

Lehrstuhl für Zellbiologie der Technischen Universität München

Wissenschaftszentrum Weihenstephan

Univ.-Prof. Dr. Bertold Hock, em.

# **Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers zum immunochemischen Nachweis von Proglycinin aus Soja**

Georg Mahlknecht

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für  
Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung  
des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Heinrich H. D. Meyer

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. K. Kramer

2. Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Johann Bauer

Die Dissertation wurde am 04.07.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung  
und Umwelt am 12.11.2007 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungen</b> .....	3
<b>Tabellen</b> .....	7
<b>Abkürzungen</b> .....	8
<b>1 Einleitung</b> .....	9
1.1 Soja und seine Speicherproteine .....	9
1.2 Allergien.....	11
1.3 Antikörper .....	12
1.4 Struktur und Einteilung von Immunglobulinen .....	13
1.5 Monoklonale Antikörper .....	14
1.6 Zielsetzung und methodische Vorgehensweise.....	15
<b>2 Material und Methoden</b> .....	17
2.1 Material .....	17
2.2 Gelelektrophorese.....	28
2.3 SDS-PAGE.....	29
2.4 Western-Blot .....	33
2.5 Dot-Blot.....	36
2.6 Präparative SDS-PAGE.....	38
2.7 MALDI-TOF .....	41
2.8 Immunisierung .....	41
2.9 Gewinnung der Milzzellen für die Zellfusion .....	42
2.10 Fusion .....	43
2.11 HAT-Selektion .....	46
2.12 Klonierung und Reklonierung von Hybridomzellen.....	47
2.13 Gefrierkonservierung von Zellen .....	49
2.14 Massenproduktion der monoklonalen Antikörper.....	51
2.15 Lyophilisierung .....	53
2.16 Proteinkonzentration .....	54
2.17 Herstellung des Soja-Extrakts .....	56
2.18 Affinitätschromatographie .....	57
2.19 Antikörper-Biotinylierung.....	60
2.20 Herstellung einer Immunaффinitätschromatographiesäule .....	61
2.21 Aufreinigung des Proglycinin-Standards .....	63
2.22 Bradford-Assay .....	64
2.23 Immunoassays .....	65
2.24 Auswertung der Immunoassays .....	70
2.25 Bestimmung der Immunglobulin-Subklassen .....	71
2.26 Kreuzreaktivität .....	73
2.27 Epitopmapping .....	74
<b>3 Ergebnisse</b> .....	76
3.1 Antigenaufreinigung.....	76
3.2 MALDI-TOF.....	77
3.3 Produktion von Hybridomazellen und Screening verschiedener Zelllinien ELISA .....	79
3.4 Screening verschiedener Zelllinien im Dot-Blot.....	79
3.5 Screening verschiedener Zelllinien im Western-Blot .....	81
3.6 Massenproduktion des Antikörpers G17E im Miniperm .....	87
3.7 Antikörperaufreinigung.....	87
3.8 Aufreinigung des Proglycinin-Standards .....	88
3.9 Bradford-Assay .....	90
3.10 Subklassenbestimmung .....	92

3.11 Etablierung einer Kalibrationskurve .....	92
3.12 Kreuzreaktivität .....	98
3.13 Epitopmapping .....	99
<b>4 Diskussion</b> .....	<b>109</b>
4.1 Allgemeine Betrachtungen zur Arbeit.....	109
4.2 Präparative Gelelektrophorese .....	110
4.3 SDS-Gele.....	111
4.4 Western-Blot .....	111
4.5 Immunisierung .....	112
4.6 Zellkultur .....	113
4.7 Screening der Zelllinien im Western-Blot.....	114
4.8 Massenproduktion in Zellkulturflaschen und im Miniperm .....	114
4.9 Aufreinigung des monoklonalen Antikörpers G17E.....	115
4.10 Subklassenbestimmung von G17E.....	115
4.11 Gewinnung von reinem Proglycinin .....	115
4.12 Etablierung der Immunoassays .....	116
4.13 Quantifizierung von Antikörpern und Proteinen.....	117
4.14 Kreuzreaktivität .....	117
4.15 Epitopmapping .....	118
4.16 Anwendungsmöglichkeiten des Antikörpers G17E .....	118
<b>5 Zusammenfassung</b> .....	<b>120</b>
<b>6 Literatur</b> .....	<b>122</b>
<b>7 Danksagung</b> .....	<b>128</b>

