden die allotypischen Markerpeptide bis auf weiteres mit G4m(L) und G4m(V) bezeichnet (Tabelle 3-11). Nachteilig wirkt sich die Glykosylierung dieser Markerpeptide an Position 297 aus, die eine Identifizierung erschweren (Kapitel 3.4.5).

Tabelle 3-12: Phänotypen von IgG4 in der kaukasischen Population und das damit verbundene Auftreten allotypischer Markerpeptide.

Phänotyp	**allotypische Markerpeptide**				**IgG4-Allotypen**
	L	V	R	K	
G4m(LR)	x		x		G4m(LR)
G4m(LVR)	x	x	x		G4m(LR),G4m(VR)
G4m(VR)		x	x		G4m(VR)
G4m(LRK)	x		x	x	G4m(LR),G4m(LK)
G4m(LVKR)	x	x	x	x	G4m(VR),G4m(LK)
G4m(LK)	x			x	G4m(LK)

Die möglichen Phänotypen sind in Tabelle 3-12 zusammengefasst. Ein Rückschluss auf den Genotypen eines Individuums ist hier nicht möglich, weil bei vielen Individuen eine Duplikation des IgG4-Gens innerhalb eines Haplotyps vorliegt. Dieses hat zur Folge, dass ein Individuum insgesamt vier IgG4-Gene besitzen kann. Ausgehend von der Markerkompo-

sition ist aber eindeutig feststellbar, welche IgG4-Allotypen im Serum eines Individuums enthalten sind.

3.3.5 Erstellung eines IgG-Profils kaukasischer Individuen (Phänotypisierung)

Das klassische, von Grubb begründete[30], Gm-System konnte in der Theorie vollständig auf ein äquivalentes Markersystem übertragen werden, das anstelle serologischer Reagenzien allotypische Markerpeptide eines proteolytischen Verdaus zur Charakterisierung des humanen IgG verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die praktische Anwendbarkeit dieses Systems durch Phänotypisierung kaukasischer Individuen belegt werden. In Tabelle 1-7 wurden die fünf Haplotypen Gm(f;n;b), Gm(f;-n;b), Gm(za;-n;g), Gm(zax;-n;g) und Gm(za;-n;b), mit denen ~99 % der kaukasischen Individuen beschrieben werden können[31], bereits vorgestellt.

Tabelle 3-13: Theoretisch mögliche Phänotypen bei Kaukasiern, die durch Kombination der Haplotypen dieser Population entstehen können. Die Subklasse IgG4 wurde nicht berücksichtigt.

Phänotyp	**Genotyp**		**G1m**				**G2m**		**G3m**	
	Haplotyp I	Haplotyp II	a	-a	x	-x	n	-n	b1	g5
Gm(f-a-x;n;b)	Gm(f-a-x;n;b)	Gm(f-a-x;n;b)		x		x	x		x	
Gm(f-a-x;n-n;b)	Gm(f-a-x;n;b)	Gm(f-a-x;-n;b)		x		x	x	x	x	
Gm(fza-a-x;n-n;bg)	Gm(f-a-x;n;b)	Gm(za-x;-n;g)	x	x		x	x	x	x	x
Gm(f-a-x;-n;b)	Gm(f-a-x;-n;b)	Gm(f-a-x;-n;b)		x		x		x	x	
Gm(fza-a-x;-n;bg)	Gm(f-a-x;-n;b)	Gm(za-x;-n;g)	x	x		x		x	x	x
Gm(fza-ax-x;n-n;bg)	Gm(f-a-x;n;b)	Gm(zax;-n;g)	x	x	x	x	x	x	x	x
Gm(za;-n;g)	Gm(za-x;-n;g)	Gm(za-x;-n;g)	x			x		x		x
Gm(fza-ax-x;-n;bg)	Gm(f-a-x;-n;b)	Gm(zax;-n;g)	x	x	x	x		x	x	x
Gm(zax-x;-n;g)	Gm(za-x;-n;g)	Gm(zax;-n;g)	x		x	x		x		x
Gm(zax;-n;g)	Gm(zax;-n;g)	Gm(zax;-n;g)	x		x			x		x
Gm(fza-a-x;n-n;b)	Gm(f-a-x;n;b)	Gm(za-x;-n;b)	x	x		x		x	x	
Gm(fza-a-x;-n;b)	Gm(f-a-x;-n;b)	Gm(za-x;-n;b)	x	x		x		x	x	x
Gm(za-x;-n;bg)	Gm(za-x;-n;b)	Gm(za-x;-n;g)	x			x		x	x	x
Gm(zax-x;-n;bg)	Gm(zax;-n;g)	Gm(za-x;-n;b)	x		x	x		x	x	x
Gm(za-x;-n;b)	Gm(za-x;-n;b)	Gm(za-x;-n;b)	x			x		x	x	

Durch Kombination der Haplotypen im Genotyp sind somit die in Tabelle 3-13 dargestellten Phänotypen denkbar. Hierbei wurde die IgG4-Subklasse vorerst nicht berücksichtigt, da diese bisher in Populationsstudien aufgrund fehlender spezifischer, serologischer G4m-Faktoren nicht typisiert wurde. Der Genotyp von kaukasischen Individuen kann mit den allotypischen Markerpeptiden (Tabelle 3-14) eindeutig bestimmt werden, da alle Genotypen durch eine einzigartige Markerkombination repräsentiert werden.

Tabelle 3-14: Theoretisch mit dem Programm IgPep vorhergesagte **allotypische Markerpeptide von IgG**, die bei Verdau mit der Protease GluC entstehen; die varianten Positionen, die verschiedene Allotypen von IgG definieren, sind rot und Glykosylierungen blau markiert markiert. Grundlage waren die IgG-Sequenzen der Ig-DB. Angegeben sind die monoisotopischen m/z-Verhältnisse.

Marker	Von - Bis	$[M+H]^{+}$	$[M+2H]^{2+}$	$[M+3H]^{3+}$	R.T.-Wert	Sequenz
GluC						
G1m(x)	314-329	1738,89	869,95	580,3	19,82	**G**LHNHYTQKSLSLSPG
G1m(-x)|2	314-329	1752,9	876,96	584,97	19,62	**A**LHNHYTQKSLSLSPG
G1m(a)	217-240	2725,46	1363,24	909,16	20,91	KTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**D**E
G1m(-a)	217-240	2739,48	1370,24	913,83	21,15	KTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**E**E
G2m(n)	152-162	1387,6	694,3	463,2	20,67	VQFNWYVDG**M**E
G2m(-n)|4	152-162	1355,63	678,32	452,55	19,82	VQFNWYVDG**V**E
G3m(b1)	361-376	1755,95	878,48	585,99	20,35	ALHNR**F**TQKSLSLSPG
G3m(g5)	361-376	1771,95	886,48	591,32	19,43	ALHNR**Y**TQKSLSLSPG
G4m(K)	385-415	3635,8	1818,41	1212,61	28,1	NNYKTTPPVLDSDGSFFLYS**K**LTVD KSRWQE
G4m(R)	385-415	3663,81	1832,41	1221,94	28,31	NNYKTTPPVLDSDGSFFLYS**R**LTVD KSRWQE
G4m(L)	291-314	2833,46	1417,24	945,16	25,39	QF**N**STYRVVSVLTV**L**HQDWLNGKE
G4m(V)	291-314	2819,45	1410,23	940,49	24,09	QF**N**STYRVVSVLTV**V**HQDWLNGKE

Die isotypischen GluC-Markerpeptide, die für die Ig-Subklassenquantifizierung in der experimentellen Phase verwendet werden, sind in Tabelle 3-15 zusammengestellt. Ergänzend wird das isotypische Markerpeptid G1|3 aufgeführt, welches zusammen mit den isotypischen Markerpeptiden G1, G2, G3 und G4 für eine relative Quantifizierung (Kapitel 3.6) der IgG-Subklassen benötigt wird.

Tabelle 3-15: Theoretisch mit dem Programm IgPep vorhergesagte **isotypische Markerpeptide von IgG**, die bei Verdau mit der Protease GluC entstehen; die varianten Positionen, die verschiedene Allotypen von IgG definieren, sind rot und Glykosylierungen blau markiert markiert. Grundlage waren die IgG-Sequenzen der Ig-DB. Angegeben sind die monoisotopischen m/z-Verhältnisse.

Marker	Von - Bis	$[M+H]^{+}$	$[M+2H]^{2+}$	$[M+3H]^{3+}$	R.T.-Wert	Sequenz
GluC						
G1	156-166	1356,5	678,8	452,9	19,2	V**K**F**N**WYVDGVE
G3	203-213	1370,6	685,8	457,5	20,8	V**Q**F**K**WYVDGVE
G1|3	249-263	1720,0	860,5	574,0	19,5	YKCKVSNK**A**L**PA**PIE
G2	198-212	1704,9	853,0	569,0	19,7	YKCKVSNK**G**L**PA**PIE
G4	199-213	1712,0	856,5	571,3	19,2	YKCKVSNK**G**LP**SS**IE

Die Phänotypisierung mittels der Markerpeptide entspricht der Erstellung eines Ig-Profils, aus dem hervorgeht, welche Immunglobuline der einzelnen Subklassen des IgG im Human-Serum kaukasischer Individuen vorhanden sind. Mit den Markerpeptiden G4m(V), G4m(L), G4m(R) und G4m(K) können hier auch die drei Allotypen des IgG4 bestimmt werden, was serologisch bisher nicht möglich war.

- PHASE II -

3.4 Experimentell-qualitative Charakterisierung der Markerpeptide des IgG-Systems mittels LC/ESI-MS/MS

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der experimentell-qualitativen Phase (Abbildung 3-15) für das humane IgG-System zusammengefasst. Für die Identifizierung einzelner Markerpeptide war die Anreicherung der verschiedenen Subklassen (Kapitel 3.1) notwendig, weil die beiden Subklassen IgG3 (5,0 - 8,4 %) und IgG4 (0,7 – 4,2 %) einen Anteil von unter 10 % am gesamten IgG im Human-Serum besitzen. War die massenspektrometrische Identifizierung und Charakterisierung isotypischer Markerpeptide für IgG3 und IgG4 noch direkt aus über Protein A- oder DEAE-Chromatographie gereinigtem IgG möglich, galt dieses für allotypische Markerpeptide dieser Subklassen nicht mehr. Insgesamt war eine Anreicherung aller einzelnen Subklassen sinnvoll, weil hierdurch MS/MS-Spektren der Markerpeptide mit verbessertem Signal/Rausch-Verhältnis erhalten wurden, wodurch die nachfolgende Bestimmung selektiver Übergänge bei *Single Reaction Monitoring* (SRM)-Experimenten erleichtert wurde.

Alle 17 theoretisch vorhergesagten 17 allotypischen (Tabelle 3-14) und isotypischen (Tabelle 3-15) Markerpeptide des IgG-Systems konnten mittels qualitativer LC/ESI-MS nachgewiesen und charakterisiert werde. Das Basisionenchromatogramm der GluC-verdauten IgG-Fraktion eines Individuums ist exemplarisch in Abbildung 3-17 dargestellt.

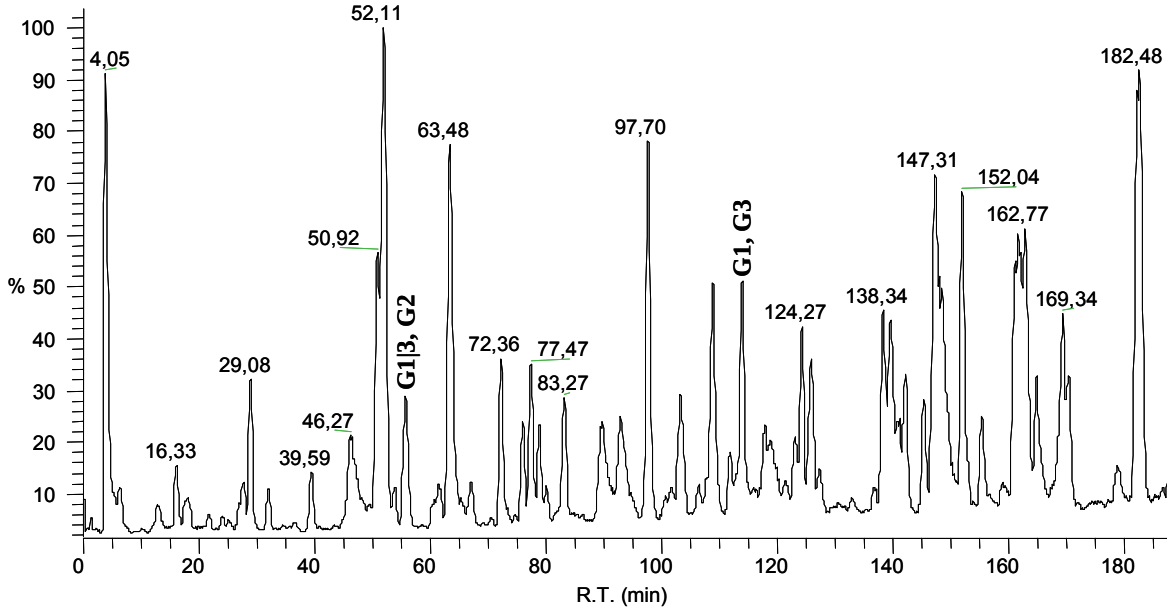


Abbildung 3-17: Ausschnitt aus dem Basisionenchromatogramm einer GluC-verdauten IgG-Fraktion, die mittels DEAE-Chromatographie aus Serum eines kaukasischen Individuums isoliert wurde. Die isotypischen Markerpeptide sind exemplarisch markiert. Die übrigen Peaks des Basisionenchromatogramms konnten Peptiden aus den konstanten Bereichen der schweren und leichten Ketten von IgG zugeordnet werden.

Tabelle 3-16: Charakterisierung der Markerpeptide des IgG-Systems und der selektiven SRM-Übergänge für die qualitative Phänotypisierung und quantitative Subklassenbestimmung. Neben der Retentionszeit (R.T.) sind die Parameter XCorr und DelCn als Qualitätskriterien einer automatischen Identifizierung mittels des Sequestalgorithmus angegeben. Eine XCorr-Wert > 2,5 entspricht einer ausreichenden Übereinstimmung zwischen den experimentellen und den simulierten MS/MS-Daten. Ob die Identifizierung eindeutig war, wurde anhand des DelCn-Wertes beurteilt. Bei Werten unter 0,2 wurden ähnliche Suchergebnisse (z.B. isobarer Peptide) berücksichtigt. * Die Selektivität der Übergänge für die IgG4-Markerpeptide wurde nicht experimentell belegt.

Marker	**SRM-Übergang** [m/z]			**R.T.**	**Identifikation**	
	Vorläuferion [Mo.]		Fragmention [Mo.]	[min]	Xcorr	DelCn
isotypische Markerpeptide						
G1|3	860,0	(+2)	1179,6 (b1-10)	54	3,6	0,81
G2	853,0	(+2)	1179,6 (b1-10)	54	3,4	0,96
G4	856,0	(+2)	1179,6 (b1-10)	47	3,2	0,84
G1	678,3	(+2)	938,5 (b1-7)	111	4,4	0,02
G3	685,3	(+2)	952,5 (b1-7)	111	3,6	0,60
allotypische Markerpeptide						
G1m(x)	870,0	(+2)	783,9 (b2-14)	52	2,9	0,75
G1m(-x)|2	877,0	(+2)	790,9 (b2-14)	52	3,0	0,81
G3m(b1)	878,5	(+2)	792,4 (b2-14)	74	3,1	0,69
G3m(g5)	886,5	(+2)	800,4 (b2-14)	55	3,3	0,80
G1m(a)	909,2	(+3)	866,5 (y3-23)	50	4,6	0,81
G1m(-a)	913,8	(+3)	871,1 (y3-23)	50	4,8	0,63
G2m(n)	694,3	(+2)	937,5 (b1-7)	131	3,1	0,58
G2m(-n)|4	678,3	(+2)	937,5 (b1-7)	123	2,8	0,04
G4m(L)	945,5	(+3)	y2-21, **y3-21***	183	3,1	0,07
G4m(V)	940,8	(+3)	y2-21, **y3-21***	168	2,8	0,05
G4m(R)	1221,9	(+3)	**y2-25***	146	4,1	1,00
G4m(K)	1212,6	(+3)	**y2-25***	145	4,2	0,20

Ein Überblick der Identifizierung und Charakterisierung der Markerpeptide ist in Tabelle 3-16 dargestellt. Die Tabelle ist das Ergebnis aus den MS/MS-Spektren der Markerpeptide, die in Abbildung 3-18 bis Abbildung 3-35 dargestellt sind.

Mit Hilfe der aufgeführten SRM-Übergänge vom Vorläuferion auf ein intensives Fragmention konnten die Markerpeptide im GluC-Verdau gereinigter IgG-Fraktionen und im GluC-Totalverdau von Human-Plasma detektiert werden. Lediglich die Selektivität der allotypischen IgG4-Markerpeptide wurde nicht überprüft.

Bei der Auswahl der Übergänge wurden folgende Kriterien berücksichtigt: Die Übergänge auf intensivere Fragmentionen wurden bevorzugt, da diese eine höhere Empfindlichkeit garantieren. Die Übergänge auf Fragmentionen, deren m/z-Verhältnis über dem des jeweiligen Vorläuferions lag, wurden ebenfalls bevorzugt, da einfachgeladene Peptide diesen Übergang nicht besitzen können. Dies führt zu einer höheren Selektivität. Des Weiteren durfte das m/z-Verhältnis der Fragmentionen nicht im vorgegebenen m/z-Bereich des Vorläuferions liegen, weil die Vorläuferionen nicht immer vollständig fragmentierten und dann falsch positive Signale erzeugen.

Die Markerpeptide wurden automatisch mittels des Sequestalgorithmus[147] identifiziert. Das Fragmentierungsverhalten der isotypischen und allotypischen Markerpeptide sowie das Verhalten isobarer Peptide werden im Folgenden näher beschrieben.

3.4.1 Isotypische Markerpeptide G1|3, G2, G4

Die isotypischen Markerpeptide G1|3, G2 und G4 traten bevorzugt im zweifach positiven Ladungszustand auf und wurden deshalb als Vorläuferionen ausgewählt.
Die MS/MS-Spektren dieser Gruppe isotypischer Markerpeptide (Abbildung 3-18 – Abbildung 3-20) werden durch Peptidbrüche benachbart zu den Prolinen an den Positionen 11 und 13 dominiert. Die Übergänge vom Vorläuferion auf die Fragmentionen b1-10 oder b1-12 der einfach geladenen b-Ionenserie sowie y1-5 oder y1-3 der einfach geladenen y-Ionenserie sind für nachfolgende *Single Reaction Monitoring* (SRM)-Experimente dieser Markerpeptide geeignet. Die Fragmentionen b1-12 und y1-3 sind beim G4-Marker nicht vorhanden, da diesem Peptid das Prolin an Position 13 fehlt. Der Übergang auf das Fragmention b1-10 erwies sich bei allen Markerpeptiden dieser Gruppe als selektiv im GluC-Totalverdau von Human-Plasma.

- **G1|3-Marker – YKCKVSNKALPAPIE**

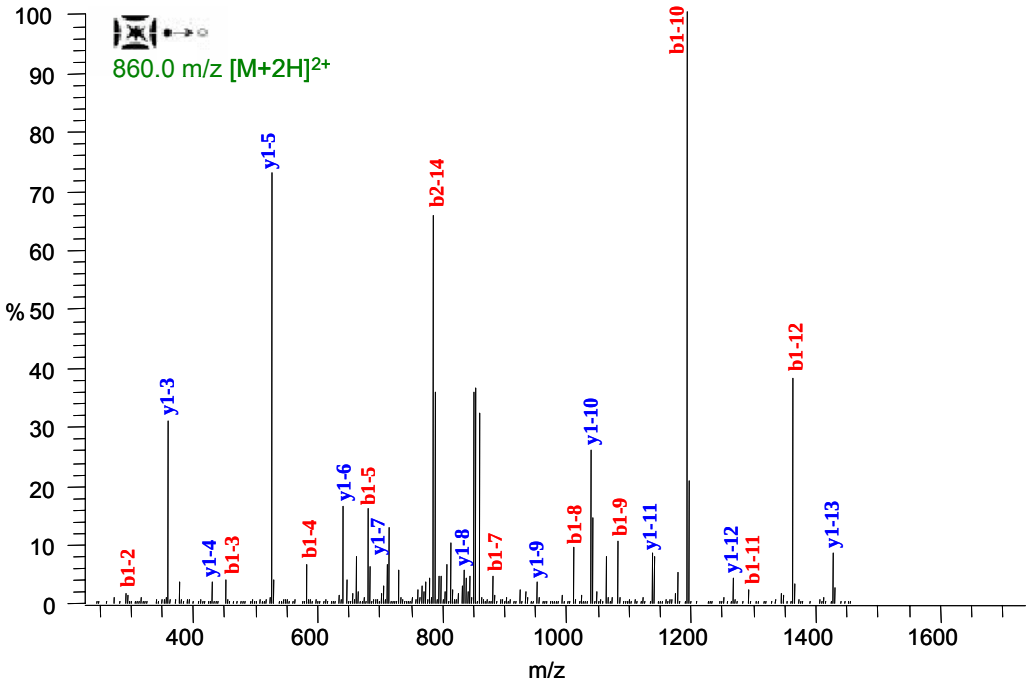


Abbildung 3-18: MS/MS-Spektrum des isotypischen Markerpeptids G1|3 aus einer GluC-verdauten IgG-Probe, die mittels Protein A-Chromatographie gereinigt wurde (Kapitel 3.1.1).

- **G2-Marker – YKCKVSNKGLPAPIE**

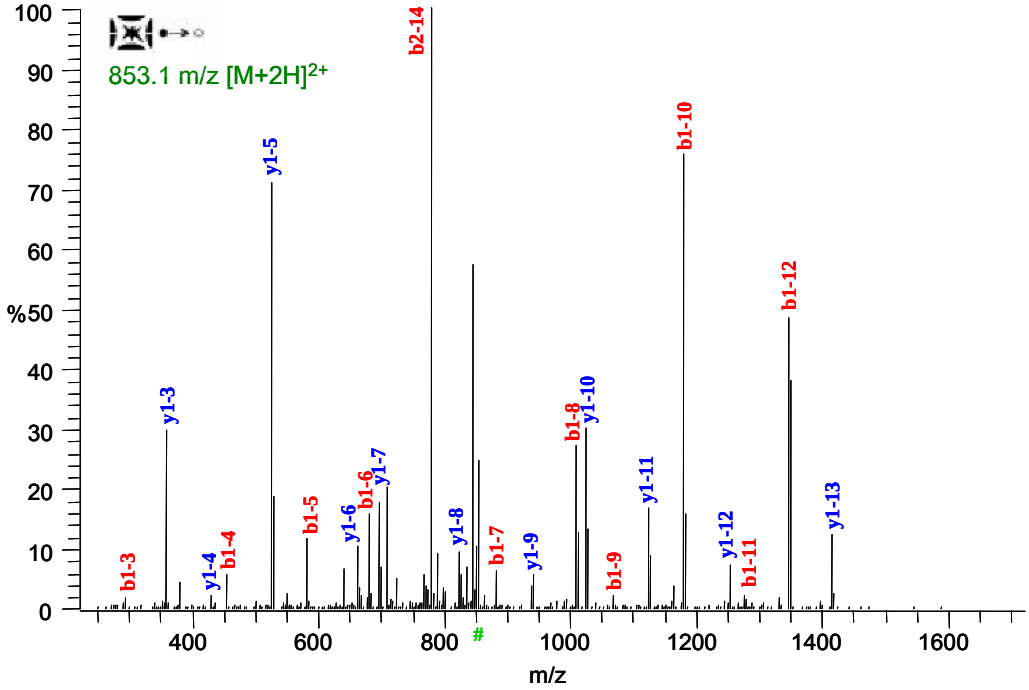


Abbildung 3-19: MS/MS-Spektrum des isotypischen Markerpeptids G2 aus einer GluC-verdauten IgG2-Anreicherung (IgG2-Gehalt > 90 %, Kapitel 3.1.3).

- **G4-Marker – YKCKVSNKGLPSSIE**

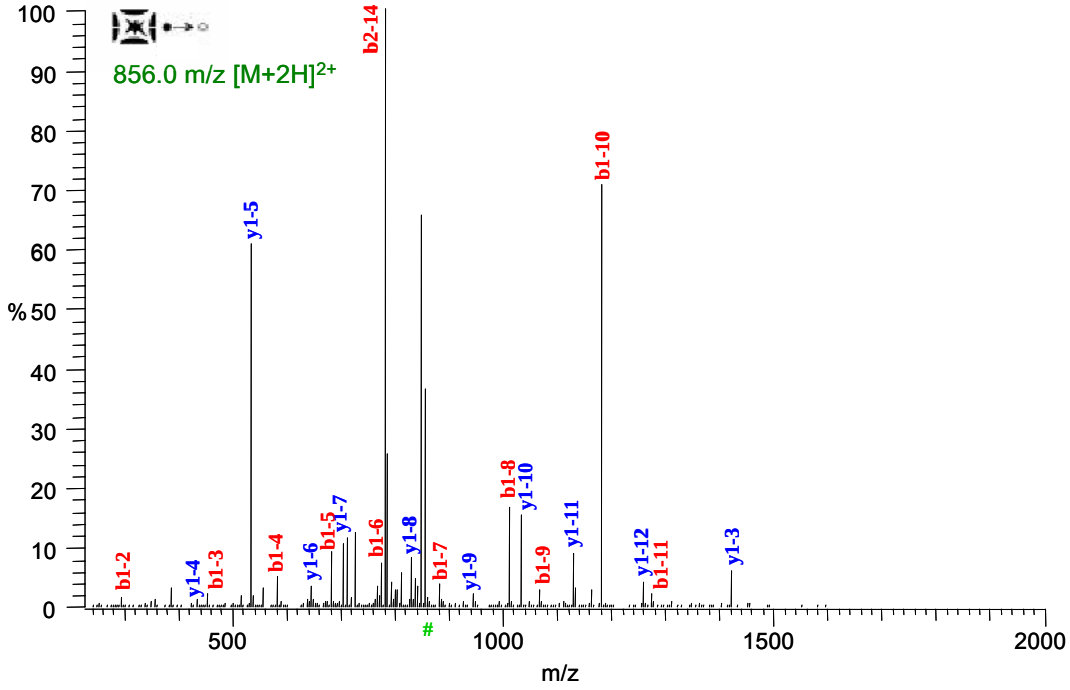


Abbildung 3-20: MS/MS-Spektrum des isotypischen Markerpeptids IgG4 aus einer GluC-verdauten IgG4-reichen Probe (IgG4-Gehalt > 50 %, Kapitel 3.1.4).

3.4.2 Iso- und allotypische Markerpeptide G1, G3, G2m(n), G2m(-n)|4

Die Markerpeptide G1, G3, G2m(n), G2m(-n)|4 lagen unter den gewählten ESI-MS-Bedingungen bevorzugt im zweifach positiven Ladungszustand vor. Jedoch zeigten die Peptide G2m(n) und G2m(-n)|4 einen erhöhten Anteil des einfach positiven Ladungszustandes, da diesen Peptiden eine basische Aminosäure im Vergleich zu G1 und G3 fehlt.
Die Markerpeptide der Gruppe G1, G3 (Abbildung 3-22 - Abbildung 3-23), G2m(n) und G2m(-n)|4 (Abbildung 3-24 - Abbildung 3-25) zeigen kein dominantes Fragmentierungsverhalten im MS/MS. Der Übergang auf das Fragmention b1-7 ist bei allen Markerpeptiden dieser Gruppe selektiv im GluC-Totalverdau von Human-Plasma.
Die beiden Markerpeptide G2m(-n)|4 und G1 sind isobar und verhalten sich im MS/MS fast gleich, was zu einer uneindeutigen Identifizierung der Peptide mittels des Sequest-Algorithmus führt.

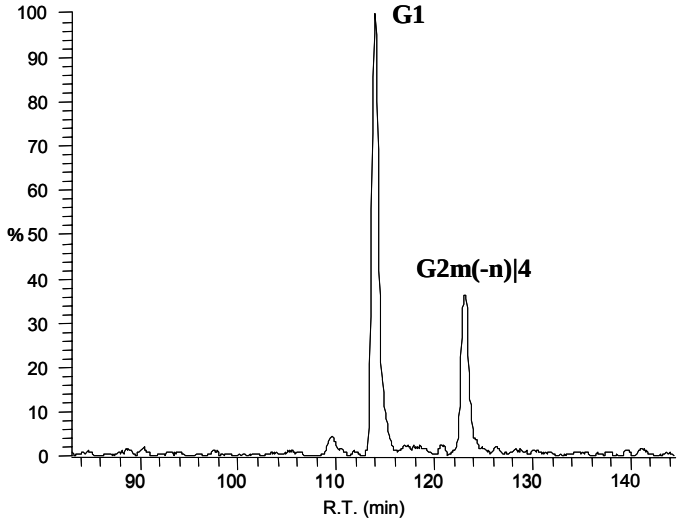


Abbildung 3-21: Ionenspurchromatogramm (678,8 m/z) der Markerpeptide G1 und G2m(-n)|4 aus GluC-verdautem IgG, das über Protein A-Chromatographie aus Human-Plasma gereinigt wurde (Kapitel 3.1.1).

Die beiden Peptide konnten aufgrund ihrer unterschiedlichen Retentionszeiten (G1 – R.T. 111 min, G2m(-n)|4 – R.T. 123 min) im qualitativen *Peptide Map* unterschieden werden (Abbildung 3-21). Die Zuordnung erfolgte jeweils aus Fcγ1-Fragment und vom angereicherten IgG2 (Kapitel 3.1.3), in denen nur jeweils ein Markerpeptid in hoher Konzentration zu finden war.

- **G1-Marker – VKFNWYVDGVE**

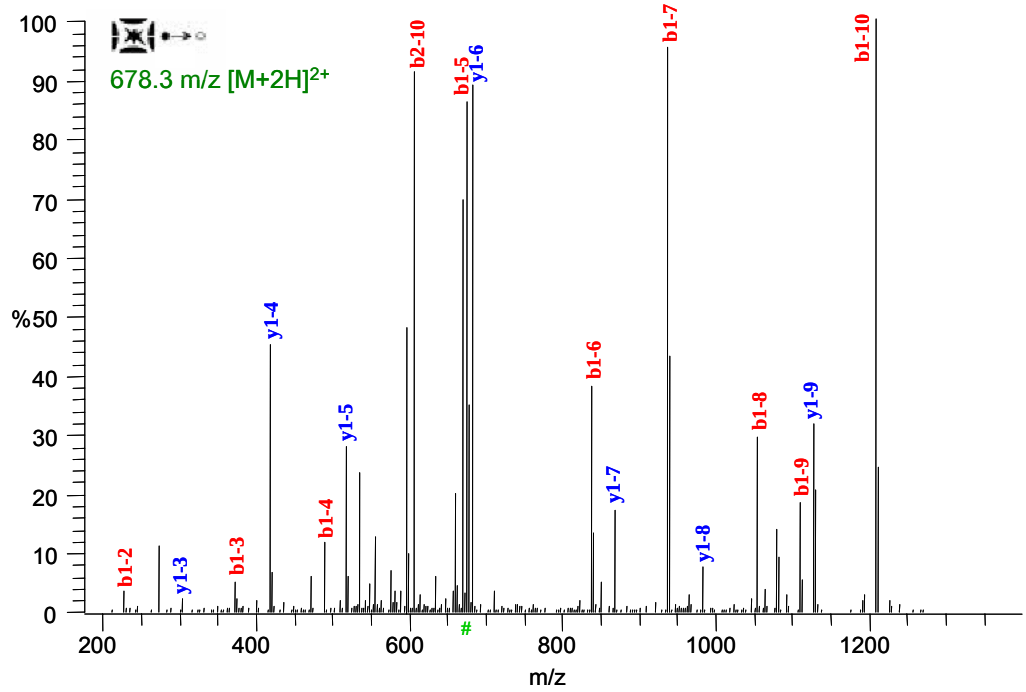


Abbildung 3-22: MS/MS-Spektrum des isotypischen Markerpeptids G1 aus GluC-verdauten IgG (IgG1 > 60 %, Kapitel 3.1.1); Die Übergänge auf die intensiven Fragmentionen b1-7 und b1-10 sind für SRM-Experimente geeignet. Übergänge auf die intensiven Fragmentionen y1-6 und b1-5 können nicht verwendet werden, da sie im Bereich des Vorläuferions liegen.

- **G3-Marker – VQFKWYVDGVE**

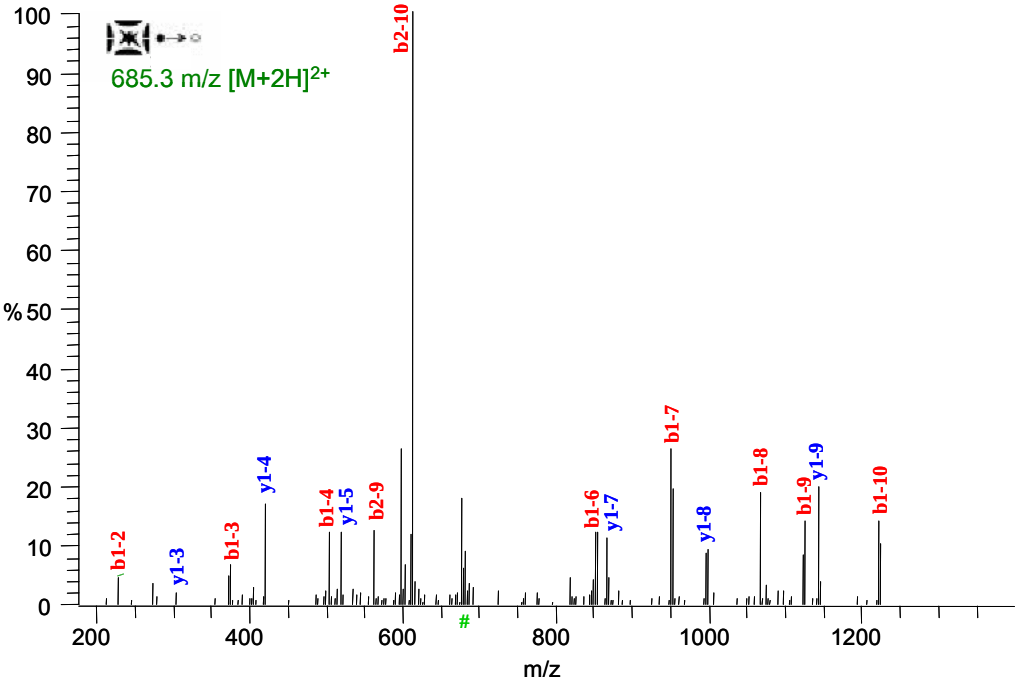


Abbildung 3-23: MS/MS-Spektrum des isotypischen Markerpeptids G3 aus einer GluC-verdauten IgG3 (IgG3 > 90 %, Kapitel 3.1.2); mit Ausnahme des dominanten b2-10 Fragmentions zeigt der G3-Marker ein homogenes Fragmentierungsverhalten. Der SRM-Übergang auf dieses Fragmention ist aber nicht spezifisch im Plasmatotalverdau.

- **G2m(n) – VQFNWYVDGME**

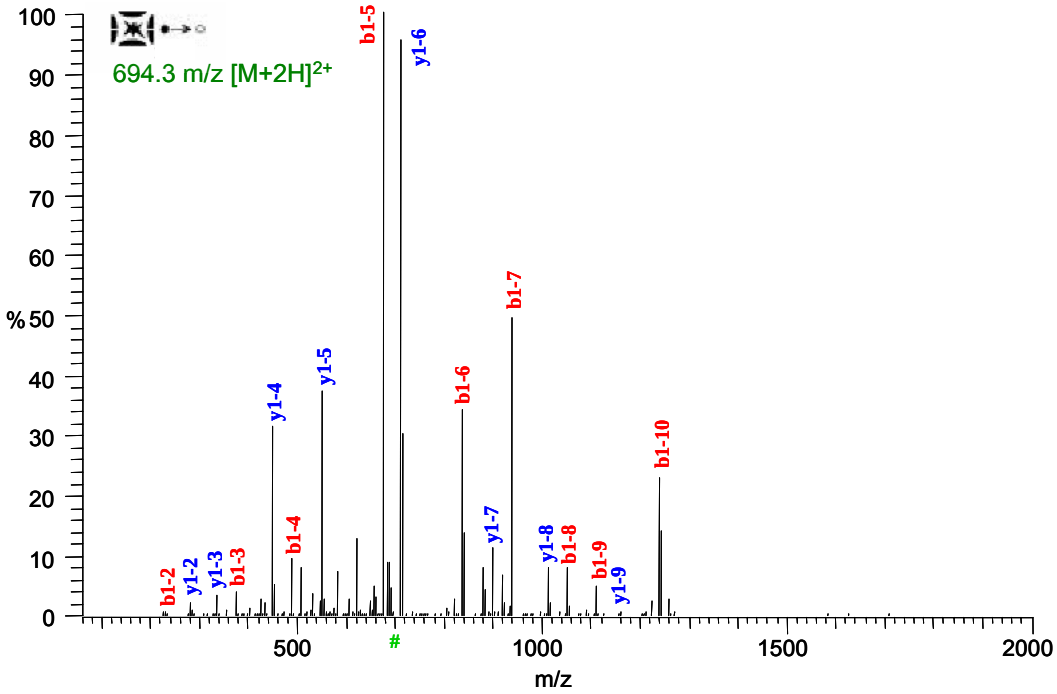


Abbildung 3-24: MS/MS-Spektrum des isotypischen Markerpeptids G2m(n) aus einer GluC-verdauten IgG2-Anreicherung (IgG1 > 80 %, Kapitel 3.1.3); die korrespondierenden Fragmentionen b1-5 und y1-6 dominieren das Fragmentierungsverhalten.

- **G2m(-n)|4 – VQFNWYVDGVE**

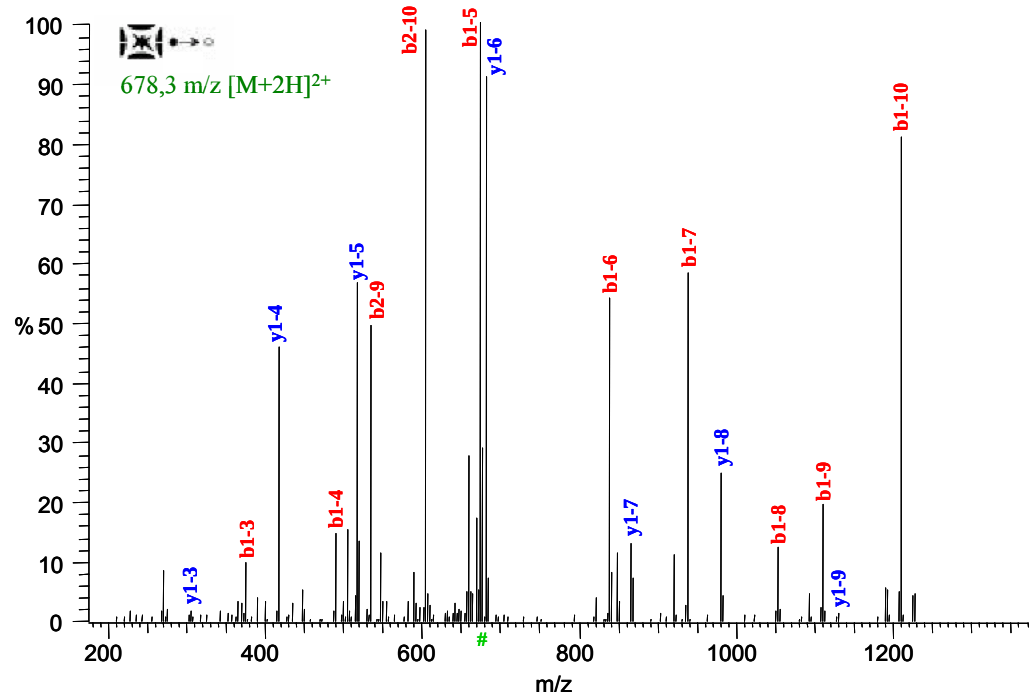


Abbildung 3-25: MS/MS-Spektrum des isotypischen Markerpeptids G2m(-n)|4 aus einer GluC-verdauten IgG2-Anreicherung (IgG1 > 80 %); Neben dem Fragmention b1-5, welches im m/z-Bereich des Vorläuferions liegt und somit keinen selektiven SRM-Übergang bildet, ist das Fragmention b1-10 intensiv.

3.4.3 Allotypische Markerpeptide G1m(x), G1m(-x)|2, G3m(b1) und G3m(g5)

Alle C-terminalen Markerpeptide lagen bevorzugt im zweifach positiven Ladungszustand vor. Das Fragmentierungsverhalten dieser Gruppe (Abbildung 3-26 - Abbildung 3-29) wird durch Brüche der Peptidbindungen benachbart zum Prolin an Position 15 dominiert. Dadurch entsteht bevorzugt das Fragmention b2-14 der zweifach geladenen b-Ionenserie. Der SRM-Übergang auf dieses Fragmention ist selektiv für jedes Markerpeptid dieser Gruppe im GluC-Totalverdau von Human-Plasma.

- **G1m(x) – GLHNHYTQKSLSLSPG**

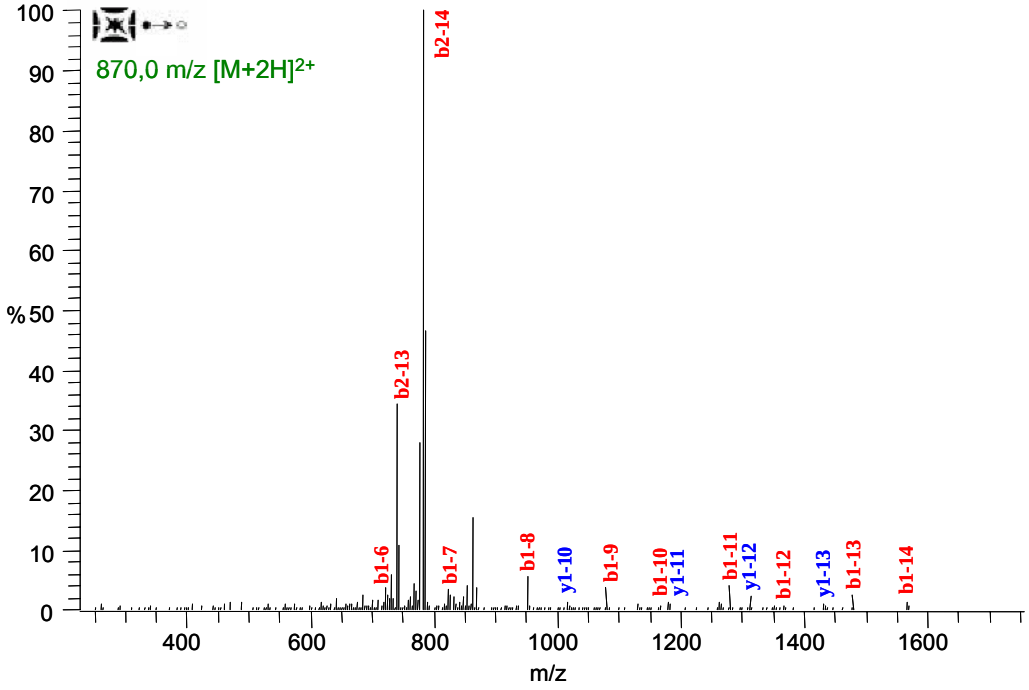


Abbildung 3-26: MS/MS-Spektrum des isotypischen Markerpeptids G1m(x) aus GluC-verdautem IgG (IgG1 > 60 %, Kapitel 2.3.1), das mittels Protein A-Chromatographie aus Human-Plasma gereingt wurde.

