



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

**„Entwicklung alternativer Reinigungs- und
Detektionsmethoden für den bispezifischen single-chain
Antikörper r28M“**

Verfasser

Alfred Memaj

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 441

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Genetik-Mikrobiologie

Betreuer: Univ. Doz. Mag. Dr. Christoph Schüller

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von November 2011 bis Juli 2012 im
Christian Doppler Labor für Innovative Immuntherapie an der Veterinärmedizinischen
Universität Wien durchgeführt.

Betreuung

Prof. Dr. Dr. Gottfried Brem

Dr. nat techn. Judith Rudolf

Danksagung

Ein großes Dankeschön geht an Herrn Prof. Dr. Gottfried Brem für die Möglichkeit, diese Diplomarbeit im Christian-Doppler-Labor für innovative Immuntherapie an der Veterinärmedizinischen Universität Wien durchführen zu können. Danke für die Idee dieses spannenden Themas, sowie für das Vertrauen, das er in mich setzte.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Univ. Doz. Dr. Christoph Schüller für die Übernahme des Gutachtens.

Ein herzliches Dankeschön geht an Dr. Judith Rudolf für die Betreuung, die Ideen, die guten Tipps, die Geduld, sowie für ihre Bereitschaft zur Unterstützung. Sie war jederzeit mit konstruktiven Gesprächen und Diskussionen für mich da.

Vielen Dank der ganzen Arbeitsgruppe des CD Labors, die für ein nettes Arbeitsklima sorgten. Besonders möchte ich mich bei Mag. Corinna Kern und Mag. Karina Scherrer bedanken, die mich jederzeit unterstützten.

Mein größter Dank geht an meine gesamte Familie für ihr Vertrauen und ihre Unterstützung. Insbesondere an meine Frau Danijela, die mir mit ihrer Geduld und Liebe geholfen hat mein Ziel zu erreichen.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	13
1.1	Das maligne Melanom.....	13
1.1.1	Ursachen	14
1.1.2	Das MCSP-Antigen	14
1.2	Immuntherapie für die Behandlung von Melanomen	15
1.2.1	Rekombinante bi-scFv Antikörper.....	16
1.2.2	Der Rekombinante bi-scFv Antikörper r28M	17
	Zielsetzung.....	26
2	MATERIAL UND METHODEN	27
2.1	Material	27
2.1.1	Verwendete Geräte.....	27
2.1.2	Glas und Plastikwaren.....	28
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien.....	29
2.1.4	Antikörper	30
2.1.5	Verwendete Plasmaproben.....	31
2.1.6	Standardproteine	31
2.1.7	Zusätzliche Materialien.....	31
2.1.8	Puffer	32
2.2	Methoden.....	34
2.2.1	Affinitätschromatographie	34
2.2.2	Reinigung des r28M Antikörpers via α -c-myc Affinitätschromatographie	35
2.2.3	ELISA (Enzyme-Linked-ImmunoSorbent Assay)	37
2.2.4	Kopplung des c-myc Peptides über Glutaraldehyd an BSA.....	42
2.2.5	Elektrophoretische Methoden	44
2.2.6	Quantitative Bestimmung des Gesamtproteins	45
2.2.7	Software	47
3	ERGEBNISSE	48
3.1	Reinigung des r28M via α-c-myc Affinitätschromatographie	48
3.1.1	Kopplung des Liganden (9E10) an die Matrix.....	48

Inhaltsverzeichnis

3.1.2	Reinigung des r28M.....	49
3.1.3	Analytik der Reinigung.....	50
3.1.4	Vergleich α -c-myc- und Protein L Reinigung.....	53
3.2	Entwicklung eines α-c-myc ELISA für Detektion des r28M.....	54
3.2.1	Direkter Test mit r28M Antikörper.....	54
3.2.2	Erstellen einer Standardkurve für den α -c-myc Sandwich ELISA.....	56
3.2.3	Einfluss der Lagerbedingungen des Standards auf den α -c-myc ELISA.....	59
3.2.4	Ermittlung der Konzentration von r28M in Plasma.....	61
3.2.5	Vergleichende Konzentrationsbestimmung von r28M mittels α -c-myc- und Protein L ELISA.....	62
3.3	Optimierung des α-c-myc ELISA.....	64
3.3.1	Entwicklung eines kompetitiven α -c-myc ELISA.....	64
3.3.2	Erstellen einer Standardkurve für den kompetitiven ELISA.....	66
3.3.3	Optimierung des kompetitiven ELISA.....	68
3.3.4	Stabilitätstest mittels kompetitivem α -c-myc ELISA.....	70
3.4	Vergleichende Ergebnisse mittels Sandwich- und kompetitivem ELISA.....	72
4	DISKUSSION.....	74
4.1	Reinigung des r28M Antikörpers.....	74
4.2	Detektion des r28M Antikörpers.....	76
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	80
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	82
7	ANHANG.....	91
7.1	r28M AS-Struktur.....	91
7.2	r28M Konzentration in Plasmaproben von 37 Tieren.....	92
	Lebenslauf.....	95

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Tumorstadien bei schwarzem Hautkrebs (Melanom).....	13
Abbildung 1.2:	Aufbau und Struktur eines bispezifischen scFv Antikörpers gegen Tumorzellen	16
Abbildung 1.3:	Konstruktion des bi-scFv r28M Antikörper	18
Abbildung 1.4:	Struktur des bispezifischen single-chain Antikörpers r28M.	19
Abbildung 1.5:	Gelfiltration des r28M Antikörper (Monomer und Dimer).....	20
Abbildung 1.6:	r28M-vermittelte Lyse von Melanomzellen: Wirkmechanismus.	21
Abbildung 1.7:	Induktion von T-Zell-Aktivierung und Abtöten der Tumorzellen (Mikrofotographie).....	22
Abbildung 1.8:	Darstellung des c-myc Tags und dessen Sequenz.....	24
Abbildung 1.9:	Detektion und Reinigung des r28M via monoklonale α -c-myc Antikörper (9E10).....	25
Abbildung 2.1	Prinzip der Affinitätschromatographie	35
Abbildung 2.2:	Kopplung des Liganden an NSH-aktivierte Sepharose	36
Abbildung 2.3:	Aufbauprinzip eines α -c-myc Sandwich ELISA.	38
Abbildung 2.4:	Prinzip eines kompetitiven α -c-myc ELISA	41
Abbildung 2.5:	Mechanismus der Glutaraldehyd-Kopplung.....	43
Abbildung 3.1	SDS-PAGE (8%) Silberfärbung und Western-Blot.....	48
Abbildung 3.2:	Chromatogramm Reinigung vom Plasma via α -c-myc-Affinitätssäule	49
Abbildung 3.3:	Reinigung des r28M via α -c-myc Affinitätssäule, Elution des r28M Antikörpers mit 0,1 M Natriumcitrat pH 3.....	50
Abbildung 3.4:	Vergleichende Ergebnisse von BCA und ELISAs.....	51
Abbildung 3.5:	8% SDS-PAGE (nicht-reduzierend)	52
Abbildung 3.6:	8% SDS-PAGE (reduzierend)	52
Abbildung 3.7:	Chromatogramm: Vergleich α -c-myc- und Protein L Reinigung	53
Abbildung 3.8:	Western-Blots mit verschiedenen c-myc-spezifischen Antikörpern..	54
Abbildung 3.9:	ELISA Kurven, direktes Coating mit FB11PAKT01	55
Abbildung 3.10:	Einfluss des Coating-Antikörpers auf die Standardkurve.....	57
Abbildung 3.11:	Einfluss der Konzentration des Coating-Antikörpers	58
Abbildung 3.12:	Einfluss der Konzentration des Detektions-Antikörpers und Negativkontrolle.....	59
Abbildung 3.13:	Einfluss der Lagerbedingungen auf die Standardkurve	60

Abbildung 3.14: Vergleichende Ergebnisse bei Messung des Standards 11CDL02 bei verschiedenen Lagerbedingungen.....	61
Abbildung 3.15: Ermittlung der r28M-Konzentration in Plasma mittels α -c-myc ELISA	62
Abbildung 3.16: Vergleichende Ergebnisse mittels Protein L und α -c-myc ELISA ...	63
Abbildung 3.17: Dot-Blots des BSA-c-myc Konjugates und Kontrollen	65
Abbildung 3.18: Einfluss der Konzentration des Coating-Antigens	66
Abbildung 3.19: Einfluss der Blockierungslösung	67
Abbildung 3.20: kompetitive c-myc Standardkurve sowie verschiedene r28M-Proben und GST-cmyc	68
Abbildung 3.21: Kompetitiver ELISA, c-myc Standardkurve	69
Abbildung 3.22: Kompetitiver ELISA: Messung verschiedener r28M-Proben (12CDL08 & #236)	69
Abbildung 3.23: Stabilitätstest mittels kompetitiven α -c-myc ELISA	70
Abbildung 3.24: Stabilitätstest 12CDL12 mittels α -c-myc ELISA	71
Abbildung 3.25: Vergleichende Ergebnisse mittels Sandwich- und kompetitiven ELISA	72
Abbildung 4.1: Vergleich zwischen Protein L und α -c-myc Reinigung	75
Abbildung 7.1: Konzentrationsbestimmung des r28M in Plasma transgener Tieren mittels α -c-myc- und Protein L ELISA.	94

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Liste der verwendeten Antikörper.....	30
Tabelle 2.2:	Liste der verwendeten Plasmaproben	31
Tabelle 2.3:	Liste der verwendeten Standardproteine.....	31
Tabelle 2.4:	Bedingungen eines α-c-myc ELISA	39
Tabelle 2.5:	Bedingungen für den Protein L ELISA.....	40
Tabelle 2.6:	Bedingungen für kompetitiven ELISA.....	42
Tabelle 2.7:	Optimierte Bedingungen für α-c-myc kompetitiven ELISA.....	42
Tabelle 2.8:	Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel (SDS-PAGE)	44
Tabelle 2.9:	Verdünnung des BSA Standards	46
Tabelle 3.1:	Effizienz der Kopplung mittels BCA-Messung.....	48
Tabelle 3.2:	Vergleichende Konzentrationsbestimmung r28M mittels Protein L- und c-myc-ELISA.....	63
Tabelle 3.3:	Konzentrationsbestimmung durch BCA.....	65
Tabelle 7.1:	Bedingungen für α-c-myc- und Protein L ELISA	92
Tabelle 7.2:	Konzentrationsbestimmung des r28M in Plasma transgener Tieren mittels α-c-myc- und Protein L ELISA.....	93

Abkürzungsverzeichnis

α	anti
APS	Ammoniumpersulfat
BiTE®	Bispecific T Cell Engager
BSA	Bovine serum albumin
CDLIIT	Christian Doppler Labor für innovative Immuntherapie
c-myc	Cellular myelocytomatosis
CSPG4	Chondroitinsulfat-Proteoglykan 4
C-Terminus	Carboxyterminus
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CTLA4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Fc	Konstante Fragment des Antikörpers
FCS	Fetal calf serum
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde/n
His	Histidin
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
HRP	Horseradish peroxidase
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilo-Dalton
M	Molar
mAb	Monoclonal antibody
MCSP	Melanom Chondroitinsulfat-Proteoglykan

Abkürzungsverzeichnis

mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
ml	Milliliter
MTP	Mikrotiterplatte
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
NG2	Neural/Glial Antigen 2
N-Terminus	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate buffered saline
PVA	Polyvinylalkohol
rpm	Revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
r28M	Rekombinanter bispezifischer single-chain Antikörper
scFv	Single-chain fragment variable
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEC	Size-exclusion chromatography
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMB	3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin
UV	Ultraviolet
VH	Variable Domäne der schweren Kette
VL	Variable Domäne der leichten Kette
WHO	World Health Organization

1 Einleitung

Seit den 1970ern steigen die Fälle von Hautkrebserkrankungen kontinuierlich an. Die Todesrate bei Melanomen steigt schneller als die Rate bei den meisten anderen Krebsarten [Hodi et al., 2010]. Die World Health Organization (WHO) schätzt, dass es 66.000 Todesfälle jährlich an Hautkrebs weltweit sind, mit ca. 80% aufgrund des Melanoms [World Health Organization, 2010]. In Europa gibt es jährlich etwa 63.000 neue Melanomfälle und davon 17.000 Todesfälle. Im Jahr 2010 in Österreich erkrankten 1.436 Menschen an einem malignen Melanom der Haut, etwa 376 Personen bzw. 2,4 von 100.000 Einwohnern starben zuletzt infolge dieser Krebserkrankung [Statistik Austria, 2012].

1.1 Das maligne Melanom

Das Melanom, auch schwarzer Hautkrebs genannt, ist ein extrem bösartiger und aggressiver Tumor der Melanozyten (Pigmentzellen). Das Melanom gehört zu den Hauttumoren mit dem höchsten Malignitätsgrad. Dieser Tumor neigt sehr früh zur Ausbildung von Metastasen über Blutbahnen und Lymphwege in andere Organe, wie Lunge, Leber, Gehirn, Herz oder Knochen [Balch, 1992].

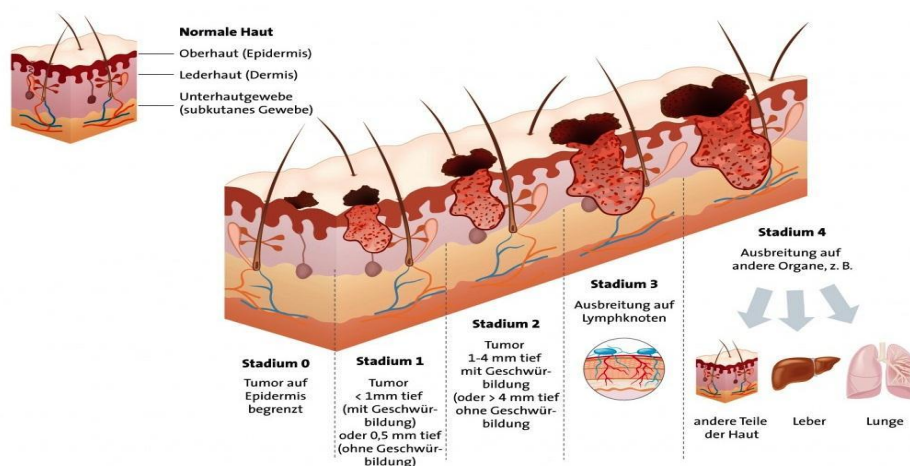


Abbildung 1.1: Tumorstadien bei schwarzem Hautkrebs (Melanom). Stadium 0: das Melanom ohne Primärtumor. Stadium 1: Primärtumor ohne klinische regionale Lymphknotenmetastasen. Stadium 2: Primärtumor mit oder ohne klinische regionale Lymphknotenmetastasen. Stadium 3: Primärtumor mit hämatogenen oder lymphogenen Fernmetastasen. Stadium 4: Primärtumor mit Metastasen in anderen Organen. *Modifiziert nach [Chemiereport.at].*

Stadium 0 des Melanoms bezieht sich auf frühe Läsionen, die flach sind und sich nicht ausbreiten (Lymph- bzw. Blutgefäße); Stadium 1 ist lokalisiert, weniger als 1,5 mm dick und hat eine günstige Prognose; Stadium 2 ist 1 mm bis 4 mm dick und, obwohl die Lymphknoten noch nicht betroffen sind, wurde bereits die Dermis des lymphatischen Systems und Blutgefäße infiltriert; Stadium 3: Tumore sind dicker als 4 mm und haben sich in benachbarte Lymphknoten ausgebreitet, den im Stadium 4: Ausbreitung durch das Lymphsystem und den Blutkreislauf, mit möglichen Metastasen in inneren Organen.

1.1.1 Ursachen

Das Melanom ist vorwiegend eine Neoplasie der weißen Bevölkerung. Bei diesen korreliert die Inzidenz des Melanoms mit der UV-Bestrahlung des Wohngebiets. Die höchste Krankheitsrate liegt in Australien bei mehr als 40 Fällen/100.000 Einwohner. In der weißen Bevölkerung liegt die Inzidenz bis 100- fach höher als bei Afrikanern und Asiaten [Fritsch, 2009; Grin-Jorgensen et al., 1992]. Die Risikofaktoren für die Melanomentstehung sind sehr dispositionell: UV-Licht (UV-Empfindlichkeit: Hauttypen I und II), ethnische Zugehörigkeit (weiße Bevölkerung), genetische Disposition (gestörte DNA-Reparation, wie z.B. Xeroderma pigmentosum), immunsuppressive Faktoren, höheres Durchschnittsalter, Geschlecht (weiblich) [Godar et al., 2010; Fritsch, 2009].

Das familiäre maligne Melanom macht in der Gesamttumorhäufigkeit zwischen 5 und 10% aus. Bei 30-50% aller familiär und 25-40% der sporadisch auftretenden Melanome ist das sogenannte Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor 2A Gen (CDKN2A) am kurzen Arm des Chromosoms 9 mutiert, welches für die Proteine p16 und p14ARF kodiert. Diese Proteine spielen in den Zellzyklus eine wichtige Rolle, sodass deren Mutation zur unkontrollierten Zellteilung führt [Monzon et al., 1998; Jenkins et al., 2012; Aravidis et al., 2012].

1.1.2 Das MCSP-Antigen

Das Melanom Chondroitinsulfat-Proteoglykan (MCSP; auch als CSPG4, NG2, HMW-MAA, MSK16, MCSPG, MEL-CSPG oder GP240) ist ein Oberflächen-

Antigen, das häufig auf menschlichen Melanomzellen exprimiert wird [Bluemel et al., 2010; Bumol et al., 1982; Morgan et al., 1981]. Dieses Antigen setzt sich aus einem 250 kDa N-gebundenen Glykoprotein und einem 450 kDa Proteoglycan zusammen. Das MCSP-Antigen ist ein zielgerichteter Punkt für Antikörper-basierte Immuntherapien, da es von über 90 % der malignen Melanome exprimiert wird. Das Gen für MCSP befindet sich in Chromosom 15 [Pluschke et al., 1996; Campoli et al., 2004]. Die Funktion ist noch nicht geklärt, laut bisher durchgeführten Studien soll das MCSP-Molekül eine Rolle in der Wachstumskontrolle, Zell-Substrat-Wechselwirkungen, Zell-Zell-Kontakte und Invasion von Zellen in das Gewebe spielen [Iida et al., 2001; Pluschke et al., 1996; Iida et al., 1995].

1.2 Immuntherapie für die Behandlung von Melanomen

Maligne Melanome stellen die häufigste Form tödlich verlaufender Hautkrebserkrankungen dar. Die herkömmlichen angewandten Therapien (Chemo- und Strahlentherapie) für die Behandlung von fortgeschrittenen Stadien des Melanoms sind nicht zufriedenstellend. Daher besteht ein dringender Bedarf an neuartigen Therapieoptionen. Antikörper-basierte Immuntherapeutika gegen MCSP-Antigen bieten eine vielversprechende Alternative bzw. Ergänzung zu den herkömmlichen Therapieschemata.

Mitte der 1970er Jahre entwickelten Köhler und Milstein die Hybridom-Technologie [Köhler & Milstein, 1975], welche einen entscheidenden Schritt für die Entwicklung der Immuntherapie darstellte. Die Therapie des metastasierten malignen Melanoms gehört zu den größten Herausforderungen in der Dermato-onkologie [Hafner, 2010]. Hodi et al. berichten über α -CTLA4-Antikörper (Ipilimumab) als Antikörpertherapie gegen metastasierende Melanome. CTLA4 (Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) wird an den T-Zellen exprimiert und interagiert mit B7 der antigenpräsentierenden Zellen, wodurch die Aktivität der T-Zellen inhibiert wird [Brunet et al., 1987]. Durch α -CTLA4-Antikörper wird CTLA4 geblockt, sodass die T-Zell-Antwort verstärkt wird [Hodi et al., 2010].

In den vergangenen Jahren haben die bispezifische Antikörper für die Therapie von Tumorerkrankungen eine besondere Bedeutung erlangt, da sie in der Lage sind,

Zellen des Immunsystems und Tumorzellen effektiv miteinander zu verbinden [Dübel, 2004], wodurch es zur Abtötung der Tumorzellen kommt. Dieser Effekt wird durch die simultane Bindung eines Antigens auf der Tumorzelle und eines aktivierenden Moleküls auf einer immunologischen Effektorzelle erreicht, welche dann die gebundene Tumorzelle zerstören kann [Ströhlein & Heiss, 2012].

1.2.1 Rekombinante bi-scFv Antikörper

Rekombinante Antikörper sind gentechnisch hergestellte Antikörperfragmente, die durch genetische Selektion aus Antikörpergenbibliotheken gewonnen werden. Die häufigsten rekombinanten Antikörper sind die so genannten single-chain Antikörper, die nur aus einem Fv-Fragment bestehen. Da das Fv-Fragment aus den beiden Ketten VH und VL gebildet wird, müssen bei der rekombinanten Technologie diese beiden Ketten miteinander über eine Peptidbrücke verbunden werden. So entsteht eine einzelne Kette (single-chain) [Bratke, 2009].

Bispezifische (bi) Antikörper bestehen aus je einer schweren und einer leichten Kette zweier unterschiedlicher monoklonaler Antikörper. Sie sind rekombinante Moleküle, die zwei unterschiedlicher Spezifitäten besitzen [Rüttinger et al., 2008].

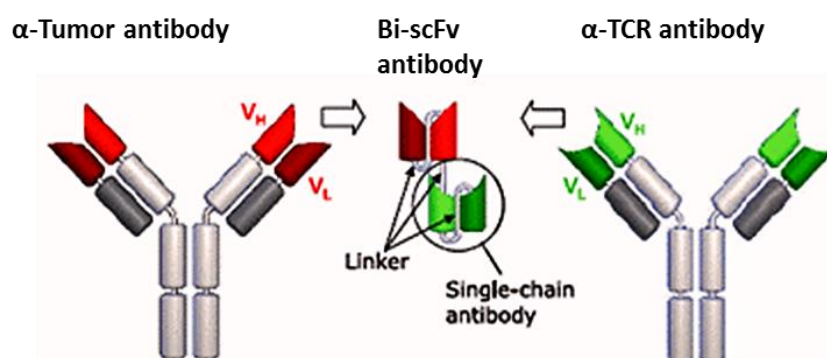


Abbildung 1.2: Aufbau und Struktur eines bispezifischen scFv Antikörpers gegen Tumorzellen
Variable Domänen (VH und VL) eines Tumorantigen-spezifischen monoklonalen Antikörpers (mAb) und einer T-Zellrezeptor-spezifischer mAb wurden in single-chain-Antikörper umgesetzt (Kreis) rekombinant verbunden durch nicht-immunogen Linkersequenzen. Das resultierende Konstrukt bispezifischen Antikörpers mit nur ein Drittel der Größe einer normalen mAb. *Modifiziert nach [Rüttinger et al., Journal Onkologie 2008]*

Zur Herstellung bispezifischer Immunglobuline fusionierten Milstein und Cuello 1983 erstmals zwei unterschiedliche Hybridomzelllinien miteinander (Hybrid-Hybridom (Quadrom)) [Milstein & Cuello, 1983]. Damit ließen sich unterschiedliche

Leicht- und Schwerketten, die rekombinant modifiziert wurden, zu unterschiedlichen Antikörperkonstrukten kombinieren, die nach entsprechender Auftrennung als therapeutisches Agens verwendet werden können [Ströhlein & Heiss, 2012].

1.2.2 Der Rekombinante bi-scFv Antikörper r28M

Im Jahr 2003 gelang Grosse-Hovest et al. die Herstellung des r28M Antikörpers. Dies rekombinante Molekül wurde durch Fusion zwei verschiedenen single-chain Fv (scFv) Antikörperfragmente ausgebildet und ist gegen Melanom-assoziierte Proteoglykan (MCSP auch CSPG4 oder NG2) und das kostimulatorische CD28-Moleküls auf die menschlichen T-Zellen konstruiert worden [Grosse-Hovest et al., 2003]. Der Antikörper besitzt eine „supra-agonistische“ Aktivität, die verstärkt bei der dimerisierten Form des Antikörpers nachgewiesen wurde [Grosse-Hovest et al., 2003; Grosse-Hovest et al., 2004].

1.2.2.1 Aufbau, Struktur und Produktion des r28M

Die Expression des r28M wurde sowohl *in vitro* [Grosse-Hovest et al., 2003], als auch *in vivo* [Grosse-Hovest et al., 2004] durchgeführt.

1.2.2.1.1 *In vitro* Produktion

Die bi-scFv Antikörper lassen sich *in vitro* mittels Hybridom-Technik produzieren [Milstein & Cuello, 1983]. Der r28M Antikörper wurde aus zwei verschiedenen monoklonalen Antikörpern (α -human CD28, mAb 9.3 x α -human-CSPG4, mAb 9.2.27) hergestellt. Für die Erzeugung von monospezifischen scFv Einzelketten-Antikörper aus Hybridom-abgeleiteten cDNA wurde das rekombinante Phagen-Antikörper-System verwendet. Beide funktionellen scFv-Fragmente sind durch eine 18-Aminosäuren-Linker (L) vom N-Terminus der CH1-Domäne eines menschlichen Immunglobulins verbunden. Dies führte zu einem Konstrukt mit der folgenden 5`-3` Orientierung: (VL-VH)_{9.3}-L-(VH-VL)_{9.2.27}-6His. Zur Erzeugung einer Expressionskassette wurden die regulatorischen Elemente subkloniert. Das gesamte Konstrukt (pCDNA3- und pCR-Script Vektor) wurde in einen Vektor fusioniert (Abbildung 1.3), der dann in Maus-Myelom-Zellen (Sp-2/0-Ag14 Zelllinie) transfiziert wurde. *In vitro* produzierter single-chain Antikörper konnte erfolgreich mittels einem Vorreinigungsschritt, Ammoniumsulfatfällung sowie Protein L

Einleitung

Chromatographie gereinigt werden [Grosse-Hovest et al., 2003]. Ein Problem bei der *in vitro* Herstellung stellt die geringe Ausbeute an Antikörper aus dem Zellüberstand dar.

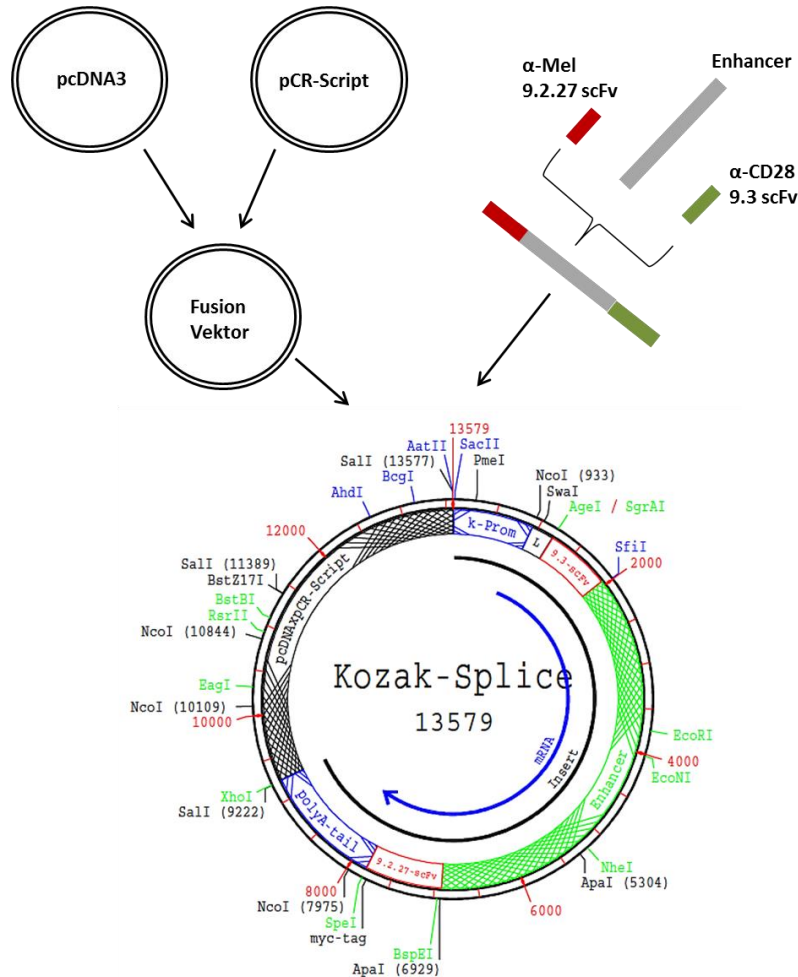


Abbildung 1.3: Konstruktion des bi-scFv r28M Antikörper

Die Expressionsvektoren dienen als Ausgangsmaterial für die Klonierungen und basieren auf einem Vektorgerüst, das aus den beiden Standard-Vektoren pcDNA3 und PCR-Script entwickelt wurde. Die enthaltenen Sequenzen (Promotoren, Intron, Polyadenylierungssequenzen) entsprechen den Sequenzen der Maus-Immunglobulinloci leichter (κ) und schwerer Kette. Der Vektor Kozak Splice ist ein eukaryontischer Expressionsvektor für bispezifische single-chain Antikörper. Er enthält wesentliche Elemente: κ -Promoter Leader-Sequenz L, scFv-cDNA in der Konformation VL- (G4S)3-Linker-VH, μ -Intron mit enhancer-Elementen, Linker-Sequenz, scFv-cDNA in der Konformation VH- (G4S)3-Linker-VL. *Modifiziert nach [Otz T., 2008]*

1.2.2.1.2 *In vivo* Produktion

Seit den Arbeiten von Behring und Kitasato vor über 100 Jahren ist bekannt, dass spezifisch bindende Moleküle aus Blutseren gewonnen werden können. Anfang der 1980-er Jahre wurde zum ersten Mal der Begriff "gene farming" verwendet, um später mit der Entwicklung der neuen Methoden für die Produktion transgener Tiere,

Einleitung

wie Schafe, Schweine, Kaninchen [Hammer et al., 1985; Brem et al., 1985] oder Rinder [Biery et al., 1988] zu beginnen. Das Einfügen von neuem genetischen Material, oft rekombinanter Gene, in das Genom der Tiere bietet die Möglichkeit neuartige Produkte wie rekombinante Antikörper zu produzieren [Dübel, 2004].