## Abbildungen

- Abb. 1:** Fruchtstand der Sojabohne [Aus: BAUER, S. (2007) Image K4389-1 (<http://www.ars.usda.gov/is/graphics/photos/k4389-11.htm>) Stand: 23.01.2007].
- Abb. 2:** Das Homotrimer Proglycinin A1aB1b [Aus: ADACHI, M., TAKENAKA, Y., GIDAMIS, A.B., MIKAMI, B. UTSUMI, S. (2001) Crystal structure of soybean proglycinin A1aB1b homotrimer. J. Mol. Biol. 305: 291-305 (<http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/msdlite/atlas/visualization/1fxz.html>) Stand: 23.01.2007].
- Abb. 3:** Schematischer Aufbau eines IgG-Moleküls mit einem konstanten (c) und variablen (v) Bereich [leichten (L) und schweren Ketten (H)] [Aus: CLARK, M. (2003) A collection of images of Ig structures ([http://www-immuno.path.cam.ac.uk/~mrc7/igs/mike\\_images.html](http://www-immuno.path.cam.ac.uk/~mrc7/igs/mike_images.html)) Stand: 23.01.2007].
- Abb. 4:** Polymerisationsreaktion zur Bildung eines Polyacrylamidgels [Aus: Bio-Rad (2000) Acrylamide Polymerization-A Practical Approach ([http://www.biorad.com/LifeScience/pdf/Bulletin\\_1156.pdf](http://www.biorad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_1156.pdf)) Stand: 23.01.2007].
- Abb. 5:** Protein-Standard von Bio-Rad [Aus: Bio-Rad (2007) Precision Plus Protein Unstained Standards ([www.bio-rad.com/B2B/BioRad/product/br\\_product.jsp](http://www.bio-rad.com/B2B/BioRad/product/br_product.jsp)) Stand: 23.01.2007].
- Abb. 6:** Gelapparatur und Elektrophoresekammer [Aus: BIO-RAD (2007) Mini-PROTEAN ® 3 Cell Instruction Manual ([http://www.bio-rad.com/emc\\_upload/Literature/444\\_32/4006157\\_B.pdf](http://www.bio-rad.com/emc_upload/Literature/444_32/4006157_B.pdf)) Stand: 32.01.2007].
- Abb. 7:** A: Naß-Blot, B: horizontaler Semi-Dry-Blot [Aus: AMERSHAM BIOSCIENCES (1999) Protein-Electrophoresis-technical manual ([http://www5.amershambiosciences.com/aptrix/upp00919.nsf/\(FileDownload\)?OpenAgent&docid=441122C35FCDD058AC1256EB40044A89C&file=80601388.pdf](http://www5.amershambiosciences.com/aptrix/upp00919.nsf/(FileDownload)?OpenAgent&docid=441122C35FCDD058AC1256EB40044A89C&file=80601388.pdf)) Stand: 23.01.2007].
- Abb. 8:** Schematischer Ablauf des Western-Blots.
- Abb. 9:** Aufbau der Model 491 Prep Cell zur präparativen Gewinnung von Proteinen [Aus: Bio-Rad (2007) Model 491 Prep Cell and Mini Prep Cell (<http://www.bio-rad.com>) Stand: 23.01.2007].
- Abb. 10:** Neubauer-Zählkammer [Aus: WIKIPEDIA-USER: ALCIBIADES (2006) Neubauer improved counting chamber ([http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Neubauer\\_improved\\_counting\\_chamber.jpg](http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Neubauer_improved_counting_chamber.jpg)) Stand: 23.01.2007].

