

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Titel:

Peptid-induzierte Antikörper als hochspezifische  
Werkzeuge der modernen Proteom-Analyse

Autor:

Thomas Fröhlich

aus

St. Maur des Fosses

(Frankreich)

2003

Erklärung:

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von **Prof. Dr. Horst Domdey** betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am .....

.....  
(Unterschrift des Autors)

Dissertation eingereicht am ...29.04.2003.....

1. Gutachter Prof. Dr. Horst Domdey

2. Gutachter Prof. Dr. Angelika Vollmar

Mündliche Prüfung am ..21.05.2003.....

## Inhaltsverzeichnis:

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 Warum Proteomics? .....	1
1.2 Proteomics – Stand der Technik.....	2
1.2.1 Trennung der Proteine.....	3
1.2.2 Detektion und Quantifizierung der aufgetrennten Proteine .....	5
1.2.3 Identifizierung der Proteine .....	5
1.3 Proteomics – bisherige Grenzen.....	7
1.3.1 Die Empfindlichkeit.....	7
1.3.2 Die Adressierbarkeit von Protein-Spots– Bindeglied zu RNA basierenden Technologien .....	9
1.3.3 Der experimentelle Aufwand .....	9
1.4 Antikörper und Proteomics .....	10
1.4.1 Erzeugung von Antikörpern - Stand der Technik .....	10
1.4.2 Rekombinante Antikörper – Stand der Technik.....	11
1.4.3 Peptid induzierte Antikörper – Stand der Technik.....	11
1.5. Aufgabenstellung und Zielsetzung:.....	14
<b>2. MATERIALIEN .....</b>	<b>16</b>
2.1. Allgemein verwendete Chemikalien .....	16
2.2. Aminosäurederivate .....	18
2.3. Syntheseharze.....	19
2.4. Aktivatoren.....	20
2.5. Antikörper und andere Proteine .....	21
2.6. Häufig verwendete Puffer .....	21
2.7. Verschiedenes.....	21
2.8. Geräte .....	22
2.9. Verwendete Software .....	24
2.10. Verwendete Versuchstiere.....	24

<b>3. METHODEN .....</b>	<b>25</b>
3.1 Auswahl der zur Immunisierung verwendeten Peptide.....	25
3.2 Peptidsynthese.....	25
3.2.1 Parallele Synthese von Peptiden im 20 µmol Maßstab.....	27
3.2.2 Synthese von Peptiden im 100 µmol Maßstab.....	27
3.2.3 N-terminale Biotinylierung von Peptiden.....	27
3.2.4 Spotsynthese von Peptiden auf Zellulose-Membranen.....	28
3.2.5 Abspalten der Seitenschutzgruppen Harz-gebundener Peptide.....	29
3.2.6 Abspalten von Peptiden mit C-terminaler Carboxyl- bzw. Amidgruppe.....	29
3.2.7 Abspalten von Peptiden mit C-terminalem Polyoxyethylen (POE).....	30
3.2.8 Abspalten der Seitenschutzgruppen von Membran-gebundenen Peptiden.....	30
3.3 Reinigung und Analyse der Peptide.....	30
3.3.1 Reinigung der Peptide mittels präparativer Reversed Phase HPLC.....	30
3.3.2 Analytische Reversed Phase HPLC der Peptide.....	32
3.3.3 MALDI-MS Analyse der Peptide.....	33
3.4 Herstellung von Peptid-Protein-Carrier Konstrukten.....	33
3.4.1 Kopplung der Peptide an Protein-Carrier-Moleküle mittels ECDI.....	33
3.4.2 Vorbereitung der Dialyse-Schläuche.....	34
3.5 Immunisierung der Tiere.....	34
3.5.1 Injektion der Antigene.....	34
3.5.2 Präparieren der Seren.....	35
3.6 Titration der Seren mittels ELISA.....	35
3.6.1 Beschichten von Polystyrol-Mikrotiterplatten mit Peptiden bzw. POE-Peptiden.....	36
3.6.2 Kovalente Beschichtung von NOS-reaktiv-Mikrotiterplatten mit Peptiden.....	36
3.6.3 Beschichtung von Polystyrol-Mikrotiterplatten mit biotinylierten Peptiden über Streptavidin.....	37
3.6.4 Titration Peptid-induzierter Antiseren mit Peptid-beschichteten Mikrotiterplatten.....	37
3.7 Epitopmapping mit durch Spot-Synthese hergestellten Peptid-„Arrays“.....	38
3.7.1 Immunoassay mit den Peptid-„Arrays“.....	38
3.7.2 Quantifizieren der Signale.....	39
3.7.3 Entfernen der gebundenen Antikörper von den Membranen („Stripping“.....)	39
3.8 Vorbereitung der Proben für die Elektrophorese.....	40
3.8.1 Aufschluss von Geweben.....	40

3.8.2 Proteinbestimmung nach Bradford .....	41
3.9 Gel-Elektrophorese von Proteinen .....	42
3.9.1 1D-SDS-Gel-Elektrophorese .....	42
3.9.2 2D-Gel-Elektrophorese .....	43
3.9.2.1 Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension) .....	43
3.9.2.2 SDS-Gel-Elektrophorese (2. Dimension) .....	44
3.10 Färbungen von Protein-Gelen .....	45
3.10.1 Coomassie Färbung .....	45
3.10.2 Silber-Färbung nach Blum .....	46
3.10.3 Trocknen der Gele .....	47
3.11 Immunoblotting .....	47
3.11.1 Semi-dry Western-Blotting .....	47
3.11.2 Ponceau S Färbung der Membran .....	47
3.11.3 Immunodetektion .....	48
3.11.4 Entfernen der gebundenen Antikörper von den Membranen („Stripping“) .....	49
3.12 Identifikation von 2D-Protein-Spots mittels nano-ESI/MS/MS .....	49
3.12.1 Tryptische Spaltung von Proteinen im Gel .....	49
3.12.2 Mikro-Entsalzung des tryptisch gespaltenen Peptidgemisches .....	50
3.12.3 Nano-ESI/MS/MS-Analyse der tryptisch gespaltenen Proteine .....	51
3.12.4 Auswertung der MS/MS Spektren und Datenbanksuche .....	51
3.13 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen mit Cy5 .....	51
3.14 Detektion von Proteinen aus Cy5-markierten Proteingemischen .....	52
3.14.1 Detektion mit Poly-L-Lysin bzw. Nitrozellulose Objektträgern .....	52
3.14.2 Detektion mit Protein A gekoppelten Partikeln .....	52
3.14.3 Scannen und Auswerten der Objektträger .....	52
<b>4. ERGEBNISSE .....</b>	<b>53</b>
4.1 Entwicklung eines ELISA-Systems zur Titration Peptid-induzierter Antiseren .....	53
4.1.1 Vergleich verschiedener Verfahren zur Beschichtung von Mikrotiterplatten mit kurzen synthetischen Peptiden .....	54
4.1.2 Ermittlung der optimalen Streptavidin-Konzentration zur Beschichtung von Polystyrol-Mikrotiterplatten .....	56
4.1.3 Vergleich der Sensitivität verschiedener Streptavidin-beschichteter Mikrotiterplatten .....	58
4.2 Evaluierung und Vergleich verschiedener Carriersysteme zur Erzeugung Peptid-induzierter Antikörper .....	61
4.2.1 Evaluierung und Vergleich verschiedener Carriersysteme auf Kunststoffbasis .....	62

4.2.2	Evaluierung und Vergleich zweier Carriersysteme auf Proteinbasis .....	65
4.2.3	Evaluierung und Vergleich zweier Carriersysteme auf T-Zell-Epitop-Basis .....	66
4.2.4	Vergleich der Carriersysteme Thyreoglobulin, N-terminales MVH und C-terminales MVH T-Zell-Epitop .....	67
4.3	Produktion von Peptid-induzierten Antikörpern und Evaluierung ihrer Eignung für Proteom-Studien.....	71
4.3.1	Produktion von Peptid-induzierten Antikörpern gegen Proteine aus menschlicher Magenschleimhaut .....	71
4.3.1.1	Produktion Peptid-induzierter Antikörper gegen humanen „gastric intrinsic factor“ .....	72
4.3.1.2	Produktion Peptid-induzierter Antikörper gegen Aldehyddehydrogenase Klasse 1 (ADH1) .....	79
4.3.1.3	Produktion Peptid-induzierter Antikörper gegen Carboanhydrase II .....	84
4.3.2	Produktion von Peptid-induzierten Antikörpern gegen IGFBP2 .....	92
4.4	Ermittlung der Epitope Peptid-induzierter Antikörper.....	100
4.4.1	Ermittlung der Epitope der HIF348-induzierten Antikörper.....	100
4.4.2	Ermittlung der Epitope der Adh1_1 und ADH1_2-induzierten Antikörper.....	105
4.4.3	Ermittlung der Epitope der CAH2_1, CAH2_2 und CAH2_3-induzierten Antikörper.....	110
4.4.4	Ermittlung des Epitops der mit IGFBP5_1, IGFBP5_2 und IGFBP5_3 induzierten Antikörper .....	116
4.4.5	Resümee.....	123
4.5	Peptid-induzierter Antikörper für Chip-basierende Protein-Detektionstechniken.....	124
4.5.1	Evaluierung verschiedener fester Phasen hinsichtlich ihrer Kapazität Peptid-induzierte Antikörper zu binden, und bezüglich ihres Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisses .....	124
4.5.1.1	Evaluierung von Poly-L-Lysin Objektträgern als feste Phase zur Bindung Peptid-induzierter Antikörper .....	125
4.5.1.2	Evaluierung Nitrozellulose beschichteter Objektträger als feste Phase zur Bindung Peptid-induzierter Antikörper.....	128
4.5.1.3	Evaluierung von Protein A HPLC Material als feste Phase zur Bindung Peptid-induzierter Antikörper .....	129
4.5.2	Detektion einiger Proteine aus Cy5-markiertem Zell-Lysat humaner Magenschleimhaut....	132
4.5.2.1	Detektion von Carboanhydrase II aus Cy5-markiertem Zell-Lysat humaner Magenschleimhaut .....	133
4.5.2.2	Detektion von IF in Cy5-markiertem Zell-Lysat humaner Magenschleimhaut.....	135
4.5.2.3	Detektion der Aldehyddehydrogenase Klasse 1 aus Cy5-markiertem Zell-Lysat humaner Magenschleimhaut.....	136
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>139</b>
5.1	Die Immunisierung mit synthetischen Peptiden zur Generierung von Antikörpern hat wesentliche Vorteile .....	139

5.2 Entwicklung eines standardisierten ELISAs zur Titration Peptid-induzierter Antiseren .....	141
5.3 Evaluierung von „Carriern“ zur Steigerung der Immunogenität von Antigenen.....	143
5.4 Peptid-induzierte Antikörper sind wertvolle Werkzeuge für Proteomanalysen.....	149
5.5 Ermittlung der Epitope Peptid-induzierter Antikörper.....	154
5.6 Peptid-induzierte Antikörper zur Produktion Antikörper-basierender Chips .....	156
5.7 Ausblick – Zukünftige Experimente .....	162
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>164</b>
<b>7. LITERATUR .....</b>	<b>166</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>175</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 Warum Proteomics?

Bis dato sind die kompletten Genome einer Vielzahl von Spezies sequenziert worden (Stand September 2002 [1]: 968 Viren, 338 Organellen, 88 Bakterien, *Anopheles gambiae*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Arabidopsis thaliana*, *Guillardia theta*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* und zwei Reissorten). Im Februar 2001 wurde auch die Rohsequenz des humanen Genoms vorgestellt [2, 3]. Parallel dazu wurden Methoden entwickelt, die es erlauben, die komplexen RNA-Pools von Zellen quantitativ zu analysieren. Dazu zählen beispielsweise Methoden wie "differential display" [4], RAP-PCR (RNA arbitrarily primed PCR) [5] oder auch serielle Analysen der Genexpression wie z.B. die SAGE (serial analysis of gene expression) Technik [6]. Die Analyse der komplexen RNA-Pools in Zellen, den sogenannten Transkriptomen, ist jedoch vor allem durch die Entwicklung von DNA-Microarrays, bei denen DNA-Fragmente auf feste Träger gebunden werden [7], effizient geworden. So gelang es bereits, mehr als 10.000 unterschiedliche cDNA-Fragmente pro cm<sup>2</sup> Fläche zu positionieren [8, 9] und damit die entsprechenden mRNAs parallel zu detektieren und zu quantifizieren. Hierfür werden ganze mRNA-Populationen von Zellen revers transkribiert, die cDNA mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und dann an die DNA-Fragmente auf den Microarrays hybridisiert. Mit diesen Techniken ist es auf effektive Weise möglich Transkriptome parallel, sensitiv, qualitativ, wie auch quantitativ zu charakterisieren. Diese Technologien können in Kombination mit bioinformatischen Verfahren wie „clustering“ viel zum Verständnis der komplexen biochemischen Zusammenhänge in Zellen beitragen.

Dennoch wird es immer deutlicher, dass solche als „Transcriptomics“ bezeichneten Untersuchungen zwar zwingend notwendig, aber nicht hinreichend für das Verständnis der komplexen biochemischen Vorgänge in der Zelle sind. Experimentelle Befunde belegen, dass die Quantität einzelner mRNA-Moleküle oft nicht mit der Quantität des zugehörigen Proteins korreliert [10, 11]. Außerdem ist bekannt, dass Gene zwar transkribiert werden können, die entsprechende mRNA aber nicht unbedingt translatiert werden muss. Auch auf Proteinebene besteht eine hohe und dynamische Variabilität. So werden Proteine oft posttranslational modifiziert wie z.B. phosphoryliert, glykosyliert, acetyliert, ubiquityliert, farnesyliert oder sulfatiert und so ihre Stabilitäten oder auch ihre Bindungseigenschaften moduliert. So konnten

beispielsweise von 6330 annotierten humanen Protein-Sequenzen in der SwissProt-Datenbank ausgehend, 16.449 potentielle bzw. experimentell ermittelte posttranslationale Modifikationen gefunden werden [12]. Eine weitere Studie zeigt, dass über die Hälfte der bekannten Proteine glykosyliert sind [13]. Zusätzlich werden Proteine häufig sezerniert, so dass als Konsequenz die Konzentration der entsprechenden mRNA nicht mit der Konzentration des entsprechenden Proteins korreliert. Aus diesen Gründen ist eine zu den RNA-Technologien komplementäre Technologie nötig, welche die Analyse von ganzen Protein-Populationen zulässt. Hierbei ist es wünschenswert, nach Möglichkeit das gesamte komplexe Proteingemisch in Zellen gleichzeitig darzustellen, zu analysieren und in einem nächsten Schritt Vergleiche zwischen verschiedenen Proteingemischen durchzuführen. So können beispielsweise die Proteinprofile von „gesunden“ und „kranken“ Zellen oder aber mit einem Wirkstoff behandelten mit unbehandelten Zellen verglichen werden. Die Gesamtheit der **Proteine**, die in einem Gewebe- oder Zelltyp exprimiert werden, wird in Analogie zum Begriff **Genom** üblicherweise als **Proteom** [14] bezeichnet. Techniken für die Analyse dieser komplexen Proteingemische werden, in Analogie zum Begriff „Genomics“, als „Proteomics“ bezeichnet.

Bisher wurden einige „large scale“ Proteomprojekte von Organismen gestartet wie z.B. *Saccharomyces cerevisiae* [15], *Escherichia coli* [16], *Haemophilus influenzae* [17], *Mycobacterium tuberculosis* [18], *Salmonella enterica* [19], *Spiroplasma melliferum* [20], *Synechocystis* spp. [21], *Dictyostelium discoideum* [22], *Brucella melitensis* und *Rhizobium leguminosarum* [23]. Zusätzlich wurde die systematische Proteomanalyse einiger Protein-Extrakte wie z.B. humane Cerebrospinal-Flüssigkeit [24], humane Thrombozyten [25], humane Leber [26], humanes Plasma [26], humane Fibroblasten [27], humane Keratinocyten [27], humanes Blasenkarzinom [27], Mäuse-Niere [27] und Ratten-Serum [28] gestartet. Auch eine Reihe von Biotechnologie-Firmen wie z.B. Celera Genomics und Incyte Genomics [29] starten zur Zeit sehr umfangreiche humane Proteom-Projekte.

## 1.2 Proteomics – Stand der Technik

Die Kernschritte zur Analyse von Proteomen bestehen darin, das komplexe Proteingemisch zu extrahieren, aufzutrennen (meist durch 2D-Gelelektrophorese), die Proteine zu detektieren, sie zu quantifizieren und schließlich zu identifizieren. Die prinzipielle Vorgehensweise ist in Abb. 1.1 dargestellt.

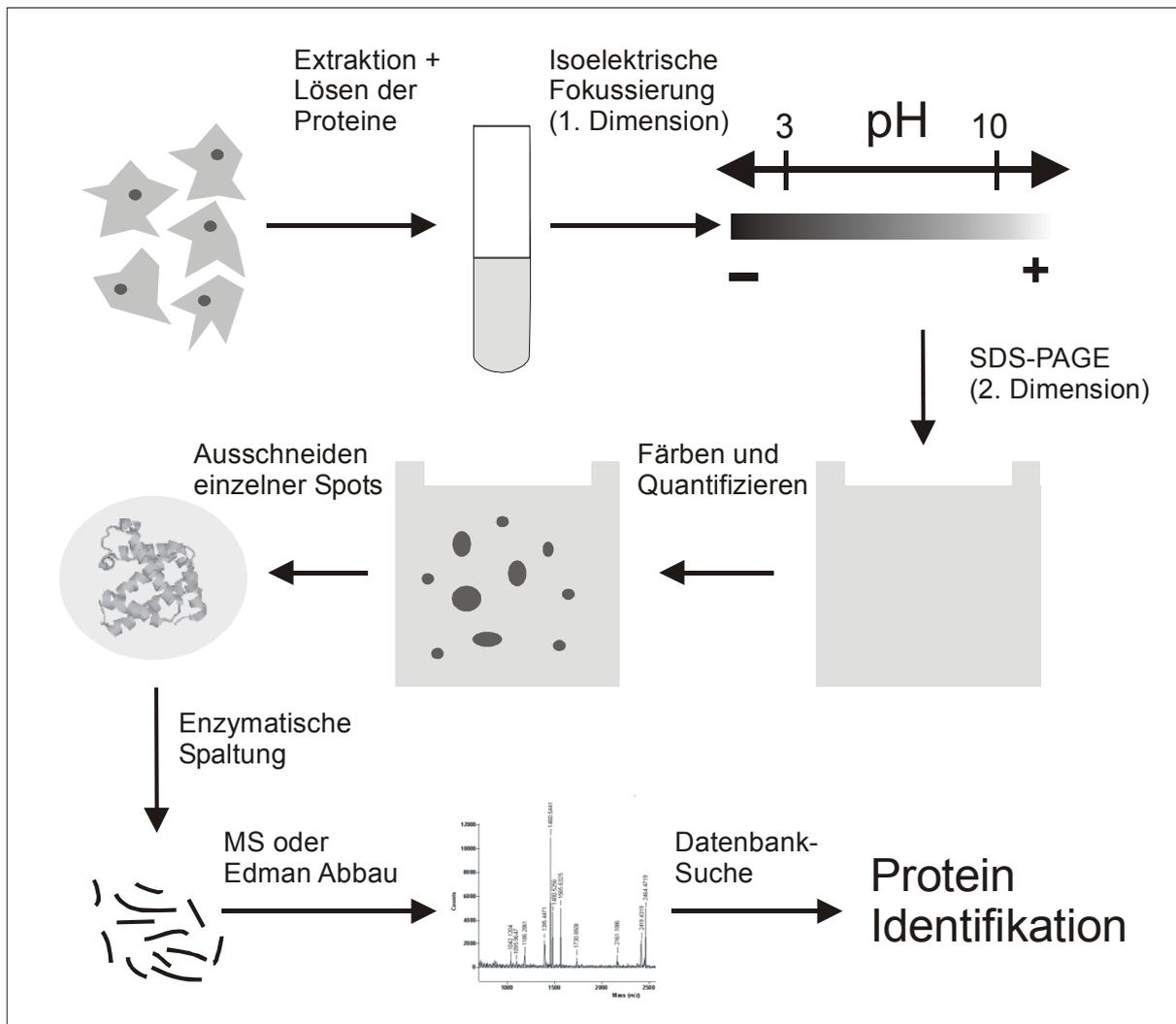


Abb. 1.1 Einzelschritte der Proteomanalyse, Schematische Darstellung.

### 1.2.1 Trennung der Proteine

Die am häufigsten verwendete Technologie zur Trennung der komplexen Proteingemische ist die zweidimensionale Gelelektrophorese (2DE: zweidimensionale Elektrophorese) [30, 31]. Hierbei werden die Proteine zunächst mittels isoelektrischer Fokussierung nach ihrer Basizität / Azidität und dann mittels SDS-PAGE anhand ihrer Molekulargewichte getrennt. Färbt man die Proteine nach der Elektrophorese an, so entsteht ein komplexes Muster auf dem Gel. Die Proteinpunkte auf dem Gel werden auch „Spots“ genannt. Ein typisches 2D-Gel ist in Abb. 1.2 dargestellt.

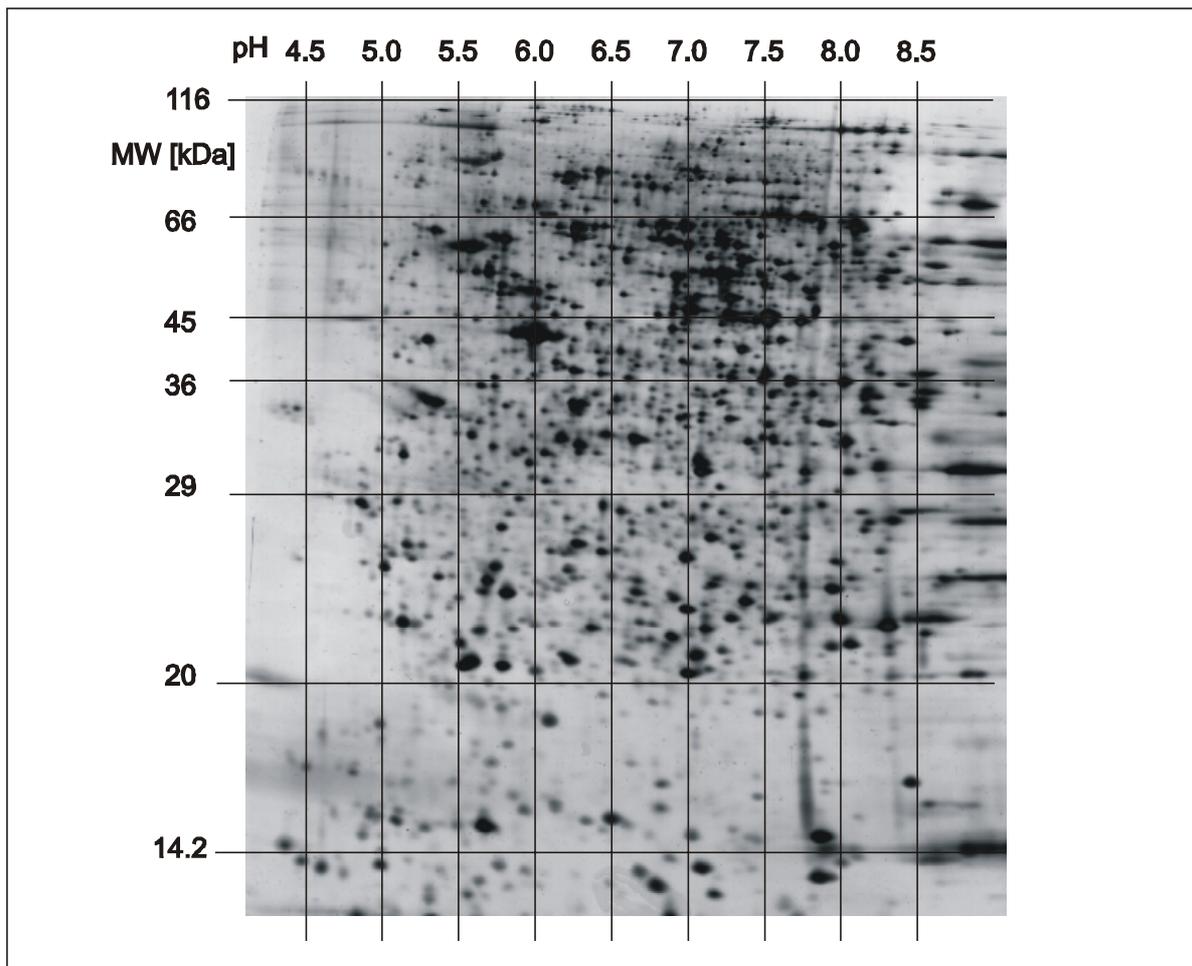


Abb. 1.2 Silbergefärbtes 2D-Gel, NG108-15 Zellen (100 $\mu$ g Protein).

Breite Akzeptanz fand diese Methode mit der Entwicklung immobilisierter pH-Gradienten (IPG) [32] für die isoelektrische Fokussierung. Zum einen sind isoelektrische Fokussierungen mit IPGs reproduzierbarer und technisch einfacher durchzuführen als mit freien Trägerampholyten und zum anderen ist es mit IPGs möglich, ohne Verzerrung des pH-Gradienten größere Mengen an Gesamtproteingemisch aufzutrennen (bis zu 15 mg) [33], was manche Proteine niedriger Konzentration erst detektierbar und identifizierbar macht. Schließlich ist es mit immobilisierten pH-Gradienten möglich, extrem enge pH-Gradienten zu realisieren, was die Auflösung der 2D-Gele in einem gegebenen pH-Bereich erhöht [34].

Ein Problem stellt bislang die exakte Trennung extrem saurer bzw. basischer Proteine (wie z.B. Histone) sowie die Trennung von sehr kleinen und sehr großen Proteinen dar. So ist üblicherweise nur der pH-Bereich zwischen 3 und 10 und der Größenbereich zwischen 10 und 100 kDa zugänglich. Zwar gibt es für den basischen pH-Bereich (pH 10-12) speziell angepasste Methoden der isoelektrischen Fokussierung [35], jedoch sind diese mit starken Verlusten an Auflösung oberhalb pH 9 verbunden.

### 1.2.2 Detektion und Quantifizierung der aufgetrennten Proteine

Üblicherweise werden die Proteinspots auf den 2D-Gelen mittels klassischer Techniken wie nicht-kolloidaler bzw. kolloidaler Coomassie Brilliant Blue Färbung oder Silberfärbung sichtbar gemacht. Während Coomassie Brilliant Blue nicht sensitiv genug ist (Empfindlichkeit 0.5-1 µg / Spot) um die Mehrzahl der aufgetrennten Proteine in einem komplexen Proteingemisch zu visualisieren, ist die Silberfärbung zwar empfindlicher (Empfindlichkeit ca. 1-10 ng / Spot), jedoch die Quantifizierung silbergefärbter Gele ungleich schwieriger. So ist es technisch sehr anspruchsvoll reproduzierbare Silberfärbungen durchzuführen, was üblicherweise bei anschließender Quantifizierung der Signale zu Varianzen von 20 % bei optimaler Durchführung [36] führt. Außerdem ist der lineare dynamische Bereich für Proteinquantifizierungen Silber-gefärbter Gele von 4 ng bis 60 ng [37] Protein sehr klein. Zusätzlich modifizieren die Silberfärbetechniken die Proteine chemisch, was meist die Identifizierung des entsprechenden Proteins mit Massenspektrometrie-basierten Verfahren erschwert. Aus diesen Gründen wurden neuerdings Färbetechniken entwickelt, die auf Fluoreszenzfarbstoffen basieren. Als wichtige Vertreter dieser Farbstoffe gelten „SYPRO orange“, „SYPRO red“ und vor allem „SYPRO ruby“ [37-39]. Diese Techniken sind einfacher in der Durchführung, reproduzierbarer und ähnlich empfindlich wie die Silberfärbung, zeigen aber einen im Vergleich zur Silberfärbung wesentlich größeren linearen dynamischen Bereich zwischen 1 ng und 1 µg. Dennoch ist es auch mit diesen neuen Färbetechniken oft nicht möglich, ohne Vorfraktionierungen und Anreicherungen Proteine niedriger Konzentration zu detektieren.

### 1.2.3 Identifizierung der Proteine

Die erste Technik, die es ermöglichte, Proteinspots entsprechenden Proteinen zuzuordnen, war das Elektroblothing kombiniert mit N-terminaler Edman-Sequenzierung [40-42]. Die Empfindlichkeit dieser Technik liegt bei ca. 10 pmol [43], was 1 µg eines 100 kDa Proteins entspricht. Obwohl die N-terminale Sequenzierung nicht sonderlich empfindlich ist, hat sie den Vorteil, dass man de novo Proteinsequenzdaten generieren kann und somit die Analyse völlig unbekannter Proteine möglich ist. Mit der steigenden Anzahl an DNA Sequenzdaten und den damit ableitbaren Proteinsequenzen haben jedoch völlig andere Proteinidentifizierungsstrategien, die auf Massenspektrometrie mit anschließender Proteindatenbanksuche beruhen, an Bedeutung gewonnen.

Das meist verwendete Verfahren zur Identifizierung von Proteinen mit bekannter Sequenz ist das MALDI Peptide Mass Fingerprinting (MALDI-PMF) [44, 45]. Hierbei werden die zu analysierenden Proteinspots im Gel enzymatisch (z.B. mit Trypsin) gespalten und mittels MALDI-MS (**M**atrix **a**ssistierte **L**aser **D**esorptions **I**onisations **M**assenspektrometrie) [46] das Molekulargewicht der Fragmente genau bestimmt. Die erhaltenen Daten werden dann mit Hilfe von Computerprogrammen mit den Molekulargewichten der Fragmente verglichen, die sich theoretisch aus der Spaltung eines bestimmten Proteins ergeben müssten. Dies geschieht mit allen Datenbankeinträgen bekannter oder von Open Reading Frames abgeleiteter Proteine. Die Proteinsequenzen mit den besten Übereinstimmungen werden anschließend ausgegeben. Die Empfindlichkeit dieser Technik liegt im unteren Picomol- beziehungsweise oberen Femtomol-Bereich [43]. Eine Grundvoraussetzung für diese Methode ist jedoch, dass die Sequenz exakt in der Datenbank vorliegen muss. Proteinsequenzdaten anderer Spezies führen meist nicht, wie beispielsweise bei Homologieanalysen von Sequenzdaten (z.B. BLAST), zur Identifizierung des Proteins. Dies hat zur Folge, dass die Identifizierung von Proteinen aus Spezies mit nur wenigen Protein-Datenbankeinträgen problematisch ist. Außerdem ist die Methode nicht auf stark posttranslational modifizierte und bisher unbekannte Proteine anwendbar.

Eine weitere wichtige Methode ist ESI-MS-MS [47, 48]. Auch hier werden die Proteinspots zunächst im Gel tryptisch gespalten und dann mittels ESI-MS (**E**lektrospray **I**onisations **M**assenspektrometrie) [49] untersucht. In einem weiteren Schritt werden einzelne, aus der Spaltung erhaltene Peptide in eine Kollisionskammer geleitet, in der sie mit verdünnten Gasen wie z.B. Argon kollidieren und an den Peptidbindungen zerbrechen. Aus den Massenspektren der Fragmente lassen sich kurze Aminosäuresequenzen ableiten, die es in Kombination mit dem Molekulargewicht des Mutterions erlauben, mittels computergestützter Datenbanksuche das Protein eindeutig zu identifizieren. Auch aus bislang unbekanntem Proteinen können mit dieser Methode *de novo* Sequenzinformationen gewonnen werden. Die Empfindlichkeit dieses Verfahrens liegt im unteren Picomol-Bereich [43].

In letzter Zeit wurden noch einige weitere massenspektrometrische Verfahren zur Identifizierung von Proteinen entwickelt. Hier sei nur MALDI-PSD (PSD = **p**ost-**s**ource **d**ecay) [50, 51] und MALDI-TOF/TOF genannt, Methoden, mit denen man auch mittels MALDI-MS Sequenzinformationen erhalten kann. Eine zukunftssträchtige, jedoch noch nicht weit verbreitete Weiterentwicklung der auf Massenspektrometrie beruhenden Verfahren ist das ICAT (**i**sotope-**c**oded **a**ffinity **t**ag) peptide labeling [52] welches es erlaubt, neben der Identifizierung von Proteinen zusätzlich anhand der MS-Signalintensitäten Proteine

quantitativ miteinander zu vergleichen. Alle diese Verfahren setzten einige Picomol Einzelprotein voraus [43].

### **1.3 Proteomics – bisherige Grenzen**

Obwohl die oben genannten Verfahren bereits sehr erfolgreich in einer Vielzahl von Projekten angewendet werden und auf äußerst effektive Weise die Identifizierung von Proteinen ermöglichen, haben diese Techniken Limits, welche die Beantwortung vieler Fragestellungen erschweren.

#### **1.3.1 Die Empfindlichkeit**

Ein noch nicht gelöstes Problem stellt die Detektion und Identifizierung von Proteinen dar, die in sehr geringen Konzentrationen vorliegen. Die Empfindlichkeit der gängigsten Proteinidentifizierungstechniken in Abhängigkeit von der Kopienzahl (Moleküle Einzelprotein pro Zelle) ist in Abb.1.3 zusammengestellt.

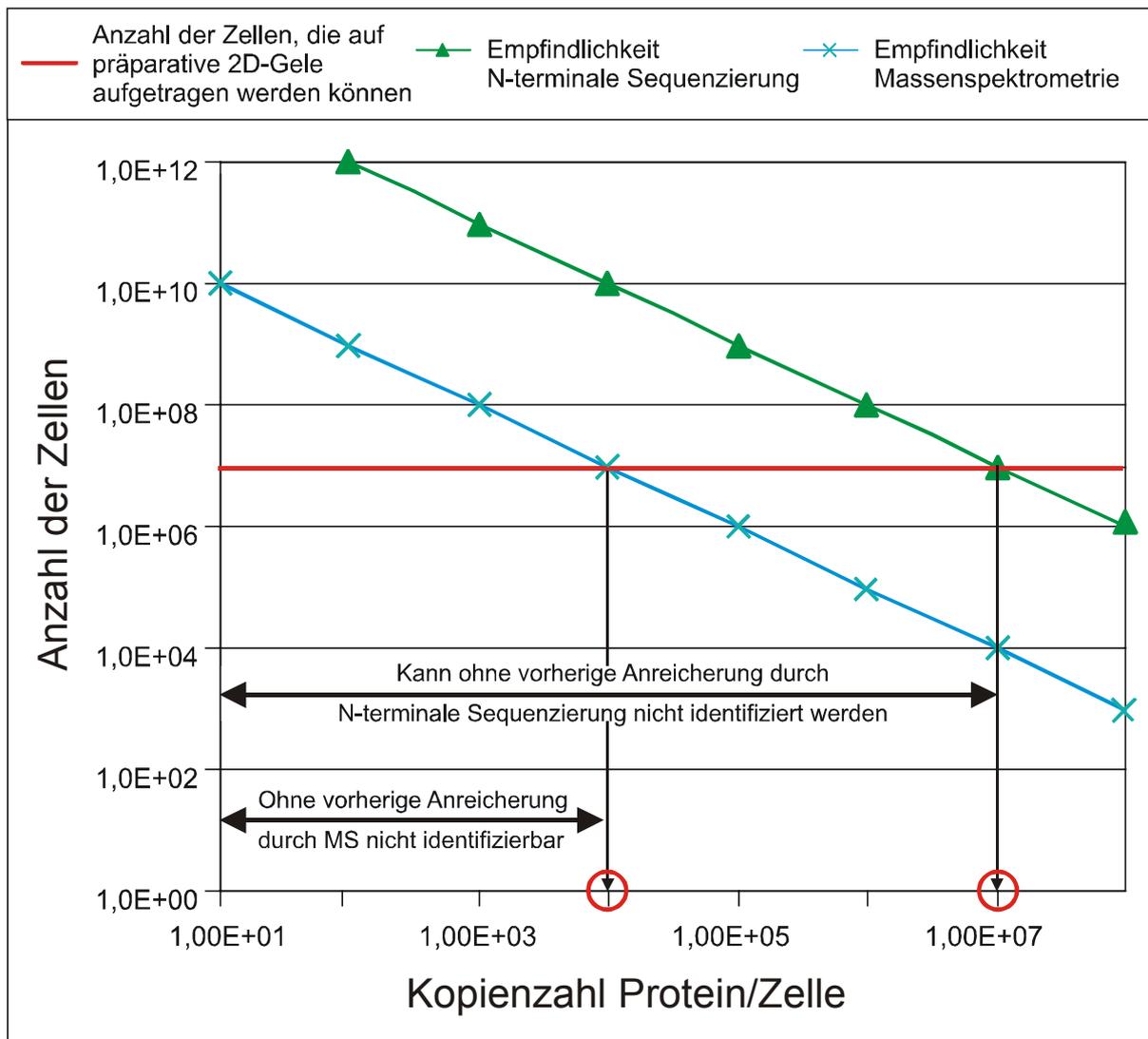


Abb.1.3 Empfindlichkeit der N-terminalen Sequenzierung und der Massenspektrometrie.

Wird beispielsweise ein Detektionslimit von 160 fmol Einzelprotein für die auf Massenspektrometrie basierenden Verfahren vorausgesetzt, und berücksichtigt man, dass typischerweise für präparative Gele ein Lysat aus ca.  $10^7$  Zellen eingesetzt wird, ist es ohne vorherige Anreicherung nicht möglich, Proteine mit einer Kopienzahl von kleiner  $10^4$  pro Zelle zu identifizieren. Außerdem wird davon ausgegangen, dass sich der Unterschied zwischen hoch exprimierten Proteinen und schwach exprimierten Proteinen über 8-12 Größenordnungen erstrecken kann [53, 54]. So beträgt zum Beispiel der Konzentrationsunterschied zwischen Albumin und Glukagon im humanen Serum 9 Größenordnungen [54]. Dies bedeutet, dass man z.B. ca. 1,6 g Serumprotein (ca. 18 ml Serum) auf ein 2D-Gel auftragen müsste, um Glukagon von den anderen Proteinen im Serum zu trennen und anschließend massenspektrometrisch nachzuweisen. 2D-Gele vermögen jedoch maximal wenige mg Protein gut zu trennen. Als Konsequenz hat eine Reihe von

Studien gezeigt, dass bisher vor allem Proteine, die in höheren Konzentrationen vorliegen, in 2D-Gelen gefunden und identifiziert wurden. So wurden beispielsweise beim Hefe-Proteom-Projekt vor allem Proteine identifiziert, die als stark exprimiert gelten [11]. Für über die Hälfte der 6000 Hefe-Gene, die als weniger stark exprimiert gelten, konnten die Proteine jedoch noch nicht nachgewiesen werden [55]. Zwar wird an einigen Techniken gearbeitet, um einzelne Proteinpopulationen durch Vorfraktionierung mit anschließender Aufkonzentration der Fraktionen anzureichern, jedoch sind diese Verfahren noch nicht ausgereift, meist nicht universell anwendbar und schwer reproduzierbar. Außerdem führt diese Vorgehensweise zu einem drastischen Anstieg der zu analysierenden 2D-Gele.

### 1.3.2 Die Adressierbarkeit von Protein-Spots– Bindeglied zu RNA basierenden Technologien

Die fehlende Möglichkeit vorab determinierte Proteine gezielt im Gel zu identifizieren, ist eine weitere Einschränkung der auf N-terminaler Sequenzierung bzw. Massenspektrometrie beruhenden Identifizierung von 2D-Spots. Da selbst anhand der vollständigen Proteinsequenz das Laufverhalten eines Proteins im 2D-Gel nicht exakt vorhergesagt werden kann, muss erst eine Vielzahl von in Frage kommenden Spots exzidiert und identifiziert werden, d.h. das entsprechende Protein gesucht werden. Dies ist ein sehr zeitaufwendiger und kostenintensiver Prozess. Außerdem führt diese Vorgehensweise nur dann zum Ziel, wenn das Protein nicht durch ein weiteres mit ähnlichem Laufverhalten überlagert wird.

Aus diesem Mangel an direkter Adressierbarkeit folgt, dass es mittels klassischer proteomanalytischer Verfahren nicht ohne weiteres möglich ist, Ergebnisse differentieller mRNA-Analysen auf Proteom-Ebene zu überprüfen. Dies ist ein besonderes Dilemma, da differentielle mRNA-Analysen zwar sehr effektiv und viel schneller als differentielle Proteomanalysen durchzuführen sind, aber deren Ergebnisse nicht grundsätzlich auf die Proteinebene übertragen werden können [10, 11].

### 1.3.3 Der experimentelle Aufwand

Der Aufwand, quantitative Proteomstudien durchzuführen, ist im Vergleich zu differentiellen mRNA-Studien immens. Wegen der begrenzten Proteinmenge, die auf ein Gel aufgetragen werden kann, und der Empfindlichkeit, mit der man Proteine identifizieren kann, sind für gründliche Studien Vorfraktionierungen der zu analysierenden Proteingemische, sowie die Durchführung mehrerer isoelektrischer Fokussierungen mit überlappenden pH-Bereichen

unerlässlich. Da bisher weder die Durchführung der 2D-Gelelektrophorese noch die computergestützte differentielle Analyse der äußerst komplexen Proteinmuster voll automatisierbar sind, benötigen solche Analysen viel Zeit und sind äußerst kostenintensiv. Wünschenswert wäre daher eine Technologie, die es ermöglicht, differentielle Proteomstudien ähnlich effizient wie die auf DNA-Chips basierenden differentiellen mRNA-Analysen durchzuführen.

## **1.4 Antikörper und Proteomics**

Auf Protein-Ebene sind Antikörper ähnlich selektive und sensitive Sonden wie Oligonukleotide auf DNA/RNA-Ebene. Antikörper als Sonden für die quantitative Detektion einzelner Proteine haben, was die Empfindlichkeit und Spezifität angeht, das Potential, einige der in Abschnitt 1.3 beschriebenen Limitierungen zu überwinden. Mittels Antikörpern ist es möglich, im attomolaren Bereich Proteine nachzuweisen [56] und damit die Nachweissensitivität erheblich zu steigern. Außerdem können mit Antikörper-Sonden gezielt und spezifisch vorab determinierte Proteine im Proteom nachgewiesen, und somit direkt adressiert werden. Dadurch ist es möglich, mit Antikörpern Ergebnisse RNA-basierender Experimente auf Proteom-Ebene zu validieren. Sogar Proteomstudien ohne den Einsatz von 2D-Gelen sind mit Antikörpern denkbar. So könnten eine Vielzahl unterschiedlicher Antikörper auf einen festen Träger aufgebracht werden und mit einem solchen Proteinchip spezifisch, hochsensitiv und parallel viele Proteine eines komplexen Proteingemisches quantitativ detektiert werden. Eine solche Technologie wäre ein Analogon zu den RNA-basierenden Technologien auf Proteinebene. Jedoch ist die Erzeugung von Antikörpern bei weitem aufwendiger als die Erzeugung von cDNA-Fragmenten bzw. Oligonukleotiden. Als Konsequenz sind Antikörper die bezüglich ihrer Spezifität und Sensitivität für die Analyse komplexer Proteingemische geeignet sind nur für eine sehr beschränkte Anzahl von Proteinen verfügbar.

### **1.4.1 Erzeugung von Antikörpern - Stand der Technik**

Die einfachste Methode, Antikörper zu generieren, ist die Immunisierung eines Tieres mit den entsprechenden Antigenen. Die erhaltenen polyklonalen Antikörper sind häufig ausreichend sensitiv und spezifisch. Allerdings scheitert ihre Produktion meist an der Verfügbarkeit des Proteins in ausreichender Menge und Reinheit. Auch ist die Erzeugung vieler unterschiedlicher Antikörper für Proteomstudien durch Immunisierung mit rekombinanten

Proteinen nicht praktikabel, da die Herstellung und Reinigung rekombinanter Proteine in immunogenen Mengen oft zu aufwendig und schwierig ist. Aus diesem Grunde müssen andere Strategien zur Produktion von Antikörpern in Betracht gezogen werden.

#### 1.4.2 Rekombinante Antikörper – Stand der Technik

Mittlerweile sind verschiedene Methoden verfügbar, die es erlauben, Antikörperfragmente oder komplette Antikörper rekombinant zu produzieren. Um Antikörper der gewünschten Spezifität zu erhalten, werden Bibliotheken möglichst hoher Komplexität zumeist durch Oberflächenexpression (Fusionsprodukte mit Capsidproteinen) auf Bakteriophagen präsentiert ("*phage display*") [57-59]. Die Phagen, die das Fragment mit der gewünschten Spezifität tragen werden anschließend durch Affinitätschromatographie über mehrere Runden angereichert. Wird das Fragment nun in geeignete Expressionssysteme mit Ig-Anteilen subkloniert, können große Mengen Antikörper hergestellt werden. Der große Vorteil dieser Technologie besteht darin, dass auch mit dem menschlichen Immunsystem kompatible Antikörper rekombinant in größeren Mengen hergestellt werden können, die als Therapeutika geeigneter sind als tierische Antikörper, da sie keine Immunreaktion im Patienten induzieren [60-62]. Zum anderen können mit Hilfe von synthetischen Bibliotheken Antikörper gegen Antigene erzeugt werden, die nur schwach oder gar nicht immunogen sind [60, 61]. Den kritischen Schritt der Technologie rekombinanter Antikörper stellt die Erzeugung hinreichend großer Repertoires dar. So zeigt sich, dass auch bei sehr großen Repertoires ( $10^{10}$  unterschiedliche Fragmente) rekombinante Antikörper nicht selten geringere Affinität zum Antigen haben, als ihre *in vivo* produzierten Pendanten [62]. Ein Grund hierfür ist die Tatsache, daß *in vivo* die Antikörper durch somatische Mutationen und Selektion der entsprechenden B-Lymphozyten optimiert werden, dieser Prozess aber *in vitro* bisher nur sehr eingeschränkt nachgeahmt werden kann.

#### 1.4.3 Peptid induzierte Antikörper – Stand der Technik

Eine alternative Technik, um Antikörper bei Nichtverfügbarkeit des gereinigten Proteins zu produzieren, ist die Immunisierung von Tieren mit synthetischen Peptiden. Kurze Peptide können problemlos und weitestgehend automatisiert in ausreichenden Mengen synthetisch hergestellt werden [63-65]. So wurden eine Vielzahl von Peptid-induzierten Antikörpern gegen die unterschiedlichsten Proteine entwickelt [66-71]. Da jedoch kurze synthetische

Peptide in den wenigsten Fällen ausreichend immunogen sind, werden sie meistens vor der Immunisierung an sogenannte Carrierproteine (wie z.B. KLH, BSA oder Thyreoglobulin) gekoppelt [72-75] (siehe Abb. 1.4.A). Das resultierende Antigen besteht aus einem Peptid-spezifischen Hapten und einem Protein-Carrier, der die für eine Immunantwort notwendigen T-Zell-Epitope enthält. Resultat der Immunisierung ist eine humorale Immunantwort mit der Bildung Peptid-spezifischer Antikörper. Obwohl die Technik der Kopplung von Peptiden an Carrierproteine die am häufigsten verwendete ist, wird dabei oft beobachtet, dass sich die Immunantwort vor allem gegen das Carrier Protein richtet und die Immunantwort gegen das Hapten sogar supprimiert wird [76, 77]. Da durch den Protein-Carrier meist eine Vielzahl von T-Zell und B-Zell Epitopen präsentiert werden, steigt außerdem das Risiko, dass die Antiseren unerwünschte Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen zeigen. Deswegen wird alternativ dazu an voll-synthetischen Carriern gearbeitet. So wurde vorgeschlagen, mit an Syntheseharz gebundenen Peptiden [78] (siehe Abb. 1.4 B) oder mit an Polyoxyethylen gebundenen Peptiden (siehe Abb. 1.4 C) zu immunisieren [79]. Des Weiteren wurden sogenannte "multiple antigenic peptides" (siehe Abb. 1.4 D) verwendet [80-82]. Hierbei handelt es sich um an Polylysin-Baumstrukturen synthetisierte Peptide. Durch die Entdeckung von T-Zell-Epitopen, die weitestgehend unabhängig vom jeweiligen MHC-II-Haplotyp sind [83-87], ist es möglich geworden, diese Epitope als Carrier zu verwenden und direkt N-terminal oder C-terminal an das Peptid zu synthetisieren [66, 88, 89] (siehe Abb. 1.4 E). Mit solchen Konstrukten können die Vorteile der klassischen Protein-Carrier (T-Zell vermittelte Immunantwort) mit den Vorteilen der synthetischen Carrier (keine störende Immunantwort gegen den Carrier) vereint werden. Eine Übersicht der unterschiedlichen Carriersysteme ist in Abb. 1.4 dargestellt.

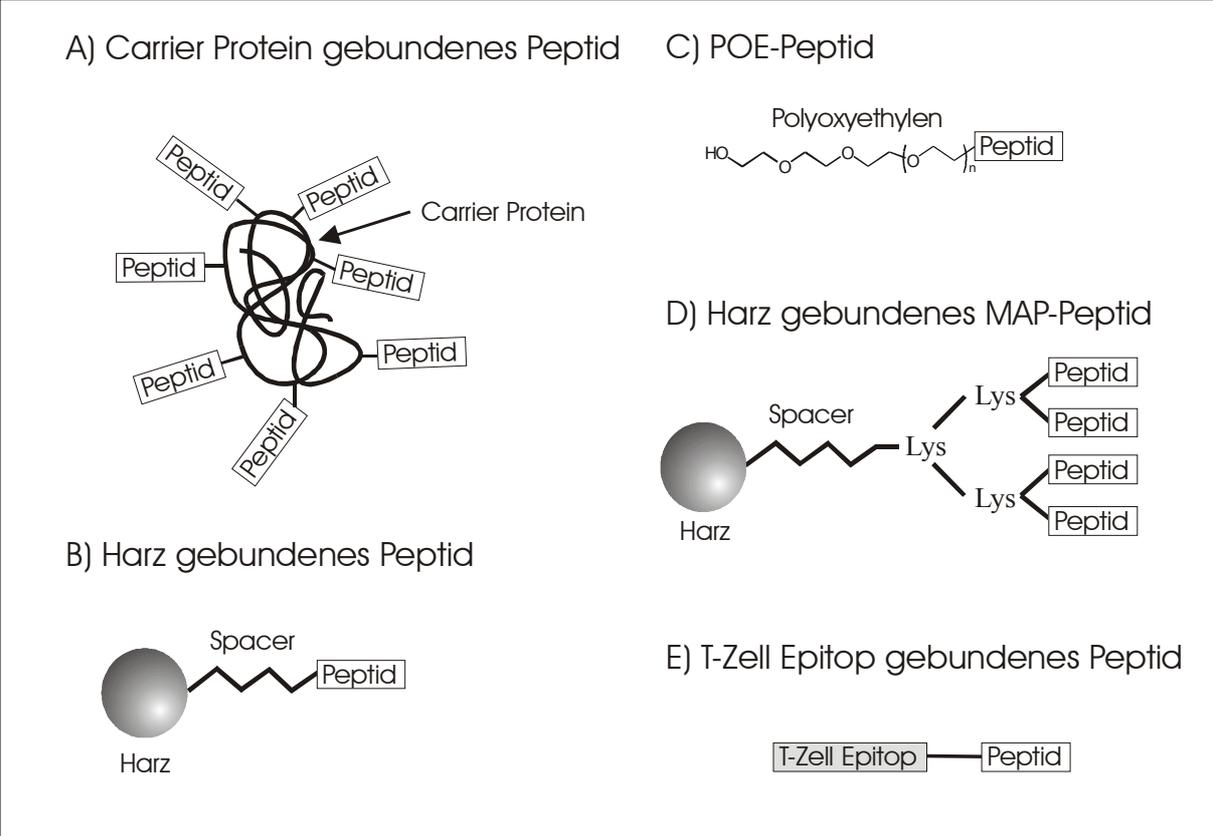


Abb.1.4 Antigene zur Erzeugung Peptid-induzierter Antikörper.

### 1.5. Aufgabenstellung und Zielsetzung:

Obwohl bereits eine Vielzahl unterschiedlichster Peptid-induzierter Antikörper generiert wurden zeigen die in der Literatur beschriebenen Verfahren eine sehr hohe Diversität. Erschwerend kommt hinzu, dass die meisten Verfahren zwar für die Generierung einzelner Antikörper gut geeignet, jedoch für die parallele Generierung mehrerer Antikörper im Rahmen von Proteomstudien kaum geeignet sind. In diesem Kontext sollte ein optimiertes sowie standardisiertes Verfahren zur Generierung Peptid-induzierter Antikörper entwickelt werden und die Spezifität sowie die Sensitivität der erhaltenen Antikörper beurteilt werden. Die Arbeit beschäftigt sich in diesem Zusammenhang mit den folgenden Punkten:

- **Entwicklung eines standardisierten Verfahrens zur Titration einer Vielzahl Peptid-induzierter Antiseren**

Verschiedene Verfahren zur Beschichtung von ELISA-Mikrotiterplatten mit Peptiden sollen getestet werden. Um Seren von Tieren zu vergleichen, die mit unterschiedlichen Peptid-Antigenen immunisiert wurden, soll das Verfahren unabhängig von der Peptidsequenz hohe Beschichtungseffizienz bieten.

- **Evaluierung von Carriersystemen zur Steigerung ihrer Immunogenität**

Unterschiedliche proteinbasierende und synthetische Carriersysteme sollen auf ihre Eignung für die Produktion Peptid-induzierter Antikörper vergleichend getestet werden. Bei der Auswahl der Carrier soll neben der erzielten Steigerung der Immunantwort zusätzlich ein besonderes Augenmerk auf eine möglichst einfache Herstellung, Reinigung und gute Charakterisierbarkeit der Peptid-Carrier-Konstrukte geworfen werden.

- **Produktion von mehreren Peptid-induzierten Antikörpern und Evaluierung ihrer Eignung für Proteomstudien**

Es soll überprüft werden, ob sich die entsprechenden Proteinspots in 2D-Gelen mit Hilfe der produzierten Antikörper spezifisch detektieren lassen. Weiterhin soll die Sensitivität Peptid-induzierter Antikörper-Sonden ermittelt werden, die nach Möglichkeit die Empfindlichkeit N-terminaler Sequenzierung bzw. MS-basierender Techniken erreichen soll.

- **Ermittlung der Epitope Peptid-induzierter Antikörper**

Es soll ein effizientes Verfahren etabliert werden, mit dessen Hilfe sich ein Antikörper-Epitop auf eine Aminosäure genau ermitteln lässt. Mit der erarbeiteten Technik sollen die Epitope der produzierten Peptid-induzierten Antikörper möglichst exakt ermittelt werden.

- **Vorschlag eines prinzipiellen Verfahrens zur Chip-basierten Detektion von Proteinen mit Peptid-induzierten Antiseren**

Da Chip-basierte Protein-Detektionstechniken zunehmend an Bedeutung gewinnen werden, sollte abschließend ein Verfahren vorgeschlagen werden, welches es erlaubt, mit Festphasen-gebundenen Peptid-induzierten Antikörper einzelnen Proteine aus einem Zell-Lysat spezifisch und sensitiv zu detektieren.

## 2. Materialien

### 2.1. Allgemein verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acetanhydrid z.A.	Fluka
Acetonitril (Chromasolv für HPLC)	Riedel-de Haen
Acrylamidlösung 30 %: Acrylamid : Bisacrylamid 37,5 : 1 (rotiphorese Gel 30)	Roth
Agarose SERVA high EEO	Serva
Ammoniumcarbonat z.A. ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Merck
Ammoniumperoxidisulfat z.A. (APS)	Merck
Ampholyte pH 3-10 (Bio-Lyte)	Bio-Rad
Ampholyte pH 3-10 (Pharmalyte)	Amersham Pharmacia
Argon	Linde
(+)-Biotin	Fluka
Bromphenolblau	Merck
tert-Butylmethylether ≥ 99,5 %	Fluka
CHAPS: 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonat	Sigma
Chemolumineszenz-Substratlösung SuperSignal	Pierce
Coomassie G-250	Sigma
Coomassie R-250	Sigma
Cy5-NHS	Amersham Pharmacia
Dichlormethan	Fluka
Dichlormethan	Applied Biosystems
DMF: N,N-Dimethylformamid für die Peptidsynthese	Fluka
DMF: N,N-Dimethylformamid with Crown Cap	Fluka
DMSO: Dimethylsulfoxid z.A.	Fluka
DTE: Dithioerythrit	Roth
ECDI: 1-Ethyl-3-(3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid	Sigma

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
EDTA : Ethylendiamintetraessigsäure	Merck
Essigsäure 99-100 %	Riedel de Haen
Ethanol z.A. ca. 96 %	Merck
Formaldehyd 36,5-38 %	Sigma
Freund's Adjuvans inkomplett	Sigma
Freund's Adjuvans komplett	Sigma
Glycin $\geq 99$ %	Sigma
Glyzerin $\geq 99$ %	Sigma
Harnstoff $\geq 99,5$ %	Roth
Helium	Linde
Iodacetamid $\geq 98$ %	Sigma
Kaliumchlorid z.A. (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat z.A. (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma
Methanol z.A.	Roth
4-Methylmorpholin $\geq 99,5$ %	Fluka
Molekulargewichtsmarker: Dalton Mark VII	Sigma
Molekulargewichtsmarker: High Molecular Weight Marker	Sigma
N,N-Diisopropylethylamin in NMP (2M)	Applied Biosystems
Natriumacetat z.A. (CH <sub>3</sub> COONa)	Merck
Natriumcarbonat z.A. (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Roth
Natriumchlorid z.A. (NaCl)	Roth
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat z.A. (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O)	Merck
Natriumhydrogencarbonat z.A. (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck
Natriumhydrogenphosphat Dihydrat z.A. (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O)	Merck
Natriumhydroxid-Lösung (1 N)	Merck
Natriumthiosulfat Pentahydrat (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> * 5 H <sub>2</sub> O)	Sigma
NMP: N-Methylpyrrolidon	Applied Biosystems
Phosphorsäure z.A. (85 %)	Merck
Piperidin	Applied Biosystems

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Piperidin z.A.	Fluka
Ponceau S	Sigma
Salzsäure (1N)	Roth
Schwefelsäure konz. (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck
SDS: Natriumlaurylsulfat ca. 99 %	Sigma
Silbernitrat z.A. (AgNO <sub>3</sub> )	Roth
Silikonöl DryStrip Cover Fluid	Amersham Pharmacia
Stickstoff (flüssig)	Linde
Sulfosalicylsäure z.A.	Merck
TEMED: N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin z.A.	Roth
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma
Thioanisol ≥ 99 %	Fluka
Trichloressigsäure z.A.	Riedel de Haen
Triethylsilan ≥ 97 %	Fluka
Trifluoressigsäure ≥ 99,5 %	Fluka
Triisopropylsilan ≥ 98 %	Fluka
Trimethylbromsilan ≥ 97 % (TMSBr)	Fluka
Tris: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan z.A.	Roth
Tween 20	Sigma
Wasserstoffperoxid 30 % (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Aldrich
Zitronensäure z.A.	Merck

## 2.2. Aminosäurederivate

<b>Aminosäurederivate</b>	<b>Hersteller</b>
Fmoc-β-Ala-OH	Novabiochem
Fmoc-Abz-OH (Abz: α-Aminohexansäure)	Bachem
Fmoc-Ala-OH	Novabiochem
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	Bachem
Fmoc-Asn(Trt)-OH	Bachem

<b>Aminosäurederivate</b>	<b>Hersteller</b>
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	Senn Chemicals
Fmoc-Cys(Trt)-OH	Bachem
Fmoc-Gln(Trt)-OH	Senn Chemicals
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	Bachem
Fmoc-Gly-OH	Senn Chemicals
Fmoc-His(Trt)-OH	Novabiochem
Fmoc-Ile-OH	Bachem
Fmoc-Leu-OH	Novabiochem
Fmoc-Lys(Boc)-OH	Senn Chemicals
Fmoc-Met-OH	Novabiochem
Fmoc-Phe-OH	Novabiochem
Fmoc-Pro-OH	Novabiochem
Fmoc-Ser(tBu)-OH	Bachem
Fmoc-Thr(tBu)-OH	Senn Chemicals
Fmoc-Trp(Boc)-OH	Novabiochem
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	Novabiochem
Fmoc-Val-OH	Senn Chemicals

### 2.3. Synthescharze

<b>Harz</b>	<b>Hersteller</b>
Fmoc-Ala-Wang-Resin	Bachem
Fmoc-Arg(Pmc)-Wang-Resin	Novabiochem
Fmoc-Asn(Trt)-Wang-Resin	Novabiochem
Fmoc-Asp(OtBu)-Wang-Resin	Novabiochem
Fmoc-Cys(Trt)-Wang-Resin	Novabiochem
Fmoc-Gln(Trt)-Wang-Resin	Novabiochem
Fmoc-Glu(OtBu)-Wang-Resin	Bachem
Fmoc-Gly-Wang-Resin	Bachem

<b>Harz</b>	<b>Hersteller</b>
Fmoc-His(Trt)-Wang-Resin	Bachem
Fmoc-Ile-Wang-Resin	Bachem
Fmoc-Leu-Wang-Resin	Novabiochem
Fmoc-Lys(Boc)-Wang-Resin	Novabiochem
Fmoc-Met-Wang-Resin	Bachem
Fmoc-Phe-Wang-Resin	Bachem
Fmoc-Pro-Wang-Resin	Bachem
Fmoc-Ser(tBu)-Wang-Resin	Bachem
Fmoc-Thr(tBu)-Wang-Resin	Novabiochem
Fmoc-Trp(Boc)-Wang-Resin	Bachem
Fmoc-Tyr(tBu)-Wang-Resin	Bachem
Fmoc-Val-Wang-Resin	Bachem
TentaGel MAP (4-branch)	Rapp Polymere GmbH
TentaGel PAP	Rapp Polymere GmbH
Tentagel S NH <sub>2</sub>	Rapp Polymere GmbH
TentaGel SAM	Rapp Polymere GmbH

## 2.4. Aktivatoren

<b>Aktivatoren</b>	<b>Hersteller</b>
PyBop: (Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat	Novabiochem
Diisopropylcarbodiimid	Fluka
HOBt: 0,5M 1-Hydroxybenzotriazol in DMF	Applied Biosystems
HBTU: 0,1M (2-(1H-Benzotriazol-1-yl)1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphate)	Applied Biosystems

## 2.5. Antikörper und andere Proteine

Antikörper bzw. Proteine	Hersteller
Bovines Albumin Fraction V (BSA)	Sigma
Carboanhydrase II (Human)	Sigma
Maus-Anti-Ratte-HRP	Dianova
Porciner Intrinsic Faktor	Sigma
Porcines Trypsin	Promega
Streptavidin	Fluka
Thyreoglobulin	Sigma
Ziege-Anti-Kaninchen-HRP	Dako
Ziege-Anti-Maus-HRP	Dako

## 2.6. Häufig verwendete Puffer

Puffer	Zusammensetzung
PBS	8 g/l NaCl 0,3 g/l KCl 1,44 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,24 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
TBS	2,42 g/l Tris 8 g/l NaCl
TBS-T	0,1 % (v/v) Tween 20 in TBS

## 2.7. Verschiedenes

Material	Hersteller
Amino-PEG <sub>500</sub> -UC Sheet	Abimed
Dialyseschläuche Visking Typ8/32	Roth
Faltenfilter Typ: 595	Schleicher & Schuell
Film, Kodak X-OMAT XAR-5	Sigma
Gel Drying Film 17,5 x 20 cm	Promega

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Gelausschluß-Chromatographie-Säule Sephadex G-25 M	Amersham Pharmacia
Gel-Blotting Papier 460 x 570 cm	Roth
Glaskapillare: NanoES spray capillaries	Protana
HPLC-Material POROS 20 R2	Perseptive
HPLC-Material Protein A HyperD 20	Biosepra
HPLC-Säule: Protein & Peptide C18	Vidac
HPLC-Säule: Sil ODS2	GROM
HPLC-Säule: SOURCE 5RPC ST 4.6/150	Amersham Pharmacia
HPLC-Säule: Ultrasphere	Beckmann
IEF-Gele: Immobiline DryStrips pH 3-10, 18 cm	Amersham Pharmacia
Mikrotiterplatten: Clear Polystyrene	Costar
Mikrotiterplatten: Maxisorb	Nunc
Mikrotiterplatten: Streptavidin	Microcoat
Nitrozellulose Objektträger (FAST Slides)	Schleicher & Schuell
Poly-L-Lysin Objektträger (Poly-Prep Slides)	Sigma
Transfer Membran Biotrace NT 0,45 µm	Pall Gelman Sciences

## 2.8. Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Auto-Spot-Roboter ASP222	Abimed
Elektrophorese Apparatur Mini-Protean	Bio-Rad
Elektrophorese Apparatur Multiphor II	Amersham Pharmacia
Elektrophorese Apparatur Protean II	Bio-Rad
ELISA-Platten-Lesegerät Biolumin 960	Molecular Dynamics
Gel Drying Kit 17,5 x 20 cm	Promega
HPLC System-Gold: Autosampler 507 Programmable Solvent Module 126 Diode Array Detector Module 168	Beckman

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
HPLC-System Sykam: Injektor S5110 (Rheodyne mit 2 ml Loop) Solvent Delivery System S1000 Solvent Organizer S7110 Mischer S8110 Detektor 206 PHD Linear	Sykam
Hybridisierungs-ofen	Bachofer
Laserscanner Storm 860	Molecular Dynamics
Lyophyle Alpha 2-4	Christ
Massenspektrometer (Triple-Quad.): TSQ7000	Finnigan
Mutlipler Synthese-Roboter AMS422	Abimed
Nano-Elektrospray-Quelle	Protana
Peptid-Synthesizer ABI433A	Applied Biosystems
Photometer DU 640	Beckman
Rehydratisierungs-Kassette	Amersham Pharmacia
Röntgenfilmentwickler 1120	Protec
Scanner: Powerlook II	Umax
Schüttler GFL 3015	Bachofer
Semi Dry Blotting Apparatur	Hölzel GmbH
Stromversorgung: Model 200/2.0	Bio-Rad
Stromversorgung: PAC 300	Bio-Rad
Stromversorgung: PAC 3000	Bio-Rad
Stromversorgung: PNC 6000-100	Knürr – Heinzinger
Thermostat RM 6	MGW Lauda
Tischzentrifuge EBA 3 S	Hettich
Ultraschallbad Sonorex Super RK 103H	Bandelin
Vacuum Concentrator	Bachhofer
Zentrifuge: 202MK	Sigma

## 2.9. Verwendete Software

Software	Link bzw. Hersteller
2D Software: 2D-Analyzer V6.2.6	BioImage
Proteomweaver V 1.3.2	Definiens
BlastP	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>
Imagequant V5.0	Amersham Pharmacia
PeptideSearch	<a href="http://www.protana.com/~pm/#PeptProtana">http://www.protana.com/~pm/#PeptProtana</a>
Protscale	<a href="http://www.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl">http://www.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl</a>

## 2.10. Verwendete Versuchstiere

Versuchstier	Hersteller
Weibliche BALB/c Mäuse	Prof. Dr. Eckhard Wolf Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie
Weibliche Lewis Ratten	Charles River Laboratories
Weibliche New Zealand White Kaninchen	Prof. Dr. Eckhard Wolf Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie

### 3. Methoden

#### 3.1 Auswahl der zur Immunisierung verwendeten Peptide

Da hydrophile Peptide als besonders immunogenen gelten wurden stets Hydrophobizitätsplots nach Kyte & Doolittle über die gesamte Proteinsequenz erstellt. Hierfür wurde das im Internet verfügbare Programm „ProtScale“ (<http://www.expasy.ch>) mit einem „Fenster“ von 10 verwendet. Als Werte für die Hydrophobizität wurde der in Tabelle 3.1 dargestellte Standard-Kyte & Doolittle „Scale“ [90] verwendet.

Aminosäure	Wert	Aminosäure	Wert
Ala	1,8	Leu	3,8
Arg	-4,5	Lys	-3,9
Asn	-3,5	Met	1,9
Asp	-3,5	Phe	2,8
Cys	2,5	Pro	-1,6
Gln	-3,5	Ser	-0,8
Glu	-3,5	Thr	-0,7
Gly	-0,4	Trp	-0,9
His	-3,2	Tyr	-1,3
Ile	4,5	Val	4,2

Tab. 3.1 Standard-Kyte & Doolittle Scale.

