

## GPC/SEC mit Dreifachdetektion

### Application Note: Antikörper, DNA und Proteine

# Antikörper, DNA und Proteine - Masse und Struktur von komplexen Biomolekülen in Lösung exakt analysieren

Dr. Gerhard Heinzmann, Dr. Bernd Tartsch

In der biomolekularen Forschung wie auch im pharmazeutischen Bereich ist eine exakte Analyse der verwendeten Wirkstoffe zunehmend von Bedeutung. Meist werden Methoden wie z. B. die Massenspektrometrie (MALDI-TOF) zur Bestimmung von Molekulargewichten eingesetzt. Mit dieser Technik können die Moleküle aber nicht in Lösung untersucht werden; es kann also nicht geklärt werden ob sich im gelösten Zustand Aggregationen bilden die im Medikament störend wirken können. Außerdem sind viele der zu untersuchenden Moleküle zu groß, um als Einzelmolekül in die Gasphase gebracht werden zu können. Gerade im biomolekularen Bereich reicht die Größe der eingesetzten Moleküle von sehr kleinen Polypeptiden mit weniger als tausend Dalton Molekulargewicht über Antikörper mit einigen hunderttausend Dalton bis zu DNA-Molekülen und Viren mit mehreren Millionen Dalton molekularer Masse. All diese auch vom strukturellen Aufbau her sehr unterschiedlichen Biomoleküle können mit der Methode der GPC/SEC mit geeigneten Detektoren in Lösung umfassend charakterisiert werden.

#### Einleitung

Die GPC/SEC ist im biomolekularen Bereich sehr bekannt. Allerdings wird in der Regel nur ein UV-Detektor zur Charakterisierung der Proben verwendet, was den Informationsgehalt dieser Technik stark einschränkt. Es sind nur relative Molekulargewichte zugänglich die durch unerwünschte Wechselwirkungen der Proben mit dem Material der Trennsäulen oft noch verfälscht werden. Direkte Informationen über die Struktur der Biomoleküle können nicht erhalten werden.

Durch den Einsatz von molekulargewichts- und struktursensitiven Detektoren kann der Informationsgehalt der GPC/SEC wesentlich erweitert werden [1]. Der bekannteste Detektor in diesem Zusammenhang ist sicherlich der Rayleigh-Lichtstreuendetektor (nicht zu verwechseln mit dem Verdampfungs-Lichtstreuendetektor, ELSD) mit dessen Hilfe direkt die absoluten Molekulargewichte von Proteinen und anderen biologischen Proben bestimmt werden können. Allerdings kann dieser Detektor nur sehr begrenzt strukturelle Informationen wie z. B. molekulare Größen liefern. Besser geeignet hierfür sind der weniger bekannte Viskositätsdetektor und die dynamische Lichtstreuung (DLS; entweder als Durchflussdetektor oder als Küvettengerät). Mit beiden Techniken kann der hydrodynamische Radius einer Probe bestimmt werden. Daraus resultieren Informationen über die Struktur eines Proteins oder Biomoleküls. Der Viskositätsdetektor ist der DLS hinsichtlich der Auflösung deutlich überlegen wie die folgenden Beispiele zeigen werden.

#### DNA: Molekulargewichte und Strukturen

DNA- und RNA-Proben sind am oberen Ende des GPC/SEC-Messbereiches angesiedelt. Vor allem die DNA-Moleküle sind sehr groß und weisen Molekulargewichte von mehreren Millionen Dalton auf. Abbildung 1 zeigt ein Dreifachchromatogramm einer DNA-Probe (rot: Brechungsindexdetektor, blau: Viskositätsdetektor, schwarz: Kleinwinkel-Lichtstreuendetektor). Aus dem Kleinwinkel-Lichtstreuendetektor resultiert direkt das Molekulargewicht von 3,2 Mio Dalton, ohne dass hierfür die Messdaten extrapoliert oder andere Korrekturen vorgenommen werden müssen.