Im Jahr 2004 beschreibt Grosse-Hovest et al. die Expression des single-chain Antikörpers r28M im Plasma transgener Rinder (Tierversuche wurden in Agrobiogen, Deutschland durchgeführt). Der r28M Vektor wurde in fötale Rinder Fibroblasten eingefügt. Diese fötalen Fibroblasten mit der linearisierten r28M Expressionskassette wurden in eine entkernte Eizelle transferiert. Die Blastozysten wurden nach 7 Tagen *in vitro* Kultivierung in den Uterus des Empfängers (Kuh) übertragen. Mittels Protein L ELISA konnte im Blutplasma der transgenen Kälber der scFv r28M nachgewiesen werden [Grosse-Hovest et al., 2004].

Die Struktur des r28M Monomers besteht aus zwei monospezifischen single-chain Fv-Fragmenten, die jeweils zwischen der schweren und leichten Kette mit einem Glycin-Serin-Linker (L1) verbunden sind. Die monospezifischen single-chain Fv-Fragmente sind zwischen den beiden VH Domänen durch einen zweiten Linker (L2) verbunden. Die Monomer-Struktur des scFv r28M hat ein Molekulargewicht von 57,37 kDa. Um Reinigung bzw. Detektion zu ermöglichen, wurde der r28M Antikörper am C-Terminus mit einem c-myc-Epitop versehen (Abbildung 1.4) [Grosse-Hovest et al., 2004; Grosse-Hovest et al., 2005].

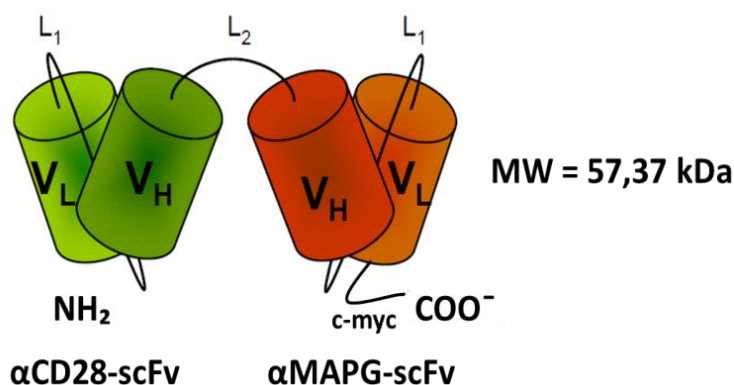


Abbildung 1.4: Struktur des bispezifischen single-chain Antikörpers r28M. Zwei monospezifische einzelkettiges Fv-Fragmente mit einem Glycin Serin-Linker (L1) zwischen den V_H/V_L Bereiche durch einen zweiten Linker (L2), um ein bispezifisches einzelkettiges Molekül mit einem berechneten Molekulargewicht von 57,37 kDa zu bilden. An C-Terminale Ende bzw. auf α -MAPG Seite ist ein c-myc-Tag fusioniert. *Modifiziert nach [Grosse-Hovest et al., 2005].*

Mittels Gelfiltrationschromatographie konnte von Grosse-Hovest et al. gezeigt werden, dass der r28M sowohl in Monomer- als auch in Dimer Form existiert (Abbildung 1.5) [Grosse-Hovest et al., 2005].

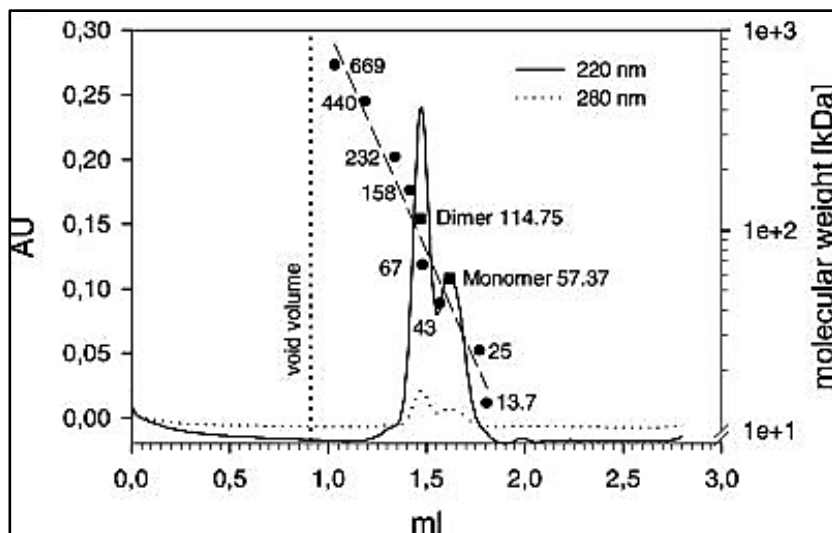


Abbildung 1.5: Gelfiltration des r28M Antikörper (Monomer und Dimer)
Kalibrierung der Elutionsvolumen und Molekulargewichte (kDa) wurde mittels folgenden Eichproteine: Thyreoglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Katalase (232 kDa), Aldolase (158 kDa), Rinderserumalbumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Chymotrypsinogen A (25 kDa) und Ribonuclease A (13,7 kDa). Nach [Grosse-Hovest et al., 2005].

Die Ausbeute bei transgenen Rinder war vergleichsweise hoch: ~100 Milligramm Antikörper pro Liter Blut, gegenüber nur einem Milligramm bei der Herstellung in Zellkulturen (Hybridom-Technik). Eine erhöhte Produktion des r28M Antikörpers in transgenen Rinder konnte im Alter von 4-10 Monate nachgewiesen werden [Grosse-Hovest et al., 2004].

1.2.2.2 Wirkmechanismus des r28M

Bispezifische single-chain Antikörper im Allgemeinen erkennen zwei verschiedene Antigene: eines an der Zielzelle und das andere an der zytotoxischen Zelle. Durch gleichzeitige Bindung beider Epitope bilden sie eine zytolytischen Synapse [Dustin & Shaw., 1999]. Diese neuartige Verknüpfung zwischen T-Zelle und Tumorzelle kann den Komplex aus T-Zell-Rezeptor (TCR), Peptidantigen und MHC-Molekül funktionell ersetzen und macht somit eine zytotoxische T-Zellantwort einzig von der Anwesenheit des bispezifischen Antikörpers abhängig [Rüttinger et al., 2008].

Einleitung

Der Antikörper r28M bindet an CD28-Antigen der T-Zellen sowie CSPG4-Antigen der Melanomzellen. Gleichzeitige Bindung induziert die T-Zellaktivierung in peripheren mononukleären Zellen (PBMC) ohne zusätzliche TCR/CD3 Stimulation [Grosse-Hovest et al., 2004]. Die Freisetzung von zytotoxische Granulum führt zur Membranperforation, die Aktivierung der Caspasen, Fragmentierung der DNA und letztendlich zum Abtöten der Tumorzelle durch Apoptose [Evelyn et al., 2005].

Für eine T-Zellaktivierung über den r28M Antikörper ist:

- keine Antigenpräsentierende-Zelle (APC) erforderlich,
- keine Prozessierung von Antigenen nötig,
- keine Assoziation mit MHC-Molekülen erforderlich, die Erkennung wird über MCSP-Antigen vermittelt,
- keine zusätzlichen kostimulatorischen Signale erforderlich.

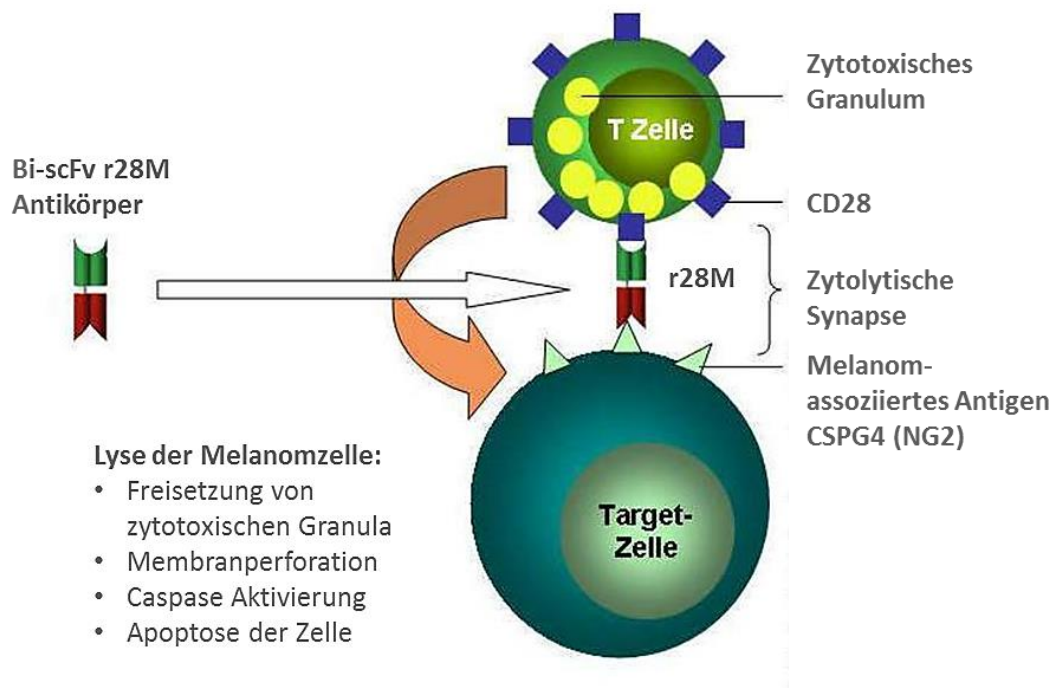


Abbildung 1.6: r28M-vermittelte Lyse von Melanomzellen: Wirkmechanismus.

Gleichzeitige Bindung von r28M Antikörper an T-Zellen (CD28-Antigen) sowie Melanomzellen (MCSP) führt zur Aktivierung von T-Zellen. Freisetzung von zytotoxischen Granula führt zur Membranperforation, die als Folge die Aktivierung der Caspasen und Abtöten der Tumorzelle durch Apoptose hat. *Modifiziert nach [laborpraxis.vogel.de/bispecific antibody]*

1.2.2.3 r28M-vermittelte Zellabtötung

Der r28M Antikörper ist in der Lage eine „supra-agonistische“ T-Zellaktivierung über das CD28-Molekül, ohne zusätzliches Signal über den TCR/CD3-Komplex, zu induzieren und eine Tumorzelllyse sowohl *in vitro* [Grosse-Hovest et al., 2003] als auch *in vivo* [Grosse-Hovest et al., 2005] zu vermitteln. In einer Studie von Grosse-Hovest et al. wurde die biologische Aktivität des r28M aus transgenen Rindern getestet. Es wurden die Melanomzellen Sk-Mel63 mit humanen PBMC und r28M-positivem Kälberserum für 3 Tage inkubiert. Dabei konnte die Induktion von T-Zellaktivierung und das Abtöten der Sk-Mel63 mittels r28M nachgewiesen werden (Abbildung 1.7).

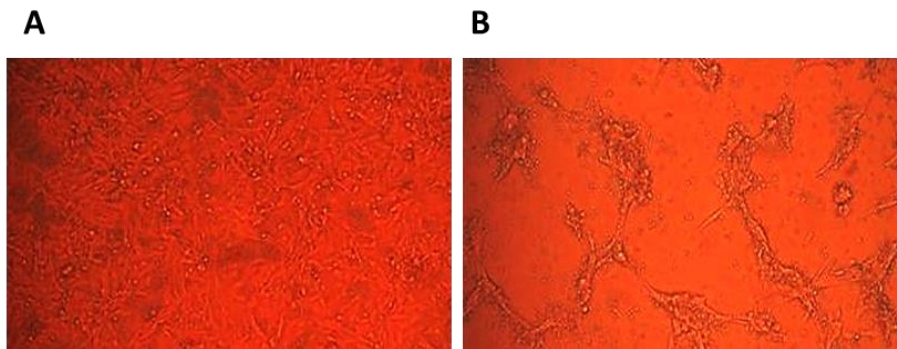


Abbildung 1.7: Induktion von T-Zell-Aktivierung und Abtöten der Tumorzellen (Mikrofotographie)
(A) Sk-Mel63 Tumorzellen mit PBMC ohne r28M Antikörper; (B) Abtöten der Sk-Mel63 Tumorzellen mit PBMC in Gegenwart von Plasma eines transgenen Kalbes (407). Nach [Grosse-Hovest et al., 2004].

Die Lyse der Tumorzelle wurde sowohl durch das Gesamt-Serum, als auch durch den gereinigten Antikörper induziert. In beiden Fällen konnten eine ~90% Abtötung der Tumorzellen bewirkt werden [Grosse-Hovest et al., 2004].

Nachdem das MCSP-Antigen (NG2) auch in Glioblastomzellen exprimiert wird [Dawson et al., 2003], wurde von Grosse-Hovest et al. auch die r28M-Aktivität zur Abtötung der Glioblastomzellen getestet. Die Ergebnisse zeigten ebenfalls eine fast vollständige Abtötung der Tumorzellen [Grosse-Hovest et al., 2005].

Beim Vergleich der pharmakokinetischen Eigenschaften zwischen bi-scFv r28M aus der Zellkultur und gereinigten r28M aus transgenen Tieren, konnten von Grosse-Hovest et al. keine Unterschiede nachgewiesen werden. Die Halbwertszeit des r28M

beider Quellen betrug ~10-12 Stunden, was die Anforderungen für die klinische Anwendung des Antikörpers erfüllt [Grosse-Hovest et al., 2004].

1.2.2.4 Reinigung des r28M aus dem Plasma transgener Rinder

Rekombinante Antikörper werden hauptsächlich über affinitätschromatographische Methoden gereinigt. Die Bindung erfolgt an den Fc-Teilen oder konstanten Regionen der Fab'-Fragmenten durch Protein A oder G [Schmiedel, 2004]. Im Falle des bispezifischen single-chain Antikörpers r28M stehen solche Wechselwirkungsdomänen nicht zur Verfügung. Eine Alternative für die Reinigung des r28M bietet die Protein L Chromatographie. Protein L wird von der anaeroben Spezies *Peptostreptococcus magnus* exprimiert [Björck L., 1988]. Das Protein bindet spezifisch an die variable Domäne der leichten κ -Kette eines Ig [Nilson et al., 1993]. Es konnte von Grosse-Hovest et al. gezeigt werden, dass der r28M sowohl aus dem Zellüberstand [Grosse-Hovest et al., 2003], als auch aus dem Blutplasma transgener Tiere [Grosse-Hovest et al., 2004; Grosse-Hovest et al., 2005] über eine Protein L-Matrix erfolgreich gereinigt werden kann. Ein Problem stellt das Vorhandensein fötalen Kälberserums (FCS) im Zellüberstand- bzw. Plasmaproteine im Blutplasma dar.

Um mehrere Alternativen zur Reinigung des r28M zu schaffen, wurde eine genetische Fusion des rekombinanten Antikörpers an kurze Peptidsequenzen, sogenannte „Tags“, His-Tag [Grosse-Hovest et al., 2003] und c-myc-Tag [Grosse-Hovest et al., 2004], versehen. Diese Tags vermitteln eine spezifische Bindung an die Säulenmaterialien. Der His-Tag ermöglicht eine Anreicherung an immobilisierten Metallen, wie Ni, Co, Zn (Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie IMAC) [Porath, 1992]. Hingegen zeigt der c-myc-Tag spezifische Affinität mit α -c-myc Antikörper (9E10) [Evan et al., 1985], der chemisch an die Sepharose gekoppelt werden kann (Affinitätschromatographie -AC).

1.2.2.5 c-myc-Tag

Der c-myc-Tag ist ein synthetisches Peptid mit einem Molekulargewicht von 1,2 kDa und besteht aus 10 Aminosäureresten des menschlichen c-Myc Proteins (auch Cellular myelocytomatosis Protein, myc proto-oncogene protein oder onco-Protein). Die c-myc Sequenz wurde zum ersten Mal im 1985 als Epitop eines monoklonalen

Einleitung

Maus IgG (Klon 9E10) beschrieben [Evan et al., 1985]. Das c-myc Gen befindet sich im Chromosom 8 der menschlichen Zellen. Es ist ein 230 Kilobasen Gen, welches für ein 439 Aminosäure Protein, das eine wesentliche Rolle in der Regulation des Zellzyklus spielt, kodiert [Cole & McMahon, 1999; Greil et al., 1991].

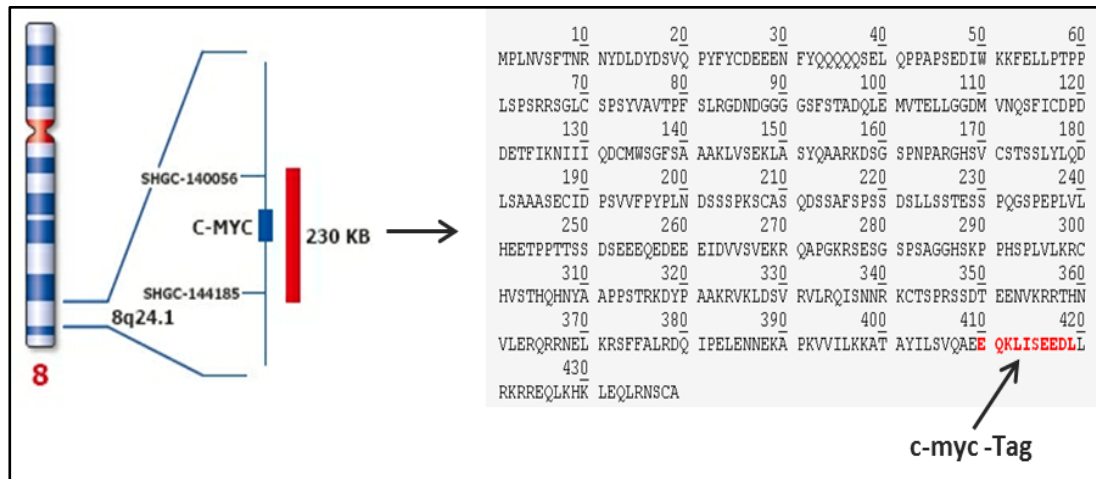


Abbildung 1.8: Darstellung des c-myc Tags und dessen Sequenz.

Das Gen für c-myc Protein befindet sich in Chromosom 8 der menschlichen Zelle. Die Peptidsequenz ist EQKLISEEDL, entsprechend den C-terminalen Aminosäuren (410-419) von menschlichem c-myc-Protein. *Modifiziert nach [Kreathech Diagnostics]*

Die Peptidsequenz ist EQKLISEEDL, entsprechend den C-terminalen Aminosäuren (410-419) des menschlichen c-myc-Proteins (Abbildung 1.8 rot markiert). Der c-myc-tag ist ein leistungsfähiges Werkzeug in Proteinlokalisierung, Immunchemie (ELISA) oder Proteinreinigung [Hilpert et al., 2001].

1.2.2.6 Detektion und Reinigung des r28M via α -c-myc Antikörper (9E10)

Der 9E10 ist ein monoklonaler Maus-Antikörper, der zum ersten Mal im 1985 gegen das c-myc-Epitop (EQKLISEEDL) isoliert wurde [Evan et al., 1985]. Er kann in einer Vielzahl biochemischer und immunologischer Assays wie c-myc-Peptid-basierte Reinigungsverfahren, ELISA, Western-blot, Flow Cytometrie oder Diagnostik eingesetzt werden. Die Herstellung des monoklonalen Antikörpers 9E10 wird heutzutage ohne Qualitätsverlust in Maus Hybridom-Zelllinien durchgeführt [Hillman et al., 2001; Fuchs et al., 1997].

Einleitung

Wie oben schon erwähnt, wurde der single-chain Antikörper r28M am C-terminalen Ende bzw. am α -MCSP Arm mit einem c-myc-Tag versehen [Grosse-Hovest et al., 2004]. Das getaggte Peptid bindet spezifisch an die Paratope des 9E10 Antikörpers (Abbildung 1.9) und ermöglicht somit die Detektion des r28M Antikörpers bzw. die Reinigung aus Blutplasma transgener Tieren.

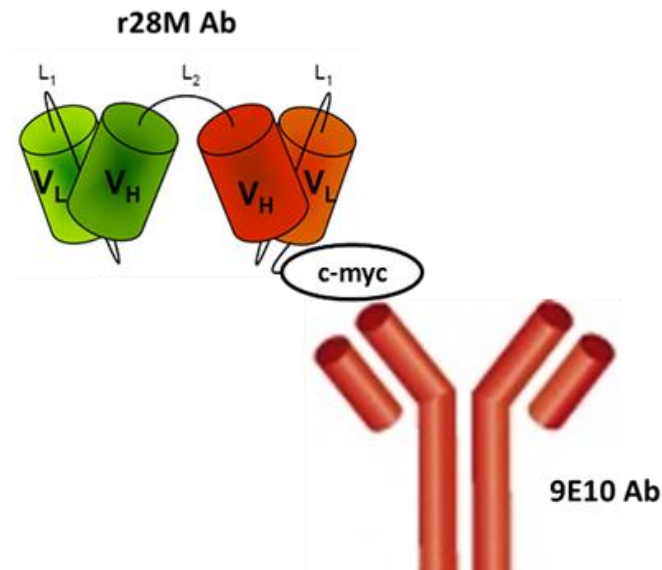


Abbildung 1.9: Detektion und Reinigung des r28M via monoklonale α -c-myc Antikörper (9E10). Paratope des 9E10 Antikörpers binden spezifisch an die myc-Tag-Sequenz (EQKLISEEDL)

Detektion des r28M über 9E10 Antikörper (ELISA) kann entweder direkt oder indirekt durchgeführt werden. Die direkte Detektion kann durch chemische Kopplung des 9E10 Antikörpers mit einem Enzym (HRP Meerrettichperoxidase), welches einen Substrat (TMB Tetramethylbenzidin) umsetzt, durchgeführt werden. Hingegen kann die indirekte Detektion durch Verwendung eines sekundären Antikörpers (Enzym-markierten Kaninchen- α -Fc-Maus Antikörper), der spezifisch an Fc-Fragmente des 9E10 Antikörpers bindet, durchgeführt werden.

Zur Reinigung des r28M wird der 9E10 Antikörper über seine primäre Aminogruppe an eine NHS-aktivierte Sepharose kovalent gebunden (Affinitätschromatographie). Die Affinitätsreinigung des r28M über α -c-myc Antikörper sollte zur guten Ergebnissen führen, da die Bindungsstärke der 9E10 Antikörper zum 10-mer myc-Tag-Peptid (EQKLISEEDL) sehr stabil ist [Hilpert et al., 2001].

Zielsetzung

Rekombinante bispezifische Antikörper stellen in den letzten Jahren potentielle Kandidaten für Antikörper-basierte Therapeutika dar. Grosse-Hovest et al. gelang es 2003 erstmalig, mit einem rekombinanten bispezifischen single-chain Antikörper (r28M), eine Zielzell-restringierte supra-agonistische T-Zellaktivierung und Lyse der Melanomzellen zu zeigen. Das Melanom ist eine maligne Erkrankung, für die eine Antikörpertherapie mit bi-scFv r28M vielversprechend ist. Dennoch stellen die Reinigung und Charakterisierung des r28M Antikörpers weiterhin ein großes Problem dar. Das Ziel dieser Arbeit war es, für den r28M Antikörper eine neue Reinigungs- und Detektionsmethode, die alternativ zur bisher verwendeten Methode (Protein L) eingesetzt werden kann, zu entwickeln und zu optimieren.

Basierend auf den Arbeiten von Evan et al., 1985, in welchen die spezifische Bindung des 9E10 Antikörpers an die c-myc-Sequenz (EQKLISEEDL) beschrieben wird, sollte im Rahmen dieser Arbeit ein monoklonaler α -c-myc-Antikörper, der in der Hybridomzelllinie (9E10) hergestellt wird, in verschiedenen Varianten eingesetzt werden, um r28M im Plasma transgener Rinden zu detektieren bzw. aus dem Plasma zu reinigen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine c-myc-basierte Affinitätschromatographie für die Reinigung des r28M aus dem Blutplasma transgener Tieren entwickelt werden. Dabei sollte der 9E10 Antikörper an eine Sepharose-Matrix gekoppelt werden. Weiters sollte für die Detektion des r28M ein α -c-myc ELISA sowohl in kompetitivem, als auch im Sandwich-Format entwickelt werden und die Reproduzierbarkeit der Assays getestet, sowie vergleichende Ergebnisse mit dem Protein L-Assay dargestellt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank	Memmert
Elektrophorese-Apparatur Power pac 300	Bio-Rad
Elektropipette	Thermo scientific
ELISA-Plattenlesegerät Epoch reader	Bio Tek
FPLC ÄKTA	GE Healthcare
Fraktionskollektor FRAC-900	GE Healthcare
Feinwaage	Sartorius
Heizblock QBT4	Grant
Magnetrührer L34	LAB-inco
Mikropipette Lambda (5,200 und 1000 µl)	Corning
Multikanalpipette 300µl	Eppendorf
Peristaltikpumpe	GE Healthcare
pH-Messgerät WTW	InoLab
Schüttler Rocker 25	Labnet
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf
Tischwaage PLS	Kern & Sohn
Thermomixer 5436	Eppendorf
Vortexer peq TWIST	PeqLab Biotechnologie
Western-Blot-Apparatur	Bio-Rad
Zentrifuge Avanti J-26 XP	Beckman coulter

2.1.2 Glas und Plastikwaren

Bezeichnung	Hersteller
AMICON ultra 0,5 centrifugal filter 3kDa	Sigma-Aldrich
Bechergläser Glas	Schott
Bechergläser Plastik	Vitlab
Desalting Columns	Pierce
Einmalpipetten Plastik 5 ml, 10 ml, 25 ml	Becton-Dickinson
Erlenmeyerkolben Simax 500 ml, 1l	Bohemia Cristal
Glasflaschen 50 ml, 250 ml, 500 ml, 1 l, 2 l	Schott
Glaspipetten 1 ml, 5 ml, 10 ml	Fortuna
Messzylinder Plastik 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1 l	Vitlab
NC Membrane	Lactan
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Greiner Bio-one
PP-Röhrchen Falcon 15 ml, 50 ml	Sarstedt
Parafilm® "M"	American National Can™
UV Star 96 well Microplatte F-Form	Greiner bio-one
Vivaspin 20	Sartorius
ZEBA desalt spin columns	Thermo scientific
96-well Microtiterplatte Immuno™-Plate MaxiSorp™ Surface	Nunc
96-well Microtiterplatte non- binding for BCA	Greiner bio-one

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Acrylamid/Bis 37,5:1, 30%	Applichem
Agarose (Top Vision)	Fermentas
Ammonium Hydrogen Carbonate	Applichem
Ammoniumacetat	Applichem
Ammoniumpersulfat	Applichem
Ammoniumsulfat	Applichem
beta-Mercaptoethanol	Sigma
Bis-Tris (Bis(2-hydroxyethyl)amino- tris(hydroxymethyl)methan)	Applichem
Bovine Serum Albumine	Sigma-Aldrich
Bovine Serum Albumine Fraction V	PAA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid getrocknet	Applichem
Coomassie Brilliant Blue G 250	Serva
Di-Natriumhydrogenphosphat	Applichem
Dithiothreitol	Pierce
Essigsäure, 100%	Merck
Ethanol	Merck
Ethylendiamintetraacidacid	Applichem
Glutardialdehyd 50%	Lactan
Glycerol/Glycerin	Lactan
Glycin	Applichem
Methanol	Merck
Milchpulver for Westernblot	Roth
Natriumchlorid	Applichem
Natriumdeoxycholot	Applichem
Natrium-di-Hydrogenphosphat	Applichem
Natriumhydrogencarbonat	Applichem

Material und Methoden

Natrium-Thiosulfat pentahydrat	Appllichem
Natronlauge 1 M	Merck
Natronlauge, Plätzchen	Merck
Natroumborhydrid	Roth
PBS 0,1 M/0,15M NaCl (Phosphate buffered Saline)	Pierce
Polyvinylalkohol 2000	Appllichem
Salzsäure 1 M	Merck
Salzsäure 37% rauchend	Merck
Silbernitrat	Appllichem
Sodium Dodecylsulfat	Appllichem
Sodium Hydroxid	Appllichem
Tetramethylethyldiamin	Appllichem
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	Appllichem
Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane)	Appllichem
Tween20	Appllichem
Wasserstoffperoxid 30 %	Appllichem

2.1.4 Antikörper

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Antikörper (sowohl kommerziell erhältlich auch selbsthergestellte) aus verschiedenen Spezies und unterschiedliche Spezifitäten verwendet (siehe Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Liste der verwendeten Antikörper

Bezeichnung	Spezifität	Klonalität	Spezies	Hersteller
α -Maus IgG	Murines IgG, H+L-spezifisch	Polyklonal	Ziege	Jackson IR
α -Maus IgG	Murines IgG, F(ab') ₂ -spezifisch	Polyklonal	Ziege	Sigma-Aldrich
α -Maus IgG HRP	Murines IgG, H+L-spezifisch	Polyklonal	Ziege	Sigma-Aldrich
α -Kaninchen IgG HRP	Murines IgG, (gesamtmolekül)	Polyklonal	Ziege	Sigma-Aldrich
α -c-myc-Tag	c-myc-Tag	Polyklonal	Kaninchen	Antibodies-online
α -c-myc-Tag	c-myc-Tag	Monoklonal	Maus	CDIIT, Wien
α -c-myc-Tag HRP	c-myc-Tag	Monoklonal	Maus	Invitrogen
α -BSA HRP	BSA	Polyklonal	Schaf	Icllab

2.1.5 Verwendete Plasmaproben

In dieser Arbeit wurden folgende Rinderplasma zur Reinigung bzw. Detektion des r28M Antikörpers verwendet. Die Blutabnahme bei den Rinden wurde von der Firma Agrobiogen, Deutschland durchgeführt.