Bereiche mit einem Score von kleiner -1 gelten als ausreichend hydrophil und sind als geeignet erachtet worden. Alle in Frage kommenden Bereiche wurden mittels einer BLAST-Homologiesuche [91], gegen die NCBI-nr-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), analysiert. Cystein-haltige Peptide wurden nicht berücksichtigt.

#### 3.2 Peptidsynthese

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Peptide wurden mittels Festphasensynthese nach Merrifield [63-65] hergestellt. Hierfür wurde die orthogonale 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) Schutzgruppenstrategie verwendet [92]. Je nach gewünschtem C-Terminus wurden unterschiedliche Synthescharze verwendet. Eine Aufstellung der verwendeten Harze ist in Tab. 3.2 zu sehen.

Art des Peptides	Verwendetes Harz
C-terminale Carboxylfunktion	Mit einer Aminosäure beladenes Hydroxymethylphenoxy-Harz (Wang-Harz)
C-terminales Carbonsäureamid	Tentagel* S AM
C-terminales Polyoxyethylen (POE)	Tentagel* PAP
Harz gebundenes Peptid	Tentagel* S NH <sub>2</sub>
Harz gebundenes MAP Peptid	Tentagel* MAP (4-branch)
* Tentagel: Polystyrol – Polyethylenglykol Copolymer (Rapp Polymer GmbH)	

Tab. 3.2 Für die Peptidsynthese verwendete Syntheseharze.

Eine Zusammenstellung der verwendeten Aminosäurederivate zeigt Tab. 3.3.

Aminosäure	N-Terminale Schutzgruppe	Schutzgruppe der Seitenketten
Alanin	Fmoc	-
Cystein	Fmoc	Trityl
Aspartat	Fmoc	t-Butyl
Glutamat	Fmoc	t-Butyl
Phenylalanin	Fmoc	-
Glycin	Fmoc	-
Histidin	Fmoc	Trityl
Isoleucin	Fmoc	-
Lysin	Fmoc	t-Butyloxycarbonyl (t-Boc)
Leucin	Fmoc	-
Methionin	Fmoc	-
Asparagin	Fmoc	Trityl
Prolin	Fmoc	-
Glutamin	Fmoc	Trityl
Arginin	Fmoc	Pbf oder Pmc
Serin	Fmoc	t-Butyl
Threonin	Fmoc	t-Butyl
Valin	Fmoc	-
Tryptophan	Fmoc	t-Boc
Tyrosin	Fmoc	t-Butyl
$\alpha$ -Aminohexansäure	Fmoc	-

Tab. 3.3 Verwendete Aminosäurederivate.

### 3.2.1 Parallele Synthese von Peptiden im 20 µmol Maßstab

Die Peptidsynthesen im 20 µmol Maßstab wurden mit einem multiplen Synthese-Roboter (Typ: AMS422, Fa. Abimed) durchgeführt. Der Synthesizer wurde mit den entsprechenden Peptid-Sequenzen programmiert, die Einwaagen entsprechend den Angaben des Synthesizer-Standard-Programms durchgeführt. Nun wurden die Aminosäuren entsprechend den Vorgaben des Synthesizers in DMF bzw. N-Methylpyrrolidon (His und Phe) gelöst. Anschließend wurden die Peptide mit den Standard-Zyklen des Gerätes synthetisiert. Hierbei wurden die Aminosäurederivate im 6,5-fachem Überschuss eingesetzt. Zur Aktivierung wurde (Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat (PyBOP) mit N-Methylmorpholin als Base verwendet. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte mit 20 % Piperidin in N,N-Dimethylformamid (DMF). Für die Waschschrte wurde DMF und 60 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in DMF verwendet. Die Peptide wurden mit den Standard-Zyklen synthetisiert und wie in den Abschnitten 3.2.5 bis 3.2.7 beschrieben abgespalten.

### 3.2.2 Synthese von Peptiden im 100 µmol Maßstab

Die Peptidsynthesen im 100 µmol Maßstab wurden mit einem Peptidsynthesizer des Typs ABI433A (Applied Biosystems) durchgeführt. Zunächst wurde in die Reaktionskammer des Synthesizers die Menge Harz eingewogen, die unter Berücksichtigung der Beladung des jeweiligen Harzes 100 µmol an reaktiven Gruppen entspricht. Da die Aminosäurederivate im 10-fachem Überschuss eingesetzt werden, ist jeweils 1 mmol der Aminosäurederivate in die zugehörigen Kartuschen eingewogen worden. Nun wurde der Synthesizer entsprechend der zu synthetisierenden Sequenz mit den Aminosäuren beschickt. Die Synthesen wurden mit den Standard FastMoc 0.1 ΩMonPrevPk Zyklen durchgeführt. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte hierbei mit Piperidin. Zur Aktivierung der Carboxylgruppe wurde 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU) in Kombination mit 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) als Aktivator und Diisopropylethylamin als Base verwendet. Als Lösungsmittel und für die Waschschrte diente N-Methylpyrrolidon.

### 3.2.3 N-terminale Biotinylierung von Peptiden

Um sterische Behinderung des Peptides durch Streptavidin zu verhindern, wurden zunächst zwei α-Aminohexansäure als „Spacer“ zwischen Biotin und dem Peptid eingebaut. Die Spacer

wurden wie „gewöhnliche“ Aminosäuren (siehe Abschnitt 3.2.1 und 3.2.2) im Peptidsynthesizer an das Harz-gebundene und geschützte Peptid gekoppelt. Die N-terminale Kopplung des Biotin an die Peptide erfolgte manuell vor der Abspaltung des Peptids vom Harz. Pro 100  $\mu\text{mol}$  Peptid wurde folgende Lösung hergestellt:

Aktivierte Biotin-Lösung:	433 mg Biotin 0,55 g PyBOP 390 $\mu\text{l}$ N-Methylpyrrolidon 390 $\mu\text{l}$ Dichlormethan 390 $\mu\text{l}$ N-Methylmorpholin auf 30 ml mit Dimethylformamid (DMF)
---------------------------	---

Das an das Syntheseharz gekoppelte Peptid wurde 3 mal für 30 min in 10 ml Biotin-Lösung inkubiert. Schließlich wurde das Harz noch 3 mal mit DMF und 1 mal mit Dichlormethan (DCM) gewaschen und an der Luft getrocknet. Die biotinylierten Peptide wurden wie in den Abschnitten 3.2.5 bis 3.2.7 beschrieben abgespalten.

### 3.2.4 Spotsynthese von Peptiden auf Zellulose-Membranen

Zur Spotsynthese von Peptiden auf Zellulose-Membranen wurde ein Spotting-Roboter (ASP 222, Fa. Abimed) verwendet. Die Synthese wurde exakt wie vom Gerätehersteller beschrieben durchgeführt (Voraktivierung der Aminosäuren mit Diisopropylcarbodiimid (DIC) und HOBt). Als Membranen diente mit Polyethylenglykol-Linkern ( $n = 8-10$ ) derivatisierte Zellulose (Beladung: 400  $\text{nmol}/\text{cm}^2$ , Fa. Abimed). Auf jede Membran wurden maximal 96 verschiedene Peptide synthetisiert. Um möglichst scharfe und homogene Peptid-Spots zu erhalten wurde im ersten Synthesesyklus auf jede Position 0,3  $\mu\text{l}$  aktiviertes  $\beta$ -Alanin aufgetragen und die restlichen noch freien Bindungsstellen blockiert. Bei den weiteren Reaktionszyklen wurden jeweils 0,5  $\mu\text{l}$  der aktivierten Aminosäurederivate auf die entsprechende Position pipettiert. Zwischen jedem Zyklus wurde, wie vom Hersteller des Synthesizers vorgeschlagen, die Membran aus dem Gerät entfernt, freie Aminogruppen manuell blockiert und anschließend die Fmoc-Schutzgruppen manuell abgespalten. Nach der Synthese wurden die Seitenschutzgruppen der Membran-gebundenen Peptide wie in Abschnitt 3.2.8 beschrieben abgespalten.

### 3.2.5 Abspalten der Seitenschutzgruppen Harz-gebundener Peptide

Zum Abspalten der Seitenschutzgruppen der Harz-gebundenen Peptide wurde die folgende Lösung verwendet:

Abspalllösung für Harz-gebundene Peptide :	92,5 %	TFA
	2,5 %	Wasser
	5 %	Triethylsilan

Pro Gramm getrocknetes Syntheseharz wurden 20 ml Abspalllösung verwendet. Das Harz wurde für 2 h in der Abspalllösung unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das Harz abfiltriert, einmal mit 10 ml konzentrierter TFA und einmal mit 10 ml Eisessig gewaschen. Abschließend wurde 3mal mit Dichlormethan gewaschen und das Harz im Vakuum getrocknet.

### 3.2.6 Abspalten von Peptiden mit C-terminaler Carboxyl- bzw. Amidgruppe

Zum Abspalten der Seitenschutzgruppen unter gleichzeitiger Abspaltung der Peptide vom Harz wurde mit folgender Lösung gearbeitet:

Abspalllösung für Peptide mit C-terminaler Carboxyl- bzw. Amidgruppe:	92,5 %	TFA
	2,5 %	Wasser
	5 %	Triisopropylsilan oder 5 % Triethylsilan

Für 10  $\mu$ mol Syntheseharz wurde 1 ml Abspalllösung verwendet. Das Harz wurde für 2 h bei Raumtemperatur in der Abspalllösung geschüttelt. Es wurde abfiltriert und das Filtrat in  $-20^{\circ}\text{C}$  kalten t-Butylmethylether getropft. Die entstandene Peptid-Suspension wurde anschließend für minimal 2 h bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gekühlt und dreimal gründlich mit  $-20^{\circ}\text{C}$  kaltem tert-Butylmethylether unter vollständiger Resuspension gewaschen und an der Luft getrocknet.

### 3.2.7 Abspalten von Peptiden mit C-terminalem Polyoxyethylen (POE)

Zum Abspalten POE-gebundener Peptide wurde mit der folgenden Lösung gearbeitet:

Abspatlösung für POE-gebundene Peptide:	94 % Trifluoressigsäure 1 % Trimethylbromsilan (TMSBr) 5 % Thioanisol
---	---

Die Inkubationszeit der Harze in der Abspatlösung betrug 1 h. Ansonsten wurde wie bei der Abspaltung von Peptiden mit C-terminaler Carboxylgruppe verfahren (siehe Abschnitt 3.2.6).

### 3.2.8 Abspalten der Seitenschutzgruppen von Membran-gebundenen Peptiden

Pro Membran wurde die folgende Abspatlösung verwendet:

Abspatlösung für Membran-gebundene Peptide:	10 ml Trifluoressigsäure 9 ml Dichlormethan (DCM) 600 µl Triisopropylsilan 400 µl Wasser
---	---

Die Membranen wurden nach folgender Vorschrift unter Schütteln inkubiert:

Schritt	Inkubation
Abspalten	Einmal für 1 h in 20 ml Abspatlösung
Waschen	Zweimal für 2 min mit je 25 ml DCM
Waschen	Zweimal für 2 min mit je 25 ml DMF
Waschen	Zweimal für 2 min mit je 25 ml Ethanol

Tab. 3.5 Schema der Schutzgruppen-Abspaltung Membran-gebundener Peptide.

Schließlich wurden die Membranen an der Luft getrocknet und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

## 3.3 Reinigung und Analyse der Peptide

### 3.3.1 Reinigung der Peptide mittels präparativer Reversed Phase HPLC

Alle Peptide mit C-terminaler Carboxyl- bzw. Amidgruppe wurden mittels präparativer Reversed Phase HPLC gereinigt. Hierfür wurde ein HPLC-System der Fa. Sykam bestehend





Programm	
Zeit [min]	Lösungsmittelzusammensetzung
0-3	100 % Laufmittel A 0 % Laufmittel B
3-23	Gradient von 0 % Laufmittel B auf 80 % Laufmittel B
23-27	20 % Laufmittel A 80 % Laufmittel B
27-35	100 % Laufmittel A 0 % Laufmittel B

Tab. 3.8 HPLC-Methode für die Analyse von Peptiden.

Eine kleine Spatelspitze des Peptids wurde in 200 µl 0,1 % Trifluoressigsäure gelöst, 5 min mit 6000 U/min zentrifugiert (Hettich EBA 3 S Tischzentrifuge), die Probenröhrchen des Probengebers mit dem Überstand befüllt und die HPLC-Anlage gestartet.

### 3.3.3 MALDI-MS Analyse der Peptide

Die MALDI-MS Analysen wurden von der Arbeitsgruppe Lottspeich des Max-Planck-Institutes für Biochemie durchgeführt. Hierfür wurde ein MALDI-TOF Massenspektrometer (Reflex III, Bruker) verwendet. Als Laser wurde ein 337 nm Stickstoff-Laser und 2,5-Dihydroxybenzoesäure als Matrix verwendet. 20 mg der Matrix wurde in 1 ml eines Gemisches aus 30 % (v/v) Acetonitril und 0,1 % (v/v) TFA in Wasser gelöst. Vor der Messung wurde eine kleine Probe des Peptides in 500 µl eines Gemisches aus 30 % (v/v) Acetonitril und 0,1 % (v/v) TFA in Wasser aufgenommen. Nun wurde 1 µl Matrix-Lösung auf das „Target“ aufgetragen und an der Luft getrocknet. Anschließend wurden 0,6 µl der Probe auf die getrocknete Matrix gegeben und abermals an Luft getrocknet. Gemessen wurde im „positive-reflector mode“ mit „delayed extraction“. Die Beschleunigungsspannung betrug 20 kV und die Reflektorspannung 22,8 kV. Über etwa 50 Laserpulse wurde das Spektrum aufaddiert.

## 3.4 Herstellung von Peptid-Protein-Carrier Konstrukten

### 3.4.1 Kopplung der Peptide an Protein-Carrier-Moleküle mittels ECDI

Zunächst wurde das Peptid in Wasser gelöst (Konzentration: 1 mg/ml) und anschließend pro mg Peptid 10 mg 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (ECDI) zugegeben. Nun wurde der pH mittels 0,1 M NaOH auf pH 5 eingestellt. Nach 5 min Schütteln wurde soviel

Carrier-Protein zugegeben, daß auf 50 Aminosäuren des Carriers ein Peptid-Molekül kam. Nach 4 h Schütteln wurde die Reaktion mit Natriumacetat-Puffer pH 4,2 gestoppt (Endkonzentration Natriumacetat: 100 mM). Nach einstündiger Inkubation wurde zunächst gegen PBS, dann gegen Wasser in den vorbereiteten Schläuchen (siehe Abschnitt 3.4.2) dialysiert und schließlich lyophilisiert.

### 3.4.2 Vorbereitung der Dialyse-Schläuche

Die Dialyse-Schläuche (Dialyseschläuche Visking Typ8/32 der Fa. Roth) wurden auf die gewünschte Länge zugeschnitten und für 5 min in einem Liter 5 mM EDTA / 200 mM NaHCO<sub>3</sub> Lösung gesiedet. Anschließend wurden sie kurz mit entsalztem Wasser gewaschen und erneut 5 min in einem Liter 5 mM EDTA / 200 mM NaHCO<sub>3</sub> Lösung gesiedet. Die Dialyse-Schläuche wurden kurz mit H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> gewaschen, autoklaviert und schließlich bei 4°C gelagert.

## 3.5 Immunisierung der Tiere

### 3.5.1 Injektion der Antigene

Vor den Immunisierungen wurde die Präimmunsere der Tiere mit einem ELISA (siehe Abschnitt 3.6) gegen das Antigen getestet. Es wurden nur Tiere verwendet die bei Serumverdünnungen von 1/50 Absorptionen < 0,1 zeigten. Alle Antigene wurden im Laufe der Arbeit einmal mit komplettem Freund's Adjuvans [93] und mehrmals mit inkomplettem Freund's Adjuvans subkutan in die Tiere injiziert. Vor der Injektion wurde das in PBS pH 7,2 gelöste Antigen zu gleichen Teilen mit dem Adjuvans solange gemischt, bis eine homogene weiße Emulsion entstand. Die Antigene wurden nach dem folgenden Schema in die Tiere injiziert:

Art des Tieres	Peptidmenge / Volumina / Ort der Injektion
Weibliche BALB/c Mäuse	100 µg verteilt auf 4 Injektionen a 25 µl subkutan unter die Rückenhaut
Weibliche Lewis Ratten	150 µg verteilt auf 4 Injektionen a 50 µl subkutan unter die Rückenhaut
Weibliche New Zealand White Kaninchen	250 µg verteilt auf 8 Injektionen a 50 µl subkutan unter die Rückenhaut

Tab. 3.9 Antigen-Mengen und Art der Injektionen.

Die Gabe der Antigene erfolgte im Abstand von 3 Wochen. Ab der zweiten Injektion wurde jeweils 10 Tage nach den Injektionen Probeblut genommen. Die Blutentnahme erfolgte bei den Mäusen und Ratten retrobulbär und im Falle der Kaninchen aus der marginalen Ohrvene. Das Serum wurde wie in Abschnitt 3.5.2 beschrieben gewonnen und mit einem ELISA (siehe Abschnitt 3.6) untersucht. Je nach Titer des Probeblutes wurden zwischen drei und sechs Injektionen durchgeführt.

### 3.5.2 Präparieren der Seren

Nach der Blutentnahme wurde das Blut zunächst für 60 min bei 37°C und dann über Nacht bei 4°C inkubiert. Daraufhin wurde es für 10 min bei 4°C mit 10000 g zentrifugiert (Zentrifuge: Sigma 202MK, Trommelrotor), das Serum abpipettiert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### 3.6 Titration der Seren mittels ELISA

Für alle verwendeten ELISAs wurden die folgenden Puffer verwendet:

<p><b>Beschichtungspuffer:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 17,5 mM NaHCO<sub>3</sub></li> <li>▪ 7,5 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></li> <li>▪ auf pH 9,6 titriert</li> </ul> <p><b>Blockierlösung:</b> 5 % (w/v) BSA in Waschpuffer</p>	<p><b>Waschpuffer:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></li> <li>▪ 14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>*H<sub>2</sub>O</li> <li>▪ 2 g KCl</li> <li>▪ 80 g NaCl</li> <li>▪ 5 ml Tween 20</li> <li>▪ in 10 l H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub></li> </ul>
---	--

### 3.6.1 Beschichten von Polystyrol-Mikrotiterplatten mit Peptiden bzw. POE-Peptiden

Zur Beschichtung der 96er Mikrotiterplatten (Nunc „Maxisorb“ bzw. Costar „Clear Polystyrene“) mit Peptiden bzw. POE-Peptiden wurde nach folgendem Schema gearbeitet:

<b>Schritt</b>	<b>Volumen pro „Well“</b>	<b>Lösung</b>	<b>Inkubation</b>
Beschichten	50 µl	10 µg/ml Peptid in Beschichtungspuffer	3 h bei 37°C
Waschen	350 µl	Waschpuffer	4 x 1 min
Blockieren	350 µl	Blockierlösung	1 h bei 37°C
Waschen	350 µl	Waschpuffer	4 x 1 min

Tab. 3.10 Beschichten von Mikrotiterplatten mit Peptiden bzw. POE-Peptiden.

Die beschichteten Platten wurden bei –20°C gelagert.

### 3.6.2 Kovalente Beschichtung von NOS-reaktiv-Mikrotiterplatten mit Peptiden

Zur kovalenten Beschichtung der reaktiv-Mikrotiterplatten (Costar: NOS) wurde nach folgendem Schema gearbeitet:

<b>Schritt</b>	<b>Volumen pro „Well“</b>	<b>Lösung</b>	<b>Inkubation</b>
Beschichten	50 µl	10 µg/ml Peptid in PBS pH 9,0	1 h bei RT
Waschen	350 µl	Waschpuffer	4 x 1 min
Blockieren	350 µl	Blockierlösung	30 min bei RT
Waschen	350 µl	Waschpuffer	4 x 1 min

Tab. 3.11 Beschichten von NOS-reaktiv-Mikrotiterplatten mit Peptiden.

Die beschichteten Platten wurden bei –20°C gelagert.

### 3.6.3 Beschichtung von Polystyrol-Mikrotiterplatten mit biotinylierten Peptiden über Streptavidin

Zur Beschichtung von Polystyrol-Mikrotiterplatten mit biotinylierten Peptiden über Streptavidin wurde nach folgender Vorschrift gearbeitet:

Schritt	Volumen pro „Well“	Lösung	Inkubation
Beschichten mit Streptavidin	50 µl	10 µg/ml Streptavidin in Beschichtungspuffer	3 h bei 37°C
Waschen	350 µl	Waschpuffer	4 x 1 min
Beschichten mit Biotin-Peptid	50 µl	10 µg/ml biotinyliertes Peptid in Waschpuffer	1 h bei 37°C
Waschen	350 µl	Waschpuffer	4 x 1 min
Blockieren	350 µl	Blockierlösung	1 h bei 37°C
Waschen	350 µl	Waschpuffer	4 x 1 min

Tab. 3.12 Beschichtung von Polystyrol-Mikrotiterplatten mit biotinylierten Peptiden über Streptavidin.

Die beschichteten Mikrotiterplatten wurden bei -20°C gelagert.

### 3.6.4 Titration Peptid-induzierter Antiseren mit Peptid-beschichteten Mikrotiterplatten

Für die ELISA-Analysen wurden folgende sekundären Antikörper verwendet:

Antikörpertyp	Hersteller	Verdünnung
Ziege-Anti-Maus-HRP	Dako	1/2000 in Waschpuffer
Ziege-Anti-Kaninchen-HRP	Dako	1/2000 in Waschpuffer
Maus-Anti-Ratte-HRP	Dianova	1/5000 in Waschpuffer

Tab. 3.13 Die verwendeten sekundären Antikörper.

Als Substrat wurde die folgende Lösung kurz vor Gebrauch hergestellt:

**TMB-Substratlösung:**

(kurz vor Gebrauch hergestellt)

- 10 ml H<sub>2</sub>O
- 9,9 ml 0,2 M Natriumacetat
- 100 µl 0,2 M Zitronensäure
- 200 µl TMB (Tetramethylbenzidin) in DMSO  
(0,1 g TMB in 10 ml DMSO lösen, aliquotieren und bei -20°C lagern)
- 8 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Die ELISA-Analyse der Seren wurde mit den Peptid-beschichteten Mikrotiterplatten nach folgendem Schema durchgeführt:

Schritt	Volumen pro „Well“	Lösung	Inkubation
Inkubation des Serums	50 µl	Verdünnungsreihen zwischen 1/50 und 1/6400 in PBS-T	1 h bei 37°C
Waschen	350 µl	Waschpuffer	4 x 1 min
Inkubation der sek. Antikörper (HRP markiert)	50 µl	Den Herstellerangaben entsprechend verdünnt in PBS-T	1 h bei 37°C
Waschen	350 µl	Waschpuffer	4 x 1 min
Reaktion	50 µl	TMB-Substratlösung	10 min
Stoppen der Reaktion	25 µl	2M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-

Tab. 3.14 Titration der Peptid-induzierten Seren.

Die optische Dichte (OD) der Lösungen in den „Wells“ wurde mit einem ELISA-Platten-Lesegerät (Typ: Biolumin960 der Fa. Molecular Dynamics) bei 450 nm bestimmt.

### 3.7 Epitopmapping mit durch Spot-Synthese hergestellten Peptid-„Arrays“

#### 3.7.1 Immunoassay mit den Peptid-„Arrays“

Zur Identifizierung der Bindungsepitope, der in den Seren enthaltenen Peptid-induzierten Antikörper, wurden die durch Spot-Synthese hergestellten Peptid-„Arrays“ (Herstellung siehe Abschnitt 3.2.4) nach dem in Tabelle 3.15 dargestellten Schema behandelt. Die Inkubationen

wurden mit jeweils 15 ml der Lösung im Hybridisierungssofen bei Raumtemperatur durchgeführt.

Schritt	Lösung	Inkubation
Waschen	TBS-T Puffer	2 x 10 min
Blockieren	5 % BSA in TBS-T Puffer	1 x 2 h
Antiseren	Je nach Serum zwischen 1/500 oder 1/1000 verdünnt in 5 % BSA / TBS-T	1 x 1 h
Waschen	TBS-T Puffer	4 x 10 min
Sek. Antikörper	Sekundären Antikörper (Ziege-Anti-Maus-HRP, Fa. Dako) wurde 1/2000 in 5 % BSA / TBS-T verdünnt	1 x 1 h
Waschen	TBS-T Puffer	4 x 10 min

Tab. 3.15 Immunoassay mit den Peptid-„Arrays“.

Zur Detektion wurde die Membran mit etwas Filterpapier (Gel-Blotting-Papier, Fa. Roth) abgetupft und mit 3 ml Chemolumineszens-Substratlösung (SuperSignal, Fa. Pierce) getränkt. Nach 7 min Inkubationszeit wurde die Substratlösung abgegossen und die Membran in Klarsichtfolie verpackt. Schließlich wurden die Röntgenfilme („XAR5“ der Fa. Kodak) mit Expositionszeiten zwischen 1 s und 1 min aufgelegt und die Filme mit einem Röntgenfilmentwickler (Typ: 1120, Fa. Protec) entwickelt.

### 3.7.2 Quantifizieren der Signale

Die erhaltenen Filme wurden im Durchlichtverfahren mit 150 dpi Auflösung als 8 bit Graustufenbild gescannt (Scanner: PowerLook II, Fa. Umax) und mit einer Bildanalysesoftware (2-D Analyzer V6.2.6, Fa. BioImage) ausgewertet. Hierbei wurden die Signalintensitäten über die Gesamtfläche der Peptid-Spots integriert.

### 3.7.3 Entfernen der gebundenen Antikörper von den Membranen („Stripping“)

Um die Antikörper von den Membranen wieder zu entfernen wurden folgende Waschschrte mit jeweils 15 ml im Hybridisierungssofen bei Raumtemperatur durchgeführt:

Anzahl und Dauer der Waschschrirte	Lösungen
2 x 10 min	TBS-T
3 x 10 min	H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>
3 x 10 min	Dimethylformamid (DMF)
3 x 10 min	H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>
3 x 10 min	8 M Harnstoff, 1 % (w/v) SDS und 0,5 % (v/v) β-Mercaptoethanol
3 x 10 min	50 % (v/v) Ethanol
3 x 10 min	10 % (v/v) Essigsäure
2 x 10 min	Methanol

Tab. 3.16 Waschschrirte zum Entfernen der an den Peptid-Membranen gebundenen Antikörper.

Anschließend wurde die Membran an der Luft getrocknet und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Kontrolle wurde, vor dem erneuten Verwenden der Membranen, die in Abschnitt 3.7.1 beschriebene Detektion, ohne Serum also nur mit den sekundären Antikörpern durchgeführt. Nur wenn nach 30 min Expositionszeit kein Signal auf dem Filmen sichtbar geworden war, wurde die Membran für weitere Versuche verwendet.

### 3.8 Vorbereitung der Proben für die Elektrophorese

#### 3.8.1 Aufschluss von Geweben

10 mg Gewebe wurde unter Stickstoffkühlung in einem Mörser zu einem feinen Pulver zerrieben. Auf das noch gefrorene Pulver wurden 500  $\mu\text{l}$  des folgenden Puffers gegeben:

Lyse-Puffer:	0,6 g Harnstoff 0,4 g CHAPS 48 mg Tris 100 mg DTT 200 $\mu\text{l}$ Ampholyte 3-10 ad 10 ml H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>
--------------	---

Das Gemisch wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, für 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt und für 10 min im Ultraschallbad (Sonorex Super RK103H, Fa. Bandelin)

sonifiziert und schließlich mit 10.000 g zentrifugiert (Zentrifuge: Sigma 202MK, Trommelrotor). Die Überstände wurden aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.8.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Um den Proteingehalt des Zell-Lysates zu ermitteln, wurde die Methode nach Bradford [94] verwendet.

#### Herstellung des Bradford-Reagenz:

Zur Herstellung des Bradford-Reagenz wurden 10 mg Coomassie G-250 in 5 ml Ethanol gelöst und 10 ml 85 % Phosphorsäure zugegeben. Nun wurde mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt und die Lösung mit einem Faltenfilter (Typ: 595, Fa. Schleicher & Schuell) filtriert.

#### Erstellen einer Eichgerade:

Mit einer BSA-Verdünnungsreihe (0  $\mu\text{g/ml}$  Leerwert, 12,5  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$ , 37,5  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ , 62,5  $\mu\text{g/ml}$ , 75  $\mu\text{g/ml}$ , 87,5  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ ) wurde für jedes angesetzte Bradford-Reagenz eine Eichgerade erstellt. Hierfür wurden zu jeweils 100  $\mu\text{l}$  der BSA-Lösungen 1000  $\mu\text{l}$  Bradford-Reagenz zugegeben und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die optische Dichte der Lösungen wurde bei 595 nm photometrisch bestimmt (Photometer: DU 640, Fa. Beckman). Die gemessenen Werte wurden gegen die BSA-Konzentration in einem Diagramm aufgetragen.

#### Bestimmung der Proteinkonzentration:

Der Bradford-Assay wurde mit jeweils 100  $\mu\text{l}$  von 1/100, 1/50 und 1/25 verdünnten Zell-Lysaten durchgeführt. Die Proteinkonzentrationen der Verdünnungen wurden anhand der Eichgeraden bestimmt, die entsprechende Proteinkonzentration des Lysates berechnet und der Mittelwert bestimmt.

### 3.9 Gel-Elektrophorese von Proteinen

#### 3.9.1 1D-SDS-Gel-Elektrophorese [95]

Vorbereiten der Gele (7 cm Länge x 8 cm Breite x 0,75 mm Tiefe):

Vor dem Gießen der Gele wurden folgende Gel-Lösungen hergestellt und 15 min entgast:

4 %iges Sammelgel (für 10 ml):	6,1 ml	H <sub>2</sub> O
	2,5 ml	0,5 M Tris-HCl pH 6,8
	1,3 ml	30 % (w/v) Acrylamid (Acrylamid / Bisacrylamid 37,5 / 1)
	100 µl	10 % (w/v) SDS-Lösung
12 %iges Trenngel (für 40 ml):	13,4 ml	H <sub>2</sub> O
	10,0 ml	1,5 M Tris-HCl pH 8,8
	16,0 ml	30 % (w/v) Acrylamid (Acrylamid / Bisacrylamid 37,5 / 1)
	400 µl	10 % (w/v) SDS-Lösung

Zum Start der Polymerisation wurde zu 40 ml Trenngel-Lösung 200 µl einer 10 % Ammoniumperoxodisulfat (APS) Lösung und 20 µl N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED) zugegeben und gemischt. Anschließend wurde das Gel in die Apparatur gegossen (Mini-Protean, Fa. BioRad) und vorsichtig mit H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> überschichtet. Die Polymerisation der Gele erfolgte über Nacht. Am nächsten Tag wurde das Wasser über dem Trenngel entfernt und das Sammelgel gegossen. Hierfür wurden zu 10 ml der Sammelgel-Lösung 50 µl 10 % (w/v) APS-Lösung und 10 µl TEMED gegeben und die Lösung direkt auf das Trenngel gegossen. Nun wurden die Kämmen eingesetzt. Die Polymerisationszeit der Sammelgele betrug mindestens 30 min.

Probenauftrag und Laufbedingungen:

Fünf Volumenteile der zu trennenden Proteinlösungen (Zell-Lysate oder Einzelproteine) wurden mit einem Volumenteil des folgenden 6-fach konzentrierten Probenpuffers versetzt:

6-fach Probenpuffer:	7 ml Tris pH 6,8 1 g SDS 3,6 ml Glyzerin 0,93 g DTT 200 µl gesättigte Bromphenolblau-Lösung ad 10 ml H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub> der Puffer wird aliquotiert bei -20°C gelagert
----------------------	--

Die Proben wurden für 2 min auf 95°C erhitzt im Eisbad abgekühlt und auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer wurde die folgenden Lösung verwendet:

Laufpuffer:	5 g/l Tris 14,4 g/l Glycin 1 g/l SDS
-------------	--

Es wurde eine konstante Spannung von 200 V angelegt bis die Bromphenolblau-Front den unteren Rand des Geles erreicht hatte (nach ca. 1 h).

### 3.9.2 2D-Gel-Elektrophorese

#### 3.9.2.1 Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)

Die Gelstreifen (Immobiline DryStrip pH 3-10, 18 cm, linear, Amersham Pharmacia) wurden von ihrer Schutzfolie befreit und in die Rehydratisierungs-Kassette (Amersham Pharmacia) überführt. Die Kassette wurde mit 25 ml des folgenden Puffers befüllt:

Rehydratisierungspuffer für 25 ml:	12 g Harnstoff 0,5 g 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat (CHAPS) 38 mg 1,4-Dithioerythrit (DTE) 200 µl gesättigte Bromphenolblau-Lösung in H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub> 0,5 ml Pharmalyte pH 3-10 mit H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub> auf 25 ml
------------------------------------	--

Die Gele wurden über Nacht gequollen und daraufhin in die Elektrophorese-Apparatur (Multiphor II mit Immobiline DryStrip Kit, Amersham Pharmacia) wie vom Hersteller vorgeschrieben montiert. Maximal 100 µl Zell-Lysat (siehe Abschnitt 3.8.1) wurde pro Gel aufgetragen und nach folgendem Protokoll unter Silikon-Öl (Cover Fluid, Amersham Pharmacia) bei 20°C elektrophoresiert:

Protokoll für die isoelektrische Fokussierung (pH3-10, 18 cm)	300 V konstant über 4 h	1200 Vh
	Rampe von 300 V bis 2000 V über 8h	9200 Vh
	Rampe von 2000 V bis 5000 V über 4h	14000 Vh
	<u>5000 V konstant über 6 h</u>	<u>30000 Vh</u>
	Total	54400 Vh

Tab. 3.17 Protokoll für die isoelektrische Fokussierung.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele aus der Apparatur genommen, mit einem feuchten Filterpapier abgetupft, und in Petrischalen bei -80°C aufbewahrt.

### 3.9.2.2 SDS-Gel-Elektrophorese (2. Dimension)

Die Gele für die 2. Dimension (18 cm Länge, 16 cm Breite, 1mm Tiefe) wurden analog zu Abschnitt 3.9.1 hergestellt. Als Apparatur fand jedoch eine größere Apparatur (ProteanII, Fa. BioRad) Verwendung. Zum Umpuffern der aus der isoelektrischen Fokussierung erhaltenen Gele wurde der folgende Puffer verwendet:

Äquilibrierungspuffer	50 mM Tris 6 M Harnstoff 30 % (v/v) Glycerin 2 % (w/v) SDS
-----------------------	---

Da neben der Umpufferung zugleich Disulfid-Bindungen gespalten und acetyliert werden sollten, wurden die Gele für 15 min in 15 ml einer Lösung aus 1 % 1,4-Dithioerythrit in Äquilibriumspuffer und anschließend für 15 min in 15 ml einer Lösung aus 2,5 % Iodacetamid in Äquilibriumspuffer unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Gele blau zu färben und so während des Laufes eine blaue Lauffront zu erhalten, wurde beim zweiten Äquilibriumsschritt noch 200 µl einer konzentrierten Bromphenolblau-Lösung zugegeben. Parallel dazu wurde eine 0,5 % Agarose-Lösung in Laufpuffer (siehe Abschnitt 3.9.1) hergestellt. Die äquilibrierten Gelstreifen wurden dann auf das Sammelgel gelegt und mit der Agarose-Lösung luftbalsenfrei eingegossen. Nun wurde solange bei 9°C und einer konstanten Stromstärke von 40 mA pro Gel elektroforesiert bis die Bromphenolblau-Front den unteren Rand der Gele erreicht hatte.

### 3.10 Färbungen von Protein-Gelen

#### 3.10.1 Coomassie Färbung

Für die Coomassie Färbung der Proteine im Gel wurden die folgenden Lösungen verwendet:

Färbelösung:	0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250 in 50 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 40 % (v/v) H <sub>2</sub> O
Entfärbelösung:	5 % (v/v) Methanol 7 % (v/v) Essigsäure 88 % H <sub>2</sub> O
Konservierungslösung:	1 % (v/v) Methanol 3 % (v/v) Glycerin

Für alle Waschschritte wurde das 10-fache des Gelvolumens verwendet. Direkt nach dem Gel-Lauf wurde das Gel für mindestens 4 h unter leichtem Schütteln in Färbelösung inkubiert. Nun wurde das Gel solange mit Entfärbelösung gewaschen, bis das Gel nahezu farblos geworden war, und nur noch die Proteinbanden bzw. Proteinspots tiefblaue Färbung zeigten. Die Entfärbelösung wurde hierbei stündlich gewechselt. Sollte das Gel getrocknet werden, so

wurde es noch zweimal 1 h bei Raumtemperatur und unter leichtem Schütteln in Konservierungslösung inkubiert.

### 3.10.2 Silber-Färbung nach Blum

Für die Silber-Färbungen wurde ein leicht modifiziertes Protokoll nach Blum verwendet. Die einzelnen Lösungen wurden bei jedem Schritt im 10-fachen Volumen der Gele eingesetzt. Es wurde nach folgendem Protokoll unter leichtem Schütteln gefärbt und inkubiert:

Schritt	Lösung	Zeit
Fixierung	50 % (v/v) Methanol 12 % (v/v) Essigsäure	über Nacht (mindestens 5 h)
Waschen	30 % (v/v) Ethanol	3 x 30 min
Imprägnieren	0,22g/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	1 min
Waschen	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$	3 x 1 min
Versilbern	2 g/l $\text{AgNO}_3$ 0.667 ml/l Formaldehyd (37 %)	> 20 min
Waschen	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$	4 x 1 min
Reduzieren	60 g/l $\text{Na}_2\text{CO}_3$ (0.57 M) 0,5 ml/l Formaldehyd (37 %) 4 mg/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	1-10 min bis die gewünschte Intensität der Färbung erreicht wurde (ca. 5 min)
Waschen	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ – Eiskühlung	3 x 5 min
Stoppen	7 % (v/v) Essigsäure – Eiskühlung	2 x 10 min
Waschen	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ – Eiskühlung	2 x 10 min
Konservieren	3 % (v/v) Glycerin 1 % (v/v) Methanol	30 min

Tab. 3.18 Schema der modifizierten Silberfärbung nach Blum.

### 3.10.3 Trocknen der Gele

Die Gele wurden entsprechend der Herstellerangaben in die Trocknungsapparatur (Gel Drying Kit, 17,5 x 20 cm, Promega) eingespannt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

## 3.11 Immunoblotting

### 3.11.1 Semi-dry Western-Blotting

Für das Blotting wurde der folgende Transferpuffer verwendet:

Transferpuffer:	5,8 g/l Tris 2,9 g/l Glycin 0,37 g/l SDS 20 % (v/v) Methanol
-----------------	---

Pro Gel wurden 6 Blotting-Papiere (Blotting Papier, 460 x 570 mm, Roth) exakt auf die Gelgröße zugeschnitten und 10 min in soviel Transferpuffer inkubiert, dass die Papiere vollständig damit bedeckt waren. Anschließend wurden erst drei Schichten dieser getränkten Papiere und dann die Nitrozellulose-Membran (BioTrace NT, 0.45 µm, Pall) luftblasen-frei auf die Anode das Gel der Blotting-Apparatur (H.Hölzel GmbH) gelegt. Nun wurde das Gel aufgelegt und die Ränder mit Parafilm (Isolator) abgedeckt. Schließlich wurden nochmals drei Schichten getränktes Blotting-Papier darauf geschichtet. Nach der Montage der Kathode wurde bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche für 1,5 h geblottet.

### 3.11.2 Ponceau S Färbung der Membran

Zum Färben der Proteine auf den Membranen wurde das folgende Konzentrat 10-fach verdünnt eingesetzt:

10-fach konzentrierte Ponceau S Lösung:	2 % (w/v) Ponceau S 30 % (w/v) Trichloressigsäure 30 % (w/v) Sulfosalicylsäure in H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>
---	---

Die Membran wurde 10 min in einfach konzentrierter Ponceau S Lösung unter schütteln bei Raumtemperatur inkubiert und durch Waschen mit  $H_2O_{bd}$  entfärbt. Die Proteinbanden bzw. Proteinspots blieben hierbei als rote Signale sichtbar.

### 3.11.3 Immunodetektion

Für alle Schritte wurde der folgende PBS-T Puffer verwendet:

PBS-T Puffer:	14,2 g/l $Na_2HPO_4 * 2 H_2O$ 2,8 g/l $NaH_2PO_4 * H_2O$ 5,8 g/l NaCl 0,1 % (v/v) Tween 20 in $H_2O_{bd}$
---------------	---

Vor der eigentlichen Detektion wurde die Membran mit jeweils 0,1 ml Lösung pro  $cm^2$  nach folgendem Schema behandelt:

Schritt	Lösung	Zeit
Waschen	PBS-T	1 x 15 min 2 x 10 min
Blockieren	5 % (w/v) BSA in PBS-T	mindestens 2 h
Waschen	PBS-T	1 x 15 min 2 x 10 min
Primäre Antikörper Lösung	In PBS-T verdünntes Serum mit 1 % (w/v) BSA. Die Verdünnung hängt vom Serum ab und ist jeweils im Ergebnisteil angegeben.	1 x 60 min
Waschen	PBS-T	1 x 15 min 2 x 10 min
Sekundäre Antikörper Lösung	In PBS-T verdünnte sekundäre Antikörper mit 1 % (w/v) BSA. Die Verdünnung hängt von den Antikörpern ab und ist jeweils im Ergebnisteil angegeben.	4 x 1 min
Waschen	PBS-T	1 x 15 min 2 x 10 min

Tab. 3.19 Inkubationsschritte der Membran für die Immunodetektion.

Zur Detektion wurde die Membran mit etwas Filterpapier (Gel-Blotting-Papier, Fa. Roth) abgetupft und mit Chemolumineszens-Substratlösung (SuperSignal, Fa. Pierce) getränkt (0,1 ml pro cm<sup>2</sup> Membranfläche). Nach 7 min Inkubationszeit wurde die Substratlösung abgegossen und die Membran in Klarsichtfolie verpackt. Schließlich wurden die Röntgenfilme („XAR5“ der Fa. Kodak) mit Expositionszeiten zwischen 1 s und einigen Minuten (siehe Einzelexperimente im Ergebnisteil) aufgelegt und die Filme mit dem Röntgenfilmentwickler (Typ: 1120, Fa. Protec) entwickelt.

### 3.11.4 Entfernen der gebundenen Antikörper von den Membranen („Stripping“)

Um die Antikörper von den Membranen wieder zu entfernen, wurde bei 50°C für 30 min mit jeweils 0,1 ml pro cm<sup>2</sup> Membranfläche der folgenden Lösung inkubiert:

„Stripping“ Puffer:	100 mM $\beta$ -Mercaptoethanol 62,5 mM Tris-HCl pH 6,7
---------------------	--

Schließlich wurde noch zweimal 10 min mit PBS-T gewaschen. Zur Kontrolle wurde vor einer erneuten Verwendung der Membranen die in Abschnitt 3.11.3 beschriebene Detektion jedoch ohne Serum, also nur mit dem sekundären Antikörpern, durchgeführt. Nur wenn nach 30 min Expositionszeit kein Signal auf dem Film sichtbar geworden war, wurde die Membran für weitere Versuche verwendet.

## 3.12 Identifikation von 2D-Protein-Spots mittels nano-ESI/MS/MS

### 3.12.1 Tryptische Spaltung von Proteinen im Gel

Die zu analysierenden Coomassie-gefärbten Spots wurden mit einem Skalpell aus dem Gel exzidiert und in silanisierte Reaktionsgefäße (SafeSeal, Sorenson BioScience) überführt. Anschließend wurden die Spots einmal mit 500  $\mu$ l und ein weiteres mal mit 250  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> jeweils 15 min gewaschen. Danach erfolgten noch zwei weitere 15 min Waschschrte mit 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung. Anschließend wurde das Gelstück mit einer Pipettenspitze zerkleinert, die Gelstücke mit 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> überschichtet und 70 ng Trypsin zugegeben. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden 40  $\mu$ l 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung zugegeben, 10 min geschüttelt und die Lösung ohne die Gelstücke in ein

weiteres silanisiertes Reaktionsgefäß überführt. Die Gelstücke wurden nun mit 70 % Acetonitril für 10 min gewaschen und die Waschlösung mit der  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung in dem anderen Reaktionsgefäß vereinigt. Die erhaltene Peptid-Lösung (ca. 80  $\mu\text{l}$ ) wurde in der „SpeedVac“ (Vacuum Concentrator, Bachhofer) auf ca. 10  $\mu\text{l}$  eingengt und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.12.2 Mikro-Entsalzung des tryptisch gespaltenen Peptidgemisches

Zur Herstellung der Mikro-Entsalzungssäulen, wurden 50 mg RP-HPLC-Material (POROS 20 R2, Fa. Perseptive) zweimal mit je 1 ml Methanol und zweimal mit je 1 ml einer Lösung aus 50 % (v/v) Methanol und 1 % (v/v) Essigsäure in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$  gewaschen. Anschließend wurde eine Gelauftrags-Pipettenspitze (GELoad, Eppendorf) am unteren Ende mit einer Pinzette zugezwickt und 50  $\mu\text{l}$  des suspendierten HPLC-Materials (50 mg in 1 ml 50 % Methanol, 1 % Essigsäure) von oben in die Spitze pipettiert. Es wurde darauf geachtet, dass das HPLC-Material vollständig in der verengten Pipettenspitze hängen blieb, jedoch die Flüssigkeit mit Druckluft herausgedrückt werden konnte. Bei den nun folgenden Chromatographie-Schritten wurden die Lösungen von oben in die so hergestellte Entsalzungssäule pipettiert und die Lösungen langsam mit Druckluft durch die Säule gepresst. Es wurde nach folgender Vorschrift gearbeitet, wobei das Eluat in silanisierten Reaktionsgefäßen aufgefangen wurde:

Schritt	Lösung	Volumen
Waschen der Säule	1 % (v/v) Essigsäure 5 % (v/v) Methanol	2 x 10 $\mu\text{l}$
Probenauftrag	Probe aus der tryptischen Spaltung (siehe Abschnitt 3.12.1)	10 $\mu\text{l}$
Waschen	1 % (v/v) Essigsäure 5 % (v/v) Methanol	4 x 10 $\mu\text{l}$
Eluieren	1 % (v/v) Essigsäure 50 % (v/v) Methanol	1 x 10 $\mu\text{l}$

Tab. 3.20 Methode zur Entsalzung der tryptisch gespaltenen Peptide.

Die Proben wurde bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.12.3 Nano-ESI/MS/MS-Analyse der tryptisch gespaltenen Proteine

Die Analysen wurden mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (TSQ7000, Finnigan) in Kombination mit einer Nano-Elektrospray-Quelle (Protana) durchgeführt. Hierzu wurden 5 µl der entsalzten Probe in die mit Gold beschichtete Glaskapillare (NanoES spray capillaries, Protana) überführt, in das Gerät eingespannt und mit einer Spritze unter Druck gesetzt. Dann wurde die Kapillare vorsichtig am äußersten Ende gebrochen, positioniert und das Elektrospray durch Anlegen einer Potentialdifferenz von 1000 V erzeugt. Nun wurde das Massenspektrum des Gemisches mit den, durch eine Optimierungsroutine ermittelten, gerätespezifischen Einstellungen aufgenommen. Die Fragmentierung der zweifach geladenen Ionen erfolgte im zweiten Quadrupol bei einem Argon-Druck zwischen 0,35 und 0,40 Pascal und einer stufenweise Anhebung der Kollisionsenergie von 16 eV über 19 eV auf 23 eV. Im dritten Quadrupol wurden dann die Massenspektren der fragmentierten Peptide aufgenommen.

### 3.12.4 Auswertung der MS/MS Spektren und Datenbanksuche

Die aufgenommenen MS/MS Spektren wurden manuell nach Y bzw. B-Serien durchsucht. Mit den erhaltenen Sequenzdaten wurde, unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes des Mutterions, mit dem im Internet frei zugänglichen PeptideSearch Protein-Identifizierung Programm und dessen Default-Einstellungen die NCBIInr-Datenbank durchsucht.

## 3.13 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen mit Cy5

Das zu markierende Protein bzw. Proteingemisch wurde in soviel 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung pH 9,3 gelöst, dass sich eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml ergab. Die Protein-Lösung wurde dann zu 0,2 mg Cy5-NHS (1-(e-Carboxypentyl)-1'-(ethyl)-3,3,3',3'-tetramethyl-indo-dicarbocyanin-5,5'-disulfonatkaliumsalz-N-hydroxysuccinimidester, Cy5 reactive dye, Amersham Pharmacia) gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Alle 10 min wurde kurz geschüttelt. Anschließend wurde der überschüssige Farbstoff mittels Gelausschluss-Chromatographie abgetrennt. Hierzu wurde die Säule (Sephadex G-25 M, Amersham Pharmacia) zunächst mit fünf Säulenvolumina PBS pH 7,2 äquilibriert, das Protein / Farbstoffgemisch aufgetragen und in 1 ml-Schritten eluiert. Von den zwei deutlich sichtbaren Farbstoffbanden wurde die erste aufgefangen und das Spektrum von 220 nm bis 280 nm im Spektralphotometer (DU640, Beckman) aufgenommen. Die Absorptionen bei den

Maxima 280 nm und 650 nm wurden abgelesen und im Falle der Markierung von Einzelproteinen, anhand der molaren Extinktionskoeffizienten des Farbstoffes und des Proteins, die Markierungsrate ermittelt.

### **3.14 Detektion von Proteinen aus Cy5-markierten Proteingemischen**

#### **3.14.1 Detektion mit Poly-L-Lysin bzw. Nitrozellulose Objektträgern**

Zunächst wurden jeweils 0,5 µl der in PBS verdünnten Seren manuell auf die Poly-L-Lysin Träger (Poly-Prep Slides, Sigma) oder die Nitrozellulose beschichteten Träger (FAST Slides, Schleicher & Schuell) gespottet und für 1 h bei 4°C inkubiert. Daraufhin wurden die Objektträger 2 h mit 5 % BSA in PBS-T blockiert. Nun wurden die Objektträger 1 h in der in PBS-T verdünnten Cy5-markierten Protein-Lösung inkubiert und dreimal für 10 min mit 20 ml PBS-T gewaschen. Die Verdünnungen der Seren und die Konzentrationen der Cy5-markierten Proteinlösungen sind den einzelnen Experimenten im Ergebnisteil zu entnehmen.

#### **3.14.2 Detektion mit Protein A gekoppelten Partikeln**

Es wurde Protein A beschichtetes HPLC-Material (Protein A HyperD 20) mit einer Partikelgröße von 20 µm verwendet. Je 10 µl der Suspension des HPLC-Materials (50 mg/ml in Ethanol) wurde abzentrifugiert (3000 U/min, EBA 3s, Hettich) und dreimal mit je 500 µl PBS gewaschen. Das getrocknete Material wurde dann mit je 10 µl der Seren suspendiert und 15 min unter Schütteln inkubiert. Daraufhin wurde abermals abzentrifugiert und dreimal mit PBS gewaschen. Nun wurde mit je 10 µl den Cy5-markierten Protein-Lösungen 15 min unter Schütteln inkubiert und noch dreimal mit je 500 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden 0,5 µl der Suspension auf einen Objektträger aufgetragen und mittels Klebefilm fixiert.

#### **3.14.3 Scannen und Auswerten der Objektträger**

Die erhaltenen Objektträger wurde mit einem Laserscanner (Storm 860 Fa. Molecular Dynamics) im „Red Fluorescence“ Modus (635 nm Laser) mit einer Auflösung von 100 Pixel/cm gescannt und die Signale über ihre Gesamtfläche mit einer Bildanalyse-Software (Imagequant V5.0, Amersham Pharmacia) quantifiziert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Entwicklung eines ELISA-Systems zur Titration Peptid-induzierter Antiseren

Um Seren immunisierter Tiere schnell und effizient titrieren zu können, ist der ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay) mit Antigen-beschichteten Mikrotiterplatten die Methode der Wahl [96, 97]. Bei diesem auch als „Antibody-Capture“-ELISA bezeichneten Verfahren werden nach der Beschichtung der Mikrotiterplatten mit Antigen die Seren in Verdünnungsreihen aufgetragen. Die aus den Seren gebundenen Antikörper (primäre Antikörper) werden dann mit Spezies-spezifischen Enzym-markierten Anti-Antikörpern (sog. sekundäre Antikörper) detektiert. Jedoch ist die direkte Beschichtung von Standard-Polystyrol-Mikrotiterplatten mit kurzen synthetischen Peptid-Antigenen schlecht möglich. Die Wechselwirkungen zwischen Peptid und Plattenoberfläche sind meist zu schwach um eine effiziente Beschichtung der Mikrotiterplatten zu gewährleisten. Außerdem ist die Beschichtungseffizienz direkt von der Aminosäurezusammensetzung des jeweiligen Peptid-Antigens abhängig, so dass Vergleiche von Seren, die mit unterschiedlichen Peptiden induziert wurden, nicht möglich sind. Deshalb sollten im Rahmen dieser Arbeit einige alternative Beschichtungsverfahren getestet und evaluiert werden. Um die verschiedenen Beschichtungsverfahren zu vergleichen, wurde mit einem Modellpeptid (HIF348), welches der Aminosäuresequenz 348-360 des menschlichen „gastric intrinsic factor“ (IF) entspricht, und einem entsprechenden Peptid-induzierten Antiserum gearbeitet. HIF348 ist ein gut synthetisierbares und gut lösliches Peptid, das mit Hilfe eines Hydrophobizitätsplot nach Kyte & Doolittle ausgewählt wurde (siehe Abb. 4.3.2 in Abschnitt 4.3.1.1).

#### 4.1.1 Vergleich verschiedener Verfahren zur Beschichtung von Mikrotiterplatten mit kurzen synthetischen Peptiden

Die folgenden Verfahren zur Beschichtung von Mikrotiterplatten mit Peptiden wurden getestet und miteinander verglichen:

- A) die direkte Beschichtung von Polystyrol-Mikrotiterplatten mit synthetischen Peptiden (Abb. 4.1.1 A)
- B) die kovalente Bindung der Peptide an Mikrotiterplatten mit reaktiven N-Oxysuccinimide (NOS) Gruppen (Abb. 4.1.1 B)
- C) die Beschichtung von Polystyrol-Mikrotiterplatten mit Polyoxyethylen (POE) (n = 45-70) verlängerten Peptiden (Abb. 4.1.1 C)
- D) die Beschichtung von Streptavidin-beschichteten Polystyrol-Mikrotiterplatten mit N-terminal biotinylierten Peptiden; zwischen Peptid und Biotin wurden zwei Aminohexansäure-Einheiten als „Spacer“ eingefügt (Abb. 4.1.1 D)

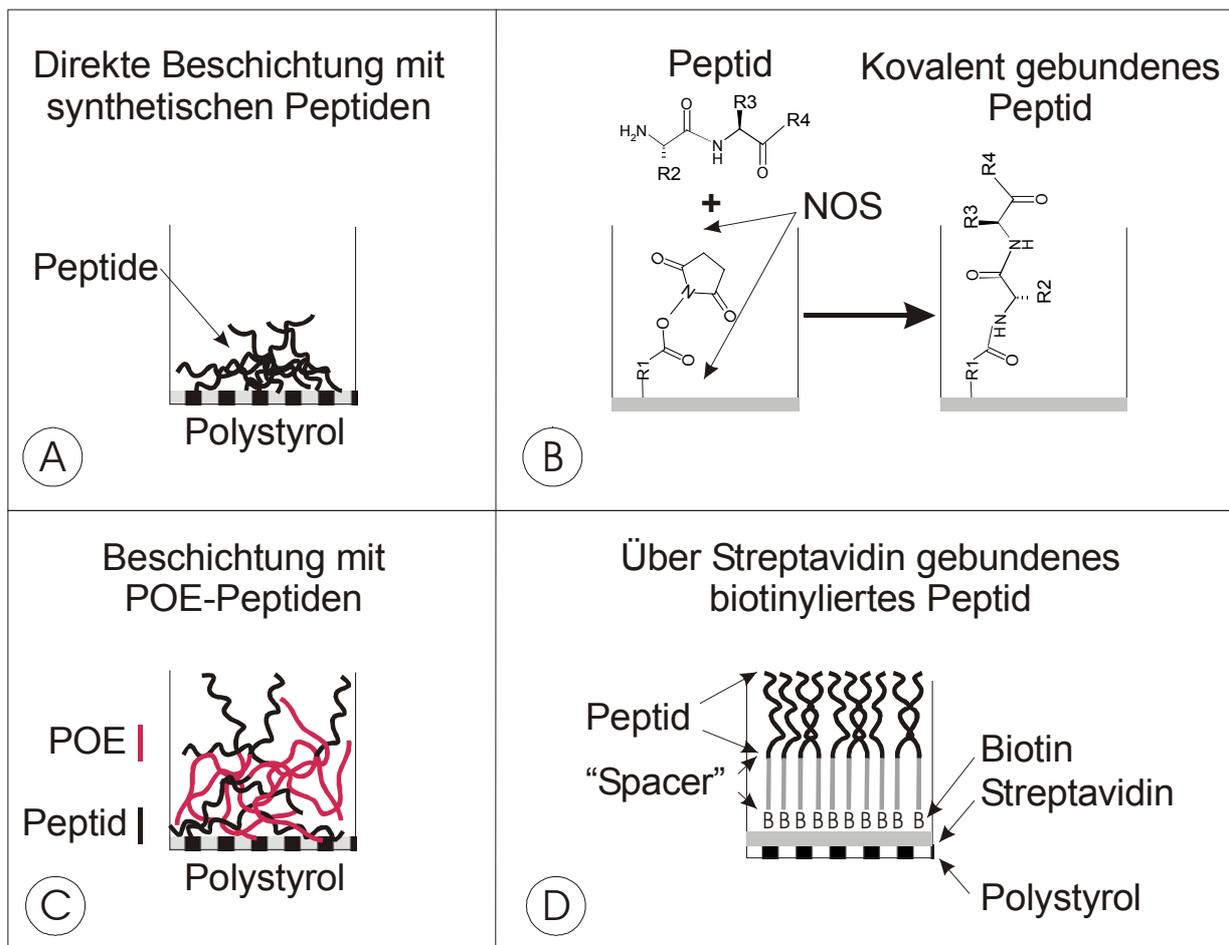


Abb. 4.1.1 Schematische Darstellung der evaluierten Techniken zur Bindung kurzer synthetischer Peptide an die Oberfläche von Mikrotiterplatten.

Alle Mikrotiterplatten wurden mit der gleichen Konzentration (10 µg/ml) an Peptid, POE-Peptid bzw. biotinyliertem Peptid beschichtet (siehe Methodenteil Abschnitt 3.6.1 bis Abschnitt 3.6.3) und auch ansonsten gleich behandelt. Zur Detektion diente in allen Fällen Peroxidase-markierte Ziege-anti-Maus-Antikörper, die 1/2000 verdünnt eingesetzt wurden. Als Substrat wurde Tetramethylbenzidin (TMB)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verwendet (siehe Methodenteil Abschnitt 3.6.4). Die Reaktion wurde nach 10 min gestoppt. Die Signale je einer Serum-Verdünnung wurden miteinander verglichen und auf statistisch signifikante Unterschiede hin untersucht. Hierzu wurden die Differenzen dem „one way“ ANOVA-Test mit angeschlossenen Scheffé-Test als post-hoc Test unterzogen. Als Fehler erster Ordnung wurde ein Fehler  $p < 0,05$  akzeptiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.1.2 grafisch, sowie in Tab. 4.1.1 tabellarisch zusammengefasst.

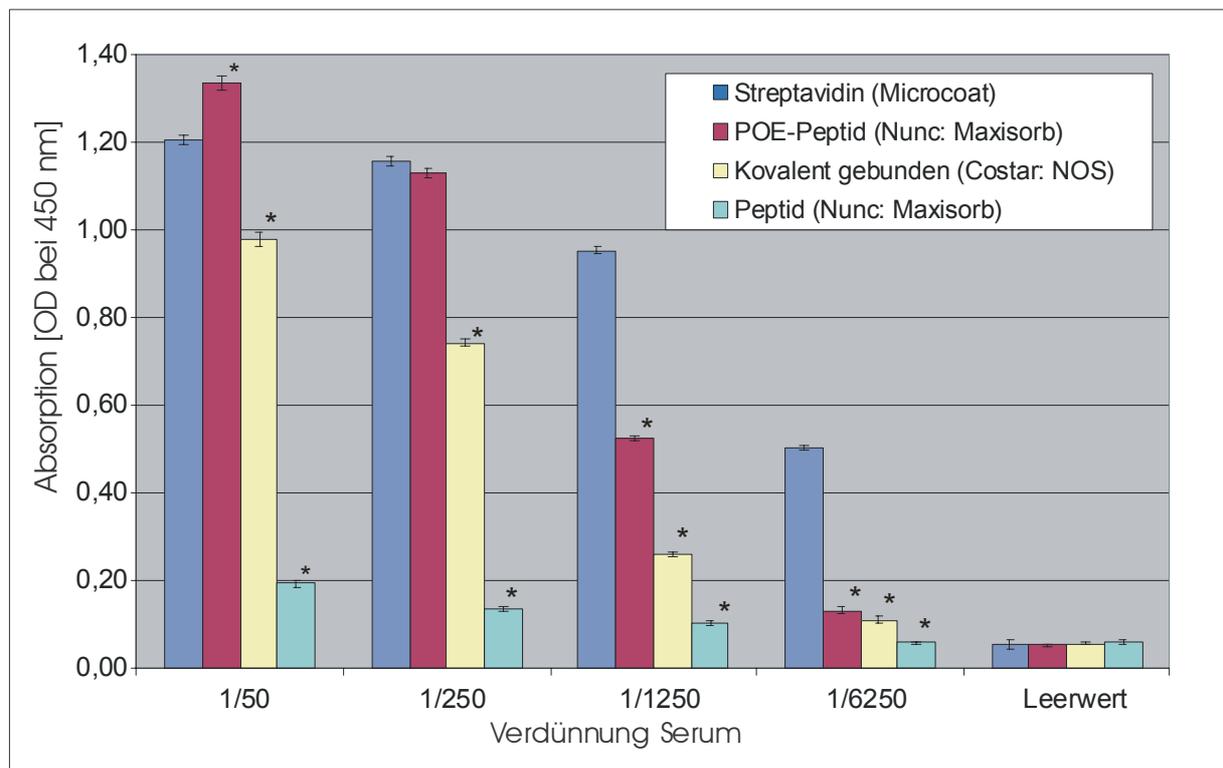


Abb. 4.1.2 Vergleich der Signalintensitäten verschiedener ELISA-Systeme zur Titration Peptid-induzierter Antiseren. Die Werte stellen den Mittelwert einer 24-fach Bestimmung dar. \*:  $p < 0,05$  verglichen mit dem Streptavidin-ELISA-System innerhalb einer Verdünnung.

Beschichtung	Verdünnung	Mittelwert $\pm$ SD	Beschichtung	Verdünnung	Mittelwert $\pm$ SD
Streptavidin + Biotin-Peptid	1/50	1,206 $\pm$ 0,006	Kovalent (NOS)	1/50	0,982 $\pm$ 0,016 *
	1/250	1,157 $\pm$ 0,010		1/250	0,743 $\pm$ 0,009 *
	1/1250	0,954 $\pm$ 0,007		1/1250	0,258 $\pm$ 0,006 *
	1/6250	0,503 $\pm$ 0,007		1/6250	0,110 $\pm$ 0,008 *
	Leerwert	0,055 $\pm$ 0,010		Leerwert	0,055 $\pm$ 0,003
POE-Peptid	1/50	1,336 $\pm$ 0,008 *	Peptid	1/50	0,193 $\pm$ 0,006 *
	1/250	1,131 $\pm$ 0,019		1/250	0,136 $\pm$ 0,006 *
	1/1250	0,524 $\pm$ 0,011 *		1/1250	0,104 $\pm$ 0,006 *
	1/6250	0,131 $\pm$ 0,004 *		1/6250	0,058 $\pm$ 0,007 *
	Leerwert	0,053 $\pm$ 0,004		Leerwert	0,059 $\pm$ 0,006

Tab. 4.1.1 Mittelwerte mit Standardabweichungen (SD) der ELISA-Systeme bei unterschiedlichen Verdünnungen des Peptid-induzierten Antiserums. Die Mittelwerte sind das Ergebnis einer 24-fach Bestimmung. \*:  $p < 0,05$  verglichen mit dem Streptavidin-ELISA-System innerhalb einer Verdünnung.

Es wurde deutlich, dass die direkte Beschichtung von Polystyrol-Mikrotiterplatten mit Peptiden auch bei einer Verdünnung des Serums von 1/50 zu vergleichsweise schwachen Signalintensitäten führte. Höhere Signalintensitäten ergab die kovalente Kopplung von Peptid an NOS-Mikrotiterplatten, die Beschichtung von Polystyrol-Mikrotiterplatten mit POE-Peptid und die Beschichtungen von Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatten mit biotinyliertem Peptid. Das System mit Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatten gibt bei höheren Verdünnungen des Serums (1/1250 und 1/6250) die signifikant ( $p < 0,05$ ) höchsten Signalintensitäten (siehe Tab. 4.1.1). Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit die Seren in der Regel mit dem Streptavidin ELISA-System titriert.

#### 4.1.2 Ermittlung der optimalen Streptavidin-Konzentration zur Beschichtung von Polystyrol-Mikrotiterplatten

Um eine optimale Beschichtung von Polystyrol-Mikrotiterplatten mit Streptavidin zu gewährleisten, wurde die Streptavidin-Konzentration ermittelt, ab der sich eine Sättigung der Mikrotiterplatten-Oberfläche ergibt. Bei diesem Experiment wurden die Polystyrol-Mikrotiterplatten zweier Hersteller (Nunc: „Maxisorb“ und Costar: „Clear polystyrene“) verwendet. Es wurden Streptavidin-Konzentrationen zwischen 0  $\mu\text{g/ml}$  und 11  $\mu\text{g/ml}$  getestet. Die Beschichtung der Platten erfolgte in Coating-Buffer für jeweils 2 h bei 37°C (siehe Methodenteil Abschnitt 3.6.3). Als Peptid diente das biotinylierte HIF348-Modellpeptid,

welches in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt wurde. Das primäre Anti-HIF348-Mäuseserum wurde in einer Verdünnung von 1/50 verwendet. Zur Detektion wurden sekundäre Peroxidase-markierte Ziege-anti-Maus-Antikörper in einer Verdünnung von 1/2000 mit TMB / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Substrat verwendet. Die Reaktion wurde nach 10 min gestoppt. Die Daten wurden statistisch auf signifikante Unterschiede zum Maximalwert von 11 µg/ml hin untersucht. Es wurde ein Fehler erster Ordnung von  $p < 0,05$  akzeptiert. Dafür ist der einfaktorielle ANOVA-Test mit zweiseitigem Dunnet-T als post-hoc Test durchgeführt worden. Das Ergebnis der ELISAs ist in Abb. 4.1.3 grafisch und in Tab. 4.1.2 tabellarisch dargestellt.