- **G1m(-x)|2 – ALHNHYTQKSLSLSPG**

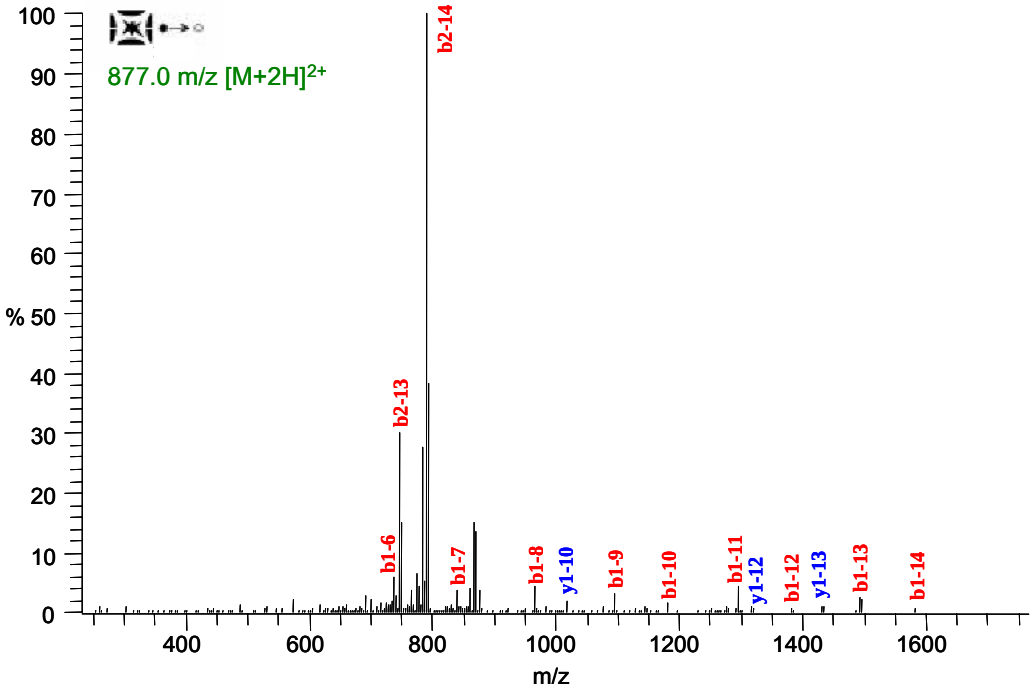


Abbildung 3-27: MS/MS-Spektrum des isotypischen Markerpeptids G1m(-x)|2 aus GluC-verdautem IgG (IgG1 > 60 %, Kapitel 2.3.1), das mittels Protein A-Chromatographie aus Human-Plasma gereingt wurde.

- **G3m(b1)** – **A**LHN**RY**TQKSLSLS**P**G

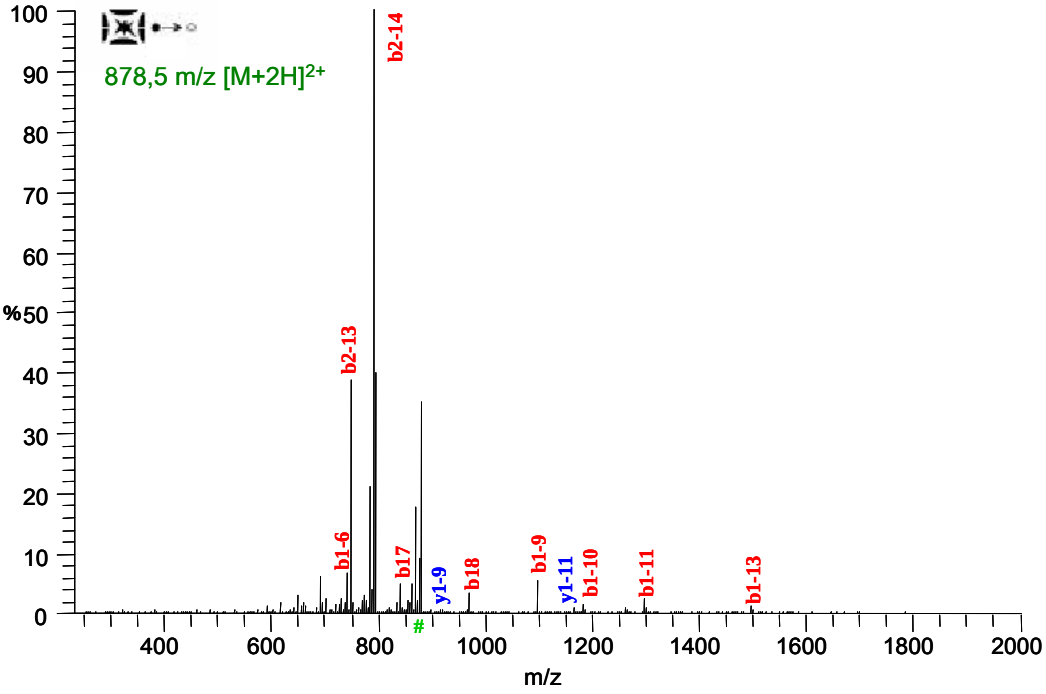


Abbildung 3-28: MS/MS-Spektrum des isotypischen Markerpeptids G3m(b1) aus einer IgG3-Anreicherung (IgG3 > 90 %, Kapitel 3.1.2).

- **G3m(g5) – ALHNRFTQKSLSLSPG**

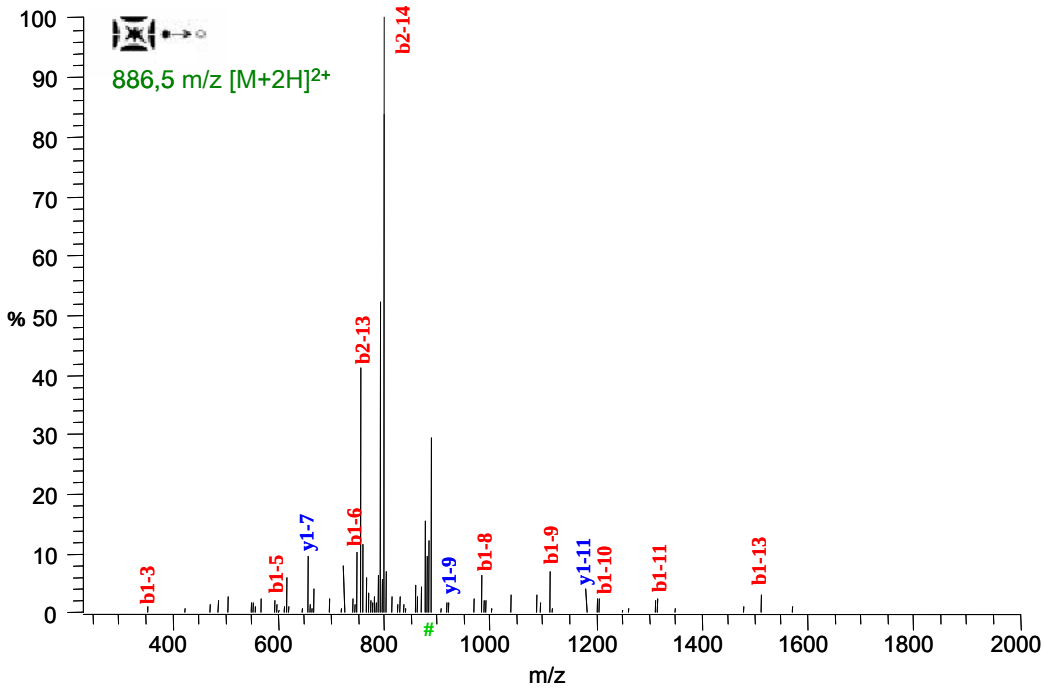


Abbildung 3-29: MS/MS-Spektrum des isotypischen Markerpeptids G3m(g5) aus einer IgG3-Anreicherung (IgG3 > 90 %, Kapitel 3.1.2).

3.4.4 Allotypische Markerpeptide G1m(a) und G1m(-a)

Der dreifach positive Ladungszustand dieser Markerpeptide war dominant und bildete das jeweilige Vorläuferion.

Die Markerpeptide G1m(a) und G1m(-a) (Abbildung 3-30 – Abbildung 3-31) zeigen kein dominantes Fragmentierungsverhalten. Durch Peptidbrüche benachbart zum Aspartat an Position 23 entstehen die intensiven Fragmentionen y3-23 und b3-23. Der Übergang auf das Fragmention y3-23 erwies sich als selektiv im GluC-Totalverdau von Human-Plasma.

- **G1m(a) – KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE**

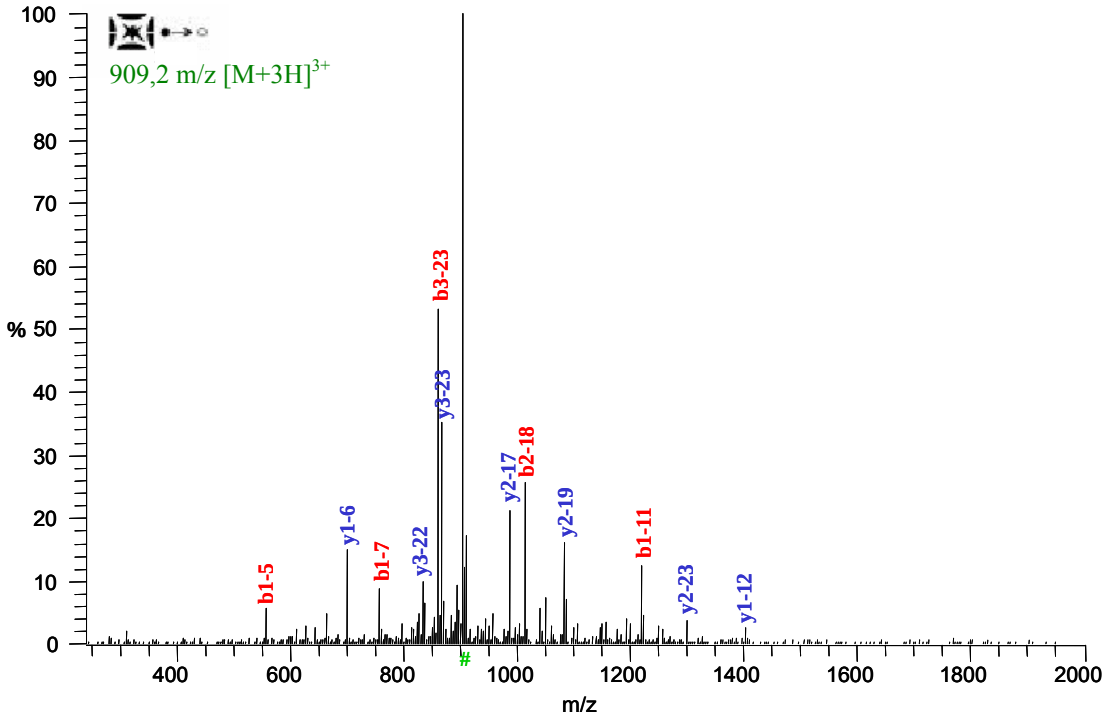


Abbildung 3-30: MS/MS-Spektrum des isotypischen Markerpeptids G1m(a) aus GluC-verdautem IgG (IgG1 > 60 %), das mittels Protein A-Chromatographie aus Human-Plasma gereingt wurde.

- **G1m(-a) – KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE**

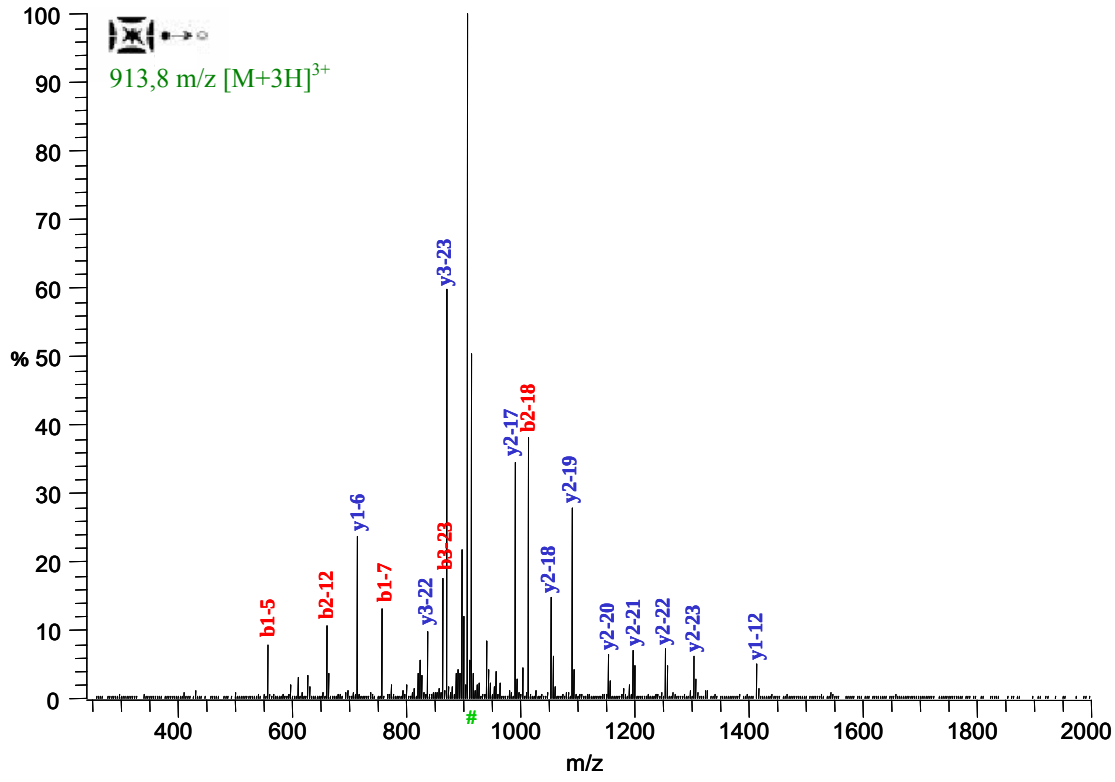


Abbildung 3-31: MS/MS-Spektrum des isotypischen Markerpeptids G1m(-a) aus GluC-verdautem IgG (IgG1 > 60 %), das mittels Protein A-Chromatographie aus Human-Plasma gereingt wurde.

3.4.5 Allotypische Markerpeptide G4m(V) und G4m(L)

Die beiden Markerpeptide G4m(V) und G4m(L) wurden im dreifachen Ladungszustand detektiert.

Die MS/MS-Spektren (Abbildung 3-34 - Abbildung 3-35) zeigen kein dominantes Fragmentierungsverhalten. Die Markerpeptide enthalten die konservierte Glykosylierungsstelle Asn-297 (Position 3 im Peptid), wodurch im MS/MS ausschließlich der Zuckeranteil (Abbildung 3-50) der Glykopeptide fragmentierte. Dadurch war die Primärstruktur der Peptide nicht zugänglich.

Einige Allotypen von IgG3 enthalten isobare Peptide (Abbildung 3-32), bei denen im Vergleich zu den IgG4-Allotypen nur die beiden Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin an den Positionen 2 und 6 vertauscht sind (Abbildung 3-32).

```
G3m-1 QYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKE
G3m-2 -F---F--------L---------
G3m-3 -Y---F--------V---------
G4m-L -F---Y--------L---------
G4m-V -F---Y--------V---------
      *:***:********:*********
```

Abbildung 3-32: Vergleich aller in der Ig-DB eingetragenen IgG3- und IgG4-Glykopeptide, die sich durch variante Aminosäurepositionen verschiedener Allotypen ergeben. Nur drei Aminosäurepositionen (:) innerhalb dieses Systems isobarer Peptide sind variant. Alle übrigen Aminosäuren sind identisch (*).

Die Glykosylierung der Subklassen IgG3 und IgG4 bzw. der Peptide war homolog. Zur Unterscheidung im MS/MS war daher eine Deglykosylierung der Peptide notwendig.

Die deglykosylierten IgG4-Markerpeptide G4m(L) und G4m(V) können aufgrund der Existenz isobarer Peptide nicht eindeutig mittels des Sequest-Algorithmus identifiziert werden. Die MS/MS-Spektren der deglykosylierten Peptide besitzen aber einige spezifische Fragmentionen, die eine manuelle Unterscheidung ermöglichen (Abbildung 3-33).

IgG4

Seq	#	b	y	#
Q	1	129.1	-	24
F	**2**	**276.3**	2707.0	23
N	**3**	**390.4**	**2559.9**	**22**
S	**4**	**477.5**	**2445.8**	**21**
T	**5**	**578.6**	**2358.7**	**20**
Y	6	741.8	**2257.6**	**19**
R	7	898.0	2094.4	18
.	.	.	.	.

IgG3

Seq	#	b	y	#
Q	1	129.1	-	24
Y	**2**	**292.3**	2707.0	23
N	**3**	**406.4**	**2543.9**	**22**
S	**4**	**493.5**	**2429.8**	**21**
T	**5**	**594.6**	**2342.7**	**20**
F	6	741.8	**2241.6**	**19**
R	7	898.0	2094.4	18
.	.	.	.	.

Abbildung 3-33: Ausschnitt aus den einfach geladenen b- und y-Fragmentionenserien der isobaren Glykopeptide des IgG4 und IgG3. Die Aminosäureunterschiede sind rot markiert und Unterschiede in den Fragmentionenserien sind hervorgehoben.

Die Fragmentionen aller Ladungszustände der y-Ionenserie zwischen y18 und y23, sowie der b-Ionenserie zwischen b1 und b6 unterscheiden sich bei den isobaren Peptiden von IgG3 und IgG4. Von diesen Fragmentionen besitzen aber nur die Fragmentionen y2-21 und y3-21 der y-Ionenserie keine m/z-Überschneidungen mit anderen Fragmentionen und werden ausserdem mit ausreichender Intensität im MS/MS gebildet.
Anhand dieser Fragmentionen können die IgG4-Peptide von isobarern IgG3-Peptiden unterschieden werden.

G4m(L) – QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE

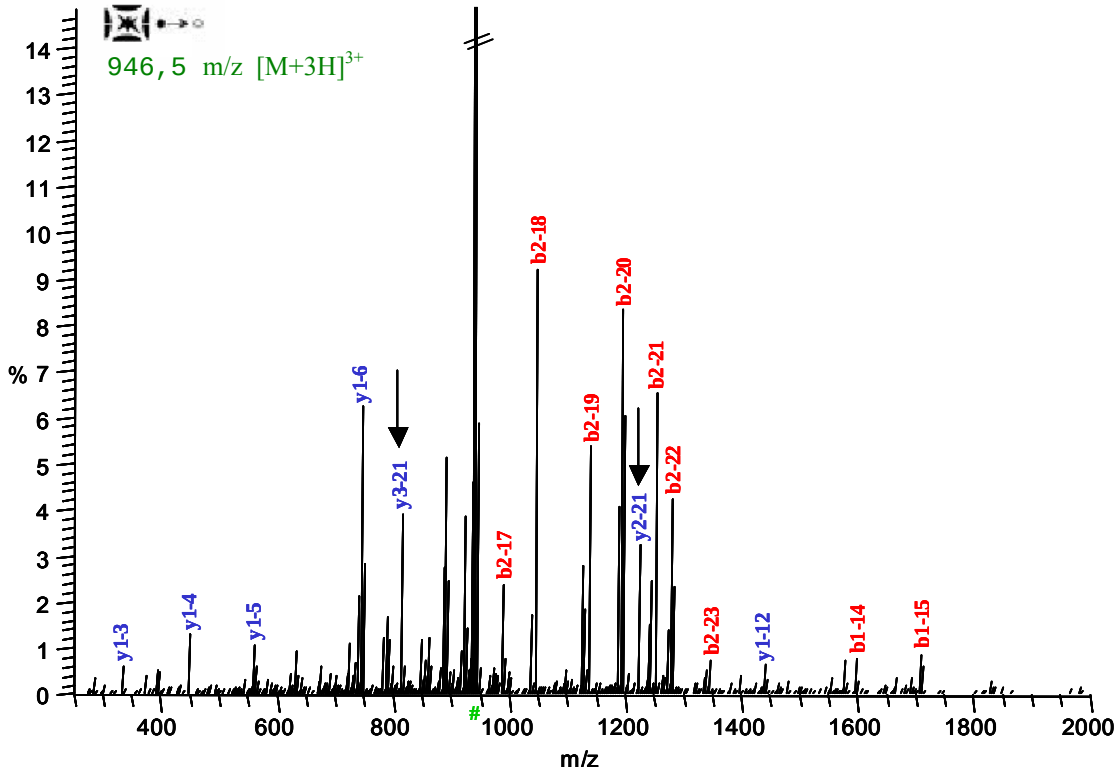


Abbildung 3-34: MS/MS-Spektrum des isotypischen Markerpeptids G4m(L) aus einer GluC-verdauten und deglykosylierten IgG4-Anreicherung (IgG4 > 50 %, Kapitel 3.1.4). Die beiden selektiven Fragmentionen der y-Ionenserie y2-21 und y3-21 sind markiert.

G4m(V) – QFNSTYRVVSVLTVVHQDWLNGKE

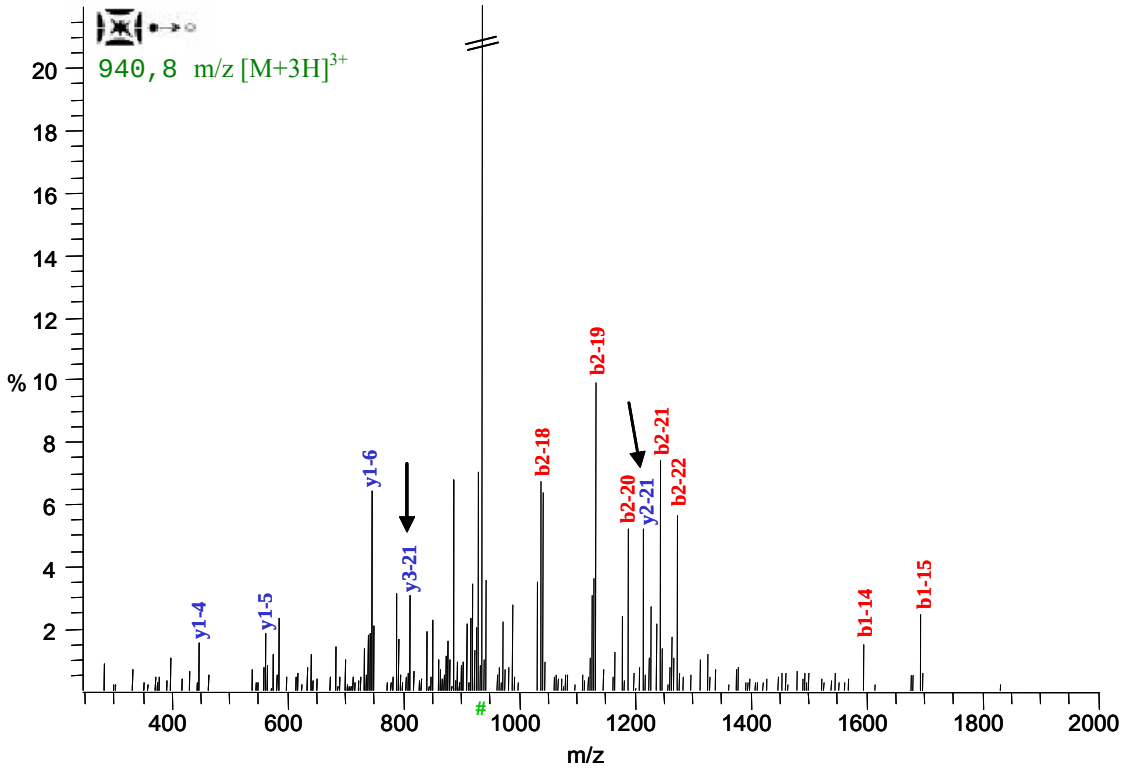


Abbildung 3-35: MS/MS-Spektrum des isotypischen Markerpeptids G4m(V) aus einer GluC-verdauten und deglykosylierten IgG4-Anreicherung (IgG4 > 50 %, Kapitel 3.1.4). Die beiden selektiven Fragmentionen der y-Ionenserie y2-21 und y3-21 sind markiert.

3.4.6 Allotypische Markerpeptide G4m(R) und G4m(K)

Beide Markerpeptide G4m(R) und G4m(K) wurden im dreifachen Ladungszustand detektiert. Der Bruch der Peptidbindung zwischen den beiden Prolinen an den Positionen 7 und 8 führt im MS/MS zum intensivsten Fragmention y2-25 bei beiden Markerpeptiden (Abbildung 3-36 - Abbildung 3-37). Die uneindeutige Identifizierung des G4m(K)-Markerpeptids mittels des Sequestalgorithmus kann mit einem Peptid der Subklasse IgG1 erklärt werden, das anstelle des C-terminalen Glutamats ein Glutamin trägt. Da die IgG1-Sequenz dadurch aber die GluC-Schnittstelle verliert, wird das äquivalente Peptid nicht gebildet.

- **G4m(R) – NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE**

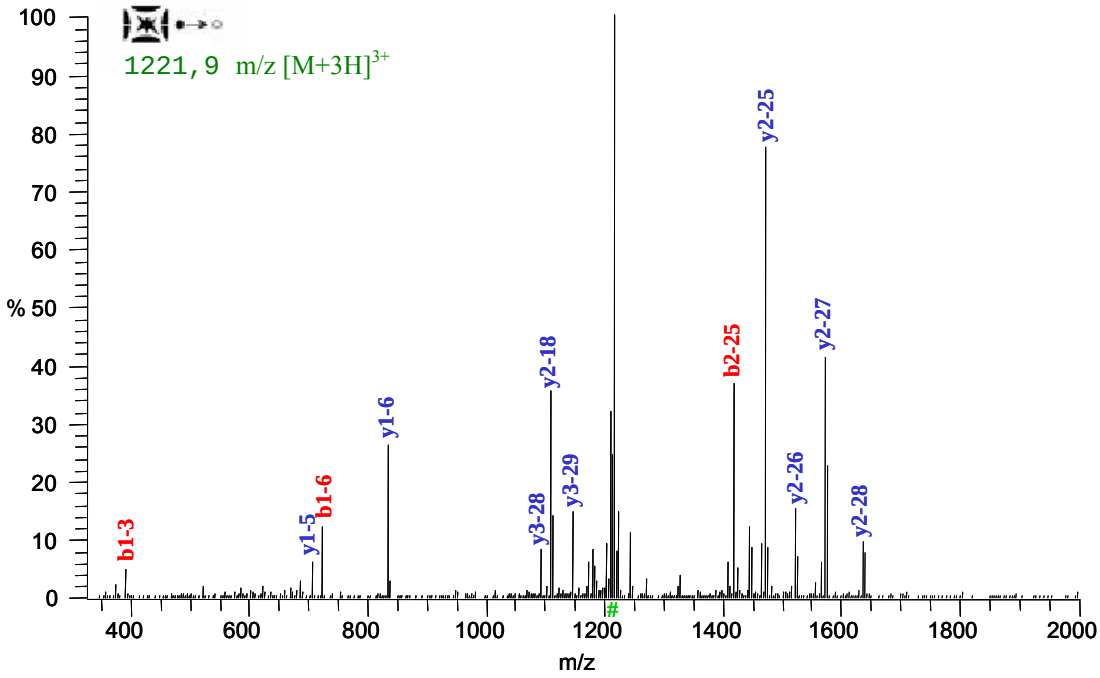


Abbildung 3-36: MS/MS-Spektrum des isotypischen Markerpeptids G4m(R) aus einer GluC-verdauten IgG4-Anreicherung (IgG4 > 50 %, Kapitel 3.1.4).

- **G4m(K) – NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQE**

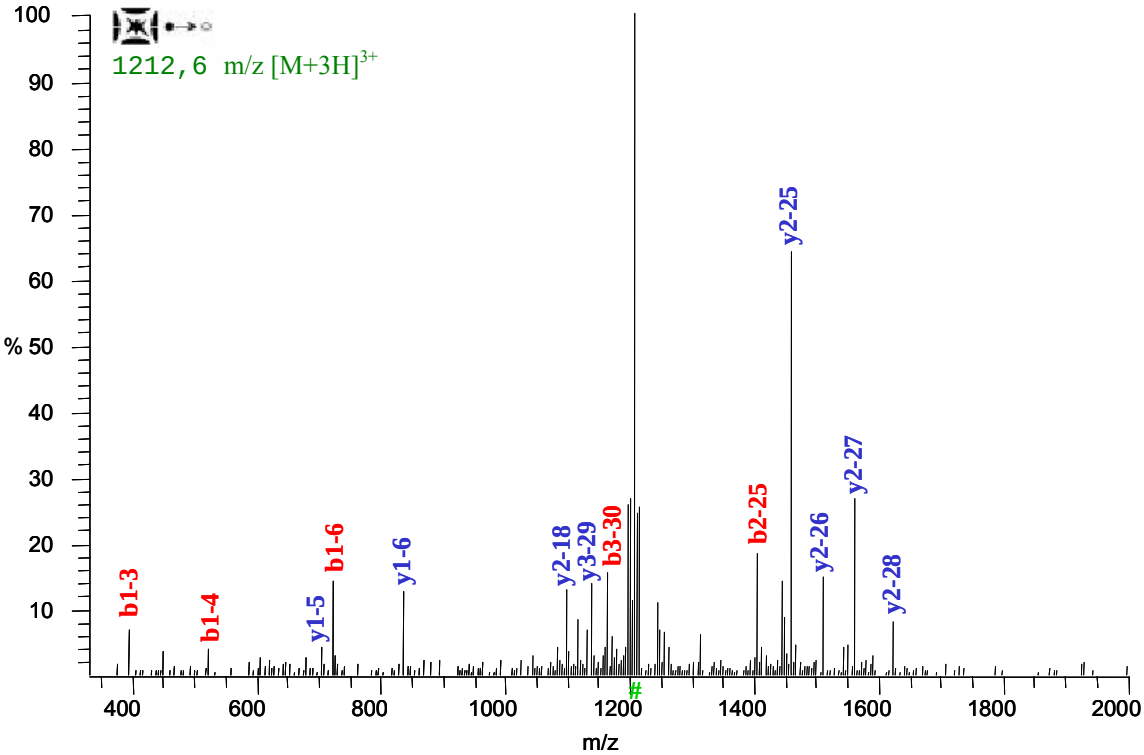


Abbildung 3-37: MS/MS-Spektrum des isotypischen Markerpeptids G4m(K) aus einer GluC-verdauten IgG4-Anreicherung (IgG4 > 50 %, Kapitel 3.1.4).

- PHASE III -

3.5 Erstellung eines IgG-Profils von kaukasischen Individuen

Bereits in Kapitel 3.3.5 wurde theoretisch gezeigt, dass mit Hilfe der Markerpeptide ein IgG-Profil erstellt werden kann, das Aufschluß über die verhandenen IgG-Subklassen und Allotypen im Human-Serum von kaukasischen Individuen gibt. Voraussetzung hierfür ist die intermediäre Vererbung der Haplotypen[141], die für die konstanten Bereiche der IgG kodieren. Dadurch kann vom Phänotyp auf die in Tabelle 3-13 aufgelisteten Genotypen kaukasischer Individuen geschlossen werden. Das theoretische Modell wurde hier mittels der allotypischen Markerpeptide experimentell umgesetzt.

3.5.1 Isoallotypische Markerpeptide G1m(-x)|2 und G2m(-n)|4

Die Verwendung der beiden isoallotypischen Markerpeptide G1m(-x)|2 und G2m(-n)|4 war bei ausschließlicher Verwendung von GluC-Peptiden zur Erstellung der Ig-Profile erforderlich (Kapitel 3.3.5).

Dazu wurde jeweils ein *Response*-Verhältnis (Kapitel 3.6) für die isoallotypischen Markerpeptide G1m(-x)|2 und G2m(-n)|4 zu einem isotypischen Markerpeptid bestimmt, um den isotypischen Peakflächenanteil an der Gesamtmarkerfläche berechnen zu können. Es wurden reine IgG2- bzw. IgG4-Myelomaproteinproben verwendet, bei denen die Gesamtpeakfläche eines isoallotypischen Markerpeptids dem isotypischen Anteil entspricht.

Das *Response*-Verhältnis wurde zwischen den GluC-Fragmenten G2 und G1m(-x)|2 in einer IgG2-Myelomaproteinprobe und zwischen G4 und G2m(-n)|4 in einer IgG4-Myelomaproteinprobe bestimmt. Das Ergebnis ist in Tabelle 3-17 aufgeführt. Mit den *Response*-Verhältnissen kann der isotypische Anteil an der Gesamtmarkerfläche eines isoallotypischen Markers aus der Peakfläche des isotypischen Markerpeptids berechnet werden.

Tabelle 3-17: *Response*-Verhältnisse zur Berechnung des isotypischen Anteils an den isoallotypischen Markern G1m(-x)|2 und G2m(-n)|4 ermittelt aus IgG2- und IgG4-Myelomaprotein-Proben. Zur Berechnung des isotypischen Anteils wurden die Peakflächen der Marker G2 und G1m(-x)|2 sowie die der Marker G4 und G2m(-n)|4 zueinander ins Verhältnis gesetzt.

Marker	*Response*-Faktor
G2	**1,0**
G1m(-x)|2	**3,3**
G4	**1,0**
G2m(-n)|4	**0,6**

3.5.2 IgG-Profil der Individuen AR und SE

Im Folgenden wird die Erstellung eines IgG-Profils am Beispiel zweier kaukasischer Individuen verglichen. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 3-18 dargestellt.

Tabelle 3-18: IgG-Profil (Phänotypisierung) der Individuen AR und SE. Es wurden jeweils die DEAE-gereinigten IgG-Fraktionen (Kapitel 3.1.2) aus Plasma beider Individuen verwendet.

Person	G1m				G2m		G3m		Phänotyp	Genotyp	
	a	-a	x	-x	n	-n	b1	g5		Haplotyp I	Haplotyp II
AR		x		x	x	x	x		Gm(f;n-n;b)	Gm(f;n;b)	Gm(f;-n;b)
SE	x		x	x		x		x	Gm(zax;-n;g)	Gm(za;-n;g)	Gm(zax;-n;g)

Das IgG-Profil des Individuums AR, bei dem die Allotypen G1m(f-a-x), G2m(n), G2m(-n) und G3m(b) im Plasma vorhanden sind, unterscheidet sich erheblich von dem des Individuums SE, das die Allotypen G1m(za-x), G1m(zax), G2m(-n) und G3m(g) besitzt. Während AR ein in der kaukasischen Population verbreitetes IgG-Profil besitzt, ist das von SE selten. Beide Haplotypen Gm(za-x;-n;g) (18,7 %) und Gm(zax;-n;g) (9,8 %), die zur Expression der Allotypen führen, werden mit einer Frequenz von unter 20 % in der kaukasischen Population bzw. bei Europäern detektiert (Tabelle 1-7) [31].
Die Bestimmung der allo- und isoallotypischen Markerpeptide beider Individuen wird im Folgenden betrachtet.

- **IgG1 – G1m(f-a-x), G1m(za) und G1m(zax)**

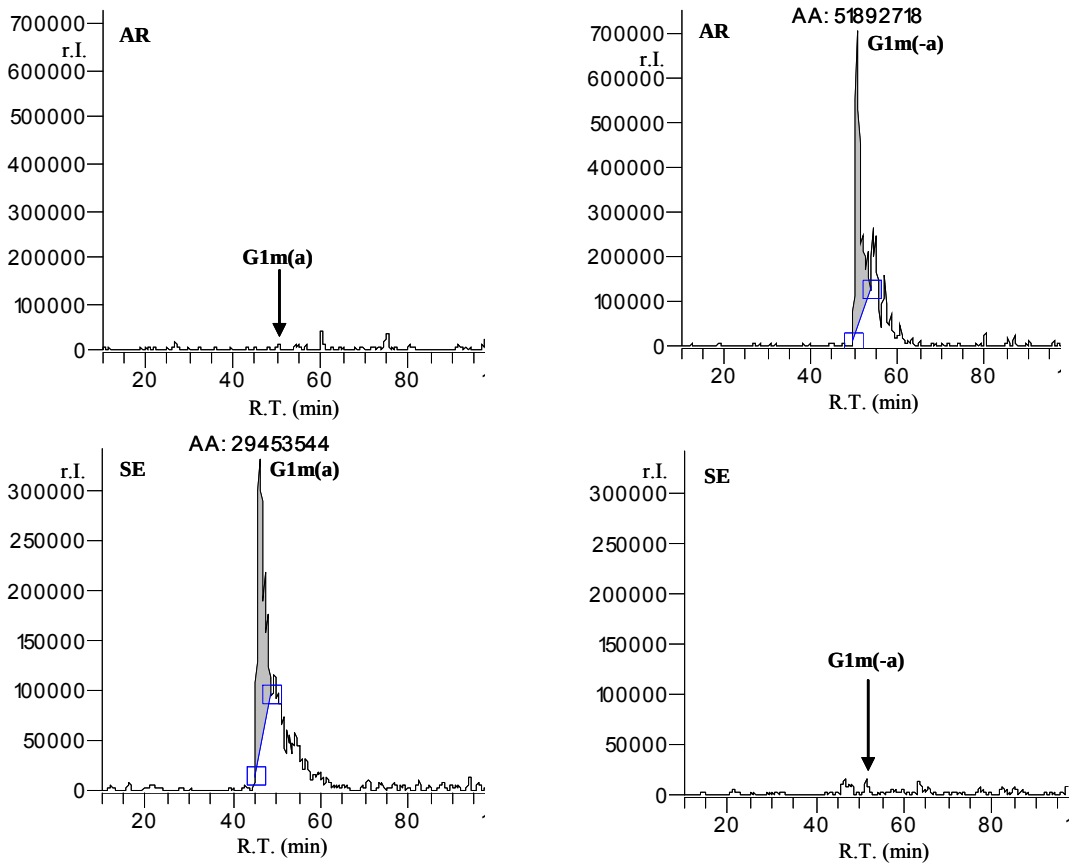


Abbildung 3-38: Ionenspuren der IgG1-Markerpeptide G1m(a) (links) und G1m(-a) (rechts) bei den Individuen AR (oben) und SE (unten). Das monoisotopische m/z-Verhältnis der Markerpeptide wurde mit ± 0,5 amu detektiert. Die Peakformen der beiden Marker lassen vermuten, dass es sich um ein Peptidgemisch handelt. Aufgrund von m/z-Verhältnissen mit Variationen unter 0,5 amu kann vermutet werden, dass verschiedene Amidierungszustände der Markerpeptide hierfür verantwortlich sind. Die Peptide besitzen Glutamine an den Positionen 9 und 14.

Die Abbildung 3-38 zeigt die Ionenspuren der Markerpeptide G1m(a) und G1m(-a) von den Individuen AR und SE im *Peptide Map*. Das Individuum AR zeigt nur ein Signal für den Marker G1m(-a), weshalb im Serum nur der IgG1-Allotyp G1m(f-a-x) vorliegen kann. Durch das Fehlen des G1m(a)-Markers kann AR die IgG1-Allotypen G1m(za-x) und G1m(zax) nicht besitzen. AR ist somit homozygot G1m(f-a-x):G1m(f-a-x).
Im Vergleich dazu konnte beim Individuum SE nur das Markerpeptid G1m(a) nachgewiesen werden. SE kann somit die IgG1-Allotypen G1m(za-x) und G1m(zax) besitzen. Ob SE beide IgG1-Allotypen G1m(za-x) und G1m(zax) besitzt oder nur einen der beiden, muss anhand des Markerpeptids G1m(-x)|2 geklärt werden. Durch das Fehlen des G1m(-a)-Markers kann SE den IgG1-Allotypen G1m(f-a-x) aber nicht besitzen.

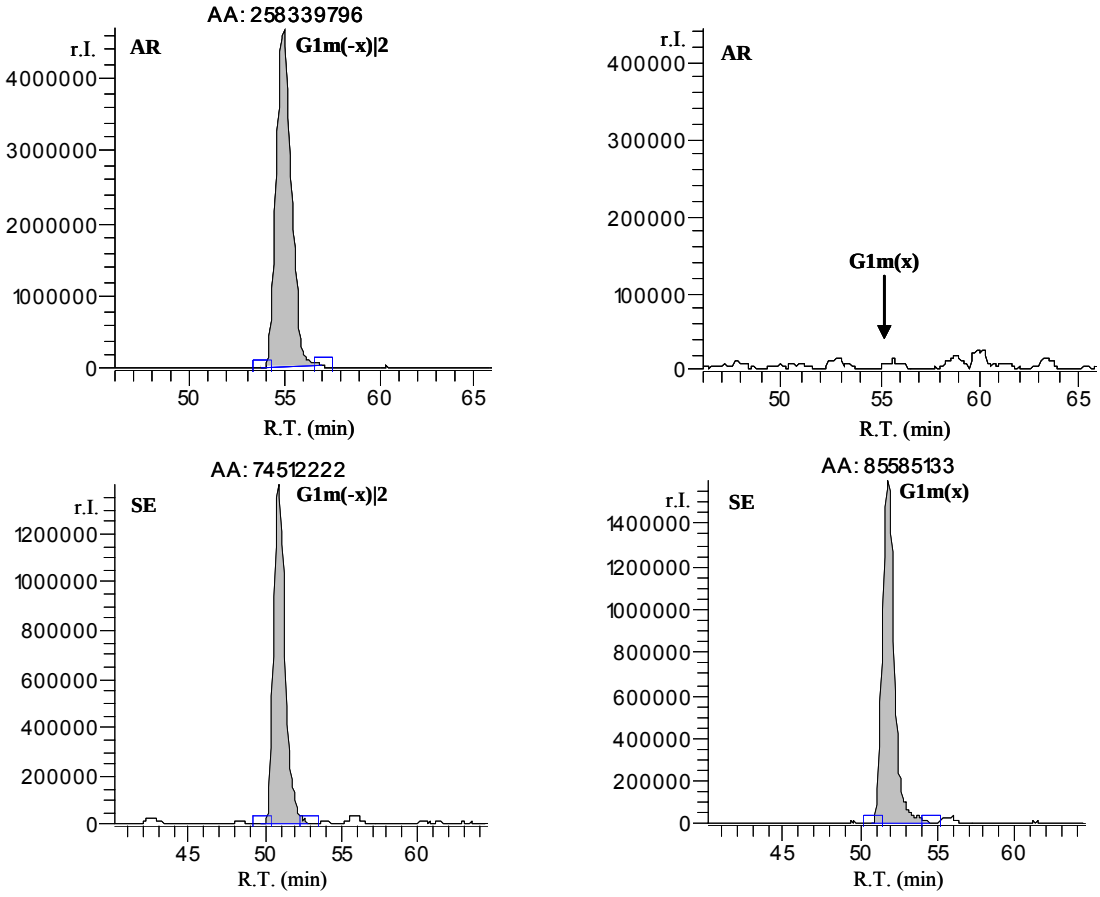


Abbildung 3-39: Ionenspuren der IgG1-Markerpeptide G1m(-x)|2 (links) und G1m(x) (rechts) bei den Individuen AR (oben) und SE (unten). Das monoisotopische m/z-Verhältnis der Markerpeptide wurde mit ± 0,5 amu detektiert.

Die Abbildung 3-39 zeigt die Ionenspuren der Markerpeptide G1m(-x)|2 und G1m(x) für die Individuen AR und SE. Das Fehlen des G1m(**x**)-Markerpeptids beim Individuum AR bestätigt, die Abwesenheit des G1m(zax)-Allotypen.
Das Individuum SE besitzt dieses Markerpeptid dagegen und somit auch den Allotypen G1m(za**x**). Für SE muss abschließend geklärt werden, ob nur der G1m(zax)-Allotyp oder zusätzlich auch der G1m(za)-Allotyp im Serum vorhanden ist. Dies kann mit dem isoallotypischen Markerpeptid G1m(-x)|2 geklärt werden, wozu aber erst der allotypische Peakflächenanteil G1m(-x) an der Gesamtmarkerpeakfläche berechnet wurden muss (Tabelle 3-19).