Tabelle 2.2: Liste der verwendeten Plasmaproben

Tiernummer	Datum der Blutabnahme
#020	05.08.2011
#234	20.09.2011
#236	16.03.2011
#335	02.09.2010
#408	02.09.2010
#536	02.09.2010

2.1.6 Standardproteine

Tabelle 2.3: Liste der verwendeten Standardproteine

Bezeichnung	Standard	Herstellung
GST-cmyc	c-myc	Thermo scientific
c-myc Peptid	c-myc	Sigma-Aldrich
FB11PAKT01	r28M	Bibitec
FB11PAKT06	r28M	Bibitec
Monomer	r28M	Bibitec
Dimer	r28M	Bibitec
Aggregat	r28M	Bibitec
11CDL02	r28M	CDIIT
12CDL02	r28M	CDIIT
12CDL08	r28M	CDIIT
12CDL12	r28M	CDIIT

2.1.7 Zusätzliche Materialien

Protein-Marker

Native Mark unstained Protein Standard	Invitrogen
Native MW Standard Proteins	Serva
Novex sharp prestained Protein Standard	Invitrogen
Page Ruler, prestained	Fermentas
Page ruler, unstained	Fermentas

Material und Methoden

Diverse

HiTrap NSH-activated Sepharose 1 ml	GE Healthcare
Pierce BCA Protein Assay Kit	Pierce
Protein L HRP	Invitrogen

2.1.8 Puffer

ELISA

Bindungspuffer	0,1 M NaHCO ₃ , pH 9
Blockierungslösung	2% BSA / 2% PVA
Assaypuffer	0,05% Tween20 in 1 x PBS
Entwicklungslösung	TMB Peroxidase Substrat in Peroxidaselösung (H ₂ O ₂), 1:1
Stopplösung	1 M H ₃ PO ₄ , pH < 2

SDS-PAGE

Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
30% Akrylamid/Bis	Akrylamid/Bis-Lösung (29 : 1 / 37,5 : 1)
10% APS	100 µg in 1 ml ddH ₂ O
5 x Ladepuffer nicht-reduzierend	100 mg SDS, 0,5 ml 0,5 M Tris/HCl pH 6,8, 0,3 mL glycerol 0,2% Bromphenolblau mit ddH ₂ O auf 2 mL
5 x Ladepuffer reduzierend	12% β-ME oder 800 mM DTT in 5 x Ladepuffer
10 x Laufpuffer	30,9 g Tris, 144,13 g Glycine 10 g SDS mit ddH ₂ O auf 1 l

Material und Methoden

Silberfärbung

Fixierlösung	50% MeOH, 5% Essigsäure
Waschpuffer	50% MeOH
Vorbereitungspuffer	0,02% Na ₂ S ₂ O ₃ in ddH ₂ O
Färbungslösung	0,2% AgNO ₃ + 0,02% Formaldehyd in ddH ₂ O
Entwicklungslösung	0,05% formaldehyde in 3% Na ₂ CO ₃ in ddH ₂ O
Stopplösung	5% acetic acid

Western-Blot

5 x Transferpuffer	15 g Tris, 72 g Glycine 1:5 verd. und 20% MeOH zugeben
Blockierungslösung	1 x PBS + 0,05% Tween20 2% BSA
Waschpuffer	1 x PBS + 0,05% Tween20
Vorbereitungspuffer	0,01 M Tris-HCl, pH 6
Substratpuffer	0,15 M Essigsäure, pH 5 (mit NaOH)
Substratreagenz	24 mg TMB + 80 mg DOSS gelöst in 10 ml EtOH
Substratlösung	Substratreagenz 1:4 in Substratpuffer + 5 µl H ₂ O ₂ /10 ml

Affinitätschromatographie

Kopplungspuffer	0,2 M NaHCO ₃ + 0,5 M NaCl, pH 8,3
Blockpuffer	0,5 M Ethanolamine + 0,5 M NaCl, pH 8,3
Waschpuffer	0,1 M Natriumacetat + 0,5 M NaCl, pH 4
Bindungspuffer	20 mM Na ₂ HPO ₄ + 0,1 M NaCl, pH 7,2
Elutionspuffer	0,1 M Natriumcitrat, pH 3

2.2 Methoden

2.2.1 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie wurde seit 1968 als Reinigungsmethode für Enzyme eingesetzt [Cuatrecasas et al., 1968]. Sie beruht auf der spezifischen und reversiblen Wechselwirkung zwischen Antikörper und Antigen. Zur Durchführung der Affinitätschromatographie müssen die gegen den Zielanalyten gerichteten Antikörper an eine feste Matrix immobilisiert werden [Yarmush et al., 1992]. Dabei ist es wichtig, dass zwischen aktivierter Matrix und Antikörper eine feste kovalente Bindung besteht, die die spezifische Bindungscharakteristik des Liganden nicht beeinflusst [O'Shannessy et al., 1990; Narayanan et al., 1994; Hage, 1999].

Wie bei jeder Chromatographie gibt es auch hier eine stationäre und eine Mobile Phase [GE Healthcare Bio-Sciences, 2007]. Die stationäre Phase besteht aus Matrix, Abstandhalter und Ligand (oft ein Antikörper). Die mobile Phase wird so gewählt, dass die Komponenten mit selektiver Affinität zum Liganden zurückgehalten, während Begleitsubstanzen sofort eluiert werden. Durch Veränderung z.B. des pH-Wertes kann anschließend die gebundene Substanz in reiner Form von der stationären Phase eluiert werden [Silva, 2004; Cuatrecasas, 1968; Cutler, 2004].

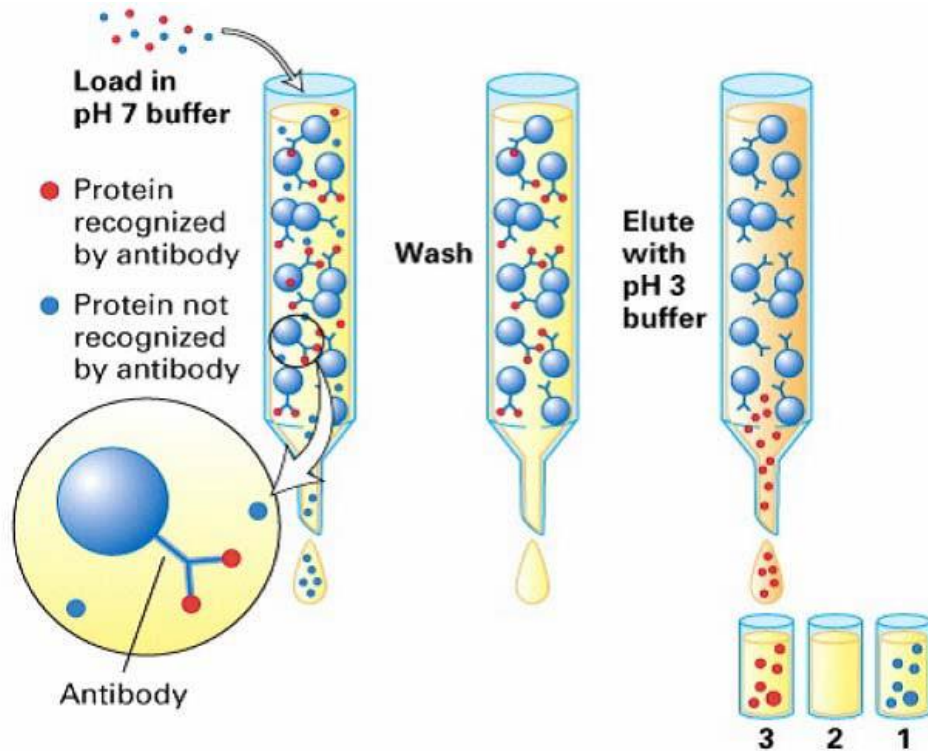


Abbildung 2.1 Prinzip der Affinitätschromatographie

Ligand ist kovalent an eine Matrix gebunden. Nur die Moleküle, die eine spezifische Bindungsstelle für den Ligand besitzen, binden mit hoher Affinität an Matrix. Nach erfolgter spezifischer Adsorption werden alle Moleküle, die keine Affinität zum Ligand besitzen, aus der Matrix ausgewaschen. Die spezifische Disorption des gebundenen Moleküls erlaubt einen neuerlichen Einsatz der Affinitätsmatrix. Nach [Analytical Chemistry, Department of Chemistry, University of Konstanz]

2.2.2 Reinigung des r28M Antikörpers via α -c-myc Affinitätschromatographie

Die Reinigung des r28M Antikörpers erfolgte mittels Affinitätschromatographie über eine α -c-myc-gekoppelte Matrix mit 1 ml Säulenvolumen.

2.2.2.1 Kopplung des Liganden (9E10)

Der immobilisierte Ligand ist der entscheidende Faktor, der den Erfolg jeder affinitätschromatographischen Methode bestimmt. Der 9E10 Antikörper wurde aus Hybridomzelllinie in Christian Doppler Labor hergestellt und gereinigt. Die Kopplung der Liganden an NHS aktivierte Sepharose (GE Healthcare) erfolgte über primäre Amino-Gruppen des Antikörpers (siehe Abbildung 2.2). Der monoklonale Antikörper verfügt an seine Oberfläche mehrere Lysinreste, die jedoch unterschiedlich leicht zugänglich sind. Daher ist es recht unwahrscheinlich, dass in Konkurrenz terminale Aminogruppen als reaktive Ankergruppen fungieren und

unerwünschte Kopf-Orientierung des Antikörpers an der Trägermatrix verursachen [Schulz-Jander, 1999].

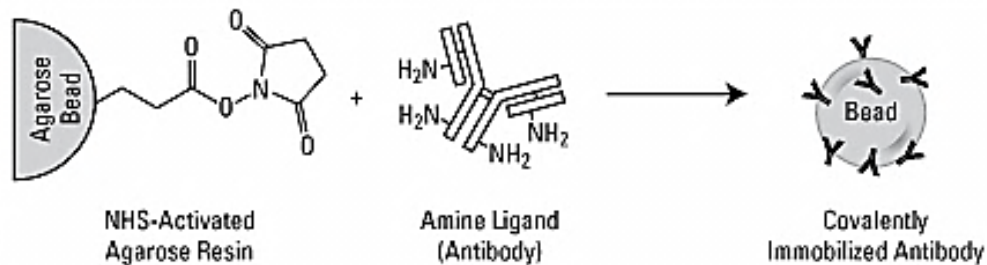


Abbildung 2.2: Kopplung des Liganden an NSH-aktivierte Sepharose

Die kovalente Kopplung des Liganden mit der Trägermatrix bzw. deren aktiven Oberflächen passiert meist über eine Aminogruppe an den Antikörper, der wiederum am günstigen über seine primären Aminogruppen der Lysinreste gebunden wird. Nach [GE Healthcare affinity chromatography handbook].

2.2.2.1.1 Praktische Durchführung

Durch Waschen mit 6 ml eiskalter 1 mM HCl Lösung wurde das Isopropanol aus der Säule entfernt. Es wurden 3 ml Ligand mit einer Konzentration 2,5 mg/ml (in Kopplungspuffer 0,2 M NaHCO_3 + 0,5 M NaCl, pH 8,3 verdünnt) auf die Säule aufgetragen. Die Ligandlösung wurde mittels peristaltischer Pumpe mit einer Flussrate von 0,3 ml/min durch die Säule 1 h zirkuliert. Das Absättigen freier reaktiver Gruppen wurde durch injizieren von je 6 ml Ethanolamin \rightarrow Natriumacetat \rightarrow Ethanolamin durchgeführt. Nach 20 min Inkubation erfolgte der zweite Sättigungsschritt durch injizieren von je 6 ml Natriumacetat \rightarrow Ethanolamin \rightarrow Natriumacetat. Nach dem blocken wurde die Säule durch Zugabe von 3 ml PBS pH 7,2 äquilibriert.

2.2.2.2 Reinigung des r28M Antikörpers

Die Säule wurde mit je 3 ml Bindungspuffer bzw. Elutionspuffer vorbereitet. Dann mit 10 ml Bindungspuffer äquilibriert. Das zentrifugierte und gefilterte Antikörperhaltige Rinderplasma wurde mit Bindungspuffer (20 mM Na_2HPO_4 + 0,1 M NaCl) auf pH 7 eingestellt und anschließend mit einer Flussrate von 0,3 ml/min auf die Säule aufgetragen. Vor der Elution des gebundenen Antikörpers wurde die Säule mit Bindungspuffer gewaschen um alle unspezifisch gebundenen Proteine zu entfernen. Die Elution des gebundenen Antikörpers erfolgte mittels Elutionspuffer (0,1 M

Natriumcitrat, pH 3). Schließlich wurde die Säule mit 10 ml Bindungspuffer reäquilibriert.

2.2.3 ELISA (Enzyme-Linked-ImmunoSorbent Assay)

ELISA (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest) ist der am häufigsten angewendete quantitative Immunassay. Die Methode wurde zum ersten Mal 1971 beschrieben [Engvall et al., 1971; Avrameas et al., 1971]. Sie beruht auf einer enzymatischen Farbreaktion. Ein Enzym z.B. Meerrettichperoxidase (HRP) ist mit dem Antikörper oder dem Antigen chemisch verknüpft und setzt das Substrat z.B. Tetramethylbenzidine (TMB) um. Die meisten Assays werden in Mikrotiterplatten (MTP) durchgeführt, deren modifizierte Oberfläche die Analyten unspezifisch, aber relativ fest binden. Die freibleibenden bzw. aktiven Bindungsstellen auf der Platte werden mittels einer Blockierungslösung (Bsp. BSA) gesättigt. Da der Antikörper eine spezifische Wechselwirkung mit seinem Analyten ausbildet, bleibt nur der Analyt-Antikörper-Komplex auf dem Trägermaterial gebunden, während ungebundenen Komponenten in Waschschrinen entfernt werden [Raem, 2007]. Weiters wird ein zweiter enzymmarkierter Antikörper zugesetzt und abschließend Enzymsubstrat [Aigner, 1997]. Die Analyt-Antikörper-Bindung wird mithilfe der enzymatischen Reaktion quantifiziert. Deren Substratumsatz wird kolorimetrisch detektiert und ist proportional zur Menge des gebundenen Analyten [Raem, 2007].

2.2.3.1 Detektion des r28M Antikörpers mittels Sandwich ELISA

Zur Bestimmung des r28M Antikörpers in Rinderplasma wurden in dieser Arbeit ein α -c-myc- sowie ein Protein L Sandwich ELISA eingesetzt. Der Sandwich ELISA erlaubt sowohl die Detektion als auch die Quantifizierung des Antigens. Sandwich, weil der Analyt zwischen zwei Antikörpern liegt und detektiert wird. Der Analyt muss zwei Epitope besitzen, um im Sandwich ELISA detektiert werden zu können.

2.2.3.1.1 Aufbauprinzip des α -c-myc ELISA

Für das Verfahren des α -c-myc Sandwich ELISA benötigt man 96 Well-MTP, die speziell behandelt sind um den Capture-Antikörper zu adsorbieren. Nach Zugabe der Probe bindet zunächst der r28M Antikörper spezifisch an den Capture-Antikörper.

Material und Methoden

Der Überstand wird entfernt und die Platte gewaschen. Der Waschschrift ist nötig um die nicht oder unspezifisch gebundenen Antigene zu entfernen und eine falsch positive Reaktion zu verhindern. Im Anschluss wird ein primärer Antikörper gegen das c-myc hinzugefügt. Weiters wird ein sekundärer Antikörper, an welchen ein HRP Enzym gekoppelt ist, hinzugefügt. Je nach Menge des gebundenen r28M bindet eine entsprechende Menge des sekundären Antikörpers. Das gebundene HRP Enzym setzt TMB Substrat um, so dass eine Farbentwicklung stattfindet. Die Enzymaktivität ist direkt proportional zur Menge des gebundenen r28M Antikörpers.

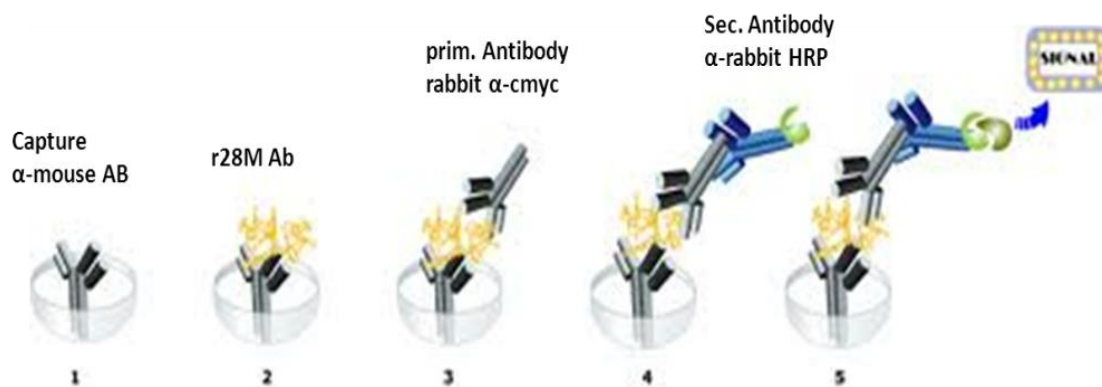


Abbildung 2.3: Aufbauprinzip eines α -c-myc Sandwich ELISA. (1) Capture-Antikörper, an den Boden der MTP gebunden; (2) Zugabe der Probe und Inkubation; (3) Zugabe des Detektions-Antikörpers; (4) Zugabe und Komplexbildung des enzyme-linked Antikörper-Antigen-Antikörper; (5) Zugabe des TMB-Substrats, das zu einem nachweisbaren Reaktionsprodukt umgesetzt wird. *Modifiziert nach [GenWay Biotech, Inc.].*

2.2.3.1.2 Praktische Durchführung

In einer MTP wurden je 50 μ l eines Ziege α -Maus F(ab')₂ Coating-Antikörpers in einer Konzentration von 5 μ g/ml (in NaHCO₃-Puffer pH9 verdünnt) in jedes well pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Der nicht gebundene Antikörper wurde durch Entleeren und einmaliges Waschen der MTP entfernt. Nach Sättigung des Plattenbodens mit 200 μ l Blockierungslösung (1,5 h, RT), wurde das r28M enthaltende Plasma in einem Volumen von 50 μ l per well zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei RT. Dann wurden 50 μ l eines Kaninchen α -c-myc Antikörpers in einer Konzentration von 0,5 μ g/ml (mit Assaypuffer verdünnt) zugegeben. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei RT wurden je 50 μ l Ziege- α -Kaninchen HRP-konjugierter Antikörper (mit Assaypuffer verdünnt) zugefügt und für 1 h bei RT inkubiert. Nach jedem Inkubationsschritt wurde die Platte 3-5 Mal gewaschen.

Material und Methoden

Anschließend wurden je 100 µl TMB Substrat zugegeben und bis zu 30 Minuten bei RT (im Dunkeln) inkubiert. In weiterer Folge wurde die Farbbildung beobachtet und die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 1 M H₃PO₄ per well abgestoppt. Schließlich wurde die Platte bei OD 450 nm im ELISA-Reader gemessen.

2.2.3.1.3 Bedingungen für den α -c-myc Sandwich ELISA

In der Tabelle 2.4 sind die Bedingungen für den α -c-myc Sandwich ELISA.

- Coating-Antikörper: Ziege- α -Maus F(ab')₂ (Sigma) 2 mg/ml
- Blocken: BSA
- Standard: 11CDL02 (CDIIT) 2,2 mg/ml
- Primär Antikörper: Kaninchen- α -c-myc (Antibodies online) 0,5 mg/ml
- Sekundär Antikörper: Ziege- α -Kaninchen HRP (Sigma) 0,7 mg/ml

Tabelle 2.4: Bedingungen eines α -c-myc ELISA

Parameter	Verd./Konz./%	Inkubation	Temperatur
Coating	1:2000 (1 µg/ml)	über Nacht	4°C
Blocken	2%	2 Stunden	RT
Standard	max. 5 µg/ml →1:4	1,5 Stunden	RT
Primär Antikörper	1:1000 (0,5µg/ml)	1 Stunde	RT
Sekundär Antikörper	1:5000 (0,14 µg/ml)	1 Stunde	RT
TMB-Substrat	1:2	~10 min.	RT (im Dunkeln)

2.2.3.1.4 Aufbauprinzip und Durchführung des Protein L ELISA

Das Aufbauprinzip des Protein L ELISA erfolgte ohne wesentlichen Unterschied zum α -c-myc Sandwich ELISA. Beim Protein L ELISA wurde als Coating-Antikörper Ziege α -Maus IgG verwendet. Zur Detektion des r28M wurde das HRP-konjugiertes Protein L eingesetzt. Alle anderen Schritte des Protein L ELISA wurden ident mit dem α -c-myc Sandwich ELISA durchführt (siehe 2.2.3.1.2).

2.2.3.1.5 Bedingungen für den Protein L ELISA

In der Tabelle Tabelle 2.5 sind die Bedingungen für den Protein L Sandwich ELISA.

- Coating-Antikörper: Ziege- α -Maus IgG (Jackson) 1,8 mg/ml
- Blocken: BSA
- Standard: 11CDL02 (CDIIT) 2,2 mg/ml

Material und Methoden

- Detektion: Protein L 0,5 mg/ml

Tabelle 2.5: Bedingungen für den Protein L ELISA

Parameter	Verd./Konz./%	Inkubation	Temperatur
Coating	1:800 (2,2 µg/ml)	über Nacht	4°C
Blocken	2%	2 Stunden	RT
Standard	max. 0,05 µg/ml →1:2	1,5 Stunden	RT
Detektion	1:10000	1 Stunde	RT
TMB-Substrat	1:2	~10 min.	RT (im Dunkeln)

2.2.3.2 Detektion des r28M Antikörpers mittels kompetitiven ELISA

Beim kompetitiven ELISA wird das Antigen auf der Oberfläche einer MTP gecoatet. Die überschüssigen Antigene werden durch einen Waschschrift entfernt und die aktiven Stellen der MTP mit einer Blockierungslösung gesättigt. Anschließend wird die Probe mit dem zu bestimmenden Antigen und einer definierten Menge Detektions-Antikörper inkubiert. In diesem Schritt findet eine Konkurrenz zwischen freiem und gebundenem Antigen um die Bindungsstellen am Detektions-Antikörper statt. Je mehr freies Antigen in der Probe vorhanden ist, desto weniger Antikörper bindet an die gebundenen Antigene auf der Platte. Im Anschluss wird ein enzymgekoppelter Sekundärantikörper, der gegen den konstanten Fc Teil des im kompetitiven Schritt eingesetzten Antikörpers gerichtet ist, zugegeben. Das gekoppelte Enzym setzt das Substrat um und damit wird ein Farbsignal erzeugt, dessen Intensität umgekehrt proportional zur Menge des Antigens aus der Probe ist [Raem, 2007; Luttmann, 2004].

2.2.3.2.1 Aufbauprinzip des α -c-myc kompetitiven ELISA

Ein c-myc-Antigen ist mittels BSA als Trägerprotein an die MTP gecoatet. Das gebundene c-myc konkurriert mit gelöstem c-Myc-Peptid im Standard bzw. Analyt (r28M) um freie Bindungsstellen an, im selben Inkubationsschritt zugesetzten, α -c-myc-Antikörper. Antikörper, der an freies c-myc bindet, wird beim Waschschrift entfernt, während der an gecoatetes c-myc gebundene Antikörper von einem HRP-konjugierten Antikörper detektiert wird. Die Platte muss nach jedem Inkubationsschritt gewaschen werden. Abschließend wird das TMB Substrat, das durch HRP-Enzym umgesetzt wird, zugegeben und die Platte bei 450 nm gemessen.

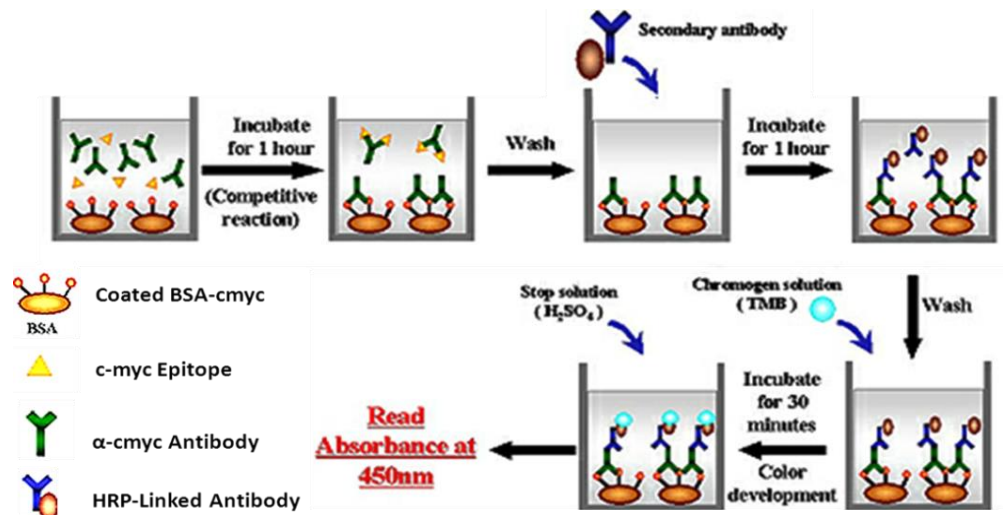


Abbildung 2.4: Prinzip eines kompetitiven α-c-myc ELISA

Coating-Antigen (BSA-c-myc Konjugat) wird an den Boden der MTP gebunden; Die Probe und Detektions- Antikörper werden gleichzeitig zugegeben (1 h inkubiert); Weiters wird ein Enzym-markierter Antikörper zugegeben (1 h inkubiert); Anschließend wird das TMB-Substrats, das zu einem nachweisbaren Reaktionsprodukt umgesetzt wird, zugegeben; Abschließend wird die MTP bei 450 nm gemessen.

2.2.3.2.2 Praktische Durchführung

Die MTP wurde mit je 100 µl eines BSA-c-myc-Konjugats in einer Konzentration von 5 µg/ml (in NaHCO₃-Puffer pH9 verdünnt) gecoatet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die nicht gebundenen Konjugate wurden durch Entleeren der MTP entfernt. Nach Sättigung des Plattenbodens mit 200 µl Blockierungslösung (1,5 h, RT) wurde der c-myc Standard (30 µg/ml) bzw. c-myc (r28M) enthaltende Plasma (unverdünnt) in einem Volumen von 50 µl per well zugegeben. Unmittelbar darauf wurden 50 µl eines α-c-myc Antikörpers mit einer Konzentration von 0,6 µg/ml zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 1 h unter ständigem Schütteln bei RT. Die MTP wurde nach jedem Inkubationsschritt 3-5 Mal gewaschen. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei RT wurden je 100 µl TMB Substrat zugegeben und bis 30 Minuten bei RT (im Dunkeln) inkubiert. Infolge wurde die Farbbildung beobachtet und die Reaktion durch Zugabe von 50 µl Stopplösung (1 M H₃PO₄) per well abgestoppt. Schließlich wurde die Platte bei OD 450 nm im ELISA-Reader gemessen.