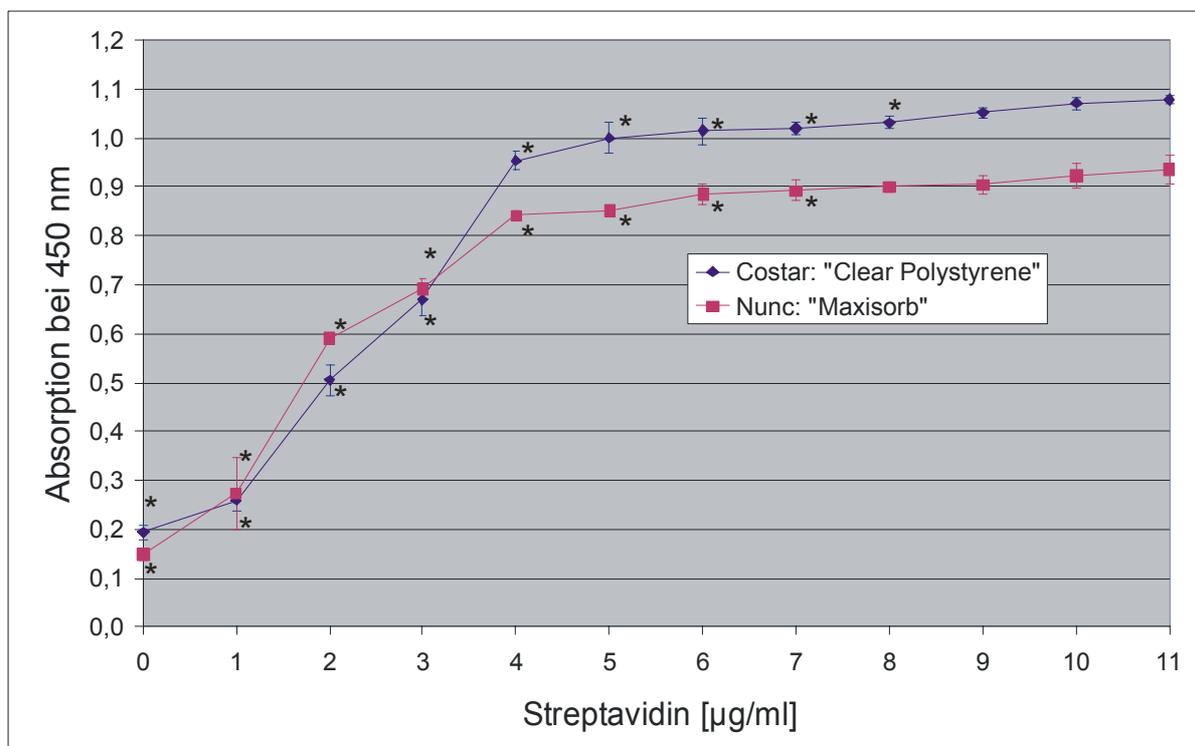


Abb. 4.1.3 Titrationskurve: Streptavidin-Konzentration versus Signalintensität. Die Werte sind Mittelwerte einer 8-fach Bestimmung dar. \*:  $p < 0,05$  verglichen mit dem Endwert bei 11 µg/ml.

Costar: „Clear Polystyrene“			Nunc: „Maxisorb“		
Konzentration Streptavidin [ $\mu\text{g/ml}$ ]	OD 450 nm Mittelwert	Standard-abweichung (SD)	Konzentration Streptavidin [ $\mu\text{g/ml}$ ]	OD 450 nm Mittelwert	Standard-abweichung (SD)
0 *	0,194	0,015	0 *	0,150	0,012
1 *	0,260	0,024	1 *	0,274	0,074
2 *	0,505	0,033	2 *	0,590	0,009
3 *	0,670	0,035	3 *	0,692	0,022
4 *	0,954	0,018	4 *	0,841	0,008
5 *	1,000	0,030	5 *	0,852	0,008
6 *	1,015	0,027	6 *	0,884	0,021
7 *	1,020	0,014	7 *	0,892	0,021
8 *	1,032	0,012	8	0,901	0,011
9	1,052	0,010	9	0,904	0,021
10	1,071	0,012	10	0,922	0,026
11	1,079	0,009	11	0,936	0,028

Tab. 4.1.2 Titration: Streptavidin-Konzentration versus Signalintensität. Die Werte stellen den Mittelwert einer 8-fach Bestimmung dar. \* :  $p < 0,05$  verglichen mit dem Endwert bei 11  $\mu\text{g/ml}$ .

Es wurde deutlich, dass bei den Costar: „Clear Polystyrene“ Mikrotiterplatten ab einer Konzentration von ca. 9  $\mu\text{g/ml}$  auch höhere Streptavidin-Konzentrationen zu keiner signifikanten Erhöhung der Signalintensität führten. Mit den Nunc: „Maxisorb“ Mikrotiterplatten wurde dieser Werte bereits ab einer Konzentration von 8  $\mu\text{g/ml}$  erreicht. Als Konsequenz wurde, zur Beschichtung der Mikrotiterplatten, Streptavidin in einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  eingesetzt, was einem leichten Überschuss entspricht.

#### 4.1.3 Vergleich der Sensitivität verschiedener Streptavidin-beschichteter Mikrotiterplatten

Nun wurden die Sensitivitäten Streptavidin-beschichteter Mikrotiterplatten des Typs „Nunc Maxisorb“ und „Costar Clear polystyrene“ bei unterschiedlichen Serumverdünnungen verglichen. Dem Vergleich hinzugezogen wurden Platten des Herstellers Microcoat, der mit einem patentierten Verfahren (Patent-Nr. DE 3640412 A1) das Streptavidin zunächst an ein Carrier koppelt, und dann die Platten damit beschichtet. HIF348-induziertes Antiserum wurde in einer Verdünnungsreihe zwischen 1/50 und 1/6250 eingesetzt. Als sekundärer Antikörper

dienten Peroxidase-markierte Ziege-anti-Maus-Antikörper in einer Verdünnung von 1/2000, die mit TMB / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Substrat detektiert wurden. Die Daten wurden statistisch analysiert und die Mittelwerte der Signalintensitäten bei verschiedenen Antikörperverdünnungen miteinander verglichen. Als signifikant unterschiedlich wurde  $p < 0,05$  im „one way“ ANOVA-Test mit angeschlossenen Scheffé-Test als post-hoc Test akzeptiert. Das Ergebnis der ELISA-Analyse ist in Abb. 4.1.4 grafisch und in Tab. 4.1.3 tabellarisch dargestellt.

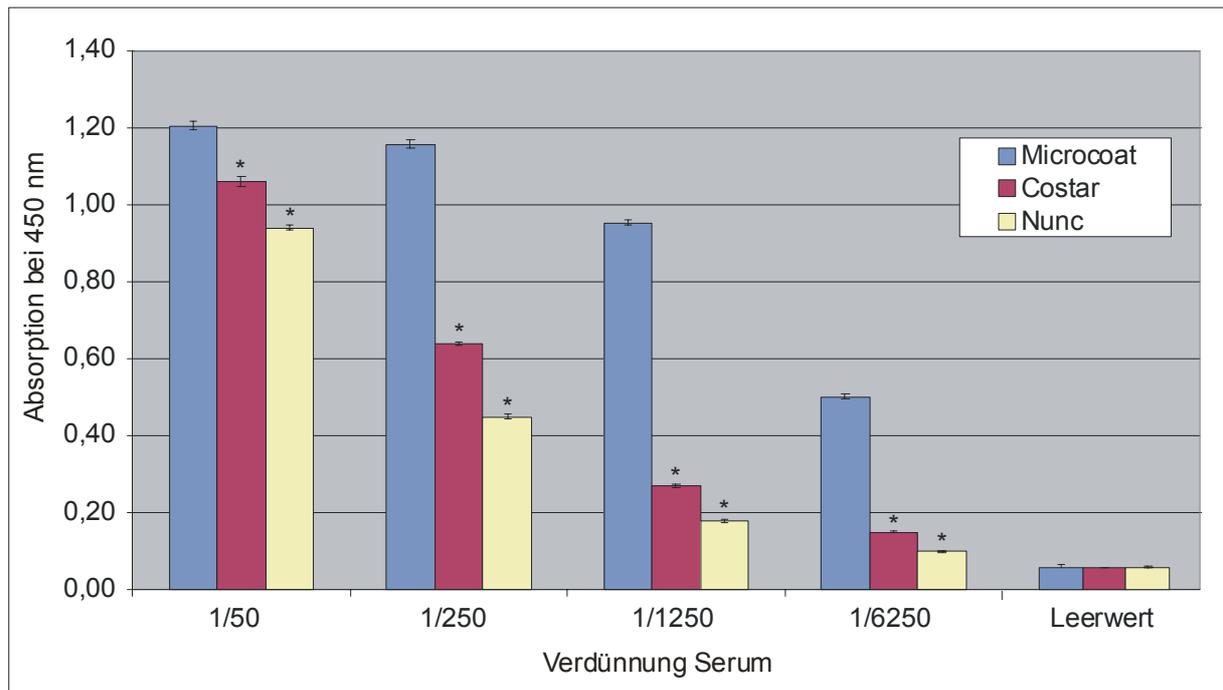


Abb. 4.1.4 Vergleich verschiedener Streptavidin-beschichteter Mikrotiterplatten hinsichtlich ihre Empfindlichkeit bei ELISAs mit Peptid-induzierten Antikörpern. Die Werte stellen den Mittelwert einer 24-fach Bestimmung dar. \* :  $p < 0,05$  verglichen mit der Microcoat Streptavidin-Mikrotiterplatte innerhalb einer Verdünnung.

Platte	Verd.	Mittelwert $\pm$ SD	Platte	Verd.	Mittelwert $\pm$ SD
„Microcoat“	1/50	1,206 $\pm$ 0,012	„Costar: Clear polystyrene“	1/50	1,016 $\pm$ 0,012 *
	1/250	1,157 $\pm$ 0,010		1/250	0,636 $\pm$ 0,005 *
	1/1250	0,954 $\pm$ 0,007		1/1250	0,272 $\pm$ 0,004 *
	1/6250	0,503 $\pm$ 0,007		1/6250	0,155 $\pm$ 0,002 *
	Leerwert	0,055 $\pm$ 0,010		Leerwert	0,053 $\pm$ 0,002
„Nunc: Maxisorb“	1/50	0,935 $\pm$ 0,007 *			
	1/250	0,449 $\pm$ 0,007 *			
	1/1250	0,177 $\pm$ 0,004 *			
	1/6250	0,104 $\pm$ 0,001 *			
	Leerwert	0,056 $\pm$ 0,002			

Tab. 4.1.3 Vergleich verschiedener Streptavidin-beschichteter Mikrotiterplatten hinsichtlich ihre Empfindlichkeit bei ELISAs mit Peptid-induzierten Antikörpern. Die Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) sind das Ergebnis einer 24-fach Bestimmung. \* :  $p < 0,05$  verglichen mit der Microcoat Streptavidin-Mikrotiterplatte innerhalb einer Verdünnung.

Die Sensitivitäten der Mikrotiterplatten „Nunc Maxisorb“ und „Costar Clear polystyrene“ waren nahezu gleichwertig, wobei mit den Platten der Fa. Costar leicht höhere Signalintensitäten erreicht werden konnten. Es wurde aber auch deutlich, dass die Mikrotiterplatten der Fa. Microcoat, bei allen Verdünnungen des Serums signifikant stärkere Signale ergaben. Daher wurden die Platten dieses Herstellers für die folgenden Streptavidin-Peptid-ELISAs bevorzugt.

## **4.2 Evaluierung und Vergleich verschiedener Carriersysteme zur Erzeugung Peptid-induzierter Antikörper**

Kurze synthetische Peptide sind in den seltensten Fällen immunogen. Aus diesem Grunde wird im Regelfall mit sogenannten Carriermolekülen gearbeitet [73, 98]. Dabei werden die Peptide an den Carrier gebunden, um durch Immunisierung mit diesen Konstrukten eine verstärkte Immunantwort gegen das Peptid (Hapten) zu induzieren. Da die Wahl eines geeigneten Carriersystems einen entscheidenden Schritt zur erfolgreichen Produktion Peptid-induzierter Antikörper darstellt, wurden verschiedene Systeme getestet und miteinander verglichen. Als Modellpeptid diente abermals HIF348. Um zunächst die Immunantwort gegen das Peptid-Antigen ohne Carrier zu prüfen, wurden zwei BALB/c Mäuse mit nicht modifizierten HIF348-Peptid immunisiert. Jeweils 100 µg des Antigens wurden hierfür einmal mit komplettem Freund's Adjuvans und viermal mit inkomplettem Freund's Adjuvans im Rhythmus von 3 Wochen injiziert. 10 Tage nach jeder Injektion wurde Probeblut entnommen und das Serum einer ELISA-Analyse (siehe Methodenteil Abschnitt 3.6.3) unterzogen. Da mit einer geringen Immunantwort zu rechnen war, wurden die Seren in einer niedrigen Verdünnung von 1/50 eingesetzt. Die sekundären Ziege-anti-Maus-HRP-Antikörper wurde 2000-fach verdünnt verwendet und die enzymatische Farbreaktion des TMB / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Substrates nach 10 min gestoppt.

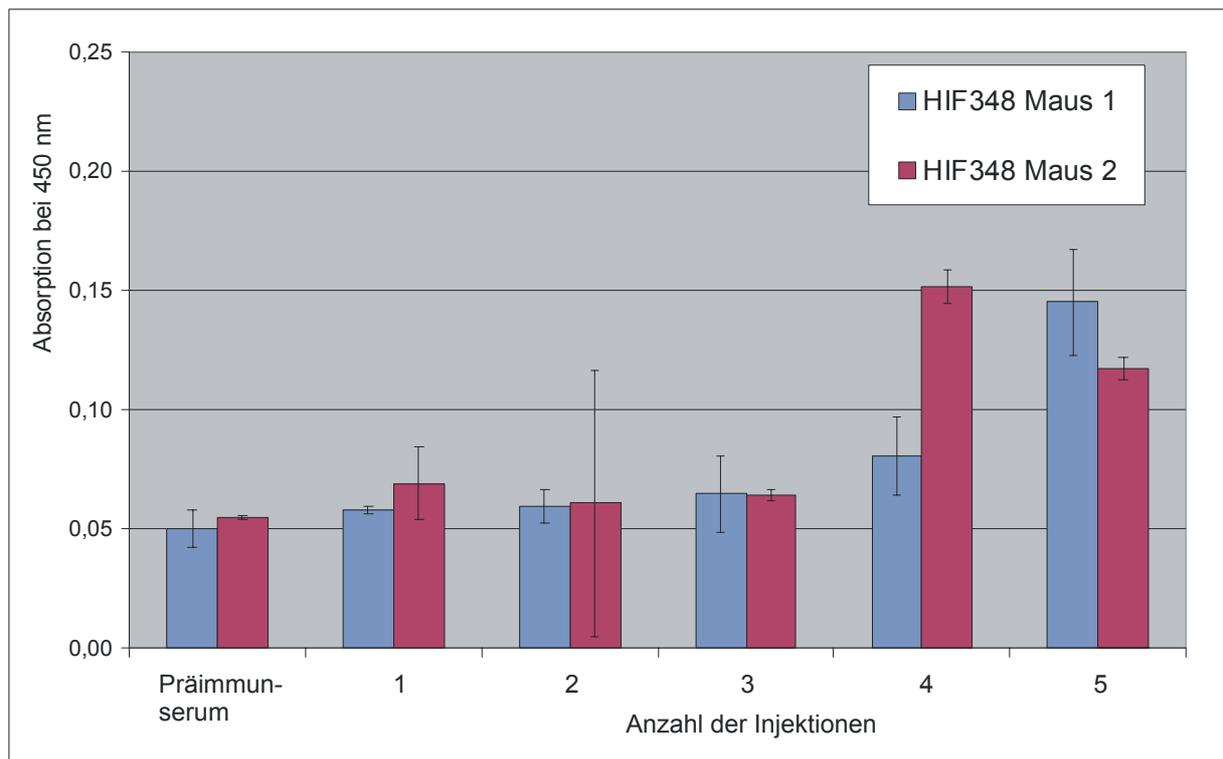


Abb. 4.2.1 Immunantwort der Immunisierung mit HIF348 ohne Carrier. Die Werte stellen den Mittelwert einer Doppelbestimmung dar.

Aus Abb. 4.2.1 wird deutlich, dass das unmodifizierte HIF348 auch nach fünf Injektionsrunden eine nur schwache Immunantwort induzierte. Für die folgenden Experimente wurden nur Seren die bei einer Verdünnung von 1/400 mindestens eine Absorption von  $\geq 0,3$  zeigten, als Seren mit ausreichend hohen Titer erachtet. Erfahrungsgemäß waren Seren, die unter diesem Schwellenwert lagen, für eine sensitive und spezifische Detektion des Zielproteins nicht geeignet. Dieser Wert wurde bei den Seren die mit HIF348 ohne Carrier induziert wurden selbst bei 1/50 Verdünnung nicht erreicht.

#### 4.2.1 Evaluierung und Vergleich verschiedener Carriersysteme auf Kunststoffbasis

In der Literatur wurden mehrfach Carrier auf Kunststoffbasis vorgestellt [78, 79]. Sie sollen gegenüber den klassischen Carrierproteinen den Vorteil haben, keine störenden Immunantworten gegen den Carrier zu induzieren. Evaluiert wurden zwei Systeme, bei denen das Peptid über einen Polyoxyethylen (POE) Spacer am Syntheseharz gekoppelt war. Beim ersten Carrier-System wurde das Peptid einfach (Abb. 4.2.2 A) und beim zweiten vierfach über eine Polylysin-Baumstruktur präsentiert (Abb. 4.2.2 B). Systeme mit mehrfach präsentierten Peptiden werden als sogenannte „multiple antigenic peptides“ (MAP) bezeichnet. Beide Harz-basierenden Systeme sollen den zusätzlichen Vorteil haben die



Immunantworten detektieren zu können, wurden die Seren in der niedrigen Verdünnung von 1/50 verwendet. Die sekundären Ziege-anti-Maus-HRP-Antikörper wurden 2000-fach verdünnt und die enzymatische Farbreaktion des TMB / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Substrates nach 10 min gestoppt. Das Ergebnis der Titration der Seren 10 Tage nach der 5. Injektion ist in Abb. 4.2.3 dargestellt.

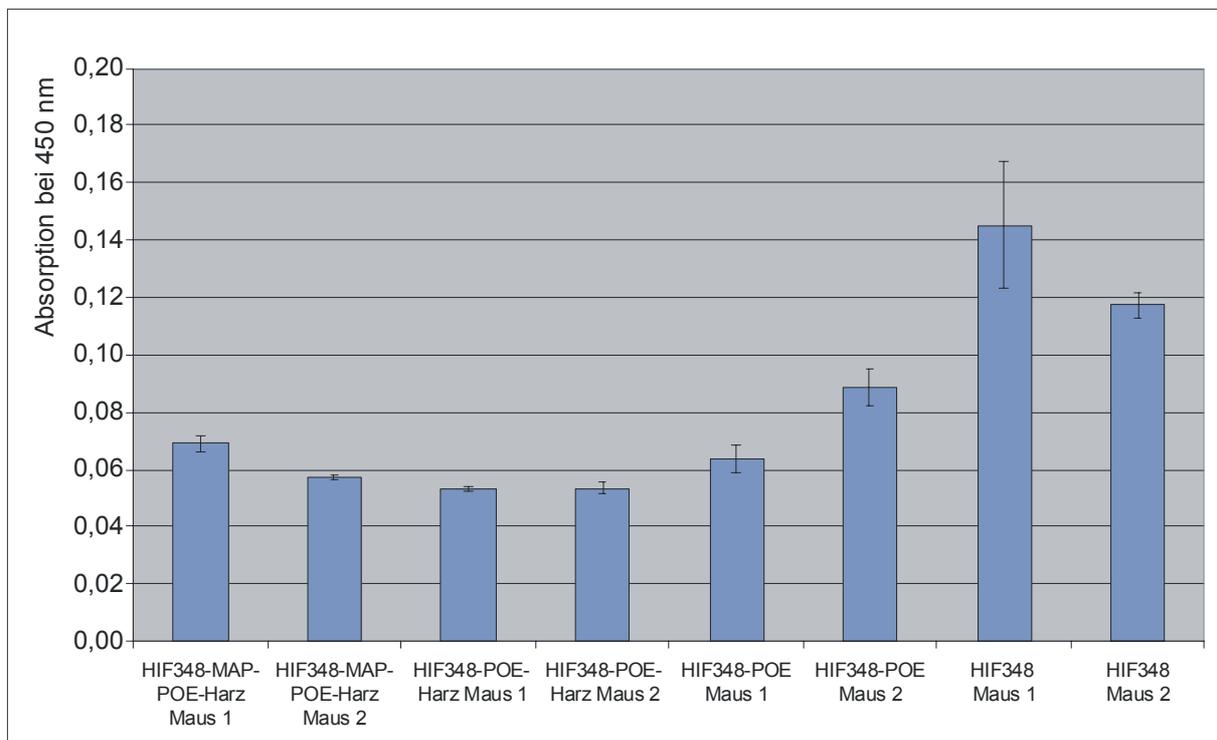


Abb. 4.2.3 HIF348 spezifische Immunantwort der Mäuse, die mit Kunststoff-Carriern immunisiert wurden. Die Werte stellen Mittelwerte von Doppelbestimmungen dar.

Es wurde deutlich, dass die Verwendung dieser Kunststoff Carrier im Vergleich zur Immunisierung mit unmodifiziertem HIF348 zu keiner Erhöhung der Titer führte. Keines der Seren, die mit Kunststoff-Carrier-Peptid Konstrukten induziert wurden, zeigte bei 1/50 Verdünnung Absorptionen größer 0,1. Um die Reaktivität der Seren gegen den POE-Carrier/Linker zu ermitteln, wurde ein weiterer ELISA mit Polyoxyethylen (PEG 400) beschichteten Platten durchgeführt. Die Seren, wie auch die sekundären Antikörper wurden exakt wie im Versuch davor eingesetzt und die Reaktion abermals nach 10 min gestoppt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.2.4 zu sehen.

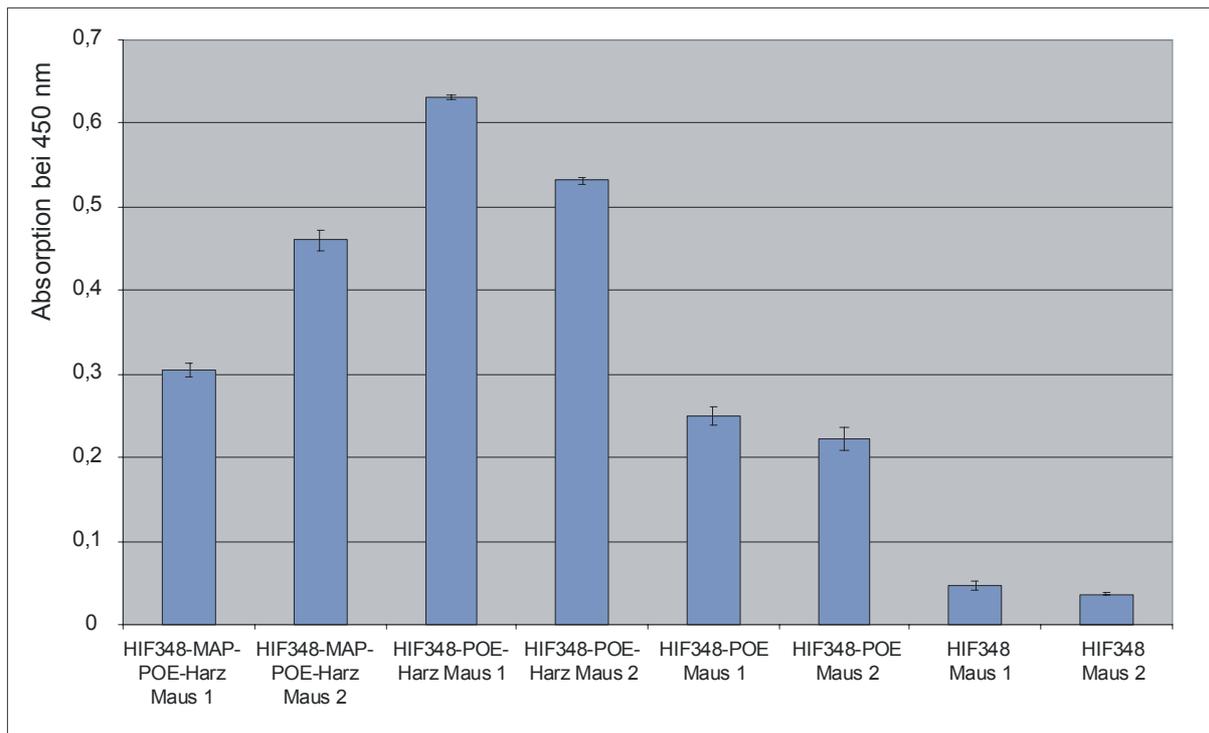


Abb. 4.2.4 POE spezifische Immunantwort der Mäuse, die mit Kunststoff-Carriern immunisiert wurden. Die Werte stellen Mittelwerte von Doppelbestimmungen dar.

Es wurde deutlich, dass die Kunststoff-Carrier eine Immunantwort gegen POE induziert haben. Da die Verwendung von Carriern auf Kunststoffbasis keine Erhöhung der Immunantwort gegen das Peptid-Antigen zur Folge hatte, sondern ausschließlich eine Immunantwort gegen den POE-Spacer zu beobachten war, wurde diese Art der Carrier im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verwendet.

#### 4.2.2 Evaluierung und Vergleich zweier Carriersysteme auf Proteinbasis

In dieser Versuchsreihe wurden bovines Serum-Albumin (BSA) und bovines Thyreoglobulin als klassische Protein-Carrier getestet. Das HIF348-Peptid wurde in beiden Fällen N-terminal mit ECDI (1-Ethyl-3-(3--dimethylaminopropyl)carbodiimid) als Linker an das Hapten gekoppelt (siehe Methodenteil Abschnitt 3.4). Mit jeweils 100 µg des von überschüssigem ECDI gereinigten Carrier-Peptid-Konstrukts wurde viermal injiziert. Die Seren der Tiere wurden gegen das Peptid mit dem Streptavidin-ELISA-System, wie im Methodenteil (Abschnitt 3.6.3. und Abschnitt 3.6.4) beschrieben, titriert. Um auch die Reaktivität von Seren hohen Titers ermitteln zu können, wurden die Seren in Verdünnungen zwischen 1/50 bis 1/6400 eingesetzt. Die sekundären Ziege-anti-Maus-HRP-Antikörper wurde 2000-fach verdünnt. Das Ergebnis der ELISA-Analysen nach vier Injektionen ist in Abb. 4.2.5 zu sehen.

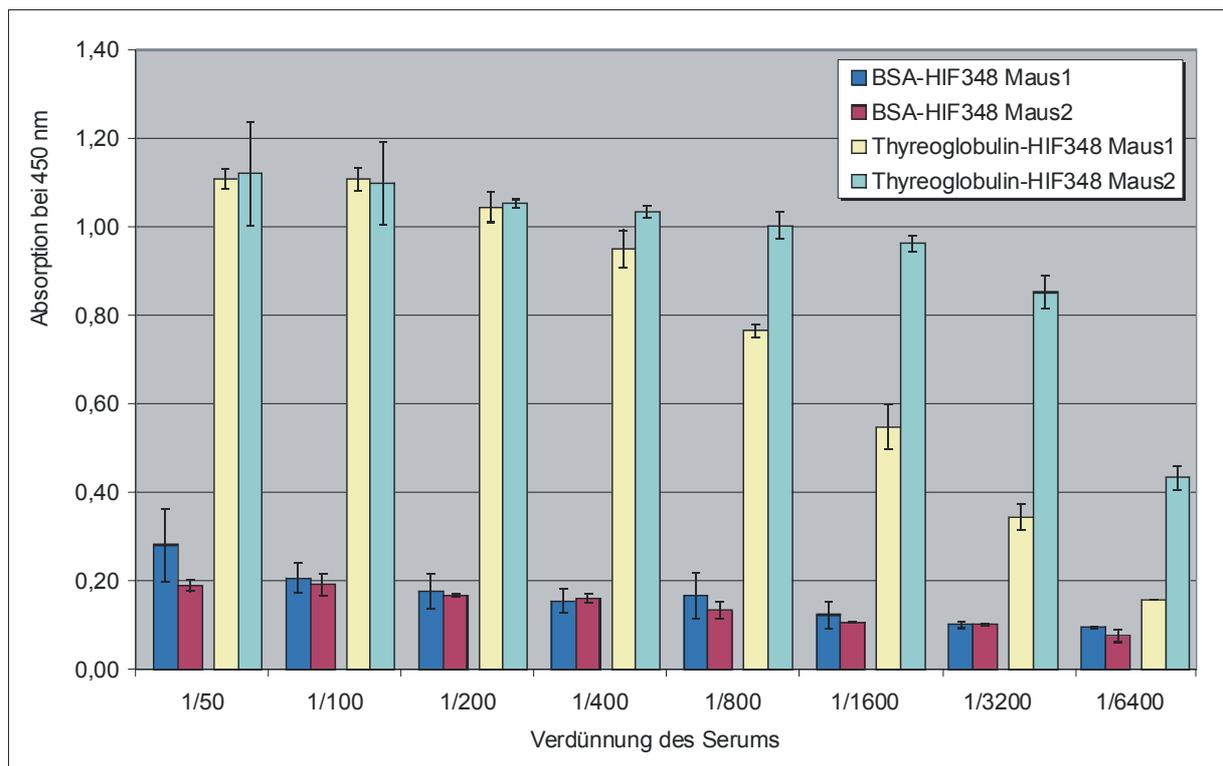


Abb. 4.2.5 Titer der mit HIF348-Proteincarrier-Konstrukten immunisierten Mäuse nach vier Injektionen. Die Werte stellen Mittelwerte von Doppelbestimmung dar.

Es wurde festgestellt, dass das BSA-HIF348 Konstrukt eine nur schwache Immunantwort gegen das HIF348 Peptid induzieren konnte. Im Gegensatz dazu konnten durch Immunisierung mit dem Thyreoglobulin-HIF348-Konstrukt Seren hohen Titer erhalten werden. Beide mit Thyreoglobulin-Peptid-Konstrukt immunisierten Tiere zeigten bei einer Verdünnung des Serums von 1/400 eine Absorption  $\geq 0,3$  (Maus1: 0,95; Maus2: 1,03) und wurden demzufolge für weitere Experimente verwendet.

#### 4.2.3 Evaluierung und Vergleich zweier Carriersysteme auf T-Zell-Epitop-Basis

Eine weitere Möglichkeit, humorale Immunantworten gegen kurze synthetische Peptide zu induzieren, besteht darin, die Peptidantigene an kurze T-Zell-Epitope zu koppeln. Getestet wurde das 10 Aminosäuren lange Tetanus-Toxin-T-Zell-Epitop TT (AS 12-21: PVNNDTIIMM) [85] und das Masernvirus-Fusions-Protein-T-Zell-Epitop MVH (AS 288-302: LSEIKGVIVHRLEGV) [84]. Die Konstrukte aus T-Zell-Epitop und dem HIF348-Peptid wurden per Fmoc-Peptidsynthese hergestellt. Die T-Zell-Epitope wurden zum einen N-terminal (Peptide: TT-HIF34; MVH-HIF348) und zum anderen C-terminal (Peptide:

HIF348-TT, HIF348-MVH) an das Modellpeptid (HIF348) gekoppelt. Jeweils 100 µg der Konstrukte wurden in je zwei weibliche BALB/c Mäuse im Abstand von drei Wochen injiziert (einmal mit komplettem und dreimal mit inkomplettem Freund's Adjuvans). Die Seren wurden schließlich wie im Abschnitt zuvor titriert. Die Ergebnisse der ELISA-Analysen der Seren nach der vierten Injektion sind in Abb. 4.2.6 dargestellt.

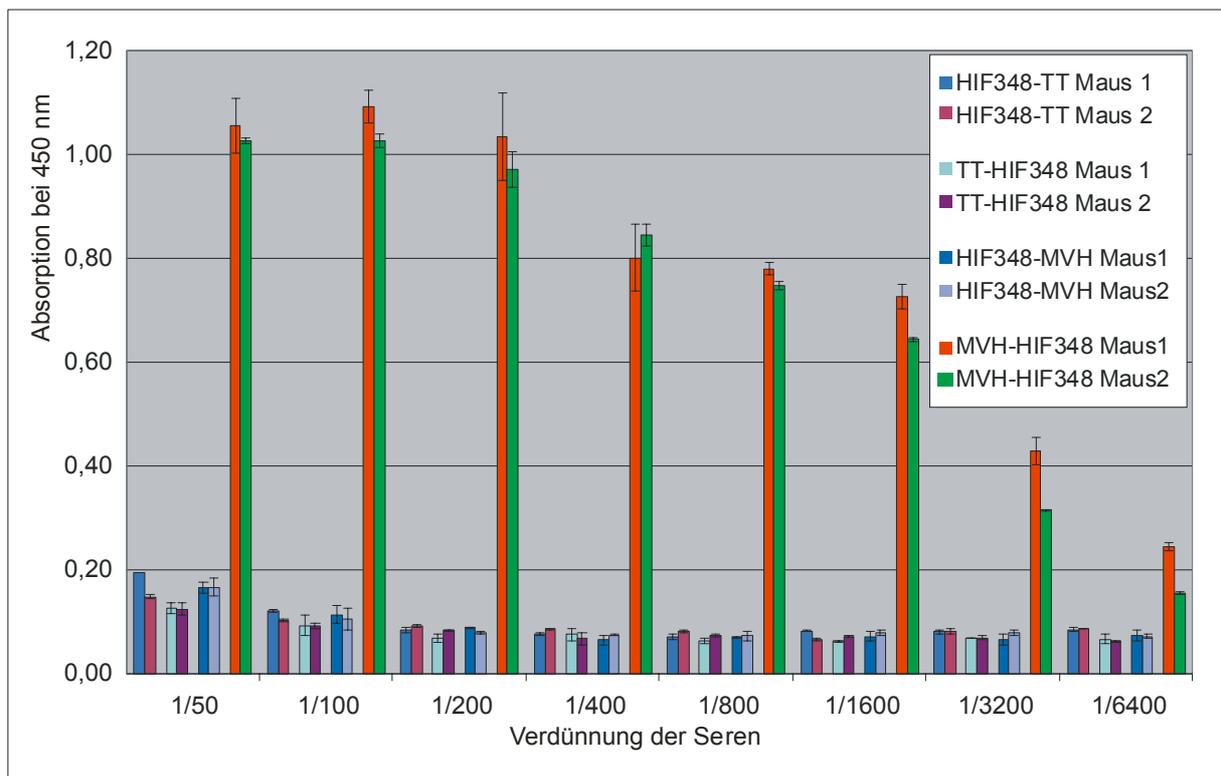


Abb. 4.2.6 Titration der Seren von mit HIF348 T-Zell-Epitop-Konstrukten immunisierten Mäusen. Die Werte stellen Mittelwerte von Doppelbestimmungen dar.

Es wurde deutlich, dass nur mit N-terminalen MVH als Carrier Seren hohen Titers gegen das Peptid erhalten werden konnten. So ergaben die Seren der Tiere, die mit MVH-HIF348-Peptid immunisiert wurden, bis zu einer Verdünnung von 1/400 Absorptionen von  $> 0,8$ , und wurden demzufolge für weiter Experimente verwendet.

#### 4.2.4 Vergleich der Carriersysteme Thyreoglobulin, N-terminales MVH und C-terminales MVH T-Zell-Epitop

Aufgrund der experimentellen Befunde aus den Abschnitten 4.2.1 bis 4.2.3 wurde im Rahmen dieser Arbeit vorrangig mit Thyreoglobulin, N-terminalem sowie mit C-terminalem MVH als Carrier gearbeitet. Obwohl C-terminales MVH die Immunantwort gegen HIF348 nicht

verstärken konnte, wurde aufgrund der komplizierten Pfade der Antigen-Prozessierung, die zur Bildung von Peptid-MHC-II-Komplexen führen, angenommen, dass C-terminales MVH die Immunantwort gegen Peptide mit anderer Sequenz durchaus verstärken kann. Aus diesem Grunde wurden auch mit C-terminalem MVH als Carrier weitere Experimente durchgeführt. Alle Tiere (72 weibliche BALB/c Mäuse) wurden mit jeweils 100 µg Peptid-Carrier Konstrukt immunisiert. Eine Zusammenstellung der verwendeten Peptidsequenzen und der Anzahl der damit immunisierten Tiere ist in Tab. 4.2.2 zusammengestellt. Alle ELISA-Analysen wurden, wie im Methodenteil beschrieben (Abschnitte 3.6.3 und 3.6.4) mit dem Streptavidin-ELISA-System unter gleichen standardisierten Bedingungen durchgeführt. Als positiv wurden die Seren gewertet, die bei einer Verdünnung von 1/400 mindestens eine Absorption von  $\geq 0,3$  zeigten. Die Aufstellung positiv bzw. negativ verlaufener Immunisierungen ist mit den entsprechenden Peptid-Carrier-Konstrukten in Tab. 4.2.2 tabellarisch und in Abb. 4.2.9 grafisch zusammengestellt.

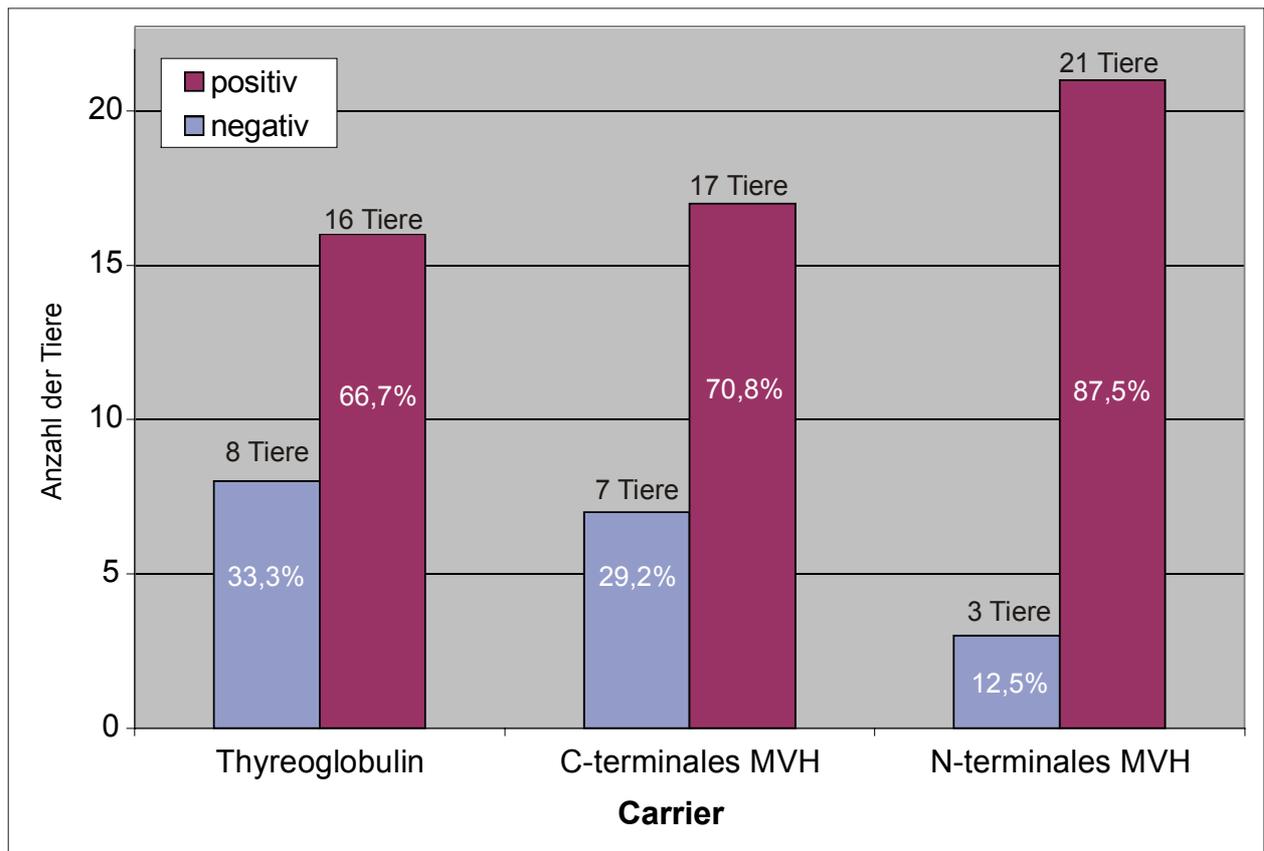


Abb. 4.2.7 Rate erfolgreicher Immunisierungen von Mäusen unter Verwendung von Thyreoglobulin, N-terminalem und C-terminalem MVH-Peptid als Carrier.

<b>Peptidsequenz:</b>	<b>Thyreoglobulin pos./neg.</b>	<b>C-terminales MVH pos./neg.</b>	<b>N-terminales MVH pos./neg.</b>
HIF348: EEAQRKNPMFKFE Humaner „gastric intrinsic factor“ AS 348-360	2 / 0	0 / 2	2 / 0
CAH2_1: SHHWGYGKHNGPEHWHKDF Humane Carboanhydrase II AS 1-19	0 / 2	2 / 0	2 / 0
CAH2_2: GQGSEHTVDKKKYAAELHLV Humane Carboanhydrase II AS 100-120	2 / 0	0 / 2	2 / 0
CAH2_3: DNWRPAQPLKNRQIKASFK Humane Carboanhydrase II AS 230-259	2 / 0	2 / 0	2 / 0
ADH1_1: QGPQIDKEQYDKILD Humane Aldehyddehydrogenase Klasse 1 AS 341-355	2 / 0	2 / 0	2 / 0
ADH1_2: YTEVKTIVTKISQKNS Humane Aldehyddehydrogenase Klasse I AS 485-500	0 / 2	0 / 2	1 / 1
cDNA Pep 1: SHESGLHTHTQAPV Abgeleitet von cDNA Klon RGMB025 (hypothetical protein FLJ22649)	3 / 0	--	--
cDNA Pep 2: YPAARRWQRETGPGR Abgeleitet von cDNA Klon RGMB067 (uncharacterized hematopoietic stem/progenitor cells)	2 / 1	--	--
cDNA Pep 3: RHEDVVTNSIDEAMTEAM Abgeleitet von cDNA Klon (putative sterol reductase SR-1)	3 / 0	--	--
cDNA Pep 4: KPDGLLEFAKRLERWGRG Abgeleitet von cDNA Klon RGMB159 (MUF 1)	0 / 3	--	--
IGFBP5_1: LPRQDEEKPLHALLHGRG Porcines IGFBP5 AS 80-97	--	2 / 0	2 / 0
IGFBP5_2: KSYREQAKIERDSREHEE Porcines IGFBP5 AS 103-120	--	2 / 0	2 / 0

<b>Peptidsequenz:</b>	<b>Thyreoglobulin pos./neg.</b>	<b>C-terminales MVH pos./neg.</b>	<b>N-terminales MVH pos./neg.</b>
IGFBP5_3: SEMAEETYSKIFRPKHT Porcines IGFBP5 AS 124-141	--	2 / 0	2 / 0
IGFBP5_4: SELKAEAVKKDRRKKLTQ Porcines IGFBP5 AS144-161	--	2 / 0	2 / 0
IGFBP5_5: ENTAHPRVILAPEMRQESE Porcines IGFBP5 AS 169-187	--	2 / 0	0 / 2
IGFBP5_6: EYVDGDFQCHSFDSSNVE Porcines IGFBP5 AS 254-271	--	1 / 1	2 / 0

Tab. 4.2.2 Quote erfolgreicher Immunisierungen von Mäusen unter Verwendung von Thyreoglobulin, N-terminalem und C-terminalem MVH-Peptid als Carrier.

Es konnte festgestellt werden, dass die Erfolgsquote, Seren hohen Titers gegen das Antigen zu erhalten, im Falle des Thyreoglobulins als Carrier bei 66,7 %, im Falle des C-terminalen MVH Carriers bei 70,8 % und im Falle des N-terminalen MVH Carriers bei 87,5 % lag.

### **4.3 Produktion von Peptid-induzierten Antikörpern und Evaluierung ihrer Eignung für Proteom-Studien**

Um die Eignung Peptid-induzierter Antikörper, zur gezielten Detektion von Proteinen und deren Isoformen zu prüfen, wurden einige Peptid-induzierte Antikörper produziert und im 2D-Western-Blot getestet.

#### **4.3.1 Produktion von Peptid-induzierten Antikörpern gegen Proteine aus menschlicher Magenschleimhaut**

Zunächst wurden einige Peptid-induzierte Antikörper zur Detektion von Proteinen aus menschlicher Magenschleimhaut generiert. Es wurde dieses Gewebe gewählt, weil es aus einem vorangegangenen cDNA-Sequenzierungs-Projekt in ausreichender Menge zur Verfügung stand und weil Magenschleimhaut-Zell-Lysat ein sehr komplexes Proteingemisch darstellt. So zeigen Silber-gefärbte Magenschleimhaut 2D-Gele ein heterogenes und komplexes Spotmuster (Siehe Abb. 4.3.1). Mit Hilfe einer 2D-Gel Analysesoftware (Proteomweaver V 1.3.2, Fa. Definiens) konnten auf einem silbergefärbten 2D-Gel, dieses humanen Materials, 653 Spots nachgewiesen werden. Damit stellt Magenschleimhaut-Zell-Lysat ein anspruchsvolles Testsystem zur Evaluierung Peptid-induzierter Antikörper zur Detektion von Proteinen im Rahmen von Proteomstudien dar.

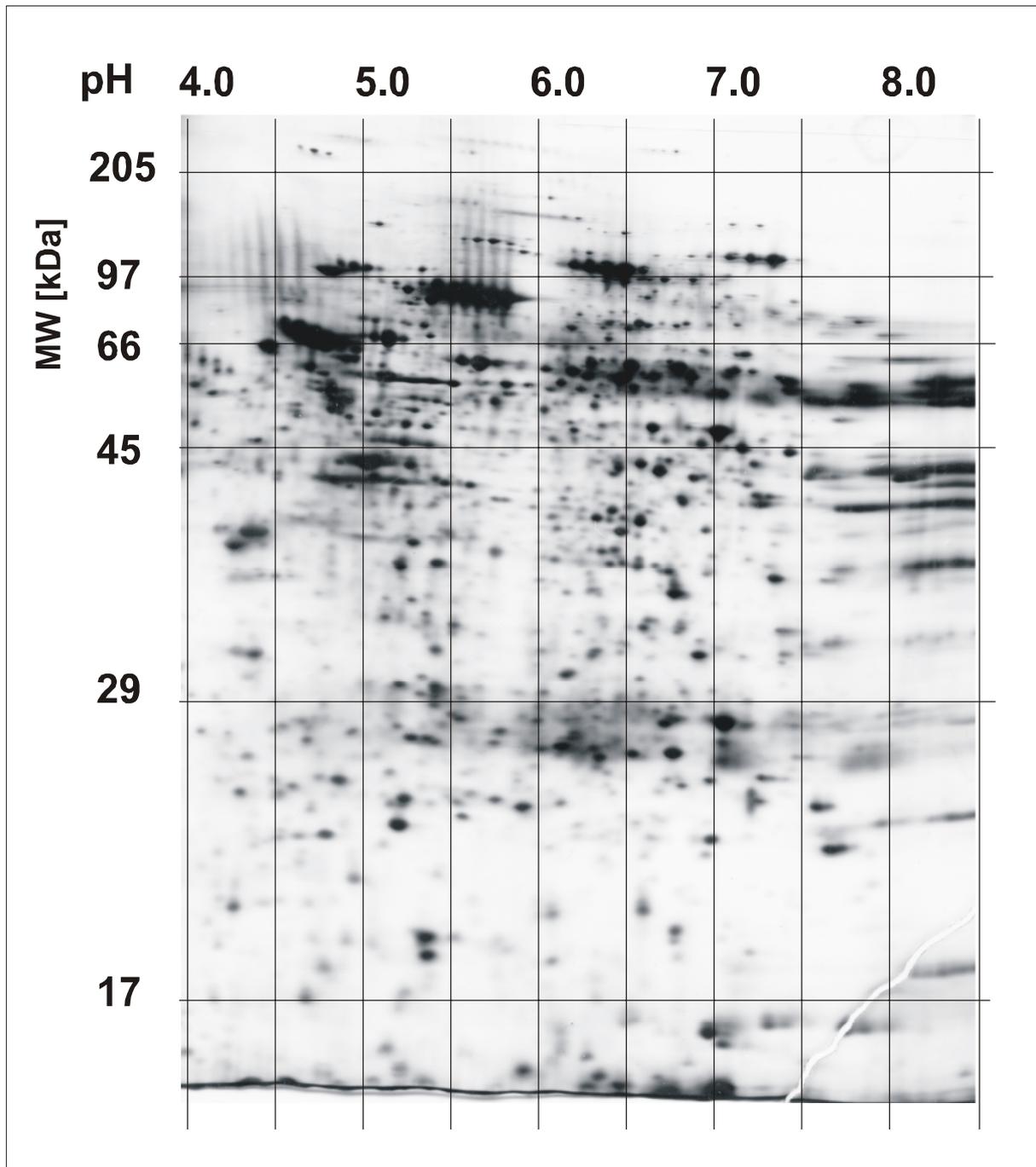


Abb. 4.3.1 Silbergefärbtes 2D-Gel menschlicher Magenschleimhaut.

#### 4.3.1.1 Produktion Peptid-induzierter Antikörper gegen humanen „gastric intrinsic factor“

Humaner „gastric intrinsic factor“ (IF) ist ein sialinsäurehaltiges 45 kDa Glykoprotein, das mit Cobalamin (Vitamin B12) komplexiert und im Ileum resorbiert wird. Zur Ermittlung von Peptiden, die sich für Immunisierungszwecke eignen, wurde stets ein Hydrophobizitätsplot nach Kyte & Doolittle erstellt. Bereiche mit einem Score von kleiner -1 gelten als ausreichend hydrophil und sind prinzipiell für Immunisierungen geeignet. Alle in Frage kommenden

Bereiche wurden mittels einer BLAST-Homologiesuche gegen die NCBI-nr-Datenbank analysiert. Sequenzen mit hoher Homologie zu anderen humanen Proteinen wurden nicht berücksichtigt. Auch Cystein-haltige Peptide wurden nicht verwendet. Die Wahrscheinlichkeit, dass an dieser Position Disulfidbrücken zur Struktur des nativen Proteins beitragen und als Konsequenz Antikörper, die gegen das entsprechende Peptid mit freiem Cystein gerichtet sind nicht mit dem nativem Protein reagieren, wurde als zu hoch erachtet. Das Ergebnis der Analyse ist in Abb. 4.3.2 dargestellt.

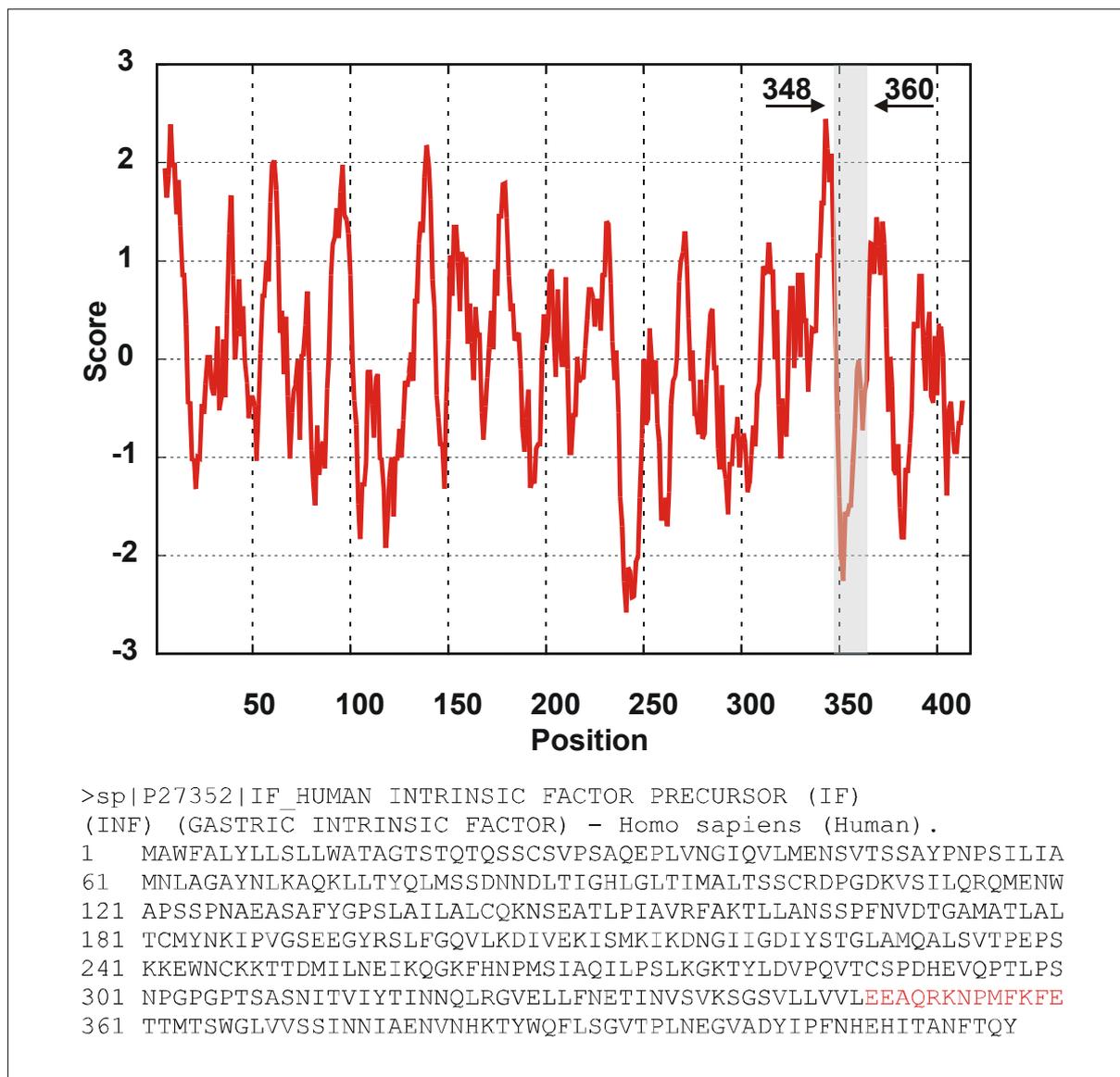


Abb. 4.3.2 Hydrophobizitätsplot des humanen IF – die zur Immunisierung ausgewählte Sequenz (AS 448-460) ist rot markiert. Für die Hydrophobizität der einzelnen Aminosäuren wurde der Standard-Kyte & Doolittle „scale“ (siehe Methodenteil Abschnitt 3.1) mit einem Fenster von 9 Aminosäuren verwendet.

Das Peptid HIF348 (humaner „gastric intrinsic factor“ AS 348-360: EEAQRKNPMFKFE) wurde als Hapten gewählt. Als Carrier wurden bovines Thyreoglobulin und MVH (Masernvirus-Fusions-Protein-T-Zell-Epitop AS 288-302: LSEIKGVIVHRLEGV) verwendet. Es wurden die folgenden Peptid-Carrier-Konstrukte hergestellt:

- HIF348-Thyreoglobulin (HIF348-Thyr)
- N-terminales MVH (MVH-HIF348): LSEIKGVIVHRLEGV-EEAQRKNPMFKFE
- C-terminales MVH (HIF348-MVH): EEAQRKNPMFKFE- LSEIKGVIVHRLEGV

Die Peptide (HIF348, MVH-HIF348 und HIF348-MVH) konnten mittels Fmoc-Peptidsynthese und anschließender RP-HPLC-Reinigung in hoher Reinheit (> 90 %) gewonnen werden (siehe analytische HPLC in Abb. 4.3.3).

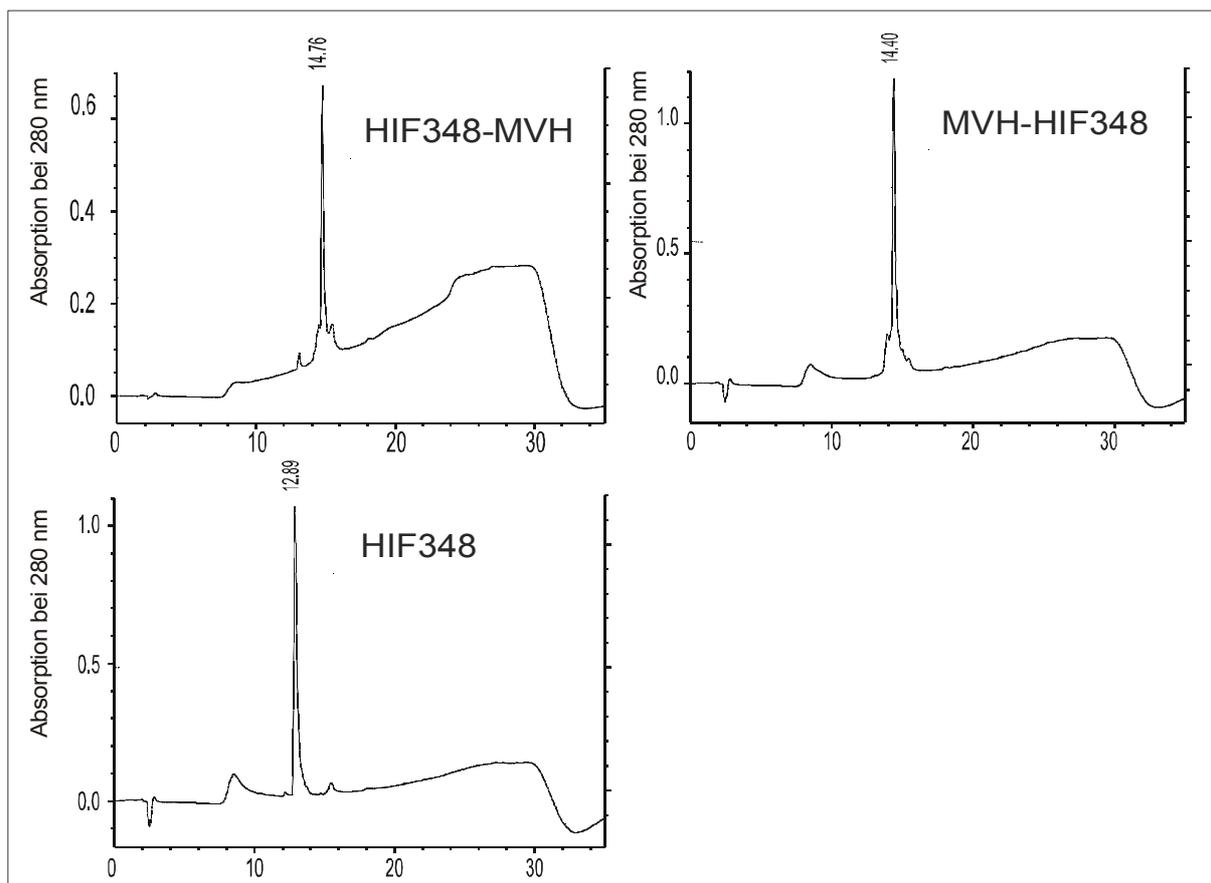


Abb. 4.3.3 Analytische Reversed Phase HPLC des HIF348 Peptides und des MVH-HIF348 Konstruktes.

Die Korrektheit der Peptide wurde durch MALDI-MS geprüft. Für das Konstrukt mit bovinem Thyreoglobulin (HIF348-Thyr) wurde das HIF348-Peptid mittels ECDI an das

Protein gekoppelt. Überschüssiges Peptid und ECDI wurde mittels Gel-Ausschlusschromatographie entfernt. Nach viermaliger Injektion von je 100 µg Konstrukt in je zwei weibliche BALB/c Mäuse, wurden die Seren der Tiere mit dem im Abschnitt 4.1.3 evaluierten Streptavidin ELISA-System titriert. Die Ergebnisse der ELISA-Analysen sind in Abb. 4.3.4 dargestellt.

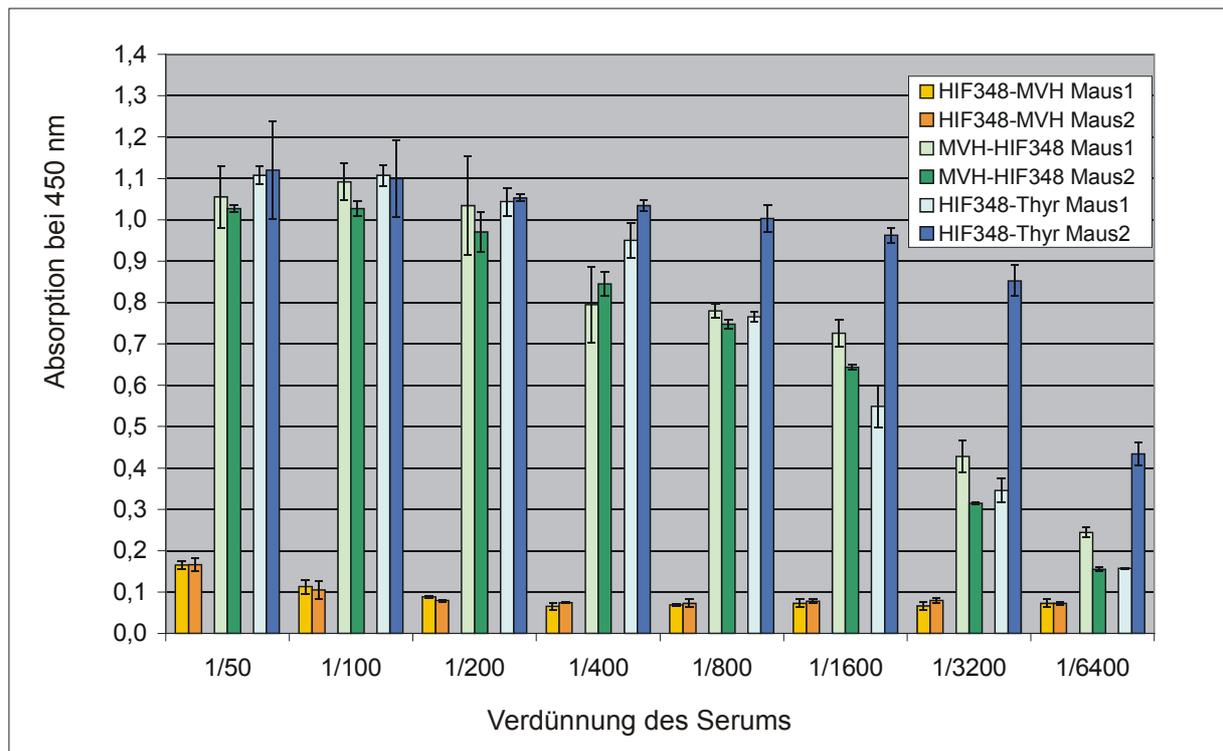


Abb. 4.3.4 ELISA der Anti-HIF348 Peptid Antiseren. Die Werte stellen Mittelwerte von Doppelbestimmungen dar.

Es konnte festgestellt werden, dass durch Immunisierung mit den HIF348-MVH-Konstrukt keine Seren ausreichenden Titters erhalten werden konnten. So beträgt die Absorption bei 50-facher Verdünnung der Seren durchschnittlich nur 0,17. Hingegen konnten durch Immunisierung mit dem MVH-HIF348 und mit dem HIF348-Thyr Konstrukt Seren hohen Titters gegen das Peptid-Antigen erhalten werden. Das im ELISA erhaltene Signal lag bei 400-facher Verdünnung der Seren deutlich über die minimal geforderte Absorption von  $\geq 0,3$ . Um zu testen, ob die Seren neben den Peptiden auch das Protein (IF) detektieren, wurde eine Verdünnungsreihe dieses Proteins im 1D-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, per Semidry-Blotting auf Nitrozellulose überführt und mit den Peptid-Antiseren detektiert. Da humaner IF nicht kommerziell zu erwerben war, musste das porcine Protein verwendet werden. Die Gelelektrophorese und der Western-Blot wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt (siehe Abschnitt 3.9.1 und 3.11.1). Die Membran wurde dann über Nacht mit

5 % BSA blockiert und mit den Seren (MVH-HIF348 Maus 1 und HIF348-Thyr Maus 1) in einer Verdünnung von 1/1000 und mit den 2000-fach verdünnten Ziege-anti-Maus-HRP-Antikörpern für je 1 h inkubiert. Die Detektion erfolgte per Lumineszenz-Substrat wobei die Expositionszeit des Filmes 30 s betrug. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.3.5 zu sehen.

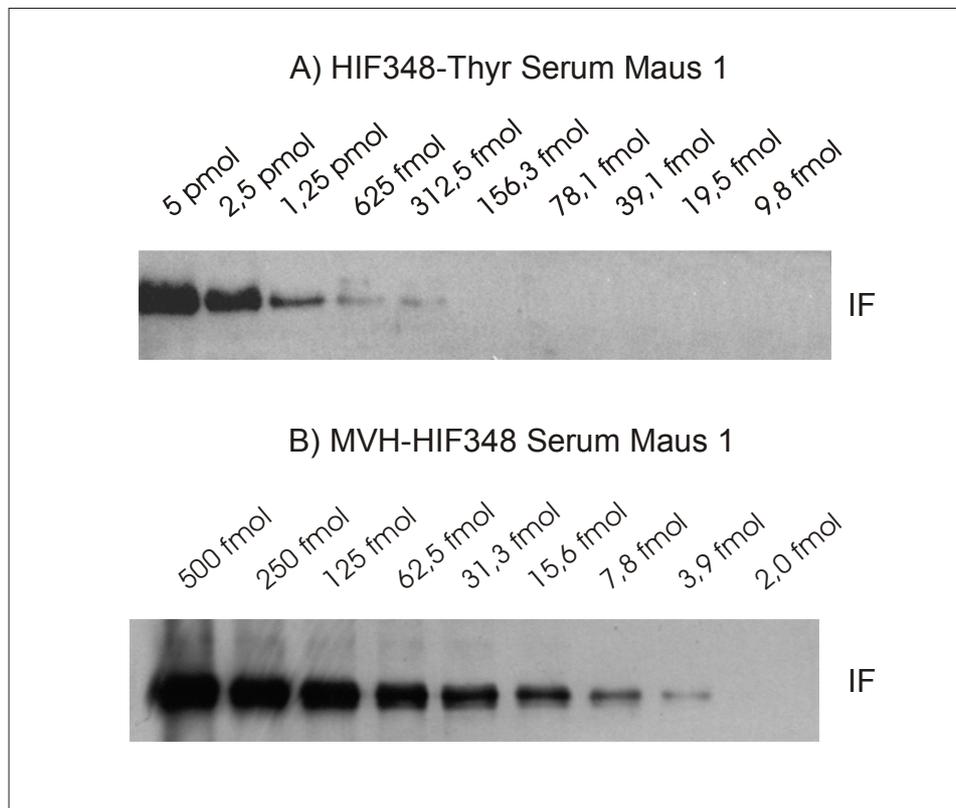


Abb. 4.3.5 Western-Blot einer Verdünnungsreihe porcinen IFs. Detektion mit den Peptid-induzierten Antiseren.

Die Seren zeigten unterschiedliche Sensitivitäten. Mit dem HIF348-Thyr-induzierten Antiserum wurden bis zu 312,5 fmol des Proteins nachgewiesen. Das MVH-HIF348 induzierte Antiserum konnte sogar noch 4 fmol porcinen IFs deutlich nachweisen. Um die Eignung der erhaltenen Seren für Proteom-Studien zu zeigen, wurden je 100 µg Protein menschlicher Magenschleimhaut durch 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Hierfür wurden mehrere 2D-Gele, wie im Methodenteil Abschnitt 3.9.2. beschrieben, hergestellt. Für die isoelektrische Fokussierung wurden lineare Gradienten zwischen pH 3 und pH 10 verwendet, für die zweite Dimension 4 % Sammelgele und 12 % Trenngele. Als Qualitätskontrolle wurde ein Gel mit der Silberfärbetechnik nach Blum gefärbt. Das silbergefärbte Gel wurde bereits in Abb. 4.3.1 dargestellt. Die anderen Gele wurden wie im Methodenteil Abschnitt 3.11.1 beschrieben, dem Semidry-Western-Blotting-Verfahren unterzogen. Die Nitrozellulose-Membranen wurden für 2 h mit 5 % BSA in PBS-T blockiert, die Seren

500-fach und die sekundären Ziege-Anti-Maus-HRP-Antikörper 2000-fach verdünnt, verwendet. Die Detektion erfolgte per Lumineszenz-Substrat. Die Expositionszeit des Filmes betrug 30 s. Das Ergebnis des Western-Blots mit HIF348-Thyreoglobulin induziertem Antiserum ist in Abb. 4.3.6 dargestellt. Der Western-Blot mit MVH-HIF348 ergab ein vergleichbares Bild (nicht dargestellt).