## GPC/SEC mit Dreifachdetektion

### Application Note: Antikörper, DNA und Proteine

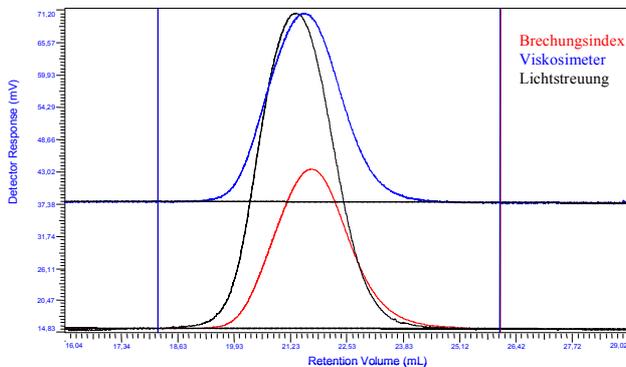


Abb. 1: Dreifachchromatogramm einer DNA-Probe

Der Viskositätsdetektor ermittelt die intrinsische Viskosität (IV) von 4,6 dl/g. Aus beiden Werten wird der hydrodynamische Radius der Probe von 62,8 nm berechnet.

Bekannt ist dass das DNA-Molekül in drei verschiedenen Formen vorkommen kann. In einer geschlossenen Form (closed coil, CC), einer halboffenen Form (open coil, OC) sowie einer völlig geöffneten, linearen Form. Natürlich weisen alle drei Formen dasselbe Molekulargewicht auf da es sich chemisch gesehen um dasselbe Molekül handelt. Da sich aber die molekulare Dichte von der CC-Form über die OC-Form bis zur linearen Form stark verringert kann der Viskositätsdetektor diese drei Formen deutlich unterscheiden; die IV ist direkt umgekehrt proportional zur molekularen Dichte. In Tabelle 1 sind die Resultate für die drei Formen des DNA-Moleküls aufgelistet. Aufgrund der ausgeprägten Unterschiede in der IV kann der Viskositätsdetektor die verschiedenen Strukturen problemlos unterscheiden; es lässt sich auch erkennen ob sich in einem Peak eine einzige DNA-Struktur verbirgt oder ob es sich um Mischformen handelt.

Tabelle 1: Resultate der GPC/SEC mit Dreifachdetektion für DNA-Proben

Molekülform der DNA	Molekulargewicht in 10 <sup>6</sup> g/mol	Intr. Viskosität in dl/g	Hydrodyn. Radius in nm
Closed Coil (CC)	3,2	4,6	62,8
Open Coil (OC)	3,2	9,1	77,9
Linear	3,2	12,2	86,8

### Antikörper

Die Struktur von Antikörpern wird oft mit einem Y verglichen (Abb. 2).

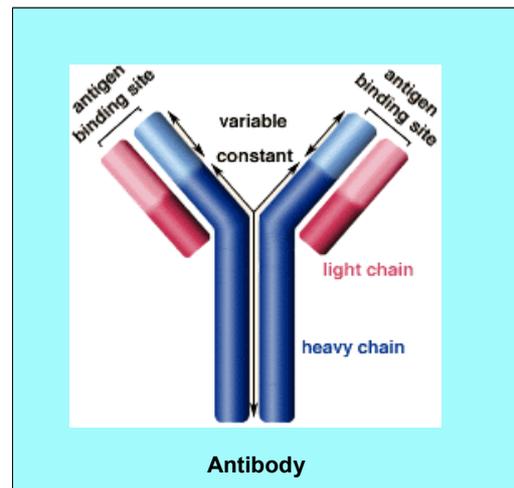


Abbildung 2: Struktur von Antikörpern

## GPC/SEC mit Dreifachdetektion

### Application Note: Antikörper, DNA und Proteine

Die Molekulargewichte dieser Substanzklasse reichen von ca. 150.000 D für IgG bis ca. 900.000 D für IgM. Während die verschiedenen Antikörper-Typen und der Anteil an Aggregaten leicht mit einem Lichtstreuendetektor anhand Ihrer Molekulargewichte identifiziert werden können [2] kommt es aber auch vor, dass sich gleiche Antikörper (z. B. 2 IgG-Typen) mit nahezu identischem Molekulargewicht strukturell unterscheiden [3].

Dieser Unterschied wiederum kann nur mit einem Viskositätsdetektor erkannt werden. Die reine Lichtstreuung versagt hier hinsichtlich der Strukturbestimmung völlig da die Moleküle zu klein sind und keine winkelabhängige Streulichtverteilung aufweisen. In Tabelle 2 sind die Resultate der Analyse von 2 IgG-Antikörpern aufgelistet:

Tabelle 2: Resultate der Analyse von 2 IgG-Antikörpern

	Molekulargewicht in g/mol	Intr. Viskosität in dl/g	Hydrodyn. Radius in nm
Antikörper IgG 1	152.400	0,043	4,73
Antikörper IgG 2	152.800	0,078	5,73

Betrachtet man nur die Molekulargewichte der beiden Proben so kommt man zum Schluss dass die Proben identisch sind. Betrachtet man hingegen die intrinsische Viskosität (IV) der beiden Antikörper und den daraus resultierenden hydrodynamischen Radius so wird schnell deutlich dass die beiden Moleküle sich deutlich in der Struktur und Form unterscheiden müssen. Die wesentlich höhere IV von Probe 2 ist auf eine sehr viel offenere, weniger dichte, ggf. gestreckte Molekülform zurück zu führen.