Tabelle 3-19: Berechnung des IgG2-Anteils an der Peakfläche des isoallotypischen Markerpeptids G1m(-x)|2. Es wurde ein *Response*-Verhältnis zwischen den Markerpeakflächen G1m(-x)|2 und G2 von 3,3/1. angenommen (*). Somit berechnet sich der IgG2-Anteil an der G1m(-x)|**2**-Peakfläche mit 3,3 · G2-Peakfläche und der allotypische Markeranteil G1m**(-x)** mit Gesamtpeakfläche G1m(-x)|2 - IgG2-Anteil.

Person	Peakflächen der Markerspeptide · 10^{-6}				
	experimentell		berechnet		experimentell
	G1m(-x)**|2**	G2	G1m**(-x)**|2	G1m(-x)|**2***	**G1m(x)**
SE	74,5	19,1	**11,5**	63,0	**85,6**

Anhand der Tabelle wird deutlich, dass das Indviduum SE neben dem Marker G1m(x) auch den Marker G1m(-x) besitzt und somit heterozygot G1m(zax):G1m(za) ist. Im Serum von SE liegen somit beide IgG1-Allotypen vor.
Eine Charakterisierung der intakten Fcγ1-Fragmente beider Individuen bestätigte die hier gemachten Ergebnisse (Abbildung 3-61).

- **IgG2 – G2m(n) und G2m(-n)**

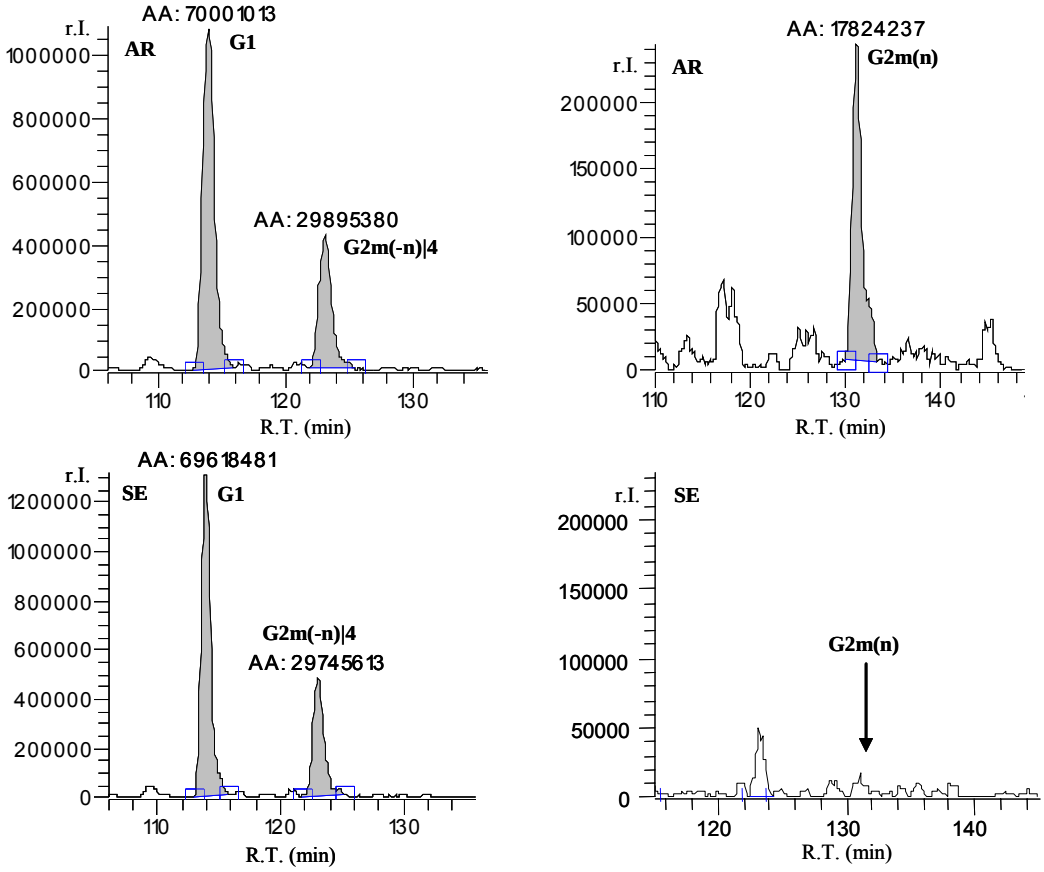


Abbildung 3-40: Ionenspuren der IgG2-Markerpeptide G2m(-n)|4 (links) und G2m(n) (rechts) bei den Individuen AR (oben) und SE (unten). Das monoisotopische m/z-Verhältnis der Markerpeptide wurde mit ± 0,5 amu detektiert.

Die Abbildung 3-40 zeigt die Ionenspuren der Markerpeptide G2m(-n)|4 und G2m(n) für die Individuen AR und SE. Beide Individuen besitzen das isoallotypische Markerpeptid G2m(-n)|4 und sind nach Abzug des isotypischen IgG4-Anteils von der Gesamtpeakfläche positiv für G2m(-n) (Tabelle 3-20).

Tabelle 3-20: Berechnung des IgG4-Anteils an der Peakfläche des isoallotypischen Markerpeptids G2m(-n)|4. Es wurde ein *Response*-Faktor zwischen den Markernpeakflächen G2m(-n)|4 und G4 von 0,6 angenommen (*). Somit berechnet sich der IgG4-Anteil an der G2m(-n)|**4**-Peakfläche mit 0,6 · G4-Peakfläche und der allotypische Markeranteil G2m**(-n)** mit Gesamtpeakfläche G2m(-n)|4 – IgG4-Anteil.

Person	Peakflächen der Markerpeptide · 10^{-6}				
	experimentell		berechnet		experimentell
	G2m(-n)**|4**	G4	G2m**(-n)**|4	G2m(-n)|**4***	**G2m(n)**
AR	29,9	2,7	**28,8**	1,1	**17,8**
SE	29,7	4,2	**28,0**	1,7	**0**

Das Individuum AR besitzt im Gegensatz zu SE auch das allotypische Markerpeptid G2m(n). Im Serum von AR sind also beide IgG2-Allotypen vorhanden, während SE nur den IgG2-Allotypen G2m(-n) aufweist.

- **IgG3 – G3m(b*) und G3m(g*)**

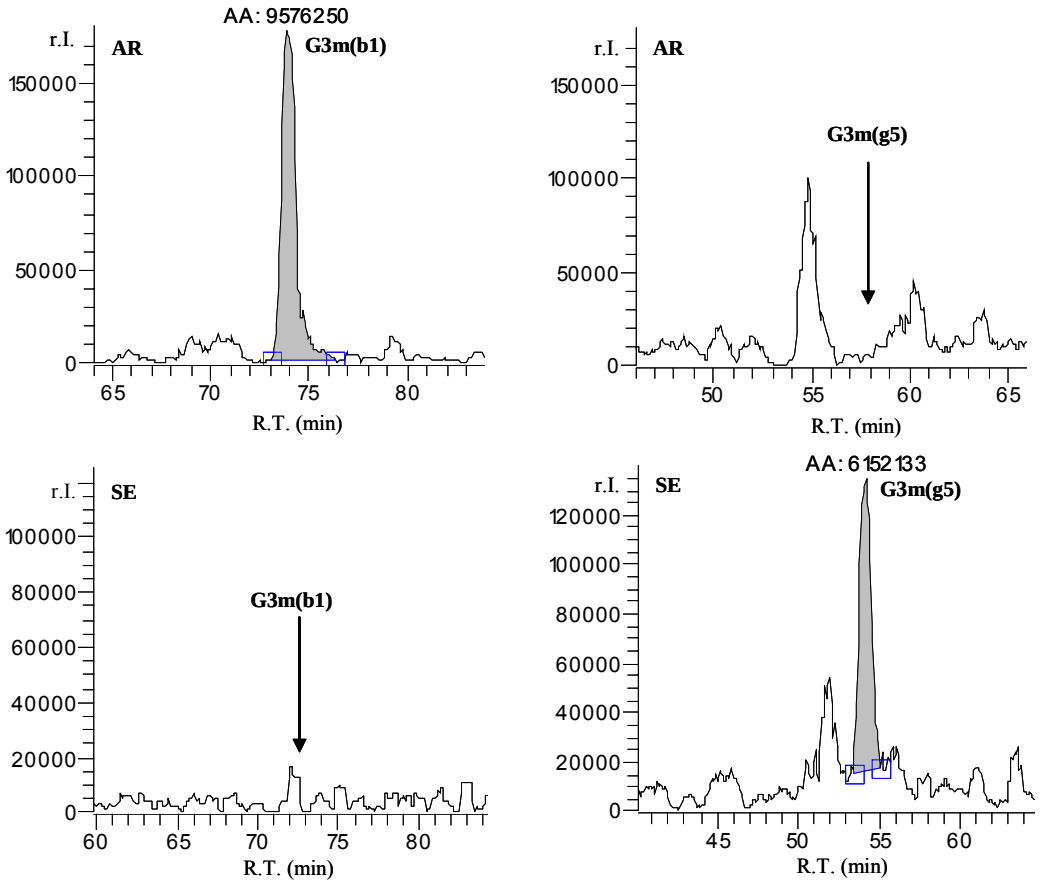


Abbildung 3-41: Ionenspuren der IgG3-Markerpeptide G3m(b1) (links) und G3m(g5) (rechts) bei den Individuen AR (oben) und SE (unten). Das monoisotopische m/z-Verhältnis der Markerpeptide wurde mit ± 0,5 amu detektiert. Änderungen in den Retentionszeiten einzelner Markerpeptide sind auf Temperaturschwankungen während der Analyse zurückzuführen. Der Peak bei einer Retentionszeit von 55 min (AR) bzw. 52 min (SE) ist ein falsch positives Signal und kann durch das Natriumaddukt des Markers G1m(-x)|2 erklärt werden.

Die Abbildung 3-41 zeigt die Ionenspuren der Markerpeptide G3m(b1) und G3m(g5) für die Individuen AR und SE. Anhand der Peakflächen der beiden Markerpeptide ist erkennbar, dass AR homozygot G3m(b*):G3m(b*) ist, da nur für das G3m(b1)-Markerpeptid ein Signal erkennbar ist. Der G3m(g5)-Marker, der bei einer Retentionszeit von 58 min erwartet wird, fehlt bei AR.
Das Individuum SE zeigt hingegen ein Signal für den G3m(g5)-Marker, während ihm ein Signal für das G3m(b1)-Markerpeptid fehlt. SE ist daher homozygot G3m(g*):G3m(g*).
Im Serum von AR ist somit der IgG3-Allotyp G3m(b*) und im Serum von SE der IgG3-Allotyp G3m(g*) vorhanden.

3.5.3 Phänotypisierung von kaukasischen Individuen

Die entwickelte Methodik zur Ermittlung der vorhandenen IgG-Allotypen in Human-Plasma wurde anhand von experimentell bestimmten Haplotypenhäufigkeiten bei kaukasischen Individuen im Vergleich zu den bekannten Haplotypenhäufigkeiten[31] in der kaukasischen Population überprüft. Dazu wurde der Genotyp von 29 kaukasischen Individuen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-21 zusammengestellt.

Tabelle 3-21: Phänotypisierung 29 kaukasischer Individuen. Die IgG-Fraktionen der Individuen wurden über DEAE-Chromatographie gereinigt. Die Prozentzahlen geben den Anteil der Allotypen einer Subklasse an. Die Verhältnisse wurden durch Relativierung der Peakflächen der Markerpeptide innerhalb der Gruppen G1m, G2m und G3m berechnet. Der allotypische Peakflächenanteil isoallotypischer Markerpeptide wurde, wie am Beispiel der Individuen AR und SE gezeigt (Kapitel 3.5.2), bestimmt. Bei einer 6-fachen Bestimmung des IgG-Profils von Kontrollserum der Firma *The Binding Site* lag der Variationskoeffizient (VK) unter 16 %. Allotypenanteile einer Subklasse < 6 % wurden nicht berücksichtigt. Der seltene (< 5 %) kaukasische Haplotyp Gm(za-x;-n;**b**) ist hervorgehoben.

	G1m [%]			G2m [%]		G3m [%]		Genotyp					
Person	f-a-x	za-x	zax	-n	n	b	g	**G1m**	**G2m**	**G3m**	**G1m**	**G2m**	**G3**
3747	98	2	0	2	98	100	0	f-a-x	n	b	f-a-x	n	b
4746	98	2	0	42	58	100	0	f-a-x	-n	b	f-a-x	n	b
4729	100	0	0	23	77	100	0	f-a-x	-n	b	f-a-x	n	b
4674	27	0	74	100	0	29	71	f-a-x	-n	b	zax	-n	g
3741	28	72	0	100	0	69	31	f-a-x	-n	b	za-x	-n	g
3748	52	48	0	100	0	100	0	f-a-x	-n	b	za-x	-n	b
3827	41	0	60	79	21	79	21	f-a-x	n	b	zax	-n	g
4152	39	0	61	100	0	73	27	f-a-x	-n	b	zax	-n	g
4195	97	3	0	3	97	100	0	f-a-x	n	b	f-a-x	n	b
4224	39	60	1	33	67	52	48	f-a-x	n	b	za-x	-n	g
4684	0	100	0	100	0	0	100	za-x	-n	g	za-x	-n	g
4229	100	0	0	95	5	100	0	f-a-x	-n	b	f-a-x	n	b
4422	100	0	0	34	66	100	0	f-a-x	-n	b	f-a-x	n	b
4449	40	60	0	46	54	69	31	f-a-x	n	b	za-x	-n	g
4458	47	53	0	74	26	76	24	f-a-x	n	b	za-x	-n	g
4118	100	0	0	73	27	100	0	f-a-x	n	b	f-a-x	-n	b
3742	100	0	0	6	94	100	0	f-a-x	n	b	f-a-x	n	b
3524	0	14	86	100	0	0	100	zax	-n	g	za-x	-n	g
4090	100	0	0	52	48	100	0	f-a-x	n	b	f-a-x	-n	b
3728	44	56	0	44	56	74	26	f-a-x	n	b	za-x	-n	g
3561	41	0	59	100	0	70	30	f-a-x	-n	b	zax	-n	g
3520	100	0	0	11	89	100	0	f-a-x	n	b	f-a-x	-n	b
2911	40	60	0	100	0	83	17	f-a-x	-n	b	za-x	-n	g
3156	100	0	0	83	17	100	0	f-a-x	n	b	f-a-x	-n	b
3473	36	64	0	100	0	75	25	f-a-x	-n	b	za-x	-n	g
1159	100	0	0	78	22	100	0	f-a-x	-n	b	f-a-x	n	b
4861	0	56	44	100	0	50	50	za-x	-n	b	zax	-n	g
4634	100	0	0	4	96	100	0	f-a-x	n	b	f-a-x	n	b
4468	100	0	0	6	94	100	0	f-a-x	n	b	f-a-x	n	b
4466	33	0	67	74	26	79	21	f-a-x	n	b	zax	-n	g

Ausgehend vom Phänotyp konnte der Genotyp aller Individuen eindeutig zugewiesen werden. Außergewöhnliche Markerkombinationen, die zu untypischen Haplotypen geführt

hätten, traten nicht auf. So hätte die Markerkombination G1m(a) und G2m(n) das gemeinsame Vorliegen des IgG1-Allotypen G1m(za-x) bzw. G1m(zax) mit dem IgG2-Allotypen G2m(n) vorausgesetzt. Diese Allotypenkombination ist in der kaukasischen Population aber nicht vorhanden[31], da die Allotypen G1m(zax) und G1m(za-x) in Haplotypen kaukasischer Individuen nur mit dem Allotypen G2m(-n) kombinieren.

Tabelle 3-22: Vergleich der Haplotyphäufigkeiten bei Kaukasiern unter Verwendung serologischer Reagenzien und Massenspektrometrie. Die masssenpektrometrisch bestimmte Häufigkeit eines Haplotypen wurde durch Addition aus den Genotypen von 29 kaukasischen Individuen bestimmt.

Haplotyp			**Serologisch**	**Massenspektrometrie**	
G1m	G2m	G3m	Häufigkeit	Häufigkeit	Anzahl
f-a-x	n	b	0,450	0,431	25
f-a-x	-n	b	0,249	0,276	16
za-x	-n	g	0,187	0,138	8
zax	-n	g	0,098	0,121	7
za-x	-n	b	0,004	0,034	2

Die relative Häufigkeit, mit der die einzelnen Haplotypen in der Stichprobe von 29 Individuen nachgewiesen wurden, stimmt mit einer umfangreichen Studie der kaukasischen Population, die von de Lange et al. durchgeführt wurde, überein (Tabelle 3-22)[31]. Die Ergebnisse belegen, dass ein IgG-Profil kaukasischer Individuen massenspektrometrisch ermittelt werden kann.

Durch Verwendung von *Single Reaction Monitoring* (SRM)-Experimenten konnte die Methode auf einen GluC-Totalverdau von Human-Plasma übertragen werden, wodurch die vorherige Isolierung der IgG-Fraktion entfiel. Außerdem wurde die Laufzeit des LC-ESI-MS/MS-Experiments, während dessen die SRM-Übergänge aller allotypischen Markerpeptide aufgezeichnet wurden, auf 45 min pro Individuum verkürzt. Somit können IgG-Profile einzelner Individuen schnell erstellt werden. Insgesamt erwies sich die Methode als robust und einfach anwendbar. Das IgG-Profil kann in einem einzigen analytischen LC/ESI-MS/MS-Lauf erstellt werden. Ein vergleichbares Resultat kann nur durch Kombination mehrerer kostenintensiver und zeitaufwändiger serologischer Assay-Systeme erreicht werden.
Obwohl die Methode zur Erstellung von IgG-Profilen bis jetzt nicht quantitativ ist, da die *Response*-Verhältnisse der Markerpeptide bis jetzt nicht bestimmt wurden, reicht die Präzision der Messung für einen Vergleich der Ig-Profile untereinander aus. Auffällig ist, dass bei verschiedenen heterozygoten Individuen der Anteil von Allotypen einer Subklasse stark schwankt. Dies wird besonders deutlich beim IgG2, wo sich das Verhältnis der beiden IgG2-Allotypen von Individuum zu Individuum umkehren kann.
Das Expressionsniveau der vorhandenen Allotypen einer Subklasse hängt offenbar von bestimmten Bedingungen (z.B. Alter, Geschlecht und pharmakologischen, pathologischen, ökologischen oder anderen Einflüssen) ab. Dieses stimmt mit der Vermutung von Oxelius[148] überein, dass die Aktivität der Genloci verschiedener Allotypen variabel ist. Nachgewiesen wurde dies bereits für die IgG3-Allotypen G3m(b*) und G3m(g*). Beide besitzen unterschiedlich aktive Promotor- und Schaltregionen (eng. *Switchregion*)[149-151], was zur unterschiedlich

starken Expression beider Allotypen führt. Diese Beobachtung unterstützt die Bedeutung einzelner Allotypen, da diese ein indiviuell reagierendes Immunsystem formen.

3.6 Vergleichende Quantifizierung der IgG-Subklassen

Die Grundlage für die vergleichende Quantifizierung der IgG-Subklassen von Individuen waren die isotypischen Markerpeptide G1|3, G2, G4, G1 und G3. Diese lassen sich nach ihrer strukturellen Ähnlichkeit in zwei Gruppen zusammenfassen: G1|3, G2 und G4 bilden die eine, G1 und G3 die andere Gruppe.

Folgende Überlegungen galten für eine vergleichende Quantifizierung:

1. Das Verhältnis, mit dem die GluC-Fragmente einer Gruppe beim Verdau der IgG-Moleküle entstehen, ist konstant.
2. Das Verhältnis der Effizienz, mit der die GluC-Fragmente einer Gruppe im MS ionisieren, ist konstant.

Die gemachten Annahmen basieren auf folgenden Überlegungen. Die einzelnen Markerpeptide einer Gruppe befinden sich an vergleichbaren Positionen innerhalb des IgG-Moleküls und sind strukturell ähnlich. Dadurch verhalten sich die Peptide bei der Probenaufbereitung (1.), die unter anderem die Proteolyse umfasst, und bei der Ionisierung im MS (2.) vergleichbar. So besitzen die Marker G1|3, G2 und G4 ein reaktives Cystein an Position 3 und die Marker G1 und G3 ein Aspartat an Position 8. Das Aspartat bildet eine mögliche Fehlschnittstelle für GluC.
Die Peakflächen der einzelnen Marker sind somit proportional zur Menge der jeweiligen IgG-Subklasse (Abbildung 3-42), so dass durch Relativierung der Peakflächen auch das relative Verhältnis der IgG-Subklassen berechnet werden kann. Der Anteil des G1|3-Markers wurde mit Hilfe der G1- und G3-Peakflächen weiter unterteilt. Die Peakflächen wurden aus den Ionenspuren der einzelnen Marker ermittelt. Die monoisotopischen m/z-Verhältnisse der mit einer Abweichung von ± 0,5 amu selektierten Molekülionen der einzelnen Markerpeptide sind der Tabelle 3-16 zu entnehmen.

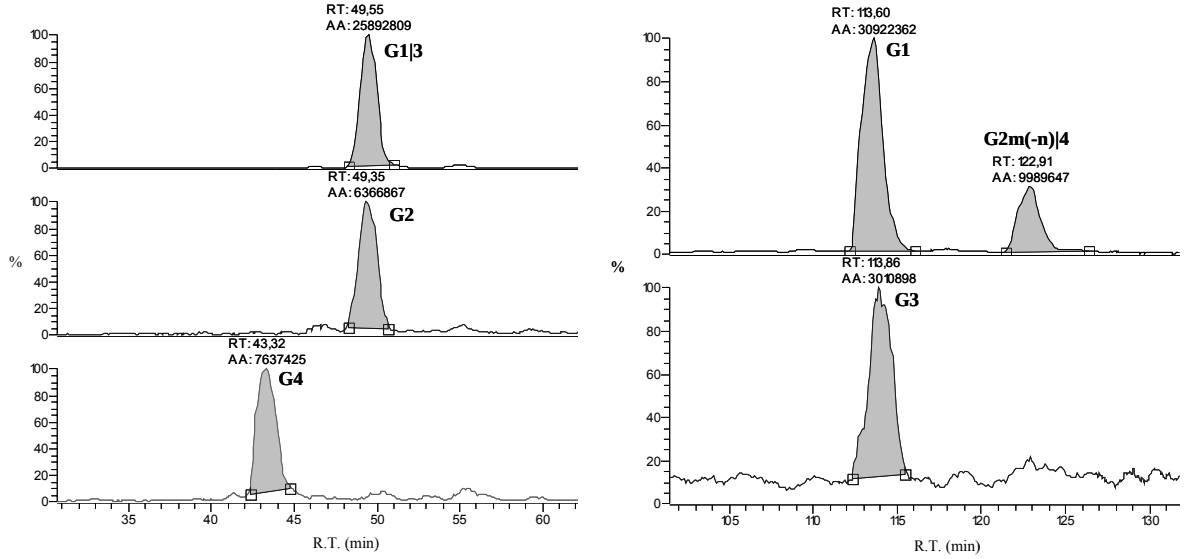


Abbildung 3-42: Ionenspuren der isotypischen Markerpeptide des IgG; das isobare Markerpeptid G2m(-n)|4 ist ebenfalls gekennzeichnet. Das monoisotopische m/z-Verhältnis der Markerpeptide wurde mit ± 0,5 amu detektiert.

Um die Unterschiede während der Probenaufbereitung und der Ionisationseffizienz im MS auszugleichen wurden die *Response*-Verhältnisse der Markerpeptide innerhalb einer Gruppe ermittelt. Dies gelang durch Messung von Kontrollserum (Firma *The Binding Site*), dessen IgG-Subklassenkonzentrationen bekannt waren (Tabelle 3-23).

Tabelle 3-23: Bestimmung der *Response*-Faktoren der isotypischen Markerpeptide von IgG für die „relative" Quantifizierung. Es wurde Kontrollserum der Firma *The Binding Site* verwendet. Neben der Standardabweichung (SA) ist der Variationskoeffizient (VK) vom Mittelwert (Ø) angegeben.

Marker	relative Peakflächen in Prozent												
	Referenzserum								Ø	SA	VK	Sollwert	Response-
	1	2	3	4	5	6	7	8			%	%	faktor
G1|3	67	63	62	62	64	60	64	64	63	2	3	**63,3**	**1,0**
G2	20	19	21	19	22	20	19	20	20	1	5	**33,1**	**1,7**
G4	13	17	17	19	15	20	18	16	17	2	13	**3,6**	**0,2**
G1	92	91	90	90	93	90	93	90	91	1	2	**91**	**1,0**
G3	8	9	10	10	7	10	7	10	9	1	16	**9**	**1,1**

Der Variationskoeffizient (VK, n = 8) der ermittelten Markerkonzentrationen lag unter 16 %. Trotz der Ähnlichkeit der Markerpeptide ist das Verhalten während der Probenaufbereitung bzw. die Ionisierungseffizienz unterschiedlich, was sich in den unterschiedlichen *Response*-Faktoren widerspiegelt.

Eine 6-fache Bestimmung der relativen IgG-Subklassenkonzentrationen in einem anderen Kontrollserum (Firma *The Binding Site*) unter Einbeziehung der *Response*-Faktoren führte zu einer Richtigkeit von < 12 % für alle IgG-Subklassen (Tabelle 3-24).

Tabelle 3-24: Präzision und Richtigkeit für die „relative“ Quantifizierung der IgG-Subklassen. Es wurde Kontrollserum der Firma *The Binding Site* verwendet. Neben der Standardabweichung (SA) ist der Variationskoeffizient (VK) vom Mittelwert (Ø) angegeben. Die Richtigkeit der Messung wird durch die prozentuale Abweichung des Mittelwerts vom Sollwert angegeben.

Subklasse	relative Peakflächen in Prozent										
	Referenzserum						Ø	SA	VK	Sollwert	Richtigkeit
	1	2	3	4	5	6			%	%	%
IgG1	60	58	56	56	61	58	58	2	4	**57,3**	1
IgG2	32	32	34	34	31	32	33	2	5	**33,1**	-2
IgG3	5	6	7	7	5	7	6	1	10	**6,0**	2
IgG4	3	4	3	4	4	3	3,2	0,5	15	**3,6**	-12

Die Linearität der Mengenbestimmung für die einzelnen Markerpeptide wurde nicht weiter überprüft, allerdings waren die Ergebnisse der „relativen“ Quantifizierung der IgG-Subklassen mittels der Massenspektrometrie in guter Übereinstimmung mit den RID-Messungen von angereicherten Proben einzelner IgG-Subklassen, bei denen die Konzentrationsverhältnisse stark von den Normalwerten in Human-Plasma abweichen. Für Fragestellungen, bei denen keine absoluten IgG-Konzentrationen erforderlich waren, bietet diese Art der Quantifizierung daher eine einfache und schnelle alternative zu den RID-Messungen, bei denen der Äquivalenzpunkt erst nach 62 h erreicht wird.

3.7 Quantifizierung der IgG-Subklassen mittels LC/ESI-MS/MS

Die letzte experimentelle Phase (Abbildung 3-15), bei der die „absolute“ Quantifizierung einzelner Immunglobuline im Zentrum stand, wurde für die vier IgG-Subklassen durchgeführt. Die Quantifizierung wurde, wie die vergleichende Quantifizierung, mit den isotypischen Markerpeptiden G1, G2, G3 und G4 erreicht. Es wurde Human-Plasma verwendet, welches ohne weitere Reinigungsschritte mit der Endoprotease GluC verdaut wurde. Neben Zeit- und Kostenersparnis hatte dies den Vorteil, dass eine mögliche Selektivität bei der Reinigung IgG durch die DEAE-Chromatographie, Protein A oder Protein G vermieden wurde. Die Chromatographie konnte im Vergleich zum qualitativen *Peptide Mapping* von 240 min auf 45 min verkürzt werden. Die Quantifizierung der IgG-Subklassen mittels der MS^1-Ionenspuren der isotypischen Markerpeptide war in einem Totalverdau von Human-Plasma anders als in einem Verdau gereinigter IgG nicht möglich, da die Ionenspuren durch Matrixsignale stark verrauscht waren. Eine hohe Spezifität wurde erst durch LC/ESI-MS/MS-Experimente erreicht.

3.7.1 Identifizierung und Charakterisierung eines geeigneten internen Standards

Das Finden eines geeigneten internen Standards (IS) war von zentraler Bedeutung für die Quantifizierung, um Schwankungen ausgehend von der Probenaufbereitung bis hin zur Ionisisierung jedes Markerpeptids im MS-Instrument zu kompensieren.

Eine Bedingung, die zu Beginn an einen möglichen IS gestellt wurde, war die strukturelle Homologie zu humanem IgG. Dabei sollte aus Kostengründen auf isotopenmarkierte Substanzen verzichtet werden. Proteine, die dieses Kriterium erfüllten, waren IgG anderer

Organismen. Das kommerziell erhältliche murine IgG1, welches eine Sequenzidentität von mehr als 61 % zu humanen IgG1 hat, wurde ausgewählt. Es verhielt sich während der Probenaufbereitung, die neben der reduktiven Alkylierung den GluC-Verdau beinhaltete, ähnlich wie humanes IgG.

Tabelle 3-25: Interne Standardpeptide (IS1 und IS2) aus murinem IgG1 zur Quantifizierung der humanen IgG-Subklassen im Vergleich zu den struktruell homologen Peptiden der einzelnen Subklassen.

Peptid	Organismus	Sequenz
G2	human	YKCKVSNKGLPAPIE
G4	human	YKCKVSNKGLPSSIE
IS1	murine	**FKCRV**NSAAF**P**AP**IE**
G1	human	VKFNWYVDGVE
G3	human	VQFKWYVDGVE
IS2	murine	**VQFSWF**V**D**DV**E**

Beim GluC-Verdau von murinen IgG1 entstehen zwei Peptide, die den beiden Gruppen von Markerpeptiden (G2 und G4 sowie G1 und G3) strukturell ähnlich sind (Tabelle 3-25). Wurden zu Beginn noch beide Peptide als IS für die jeweiligen Gruppen verwendet, zeigte sich später, dass die Verwendung des IS1-Peptids für alle Markerpeptide ausreichte. Dies war möglich, obwohl das IS1-Peptid keine strukturelle Ähnlichkeit mit den Markerpeptiden G1 und G3 hat und an anderer Stelle in der Primärstruktur des Proteins lokalisiert ist.
Feng et al.[117] zeigten schon am Beispiel des Bradykinin Antagonisten B201, dass für die Quantifizierung von Peptiden die Verwendung eines strukturell ähnlichen Peptids nicht zwingend notwendig ist. Dieses gilt auch in diesem Fall und kann außerdem auf die Position des IS-Peptids in der Primärstruktur des IS-Proteins erweitert werden.

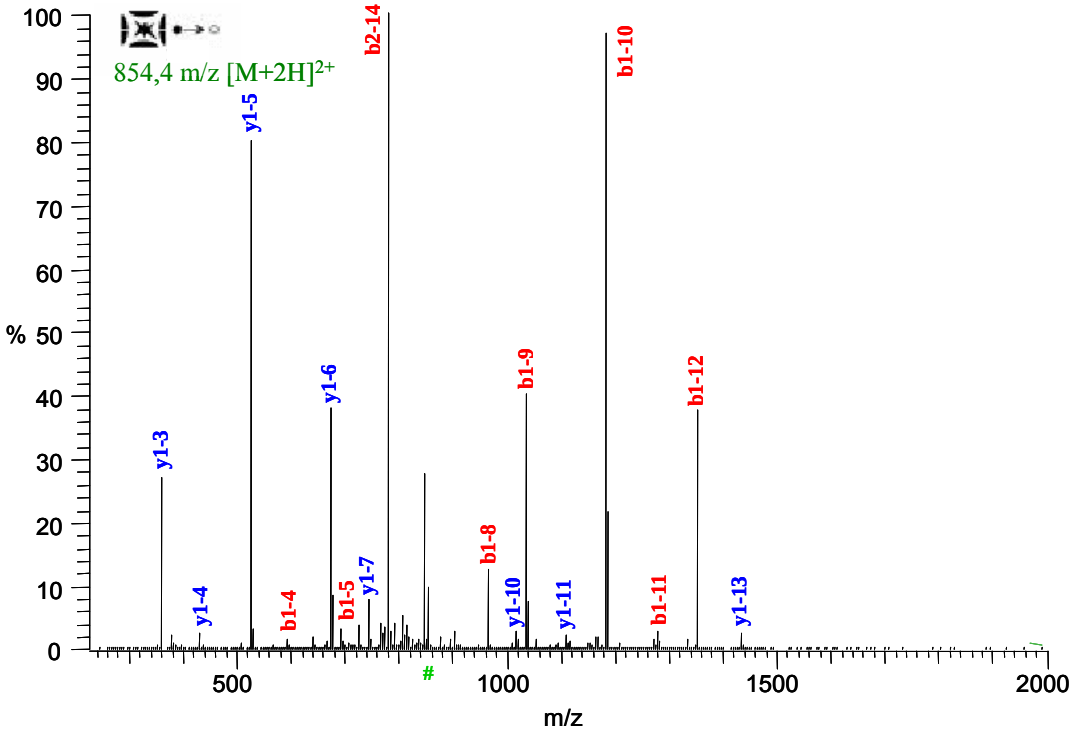


Abbildung 3-43: MS/MS-Spektrum des internen Standardpeptids IS1 aus GluC-verdautem murinem IgG1 (Myelomaproduktion).

Das IS1-Peptid trat unter den gewählten ESI-Bedingungen dominant im zweifachen Ladungszustand auf, welcher auch für das nachfolgende MS/MS-Experiment ausgewählt wurde.
Das Fragmentierungsverhalten des IS1-Peptids (Abbildung 3-43) wird, entsprechend der Markerpeptide G2 und G4, durch Brüche der Peptidbindungen benachbart zu den beiden Prolinen an den Positionen 11 und 13 bestimmt. Dadurch entstehen bevorzugt die beiden Fragmentionen b1-10 der b-Ionenserie und das korrespondierende y1-5 der y-Ionenserie. Die MS/MS-Spektren aller isotypischen Markerpeptide wurden bereits im Kapitel 3.4 beschrieben.

3.7.2 Selektivität der SRM-Übergänge für die Markerpeptide G1, G2, G3 und G4 sowie dem internen Standardpeptid

Um zu gewährleisten, dass die Signale der Markerpeptide selektiv sind und keine durch die Matrix verursachten Fremdsignale enthalten, mussten die SRM-Spuren der Markerpeptide sowie des internen Standardpeptids in Leermatrix, die keine Analyten enthält, überprüft werden. Die Vorläufer- und Fragmentionen der SRM-Experimente sowie die Retentionszeiten der Markerpeptide und des IS1-Peptids sind in Tabelle 3-26 dargestellt.

Tabelle 3-26: SRM-Übergänge zur Quantifizierung der IgG-Subklassen. Die Retentionszeiten (R.T.) beziehen sich auf ein verkürztes LC/ESI-MS/MS-Experiment (45 min).

Marker	**SRM-Übergang** [m/z]			**R.T.**
	Vorläuferion [Av.]	Fragmention [Av.]	[Mo.]	[min]
isotypische Markerpeptide				
IS1	855,0 (+2)	1183,4 (b1-10)	1182,6	16,5
G2	853,5 (+2)	1180,4 (b1-10)	1179,6	12
G4	856,5 (+2)	1180,4 (b1-10)	1179,6	11
G1	678,8 (+2)	938,1 (b1-7)	937,5	22
G3	685,8 (+2)	952,1 (b1-7)	951,5	22

Unter den LC-Bedingungen wurden alle Peptide bis auf die Markerpeptide G1 und G3 chromatographisch getrennt. Letztere koeluierten aufgrund ihrer hohen strukturellen Homologie.
Es wurde eine optimale Empfindlichkeit erreicht, wenn die Vorläufer- und Fragmentionen ausgehend vom durchschnittlichen m/z-Verhältnissen (Av.) mit einer Breite von ± 1,5 amu selektiert wurden. Zur Bestimmung der Peakflächen wurde für eine höhere Selektivität allerdings die monoisotopische (Mo.) Ionenspur (± 0,5 amu) des Fragmentions verwendet.

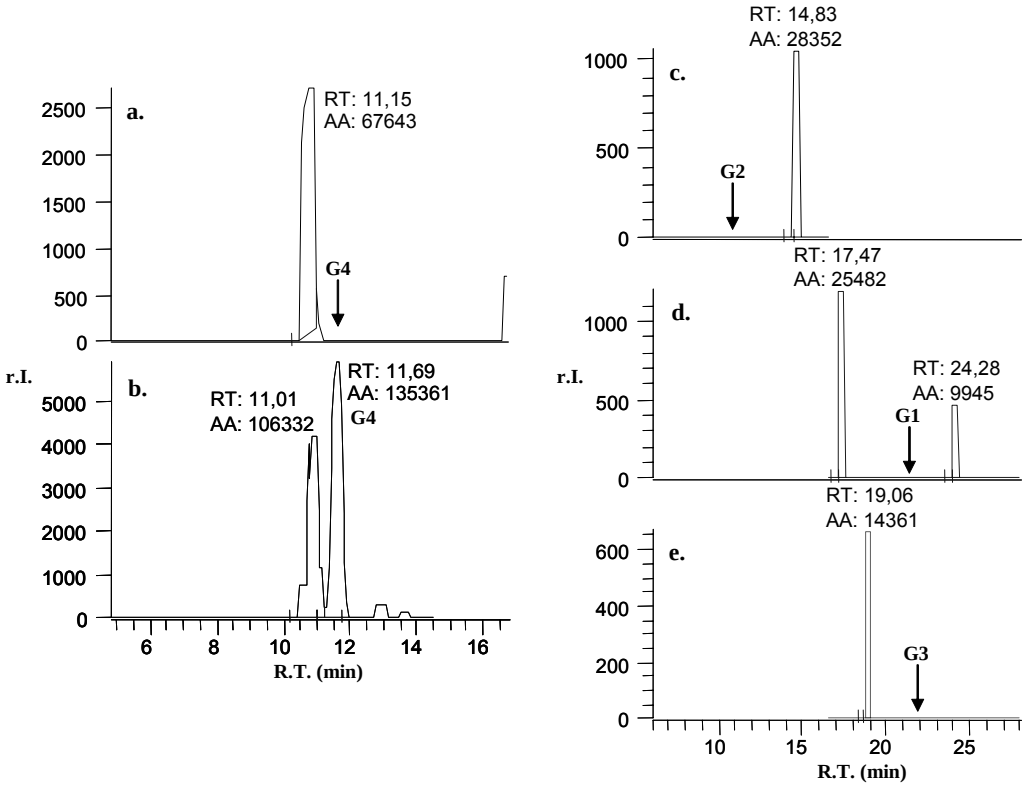


Abbildung 3-44: Ionenspuren der isotypischen Markerpeptide in mit internem Standard (IS) versetztem Leerplasma (LP); **a** – Markerpeptid G4 in LP + IS, **b** – G4 in 1/10 verd. Human-Plasma, **c** – Markerpeptid G1 in LP + IS, **d** – Markerpeptid G2 in LP + IS, **e** – Markerpeptid G3 in LP + IS.

Zu den erwarteten Retentionszeiten waren weder Signale des IS-Peptids in Human-Plasma noch Signale der Markerpeptide G1, G2 und G3 im mit IS versetzten Leerplasma, welches kein humanes IgG enthielt (Abbildung 3-44), vorhanden. Das SRM-Spektrum des G4-Markerpeptids zeigte ein Matrixsignal. Dieses Signal ließ sich aber aufgrund einer Retentionszeitverschiebung eindeutig vom Signal des G4-Markerpeptids unterscheiden. Der Assay ist somit selektiv.

3.7.3 Linearität der Markerpeptide G1, G2, G3 und G4

Die Linearität der Markerpeptide musste in einem geeigneten Konzentrationsbereich überprüft werden, um eine Kalibrierung zu ermöglichen.

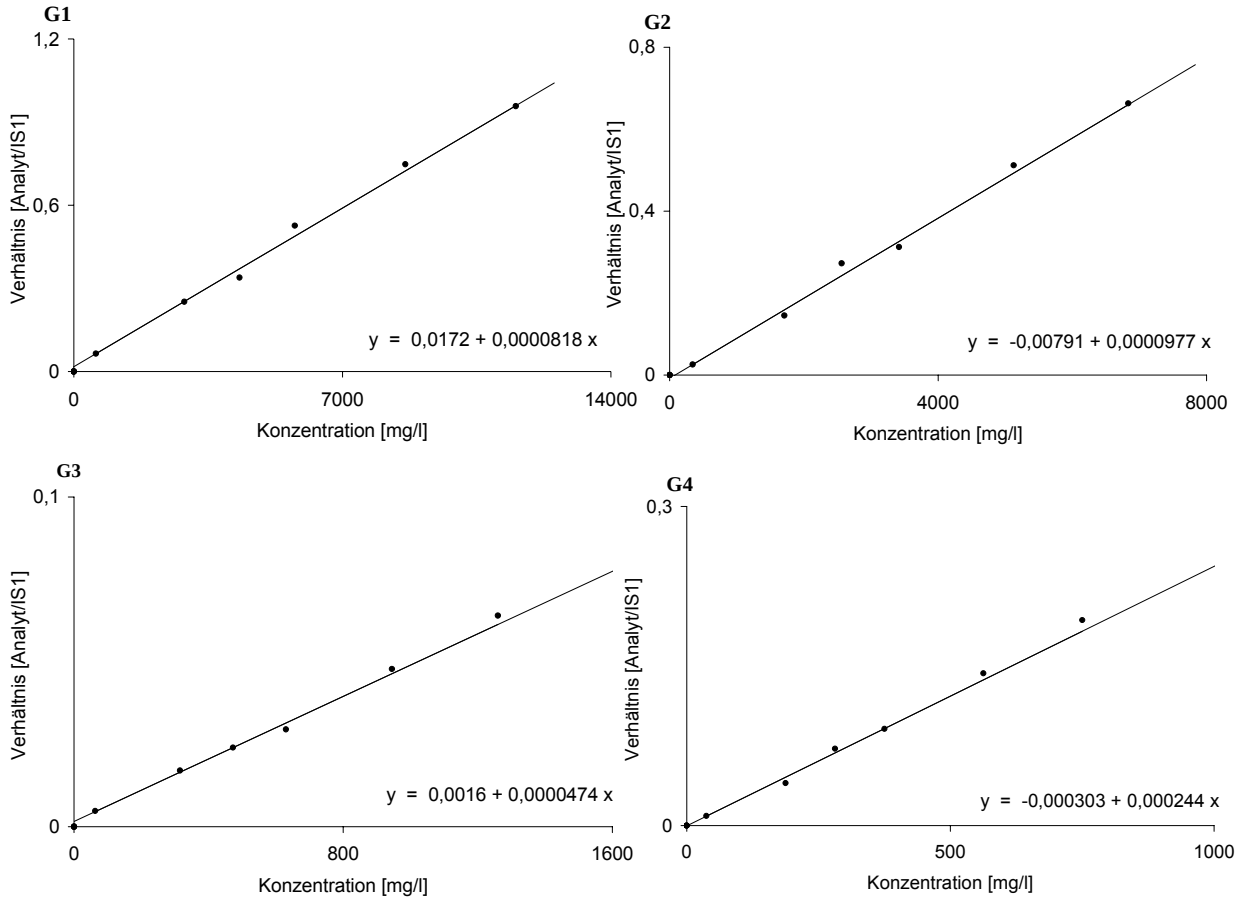


Abbildung 3-45: Überprüfung der Linearität der isotypischen Markerpeptide. Für die Erstellung der Kalibriergraden wurde eine Verdünnungsreihe (5, 25, 37.5, 50, 75, 100 %) Kontrollserum (*The Binding Site*) in Leermatrix verwendet.