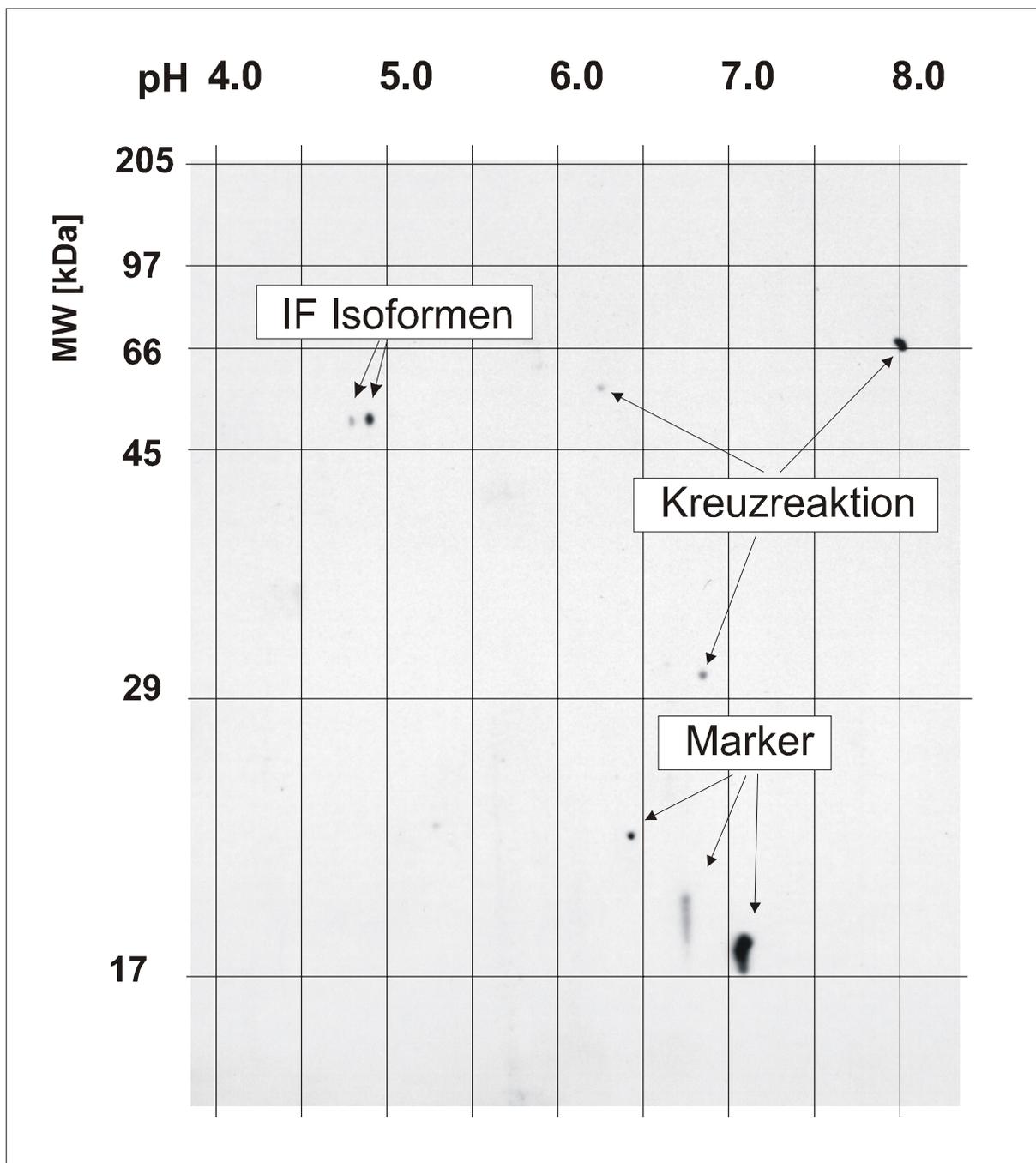


Abb. 4.3.6 Western-Blot menschlicher Magenschleimhaut - Detektion des humanen IFs mit HIF348-Thyreoglobulin-induziertem Antiserum.

Es ist zu erkennen, dass zwei IF Isoformen mit den HIF348-Thyreoglobulin-Konstrukt induzierten Antiseren detektiert werden konnten. Um die Richtigkeit der Signale zu

überprüfen wurde ein weiterer Western-Blot mit einem Kaninchen-Antiserum gegen porcinen IF geführt. Der Western-Blot wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Das Kaninchen Antiserum wurde 1/1000 und die sekundären Ziege-anti-Kaninchen-HRP-Antikörper 1/2000 verdünnt eingesetzt. Die Expositionszeit des Filmes betrug 15 s. Das Ergebnis ist in Abb. 4.3.7 zu sehen.

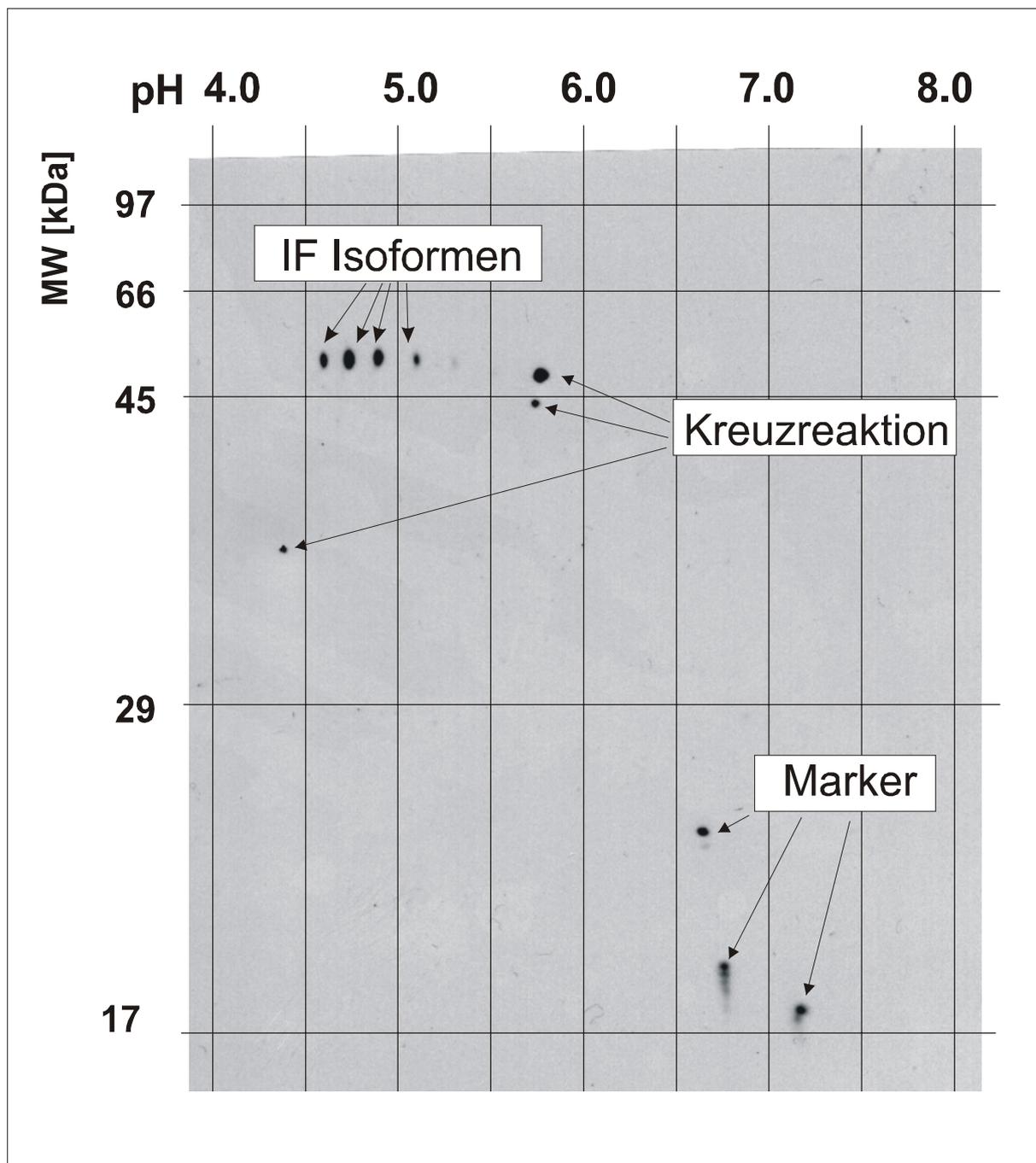
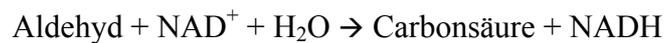


Abb. 4.3.7 Western-Blot menschlicher Magenschleimhaut; Detektion des humanen IFs mit polyklonalem anti-porcinem IF Serum.

Es konnte festgestellt werden, dass mit dem Kaninchen-Antiserum, neben den von den anti-HIF348-Serum gefundenen, noch zwei weitere „gastric intrinsic factor“ Isoformen detektiert werden konnten.

#### 4.3.1.2 Produktion Peptid-induzierter Antikörper gegen Aldehyddehydrogenase Klasse 1 (ADH1)

Aldehyddehydrogenase spielt eine Rolle im Alkohol-Metabolismus und katalysiert die folgende Reaktion:



Es wird zwischen Klasse 1 (cytosolischer) und Klasse 2 (mitochondrialer) Aldehyddehydrogenase unterschieden. Aldehyddehydrogenase Klasse 1 liegt im nativen Zustand als Tetramer aus vier identischen 55 kDa Einheiten vor. Die mRNA dieses Aldehyddehydrogenase-Isozyms konnte im Laufe eines vorangegangenen cDNA Sequenzierungsprojektes humaner Magenschleimhaut nachgewiesen werden. Zur Immunisierung wurden die Peptide ADH1\_1 (AS 341-355: QGPQIDKEQYDKILD) und ADH1\_2 (AS 485-500: YTEVKT VTKISQKNS) ausgewählt. Die Peptide sind hydrophil und somit gut in wässrigen Puffern löslich und zeigten geringere Homologie zu anderen Proteinen als die übrigen hydrophilen Bereiche. Der Kyte & Doolittle Hydrophobizitätsplot und die Positionen der Peptide sind in Abb. 4.3.8 abgebildet. Es wurden folgende Peptid-Carrier-Konstrukte synthetisiert:

- ADH1\_1-Thyreoglobulin (ADH1\_1-Thyr)
- ADH1\_2-Thyreoglobulin (ADH1\_2-Thyr)
- N-terminales MVH (MVH-ADH1\_1): LSEIKGVIVHRLEGV-QGPQIDKEQYDKILD
- C-terminales MVH (ADH1\_1-MVH): QGPQIDKEQYDKILD-LSEIKGVIVHRLEGV
- N-terminales MVH (MVH-ADH1\_2): LSEIKGVIVHRLEGV-YTEVKT VTKISQKNS
- C-terminales MVH (ADH1\_2-MVH): YTEVKT VTKISQKNS-LSEIKGVIVHRLEGV

Die Peptide ADH1\_1 und ADH1\_2, sowie die entsprechenden Konstrukte mit MVH als Carrier wurden mittels Fmoc-Peptidsynthese synthetisiert und HPLC gereinigt. Die Richtigkeit der Peptide wurde durch MALDI-MS verifiziert. Für die Konstrukte mit Thyreoglobulin als Carrier wurden die Peptide mit ECDI an das Protein gekoppelt und überschüssiges Peptid und Crosslinker mit Gel-Ausschlusschromatographie abgetrennt.

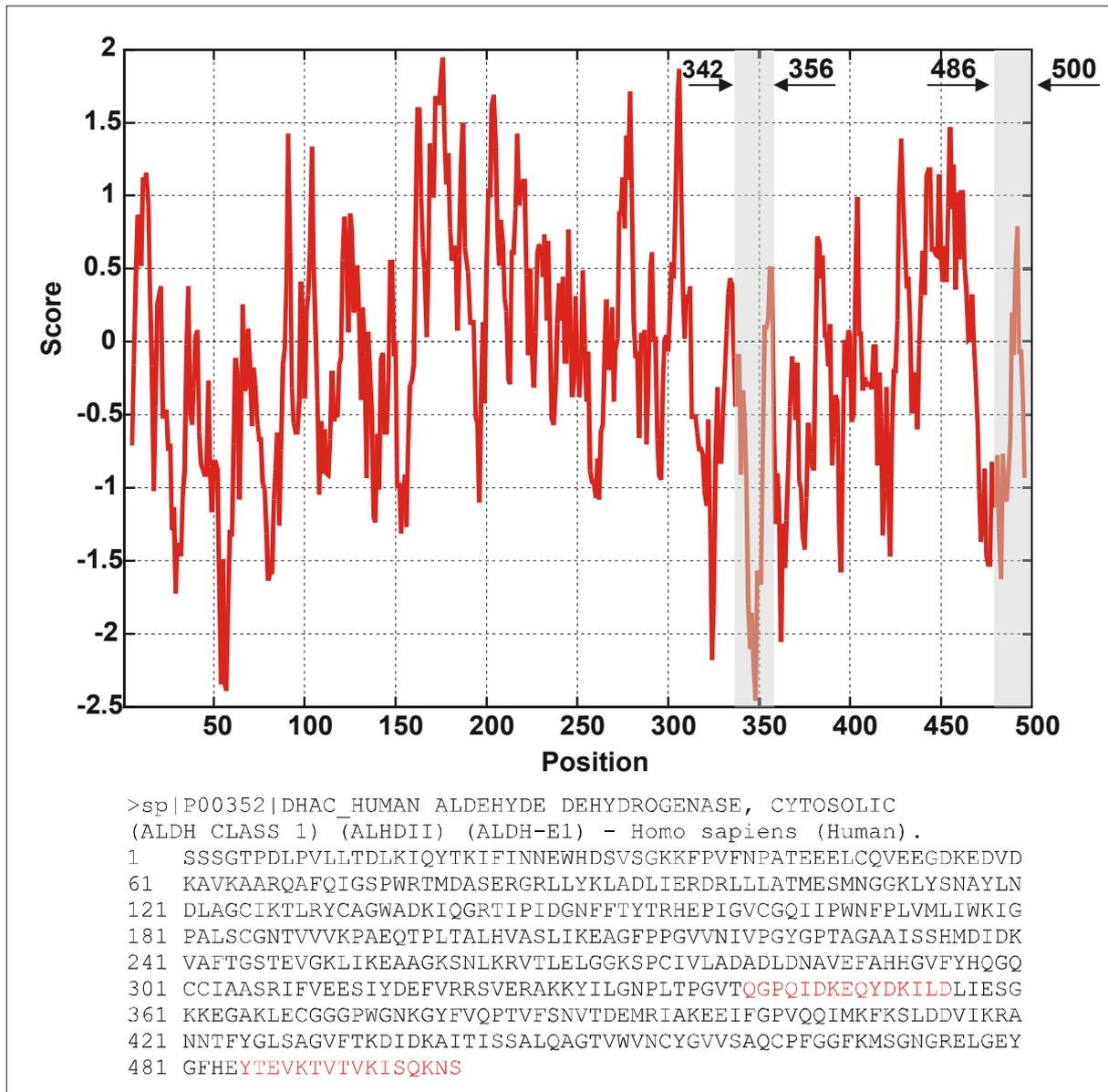


Abb. 4.3.8 Hydrophobizitätsplot von menschlicher Aldehyddehydrogenase Klasse 1 und die zur Immunisierung ausgewählte Sequenzen. Für die Hydrophobizität der einzelnen Aminosäuren wurde der Standard-Kyte & Doolittle „scale“ mit einem Fenster von 9 Aminosäuren verwendet.

Nach viermaliger Injektion (einmal mit komplettem und dreimal mit inkomplettem Freund's Adjuvans) von je 100 µg Konstrukt in je zwei weibliche BALB/c Mäuse wurden die Seren der Tiere mit dem Peptid Streptavidin-ELISA-System titriert. Die Ergebnisse der ELISAs sind in Abb. 4.3.9 und Abb. 4.3.10 abgebildet.

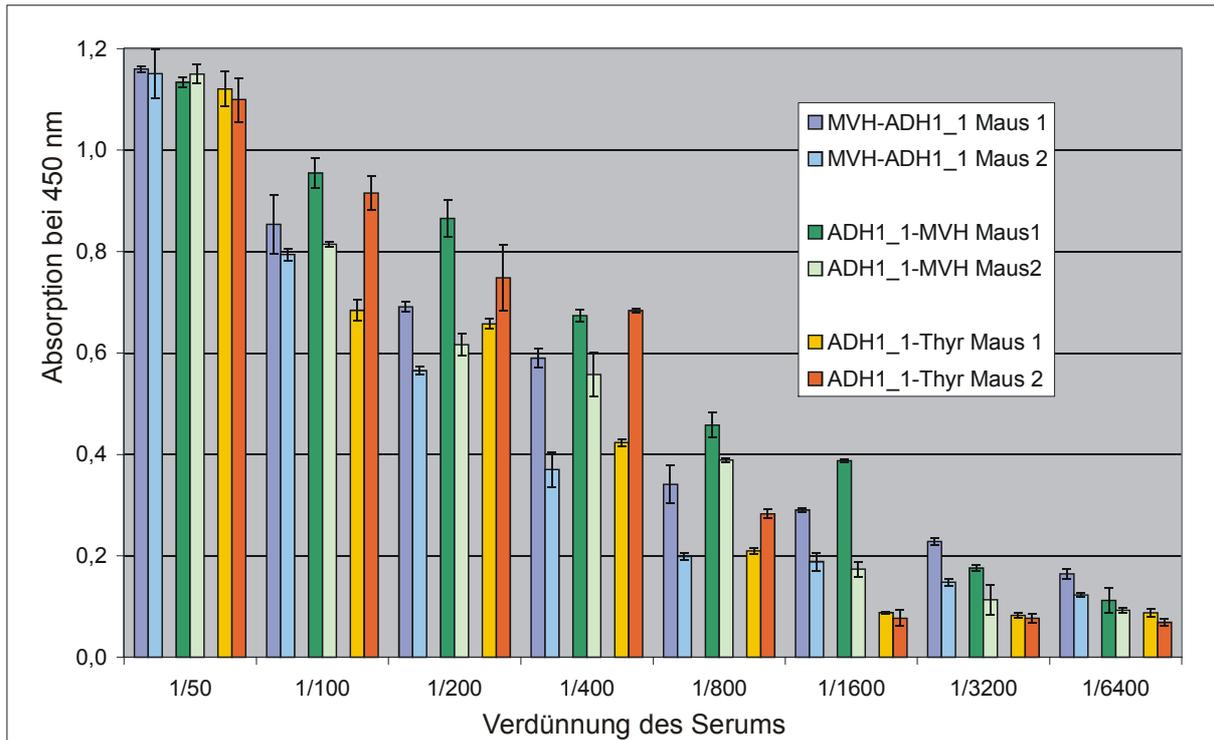


Abb. 4.3.9 ELISA-Analyse der Anti-ADH1\_1 Peptid-induzierten Antikörper. Die Werte stellen Mittelwerte von Doppelbestimmung dar.

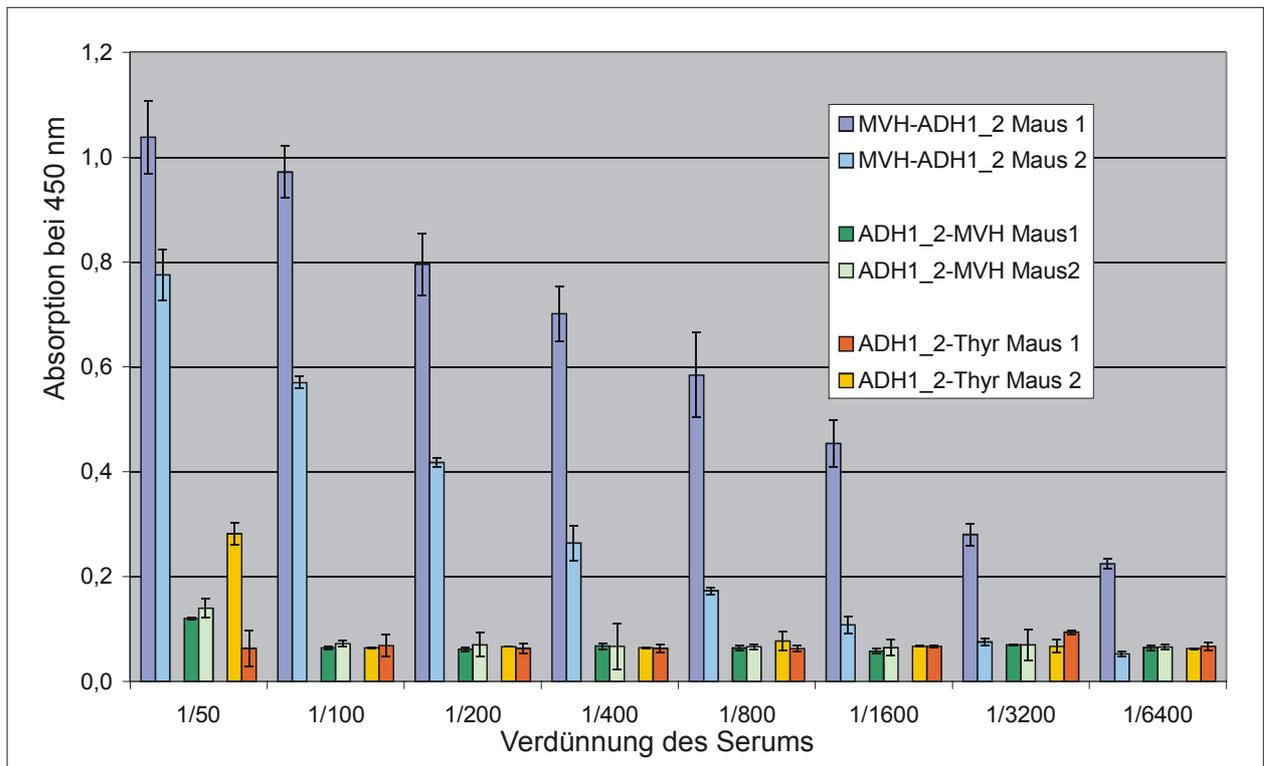


Abb. 4.3.10 ELISA-Analyse der Anti-ADH1\_2 Peptid-induzierten Antikörper. Die Werte stellen Mittelwerte von Doppelbestimmung dar.

Es konnte festgestellt werden, dass mit allen ADH1\_1-Carrier-Konstrukten Seren hohen Titers gegen das Peptid erhalten werden konnten. So zeigten alle Seren bei 1/400 Verdünnung

die minimal geforderte Absorption von  $\geq 0,3$ . Von den ADH1\_2-induzierten Seren erfüllte hingegen nur das Serum eines mit MVH-ADH1\_2 immunisierten Tieres dieses Kriterium. Wiederum wurde die Eignung der Seren das Protein zu detektieren im 2D-Western-Blot getestet. Hierfür wurden 100  $\mu\text{g}$  Protein humaner Magenschleimhaut mit 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt, und anschließend auf Nitrozellulose geblottet (siehe Methodenteil Abschnitte 3.9.2 und 3.11). Die Seren wurden 1/500 verdünnt, eingesetzt. Der sekundäre Ziege-anti-Maus-HRP-Antikörper wurde 2000-fach verdünnt verwendet. Die Detektion erfolgte per Lumineszenz-Substrat mit einer Expositionszeit des Filmes von 45 s. Die ADH1\_1-MVH-induzierten Seren zeigten keine Signale im Western-Blot. Die durch die ADH1\_1-Thyr Immunisierung erhaltenen Seren zeigten starke Kreuzreaktivität und viele unspezifische Signale. Als Beispiel für einen 2D-Western-Blot mit kreuzreagierenden Seren ist das Ergebnis dieser Immunodetektion in Abb. 4.3.11 abgebildet.

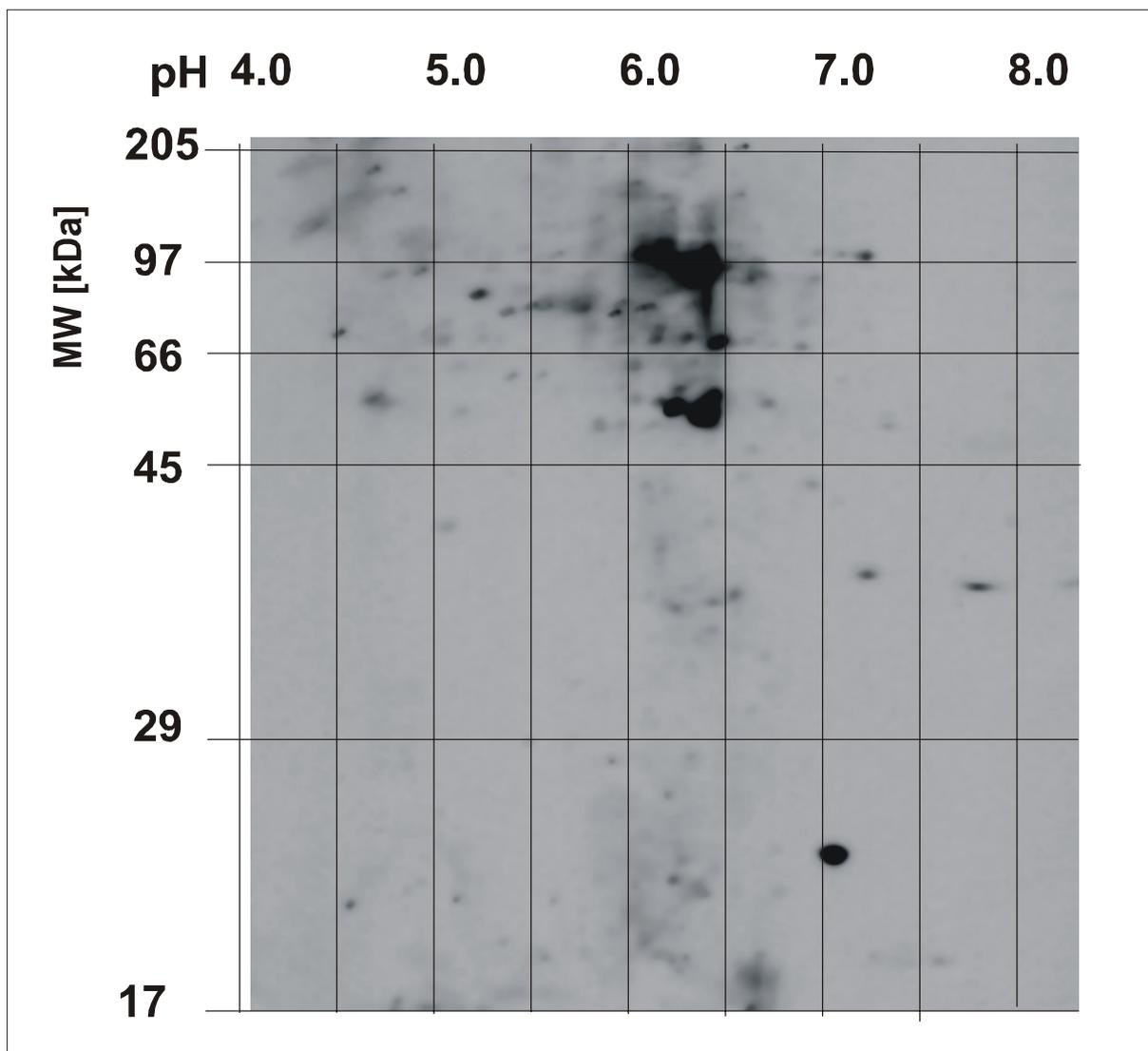


Abb. 4.3.11 Western-Blot humaner Magenschleimhaut – Detektion mit Anti-Thyr-ADH1\_1 Serum. Mit diesem Serum konnte ADH1 nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Die Western-Blots mit MVH-ADH1\_1 und MVH-ADH1\_2 induzierten Seren zeigten im Gegensatz dazu zwei spezifische Signale. Das Ergebnis des Western-Blots mit dem Serum MVH-ADH1\_1 immunisierter Mäuse zeigt die Abb. 4.3.12.

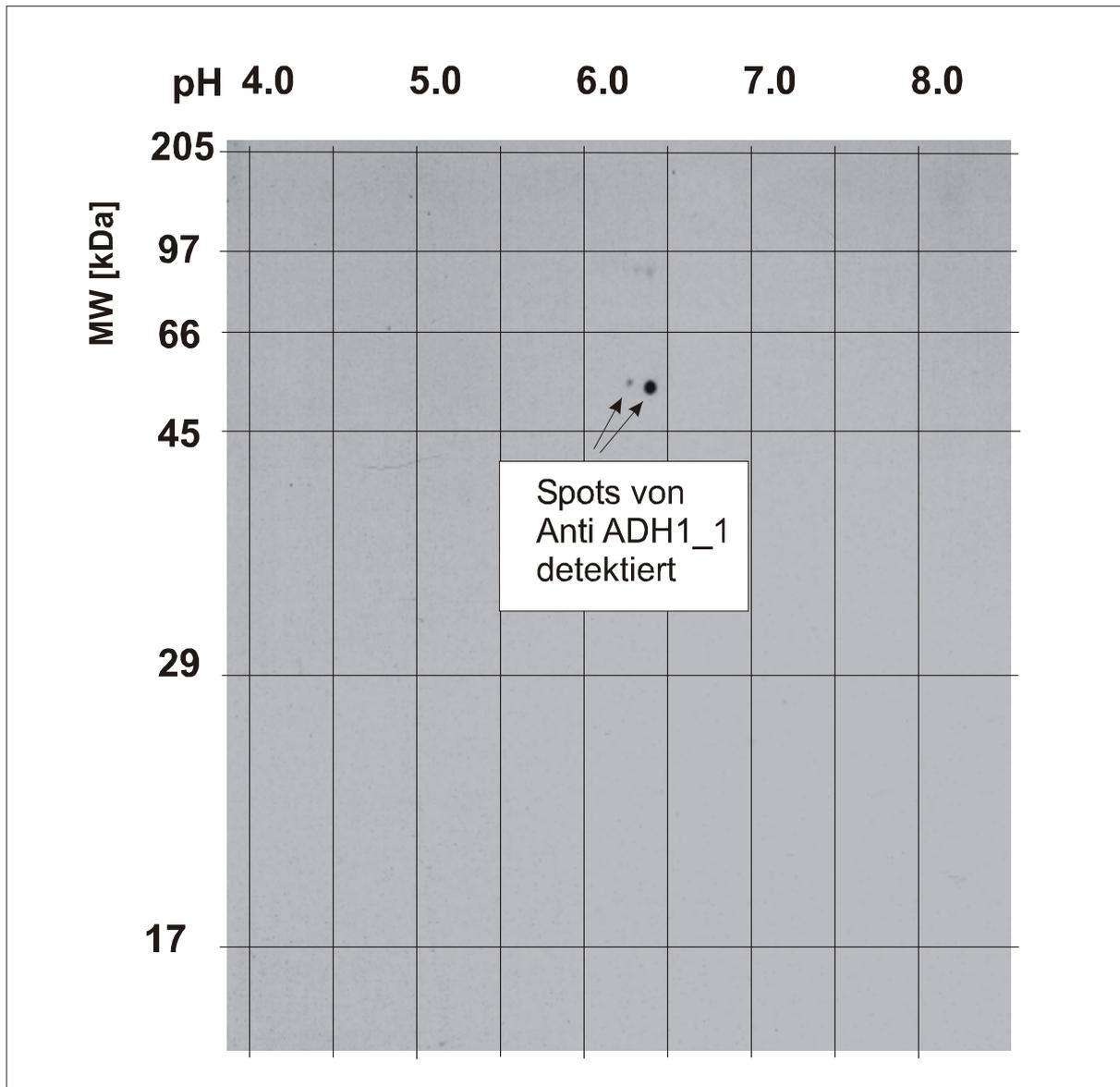


Abb. 4.3.12 Western-Blot humaner Magenschleimhaut – Detektion mit Anti-MVH-ADH1\_1 Serum.

Es ist zu erkennen, dass das Antiserum zwei spezifische Signale ergibt. Das Anti-MVH-ADH1\_2 Serum detektierte die gleichen Spots (hier nicht gezeigt). Die Koordinaten der Spots entsprechen den theoretisch berechneten Werten (55 kDa, IP: 6,3) und exakt den auf anderen 2D-Gelen ermittelten Werten [99]. Durch Zugabe der entsprechenden Peptide (100 µg/ml Peptid, 1 h Präinkubation im 500-fach verdünnten Serum) ließen sich die Signale unterdrücken, so dass eine Kreuzreaktion ausgeschlossen werden konnte.

#### 4.3.1.3 Produktion Peptid-induzierter Antikörper gegen Carboanhydrase II

Carboanhydrasen (CA) sind zinkhaltige Metalloenzyme, welche die reversible Hydratation von Kohlendioxid ( $\text{H}_2\text{CO}_3 \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ ) katalysieren. Bisher sind acht Varianten der Carboanhydrasen bekannt. Neben einer noch nicht näher charakterisierten Form sind CA-IV und CA-VII membrangebundene, CA-V mitochondriale und CA-VI sezernierte Formen der Carboanhydrasen. CA-I, CA-II und CA-III sind die cytosolischen Carboanhydrase-Varianten. Die mRNA des CA-II-Isozyms konnte im Laufe eines vorangegangenen cDNA Sequenzierungsprojektes humaner Magenschleimhaut nachgewiesen werden. Mit Hilfe eines Kyte & Doolittle Plots wurden drei hydrophile und Cystein-freie Peptide mit geringer Homologie zu anderen Proteinen ausgewählt (siehe Abb. 4.3.13) und die folgenden Peptid-Carrier-Konstrukte hergestellt:

- CAH2\_1-Thyreoglobulin (CAH2\_1-Thyr)
- CAH2\_2-Thyreoglobulin (CAH2\_2-Thyr)
- CAH2\_3-Thyreoglobulin (CAH2\_3-Thyr)
- N-term. MVH (MVH-CAH2\_1): LSEIKGVIVHRLEGV-SHHWGYGKHNNGPEHWHKDF
- C-term. MVH (CAH2\_1-MVH): SHHWGYGKHNNGPEHWHKDF-LSEIKGVIVHRLEGV
- N-term. MVH (MVH-CAH2\_2): LSEIKGVIVHRLEGV-GQGSEHTVDKKKYAAELHLV
- C-term. MVH (CAH2\_2-MVH): GQGSEHTVDKKKYAAELHLV-LSEIKGVIVHRLEGV
- N-term. MVH (MVH-CAH2\_3): LSEIKGVIVHRLEGV-DNWRPAQPLKNRQIKASFK
- C-term. MVH (CAH2\_3-MVH): DNWRPAQPLKNRQIKASFK-LSEIKGVIVHRLEGV

Die Peptide CAH2\_1, CAH2\_2 und CAH2\_3 und die vollsynthetischen MVH-Peptid-Konstrukte wurden durch Fmoc-Peptidsynthese hergestellt und mit anschließender RP-HPLC-Reinigung gereinigt. Die Protein-Peptid-Konstrukte sind mit ECDI an das Protein gekoppelt und durch anschließende Gel-Ausschlusschromatographie gereinigt worden.

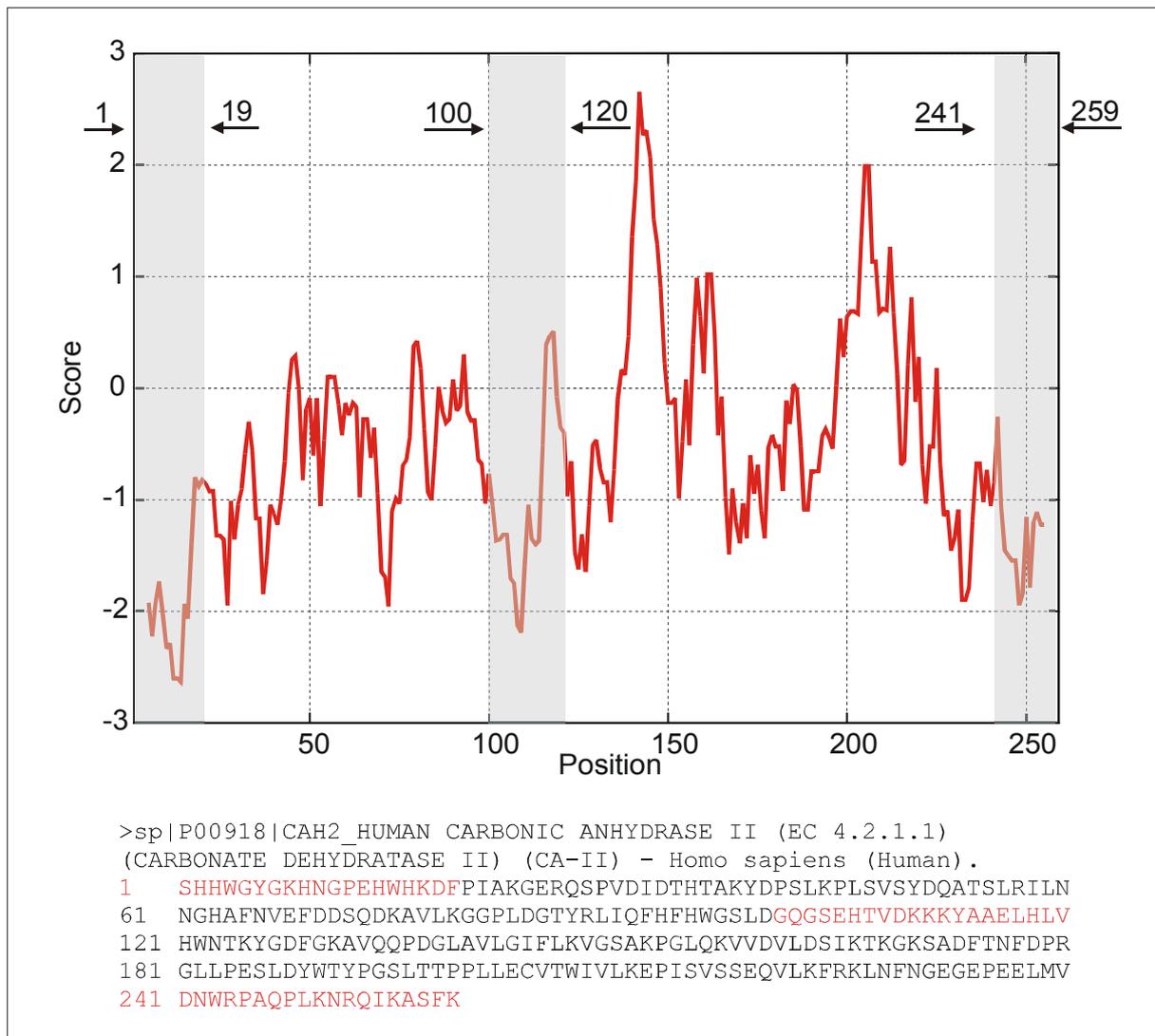


Abb. 4.3.13 Hydrophobizitätsplot menschlicher Carboanhydrase II und die zur Immunisierung ausgewählten Sequenzen. Für die Hydrophobizität der einzelnen Aminosäuren wurde der Standard-Kyte & Doolittle „scale“ mit einem Fenster von 9 Aminosäuren verwendet.

Je 100 µg der Konstrukte wurden in je zwei weibliche BALB/c Mäuse, einmal mit komplettem und dreimal mit inkomplettem Freund's Adjuvans injiziert. Der Titer der Seren wurde mit dem Streptavidin-ELISA System ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.3.14, Abb. 4.3.15 und Abb. 4.3.16 grafisch dargestellt.

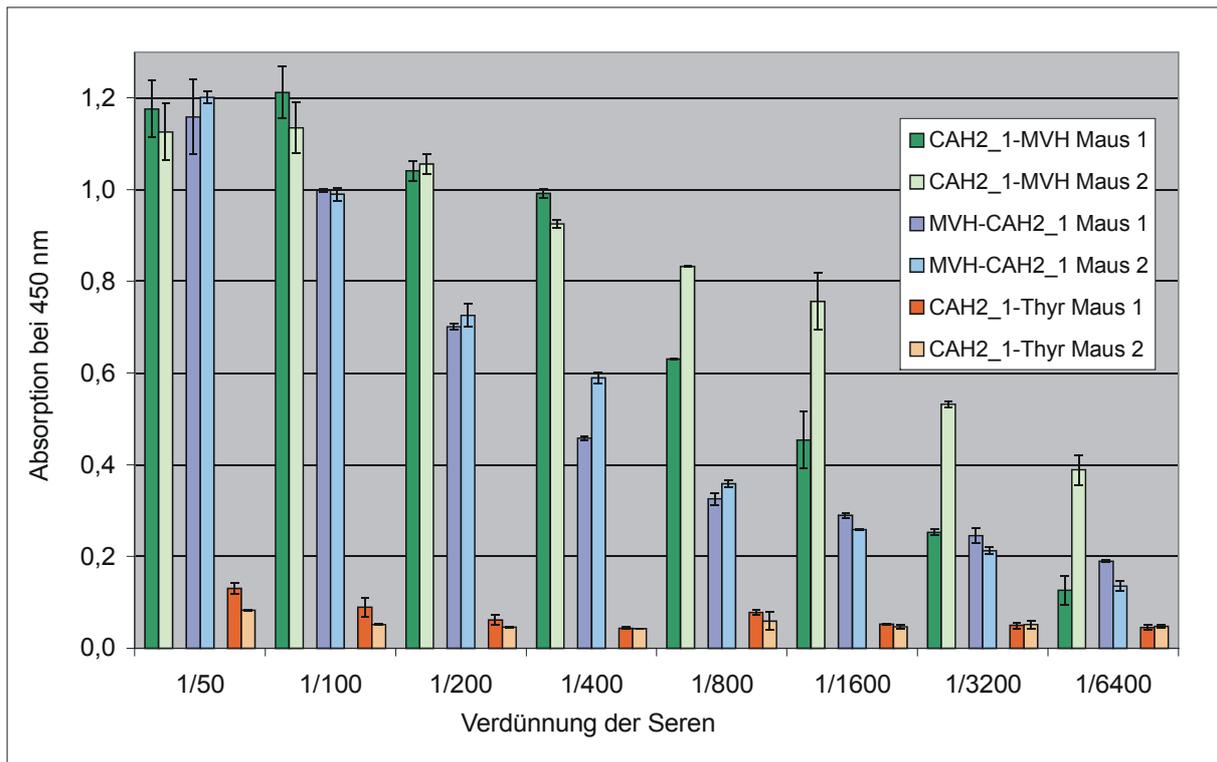


Abb. 4.3.14 Titration der Anti-CAH2\_1-induzierten Antiseren. Die Werte stellen Mittelwerte von Doppelbestimmungen dar.

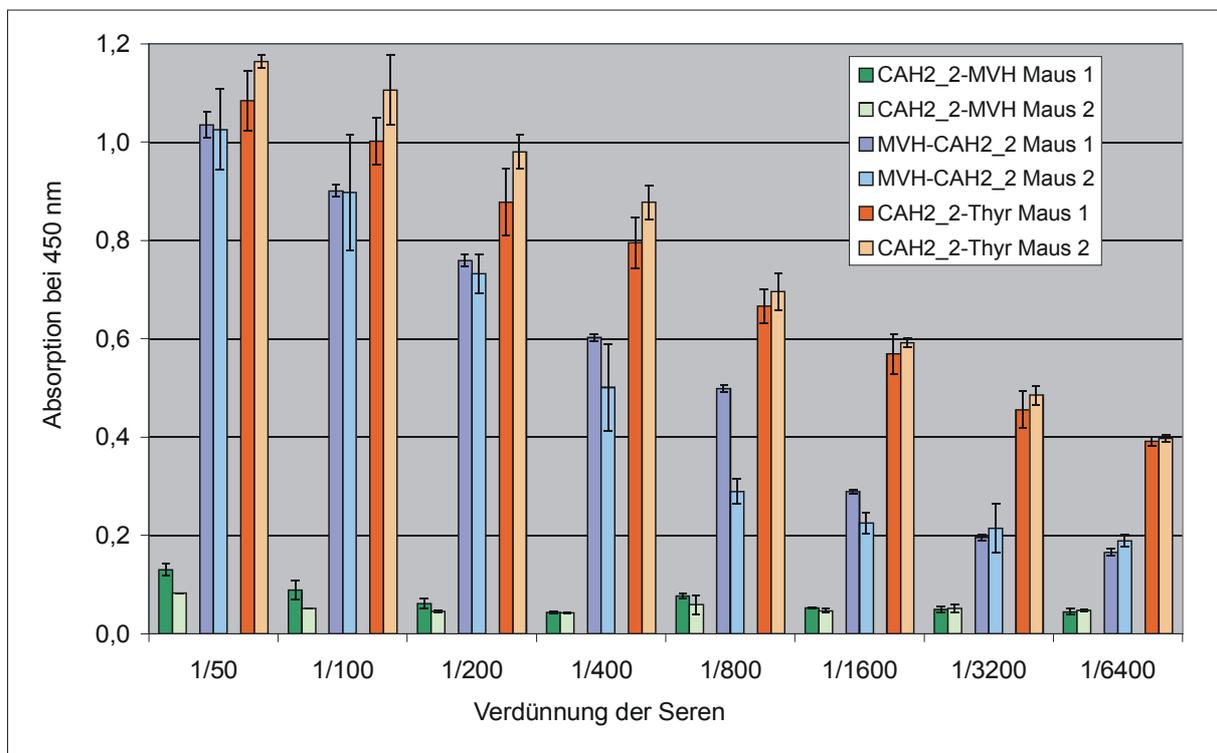


Abb. 4.3.15 Titration der Anti-CAH2\_2-induzierten Antiseren. Die Werte stellen die Mittelwerte von Doppelbestimmungen dar.

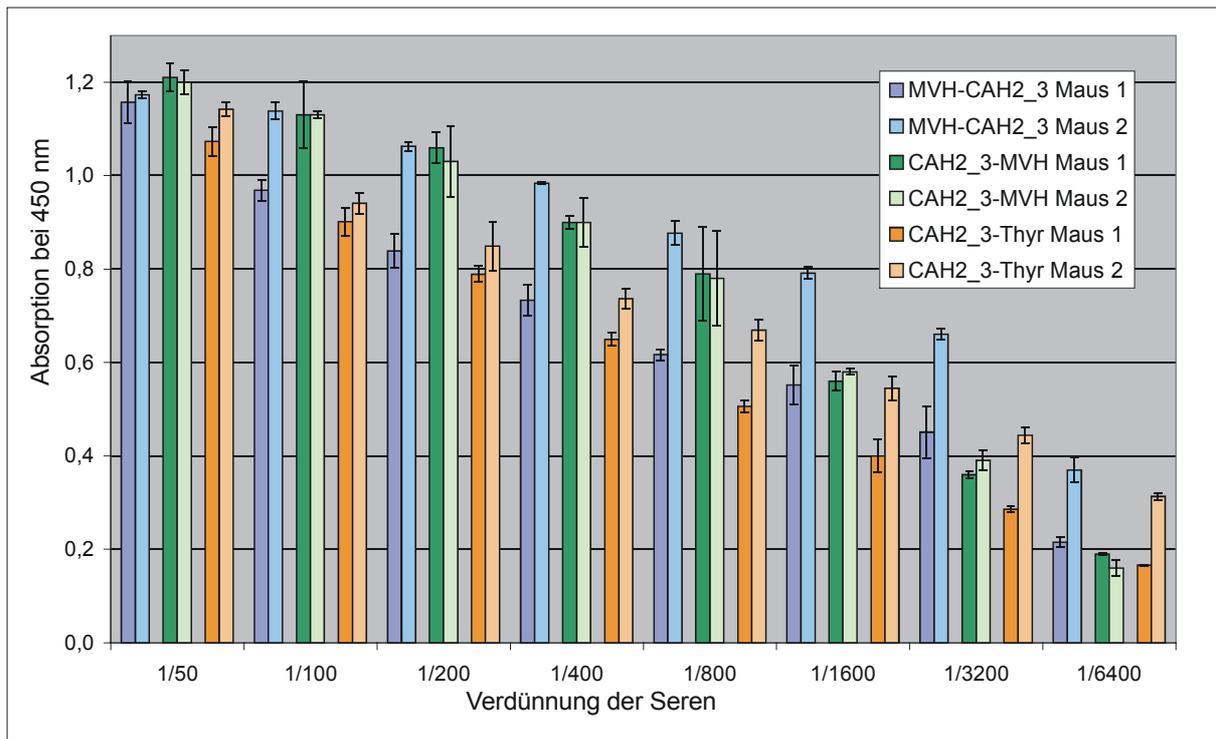


Abb. 4.3.16 Titration der Anti-CAH2\_3-induzierten Antiseren. Die Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Mit den Konstrukten CAH2\_1-MVH, MVH-CAH2\_1, MVH-CAH2\_2, CAH2\_2-Thyr und mit allen CAH2\_3-Konstrukten konnten Seren hohen Titer (Absorption bei 1/400 Verdünnung  $\geq 0,3$ ) induziert werden. Um zu prüfen, ob die erhaltenen Seren in der Lage sind, Carboanhydrase II im Western-Blot zu detektieren, wurde eine Verdünnungsreihe humaner Carboanhydrase II im 1D-SDS-Gel (4 % Sammelgel und 12 % Trenngel) aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Die Peptid-induzierten Seren wurden in einer Verdünnung von 1/500, und die sekundären Ziege-anti-Maus Antikörper in einer Verdünnung von 1/2000 eingesetzt. Es konnte festgestellt werden, dass die mit MVH-CAH2\_1, CAH2\_2-MVH, CAH2\_2-Thyr und die mit MVH-CAH2\_3 induzierten Seren nicht in der Lage waren Carboanhydrase II Mengen  $\geq 1$  pmol zu detektieren (nicht dargestellt). Dies wurde als nicht sensitiv genug erachtet. Folglich wurden keine weiteren Experimente mit diesen Seren durchgeführt. Das Ergebnis der Western-Blots mit den übrigen Seren ist in Abb. 4.3.17 dargestellt.

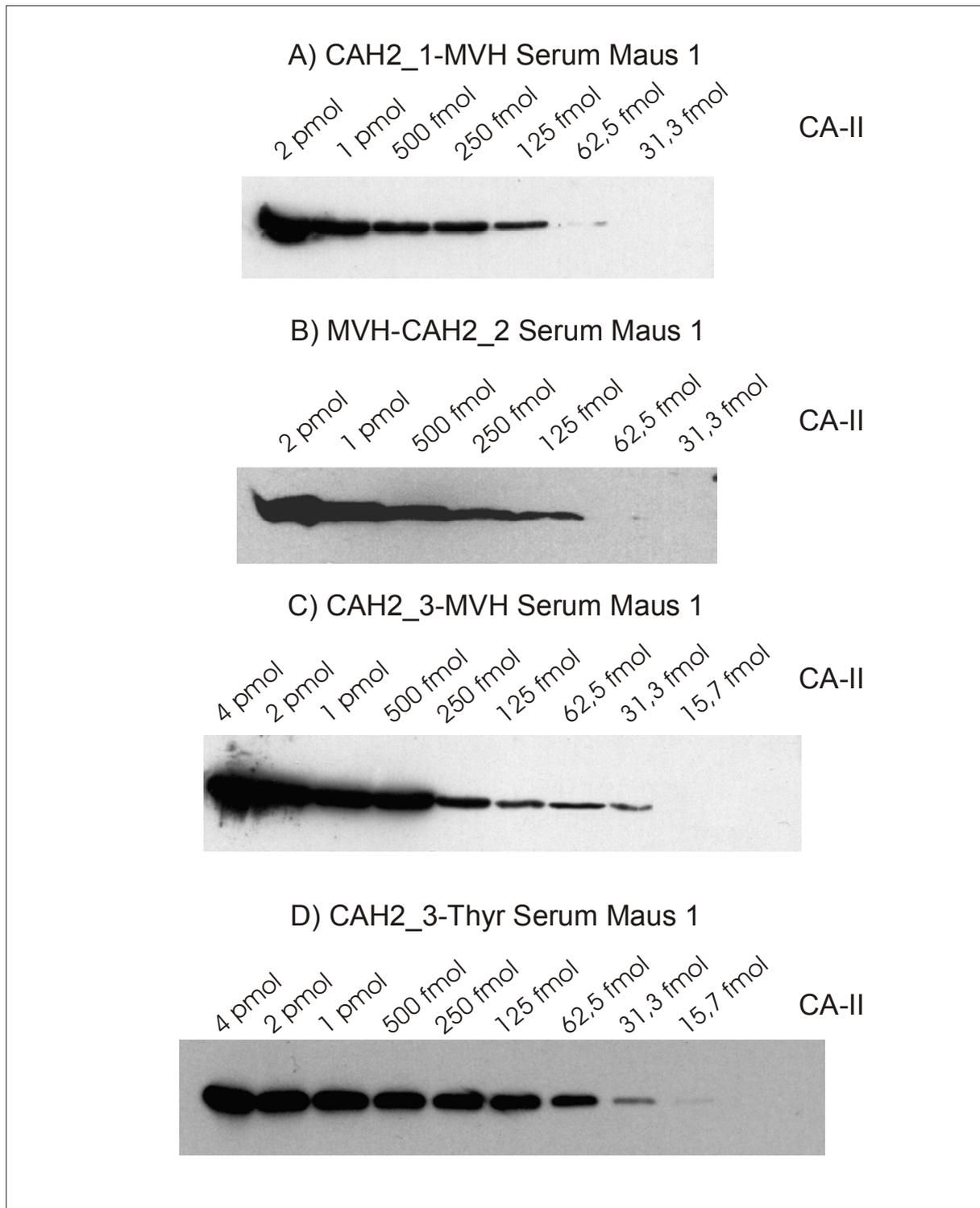


Abb. 4.3.17 Western-Blot humaner Carboanhydrase II- Detektion mit Peptid-induzierten Antikörpern.

Es wurde deutlich, dass die Peptid-induzierten Antiseren unterschiedlich sensitiv sind. Das CAH2\_1-MVH-induzierte Antiserum konnte noch 63 fmol Carboanhydrase II im 1D-Western-Blot detektieren. Das MVH-CAH2\_2-induzierte Antiserum war mit einem Detektionslimit von 125 fmol weniger empfindlich. Die beiden empfindlichsten Peptid-Antiseren waren das CAH2\_3-MVH-induzierte und das Thyreoglobulin-CAH2\_3-

induzierte, welche noch 31 fmol Carboanhydrase bzw. 16 fmol Carboanhydrase II detektieren konnten. Um zu testen, ob die erhaltenen Seren auch für 2D-Western-Blot Analysen geeignet sind, wurden die Proteine aus 100 µg humanem Magenschleimhaut-Lysat mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese (pH 3-10, 4 % Sammelgel, 12 % Trenngel) aufgetrennt und durch Semidry-Blotting auf Nitrozellulose-Membranen überführt. Die Peptid-induzierten Seren wurden 1/500 und die sekundären Ziege-anti-Maus Antikörper 1/2000 verdünnt verwendet. Während die mit dem CAH2\_3-Thyreoglobulin Konstrukt induzierten Seren erhöhte Kreuzreaktivität zeigten und eine Vielzahl von Spots detektierten (nicht abgebildet), zeigten die 2D-Western-Blots der übrigen Seren zwei spezifische Spots. Das Ergebnis des Western-Blots mit dem CAH2\_1-MVH-induzierten Antikörpern zeigt Abb. 4.3.18.

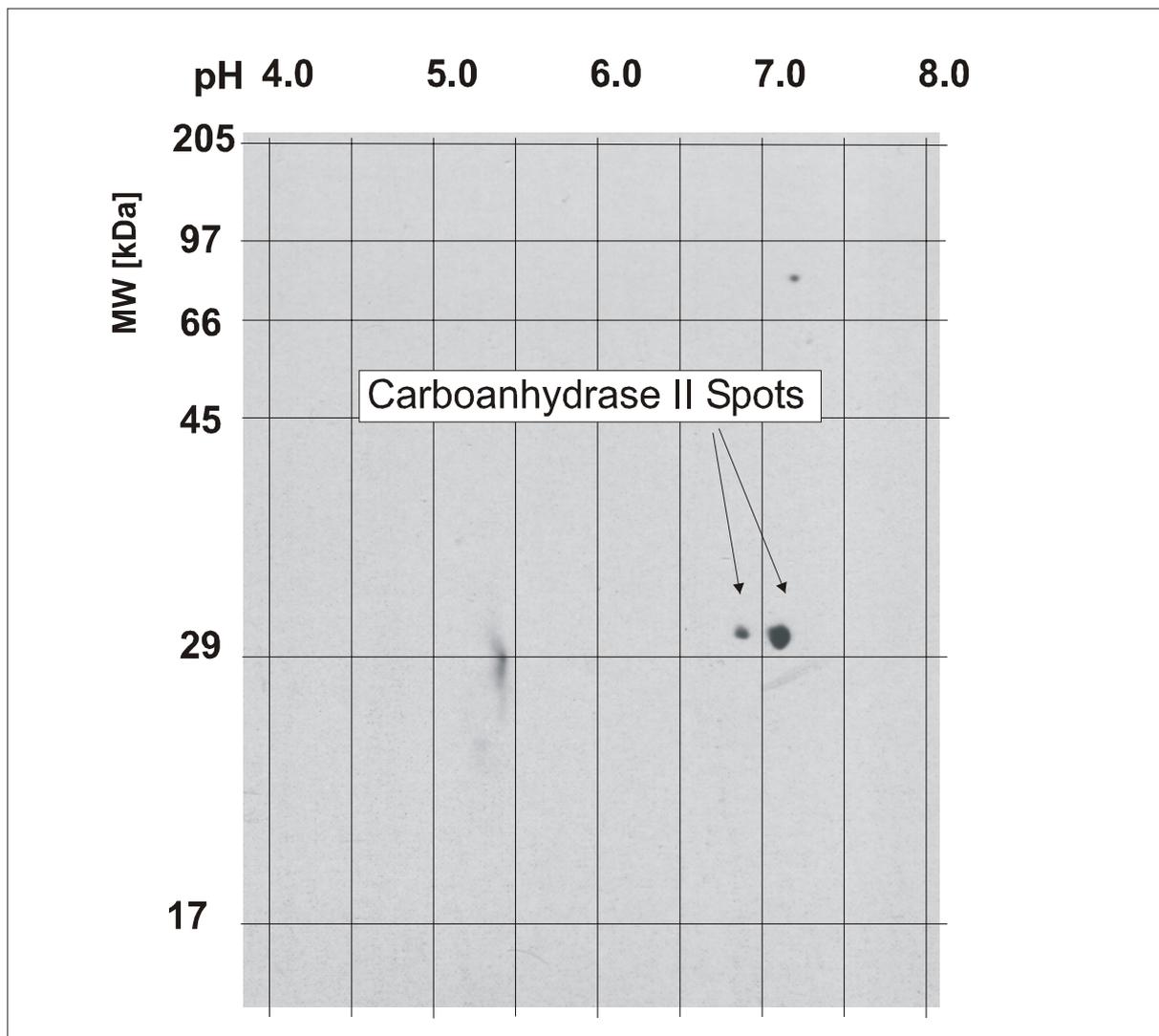


Abb. 4.3.18 Western-Blot humaner Magenschleimhaut, Detektion mit CAH2\_1-MVH induziertem Serum.

Es war zu erkennen, dass die Seren zwei Spots bei ca. 29 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 6,9 und 7,1 weitestgehend hintergrundfrei detektierten. Die theoretischen Werte von Carboanhydrase II sind ein Molekulargewicht von 29.115 Da und ein isoelektrischer Punkt von 6,86. Zum Nachweis der Richtigkeit der Signale wurden die entsprechenden Spots aus dem Gel exzidiert und im Gel tryptisch gespalten. Die erhaltenen Peptide wurden dann mit Acetonitril eluiert, entsalzt und das erhaltene Peptid-Gemisch mittels nano-ESI-MS/MS analysiert. Hierzu wurde das Massenspektrum des Peptidgemisches aufgenommen und die doppelt geladenen Ionen fragmentiert. Um die Peptidsequenz der Peptide zu ermitteln, wurden die Tandem Massenspektren manuell ausgewertet. Die Datenbanksuche wurde mit dem am EMBL verfügbaren Programm PeptideSearch und dessen Default-Einstellungen durchgeführt. Das Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse des kleineren Spots bei einem isoelektrischen Punkt von 6,9 ist in Abb. 4.3.19 dargestellt. Die Analyse des größeren Spots ergab ein analoges Massenspektrum. In beiden Fällen konnte humane Carboanhydrase II eindeutig nachgewiesen werden. Aufgrund welcher Modifikation Carboanhydrase zwei Spots im 2D-Western-Blot zeigte, konnte anhand der Spektren nicht eindeutig geklärt werden.

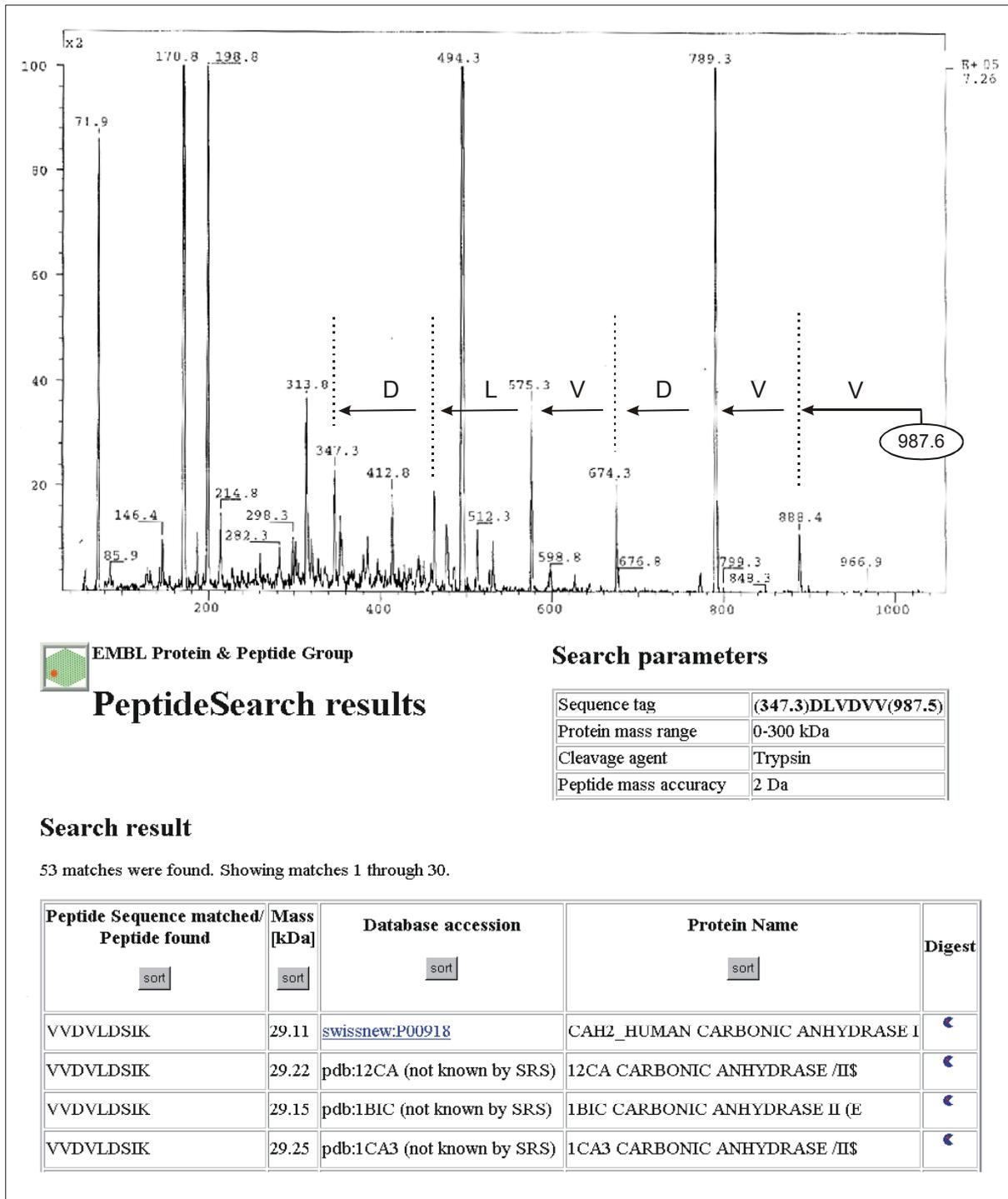


Abb. 4.3.19 Identifikation der durch CAH-Peptid-Antiseren detektierten Proteine mittels nano-ESI-MS/MS.

#### 4.3.2 Produktion von Peptid-induzierten Antikörpern gegen IGFBP2

In den folgenden Experimenten wurden Peptid-induzierte Antikörper gegen „insulin-like growth factor binding“ Protein 2 (IGFBP2) generiert. „Insulin-like growth factor binding“ Proteine (IGFBPs) binden an beide Formen des „insulin-like growth factor“ (IGFI und IGFI), verlängern deren Halbwertszeit und scheinen auf diese Art und Weise die Interaktion zwischen IGF und deren Rezeptoren zu modulieren. Es sind mindestens sechs verschiedene IGFBP Varianten bekannt. Im Rahmen einer Studie, die sich mit der Produktion und Charakterisierung IGFBP2 überexprimierender transgener Mäuse beschäftigte, sollte zur Messung der IGFBP2-Expression in unterschiedlichen Organen, Peptid-induzierte Antikörper gegen murines IGFBP2 generiert werden. Zusätzlich sollte mit der Immunisierung von anderen Spezies überprüft werden, ob mit der vorgestellten Methodik auch Peptid-induzierte Antikörper gegen Proteine aus der Maus zugänglich sind. Aus diesem Grunde wurden Ratten statt Mäuse immunisiert. Unter Berücksichtigung des Kyte & Doolittle Plots (in Abb. 4.3.20 dargestellt) und unter Berücksichtigung der Homologie zu anderen Proteinen wurden die folgenden beiden hydrophilen und Cystein-freien Peptide aus dem mittleren Bereich des Proteins zur Immunisierung ausgewählt:

- IGFBP2\_1 (AS 117-132: KRRVGTTPQQVADSDD)
- IGFBP2\_3 (AS 154-169: GSSAGRKPLKSGMKEL)

Die Peptide wurden per Fmoc-Peptidsynthese synthetisiert und HPLC gereinigt. Anschließend wurden die Peptide mit ECDI N-terminal an bovines Thyreoglobulin gekoppelt und überschüssiges Peptid bzw. Crosslinker per Gel-Ausschlusschromatographie (Sephadex-G-25-Säule) abgetrennt.

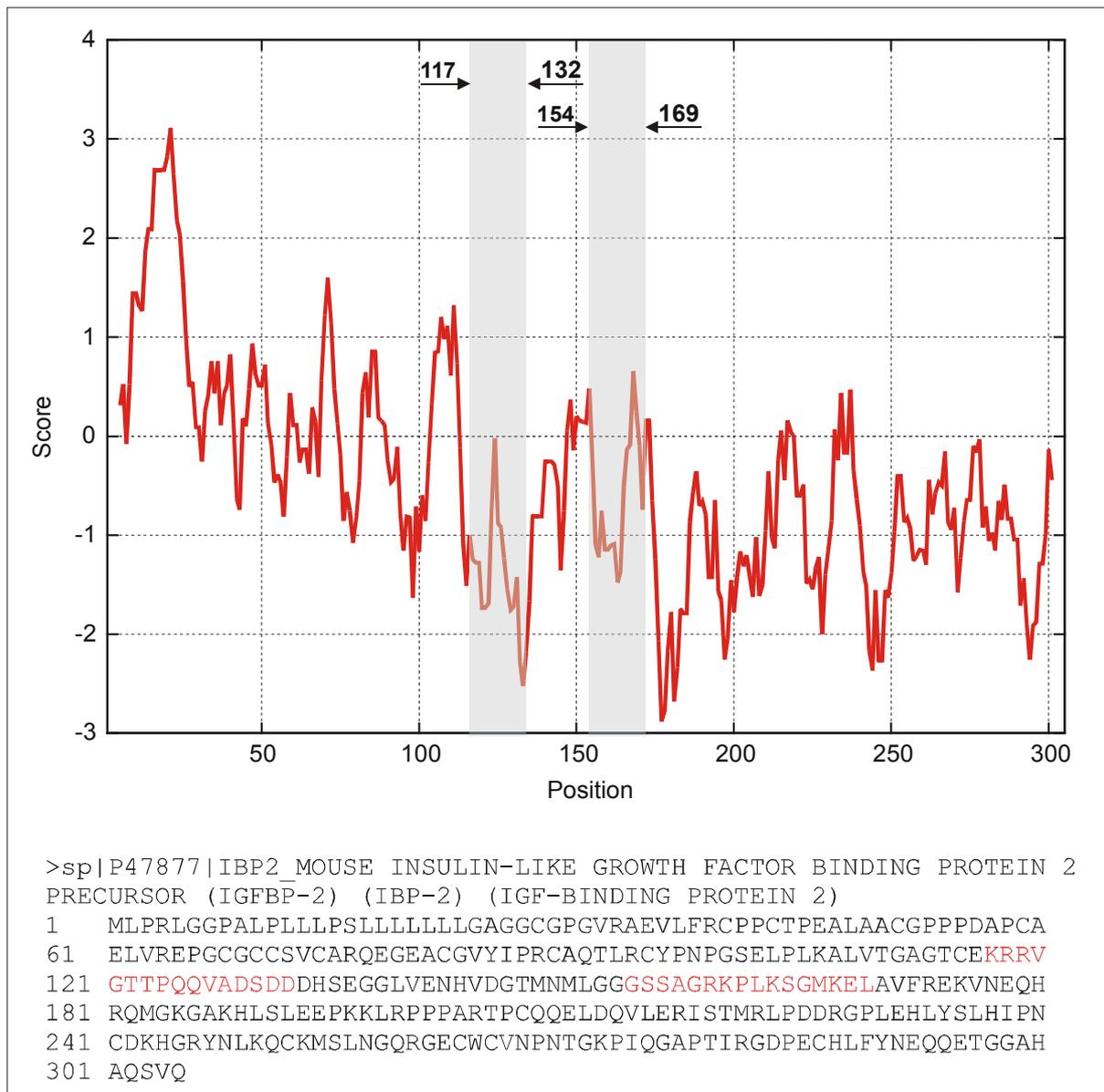


Abb. 4.3.20 Hydrophobizitätsplot von Mäuse-IGFBP2 und die zur Immunisierung ausgewählte Sequenz. Der Hydrophobizitätsplot wurde unter Verwendung des Kyte & Doolittle „scale“ für die einzelnen Aminosäuren mit einem Fenster von 9 Aminosäuren erstellt.