- Abb. 11:** Schematischer Aufbau der Gitternetzstruktur einer Neubauer-Zählkammer mit den hier grau markierten Auszählfeldern [Aus: MTA-LABOR (2007) Neubauer-Zählkammer ([http://www.mta-labor.info/front\\_content.php?idcat=25&idart=139](http://www.mta-labor.info/front_content.php?idcat=25&idart=139)) Stand: 23.01.2007].
- Abb. 12:** Schematischer Ablauf der monoklonalen Antikörperproduktion.
- Abb. 13:** Miniperm-Bioreaktor zur Massenproduktion von Antikörpern [Aus: GREINER (2006) mini-Perm ([http://www.greinerbioone.com/de/row/files/84228/075050\\_miniperM.pdf](http://www.greinerbioone.com/de/row/files/84228/075050_miniperM.pdf)) Stand: 23.01.2007].
- Abb. 14:** Darstellung der benötigten Geräte und der funktionellen Ablafrichtung (grüne Pfeile) bei einer Affinitätschromatographie.
- Abb. 15:** Schematischer Ablauf der Biotinylierung eines Proteins [Aus: PIERCE (2007) EZ-Link-Sulfo-NHS Biotinylation Kit (<http://www.piercenet.com/files/1775as4.pdf>) Stand: 23.01.2007].
- Abb. 16:** Schematischer Verlauf des nicht kompetitiven, heterogenen ELISAs für gereinigtes Proglycinin und ein Rohextrakt aus Soja.
- Abb. 17:** Schematischer Ablauf des Sandwich-ELISAs.
- Abb. 18:** Schematischer Ablauf des Assays zur Bestimmung der Subklassen eines Antikörpers.
- Abb. 19:** Verlauf einer typischen Proteinaufreinigung mit der präparativen Gelelektrophorese.
- Abb. 20:** Darstellung der erhaltenen Produkte aus der präparativen Gelelektrophorese in einer SDS-PAGE (Silberfärbung).
- Abb. 21:** Darstellung der massenspektroskopischen Untersuchung der oberen Bande, die dem Molekül Proglycinin entspricht.
- Abb. 22:** Darstellung der massenspektroskopischen Untersuchung der unteren Bande, die dem Molekül  $\beta$ -Conglycinin entspricht.
- Abb. 23:** Verschiedene, exemplarische Klone in Wechselwirkung mit drei verschiedenen Antigenen, die alle die entsprechenden Proteine Proglycinin und  $\beta$ -Conglycinin enthielten.
- Abb. 24:** Vergleich der Absorptionen im ELISA eines 2,5 %-Extrakts mit einem 0 %-Extrakt nach Inkubation mit einem SDI-Primär- und Sekundärkonjugat.
- Abb. 25:** Darstellung der Etablierung eines Referenz-Western Blots mit dem Antikörper G17E.

- Abb. 26:** Darstellung eines Screenings mit den Zellkulturüberständen zweier Zelllinien im Western-Blot. Beide Zelllinien bilden Proglycinin-spezifische Antikörper.
- Abb. 27:** Darstellung eines Screenings mit den Zellkulturüberständen zweier Zelllinien im Western-Blot. Beide Zelllinien bilden  $\beta$ -Conglycinin spezifische Antikörper.
- Abb. 28:** Darstellung eines Screenings mit den Zellkulturüberständen zweier Zelllinien im Western-Blot. Beide Zelllinien bilden Proglycinin-spezifische Antikörper.
- Abb. 29:** Darstellung eines Screenings mit den Zellkulturüberständen zweier Zelllinien im Western-Blot.
- Abb. 30:** Darstellung der Aufreinigung des Antikörpers G17E mit der Affinitätschromatographie.
- Abb. 31:** Erste Elution des Proglycinins von der mit G17E gekoppelten Immunaффinitätssäule.
- Abb. 32:** Beispielhafte Elution für zweite und dritte Elutionsschritte von Proglycinin an der Immunaффinitätschromatographiesäule bei pH 3.
- Abb. 33:** SDS-PAGE mit dem aufgereinigten Proglycinin-Standard (Silberfärbung)
- Abb. 34:** Vergleich einer BSA-Verdünnungsreihe (schwarz) mit der Verdünnungsreihe des aus einer Aufreinigung erhaltenen Proglycinins (rot).
- Abb. 35:** Darstellung der Ergebnisse aus der Subklassenbestimmung des Antikörpers G17E (Subklasse: IgG<sub>2b</sub>; Leichtkette:  $\kappa$ ).
- Abb. 36:** Kalibrationskurve mit aufgereinigtem Proglycinin. Der obere Graph stellt die absolute und der untere die normierte Kalibrationskurve dar.
- Abb. 37:** Kalibrationskurve mit dem Soja-Extrakt. Der obere Graph stellt die absolute und der untere die normierte Kalibrationskurve dar.
- Abb. 38:** Kalibrationskurve mit dem Soja-Extrakt unter Anwendung des Ziege-Anti-Maus-POD-Antikörpers. Der obere Graph stellt die absolute und der untere die normierte Kalibrationskurve dar.
- Abb. 39:** Vergleich der normierten Kalibrationskurven mit dem Soja-Extrakt unter Anwendung des Ziege-Anti-Maus-POD-Antikörpers (schwarz) und des biotinylierten G17E-Antikörpers (rot).
- Abb. 40:** Kalibrationskurve eines Sandwich-ELISAs unter Verwendung des Antikörpers G16C. Der obere Graph stellt die absolute und der untere die normierte Kalibrationskurve dar.