2.2.3.2.3 Bedingungen für den kompetitiven α-c-myc ELISA

In der Tabelle 2.6 sind die Bedingungen für den kompetitiven α-c-myc ELISA (detektiert mit Kaninchen-α-c-myc Antikörper) beschrieben.

Material und Methoden

- Coating-Antigen: c-myc-BSA-Konjugate (CDIIT) 7,5 mg/ml
- Blocken: BSA
- Standard: c-myc Peptid (Sigma) 2,2 mg/ml
- Primär Antikörper: Kaninchen- α -c-myc (Antibodies online) 0,5 mg/ml
- Sekundär Antikörper: Ziege- α -Kaninchen HRP (Sigma) 0,7 mg/ml

Tabelle 2.6: Bedingungen für kompetitiven ELISA

Parameter	Verd./Konz./%	Inkubation	Temperatur
Coating	1:150000 (0,05 μ g/ml)	über Nacht	4°C
Blocken	2%	2 Stunden	RT
Standard	max. 20 μ g/ml \rightarrow 1:3	1 Stunde	RT
Primär Antikörper	1:1000 (0,5 μ g/ml)	1 Stunde	RT
Sekundär Antikörper	1:5000 (0,14 μ g/ml)	1 Stunde	RT
TMB-Substrat	1:2	~10 min.	RT (im Dunkeln)

2.2.3.2.4 Optimierte Bedingungen für den kompetitiven α -c-myc ELISA

In der Tabelle 2.7 sind die optimierten Bedingungen für α -c-myc kompetitiven ELISA (detektiert mit Maus- α -c-myc Antikörper) beschrieben.

- Coating-Antikörper: c-myc-BSA-Konjugate (CDIIT) 7,5 mg/ml
- Blocken: BSA
- Standard: c-myc Peptid (Sigma) 2,2 mg/ml
- Detektions-Antikörper: Maus- α -c-myc (Invitrogen) 1,6 mg/ml

Tabelle 2.7: Optimierte Bedingungen für α -cmyc kompetitiven ELISA

Parameter	Verd./Konz./%	Inkubation	Temperatur
Coating	1:1500 (5 μ g/ml)	über Nacht	4°C
Blocken	2%	2 Stunden	RT
Standard	max. 30 μ g/ml \rightarrow 1:3	1 Stunde	RT
Detektion	1:3000 (0,6 μ g/ml)	1 Stunde	RT
TMB-Substrat	1:2	~10 min.	RT (im Dunkeln)

2.2.4 Kopplung des c-myc Peptides über Glutaraldehyd an BSA

Um in der MTP fixiert und gleichzeitig von einem Antikörper gebunden werden zu können, müssen Peptide an so genannte Trägerproteine gekoppelt werden. Keyhole

Material und Methoden

Limpet Hemocyanin (KLH) und Bovine Serum Albumin (BSA) sind zwei Trägerproteine, die häufig für die Peptidkonjugation verwendet werden [Walker, 1984]. Glutaraldehyd ist ein cross-linker, der eine Quervernetzung zwischen Proteinen bewirkt. Aminosäuren besitzen zwei reaktive Gruppen: eine Carboxylgruppe und eine Aminogruppe. Glutaraldehyd ist ein Homo-bifunktionelles Reagenz, das in einer wässrigen Lösung spezifisch mit primären Aminogruppen der Lysinreste reagiert, sodass eine stabile kovalente Bindung zwischen Protein und Peptid entsteht (siehe Abbildung 2.5) [Lateef et al., 2007; Cheung et al., 1982; Wiechelman, 1988].

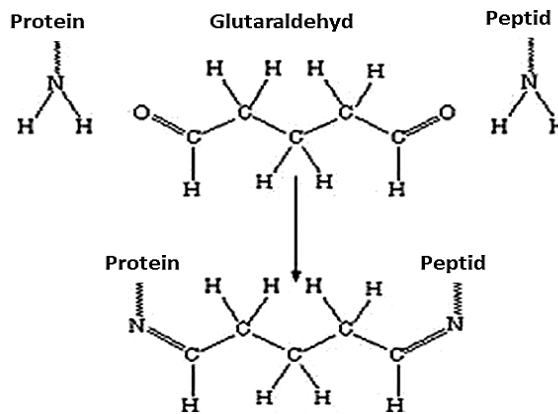


Abbildung 2.5: Mechanismus der Glutaraldehyd-Kopplung
Das Glutaraldehyd in einer wässrigen Lösung reagiert spezifisch mit primären Aminogruppen der Lysinreste, sodass eine kovalente Bindung zwischen vorhandenen Proteinen entsteht.

2.2.4.1 Praktische Durchführung

In dieser Arbeit wurde das c-myc Peptid über Glutaraldehyd an BSA gekoppelt. Pro Milligramm Peptid wurde ein Milligramm BSA eingesetzt. Das Peptid wurde zusammen mit dem BSA in einem Milliliter PBS pH 7,2 auf Eis gelöst. Das entsprechend gleiche Volumen einer frisch angesetzten 2,5% Glutaraldehydlösung in PBS wurde tropfenweise zugegeben. Die Mischung wurde mindestens eine Stunde auf Eis gerührt. Die Reaktion wurde durch langsame Zugabe von 10 mg Natriumborhydrit pro Milligramm Peptid und einstündiges Rühren gestoppt. Die nicht gebundenen Peptide wurden durch einen Millipore-Amicon-Filter 3K entfernt. Die Konjugat-Lösung wurde mittels Zebra-spin Entsalzungssäule auf PBS pH 7,2 umgepuffert.

2.2.5 Elektrophoretische Methoden

2.2.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Reinheitsbestimmung von Proteinen und ungefähre Abschätzung des Molekulargewichts wird die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) eingesetzt. SDS-PAGE besteht aus zwei Gelen, einem Trenn- und einem Sammelgel. Sie unterscheiden sich im pH-Wert, in der Ionenstärke und in der Porengröße. Im Sammelgel wird die Probe konzentriert und im Trenngel werden die Proteine anschließend aufgetrennt. Durch Zugabe von SDS (Sodium dodecyl sulfate) bilden sich SDS-Protein-Komplexe mit einem konstanten Masse-Ladungs-Verhältnis, so dass die Proteine nur nach ihrer Größe aufgetrennt werden [Raem, 2007; Blank et al., 2002].

Die Proben wurden mit 1 x SDS-Puffer (1:5 aus 5 x Stock) 5 min bei 95°C im Thermomixer denaturiert. Sollten die Proteine reduziert werden, so wurden die Disulfidbrücken durch Zugabe von 0,1 M DTT gespalten. Nach dem Laden der Probe, wurde die Elektrophorese 120 Volt für 10 min und dann 180 Volt (bis die blaue Front ausgelaufen war) durchgeführt.

Tabelle 2.8: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel (SDS-PAGE)

Material	Trenngel 8%	Sammelgel 5%
30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid	3.24 ml	1.7 ml
Tris, pH 8.8	4.8 ml	–
Tris, pH 6.8	–	1.25 ml
10% SDS	128 µl	100 µl
H ₂ O (bidestiliert)	4.06 ml	7 ml
TEMED	10 µl	10 µl
10% APS	66 µl	50 µl

2.2.5.2 Silberfärbung

Um die aufgetrennten Proteinbanden sichtbar zu machen, wurde eine Silberfärbung durchgeführt. Die Silberfärbung gehört zu den sensitivsten Färbemethoden für Polyacrylamid-Gele. Sie basiert auf einer selektiven Anlagerung von metallischem Silber an die Proteine. Silber-Ionen binden an die basischen Aminosäuren-Reste in der Proteinsequenz, wo sie zu metallischem Silber reduziert werden und Silberkerne

ausbilden, die dann je nach Proteinkonzentration braun oder schwarz färben [GE Healthcare Bio-Sciences, 2007; Laemmli; 1970].

Das Gel wurde mindestens 30 min in Fixierlösung geschwenkt. Nach 10 min Schwenken in 50% MeOH, wurde das Gel 2 h mit ddH₂O gewaschen. Dann 1 min in Sensitizer-Lösung sensibilisiert und anschließend dreimal 20 sec. mit ddH₂O gewaschen. Nun folgte die Inkubation mit Silbernitrat für 20 min im Dunkeln. Nach dreimaligem Waschen mit ddH₂O, wurde das Gel für 5-10 min in Entwicklungslösung gegeben. Abschließend wurde die Entwicklung mit 5% Essigsäure gestoppt, das Gel mit ddH₂O gewaschen und eingescannt.

2.2.5.3 Western-Blot

Western-Blot ist ein Verfahren zum elektrophoretischen Transfer von Proteinen aus Polyacrylamid-Gelen auf eine Nitrocellulose-Membran (NC-Membran), um die Detektion von immobilisierten Proteinen durch spezifische Antikörper (Immuno-blot) zu ermöglichen [Kerényi et al., 1973]. Die Bindung der Antikörper an die immobilisierten Proteine kann auf verschiedene Weise nachgewiesen werden. Beim direkten Nachweis der Proteine werden Antikörper eingesetzt, die mit Enzymen (z.B. Peroxidase) gekoppelt sind. Bei der indirekten Nachweismethode wird ein bereits gebundener, spezifischer Antikörper durch einen Sekundärantikörper nachgewiesen [Luttmann, 2004].

Das SDS-Gel wurde mit 40 Volt konstant für 1 h geblottet. Die NC-Membran mit absorbierten Proteinen wurde 2 h mit Blockierungslösung abgesättigt. Nach dreimal 10 min Waschen mit ddH₂O, wurde die Membran für 1 h mit HRP konjugiertem α -c-myc-Antikörper aus Maus (1:5000 in Waschpuffer verdünnt) inkubiert. Nach wiederholtem dreimaligen Waschen mit ddH₂O, wurde die Membran für 1 min in Vorbereitungspuffer gegeben. Unmittelbar darauf folgte die Entwicklung des Signales mit Substratlösung. Die Reaktion wurde durch Waschen mit ddH₂O gestoppt und die Membran wurde eingescannt.

2.2.6 Quantitative Bestimmung des Gesamtproteins

Die quantitative Proteinbestimmung in dieser Arbeit erfolgte durch Bicinchoninsäure (BCA)-Assay. Es war erforderlich, die Gesamtproteinmengen einzustellen, um

Material und Methoden

vergleichende Aussagen über die enthaltene Menge des Zielproteins (r28M) machen zu können.

2.2.6.1 BCA-Assay

Die BCA-Methode basiert auf einer Biuret-Reaktion, die die Reduktion der Cu^{2+} zu Cu^+ durch Protein in einer alkalischen Lösung bewirkt. Es kommt zunächst zur Komplexbildung von Protein mit Cu^{2+} -Ionen, die dann unter alkalischen Bedingungen zu monovalenten Ionen reduziert werden, dadurch entsteht ein Komplex mit BCA. Der BCA-Kupfer-Komplex ist wasserlöslich und weist, bei Proteinbindung, eine starke lineare Absorption bei 562 nm auf. Eine Verdünnungsreihe von Rinderserumalbumin (BSA) mit bekannten Konzentrationen wird hergestellt und als Standardkurve verwendet [Towbin, 1979; Smith, 1985].

Tabelle 2.9: Verdünnung des BSA Standards

	Vol. von Verd. [μl]	Volumen von BSA [μl]	Endkonzentration von BSA [$\mu\text{g/ml}$]
A	0	300 von Stock	2000
B	100	300 von Stock	1500
C	400	400 von Stock	1000
D	350	350 von C	500
E	300	300 von D	250
F	250	250 von E	125
G	400	100 von F	25
H	400	0	0 (Blank)

Der Standard (BSA) wurde in 8 Verdünnungsstufen (siehe Tabelle 2.9) hergestellt. Die Proben wurden in verschiedenen Verdünnungen gemessen, um sicherzustellen, dass die Auswertung im linearen Bereich 25-2000 $\mu\text{g/ml}$ erfolgte. Je 20 μl jeder Probe und der BSA Standards wurden ins well (in Duplikaten) gegeben. Das Farbreagenz wurde (1+50 Reagenz A und B) gemischt und je 200 μl /well zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei 37°C im Dunkeln wurde die Platte bei 562 nm (ELISA-Reader) gemessen und die Ergebnisse unter Verwendung der Standardkurve berechnet.

2.2.7 Software

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden folgenden Software verwendet:

- Microsoft Office 2010 (Erstellung von Texten, Graphiken und Tabellen)
- BioTek Gen5 Data Analysis Software (Extinktionsmessungen der ELISA-Platten)
- UNICORN 5,31 ÄKTA GE-Healthcare (Erstellung der Chromatogramme bei FPLC)

3 Ergebnisse

3.1 Reinigung des r28M via α -c-myc Affinitätschromatographie

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde als Alternative zum Protein L- eine α -c-myc Affinitätschromatographie entwickelt, die auf der Bindung des c-myc-Tags des r28M beruht.

3.1.1 Kopplung des Liganden (9E10) an die Matrix

Es wurde eine „HiTrap NHS-activated Sepharose“ 1 ml Säule der Firma GE Healthcare eingesetzt. Der in Hybridomazellen produzierte und vorab aufgereinigte monoklonale Antikörper (Maus- α -c-myc) wurde als Ligand an die Säule gekoppelt und damit die Matrix für die Reinigung des r28M-Antikörpers immobilisiert.

Nach der Kopplung wurde ein Effizienztest mittels BCA und 8% SDS-PAGE (Silberfärbung, Western-Blot) durchgeführt. Um die genaue Konzentration des Liganden in Flow Through, Blockierlösung bzw. Waschlösung zu bestimmen, wurden alle verwendeten Puffer als Blank gemessen und dann das Verhältnis zwischen gebundenen und ungebundenen Antikörpern berechnet.

Tabelle 3.1: Effizienz der Kopplung mittels BCA-Messung

Ligand	Load	Wash	Kopplung	Effizienz
α -cmyc Ab	7,4 mg	0,8 mg	6,6 mg	~ 89%

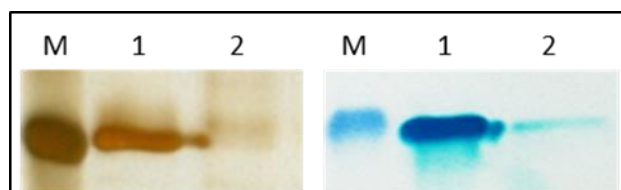


Abbildung 3.1 SDS-PAGE (8%) Silberfärbung und Western-Blot
Kopplung des Liganden an NSH-aktivierte Sepharose. (M) Marker, (1) Ligand, (2) Wash

Die BCA-Messung zeigt, dass 7,4 mg Antikörper auf die Säule aufgetragen wurden. Im Waschschrift wurden nur 0,8 mg als ungebundener Antikörper gemessen, woraus

sich eine Kopplungseffizienz von ~89% ergibt. Auch bei Silberfärbung und Western-Blot ist klar ersichtlich, dass in der Waschfraktion nur sehr wenig Protein enthalten war.

3.1.2 Reinigung des r28M

Die Affinitätsreinigung des r28M Antikörpers aus dem Plasma wurde mittels FPLC durchgeführt. Um Beschädigung des Säulenmaterials so wie Verstopfung der Säule durch Fettsäuren und Plasmaproteine vorzubeugen, wurden die Plasmaproben vor dem Auftragen für 10 min bei 7000 rpm und 4°C zentrifugiert und in einem Verhältnis 1:2 mit Bindungspuffer (PBS) pH 7 verdünnt. Die Elution erfolgte mit 0,1 M Natriumcitrat pH 3. Die Aufreinigung wurde mittels UV Detektion bei 280 nm verfolgt (siehe Abbildung 3.2).

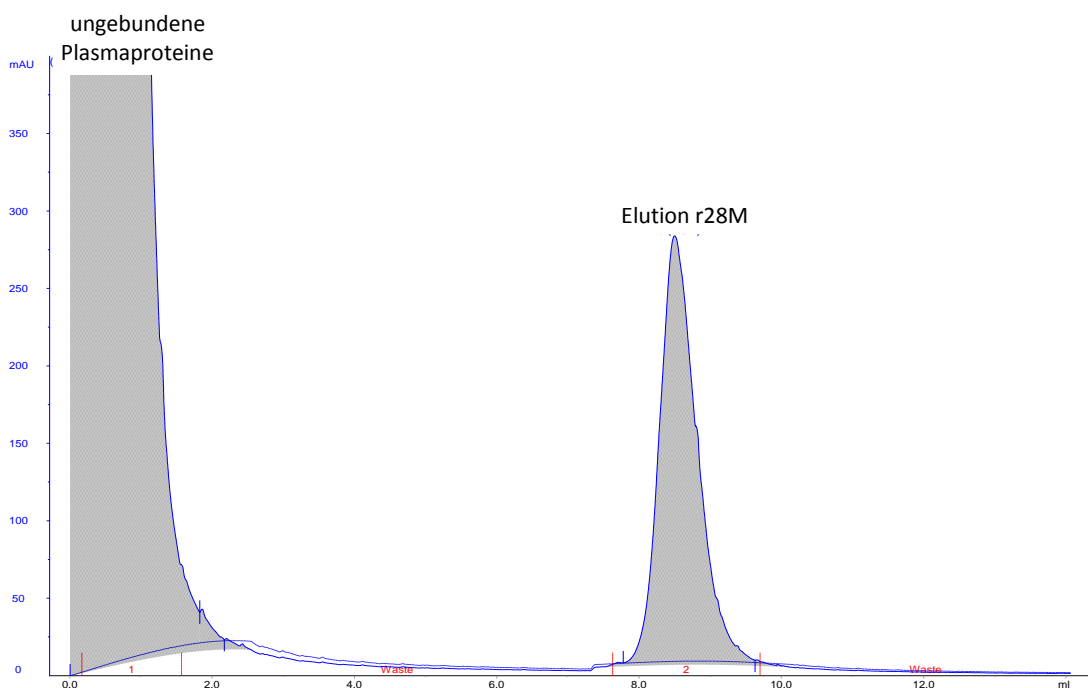


Abbildung 3.2: Chromatogramm Reinigung vom Plasma via α -c-myc-Affinitätssäule
Der erste Peak zeigt die ungebundenen Plasmaproteinen, die in große Menge vorkommen.
Der zweite Peak zeigt Elution des gebundenen r28M Antikörpers.

3.1.2.1 Einfluss des Gerinnungs- und Bindungspuffer auf die r28M-Reinigung

Um Einfluss des Gerinnungspuffers auf α -c-myc-Affinitätsreinigung zu testen, wurde das Plasma #234 mit EDTA, ACD, Heparin und Citrat verwendet. Es wurden

Ergebnisse

immer gleiche Plasmavolumina (5 ml) eingesetzt. Weiters wurde auch der Einfluss des pH-Wertes des Bindungspuffes auf die Bindungseffizienz und damit auf die Ausbeute getestet. Dafür wurden obengenannten Plasmaproben mit PBS pH 7 und 8 auf die Säule geladen.

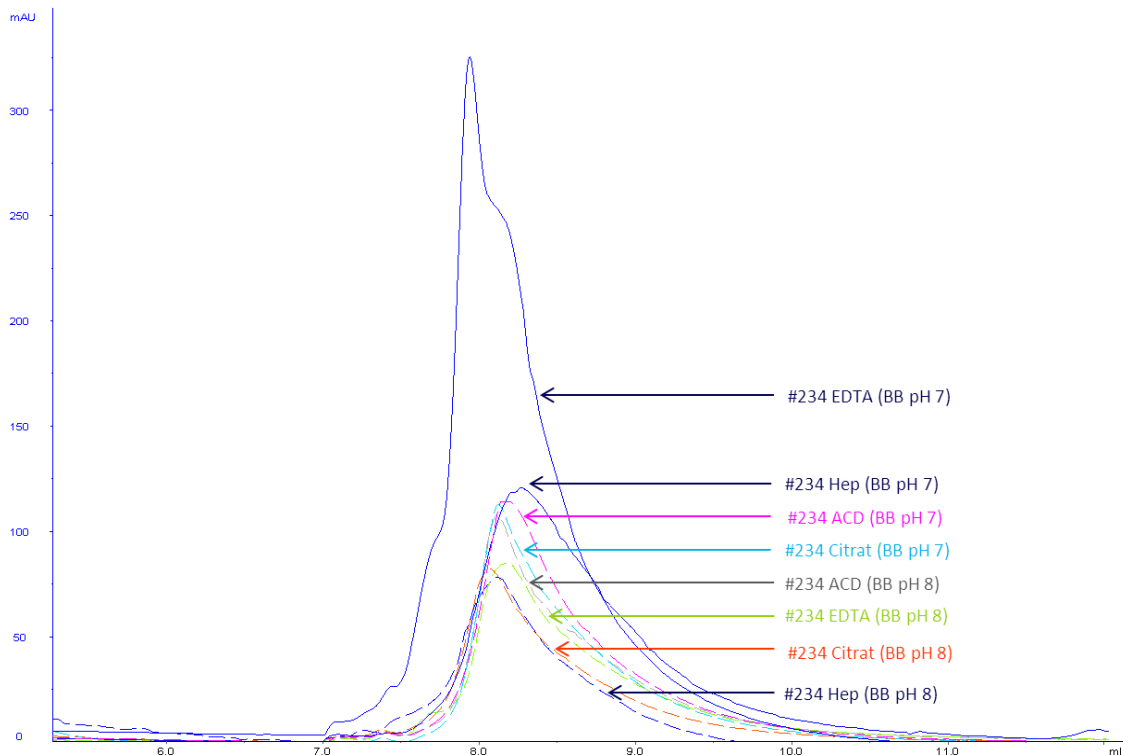


Abbildung 3.3: Reinigung des r28M via α -c-myc Affinitätssäule, Elution des r28M Antikörpers mit 0,1 M Natriumcitrat pH 3
Plasma #234 mit 4 verschiedenen Gerinnungshemmern (EDTA, ACD, Heparin und Citrat), Bindungspuffer PBS pH 7 bzw. 8.

Das Chromatogramm zeigt deutlich, dass die Elutionspeakhöhe und -fläche des EDTA Plasmas, aufgetragen in PBS pH 7, sehr stark von anderen Proben abweicht. Es dürfte höhere Proteinmenge gebunden werden. Die Gründe dafür konnten zunächst noch nicht gefunden werden.

3.1.3 Analytik der Reinigung

3.1.3.1 Konzentrationsbestimmung

Zur Ermittlung der Gesamtproteinkonzentration sowie den Unterschied des r28M-Anteils zwischen einzelnen Reinigungen, wurden folgende Assays durchgeführt:

- Gesamtproteinkonzentration: BCA-Messung

- r28M Konzentration: Protein L und α -c-myc ELISA

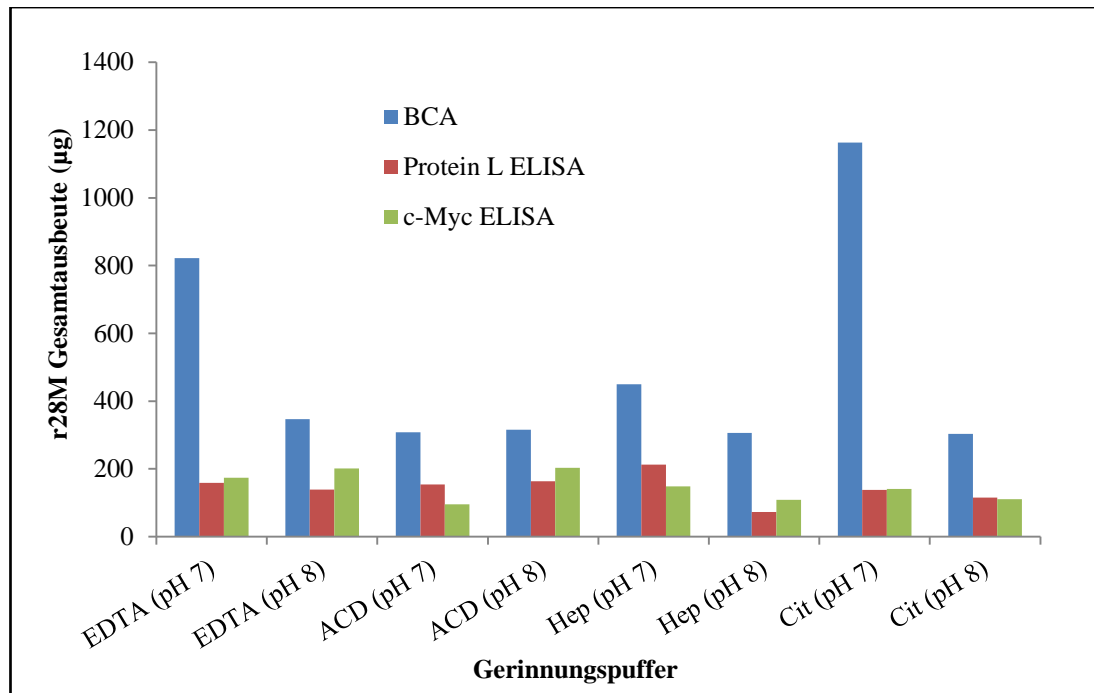


Abbildung 3.4: Vergleichende Ergebnisse von BCA und ELISAs
r28M-Gesamtausbeute in μg per 5 ml #234 Plasma. Die Methoden wurden mit folgenden Standard-Proteinen durchgeführt: BCA \rightarrow BSA; Protein L ELISA \rightarrow 12CDL12; α -c-myc ELISA \rightarrow c-myc-Peptid.

Aus der Abbildung 3.4 ist klar ersichtlich, dass die BCA-Ergebnisse signifikant höhere Werte liefern als die ELISA-Ergebnisse. Die BCA-Messung ergibt für die Eluate von EDTA- und Citrat-Plasma mit BB pH 7 eine höhere Gesamtproteinausbeute als für die anderen Eluate. Bei den ELISA-Messungen konnten keine signifikanten Unterschiede an r28M-Gehalt nachgewiesen werden. Es scheint, dass die oben genannten Bedingungen mehr Einfluss auf die Bindung von anderen Plasmaproteinen als direkt auf die Bindung von r28M haben.

3.1.3.2 Analytische Charakterisierung des r28M-Antikörpers

Die Reinheit des Antikörpers wurde mittels SDS-PAGE (reduzierend und nicht-reduzierend) und Western-Blot analysiert. Es wurden, auf die ELISA-Ergebnisse bezogen, 2 μg pro Slot aufgetragen. Die Western-Blots wurden mit α -c-myc sowie α -BSA Antikörper detektiert.

Ergebnisse

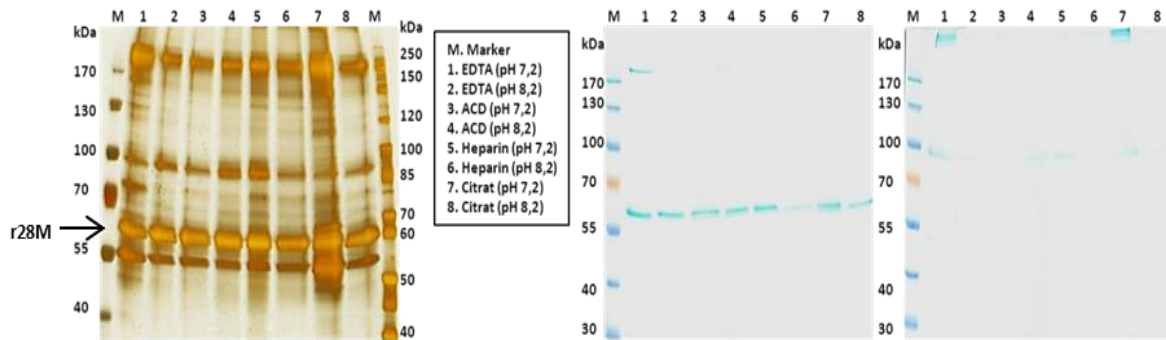


Abbildung 3.5: 8% SDS-PAGE (nicht-reduzierend)
links Silberfärbung, Mitte WB detektiert mit Maus- α -c-myc HRP, rechts mit α -BSA HRP

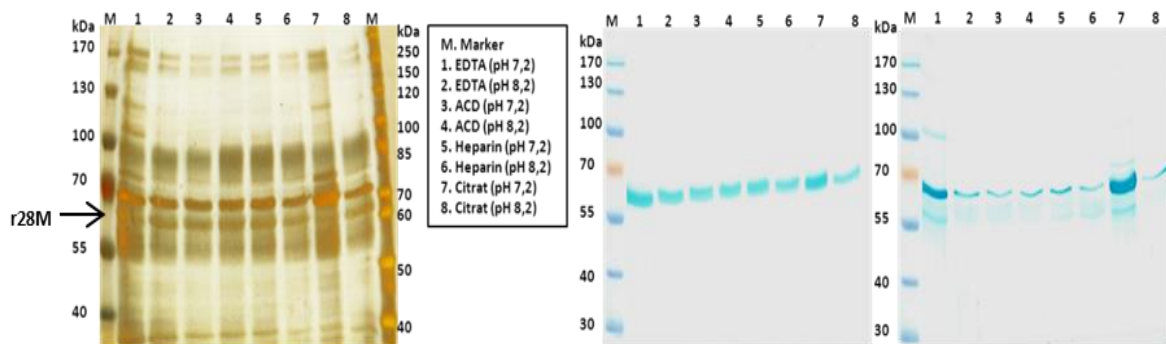


Abbildung 3.6: 8% SDS-PAGE (reduzierend)
links Silberfärbung, Mitte WB detektiert mit Maus- α -c-myc HRP, rechts mit α -BSA HRP

Bei SDS-PAGE-Silberfärbung ist deutlich erkennbar, dass die E1 (EDTA, BB pH 7) und E7 (Citrat, BB pH 7) im Vergleich zu anderen Eluaten mehr Banden zeigen, was auf die Bindung von anderen Plasmaproteinen zurückzuführen ist. Der Western-Blot, detektiert mit α -c-myc, zeigt relativ gleiche Intensität der r28M Bande (~57 kDa), die auch den ELISA-Messungen entsprechen. Die Abbildung 3.5 (links) und Abbildung 3.6 (rechts) zeigen, dass es bei der r28M-Reinigung über die α -c-myc Säule zur Bindung von BSA kam.