Mit diesen Konstrukten wurden dann je zwei Ratten immunisiert. Nachdem festgestellt wurde, dass mit dem IGFBP2\_1-Konstrukt Immunantworten in den Ratten induziert werden konnten, wurde zur Gewinnung größerer Mengen an Serum zusätzlich ein Kaninchen immunisiert. Die Seren wurden mit dem in Abschnitt 4.1.3 evaluierten Streptavidin-ELISA-System titriert. Die sekundären Maus-anti-Ratte-Antikörper wurden hierbei in einer Verdünnung von 1/5000 und die sekundären Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper 1/2000 verdünnt eingesetzt. Die Reaktion wurde nach 10 min gestoppt. Die Titer der Tiere nach vier Injektionen sind in Abb. 4.3.21 dargestellt.

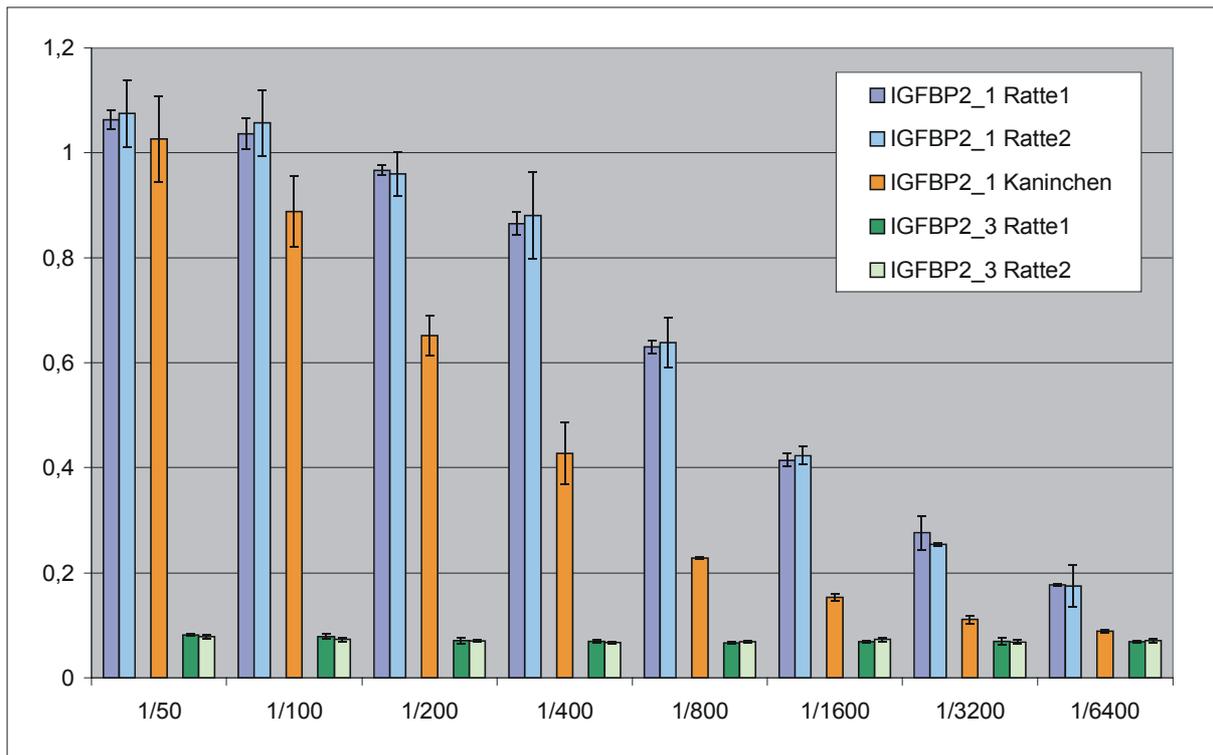


Abb. 4.3.21 ELISA der Anti-IGFBP2- induzierten Antikörper.

Es konnte festgestellt werden, dass ausschließlich die Immunisierung mit IGFBP2\_1 Konstrukt Rattenseren ausreichend hohen Titer ergaben (Absorption von  $\geq 0,3$  bei 1/400 Verdünnung des Serums). Es konnte außerdem festgestellt werden, dass dieses Konstrukt auch im Kaninchen eine deutliche Immunantwort induzierte. Die erhaltenen IGFBP2\_1 Seren wurden anschließend auf ihre Eignung im 2D-Western-Blot getestet. Da die Antikörper zur Detektion von IGFBP2 in transgenen Mäusen verwendet werden sollten, wurden 100  $\mu\text{g}$  Mäuse-Pankreas-Lysat einer transgenen und einer Wildtyp (WT) Maus mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Gele wurden mit der im Methodenteil (Abschnitt 3.10.2.) beschriebenen Silberfärbung nach Blum gefärbt. Das gefärbte Gel des Pankreas-Lysates der Wildtyp Maus ist in Abb. 4.3.22 und das entsprechende Gel der transgenen Maus in Abb. 4.3.23 gezeigt.

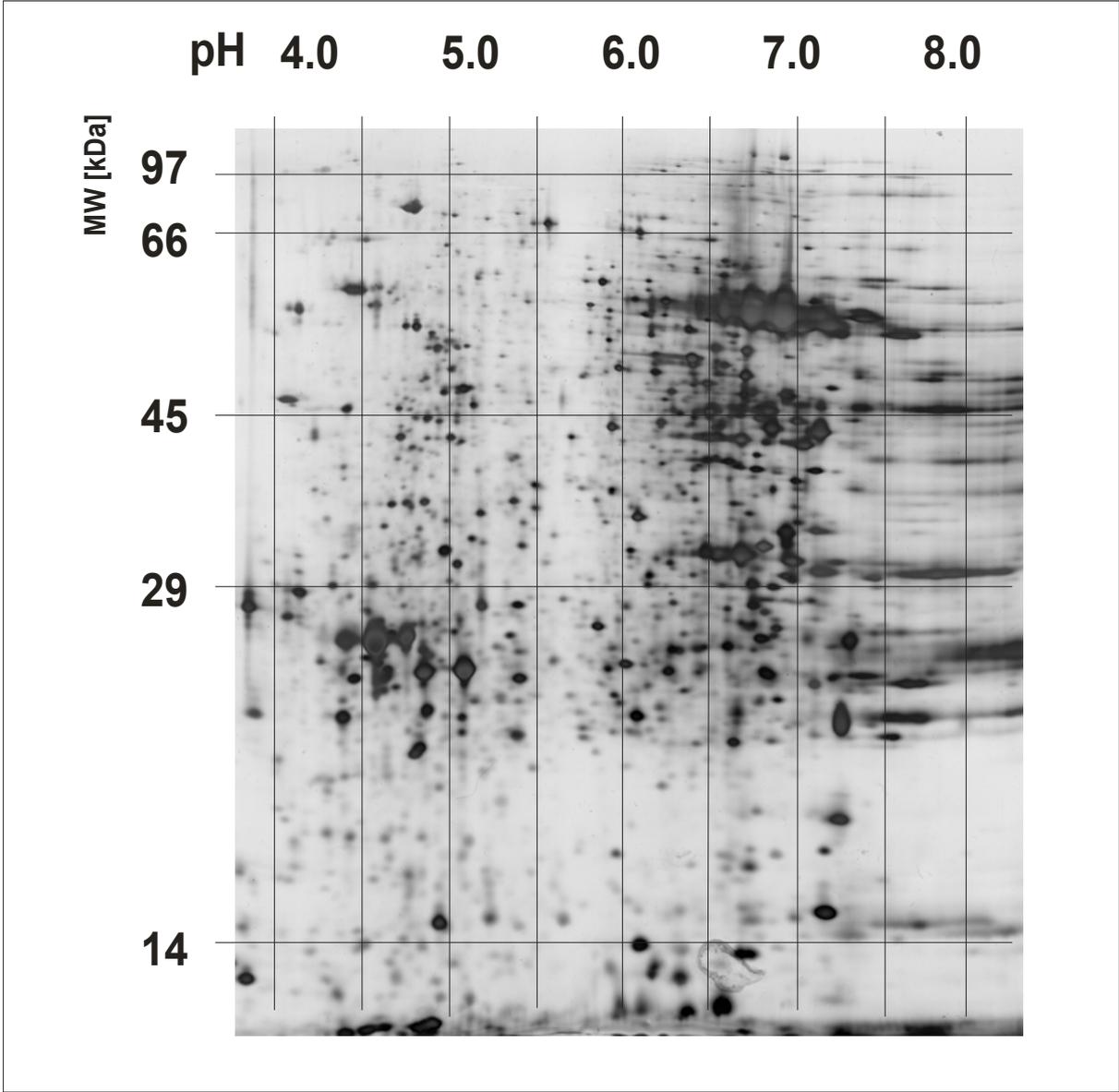


Abb. 4.3.22 Silberfärbung eines 2D-Geles aus 100 µg Mäuse-Pankreas-Lysat einer WT-Maus.

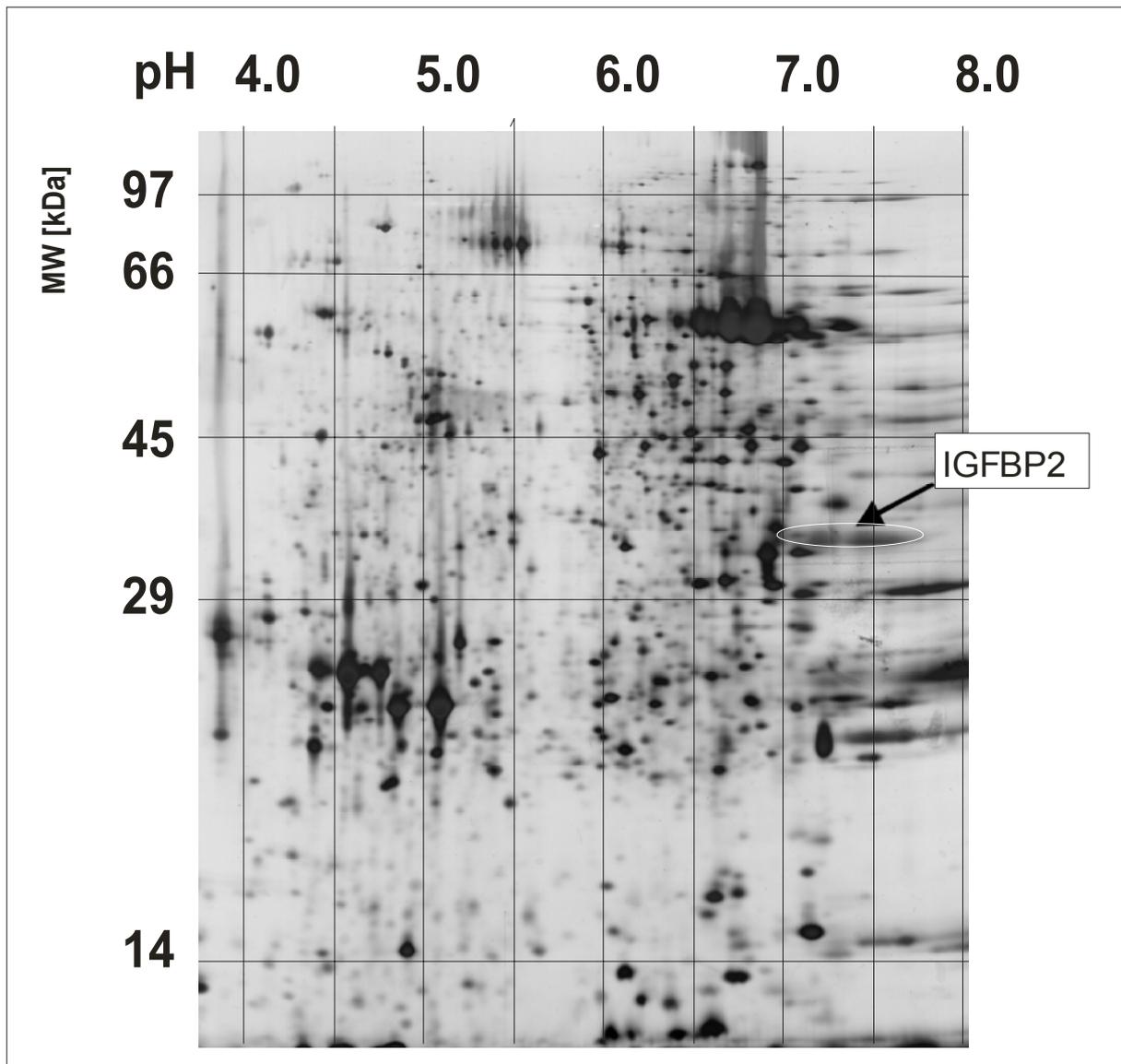


Abb. 4.3.23 Silberfärbung eines 2D-Geles aus 100  $\mu$ g Mäuse-Pankreas-Lysat einer IGFBP2-überexprimierenden transgenen Maus (CMV als Promoter). Die als IGFBP2 markierten Spots wurden mittels 2D-Western-Blot gefunden (siehe Abb. 4.3.24).

Parallel dazu wurden die Proteine der Zell-Lysate durch 2D-Semidry-Western-Blotting auf Nitrozellulose überführt und mit den IGFBP2\_1-induzierten Rattenserum eine Immunodetektion durchgeführt. Die IGFBP2\_1-induzierten Rattenserum wurden in einer Verdünnung von 1/1000 und die sekundären Mäuse anti-Ratte-HRP Antikörper in einer Verdünnung von 1/5000 eingesetzt. Die Detektion erfolgte per Lumineszenz Substrat. Die Exposition des Filmes erfolgte für 20 s. Das Ergebnis des Western-Blots mit einem der Seren ist in Abb. 4.3.24 abgebildet, das Serum des anderen Tieres zeigte ein analoges Bild.

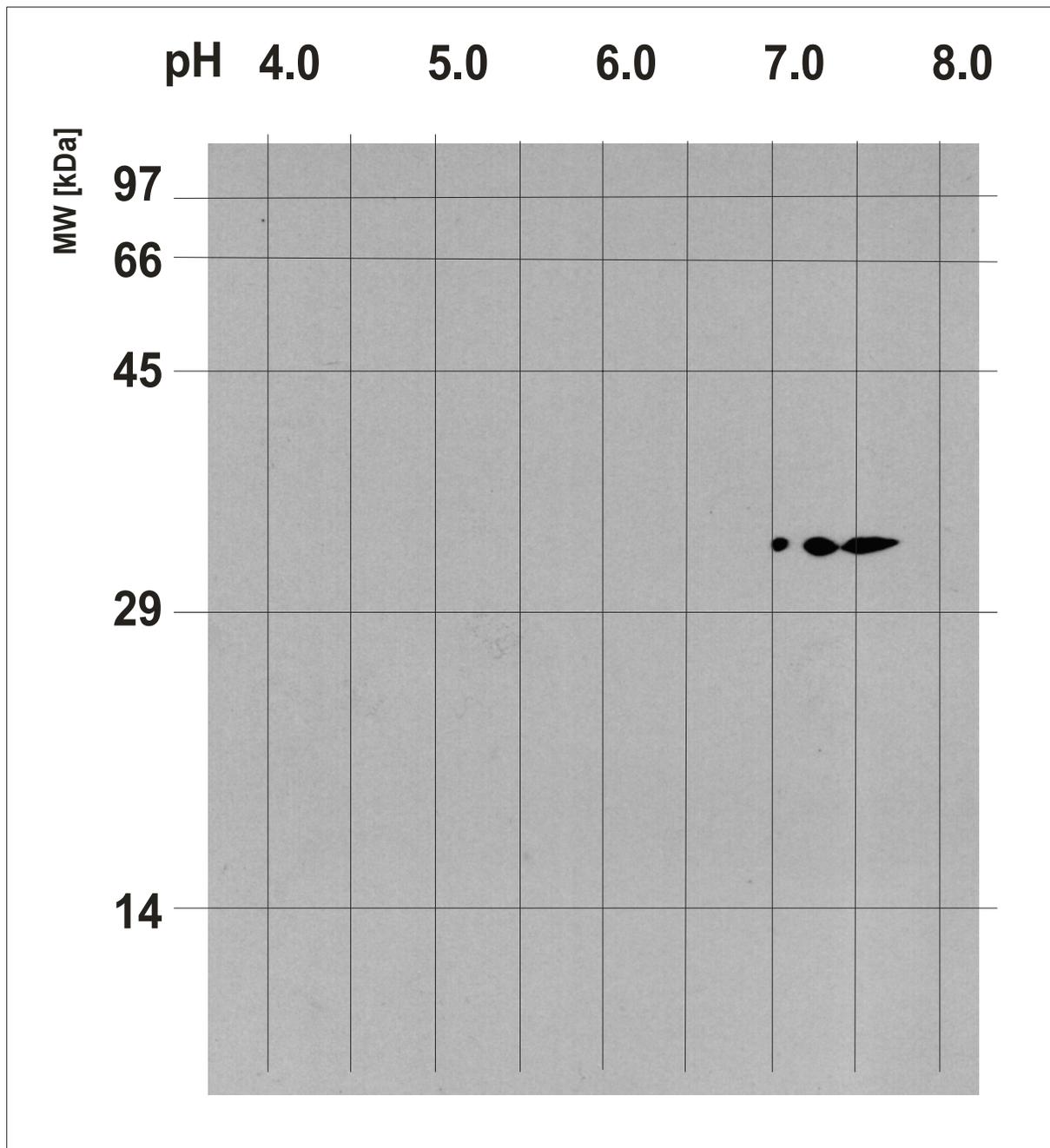


Abb. 4.3.24 Western-Blot Mäuse Pankreas - Detektion mit Ratten Anti-IGFBP2 Serum.

Es ist zu erkennen, dass drei Spots bei einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa und isoelektrischen Punkten zwischen 6,7 und 7,5 hintergrundfrei detektiert werden konnten. Die theoretischen Werte sind 32 kDa für das Molekulargewicht und 7,5 für den isoelektrischen Punkt. Der Western-Blot mit Wildtyp-Mäuse-Pankreas zeigte kein Signal. Zur Überprüfung der Identität der Signale wurden die entsprechenden Spots aus dem Gel exzidiert, im Gel tryptisch gespalten, die erhaltenen Peptide mit Acetonitril eluiert, entsalzt und das erhaltene Peptid-Gemisch mittels nano-ESI-MS/MS analysiert (siehe Methodenteil Abschnitt 3.12). Die Tandem-Massenspektren wurden manuell ausgewertet und die Datenbanksuche mit dem am

EMBL verfügbaren Programm PeptideSearch durchgeführt. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse und der zugehörigen Datenbanksuche sind in Abb. 4.3.25 zu sehen.

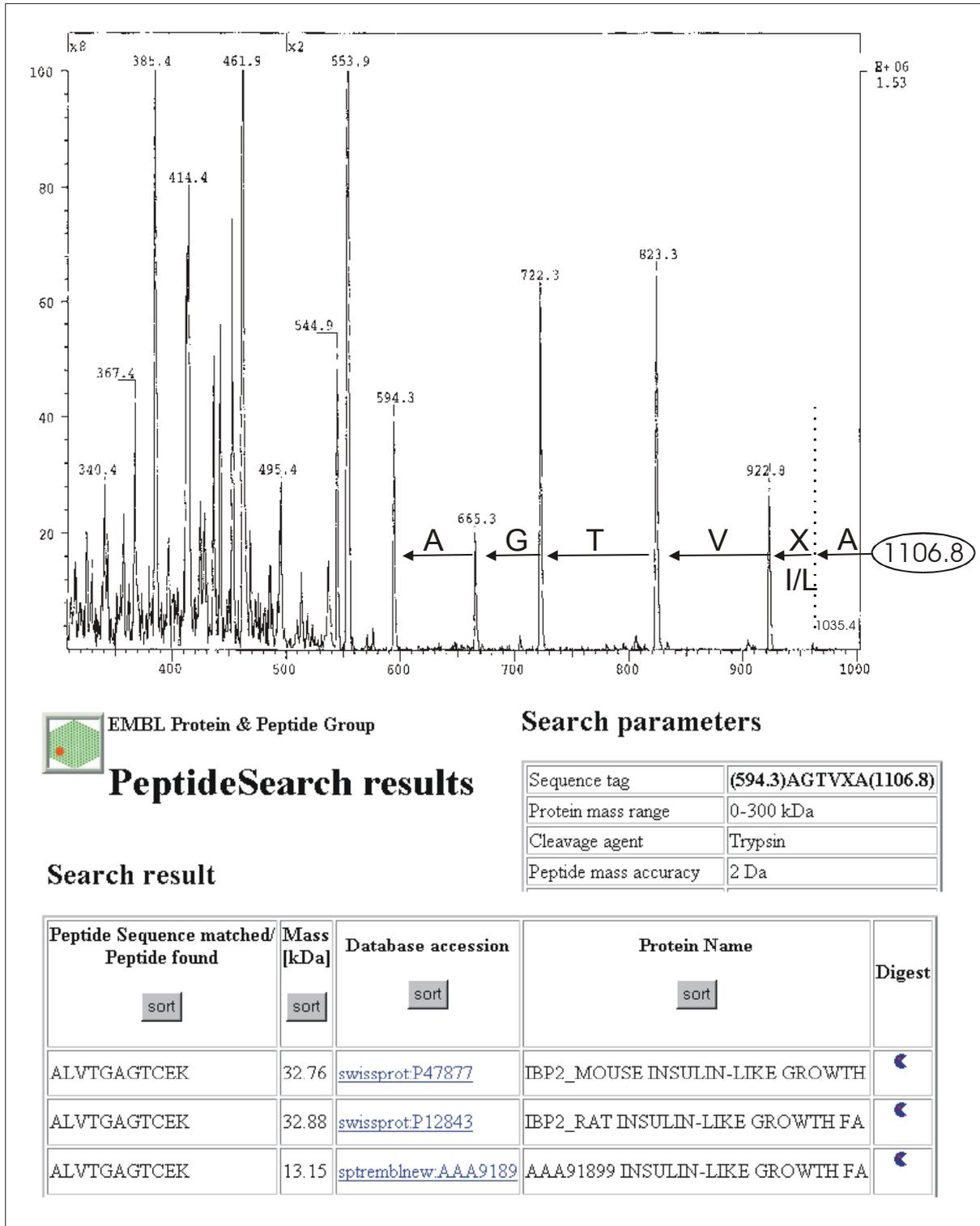


Abb. 4.3.25 Identifikation der durch IGFBP2\_1 Antiseren detektierten Spots.

Die Proteinspots konnten eindeutig als IGFBP2 identifiziert werden. In weiteren Versuchen wurde das Kaninchen-Serum von einem Kooperationspartner zu immunhistochemischen Untersuchungen verwendet. Die Antikörper konnten das IGFBP2 in den Inselzellen des Pankreas der transgenen Tiere lokalisieren [71]. In Abb. 4.3.26 sind die Hematoxylin-Eosin-Färbungen (A und C), sowie die immunhistochemischen Färbungen (B und D) von Pankreas-Zellen eines der IGFBP2-trangenen Tiere (C und D), sowie eines WT-Kontroll-Tieres (A und B) zu sehen. Für die immunhistochemischen Färbungen wurde das IGFBP2\_1-induzierte Kaninchen-Antiserum und das Porcine-anti-Kaninchen-HRP 1/100 verdünnt und mit TMB als Substrat eingesetzt.

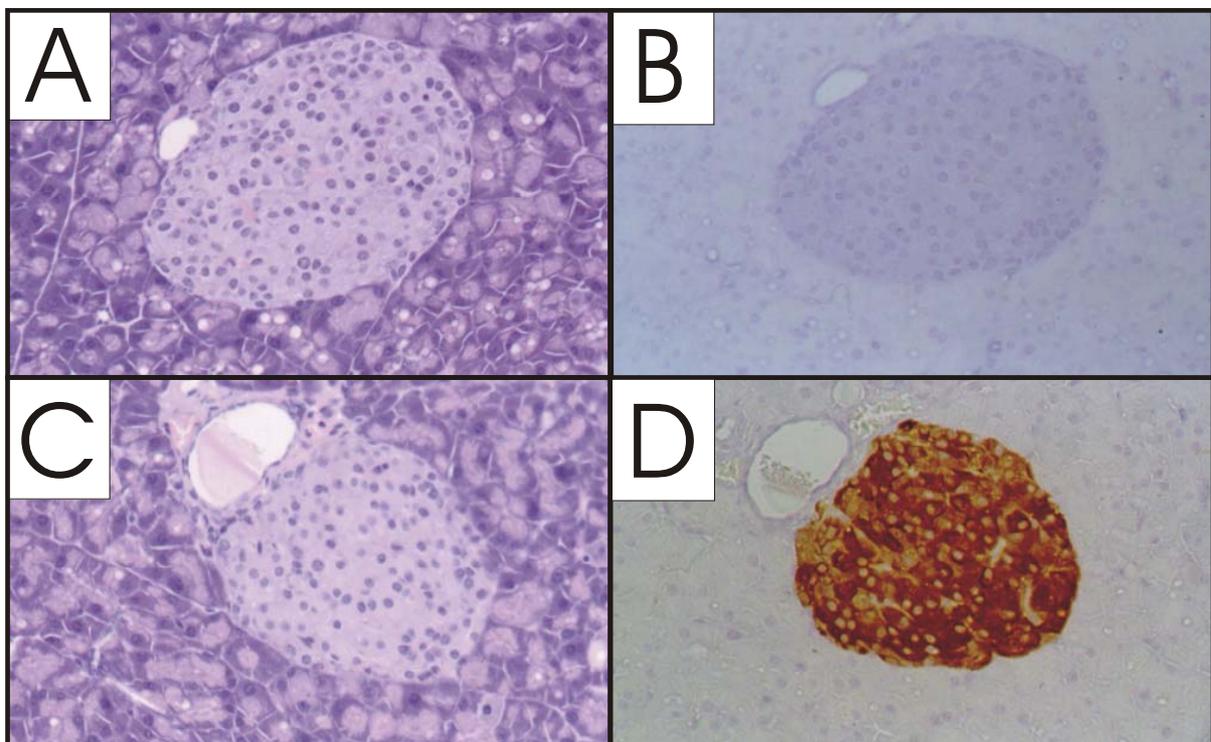


Abb. 4.3.26 Immunhistochemische Färbung des IGFBP2-Transgens in Mäuse-Pankreas [71].

#### 4.4 Ermittlung der Epitope Peptid-induzierter Antikörper

Um die Epitope der im Rahmen dieser Arbeit produzierten Peptid-induzierten Antikörper möglichst exakt zu ermitteln, wurden Peptid-Arrays verwendet. Zur Herstellung der Arrays wurden maximal 96 unterschiedliche Peptide mittels Spot-Synthese auf Zellulosemembranen synthetisiert. Für jedes zu analysierende Peptid-induzierte Antiserum wurde eine Membran mit vom N-Terminus sowie vom C-Terminus sukzessiv verkürzten Peptid-Antigenen hergestellt. Zusätzlich wurde jede Position des Peptid-Antigens durch Alanin (einfachste chirale Aminosäure ohne Ladung an der Seitenkette) substituiert. Mit diesen Membranen wurde ein Immunoassay durchgeführt und getestet, an welchen der verkürzten bzw. modifizierten Peptide die Antikörper binden. Hierfür wurden in allen Fällen 1/1000 Verdünnungen der Seren verwendet. Die sekundären Ziege-anti-Maus-HRP-Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1/2000 eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit einem Lumineszenz-Substrat in Kombination mit Röntgenfilmen. Die erhaltenen Filme wurden mit einem Durchlichtscanner digitalisiert und die Signale über ihre Gesamtfläche mit einer Bildanalyse-Software quantifiziert. Als partieller Bindungsverlust wurden Signale interpretiert, die weniger als 30 % des Signals des unsubstituierten Peptides voller Länge hatten. Dieses recht stringente Kriterium berücksichtigt die Tatsache, dass die Effizienz der Fmoc-Peptidsynthese in Abhängigkeit von der Sequenz des Peptides schwanken kann.

##### 4.4.1 Ermittlung der Epitope der HIF348-induzierten Antikörper

Der im Abschnitt zuvor beschriebene Membran-basierte Immunoassay wurde mit den HIF348-Thyreoglobulin-induzierten sowie mit den MVH-HIF348-induzierten Antiseren durchgeführt. Das Ergebnis des Immunoassays mit MVH-HIF348-induziertem Antiserum aus Abschnitt 4.3.1.1, sowie die Anordnung der Peptide auf der Membran sind in Abb. 4.4.1 dargestellt.

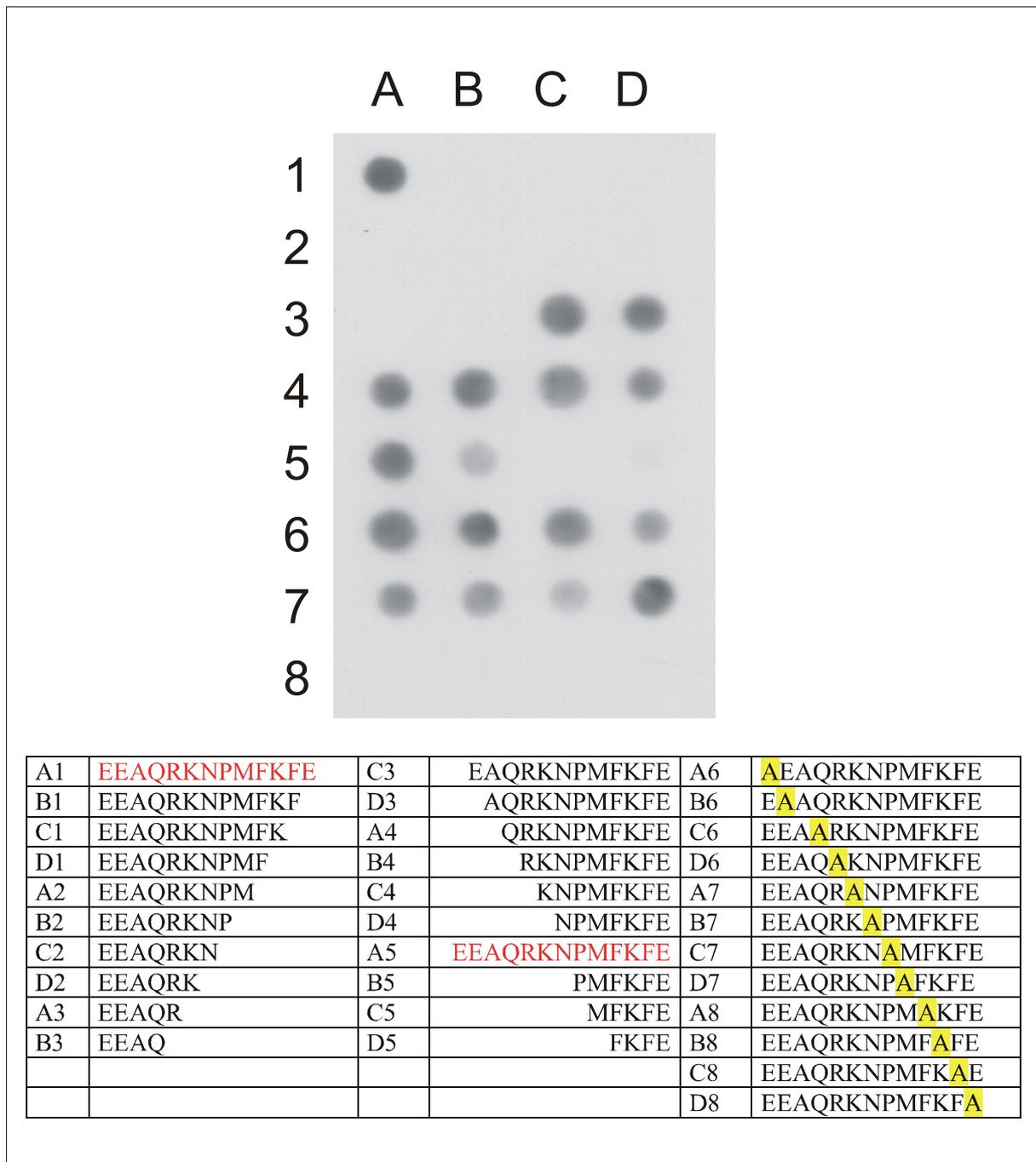


Abb. 4.4.1 Ermittlung des Epitops der MVH-HIF348-induzierten Antiseren. Die rot geschriebenen Sequenzen entsprechen dem unmodifizierten HIF348 Peptid-Antigen. Die Position der Ala-Substitution ist jeweils gelb markiert.

Das Serum des zweiten mit MVH-HIF348 immunisierten Tieres ergab ein analoges Bild. Die Quantifizierung der Signale zeigt Abb. 4.4.2.

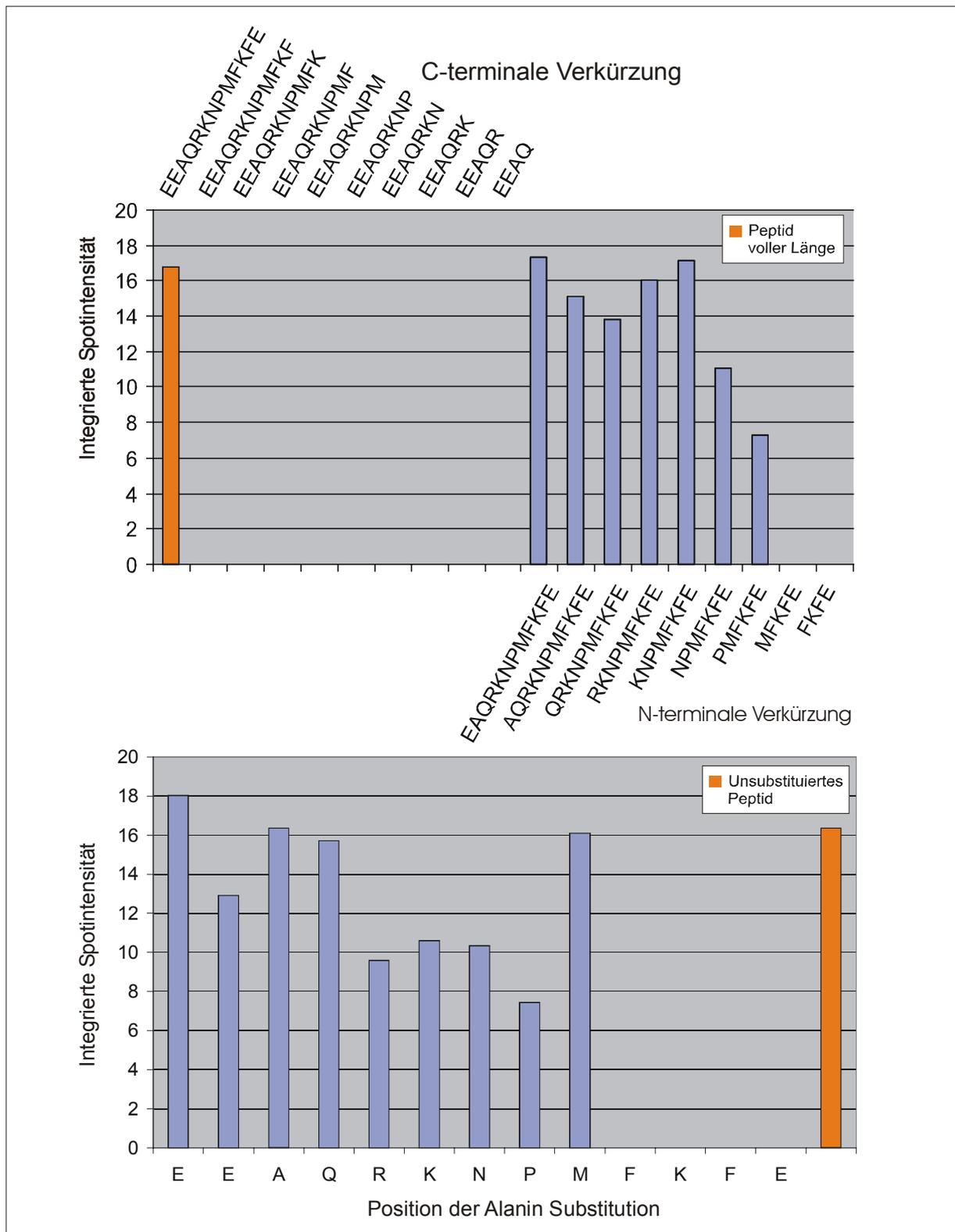


Abb. 4.4.2 Ergebnis der quantitativen Auswertung des Epitop-Mappings der MVH-HIF348-induzierten Antiseren. Die Spots wurden über ihre Gesamtfläche quantifiziert.

Es ist zu erkennen, dass die MVH-HIF348-induzierten Antikörper am C-Terminus des Peptides EEAQRKN**PMFKFE** binden (rot markiert). Die Substitution der gelb markierten C-terminalen Teilsequenz durch Alanin, führt zum totalen Bindungsverlust der Antikörper.

Den HIF348-Thyreoglobulin-induzierten Antikörpern konnte im Gegensatz dazu kein diskretes sequentielles Epitop zugeordnet werden. Das entsprechende Ergebnis ist, als Beispiel für Peptid-induzierte Antikörper denen kein lineares Epitop zugeordnet werden kann, in Abb. 4.4.3 dargestellt.

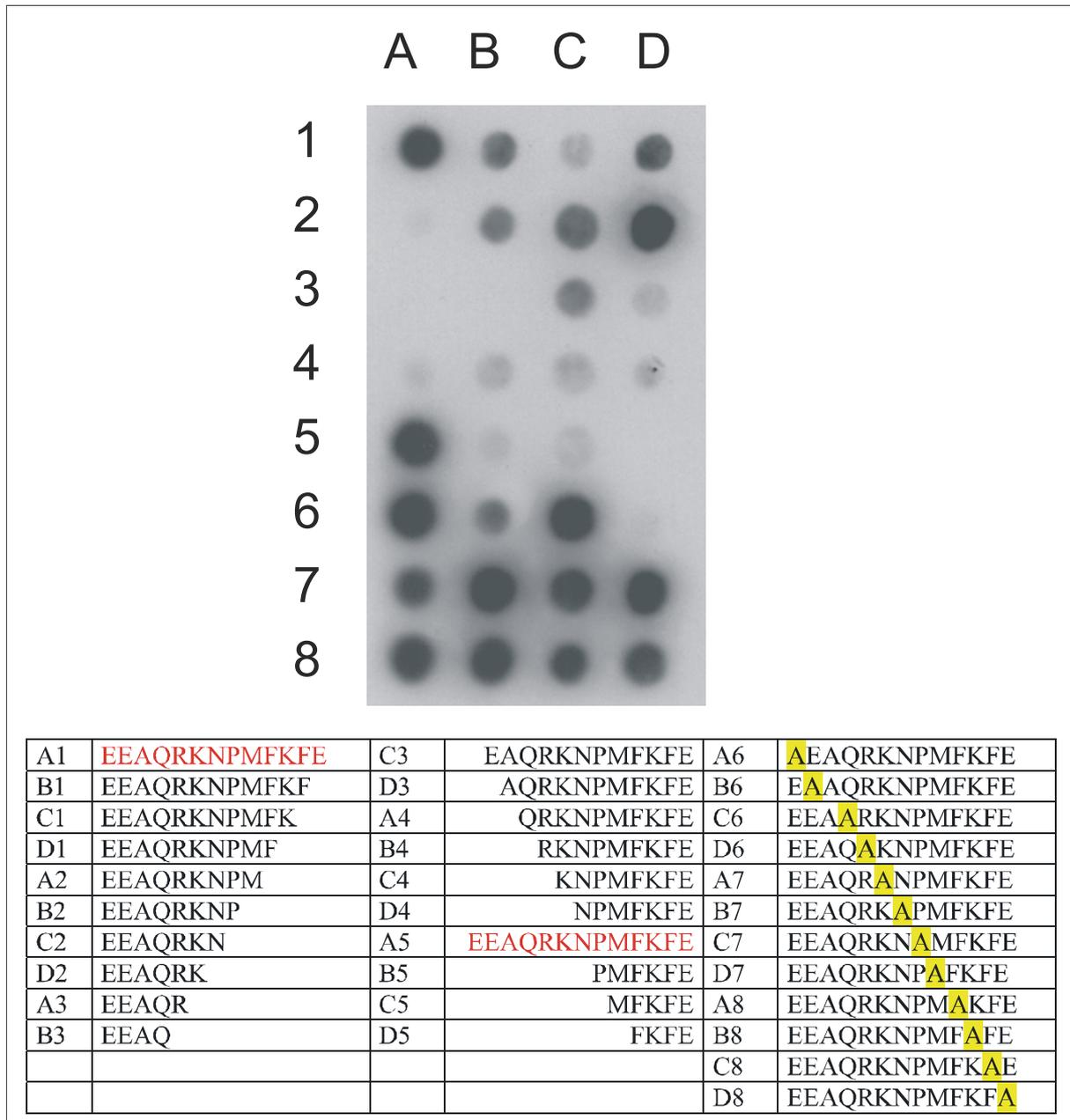


Abb. 4.4.3 Epitopmapping der HIF348-Thyr-induzierten Antiseren. Die rot geschriebenen Sequenzen entsprechen dem unmodifizierten HIF348 Peptid-Antigen. Die Position der Ala-Substitution ist jeweils gelb markiert.

Die Quantifizierung der Signale zeigt Abb. 4.4.4.

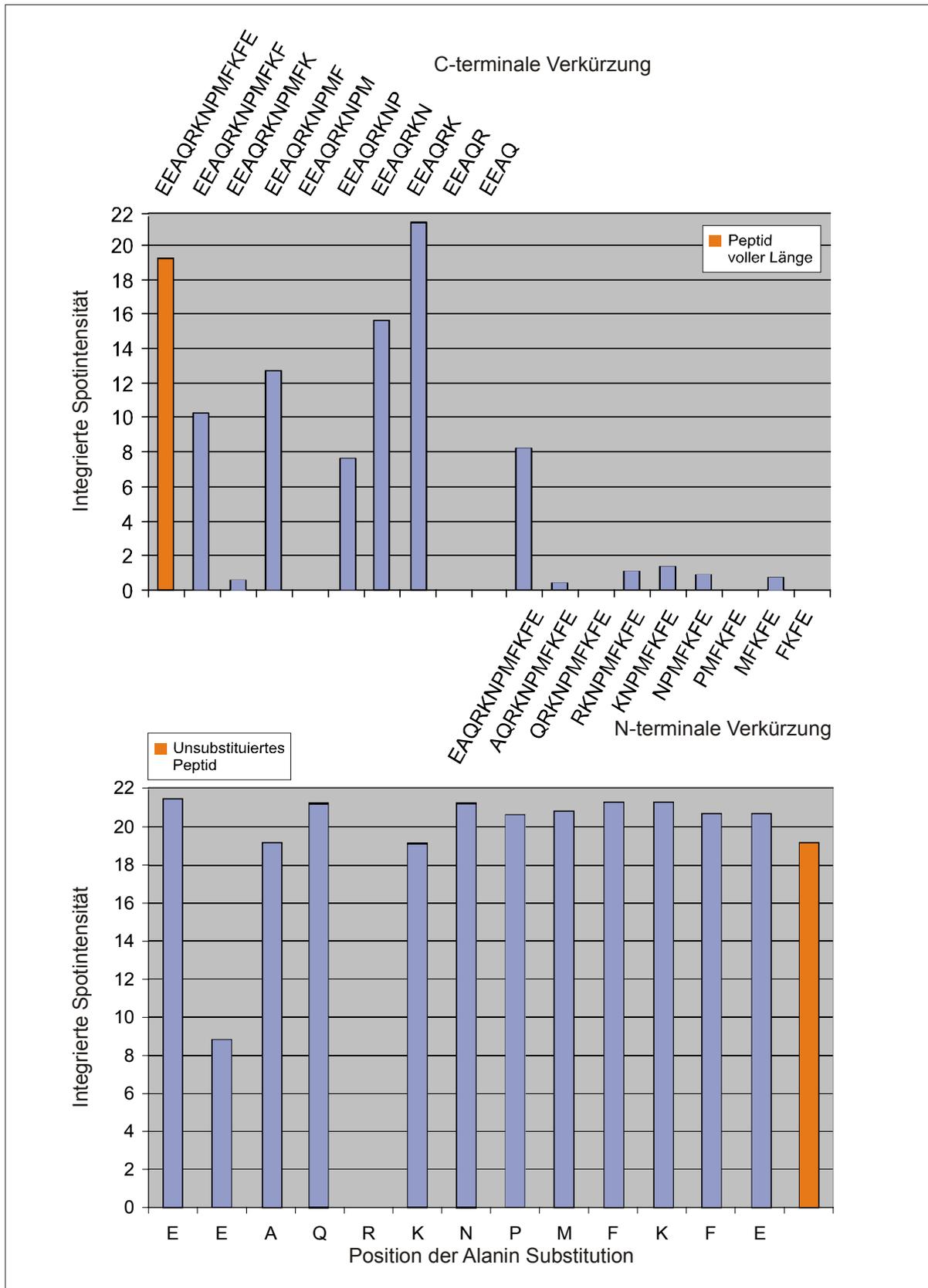


Abb. 4.4.4 Ergebnis der quantitativen Auswertung des Epitop-Mappings der HIF348-Thyr-induzierten Antiseren. Die Spots wurden über ihre Gesamtfläche quantifiziert.

Es wurde beobachtet, dass die HIF348-Thyr-induzierten Antikörper nicht an ein diskretes lineares Epitop binden. So binden sie zwar stark an die unterstrichene Teilsequenz des Peptides (EEAQRKNPMFKFE) jedoch nicht an das längere, die erste Teilsequenz enthaltende, unterstrichene Peptid (EEAQRKNPMFKFE). Eine mögliche Erklärung für einen solchen Befund ist, dass im Serum Populationen von Antikörpern enthalten sind, die zwar an kurze Teilsequenzen des Peptides binden, jedoch diese Teilsequenzen im Kontext des gesamten Peptides nicht erkennen. Um eine klare Aussage diesbezüglich machen zu können müssten noch weitere Experimente, wie beispielsweise die Isolierung dieser Teilpopulationen durch Immunaффinitätsreinigungen, durchgeführt werden.

#### 4.4.2 Ermittlung der Epitope der Adh1\_1 und ADH1\_2-induzierten Antikörper

Analog zu den vorherigen Experimenten wurden die Bindungsstellen der MVH-ADH1\_1-induzierten und der MVH-ADH1\_2-induzierten Antikörper aus Abschnitt 4.3.1.2 ermittelt. Den mit ADH1\_1-Thyreoglobulin induziertem Antikörpern konnte kein definiertes Epitop zugeordnet werden (nicht gezeigt). Die Epitope der MVH-ADH1\_1 bzw. mit MVH-ADH1\_2 induzierten Antikörper konnten ermittelt werden. Abb. 4.4.5 zeigt das Ergebnis des Immunoassays mit MVH-ADH1\_1-induziertem Antiserum. Die Expositionszeit des Filmes betrug 10 s.

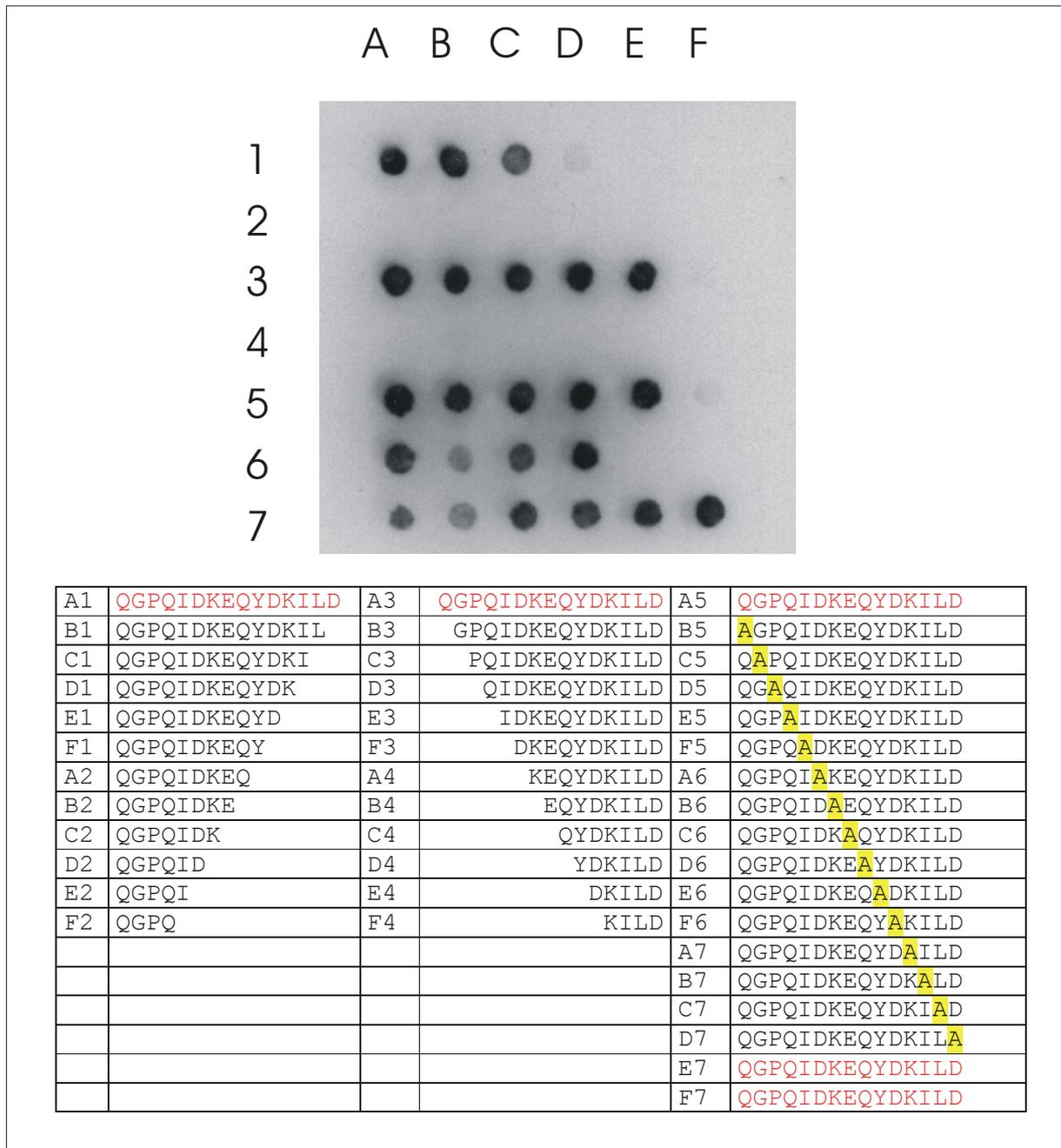


Abb. 4.4.5 Epitopmapping MVH-ADH1<sub>1</sub>-induzierter Antikörper mittels eines durch Spotsynthese hergestellten Peptid-Arrays. Die rot geschriebenen Sequenzen entsprechen dem unmodifizierten ADH1<sub>1</sub> Peptid-Antigen. Die Position der Ala-Substitution gelb markiert.

Das Serum des zweiten mit MVH-ADH1<sub>1</sub> immunisierten Tieres zeigte ein analoges Bild. Die quantitative Auswertung der Signale zeigt Abb. 4.4.6.

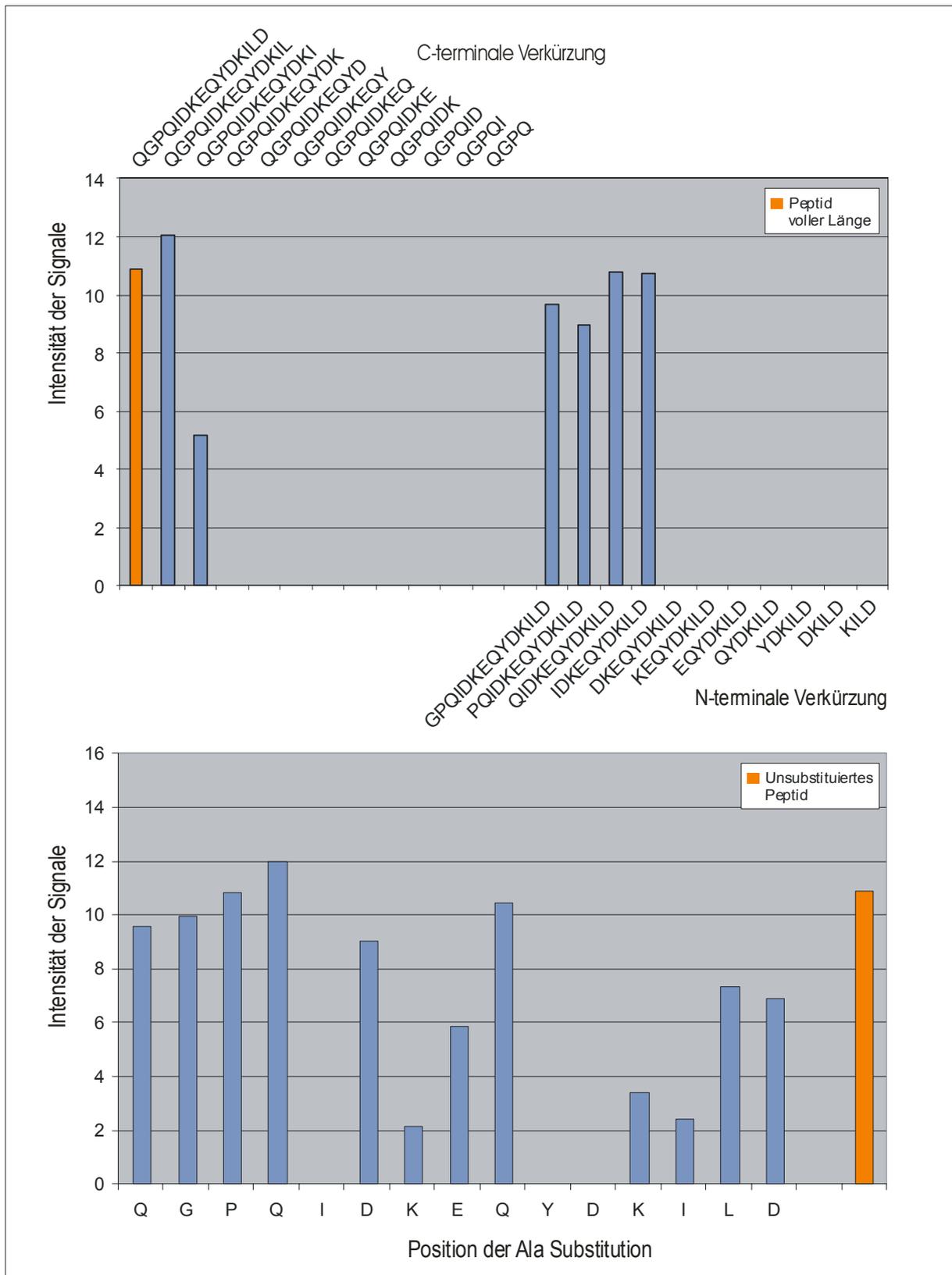


Abb. 4.4.6 Ergebnis der quantitativen Auswertung des Epitop-Mappings der ADH1\_1-induzierten Antikörper.

Es war zu erkennen, dass sich das Epitop MVH-ADH1\_1 induzierter Antikörper im mittleren Bereich des Peptides QGPQIDKEQYDKILD befindet (rot markierter Bereich). Die

Substitution der gelb markierten Aminosäuren durch Alanin, führte zu deutlichen Bindungsverlust (Signalintensitäten < 30 % im Vergleich zum unsubstituierten Peptid).

Die äquivalenten Experimente wurden auch mit MVH-ADH1\_2-induzierten Antisera durchgeführt. Der resultierende Film (Expositionszeit 15 s) ist in Abb. 4.4.7 dargestellt.

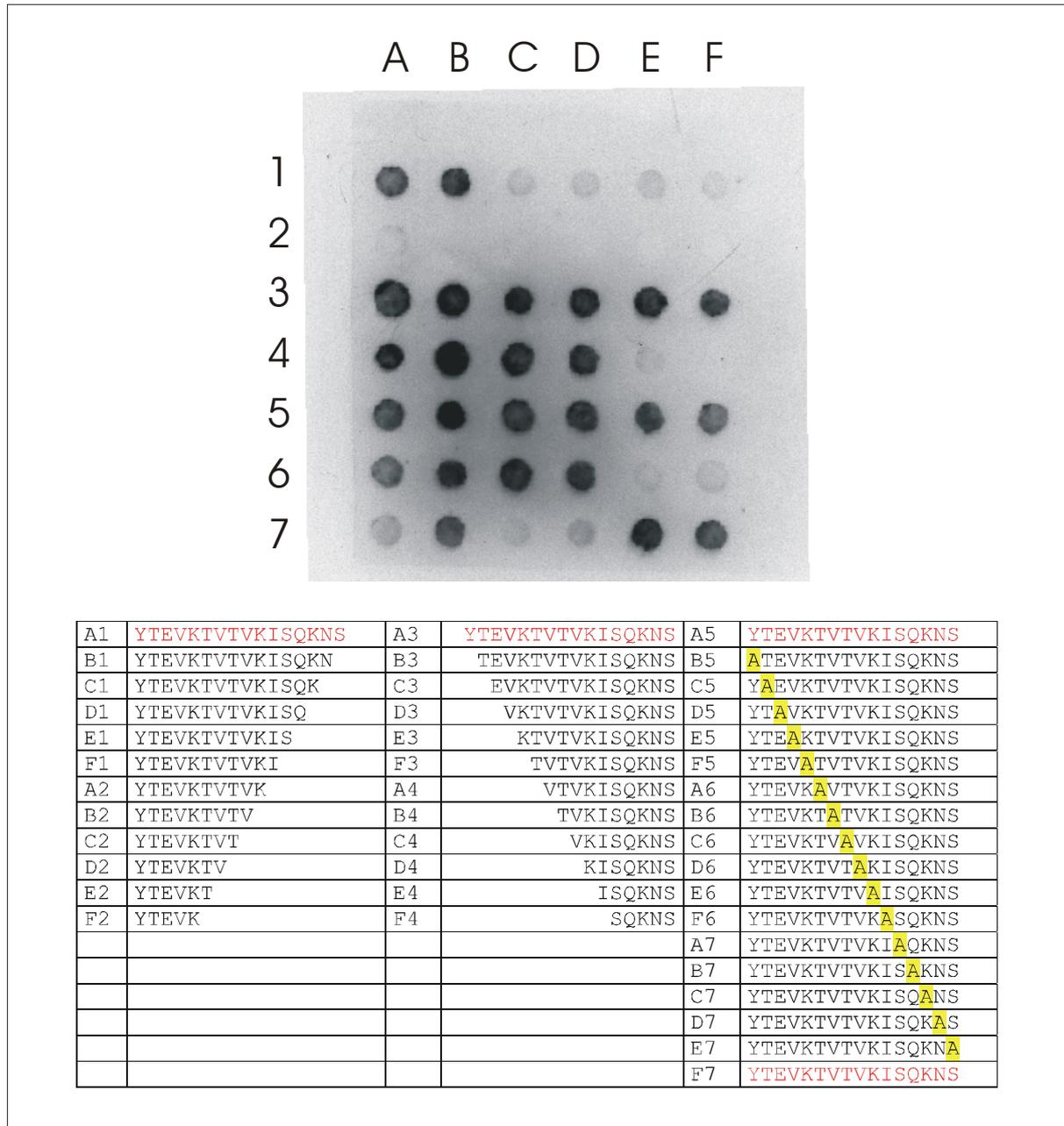


Abb. 4.4.7 Ermittlung der Epitope MVH-ADH1\_2-Peptid Antikörper. Die rot geschriebenen Sequenzen entsprechen dem unmodifizierten ADH1\_2 Peptid-Antigen. Die Position der Ala-Substitution ist jeweils gelb markiert.

Die zugehörige quantitative Auswertung der Signale ist in Abb. 4.4.8 dargestellt.

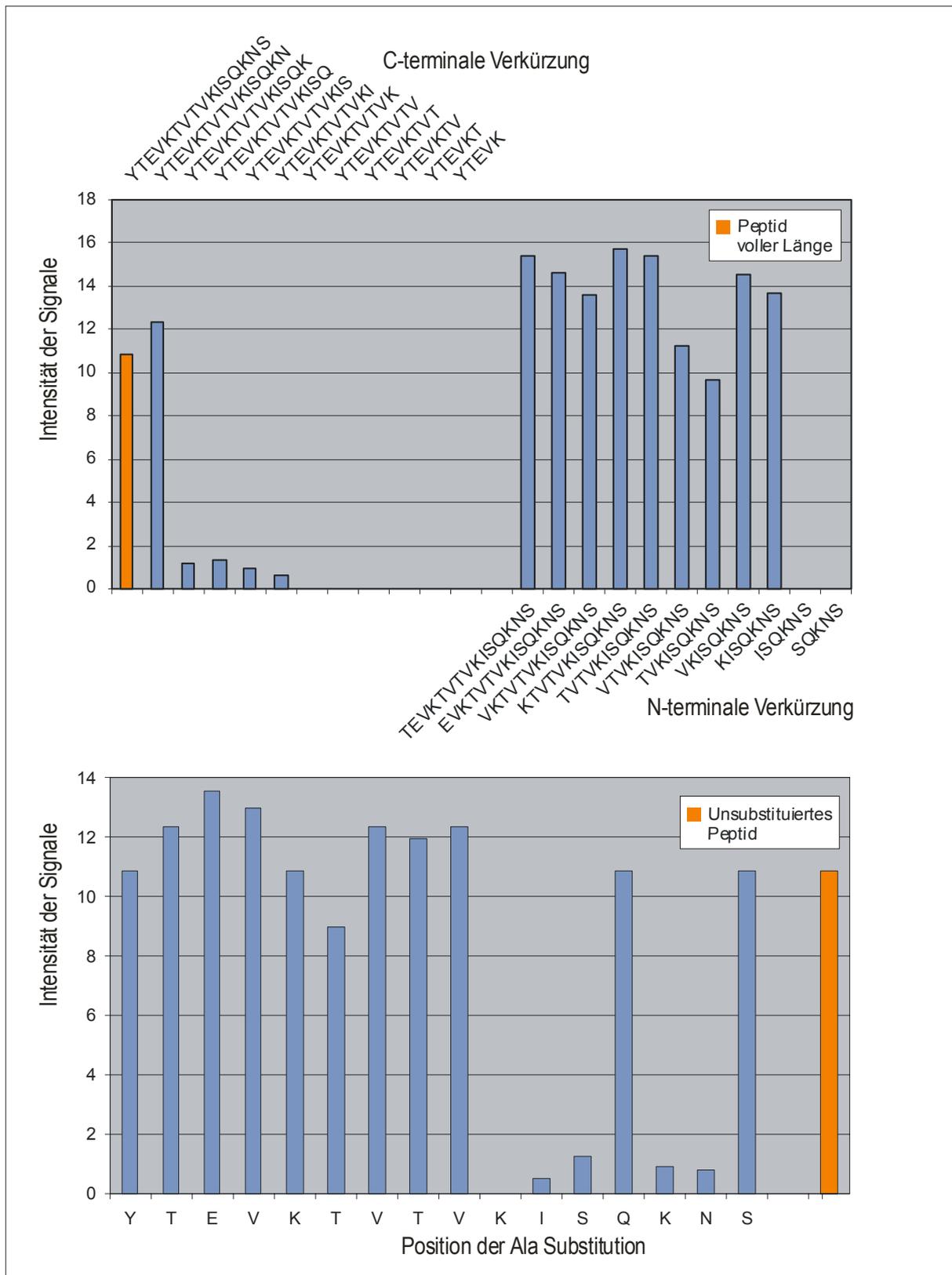


Abb. 4.4.8 Ergebnis der quantitativen Auswertung des Epitop-Mappings der ADH1\_2-induzierten Antikörper.

Die Auswertung des Immunoassays ergibt ein 6 Aminosäuren langes Epitop (YTEVKTVT VKISQKNS) (rot markierter Bereich). Bei diesem Epitop führt die Substitution

aller gelb markierten Aminosäuren durch Alanin zu deutlichen Bindungsverlust, die Substitution des Glutamins jedoch nicht.

#### 4.4.3 Ermittlung der Epitope der CAH2\_1, CAH2\_2 und CAH2\_3-induzierten Antikörper

Entsprechend den vorherigen Versuchen wurden die Epitope der CAH-Peptid-induzierten Antikörper aus Abschnitt 4.3.1.3 ermittelt. Die mit CAH2\_2-Thyreoglobulin und CAH2\_3-Thyreoglobulin induzierten Seren zeigten keine definierte Erkennungssequenz (hier nicht gezeigt). Das Ergebnis des Immunoassays mit CAH2\_1-MVH-Peptid-induzierten Antikörpern der Abb. 4.4.9 zu entnehmen.

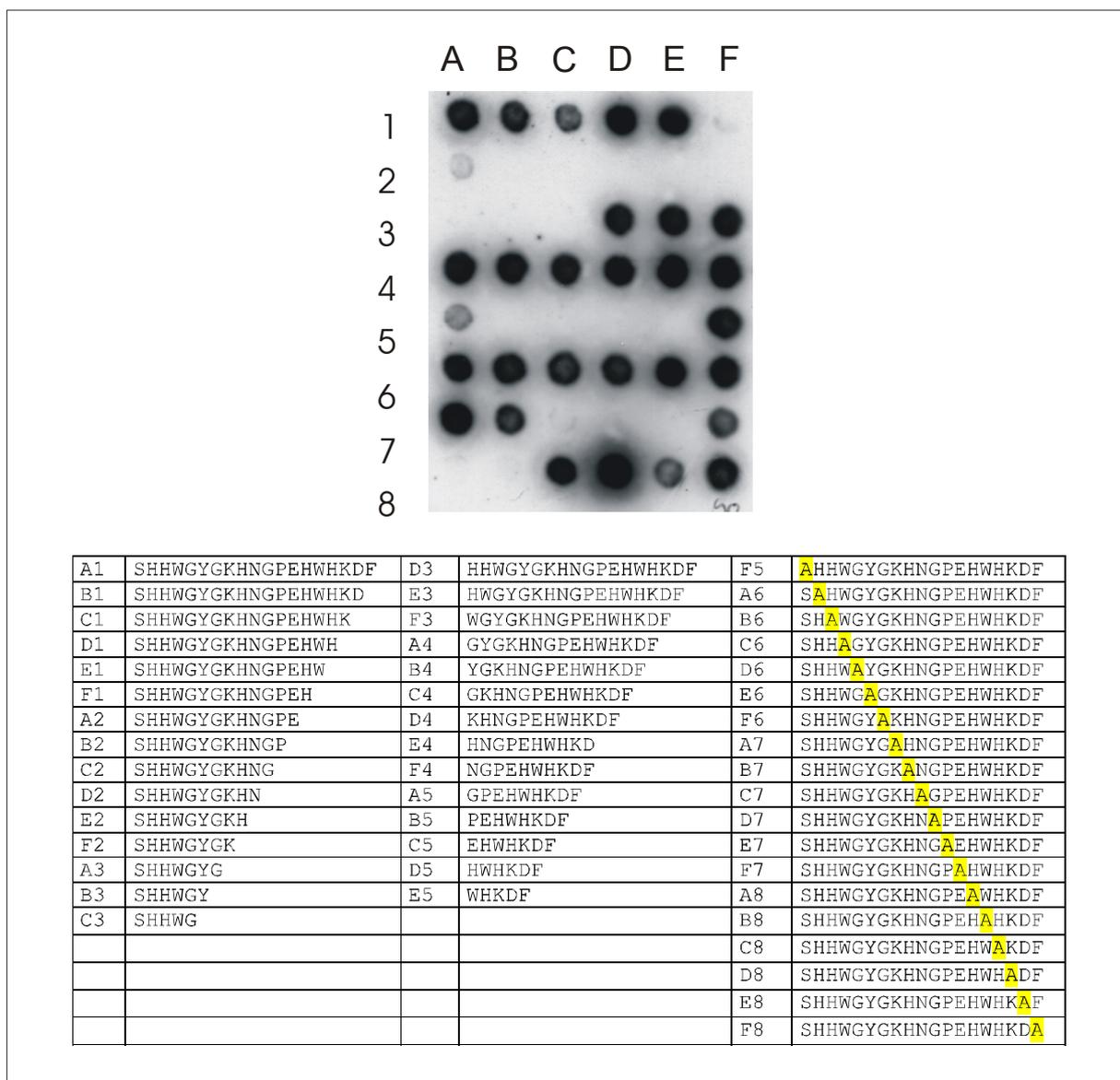


Abb. 4.4.9 Ermittlung der Epitope der CAH2\_1-MVH-induzierten Antikörper. Die Exposition des Filmes erfolgte für 5 s. Die rot geschriebenen Sequenzen entsprechen dem unmodifizierten CAH2\_1 Peptid-Antigen. Die Position der Ala-Substitution ist jeweils gelb markiert.