Die Linearität der isotypischen Markerpeptide wurde in einem Messbereich von 5 % bis 100 % der normalen Plasmakonzentration der einzelnen IgG-Subklassen überprüft (Abbildung 3-45). Es wurde keine Empfindlichkeitsoptimierung durchgeführt, so dass die geringste Konzentration nicht dem unteren Limit der Quantifizierung (LOQ) entsprechen muss. Der Koeffizient der gewichteten linearen Regression betrug in allen Fällen mehr als 0,995. Somit ist eine ausreichende Linearität in diesem Konzentrationsbereich gegeben.

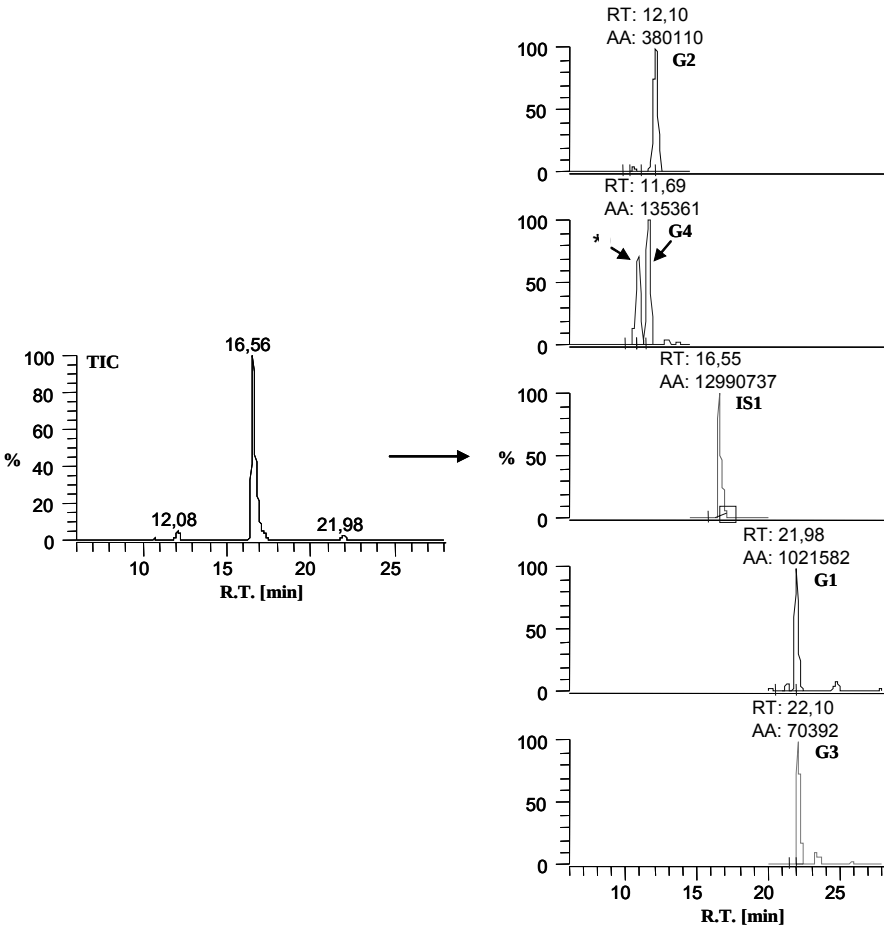


Abbildung 3-46: SRM-Spektren der Markerpeptide G1 – G4 bei 10 % der durchschnittlichen Serumkonzentration in 20 µl Plasma. Neben den Signalen der einzelnen Markerpeptide ist das Matrixsignal (*) der Leermatrix gekennzeichnet.

Die Signale der einzelnen Markerpeptide bei der geringsten Konzentration (5 %) sind in Abbildung 3-46 im Vergleich zum IS1-Peptid dargestellt. Dies entsprach 576 µg/ml IgG1, 342 µg/ml IgG2, 63 µg/ml IgG3 und 38 µg/ml IgG4 ausgehend von 20 µl Human-Plasma.

3.7.4 Präzision und Richtigkeit der absoluten Quantifizierung

Die Methode wurde im Bezug auf die Präzision und Richtigkeit innerhalb eines Messtages (eng. *within-day*) bei der Hälfte der normalen Plasmakonzentration überprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-27 zusammengestellt.

Tabelle 3-27: Bestimmung von Präzision und Richtigkeit bei der Quantifizierung der IgG-Subklassen innerhalb eines Messtages bei 50 % der durchschnittlichen Plasmakonzentration. Für die 6-fache Bestimmung wurde Kontrollserum der Firma *The Binding Site* verwendet.

Subklasse	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Messungen innerhalb eines Tages / [mg/l]				
1	2699	1971	318	189
2	3055	1758	333	195
3	3111	2066	365	185
4	3516	2155	426	206
5	2900	1663	392	168
6	2434	1945	248	153
Kontrollserum	3010	1779	315	198
Ø	2952	1926	347	183
± SA	371	185	62	19
VK [%]	13	10	18	10
Richtigkeit [%]	-2	8	10	-8

Der Variationskoeffizient (VK, n = 6), der hier die prozentuale Standardabweichung innerhalb eines Messtages beschreibt, lag außer bei der Konzentrationsbestimmung des IgG3 (18 %) unter 15 %. Die Richtigkeit, die die prozentuale Abweichung der gemittelten Ergebnisse von den Sollwerten angibt, lag unter 10 %. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Quantifizierung der IgG-Subklassenkonzentrationen massenspektrometrisch möglich ist.

Die Empfindlichkeit der Methode wurde nicht optimiert. Dennoch liegt sie im µg/ml-Bereich und ist damit bereits ausreichend sensitiv, um Schwankungen aller IgG-Subklassenkonzentrationen von gesunden oder auch kranken Personen zu verfolgen. Die Empfindlichkeit ist vergleichbar der RID-Methodik, welche ebenfalls im µg/ml-Bereich liegt. Durch Übertragung der Methodik auf nano-LC/ESI-MS ist eine Empfindlichkeitssteigerung bis hinein in den ng/ml-Bereich möglich, wie er für die Quantifizierung von IgE mit einer normalen Serumkonzentration von 0,1 – 1,4 µg/ml erforderlich wäre. Dies entspräche der Empfindlichkeit ELISA-basierter Assays.

Im Gegensatz zu einem vergleichbaren Ansatz zur Quantifizierung von Proteinen konnte hier vollständig auf isotopenmarkierte Peptide als interne Standards verzichtet werden. Gerber et al.[112] verwendeten ^{13}C-markierte Peptide als interne Standards, um Proteine zu quantifizieren. Dies hat, neben den hohen Kosten, den Nachteil, dass der Analyt erst auf der Peptidebene simuliert wird. Die vorherige Probenaufbereitung und die Proteolyse des Analytproteins werden somit nicht abgedeckt.

Die Verwendung von Proteinen mit hoher Sequenzhomologie, sofern diese verfügbar sind, stellt in diesem Fall eine sehr gute Alternative zu isotopenmarkierten internen Standards dar. Proteine mit hohen Sequenzhomologien können aus demselben oder anderen Organismen stammen. Bei der Verwendung intakter Proteine als interner Standard wird nicht nur die Peptidebene simuliert, sondern der gesamte Weg der Probenaufbereitung. Es bleibt abzuwarten, ob diese Methodik auf die Quantifizierung anderer Proteine übertragen werden kann. Wenn dieses der Fall ist, wurde hier ein kostengünstiger und einfacher Weg gezeigt, um Proteine mit der Größe eines Ig (~ 150 kDa) zu quantifizieren.

3.8 IgG-Subklassen- und Allotypenverteilungen in verschiedenen IVIG-Präparationen

Die entwickelte Methodik zur Ermittlung der IgG-Subklassen- (Kapitel 3.6) und Ig-Allotypen (Kapitel 3.7) wurde verwendet, um IVIG-Präparationen verschiedener Hersteller untereinander und diese mit gepooltem Human-Plasma verschiedener Herkunft zu vergleichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-28 zusammengestellt. Die IgG-Fraktionen der verschiedenen Human-Plasmen wurden mit Protein G-Chromatographie gereinigt, welche keine Selektivität hinsichtlich verschiedener Allotypen oder Subklassen besitzt[22].

Tabelle 3-28: IgG-Subklassen- und Allotypenverteilung von Human-Plasmen im Vergleich zu verschiedenen IVIG-Präparationen. Die Herstellerangaben sind in Klammern angegeben. Der Variationskoeffizient (VK) der Methode wurde aus Kontrollserum der Firma *The Binding Site* (n = 6) bestimmt und beträgt weniger als 16 %. Angegeben sind die relativen Peakflächen in Prozent. Bei der Herstellerangabe des Produkts Hyland Immuno handelt es sich um Minimalwerte (*).

	Subklassen				G1m			G2m		G3m	
Produkt	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	f-a-x	za-x	zax	-n	n	b1	g5
Flebogamma	61 (69)	32 (26)	4 (4)	3 (2)	33	63	4	69	31	95	5
Hyland Immuno	65 (63*)	28 (22*)	6 (5*)	2 (0*)	43	54	3	63	37	85	15
Octagam	65 (64)	29 (29)	4 (6)	2 (1)	40	55	5	70	30	81	19
Polyglobin	61 (65)	28 (25)	7 (6)	4 (4)	24	70	7	82	18	97	3
Plasma (Europa)	58	32	6	4	50	43	7	69	31	86	14
Plasma (Amerika)	63	29	4	3	38	57	5	85	15	97	3

Die Bestimmung der IgG-Subklassenanteile mittels MS (Kaptiel 3.6) stimmte mit den Herstellerangaben überein. Die Abweichungen lagen unter ± 20 %. Außerdem war innerhalb der Messpräzision kein Unterschied zwischen der relativen IgG-Konzentration von amerikanischem und europäischem Plasma erkennbar.

Die Subklassenverteilungen der IVIG-Präparationen wichen von denen der humanen Poolplasmen nicht signifikant ab. Einzig der Anteil der Subklasse IgG4 lag bei den Präparationen Hyland Immuno und Octagam unterhalb des durchschnittlichen IgG-Anteils von 3 %. Der Anteil lag aber denoch, wie auch der aller anderen IgG-Subklassen, innerhalb der Schwankungen, die bei gesunden Individuen beobachtet werden. Ein zu geringer IgG4-Anteil (< 1,5 %), wie er in IVIG-Präparationen anderer Hersteller in früheren Untersuchungen beobachtet wurde[137], konnte hier nicht nachgewiesen werden.

Mit einem Variationskoeffizienten der Methode unter 16 % konnten auch die Allotypenverteilungen in den IVIG-Präparationen gegeneinander verglichen werden. Die Verteilung der IgG1-Allotypen wurde zusätzlich durch die Charakterisierung der Fcγ1-Fragmente der verschiedenen IVIG-Präparationen und der verschiedenen Poolplasmen (Abbildung 3-53) belegt.

Der Anteil des IgG1-Allotyps G1m(za-x) ist im Vergleich zu den Allotypen G1m(f-a-x) und G1m(zax) in allen IVIG-Präparationen am größten. In den IVIG-Präparationen Polyglobin und Flebogamma ist dieser mit einem Anteil von mehr als 60 % dominant. Dieses ist im europäischen Poolplasma, bei denen der G1m(f-a-x)-Allotyp den höheren Anteil besitzt, nicht gegeben. Eine vergleichbare Allotypenverteilung findet sich aber in amerikanischem Poolplasma, welches zur Herstellung aller untersuchten IVIG-Präparation verwendet wird.

Die Verschiebung der Allotypenverteilung des IgG1 war somit nicht produktionsbedingt. Vielmehr scheint der Einfluss verschiedener Populationsgruppen auf das bei der Herstellung verwendete Poolplasma entscheidend zu sein.

Tabelle 3-29: Haplotypenverteilung in der negroiden Population.

Haplotyp			Häufigkeit
G1m	G2m	G3m	[%]
za-x	-n	b	67,8
za-x	-n	c3c5	20,3
za-x	-n	c3	6,1
za-x	-n	s	5,1
		Sonstige	0,7

Die negroide Population besitzt ausschließlich den IgG1-Allotypen G1m(za-x) (Tabelle 3-29)[31,40]. Ein höherer Plasma-Anteil von Individuen dieser Population neben dem kaukasischer Individuen im amerikanischen Poolplasma, würde somit zu einer Erhöhung des IgG1-Allotypen G1m(za-x) im Vergleich zu europäischem Poolplasma führen.
Das Verhältnis der G3m-Markerpeptide unterstützt diese Vermutung. Der G3m(b1)-Marker ist nicht nur positiv für den G3m(b)-Allotypen, sondern auch für die IgG3-Allotypen G3m(c3) und G3m(c3c5), die nur in negroiden Populationen auftreten[40]. Der G3m(g5)-Marker tritt dagegen nur in Kombination mit den G1m(za-x)- und G1m(zax)-Allotypen bei Haplotypen kaukasischer Individuen auf[31].
Der geringe Anteil des G3m(g5)- im Vergleich zum G3m(b1)-Markerpeptid in den Präparationen Polyglobin und Flebogamma und vor allem im amerikanischen Poolplasma ergänzt somit die Vermutung, dass der Plasma-Anteil negroider Individuen in amerikanischem Poolplasma größer ist.
Oxelius et al. führte in einer vergleichbaren Studie, in der andere IVIG-Präparationen untersucht wurden, die Unterschiede in der Allotypenverteilung im Vergleich zu Normalserum von mehr als 500 kaukasischer Individuen auf den Herstellungsprozess zurück[148]. Dagegen scheint die unterschiedliche Allotypenverteilung der verschiedenen IVIG-Präparationen hier vor allem ein Resultat der Verwendung amerikanischen Poolplasmas zu sein.
Unterschiedliche IVIG-Präparationen enthalten unterschiedliche Mengen spezifischer Antikörper[152] und die verschiedenen IgG-Allotypen und die Menge spezifischer Antikörper ist ebenfalls von allotypenabhängige[18]. Individuen mit dem G2m(n)-Genotyp besitzen mehr Antikörper gegen Polysaccharide als solche, die den G2m(-n)-Genotyp besitzen[153]. Daher kann die Allotypenverteilung der IVIG-Präparationen mit dem Gehalt an spezifischen Antikörpern korrelieren. Dieses mag auch auf den Gehalt spezifischer Antikörper in verschiedenen Populationen erweiterbar sein, da die Allotypenverteilung populationsbedingt ist. Die Zusammensetzung spezifischer Antikörper in IVIG-Präparationen könnte somit durch die Art des Spenerplasmas beeinflusst werden.

Teil II – Glykosylierung von IgG

3.9 Glykosylierung von IgG1 und Charakterisierung von Fcγ1-Fragmenten

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Aminosäuresequenz der konstanten Bereiche von IgG-Subklassen und Allotypen betrachtet. Im zweiten Teil wird nun die konservierte Glykosylierung der IgG behandelt. Die Mikroheterogenität der N-Glykosylierung an Asn-297 resultiert (Kapitel 1.3.1) aus Variationen der Oligosaccharidkernstruktur (biverzweigendes N-Acetylglucosamin (+Nag), Defukosylierung (-Fuc)) sowie einer variablen Galaktosylierung (G0, G1, G2) und Sialysierung (+Sia) der Oligosaccharide. Die verschiedenen Glykospezies, die aus diesen Variationsmöglichkeiten auf der Ebene der reduzierten und in Kombination auf der Ebene des intakten Fc-Fragments resultieren, wurden in der Einleitung vorgestellt (Kapitel 1.3.1).
Die Mikroheterogenität wurde bereits in nativen Gelen, IEF-Gelen und MALDI-Spektren (Kapitel 3.1.3) anhand des Fcγ1-Fragments nachgewiesen. Eine verbesserte Auflösung des mikroheterogenen Signals war aber erst durch ESI-MS-Messungen (Abbildung 3-60) am intakten Fc-Fragment möglich.

3.9.1 Bestimmung des Glykosylierungsprofils von IgG1

- **Identifizierung der Glykospezies von IgG1**

Im Folgenden wird die Glykosylierung am Beispiel von IgG1 in europäischem Human-Plasma beschrieben. Die Glykospezies von IgG1 wurden anhand des Glykopeptids mittels LC/ESI-MS und LC/ESI-MS/MS charakterisiert. Das Glykopeptid wurde zuvor durch einen GluC-Verdau von gereinigtem IgG erzeugt. Dieses GluC-Glykopeptid war in allen Allotypen des IgG1, aber in keiner anderen Subklasse enthalten und somit spezifisch für IgG1 (Abbildung 3-47).

QY**N**STYRVVSVLTVLHQDWLNGKE

Abbildung 3-47: Aminosäuresequenz des Glykopeptids aus IgG1; die N-Glykosylierungsstelle ist blau markiert.

Das Glykopeptid trat unter den gewählten ESI-Bedingungen hauptsächlich im dreifachen Ladungszustand auf. Die einzelnen Glykospezies konnten chromatographisch nicht getrennt werden, zeigten aber leichte Retentionszeitverschiebungen. Sie eluierten in einem Retentionszeitfenster zwischen 165 – 175 min. Das ESI-MS-Spektrum (Abbildung 3-48) in diesem Retentionszeitbereich zeigt die Mikroheterogenität der Glykosylierung.

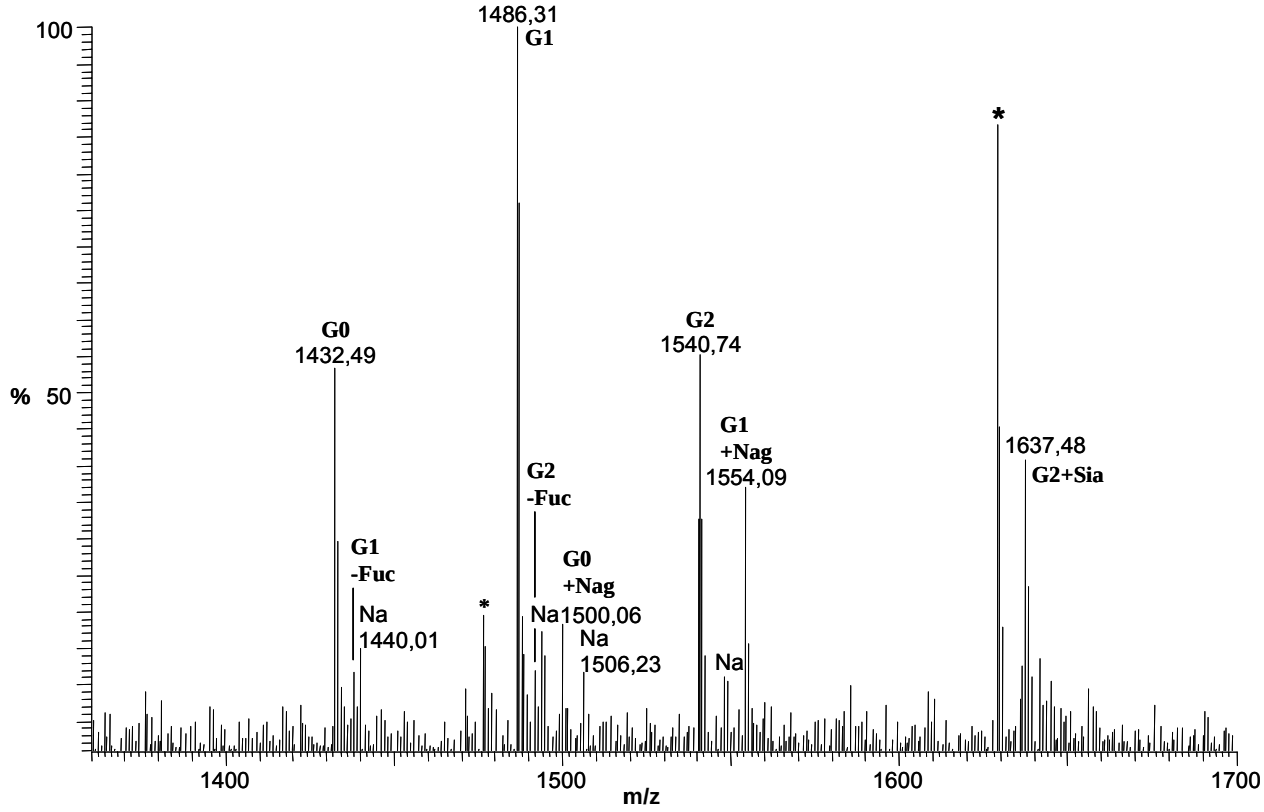


Abbildung 3-48: ESI-MS-Spektrum des GluC-Glykopeptids von IgG1 aus europäischem Poolplasma. Die gekennzeichneten Signale stammen von Fremdpeptiden (*).

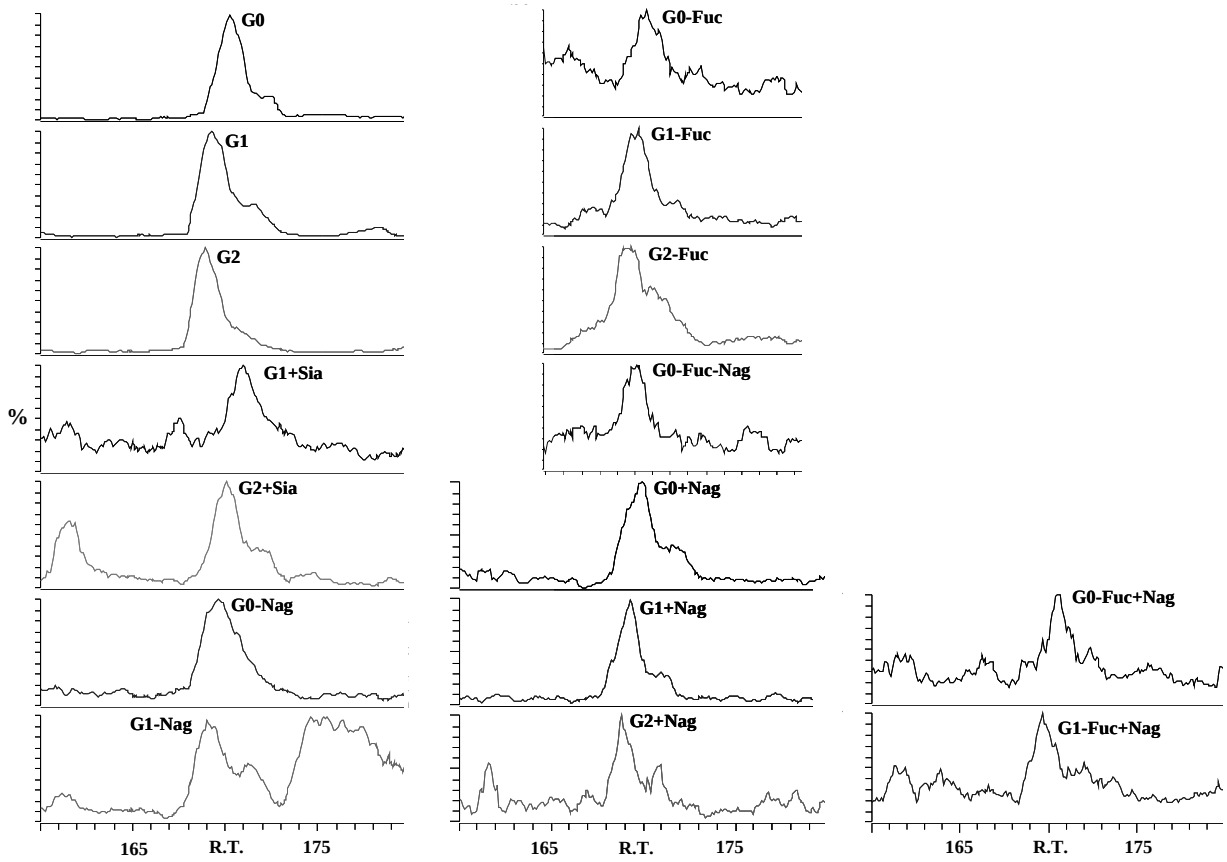


Abbildung 3-49: Ionenspuren der einzelnen Glykospezies des IgG1-Glykopeptids. Die durchschnittlichen m/z-Verhältnisse des dreifachen Ladungszustandes (Tabelle 3-30) wurden in einem Bereich von ± 0,5 amu selektiert.

Die variabel galaktosylierten Glykospezies G0, G1 und G2 zeigten die intensivsten Signale. Neben den weiteren intensiven Glykospezies mit biverzweigendem N-Acetylglucosamin (G0+Nag, G1+Nag) und sialinsäurehaltigen Glykospezies G2+Sia gab es auch solche mit geringer Intensität. Diese konnten anhand ihrer Ionenspuren identifiziert werden (Abbildung 3-49). Bei den Ionenspuren der einzelnen Glykospezies fiel der Doppelpeak auf, der aber durch die Deamidierung des Asparagins an Position 21 erklärt werden konnte. Robinson et al.[154] zeigten, dass zu Glycin und Leucin benachbartes Asparagin (Motiv - L**N**G) besonders schnell deamidiert.

Die Glykospezies, deren Glykostruktur anhand der MS/MS-Spektren überprüft werden konnten, wurden eindeutig identifziert. Das MS/MS-Spektrum der G1-Glykospezies ist in Abbildung 3-50 dargestellt.

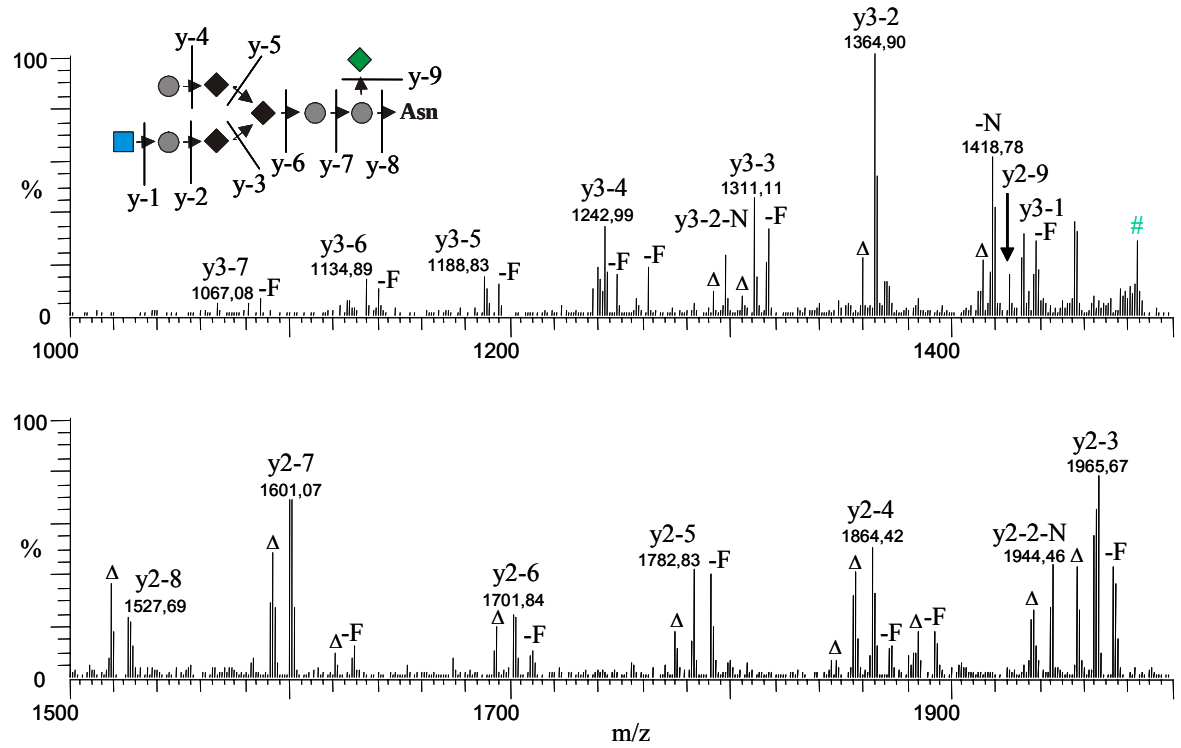


Abbildung 3-50: ESI-MS/MS-Spektrum der G1-Glykospezies des Glykopeptids vom IgG1. Neben den zweifach (y2) und dreifach (y3) geladenen y-Ionenserien sind Wasser (-Δ), Fukose- (-F) und N-Acetylglukosaminverluste (-N) gekennzeichnet..# markiert das Vorläuferion. In der schematischen Darstellung des G1-Oligosaccharids ist Fukose grün, Nag grau, Mannose schwarz und Galaktose blau dargestellt.

Im MS/MS der Glykopeptide fragmentiert, aufgrund der geringeren Bindungsenthalpien der glykosidischen Bindungen im Vergleich zu den Peptidbindungen, nur das Oligosaccharid. Fragmentierungen entlang des Peptidrückgrats werden nicht beobachtet. Das MS/MS-Spektrum wird durch eine Überlagerung der zweifach- und dreifachgeladenen y-Ionenserien geprägt. Fragmentionen der b-Ionenserie, denen der Peptidanteil fehlt, wurden nicht gebildet. Die zweiantennige, fukosylierte Struktur des Oligosaccharids wird vollständig bis hin zum Fragmention y2-9, welches vollständig deglykosyliert ist, abgedeckt. Neben dem dargestellten Fragmentierungsweg sind auch Fragmentionen zu finden, die durch alternative Fragmentierungen gebildet werden. Dazu zählt hauptsächlich der Verlust der Fukose (-F),

aber auch der Verlust eines N-Acetylglucosamins (-N) ausgehend vom y-2-Fragmention. Alle Fragmentionen sind durch eine intensive Wassereliminierung (∆) gekennzeichnet.
Die Ergebnisse der Identifizierung und Charakterisierung der IgG1-Glykospezies sind in Tabelle 3-30 zusammengefasst.

Tabelle 3-30: Glykospezies von IgG1. Diejenigen, die mittels ESI-MS und/oder -MS/MS anhand des Glykopeptids im *Peptide Map* von GluC-verdautem IgG identifiziert wurden, sind gekennzeichnet. Die drei variabel galaktosylierten Hauptkomponenten G0, G1 und G2 sind hervorgehoben. Das IgG wurde aus europäischem Poolplasma (*Deutsches Rotes Kreuz*) mittels Protein A-Chromatographie isoliert. Die m/z-Verhältnisse beziehen sich auf den Ladungszustand 3+ des Glykopeptids.

Glykan	m/z (+3) [Av]	LC/ESI-MS/MS	LC/ESI-MS
G0-Fuc-Nag	1315,8		x
G0-Nag	1364,5	x	x
G1-Fuc-Nag	1369,8		
G0-Fuc	1383,5		x
G1-Nag	1418,5		x
G0	1432,2	x	x
G1-Fuc	1437,6	x	x
G0-Fuc+Nag	1451,3		x
G1	1486,3	x	x
G2-Fuc	1491,6	x	x
G0+Nag	1500,0	x	x
G1-Fuc+Nag	1505,3		x
G1-Fuc+Sia	1534,7		
G2	1540,3	x	x
G1+Nag	1554,0	x	x
G2-Fuc+Nag	1559,3		
G1+Sia	1583,4		x
G2-Fuc+Sia	1588,7		
G1-Fuc-Nag+Sia	1602,4		
G2+Nag	1608,0		x
G2+Sia	1637,4	x	x
G1+Nag+Sia	1651,1		
G2-Fuc+Nag+Sia	1656,4		
G2-Fuc+2Sia	1685,8		
G2+Nag+Sia	1705,1		
G2+2Sia	1734,5		
G2-Fuc+Nag+2Sia	1753,5		
G2+Nag+2Sia	1802,2		

Es konnten 16 Glykospezies von IgG1 identifiziert werden, von denen neun mit MS/MS charakterisiert wurden. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit denen von Saba et al., die 19 Glykospezies des IgG mittels LC/ESI-MS identifizierten, davon aber nur fünf auch mittels MS/MS[155]. Allerdings konnten einzelne IgG-Subklassen nicht getrennt betrachtet werden, da der Glykanpool getrennt vom Proteinanteil untersucht wurde.
Die massenspektrometrische Methode besitzt gegenüber HPLC-Methoden den Vorteil, dass isobare Glykospezies mit unterschiedlicher Struktur im MS/MS unterscheidbar sind. Glykane, die sich von den vier möglichen Oligosaccharidkernstrukturen ableiten, sind im MS/MS unterscheidbar. Die Variationen der Kernstruktur entstehen durch variable Fukosylierung und Einführung des biverzweigenden N-Acetylglucosamins. Analog dem Verlust von Fukose

werden bei Glykospezies mit einem biverzweigenden N-Acetylglucosamin (+Nag) Fragmentionen im MS/MS durch den alternativen Verlust von N-Acetylglucosamin gebildet. Bei entsprechenden HPLC-Methoden können die Glykospezies dagegen nur unter Verwendung von Standards bestimmt werden. Eine Analyse der Zusammensetzung einzelner Glykospezies ist hingegen nicht zugänglich.

- **Quantifizierung des Glykosylierungsprofils von IgG1**

Nach der qualitativen Bestimmung der Glykosylierung von IgG1 wurde das Glykosylierungsprofil quantifiziert. Das Ergebnis ist in Tabelle 3-31 zusammengefasst.

Tabelle 3-31: Präzision der Quantifizierung der IgG1-Glykospezies anhand des Glykopeptids mit LC/ESI-MS. Für die Bestimmung wurde IgG aus europäischem Poolplasma (*Deutsches Rotes Kreuz*) über Protein A-Chromatographie isoliert und GluC-verdaut. Für die Quantifizierung der einzelnen Glykospezies wurden die Peakflächen der in **Tabelle 3-30** angegeben Ionenspuren verwendet. Der Mittelwert Ø wurde aus fünf Messungen bestimmt. Neben der Standardabweichung (SA) ist der Variationskoeffizient (VK) der einzelnen Glykospezies angegeben.

	Relative Peakflächen in Prozent							
	Messung							
Glykan	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**Ø**	**±SA**	**VK**
G0	16	17	19	16	13	16	2	14
G1	27	26	29	31	30	29	2	6
G2	17	16	15	17	18	16	1	7
G1+Sia	1,8	1,7	1,8	1,7	2,1	1,8	0,2	10
G2+Sia	6	8	7	6	8	7	1	16
G0+Nag	6,4	6,4	5,3	6,2	5,9	6,0	0,5	8
G1+Nag	7	6	5	6	7	6	1	12
G2+Nag	1,6	1,7	1,1	1,3	1,5	1,4	0,2	16
G0-Nag	5,1	5,4	5,5	4,7	4,6	5,1	0,4	8
G1-Nag	4	6	6	4	4	5	1	21
G0-Fuc	1,0	0,8	1,1	0,9	0,7	0,9	0,2	18
G1-Fuc	3,6	2,8	2,4	2,4	2,8	2,8	0,5	19
G2-Fuc	3,1	2,8	2,5	3,3	2,5	2,8	0,3	12

Das Glykosylierungsprofil von IgG1 in europäischem Poolplasma konnte mit einem Variationskoeffizient (n = 5) von durchschnittlich 13 % bestimmt werden. Der Variationskoeffizient lag maximal bei 21 % für die fukosylierte Oligosaccharidkernstruktur mit nur einem N-Acetylglucosamin (G0-Nag). Der Anteil der kernfukosylierten Glykospezies lag bei mehr als 92 %, der Anteil von Glykospezies mit biverzweigendem N-Acetylglucosamin (+Nag) bei 11 – 15 % und der Anteil von Glykospezies ohne Fukose (-Fuc) bei 6 - 7,7 %. Die Glykospezies mit mindestens einer terminalen Galaktose hatten einen Anteil von mehr als 70 %. Die Quantifizierung der sialinsäurehaltigen Glykopeptide ergab einen Anteil von ~9 %, der hauptsächlich auf die einfache Sialysierung der zweifachglaktosylierten Glykospezies (G2+Sia, 7 %) zurückzuführen ist.

Diese Ergebnisse stimmten mit denen von Raju et al.[47] überein, die den Pool der enzymatisch abgespaltenen Glykane beim Menschen und verschiedener anderer Spezies mittels MALDI-MS und Kapillarelektrophorese mit laserinduzierter Fluoreszenzdetektion (CE-LIF) charakterisierten. Der Anteil von Glykospezies ohne Fukosylierung und der Anteil

sialinsäurehaltiger Glykospezies am gesamten Glykanpool wurden in dieser Arbeit allerdings erstmals bestimmt.

Massenspektrometrische Methoden haben sich für eine semiquantitative Bestimmung der variabel galaktosylierten Hauptglykospezies (G0, G1 und G2) bereits vorher als geeignet erwiesen (Tabelle 3-32).

Tabelle 3-32: Vergleich verschiedener Methoden zur Quantifizierung der fukosylierten Glykospezies bzw. Glykane mit keiner (G0), einer (G1) bzw. zwei Galaktosen (G2) mit der in dieser Arbeit vorgestellten LC/ESI-MS-Methode. Die absoluten Fehler sind für die Glykospezies G0 und G2 angegeben. Zur besseren Vergleichbarkeit sind die relativen Peakflächen bzw. Signalintensitäten auf die einfach galaktosylierte Glykospezies (G1) normiert. In Klammern sind die absoluten Fehler einzelner Methoden angegeben.

	Relative Peakflächen bzw. -höhen*, normalisiert auf G1			
	Peptide	Glykane		
Spezies	**LC/ESI-MS (±8)**	MALDI* (± 8)	HPAEC-PAD (± 2)	CE-LIF
G0	**56**	61	51	71
G1	**100**	100	100	100
G2	**57**	55	81	45

Ein Vergleich der Methoden zeigt, dass die Quantifizierung der variabel galaktosylierten Glykospezies mittels LC/ESI-MS innerhalb der angegebenen Fehler mit den MALDI-MS-Ergebnissen von Saba et al.[155] übereinstimmt. Allerdings war der Anteil von Glykospezies mit zwei Galaktosen (G2) bei den MS-Methoden geringer als bei der Anionenaustauch-Chromatographie bei stark basischem pH, gekoppelt mit amperometischer Detektion (HPAEC-PAD)[64,156]. Saba et al. führen den niedrigen G2-Gehalt auf Fragmentierungsprozesse innerhalb der MALDI-Quelle (*in-source* Fragmentierung) zurück. Roberts et al., welche die Glykosylierung eines monoklonalen Antikörpers mit HPLC-Methoden und anhand des tryptischen Glykopeptids charakterisierten, führten die beobachteten Differenzen hingegen auf eine unterschiedliche Ladungsverteilung einzelner Glykospezies zurück[67]. Dies würde zu einer Abhängigkeit des bestimmten Glykosylierungsprofils in Abhängigkeit des verwendeten Ladungszustands führen. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass das Verhältnis der Glykospezies mit keiner (G0), einer (G1) bzw. zwei Galaktosen (G2) im reduzierten Fcγ1-Fragment nicht vom Ladungszustand abhängt (Tabelle 3-37). Diese Ergebnisse der Quantifizierung am reduzierten Fcγ1-Fragment stimmen mit denen am GluC-Glykopeptid überein. Die beobachteten Differenzen sind somit eher durch *in-source* Fragmentierungen erklärbar, wie sie fürs MALDI-MS als Erklärung bereits vorgeschlagen wurden[155].

Ein Vorteil der hier vorgestellten ESI-MS-Methodik zur Quantifizierung des Glykosylierungsprofils von IgG1 im Vergleich zu HPLC-basierten Methoden ist die einfache und umfangreiche Bestimmung des Glykosylierungsprofils, die weit über die Quantifizierung der Hauptglykospezies (G0, G1, G2) hinausgeht. Das Glykosylierungsprofil von IgG gesunder[47,64,155] Menschen wurde schon mehrfach beschrieben und auch schon mit dem von Kranken verglichen[48]. allerdings basieren diese Arbeiten überwiegend auf analytischen Methoden, bei denen die Oligosaccharide vom IgG getrennt werden, wodurch die Unterscheidung einer möglicherweise spezifischen Glykosylierung von IgG-Subklassen oder gar Allotypen nicht möglich ist. Dazu zählen sowohl die Anionenaustauch-Chromatographie

bei stark basischem pH, gekoppelt mit amperometischer Detektion (HPAEC-PAD) als auch massenspektrometrische Methoden wie ESI- oder MALDI-MS, bei denen nur der Glykanpool untersucht wird. Im Gegensatz dazu wurde hier am Beispiel des IgG1 gezeigt, dass die Erstellung eines umfangreichen Glykosylierungsprofils anhand des Glykopeptids möglich ist. Die Methode kann auf andere Subklassen oder Allotypen übertragen werden, insofern die Aminosäuresequenz der entsprechenden Glykopeptide spezifisch ist.
Das Glykosylierungsprofil umfasst die Glykospezies, die ein biverzweigendes N-Acetylglucosamin (+Nag) besitzen und auch die, denen die Fukosylierung (-Fuc) fehlt. Dies ist von Interesse, da diese Variationen der Kernstruktur die Effektivität der antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) beeinflussen[57,59,60], die einen wichtigen Effektormechanismus der IgG darstellt.

3.9.2 Vergleich von verschiedenen Fcγ1-Fragmenten

- **Bestimmung der Primärstruktur und Glykosylierung von Fcγ1-Fragment durch *Peptide Mapping***

Das Glykosylierungsprofil von Fcγ1-Fragment wurde mittels LC/ESI-MS bestimmt und entsprach der Glykosylierung von IgG1 (Kapitel 3.9.1). Somit war die Darstellung von Fcγ1-Fragment unabhängig von der Glykosylierung. Anders als bei der Allotypenverteilung (Kapitel 3.8) wurde kein Unterschied in der IgG1-Glykosylierung zwischen amerikanischem und europäischem Poolplasma festgestellt. Die Bestimmung der Primärstruktur von Fcγ1-Fragment wird nachfolgend am Beispiel von EU-Fcγ1-Fragment beschrieben.
Mit *Peptide Mapping* (Abbildung 3-51 und Tabelle 3-33) wurden die GluC-verdauten Fcγ1-Fragmente mit einer Sequenzabdeckung von > 96 % charakterisiert. Nur das GluC-Peptid SNGQPE konnte nicht identifiziert werden. Der Sequenzbereich konnte aber in verschiedenen anderen *Peptide Maps* von IgG durch Peptide mit mindestens einem fehlenden Schnitt, die diesen Sequenzbereich enthielten, abgedeckt werden.
Des Weiteren konnten alle drei IgG1-Allotypen G1m(f-a-x), G1m(za-x) und G1m(zax) mit den allotypischen Markerpeptiden G1m(x), G1m(-x), G1m(a) und G1m(-a) nachgewiesen werden.