Aus der gesamten Analytik kann man schließen, dass es bei der Reinigung des r28M via α -c-myc Affinitätssäule trotz spezifischer c-myc- α -c-myc Bindung zu unspezifischen Bindungen von Plasmaproteinen kam. Da der α -c-myc Antikörper, wie die Western-Blots zeigen, tatsächlich nur c-myc und damit r28M bindet, lassen sich die unspezifischen Bindungen vermutlich auf eine nicht ausreichende Absättigung des Säulenmaterials zurückführen. Eine diesbezügliche Optimierung

müsste den Einsatz einer höheren Antikörper-Menge, sowie das Anpassen einzelnen Reaktionsschritte beinhalten.

3.1.4 Vergleich α -c-myc- und Protein L Reinigung

Um Vergleiche zwischen den Reinigungsverfahren darstellen zu können, wurden von Dr. Judith Rudolf (CDIIT) der gereinigter r28M via α -c-myc- und Protein L Reinigung auf der SEC-HPLC analysiert. SEC-HPLC ist ein Größenausschluss-Trennverfahren, das die Komponenten aufgrund ihres hydrodynamischen Radius, welcher bei globulären Proteinen annähernd dem Molekulargewicht entspricht, trennt [Keith et al., 1983].

- Gerät: Agilent HPLC 12000
- Säule: GS3000SWXL (TOSOH)
- Dimensionen: 5 μ m Particles, ID 7,8 x 300 mm length
- Puffer: PBS pH 7

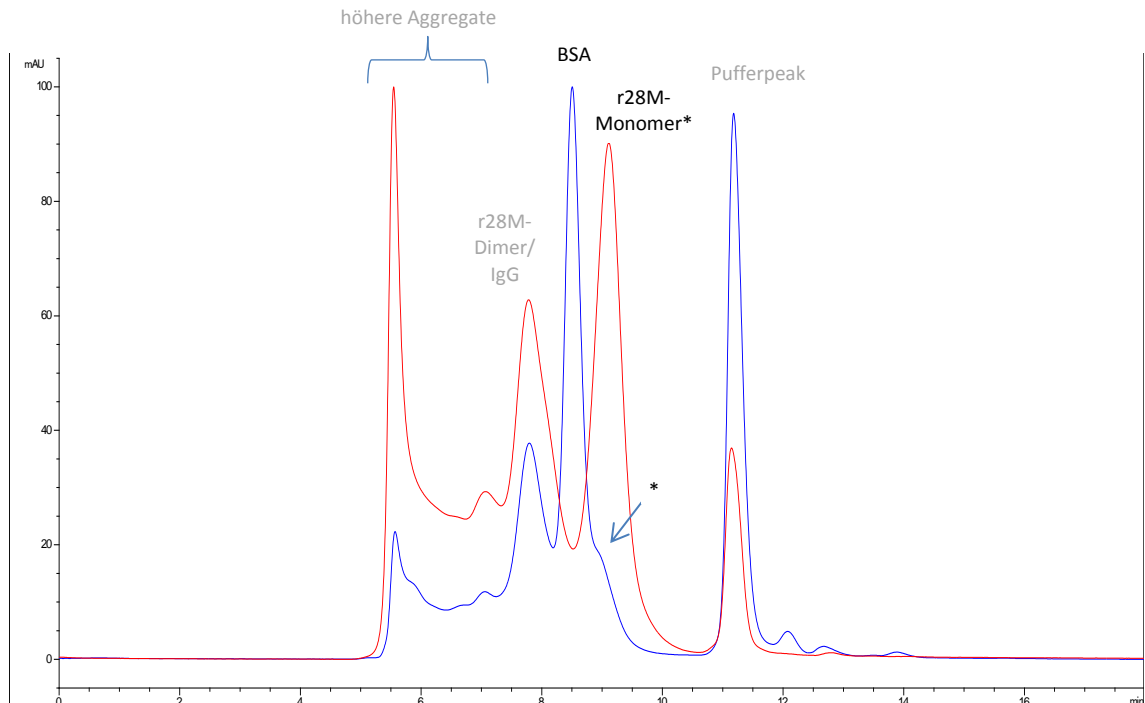


Abbildung 3.7: Chromatogramm: Vergleich α -c-myc- und Protein L Reinigung
Rot: Protein L gereinigter r28M; Blau: α -c-myc gereinigter r28M

Das SEC-Profil zeigt die generelle Tendenz zur Aggregatbildung des r28M. Bei der Reinigung über Protein L stellt die monomere Form des r28M einen deutlichen Peak dar, während bei der Reinigung über α -c-myc der BSA-Peak dominiert. Die dimere Form des r28M und potentiell enthaltenes IgG können aufgrund ihres ähnlichen Molekulargewichts nicht unterschieden werden.

Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutungen aus SDS-PAGE und Western Blot hinsichtlich der unspezifischen Bindung von bovinem IgG und BSA an die Affinitätsmatrix.

3.2 Entwicklung eines α -c-myc ELISA für Detektion des r28M

Weiters wurde in dieser Arbeit als Alternative zum Protein L ELISA ein weiterer ELISA entwickelt, der auch auf der Detektion des c-myc-Tags des rekombinanten Antikörpers beruht.

3.2.1 Direkter Test mit r28M Antikörper

In ersten Versuchen wurden vergleichende Western-Blots und ELISA-Ansätze ausprobiert, um die Bindungsaffinitäten verschiedener Antikörper zu testen.

Für Western-Blot Experimente wurde die r28M Reinigung Final bulk 11PAKT01 verwendet. Für die Detektion wurde ein monoklonaler Maus- α -c-myc-HRP (Invitrogen), ein polyklonaler Kaninchen- α -c-myc-HRP (Antibodies online) und Ziege- α -Kaninchen-HRP Antikörper (Sigma) verwendet. Die SDS-PAGE wurde denaturierend, aber nicht reduzierend mit einem 8% Gel durchgeführt.

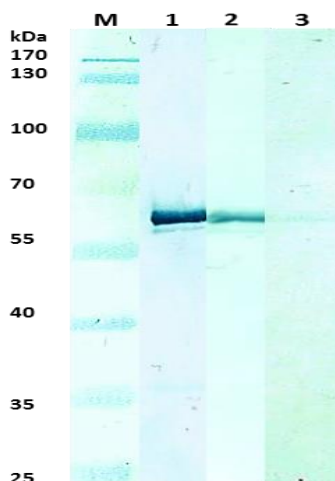


Abbildung 3.8: Western-Blots mit verschiedenen c-myc-spezifischen Antikörpern.

(M) Marker, (1) Maus- α -c-myc HRP, (2) Kaninchen- α -c-myc und Ziege- α -Kaninchen HRP, (3) Ziege- α -Kaninchen HRP.

Mit dem Maus- α -c-myc-Antikörper wurde ein wesentlich stärkeres Signal erhalten, als nur dem Kaninchen- α -c-myc-Antikörper. Durch zusätzliche Inkubation mit einem sekundären spezies-

Ergebnisse

spezifischen α -Kaninchen-Antikörper konnte das Signal sehr gut verstärkt werden. Es wurden für Final bulk 11PAKT01 Banden bei ca 57 kDa erhalten. Um eine falsche negative Bindung des α -Kaninchen-HRP an r28M auszuschließen, wurde eine Negativ-Kontrolle nur mit α -Kaninchen-HRP durchgeführt. Es ist eine sehr leichte Bande zu erkennen, die Intensität der positiven Proben ist aber deutlich höher, so dass es zu keinen Fehlinterpretationen kommen sollte.

Für die ersten ELISA Versuche, wurde der Final Bulk 11PAKT01 in unterschiedlichen Konzentrationen gecoatet (max. Konz. = 5 $\mu\text{g/ml}$, 1:2 Verdünnungen), geblockt und anschließend wieder mit verschiedenen Antikörper Kombinationen detektiert. Es wurde darauf geachtet die eingesetzten Antikörperkonzentrationen anzugleichen, um einen optimalen Vergleich erstellen zu können.

- Maus- α -c-myc-HRP [0,13 $\mu\text{g/ml}$] Verd. 1:10000
- Kaninchen- α -c-myc-HRP [0,16 $\mu\text{g/ml}$] Verd. 1:3000
- Ziege- α -Maus-HRP [0,14 $\mu\text{g/ml}$] Verd. 1:5000

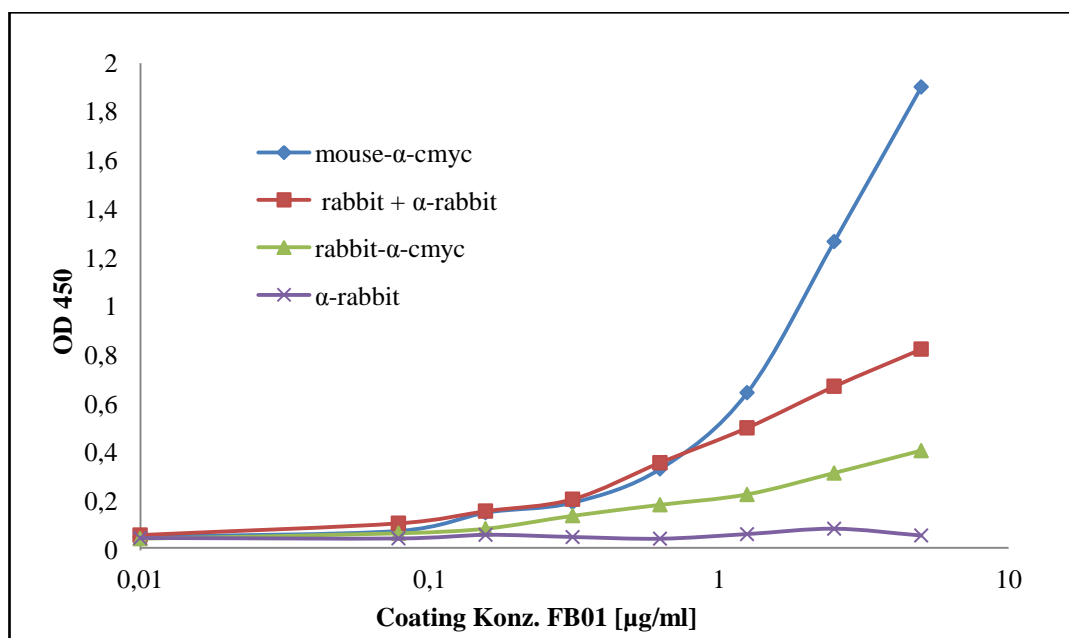


Abbildung 3.9: ELISA Kurven, direktes Coating mit FB11PAKT01
r28M wurde mit verschiedenen Antikörper detektiert: Maus- α -c-myc-HRP (blau); Kaninchen- α -c-myc und Ziege- α -Kaninchen-HRP (rot); nur Kaninchen- α -c-myc-HRP (grün); Negativ-Kontrolle: Ziege- α -Kaninchen-HRP (lila).

Entsprechend den Western-Blot Ergebnissen lieferte die Detektion mit dem Maus- α -c-myc die höchsten Signale. Die sehr schwachen Signale mit Kaninchen- α -c-myc konnten durch Inkubation mit einem sekundären Antikörper verstärkt werden. Es wurden keine falsch positiven Signale nur mit α -Kaninchen erhalten.

Für die schwächere Reaktion des Kaninchen- α -c-myc im Vergleich mit dem monoklonalen Antikörper gibt es einige mögliche Erklärungen. Es könnte zum einen daran liegen, dass der polyklonale Antikörper eine geringere Sensitivität für den c-myc Tag aufweist, weiters ist sicher, trotz Immunoaffinitätsaufreinigung das Verhältnis der c-myc spezifischen Antikörper zur gesamten polyklonalen Mischung ungünstiger als bei einem selektierten monoklonalem Antikörper. Außerdem kann auch die Kopplungsdichte des HRP-Enzyms an den Antikörper eine Auswirkung auf die Signalstärke haben.

3.2.2 Erstellen einer Standardkurve für den α -c-myc Sandwich ELISA

Für die Erstellung einer Standardkurve wurden zwei verschiedene Coating-Antikörper in unterschiedlichen Konzentrationen, verschiedene Konzentrationen des Detektionsantikörpers, des Standards und unterschiedlich lange Inkubationszeiten der Substratlösung getestet.

3.2.2.1 Einfluss des Coating-Antikörpers

Um den Einfluss des Coating-Antikörpers auf die Entwicklung einer Standardkurve für den c-myc ELISA zu testen, wurden zwei verschiedene Coating-Antikörper Ziege- α -Maus IgG (Firma Jackson) und Ziege- α -Maus F(ab')₂ (Firma Sigma) verwendet. Beide Tests wurden unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Die MTP wurde bei 4°C über Nacht gecoatet.

- Coating-Antikörper (Sigma/Jackson) 1:1000 verdünnt
- r28M Standard (FB11PAKT01) max. Konz. 5 μ g/ml \rightarrow 1:2 verdünnt
- Primär Antikörper (Kaninchen- α -c-myc HRP) 1:1000 verdünnt
- Sekundär Antikörper (Ziege- α -Kaninchen HRP) 1:5000 verdünnt

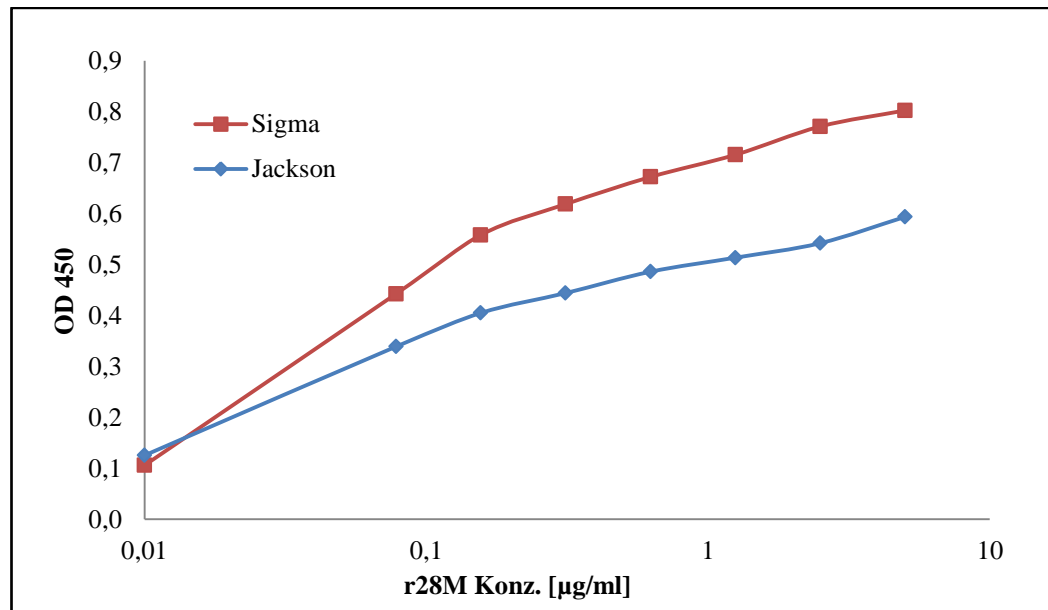


Abbildung 3.10: Einfluss des Coating-Antikörpers auf die Standardkurve
Coating-Antikörper Ziege- α -mouse Sigma/Jackson 1:1000 gecoatet. Standard FB11PAKT01 mit max Konz. 5 $\mu\text{g/ml}$ in einer Verdünnungsreihe 1:2. Detektion mit Kaninchen α -c-myc HRP 1:1000 sowie α -Kaninchen HRP 1:5000. Die Reaktion wurde bei beiden Tests gleichzeitig (nach 10 min.) gestoppt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass der Coating-Antikörper, Ziege- α -Maus F(ab')₂ (Sigma), im Vergleich zum Ziege- α -Maus IgG Antikörper (Jackson) um ~30% höhere Signale bei gleichen Blank-Werten liefert. Damit erwies sich der Ziege- α -Maus F(ab')₂ Antikörper (Sigma) besser für α -c-myc ELISA geeignet.

3.2.2.2 Einfluss der Konzentration des Coating-Antikörpers

Um weitere Einflüsse auf Erstellung der Standardkurve zu testen, wurde eine MTP mit drei unterschiedlichen Konzentrationen an Coating-Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der Ziege- α -Maus Coating-Antikörper (Sigma) wurde 1:1000, 1:2000 bzw. 1:3000 verdünnt. Die Enzymreaktion wurde nicht für jede Verdünnung gleichzeitig gestoppt, sondern bei annähernd gleicher Intensität der Blaufärbung. Die Bedingungen wurden für alle drei Tests ident durchgeführt.

- Standard: r28M Aufreinigung (11CDL02) max. Konz. 5 $\mu\text{g/ml}$ → 1:4 verdünnt
- Primär Antikörper (Kaninchen- α -c-myc HRP) 1:1000 verdünnt
- Sekundär Antikörper (Ziege- α -Kaninchen HRP) 1:5000 verdünnt

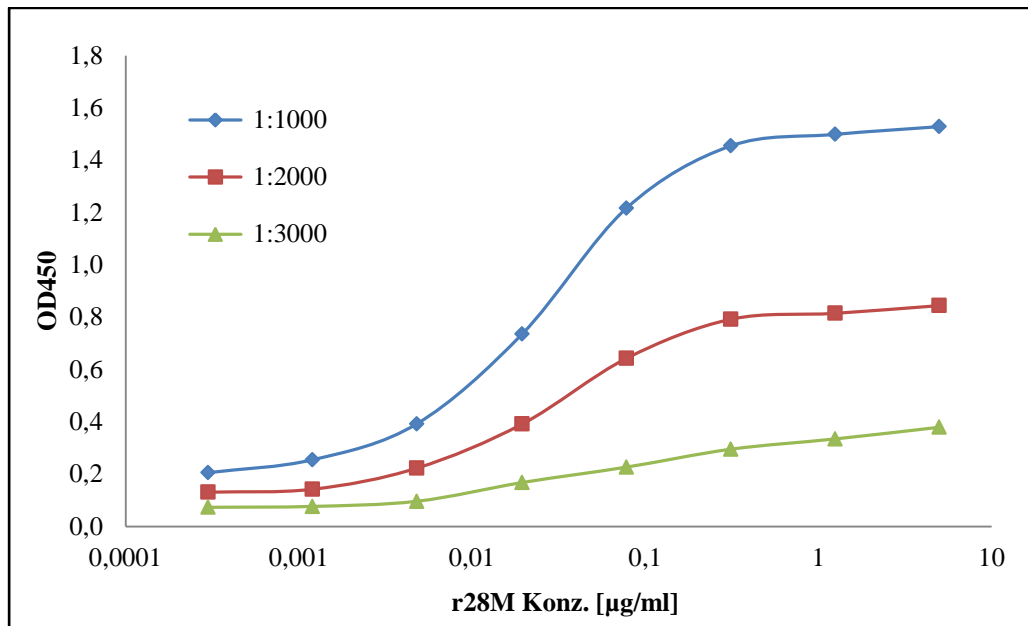


Abbildung 3.11: Einfluss der Konzentration des Coating-Antikörpers

Coating-Antikörper Ziege- α -Maus Sigma bei 4°C über Nacht gecoatet. Standard 11CDL02 mit max Konz. 5 $\mu\text{g/ml}$ in einer Verdünnungsreihe 1:4. Detektion mit Kaninchen- α -c-myc HRP 1:1000 sowie α -Kaninchen HRP Antikörper 1:5000.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Verdünnung von 1:1000 des Coating-Antikörpers den größten Signalunterschied ergibt (siehe Abbildung 3.11). Der am höchst konzentrierte Coating-Antikörper bzw. 1:1000 Verdünnung wurde nach ~10 min gestoppt, die 1:2000 und 1:3000 Verdünnungen nach ~20 min.

3.2.2.3 Optimierung der Konzentration des Detektions-Antikörpers

Zur Ermittlung der optimalen Konzentration wurden zwei verschiedene Verdünnungen des Detektions-Antikörpers hergestellt. Die Verdünnung des primären Antikörpers betrug 1:500 bzw. 1:1000. Der sekundäre Antikörper wurde 1:5000 verdünnt. Die Durchführung erfolgte ident zum oben beschriebenen Versuch (Kapitel 3.2.2.2). Um die möglichen Kreuz-Reaktivitäten aufzuzeigen, wurde eine Kontrolle ohne Standard durchgeführt.

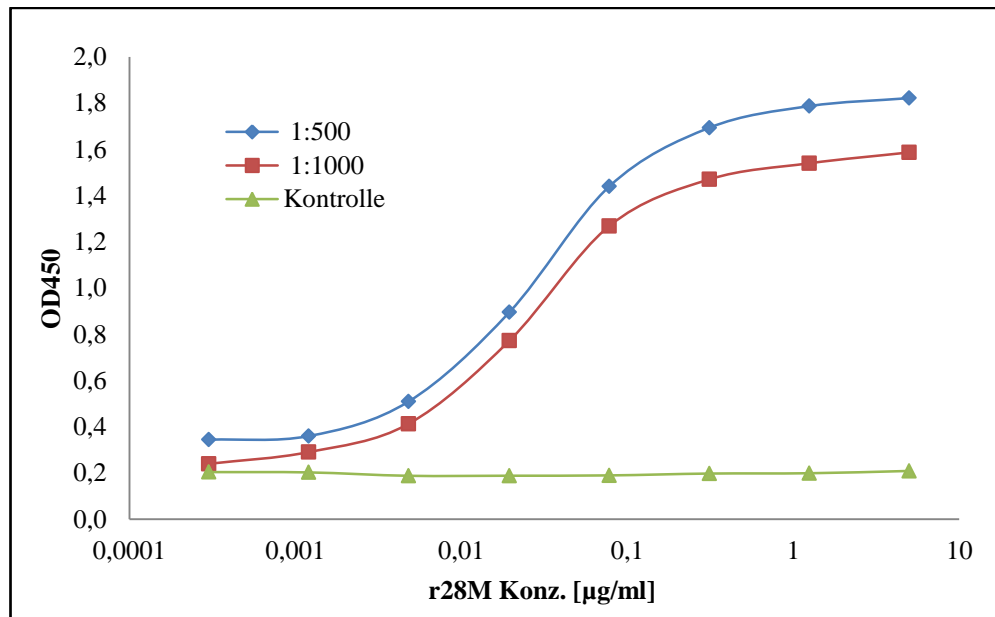


Abbildung 3.12: Einfluss der Konzentration des Detektions-Antikörpers und Negativkontrolle
 Coating-Antikörper Ziege- α -Maus Sigma bei 4°C über Nacht gecoatet. Standard 11CDL02 mit max Konz. 5 µg/ml in einer Verdünnungsreihe 1:4. Detektion mit Kaninchen- α -c-myc HRP 1:500 bzw. 1:1000, α -Kaninchen HRP Antikörper 1:5000.

Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass nur ein geringer Unterschied zwischen den Verdünnungen bestand. Daher wurde entschieden die 1:1000 Verdünnung zu verwenden, die auch sparsamer ist. Einen wichtigen Nachweis stellt die negativ Kontrolle ohne Standard dar, es kam zu keiner Signalentwicklung, der max. OD-Wert betrug 0,2.

3.2.3 Einfluss der Lagerbedingungen des Standards auf den α -c-myc ELISA

Es wurden Versuche mit r28M Standard bei folgenden vier verschiedenen Lagerbedingungen durchgeführt: PBS sowie PBS + 0,05% Tween20 bei 4°C bzw. -20°C. Dafür wurde frischer Standard 11CDL02 (gelagert bei -80°C) aufgetaut und die Verdünnungen 1:10 mit PBS bzw. PBS + 0,05% Tween20 hergestellt. Die Verdünnungen wurden aliquotiert und bei oben genannten Temperaturen gelagert. Die Durchführung des Versuchs erfolgte ident zu oben beschriebenen Bedingungen (siehe Tabelle 2.4).

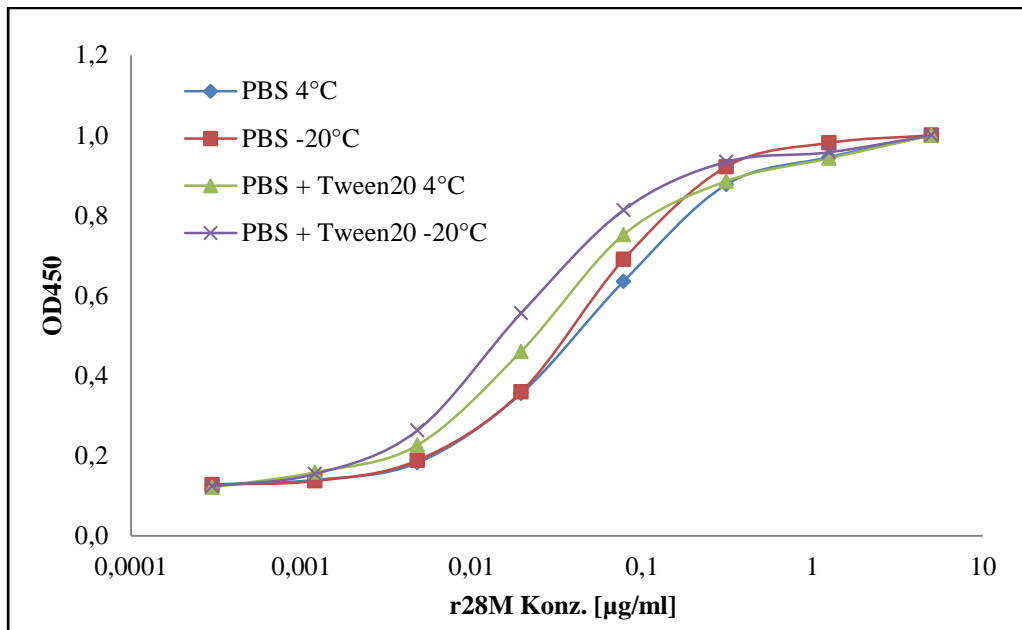


Abbildung 3.13: Einfluss der Lagerbedingungen auf die Standardkurve
Standardkurve in normalisierter Form (OD/ODmax) bei vier verschiedenen Lagerbedingungen. Die Messungen wurden nach zwei Woche Lagerung bei entsprechenden Bedingungen durchgeführt.

In der Abbildung 3.13 ist zu erkennen, dass die Lagerung des Standards bei verschiedenen Bedingungen zu leicht unterschiedlichen Standardkurven führte. Die Kurven wurden normalisiert (OD/ODmax), um Unterschiede, die aus der nicht immer gleich schnell von statten gehenden Substratumsetzung resultieren, auszugleichen. Es zeigen sich dadurch geringe Veränderungen im Kurvenverlauf, die auf Veränderungen der r28M-Konzentration zurückzuführen sind.

Die folgenden Diagramme stellen die an 4 verschiedenen Tagen gemessenen Standards in normalisierter Form (OD/ODmax). Die Messungen wurden in einem Zeitraum von zwei Wochen durchgeführt. Die erste Messung erfolgte am selben Tag der Aliquotierung. Die anderen Messungen wurden am Tag 5, 12 bzw. 15 durchgeführt.