Das Mapping der Antikörper des anderen mit CAH2\_1-MVH immunisierten Tieres ergab ein äquivalentes Bild. Es wurde deutlich, dass auch in diesem Fall die Antikörper an eine kurze Teilsequenz auf dem Peptid binden. Es ist die sechs Aminosäuren lange, rot geschriebene Teilsequenz SHHWGYGKHNGPEHWHKDF. Hierbei lässt sich ausschließlich das Glutamat durch Alanin ohne Bindungsverlust substituieren, die gelb markierten Aminosäuren jedoch nicht. Außerdem fällt auf, dass bei Substitution des in der Sequenz unterstrichenen Lysins durch Alanin das Bindungsvermögen der Antikörper stark zunimmt (Zunahme des Signals um den Faktor 2,3).

Das analoge Experiment wurde auch mit MVH-CAH2\_2-induziertem Antiserum durchgeführt. Der Film nach 30 s Expositionszeit ist in Abb. 4.4.11 zu sehen.

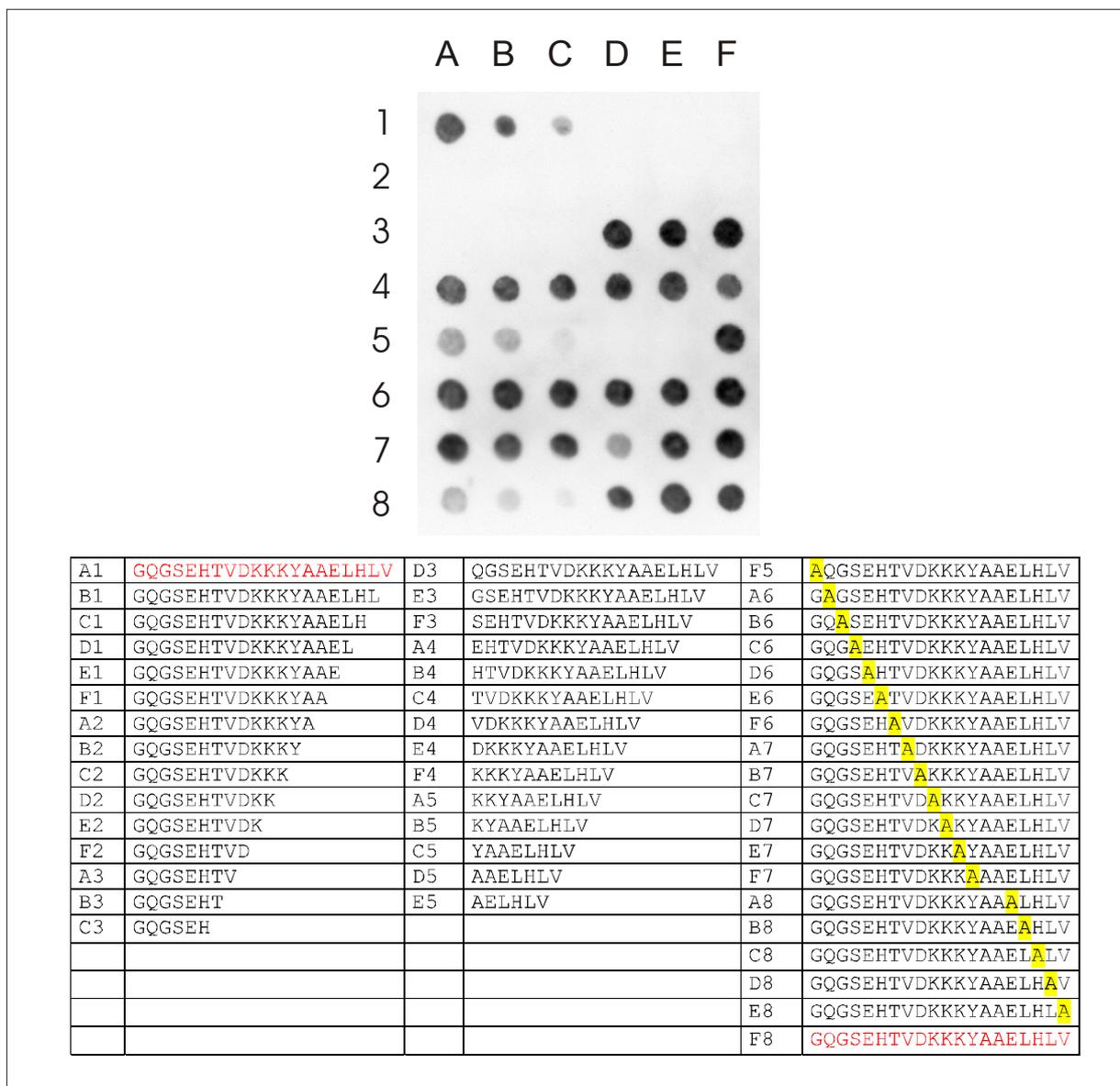


Abb. 4.4.11 Ermittlung der Epitope MVH-CAH2\_2-induzierter Antikörper. Die rot geschriebenen Sequenzen entsprechen dem unmodifizierten CAH2\_2 Peptid-Antigen. Die Position der Ala-Substitution ist jeweils gelb markiert.

Der Assay mit dem Serum des zweiten mit MVH-CAH2\_2 immunisierten Tieres ergab ein analoges Ergebnis. Abbildung 4.4.12 zeigt die quantitative Auswertung des Experimentes.

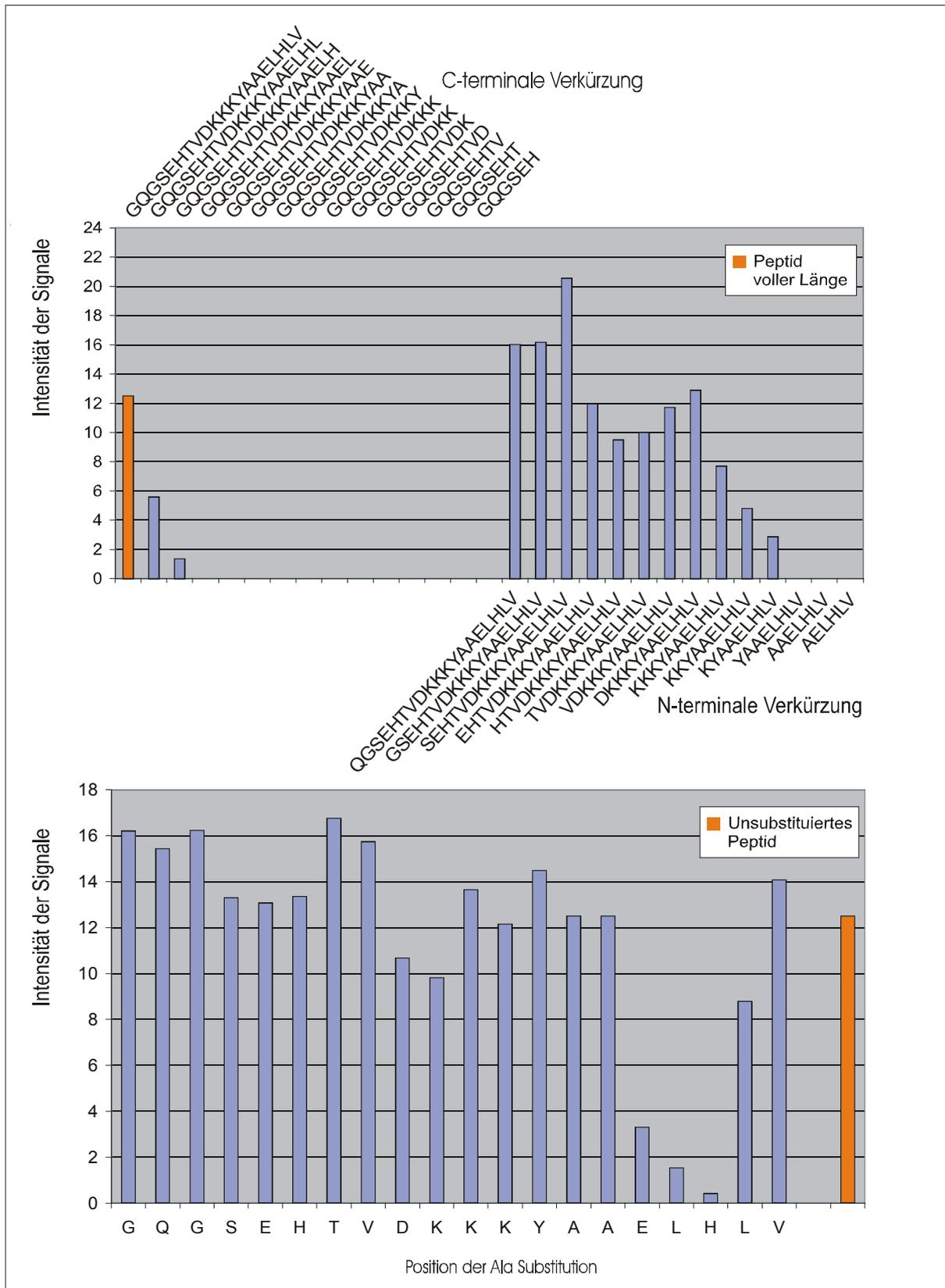


Abb. 4.4.12 Quantitative Auswertung des Epitop-Mappings der MVH-CAH2\_2-induzierten Antikörper.

Es konnte gezeigt werden, dass die Antikörper eine sieben Aminosäuren lange, auf der Peptidsequenz GQGSEHTVDKKKYAAELHLV rot markierte Bindungsstelle haben. Wird eine der gelb markierten Aminosäuren durch Alanin substituiert, führt dies zum partiellen Bindungsverlust der Antikörper an das Peptid.

Das analoge Experiment wurde schließlich auch mit den CAH2\_3-MVH Peptid-induzierten Antiseren gemacht. Wiederum ergaben die Seren beider Tiere ein vergleichbares Bild. Das Ergebnis des Immunoassays (Expositionszeit: 20 sek.) nebst quantitativer Analyse ist in Abb. 4.4.13 und Abb. 4.4.14 gezeigt.

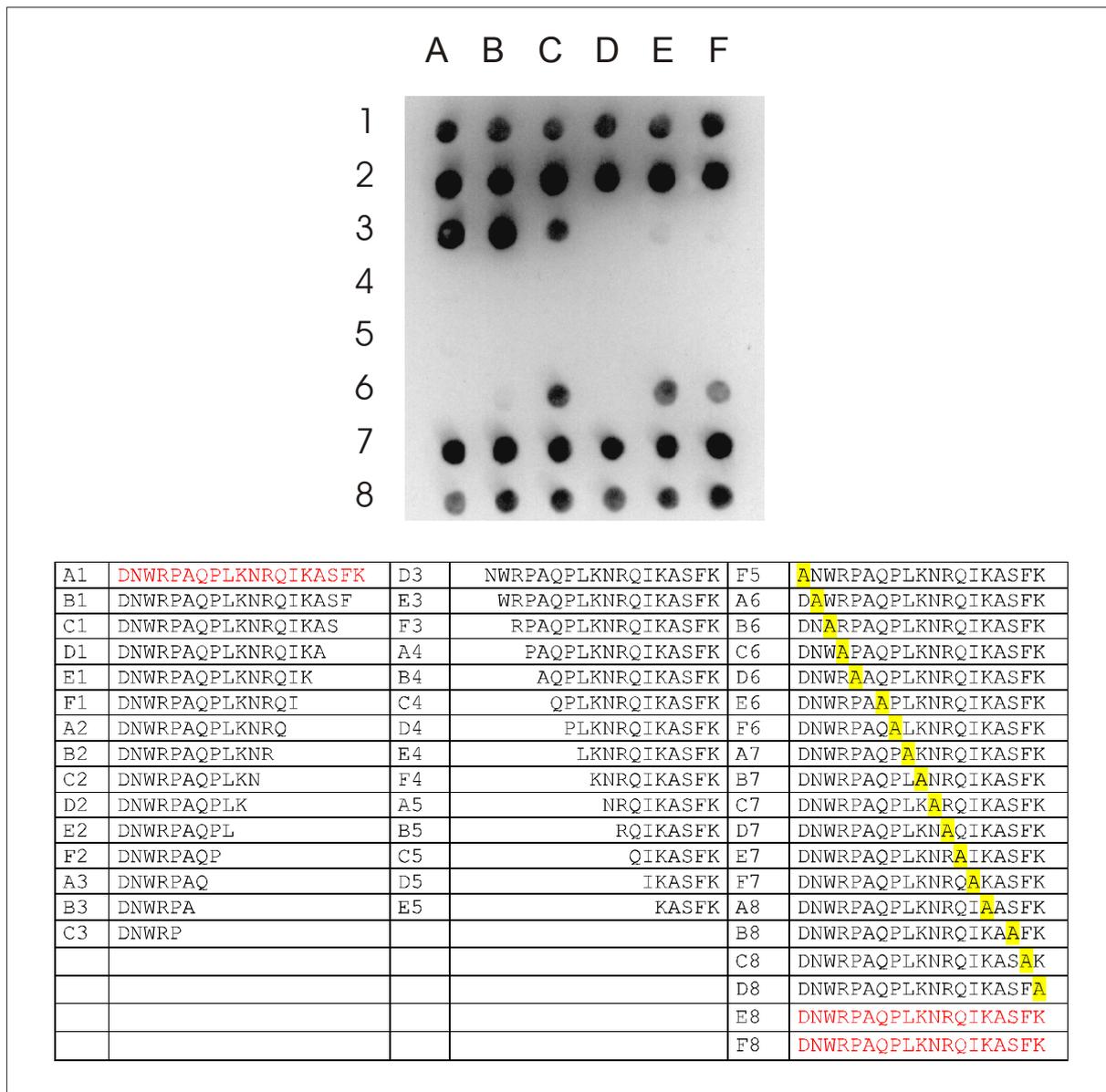


Abb. 4.4.13 Ermittlung der Epitope der CAH2\_3-MVH-induzierten Antikörper. Die rot geschriebenen Sequenzen entsprechen dem unmodifizierten CAH2\_3 Peptid-Antigen. Die Position der Ala-Substitution ist jeweils gelb markiert.

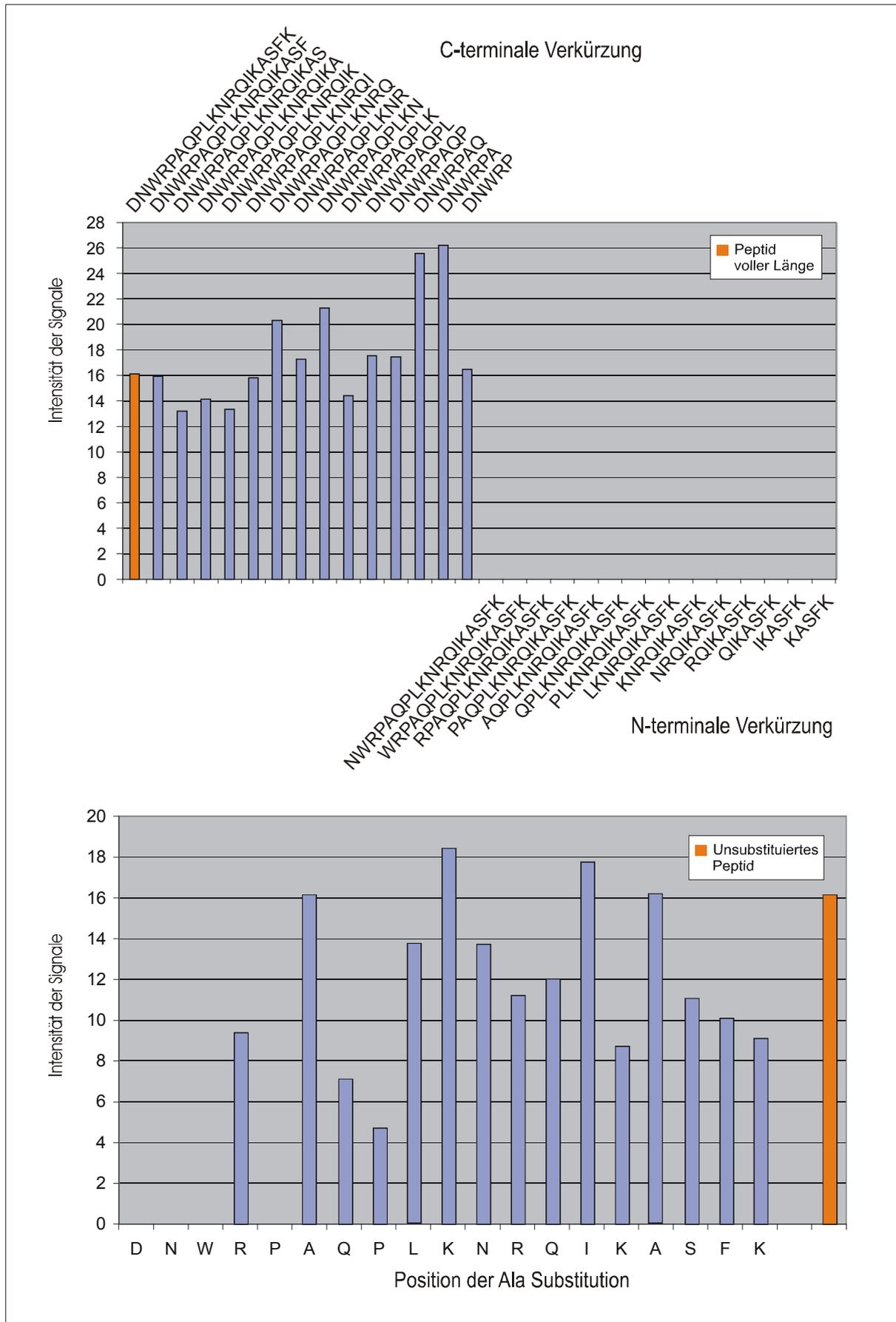


Abb. 4.4.14 Ergebnis der quantitativen Auswertung des Epitop-Mappings der CAH2\_3-MVH-induzierten Antikörper.

Es zeigt sich, dass die Antikörper am rot markierten N-terminalen Ende des Peptides **DNWRP**AQPLKNRQIKASFK binden. Die Antikörper binden nicht mehr an dem Peptid, wenn die gelb markierten Aminosäuren durch Alanin substituiert werden.

#### 4.4.4 Ermittlung des Epitops der mit IGFBP5\_1, IGFBP5\_2 und IGFBP5\_3 induzierten Antikörper

Im Rahmen einer Kooperation mit dem „Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Haustiergenetik (Prof. Dr. E. Wolf)“ wurden Peptid-induzierte Antikörper gegen porcines IGFBP5 hergestellt. Mit diesen Seren sollen in weiteren Experimenten IGFBP5 Konzentrationen in einer Vielzahl porciner Proben ermittelt werden. In diesem Zusammenhang wurden Peptid-induzierte Antiseren gegen die folgenden Peptide generiert:

- |  |                    |
|--|--------------------|
| • IGFBP5_1 (Porcines IGFBP5 AS 80-97):   | LPRQDEEKPLHALLHGRG |
| • IGFBP5_2 (Porcines IGFBP5 AS 80-97):   | KSYREQAKIERDSREHEE |
| • IGFBP5_3 (Porcines IGFBP5 AS 124-141): | SEMAEETYSFKIFRPKHT |

Für jedes dieser Peptid-Sequenzen wurde je ein Konstrukt mit C-terminalem und N-terminalem MVH-Peptid als Carrier hergestellt und jeweils 100 µg der Konstrukte einmal mit komplettem und zweimal mit inkomplettem Freund's Adjuvans in je zwei BALB/c Mäuse injiziert. Analog zu den vorherigen Experimenten wurden mit Hilfe der Peptid-Arrays die Epitope genau ermittelt. Das Ergebnis des Immunoassays mit IGFBP5\_1-MVH-induziertem Antiserum ist in Abb. 4.4.15 dargestellt. Die Expositionszeit des Filmes betrug 10 s.

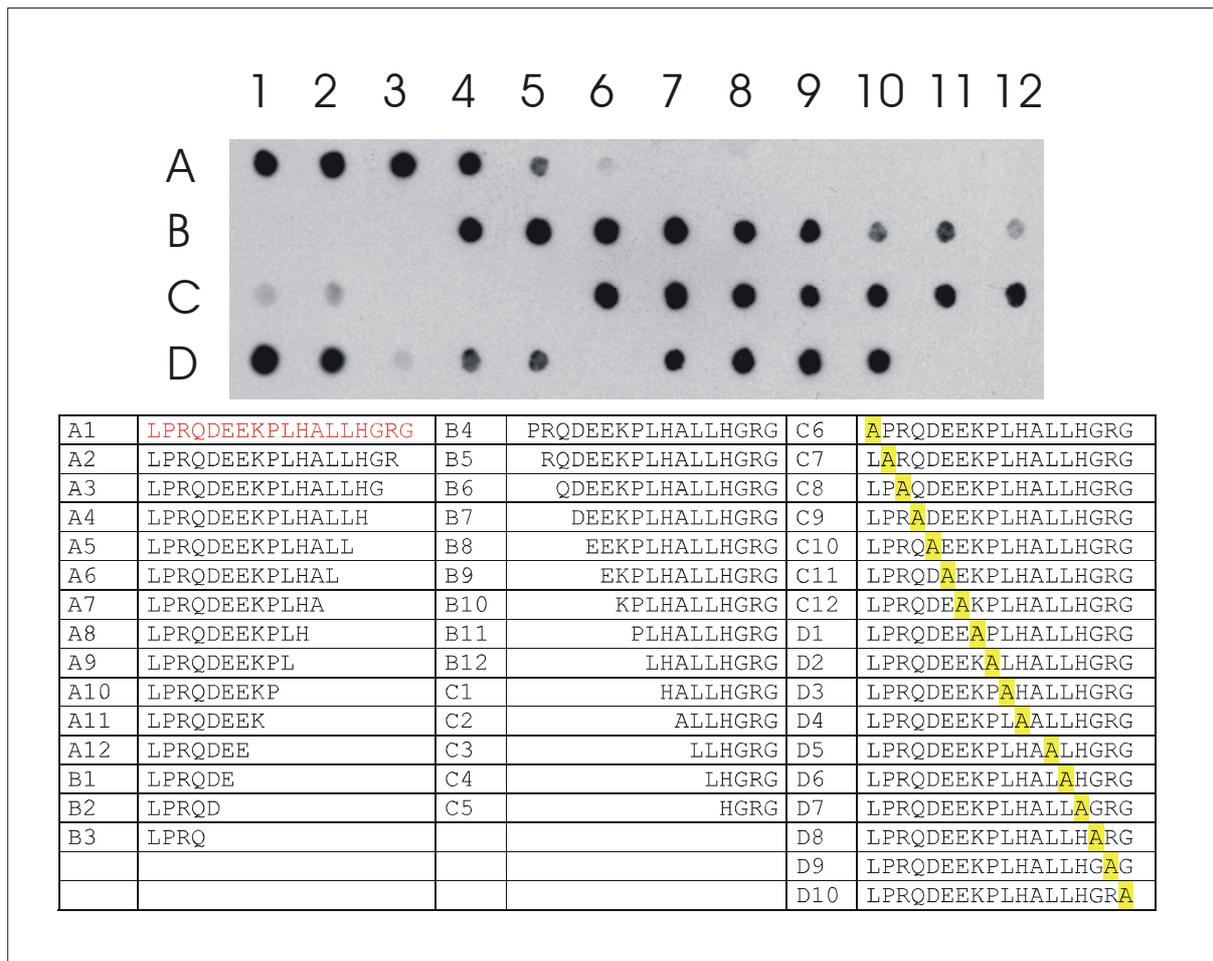


Abb. 4.4.15 Ermittlung der Epitope der IGFBP5\_1-MVH-induzierten Antikörper mittels eines durch Spotsynthese hergestellten Peptid-Arrays. Die rot geschriebene Sequenz entspricht dem unmodifizierten IGFBP5\_1-Peptid-Antigen. Die Position der Ala-Substitution ist jeweils gelb markiert.

Für beide mit IGFBP5\_1 immunisierten Tiere ergab sich das gleiche Bild. Die quantitative Auswertung des Immunoassays zeigt Abb. 4.4.16.

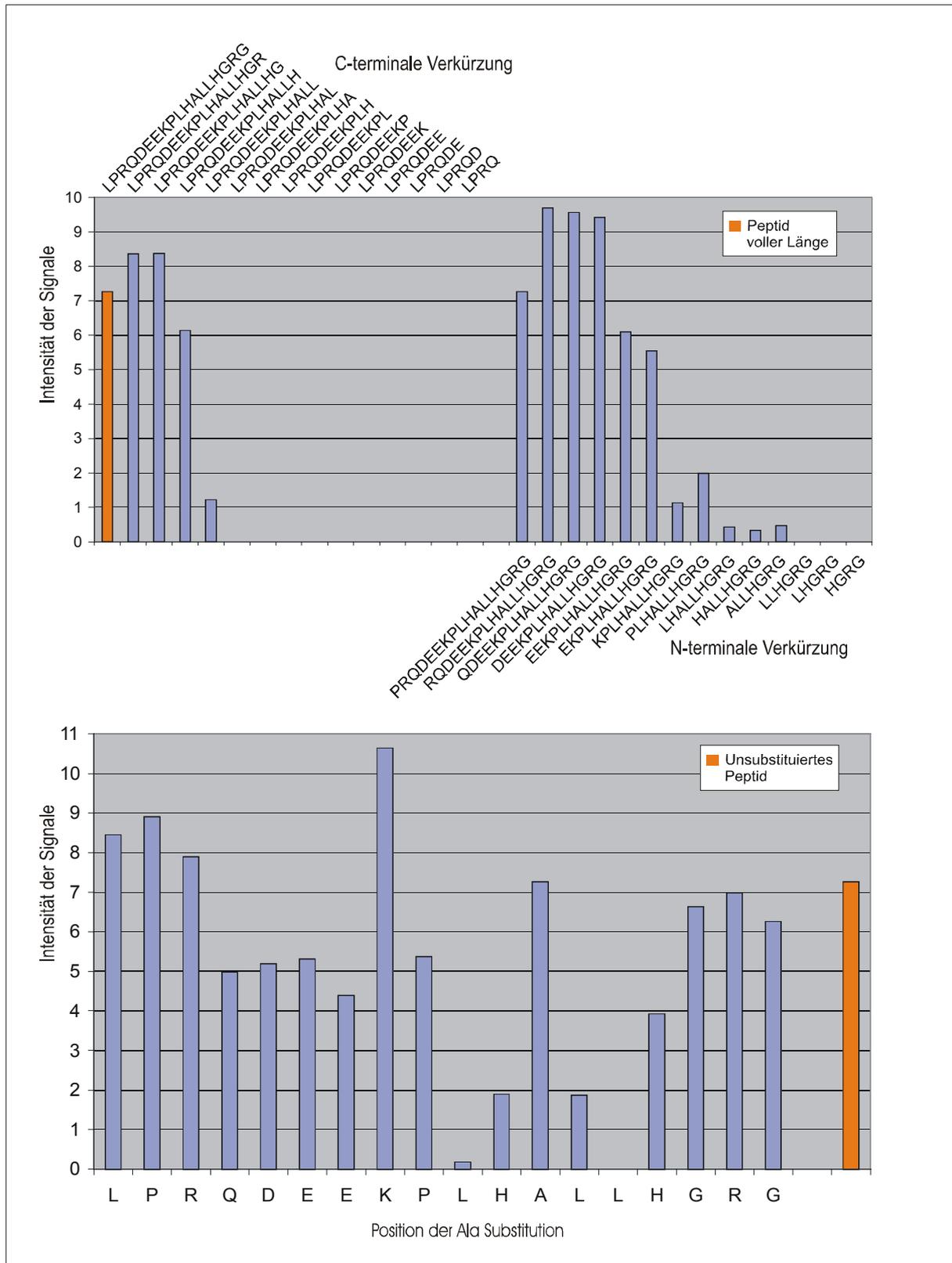


Abb. 4.4.16 Quantitative Auswertung des Immunoassays zur Ermittlung der Epitope der IGFBP5\_1-MVH-induzierten Antikörper.

Abermals konnte beobachtet werden, dass die Antikörper an ein diskretes Epitop auf dem Peptid binden. Es ist der sechs Aminosäuren lange rot markierte Bereich innerhalb des

Peptids LPRQDEEKPLHALLHGRG. Werden die gelb markierte Aminosäuren durch Alanin substituiert, führt dies zu partiellen Bindungsverlust der Antikörper, was sich in deutlich schwächeren Signalintensitäten (< 30% im Vergleich zum Peptid voller Länge) widerspiegelte.

Auf gleiche Art und Weise wurde das Epitop der IGFBP5\_2-MVH-induzierten Antikörper bestimmt. Der Immunoassay mit dem Serum eines der Tiere ist in Abb. 4.4.17 und die quantitative Auswertung in Abb. 4.4.18 dargestellt. Der Film wurde 45 s exponiert. Das Serum des anderen Tieres ergab analoge Signale.

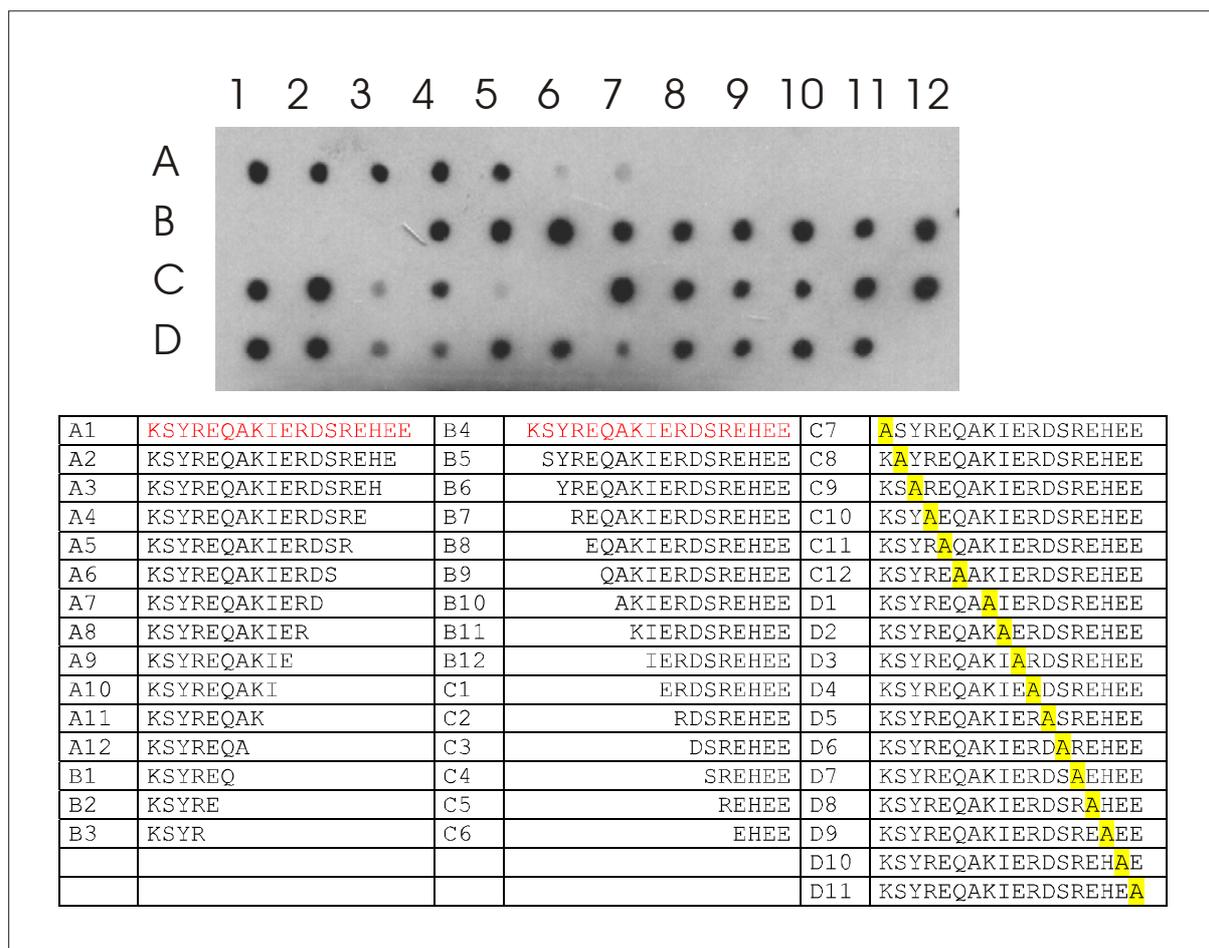


Abb. 4.4.17 Ermittlung der Epitope der IGFBP5\_2-MVH-induzierten Antikörper mittels eines durch Spotsynthese hergestellten Peptid-Arrays. Die rot geschriebenen Sequenzen entsprechen dem unmodifizierten IGFBP5\_2-Peptid-Antigen. Die Position der Ala-Substitution ist jeweils gelb markiert.

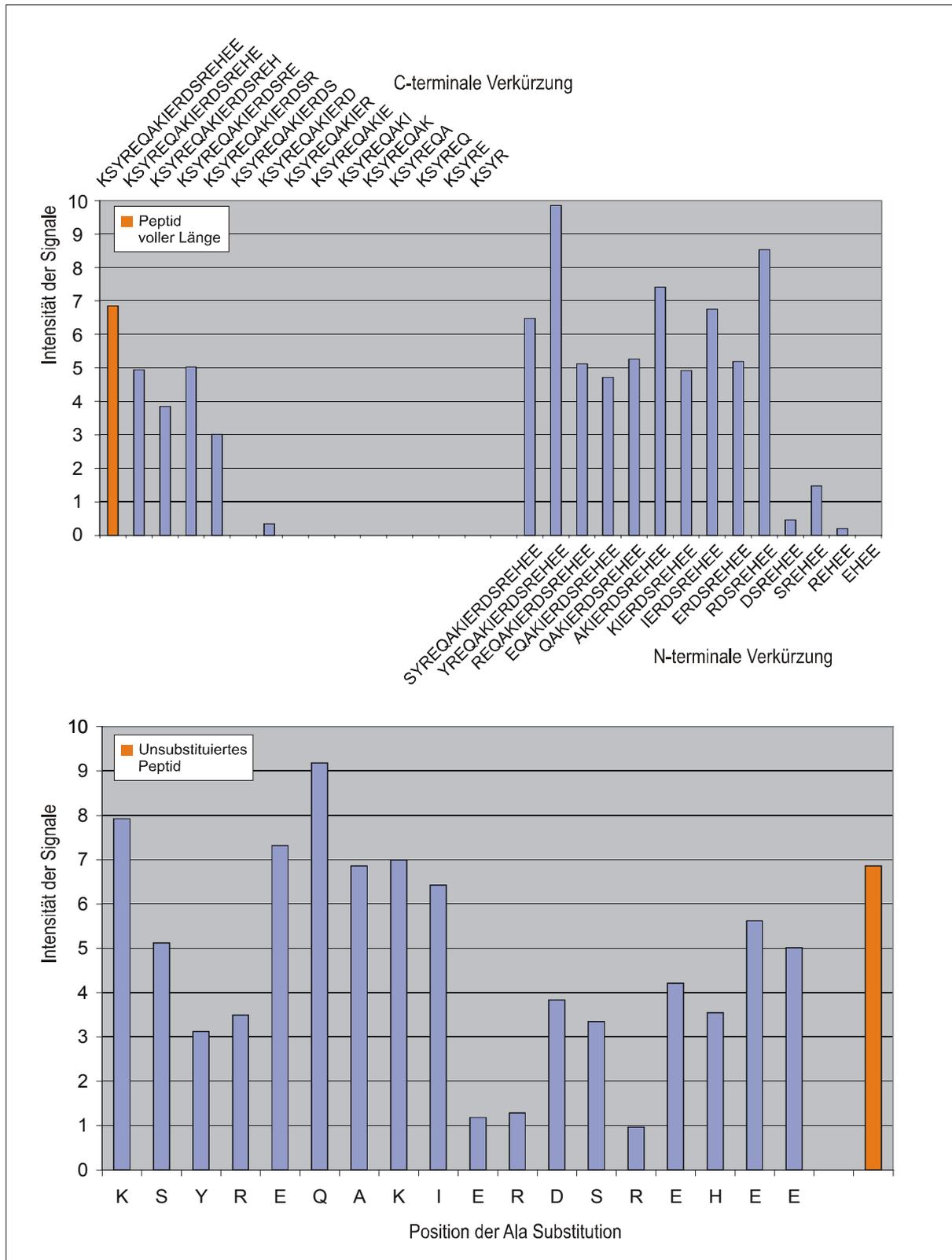


Abb. 4.4.18 Quantitative Auswertung des Immunoassays zur Ermittlung der Epitope der IGFBP5\_2-MVH-induzierten Antikörper.

Es konnte festgestellt werden, dass die IGFBP5\_2-MVH-induzierten Antikörper an ein kurzes vier Aminosäuren langes Epitop (rot markiert) KSYREQAKIERDSREHEE innerhalb des

Peptides binden. Jedoch nimmt die Affinität der Antikörper auch stark ab (Signalabnahme > 70 %), wenn das gelb markierte Glutamat direkt neben dem durch die Verkürzungen ermittelten Epitop durch Alanin substituiert wird. Auch die Substitution der Arginine innerhalb des Epitops führt zu partiellem Bindungsverlust der Antikörper.

Auf gleiche Art und Weise wurde schließlich die Bindungsstelle der IGFBP5\_3-MVH-induzierten Peptid-Antikörper bestimmt. Allerdings ließ sich nur dem Serum eines Tieres eine eindeutige Bindungsstelle zuordnen. Das Ergebnis des Immunoassays mit dem Serum dieses Tieres (Expositionszeit = 5 s) und die quantitative Auswertung sind in Abb. 4.4.19 und Abb. 4.4.20 zu sehen.

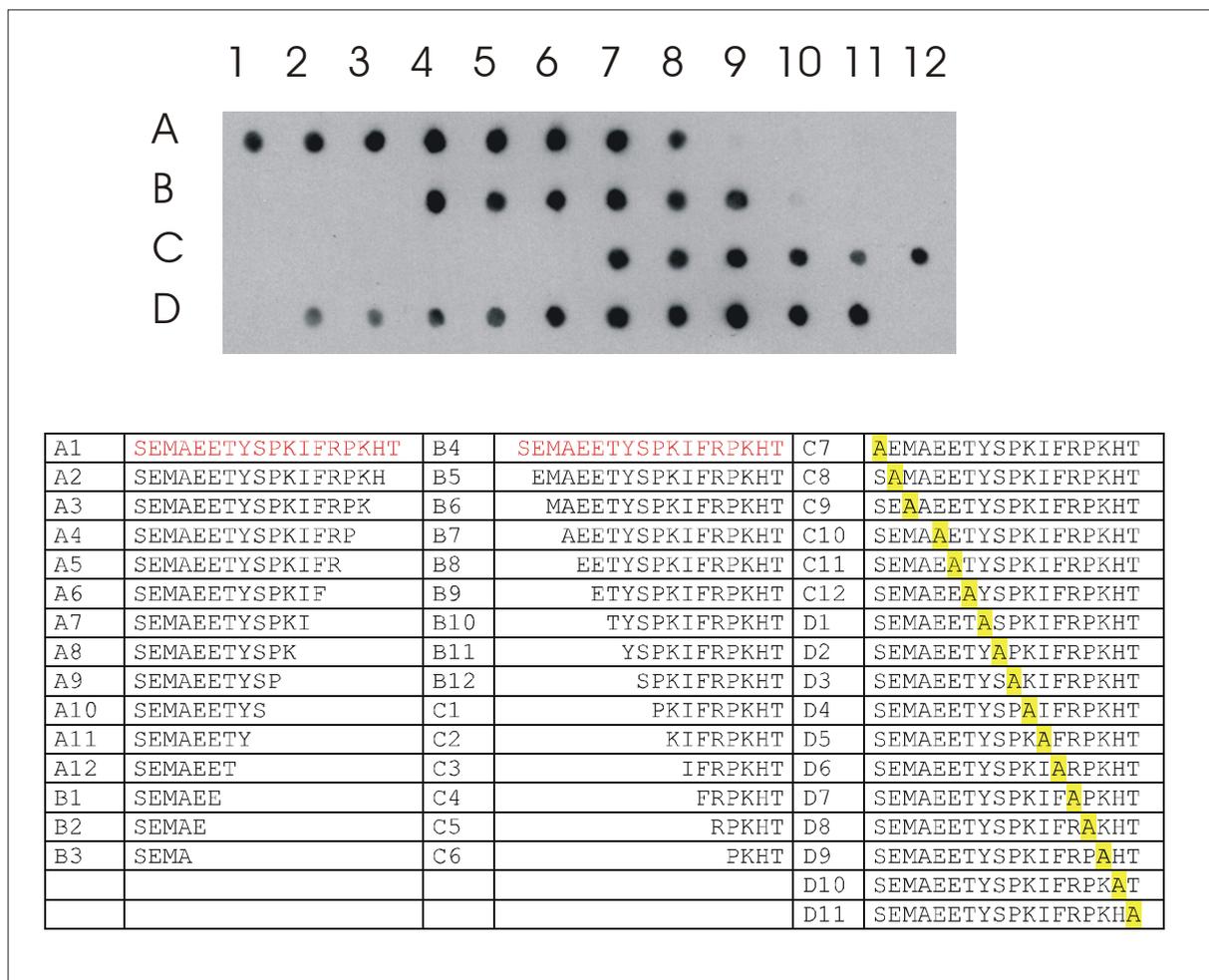


Abb. 4.4.19 Ermittlung des Epitops der IGFBP5\_3-MVH-induzierten Antikörper mittels eines durch Spotsynthese hergestellten Peptid-Arrays. Die rot geschriebene Sequenz entspricht dem unmodifizierten IGFBP5\_3-Peptid-Antigen. Die Position der Ala-Substitution ist gelb markiert.

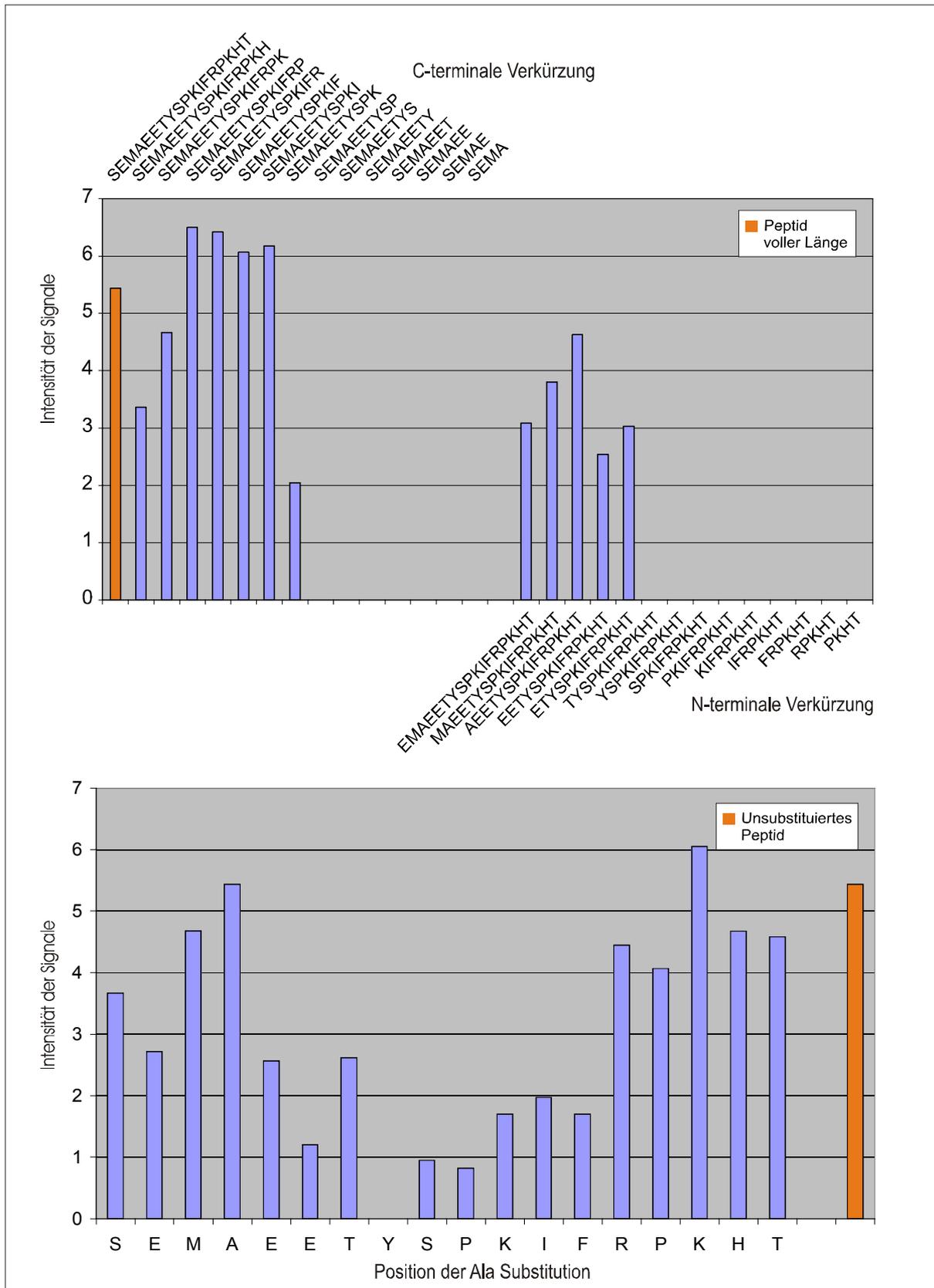


Abb. 4.4.20 Quantitative Auswertung des Immunoassays zur Ermittlung des Epitops der IGFBP5\_3-MVH-induzierten Antikörper.

Wiederum binden die IGFBP5\_3 Peptid-induzierte Antikörper an ein kurzes sieben Aminosäuren langes Epitop, das auf der Peptidsequenz SEMAE**ET**Y**SP**KIFRPKHT rot markiert ist. Die Alanin-Substitution der einzelnen Aminosäurepositionen zeigt, dass die Substitution des gelb markierten Tyrosins zu einem Totalverlust der Affinität der Antikörper führt. Die Alanin-Einzelsubstitutionen des gelb markierten Tyrosin, Serin und Prolin führen ebenfalls zu mindestens 70 % Abschwächung der Signalintensitäten.

#### 4.4.5 Resümee

Tabelle 4.4.1 fasst nochmals die Ergebnisse der durchgeführten Bindungsassays zusammen.

Peptid-Antigen:	Sequenz / Epitop:	Länge des Epitops
MVH-HIF348	EEAQRKN <b>PMFKFE</b>	6 AS
HIF348-Thyreoglobulin	Kein definiertes Epitop	-
MVH-ADH1_1	QGPQ <b>IDKEQYDKILD</b>	9 AS
ADH1_1-Thyreoglobulin	Kein definiertes Epitop	-
MVH-ADH1_2	YTEVKT <del>TV</del> <b>KISQKNS</b>	6 AS
CAH2_1-MVH	SHHWGYGKH <b>NGPEHW</b> HKDF	6 AS
MVH-CAH2_2	GQGSEHTVDK <b>KKYAAELHLV</b>	7 AS
CAH2_2-Thyreoglobulin	Kein definiertes Epitop	-
CAH2_3-MVH	<b>DNWRP</b> PAQLKNRQIKASFK	5 AS
CAH2_3-Thyreoglobulin	Kein definiertes Epitop	-
IGBP5_1-MVH	LPRQDEEK <b>PLHALL</b> HGRG	6 AS
MVH-IGFBP5_1	Kein definiertes Epitop	-
IGFBP5_2-MVH	KSYREQAKI <b>ERDSRE</b> EHEE	5 AS
MVH-IGFBP5_2	Kein definiertes Epitop	-
IGFBP5_3-MVH	SEMAE <b>ET</b> Y <b>SP</b> KIFRPKHT	6 AS
MVH-IGFBP5_3	Kein definiertes Epitop	-

Tabelle 4.4.1: Ergebnisse des Epitop „Mapping“ von im Laufe der Arbeit generierten Peptid-induzierten Antikörpern. Die Epitope entsprechen den rot markierten Aminosäuren, **Y** bedeutet Bindungsverlust bei Alanin Substitution.

Es konnte gezeigt werden, dass 9 von 16 Antigenen Seren induzieren konnten die ähnlich monoklonalen Antikörpern, kurze definierte 5-9 Aminosäure lange Epitope „erkennen“. Außerdem fällt auf, dass nur die MVH-gekoppelten nicht jedoch die Thyreoglobulin gekoppelten Peptide Seren dieser Eigenschaft induzierten. Um daraus einen generellen Trend abzuleiten zu können, müssten jedoch noch weitere Seren generiert und untersucht werden.

## **4.5 Peptid-induzierter Antikörper für Chip-basierende Protein-Detektionstechniken**

Auf feste Phasen aufgebrachte DNA-Arrays ermöglichen den gezielten Nachweis von RNA-Molekülen aus komplexen RNA-Gemischen. Als Analogon hierzu können Antikörper-basierende Proteinarrays zukünftig eine elegante und effiziente Methode zur gezielten quantitativen Detektion ausgewählter Proteine aus komplexen Proteingemischen darstellen. Für diese auch als Antikörperchips bezeichneten Arrays werden Antikörper, die in der Lage sind Einzelproteine aus einem Fluoreszenz-markierten Proteingemisch zu binden, an einer festen Phase fixiert. Die an den Antikörper gebundenen Proteine können schließlich mittels eines Laser-Fluoreszenz-Scanners nachgewiesen und quantifiziert werden. Ziel der folgenden Versuchsreihe war es, ein Verfahren für die Herstellung solcher Chips mit Peptid-induzierten Antikörpern zu entwickeln. Der Einfachheit halber, sollen mit diesem Verfahren Rohseren und nicht gereinigte Antikörper verarbeitet werden können.

### **4.5.1 Evaluierung verschiedener fester Phasen hinsichtlich ihrer Kapazität Peptid-induzierte Antikörper zu binden, und bezüglich ihres Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisses**

Da im Gegensatz zu anderen Immuno-Detektionstechniken der Nachweis der Fluoreszenz-markierten Proteine mit einem Scanner erfolgt und somit Signale nicht über längere Zeiträume akkumuliert werden können, muss die feste Phase einigen wichtigen Kriterien genügen, um ein möglichst sensitives Nachweissystem zu erhalten. Zum einen sollte die Oberfläche möglichst hohe Antikörper-Bindungskapazitäten aufweisen und zum anderen sollte der Träger möglichst geringe Eigenfluoreszenz zeigen. Deswegen wurden verschiedene feste Phasen verglichen. Für alle in diesem Abschnitt durchgeführten Experimente wurde CAH2\_1-MVH-induziertes Mäuse Antiserum verwendet (siehe Abschnitt 4.3.1.3). Als Analyt diente humane Carboanhydrase II. 1 mg dieses Proteins wurde hierfür mit Cy5-NHS markiert und überschüssiger Farbstoff mittels Gel-Ausschlusschromatographie (Sephadex-G-25-Säule) abgetrennt. Das UV/Vis-Spektrum des Produktes ist in Abb. 4.5.1 dargestellt.

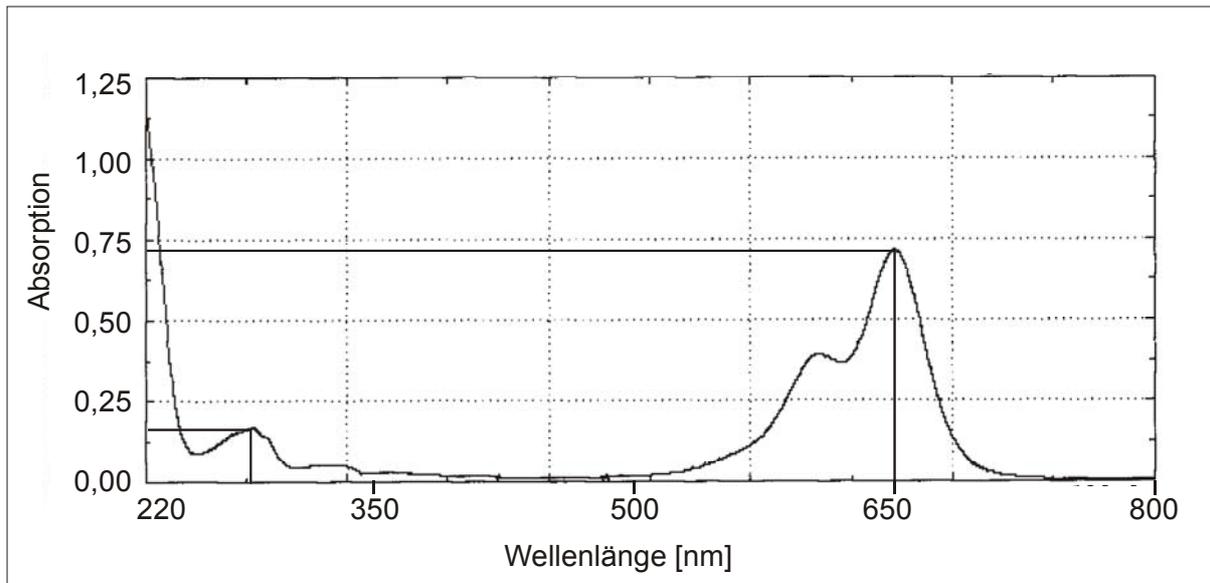


Abb. 4.5.1 UV/Vis Spektrum des Cy5/Carboanhydrase.

Es wurde ein Absorptionsmaximum von 0,71 (Cy5) bei 650 nm und von 0,16 (Protein) bei 280 nm ermittelt. Die Kenngröße für die Effizienz der Markierung ist das durchschnittliche Verhältnis von Anzahl der Farbstoffmoleküle zu Anzahl der Proteinmoleküle. Diese Markierungsrate wurde wie folgt (näherungsweise) berechnet:

Molarer Extinktionskoeffizient für Carboanhydrase II:  $\epsilon_{280} = 398.100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Molarer Extinktionskoeffizient für Cy5:  $\epsilon_{650} = 250.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$\epsilon_{280} = 12.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Lichtweg durch die Probe:  $l = 1 \text{ cm}$

Aus  $A = \log(I_0/I) = \epsilon * [c] * l$  (Lambert-Beer) folgt:

$$[\text{Cy5}] = A_{650} / 250.000 \text{ M}^{-1}$$

$$[\text{Carboanhydrase}] = (A_{280} - ([\text{Cy5}] * 12.500 \text{ M}^{-1})) / 398.100 \text{ M}^{-1}$$

$\Rightarrow [\text{Cy5}]/[\text{Carboanhydrase}] = \mathbf{8,9 \text{ Cy5-Gruppen pro Proteinmolekül}}$

#### 4.5.1.1 Evaluierung von Poly-L-Lysin Objektträgern als feste Phase zur Bindung Peptid-induzierter Antikörper

Zunächst wurden Poly-L-Lysin Objektträger getestet, die auch in der Produktion von DNA-Chips verwendet werden. Hierzu wurden je  $0,5 \mu\text{l}$  CAH2\_1-MVH Präimmunsereum (Negativ-Kontrolle), CAH2\_1-MVH-induziertes Antiserum und  $0,5 \mu\text{l}$  der Cy5-markierten

Carboanhydrase II Lösung (70 µg/ml, zur Abschätzung der prinzipiellen Proteinbindungskapazität) auf den Objektträger gegeben und luftdicht für 1 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger 2 h lang mit 5 % BSA in PBS-T blockiert. Nun wurde der Objektträger 1 h lang in der Cy5-markierten Carboanhydrase II Lösung (70 µg/ml) inkubiert und dreimal mit PBS-T gewaschen. Der Objektträger wurde schließlich mit einem Laserscanner (Storm 860, Fa. Molecular Dynamics) gescannt und die Signale mit der Imagequant V5.0 Software ausgewertet. Das Ergebnis ist in Abb. 4.5.2 zu sehen. Der Scan wurde zur besseren Sichtbarkeit der quantitativen Unterschiede als Falschfarben-Bild dargestellt (siehe Abb. 4.5.2 A). Bei der Quantifizierung wurde sowohl der horizontale Querschnitt (siehe Abb. 4.5.2 B) als auch das Gesamtvolumen der Spots (Siehe Abb. 4.5.2 C) berücksichtigt. Das Hintergrundsignal wurde durch die Quantifizierung eines Bereiches gleicher Größe jedoch ohne Probenauftrag ermittelt. Das Ergebnis der Auswertung ist in Abb. 4.5.2 graphisch und in Tab. 4.5.1 tabellarisch zusammengefasst.

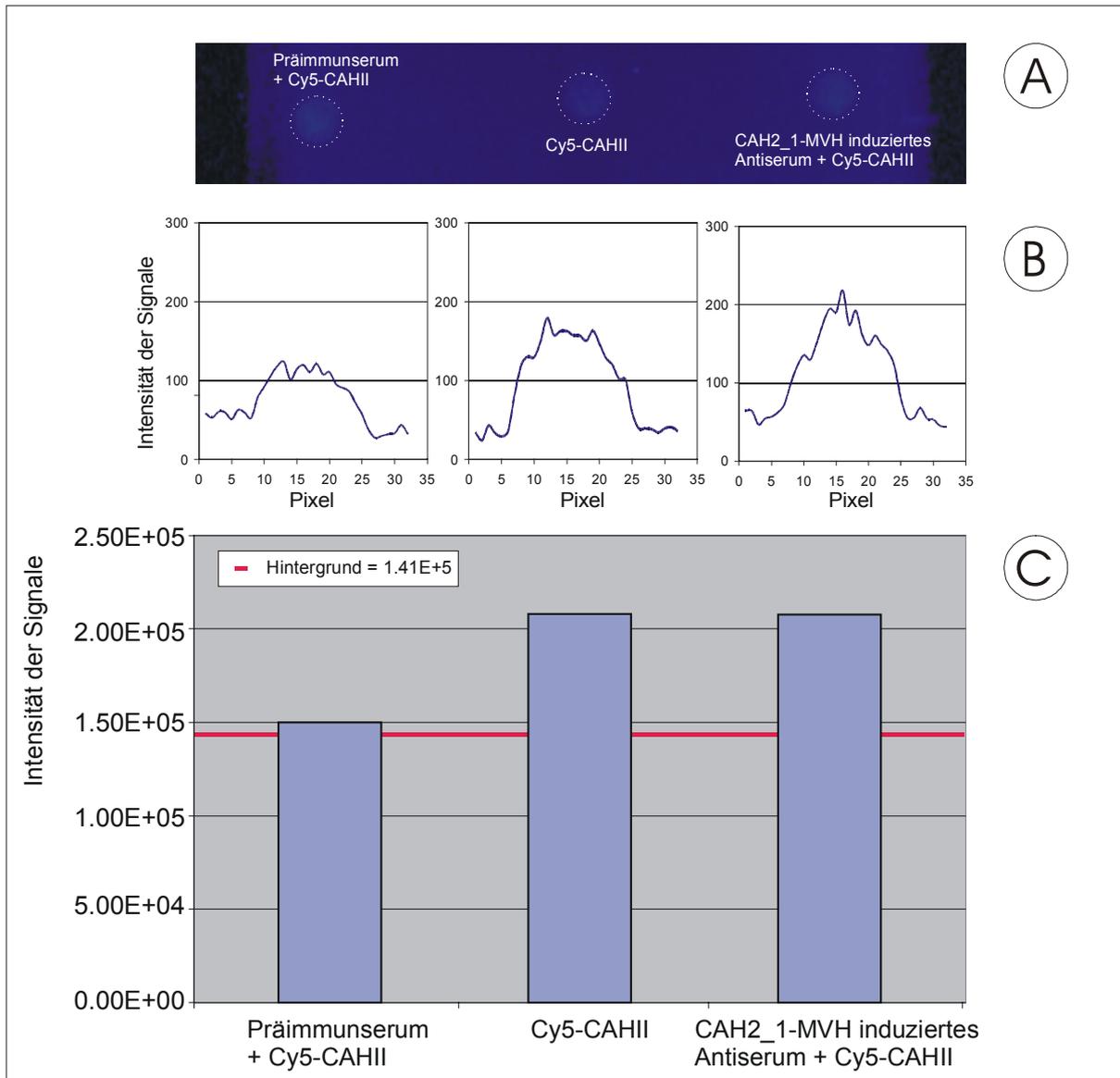


Abb. 4.5.2 Scan des Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgers und quantitative Auswertung der Signale. Die Werte stellen das Integral der Intensitäten über die Gesamtfläche dar.

	Präimmunserum + Cy5-CAHII	Cy5-CAHII	CAH2_1-MVH Serum + Cy5-CAHII
Integrierte Intensität	1,50E+5	2,12E+5	2,08E+5
Signal/Hintergrund	1,1	1,5	1,5
Signal/Präimmunserum	1,0	1,4	1,4

Tab. 4.5.1 Signalintensitäten auf Poly-L-Lysin Objektträgern.

Es wurde deutlich, dass alle Signale nur wenig über der Hintergrundfluoreszenz (Signal/Hintergrund < 2) des Objektträgers lagen. Da auch das Signal des Cy5-markierten Carboanhydrase II Spots nicht stärker war, scheint der limitierende Faktor die Protein-Bindungskapazität der Oberfläche gewesen zu sein.

#### 4.5.1.2 Evaluierung Nitrozellulose beschichteter Objektträger als feste Phase zur Bindung Peptid-induzierter Antikörper

Da Nitrozellulose besonders hohe Protein-BindungsKapazitäten aufweist, wurde das gleiche Experiment, wie in Abschnitt 4.5.1.1 beschrieben, mit Nitrozellulose beschichteten Objektträgern der Fa. Schleicher & Schuell durchgeführt (FAST Slides). Das Ergebnis ist in Abb. 4.5.3 grafisch und in Tab. 4.5.2 tabellarisch dargestellt.

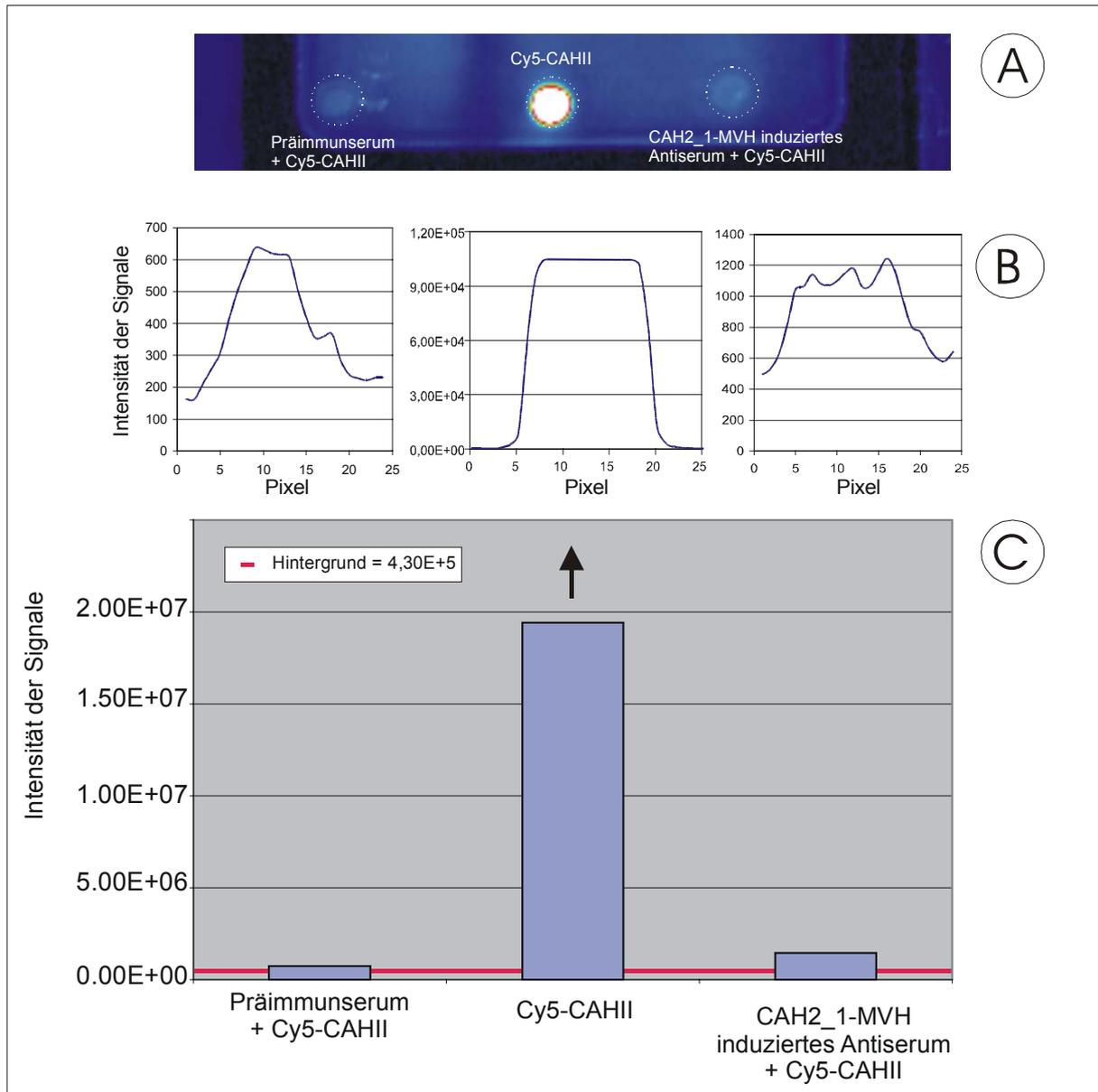


Abb. 4.5.3 Scan des Nitrozellulose-beschichteten Objektträgers und quantitative Auswertung der Signale. Die Werte stellen das Integral der Intensitäten über die Gesamtfläche dar. ↑ = Sättigungssignale.

	Präimmunserum + Cy5-CAHII	Cy5-CAHII	CAH2_1-MVH Serum + Cy5-CAHII
Integrierte Intensität	7,22E+5	(1,94E+7) ↑	1,44E+6
Signal/Hintergrund	1,7	(> 45,1) ↑	3,3
Signal/Präimmunserum	1,0	(> 26,9) ↑	2,0

Tab. 4.5.2 Signalintensitäten auf Nitrozellulose-beschichteten Objektträgern. ↑ = Sättigungssignale.

Es war zu erkennen, dass das Signal des reinen Cy5-Carboanhydrase II Spots den Sättigungsbereich des Scanners erreicht und um mindestens den Faktor 93 stärker ist als bei den Poly-L-Lysin Objektträgern. Folglich wurde deutlich mehr Protein auf Nitrozellulose-beschichteten Objektträgern gebunden als auf den Poly-L-Lysin beschichteten. Dennoch war der Unterschied der Signalintensitäten zwischen Präimmunserum und CAH2\_1-MVH-induziertem Antiserum gering. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Protein-Bindungskapazität des Trägermaterials vor allem durch andere Proteine im Serum erschöpft wurde und nur ein Bruchteil der gebundenen Proteine spezifische Anti-Carboanhydrase II Antikörper waren. Aufgrund dieser Hypothese wurde noch ein Material getestet, das selektiv Antikörper bindet.