- Abb. 41:** Vergleich der Kreuzreaktivitäten von G17E (mit dem Soja-Extrakt als Referenz) mit verschiedenen Protein-Extrakten.
- Abb. 42:** Vergleich von Epitop A mit verschiedenen Spezies der Proteindatenbank SWISS-PROT [Aus: EXPASY PROTEOMICS SERVER (2005) ProtScale (<http://www.expasy.org/cgi-bin/blast.pl>) Stand: 23.01.2007].
- Abb. 43:** Vergleich von Epitop A1 mit verschiedenen Spezies der Proteindatenbank SWISS-PROT (Aus: EXPASY PROTEOMICS SERVER (2005) ProtScale (<http://www.expasy.org/cgi-bin/blast.pl>) Stand: 23.01.2007].
- Abb. 44:** Vergleich von Epitop B mit verschiedenen Spezies der Proteindatenbank SWISS-PROT (Aus: EXPASY PROTEOMICS SERVER (2005) ProtScale (<http://www.expasy.org/cgi-bin/blast.pl>) Stand: 23.01.2007].
- Abb. 45:** Vergleich von Epitop B1 mit verschiedenen Spezies der Proteindatenbank SWISS-PROT (Aus: EXPASY PROTEOMICS SERVER (2005) ProtScale (<http://www.expasy.org/cgi-bin/blast.pl>) Stand: 23.01.2007].
- Abb. 46:** Hydrophobizitätsskala nach Kyte und Doolittle für Epitop A1 [Aus: EXPASY PROTEOMICS SERVER (2005) ProtScale (<http://www.expasy.org/cgi-bin/blast.pl> ?1) Stand: 23.01.2007].
- Abb. 47:** Hydrophobizitätsskala nach Kyte und Doolittle für Epitop B1 [Aus: EXPASY PROTEOMICS SERVER (2005) ProtScale (<http://www.expasy.org/cgi-bin/blast.pl> ?1) Stand: 23.01.2007].
- Abb. 48:** Vergleich verschiedener Epitope zur Spezifitätsbestimmung des Antikörpers G17E (10 µg/ml G17E).
- Abb. 49:** Vergleich verschiedener Epitope zur Spezifitätsbestimmung des Antikörpers G17E (0,1 µg/ml G17E).

## **Tabellen**

**Tab. 1:** Chemikalien

**Tab. 2:** Immunreagenzien

**Tab. 3:** Zellkulturmedien

**Tab. 4:** Proteine und Testsubstanzen für Kreuzreaktivitätsmessungen

**Tab. 5:** Puffersysteme und Lösungen

**Tab. 6:** Verbrauchsmaterialien

**Tab. 7:** Geräte

**Tab. 8:** Software

**Tab. 9:** Immunisierungsschema für zwei Mäuse

**Tab. 10:** Kreuzreaktivität des monoklonalen Antikörpers G17E



## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Art.-Nr.	Artikelnummer
Ak	Antikörper
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
cFA	komplettes Freundsches Adjuvans
DNA	desoxyribonucleic acid
dest.	destilliert
ELISA	Enzym-linked immunosorbent assay
g	Gramm
HAT	Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
Hrsg.	Herausgeber
iFA	inkomplettes Freundsches Adjuvans
Ig	Immunglobulin
kDa	KiloDalton
L	Liter
ml	Milliliter
μ	Mikro
min	Minute
MMP	Magermilchpulver
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PEG	Polyethylenglycol
RNA	ribonucleic acid
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	„Roswell Park Memorial Institute“, Basalmedium
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ü.N.	über Nacht
w	weight (Masse)