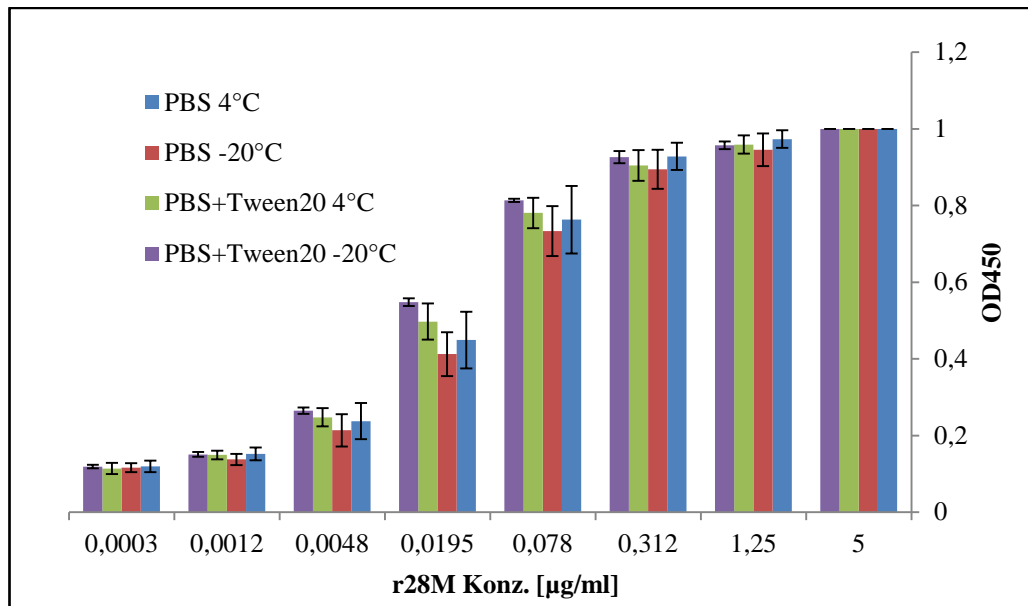


Abbildung 3.14: Vergleichende Ergebnisse bei Messung des Standards 11CDL02 bei verschiedenen Lagerbedingungen

Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen der vier verschiedenen Messtermine dar. Alle angegebenen Werte sind in normalisierter Form (OD/ODmax) dargestellt.

Wie in Abbildung 3.14 ersichtlich, führt die Lagerung des r28M-Standards in PBS + 0,05% Tween20 bei -20°C zu den stabilsten Ergebnissen.

3.2.4 Ermittlung der Konzentration von r28M in Plasma

Zur Ermittlung der r28M Konzentration in Plasma, sowie um den Einfluss der Lagerbedingungen des Standards auf die Konzentrationsbestimmung zu testen, wurden die Ergebnisse der Plasmaproben (#20 bei 4°C sowie #20, #234 bzw. 408 bei -20°C) gegen, an vier verschiedenen Tagen gemessenen Standardkurven ausgewertet.

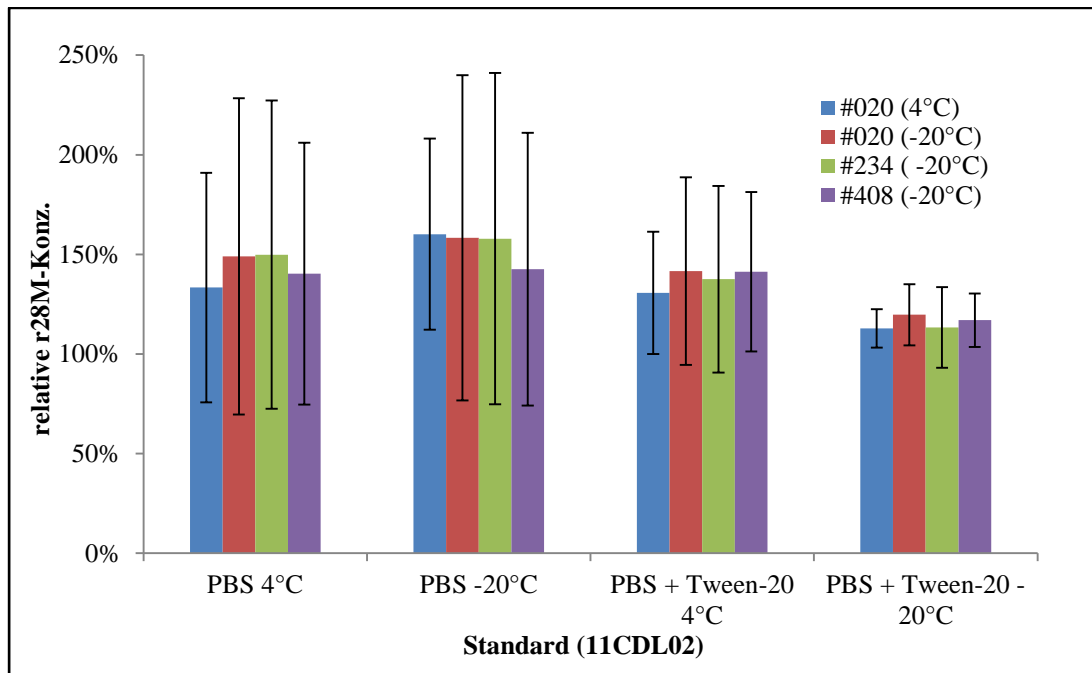


Abbildung 3.15: Ermittlung der r28M-Konzentration in Plasma mittels α -c-myc ELISA
 Die x-Achse zeigt die Lagerbedingungen des Standards 11CDL02 und die y-Achse die relative r28M Konzentration berechnet in %. Die Balken zeigen die Mittelwerte bzw. Standardabweichung der an vier verschiedenen Tagen gemessenen Plasmaproben. 100% beziehen sich auf den Tag 1 der Messungen.

Trotz identischer Durchführung des Assays an verschiedenen Tagen, zeigen die Ergebnisse relativ hohe Schwankungen der r28M Konzentration in Plasma. Aus den Abbildungen der Standardabweichungen ist ersichtlich, dass der Standard 11CDL02 bei Lagerung in PBS + 0,05% Tween20 bei -20°C stabiler zu sein scheint als bei Lagerung nur in PBS bzw. bei 4°C.

Nachdem die Proben immer mit einer Standardkurve auf derselben Platte ausgewertet wurden, kommt es dadurch auch zu keinen Verfälschungen.

3.2.5 Vergleichende Konzentrationsbestimmung von r28M mittels α -c-myc- und Protein L ELISA

Um beide Assays miteinander zu vergleichen, wurden parallele Messungen mit Protein L und α -c-myc ELISA durchgeführt. Die Bedingungen für den α -c-myc ELISA sind in der Tabelle 2.4 bzw. für den Protein L ELISA in der Tabelle 2.5 beschrieben.

Ergebnisse

Tabelle 3.2: Vergleichende Konzentrationsbestimmung r28M mittels Protein L- und c-myc-ELISA

Probe →		#020 (4°C)		#020 (-20°C)		#234 (-20°C)		#408 (-20°C)	
ELISA →		c-myc	P. L	c-myc	P. L	c-myc	P. L	c-myc	P. L
Lagerb. v. Std. ↓		r28M Konzentration [µg/ml]							
Tag 1	PBS 4°C	207	450,8	206	690,1	96,2	350,9	264,5	827,8
	PBS -20°C	207	450,8	206	690,1	96,2	350,9	264,5	827,8
	PBS + Tween20 4°C	155,5	79,5	169,8	122,9	82,3	56,5	216,7	148,6
	PBS + Tween20 -20°C	155,5	79,5	169,8	122,9	82,3	56,5	216,7	148,6
Tag 5	PBS 4°C	149,7	168,4	155,9	209	65,6	94,5	182,6	249,6
	PBS -20°C	349,4	108,5	174,6	166,3	81,3	72,7	188,9	187,9
	PBS + Tween20 4°C	168,9	76,4	174,6	102,2	81,3	45,4	257,4	120,3
	PBS + Tween20 -20°C	185,8	93,1	200,1	138,6	79,2	63,6	257,4	161,6
Tag 12	PBS 4°C	335,5	89,6	345,1	130,5	199,1	64	523,8	154,1
	PBS -20°C	321,5	153,1	390	229,2	175,3	105,2	476,9	269,5
	PBS + Tween20 4°C	246,4	69,4	292,4	102,6	160,5	49,5	411,1	121,7
	PBS + Tween20 -20°C	172,9	102,3	210,5	148	95,6	71,3	287,6	182,2
Tag 15	PBS 4°C	411,9	82,9	520,6	119,4	215,8	53,7	513,5	117,5
	PBS -20°C	448,1	165,6	534,3	279,1	254,7	122,6	578,1	304,8
	PBS + Tween20 4°C	242,1	60,3	325,1	88,6	128,8	41,7	339,8	85,8
	PBS + Tween20 -20°C	187,9	114,9	232,7	190,9	115,9	83,6	252,2	209,1

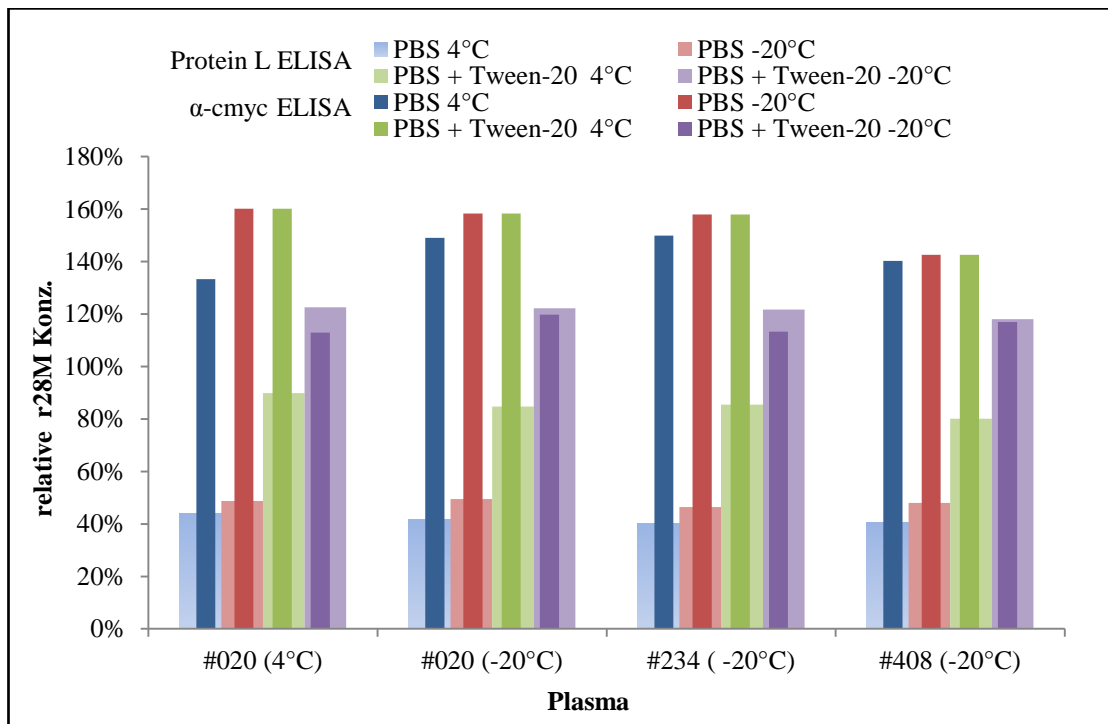


Abbildung 3.16: Vergleichende Ergebnisse mittels Protein L und α-c-myc ELISA

Die x-Achse zeigt die Plasmaproben gemessenen gegen Standard 11CDL02, der bei 4 verschiedenen Bedingungen gelagert war, die y-Achse zeigt die relative r28M Konzentration. Die Balken zeigen die Mittelwerte von 4 verschiedenen Messterminen. 100% beziehen sich auf den Tag 1 der Messungen.

Es zeigt sich, dass, obwohl die Standardkurven an den verschiedenen Tagen relativ ähnlich verlaufen, kleine Abweichungen sofort zu erheblichen Unterschieden in der Konzentrationsbestimmung führen. Das ist vermutlich auf die hohe Empfindlichkeit beider Tests zurückzuführen.

Die Assays zeigen leider weder einen Trend noch konstante Unterschiede. Die geringsten Schwankungen wurden mit dem α -c-myc ELISA und Lagerung des Standards in PBS + 0,05 % Tween20 bei -20°C erhalten.

Nachdem die Detektion des α -c-myc ELISAs auf der Erkennung der, nur einmal pro r28M Molekül vorkommenden, c-myc Sequenz beruht, sollten Schwankungen der Ergebnisse eigentlich reduziert werden, da ja die Konzentration des c-myc Tags in einer Probe gleich bleiben muss, unabhängig von sonstigen Umlagerungen oder Fragmentierungen des Proteins. Diese Vorgänge können die Erkennung des Antikörpers durch Protein L stärker beeinflussen. Die Antikörper könnten aber durch Aggregation des r28M in ihrer Bindung beeinflusst werden, da Epitope dadurch besser oder schlechter zugänglich würden. Dies trifft allerdings ebenfalls auf den α -Maus (Coating-Antikörper) zu.

3.3 Optimierung des α -c-myc ELISA

Für die weitere Optimierung des α -c-myc ELISAs wurde ein kompetitives Format, unter Verwendung eines c-myc Peptid Standards, entwickelt, um die Stabilität und Reproduzierbarkeit des Assays unabhängig von der Instabilität des r28M-Standards zu testen. Weiters können so eventuell auftretende Affinitätsunterschiede des Coating-Antikörpers für r28M, aufgrund von Fragmentierung oder Aggregation, evaluiert werden.

3.3.1 Entwicklung eines kompetitiven α -c-myc ELISA

Es wurde ein kompetitiver α -c-myc ELISA entwickelt, um anstelle von r28M einen unabhängigen Standard einsetzen zu können und somit hoffentlich stabilere und verlässlichere Messwerte zu erhalten. Für den Einsatz als Coating-Antigen wurde das c-myc-Peptid mittels Glutardialdehyd im Verhältnis 1:2 an BSA gekoppelt. Der Erfolg

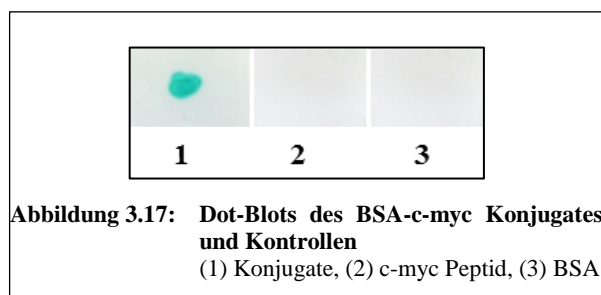
Ergebnisse

der Kopplung wurde mittels Dot-Blot und Detektion mit Maus- α -c-myc-HRP getestet.

3.3.1.1 Immobilisierung des c-myc Peptides

Das c-myc ist ein 10 Aminosäuren langes Peptid, mit einem Molekulargewicht von 1,2 kDa. Um nach dem Coaten des c-myc-Antigens an die MTP, noch für einen Antikörper zugänglich zu sein, muss das Peptid an ein größeres Träger-Protein gekoppelt werden. Als Träger-Protein wurde BSA (Sigma) verwendet, die Reaktion wurde über Glutaraldehyd gestartet und mit Natriumborhydrit gestoppt.

Dot-Blot



Die Einzelproben (c-myc Peptid und BSA) zeigen keine Reaktion mit dem α -c-myc Antikörper. Im Fall des Peptids liegt das an der Größe von nur 10 Aminosäuren, die direkt an die Membran gebunden und mit

Blockierungsreagenz „überdeckt“ keine Bindungsstelle mehr für den Antikörper bietet.

3.3.1.2 Stabilitätstest

Die Stabilität der Proteinkonzentration der Konjugate sowie des Peptids allein bei -20°C wurde mittels BCA bestimmt.

Tabelle 3.3: Konzentrationsbestimmung durch BCA

BCA	Tag 1	Tag 30	Tag 60	Stabilität
c-myc Peptid	1,26 mg/ml	1,28 mg/ml	1,3 mg/ml	100 %
BSA-c-myc Konjugate	7,57 mg/ml	7,3 mg/ml	7,24 mg/ml	95,6 %

Die Ergebnisse zeigen, dass das c-myc Peptid 100% stabil ist, während das BSA-c-myc-Konjugat einen Konzentrationsverlust von 4,4 % zeigt, womit aber trotzdem ein stabiles Produkt für das Coaten gegeben sein dürfte.

3.3.2 Erstellen einer Standardkurve für den kompetitiven ELISA

Zur Erstellung einer Standardkurve wurden verschiedene Coating-Konzentrationen der Peptid-Protein Konjugate getestet, Einfluss der Blockierungslösung sowie verschiedene Standard und Antikörperverdünnungen.

3.3.2.1 Einfluss der Konzentration des Coating-Antigens

Zur Optimierung dieses Schritts wurde die MTP mit drei unterschiedlichen Konzentrationen an Antigen über Nacht bei 4 °C gecoatet. Die Coating-Konzentrationen lagen bei 0,001; 0,01 bzw. 0,05 µg/ml in Coating-Puffer pH 9 verdünnt. Der c-myc Standard wurde in einer maximalen Konzentration von 20 µg/ml und einer Verdünnungsreihe von 1:3 eingesetzt. Die Detektion erfolgte mittels primärem und sekundärem Antikörper. Der primäre Antikörper wurde 1:1000 und der sekundäre Antikörper 1:5000 verdünnt.

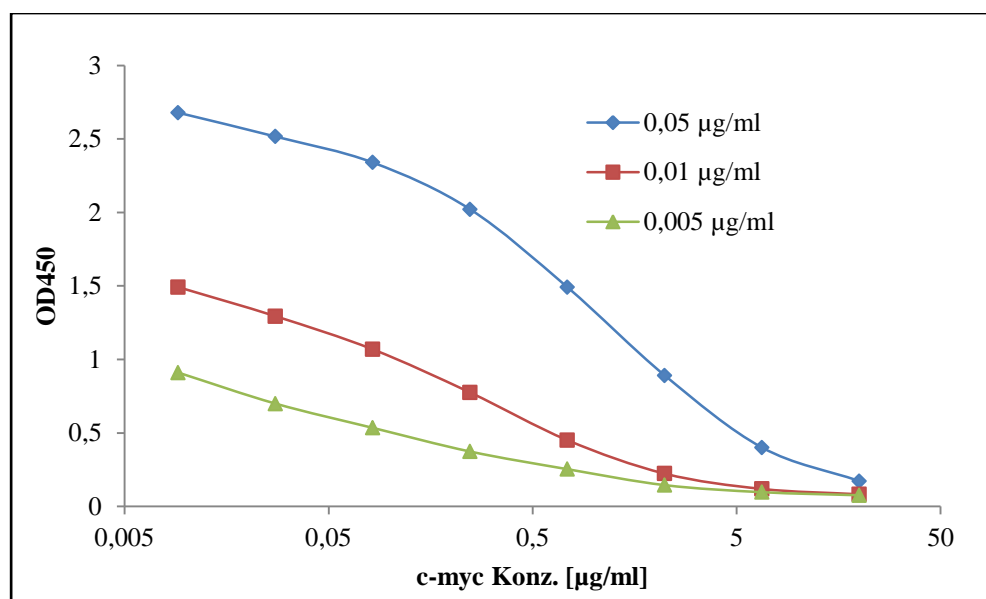


Abbildung 3.18: Einfluss der Konzentration des Coating-Antigens

Das Coating-Antigen (BSA-c-myc-Konjugat) wurde verschiedenen Konzentrationen: 0,05 µg/ml (blau); 0,01 µg/ml (rot); 0,005 µg/ml (grün), über Nacht bei 4 °C gecoatet. Die Detektion für alle drei Tests wurde unter gleichen Bedingungen durchgeführt: der primäre Antikörper wurde 1:1000 und der sekundäre Antikörper 1:5000 verdünnt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Coating-Konzentration von 0,05 µg/ml im Vergleich zu niedrigeren Konzentrationen zu einem erwünschten sigmoiden Verlauf der Standardkurve führt.

3.3.2.2 Einfluss der Blockierungslösung

Nachdem das Coating-Antigen aus BSA besteht, wurde als Alternative zu 2% BSA 2% PVA (Polyvinylalkohol) getestet. Die Platte wurde mit einer Konzentration von 0,05 µg/ml an Coating-Antigen über Nacht bei 4°C gecoatet. Der Blockierschritt wurde identisch für beide Tests (200 µl per well, 2 h bei RT inkubiert) durchgeführt. Der c-myc Standard wurde in einer maximalen Konzentration von 20 µg/ml und einer Verdünnungsreihe von 1:3 eingesetzt. Der primäre Antikörper wurde 1:1000 und der sekundäre Antikörper 1:5000 verdünnt.

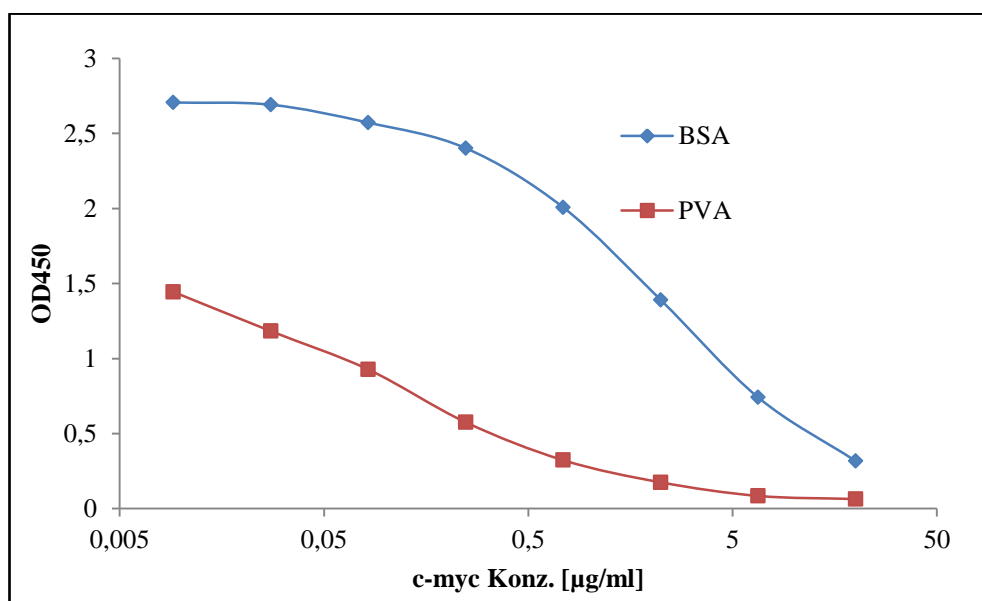


Abbildung 3.19: Einfluss der Blockierungslösung

Die Platte wurde mit einer Konzentration von 0,05 µg/ml an Coating-Antigen über Nacht bei 4°C gecoatet. Der Blockierschritt wurde identisch für beide Tests (200 µl per well, 2 h bei RT inkubiert) durchgeführt. Der primäre Antikörper wurde 1:1000 und der sekundäre Antikörper 1:5000 verdünnt.

Wie in Abbildung 3.19 ersichtlich wird, zeigt der Blockierschritt einen relativ großen Einfluss auf die Standardkurve. Das Blockieren mit BSA liefert im Vergleich zu PVA höhere OD-Werte und einen steileren Kurvenverlauf, was für eine bessere Zugänglichkeit des gecoateten c-myc-Peptids bei BSA-Blockierung spricht.

3.3.2.3 Konzentrationsmessung mittels α -c-myc ELISA

Im entwickelten Format wurde Kaninchen- α -c-myc (Antibodies online) und ein sekundärer α -Kaninchen-HRP eingesetzt. Der c-myc Standard wurde wie in Tabelle 2.6 beschrieben eingesetzt. Als Probe wurde r28M Monomer bzw. Dimer, unverdünnt, sowie ein rekombinantes GST-c-myc Standardprotein, 1:30 verdünnt eingesetzt, was ungefähr der Konzentrationen des Standards entsprechen sollte.

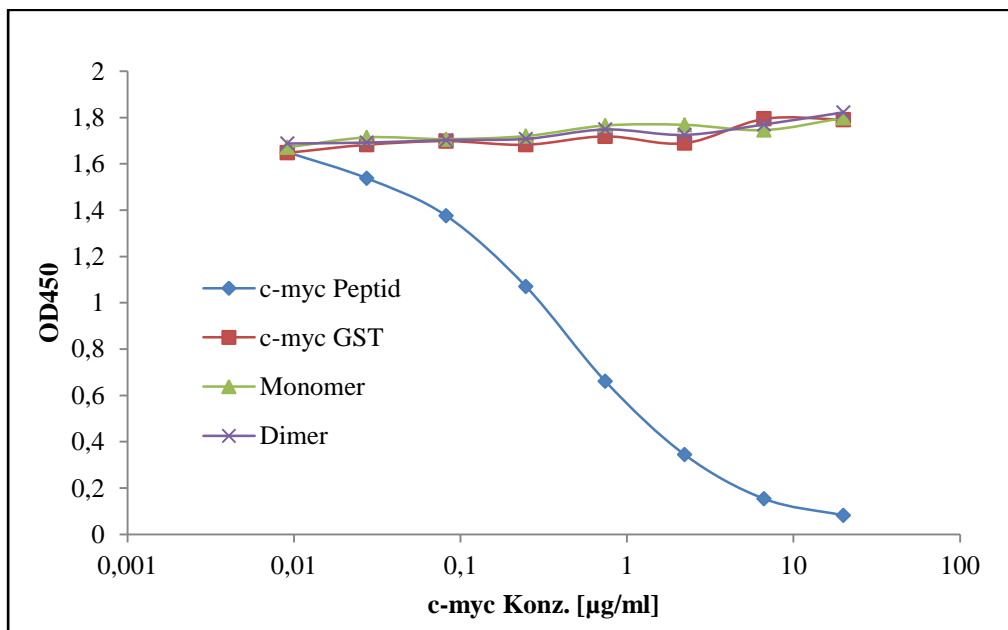


Abbildung 3.20: kompetitive c-myc Standardkurve sowie verschiedene r28M-Proben und GST-c-myc
Die Proben wurden mit Kaninchen- α -c-myc und α -Kaninchen HRP detektiert.

Aus der Abbildung 3.20 ist klar ersichtlich, dass die Standardkurve problemlos erstellt werden konnte, jedoch war eine Detektion von r28M oder GST-c-myc-Standardprotein auch in hohen Konzentrationen nicht möglich.

Das direkte Coaten von r28M zeigte allerdings, dass der Kaninchen-Antikörper in der Lage ist c-myc getaggetes Protein zu erkennen. Im Falle des kompetitiven ELISAs dürfte die Sensitivität und Affinität des Detektionsantikörpers für die Proben zu gering sein.

3.3.3 Optimierung des kompetitiven ELISA

Für die Optimierung des ELISA wurde ein Maus- α -c-myc-HRP (Invitrogen) als Detektions-Antikörper eingesetzt. Die Standardkurve wurde durch Erhöhung des

Ergebnisse

Coating-Antigens optimiert. Die MTP wurde mit 5 µg/ml c-myc-BSA-Konjugat über Nacht bei 4°C gecoatet. Die Detektion erfolgte mit Maus-α-c-myc HRP Antikörper 1:3000 verdünnt.

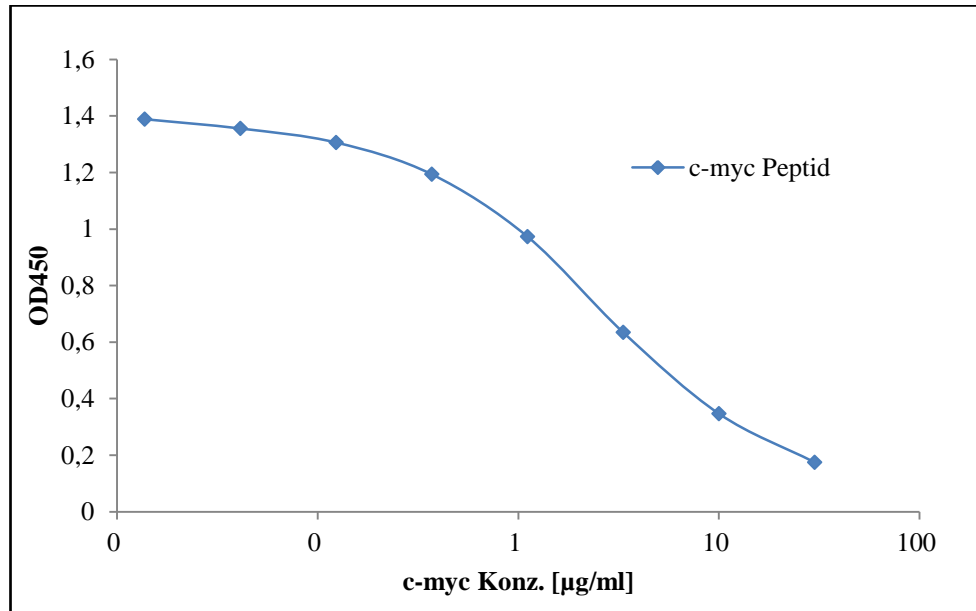


Abbildung 3.21: Kompetitiver ELISA, c-myc Standardkurve

Die Platte wurde mit 5 µg/ml c-myc-BSA-Konjugat über Nacht bei 4°C gecoatet. Die Detektion erfolgte mit Maus-α-c-myc HRP Antikörper 1:3000 verdünnt.