#### 4.5.1.3 Evaluierung von Protein A HPLC Material als feste Phase zur Bindung Peptid-induzierter Antikörper

Zu diesem Zweck wurde Protein A beschichtetes HPLC-Material (Protein A HyperD 20) mit einer Partikelgröße von 20 µm verwendet. Je 10 µl der Suspension des HPLC-Materials wurden abzentrifugiert und 3 mal mit PBS gewaschen. Das getrocknete Material wurde dann mit je 10 µl CAH2\_1-MVH-induziertem Antiserum und mit Präimmunserum als Negativkontrolle suspendiert. Daraufhin wurde 15 min unter Schütteln inkubiert, abermals abzentrifugiert und 3 mal mit PBS gewaschen. Sodann wurden die behandelten Materialien, sowie unbehandeltes Material, mit je 10 µl der Cy5-markierten Carboanhydrase II Lösung (70 µg/ml) 15 min unter Schütteln inkubiert und 3 mal mit PBS gewaschen. 0,5 µl der Suspension wurden dann auf einen Objektträger aufgetragen und mittels Klebefilm fixiert. Der erhaltene Objektträger wurde schließlich mit dem Laserscanner (Storm 860 Fa. Molecular Dynamics) gescannt und die Signale mit der Imagequant V5.0 Software quantifiziert. Das Ergebnis ist in Abb. 4.5.4 und Tab. 4.5.3 dargestellt.

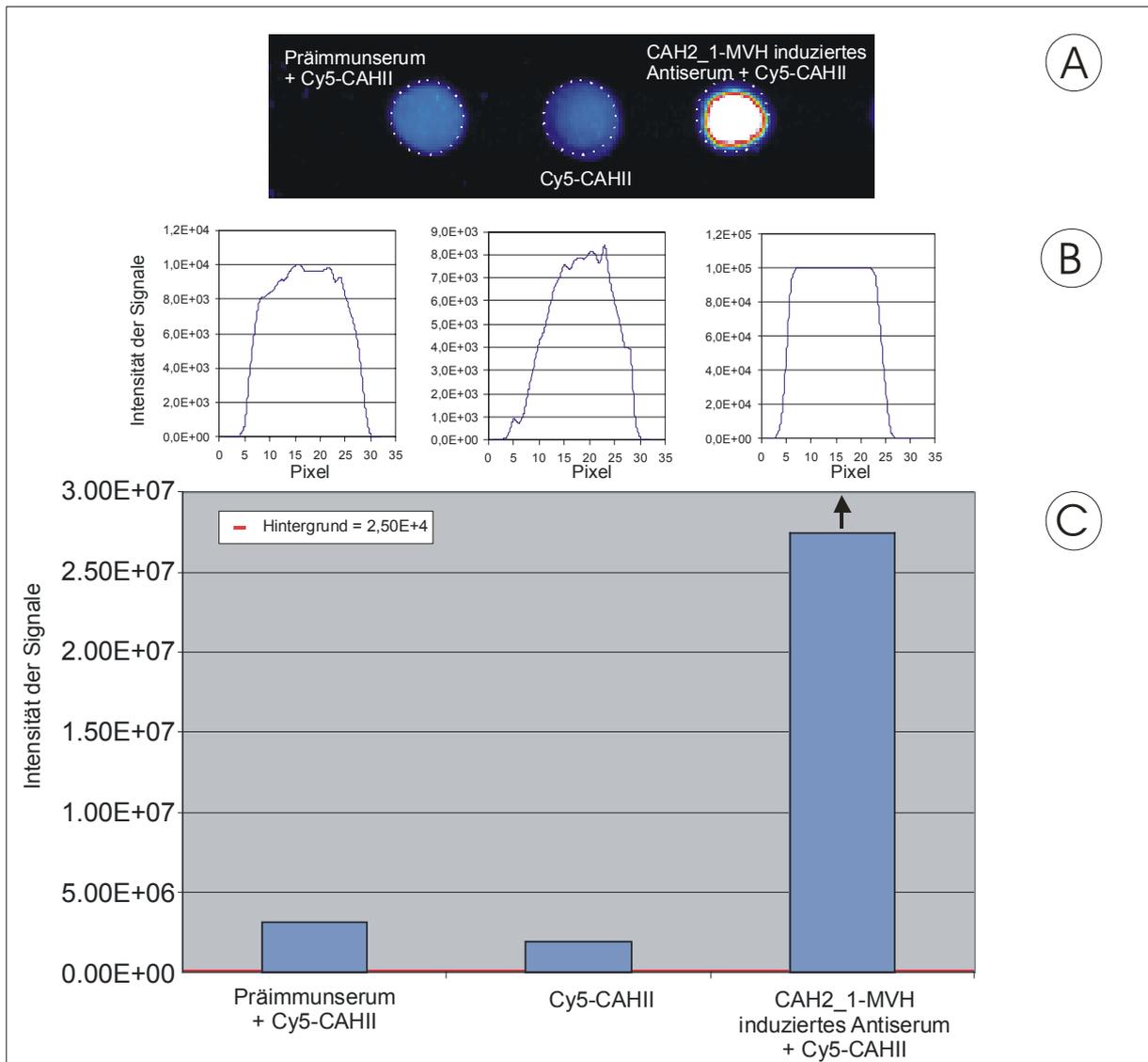


Abb. 4.5.4 Scan der Protein A Partikel und quantitative Auswertung der Signale. Die Werte stellen das Integral der Intensitäten über die Gesamtfläche dar. ↑ = Sättigungssignale.

	Präimmunserum + Cy5-CAHII	Cy5-CAHII	CAH2_1-MVH Serum + Cy5-CAHII
Integrierte Intensität	3,08E+6	1,94E+6	(2,75E+7) ↑
Signal/Hintergrund	123,2	77,6	(1028) ↑
Signal/Präimmunserum	1,0	0,6	(> 8,3) ↑

Tab. 4.5.3 Signalintensitäten auf Objektträgern mit Protein A HPLC Material und die Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisse. ↑ = Sättigungssignale.

Es wurde festgestellt, dass nur das Material, welches mit CAH2\_1-MVH-induziertem Antiserum behandelt worden war, ein starkes Signal ergab. Es lag im Sättigungsbereich des Scanners und war mindestens um den Faktor 8,3 größer als das Signal des Präimmunserums der entsprechenden Maus. Das mit Präimmunserum bzw. das ohne Serum behandelte Material ergab im gegensatz dazu erwartungsgemäß nur schwache Signale. Um die Sättigungsgrenze und die Sensitivitätsgrenze des Nachweissystems zu ermitteln, wurde ein neuer Versuch mit

einer Verdünnungsreihe der Cy5-markierten Carboanhydrase II durchgeführt. Das Ergebnis ist Abb. 4.5.5 und Tab. 4.5.4 zu entnehmen.

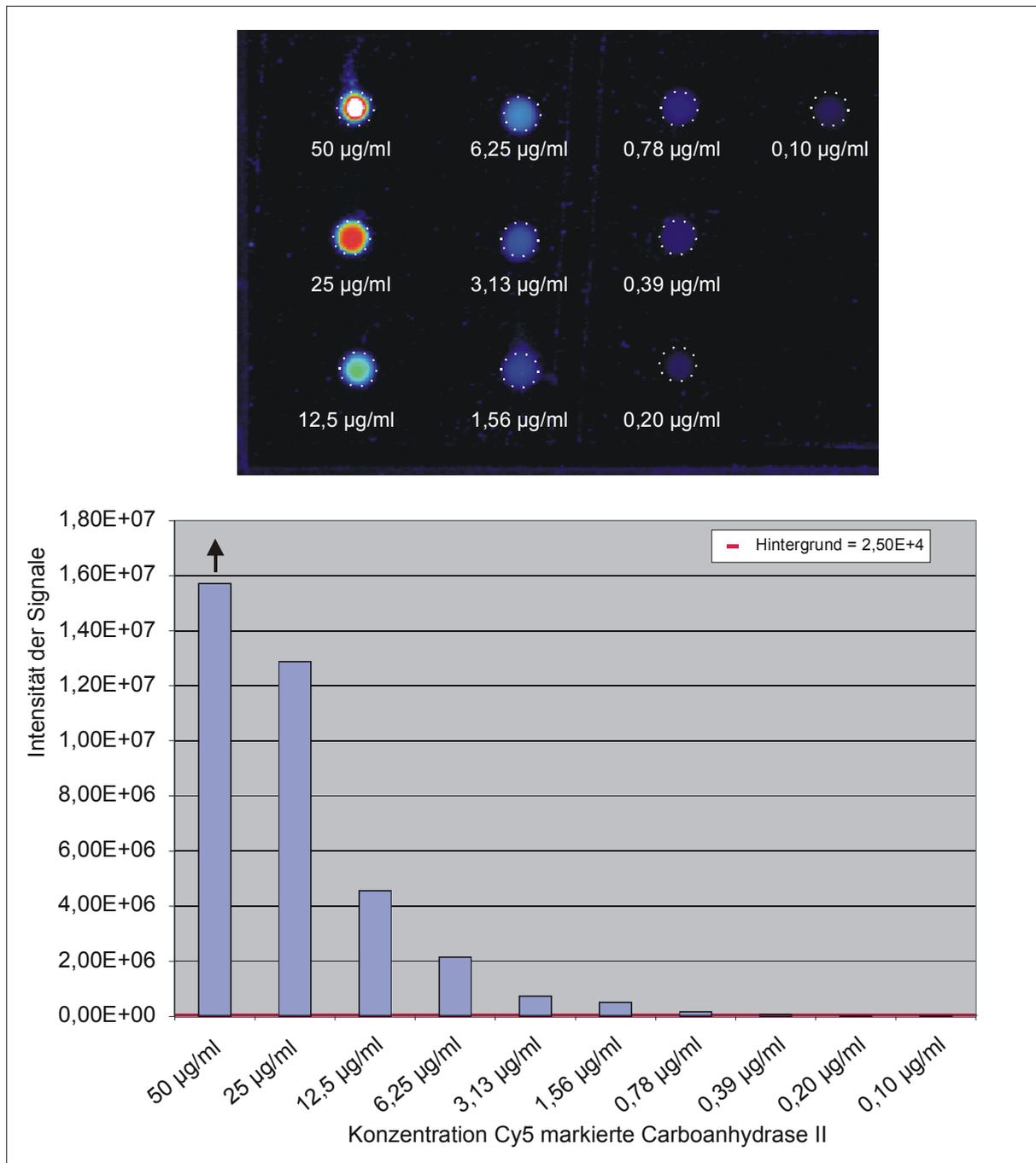


Abb. 4.5.5 Scan der Protein A HPLC Materialien. Der Assay wurde mit einer Verdünnungsreihe aus Cy5-markierter Carboanhydrase durchgeführt. Die Werte stellen das Integral der Intensitäten über die Gesamtfläche dar. ↑ = Sättigungssignale.

Konzentration	50 µg/ml	25 µg/ml	12,5 µg/ml	6,25 µg/ml	3,13 µg/ml
Intensität	(1,6E+7)↑	1,3E+7	4,6E+6	2,1E+6	7,3E+5
Signal/Hintergrund	(> 640)↑	520	160	84	29
Konzentration	1,56 µg/ml	0,78 µg/ml	0,39 µg/ml	0,20 µg/ml	0,10 µg/ml
Intensität	5,0E+5	1,6E+5	6,3E+4	2,7E+4	2,6E+4
Signal/Hintergrund	20	6	3	1	1

Tab. 4.5.4 Signalintensitäten in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration und die Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisse. ↑ = Sättigungssignale.

Es zeigte sich, dass bis zu einer Cy5-markierten Carboanhydrase II-Konzentration von 0,39 µg/ml, Signale erhalten werden konnten, die mindestens um den Faktor 2 über dem Background lagen. Da von den drei getesteten festen Phasen das Protein A Material das beste Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis bzw. die größten Signalunterschiede zwischen Präimmenserum und CAH2\_1-MVH-induziertem Antiserum ergab, wurden die folgenden Experimente mit diesem Träger durchgeführt.

#### 4.5.2 Detektion einiger Proteine aus Cy5-markiertem Zell-Lysat humaner Magenschleimhaut

Zur Herstellung des im folgenden Abschnitt verwendeten Cy5-markiertem Magenschleimhaut Lysates wurde das Gewebe unter Stickstoffkühlung zerrieben und das feine Pulver in PBS aufgenommen. Das Lysat mit einer Protein-Konzentration von 1,5 mg/ml Protein wurde mit Cy5-NHS (Amersham Pharmacia) markiert und überschüssiges Cy5-NHS mittels Gel-Ausschlusschromatographie (Sephadex-G-25-Säule) abgetrennt. Für alle in diesem Abschnitt durchgeführten Experimente wurde das in Abschnitt 4.5.1.3 evaluierte Protein A beschichtete Material verwendet. Hierfür wurden jeweils 10 µl der Suspension der Protein A Partikel getrocknet und mit dem jeweiligen Seren suspendiert, geschüttelt und nach 15 min Inkubationszeit, je 3 mal mit PBS gewaschen. Daraufhin wurde das Material mit 10 µl des Fluoreszenz-markierten Lysates für 15 min suspendiert und geschüttelt, 3 mal mit PBS gewaschen und jeweils 0,5 µl der Suspension auf einen Objektträger gegeben.

#### 4.5.2.1 Detektion von Carboanhydrase II aus Cy5-markiertem Zell-Lysat humaner Magenschleimhaut

Zur Detektion der Carboanhydrase wurde CAH2\_1-MVH-induziertes Antiserum (Siehe Abschnitt 4.3.1.3) und das entsprechende Präimmunserum verwendet. Um die Signalintensitäten des Präimmunserums und des Anti-CAH2\_1-MVH Serums bei unterschiedlichen Konzentrationen an Gesamtprotein zu bestimmen, wurde das Experiment mit einer Verdünnungsreihe des Zell-Lysates durchgeführt. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 4.5.5 zusammengefasst.

Konzentration Zell-Lysat	Intensität CAH2_1-induziertes Antiserum	Intensität Präimmunserum	Verhältnis Präimmunserum/Serum (Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis)
1 mg/ml	(1,24E+07)↑	9,13E+06	(> 1,4)↑
* 0,5 mg/ml	9,59E+06	4,14E+06	2,3
* 250 µg/ml	4,31E+06	6,99E+05	6,2
* 125 µg/ml	2,49E+06	6,19E+05	4,0
* 62,5 µg/ml	5,03E+05	7,75E+04	6,5
* 31,3 µg/ml	1,20E+05	4,00E+04	3,0
* 15,6 µg/ml	8,56E+04	2,99E+04	2,9
* 7,8 µg/ml	3,66E+04	2,78E+04	1,3
* 3,9 µg/ml	3,05E+04	2,72E+04	1,1
* 2 µg/ml	2,89E+04	1,73E+04	1,7

Tab. 4.5.5 Intensitäten der Signale des Präimmun- bzw. des CAH2\_1-MVH-induzierten Serums und die Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisse. ↑ = Sättigungssignale; \* = linearer Bereich mit Korrelationskoeffizient  $r > 0,99$ .

Den Scan des Objektträgers mit grafischer Darstellung der Signalintensitäten zeigt Abb. 4.5.6.

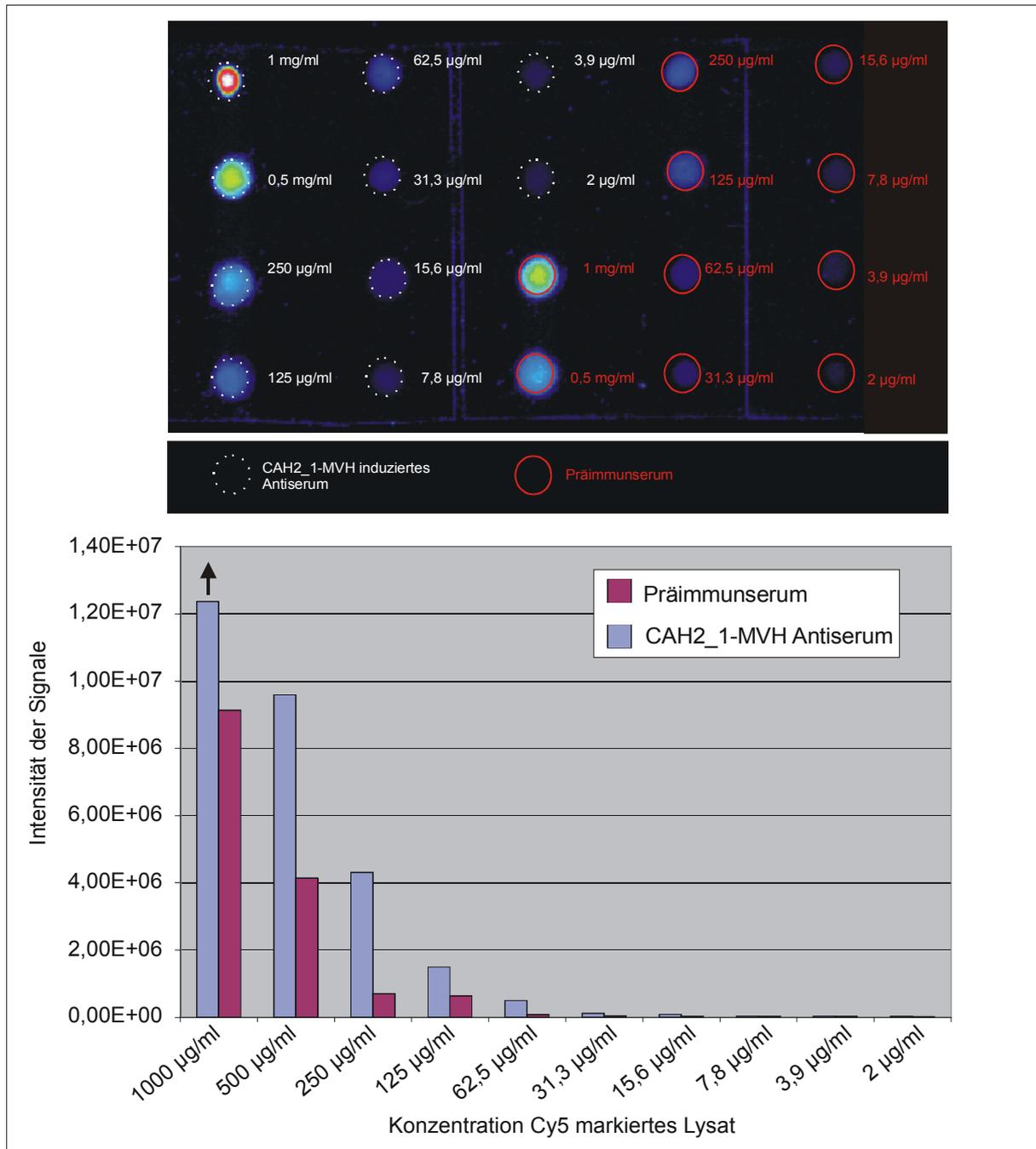


Abb. 4.5.6 Scan des Objektträgers zur Detektion von Carboanhydrase II. Das Experiment wurde mit einer Verdünnungsreihe aus Cy5-markiertem Lysat humaner Magenschleimhaut durchgeführt. Die Werte stellen das Integral der Intensitäten über die Gesamtfläche dar. ↑ = Sättigungswerte.

Bei Protein-Konzentrationen zwischen 500 µg/ml und 15,6 µg/ml wurden Signalintensitäten erhalten, die mindestens um den Faktor 2 größer waren als die Signale der Präimmunseren. Der lineare Bereich (Korrelationskoeffizient  $r > 0,99$ ) erstreckte sich zwischen 500 µg/ml und 2 µg/ml.

4.5.2.2 Detektion von IF in Cy5-markiertem Zell-Lysat humaner Magenschleimhaut

Der Versuch aus Abschnitt 4.5.2.1 wurde zusätzlich mit MVH-HIF348-induziertem Antiserum bzw. dem entsprechenden Präimmunserum (siehe Abschnitt 4.3.1.1) durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 4.5.7 und die Werte sind in der Tabelle 4.5.6 zusammengefasst.

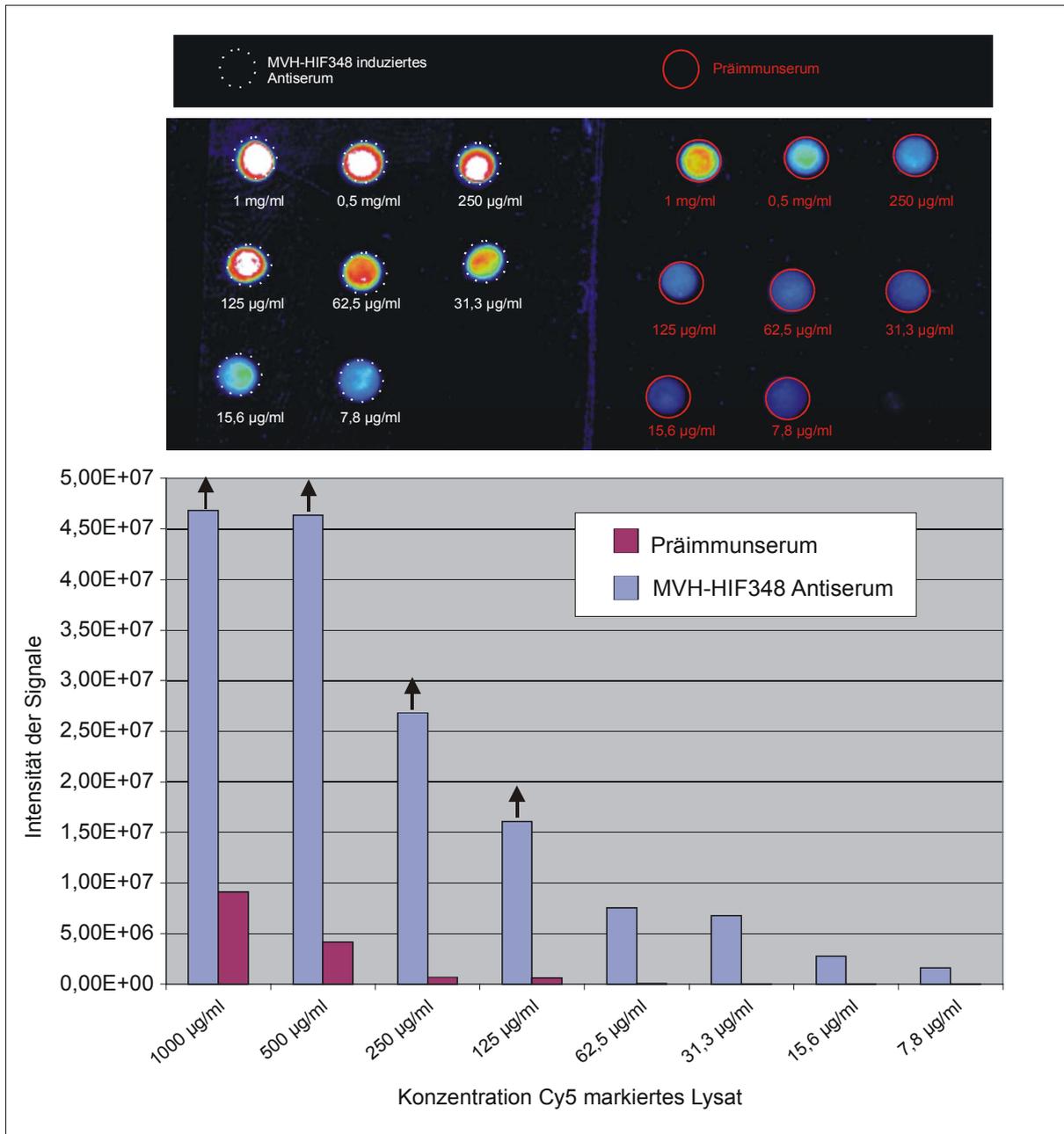


Abb. 4.5.7 Scan des Objektträgers zur Detektion von IF. Die Werte stellen das Integral der Intensitäten über die Gesamtfläche dar. ↑ = Sättigungssignale.

Konzentration Zell-Lysat	Intensität MVH-HIF348-induziertes Antiserum	Intensität Präimmunserum	Verhältnis Präimmunserum/Serum (Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis)
1 mg/ml	(4,68E+07)↑	9,13E+06	(> 5,1)↑
0,5 mg/ml	(4,64E+07)↑	4,14E+06	(> 11,2)↑
250 µg/ml	(2,68E+07)↑	6,99E+05	(> 38,3)↑
125 µg/ml	(1,61E+07)↑	6,39E+05	(> 25,2)↑
62,5 µg/ml	7,55E+06	7,75E+04	97,4
* 31,3 µg/ml	6,76E+06	4,00E+04	169,0
* 15,6 µg/ml	2,74E+06	2,99E+04	91,6
* 7,8 µg/ml	1,61E+06	2,78E+04	57,9

Tab. 4.5.6 Intensitäten der Signale des Präimmun- bzw. des MVH-HIF348-induzierten Serums und die Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisse. ↑ = Sättigungssignale; \* = Linearer Bereich mit Korrelationskoeffizient  $r > 0,99$ .

Es wurde deutlich, dass bei Protein-Konzentrationen zwischen 1 mg/ml und 7,8 µg/ml die IF-Detektion Signalintensitäten lieferten, die um mindestens den Faktor 5 größer waren als die Signale des Präimmunserums. Das beste Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis (169,0) wurde bei einer Protein-Konzentration von 31,3 µg/ml erreicht. Der lineare Bereich (Korrelationskoeffizient  $r > 0,99$ ) erstreckte sich zwischen 31,3 µg/ml und 7,8 µg/ml.

#### 4.5.2.3 Detektion der Aldehyddehydrogenase Klasse 1 aus Cy5-markiertem Zell-Lysat humaner Magenschleimhaut

Der Versuch aus Abschnitt 4.5.2.1 und Abschnitt 4.5.2.2 wurde auch für die Detektion von Aldehyddehydrogenase Klasse 1 durchgeführt. Hierfür wurde MVH-ADH1\_1-induziertes Antiserum bzw. das entsprechende Präimmunserum verwendet (siehe Abschnitt 4.3.1.1). Das Ergebnis ist Abb. 4.5.8 dargestellt und die Werte sind der Tabelle 4.5.7 zu entnehmen.

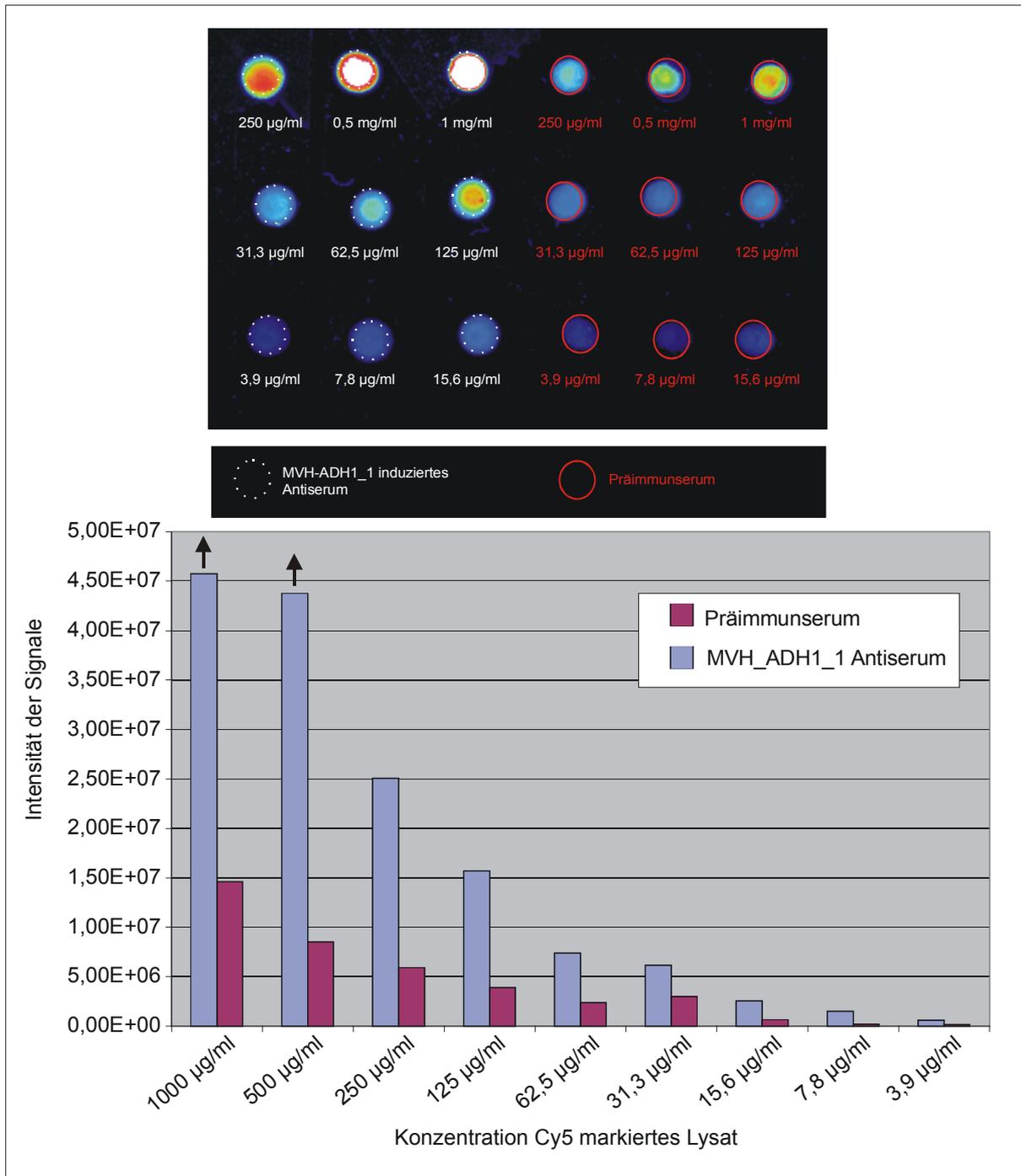


Abb. 4.5.8 Scan des Objektträgers zur Detektion der Aldehyddehydrogenase. Die Werte stellen das Integral der Intensitäten über die Gesamtfläche dar. ↑ = Sättigungssignale.

Konzentration Zell-Lysat	Intensität MVH-AdH1_1-induziertes Antiserum	Intensität Präimmunserum	Verhältnis Präimmunserum/Serum (Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis)
1 mg/ml	(4,58E+07)↑	1,46E+07	(> 3,1)↑
0,5 mg/ml	(4,38E+07)↑	8,51E+06	(> 5,1)↑
* 250 µg/ml	2,51E+07	5,92E+06	4,2
* 125 µg/ml	1,57E+07	3,91E+06	4,0
* 62,5 µg/ml	7,40E+06	2,36E+06	3,1
* 31,3 µg/ml	6,18E+06	3,01E+06	2,1
* 15,6 µg/ml	2,56E+06	6,42E+05	4,0
* 7,8 µg/ml	1,50E+06	1,72E+05	8,7
3,9 µg/ml	5,96E+05	1,64E+05	3,6

Tab. 4.5.7 Intensitäten der Signale des Präimmun- bzw. des MVH-ADH1\_1-induzierten Serums und die Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisse ↑ = Sättigungssignale und \* : Linearer Bereich mit Korrelationskoeffizient  $r > 0,99$ ).

Auch bei diesem Experiment wurde deutlich, dass bei allen getesteten Magenschleimhaut Zell-Lysat-Konzentrationen sich das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis mindestens um den Faktor 2 unterschied. Der lineare Bereich (Korrelationskoeffizient  $r > 0,99$ ) erstreckte sich zwischen 250 µg/ml und 7,8 µg/ml.

## 5. Diskussion

Für die funktionelle Genomforschung ist die Verfügbarkeit spezifischer und sensitiver Sonden (meist Oligonukleotide) für individuelle Gene ein essentielles Instrument geworden. So sind diese Sonden integraler Bestandteil vieler Techniken wie beispielsweise der PCR, Differential Display, FISH, TaqMan und DNA-Chips. Auf der Protein-Ebene stellen, bezüglich Spezifität und Sensitivität, Antikörper das Pendant zu diesen Oligonukleotid-Sonden dar. Jedoch ist die Herstellung von Antikörpern sehr aufwendig und weitaus kostspieliger als die Synthese von Oligonukleotiden. Als Konsequenz sind für die Mehrzahl der bekannten Proteine, und vor allem für die aus DNA-Sequenzen abgeleiteten jedoch noch nicht experimentell nachgewiesenen Proteine, keine geeigneten Antikörper verfügbar. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich in diesem Zusammenhang mit der systematischen Ausarbeitung und Optimierung von standardisierten Verfahren zur Generierung von Antikörpern durch Immunisierung von Tieren mit kurzen synthetischen Peptiden. Die so erhaltenen Antiseren werden bezüglich ihrer Spezifität und Sensitivität, sowie hinsichtlich ihrer Eignung als Sonden im Kontext funktioneller Proteomanalysen evaluiert. Zusätzlich wird ein Verfahren entwickelt, wie ausgehend von Peptid-induzierten Rohseren „custom designed“ Antikörperchips hergestellt werden können, die es ermöglichen Einzelproteine in komplexen Proteingemischen schnell und sensitiv zu detektieren.

### 5.1 Die Immunisierung mit synthetischen Peptiden zur Generierung von Antikörpern hat wesentliche Vorteile

Die einfachste Methode, Antikörper zu erzeugen, ist die Immunisierung von Tieren mit den entsprechenden Antigenen. Die erhaltenen polyklonalen Antiseren sind häufig hoch sensitiv und spezifisch. In den Fällen, in denen das Antigen nicht in ausreichender Menge (einige 100 µg) zur Verfügung steht, muss das Antigen jedoch erst hergestellt werden. Hierfür können die Antigene rekombinant exprimiert oder aber Antigenfragmente (Peptide) synthetisiert werden. Rekombinante Techniken wie *in vivo* [100] und *in vitro* Genexpression [101] erfordern zunächst eine korrekte Expressionsklonierung und anschließend teilweise recht aufwendige Reinigungen der erhaltenen Proteine. Synthetische Peptid-Antigene können im Gegensatz dazu schnell, parallel, kostengünstig und in großer Menge hergestellt werden

[63, 65]. Hierfür ist keinerlei „biologisches“ Material, sondern ausschließlich *in silico* Sequenzinformation (DNA- bzw. Proteinsequenzen) notwendig. Sogar die Produktion von Antikörpern gegen Proteine, bei denen nur DNA-Teilssequenzen (z.B. ESTs) bekannt sind, ist mit dieser Technik realisierbar. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Peptidsequenz innerhalb des Proteins und damit auch der Bereich, an dem die Antikörper binden, deduktiv und *a priori* ausgewählt wird. So kann einerseits die Herstellbarkeit und die Löslichkeit des Antigens durch die Wahl geeigneter Sequenzen gezielt beeinflusst werden. Andererseits können durch Homologievergleiche der ausgewählten Sequenzen mit allen bekannten DNA und Proteinsequenzen [91, 102] Ähnlichkeiten zu anderen Proteinen und die damit verbundene Gefahr, unerwünschte Kreuzreaktivitäten der Antikörper zu induzieren, von vorneherein vermieden werden.

Obwohl bereits eine Vielzahl Peptid-induzierter Antikörper gegen die unterschiedlichsten Proteine entwickelt wurden [66-71], differieren die in der Literatur beschriebenen Verfahren stark. Außerdem sollten die im Rahmen von Proteomstudien verwendeten Techniken, einigen wichtigen Anforderungen genügen. Durch die hohe Komplexität der im Rahmen von Proteomstudien zu analysierenden Proteingemische werden nur parallele und weitestgehend automatisierbare Techniken die Analyse von Proteomen ermöglichen. Die Grundvoraussetzung zur parallelen Hochdurchsatzanwendung eines Verfahrens ist die Verwendung von standardisierten Methoden. Das Endergebnis sowie die erhaltenen Zwischenschritte sollten so reproduzierbar und validierbar wie möglich sein. Für die Generierung Peptid-induzierter Antikörper bedeutet dies, dass die zur Herstellung der Antigene angewendeten Verfahren Produkte liefern müssen, die hinsichtlich ihrer chemischen Struktur, ihrer Menge und ihren Reinheitsgrades möglichst gut charakterisierbar sind. Außerdem sollte zur Analyse der nach der Immunisierung anfallenden Seren ein System zur Verfügung stehen, das unabhängig von der Sequenz der Peptid-Antigene gleichmäßig sensitiv und reproduzierbar ist. Aus diesen besonderen Anforderungen heraus, die ein Verfahren zur Herstellung Peptid-induzierter Antikörper im Rahmen von Proteomstudien mit sich bringen soll, war es unerlässlich, die bereits publizierten Verfahren hinsichtlich ihrer Eignung vergleichend zu evaluieren, sie zu optimieren und zu standardisieren. Für die vergleichenden Studien wurde humane Magenschleimhaut als zu untersuchendes Lysat gewählt weil erstens, aufgrund eines vorherigen Projektes dieses Material in ausreichender Menge zur Verfügung stand und zweitens dieses humane Material ein genügend komplexes Proteingemisch für diese Evaluierungen darstellt. So konnten auf einem silbergefärbten Gel dieses Materials 653 Spots nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.3.1). Als Zielprotein wurde humaner „Gastric

Intrinsic Factor“ (IF) gewählt. IF ist ein Protein das in der Magenschleimhaut exprimiert wird. Es fördert durch spezifische Rezeptor-vermittelte Endozytose die Resorption des essentiellen Vitamins Cobalamin (Vitamin B<sub>12</sub>) ins Ileum (Krummdarm). IF ist ein gutes und anspruchsvolles Testsystem weil es zum einen stark glykosyliert ist [103], also getestet werden kann, ob posttranslational modifizierte Proteine mit dem System zugänglich sind, und zum anderen nicht übermäßig stark exprimiert wird [104] und folglich dieses Protein nur mit einem sensitiven Verfahren nachgewiesen werden kann. Als Modellpeptid wird das von der Sequenz abgeleitete Peptid HIF348 (humaner „gastric intrinsic factor“ AS 348-360: EEAQRKNPMFKFE) verwendet. Das Peptid ist in wässrigem Milieu gut löslich und zeigte keine Homologie zu anderen bekannten humanen Proteinsequenzen.

## **5.2 Entwicklung eines standardisierten ELISAs zur Titration Peptid-induzierter Antiseren**

Die Grundvoraussetzung für ein standardisiertes Verfahren zur Herstellung von Peptid-induzierten Antikörpern ist ein geeignetes System zur Titration der mit Peptid-Antigenen-induzierten Antiseren. Der ELISA mit Antigen-beschichteten Mikrotiterplatten ist eine der effizientesten Methoden, um eine Vielzahl von Seren zu titrieren [96, 97]. Der Umgang mit Mikrotiterplatten ist einfach, es lassen sich viele Titrations parallel durchführen und durch die gute Waschbarkeit der Platten ergeben sich, im Vergleich zu Partikel- und Membran-basierten Assays, hervorragende Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisse. Ganz entscheidend für die Sensitivität eines ELISA-Systems zur Titration von Seren ist eine möglichst effiziente und konstant hohe Beladung der Mikrotiterplatten mit dem Antigen.

### **Die direkte Beschichtung von Standard-Mikrotiterplatten mit kurzen Peptiden ist kein geeignetes Verfahren**

Prinzipiell ist die direkte Beschichtung von Mikrotiterplatten mit kurzen synthetischen Peptiden zwar naheliegend und sehr einfach durchzuführen, jedoch nicht die geeignete Vorgehensweise weil die Wechselwirkungen zwischen Peptid und Plattenoberfläche oft zu schwach sind, um eine effiziente Beschichtung der Mikrotiterplatten mit Peptiden zu gewährleisten [105]. Der Versuch, eine Standard-Polystyrol-Mikrotiterplatte mit dem Modellpeptid HIF348 zu beschichten, führte erwartungsgemäß zu vergleichsweise niedrigen Signalintensitäten im ELISA ( $OD_{450} = 0,19$  bei 1/50 Verdünnung des Serums; siehe Abbildung 4.1.2). Da bei der Bindung der Peptide an Standard-Polystyrol-Mikrotiterplatten Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Interaktionen eine Rolle spielen [106], ist die

Beschichtungseffizienz ohnehin direkt von der Sequenz des Peptids abhängig. Titrationsen von Seren, die mit verschiedenen Peptiden induziert wurden, sind somit kaum vergleichbar. Aus diesem Grunde wurden alternative Verfahren zur Beschichtung von Mikrotiterplatten mit Peptiden evaluiert und verglichen.

### **Vergleich verschiedener Verfahren zur Beschichtung von Mikrotiterplatten mit Peptiden**

Häufig werden die Peptide vor der Beschichtung von Mikrotiterplatten, an Trägerproteine gekoppelt oder quervernetzt. Die Mikrotiterplatten werden anschließend mit diesen Konstrukten beschichtet [73, 105]. Hierbei ist zu beachten, dass andere Proteine und andere Linker als bei den für die Immunisierung verwendeten Konstrukten verwendet werden müssen. So wird vermieden, dass nicht die Immunantwort gegen das Trägerprotein oder den Linker sondern ausschließlich die Immunantwort gegen das Peptid erfasst wird. Jedoch hat diese Vorgehensweise den großen Nachteil, dass die Effizienz der Peptid-Protein-Kopplung in Abhängigkeit von der Sequenz des zu koppelnden Peptides stark schwankt [107]. Ohne Kenntnis der Kopplungseffizienz ist aber ein Vergleich der Titer von Seren, die mit verschiedenen Peptiden induziert wurden, nur sehr eingeschränkt möglich. Deshalb muss vor der Beschichtung der Mikrotiterplatten für jedes Peptid-Protein-Konstrukt die Kopplungsrate bestimmt werden. Dies ist aber sehr schwierig und sehr aufwendig [73]. Dies liegt vor allem daran, dass bei der Kopplung von Peptiden an Proteine im Prinzip alle reaktiven Seitengruppen des Peptides mit allen reaktiven Seitengruppen des Proteins reagieren können. Aus diesem Grunde entsteht zumeist ein hoch komplexes Gemisch verschiedener Peptid-Protein-Konstrukte, welches schwer analysierbar und charakterisierbar ist. Deswegen wurde dieses Verfahren nicht in Betracht gezogen und stattdessen einige alternative Beschichtungsverfahren evaluiert. Getestet wurde die kovalente Bindung von Peptiden über Aminofunktionen an Mikrotiterplatten mit N-Oxysuccinimid-Gruppen, die Beschichtung von Polystyrol-Mikrotiterplatten mit N-terminal durch Polyoxyethylenreste (POE) verlängerten Peptiden und schließlich die Kopplung von N-terminal biotinylierten Peptiden an Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten. Hierbei wurden zwischen dem N-Terminus des Peptides und dem Biotin zwei Aminocaprinsäure-Bausteine als Spacer eingeführt, um die Maskierung N-terminaler Peptid-Bereiche durch Streptavidin und daraus resultierende sterische Behinderung N-terminal an das Peptid bindender Antikörper zu vermeiden [108].

Im Rahmen des Vergleiches der unterschiedlichen Verfahren konnte mit dem Modellpeptid HIF348 gezeigt werden, dass all diese Beschichtungsverfahren bei jeder der getesteten

Serumverdünnungen im ELISA signifikant höhere Signale ergaben als die direkte Beschichtung von Polystyrol-Mikrotiterplatten mit nicht modifiziertem Peptid (Abbildung 4.1.2). So wurde bei Verdünnungen des Serums zwischen 1/50 und 1/250 eine mindestens 5-fache Steigerung, bei Verdünnungen des Serums zwischen 1/1250 und 1/6250 mindestens eine Verdoppelung der Signalintensitäten gegenüber der direkten Beschichtung mit dem Modellpeptid beobachtet.

### **Der Streptavidin-vermittelte Peptid-ELISA hat gegenüber anderen Verfahren entscheidende Vorteile**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Streptavidin-vermittelte Beschichtung favorisiert, weil dieses System gegenüber den anderen Beschichtungsmethoden einige wesentliche Vorteile hat. Zunächst ist es den anderen Verfahren in Punkto Sensitivität bei höheren Verdünnungen überlegen (Abbildung 4.1.2). So ließen sich bei einer Serumverdünnung von 1/6250 viermal höhere Signalintensitäten erzielen als mit allen anderen Verfahren. Ein weiterer entscheidender Vorteil dieser Beschichtungsmethode resultiert aus der Tatsache, dass das Biotin ausschließlich N-terminal an das Peptid synthetisiert wird. Als Konsequenz ergibt sich, dass dieses System die Peptide unabhängig von deren Sequenz ausschließlich N-terminal an die feste Phase bindet. Die Orientierung von POE-Peptiden bzw. die Orientierung von Peptiden mit mehreren Aminofunktionen an NOS-Peptid Mikrotiterplatten ist demgegenüber heterogen und dürfte je nach Peptidsequenz starken Schwankungen unterliegen. Ein weiterer Vorteil der Beschichtung von Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatten mit biotinylierten Peptiden ist, dass durch die vergleichsweise starke Wechselwirkung zwischen Biotin und Streptavidin ( $K_d = 10^{-15}$  M) weitestgehend von der Peptidsequenz unabhängige, konstant hohe Beschichtungsraten erzielt werden können.

### **5.3 Evaluierung von „Carriern“ zur Steigerung der Immunogenität von Antigenen**

Zur Steigerung der Immunogenität von kurzen synthetischen Peptiden müssen diese zuvor an sogenannte Carrier gekoppelt werden [66, 109]. Als Carrier werden meist Proteine verwendet. Als Alternative dazu wurden auch die Verwendung vollsynthetischer Carrier auf Kunststoffbasis [78, 79, 110, 111] und die Verwendung von diskreten T-Zell-Epitopen [66, 88, 89] in der Literatur beschrieben. Da die Verwendung geeigneter Carriersysteme ein entscheidender Schritt für die Generierung sensitiver sowie spezifischer Peptid-induzierter

Antiseren ist, wurden mehrere dieser Carriersysteme getestet und miteinander verglichen. Als Modellpeptid wurde das bereits zur Evaluierung der ELISA-Systeme verwendete HIF348 Peptid (humaner „gastric intrinsic factor“ AS 348-360: EEAQRKNPMPFKFE) verwendet. Die Seren aus Immunisierungen von jeweils zwei Mäusen wurden mit dem evaluierten Streptavidin-vermittelten Peptid-ELISA getestet. Als Seren mit ausreichend hohem Titer wurden diejenigen erachtet, die bei Verdünnungen von mindestens 1/400 noch Signalintensitäten von  $OD_{450} \geq 0,3$  ergaben, was in allen Fällen mindestens dem 4-fachen des Hintergrundsignals (ELISA mit Präimmenserum) entsprach. Erfahrungsgemäß waren Seren, die diesen Schwellenwert nicht erreichten, hinsichtlich Sensitivität und Spezifität im Kontext der vorliegenden Arbeit ungeeignet. Neben der erzielten Steigerung der Immunantwort wurde auch auf die einfache Herstellbarkeit und die auf einfache Charakterisierbarkeit der Peptid-Carrier-Konstrukte Wert gelegt.

### **Carrier auf Proteinbasis: Nur bovines Thyreoglobulin konnte die Immunantwort gegen das Modellpeptid verstärken**

Die klassische Methode zur Erhöhung der Immunogenität von Peptiden ist die Kopplung der Peptide an Carrierproteine [72-75] wie BSA, KLH, Ovalbumin und Thyreoglobulin. Das Peptid soll dabei in erster Linie als B-Zell-Epitop dienen und der Carrier T-Helferzell-Epitope liefern. Durch Immunisierung mit solchen Konstrukten kann eine T-Zell vermittelte Immunantwort gegen das Peptid induziert werden.

Getestet wurde die Kopplung des Modellpeptides (HIF348) an bovines Thyreoglobulin und an BSA. Zur Titration der Seren wurde das evaluierte Streptavidin ELISA System verwendet. Es zeigte sich, dass die Immunisierung mit BSA-HIF348 Konstrukten zu keiner Steigerung der Immunantwort im Vergleich zur Immunisierung mit dem ungekoppeltem Peptid führte. Im Gegensatz hierzu ließ sich durch Injektion mit Thyreoglobulin-HIF348 Konstrukten die Immunantwort im Vergleich zur Immunisierung mit dem nicht modifizierten HIF348 Peptid deutlich steigern (Abbildung 4.2.5). So ergaben diese Seren bei Verdünnungen von 1/3200 (Maus 1) bzw. 1/6400 (Maus 2) Signalintensitäten von  $OD_{450} \geq 0,3$  und erfüllten das Kriterium für Seren ausreichend hohen Titer (bei Verdünnung von mindestens 1/400  $OD_{450} \geq 0,3$ ). Aus diesem Befund heraus wurde im Rahmen der Arbeit bovines Thyreoglobulin als Carrier auch für weitere Immunisierungen verwendet.

Der Einsatz von Proteinen als Carrier hat jedoch einige Nachteile. Der Hauptnachteil ist, dass durch den Protein-Carrier meist eine Vielzahl von T-Zell und B-Zell Epitopen präsentiert werden. Damit steigt das Risiko, dass die Antiseren unerwünschte Kreuzreaktionen mit

anderen Proteinen zeigen. Auch das Risiko, dass die Immunantwort sich vorrangig gegen durch die Kopplung hervorgerufene „künstliche“ Epitope (Neodeterminanten) richtet, die auf dem zu detektierenden Zielprotein nicht zu finden sind, ist groß. Ein weiterer Nachteil ist, dass durch die Kopplung von Peptiden an Proteine ein hoch komplexes Gemisch verschiedener Moleküle entsteht, das schwer charakterisierbar ist. Da prinzipiell jede reaktive Seitenkette des Peptides mit jeder reaktiven Seitenkette des Proteins reagieren kann ist das resultierende Gemisch so komplex, dass die Bestimmung der Kopplungseffizienz mit schnellen Verfahren wie HPLC oder MS nicht möglich ist und verhältnismäßig aufwendige Verfahren, wie beispielsweise die Aminosäureanalyse oder der Zusatz von markierten Peptiden, angewendet werden müssen [73]. Aus diesen Gründen wurden noch weitere Carriersysteme evaluiert.

### **Carrier auf Kunststoffbasis: Die getesteten Carrier induzierten Immunantworten gegen die hoch-repetitiven Linker, nicht jedoch gegen das Modellpeptid**

Die in der Literatur beschriebenen Carrier auf Kunststoffbasis [78, 79, 110, 111] sollen gegenüber den klassischen Carrierproteinen den Vorteil haben, keine störenden Immunantworten gegen den Carrier zu induzieren. Der erste getestete Carrier stellt eine C-terminal an das Peptid gekoppelte Polyoxyethylenkette (POE:  $n = 45-70$ ) dar [79]. Dieses System soll neben der geringen Induktion von Immunantworten gegen den Carrier den zusätzlichen Vorteil haben, die Wasserlöslichkeit der Peptide zu erhöhen. Parallel dazu wurden zwei weitere Systeme getestet, bei denen das zur Synthese des Peptides verwendete Harz als Carrier Verwendung findet. Bei diesen harzgebundenen Peptiden sind die Peptidmoleküle über POE-Ketten als Spacer an das Polystyrol-Harz gekoppelt. Die Systeme unterscheiden sich dadurch, dass bei einem der Systeme die Peptide einfach [79] und beim anderen vierfach über eine Polylysin-Baumstruktur als sogenanntes „multiple antigenic peptide“ (MAP) [78, 81, 82] präsentiert werden (siehe Abbildung 4.2.2). Beide Systeme haben den Vorteil, optional als Säulenmaterial zur Immunoaffinitätsreinigung der erhaltenen Antikörper dienen zu können [78]. Als Nachteil aller drei Systeme ist zu erachten, dass die Reinigung und Charakterisierung dieser Kunststoff-Peptid Konstrukte schwer möglich ist. Dies liegt im Fall der löslichen POE-Peptid-Konstrukte daran, dass die POE-Ketten ein Gemisch aus 45 bis 70 Ethylenglykoleinheiten darstellen und folglich schlecht HPLC-gereinigt und auch schlecht mittels Massenspektrometrie analysiert werden können. Die am Syntheseharz gebundenen Peptide können ohnehin nicht gereinigt werden. Als Konsequenz muss zur Kontrolle zusätzlich das freie unmodifizierte Peptid hergestellt werden und die

Reinheit des Peptid-Kunststoff-Konstrukts durch Analyse des erhaltenen freien Rohpeptids abgeschätzt werden.

Die Immunisierungen mit den entsprechen HIF348-Modellpeptid-Carrier Konstrukten zeigten außerdem, dass in allen Fällen nur schwache Immunantworten gegen das Peptid induziert werden konnten. Keines der Konstrukte war in der Lage, eine stärkere Immunantwort zu induzieren als das unmodifizierte HIF348 Peptid (Abbildung 4.2.3). Jedoch war zu beobachten, dass die Harz-gekoppelten HIF348 Konstrukte ähnlich wie T-Zell-unabhängige Typ 2 Antigene (z.B. Polysaccharide) [112, 113] die Bildung von Antikörpern gegen den hoch-repetitiven Polyoxyethylen-Spacer induzierten (Abbildungen 4.2.4). Da mit Carriern auf Kunststoffbasis im Modellsystem keine Steigerung der Immunogenität erreicht wurde, sondern nur die unerwünschte Induktion einer Immunantwort gegen Polyoxyethylen beobachtet werden konnte, wurde diese Art der Carrier nicht weiter für die Produktion Peptid-induzierter Antikörper eingesetzt.

### **Carrier auf T-Zell-Epitop-Basis: Masernvirus-Fusionsprotein-T-Zell-Epitop (MVH) konnte die Immunantwort gegen das Modellpeptid verstärken**

Um eine zellvermittelte Immunantwort zu induzieren werden Protein-Antigene durch antigenpräsentierende Zellen (z.B. durch dendritische Zellen) aufgenommen und zu kleinen Peptidbruchstücken gespalten. Diese Peptide werden dann an die sogenannten MHC-II Moleküle (MHC-II = „major histocompatibility complex“-Klasse-II) gebunden und die entsprechenden Komplexe an der Zelloberfläche präsentiert [114-116]. Dieser Peptid-MHC-II-Komplex wird dann von  $CD4^+$  T-Helferzell-Rezeptoren der entsprechenden Spezifität in Kombination mit dem Co-Rezeptor CD4 gebunden. Diese Aktivierung führt zur Proliferation spezifischer  $CD4^+$  T-Helferzellen. T-Helferzellen wiederum sind in der Lage durch adhäsive Interaktion und durch die Ausschüttung von Zytokinen (voranging diverse Interleukine), die notwendigen Signale zur Aktivierung der B-Zellen zu geben. Nur wenn diese Interaktion zwischen T-Helferzellen und B-Zellen stattfindet kommt es zur Reifung der B-Zellen und schließlich dazu, dass die reifen B-Zellen zu Antikörper sezernierenden Plasmazellen ausdifferenzieren. Im weiteren Verlauf der Immunantwort wird die Affinität der Antikörper durch somatische Mutationen weiter optimiert („Affinitätsreifung“) [115, 116].

Mit der Entdeckung von T-Zell-Epitopen, die unabhängig vom individuellen MHC-Klasse-II Haplotyp [85] in Inzucht-Mäusestämmen wirksam sind [117], ergibt sich die Möglichkeit, T-Zell vermittelte Immunantworten gegen kurze, vollsynthetische Peptide zu induzieren.

Hierbei werden diese T-Zell-Epitope direkt an das Peptid, gegen das die Immunantwort gerichtet werden soll, synthetisiert [66, 88].

In BALB/c Mäusen wurde ein Tetanus-Toxin-T-Zell-Epitop (TT: AS 12-21) [117, 118] und ein Masernvirus-Fusions-Protein-T-Zell-Epitop (MVH: AS 288-302) [89, 119] als Carrier getestet. Diese Epitope wurden ausgewählt weil bereits experimentell gezeigt werden konnte, dass diese Peptide tatsächlich auch in den für die Immunisierungen verwendeten BALB/c (H-2<sup>d</sup>) Mäusen wirksame T-Zell-Epitope sind [120]. Dies ist nicht selbstverständlich. So konnte gezeigt werden, dass verschiedene T-Zell-Epitope je nach Mäuse-Inzuchtstämmen unterschiedlich stark wirksam sind [118]. Ein weiteres wichtiges Kriterium war die gute Synthetisierbarkeit der Epitope. Da die herzustellenden Konstrukte aus Hapten und Epitop für synthetische Peptide verhältnismäßig lang sind (in dieser Arbeit bis zu 34 AS), ist eine gute Synthetisierbarkeit mit hohen Ausbeuten für ein Verfahren zur Produktion vieler verschiedener Peptid-induzierter Antikörper essentiell.

Beide Epitope wurden N-terminal sowie C-terminal an das Modellpeptid HIF348 synthetisiert. Die Immunisierung mit diesen Konstrukten zeigte, dass es mit N-terminal gekoppeltem MVH gelang, eine deutliche Verstärkung der Immunantwort im Vergleich zu den Immunisierungen mit nicht modifiziertem Peptid zu erhalten (Abbildung 4.2.6). So wurde die bei Verdünnungen von 1/400 geforderte Absorption ( $OD_{450} \geq 0,3$ ) selbst bei Verdünnungen von 1/3200 noch überschritten. Aufgrund dieses Befundes wurde MVH als Carrier in weiteren Immunisierungen evaluiert.

Da die Bildung von Peptid-MHC-II-Komplexen ein äußerst komplizierter Vorgang unter Beteiligung unterschiedlichster Prozessierungspfade [114, 121] ist, war nicht davon auszugehen, dass nur N-terminales MVH-Peptid in der Lage ist, Immunantworten gegen Peptid-Antigene zu induzieren. Deshalb wurde auch C-terminales MVH-Peptid als Carrier weiter getestet.

### **Carrier auf T-Zell-Epitop-Basis haben gegenüber Carrierproteinen wesentliche Vorteile**

Einer der wesentlichen Vorteile der Carrier auf T-Zell-Epitop-basis ist, dass es sich um definierte Moleküle und nicht wie bei den Protein-gekoppelten Peptiden um ein Gemisch von verschiedensten Molekülen handelt. Sie lassen sich in größeren Mengen (mg bis g Maßstab) parallel und weitestgehend automatisiert herstellen. Zusätzlich lassen sie sich mit hochauflösender HPLC reinigen und unterliegen bezüglich ihrer Reinheit nur minimalen Schwankungen. Die sehr aufwendige Bestimmung der Kopplungseffizienz der Peptid-Haptene an Protein-Carrier entfällt und die Richtigkeit der Konstrukte kann

massenspektrometrisch verifiziert werden. Auch die Gefahr, Verunreinigungen durch die meist nicht in absoluter Reinheit erhältlichen Carrierproteine einzuschleppen, wird vermieden. Schließlich haben Carrier auf T-Zell-Epitop-Basis den großen Vorteil der Protein-Carrier, nämlich T-Helferzell-vermittelte Immunantworten zu induzieren, ohne deren Hauptnachteil zu haben, nämlich eine Vielzahl von T-Zell und B-Zell Epitopen zu präsentieren und so eventuell unerwünschte Immunantworten gegen anderen Proteine auszulösen.

### **Mit dem MVH T-Zell-Epitop als Carrier konnten höhere Quoten erfolgreicher Immunisierungen als mit Thyreoglobulin als Carrier erzielt werden**

Als Vertreter der „klassischen“ Protein-Carrier wurde bovines Thyreoglobulin verwendet und mit N-terminal bzw. C-terminal gekoppeltem Masernvirus-Fusions-Protein T-Zell-Epitop (MVH) als Vertreter der Carrier auf T-Zell-Epitop-Basis verglichen. Hierfür wurden insgesamt 72 BALB/c Mäuse mit insgesamt 10 verschiedenen Thyreoglobulin-Peptid-Konstrukten, mit 12 verschiedenen C-terminal MVH gekoppelten Peptiden und mit 12 verschiedenen N-terminal MVH gekoppelten Peptiden immunisiert. Die Immunantworten wurden durch Titration der Seren gegen die Peptide mittels ELISA-Analyse gemessen. Die Quote erfolgreicher Immunisierungen ( $OD_{450} \geq 0,3$  bei 1/400 Verdünnung des Serums) lag im Falle des Thyreoglobulins-Carriers bei 67 %, im Falle des C-terminalen MVH Carriers bei 71 % und im Falle des N-terminalen MVH Carriers bei 88 % (Abbildung 4.2.7 und Tabelle 4.2.2). Die Zahlen zeigen, dass erwartungsgemäß mit keinem der getesteten Carrier eine hundertprozentige Erfolgsquote erzielt werden konnte. Jedoch ist besonders hervorzuheben, dass gegen 94 % der unterschiedlichen Peptid-Antigene mit mindestens einem der drei Carrier Seren hohen Titer erhalten wurden. Diese Zahlen zeigen weiterhin, dass mit T-Zell-Epitopen wie MVH als Carrier höherer Raten erfolgreicher Immunisierungen erzielt werden konnten als mit Thyreoglobulin. Das MVH T-Zell-Epitop stellt somit eine hervorragende Alternative zu gängigen Protein-Carriern wie z.B. Thyreoglobulin dar.

## 5.4 Peptid-induzierte Antikörper sind wertvolle Werkzeuge für Proteom-analysen

### **Mit Peptid-induzierten Antikörpern ist es möglich, allein von *in silico* Daten ausgehend, Proteine im Proteom zu adressieren**

Eine der wichtigsten Verfahren im Rahmen von Proteomstudien ist die differentielle Proteinexpressionsanalyse. So können beispielsweise durch Vergleich der Proteinprofile von krankem mit gesundem Gewebe Proteine gefunden werden, die unterschiedlich exprimiert sind und ihrerseits als diagnostische Marker oder sogar als therapeutische Zielstrukturen (Targets) geeignet sind. Klassischerweise werden hierfür Proteingemische in 2D-Gelen aufgetrennt, die Proteine anschließend im Gel gefärbt und mehrere gefärbte Gele unterschiedlicher Proben miteinander verglichen. Spots, die quantitative Unterschiede zeigen, werden anschließend exzidiert und das entsprechende Protein identifiziert [122]. Diese Vorgehensweise hat den großen Vorteil, dass keinerlei Vorinformationen über potentielle Unterschiede zwischen den Proteingemischen notwendig sind. Der direkte quantitative Nachweis von interessanten Kandidatenproteinen, die durch andere Verfahren gefunden wurden, ist auf diese Art und Weise aber schlecht möglich. Eine wichtige, mit dieser Methode kaum zu lösende Problemstellung ist beispielsweise die Evaluierung von Ergebnissen differentieller mRNA-Analysen (z.B. aus Experimenten mit DNA-Microarrays) auf Proteinebene. Dieses Manko der klassischen Proteom-Analyse liegt vor allem darin begründet, dass das Laufverhalten eines Proteins im 2D-Gel anhand der Aminosäure-Sequenz nicht exakt vorhergesagt werden kann. Starke Abweichungen von der theoretischen Position des Proteins im Gel, sind meist darauf zurückzuführen, dass posttranslationale Modifikationen starke Auswirkungen auf das Laufverhalten der Proteine haben [123]. Die Konsequenz ist, dass unterschiedliche Modifikationszustände eines Proteins unterschiedliches Laufverhalten haben und folglich ein Protein mehrere Spots auf dem 2D-Gel zeigt. Deren Position weicht dann meist deutlich von der zu erwartenden Position des nicht modifizierten Proteins ab. Ein entsprechendes Kandidatenprotein muss dem zufolge erst aufwendig gesucht werden, was bedeutet, dass viele Spots exzidiert und analysiert werden müssen, um auf diese Art und Weise das exakte Laufverhalten des Proteins zu bestimmen. Denn erst wenn die exakte Position des gesuchten Proteins im 2D-Gel bekannt ist, werden quantitative Vergleiche dieses Proteins in vielen verschiedenen Proben, durch Vergleich der gefärbten 2D-Gele, möglich. Diese sehr aufwendige Vorgehensweise gelingt außerdem nur dann, wenn das Protein in Mengen vorliegt (einige ng Einzelprotein), die eine Detektion durch Färben im Gel ermöglichen. Schließlich sollte das Protein auch nicht durch ein anderes mit ähnlichem

Laufverhalten überlagert werden. Aus diesen Gründen erschwert die fehlende Möglichkeit, determinierte Proteine direkt adressieren zu können, die Beantwortung vieler Fragestellungen. Da zur Produktion Peptid-induzierter Antikörper ausschließlich *in silico* Sequenzdaten von Proteinen nötig sind, liegt es nahe zu testen, ob es diese Technik erlaubt, einzelne Proteine durch Immunoblotting von 2D-Gelen gezielt zu detektieren und so die direkte Adressierung des Proteins im Proteom zu ermöglichen. Als Konsequenz wurden im Rahmen dieser Arbeit einige Peptid-induzierte Antikörper auf diese Anwendung hin getestet. Besondere Aufmerksamkeit wurde hierbei auf mögliche Kreuzreaktivitäten der Seren mit anderen Proteinspots gerichtet. Als zu untersuchendes Lysat wurde humane Magenschleimhaut gewählt. Aufgrund eines vorangehenden Projektes stand dieses Material in ausreichender Menge zur Verfügung. Im silbergefärbten 2D-Gel (siehe Abbildung 4.3.1) zeigte sich, dass dieses humane Material ein sehr komplexes Proteingemisch (die computergestützte Bildanalyse ergab 653 Protein-Spots) darstellt und aus diesem Grunde für die folgenden Evaluierungen sehr gut geeignet ist. Bei der Auswahl der zu detektierenden Proteine wurden darauf geachtet, dass ihre theoretischen isoelektrischen Punkte zwischen 3 und 10 und ihre Molekulargewichte zwischen 10 und 100 kDa lagen und sie folglich mit den Standardmethoden der 2D-Gelelektrophorese getrennt werden konnten [122].

Als Vertreter der nachgewiesenermaßen glykosylierten Proteine wurde humaner „gastric intrinsic factor“, (theoretisch: MW = 45 kDa, IP = 5,9) ein Cobalamin-Transporterprotein, ausgewählt. Außerdem wurden zwei Enzyme Aldehyddehydrogenase Klasse 1 (theoretisch: MW = 55 kDa, IP = 6.3) und Carboanhydrase II (theoretisch: MW = 29 kDa, IP = 6,86) gewählt. Um zu testen, ob mit den vorgestellten Verfahren auch Antikörperpersonen gegen Proteine aus der Maus erzeugt werden können, wurden als zweites Tiermodell Kaninchen zu Immunisierungszwecken herangezogen. In diesem Sinne wurde als Vertreter regulatorischer Bindungsproteine, im Rahmen einer Kooperation, murines „insulin-like growth factor binding“ Protein 2 (IGFBP2, theoretisch: MW = 33 kDa, IP = 7,5) als Zielstruktur ausgewählt.

#### Beispiel: Humaner „gastric intrinsic factor“

„Gastric intrinsic factor“ (IF) ist ein Protein des Magensaftes, welches mit Vitamin B12 einen Komplex bildet, der im unteren Teil des Dünndarms (Ileum) Rezeptor-abhängig resorbiert wird. IF ist ein gutes Beispiel für ein stark glykosyliertes Protein [103].

Als Peptid-Antigen wurde das mittels eines Kyte & Doolittle Plots (siehe Abbildung 4.3.1) mit anschließender Homologieanalyse (BLAST) ausgewählte HIF348-Peptid („gastric

intrinsic factor“ AS 348-360) verwendet. Mit Thyreoglobulin gekoppeltem HIF348 (Thy-HIF348), sowie mit N-terminal an HIF348 gekoppeltem MVH (MVH-HIF348) konnten Seren induziert werden, die im 2D-Western-Blot humaner Magenschleimhaut zwei „gastric intrinsic factor“ Isoformen nahezu hintergrundfrei nachweisen konnten (Abbildung 4.3.6). Die Richtigkeit der Signale wurde mit Hilfe eines durch Immunisierung mit porcinem „gastric intrinsic factor“ erhaltenen polyklonalen Serums im Western-Blot gezeigt. Neben den beiden durch das Peptid-induzierte Serum nachgewiesenen Isoformen zeigte das Anti-porciner-„gastric intrinsic factor“ Serum zwei weitere Isoformen des glykosylierten Proteins (siehe Abbildung 4.3.7).