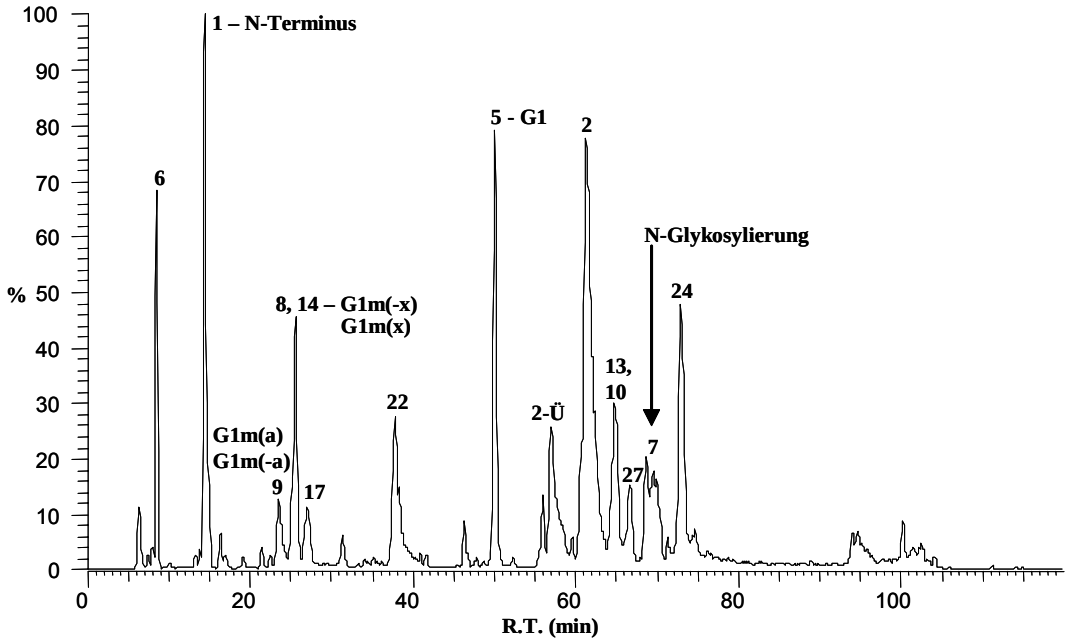


Abbildung 3-51: Basisionenchromatogramm von EU-Fcγ1-Fragment, das mit GluC verdaut wurde. Neben dem N-terminalen Peptid, das die Papainschnittstelle definiert, sind das Glykopeptid und die iso- und allotypischen Markerpeptide gekennzeichnet. Die Nummerierung bezieht sich auf die Peptidnummerierung in Tabelle 3-33.

Tabelle 3-33: Identifizierte GluC-Peptide von EU-Fcγ1-Fragment. Dargestellt ist die Sequenz des IgG1-Allotyps G1m(za-x). Die varianten Aminosäurepositionen, die zur Bildung der Allotypen G1m(f-a-x) und G1m(zax) führen sind rot und die N-Glykosylierungsstelle blau markiert. Für das Glykopeptid wurde exemplarisch das m/z-Verhältnis der G0-Glykospezies angegeben. Nicht identifzierte Peptide sind grau unterlegt.

Nr.	Von	Bis	m/z [Mo.] $[M+H]^+$	$[M+2H]^+$	$[M+3H]^+$	Sequenz
1	1	9	1030.39	515.70	344.13	TCPPCPAPE
2	10	34	2740.51	1370.76	914.18	LLGGPSVFLFPPKPKDTL**M**ISRTPE (2Ü - Überalkylierung am Met)
3	35	45	1244.58	622.80	415.53	VTCVVVDVSHE
4	46	48	360.14	180.57	120.72	DPE (nicht gefunden, s. Peptid 17)
5	49	59	1355.66	678.34	452.56	VKFNWYVDGVE (G1-Marker)
6	60	70	1308.70	654.86	436.91	VHNAKTKPREE
7	71	94	4294.2	2147.95	1432.3	QY**N**STYRVVSVLTVLHQDWLNGKE (G0-Glykopeptid)
8	95	109	1718.92	859.96	573.64	YKCKVSNKALPAPIE
9	110	133	2725.46	1363.24	909.16	KTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**D**E (G1m(a)-Marker)
10	134	156	2583.34	1292.17	861.78	**L**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
11	157	158	334.14	167.57	112.05	WE (nicht gefunden, s. Peptid 24)
12	159	164	631.27	316.14	211.09	SNGQPE (nicht gefunden)
13	165	206	4883.31	2442.16	1628.44	NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
14	207	222	1752.90	876.96	584.97	**A**LHNHYTQKSLSLSPG (G1m(-x)-Marker)
						1 fehlender Schnitt
17	35	48	1585.71	793.36	529.24	VTCVVVDVSH**E**DPE
22	95	133	4425.36	2213.18	1475.79	YKCKVSNKALPAPI**E**KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
24	134	158	2898.46	1449.73	966.83	LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV**E**WE
27	165	222	6617.19	3309.10	2206.40	NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH**E**AL HNHYTQKSLSLSPG

Auffällig war die Überalkylierung am Methionin des Peptids 2, die auch bei anderen methioninenthaltenden Peptiden beobachtet wurde. Die MS/MS-Spektren dieser Peptide sind immer durch den Δm-Verlust von 105 Da gekennzeichnet. Der postulierte Reaktionsmechanismus zur Bildung des stabilen Fragmentions [M-105] ist in Abbildung 3-52 dargestellt.

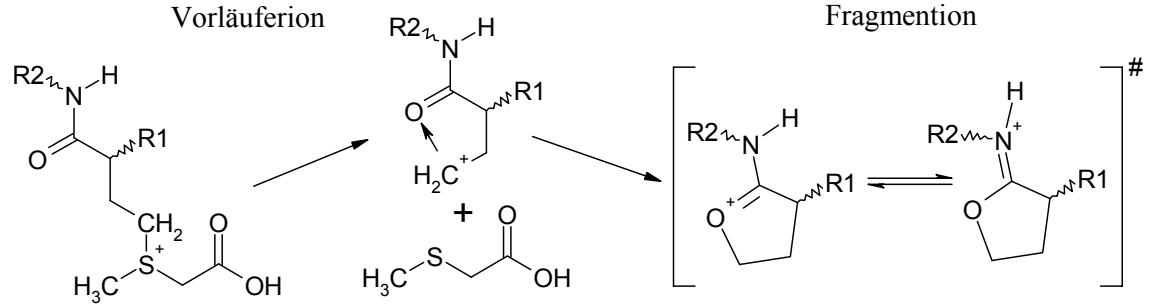


Abbildung 3-52: Postulierter Reaktionsmechanismus zur Bildung des dominanten Fragmentions des am Methionin überalkylierten GluC-Peptids LLGGPSVFLFPPKPKDTL**M**ISRTPE.

Die Spaltung der Bindung benachbart zum positiv geladenen Schwefel führt zu einer stabilen Abgangsgruppe. Die abgespaltene Methylsulfanylessigsäure hat ein Molekulargewicht von 105 Da. Das entstehende Carbokation kann durch Bildung eines 5-gliedrigen zyklischen Übergangszustandes stabilisiert werden, in dem der Kohlenstoff elektrophil an dem Sauerstoff der Carboxylgruppe angreift. Die positive Ladung wird im zyklischen Übergangszustand mesomer durch eine Delokalisierung über die Peptidbindung stabilisiert. Die Alkylierung am Methionin beim Peptid 2 war besonders auffällig, da die entsprechenden Peaks des normalen (Peptid 2) als auch des überalkylierten (Peptid 2-Ü) im *Peptide Map* intensiv waren (Abbildung 3-51).
Das C-terminale Lysin wurde nicht gefunden und somit vollständig posttranslational entfernt.
Durch Charakterisierung des N-Terminus konnte die Papainschnittstelle eindeutig definiert werden. Diese stimmt mit der von Wang[128] beschriebenen Hauptschnittstelle zwischen Histidin und Threonin in der *hinge*-Region überein. Die Peptide, die durch Papainspaltungen an weiteren Positionen in der *hinge*-Region oder am C-Terminus, wie sie in anderen Arbeiten beobachtet wurden[132,133], entstehen, wurden nicht gefunden. Der Papainschnitt war daher unter den gewählten Bedingungen homogen.

- **Deglykosylierte Fcγ1-Fragmente**

Durch ESI-MS-Spektren (Abbildung 3-53) von deglykosyliertem US-Fcγ1-Fragment und EU-Fcγ1-Fragment konnten die drei IgG1-Allotypen G1m(za-x), G1m(f-a-x) und G1m(zax) identifiziert werden. Nicht markierte Peaks konnten Natrium- und Kaliumaddukten der Allotypen G1m(za-x) und G1m(f-a-x) zugeordnet werden.

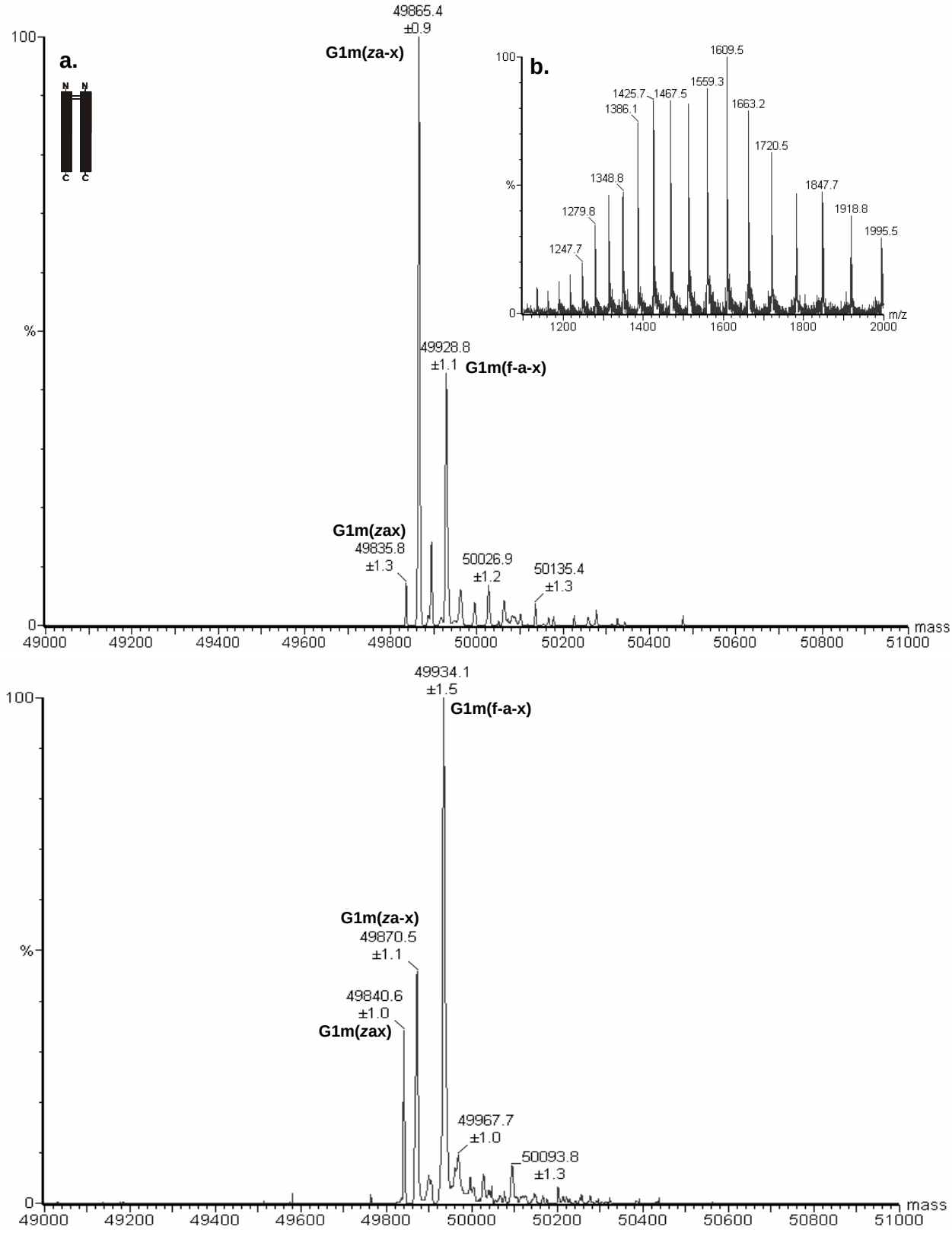


Abbildung 3-53: ESI-MS-Spektren von deglykosyliertem EU-Fcγ1-Fragment (oben) und US-Fcγ1-Fragemt (unten); a – dekonvoliertes Spektrum, b – m/z-Spektrum.

Ein Vergleich der theoretischen Molekulargewichte mit den experimentellen der einzelnen Allotypen ergab eine Abweichung von unter 36 ppm beim EU-Fcγ1-Fragment und unter 98 ppm beim US-Fcγ1-Fragment (Tabelle 3-34).

Tabelle 3-34: Vergleich der theoretischen mit den experimentell bestimmten Molekulargewichten von US-Fcγ1- und EU-Fcγ1-Fragment für die Allotypen G1m(f-a-x), G1m(za-x) und G1m(zax).

		US-Fcγ1-Fragment		**EU**-Fcγ1-Fragment	
IgG1-Allotyp	$M_{Theor.}$ [Da]	$M_{Exp.}$ [Da]	Fehler [ppm]	$M_{Exp.}$ [Da]	Fehler [ppm]
G1m(*f* -a-x)	49929,7	49928,8	-18	49934,1	88
G1m(*z* a-x)	49865,6	49865,4	-4	49870,5	98
G1m(*z* ax)	49837,6	49835,8	-36	49840,6	60

Beim Vergleich der dekonvolierten ESI-MS-Spektren der deglykosylierten Fcγ1-Fragmente aus europäischem und amerikanischem Poolplasma fällt die unterschiedliche Intensitätenverteilung der IgG1-Allotypen auf. Die Dekonvolution der ESI-MS-Daten führt zu einem quantitativen Ergebnis, bei dem das Verhältnis der Peakflächen die Konzentrationsverhältnisse der Komponenten in der Lösung widerspiegelt[157]. Dies ist unter der Annahme möglich, dass die verschiedenen Komponenten eine identische Ionisationseffizienz besitzen. Für die verschiedenen Allotypen, die sich nur in bis zu drei Aminosäurepositionen unterscheiden, kann ein identische Ionisationseffizienz angenommen werden. Die ermittelten Peakflächenverhältnisse der IgG1-Allotypen von US- und EU-Fcγ1-Fragmenten sind in Tabelle 3-35 gegenüber gestellt und werden mit der bereits aus amerikanischem bzw. europäischem Human-Plasma im *Peptide Map* bestimmten Allotypenverteilung (vgl. Tabelle 3-28) verglichen.

Tabelle 3-35: Vergleich der prozentualen Verhältnisse der IgG1-Allotypen in europäischem und amerikanischem Human-Plasma. Das Verhältnis der IgG-Allotypen wurde mittels der allotypischen Markerpeptide (*Peptide Map*) und der deglykosylierten, intakten Fcγ1-Fragmente ermittelt.

	relative Peakflächen in Prozent (Peptide map ± 16 %)					
	US-Fcγ1-Fragment		**US**-Plasma	**EU**-Fcγ1-Fragment		**EU**-Plasma
IgG1-Allotyp	Deglyk.	Peptide Map	Peptide Map	Deglyk.	Peptide Map	Peptide Map
G1m(*f* -a-x)	34	38	38	**58**	**55**	**50**
G1m(*z* a-x)	**63**	**58**	**57**	35	37	43
G1m(*z* ax)	3	4	5	7	8	7

Die Ergebnisse bestätigen den Befund, dass sich das Verhältnis zwischen dem G1m(f-a-x)- und G1m(za-x)-Allotypen in europäischem und amerikanischem Human-Plasma umkehrt (Kapitel 3.8). Das Verhältnis der IgG1-Allotypen wurde auch aus den *Peptide Maps* der Fcγ1-Fragmente bestimmt, um eine Selektion während der Darstellung von Fcγ-Fragment auszuschließen. Das Verhältnis der Ig-Allotypen kann somit auch auf der Ebene von deglykosyliertem Fcγ1-Fragment bestimmt werden.

3.9.3 Charakterisierung der Glykosylierung von intaktem Fcγ1-Fragment

Für die vollständige Interpretation der komplexen ESI-MS-Spektren vom intakten Fcγ1-Fragment (Abbildung 3-54) war eine mehrstufige Strategie erforderlich.

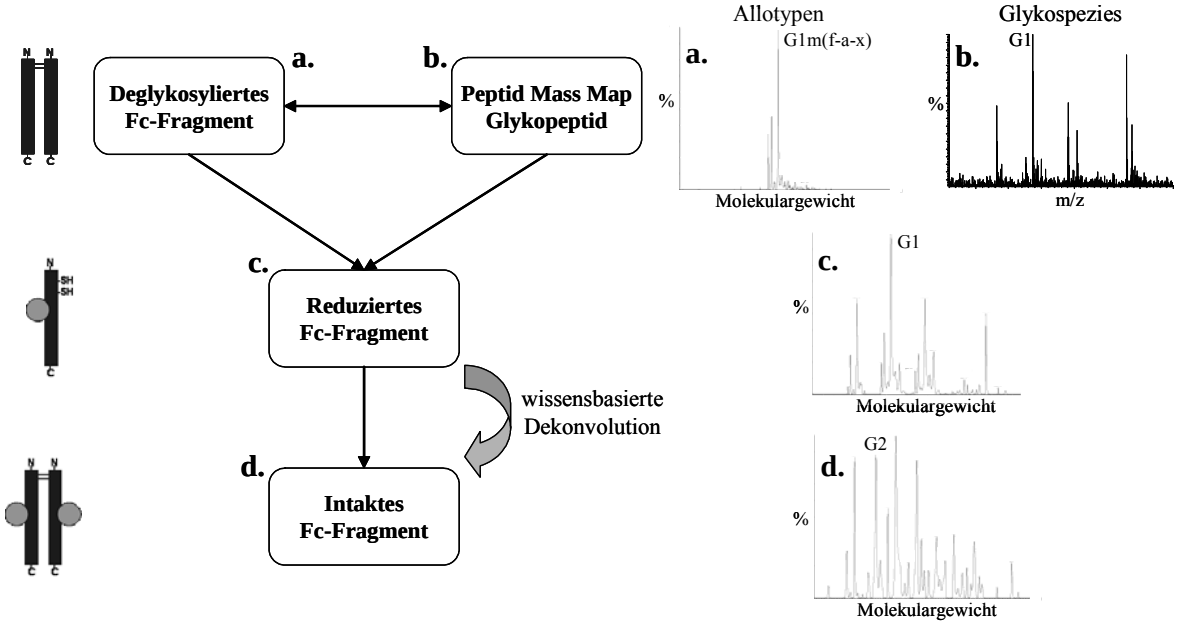


Abbildung 3-54: Strategie zur wissensbasierten Interpretation dekonvolierter ESI-MS-Daten von reduzierten und intakten Fc-Fragmenten. Im Spektrum des deglykosylierten Fc-Fragments (a.) ist der G1m(f-a-x)-Allotyp und im Spektrum des Glykopeptids (b.) die einfach galaktosylierte Glykospezies G1 gekennzeichnet. Beide kombinieren zur G1-Glykospezies des G1m(f-a-x)-Allotyps auf der Ebene des reduzierten Fc-Fragments (c.). Aber auch alle weiteren Allotypen besitzen diesen Zucker. Die Kombination zweier G1-Glykospezies des reduzierten Fc-Fragments führt zur G2-Glykospezies des intakten Fc-Fragments (d.) vom G1m(f-a-x)-Allotypen. Die G1-Glykospezies des reduzierten Fc-Fragments eines Allotyps können sich aber auch mit anderen Glykospezies desselben Allotyps paaren.

Das Glykosylierungsprofil kann mit Hilfe des Glykopeptids, welches die N-Glykosylierungsstelle der Fc-Fragmente enthält, im *Peptide Map* bestimmt werden (Kapitel 3.9.1). Die vorhandene Allotypenverteilung kann ebenfalls aus dem *Peptide Map* mittels der allotypischen Markerpeptide oder aus dem ESI-MS-Spektrum von deglykosyliertem Fc-Fragment bestimmt werden (Kapitel 3.9.2).

Das auf Peptidebene bestimmte Glykosylierungsprofil kann anschließend auf die Allotypen übertragen werden, um das ESI-MS-Spektrum des reduzierten Fc-Fragments zu simulieren. Dabei wird angenommen, dass sich die Glykosylierung der einzelnen Allotypen eines Isotyps nicht unterscheidet. Dies ermöglicht eine umfassende Interpretation der ESI-MS-Daten von reduziertem Fc-Fragment.

Durch Kombination einzelner Glykospezies eines Allotypes des reduzierten Fc-Fragments können anschließend die Glykospezies des intakten Fc-Fragments dieses Allotyps simuliert werden, wodurch eine ebenso umfassende Interpretation der ESI-MS-Daten des intakten Fc-Fragments ermöglicht wird. Hierbei wird zu Beginn angeommen, dass keine bevorzugte Paarung von Oligosacchariden auftritt.

In diesem Zusammenhang wurde die Methode einer wissensbasierten Dekonvolution der MS-Daten von reduziertem und intaktem Fc-Fragment etabliert, da die Methode die Berücksichtigung von Informationen bei der Dekonvolution der MS-Daten einschließt, die aus der Bestimmung einer weniger komplexen Ebene gewonnen wurden. Am Ende steht eine Anpassung der experimentellen an die simulierten Daten unter Minimierung der Abweichungen. Die Methode wird am Beispiel von reduziertem Fcγ1-Fragment im Folgenden näher erläutert.

- **Qualitative Charakterisierung des reduzierten Fcγ1-Fragments**

Das dekonvolierte ESI-MS-Spektrum von reduziertem EU-Fcγ1-Fragment ist in Abbildung 3-55 dargestellt. Im Spektrum sind verschiedene Serien von Glykospezies der einzelnen IgG1-Allotypen erkennbar. Entsprechend der Allotypenverteilung von IgG1 sind die Signalintensitäten der Glykospezies des IgG1-Allotyps G1m(f-a-x) (blau) dominant gegenüber denen des G1m(za-x) (rot) und G1m(zax) (grün). Von letzterem Allotypen ist nur noch die variabel galaktosylierte Hauptserie G0, G1, G2 sowie die sialinsäurehaltige Glykospezies G2+Sia erkennbar, die sich von der fukosylierten Kernstruktur ohne biverzweigendes N-Acetylglucosamin ableiten. Gut erkennbar sind auch die Glykospezies mit biverzweigendem N-Acetylamin (G0+Nag) und (G1+Nag) des G1m(f-a-x)-Allotypen. Diese Glykospezies des G1m(za-x)-Allotypen konnten bei ausschließlicher Verwendung der Dekonvolution mittels des *maximum-likelihood*-Algorithmus nicht aufgelöst werden. Unter Verwendung der wissensbasierten Dekonvolution (Abbildung 3-57) konnten diese aber, ebenso wie die defukosylierten Glykospezies G2-Fuc und G1-Fuc des G1m(f-a-x)-Allotypen in den Schultern benachbarter Peaks identifiziert werden. Neben der Peaküberlagerung der einzelnen Glykospezies erschwerte die Bildung von Salzaddukten die Spektreninterpretation.

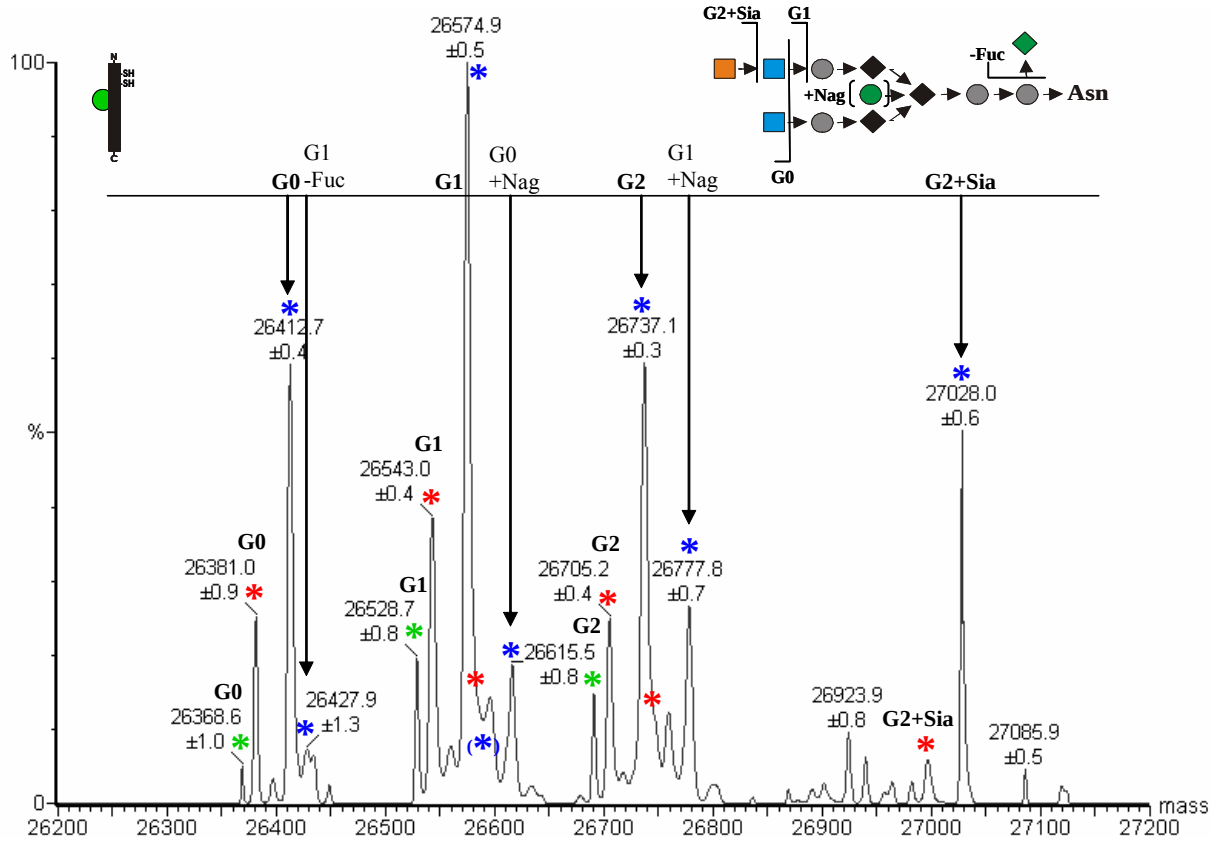


Abbildung 3-55: MaxEnt1 dekonvoliertes ESI-MS-Spektrum vom reduzierten EU-Fcγ1-Fragment; grün – G1m(zax)-Allotyp, rot – G1m(za-x)-Allotyp und blau – G1m(f-a-x)-Allotyp. Peaks die durch wissensbasierte Dekonvolution zugewiesen wurden, sind in Klammern markiert. Die Struktur der einzelnen Glykospezies kann der schematischen Darstellung entnommen werden; orange – Sialinsäure, blau – Galaktose, grau – N-Acetylglucosamin, schwarz – Mannose, grün – Fukose und biverzweigendes Nag.

Die Simulation der ESI-MS-Daten vom EU-Fcγ1-Fragment erfolgte anhand eines einzelnen Ladungszustandes (Abbildung 3-56). Die theoretischen Molekulargewichte und Intensitäten wurden für die einzelnen Glykospezies unter Berücksichtigung des Ladungszustandes berechnet. Dies wurde durch Addition der bestimmten Intensitäten der Glykospezies des GluC-Glykopeptids mit dem bestimmten Intensitätsverhältnis der Allotypen der gleichen Probe erreicht. Dabei wurde eine identische Glykosylierung der Allotypen angenommen. Abschließend wurden die berechneten Intensitäten manuell an die experimentellen Daten angepasst, indem die Abweichung der simulierten Daten an die experimentellen minimiert wurde. Dazu mussten die Peakbreiten unter Verwendung der natürlichen Isotopenbreite in beiden Spektren übereinstimmen. Die Simulation der ESI-MS-Daten ohne die defukosylierten Glykospezies und denjenigen mit biverzeigendem N-Acetylglucosamin, die durch die wissensbasierte Dekonvolution zugewiesen wurden, führt zu geringeren Peakbreiten im Vergleich mit den experimentellen ESI-MS-Daten.

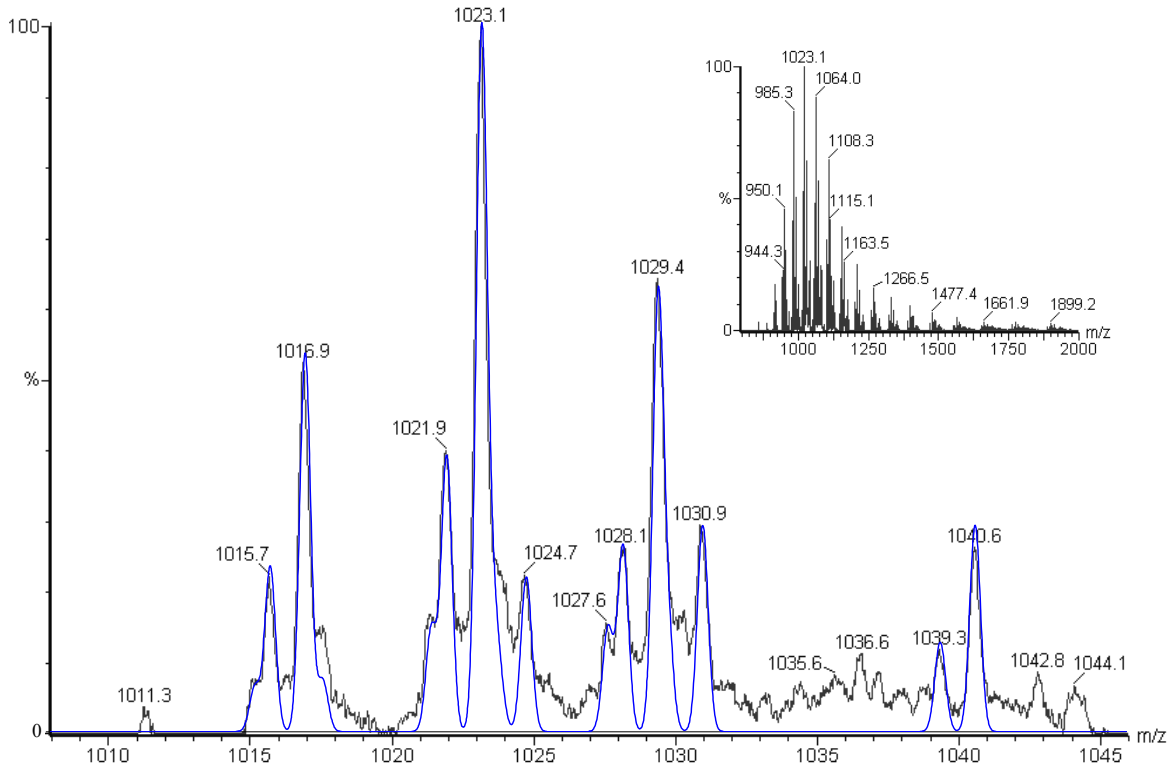


Abbildung 3-56: Manuelle Anpassung der simulierten ESI-MS-Daten an die experimentellen anhand eines Ladungszustandes; schwarz – Experimentelle ESI-MS-Daten, blau – Simulation der ESI-MS-Daten bei natürlicher Isotopenbreite (σ = 0,19); **a** - Vergrößerung eines Ladungszustandes (26+), **b** – ESI-MS-Spektrum.

In Abbildung 3-57 wurden die simulierten ESI-MS-Daten von reduziertem EU-Fcγ1-Fragment aus dem m/z-Bereich des einzelnen Ladungszustandes auf die Molekulargewichtsebene übertragen. Die Spektren wurden unter Verwendung verschiedener Peakbreiten auf halber Höhe (σ) dargestellt. Während die Peakbreiten des oberen Spektrums (a) nur 1/5 der natürlichen Isotopenbreite (σ = 1 Da) entsprechen, wird im unteren Spektrum (b) die natürliche Isotopenbreite (σ = 5 Da) simuliert.

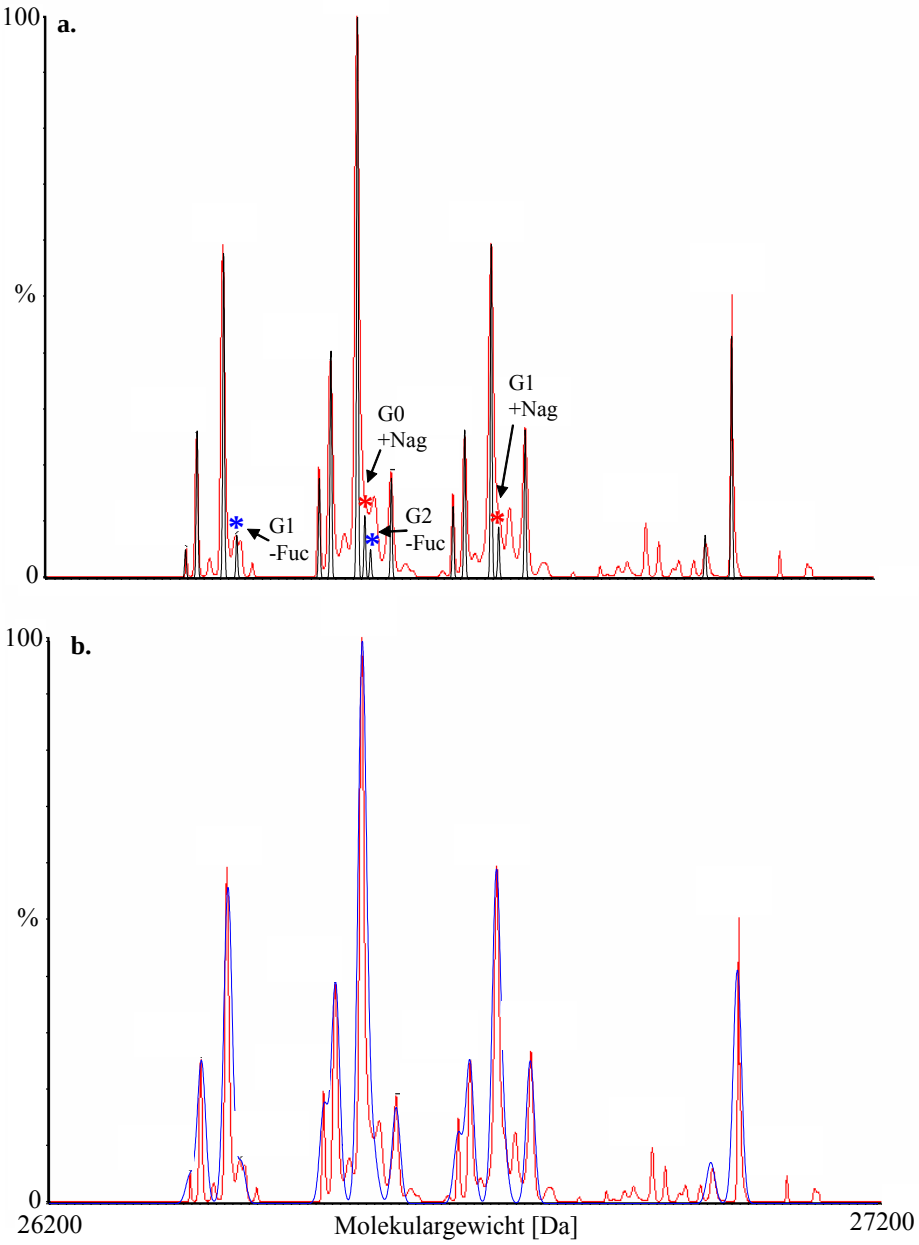


Abbildung 3-57: Wissensbasierte Dekonvolution von reduziertem EU-Fcγ1-Fragment; rot – MaxEnt1 dekonvoliertes Originalspektrum, wissensbasierte Dekonvolution (schwarz: σ = 1 Da, blau: σ = 5 Da). Beschriftet wurden die im Orginalspektrum nicht identifizierbaren Glykospezies.

Aus der Simulation geht hervor, dass selbst ohne Berücksichtigung der Salzaddukte eine massenspektrometrische Auflösung der einzelnen Glykospezies aufgrund der natürlichen Isotopenbreite (5 Da) nicht möglich ist, da der Abstand verschiedener Glykospezies in diesem Bereich liegt. Dadurch kommt es zu Überlagerungen der einzelnen Signale.
Dieses Problem kann auch durch Verwendung hochauflösender MS-Instruments nicht überwunden werden. Die dargestellten ESI-MS-Daten wurden bereits mit einem ESI-qTOF-MS-Gerät (W-Optik) bei einer Auflösung von mehr als 12000 m/Δm aufgenommen.
Die gleiche Methode wurde auch zur wissensbasierten Dekonvolution der ESI-IT-MS-Daten von US-Fcγ1-Fragment verwendet. Das in Abbildung 3-58 dargestellte dekonvolierte ESI-MS-Spektrum zeigt die gleichen Serien verschiedener Glykospezies der IgG1-Allotypen, wie

sie bereits im Spektrum von EU-Fcγ1-Fragment identifiziert wurden. Lediglich das Verhältnis der Signalintensitäten zwischen den IgG1-Allotypen G1m(f-a-x) und G1m(za-x) ist vertauscht. Die Signalintensitäten der Glykospezies des IgG1-Allotyps G1m(za-x) (rot) sind hier dominant gegenüber denen des G1m(f-a-x)- (blau) und G1m(zax)-Allotypes (grün). Von letzterem Allotypen ist auch hier nur die Hauptserie variabel galaktosylierter Glykospezies G0, G1, G2 und der sialinsäurehaltigen Glykospezies G2+Sia erkennbar, die sich von der fukosylierten Kernstruktur ohne biverzweigendes N-Acetylglucosamin ableiten. Problematisch ist die Zuweisung der Glykospezies ohne Fukosylierung G1-Fuc und G2-Fuc des G1m(za-x)-Allotypen, die kaum von den Natriumaddukten der variabel galaktosylierten Glykospezies G0 und G1 dieses Allotyps unterscheidbar sind.

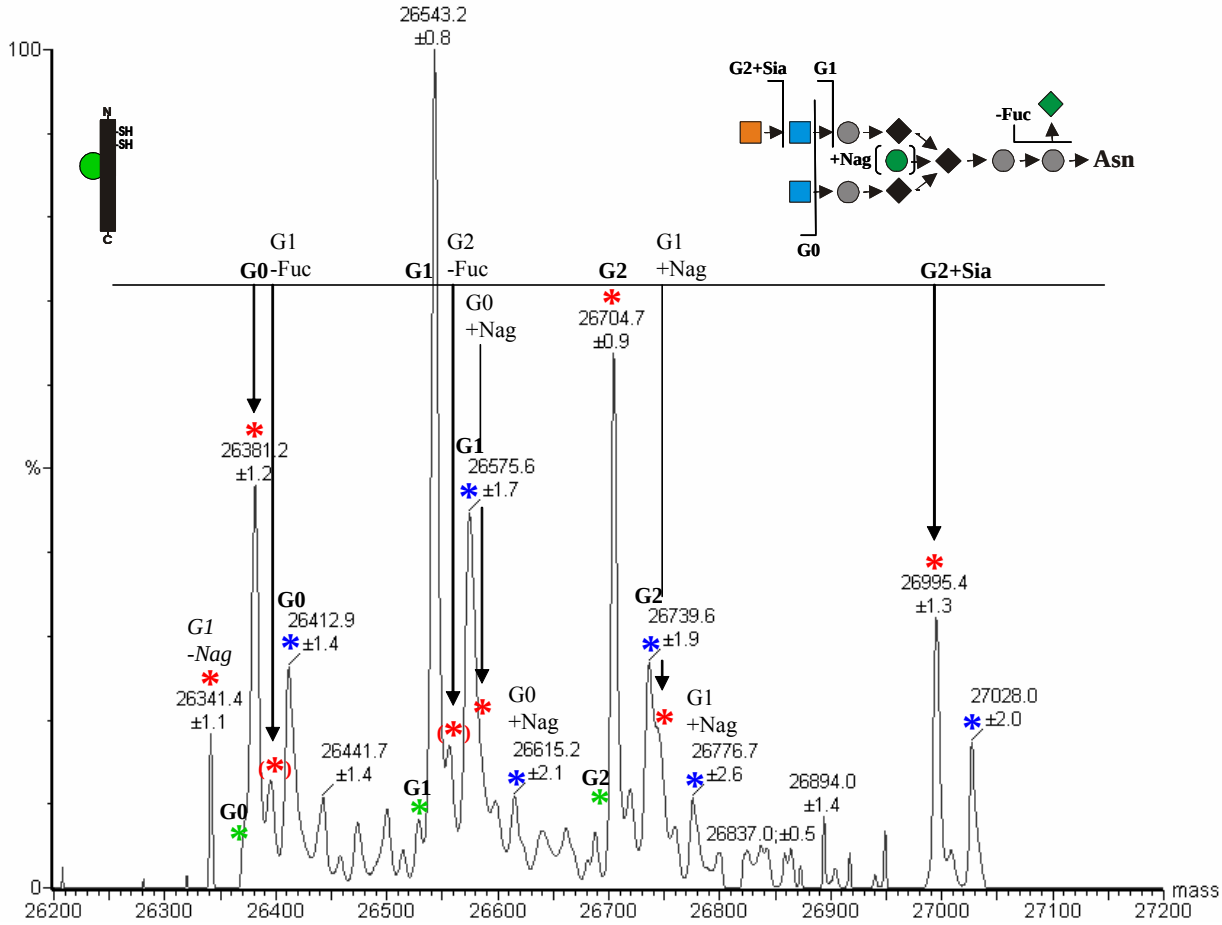


Abbildung 3-58: MaxEnt1 dekonvoliertes ESI-MS-Spektrum des reduzierten US-Fcγ1-Fragments; grün – G1m(zax)-Allotyp, rot – G1m(za-x)-Allotyp und blau – G1m(f-a-x)-Allotyp. Peaks die durch wissensbasierte Dekonvolution zugewiesen wurden, sind in Klammern markiert. Die Struktur der einzelnen Glykospezies kann der schematischen Darstellung entnommen werden; orange – Sialinsäure, blau – Galaktose, grau – N-Acetylglucosamin, schwarz – Mannose, grün – Fukose und biverzweigendes Nag.

Die Richtigkeiten der Messungen der Fcγ1-Fragmente aus amerikanischem und europäischem Human-Plasma sind in Tabelle 3-36 exemplarisch anhand der Glykospezies G1 gegenübergestellt. Auffällig war, dass ein Fehler von weniger als 50 ppm nur unter der Annahme erreicht werden konnte, dass eine Disulfidbrücke nicht gespalten wurde. Dies

resultiert in einer Abnahme der Molekulargewichte um 2 Da. Ohne diese Annahme lägen die Fehler über 100 ppm. Da jedoch die C_H2- und C_H3-Domänen des Fc-Fragments kompakt gefaltet sind und die Reduzierung des Fc-Fragments ohne Denaturierungsmittel wie Harnstoff oder Guanidiniumchlorid durchgeführt wurde, ist der Erhalt einer Disulfidbrücke auch unter stark reduzierenden Bedingungen durchaus denkbar. Die vollständige Spaltung der Disulfidbrücken zwischen den beiden Ketten des Fc-Fragments wurde aber erreicht.

Tabelle 3-36: Vergleich der theoretischen mit den experimentell bestimmten Molekulargewichten (M) für die einfach galaktosylierte Glykospezies (G1) des reduzierten US- und EU-Fcγ1-Fragments. Für die Berechnung des theoretischen Molekulargewichts wurde neben den reduzierten Cysteinen der Erhalt einer Disulfidbrücke angenommen (s. Text).

G1-Glykospezies	$M_{Theor.}$ [Da]	EU-Fcγ1-Fragment qTOF-MS $M_{Exp.}$ [Da]	EU-Fcγ1-Fragment qTOF-MS Fehler [ppm]	EU-Fcγ1-Fragment IT-MS $M_{Exp.}$ [Da]	EU-Fcγ1-Fragment IT-MS Fehler [ppm]	US-Fcγ1-Fragment IT-MS $M_{Exp.}$ [Da]	US-Fcγ1-Fragment IT-MS Fehler [ppm]
G1m(*f* -a-x)	26575,7	26574,9	-30	26575,3	-15	26575,6	-4
G1m(*z* a-x)	26543,6	26543,0	-23	26543,8	8	26543,2	-15
G1m(*z* ax)	26529,6	26528,7	-34	26530,7	41	26530,9	49

- **Quantifizierung des Glykosylierungsprofils anhand von reduziertem Fcγ1-Fragment**

Anschließend wurde das Glykosylierungsprofil der IgG1-Allotypen G1m(f-a-x) und G1m(za-x) auf der Ebene von reduziertem Fc-Fragment quantifiziert. Dazu musste gezeigt werden, dass das Verhältnis der einzelnen Glykospezies über alle Ladungszustände konstant bleibt, da nur dann das Dekonvolutionsergebnis das Konzentrationsverhältnis der Glykospezies wiedergibt.