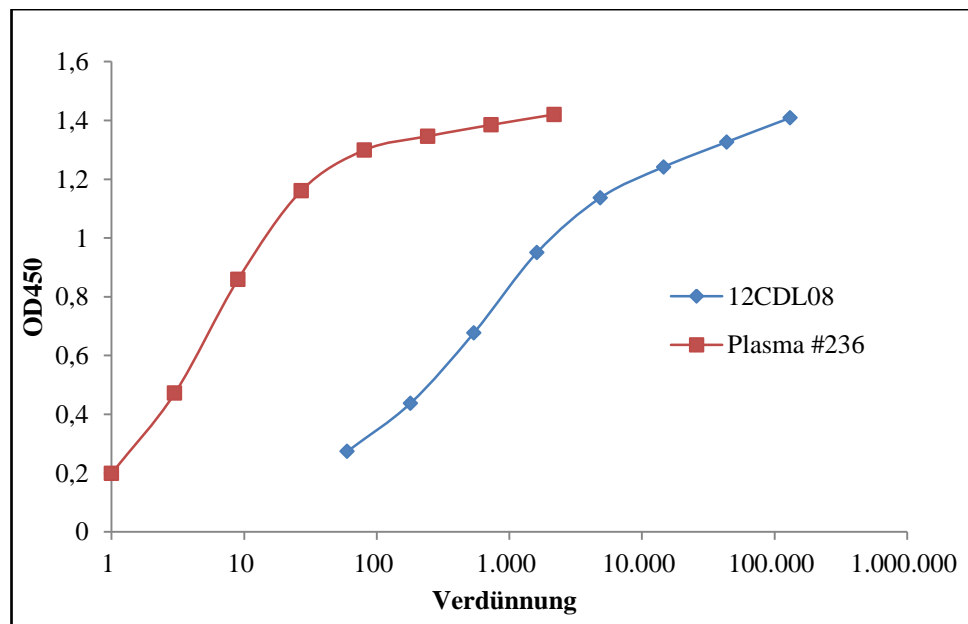


Abbildung 3.22: Kompetitiver ELISA: Messung verschiedener r28M-Proben (12CDL08 & #236)
Detektion erfolgte mittels Maus-α-c-myc-HRP Antikörper

Die Abbildung 3.21 zeigt die optimierte c-myc Standardkurve. Mit Maus- α -c-myc Antikörper war durch eine Erhöhung der Coating-Konzentration eine problemlose Detektierbarkeit der r28M Proben möglich.

3.3.4 Stabilitätstest mittels kompetitivem α -c-myc ELISA

Nachdem die Bedingungen für den kompetitiven ELISA ermittelt worden waren, wurden Stabilitätsversuche durchgeführt. Verschiedene r28M Proben wurden über einen Zeitraum von zwei Monaten gemessen, dies mithilfe der c-myc-Standardkurven ausgewertet und die erhaltenen Konzentrationen verglichen. Dafür wurden Aliquote der Proben über zwei Monate bei minus 20°C gelagert. Alle Messungen wurden unter gleichen Bedingungen durchgeführt (siehe Tabelle 2.7).

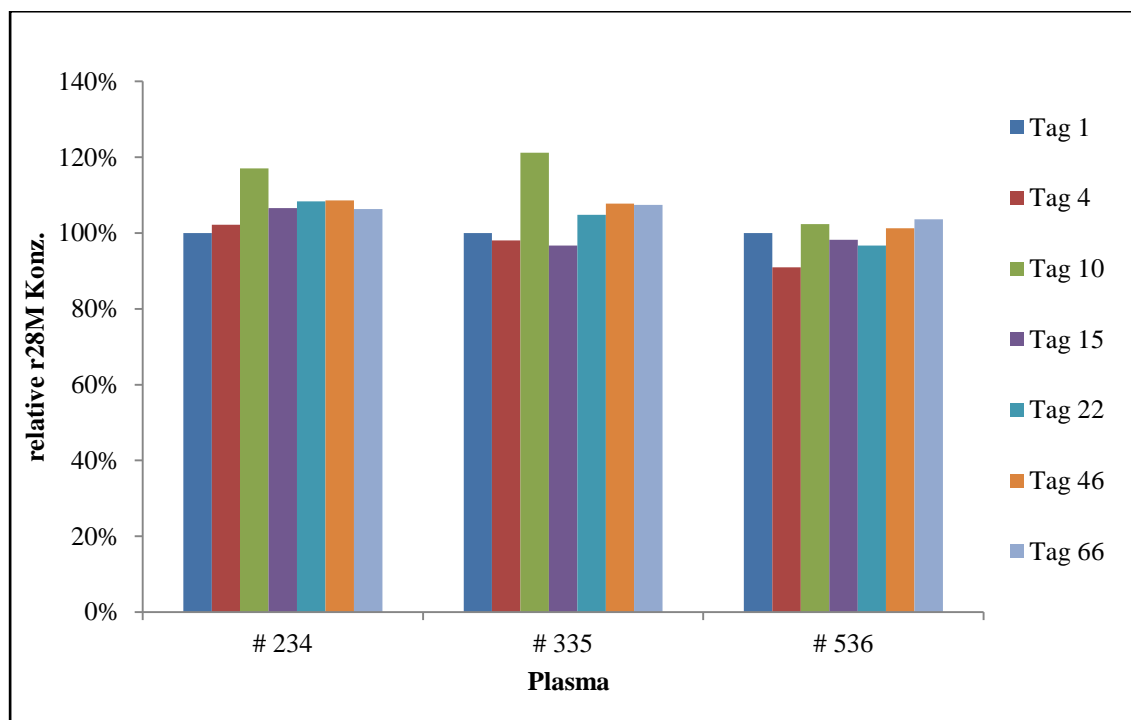


Abbildung 3.23: Stabilitätstest mittels kompetitiven α -c-myc ELISA

Die Plasmaproben wurden über einen Zeitraum von zwei Monaten und immer bei gleichen Bedingungen gemessen. 100% beziehen sich auf den Tag 1 der Messungen.

Die durchgeführten Stabilitätsversuche mit dem kompetitiven α -c-myc ELISA zeigen, dass die Plasmaproben (#234, #335 bzw. #536) stabile Messwerte liefern. Bei Berechnung der Mittelwerte ergibt sich eine maximale Standardabweichung von

Ergebnisse

8,3% (Plasma #335), was für ein kompetitives ELISA Format akzeptabel ist. Die hier dargestellten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die r28M Konzentration im Plasma bei Lagerung der Proben bei -20 °C stabil bleibt. Und es zu keinen, die Zugänglichkeit des Epitops beeinflussenden, Umlagerungen kommt.

3.3.4.1 Stabilitätstest des gereinigten r28M Antikörpers

Es wurde ein Stabilitätstest mit gereinigtem r28M (12CDL12) durchgeführt. Der beim Protein L- und α -c-myc Sandwich ELISA eingesetzte Standard 12CDL12 wurde bei 4 verschiedenen Bedingungen (PBS und PBS + Tween20 bei 4 und -20°C) gelagert. Zunächst wurde die Konzentration mittels BCA bestimmt, dann wurde der Antikörper mit entsprechenden Puffern auf 60 μ g/ml eingestellt, sodass jedes Aliquot die gleiche Konzentration enthielt. Die Messungen wurden im Zeitraum von knapp zwei Wochen durchgeführt. Die Bedingungen wurden identisch wie bei Kapitel 2.2.3.2.4 beschrieben für alle Messungen eingesetzt.

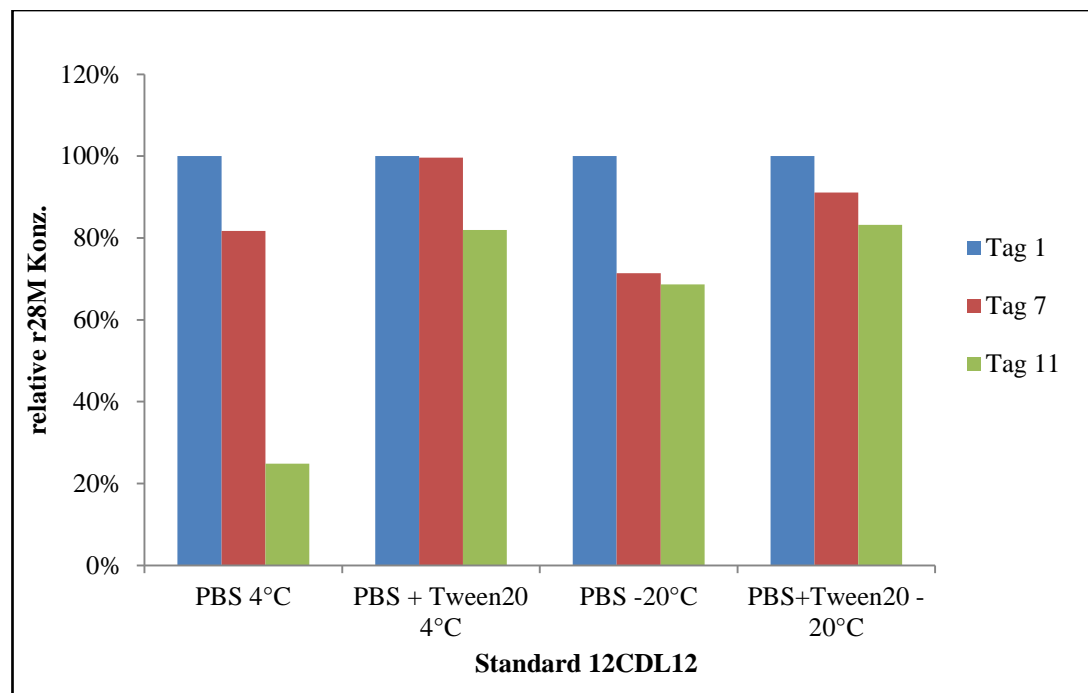


Abbildung 3.24: Stabilitätstest 12CDL12 mittels α -c-myc ELISA

Der Standard 12CDL12 wurde bei 4 verschiedenen Bedingungen (PBS und PBS + Tween20 bei 4 und -20°C) gelagert und immer die gleiche Konzentrationen (60 μ g/ml (BCA)) eingesetzt. 100% beziehen sich auf den Tag 1 der Messungen.

Wie aus der Abbildung 3.24 ersichtlich wird, nimmt die Konzentration des gereinigten r28M bei verschiedenen Lagerbedingungen unterschiedlich schnell ab. Den höchsten Konzentrationsverlust mit 75%, nach 11 Tagen zeigt die Lagerung in PBS bei 4°C. Obwohl die Zugabe von Tween20 zum Puffer, sowie die Lagerung bei -20°C die Abnahmegeschwindigkeit der Proteinkonzentration verringern, wird deutlich, dass die Stabilität des r28M nicht optimal ist. Die Verwendung als Standard für ELISA-Messungen führt, wie bereits beschrieben, zu ungenauen Messwerten.

3.4 Vergleichende Ergebnisse mittels Sandwich- und kompetitivem ELISA

Um die vergleichende Ergebnisse zu ermitteln, wurde das Plasma #234 (-20°C) mittels verschiedener ELISA gemessen.

Die Messungen wurden gegen folgende Standards durchgeführt:

- Sandwich ELISA: 11CDL02 in PBS + 0,05% Tween20 bei -20°C
- Kompetitiver ELISA: c-myc Peptide (Sigma) PBS bei -20°C

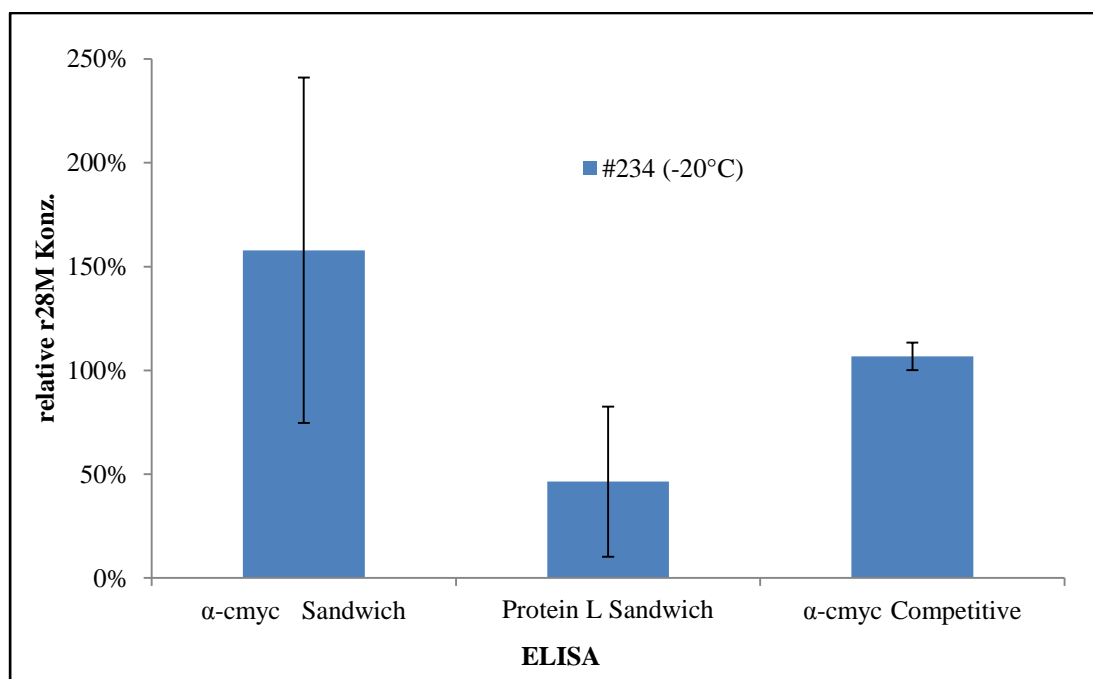


Abbildung 3.25: Vergleichende Ergebnisse mittels Sandwich- und kompetitiven ELISA
Die Messungen wurden über längere Zeiträume durchgeführt. 100% beziehen sich auf den Tag 1 der Messungen.

Ergebnisse

Vergleicht man die Ergebnisse des Plasmas #234 bei verschiedenen Assays, ist zu erkennen, dass der kompetitive ELISA eine signifikant höhere Stabilität zeigt als beide Sandwich Assays. Daraus lässt sich noch einmal schließen, dass die Schwankungen der Ergebnisse gemessen mittels Sandwich ELISA direkt auf die Instabilität des Standards zurückzuführen sind. Mittels des neu entwickelten kompetitiven c-myc ELISA lassen sich somit zukünftig nicht nur reproduzierbare Messungen der r28M Konzentration im Plasma durchführen, sondern auch Instabilitäten im aufgereinigten Produkt nachweisen.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Reinigungs- sowie Detektionsmethode für den bispezifischen single-chain r28M Antikörper entwickelt werden. Beide Methoden beruhen auf der Bindung des c-myc Antigens durch einen spezifischen α -c-myc Antikörper. Die Entwicklung dieser Methoden war von besonderem Interesse, da bislang eingesetzte Methoden für den rekombinanten Antikörper nicht ausreichend erfolgreich waren. Diese Arbeit lieferte einen wichtigen Beitrag zu Charakterisierung und Reinigung des r28M Antikörpers, und somit einen Schritt in die Richtung einer möglichen Immuntherapie für die Behandlung des Melanoms.

4.1 Reinigung des r28M Antikörpers

Für die Reinigung des r28M wurde im Rahmen dieser Arbeit eine HiTrap NHS-aktivierte Sepharose mit dem monoklonalen Maus- α -c-myc Antikörper (9E10), der spezifisch den c-myc Tag bzw. r28M erkennt, immobilisiert. Wie im Ergebnisteil zu sehen, zeigte die Kopplungsreaktion des 7,4 mg Liganden (9E10) eine Effizienz von rund 90% (Tabelle 3.1). In diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle kann der Aktivierungsgrad der Matrix spielen [Matson et al., 1988]. Es zeigt sich, dass „HiTrap NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow“ eine geeignete Säule für die Kopplung des 9E10 Antikörper ist.

Für die Reinigung des r28M Antikörpers wurde das Blutplasma transgener Rinder in einem Verhältnis 1:2 mit Bindungspuffer direkt ohne Vorreinigungsschritt (wie z.B. Proteinfällung) auf die Säule aufgetragen. Der erste Einsatz der α -c-myc Affinitätssäule zeigte, dass der r28M erfolgreich an die immobilisierte Matrix bindet. Nun zeigten die Eluate bei SDS-PAGE und Western-Blot Banden mit verschiedenen Größen (Abbildung 3.5 und Abbildung 3.6), was auf unspezifische Bindungen von Plasmaproteinen wie BSA und Bovines IgG zurückzuführen ist. Bei der SEC-HPLC-Analyse wurde bestätigt, dass ein hoher Anteil an BSA an die Affinitätsmatrix gebunden wurde. Dies kann auf mehrere mögliche Ursachen zurückgeführt werden. Es ist einerseits möglich, dass die Plasma Proteine unspezifisch an die Matrix

gebunden haben. Trotz effektiver Kopplung von 6,6 mg Liganden an die Matrix, könnten noch freie aktivierten Stellen in der Matrix verfügbar gewesen sein, die wahrscheinlich im Blockierungsschritt nicht ausreichend abgesättigt wurden. Im Gegensatz dazu steht in der Literatur, dass die unspezifische Bindung dagegen nicht sättigbar ist und linearlinear mit der Ligandenkonzentration zunimmt [Rehm, 2010]. Eine weitere mögliche Ursache ist, dass die Bedingungen für die Reinigung falsch gewählt wurden. Um dieses methodische Problem zu lösen wurde in dieser Arbeit versucht, anhand der Blutplasmaprobe #234 den Einfluss von verschiedenen Gerinnungshemmer (EDTA, ACD, Heparin und Citrat) auf die Reinigung des r28M zu testen. Es zeigte sich, dass die Gerinnungshemmer keinen Einfluss auf die Reinigung des r28M haben. Um zu überprüfen ob der pH-Wert des Bindungspuffers einen Einfluss auf die unspezifische Bindungen haben könnte, wurde das Rinderplasma mit PBS pH 7 und 8 auf die Affinitätssäule aufgetragen. Es konnte gezeigt werden, dass bei pH 7 eine höhere Plasmaprotein-Menge an die Matrix gebunden wurde als bei pH 8. Eine Ausnahme zeigte nur das ACD-Plasma, wo kein Unterschied ersichtlich war (Abbildung 3.4). Ein direkter Einfluss des pH-Wertes auf die Bindung des r28M konnte durch diesen Test nicht nachgewiesen werden.

Vergleich von α -c-myc- und Protein L Reinigung

Protein L ist ein Immunglobulin-bindendes Protein. Es bindet spezifisch an die variable Domäne der leichten κ -Kette eines Immunglobulins. [Nilson et al., 1993], die auch beim r28M Antikörper vorkommen. Hingegen bindet der 9E10-Antikörper (Maus- α -c-myc-Antikörper) den c-myc Tag, welcher an das C-terminale Ende des r28M fusioniert ist [Grosse-Hovest et al., 2004].

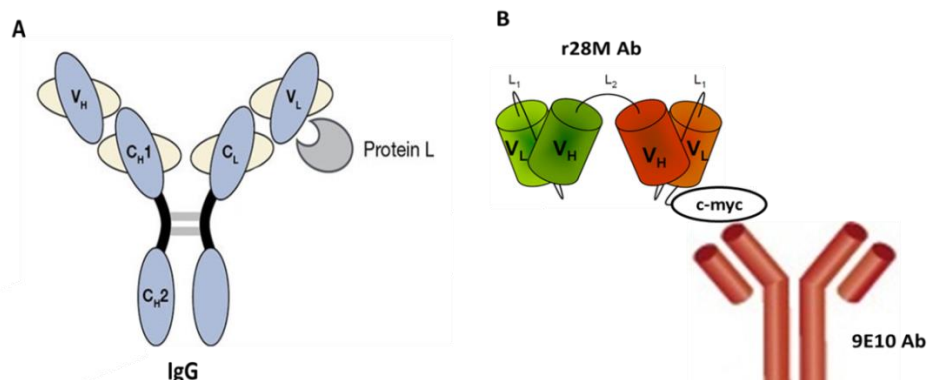


Abbildung 4.1: Vergleich zwischen Protein L und α -c-myc Reinigung

(A) Protein L: bindet spezifisch an die variable Domäne der leichten κ -Kette eines Ig, die auch beim r28M Antikörper vorkommen. (B) α -c-myc Antikörper (9E10): bindet spezifisch an c-myc Tag des rekombinanten bi-scFv Antikörpers.

Wie im Ergebnisteil erwähnt, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Judith Rudolf (CDIIT) eine SEC-HPLC-Analyse durchgeführt und der Vergleich zwischen Protein L und α -c-myc-Reinigung dargestellt. Anhand der SEC-Profile, aber auch im elektrophoretisch (SDS-PAGE und Western-Blot) konnte gezeigt werden, dass die α -c-myc Affinitätssäule eine signifikant geringere Menge an bovinem IgG bindet als die Protein L Affinitätssäule. Dies ist ein wesentlicher Vorteil für den ersten α -c-myc Einsatz gegenüber der bislang eingesetzten Protein L Chromatographie. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist jedoch, dass eine hohe BSA-Menge unspezifisch mit gereinigt wird.

Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die α -c-myc Affinitätschromatographie eine vielversprechende Alternative zur bisherigen Protein L-Reinigung darstellt. Die α -c-myc Chromatographie sollte nach der Optimierung hinsichtlich der genauen Bedingungen aufgrund ihrer spezifischen Bindung (c-myc- α -c-myc) eine große Bedeutung für die Reinigung des r28M erlangen. Reduzierung der Kosten aufgrund weniger Vorreinigungsschritte und uneingeschränkter Verfügbarkeit des 9E10 Antikörpers, sowie Erhöhung der Reinheit des r28M stellen wünschenswerte und erreichbare Ziele dar.

Im Hinblick auf diese Untersuchungen müssen in zukünftigen Experimenten zur Verringerung der unspezifischen Bindungen Optimierungen der Kopplungs- und Reinigungsbedingungen durchgeführt werden. Weiters sollte die α -c-myc Reinigung des r28M Antikörpers in Kombination mit anderen (affinitäts-) chromatographischen Verfahren, als sogenannte Polishing Schritte, durchgeführt werden.

4.2 Detektion des r28M Antikörpers

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines α -c-myc ELISA für die Detektion bzw. quantitative Bestimmung des r28M Antikörpers im Plasma transgener Rinder. Der Nachweis beruht auf der Detektion des c-myc Tags des rekombinanten Antikörpers und wurde in zwei verschiedenen Formaten (Sandwich

Diskussion

und kompetitiv) entwickelt. Als Referenzmethode wurde der Protein L ELISA (Sandwich Format) verwendet.

Um möglichst gute Ausgangsbedingungen für die Durchführung des ELISA zu schaffen, wurden in Vorversuchen die jeweiligen Konzentrationen an Coating-, Primär- und Sekundärantikörper optimiert. Nachdem für den Sandwich ELISA kein entsprechendes Standardprotein verfügbar war, wurde für die Messungen gereinigter r28M Antikörper als Standard eingesetzt. Im Rahmen der Lagerbedingungen dieses Standards konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der gereinigte r28M Antikörper in PBS + 0,05% Tween20, gelagert bei -20°C, stabiler ist als nur in PBS alleine. Es scheint jedoch, dass der Zusatz von Tween20 eine gewisse Schutzfunktion auf den Antikörper hinsichtlich seiner Lagerstabilität bei -20°C ausübt. Tween20 ist ein viskoses Detergens, das die Proteine stabilisiert und damit die Aggregation während Gefrier-Auftau-Prozess verhindert [Kreilgaard et al., 1998].

Nachdem nun die geeigneten Bedingungen für den α -c-myc Sandwich ELISA festgelegt worden waren, wurde ein Stabilitätstest mittels Protein L- und α -c-myc ELISA gleichzeitig durchgeführt. Dafür wurden verschiedenen Plasmaproben transgener Rinden verwendet. Wie im Ergebnissteil zu sehen ist, erbrachte weder Protein L noch α -c-myc ELISA im Sandwich Format stabile Ergebnisse (Abbildung 3.16). Der Grund dafür wurde auf die Instabilität des r28M Standards zurückgeführt. Geringe Abweichungen der Standardkurve führten zu signifikanten Unterschieden der Antikörperkonzentration im Plasma (Abbildung 3.14).

Um anstelle von aufgereinigtem r28M einen unabhängigen Standard (c-myc Peptid) für den α -c-myc ELISA einsetzen zu können, wurde ein kompetitives Format entwickelt. Für die Detektion des r28M wurde zunächst ein polyklonaler Kaninchen- α -c-myc Antikörper eingesetzt. Während den Optimierungsversuchen trat das Problem auf, dass der polyklonale Antikörper, obwohl er im Sandwich-Format problemlos den c-myc Tag erkannte, im kompetitiven Format nicht an r28M band. Bei der Ersetzung des polyklonalen Antikörpers durch einen monoklonalen Maus- α -c-myc-HRP Antikörper (9E10), konnte der r28M Antikörper problemlos detektiert werden. Für die Reaktion des polyklonalen α -c-myc Antikörper im Vergleich mit dem monoklonalen Antikörper gibt es einige mögliche Erklärungen. Es könnte zum einen daran liegen, dass der polyklonale Antikörper eine geringere Sensitivität für

den c-myc Tag aufweist, weiters ist sicher, dass die Reinheit der c-myc spezifischen Antikörper zur gesamten polyklonalen Mischung ungünstiger ist, als bei einem selektierten monoklonalem Antikörper.

Um die Stabilität und Reproduzierbarkeit des kompetitiven Assays mit c-myc Peptid als Standard zu testen, wurden drei verschiedene r28M Plasmaproben über einen Zeitraum von zwei Monaten und unter gleichen Bedingungen gemessen. Mit diesem Stabilitätstest konnte eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewährleistet werden. Die Standardabweichung innerhalb von zwei Monate blieb gering, sie betrug max. 8,3%, was den kompetitiven α -c-myc ELISA zu einer stabilen Methode für die Konzentrationsbestimmung des r28M macht.

Um sicher zu stellen, dass die Abweichungen der Ergebnisse beim Sandwich ELISA auf die Instabilität des eingesetzten Standards zurückzuführen sind, wurde mittels optimierten kompetitiven ELISA ein Stabilitätstest mit aufgereinigtem r28M durchgeführt. Es konnte nachgewiesen werden, dass trotz Lagerung des Antikörpers in PBS + 0,05% Tween20 bei -20°C, ein Konzentrationsverlust von 20% auftrat. Das ist ein weiterer Hinweis darauf, dass der aufgereinigte r28M kein geeigneter Standard für den Einsatz im Sandwich ELISA war.

Vergleich von kompetitiven- und Sandwich ELISA

Neben der Stabilitätsanalyse der einzelnen Assays wurde im Rahmen dieser Arbeit eine vergleichende Analyse mit kompetitiven- und Sandwich (α -c-myc bzw. Protein L) ELISA durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass der kompetitive ELISA im Vergleich zum beiden Sandwich ELISAs signifikant höhere Stabilität lieferte (Abbildung 3.25).

Der kompetitive α -c-myc ELISA hat folgende Vor- bzw. Nachteile gegenüber den Protein L und α -c-myc Sandwich-ELISA:

Nachteile:

- geringere Sensitivität; die Messungen im kompetitiven Format müssen mit unverdünntem Plasma durchgeführt werden
- Notwendigkeit eines Umrechnungsfaktors

Diskussion

- Das c-myc-Peptid und r28M besitzen unterschiedliche Molekulargewichte
- Der α -c-myc-Antikörper weist unterschiedliche Affinitäten für Peptid und bi-scFv-Antikörper auf.

Vorteile:

- höhere Stabilität bei wiederholten Messungen
- geringerer Zeitaufwand zur Durchführung des Verfahrens, da die Inkubation des Analyten und Detektions-Antikörper gleichzeitig stattfindet.
- durch den unabhängigen Peptid-Standard nicht nur für Konzentrationsbestimmungen, sondern auch für die Charakterisierung des aufgereinigten r28M hinsichtlich Schwankungen in der immunoanalytischen Detektierbarkeit, einsetzbar.

Zusammenfassung und Ausblick

Insgesamt zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass der kompetitive ELISA die bei Weitem stabilere Methode ist als die beide Sandwich ELISAs. Der entwickelte kompetitive α -c-myc ELISA stellt eine durchaus interessante Alternative zur Protein L ELISA für die Konzentrationsbestimmung des r28M Antikörpers dar, da der unabhängige c-myc Peptid-Standard eine sehr gute Stabilität aufweist. In weiteren Versuchen können die Bedingungen noch optimiert werden, um die Sensitivität des Assays zu erhöhen.