#### Beispiel: Humane Aldehyddehydrogenase Klasse 1 (ADH1)

Aldehyddehydrogenase katalysiert die Reaktion von Acetaldehyd zu Essigsäure. Als Peptid-Antigene wurden die Peptide ADH1\_1 (Aldehyddehydrogenase Klasse 1 AS 341-355) und ADH1\_2 (Aldehyddehydrogenase Klasse 1 AS 485-500) mit Hilfe eines Kyte & Doolittle Plots ausgewählt (siehe Abbildung 4.3.8). Hohe Homologie der Peptide zu anderen Proteinsequenzen wurde mittels einer BLAST-Analyse ausgeschlossen. Durch Immunisierung mit Konstrukten aus N-terminal gekoppeltem MVH und den entsprechenden Peptiden (MVH-ADH1\_1 und MVH-ADH1\_2) wurden Seren erhalten, die unabhängig voneinander spezifisch zwei Signale im 2D-Western-Blot humaner Magenschleimhaut zeigten (siehe Abbildung 4.3.11). Die Signale entsprachen exakt den theoretisch berechneten und publizierten Werten [99].

#### Beispiel: Humane Carboanhydrase II

Carboanhydrase II ist ein zinkhaltiges Enzym, das sich unter anderem in den Belegzellen der Magenschleimhaut befindet. Es beschleunigt die Hydratation von  $\text{CO}_2$  zu  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , das rasch in  $\text{H}^+$  u.  $\text{HCO}_3^-$  dissoziiert. Das freie Proton wird im Austausch gegen  $\text{Na}^+$  (aus dem Blut) in den Magen sezerniert und trägt so zur Bildung der Magensäure bei. Mit Hilfe eines Kyte & Doolittle Plots (siehe Abbildung 4.3.12) wurden die drei Peptide CAH2\_1 (Carboanhydrase II AS 1-19), CAH2\_2 (Carboanhydrase II AS 100-120) und CAH2\_3 (Carboanhydrase II AS 230-259) für die Immunisierung ausgewählt. Auch bei dieser Auswahl wurde auf geringe Homologie zu anderen Proteinsequenzen geachtet. Mit N-terminal an CAH2\_1 gekoppeltem MVH (MVH-CAH2\_1), mit C-terminal an CAH2\_2 gekoppeltem MVH (MVH-CAH2\_2) und mit N-terminal an CAH2\_3 gekoppeltem MVH (MVH-CAH2\_2) konnten Peptid-induzierte Seren gewonnen werden, die im 2D-Western-Blot unabhängig

voneinander frei von Hintergrundsignalen, jeweils zwei Spots bei ca. 29 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 6,9 und 7,1 (siehe Abbildung 4.3.17) detektierten. Die Spots konnten dann gezielt aus dem Gel exzidiert und durch massenspektrometrische Analyse eindeutig als Carboanhydrase II identifiziert werden (Abbildung 4.3.18).

#### Beispiel: Murines „insulin-like growth-factor binding“-Protein2 (IGFBP2)

IGFBP-Proteine binden beide Formen des „insulin-like growth factor“ (IGFI und IGFI), verlängern deren Halbwertszeit und scheinen so die Interaktion zwischen IGF und deren Rezeptoren zu modulieren. Es sind mindestens sechs verschiedene IGFBP Varianten bekannt. Da zur Generierung von Antikörpern gegen murine Proteine sinnvollerweise keine Mäuse immunisiert werden können, wurden zunächst Ratten, und zusätzlich, um größere Mengen an Serum zu gewinnen, Kaninchen immunisiert. Das Peptid IGFBP2\_1 (IGFBP2 AS 117-132) wurde unter Berücksichtigung des Kyte & Doolittle Plots (siehe Abbildung 4.3.19) ausgewählt. Die Seren der Tiere, die mit Thyreoglobulin gekoppeltem IGFBP2\_1 Peptid immunisiert wurden, zeigten in der ELISA-Analyse hohe Titer gegen das Peptid (siehe Abbildung 4.3.20). Im Pankreas 2D-Western-Blot einer IGFBP2 transgenen Maus (CMV als Promoter) konnten mit den erhaltenen Seren drei Spots bei einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa und isoelektrischen Punkten zwischen 6,7 und 7,5 hintergrundfrei detektiert werden (Abbildung 4.3.23), wohingegen der 2D-Western-Blot einer Wildtyp-Maus kein Signal zeigte. Die Richtigkeit des detektierten Spots wurde massenspektrometrisch gezeigt (Abbildung 4.3.24).

#### Fazit:

Es konnten durch Immunisierung mit Peptiden für alle Zielproteine Antiseren generiert werden, die deren Detektion im 2D-Western-Blot ermöglichten. Die Seren zeigten hierbei praktisch keine Hintergrundsignale. Die verwendeten Seren konnten in Verdünnungen zwischen 1/500 und 1/1000 eingesetzt werden. Dies bedeutet, dass bei einer durchschnittlichen Ausbeute von 500 µl Serum pro Maus ca. 250 – 500 ml Detektionslösung hergestellt werden kann, was für 25 bis 50 großformatige (16 cm x 20 cm) 2D-Western-Blots genügt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass außer Mäusen optional auch andere Spezies immunisiert werden können, beispielsweise um Antikörper gegen murine Proteine zu erzeugen oder um größere Mengen an Serum zu produzieren.

### **Peptid-induzierte Antiseren stellen sensitive Sonden für Proteine dar**

Der quantitative Unterschied zwischen stark und schwach exprimierten Proteinen kann sich über 8-12 Größenordnungen erstrecken [53, 54]. Da jedoch nur verhältnismäßig kleine Mengen an Gesamtprotein (maximal einige mg) durch 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt werden können, und es bis heute keine Technik gibt, die in der Lage ist, ähnlich der PCR auf DNA-Ebene, Proteine selektiv zu vermehren, stellt die Sensitivität und der dynamische Bereich ein wichtiges Qualitätskriterium aller proteinanalytischen Verfahren dar [124]. Um die Sensitivität der Peptid-induzierten Antiseren bestimmen zu können, wurde in den Fällen, in denen das Protein in ausreichender Menge und Reinheit verfügbar war, das Detektionslimit der Peptid-induzierten Antiseren in 1D-Western-Blot-Verdünnungsreihen ermittelt (porciner „gastric intrinsic factor“ siehe Abbildung 4.3.4 und humane Carboanhydrase II 4.3.16). Die getesteten Nachweisgrenzen aller Seren lagen alle unter 313 fmol. Dies entspricht dem unteren Sensitivitätsbereich massenspektrometrischer Techniken. Die empfindlichsten Seren konnten sogar noch bis zu ca. 4 fmol des Proteins nachweisen. Die Sensitivität Peptid-induzierter Antiseren kann somit um Größenordnungen unter den Nachweisgrenzen der üblicherweise angewendeten Proteinidentifizierungen liegen. Setzt man beispielsweise voraus, dass typischerweise ein Lysat aus ca.  $10^7$  Säugerzellen auf ein 2D-Gel aufgetragen werden kann, so lassen sich mit diesen Seren Proteine mit Kopienzahl größer  $2 \cdot 10^2$  bis größer  $10^4$  pro Zelle nachweisen.

### **Peptid-induzierte Antikörper können die Basis für weitere Techniken sein, die zum Verständnis der Funktion eines Proteins beitragen können**

Mit der Verfügbarkeit von Antikörpern gegen ein Protein werden auch weitere Techniken verfügbar, die zur Aufklärung der Funktion dieses Proteins beitragen können. So ist es oft nötig, beispielsweise für funktionale Assays oder für die Aufklärung der Tertiärstruktur, das Protein anzureichern oder zu reinigen. In diesem Kontext ist die Kopplung von Antikörpern an feste Träger, zur Herstellung von Chromatographie-Säulen für die Immunoaffinitätsreinigung des entsprechenden Proteins, ein sehr leistungsfähiges Verfahren. Eine weitere sehr spezifische und schnelle Methode zur Anreicherung eines einzelnen Proteins ist die Immunpräzipitation. Auch dieses Verfahren wurde im Rahmen einer Kooperation (Dr. Andreas Höflich, Institut für Molekulare Tierzucht, persönliche Mitteilung) mit dem im Rahmen dieser Arbeit generierten anti-murines-IGFBP2 Serum erfolgreich durchgeführt. Schließlich können Antikörper für die subzelluläre Lokalisation von Proteinen eingesetzt

werden. So konnte mit dem anti-murines-IGFBP2 Serum gezeigt werden, dass immunhistochemische Färbungen mit Peptid-induzierten Seren möglich sind (Abbildung 4.3.25) [125].

## **5.5 Ermittlung der Epitope Peptid-induzierter Antikörper**

### **Peptid-„Arrays“ ermöglichen das effiziente Epitop „Mapping“ von Antikörpern**

Eine sehr elegante Methode, Epitope von Antikörpern zu ermitteln ist, mittels Spot-Synthese Peptid-„Arrays“ herzustellen [126] und diese dann in Bindungsassays mit den entsprechenden Antikörpern einzusetzen [127]. Bei der Spot-Synthese werden die Peptide von einem Syntheseroboter parallel mit einem minimalen Verbrauch an Chemikalien direkt auf einer Zellulosemembran synthetisiert. Aufgrund der guten Benetzbarkeit der verwendeten Zellulosemembran im wässrigen Milieu lassen sich diese Peptid-„Arrays“ direkt in verdünnten Antikörper-Lösungen inkubieren und das Bindungsverhalten der Antikörper an die immobilisierten Peptide untersuchen [128]. Ein zusätzlicher Vorteil ist, dass die Antikörper durch Behandlung mit denaturierenden Puffern nahezu quantitativ von der Membran entfernt werden können („Stripping“) und die Membran zum „Mapping“ weiterer Antikörper eingesetzt werden kann [129].

### **MVH T-Zell-Epitop gekoppelte Peptid-Antigene können Antikörper induzieren, die trotz ihrer Polyklonalität, ähnlich wie monoklonale an kurze definierte Epitope binden**

Obwohl zu erwarten war, dass polyklonale Peptid-induzierte Antiseren viele verschiedene Antikörper enthalten, die überlappend an mehrere Teilbereiche des Peptid-Antigens binden, wurde mit den zuvor beschriebenen Peptid-„Arrays“ versucht, die Bindungseigenschaften der Antikörper in den Seren weiter zu untersuchen. Hierfür wurde für jedes Peptid-induzierte Antiserum, welches im Peptid-ELISA einen hohen Titer zeigte, jeweils ein Peptid-„Array“ individuell angefertigt. Auf den Membranen wurde das für die Immunisierung verwendete Peptid in voller Länge (positive Kontrolle) sowie sukzessiv N-terminal bzw. C-terminal verkürzt, synthetisiert. Zusätzlich wurde jede Position auf dem Peptid durch Alanin (Ala-Scan) [130] substituiert. Durch Substitution einzelner Aminosäuren mit Alanin (einfachste chirale Aminosäure) können Aussagen darüber getroffen werden, ob die Seitenkette der entsprechenden Aminosäure an der Antikörper-Peptid-Bindung beteiligt ist. Mit den entsprechenden Seren wurden dann Bindungsassays durchgeführt (siehe Abschnitt 4.4.5),

deren Ergebnisse in Tabelle 4.4.1 (siehe Ergebnisse Abschnitt 4.4) zusammengestellt sind. Überraschenderweise zeigte sich, dass mit 9 von 16 Antigenen Seren erhalten wurden die ähnlich monoklonalen Antikörpern ausschließlich an kurze, 5-9 Aminosäuren lange lineare Epitope auf den Peptid-Antigenen (13-20 Aminosäuren lang) binden. Besonders hervorzuheben ist, dass nur Seren die mit MVH-T-Zell-Epitop als Carrier immunisiert wurden diese Eigenschaft zeigten. Die Hypothese, dass vorrangig Peptide mit T-Zell-Epitopen als Carrier, nicht jedoch proteingekoppelte Peptide, Seren mit dieser Eigenschaft induzieren, müsste jedoch aufgrund der noch zu geringen Zahl an „gemapten“ Seren (38 Seren mit 19 Antigenen; pro Antigen wurden 2 Tiere immunisiert) durch zusätzliche Experimente erhärtet werden. Ein Grund für diese Beobachtung könnte jedoch sein, dass Protein-Carrier gekoppelte Peptide ein komplexes Gemisch darstellen, in dem das Peptid-Antigen an unterschiedlichen Stellen des Carrier-Proteins in unterschiedlichen Orientierungen gebunden ist. Im Gegensatz dazu zeigen T-Zell-Epitop gekoppelte Peptide keinerlei Diversität.

**Für Fragestellungen, die nur begrenzte Mengen an Antikörpern voraussetzen, sind Peptid-induzierte Antikörper eine preisgünstige Alternative für monoklonale bzw. rekombinante Antikörper**

Die Eigenschaft Peptid-induzierter Antiseren, kurze 5-9 Aminosäure lange Sequenzen zu erkennen ist sehr interessant. Bisher werden zur Erkennung kurzer linearer Proteinteilsequenzen vorrangig monoklonale oder rekombinante Antikörper eingesetzt. Da die Produktion monoklonaler bzw. rekombinanter Antikörper in den Fällen, in denen nur geringe Mengen an Antikörpern benötigt werden, sich häufig nicht lohnt, ist ein kostengünstiges Verfahren, das es erlaubt geringere Mengen von Antikörpern mit ähnlichen Eigenschaften zu generieren, wünschenswert. Für proteomanalytische Studien könnte man damit beispielsweise kurze Protein-Domänen direkt adressieren. In einem weiteren Schritt könnten im Rahmen von Proteomstudien mittels 2D-Western-Blotting verschiedene Proteine parallel detektiert werden, welche die gleichen, diskreten Motive tragen. Darüber hinaus ergibt sich die Möglichkeit, gezielt diskriminatorische Antikörper für posttranslationale Proteinmodifikationen zu erzeugen. So sind beispielsweise methylierte [131], phosphorylierte [132, 133], glykosylierte [134] oder sulfatierte [135, 136] Peptide synthetisierbar. Durch Immunisierung mit modifizierten Peptiden bzw. mit den nicht modifizierten Pendanten könnte es möglich sein, Seren zu erhalten, die es erlauben, den Modifikations-Zustand einer vorher determinierten Protein-Domäne durch 2D-Western-Blotting zu bestimmen. Aufgrund der vielen Anwendungsmöglichkeiten dieser, per Definition polyklonalen, Peptid-induzierten Antiseren

mit monoepitopischer Eigenschaft, wurde dieses iSEPIA (identified Single Epitope Peptide Induced Antibodies) getaufte Verfahren (Namensgebung Dr. G.J. Arnold, Genzentrum der Universität München) zum Patent angemeldet.

## **5.6 Peptid-induzierte Antikörper zur Produktion Antikörper-basierender Chips**

### **Antikörperchips haben das Potential, Proteomanalysen zukünftig stark zu vereinfachen**

Ein großer Nachteil proteomanalytischer Analysen ist, dass die angewendeten Verfahren enorm aufwendig sind [137]. Die Durchführung der 2D-Gel-Analysen konnte bisher noch nicht automatisiert werden und ist nach wie vor sehr arbeitsintensiv. Zusätzlich gestalten sich die computergestützten Vergleiche zwischen den gefärbten 2D-Gelen nach wie vor als sehr aufwendig. Durch die immense Komplexität der zu analysierenden Bilder müssen die Ergebnisse der zur Analyse verwendeten Softwaretools nach wie vor manuell editiert und überprüft werden. Durch die Tatsache, dass aufgrund der begrenzten Reproduzierbarkeit der 2D-Gel-Elektrophorese üblicherweise eine Vielzahl von Gelen erstellt werden muss, bevor statistisch signifikante Aussagen getroffen werden können [138], gewinnt dieser Nachteil noch zusätzlich an Gewicht. Daher wird intensiv an einfacheren Verfahren gearbeitet, welche die schnelle, effektive und quantitative Analyse von Proteom-Populationen ermöglichen. In diesem Kontext ist eine der vielversprechendsten Ansätze jüngerer Zeit die Entwicklung Antikörper-basierter Chips [139]. Bei dieser Technologie werden Antikörper an einen festen Träger fixiert. Zur Analyse werden dann markierte Proteingemische aufgetragen und die an den Antikörper gebundenen Proteine detektiert. Zur Markierung der Proteine bietet sich die Fluoreszenzmarkierung an. Zum einen ist mit den kommerziell verfügbaren Farbstoffgekoppelten Reaktivestern [140] die Markierung von Proteinen sehr einfach durchzuführen, zum anderen können überschüssige niedermolekulare Farbstoffreste leicht durch Ausschlusschromatographie abgetrennt werden. Ein weiterer Vorteil der Fluoreszenzbasierten Detektion von Proteinen ist der sehr große dynamische Bereich der Fluoreszenzscannersysteme, mit denen die Signale üblicherweise aufgenommen werden (Bsp. Amersham Biosciences Storm, 5 Größenordnungen), und der daraus resultierende große Konzentrationsbereich, in dem quantitative Unterschiede eines Proteins nachgewiesen werden können [38].

Für viele proteomanalytische Untersuchungen, insbesondere im Forschungs- und Biotech-Bereich, ist weniger die Massenproduktion vordefinierter Antikörperchips von Interesse als

vielmehr die Produktion sogenannter „custom designed“ Antikörperchips, die je nach Fragestellung individuell und in kleinen Stückzahlen gefertigt werden können. Ein wichtiger Anwendungsbereich für eine solche Technologie wäre beispielsweise die schnelle Validierung von Ergebnissen differentieller 2D-Gel-Analysen für eine Vielzahl von Proben. Da im Prinzip Peptid-induzierte Antikörper gegen jedes Protein verfügbargemacht werden können, lag es nahe ein Verfahren zur Herstellung solcher „custom designed“ Chips auf Basis Peptid-induzierter Antikörper vorzuschlagen und anhand einiger Beispiele dessen Funktionalität zu überprüfen. Da die Stückzahlen für solche „custom designed“ Chips verhältnismäßig niedrig sind, sollte im Rahmen dieser Arbeit ein möglichst unkompliziertes und schnell durchzuführendes Verfahren etabliert werden, welches es zulässt, ohne vorherige Anreicherung der Antikörper, Rohseren auf die feste Phase aufzubringen.

### **Die Sensitivität der Peptid-induzierten Antikörperchips hängt wesentlich vom festen Träger ab**

Für die Herstellung von Protein-Arrays wurden bereits einige Oberflächen in der Literatur vorgeschlagen. So können Proteine an derivatisiertem Kunststoff oder Glas kovalent [141] gebunden werden. Auch die nicht-kovalente Fixierung von Proteinen an Poly-L-Lysin beschichtetes Glas [142], an Nitrozellulose [143], an Polystyrol-Partikel [144], an PVDF-Membranen [145] und in kleine Acrylamid-Gele [146] wurde bereits beschrieben. Für Antikörper-basierte Chips ist eine hohe Antikörper-Bindungskapazität ein wichtiges Qualitätskriterium der festen Phase. Die Antikörper-Bindungskapazität des Trägers ist deswegen so entscheidend, weil die Sensitivität der Chip-basierten Detektion von Fluoreszenz-markierten Proteinen systembedingt verhältnismäßig gering ist. Im Gegensatz zu Systemen, die mit Enzym-markierten oder radioaktiven Antikörpern arbeiten, können die Signale nicht über längere Zeiträume akkumuliert werden. So gilt die Detektion von Proteinen mittels Fluoreszenz als um drei Größenordnungen unempfindlicher als Systeme, die mit enzymatischen Reaktionen und lumineszierenden Substraten arbeiten [38].

Da die in der Literatur beschriebenen festen Phasen zur Herstellung von Antikörperchips ausschließlich mit angereicherten Antikörpern evaluiert wurden, in Rohseren die Konzentration der spezifischen Antikörper jedoch wesentlich geringer ist und zusätzlich eine Fülle von anderen Proteinen vorhanden sind, können die verwendeten Methoden nicht einfach übertragen werden. Aus diesem Grunde wurden im Rahmen der Arbeit drei verschiedene feste Träger hinsichtlich ihres Vermögens, eine ausreichende Menge an Peptid-induzierten Antikörpern aus dem Serum der Tiere zu binden, getestet. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde

Cy5 aufgrund seiner hohen Lichtstabilität [147] und guten Quantenausbeute ( $\Phi = 0,23$ ) gewählt.

### **Hoch-poröse Protein A Partikel haben von allen getesteten Oberflächen das empfindlichste Detektionssystem ergeben**

Zur Evaluierung der unterschiedlichen festen Träger wurden als Modellsystem Peptid-induzierte Antikörper gegen Carboanhydrase II (CAH II) und das entsprechende Protein verwendet. Als Analyt wurde kommerziell erworbene Carboanhydrase II mit Cy5-NHS markiert wobei eine Markierungsrate von durchschnittlich 8,9 Farbstoffgruppen pro Proteinmolekül (Abbildung 4.5.1) erreicht wurde. Für die Tests wurden jeweils Peptid-induziertes anti-CAH II Serum und Präimmenserum des gleichen Tieres (Hintergrundsignal) verwendet. Um zu prüfen, inwieweit die festen Träger überhaupt in der Lage sind, Proteine zu binden, wurde zusätzlich das Fluoreszenz-markierte CAH II (Cy5-CAH II) direkt auf die festen Phasen aufgetragen. Schließlich wurde auch die Eigenfluoreszenz des Trägers an nicht beschichteten Bereichen gemessen. Diese sollte möglichst gering sein, um die maximale Sensitivität des Scanner-Systems ausnützen zu können.

#### Poly-L-Lysin Objektträger:

Poly-L-Lysin Objektträger können zur Herstellung von Proteinchips [142] sowie für DNA-Chips [148] verwendet werden. Die Eigenfluoreszenz des Trägermaterials lag bei ca. 0,7 % der Sättigung des Fluoreszenz-Scanners, was als ausreichend niedrig erachtet wurde. Die Signale des Versuches, mit Peptid-induzierten Antikörpern Fluoreszenz-markierte Carboanhydrase II zu detektieren, waren bei diesem Träger jedoch nur um den Faktor 1,4 stärker als das Hintergrundsignal mit Präimmenserum (Abbildung 4.5.2 und Tabelle 4.5.1). Zudem erreichten die Signale nur 1 % des Sättigungswertes des Fluoreszenz-Scanners. Dieser Wert ist zu niedrig, weil der Analyt in einer verhältnismäßig hohen Konzentration von 70  $\mu\text{g/ml}$  eingesetzt wurde. Eine solch hohe Konzentration dürften allenfalls sehr stark exprimierte Proteine in hochkonzentrierten Zell-Lysaten erreichen. Wünschenswert wäre es also, bei solch hohen Konzentrationen des Analyten die Sättigung des Systems zu erreichen, denn nur dann kann der maximale dynamische Bereich des Fluoreszenz-Scanners genutzt werden. Dies ist wichtig, weil der Detektor nur im dynamischen Bereich genaue, quantifizierbare Ergebnisse liefert. Auch der Versuch, die Objektträger direkt mit markiertem Protein zu beschichten, führte zu nur schwachen Signalen unter 1 % der Sättigung des

Scanners, was auf eine für das verwendete Scanner-System unzureichende Proteinbindungskapazität des Trägers schließen lässt. Aus diesen Gründen wurden Poly-L-Lysin Objektträger, in Kombination mit dem verwendeten Scanner, als nicht geeignet erachtet.

#### Nitrozellulose-beschichtete Objektträger:

Nitrozellulose-beschichtete Objektträger haben eine höhere Protein-Bindungskapazität als Poly-L-Lysin Objektträger [149]. Die Erhöhung der Bindungskapazität wird vor allem dadurch erreicht, dass nicht eine glatte Glasoberfläche verwendet wird, sondern die Nitrozellulose-Schicht eine poröse und somit weitaus größere Oberfläche darstellt. Die Nitrozellulose-Beschichtung der Objektträger zeigte zwar eine dreifach stärkere Eigenfluoreszenz als die Poly-L-Lysin Objektträger, die aber nur 2 % der Sättigung des Scanners erreichte, so dass theoretisch immer noch 98 % des dynamischen Bereichs des Scanners zur Verfügung stünden. Das Signal der mittels Peptid-induziertem Antiserum detektierten Carboanhydrase II lag jedoch nur um den Faktor 2 über dem Signal des Präimmunserums (Abbildung 4.5.3 und Tabelle 4.5.2) und erreichte nur ca. 7 % des vom Scanner vorgegebenen Sättigungswertes. Als Ursache für dieses schwache Signal wurde angenommen, dass die Kapazität des Trägermaterials vorrangig durch andere Proteine im Serum erschöpft wird und nicht durch spezifische anti-Carboanhydrase II Antikörper. Ein weiteres Indiz für diese Hypothese ist, dass das Signal der direkten Beschichtung mit Cy5-CAH II über dem Sättigungswert des Scanners lag und das Material somit, wie in den Herstellerangaben beschrieben, in der Lage ist, größere Mengen an Protein zu binden. Auf Testreihen mit gereinigten Antiseren wurde verzichtet und stattdessen ein Material getestet, das per se selektiv Antikörper zu binden vermag und zugleich eine große Oberfläche hat.

#### Hoch-poröse Protein A Partikel:

Protein A ist ein 42 kDa Polypeptid und ist Bestandteil der Zellwand von *Staphylococcus Aureus*. Wegen der Eigenschaft spezifisch Fc-Regionen von Immunglobulinen zu binden, wird Protein A in einer Vielzahl immunologischer Techniken eingesetzt [150, 151]. So finden Partikel an die Protein A gekoppelt ist zur Reinigung von Antikörpern bzw. Antikörper-Antigen-Komplexen breite Verwendung. Die Idee die hinter den folgenden Experimente stand war Protein A Partikel nicht zur Reinigung von Antikörpern zu verwenden, sondern mit den Partikeln die Antikörper aus den Rohseren im „Batch“-Verfahren zu binden und sie dann als feste Phase für Antikörper-basierte Chips zu verwenden. In diesem Zusammenhang

wurden 20 µm Protein A HPLC-Partikel [152] als Träger getestet. Es wurde ein HPLC-Material verwendet, weil diese hochporösen Materialien meist sehr große Bindungskapazitäten haben. Das verwendete Material (HyperD ProteinA) vermag beispielsweise ca. 30 mg IgG pro ml HPLC-Material zu binden. Im Rahmen der Evaluierung zeigte es mit 0,2 % der Sättigung die geringste Eigenfluoreszenz aller getesteten Materialien. Da die Partikel spezifisch Antikörper binden, ergab das ausschließlich mit Cy5-CAH II behandelte Material erwartungsgemäß ein nur sehr schwaches Signal (6 % der Sättigung). Das Signal des Präimmunserums erreichte nur 11 % der Sättigung, sodass im Modellsystem noch 89 % des dynamischen Bereichs des Scanners zur Verfügung standen. Die Detektion von CAH II mit Peptid-induzierten Antiserum, ergab ein Signal, das über der Sättigung des Scanners und mindestens um den Faktor 8 über dem des Präimmunserums lag (Abbildung 4.5.4 und Tabelle 4.5.3). In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass bei diesem Modellsystem die erhaltenen Signale zwischen 195 ng/ml und 12,5 µg/ml proportional der Cy5-CAH II Konzentration (Korrelationskoeffizient > 0,99) waren und bei Konzentrationen zwischen 25 und 50 µg/ml Cy5-CAH II der Sättigungswert des Scanners überschritten wurde (Abbildung 4.5.5 und Tabelle 4.5.4).

Da die Protein A Partikel als Träger das beste Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis (Faktor 8) hatten, sie die geringste Eigenfluoreszenz zeigten und mit diesem Material ein großer Teil des dynamischen Bereiches (89 %) des Fluoreszenz-Scanners ausgeschöpft werden konnte, wurden mit diesem Material weitere Tests durchgeführt.

### **Die hergestellten Prototypen können Einzelproteine in komplexen Proteingemischen nachweisen**

Um zu klären, ob die Ergebnisse, die mit dem Fluoreszenz-markierten Einzelprotein erhalten wurden, auch auf das komplexe Gemisch eines Zell-Lysates übertragen werden können, wurde ein Zell-Lysat humaner Magenschleimhaut mit Cy5-NHS markiert. Nun wurde versucht, die bereits im 2D-Western-Blot nachgewiesenen Proteine (Carboanhydrase II, Aldehyddehydrogenase Klasse 1 und „gastric intrinsic factor“) zu detektieren. Um zu testen, ab welcher Zell-Lysat Konzentration Sättigungssignale entstehen, wurde das Lysat in Verdünnungsreihen eingesetzt (siehe Abbildung 4.5.6 bis 4.5.8 und Tabellen 4.5.5. bis 4.5.7.). Für alle detektierten Proteine konnten breite Konzentrationsbereiche gefunden werden, in denen das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis > 2 war und folglich der entsprechende Analyt im Lysat eindeutig nachgewiesen wurde. So konnten Carboanhydrase II bei Gesamtprotein-konzentrationen zwischen 15,6 µg/ml und 500 µg/ml, „gastric intrinsic factor“ bei

Gesamtproteinkonzentrationen von 7,8 µg/ml bis 1000 µg/ml und Aldehyddehydrogenase Klasse I bei Gesamtproteinkonzentrationen zwischen 3,9 µg/ml und 1000 µg/ml nachgewiesen werden. Die detektierten Signale waren für Carboanhydrase II bei Gesamtproteinkonzentrationen zwischen 2 µg/ml und 500 µg/ml, für „gastric intrinsic factor“ von 7,8 µg/ml bis 31,3 µg/ml und für Aldehyddehydrogenase Klasse I zwischen 7,8 µg/ml und 250 µg/ml linear. Die Sättigung des Scanner-Systems wurde im Fall der Carboanhydrase II bei 500 µg/ml, für „gastric intrinsic factor“ bei 62,5 µg/ml und für Aldehyddehydrogenase Klasse I bei 250 µg/ml Gesamtproteinkonzentrationen überschritten. Der Befund, dass die dynamischen Bereiche sowie die Sättigungswerte stark differieren, war zu erwarten, weil die Signalintensität primär von der Affinität der Antikörper zum Antigen sowie von der Antigenkonzentration im Zell-Lysat abhängig ist. Beide Faktoren können um mehrere Größenordnungen differieren. Aus diesem Grunde wird es, falls man sehr unterschiedlich konzentrierte Proteine parallel auf einem Chip detektieren will, unerlässlich sein, das System hinsichtlich der verwendeten Serumverdünnungen, sowie hinsichtlich der verwendeten Konzentration an Gesamtprotein zu optimieren. Dennoch erscheint das evaluierte System, das auf Protein A Partikeln als Träger basiert, sehr vielversprechend. So ist der dynamische Bereich für alle getesteten Protein-Antikörper-Kombinationen deutlich größer als bei vielen Techniken der Proteinfärbung im Gel. Silberfärbungen erlauben beispielsweise ausschließlich Quantifizierungen im Bereich zwischen 8 ng und 60 ng Einzelprotein [37]. Zudem sollte diese Methode nicht auf den Einsatz von Peptid-induzierten Antikörpern als Sonden beschränkt sein, sondern auch mit monoklonalen Antikörpern (direkt mit Hybridoma-Zellkulturüberständen) und polyklonalen Seren funktionieren. Liegen entsprechende Mengen an Antiseren bzw. Antikörpern vor, können theoretisch größere Mengen an Protein A Partikeln beschichtet werden. Mit den asservierten Materialien könnten dann, je nach Fragestellung, individuelle Chips mit verschiedenen Kombinationen aus Antikörpern hergestellt werden („custom designed“ Antikörperchips), die nur minimalen Schwankungen bezüglich der Beschichtungseffizienz des jeweiligen Antikörpers unterliegen dürften. Schließlich besticht die gezeigte Methode durch ihre Einfachheit und schnelle Durchführbarkeit. Somit wurde ein geeignetes und einfach zu beschichtendes Material für die Herstellung von „custom designed“ Antikörperchips gefunden. Ferner konnte mit einem Prototypen demonstriert werden, dass ein solcher auf Protein A Partikeln beruhender Antikörperchip Proteine in einem breiten dynamischen Bereich quantitativ detektieren kann.

## 5.7 Ausblick – Zukünftige Experimente

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass das vorgestellte Verfahren zur Herstellung Peptid-induzierter Antikörper eine sehr interessante Technik im Rahmen funktioneller Proteomanalysen sein kann. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse gelang es Fördergelder für die Anwendung sowie Weiterentwicklung dieses Verfahrens im Rahmen eines zum Abgabezeitpunkt der Arbeit bereits begonnen BMBF Projektes mit dem Titel „Aufbau einer Technologieplattform zur funktionellen Proteomanalyse von Geweben“ (Projektkoordination: Dr. Lottspeich, Max-Planck-Institut für Biochemie) zu erhalten. Das geförderte Projekt untergliedert sich in drei Teilbereiche. Im Rahmen des ersten Teilprojektes sollen für am Projekt teilnehmende Kooperationspartner Peptid-induzierte Antiseren, für durch klassische 2D-Experimente bzw. Transkriptom-Analysen gefundene relevante Proteine, hergestellt werden. Mit diesen Antiseren sollen Western-Blots, ELISA-Analysen und immunhistochemische Färbungen durchgeführt werden. Das zweite Teilprojekt beschäftigt sich mit der Weiterentwicklung der bereits erwähnten „custom designed“ Antikörperchips auf Basis Peptid-induzierter Antiseren. Hierbei stehen vor allem die Validierung weiterer Protein A beschichteter Träger, sowie die Optimierung des Verfahrens im Mittelpunkt. Das dritte Teilprojekt beschäftigt sich mit der Herstellung von Peptid-induzierten Antiseren, die den Phosphorylierungszustand determinierter Proteine diskriminieren können. Hierbei steht nicht die Erzeugung von Antikörpern, die gegen phosphorylierte Einzelaminosäuren gerichtet sind, im Mittelpunkt. Stattdessen sollen Antikörper erzeugt werden die spezifisch für die phosphorylierte Aminosäure in Kombination mit der Aminosäuresequenz unmittelbar neben der Phosphorylierungsstelle sind. Zusätzlich wird versucht Peptid-induzierte Antikörper zu generieren, die spezifisch an strukturell ähnliche Phosphorylierungsdomänen, die jedoch einige variable Aminosäurepositionen zeigen, binden.

Zusätzlich konnten Fördermittel im Rahmen einer DFG Forschergruppe mit dem Titel „Mechanismen der embryo-maternalen Kommunikation“ (Projektleitung: Prof. Wolf, Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie) eingeworben werden. Hierbei soll unter anderem die embryo-maternale Interaktion in verschiedenen Phasen der bovinen Embryonalentwicklung auf mRNA- und auf Proteinebene untersucht werden. Gegen Proteine die durch Transkriptom-Analysen auf Basis von DNA-Arrays als potentiell interessant gelten, sollen Peptid-induzierte Antikörper generiert werden. Diese sollen einerseits die Evaluierung der Daten differentieller mRNA-Analysen auf Protein-Ebene durch 2D-Western-Blotting ermöglichen und andererseits für immunhistochemische Untersuchungen Verwendung finden.

Die im Rahmen der Arbeit entwickelten Verfahren und Techniken stellen für all diese Projekte die methodischen Grundvoraussetzungen zur Verfügung.

## 6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Verfahren entwickelt, das es erlaubt, von *in silico* Sequenzdaten ausgehend einzelne Proteine in Proteomen direkt zu adressieren. Diese gezielte, quantitative Detektion einzelner Proteine im Proteom ist mit den klassischen Methoden der Proteomanalyse (2D Gelelektrophorese mit anschließender proteinchemischer Identifizierung einzelner Spots) nicht möglich, da das Laufverhalten des „gesuchten“ Proteins, aufgrund potentieller posttranslationaler prinzipiell nicht hinreichend genau vorhergesagt werden kann. Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Verfahren beruht auf der Generierung von Peptid-Antikörpern, die sensitiv und spezifisch einzelne Proteine in Proteomen detektieren können. Die benötigten Peptid-Antigene werden hierfür ausschließlich von *in silico* Sequenzinformationen des Zielproteins abgeleitet und vollsynthetisch hergestellt.

Zunächst wurde Entwicklungsarbeit bezüglich der effizienten Titration Peptid-induzierter Antisera geleistet. Die ELISA-Analyse Peptid-induzierter Antikörper ist nicht trivial, weil Standard-Mikrotiterplatten mit kurzen synthetischen Peptiden nur mangelhaft beschichtet werden können, was geringe Sensitivität der Analyse zur Folge hat. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Kopplung von biotinylierten Peptiden an Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten die Sensitivität der ELISA-Analyse deutlich gesteigert werden konnte und das System hervorragend für die Titration Peptid-induzierter Seren geeignet ist.

Wesentliche Entwicklungsarbeit wurde hinsichtlich geeigneter Carrier-Systeme zur Steigerung der Immunantwort gegen das Peptid-Antigen geleistet. Hierfür wurden verschiedene Carrier auf Kunststoffbasis, verschiedene klassische Protein-Carrier und kurze peptidische T-Zell-Epitope getestet. Mit einem vollsynthetischen, 15 AS langen Masernvirus-Fusions-Protein-T-Zell-Epitop konnte die Immunantwort am effektivsten gesteigert werden. Mit diesem Peptid-Carrier gelangen höhere Raten erfolgreicher Immunisierungen als mit den klassischen Carrier-Proteinen. Der wesentliche Vorteil dieses vollsynthetischen Carrier-Systems ist, dass die Induktion unerwünschter Kreuzreaktivität durch das Carrier-Protein und der daraus folgende Verlust an Spezifität der Seren *a priori* vermieden wird. Außerdem können diese Konstrukte, ohne chemische „Crosslinker“, vollsynthetisch und in hoher Reinheit hergestellt und deren Identität, im Gegensatz zu Protein-gekoppelten Peptiden, mittels MS verifiziert werden.

Als anspruchsvoller Sensitivitäts- bzw. Spezifitätstest, wurden mit Peptid-induzierten Antikörpern im 2D-Western-Blot, Proteine diverser Funktionsklassen nachgewiesen. Alle

nachzuweisenden Proteine wurden im 2D-Western-Blot gezielt und hintergrundfrei detektiert. Die Detektionsgrenze der Peptid-induzierten Seren lag zwischen 313 fmol und 4 fmol Einzelprotein, was sensitiver ist als die routinemäßig verwendeten MS-basierten Proteinidentifizierungs-Verfahren. Mit Peptid-Arrays, die mit der Technik der Spot-Synthese hergestellt wurden, ist das Bindungsverhalten der Peptid-induzierten Antikörper weiter untersucht worden. Dabei konnte festgestellt werden, dass überraschenderweise die überwiegende Zahl der generierten Peptid-induzierten Antikörper an definierte ca. 5-9 AS lange Teilsequenzen der bis zu 20 AS langen Peptid-Antigene binden. Diese besonders bemerkenswerte Eigenschaft, die bislang nur in Zusammenhang mit monoklonalen Antikörpern bekannt ist, gab den Anlass, das Verfahren zum Patent anzumelden.

Ferner wurde ein Verfahren entwickelt, das unter Verwendung von Peptid-induzierten Antiseren die Produktion von Antikörper-basierten Chips ermöglicht. Mit Protein A Partikeln als feste Phase ist es im Unterschied zu anderen häufig verwendeten Trägermaterialien gelungen, eine ausreichende Menge an Antikörpern direkt aus dem Rohserum zu binden, um einzelne Proteine in komplexen Proteingemischen (z.B. eukaryontischen Zell-Lysate) zu detektieren. Das Verfahren hat den Vorteil, dass einfach und schnell größere Mengen von Partikeln beschichtet und asserviert werden können. Mit den Partikeln können z.B. Antikörperchips individuell, für spezifische Fragestellungen angefertigt werden (sog. „custom designed“ Antikörperchips). Dadurch wird es möglich, ein Set von Proteinen in einer Vielzahl von Proben schnell, parallel und quantitativ zu detektieren.

## 7. Literatur

1. National Center for Biotechnology Information, *www.ncbi.nlm.nih.gov*. 2002.
2. Consortium, I.H.G.S., *Human Genome*. Nature, 2001. **409**: p. 860-921.
3. Venter, J.C., et al., *The Sequence of the Human Genome*. Science, 2001. **291**(5507): p. 1304-1351.
4. Liang, P. and A.B. Pardee, *Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction*. Science, 1992. **257**(5072): p. 967-71.
5. Welsh, J., et al., *Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA*. Nucleic Acids Res, 1992. **20**(19): p. 4965-70.
6. Velculescu, V.E., et al., *Serial analysis of gene expression*. Science, 1995. **270**(5235): p. 484-7.
7. DeRisi, J.L., V.R. Iyer, and P.O. Brown, *Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale*. Science, 1997. **278**(5338): p. 680-6.
8. Lipshutz, R.J., et al., *High density synthetic oligonucleotide arrays*. Nat Genet, 1999. **21**(1 Suppl): p. 20-4.
9. Bowtell, D.D., *Options available--from start to finish--for obtaining expression data by microarray*. Nat Genet, 1999. **21**(1 Suppl): p. 25-32.
10. Anderson, L. and J. Seilhamer, *A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver*. Electrophoresis, 1997. **18**(3-4): p. 533-7.
11. Gygi, S.P., et al., *Correlation between protein and mRNA abundance in yeast*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(3): p. 1720-30.
12. O'Donovan, C., R. Apweiler, and A. Bairoch, *The human proteomics initiative (HPI)*. Trends Biotechnol, 2001. **19**(5): p. 178-81.
13. Apweiler, R., H. Hermjakob, and N. Sharon, *On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1473**(1): p. 4-8.
14. Wilkins, M.R., et al., *Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it*. Biotechnol Genet Eng Rev, 1996. **13**: p. 19-50.
15. Hodges, P.E., W.E. Payne, and J.I. Garrels, *The Yeast Protein Database (YPD): a curated proteome database for Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(1): p. 68-72.
16. VanBogelen, R.A., et al., *Escherichia coli proteome analysis using the gene-protein database*. Electrophoresis, 1997. **18**(8): p. 1243-51.
17. Link, A.J., et al., *Identifying the major proteome components of Haemophilus influenzae type-strain NCTC 8143*. Electrophoresis, 1997. **18**(8): p. 1314-34.
18. Urquhart, B.L., et al., *'Proteomic contigs' of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis (BCG) using novel immobilised pH gradients*. Electrophoresis, 1997. **18**(8): p. 1384-92.
19. O'Connor, C.D., et al., *The proteome of Salmonella enterica serovar typhimurium: current progress on its determination and some applications*. Electrophoresis, 1997. **18**(8): p. 1483-90.

20. Cordwell, S.J., et al., *Characterisation of basic proteins from Spiroplasma melliferum using novel immobilised pH gradients*. Electrophoresis, 1997. **18**(8): p. 1393-8.
21. Sazuka, T. and O. Ohara, *Towards a proteome project of cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC6803: linking 130 protein spots with their respective genes*. Electrophoresis, 1997. **18**(8): p. 1252-8.
22. Yan, J.X., et al., *The Dictyostelium discoideum proteome--the SWISS-2DPAGE database of the multicellular aggregate (slug)*. Electrophoresis, 1997. **18**(3-4): p. 491-7.
23. Guerreiro, N., et al., *New Rhizobium leguminosarum flavonoid-induced proteins revealed by proteome analysis of differentially displayed proteins*. Mol Plant Microbe Interact, 1997. **10**(4): p. 506-16.
24. Sickmann, A., et al., *Towards a high resolution separation of human cerebrospinal fluid*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2002. **771**(1-2): p. 167- 96.
25. O'Neill, E.E., et al., *Towards complete analysis of the platelet proteome*. Proteomics, 2002. **2**(3): p. 288-305.
26. Appel, R.D., et al., *SWISS-2DPAGE: a database of two-dimensional gel electrophoresis images*. Electrophoresis, 1993. **14**(11): p. 1232-8.
27. Celis, J.E., et al., *Human 2-D PAGE databases for proteome analysis in health and disease: <http://biobase.dk/cgi-bin/celis>*. FEBS Lett, 1996. **398**(2-3): p. 129-34.
28. Eberini, I., et al., *A web site for the rat serum protein study group*. Electrophoresis, 1999. **20**(18): p. 3599-602.
29. Service, R.F., *Proteomics. Can Celera do it again?* Science, 2000. **287**(5461): p. 2136-8.
30. O'Farrell, P.H., *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins*. J.Biol.Chem., 1975. **250**(10): p. 4007-4021.
31. Klose, J., *Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals*. Humangenetik, 1975. **26**(3): p. 231-43.
32. Bjellqvist, B., et al., *Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications*. J Biochem Biophys Methods, 1982. **6**(4): p. 317-39.
33. Bjellqvist, B., et al., *Micropreparative two-dimensional electrophoresis allowing the separation of samples containing milligram amounts of proteins*. Electrophoresis, 1993. **14**(12): p. 1375-1378.
34. Wildgruber, R., et al., *Towards higher resolution: two-dimensional electrophoresis of Saccharomyces cerevisiae proteins using overlapping narrow immobilized pH gradients*. Electrophoresis, 2000. **21**(13): p. 2610-6.
35. Gorg, A., et al., *The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients*. Electrophoresis, 2000. **21**(6): p. 1037-53.
36. Quadroni, M. and P. James, *Proteomics and automation*. Electrophoresis, 1999. **20**(4-5): p. 664-77.
37. Berggren, K., et al., *Background-free, high sensitivity staining of proteins in one- and two- dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using a luminescent ruthenium complex*. Electrophoresis, 2000. **21**(12): p. 2509-21.

38. Patton, W.F., *A thousand points of light: the application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics*. Electrophoresis, 2000. **21**(6): p. 1123-44.
39. Steinberg, T.H., et al., *SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains: one-step fluorescent staining of denaturing gels for detection of nanogram levels of protein*. Anal Biochem, 1996. **239**(2): p. 223-37.
40. Edman, P. and G. Begg, *A protein sequenator*. Eur J Biochem, 1967. **1**(1): p. 80-91.
41. Hewick, R.M., et al., *A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator*. J Biol Chem, 1981. **256**(15): p. 7990-7.
42. Aebersold, R.H., et al., *Electroblotting onto activated glass. High efficiency preparation of proteins from analytical sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels for direct sequence analysis*. J Biol Chem, 1986. **261**(9): p. 4229-38.
43. Lottspeich, H. and Z. H., *Bioanalytik*. 1998, Heidelberg . Berlin.
44. Henzel, W.J., et al., *Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(11): p. 5011-5.
45. Yates, J.R., et al., *Peptide mass maps: a highly informative approach to protein identification*. Anal Biochem, 1993. **214**(2): p. 397-408.
46. Karas, M. and F. Hillenkamp, *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons*. Anal Chem, 1988. **60**(20): p. 2299-301.
47. Wilm, M., G. Neubauer, and M. Mann, *Parent ion scans of unseparated peptide mixtures*. Anal Chem, 1996. **68**(3): p. 527-33.
48. Metzger, J.W., et al., *Electrospray mass spectrometry and tandem mass spectrometry of synthetic multicomponent peptide mixtures: determination of composition and purity*. Anal Biochem, 1994. **219**(2): p. 261-77.
49. Fenn, J.B., et al., *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. Science, 1989. **246**(4926): p. 64-71.
50. Spengler, B., et al., *Peptide sequencing by matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 1992. **6**(2): p. 105-8.
51. Kaufmann, R., B. Spengler, and F. Lutzenkirchen, *Mass spectrometric sequencing of linear peptides by product-ion analysis in a reflectron time-of-flight mass spectrometer using matrix-assisted laser desorption ionization*. Rapid Commun Mass Spectrom, 1993. **7**(10): p. 902-10.
52. Gygi, S.P., et al., *Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(10): p. 994-9.
53. Anderson, N.L. and N.G. Anderson, *Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words*. Electrophoresis, 1998. **19**(11): p. 1853-61.
54. Corthals, G.L., et al., *The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research*. Electrophoresis, 2000. **21**(6): p. 1104-15.
55. Goffeau, A., et al., *Life with 6000 genes*. Science, 1996. **274**(5287): p. 546, 563-7.
56. Laing, P., *Luminescent visualization of antigens on blots*. J Immunol Methods, 1986. **92**(2): p. 161-5.

57. Georgiou, G., et al., *Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: from the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines*. Nat Biotechnol, 1997. **15**(1): p. 29-34.
58. Sidhu, S.S., et al., *Phage display for selection of novel binding peptides*. Methods Enzymol, 2000. **328**: p. 333-63.
59. Sidhu, S.S., *Phage display in pharmaceutical biotechnology*. Curr Opin Biotechnol, 2000. **11**(6): p. 610-6.
60. Griffiths, A.D., et al., *Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires*. Embo J, 1994. **13**(14): p. 3245-60.
61. Hoogenboom, H.R. and G. Winter, *By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro*. J Mol Biol, 1992. **227**(2): p. 381-8.
62. Hoogenboom, H.R., P. Henderikx, and H. de Haard, *Creating and engineering human antibodies for immunotherapy*. Adv Drug Deliv Rev, 1998. **31**(1-2): p. 5-31.
63. Merrifield, R.B. and J.M. Stewart, *Automated peptide synthesis*. Nature, 1965. **207**(996): p. 522-3.
64. Merrifield, *Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide*. J. Amer. Chem. Soc., 1963. **85**: p. 2149-2154.
65. Merrifield, R.B., *Automated synthesis of peptides*. Science, 1965. **150**(693): p. 178-85.
66. Jackson, D.C., et al., *Preparation and properties of totally synthetic immunogens*. Vaccine, 1999. **18**(3-4): p. 355-61.
67. Arnold, G.J. and T. Froehlich, *Peptide Induced Antibodies as a Tool for Systematic Gene to Protein Linkage*. Peptide 1996 Proceedings, of the Twenty-Fourth European Peptide Symposium, 1996: p. 211-212.
68. Chersi, A., F. Di Modugno, and L. Rosano, *Aims and limitations in the use of anti-peptide antibodies in molecular biology*. Biol Chem, 1997. **378**(7): p. 635-40.
69. Fröhlich, T. and G.J. Arnold, *Peptide-induced antibodies as a tool to link genomes and proteomes*. In: Peptide Science (Ed.: Y. Shimonishi), 1999: p. 825-826.
70. White, D.A., N.D. Belyaev, and B.M. Turner, *Preparation of site-specific antibodies to acetylated histones*. Methods, 1999. **19**(3): p. 417-24.
71. Hoeflich, A., et al., *Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 in transgenic mice reduces postnatal body weight gain*. ENDOCRINOLOGY. Endocrinology., 1999. **140**(12): p. 5488-5496.
72. Deen, C., et al., *A novel carbodiimide coupling method for synthetic peptides. Enhanced anti-peptide antibody responses*. J Immunol Methods, 1990. **129**(1): p. 119-25.
73. Briand, J.P., S. Muller, and M.H. Van Regenmortel, *Synthetic peptides as antigens: pitfalls of conjugation methods*. J Immunol Methods, 1985. **78**(1): p. 59-69.
74. King, T.P., Y. Li, and L. Kochoumian, *Preparation of protein conjugates via intermolecular disulfide bond formation*. Biochemistry, 1978. **17**(8): p. 1499-506.
75. Vergara, U. and J.P. Tam, *A novel design of peptide immunogens: synthetic peptide with a reversible handle for the attachment to protein carriers*. Pept Res, 1989. **2**(1): p. 134-9.

76. Herzenberg, L.A. and T. Tokuhisa, *Carrier-priming leads to hapten-specific suppression*. Nature, 1980. **285**(5767): p. 664-7.
77. Schutze, M.P., et al., *Carrier-induced epitopic suppression, a major issue for future synthetic vaccines*. J Immunol, 1985. **135**(4): p. 2319-22.
78. Butz, S., et al., *Immunization and affinity purification of antibodies using resin-immobilized lysine-branched synthetic peptides*. Pept Res, 1994. **7**(1): p. 20-3.
79. Rapp, W.L., et al., *Comparative study of antibody titers induced by a peptide epitope conjugated with protein, lipopeptide, polyoxyethylene and polyoxyethylen-polystyrene graft copolymer*. Peptides 1990, 1990: p. 849-850.
80. Tam, J.P. and Y.A. Lu, *Vaccine engineering: enhancement of immunogenicity of synthetic peptide vaccines related to hepatitis in chemically defined models consisting of T- and B-cell epitopes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(23): p. 9084-8.
81. Tam, J.P., *Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(15): p. 5409-13.
82. Briand, J.P., et al., *Application and limitations of the multiple antigen peptide (MAP) system in the production and evaluation of anti-peptide and anti-protein antibodies*. J Immunol Methods, 1992. **156**(2): p. 255-65.
83. Sinigaglia, F., et al., *A malaria T-cell epitope recognized in association with most mouse and human MHC class II molecules*. Nature, 1988. **336**(6201): p. 778-80.
84. Partidos, C.D. and M.W. Steward, *Prediction and identification of a T cell epitope in the fusion protein of measles virus immunodominant in mice and humans*. J Gen Virol, 1990. **71**(Pt 9): p. 2099-105.
85. Panina-Bordignon, P., et al., *Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells*. Eur J Immunol, 1989. **19**(12): p. 2237-42.
86. Ho, P.C., et al., *Identification of two promiscuous T cell epitopes from tetanus toxin*. Eur J Immunol, 1990. **20**(3): p. 477-83.
87. Brett, S.J., et al., *Fine specificity of T cell recognition of the same peptide in association with different I-A molecules*. J Immunol, 1989. **143**(3): p. 771-9.
88. de Velasco, E.A., et al., *Synthetic peptides representing T-cell epitopes act as carriers in pneumococcal polysaccharide conjugate vaccines*. Infect Immun, 1995. **63**(3): p. 961-8.
89. Shaw, D.M., et al., *Influence of the T-helper epitope on the titre and affinity of antibodies to B-cell epitopes after co-immunization*. Mol Immunol, 1993. **30**(11): p. 961-8.
90. Kyte, J. and R.F. Doolittle, *A simple method for displaying the hydropathic character of a protein*. J Mol Biol, 1982. **157**(1): p. 105-32.
91. Altschul, S.F., et al., *Basic local alignment search tool*. J Mol Biol, 1990. **215**(3): p. 403-10.
92. Atherton, E., Logan, C.J. and Shepard, R.C., J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1981. **1**: p. 538.
93. Freund, J., *The mode of action of immunologic adjuvants*. Adv. Tuberc. Res., 1956. **7**: p. 130-148.

94. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
95. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(259): p. 680-685.
96. Hage, D.S., *Immunoassays*. Anal Chem, 1999. **71**(12): p. 294R-304R.
97. Kemeny, D.M., *Titration of antibodies*. J Immunol Methods, 1992. **150**(1-2): p. 57-76.
98. Skowsky, W.R. and D.A. Fisher, *The use of thyroglobulin to induce antigenicity to small molecules*. J Lab Clin Med, 1972. **80**(1): p. 134-44.
99. Golaz, O., et al., *Plasma and red blood cell protein maps: update 1993*. Electrophoresis, 1993. **14**(11): p. 1223-1231.
100. Swartz, J.R., *Advances in Escherichia coli production of therapeutic proteins*. Curr Opin Biotechnol, 2001. **12**(2): p. 195-201.
101. Kigawa, T., et al., *Cell-free production and stable-isotope labeling of milligram quantities of proteins*. FEBS Lett, 1999. **442**(1): p. 15-9.
102. Henikoff, S. and J.G. Henikoff, *Amino acid substitution matrices from protein blocks*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(22): p. 10915-9.
103. Glass, G.B.J., *Gastric intrinsic factor and other vitamin B12 binders*. 1974, Stuttgart: Georg Thieme.
104. Solch, J.P. and G.J. Arnold, *Multiplex reverse transcription polymerase chain reaction combined with temperature gradient gel electrophoresis as a tool for the normalized quantitation of intrinsic factor mRNA*. Electrophoresis, 1996. **17**(1): p. 30-9.
105. Loomans, E.E., et al., *Direct coating of poly(lys) or acetyl-thio-acetyl peptides to polystyrene: the effects in an enzyme-linked immunosorbent assay*. Anal Biochem, 1997. **248**(1): p. 117-29.
106. Rasmussen, S.E., *Solid phases and chemistries*, in *Complementary Immunoassays*, W.P. Collins, Editor. 1988, John Wiley & Sons: Chichester. p. 43-55.
107. Beekman, N.J., et al., *Highly immunogenic and fully synthetic peptide-carrier constructs targeting GnRH*. Vaccine, 1999. **17**(15-16): p. 2043-50.
108. Ivanov, V.S., et al., *Effective method for synthetic peptide immobilization that increases the sensitivity and specificity of ELISA procedures*. J Immunol Methods, 1992. **153**(1-2): p. 229-33.
109. Dyson, H.J. and P.E. Wright, *Antigenic peptides*. FASEB J. FASEB Journal, 1995. **9**(1): p. 37-42.
110. Fischer, P.M., A. Comis, and M.E. Howden, *Direct immunization with synthetic peptidyl-polyamide resin. Comparison with antibody production from free peptide and conjugates with carrier proteins*. J Immunol Methods, 1989. **118**(1): p. 119-23.
111. Kanda, P., R.C. Kennedy, and J.T. Sparrow, *Synthesis of polyamide supports for use in peptide synthesis and as peptide-resin conjugates for antibody production*. Int J Pept Protein Res, 1991. **38**(4): p. 385-91.
112. Mond, J.J., et al., *T cell independent antigens*. Curr Opin Immunol, 1995. **7**(3): p. 349-54.

113. Vos, Q., et al., *B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms*. Immunol Rev, 2000. **176**: p. 154-70.
114. Villadangos, J.A., *Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them*. Mol Immunol, 2001. **38**(5): p. 329-46.
115. Delves, P.J. and I.M. Roitt, *The immune system. First of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(1): p. 37-49.
116. Delves, P.J. and I.M. Roitt, *The immune system. Second of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(2): p. 108-17.
117. Kaumaya, P.T., et al., *Peptide vaccines incorporating a 'promiscuous' T-cell epitope bypass certain haplotype restricted immune responses and provide broad spectrum immunogenicity*. J Mol Recogit, 1993. **6**(2): p. 81-94.
118. Kaumaya, P.T.P., *Synthetic Peptide Vaccines: Dream or Reality.*, in *Peptides in Immunology*, C.H. Schneider, Editor. 1996, Wiley and Sons, Ltd., p. 117-148.
119. Ferro, V.A. and W.H. Stimson, *Investigation into suitable carrier molecules for use in an anti-gonadotrophin releasing hormone vaccine*. Vaccine, 1998. **16**(11-12): p. 1095-102.
120. Hathaway, L.J., et al., *Induction of systemic immune responses to measles virus synthetic peptides administered intranasally*. Vaccine, 1995. **13**(16): p. 1495-500.
121. McFarland, B.J. and C. Beeson, *Binding interactions between peptides and proteins of the class II Major Histocompatibility Complex*. Med Res Rev, 2002. **22**(2): p. 168-203.
122. Lottspeich, F., *Proteomanalyse - ein Weg zur Funktionsanalyse von Proteinen*. Angew. Chem, 1999. **111**: p. 2690-2647.
123. Wilkins, M.R., et al., *Current challenges and future applications for protein maps and post-translational vector maps in proteome projects*. Electrophoresis, 1996. **17**(5): p. 830-8.
124. Chambers, G., et al., *Proteomics: a new approach to the study of disease*. J Pathol, 2000. **192**(3): p. 280-8.
125. Hoeflich, A., et al., *Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 in transgenic mice reduces postnatal body weight gain*. Endocrinology, 1999. **140**(12): p. 5488-96.
126. Frank, R., *SPOT-Synthesis: An Easy Technique for the Positionally Addressable, Parallel Chemical Synthesis on a Membrane Support.* Tetrahedron, 1992. **48**: p. 9217.
127. Frank, R., S. Hoffmann, H. Overwin, Ch. Behn and H. Gausepohl, *Easy preparation of synthetic peptide repertoires for immunological studies utilizing SPOT-synthesis*, in *Peptides in Immunology*, C.H. Schneider, Editor. 1996: New York.
128. Reineke, U., R. Volkmer-Engert, and J. Schneider-Mergener, *Applications of peptide arrays prepared by the SPOT-technology*. Curr Opin Biotechnol, 2001. **12**(1): p. 59-64.
129. Kaufmann, S.H., C.M. Ewing, and J.H. Shaper, *The erasable Western blot*. Anal Biochem, 1987. **161**(1): p. 89-95.
130. Cunningham, B.C. and J.A. Wells, *High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis*. Science, 1989. **244**(4908): p. 1081-5.

131. Kaljuste, K. and A. Unden, *New method for the synthesis of N-methyl amino acids containing peptides by reductive methylation of amino groups on the solid phase*. Int J Pept Protein Res, 1993. **42**(2): p. 118-24.
132. Perich, J.W., et al., *Epitope analysis of the multiphosphorylated peptide alpha sI-casein (59-79)*. J Pept Sci, 1999. **5**(5): p. 221-33.
133. Ottinger, E.A., et al., *Synthesis of phosphotyrosine-containing peptides and their use as substrates for protein tyrosine phosphatases*. Biochemistry, 1993. **32**(16): p. 4354-61.
134. Otvos, L., Jr., et al., *Coupling strategies in solid-phase synthesis of glycopeptides*. Pept Res, 1989. **2**(6): p. 362-6.
135. Kitagawa, K., et al., *Facile solid-phase synthesis of sulfated tyrosine-containing peptides: Part II. Total synthesis of human big gastrin-II and its C-terminal glycine-extended peptide (G34-Gly sulfate) by the solid-phase segment condensation approach*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2001. **49**(8): p. 958-63.
136. Kitagawa, K., et al., *Facile solid-phase synthesis of sulfated tyrosine-containing peptides: total synthesis of human big gastrin-II and cholecystokinin (CCK)-39*. J Org Chem, 2001. **66**(1): p. 1-10.
137. Haynes, P.A. and J.R. Yates, *Proteome profiling-pitfalls and progress*. Yeast, 2000. **17**(2): p. 81-7.
138. Voss, T. and P. Haberl, *Observations on the reproducibility and matching efficiency of two-dimensional electrophoresis gels: consequences for comprehensive data analysis*. Electrophoresis, 2000. **21**(16): p. 3345-50.
139. Borrebaeck, C.A., *Antibodies in diagnostics - from immunoassays to protein chips*. Immunol Today, 2000. **21**(8): p. 379-82.
140. Mujumdar, R.B., et al., *Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters*. Bioconjug Chem, 1993. **4**(2): p. 105-11.
141. MacBeath, G. and S.L. Schreiber, *Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination [see comments]*. Science, 2000. **289**(5485): p. 1760-3.
142. Haab, B.B., M.J. Dunham, and P.O. Brown, *Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions*. Genome Biol, 2001. **2**(2).
143. Morozov, V.N. and T. Morozova, *Electrospray deposition as a method for mass fabrication of mono- and multicomponent microarrays of biological and biologically active substances*. Anal Chem, 1999. **71**(15): p. 3110-7.
144. Sato, K., et al., *Integration of an immunosorbent assay system: analysis of secretory human immunoglobulin A on polystyrene beads in a microchip*. Anal Chem, 2000. **72**(6): p. 1144-7.
145. Lueking, A., et al., *Protein microarrays for gene expression and antibody screening*. Anal Biochem, 1999. **270**(1): p. 103-11.
146. Arenkov, P., et al., *Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions*. Anal Biochem, 2000. **278**(2): p. 123-31.

147. Garnier, A., D. Husken, and J. Weiler, *New approaches towards fluorescence labelling of messenger RNA transcripts*. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2001. **20**(4-7): p. 1181-5.
148. Eisen, M.B. and P.O. Brown, *DNA arrays for analysis of gene expression*. *Methods Enzymol*, 1999. **303**: p. 179-205.
149. Stillman, B.A. and J.L. Tonkinson, *FAST slides: a novel surface for microarrays*. *Biotechniques*, 2000. **29**(3): p. 630-5.
150. Goding, J.W., *Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent*. *J Immunol Methods*, 1978. **20**: p. 241-53.
151. Stahl, S., et al., *Engineered bacterial receptors in immunology*. *Curr Opin Immunol*, 1993. **5**(2): p. 272-7.
152. Rodrigues, A.E., et al., *Bioseparations with permeable particles*. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 1995. **664**(1): p. 233-40.

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
2DE	Zweidimensionale Elektrophorese
Abb.	Abbildung
ADH	Aldehyddehydrogenase
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäuren
bd	Bidestilliert
BSA	Bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
CA	Carboanhydrasen
ca.	circa
CAH	Carboanhydrase
CDR	Complementarity deterring regions
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonat
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CMV	Cytomegalovirus
Cy5-NHS	1-(e-Carboxypentyl)-1'-(ethyl)-3,3,3',3'-tetramethyl-indodicarbocyanin-5,5'disulfonatkaliumsalz-N-hydroxysuccinimidester
Da	Dalton
DCM	Dichlormethan
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTE	1,4-Dithioerythrit
DTT	Dithiothreitol
ECDI	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carboimid

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbend assay
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ESI-MS	Elektrospray Ionisations Massenspektrometrie
et al.	et alia
eV	Elektronenvolt
Fa.	Firma
Fmoc	Fluorenylmethyloxycarbonyl
fmol	Femtomol
g	Gramm
h	Stunde
HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HIF	„Human gastric intrinsic factor“
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
HRP	Merrettich Peroxidase
ICAT	Isotope-coded affinity tag
IEF	isoelektrische Fokussierung
IGF	Insulin-like growth factor
IGFBP	Insulin-like growth factor binding Proteine
IP	Isoelektrischer Punkt
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
kDa	KiloDalton
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
kV	Kilovolt
Log	Logarithmus
M	mol/l
mA	Milliamper
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorption-Ionisation
MALDI-MS	Matrix assistierte Laser Desorptions Ionisations Massenspektrometrie

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
MALDI-PMF	MALDI Peptide Mass Fingerprinting
MAP	Multiple antigenic peptide
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
mRNA	“messenger” RNA
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Neg.	Negativ
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMP	N-Methylpyrrolidon
NOS	N-Oxysuccinimid
Nr.	Nummer
PBS	Posphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pm	Picomol
POE	Polyoxyethylen
pos.	positiv
PSD	Post-source decay
PyBop	Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidino-phosphonium-hexafluorophosphat
RAP-PCR	RNA arbitrarily primed PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Reversed phase (Umkehrphase)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SAGE	Serial analysis of gene expression

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
SD	Standartabweichung
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidelektrophorese
sog.	sogenannten
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TFA	Triflouressigsäure
TMB	Tetramethylbenzidin
TMSBr	Trimethylbromsilan
TOF	Time of flight
Tris	[Tris(hydroxymethyl)aminomethan]
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenanteil
Vh	Voltstunde
Vis	Visible
w/v	Gewicht pro Volumenanteil
WT-Maus	Wildtyp-Maus
z.A.	zur Analyse
z.B.	zum Beispiel

# Lebenslauf

Name: Thomas Fröhlich  
Geburtsdatum/-ort: 19.08.1966 in St. Maur des Fossés (Frankreich)  
Anschrift: Daxerstr. 29  
D-82140 Olching  
Tel.: 08142/45290  
Familienstand: ledig

## Schulbildung

### Grundschule:

01/03/1970-30/11/1971: Ecole maternelle Ville d'Avray  
01/12/1971-28/02/1971: Ecole maternelle Freiburg i. Br.  
01/03/1972-31/08/1975: Ecole française Vauban Freiburg i. Br.  
01/09/1975-31/03/1977: Grundschule Freiburg i. Br.  
01/04/1977-31/08/1977: Grundschule München Lochhausen

### Gymnasium:

01/09/1977-31/08/1986: Gymnasium Olching

### Abschluss:

27/06/1986: Allgemeine Hochschulreife

## Wehrdienst

01/10/1986-31/12/1987: Sanitätsakademie München

## Hochschulbildung

01/10/1987-03/05/1994: Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München

03/05/1994-03/11/1994: Diplomarbeit bei Prof. Dr. H. Domdey am Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München

### Thema der Diplomarbeit:

„Charakterisierung einer gerichteten cDNA-Bank aus menschlicher Magenschleimhaut und Etablierung von „Expressed Sequence Tags“ (ESTs) durch partielle Sequenzanalyse“

### Abschlüsse:

15/11/1990: Vordiplom Chemie  
03/11/1994: Diplom in Chemie

## Arbeitstätigkeit

ab 01/05/1995: Arbeitsgruppe Dr. Arnold am Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München

### Tätigkeitsfeld:

- Auftragssynthesen von Peptiden
- Gelegenheit zur Vorbereitung der Promotion
- ab 01/01/2002 wissenschaftliche Tätigkeit im Rahmen des BMBF Verbundes: „Aufbau einer Technologieplattform zur funktionellen Proteom-Analyse von Geweben“