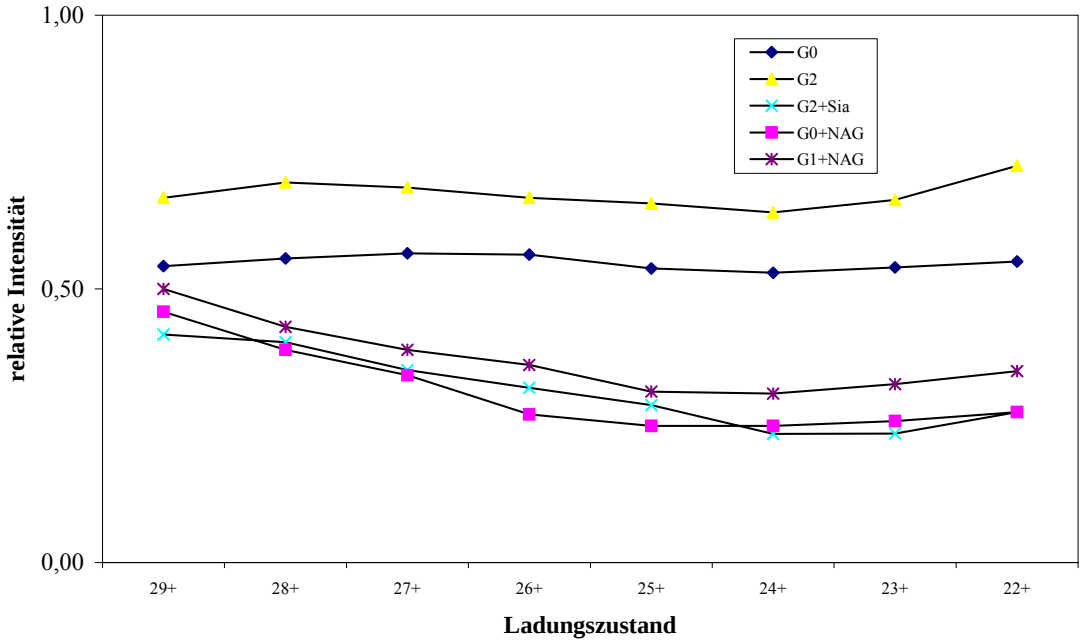


Abbildung 3-59: Verhältnis der dominanten Glykospezies des G1m(f-a-x)-Allotypen beim EU-Fcγ1-Fragment (ESI-qTOF-MS). Das Verhältnis wurde relativ zur intensivsten, einfach galaktosylierten Glykospezies G1 für die Ladungszustände 22+ bis 29+ gebildet.

Aufgrund der starken Überlagerungen einzelner Glykospezies wurden nur die in Abbildung 3-59 dargestellten Glykospezies des dominanten G1m(f-a-x)-Allotypen beim EU-Fcγ1-Fragment für die Dekonvolution verwendet. Über alle Ladungszustände ist, bezogen auf die intensivste, einfach galaktosylierte Glykospezies (G1), lediglich das Verhältnis zu den nicht (G0) und zweifach galaktosylierten Glykospezies (G2) konstant. Dies gilt für die weniger intensiven Glykospezies mit biverzweigendem N-Acetylglucosamin (G0+Nag, G1+Nag) und die sialinsäurehaltige Glykospezies G2+Sia bei Ladungszuständen von mehr als 26 nicht mehr. Eine Erklärung hierfür ist, dass einzelne Peaks hin zu höheren Ladungszuständen an Auflösung verlieren und dadurch überlagern. Dieser Effekt fällt bei den variabel galaktosylierten Hauptglykospezies (G0, G1 und G2) kaum ins Gewicht. Die weniger intensiven Glykospezies gewinnen dadurch aber deutlich an Intensität.

Tabelle 3-37: Vergleich der Verhältnisse dominanter Glykospezies des G1m(f-a-x)-Allotpyen beim EU-Fcγ1-Fragment (ESI-qTOF-MS). Die Verhältnisse wurden aus dem *Peptide Map*, den ESI-MS-Daten einzelner Ladungszustände (LZ) und den dekonvolierten ESI-MS-Daten bestimmt. Die Verhältnisse sind relativ zur intensivsten, einfach galaktosylierten Glykospezies G1 angegeben.

	relative Peakflächen und -intensitäten (*)		
Glykospezies	**m/z (LZ 22-26+)*** (± 10 %)	**Dekonvoliert** (LZ 22-29+)	***Peptid Map*** (± 16 %)
G0	54	53	56
G1	100	100	100
G0+NAG	26	28	21
G2	67	67	57
G1+NAG	33	32	22
G2+Sia	27	26	24

Die Dekonvolution der ESI-MS-Daten gleicht dieses Phänomen aus (Tabelle 3-37), da die dekonvolierten Daten mit dem mittleren Verhältnis der Glykospezies aus den Ladungszuständen +22 bis +26 übereinstimmen. In diesem Bereich blieben die Verhältnisse konstant. Das Verhältnis verschiedener Glykospezies bei dekonvolierten ESI-MS-Daten ist somit unabhängig vom Ladungszustand und damit proportional zu vorhandenen Substanzmengen. Die dekonvolierten ESI-MS-Daten können daher ebenfalls zur Bestimmung des Glykosylierungsprofils verwendet werden, da das Glykoylierungsprofil auf der Ebene des intakten Proteins auch in guter Übereinstimmung mit dem auf der Ebene des Glykopeptids (*Peptid Map)* bestimmten Glykosylierungsprofils ist. Der Einfluss der Ladungsverteilungen einzelner Glykospezies ist somit auf der Ebene des intakten Proteins sowie auf der Peptidebene, trotz des geringeren Proteinanteils im Vergleich zum Oligosaccharidanteil, nur gering.

- **Intakte Fcγ1-Fragmente**

Die Untersuchungen am reduzierten Fc-Fragment zeigten, dass eine vollständige Quantifizierung des Glykosylierungsprofils auf der Ebene intakter Proteine im Vergleich zur Peptidebene aufgrund der Signalüberlagerungen nur schwer erreichbar ist. Dies trifft in verstärktem Maße auf die Quantifizierung des Glykosylierungsprofils des intakten Fcγ1-Fragments zu, bei dem Überlagerungen verschiedener Glykospezies in Kombination mit einer erhöhten Isotopenbreite aufgrund des höheren Molekulargewichts (~50 kDa) im Vergleich zum reduzierten Fc/2-Fragment (~25 kDa) gehäuft auftreten. Eine umfassende

quantitative Beurteilung der Oligosaccharidpaarung im intakten Fc-Fragment ausgehend vom Glykosylierungsprofil auf der Ebene von reduziertem Fc-Fragment, wie sie Masuda et al.[44] treffen, wurden daher nicht weiter verfolgt.
Für die wissensbasierte Dekonvolution der intakten Fcγ1-Fragmente wurden die gewonnenen Informationen aus den Spektren der entsprechenden reduzierten Fc-Fragmente zugrunde gelegt. Dadurch war eine Simulation der Glykospezies auf der Ebene des intakten Fc-Fragments möglich, was eine umfassende Spektreninterpretation ermöglichte.

In Abbildung 3-60 und Abbildung 3-61 sind die dekonvolierten ESI-MS-Spektren intakter Fcγ1-Fragmente aus Human-Plasma des amerikanischen Pools und zweier kaukasischer Individuen dargestellt. Die Spektren zeigen Serien von Glykospezies der Allotypen G1m(za-x) (rot), G1m(f-a-x) (blau) und G1m(zax) (grün), die sich von Paaren fukosylierter, zweiantenniger Oligosaccharidkernstrukturen ableiten. Diese Hauptkernstrukturen können sowohl variabel galaktosyliert (G1 – G2) als auch einfach sialysiert (G1+Sia, G2+Sia) sein. Während Strukturen mit biverzweigendem N-Acetylglucosamin (+Nag) noch identifiziert werden konnten, war dies für defukosylierte (-Fuc) Glykospezies aufgrund von Peaküberlagerungen nicht mehr möglich. Zwei dieser Oligosaccharide, die schon auf der Ebene des reduzierten Fc-Fragments bestimmt wurden, kommen im intakten Fc-Fragment zusammen.
Die ESI-MS-Spektren von Fcγ1-Fragmenten der beiden kaukasischen Individuen AR und SE (Abbildung 3-61) zeigen verschiedene Allotypen des IgG1. Während das Individuum AR nur den IgG1-Allotypen G1m(f-a-x) besitzt, weist SE neben dem dominanten G1m(zax)-Allotypen noch den G1m(za-x)-Allotypen auf. Dies bestätigt die mit Hilfe der Markerpeptide bestimmte Allotypenverteilung beider Individuen (Kapitel 3.5.2.).

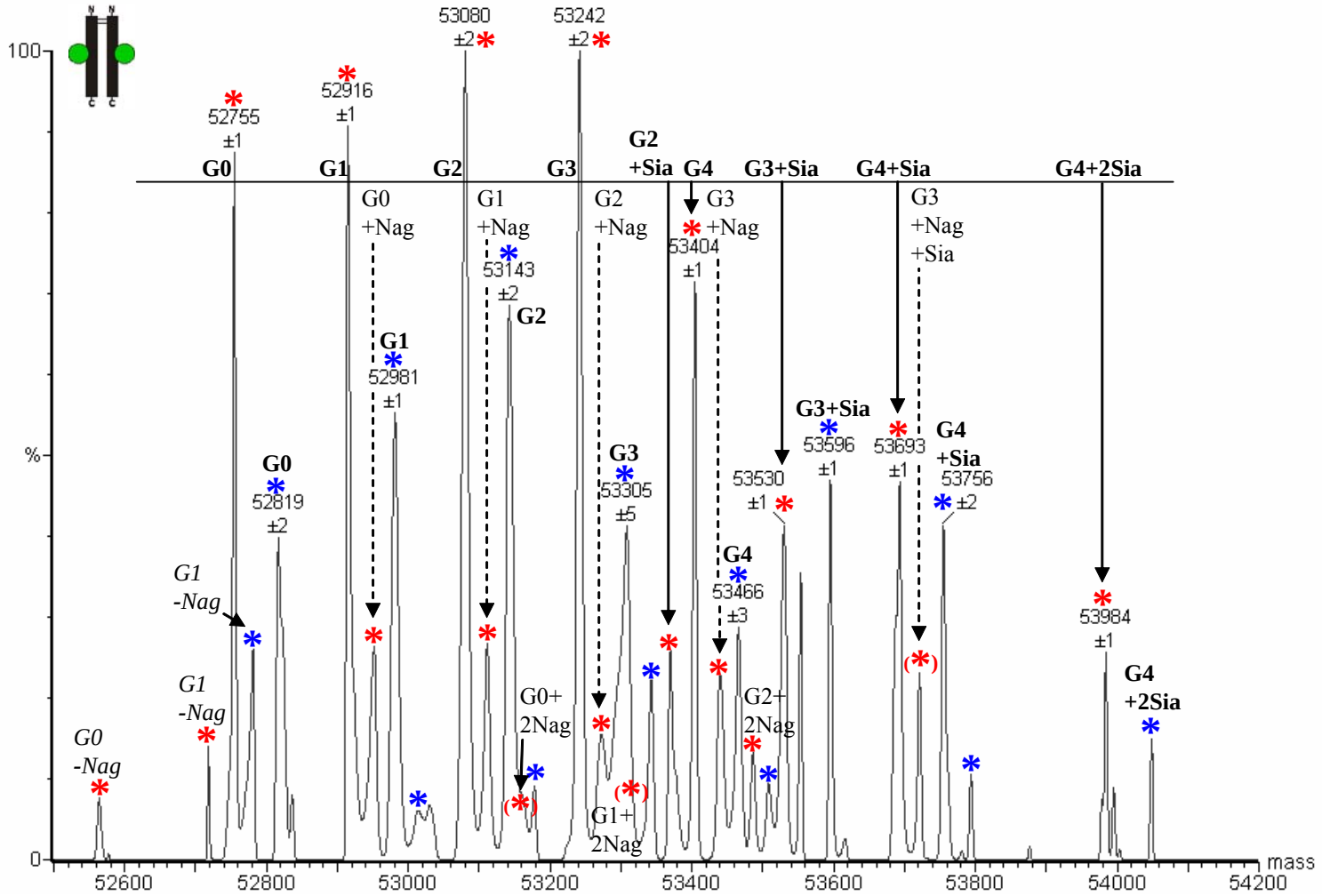


Abbildung 3-60: MaxEnt dekonvoliertes ESI-MS-Spektrum des intakten US-Fcγ1-Fragments; rot – G1m(za-x)-Allotyp und blau – G1m(f-a-x)-Allotyp. Peaks, die aufgrund der wissensbasierten Dekonvolution Glykospezies zugeordnet wurden, sind eingeklammert. Die einzelnen Glykospezies des intakten Fc-Fragments eines Allotypen sind als Kombination zweier Glykospezies vom reduzierten Fc-Fragment desselben Allotyps aufzufassen.

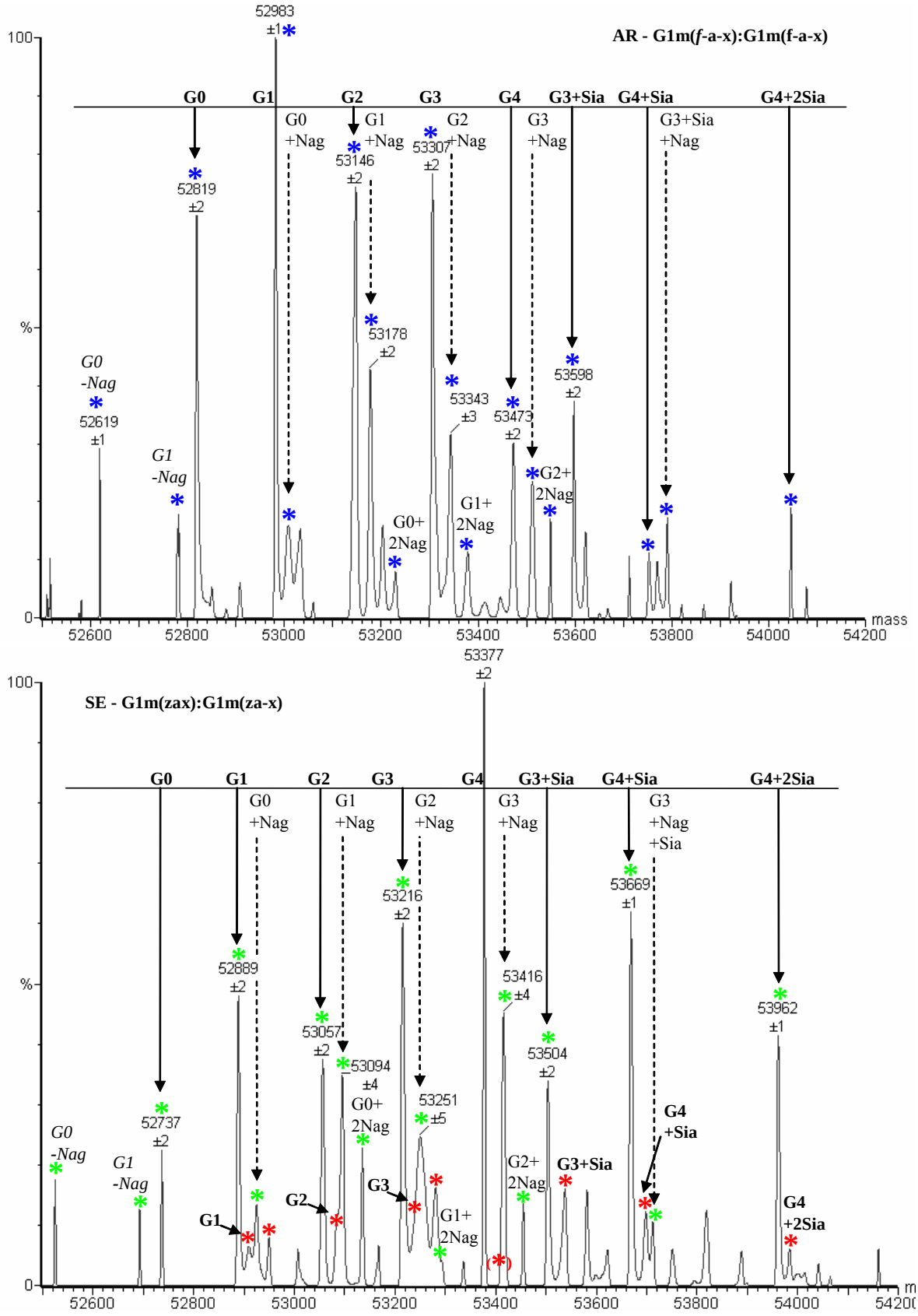


Abbildung 3-61: MaxEnt dekonvolierte ESI-MS-Spektren von intakten Fcγ1-Fragment der kaukasischen Individuen AR (oben) und SE (unten); rot – G1m(za-x)-Allotyp, blau – G1m(f-a-x)-Allotyp, grün – G1m(zax). Peaks, die aufgrund der wissensbasierten Dekonvolution Glykospezies

zugeordnet wurden, sind eingeklammert. Die einzelnen Glykospezies des intakten Fc-Fragments sind als Kombination zweier Glykospezies des reduzierten Fc-Fragments aufzufassen.

Im ESI-MS-Spektrum des US-Fcγ1-Fragments konnten nur Glykospezies der beiden Allotypen G1m(za-x) und G1m(f-a-x) identifiziert werden. Der geringe Anteil des G1m(zax)-Allotypen (< 10 %) verhinderte eine Identifizierung entsprechender Glykospezies. Neben den fukosylierten Hauptglykospezies mit variabler Galaktosylierung (G0 – G4) der intakten Fc-Fragmente konnten die entsprechenden biverzweigenden Glykospezies (+Nag) eindeutig identifiziert werden. Die Paarung biverzweigender Oligosaccharide (+2Nag) konnte erst beim homozygoten Individuum AR nachgewiesen werden, dessen ESI-MS-Daten mit nur einem vorhandenen IgG1-Allotypen weniger komplex sind. Es wurde bestätigt[44], dass die Oligosaccharide sowohl symmetrisch (z.B. G0 – G0+G0, G2 – G1+G1) als auch asymmetrisch (G1 – G0+G1, G3 – G1+G2) gepaart vorliegen. Dies wurde hier auch für die biverzweigenden Glykospezies belegt (G2+2Nag – (G1+Nag)+(G1+Nag) oder G1+Nag – (G1+Nag)+(G0)).

Der Nachweis der Glykospezies G4 im intakten Fc-Fragment, die aus der Paarung zweier bigalaktosylierter Oligosaccharide (G2) entsteht, zeigt, dass die Paarungsregeln[46] für Oligosaccharide, die aus Röntgenstrukturuntersuchung von Fc-Fragmenten abgeleitet wurden, nicht streng eingehalten werden. In der Struktur wechselwirkt die endständige Galaktose des einen Oligosaccharids mit einer der Mannosen des anderen Oligosaccharids, so dass kein Platz für insgesamt vier Galaktosereste vorhanden ist[158]. Es muss also genügend Flexibilität im Ig-Molekül vorhanden sein, um diese räumlichen Restriktionen zu überwinden, obwohl dieses einen Konformationswechsel innerhalb des Fc-Fragments bedingt. Ein Konformationswechsel könnte auch erklären, dass Glykospezies, die ein biverzweigendes N-Acetylglucosamin besitzen oder defukosyliert sind, eine stark erhöhte antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC)[57,59,60] zeigen.

Verschiedene Glykospezies könnten eine, wenn auch nur leicht veränderte, Tertiärstruktur besitzen, was zu unterschiedlichen bzw. unterschiedlich starken Effektorfunktionen führen könnte. Unter Berücksichtigung der Konformationsänderungen, die durch die Glykosylierungen induziert werden[159], kann der Proteinteil des Fc-Fragments, genauso wie dessen Oligosaccharidanteil, symmetrisch oder asymmetrisch sein. Weil das Fc-Fragment bezüglich der Bindung seiner Liganden sowohl mono- als auch bivalent sein kann[41,160], könnte der Beitrag der Glykosylierung somit sowohl kooperativ als auch additiv sein.

In unterschiedlichen Arbeiten, die sich mit der Effektivität der antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) in Abhängigkeit von der Glykosylierung beschäftigten[57,59,60], wurde die Glykosylierung nur auf der Ebene der ungepaarten Oligosaccharide bestimmt. Zwar ist der Einfluss defukosylierter Glykospezies auf die ADCC größer als der Einfluss von Oligosacchariden mit biverzweigendem N-Acetylglucosamin[60], eine Optimierung der antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität durch Paarung bestimmter Oligosaccharide wäre aber dennoch denkbar.

Hier wurde erstmals gezeigt, dass die symmetrische als auch asymmetrische Oligosaccharidpaarung biverzweigender Oligosaccharide mit ESI-MS am intakten Fc-Fragment verfolgt werden kann. Aufgrund der Limitierungen, die hauptsächlich durch die natürliche Isotopenbreite vorgegeben sind, konnte dieses nicht für die defukosylierten Glykospezies

verwirklicht werden. Wenn berücksichtigt wird, dass die defukosylierten Glykospezies nur einen Anteil unter 7 % am Glykosylierungsprofil von IgG1 haben (G0-Fuc – 0,9 %, G1-Fuc – 2,8 % und G2-Fuc – 2,8 %, Tabelle 3-31), könnten höhere Anteile die Charakterisierung der Oligosaccharidpaarung dieser Glykospezies ermöglichen. Dies ist von enormer Relevanz für die Charakterisierung von Glykosylierungsprofilen therapeutisch wirksamer monoklonaler Antikörper oder intravenöser Immunglobulin (IVIG)-Präparate, deren Glykosylierungsprofile aktiv beeinflusst werden können.

3.10 Erstellung von Glykosylierungsprofilen humaner Individuen

Es wurde bereits mehrfach erwähnt, dass die Effektivität der antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) durch den Fukosylierungsgrad und den Anteil biverzweigender Glykospezies beeinflusst wird[57,59,60]. Ob die Glykosylierung, besonders im Bezug auf die biverzweigenden und defukosylierten Glykospezies des IgG einzelner Individuen ausreichend variiert, um die Effektivität der ADCC in Abhängigkeit von der Glykosylierung auch bei verschiedenen Individuen beeinflussen zu können, wurde anhand von 14 gesunden Individuen untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-38 zusammengestellt.

Tabelle 3-38: IgG1-Glykosylierungsprofil von 14 gesunden humanen Individuen im Hinblick auf den Anteil defukosylierter und biverzeigender Glykospezies. Die Anteile galaktosylierter und sialysierten Glykospezies wurden für jede der drei Kernoligosaccharidstrukturen addiert: fukosyliert (normal), defukosyliert (-Fuc), fukosyliert mit biverzweigendem N-Acetylglucosamin (+Nag). Die drei Kernstrukturen sind schematisch dargestellt.

Person	relative Peakflächen in Prozent													
	Glykospezies													
	G0	G1	G2	G1 +Sia	G2 +Sia	Normal	G0 -Fuc	G1 -Fuc	G2 -Fuc	-Fuc	G0 +Nag	G1 +Nag	G2 +Nag	+Nag
4901	24	30	12	2,6	8	77	2,5	2,7	1,8	7,0	8	7	1,6	16
4900	21	27	19	1,5	6	74	2,1	3,4	2,5	8,0	8	8	1,2	18
4894	20	31	17	2,5	13	85	0,4	0,8	0,7	1,9	6	6	1,4	13
4887	15	30	17	2,2	15	79	1,3	2,1	2,3	5,8	6	8	1,8	15
4862	21	36	13	3,0	9	82	0,8	0,9	0,7	2,4	6	8	1,5	15
4859	20	40	15	2,5	7	83	1,5	2,1	2,3	5,8	4	5	1,1	11
4804	18	33	16	2,4	9	79	1,9	3,3	2,3	7,4	5	8	1,1	14
4803	24	30	10	2,1	5	71	2,6	6,2	2,7	11,5	7	10	1,1	18
4781	22	30	11	2,3	8	73	2,5	5,1	3,4	11,0	6	8	1,5	16
4796	16	30	18	1,9	10	76	1,4	3,2	2,5	7,1	6	8	2,0	16
4817	18	37	19	2,0	10	86	0,6	0,7	0,5	1,8	4	7	1,3	12
4758	11	26	21	2,0	13	73	2,8	3,7	3,6	10,1	5	9	2,3	16
4755	21	37	14	1,8	6	79	1,5	2,9	1,7	6,1	6	8	1,2	15
4870	12	32	20	2,2	11	77	1,4	3,5	4,4	9,3	4	7	2,2	14
Ø						**78**				**7**				**15**
± S.A.						**5**				**3,2**				**2**
V.K.						**6**				**46**				**14**

Der Anteil der fukosylierten biantennigen Hauptglykospezies (normal) mit variabler Galaktosylierung und Sialysierung (G0 – G2+Sia) unterliegt aufgrund des hohen Anteils von 78 % mit einer Standardabweichung von ±5 nur geringen Schwankungen. Das gleiche gilt auch für Glykospezies mit biverzweigendem N-Acetylglykosamin, die einen durchschnittli-

chen Anteil von 15 % mit einer Standardabweichung von ±2 haben. Der Anteil defukosylierter Oligosaccharide am gesamten Oligosaccharidpool variiert hingegen bei einem durchschnittlichen Anteil von nur 7 % und einer Standardabweichung von ±3,2 um fast eine Zehnerpotenz. Bei einigen Individuen (Person 4817) konnten die defukosylierten Glykopeptide kaum nachgewiesen werden (< 2 %), wogegen der Anteil bei anderen mehr als 10 % (Person 4803) betrug.

Dass die Standardabweichungen für fukosylierte und defukosylierte Glykospezies ähnlich groß sind, obwohl die Mengenanteile um eine Größenordnung auseinander liegen, wurde erwartet, da eine Fukosylierung der Oligosaccharidkernstruktur im gleichen Maß zur Zunahme der fukosylierten wie zur Abnahme der defukosylierten Glykospezies führt. Gleiches gilt auch für den Anteil biverzweigender Glykospezies.

Das Expressionsniveau oder die Aktivität der α1,6-Fukosyltransferase sowie der β(1,4)-N-Acetylglucosaminyltransferase III, welche die Fukosylierung bzw. die Biverzweigung von Oligosacchariden des IgG im Golgi-Apparat katalysieren[161], könnten verantwortlich für den unterschiedlichen Glykosylierungsgrad sein.

Ein erhöhter Anteil biverzweigender Glykospezies führt nur zu einem mehrfachen Anstieg der zellulären antikörperabhängigen Zytotoxizität[60]. Daher ist eine Beeinflussung der Effektivität der ADCC durch den Anteil biverzweigender Glykospezies im Zusammenhang mit den geringen Schwankungsbreiten bei gesunden Individuen unwahrscheinlich.

Shinkawa et al.[60] zeigten anhand von zwei monoklonalen Antikörpern (mAbs) mit identischer Primärstruktur aber unterschiedlichem Fukosylierungsgrad, dass die Effektivität der antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität durch die Fukosylierung stark beeinflusst wird. Der mAb mit niedrigem Fukosylierungsgrad zeigte bei einer 100-fach geringeren Konzentration eine vergleichbare ADCC als der mit hohem Fukosylierungsgrad. Außerdem war die maximale ADCC ebenfalls für den mAb mit niedrigerem Fukosylierungsgrad um das 2 – 3-fache gesteigert. Eine Variation des Anteils defukosylierter Glykospezies von 1 - 10 % könnte daher ausreichen, um die Effektivität der ADCC zu beeinflussen. Dies könnte sowohl für die Effektivität der ADCC zur Vermeidung einer Infektion, wenn nur geringe Konzentrationen spezifischer Antikörper gegen ein Antigen zur Verfügung stehen, gelten als auch bei einer akuten Infektion, bei der hohe Konzentrationen spezifischer Antikörper gebildet werden.

3.11 Glykosylierung von IgG4 und Charakterisierung von Fcγ4-Fragmenten

Während dieser Arbeit wurde ein Protokoll zur Anreicherung von IgG4 (Kapitel 2.3.6) entwickelt. Ein Auslöser hierfür sind die besonderen Eigenschaften des IgG4, die sich auf seine Bivalenz[29] begründen. IgG4 unterbindet in einer Mischung von IgG1 und IgG4 die Bindung des Komplementproteins C1q an IgG1, wodurch die Komplementaktivierung verhindert wird[24]. IgG4 schützt daher gegen die Effekte, die durch komplementfixierende Antikörper ausgelöst werden. Es wurde außerdem beobachtet, dass IgG4 bevorzugt bei chronischer Antigenstimulation exprimiert wird[12]. IgG4 ist dabei aufgrund seiner Bivalenz nicht fähig große Immunkomplexe zu bilden und führt nicht zu Immunpräzipitation[162]. Insgesamt besitzt IgG4 somit ein geringes Potential zur Auslösung immunbedingter Entzündungsprozesse.
Die genannten Eigenschaften von IgG4 sollen bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen ausgenutzt werden, wo die ständige Stimulation mit Autoantigenen zu chronischen Entzündungsprozessen führt. Durch die intravenöse Applikation von Immunglobulinen (IVIG), die einen möglichst hohen IgG4-Anteil besitzen, soll eine Hemmung entzündlicher Prozesse erreicht werden.
Dazu wurde die Methode zur präparativen Anreicherung von IgG4 aus Human-Plasma entwickelt (Kapitel 2.3.6). Eine umfangreiche Charakterisierung des Glykosylierungsprofils bis auf die Ebene von intaktem Fc-Fragment und der Allotypenverteilung von IgG4 in den verschiedenen IgG4-angereicherten Fraktionen war daher erforderlich, um deren Einsatz in klinischen Studien zu ermöglichen.

3.11.1 Bestimmung des Glykosylierungsprofils von IgG4

Die Glykosylierungsprofile von IgG4 wurden in verschiedenen Proben anhand des GluC-Glykopeptids im *Peptide Map* bestimmt. Dieses Glykopeptid ist isobar mit dem des IgG3 und kann somit nicht massenspektrometrisch von diesem unterschieden werden. Daher war es notwendig, das Glykosylierungsprofil der dominanten Glykospezies von IgG4 mit variabler Galaktosylierung und Sialysierung (G0, G1, G2 und G2+Sia) aus IgG2-angereicherten Fraktionen (Kapitel 3.1.3) zu bestimmen, die, neben IgG2, auch ~6 % IgG4 aber kein IgG1 oder IgG3 mehr enthielten (Tabelle 3-1).
Die Glykosylierungsprofile von IgG4 in IgG2-angereicherten Fraktionen und IgG1 aus europäischem Poolplasma stimmen für die Hauptglykospezies überein (Tabelle 3-39). Auffällig ist aber der, im Vergleich dazu, erhöhte Anteil sialinsäurehaltiger Glykospezies sowohl in der IgG4-Anreicherung als auch in den beiden weiteren IgG4-Fraktionen (Reich und Fcγ4-Fragment), die aus der IgG4-Anreicherung hergestellt werden (Abbildung 3-1). Dies zeigt sich in den Anteilen der sialinsäurehaltigen Oligosaccharide G1+Sia und G2+Sia. Des Weiteren geht mit dem erhöhten Sialinsäure-Anteil ein, im Vergleich zur normalen Glykosylierung von IgG4, verringerter Galaktosylierungsgrad einher, der sich in der Dominanz der nichtgalaktosylierten Glykospezies (G0) widerspiegelt.

Tabelle 3-39: Glykosylierungsprofil des IgG4 im Vergleich zu dem von IgG1 in verschiedenen Präparationen. Die Glykosylierungsprofile wurden anhand des Glykopeptids von IgG1 bzw. IgG4 im *Peptide Map* erstellt. Mit * markierte Glykospezies wurden nicht detektiert. Der IgG4-Gehalt und der maximale Variationskoeffizient in Abhänigkeit von der Anzahl der Messungen (n) sind in Klammern angegeben. Das Glykosylierungsprofil des IgG1 wurde aus, über Protein A-Chromatographie gereinigtem, europäischem Poolplasma bestimmt. Die IgG4 enthaltenden Fraktionen wurden entsprechend Kapitel 3.1.4 gereinigt.

Glykan	Relative Peakflächen in Prozent bezogen auf G1				
	IgG4				**IgG1**
	Fcγ4-Fragment (> 50 %)	Reich (> 50 %)	Anreicherung (> 25 %)	IgG2-Anreicherung (~6 %)	Europäisches Poolplasma
	Peptide Map (n=4, ± 22 %)	*Peptide Map* (n=4, ± 16 %)	*Peptide Map* (n=6, ± 18 %)	*Peptide Map* (n=4, ± 24 %)	*Peptide Map* (n=6, ± 19 %)
G0	**86**	96	95	46	56
G1	**100**	100	100	100	100
G2	**40**	43	46	53	57
G1+Sia	**28**	23	24	*	6
G2+Sia	**68**	62	64	26	24
G0+Nag	**31**	36	32	*	21
G1+Nag	**27**	22	25	*	22
G2+Nag	*	*	*	*	5
G0-Nag	**11**	12	10	*	18
G1-Nag	*	*	*	*	17
G0-Fuc	*	*	*	*	3
G1-Fuc	*	*	*	*	10
G2-Fuc	*	*	*	*	10

Der Vergleich der Glykosylierung aller Fraktionen bis zur Darstellung von Fcγ4-Fragement belegt, dass nur der erste Reinigungsschritt selektiv bezüglich der Glykosylierung ist.

Es wurde bereits zuvor für IgG1 gezeigt, dass weder die Protein A-Chromatographie noch die Papainspaltung selektiv bezüglich der Glykosylierung sind (Kapitel 3.9.1). Diese beiden Schritte werden auch für die Darstellung der IgG2-angereicherten Fraktion benötigt. Die Übereinstimmung der Glykosylierung von IgG4 in IgG2-angereicherten Fraktionen mit der von IgG1 zeigt daher, dass die Glykosylierung von IgG4 auch im Human-Plasma mit der von IgG1 übereinstimmt.

Der höhere Sialinsäure-Anteil im Glykosylierungsprofil kann mit der Anionenaustausch-Chromatographie erklärt werden, die beim ersten Reinigungsschritt verwendet wird. Die Sialinsäuren tragen im neutralen pH-Bereich negative Ladungen, die eine stärkere Bindung sialinsäurehaltiger Glykospezies an die positiv geladen Gruppen des Anionenaustauschmaterials bewirken. Eine ähnliche Beobachtung machten auch schon Bond et al. bei der Untersuchung der Glykosylierung von Patienten mit rheumatoider Arthritis[163].

Die mit dem erhöhten Sialinsäure-Anteil verbundene Anteilsverschiebung der Glykospezies mit variabler Galaktosylierung (G0, G1 und G2) lässt einen Rückschluss auf die Oligosaccharidpaarung im intakten IgG4 zu. Da eine direkte Beeinflussung des pI-Wertes vergleichbar der Sialinsäure durch die neutralen Oligosaccharide mit variabler Galaktosylierung unwahrscheinlich ist, sollten sich die sialinsäurehaltigen Oligosaccharide bevorzugt mit den Oligosacchariden, die nicht oder nur einfach galaktosyliert (G0 und G1) sind, paaren. Kombinationen sialinsäurehaltiger Oligosaccharide mit bigalaktosylierten Oligosacchariden

(G2) im intakten Fcγ4-Fragment sollten hingegen benachteiligt sein. Dies ist ein Beleg dafür, dass die Paarung der Oligosaccharide im IgG nicht willkürlich ist, sondern bestimmte Kombinationen bevorzugt gebildet werden.

3.11.2 Charakterisierung von Fcγ4-Fragment

- **Bestimmung der IgG4-Allotypen anhand von Fcγ4-Fragment**

Die vollständige Primärstrukur der verschiedenen Allotypen von Fcγ4-Fragment mussten bestimmt werden, um eine Interpretation der dekonvolierten ESI-MS-Daten von reduziertem Fcγ4-Fragment zu ermöglichen.

Durch die Identifizierung und Charakterisierung der allotypischen Markerpeptide G4m(R), G4m(K), G4m(L) und G4m(V) in IgG4-reichen Fraktionen konnte bereits erstmals die Existenz der drei polyklonalen IgG4-Allotypen G4m(RL), G4m(RV) und G4m(KL) auf Peptidebene nachgewiesen werden (Kapitel 3.4). Ob das Verhältnis der IgG4-Allotypen, welches mit den allotypischen Markern auf Peptidebene bestimmt werden kann, auch quantitativ mit dem Ergebnis auf Proteinebene übereinstimmt, sollte durch die Charakterisierung von deglykosyliertem Fcγ4-Fragment belegt werden.

Die Bestimmung des IgG-Subklassenverhältnisses in Proben von Fcγ4-Fragment mittels radialer Immunodiffusion (RID) zeigte bereits, dass neben IgG4 (~60 %) die Subklasse IgG1 (~40 %) fast äquimolar enthalten ist (Tabelle 3-1). Daher wurden im *Peptide Map* von Fcγ4-Fragment, neben den GluC-Fragmenten des konstanten Bereichs von IgG4, auch die Fragmente des konstanten Bereichs von IgG1 gefunden.

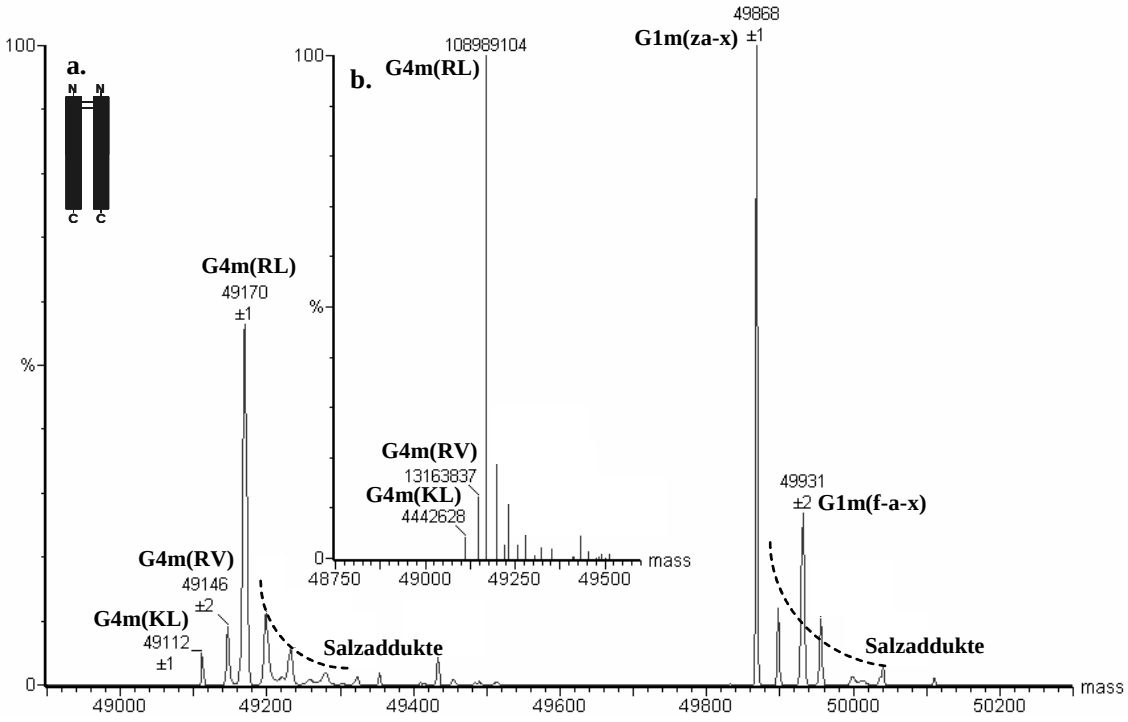


Abbildung 3-62: MaxEnt dekonvoliertes ESI-MS-Spektrum von deglykosyliertem Fcγ4-Fragment. Das Spektrum zeigt, neben den Allotypen von IgG4, auch Allotypen von IgG1. Im Spektrenausschnitt **b** sind die Peakintensitäten proportional zu den Peakflächen dargestellt.

Die Abbildung 3-62 zeigt das dekonvolierte ESI-MS-Spektrum von deglykosyliertem Fcγ4-Fragment. Wie aufgrund des hohen IgG1-Anteils zu erwarten war, wurden auch die IgG1-Allotypen G1m(za-x) und G1m(f-a-x) identifiziert.
Der Peak mit einem Molekulargewicht von 49170 Da konnte dem Fcγ4-Fragment des G4m(RL)-Allotypen von IgG4 (Abbildung 3-63) zugewiesen werden.

YGPPCPS | CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV
Papainschnittstelle
HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV

YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV

DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG.K

Abbildung 3-63: Aminosäuresequenz vom Fcγ4-Fragment des Allotypen G4m(RL); rot – Variante Positionen, welche die verschiedenen Allotypen des IgG4 definieren, blau – Glykosylierungsstelle.

Ausgehend von diesem Allotypen konnten die Peaks mit den Molekulargewichten 49146 Da und 49112 Da den Fcγ4-Fragmenten der Allotypen G4m(RV) und G4m(KL) zugeordnet werden. Die Molekulargewichte aller Komponenten wurden mit einem Fehler unter 90 ppm bestimmt (Tabelle 3-40).

Tabelle 3-40: Vergleich der theoretischen mit den experimentell bestimmten Molekulargewichten von Fcγ-Fragmenten der Allotypen des IgG1 und IgG4.

Allotypen	**Fcg-Fragment**		
	$M_{Theor.}$ [Da]	$M_{Exp.}$ [Da]	Fehler [ppm]
IgG4			
G4m(RL)	49169,6	49170	8
G4m(RV)	49141,6	49146	90
G4m(KL)	49113,6	49112	-33
IgG1			
G1m(za-x)	49929,7	49931	26
G1m(f-a-x)	49865,6	49868	48

Die Zuordnung der IgG4-Komponenten wurde durch *Peptide Mapping* von GluC-verdautem Fcγ4-Fragment bestätigt. Die Sequenzabdeckung betrug 92 %. Da das C-terminale GluC-Fragment mit Lysin in der Probe nicht nachgewiesen wurde, ist davon auszugehen, dass diese Aminosäure, wie beim IgG1, auch beim IgG4 vollständig posttranslational entfernt wird. Der N-Terminus (Abbildung 3-64) wurde in einem tryptischen Verdau von Fcγ4-Fragment identifiziert, weil das vergleichbare GluC-Peptid mit einer Länge von fünf Aminosäuren nicht nachweisbar war. Die Identifizierung gelang anhand eines Chymotrypsin-Fragments nach einer Inkubationszeit von 30 h mit Trypsin, welches Chymotrypsin als Verunreinigung enthielt.