5 Zusammenfassung

Der bispezifische single-chain-Antikörper r28M wurde für prospektive immuntherapeutischen Anwendung bei Patienten mit Melanom konzipiert. Der Antikörper wird im Plasma transgener Rinden produziert und ist in der Lage, humane T-Zellen über den CD28-Rezeptor, sowie Melanom-Zellen über das Membranprotein CSPG4 zu binden. Gleichzeitige Bindung beider führt zur Aktivierung der Immunzellen und weiter zum Abtöten der Tumorzellen.

Der rekombinante scFv Antikörper r28M wird aus Rinderplasma gereinigt. Zu diesem Zweck können mehrere Strategien angewendet werden. Eine Möglichkeit ist die Verwendung von Protein L aus *Peptostreptococcus magnus*, das die Ig mancher Spezies über κ -Leichtketten bindet. Der r28M wurde am C-Terminus mit einem c-myc-Tag versehen. Ein monoklonaler α -c-myc-Antikörper (9E10) in Zellkultur hergestellt, aber auch kommerziell erhältlich, wurde in verschiedenen Arten eingesetzt. 9E10 bindet spezifisch an c-myc-Tag, was eine Alternative zur Reinigung und auch Detektion und Quantifizierung des r28M darstellt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung zwei verschiedenen Methoden, die auf der Bindung des c-myc-Tags basieren: eine Affinitätschromatographie für die Reinigung des r28M aus Rinderplasma sowie ein ELISA für die spezifische Detektion bzw. die Quantifizierung des r28M.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine α -c-myc-Affinitätsmatrix zur chromatographischen Reinigung des r28M entwickelt werden. Der 9E10 Antikörper wurde erfolgreich als Ligand an eine NHS-aktivierte Sepharose gekoppelt. r28M wurde dann via FPLC mittels α -c-myc Affinitäts säule gereinigt. Um den Einfluss der Pufferbedingungen auf die Affinitätsreinigung des rekombinanten Antikörpers zu testen, wurde das Rinderplasma mit verschiedenen Puffern verwendet. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen verschiedenen Bedingungen nachgewiesen werden.

Zusammenfassung

Die Entwicklung des α -c-myc ELISA umfasste die Optimierung der Bedingungen für die Konzentrationsbestimmung des r28M im Plasma, sowie Durchführen mehrerer Messungen über längere Zeiträume, um die Reproduzierbarkeit der ELISA-Ergebnisse zu testen. Die Messungen mittels kompetitivem α -c-myc ELISA Format wiesen eine signifikant bessere Reproduzierbarkeit auf, als die mittels Sandwich-Format ermittelten Konzentrationen. Der wesentliche Vorteil des kompetitiven gegenüber dem Sandwich ELISA ist die Verwendung des c-myc Peptids als unabhängigen Standard, dessen Konzentration bei -20 °C Lagerung stabil bleibt.

Weiters konnte in dieser Arbeit die Reproduzierbarkeit der entwickelten Assays getestet, sowie vergleichende Ergebnisse mit bisherigen Protein L dargestellt werden.

6 Literaturverzeichnis

Aigner A., Neumann S., (1997) *Immunchemie. Grundlagen, Anwendung, Perspektiven.* G. Fischer Verlag Stuttgart. S. 72-85

Akerstrom B. and Bjoerk. L., (1989) Protein L: an immunoglobulin light chain binding protein. *J. Biol. Chem.* 264: 19740–19746.

Aravidis C, Panani AD, Kosmaidou Z, Thomakos N, Rodolakis A, Antsaklis A. (2012). Detection of Numerical Abnormalities of Chromosome 9 and p16/CDKN2A Gene Alterations in Ovarian Cancer with Fish Analysis. *Anticancer Res*; 32(12): 5309-13.]

Avrameas S, Guilbert B. et al. (1971) Enzymo-immunological determination of proteins with the aid of immunoabsorbents and enzyme-labelled antigens. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D.* 273 (25): 2705-7.

Balch CM, (1992) Cutaneous melanoma: prognosis and treatment results worldwide. *Semin Surg Oncol.* 8(6):400-14.

Besenfelder U. and Brem, G. (1993) Laparoscopic embryo transfer in rabbits. *J. Reprod. Fertil.* 99, 53–56.

Biery, K. A., Bondioli K. R. and De Mayo F. J., (1988). Gene transfer by pronuclear injection in the bovine. *Theriogenology* 29:224.

Björck L., (1988). Protein L. A novel bacterial cell wall protein with affinity for Ig L chains. *J Immunol.* 140 (4): 1194-7.

Blank K, Lindner P, Diefenbach B, Plückthun A. (2002) Self-immobilizing recombinant antibody fragments for immunoaffinity chromatography: generic, parallel, and scalable protein purification. *Protein Expr. Purif*; 24 (2) :313-22.

Bluemel C, Hausmann S, Fluhr P, Sriskandarajah M, Stallcup W, Baeuerle P, Kufer P., (2010) Epitope distance to the target cell membrane and antigen size determine

the potency of T cell-mediated lysis by BiTE antibodies specific for a large melanoma surface antigen. *Cancer Immunol Immunother* 59:1197–1209

Bratke K., Luttmann W., Küpper M., Myrtek D.(2009) *Der Experimentator Immunologie*. Elsevier. Springer; 978-3-8274-2026-8

Braun-Falco Otto (2005). *Dermatologie und Venerologie*, Auflage 5. Springer. Kapitel 58: 1345-1355

Brem, G., Brenig, B., Goodman, H. M., Selden, R. C., Graf, F., Kruff, B., Springmann, K., Hondele, J., Meyer, J., Winnacker, E. L. (1985) Production of transgenic mice, rabbits and pigs by microinjection into pronuclei. *Zuchthygiene*; 20: 241–245.

Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei MG, Golstein P (1987). A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature* 16-22; 328(6127):267-70.

Bumol TF, Reisfeld RA. (1982) Unique glycoprotein-proteoglycan complex defined by monoclonal antibody on human melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; 79(4):1245-9.

Campoli M., Chang C., Kageshita T., Wang X., McCarthy J., Ferrone S. (2004). Human high molecular weight-melanoma-associated antigen (HMW-MAA): a melanoma cell surface chondroitin sulfate proteoglycan (MCSP) with biological and clinical significance. *Critical Reviews in Immunology*, 24, 267-296

Cheung DT, Nimni ME. (1982) Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde II. Reaction with monomeric and polymeric collagen. 10(2):201-16.

Cole MD, McMahon SB. (1999) The Myc oncoprotein: a critical evaluation of transactivation and target gene regulation. *Oncogene*; 18(19):2916-24.

Cuatrecasas P, Wilchek M, Anfinsen CB (1968). Selective enzyme purification by affinity chromatography. 61 (2) :636-43

Cutler P. (2004). Methods in Molecular Biology, Vol. 244; Protein Purification Protocols second Edition Humana Press; 139-51.

Dawson MR., Polito A., Levine JM., Reynolds R., (2003) NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. Mol Cell Neurosci; 24(2):476–488.

Dübel S., Rohrbach P., Schmiedl A., (2004) Rekombinante Antikörper, Werkzeuge gegen Krebs, Infektionen und Autoimmunerkrankungen. DOI: 10.1002/biuz.200410267

Dustin Michael and Shaw Andrey. (1999) Costimulation: Building an Immunological Synapse. Science Vol. 283 no. 5402 pp. 649-650

Engvall E., Perlmann P. (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry. (9): 871-4.

Evan GI, Lewis GK, Ramsay G, Bishop JM. (1985) Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product Mol Cell Biol. 5:3610-6.

Evelyn Wolf, Robert Hofmeister, Peter Kufer, Bernd Schlereth, Patrick A. Baeuerle (2005) BiTEs: bispecific antibody constructs with unique anti-tumor activity. DDT Volume 10, 1237-1244.

Ey PL, Prowse SJ, Jenkin CR. (1978) Isolation of pure IgG, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose. Immunochemistry. 15:429-436

Fritsch P. (2009) Dermatologie und Venerologie für das Studium. Springer: 398-409

Fuchs P, Breitling F, Little M, Dübel S. (1997) Primary structure and functional scFv antibody expression of an antibody against the human protooncogen c-myc. Hybridoma; 16(3):227-33.

GE Healthcare Bio-Sciences (2007). Affinity Chromatography Principles and Methods. 18-1022-29 AE.

Godar Dianne. (2010) Worldwide Increasing Incidences of Cutaneous Malignant Melanoma. Journal of Skin Cancer Volume 2011, Article ID 858425, 6 pages.

Graille M, Harrison S, Crump MP, Findlow SC, Housden NG, Muller BH, Battail-Poirot N, Sibai G, Sutton BJ, Taussig MJ, Jolivet-Reynaud C, Gore MG, Stura EA. (2002). Evidence for plasticity and structural mimicry at the immunoglobulin light chain-protein L interface. J Biol Chem. 6;277(49):47500-6

Greil R, Fasching B, Loidl P, Huber H. (1991) Expression of the c-myc proto-oncogene in multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia: an in situ analysis. Blood; 78(1):180-91.

Grin-Jorgensen CM, Rigel DS, Friedmann RJ (1992) The worldwide incidence of malignant melanoma. JB Lippincott, Philadelphia, S 27-39.

Grosse-Hovest L, Hartlapp I, Marwan W, Brem G, Rammensee H. G, Jung G, (2003) A recombinant bispecific single-chain antibody induces targeted, supra-agonistic CD28-stimulation and tumor cell killing. Eur J Immunol. 33 (5) :1334-40.

Grosse-Hovest L, Müller S, Minoia R, Wolf E, Zakhartchenko V, Wenigerkind H, Lassnig C, Besenfelder U, Müller M, Lytton S, Jung G, Brem G, (2004) Cloned transgenic farm animals produce a bispecific antibody for T cell-mediated tumor cell killing. Proc Natl Acad Sci US A. 101 (18) :6858-63.

Grosse-Hovest L, Wick W, Minoia R, Weller M, Rammensee H. G, Brem G, Jung G, (2005) Supraagonistic, bispecific single-chain antibody purified from the serum of cloned, transgenic cows induces T-cell-mediated killing of glioblastoma cells in vitro and in vivo. Int J Cancer; 117(6):1060-4.

Große-Hovest L., Brandl M., Dohlsten M., Kalland T., Wilmanns W. and Jung G. (1999) Tumor growth inhibition with bispecific antibody fragments in a syngeneic mouse melanoma model: The role of targeted T cell costimulation via CD28. Int. J. Cancer 80: 138–144.

Hafner C. (2010) CTLA4-Antikörper in der Therapie des metastasierten Melanom. Springer-Verlag 61:808–810

Hage DS (1999) Clinical Chemistry Affinity Chromatography: A Review of Clinical Applications 45:5 593–615.

Hage DS . Katz E Eksteen R Shoenmakers P Miller N (1998). Handbook of HPLC. Marcel Dekker New York: 483 -498.

Hammer R. E., Pursel V. G., Rexroad C. E., Wall R. J., Bolt D. J., Ebert K. M., Palmiter R. D. & Brinster R. L. (1985). Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. Nature 315, 680–683.

Hearn MTW, Davies JR (1990). Evaluation of factors which affect column performance with immobilized monoclonal antibodies. Model studies with a lysozyme-antilysozyme system. J Chromatogr 512:23 – 39

Hillman MC, Yang LS, Sun S, Duke JL, O'Neil KT, Kochie JE, Karjoo A, Nath P, Breth LA, Murphy K, Ross OH, Burn TC, Hollis GF, Wynn R. (2001) A comprehensive system for protein purification and biochemical analysis based on antibodies to c-myc peptide. Protein Expr Purif. 23(2):359-68.

Hilpert K, Hansen G, Wessner H, Küttner G, Welfle K, Seifert M, Höhne W. (2001) Anti-c-myc antibody 9E10: epitope key positions and variability characterized using peptide spot synthesis on cellulose. Protein Eng; 14(10):803-6.

Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. (2010) Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. N Engl J Med; 363:711-723

Holland PT, Cargill A, Selwood AI, Arnold K, Krammer JL, Pearce KN. (2011) Determination of soluble immunoglobulin G in bovine colostrum products by Protein G affinity chromatography-turbidity correction and method validation. J Agric Food Chem. 25;59(10):5248-56

Iida J., Meijne A., Spiro R., Roos E., Furcht L., McCarthy J. (1995). Spreading and focal contact formation of human melanoma cells in response to the stimulation of both melanoma-associated proteoglycan (NG2) and alpha 4 beta 1 integrin. Cancer Research, 55, 2177-2185

Iida. J., Pei, D., Kang, T., Simpson, M., Herlyn, M., Furcht, L., McCarthy, J. (2001). Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan regulates matrix metalloproteinase-dependent human melanoma invasion into type I collagen. *Journal of biological Chemistry*, 276, 18786-18794

Kathy D McCoy¹ and Graham Le Gros (1999). The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses. *Immunology and Cell Biology* 77, 1–10

Keith D. Bartle, Norman Taylor, Michael J. Mulligan, Derek G. Mills, Christopher Gibson (1983) Evaporative analyser as a mass detector in the size-exclusion chromatography of coal extracts *C. Fuel.* 62, 1181

Kerényi L., Gallyas F. (1973). Über probleme der quantitativen auswertung der mit physikalischer entwicklung versilberten agarelektrophoretogramme. Elsevier, ISSN 0009-8981, ZDB-ID 1499920-1 Vol. 47, No. 3, p. 425-436

Köhler G., Milstein C., (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 495-7.

Kreilgaard L, Jones LS, Randolph TW, Frokjaer S, Flink JM, Manning MC, Carpenter JF (1998). Effect of Tween 20 on freeze-thawing- and agitation-induced aggregation of recombinant human factor XIII. *J Pharm Sci.* 87(12):1597-603.

Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227 (5259) :680-5.

Lateef SS , Gupta S , Jayathilaka LP , Krishnanchettiar S , Huang JS , Lee BS (2007). An Improved Protocol for Coupling Synthetic Peptides to Carrier Proteins for Antibody Production Using DMF to Solubilize Peptides . *J Biomol Tech* Jul; 18 (3) :173-6.

Lindmark R, Biriell C, Sjöquist J. (1981) Quantitation of specific IgG antibodies in rabbits by a solid-phase radioimmunoassay with ¹²⁵I-protein A from *Staphylococcus aureus*. *Scand J Immunol.* 14:409-420.

Luttmann W., Bratke K., Küpper M., Myrtek D.(2004) *Der Experimentator Immunologie.* Elsevier Spektrum akademischer Verlag, 1-23,35-40,103-118

Literaturverzeichnis

Matson RS, Little MC. (1988), Strategy for the immobilization of monoclonal antibodies on solid-phase supports. *J Chromatogr.* 23; 458:67-77.

Migneault I, Dartiguenave C, Bertrand M, Waldron K (2004). Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques* 37:790-802

Milstein C, Cuello AC (1983) Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry. *Nature* 305:537–540

Monzon J , Liu L , Brill H , Goldstein AM , Tucker MA , Von L , McLaughlin J , Hogg D , Lassam NJ . (1998) CDKN2A Mutations in Multiple Primary Melanomas. *N Engl J Med*; 338:879-887

Morgan, A., Galloway, D., Reisfeld, R. (1981). Production and characterization of monoclonal antibody to a melanoma specific glycoprotein. *Hybridoma*; 1 (1) :27-36.

Narayanan SR (1994) Preparative affinity chromatography of proteins. *J. Chromatog. A* 658: 237-258

Nilson BH, Lögberg L, Kastern W, Björck L, Akerström B.(1993) Purification of antibodies using protein L-binding framework structures in the light chain variable domain. *J Immunol Methods* 26; 164(1):33-40.

O'Shannessy DJ (1990) Hydrazido-derivatized supports in affinity chromatography. *J Chromatogr*, 510:13-21.

Pluschke G, Vanek M, Evans A, Dittmar T, Schmid P, Itin P, Filardo EJ, Reisfeld RA (1996). "Molecular cloning of a human melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan". *Proc Natl Acad Sci USA* (18): 9710–5

Porath J.(1992). Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expr Purif.*; 3(4):263-81

Raem A., Rauch P. (2007) Immunoassays. Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag; 51-62

Rüttinger D., Zugmaier G., Nagorsen D., Reinhardt C., Baeuerle P. A. (2008) BiTE®-Antikörper: Durch Bispezifität T-Lymphozyten gegen Tumorzellen richten. Journal Onkologie. Zeitschrift online - Ausgabe 04-08

Schmiedl A, Dübel S: (2004) Rekombinante Antikörper und Phagen-Display; in: Molekulare Biotechnologie; hrsg. v. Wink Michael; 1. Auflage; Wiley-VCH, Weinheim, 1-55

Schulz G, Bumol TF, Reisfeld RA. (1983) Monoclonal antibody-directed effector cells selectively lyse human melanoma cells in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci USA; 80(17):5407-11.

Schulz-Jander Daniel, (1999) Entwicklung von immunologischen Methoden zum Nachweis von Nitroaromaten im aquatischen System, Herbert Utz Verlag. 105-109

Silva C. J., Sousa F., Gübitz G., Cavaco-Paulo A. (2004) Chemical Modifications on Proteins Using Glutaraldehyde. Food Technol. Biotechnol. 42 (1) 51–56

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem. 1985 Oct;150(1):76-85.

Ströhlein M.A., Heiss M.M. (2012). Bispezifische Antikörper. Springer-Verlag 18:779–787

Towbin, H. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A. 76(9):4350-4.

Walker, John M. (1984). Methods in Molecular Biology, Volume 2. Clifton, NJ 1:349-355.

Wiechelman K.J (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. Anal Biochem; 175(1):231-7.

Literaturverzeichnis

Yarmush ML, Weiss AM, Antonsen KP, Odde DJ, Yarmush DM (1992)
Immunoaffinity purification: basic principles and operational considerations.
Biotechnol Adv 10:413–446

Affinity Chromatography; Principles and Methods (Handbooks from GE Healthcare).
http://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1334615650802/litdoc18102229AE_20121107154820.pdf (06.11.2012).

Analytical Chemistry, Department of Chemistry, University of Konstanz Analytische Chemie I.
<http://www.uni-konstanz.de/agprzybylski/chemie/files/Grundlagen%20Chromatografie.pdf> (06.11.2012).

Chemiereport.at/Austrian Life Sciences.
<http://www.chemiereport.at/marktanalyse-sagt-boom-neuer-ansaezte-der-krebstherapie-vorau> (15.01.2013).

GenWay Biotech, Inc. Sandwich ELISA
<http://www.genwaybio.com/services/sandwich-elisa> (16.02.2013).

Kreatech Diagnostics. C-MYC.
<http://www.kreatech.com/products/repeat-freetm-poseidontm-fish-probes/hematology/c-myc-8q24.html> (15.01.2012).

Laborpraxis. Wirkmechanismus des BiTE-Antikörpers.
<http://www.laborpraxis.vogel.de/index.cfm?pid=4038&pk=169034&p=1> (15.01.2013).

Statistik Austria. Krebserkrankungen; Letzte Änderung: 11.10.2012.
http://www.statistik.at/web_de/statistiken/gesundheit/krebserkrankungen/haut/index.html (20.12.2012).

Otz Tina, 2008
http://tobias-lib.uni-tuebingen.de/volltexte/2008/3316/pdf/Dissertation_Tina_Otz.pdf (10.01.2013)

World Health Organization. Skin cancers. Accessed June 4, 2010.
<http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html> (15.01.2013).

„Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.“

7 Anhang

7.1 r28M AS-Struktur

```

1  DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVE YYVTSLMQWY QOKPGQPPKL
51  LIFAASNVES GVPARFSGSG SGTNFSLNII PVDEDDVAMY FCQQRKVPY
101 TFGGGTKLEI KRGGGGSGGG GSGGGGSQVK LQQSGPGLVT PSQSL SITCT
151 VSGFSLSDYG VHWVRQSPGQ GLEWLGVIIWA GGTNYNSAL MSRKSISKDN
201 SKSQVFLKMN SLQADDTAVY YCARDKGYSY YYSMDYWGQG TTVTVSSAST
251 KGPSVFPLAP SSSSGSQVKL QQSGPELVKP GASVKISCKA SGYAFSRSWM
301 NWVKQRPQG LEWIGRIYPG DGDNYNGKF KGKATLTADK SSSTAYMQVS
351 SLTSVDSAVY FCARGNTVVV PYTMDYWGQG TTVTVSSGGG GSGGGGSGGG
401 GSDIELTQSP ASLAVSLGQR ATISCRASES VDSYGNSFMH WYQOKPGQPP
451 KLLIYLASNL ESGVPARFSG SGRRTDFTLT IDPVEADDA TTYCQONNED
501 PLTFGGGTKL ELKRTVAAPS VFIFPPSAEE OKLISEEDLN SAVD**

```

Length 546 AS; MW = 57376,76 Da

RK - potential trypsin cleavage sites

DS/P - potential hydrolysis sites

NFS - potential N-Glyc site

C - Cystein (8) → potential disulfide bridge formation,
 predicted: C23-C92; C149-C222; C287-C362; C425-494

EOKLISEEDL - c-myc-Tag

7.2 r28M Konzentration in Plasmaproben von 37 Tieren

Nach dem Optimieren des kompetitiven α -c-myc ELISA, wurde die r28M Konzentration im Plasma 37 transgener Tiere (aus Deutschland) mittels α -c-myc- und Protein L ELISA bestimmt. Die ermittelten Ergebnisse stellen die Expressionsstärke des r28M Antikörpers in verschiedenen transgenen Tieren dar.

Verwendetes Material

- α -mouse IgG (Jackson 115005146) 1,7 mg/ml
- BSA-cmyc-Konjugat (CDL) c = 6,04 mg/ml
- Standard c-myc Peptid (Sigma M2435) c = 1,12 mg/ml
- Standard 12CDL08 c = 63,5 μ g/ml
- 37 Plasmaproben (aus Deutschland)
- mouse α -cmyc HRP Antikörper (Invitrogen R950-25) c = 1,6 mg/ml
- Protein L HRP, c = 0,5 mg/ml

Vorbereitung der Plasmaproben für die Messung

- Zentrifugieren für 10 min bei 7000 rpm und 4°C (Beckman Coulter, Rotor JA-12)

Tabelle 7.1: Bedingungen für α -cmyc- und Protein L ELISA

Coating	Verd.	Standard/Probe	Verd.	Detektion	Verd.
Protein L ELISA α -mouse (IgG)	1:800	12CDL08	0,5 ng/ μ l \rightarrow 1:3	Protein L HRP	1:10000
		37x Plasma	1:1000 \rightarrow 1:3		
α-cmyc kom. ELISA BSA-cmyc Konjugat	5 ng/ μ l	c-myc Peptid	30 ng/ μ l \rightarrow 1:3	Mouse α -cmyc HRP	1:3000
		37x Plasma	1:1 \rightarrow 1:3		

Tabelle 7.2: Konzentrationsbestimmung des r28M in Plasma transgener Tieren mittels α -c-myc- und Protein L ELISA.

r28M Konzentration in $\mu\text{g/ml}$		
Plasma	α -c-myc ELISA	Protein L ELISA
00404	197,4	150,3
00408	208,9	175,2
08533	146,9	98,5
08536	244,8	158,1
08538	280,7	165,9
08540	188,9	167,4
08541	234,8	181,7
11022	89,9	45,3
11024	91,2	47,2
11027	76,6	45,8
11028	96,4	64,6
11029	78,4	61,5
11030	44,4	0,0
33376	78,5	79,1
33377	113,9	78,7
33378	99,1	70,6
33380	108,2	81,4
33382	63,0	47,2
33383	72,1	58,7
33384	103,5	79,4
43844	92,7	89,4
43850	82,7	79,8
44752	204,8	202,7
64722	8,7	0,0
64723	52,3	44,6
64725	69,3	96,5
64727	77,0	93,5
64728	28,4	24,2
65020	140,2	165,6
99233	94,2	139,8
99236	88,6	93,2
99237	141,1	176,0
99240	180,0	261,8
99242	281,0	271,2
99245	201,8	249,3
99249	126,8	99,5
99250	11,5	0,0

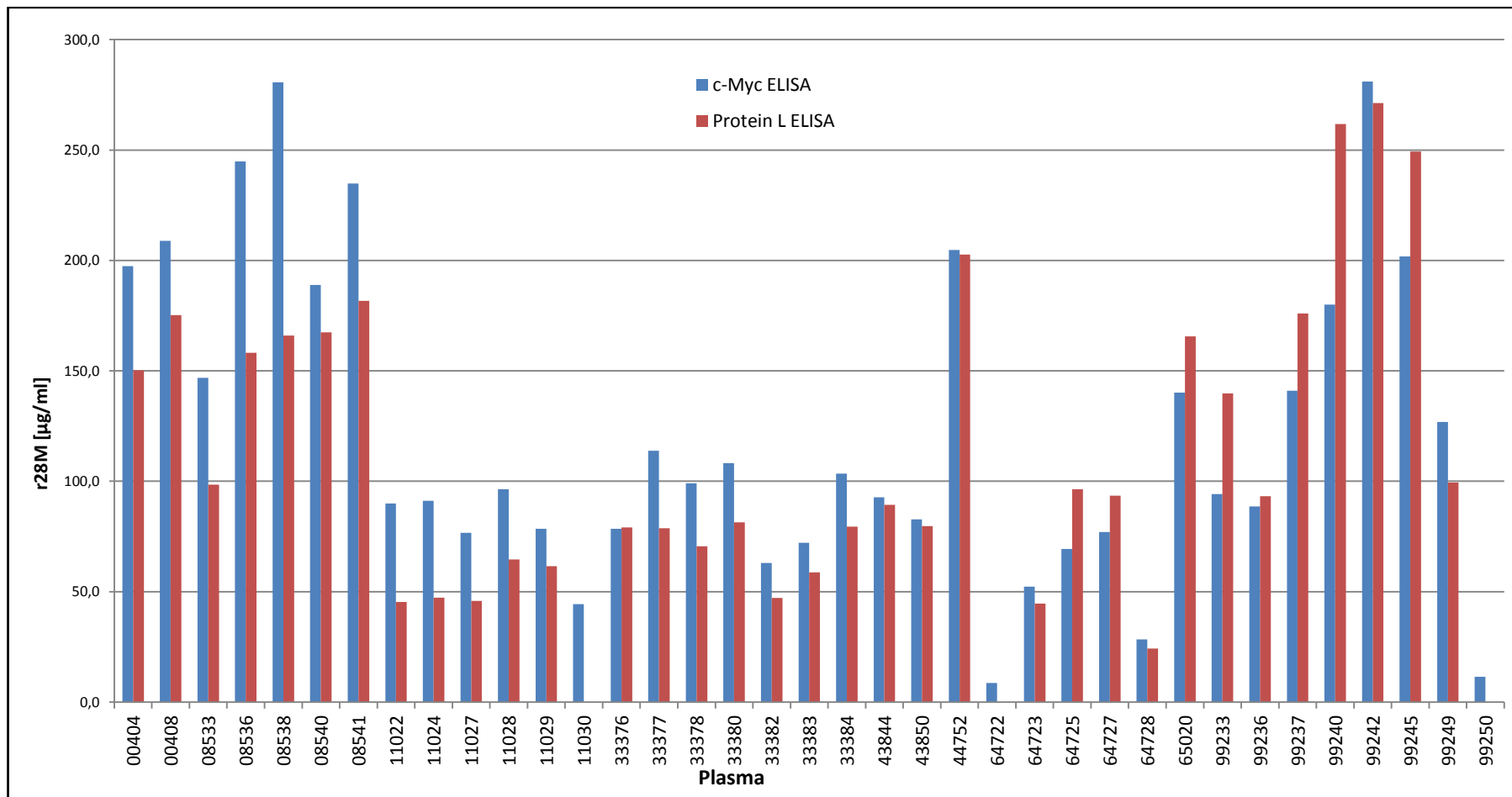


Abbildung 7.1: Konzentrationsbestimmung des r28M in Plasma transgener Tieren mittels α -c-myc- und Protein L ELISA.

Die gemessenen Plasmaproben zeigten unterschiedliche r28M Konzentrationen. Der Protein L ELISA zeigt, dass in drei Rinderplasma (11030, 64722 und 99250) kein r28M exprimiert wird, die aber bei α -c-myc ELISA jedoch geringe Konzentrationen zeigten. Zum Berechnen der Ergebnisse von c-myc ELISA wurde ein Faktor 5 (c-myc Konz. x 5) eingesetzt. Beide Assays zeigten bei den meisten Proben relativ gleiche r28M Konzentrationen. Ein signifikanter Unterschied konnte beim Plasma 08536 bzw. 08538 nachgewiesen werden.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum	23.01.1981
Geburtsort	Sallagrazhde, Kosovo
Staatsangehörigkeit	kosovarisch
Familienstand	verheiratet mit Danijela Memaj 1 Sohn: Lorian

Schulbildung

1988-1995	Grund- und Hauptschule
1995-1998	Berufsschule: Gesundheits- und Krankenpflege
1999	Abschluß: Hochschulreife

Studium

2001-2004	Angewandte Biologie: Universität Pristina
Seit 2005	Genetik-Mikrobiologie: Universität Wien