Ein ähnliches Ergebnis kann auch über die dynamische Lichtstreuung (DLS) erzielt werden; während hier aber Messzeiten von mehreren Sekunden notwendig sind um einen einzigen Messpunkt erhalten zu können misst der Viskositätsdetektor die IV mit einer Frequenz von 5 Punkten pro Sekunde. Die DLS kann also nur eine sehr grobe Rasterung über den Peak erzeugen. Außerdem muss die Flussrate sehr klein gehalten werden was zu langen Analysezeiten führt.

### Proteine und Proteinkonjugate

Bei Proteinen steht häufig die Frage im Vordergrund ob und in welchem Umfang in Lösung Aggregationen vorliegen. Diese Frage kann die Massenspektrometrie in aller Regel nicht beantworten. Das exakte Molekulargewicht des Protein-Monomers hingegen ist meist aus MALDI-TOF-Messungen bekannt und wird über die GPC/SEC lediglich bestätigt.

Mit der Lichtstreuendetektion können auch geringe Anteile an hochmolekularen Protein-Aggregationen gut erkannt werden, da dieser Detektor direkt auf das Molekulargewicht einer Probe anspricht. Ein Beispiel für die Bestimmung verschiedener Protein-Aggregationen zeigt Abbildung 3.

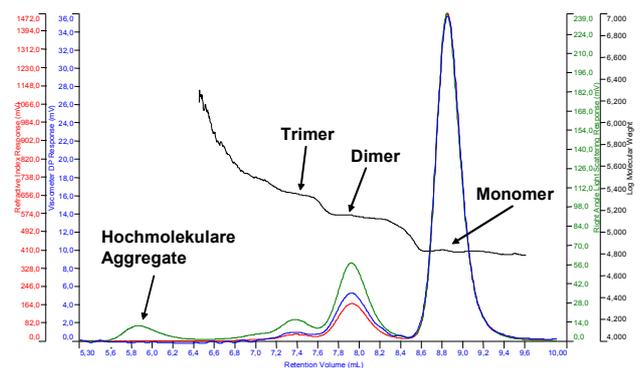


Abb. 3: Chromatogramme einer BSA-Probe mit Aggregationen

## GPC/SEC mit Dreifachdetektion

### Application Note: Antikörper, DNA und Proteine

Während der Monomer-Peak noch von allen Detektoren gut erkannt wird, ist der erste Peak bei einem Retentionsvolumen von 5,6-6 ml praktisch nur noch im Lichtstredetektor zu sehen. Die Konzentration sowie die Viskosität dieses hochmolekularen Aggregates liegen unter der Nachweisgrenze der anderen Detektoren.

Bei Proteinkonjugaten besteht durch den zusätzlichen Einsatz eines UV-Detektors die Möglichkeit der Zusammensetzungsanalyse. Als Beispiel wird die Analyse eines pegulierten Proteins aufgezeigt. Das Protein wurde zusammen mit Polyethylenglykol (PEG) gelöst; es sollte sich ein Komplex aus Protein und PEG bilden. Anwendung finden diese Substanzen im Bereich der „Drug Delivery“ Medikamente mit zeitlich verzögerter Freisetzung des Wirkstoffes. Abbildung 5 zeigt zwei Analysen von PEG-Protein-Komplexen. Im ersten Fall (Abb. 4a) liegen die Peaks für das PEG und das Protein nicht übereinander; offensichtlich hat sich der gewünschte Komplex nicht gebildet. Ein Beispiel für eine erfolgreiche Pegulierung hingegen zeigt die zweite Grafik (Abb. 4b); sowohl der Monomerpeak wie auch der Dimerpeak des Proteins sind von PEG umhüllt. Berücksichtigt man die Molekulargewichte der beiden Substanzen (PEG und Protein) dann ergibt sich als Resultat dass jedes Proteinmolekül von durchschnittlich vier PEG-Molekülen umgeben ist.