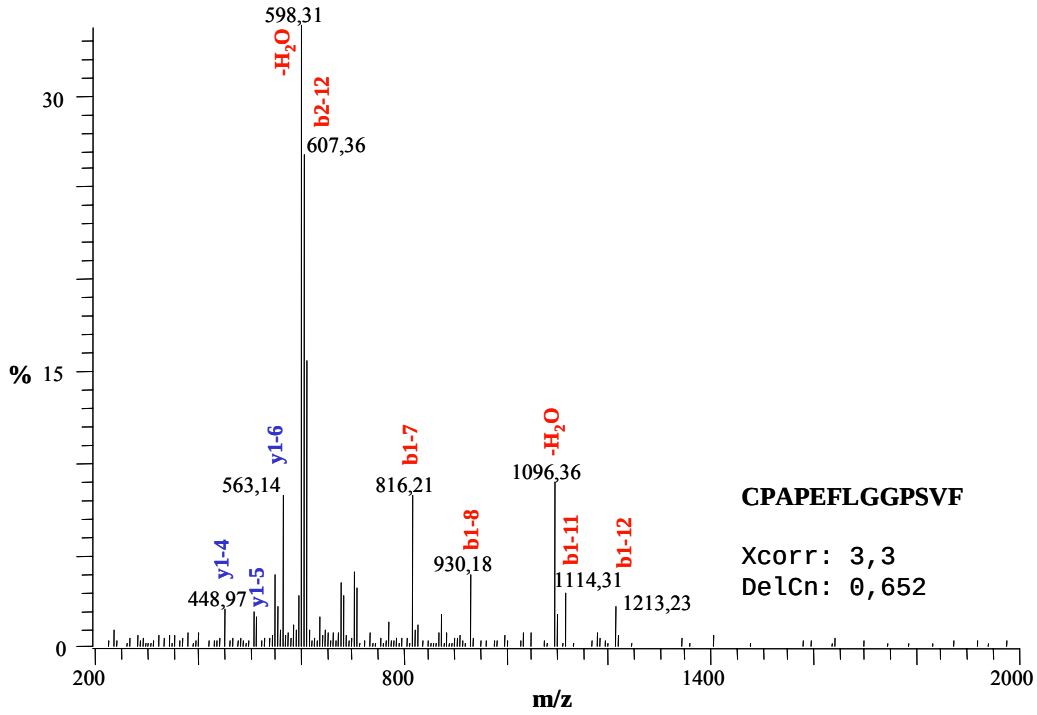


Abbildung 3-64: MS/MS-Spektrum vom N-terminalen Peptid des Fcγ4-Fragment. Der XCorr- und der DelCn-Wert sind als Güteparameter der automatischen Identifizierung mittels des Sequest-Algorithmus angegeben.

Die Allotypenverteilung des IgG4 wurde mit Hilfe der allotypischen Markerpeptide (*Peptide Map)* und anhand der intakten Fcγ4-Fragmente (Abbildung 3-62, b) bestimmt.

Tabelle 3-41: Bestimmung der Allotypenverteilung des IgG4. Das Verhältnis der IgG-Allotypen wurde mittels der allotypischen Markerpeptide (*Peptide Map*) und der deglykosylierten, intakten Fcγ4-Fragmente ermittelt. Der Bestimmung der Allotypenverteilung von intaktem deglykosyliertem Fcγ4-Fragment liegt Abbildung 3-62 zugrunde.

	relative Peakflächen in Prozent		
	deglykosyliert		
IgG4-Allotypen	**IgG4-reich**	**Fcγ4-Fragment**	
	peptide map (± 16 %)		intakt
G4m(RL)	86	84	86
G4m(RV)	11	13	10
G4m(KL)	3	3	4

Das Verhältnis der Allotypen ändert sich bei der Darstellung von Fcγ4-Fragment nicht. Somit ist die Darstellung von Fcγ4-Fragment nicht selektiv bezüglich der Allotypenverteilung (Tabelle 3-41). Außerdem stimmt die Allotypenverteilung, die mit den IgG4-Markerpeptiden G4m(R), G4m(K), G4m(L) und G4m(V) bestimmt wurde, mit der auf Proteinebene, die aus den dekonvolierten ESI-MS-Daten von deglykosyliertem Fcγ4-Fragment bestimmt wurde, überein. Das Verhältnis der vorhandenen IgG4-Allotypen kann somit auf Peptidebene quantitativ bestimmt werden.

- **Intakte Fcγ4-Fragmente**

Abschließend soll anhand des intakten Fcγ4-Fragments bestätigt werden, dass die sialysierten Oligosaccharide (G1+Sia und G2+Sia) bevorzugt mit den nicht oder nur einfach galaktosylierten Oligosacchariden im intakten IgG4 paaren (Kapitel 3.11.1). Mit Hilfe der gewonnenen Informationen auf der Ebene des reduzierten Fcγ4-Fragments, ist eine beinahe vollständige Zuordnung der vorhanden Peaks auf der Ebene des intakten Fcγ4-Fragments möglich. Dazu wurde mit den Informationen, die aus den ESI-MS-Daten von reduziertem Fcγ4-Fragment gewonnen wurden (nicht dargestellt), die ESI-MS-Daten von intaktem Fcγ4-Fragment simuliert.
Das dekonvolierte ESI-MS-Spektrum des intakten Fcγ4-Fragments zeigt eine Überlagerung zweier Gruppen von Glykospezies (Abbildung 3-65). Die Peaks der rechten Gruppe können hauptsächlich Glykospezies der Allotypen G1m(za-x) und G1m(f-a-x) vom Fcγ1-Fragment zugeordnet werden. Die meisten Peaks der linken Gruppe resultieren aus Glykospezies vom Fcγ4-Fragment des Allotyps G4m(RL). In der Spektrenmitte kommt es zu Überschneidungen beider Gruppen. Die Glykosylierung von Fcγ4-Fragment wird, neben der Serie von Glykospezies mit variabler Galaktosylierung (G0 – G4), durch sialinsäurehaltige Glykospezies (G1+Sia – G4+2Sia) bestimmt. Dies zeigte sich bereits bei der Charakterisierung des Glykopeptids von IgG4, welches einen erhöhten Anteil der sialinsäurehaltigen Oligosaccharide G1+Sia und G2+Sia aufwies. Die sialinsäurehaltigen Oligosaccharide paaren sowohl mit sich selbst als auch mit allen anderen Oligosacchariden. Die großen Peakflächen der Glykospezies G2+Sia und G3+Sia, die durch Kombination der nicht und einfach galaktosylierten Oligosaccharide (G0 und G1) mit den zweifach galaktosylierten und sialysierten Oligosacchariden (G2+Sia) im intakten Fc-Fragment gebildet werden, scheinen die bevorzugte Paarung dieser Oligosaccharide zu bestätigen. Dies wird unterstützt durch die im Vergleich dazu geringe Peakfläche der Glykospezies G4+Sia, die durch Kombination der zweifach galaktosylierten Oligosaccharide (G2) mit den zweifach galaktosylierten und sialysierten Oligosacchariden (G2+Sia) gebildet wird. Einschränkend muss hier erwähnt werden, dass quantitative Aussagen auf der Ebene des intakten Fragments nur bedingt möglich sind. Die Glykosylierung von intaktem Fcγ1-Fragment wurde zuvor bereits erläutert (Abbildung 3-60).

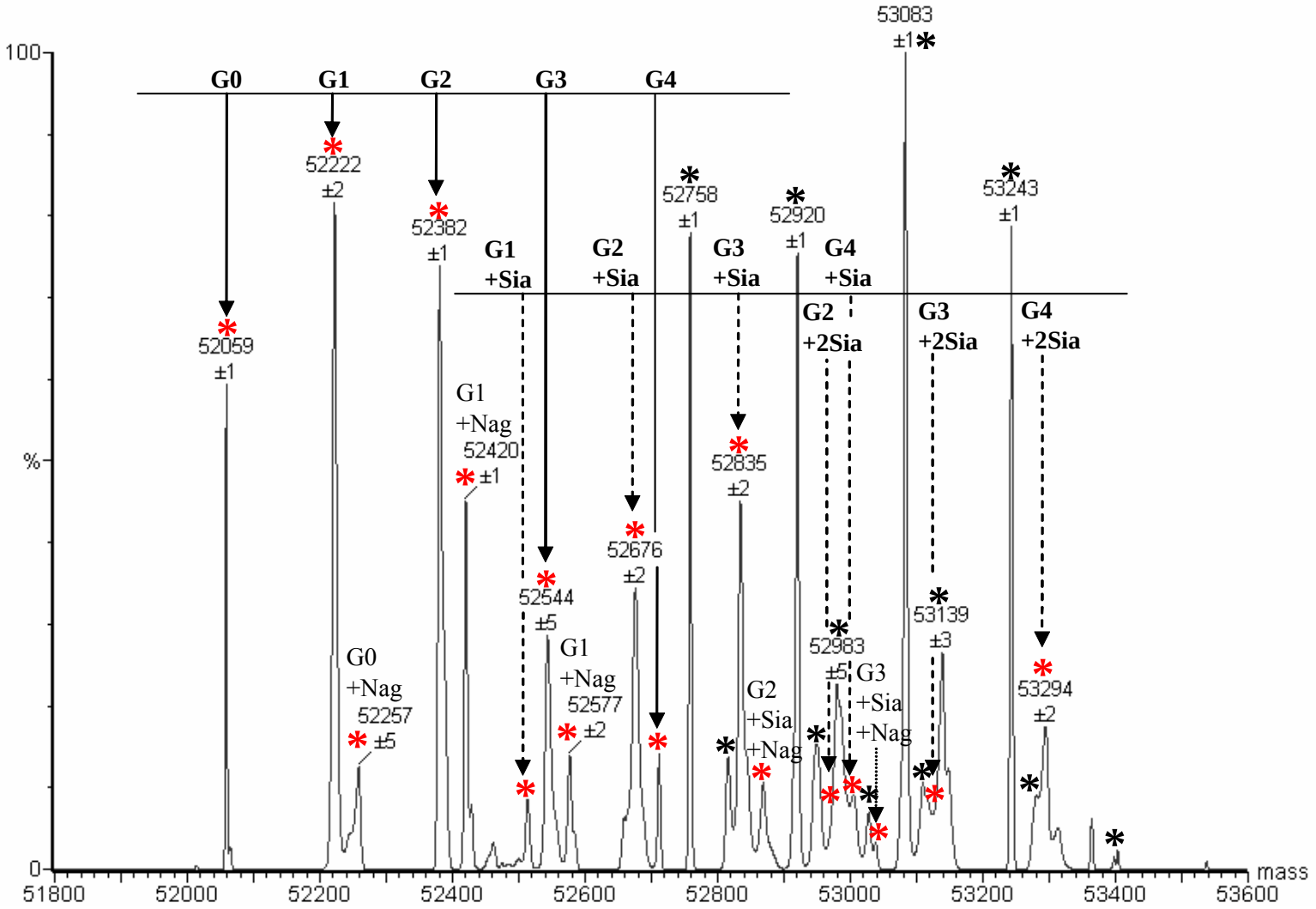


Abbildung 3-65: MaxEnt dekonvoliertes ESI-MS-Spektrum von intaktem Fcγ4-Fragment; rot – Glykospezies des-Allotyps G4m(RL) und schwarz – Glykospezies der Allotypen G1m(f-a-x) und G1m(za-x). Die einzelnen Glykospezies vom intakten Fc-Fragment sind als Kombonation zweier Glykospezies vom reduzierten Fc-Fragment aufzufassen.

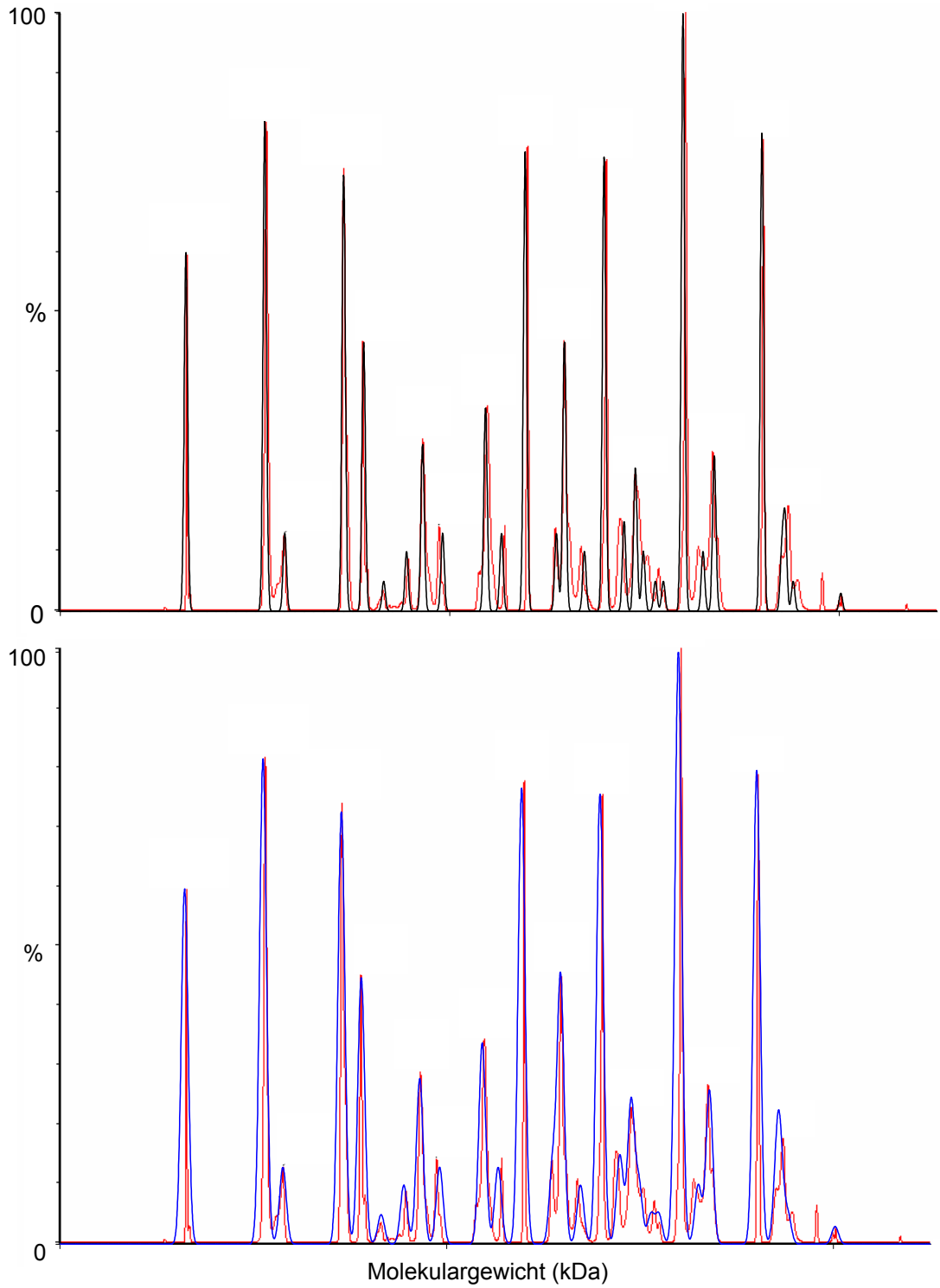


Abbildung 3-66: Wissensbasierte Dekonvolution unter Verwendung verschiedener Peakbreiten auf halber Höhe (σ) von intaktem Fcγ4-Fragment; MaxEnt dekonvoliertes Originalspektrum (rot), wissensbasierte Dekonvolution (schwarz - σ = 3,55 Da, blau - σ = 7,1 Da). Die Simulation der Spektren erfolgte durch Berechnung der theoretischen Molekulargewichte und Intensitäten für die einzelnen Glykospezies. Dazu wurden die Intensitäten der Glykospezies der IgG4- und IgG1-Allotypen, die aus den dekonvolierten ESI-MS-Daten von reduziertem Fcγ4-Fragment bestimmt wurden, zugrunde gelegt. Für die Berechnung wurde eine zufällige Oligosaccharidpaarung der Glykospezies eines Allotyps im intakten Fragment angenommen. Abschließend wurden die berechneten Intensitäten manuell an die experimentellen Daten angepasst, indem die Abweichungen minimiert wurden.

In Abbildung 3-66 ist die Simulation des dekonvolierten ESI-MS-Spektrums von Fcγ4-Fragment unter Verwendung verschiedener Peakbreiten auf halber Höhe (σ) dargestellt. Während die Peakbreite des oberen Spektrums (a) nur 1/2 der natürlichen Isotopenbreite des Fc-Fragments entspricht, ist im unteren Spektrum (b) die natürliche Isotopenbreite simuliert. Der Fehler betrug maximal 150 ppm für einzelne Glykospezies. Insgesamt gelangen hier erstmals die massenspektrometrische Charakterisierung des Fc-Fragments von IgG4 bis auf die Ebene des intakten Proteins und, damit verbunden, der Nachweis der IgG4-Allotypen und deren Glykosylierung.

Für die Verwendung von IgG4-angereicherten Fraktionen als IVIG-Präparationen in klinischen Studien zu Autoimmunerkrankungen muss der erhöhte Sialysierungsgrad und die geringere Galaktosylierung im Vergleich zur normalen Glykosylierung von IgG berücksichtigt werden. Sowohl die Galaktosylierung als auch die Sialysierung haben Einfluss auf die Effektorfunktionen des IgG[53-55].
Die genaue Bedeutung der Galaktosylierung ist bis heute unklar, allerdings wird ein geringerer Grad an Galaktosylierung bei Patienten mit rheumatoider Arthritis und anderen Autoimmunerkrankung gefunden[43]. Degalaktosylierte IgG-Glykospezies werden dort von Autoantikörpern, den rheumatoiden Faktoren, bevorzugt gebunden.
Jassal et al.[53] zeigten an einem rekombinanten monoklonalen Antikörper, dass die Bindungsaffinität zu Fcγ-Rezeptoren erst bei einer vollständigen Sialysierung Wildtypniveau erreicht. Der stark erhöhte Anteil sialysierter Glykospezies könnte daher durch eine verstärkte Bindung an Fcγ–Rezeptoren kontraproduktiv bei entzündlichen Prozessen wirken.
Da durch die intravenöse Applikation von Immunglobulinen (IVIG) mit einem möglichst hohen IgG4-Anteil eine Hemmung entzündlicher Prozesse erreicht werden soll, ist das veränderte Glykosylierungsprofil zu Gunsten einer höheren Sialysierung und geringeren Galaktosylierung daher insgesamt eher negativ zu beurteilen.

4 Zusammenfassung

4.1 Entwicklung einer Strategie zur Differenzierung und Quantifizierung von Immunglobulinen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Gesamtstrategie (Abbildung 3-15) zur Differenzierung und Quantifizierung von Immunglobulinprofilen einzelner Individuen anhand spezifischer Markerpeptide mit LC/ESI-MS und LC/ESI-MS/MS entwickelt. Die Strategie wurde für das komplexe humane IgG-System experimentell umgesetzt.

In einer ersten, theoretischen Phase wurde eine redundante Sequenzdatenbank aller bekannten humanen Ig-Sequenzen (Ig-DB) erstellt. Ausgehend davon wurde ein Programm (Ig-Pep) entwickelt, welches den proteolytischen Verdau aller in der Ig-DB enthaltenen Sequenzen mit unterschiedlichen Proteasen simuliert und durch Vergleich der Peptide eines Verdaus eine nichtredundante Peptiddatenbank erstellt. Diese nichtredundanten Peptiddaten erlaubten eine effektive Auswahl spezifischer allo- und isotypischer Markerpeptide für humane Ig-Iso- und -Allotypen. Das existierende serologische Markersystem für humane Ig, welches auf spezifischen monoklonalen und polyklonalen Antikörpern basiert, konnte vollständig durch ein System proteolytischer Markerpeptide ersetzt werden. Das im Zusammenhang mit serologischen Markern auftretende Problem der Isoallotypie konnte durch Verwendung geeigneter Proteasen überwunden werden.

In der folgenden, experimentellen Phase wurden alle für die kaukasische Population relevanten Markerpeptide des humanen IgG-Systems experimentell mit ESI-MS und ESI-MS/MS identifiziert und charakterisiert. Dazu musste im Vorfeld ein Reinigungsprotokoll für die verschiedenen IgG-Subklassen entwickelt werden.

Neben der vergleichenden Quantifizierung wurde mit Hilfe der isotypischen Markerpeptide ein Verfahren zur „absoluten“ Quantifizierung der einzelnen IgG-Subklassen entwickelt. Hierzu wurde die Verwendung eines homologen Proteins als interner Standard etabliert. Mit Hilfe der allotypischen Markerpeptide konnte ein semiquantitatives IgG-Profil für kaukasische Individuen erstellt werden. Die mit dieser Methode bestimmten Haplotyphäufigkeiten einer kaukasischen Population stimmten mit denen aus Populationsstudien der klassischen Serologie überein. Die Richtigkeit der Allotypenbestimmung von IgG1 und IgG4 mit Hilfe der allotypischen Markerpeptide wurde durch die Charakterisierung der deglykosylierten Fcγ-Fragmente dieser IgG-Subklassen belegt. Dabei gelang erstmals der Nachweis der polyklonalen IgG1-Allotypen G1m(zax) und der IgG4-Allotypen G4m(RV) und G4m(KL) aus Human-Plasma.

Die Methodik wurde anschließend erfolgreich bei der Erstellung von Ig-Profilen kaukasischer Individuen und zur Charakterisierung von IVIG-Präparationen verschiedener Hersteller eingesetzt.

Der Vergleich der IgG-Profile von kaukasischen Individuen zeigte, dass der Anteil der Allotypen eines Isotypen bei heterozygoten Individuen unterschiedlich ist. Dieses lässt vermuten, dass die Aktivitäten der Genloci von Allotypen einzelner Isotypen verschieden sind, was die unterschiedlichen Expressionsniveaus der Allotypen erklären würde.

Die Bestimmung der IgG-Subklassenanteile von IVIG-Präparationen verschiedener kommerzieller Anbieter zeigte, dass die IgG4-Konzentration bei diesen Präparaten im Vergleich zu früheren Studien innerhalb des normalen, von der *World Health Organization* angegebenen Konzentrationsbereichs lag. Weiterhin konnte durch Vergleich mit amerikanischem und europäischem Human-Plasma gezeigt werden, dass die IgG-Profile der IVIG-Präparationen nicht durch die Produktion verändert werden, sondern maßgeblich durch die Allotypenverteilung im Ausgangsplasma beeinflusst werden. Da die Anwesenheit spezifischer Antikörper gegen bestimmte Typen von Antigenen allotypenabhängig ist[153], könnte somit deren Anteil in den IVIG-Präparationen durch die Art der Plasmaspender beeinflusst werden.

4.2 Charakterisierung der Glykosylierung von Ig bis auf die Ebene des intakten Proteins

Es wurde eine Methode zur Erstellung eines Glykosylierungsprofils von IgG1 anhand des Glykopeptids im *Peptide Map* entwickelt. Der Schwerpunkt lag dabei auf den defukosylierten Glykospezies und denen mit biverzweigenden N-Acetylglucosaminen. Beide haben Einfluss auf die Effektivität der antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC). Die Methodik lieferte für die variabel galaktosylierten Hauptglykospezies (G0, G1 und G2) Mengenanteile, die in guter Übereinstimmung mit den Literaturdaten sind. Die Messpräzision war ausreichend, um auch die Anteile der defukosylierten und biverzweigenden Nebenkomponenten zu bestimmen, so dass die Erstellung eines umfassenden Glykosylierungsprofils für einzelne Individuen möglich war. Eine Übertragung der Methode auf andere Ig-Isotypen ist ebenfalls möglich. Dies wurde durch die Bestimmung des Glykosylierungsprofils von IgG4 belegt.

Ein Vergleich der Glykosylierung einzelner Individuen zeigte, dass der Anteil der defukosylierten Glykospezies um fast eine Größenordnung variiert, während die Anteile der übrigen Glykospezies kaum Schwankungen außerhalb der Messpräzision zeigen. Da eine 50-fach gesteigerte antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität durch einen höheren Anteil defukosylierter Glykospezies in Hybridoma-Zellkulturen bereits nachgewiesen wurde[59], könnte die beobachtete Schwankung auch beim Menschen die Effektivität der ADCC beeinflussen.

Die Paarung der Oligosaccharide im intakten Immunglobulin könnte sowohl eine kooperative als auch additive Wirkung besitzen, was zu veränderten Effektorfunktionen einzelner symmetrischer oder asymmetrischer Glykospezies führen würde. Um dieses untersuchen zu können, wurde die Methode einer wissensbasierten Dekonvolution von ESI-MS-Daten etabliert. Diese ermöglicht eine Bestimmung der Oligosaccharidpaarung intakter Fcγ-Fragmente auch im Hinblick auf die biverzweigenden Oligosaccharide. Die symmetrische Paarung von Oligosacchariden mit biverzweigendem N-Acetylglucosamin (+2Nag) wurde hier anhand des Fc-Fragments eines einzelnen Individuums erstmals nachgewiesen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Identifizierung aller Glykospezies durch die natürliche Isotopenbreite der einzelnen Signale im ESI-MS limitiert wird. Daher gelang es nicht die defukosylierten Glykospezies, deren Anteil im Glykosylierungsprofil unter 10 % lag, zu identifizieren.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Glykosylierung von IgG4 in Human-Plasma mit der von IgG1 übereinstimmt. Die Anreicherung von IgG4 über Anionenaustausch-Chromatographie führte allerdings zu einem höheren Sialinsäure-Anteil in Kombination mit einer geringen Galaktosylierung. Dies war von Interesse, weil sowohl die Sialysierung als auch die Galaktosylierung die Effektorfunktionen von IgG beeinflussen können[53-55] und die IgG4-angereicherten Präparationen in klinischen Studien zu Autoimmunerkrankungen Anwendung finden. Die mit dem Anstieg sialinsäurehaltiger Glykospezies verbundene Verschiebung zugunsten eines geringeren Galaktosylierungsgrad kann als Argument für die bevorzugte Paarung sialinsäurehaltiger Oligosaccharide mit nicht (G0) oder nur einfach (G1) galaktosylierten Oligosacchariden gewertet werden. Die Paarung mit zweifach galaktosylierten Oligosacchariden (G2) ist hingegen benachteiligt. In diesem Zusammenhang gelang erstmals die massenspektrometrische Charakterisierung der Glykosylierung des Fc-Fragments von IgG4.

5 Fazit

Im Unterschied zu bislang etablierten Assayverfahren zur Bistimmung von Ig in der Bioanalytik, mit deren Hilfe jeweils einzelne Ig-Isotypen[164] oder Ig-Allotypen[121] differenziert werden können, bietet die entwickelte massenspektrometrische Methodik auf der Basis von LC/ESI-MS und LC/ESI-MS/MS schon jetzt die Möglichkeit, ein umfassendes IgG-Profil kaukasischer Individuen schnell mit nur einem LC/ESI-MS/MS-Experiments zu erstellen. Des Weiteren ergibt sich die Perspektive, dieses Konzept auf alle anderen humanen Iso- und Allotypen zu erweitern, so dass am Ende dieser Entwicklung die vollständige Quantifizierung des individuellen Ig-Systems einer Person innerhalb eines LC/ESI-MS/MS-Experiments steht. Hierzu ist nicht die zeitaufwändige Entwicklung spezifischer monoklonaler Antikörper nötig, wie dieses bei alternativen Assays, die z.B. auf RID oder ELISA basieren, der Fall ist[2]. Außerdem kann mit Hilfe der Massenspektrometrie gleichzeitig die funktionell relevante Glykosylierung einzelner Ig untersucht werden und zwar bis auf die Ebene der Oligosaccharidpaarung in intakten Immunglobulinen. Ein umfassendes Gesamtbild des humoralen Immunzweiges kann somit mit einer analytischen Methodik erstellt werden.

Die Verwendung von spezifischen Antikörpern in herkömmlichen Assayverfahren hat zudem einige Nachteile. Einzelne Antikörper erkennen nur ein Epitop von 5 – 6 Aminosäuren. Diese Peptidlänge, die für die Unterscheidung der verschiedenen Isotypen noch hinreichend ist, bietet keine ausreichende Spezifität für die Differenzierung aller Immunglobulinallotypen, zumal nur die Proteinoberfläche für die Epitoperkennung zugängig ist. Aminosäuresubstitutionen im Proteininneren sind mit dieser Methode nicht nachzuweisen. Die isoallotypischen Gm-Marker, die neben einem Allotypen noch weitere Subklassen (Tabelle 1-4) binden, sind ein Resultat dieses Nachteils.

Dieses Spezifitätsproblem, welches sich aus der hohen Homologie der IgG-Subklassen und ihrer Allotypen ergibt, kann mit der massenspektrometrischen Methodik durch die Bestimmung von Markerpeptiden, die durch einen proteolytischen Verdau generiert werden, gelöst werden. Die allotypischen Markerpeptide entsprechen den bekannten Gm-Faktoren. Sie haben den Vorteil, dass es aufgrund der variablen Peptidlänge und der variierenden Ausschnittslage in der Aminosäuresequenz eines Immunglobulins in Abhängigkeit von der

verwendeten Protease, möglich ist, die Isoallotypie aufzuheben. Beispiele hierfür sind das tryptische Markerpeptid G2m(-n) und, neben dem GluC-Markerpeptid G1m(-a), alle allotypischen GluC-Markerpeptide des IgG4, für die unter den serologischen Gm-Faktoren keine Äquivalente mit ausreichender Spezifität existieren.

Die höhere Spezifität der Markerpeptide im Vergleich zu den immunologischen Markerantikörpern mag auf den ersten Blick verwundern, da die monoklonalen Antikörper ein dreidimensionales Epitop erkennen, wogegen sich die Spezifität der Markerpeptide nur durch Variationen in der Primärstruktur ergibt. Die Charakterisierung der allotypischen Epitope der Gm-Faktoren zeigte aber bereits, dass die Spezifität eines Antikörpers bei den homologen Strukturen immer auf Unterschieden in der Primärstruktur beruht[2].

In diesem Zusammenhang ist auch die Optimierung gängiger Assayverfahren auf die Bestimmung von polyklonalen Ig-Fraktionen von Nachteil, da immunologische Markerantikörper verschiedene Allotypen mit unterschiedlicher Effizienz binden können. Die direkte oder indirekte Beteiligung der antigenbindenden Bereiche an den Antikörper/Antigen-Interaktionen auf molekularer Ebene scheint hierfür verantwortlich zu sein. Dies führt dazu, dass monoklonale Antikörper für die Quantifizierung nicht als Referenzsubstanz eingesetzt werden können. Stattdessen werden Referenzserumpräparationen eingesetzt[164], deren IgG-Subklassenkonzentrationen einmalig bestimmt wurden. Diese finden aber keine Anwendung in der Laborroutine, sondern dienen der Herstellung von Sekundärstandards, die dann zum Kalibieren eingesetzt werden. Diese Standards sind demnach aber nicht homogen[165], da die entsprechenden polyklonalen Antikörperpräparationen nicht standardisiert hergestellt werden können. Direkt messbar ist dieses Problem bei Patienten mit multipler Myeloma, bei denen es zu einem gravierenden Anstieg monoklonaler Immunglobuline im Plasma kommt. Bei Ihnen wird oftmals eine zu geringe Ig-Konzentration gemessen[119].

Unter der berechtigten Annahme, dass monoklonale und polyklonale Antikörper sich beim proteolytischen Verdau nach vorheriger Denaturierung und reduktiver Alkylierung gleich verhalten, ist die Zugänglichkeit von Referenzsubstanzen in Form monoklonaler Antikörper für einzelne Ig-Isotypen und auch -Allottypen ein weiterer Vorteil der massenspektrometrischen Analytik.

Die Spezifität einzelner monoklonaler Antikörper kann auch durch das Assayverfahren selbst beeinflusst werden, weil sich in Abhängigkeit von der Fixierungsmethode die Reaktivität eines Antikörpers unterscheiden kann[2]. Monoklonale Reagenzien können somit nicht flexibel eingesetzt werden, da Abweichungen im Protokoll gegebenenfalls zu veränderten Ergebnissen führen. Diese Gefahr existiert bei der massenspektrometrischen Methodik nicht, da hier, mit Ausnahme der Proteasen, auf die Verwendung speziefischer Reagenzien verzichtet wird.

Aufgrund der oben aufgeführten Nachteile sind heute nur Assaysysteme weniger Hersteller für die Quantifizierung von Immunglobulinisotypen erhältlich und die Differenzierung von Ig-Allotypen weitestgehend spezialisierten Labors vorbehalten. Für viele Ig-Allotypen gibt es keine ausreichend spezifischen Reagenzien. Die hier entwickelte Methodik erlaubt schon jetzt die Erstellung eines IgG-Profils kaukasischer Individuen, welches die Quantifizierung der vier IgG-Subklassen beinhaltet und gleichzeitig ist die Erstellung von Glykosylierungsprofilen einzelner Immunglobuline möglich.

Die erfolgreiche Anwendung wurde anhand der Bestimmung der IgG-Profile verschiedener IVIG-Präparationen sowie einzelner Individuen, für die ebenfalls die Glykosylierungsprofile von IgG1 bestimmt wurden, gezeigt. Die Untersuchung genetisch fremder Allotypen in Patientenserum, die mit IVIG behandelt wurden, macht pharmakokinetische Studien auf diesem Gebiet möglich. Besonders die Beobachtung der IgG4-Allotypen, die mittels serologischer Reagenzien nicht erfasst werden können, steht aufgrund der einzigartigen Eigenschaften dieser Subklasse im Blickpunkt des Interesses.
Eine Erweiterung des Systems auf die übrigen, weniger komplexen Ig-Isotypen ist möglich, zumal die theoretische Identifikation der potentiellen iso- und allotypischen Markerpeptide bereits erfolgte (s. Anhang). Letztendlich wurde ein Weg gezeigt, wie Konzentrationsänderungen der Immunglobuline und gleichzeitig auch Veränderungen der Glykosylierung bis auf die Ebene von Ig-Allotypen einzelner Individuen schnell und umfassend unter verschiedenen Einflüssen detektiert werden können. Komplexe Fragestellungen, wie sie für das Verständnis des individuellen Immunsystems nötig sind, können nur beantwortet werden, wenn alle Aspekte der Immunglobuline zusammenhängend betrachtet werden.
Die Flexibilität der Gesamtstrategie erlaubt zusätzlich eine Übertragung auf andere Organismen, welches die Lösung zukünftiger Probleme, die sich beispielsweise aus der Expression von humanen Immunglobulinen in Fremdorganismen zur Herstellung von IVIG-Präparationen ergeben[166], ermöglicht. Des Weiteren steht auch bei der Wirkstoffentwicklung vor dem Menschen immer die Erprobung in adäquaten Tiersystemen.

6 Anhang

6.1 Potentielle Markerpeptide humaner Ig-Isotypen und deren Allotypen

6.1.1 Potentielle Markerpeptide von IgA

Die beiden Subklassen IgA1 und IgA2 haben eine Sequenzhomologie von > 90 %.

```
IgA1     1 ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIACLVQGFFPQEPLSVTWSESGQGVTARNFPPSQDAS
IgA2     1 ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVVACLVQGFFPQEPLSVTWSESGQNVTARNFPPSQDAS

IgA1    61 GDLYTTSSQLTLPATQCLAGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPCPVPSTPPTPSPSTPPTPSP
IgA2    61 GDLYTTSSQLTLPATQCPDGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPCPVP------------PPP

IgA1   121 SCCHPRLSLHRPALEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGVTFTWTPSSGKSAVQGPPERDLC
IgA2   108 PCCHPRLSLHRPALEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSGKSAVQGPPERDLC

IgA1   181 GCYSVSSVLPGCAEPWNHGKTFTCTAAYPESKTPLTATLSKSGNTFRPEVHLLPPPSEEL
IgA2   168 GCYSVSSVLPGCAQPWNHGETFTCTAAHPELKTPLTANITKSGNTFRPEVHLLPPPSEEL

IgA1   241 ALNELVTLTCLARGFSPKDVLVRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTFAVTSILRV
IgA2   228 ALNELVTLTCLARGFSPKDVLVRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTFAVTSILRV

IgA1 301   AAEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY
IgA2 288   AAEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY
```

Abbildung 6-1: Alignment von IgA basierend auf den SWISPROT-Einträgen P01876 (IgA1) und P01877 (IgA2); rot – variante Positionen; blau – Glykosylierungsstellen.

IgA1 besitzt im Vergleich zu IgA2 eine verlängerte *hinge*-Region (Abbildung 6-1), die mehrere O-Glykosylierungsstellen enthält. IgA2 besitzt keine O-Glykosylierung. Auffällig ist die fehlende N-Glykosylierung des IgA1 an Position 92, obwohl hier kein Sequenzunterschied zum IgA2 vorhanden ist. Auch IgA1 besitzt an dieser Stelle das N-Glykosylierungsmotiv N-X-S/T. Ob die Glykosylierung tatsächlich fehlt, sollte daher geprüft werden.

Tabelle 6-1: Theoretisch vorhergesagte isotypische Marker des IgA1 uns IgA2 ausgehend von einem tryptischen Verdau.

Marker	Von - Bis	$[M+H]^+$	$[M+2H]^{2+}$	$[M+3H]^{3+}$	R.T.-Wert	Sequenz
Trypsin						
A1	201-212	1377.51	689.26	459.84	18,06	TFTCTAAYPESK
A1	213-221	932.11	466.56	311.37	13,88	TPLTATLSK
A2	141-155	1513.60	757.31	505.21	18,05	DASGATFTWTPSSGK

Nur bei einem tryptischen Verdau (Tabelle 6-1) entstehen geeignete isotypische Markerpeptide für beide IgA-Subklassen. Auf die beiden IgA1-Allotypen wird im Rahmen

dieser Arbeit nicht weiter eingegangen. Serologisch wurden keine entsprechenden A1m-Faktoren gefunden.

- **IgA2**

Serologisch können durch die Faktoren A2m(1) und A2m(2) zwei allotypische Epitope unterschieden werden. Die Epitope der beiden Faktoren wurden bis heute nicht strukturell charakterisiert. Es ist lediglich bekannt, dass das Epitop des A2m(1)-Faktors im Fab-Teil lokalisiert ist, während sich das Epitop des A2m(2)-Faktors im Fc-Teil befindet. Somit können nur die beiden Varianten P/S an Position 93 und P/R an Position 102 in der C_H1-Domäne den A2m(1)-Marker determinieren. Die Varianten F/Y an Poition 279, D/E an Position 296, V/I an Position 326 und V/A an Position 335 in der C_H3-Domäne dagegen sollten den A1m(2)-Faktor determinieren. Wie die varianten Aminosäurepostionen in den drei IgA2-Allotypen besetzt sind, ist in Tabelle 6-2 dargestellt.

Tabelle 6-2: Allotypen und variante Positionen des IgA2.

	A2m(1) (CH1-Domäne)		A2m(2) (CH3-Domäne)			
IgA2-Allotyp	93	102	279	296	326	335
A2m(1-2)	**P**	**P**	F	D	V	V
A2m(-12)	S	R	**Y**	**E**	**I**	**A**
A2m(-1-2)	S	R	F	D	V	V

Der A2m(1)-Faktor ist positiv, wenn sich an Position 93 und 102 ein Prolin befindet. Der A2m(2)-Faktor hingegen ist positiv, wenn sich die Aminosäuren Y, E, I und A an den Positionen 279, 296, 326 und 335 befinden.
Der Allotyp A2m(-1-2) scheint durch Genumwandlung oder Rekombination aus den beiden Allotypen A2m(1-2) und A2m(-12) entstanden zu sein. Weitere Kombinationen wären denkbar, wurden aber bis heute nicht nachgewiesen. In Populationsstudien wurde gezeigt, dass die beiden Faktoren direkt voneinander abhängen, da sie nicht zusammen beobachtet werden. Die beiden Allotypen A2m(1-2) und A2m(-12) sind daher gegenüber A2m(-1-2) dominant.

Tabelle 6-3: Theoretisch vorhergesagte allotypische Marker des IgA2; rot – variante Positionen, blau – Glykosylierungsstellen.

Marker	Von - Bis	$[M+H]^+$	$[M+2H]^{2+}$	$[M+3H]^{3+}$	R.T.-Wert	Sequenz
Trypsin						
A2m(1)	89-113	2914.3	1457.6	972.1	25,6	HYTNPSQDVTVPCPVP PPPPCCHPR
A2m(-1)	89-102	1665.8	833.4	555.9	15,6	HYTNSSQDVTVPCR
A2m(-1)	103-113	1316.6	658.8	439.5	20,1	VPPPPPCCHPR
A2m(2)	270-286	1853.0	927.0	618.4	19,2	QEPSQGTTTYAVTSILR
A2m(2)	295-314	2225.6	1113.3	742.5	25,7	GETFSCMVGHEALPLA FTQK
A2m(2)	319-340	2353.7	1177.4	785.2	21,3	MAGKPTHINVSVVMA EADGTCY
A2m(-2)|1	270-286	1837.0	919.0	613.0	20,1	QEPSQGTTTFAVTSILR
A2m(-2)|1	295-314	2211.5	1106.3	737.9	25,5	GDTFSCMVGHEALPLA FTQK
A2m(-2)|1	319-340	2349.7	1175.4	783.9	20,9	LAGKPTHVNVSVVMA EVDGTCY

Mit Hilfe der in Tabelle 6-3 dargestellten allotypischen Marker ist eine Identifizierung der verschiedenen Allotypen des IgA2 möglich. Als serologische Reagenzien existieren nur der A2m(1)- und der A2m(2)-Faktor. Ein, dem A2m(-1)-Markerpeptid äquivalenter, A2m-Faktor existiert ebenso wenig, wie, ein dem A2m(-2)|1 äquivalenter, isoallotypischer Marker. Die Aussage, welche IgA2-Allotypen ein Individuum besitzt, ist bei diesen Markerpeptiden nur in Kombination mit einer Charkterisierung des Fcα2-Fragments möglich, da der A2m(-2)|1-Marker nicht selektiv ist. Im C-terminalen Bereich existieren keine Sequenzunterschiede zwischen IgA1 und IgA2. Daher ist A2m(-2)|1 ein isoallotypisches Markerpeptid, das ebenfalls in der Subklasse IgA1 enthalten ist. Der A2m(1)-Marker ist spezifisch für den A2m(1-2) und der A2m(2)-Marker für den A2m(-12)-Allotypen. Das Markerpeptid A2m(-1) in Kombination mit einem das A2m(-2)-Sequenzmotif enthaltenden Fc-Fragment des IgA2 wäre ein Beweis für die Existenz des A2m(-1-2)-Allotypen. Bei quantitativer Bestimmung der Markerpeptide wäre der Nachweis des A2m(-1-2)-Allotypen mit Hilfe des isoallotypischen A2m(-2)|1-Markerpeptids ebenfalls möglich. Allerdings bleibt hier zu berücksichtigen, dass die normale IgA1-Serumkonzentration mit 2 mg/ml weit über der des IgA2 mit 0,5 mg/ml liegt. Dies wirkt sich negativ auf die quantitative Bestimmung des allotypischen A2m(-2)-Anteils an der gesamten A2m(-2)|1-Peakmarkerfläche mit LC/ESI-MS aus.

6.1.2 Potentielle Markerpeptide von IgM

```
          10         20         30         40         50
          |          |          |          |          |
GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFSWKYKNNSDISSTRGFPSVL
RGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSVFVPPR
DGFFGNPRSKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSGVTTDQVQAEAKESGPTTYKVT
STLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMVKPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTKS
TKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWNSGE
RFTCTVTHTDLPSPLKQTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPA
DVFVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGETYTVKVAHEA
LPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
```

Abbildung 6-2: Sequenz des IgM basierend auf SWISPROT-Eintrag P01871; rot – variante Positionen; blau – Glykosylierungsstellen.

In der SWISPROT-Datenbank sind zwei Varianten für humanes IgM eingetragen, die in allen Kombinationen auftreten können. Durch Kombination der zwei Varianten S/G an Position 192 und V/G an Position 216 leiten sich vier allele Gene ab, die im Folgenden Mm(SV), Mm(SG), Mm(GV) und Mm(GG) genannt werden. In der IMGT-Datenbank sind davon nur drei eingetragen. Allen IMGT-Sequenzen fehlt das Serin an Position 129. Daher kann von einem Sequenzfehler in einer der beiden Datenbanken ausgegangen werden. Sieht man von dem Sequenzfehler ab, entspricht der SWISSPROT-Eintrag P01871 (Mm(SV)) dem allelen Gen mit der IMGT-Nummer X57331. Neben der Mm(SV)-Kombination ist nur noch Mm(GV) in der IMGT-DB vorhanden. Die tatsächliche Anzahl der IgM-Allotypen bleibt daher unklar und dürfte vier übersteigen. Aufgrund der fehlenden Übereinstimmung wurden alle sieben Sequenzen (3 IMGT + 4 SWISPROT) in die Ig-DB aufgenommen und für die Suche nach isotypischen Markern für IgM verwendet.

Tabelle 6-4: Theoretisch vorhergesagte isotypische Marker IgM ausgehend von einem tryptischen Verdau.

Von - Bis	$[M+H]^+$	$[M+2H]^{2+}$	$[M+3H]^{3+}$	R.T.-Wert	Sequenz
Trypsin					
179-186	863.04	432.03	288.35	13,53	VTSTLTIK
113-120	901.10	451.05	301.04	15,03	VSVFVPPR
324-339	1775.11	888.06	592.37	22,28	GVALHRPDVYLLPPAR
225-239	1638.99	820.00	547.00	26,9	VFAIPPSFASIFLTK

Die Verwendung von Trypsin (Tabelle 6-4) führte zu vier möglichen isotypischen Markern für das IgM, welche für LC/ESI-MS-Messungen geeignet scheinen. Serologische Marker für IgM sind nicht bekannt, weshalb die allotypischen Markerpeptide im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt wurden.

6.1.3 Potentielle Markerpeptide von IgD

```
          10         20         30         40         50
          |          |          |          |          |
APTKAPDVFPIISGCRHPKDNSPVVLACLITGYHPTSVTVTWYMGTQSQPQRTFPEIQRR
DSYYMTSSQLSTPLQQWRQGEYKVKVQHTASKSKKEIFRWPESPKAQASSVPTAQPQAEG
SLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDL
WLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSL
WNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAQAPVKLSLNLLASSDPPEAASWLLCEVSGFS
PPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTVKVSHE
DSRTLLNASRSLEVSYVTDHGPM
```

Abbildung 6-3: Sequenz des IgD basierend auf SWISPROT-Eintrag P01880; rot – variante Positionen; blau – Glykosylierungsstellen.

Sowohl in der IMGT- als auch in der SWISPROT-Datenbank ist jeweils nur eine IgD Proteinsequenz zu finden. Beide Sequenzen unterscheiden sich an Position 330. Ob es sich hierbei um eine Variante oder einen Konflikt handelt, bleibt unklar. Beide wurden in die Ig-DB eingetragen.

Tabelle 6-5: Theoretisch vorhergesagte isotypische Marker des IgD für verschiedene Proteasen.

Von - Bis	$[M+H]^{+}$	$[M+2H]^{2+}$	$[M+3H]^{3+}$	R.T.-Wert	Sequenz
Trypsin					
210-222	1356.52	678.76	452.84	17,38	VPTGGVEEGLLER
GluC					
206-217	1143.28	572.15	381.77	11,24	VAGKVPTGGVEE

Nur zwei isoallotypische Markerpeptide (Tabelle 6-5) entsprechen allen Kriterien und scheinen für die weiteren LC/ESI-MS-Messungen ohne Vorbehalt geeignet.

6.1.4 Potentielle Markerpeptide von IgE

```
          10         20         30         40         50
          |          |          |          |          |
ASTQSPSVFPLTRCCKNIPSNATSVTLGCLATGYFPEPVMVTWDTGSLNGTTMTLPATTL
TLSGHYATISLLTVSGAWAKQMFTCRVAHTPSSTDWVDNKTFSVCSRDFTPPTVKILQSS
CDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTINITWLEDGQVMDVDLSTASTTQEGELASTQSELTL
SQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKKCADSNPRGVSAYLSRPSPFDLFIRKSPTITCL
VVDLAPSKGTVNLTWSRASGKPVNHSTRKEEKQRNGTLTVTSTLPVGTRDWIEGETYQCR
VTHPHLPRALMRSTTKTSGPRAAPEVYAFATPEWPGSRDKRTLACLIQNFMPEDISVQWL
HNEVQLPDARHSTTQPRKTKGSGFFVFSRLEVTRAEWEQKDEFICRAVHEAASPSQTVQR
AVSVNPGK
```

Abbildung 6-4: Sequenz von IgE basierend auf SWISPROT-Eintrag P01854; rot – variante Positionen; blau – Glykosylierungsstellen.

Zwei allotypische Epitope bestimmen die Sequenzvariabilität von IgE. Nur eine dieser beiden Varianten (W/L – Position 359) ist in der SWISPROT-DB eingetragen. In der IMGT-DB ist eine zweite Variante (W/C – Position 43) zu finden. Insgesamt sind daher vier IgE-Allotypen Em(WW), Em(WC), Em(LW) und Em(LC) denkbar, von denen drei in der IMGT-DB eingetragen sind. Der IgE-Allotyp Em(LW) wurde noch nicht beobachtet. Alle vier Sequenzen wurden in die Ig-DB eingetragen.

Tabelle 6-6: Theoretisch vorhergesagte isotypische Marker von IgE für verschiedene Proteasen.

Von - Bis	$[M+H]^+$	$[M+2H]^{2+}$	$[M+3H]^{3+}$	R.T.-Wert	Sequenz
Trpsin					
108-115	905.04	453.02	302.35	12,66	DFTPPTVK
301-308	957.12	479.07	319.71	13,4	VTHPHLPR
381-389	1004.13	502.57	335.38	20,49	GSGFFVFSR
216-232	1926.23	963.62	642.75	26,21	GVSAYLSRPSPFDLFIR
GluC					
326-333	898.00	449.51	300.01	15,6	VYAFATPE

Insgesamt fünf isoallotypische Markerpeptide (Tabelle 6-6) scheinen für weitere LC/ESI-MS-Messungen geeignet.

Es wurde bis heute nur ein allotypischer Faktor für das IgE-System beschrieben. Eine strukturelle Aufklärung des allotypischen Epitops erfolgte bis heute allerdings nicht, so dass eine Zuordnung eines allotypischen Markerpeptids nicht möglich ist.

Tabelle 6-7: Theoretisch vorhergesagte allotypische Marker von IgE für verschiedene Proteasen; rot – variante Positionen.

Marker	Von - Bis	$[M+H]^+$	$[M+2H]^{2+}$	$[M+3H]^{3+}$	R.T.-Wert	Sequenz
CNBr						
Em(W1)	41-53	1383.52	692.26	461.85	17,06	VT**W**DTGSLNGTTM
Em(C)	41-53	1358.49	679.75	453.50	15,38	VT**C**DTGSLNGTTM
GluC						
Em(W2)	354-363	1241.35	621.18	414.45	18,76	DISVQ**W**LHNE
Em(L)	354-363	1168.29	584.65	390.10	16,7	DISVQ**L**LHNE

Sind für die Variante an Position 359 noch alternative Markerpeptide denkbar, so ist dieses für die Variante an Position 43 nicht der Fall (Tabelle 6-7). Nur CNBr spaltet IgE so, dass geeignete Markerpeptide entstehen. Mit Hilfe der vier Markerpeptide wäre eine eindeutige Charakterisierung der verschiedenen IgE-Allotypen auf Proteinebene möglich.

7 Literaturverzeichnis

1. Spiegelberg, H.L. Biological activities of immunoglobulins of different classes and subclasses. *Adv Immunol* **19**, 259-94 (1974).
2. Jefferis, R. et al. Evaluation of monoclonal antibodies having specificity for human IgG subclasses: results of the 2nd IUIS/WHO collaborative study. *Immunol Lett* **31**, 143-68. (1992).
3. Mestecky, J. et al. Evaluation of monoclonal antibodies with specificity for human IgA, IgA subclasses and allotypes and secretory component. Results of an IUIS/WHO collaborative study. *J Immunol Methods* **193**, 103-48. (1996).
4. Jefferis, R. Human IgG subclass-specific epitopes recognised by murine monoclonal antibodies. *Monogr Allergy* **20**, 26-33 (1986).
5. Rudd, P.M., Elliott, T., Cresswell, P., Wilson, I.A. & Dwek, R.A. Glycosylation and the immune system. *Science* **291**, 2370-6. (2001).
6. Morell, A. Clinical relevance of IgG subclass deficiencies. *Ann Biol Clin* **52**, 49-52 (1994).
7. Mellemkjaer, L. et al. Cancer risk among patients with IgA deficiency or common variable immunodeficiency and their relatives: a combined Danish and Swedish study. *Clin Exp Immunol* **130**, 495-500. (2002).
8. Umetsu, D.T., Ambrosino, D.M., Quinti, I., Siber, G.R. & Geha, R.S. Recurrent sinopulmonary infection and impaired antibody response to bacterial capsular polysaccharide antigen in children with selective IgG-subclass deficiency. *N Engl J Med* **313**, 1247-51. (1985).
9. Bentur, L., Nisbet-Brown, E., Levison, H. & Roifman, C.M. Lung disease associated with IgG subclass deficiency in chronic mucocutaneous candidiasis. *J Pediatr* **118**, 82-6. (1991).
10. Popa, V., Colby, T.V. & Reich, S.B. Pulmonary interstitial disease in Ig deficiency. *Chest* **122**, 1594-603. (2002).
11. Skvaril, F. & Scherz, R. IgG subclasses in IgA-deficient patients with anti-IgA antibodies. *Monogr Allergy* **20**, 164-70 (1986).
12. Aalberse, R.C., Van Milligen, F., Tan, K.Y. & Stapel, S.O. Allergen-specific IgG4 in atopic disease. *Allergy* **48**, 559-69. (1993).
13. Benjamin, M., Reddy, S. & Brawley, O.W. Myeloma and race: a review of the literature. *Cancer Metastasis Rev* **22**, 87-93. (2003).
14. Braun-Moscovici, Y. & Furst, D.E. Immunoglobulin for rheumatic diseases in the twenty-first century: take it or leave it? *Curr Opin Rheumatol* **15**, 237-45. (2003).
15. Janeway, C. *The development and clinical uses of immunoglobulins: a review.*, 3-14 (National Academy of Sciences, Washington DC, 1970).
16. Pyne, D., Ehrenstein, M. & Morris, V. The therapeutic uses of intravenous immunoglobulins in autoimmune rheumatic diseases. *Rheumatology (Oxford)* **41**, 367-74. (2002).

17. Morell, A., Skvaril, F., Steinberg, A.G., Van Loghem, E. & Terry, W.D. Correlations between the concentrations of the four sub-classes of IgG and Gm Allotypes in normal human sera. *J Immunol* **108**, 195-206. (1972).
18. Whittingham, S. & Propert, D.N. Gm and Km allotypes, immune response and disease susceptibility. *Monogr Allergy* **19**, 52-70 (1986).
19. Washburn, M.P., Wolters, D. & Yates, J.R., 3rd. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol* **19**, 242-7. (2001).
20. Gergely, J., Fudenberg, H.H. & van Loghem, E. The papain susceptibility of IgG myeloma proteins of different heavy chain subclasses. *Immunochemistry* **7**, 1-6. (1970).
21. Tracy, R.P., Currie, R.M., Kyle, R.A. & Young, D.S. Two-dimensional gel electrophoresis of serum specimens from patients with monoclonal gammopathies. *Clin Chem* **28**, 900-7. (1982).
22. Akerstrom, B. & Bjorck, L. A physicochemical study of protein G, a molecule with unique immunoglobulin G-binding properties. *J Biol Chem* **261**, 10240-7. (1986).
23. Brunhouse, R. & Cebra, J.J. Isotypes of IgG: comparison of the primary structures of three pairs of isotypes which differ in their ability to activate complement. *Mol Immunol* **16**, 907-17. (1979).
24. van der Zee, J.S., van Swieten, P. & Aalberse, R.C. Inhibition of complement activation by IgG4 antibodies. *Clin Exp Immunol* **64**, 415-22. (1986).
25. Feinstein, A. IgG flexibility in complement activation. *Immunol. Today* **7**, 169 (1986).
26. Lewis, G.D. et al. Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. *Cancer Immunol Immunother* **37**, 255-63. (1993).
27. Anderson, C.L. Human leukocyte IgG Fc receptors. *Immunol. Today* **7**, 264 (186).
28. Hamilton, R.G. *Human IgG Subclass book*, (Calbiochem-Novabiochem, Baltimore, MD, 2001).
29. Aalberse, R.C. & Schuurman, J. IgG4 breaking the rules. *Immunology* **105**, 9-19. (2002).
30. Grubb, R. Agglutination of erythrocytes coated with incomplete anti-Rh by certain rheumatoid arthritic sera and some other sera. *Acta Pathol Microbiol Scand* **39**, 195-197 (1956).
31. de Lange, G.G. Polymorphisms of human immunoglobulins: Gm, Am, Em and Km allotypes. *Exp Clin Immunogenet* **6**, 7-17 (1989).
32. Review of the notation for the allotypic and related markers of human immunoglobulins. WHO meeting on human immunoglobulin allotypic markers, held 16-19 July 1974, Rouen, France. Report amended June 1976. *J Immunogenet* **3**, 357-62. (1976).
33. Schanfield, M.S. *Human immunoglobulin allotypes*, 1 - 18 (Blackwell Scientific, Oxford, 1986).
34. van Loghem, E. et al. Human IgG allotypes co-occurring in more than one IgG subclass. *Vox Sang* **43**, 301-9 (1982).

35. Saiki, R.K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-91. (1988).
36. Johnson, W.E., Kohn, P.H. & Steinberg, A.G. Population genetics of the human allotypes Gm, Inv, and A2m. *Clin Immunol Immunopathol* **7**, 97-113. (1977).
37. Propert, D. Immunoglobulin allotypes and RFLPs in disease association. *Exp Clin Immunogenet* **12**, 198-205 (1995).
38. Pandey, J.P. & French, M.A. GM phenotypes influence the concentrations of the four subclasses of immunoglobulin G in normal human serum. *Hum Immunol* **51**, 99-102. (1996).
39. Grubb, R. Advances in human immunoglobulin allotypes. *Exp Clin Immunogenet* **12**, 191-7 (1995).
40. Pandey, J.P., Gunsolley, J.C., Tew, J.G. & Schenkein, H.A. GM allotypes and IgG subclass concentrations in blacks. *Exp Clin Immunogenet* **13**, 126-30 (1996).
41. Deisenhofer, J. Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from Staphylococcus aureus at 2.9- and 2.8-A resolution. *Biochemistry* **20**, 2361-70. (1981).
42. Nose, M. & Wigzell, H. Biological significance of carbohydrate chains on monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 6632-6. (1983).
43. Parekh, R.B. et al. Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature* **316**, 452-7. (1985).
44. Masuda, K. et al. Pairing of oligosaccharides in the Fc region of immunoglobulin G. *FEBS Lett* **473**, 349-57. (2000).
45. Harris, L.J., Skaletsky, E. & McPherson, A. Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody. *J Mol Biol* **275**, 861-72. (1998).
46. Rademacher, T.W. & Dwek, R.A. Carbohydrate Recognition in Cellular Function. in *Ciba Foundation Symposium*, Vol. 145 241 - 256 (Wiley, Chichester, 1989).
47. Raju, T.S., Briggs, J.B., Borge, S.M. & Jones, A.J. 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* **10**, 477-86. (2000).
48. Routier, F.H. et al. Quantitation of the oligosaccharides of human serum IgG from patients with rheumatoid arthritis: a critical evaluation of different methods. *J Immunol Methods* **213**, 113-30. (1998).
49. Wright, A. & Morrison, S.L. Effect of glycosylation on antibody function: implications for genetic engineering. *Trends Biotechnol* **15**, 26-32. (1997).
50. Jefferis, R., Lund, J. & Pound, J.D. IgG-Fc-mediated effector functions: molecular definition of interaction sites for effector ligands and the role of glycosylation. *Immunol Rev* **163**, 59-76. (1998).
51. Ravetch, J.V. & Bolland, S. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* **19**, 275-90 (2001).
52. Wright, A. & Morrison, S.L. Effect of C2-associated carbohydrate structure on Ig effector function: studies with chimeric mouse-human IgG1 antibodies in glycosylation mutants of Chinese hamster ovary cells. *J Immunol* **160**, 3393-402. (1998).

53. Jassal, R. et al. Sialylation of human IgG-Fc carbohydrate by transfected rat alpha2,6- sialyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun* **286**, 243-9. (2001).
54. Groenink, J. et al. On the interaction between agalactosyl IgG and Fc gamma receptors. *Eur J Immunol* **26**, 1404-7. (1996).
55. Kumpel, B.M., Rademacher, T.W., Rook, G.A., Williams, P.J. & Wilson, I.B. Galactosylation of human IgG monoclonal anti-D produced by EBV- transformed B-lymphoblastoid cell lines is dependent on culture method and affects Fc receptor-mediated functional activity. *Hum Antibodies Hybridomas* **5**, 143-51 (1994).
56. Clynes, R.A., Towers, T.L., Presta, L.G. & Ravetch, J.V. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytoxicity against tumor targets. *Nat Med* **6**, 443-6. (2000).
57. Umana, P., Jean-Mairet, J., Moudry, R., Amstutz, H. & Bailey, J.E. Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. *Nat Biotechnol* **17**, 176-80. (1999).
58. Davies, J. et al. Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FC gamma RIII. *Biotechnol Bioeng* **74**, 288-94. (2001).
59. Shields, R.L. et al. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fcgamma RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem* **277**, 26733-40. (2002).
60. Shinkawa, T. et al. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N- acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem* **278**, 3466-73. (2003).
61. Glennie, M.J. & Johnson, P.W. Clinical trials of antibody therapy. *Immunol Today* **21**, 403-10. (2000).
62. Sumar, N. in *Abnormalities of IgG Glycosylation and Immunological Disorders* (eds. Isenberg, D.A., Rademacher, T.W. & Roitt, I.) 65-87 (Wiley, Chichester, 1996).
63. Wang, Y. & Rook, G. in *Abnormalities of IgG Glycosylation and Immunological Disorders* (eds. Isenberg, D.A., Rademacher, T.W. & Roitt, I.) 89-99 (Wiley, Chichester, 1996).
64. Kunkel, J.P., Jan, D.C., Jamieson, J.C. & Butler, M. Dissolved oxygen concentration in serum-free continuous culture affects N-linked glycosylation of a monoclonal antibody. *J Biotechnol* **62**, 55-71. (1998).
65. Chait, B.T. & Kent, S.B. Weighing naked proteins: practical, high-accuracy mass measurement of peptides and proteins. *Science* **257**, 1885-94. (1992).
66. Lewis, D.A., Guzzetta, A.W., Hancock, W.S. & Costello, M. Characterization of humanized anti-TAC, an antibody directed against the interleukin 2 receptor, using electrospray ionization mass spectrometry by direct infusion, LC/MS, and MS/MS. *Anal Chem* **66**, 585-95. (1994).
67. Roberts, G.D., Johnson, W.P., Burman, S., Anumula, K.R. & Carr, S.A. An integrated strategy for structural characterization of the protein and carbohydrate components of monoclonal antibodies: application to anti-respiratory syncytial virus MAb. *Anal Chem* **67**, 3613-25. (1995).

68. Akashi, S., Noguchi, K., Yuji, R., Tagami, U. & Hirayama, K. Characterization of mouse switch variant antibodies by matix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry and electrospray ionization mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* **7**, 707-721 (1996).
69. Jiskoot, W. et al. Application of electrospray mass spectrometry (ES-MS) for the analysis of monoclonal antibody Fc subunits. *Pharm Res* **9**, 945-51. (1992).
70. Ashton, D.S. et al. Mass spectrometry of the humanized monoclonal antibody CAMPATH 1H. *Anal Chem* **67**, 835-42. (1995).
71. Bennett, K.L., Smith, S.V., Lambrecht, R.M., Truscott, R.J. & Sheil, M.M. Rapid characterization of chemically-modified proteins by electrospray mass spectrometry. *Bioconjug Chem* **7**, 16-22. (1996).
72. Masuda, K. et al. Post-translational modifications of immunoglobulin G: a mouse IgG variant that lacks the entire CH1 domain. *Mol Immunol* **36**, 993-1003. (1999).
73. Adamczyk, M., Gebler, J.C. & Wu, J. Papain digestion of different mouse IgG subclasses as studied by electrospray mass spectrometry. *J Immunol Methods* **237**, 95-104. (2000).
74. Siegel, M.M. et al. Calicheamicin derivatives conjugated to monoclonal antibodies: determination of loading values and distributions by infrared and UV matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem* **69**, 2716-26. (1997).
75. Williams, P.J. & Rademacher, T.W. Analysis of murine IgG isotype galactosylation in collagen-induced arthritis. *Scand J Immunol* **44**, 381-7. (1996).
76. Thomson, S.J.J. Positive electricity. *Phil Mag* **18**, 821-845 (1906).
77. Amy, J.W., Baitinger, W.E. & Cooks, R.G. Building Mass Spectrometers and a Philosophy of Research. *J Am Soc Mass Spectrom* **1**, 119-128 (1990).
78. Siuzdak, G. The emergence of mass spectrometry in biochemical research. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11290-7. (1994).
79. Burlingame, A.L., Boyd, R.K. & Gaskell, S.J. Mass spectrometry. *Anal Chem* **70**, 647R-716R. (1998).
80. Tanaka, K. et al. Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2**, 151-153 (1988).
81. Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F. & Whitehouse, C.M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64-71. (1989).
82. Dole, M., Mack, L.L. & Hines, R.L. Molecular beams of macroions. *Journal of Chemical Physics* **49**, 2240-2249 (1968).
83. Morris, H.R., Paxton, T., Panico, M., McDowell, R. & Dell, A. A novel geometry mass spectrometer, the Q-TOF, for low- femtomole/attomole-range biopolymer sequencing. *J Protein Chem* **16**, 469-79. (1997).
84. Morris, H.R. et al. High sensitivity collisionally-activated decomposition tandem mass spectrometry on a novel quadrupole/orthogonal-acceleration time-of- flight mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom* **10**, 889-96 (1996).
85. Stafford, G., Jr. Ion trap mass spectrometry: a personal perspective. *J Am Soc Mass Spectrom* **13**, 589-96. (2002).

86. Yost, R.A. & C.G., E. Selected ion fragmentation with a tandem quadrupole mass spectrometer. *J Am Chem Soc* **100**, 2274-5 (1978).
87. Tyler, A.N., Clayton, E. & Green, B.N. Exact Mass Measurement of Polar Organic Molecules at Low Resolution Using Electrospray Ionization and a Quadrupole Mass Spectrometer. *Anal. Chem.* **68**, 3561-3569 (1996).
88. Schwartz, J.C., Senko, M.W. & Syka, J.E. A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer. *J Am Soc Mass Spectrom* **13**, 659-69. (2002).
89. Karas, M., Bahr, U. & Hillenkamp, F. UV Laser Matrix Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Proteins in the 100000 Da Range. *J Mass Spectrom Ion Process* **92**, 231-242 (1989).
90. Ferrige, A.G. & Seddon, M.J. Disentangling Electrospray Spectra with Maximum Entropy. *Rapid Commun Mass Spectrom* **6**, 707-711 (1992).
91. Paul, W. Elektromagnetische Käfige für geladene und neutrale Teilchen, Nobelvortrag. *Phys. Blätter* **46**, 227-236 (1990).
92. Lammert, S.A. & Wells, J.M. Experimental Investigation into the Performance of the Ion Traps using Air versus Helium as the Buffer Gas. *Rapid Commun Mass Spectrom* **10**, 361-371 (1996).
93. Stafford, G.C., Kelley, P.A., Syka, J.E., Reynolds, W.E. & Todd, J.F. Recent improvments in analytical applications of advanced ion trap technology. *Int J Mass Spectrom Ion Process* **60**(1984).
94. Brown, R.S. & Lennon, J.J. Mass resolution improvement by incorporation of pulsed ion extraction in a matrix-assisted laser desorption/ionization linear time-of-flight mass spectrometer. *Anal Chem* **67**, 1998-2003. (1995).
95. Mamyrin, B.A. Laser assisted reflectron time-of-flight mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc* **131**, 1-19 (1994).
96. Roepstorff, P. & Fohlman, J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom* **11**, 601. (1984).
97. Sonsmann, G. PhD, Köln (2001).
98. Gavin, A.C. et al. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**, 141-7. (2002).
99. Rout, M.P. et al. The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol* **148**, 635-51. (2000).
100. Yates, J.R., 3rd. Mass spectrometry and the age of the proteome. *J Mass Spectrom* **33**, 1-19. (1998).
101. Henzel, W.J. et al. Identifying Proteins From 2-Dimensional Gels By Molecular Mass Searching of Peptide Fragments in Protein Sequence Databases. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **90**, 5011-5015 (1993).
102. Russell, D.H. & Edmondson, R.D. High-resolution mass spectrometry and accurate mass measurements with emphasis on the characterisation of peptides and proteins by MALDI-TOF-MS. *J. Mass Spectrom.* **32**, 263-276 (1997).

103. Spengler, B., Kirsch, D. & Kaufmann, R. Metastable Decay of Peptides and Proteins in Matrix-Assisted Laser-Desorption Mass Spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **5**, 198-202 (1991).
104. Wilm, M. & Mann, M. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal Chem* **68**, 1-8. (1996).
105. Loboda, A.V., Krutchinsky, A.N., Bromirski, M., Ens, W. & Standing, K.G. A tandem quadrupole/time-of-flight mass spectrometer (QqTOF) with a MALDI source: design and performance. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**, 1047-1057 (2000).
106. Bienvenut, W.V. et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization-tandem mass spectrometry with high resolution and sensitivity for identification and characterization of proteins. *Proteomics* **2**, 868–876 (2002).
107. Haynes, P.A. & Yates, J.R., 3rd. Proteome profiling-pitfalls and progress. *Yeast* **17**, 81-7. (2000).
108. Wolters, D.A., Washburn, M.P. & Yates, J.R., 3rd. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal Chem* **73**, 5683-90. (2001).
109. Wall, D. et al. Investigation a new method for the continuous deposition of eluent from a reversed phase HPLC protein digest separation directly onto a MALDI sample plate. in *19th Montreux Symposium* (Montreux, Switzerland, 2002).
110. Gygi, S.P. et al. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* **17**, 994-9. (1999).
111. Naylor, S. Differential Proteomics in Disease-Specific Biomarker Discovery. in *Seventh Annual of Proteomics - Applications in Therapeutic and Diagnostic Development* (San Diego, CA, 2003).
112. Gerber, S.A. et al. Absolute Quantification of Cell Cycle Regulatory Proteins and Phosphorylation States: The AQUA Strategy for Protein Profiling. in *50th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics* (Orlando, 2002).
113. Brancia, F. Meeting Review: The 50th ASMS conference on mass spectrometry and allied topics. *Comp Funct Genom.* **3**, 455–458 (2002).
114. Desiderio, D.M., Yamada, S., Tanzer, F.S., Horton, J. & Trimble, J. High-performance liquid chromatographic and field desorption mass spectrometric measurement of picomole amounts of endogenous neuropeptides in biologic tissue. *J Chromatogr* **217**, 437-52. (1981).
115. Grigoriants, O.O., Tseng, J.L., Becklin, R.R. & Desiderio, D.M. Mass spectrometric quantification of the mu opioid receptor agonist Tyr- D-Arg-Phe-Lys-NH2 (DALDA) in high-performance liquid chromatography- purified ovine plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **695**, 287-98. (1997).
116. *SCIEX, The API Book*, (Division of MDS Health Group, Canada, 1990).
117. Feng, W.Y., Chan, K.K. & Covey, J.M. Electrospray LC-MS/MS quantitation, stability, and preliminary pharmacokinetics of bradykinin antagonist polypeptide B201 (NSC 710295) in the mouse. *J Pharm Biomed Anal* **28**, 601-12. (2002).

118. Vlug, A., Nieuwenhuys, E.J., van Eijk, R.V., Geertzen, H.G. & van Houte, A.J. Nephelometric measurements of human IgG subclasses and their reference ranges. *Ann Biol Clin* **52**, 561-7 (1994).
119. Keren, D.F. *Quantitative electrophoretic, and immunochemical characterization of immunoglobulins and serum proteins*, (Blackwell Science, Victoria, Australia, 1998).
120. Ropartz, C. & Rivat, L. (WHO, 1967).
121. Oxelius, V.A. & Carlsson, A.M. Quantitation of Gm allotypes. *Scand J Immunol* **37**, 143-8. (1993).
122. Fahey, J.L. & McKelvely, E.M. Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates. *J Immunol* **94**, 84-90 (1965).
123. Mancini, A.O. & Carbonara, O. Immunochemical quantification of antigens by singel radial immunodiffusion. *Immunochemistry* **2**, 235-254 (1965).
124. Skvaril, F., Roth-Wicky, B. & Barandun, S. IgG subclasses in human gamma-globulin preparations for intravenous use and their reactivity with staphylococcus protein A. *Vox Sang* **38**, 147-55 (1980).
125. Van Loghem, E., Frangione, B., Recht, B. & Franklin, E.C. Staphylococcal protein A and human IgG subclasses and allotypes. *Scand J Immunol* **15**, 275-8. (1982).
126. Amaral, J., Inganas, M., Cabral, J. & Prazeres, D. Study on the scale-up of human IgG3 purification using protein A affinity chromatography. *Bioseparation* **10**, 139-43 (2001).
127. Jefferis, R., Weston, P.D., Stanworth, D.R. & Clamp, J.R. Relationship between the papain sensitivity of human gammaG immunoglobulins and their heavy chain subclass. *Nature* **219**, 646-9. (1968).
128. Wang, A.C. & Wang, I.Y. Cleavage sites of human IgG1 immunoglobulin by papain. *Immunochemistry* **14**, 197-200. (1977).
129. Skvaril, F. & Morell, A. The G4 subclass in IgG fractions prepared by ion-exchange chromatography. *J Immunol* **104**, 1310-2. (1970).
130. Howard, A. & Virella, G. The separation of pooled human IgG into fraction by IEF and their electrophoretic and immunological properties. *Prot Biol Fluids* **17**, 449 (1970).
131. Bjorck, L. & Kronvall, G. Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *J Immunol* **133**, 969-74. (1984).
132. Snigurowicz, J. & Powiertowska-Rezmer, M. Papain hydrolysis products in four M-IgG subclasses. *Arch Immunol Ther Exp* **28**, 265-73 (1980).
133. Nardella, F.A. & Teller, D.C. Fc intermediate (Fci), a papain-generated fragment of human IgG, intermediate in charge, molecular weight and cleavage between the Fc and Fc' fragments of IgG. *Mol Immunol* **22**, 705-13. (1985).
134. Baici, A., Knopfel, M. & Fehr, K. Cleavage of the four human IgG subclasses with cathepsin G. *Scand J Immunol* **16**, 487-98. (1982).
135. Clausen, J. Serum antibodies against cytosol antigens in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* **60**, 205-16. (1983).
136. Ramesh, S. & Schwartz, S.A. Therapeutic uses of intravenous immunoglobulin (IVIG) in children. *Pediatr Rev* **16**, 403-10; quiz 410. (1995).

137. Burckhardt, J.J. et al. Immunoglobulin G subclass distribution in three human intravenous immunoglobulin preparations. *Vox Sang* **57**, 10-4 (1989).
138. Lefranc, M.P. IMGT, the international ImMunoGeneTics database http:\imgt.cines.fr:8104. (2003).
139. Human Ig genetic markers. *Exp Clin Immunogenet* **6**, 5-132 (1989).
140. Balbin, M., Grubb, A., Abrahamson, M. & Grubb, R. Determination of allotypes G1m(f) and G1m(z) at the genomic level by subclass-specific amplification of DNA and use of allele-specific probes. *Exp Clin Immunogenet* **8**, 88-95 (1991).
141. Grubb, R. *Human immunoglobulin allotypes and Mendlian polymorphisms of the human immunoglobulin genes*, 47-68 (Dekker, New York, 1994).
142. Hougs, L., Svejgaard, A. & Barington, T. The first constant-domain (CH1) exon of human IGHG2 is polymorphic and in strong linkage disequilibrium with the CH2 exon polymorphism encoding the G2m(n+) allotype in Caucasians. *Immunogenetics* **52**, 242-8 (2001).
143. Brusco, A., de Lange, G.G., Boccazzi, C. & Carbonara, A.O. Molecular characterization of Gm(n+) and G2m(n-) allotypes. *Immunogenetics* **42**, 414-7 (1995).
144. Rautonen, N., Seppala, I., Hallberg, T., Grubb, R. & Makela, O. Determination of homozygosity or heterozygosity for the G2m(n) allotype by a monoclonal, precipitating antibody. *Exp Clin Immunogenet* **6**, 31-8 (1989).
145. Dard, P., Lefranc, M.P., Osipova, L. & Sanchez-Mazas, A. DNA sequence variability of IGHG3 alleles associated to the main G3m haplotypes in human populations. *Eur J Hum Genet* **9**, 765-72. (2001).
146. Brusco, A. et al. Molecular characterization of immunoglobulin G4 gene isoallotypes. *Eur J Immunogenet* **25**, 349-55. (1998).
147. Yates, J.R., 3rd, Eng, J.K., McCormack, A.L. & Schieltz, D. Method to correlate tandem mass spectra of modified peptides to amino acid sequences in the protein database. *Anal Chem* **67**, 1426-36. (1995).
148. Oxelius, V.A. & Eibl, M.M. Different Gm allotype amounts in human intravenous immunoglobulin (IVIG) preparations; survival of foreign Gm allotypes in immunodeficient patients. *Clin Exp Immunol* **106**, 203-7. (1996).
149. Pan, Q., Rabbani, H., Mills, F.C., Severinson, E. & Hammarstrom, L. Allotype-associated variation in the human gamma3 switch region as a basis for differences in IgG3 production. *J Immunol* **158**, 5849-59. (1997).
150. Hassan, M.S., Islam, K.B., Hammarstrom, L. & Smith, C.I. Regulation of C gamma 3 expression. Role of switch in the allotype- associated variation of human serum IgG3 levels. *J Immunol* **148**, 2555-62. (1992).
151. Pan, Q., Petit-Frere, C. & Hammarstrom, L. An allotype-associated polymorphism in the gamma3 promoter determines the germ-line gamma3 transcriptional rate but does not influence switching and subsequent IgG3 production. *Eur J Immunol* **30**, 2388-93. (2000).
152. Dwyer, J.M. Manipulating the immune system with immune globulin. *N Engl J Med* **326**, 107-16. (1992).

153. Pandey, J.P. et al. Association between immunoglobulin allotypes and immune responses to Haemophilus influenzae and meningococcus polysaccharides. *Lancet* **i**, 190 - 192 (1979).
154. Robinson, N.E. & Robinson, A.B. Molecular clocks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 944-9. (2001).
155. Saba, J.A. et al. A Study of Immunoglobulin G Glykosylation in Monoclonal and Polyclonal Species by Electrospray and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Anal Biochem* **305**, 16-31 (2002).
156. Weitzhandler, M., Hardy, M., Co, M.S. & Avdalovic, N. Analysis of carbohydrates on IgG preparations. *J Pharm Sci* **83**, 1670-5. (1994).
157. Bobin, S., Popot, M.A., Bonnaire, Y. & Tabet, J.C. Approach to the determination of insulin-like-growth-factor-I (IGF-I) concentration in plasma by high-performance liquid chromatography-ion trap mass spectrometry: use of a deconvolution algorithm for the quantification of multiprotonated molecules in electrospray ionization. *Analyst* **126**, 1996-2001. (2001).
158. Sutton, B.J. & Phillips, D.C. The three-dimensional structure of the carbohydrate within the Fc fragment of immunoglobulin G. *Biochem Soc Trans* **11 Pt 2**, 130-2. (1983).
159. Yamaguchi, Y. et al. Dynamics of the carbohydrate chains attached to the Fc portion of immunoglobulin G as studied by NMR spectroscopy assisted by selective 13C labeling of the glycans. *J Biomol NMR* **12**, 385-94. (1998).
160. Sondermann, P., Jacob, U., Kutscher, C. & Frey, J. Characterization and crystallization of soluble human Fc gamma receptor II (CD32) isoforms produced in insect cells. *Biochemistry* **38**, 8469-77. (1999).
161. Kornfeld, R. & Kornfeld, S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* **54**, 631-64 (1985).
162. van der Zee, J.S., van Swieten, P. & Aalberse, R.C. Serologic aspects of IgG4 antibodies. II. IgG4 antibodies form small, nonprecipitating immune complexes due to functional monovalency. *J Immunol* **137**, 3566-71. (1986).
163. Bond, A., Jones, M.G. & Hay, F.C. Human IgG preparations isolated by ion-exchange or protein G affinity chromatography differ in their glycosylation profiles. *J Immunol Methods* **166**, 27-33. (1993).
164. Hamilton, R.G. Human IgG subclass measurements in the clinical laboratory. *Clin Chem* **33**, 1707-25. (1987).
165. Klasen, I.S. et al. The calibration 2000 project for serum proteins. *Ned Tijdschr Klin Chem* **25**, 159-162 (2000).
166. Kuroiwa, Y. et al. Cloned transchromosomic calves producing human immunoglobulin. *Nat Biotechnol* **20**, 889-94. (2002).

Kurzzusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine umfassende Methodik zur Differenzierung und Quantifizierung von humanen Immunglobulinen G (IgG) entwickelt. Während sich der erste Teil der Arbeit auf Variationen der Aminosäuresequenz konzentriert, befasst sich der zweite Teil mit der konservierten N-Glykosylierung im konstanten Bereich der Immunglobuline.

Teil I – Sequenzvariabilität von IgG

Es wurde eine allgemein anwendbare, schnelle Methode zur Erstellung eines IgG-Profils von humanen kaukasischen Individuen entwickelt. Dies beinhaltet die qualitative Detektion vorhandener IgG-Allotypen und die Quantifizierung der vier IgG-Subklassen. Dazu wurden spezifische Markerpeptide für einzelne IgG-Subklassen und Allotypen, die bei einem proteolytischen Totalverdau von Human-Plasma entstehen, theoretisch vorhergesagt und anschließend mittels Flussigkeitschromatographie-(LC)/Elektrospray-Ionisation-(ESI)-Tandemmassenspektrometrie-(MS/MS) detektiert und quantifiziert. Die Strategie ist auf andere Immunglobuline übertragbar.
Durch Vergleich der IgG-Profile verschiedener intravenöser IgG (IVIG)-Präparationen mit europäischem und amerikanischem Poolplasma konnte nachgewiesen werden, dass die Allotypenverteilung der IgG bei der Produktion nicht verändert wird, sondern mit dem, beim Herstellungsprozess verwendeten, Human-Plasma übereinstimmt. Der Vergleich der IgG-Profile von kaukasischen Individuen zeigte zudem, dass der Anteil zweier Allotypen einer IgG-Subklasse bei heterozygoten Individuen variiert, was ein Beleg für die unterschiedliche Aktivität der für die IgG-kodierenden Genloci ist.

Teil II – Glykosylierung von IgG

Es wurde eine Methode zur Erstellung eines Glykosylierungsprofils von IgG bis hin zur Charakterisierung der Oligosaccharidpaarung im Fcγ1-Fragment entwickelt. Dazu wurden die Glykopeptide proteolytisch verdauter IgG-Fraktionen mittels LC/ESI-MS quantifiziert. Die Quantifizierung umfasst, neben den Hauptkomponenten, die sich von den fukosylierten zweiantennigen Oligosaccharidstrukturen ableiten, auch die defukosylierten und biverzeigenden Komponenten.
Ein Vergleich der Glykosylierungsprofile von humanen Individuen ergab einen, um eine Größenordnung variierenden Fukosylierungsgrad, wogegen sich der Anteil der übrigen Glykospezies kaum änderte. Da eine 50-fach gesteigerte antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) durch einen höheren Anteil defukosylierter Glykospezies in Hybridoma-Zellkulturen bereits nachgewiesen wurde, könnte die beobachtete Schwankung beim Menschen somit die Effektivität der ADCC beeinflussen.
Die Paarung der Oligosaccharide im intakten Immunglobulin kann sowohl eine kooperative als auch additive Wirkung besitzen, was zu veränderten Effektorfunktionen einzelner symmetrischer oder asymmetrischer Glykospezies führen kann. Durch Etablierung einer wissensbasierten Dekonvolution von ESI-MS-Daten intakter Fcγ-Fragmente konnte erstmals die Paarung von Oligosacchariden mit biverzweigendem N-Acetylglucosamin verfolgt werden.

ABSTRACT

In this context a comprehensive strategy has been developed to differentiate and quantify human immunoglobulines G (IgGs). While the first part of the work concentrates on variations of the amino acid sequence, the second part deals with the conserved N-glycosylation within the constant part of the immunoglobulines.

Part I – Sequence variations of IgG

A generally applicable and rapid method for profiling of human IgG from caucasian individuals has been developed, including qualitative detection of IgG allotypes and quantification of the four IgG subclasses. Therefore, specific peptide markers for IgG subclasses and allotypes emerging from a proteolytic digest of human plasma were in silico predicted by using a self-developed program for subsequent detection and quantitation by liquid chromatography (LC)/electrospray ionization (ESI)-tandem mass spectrometry (MS/MS). The strategy is generally applicable and can therefore be applied to other immunoglobuline classes.
A comparison of IgG profiles from different intravenous IgG (IVIG) preparations with european and american pool plasma showed that the allotypic distribution of IgG is not modified during production, but corresponds to the allelic distribution in human plasma used as starting material. Furthermore, a comparison of IgG profiles from heterozygote caucasian individuals revealed varying portions of allotypes belonging to one IgG subclass, indicating a variable activity of genloci encoding the different IgG allotypes.

Part II – Glycosylation of IgG

A method for profiling the glycosylation of IgG up to the characterization of the oligosaccharide pairing in the intact Fcγ1-fragments was developed. Therefore glycopeptides of proteolytically digested IgG were quantified by LC/ESI-MS. Apart from the variabel core fucosylated main components, the glycosylation profile includes also defucosylated oligosaccharides and structures with bisecting N-acetylglucosamine.
A comparison of the glycosylation profile of human individuals revealed a varying degree of fucosylation in the order of magnitude, where the portion of other glycospecies remains fairly constant. Since a 50-fold increase in antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) was obtained by the use of hybridoma cell lines with a higher portion of defucosylated glycospecies, the observed variation could also affect the effectiveness of ADCC in humans.
The pairing of oligosaccharides in intact immunoglobulines can lead to both a cooperative and additive effect by changed effectorfunctions of individual symmetrical or asymmetrical glycospecies. By establishing a knowledge-based deconvolution of ESI-MS-data from intact Fcγ-fragments pairing of the bisecting oligosaccharides could be monitored for the first time.

Lebenslauf

Lejon Martens
Email: Lejon@gmx.de

Persönliche Angaben	Geboren: 28. März 1974 in Bennekom (Niederlande) Staatsangehörigkeit: Niederländisch Familienstand: ledig, keine Kinder
Schul- und Hochschul-ausbildung	2000 - 2003 Universität zu Köln Promotion ▪ Anfertigung der Dissertation am Institut für Biochemie der Universität zu Köln, Arbeitsgruppe „Strukturbiochemie und Bioinformatik“ von Prof. Dr. D. Schomburg in Kooperation mit der Firma A & M GmbH 1994 – 2000 Universität zu Köln Diplom ▪ Studium der Chemie mit Schwerpunkt Biochemie ▪ Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Biochemie der Universität zu Köln in der Arbeitsgruppe „Strukturbiochemie und Bioinformatik“ von Prof. Dr. D Schomburg *„Isolierung des Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF)/KGF-Rezeptor-komplexes nach Expression und Reinigung seiner Komponenten und deren massenspektroskopischer Charakterisierung“* 1985 - 1994 Gymnasium Norf Abitur