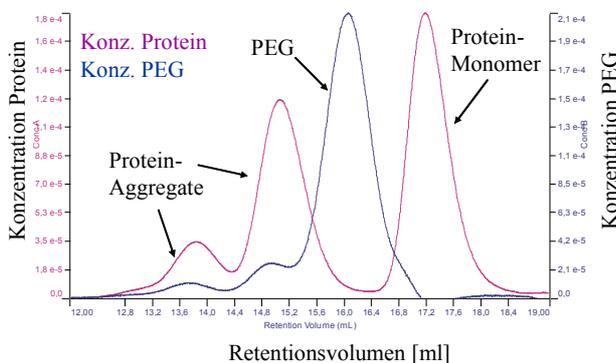


Abb.4a: Pegulierung von Proteinen; fehlgeschlagener Versuch

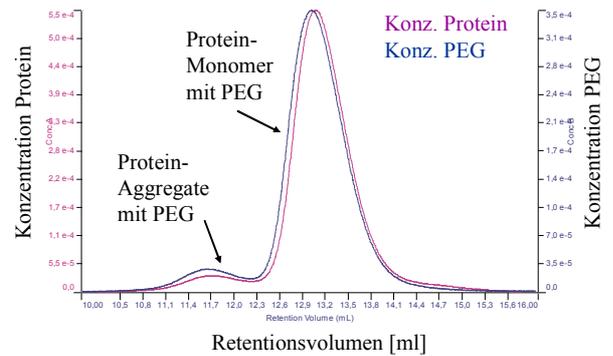


Abb.4b: Pegulierung von Proteinen; erfolgreicher Versuch

#### Zusammenfassung

Das Molekulargewicht ist ein wichtiger Parameter der Aufschluss gibt ob es sich bei Proteinen und anderen biologischen Makromolekülen in Lösung um Monomere, Dimere oder höhere Aggregate handelt. Zur Bestimmung von Molekulargewichten in Lösung ist ein Lichtstredetektor geeignet. Aufgrund der geringen Größe von Proteinen ist in aller Regel ein 90°-Detektor vollkommen ausreichend, da die Proben keine Winkelabhängigkeit des Streulichts bewirken. Nur in bestimmten Fällen (z. B. DNA) sind die zu untersuchenden Moleküle so groß dass weitere Messwinkel benötigt werden. Sollte dies der Fall sein ist ein Kleinwinkel-Lichtstredetektor die einzige Möglichkeit das Molekulargewicht exakt und ohne Extrapolation oder Korrekturen zu vermessen.

Wie die aufgeführten Beispiele zeigen ist aber oft das Molekulargewicht eines Proteins oder anderen Biomoleküls allein nicht ausreichend um beurteilen zu können ob sich zwei Moleküle unterscheiden. Die beiden IgG-Antikörper weisen ein nahezu identisches Molekulargewicht auf und würden zunächst als identisch eingestuft werden. Erst die zusätzliche Bestimmung der Intrinsischen Viskosität der beiden Proben zeigt dass die beiden Proben strukturell äußerst unterschiedlich sind. Der Antikörper Nr. 2 hat eine sehr viel offenere Struktur als Nr. 1. Auch die unterschiedlichen Strukturen des

## GPC/SEC mit Dreifachdetektion

### Application Note: Antikörper, DNA und Proteine

DNA-Moleküls können nicht direkt anhand des Molekulargewichtes unterschieden werden. Es sind die über den Viskositätsdetektor bestimmten molekularen Größen die hier eine eindeutige Unterscheidung ermöglichen.

Die Zusammensetzungsanalyse von Proteinkonjugaten, aufgezeigt am Beispiel von pegulierten Proteinen, ist ein weiteres Beispiel für die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten der GPC/SEC mit Mehrfachdetektion in der biomolekularen Forschung, der Biotechnologie und der pharmazeutischen Industrie.

#### Literatur:

- [1] B. Tartsch, „Proteine-Herausforderung für die Gelpermeationschromatographie“, GIT Labor-Fachzeitschrift 4/2004, S. 348-350
- [2] W.K. Hartmann, N. Saptharishi, X.Y. Yang, G. Mitra, G. Soman, “Characterization and analysis of thermal denaturation of antibodies by size exclusion high-performance liquid chromatography with quadruple detection”, Anal. Biochem. 325, S. 227-239 (2004)
- [3] E. Longman, S.E. Harding und N. Marheinecke, “Identifying Differences in Solution Conformations of Two Chimeric IgG3 Antibodies through Triple Detection GPC/SEC”, LC-GC Europe, Dezember 2005, S. 662-667