# 1 Einleitung

## 1.1 Soja und seine Speicherproteine

Die Sojabohne gehört zur Familie der Leguminosen (Fabaceae). Sie wird nach Poehlman (Poehlman, 1979) der Gattung der Glycine zugeordnet und in mehrere Arten unterteilt. Bereits 2800 v.Chr. wurde sie in China angebaut und gewinnt um 1840 landwirtschaftliche Bedeutung in Europa. Ein warmes und feuchtes Klima ist für einen erfolgreichen Anbau unerlässlich (Schuster, 2000).

Die vielfältigen Verwendungsmöglichkeiten haben sie zu einer ausgesprochen beliebten Kulturpflanze gemacht. Neben dem Einsatz als Futtermittel findet das Mehl als Klebe- und Bindemittel und das Öl als Speiseöl Verwendung (Jalil, 1971). Dieses wird durch Pressung oder Extraktion hergestellt.

Der hohe Gehalt an Fetten und Proteinen, die mit einem Anteil von 39% an essentiellen Aminosäuren ähnlich dem Hühnerei sind (Orthoefer, 1978), macht die Sojabohne zu einer besonders hochwertigen Kulturpflanze.



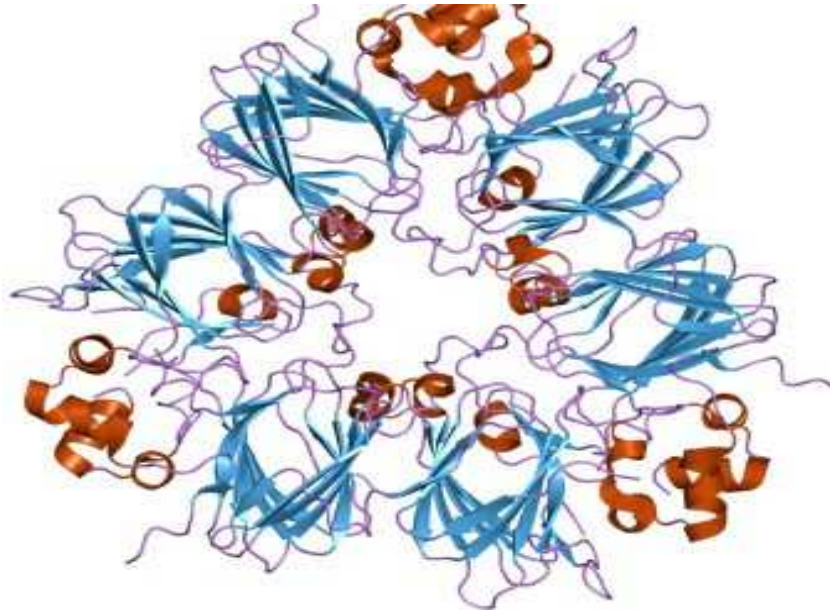
**Abb. 1:** Fruchtstand der Sojabohne (Aus: <http://www.ars.usda.gov/is/graphics/photos/k4389-11.htm>).

Leguminosen (Fabaceae) akkumulieren große Proteinmengen in ihren Samen. Diese dienen hauptsächlich als Kohlenstoff- und Stickstoffquellen. Sie unterstützen damit das frühe Wachstum und die Entwicklung des Sämlings nach der Keimung. Sie werden als

Speicherproteine bezeichnet (Argos *et al.*, 1985). Ursprünglich wurden diese Proteine in wasserlösliche Albumine, in alkohollösliche Prolamine, in salzlösliche Globuline und in schwachen Säuren und Laugen lösliche Gluteline eingeteilt (Osborne, 1924). Eine gegenwärtige Einteilung unterscheidet nur mehr zwischen den bei Getreiden vorkommenden Prolaminen und den Globulinen (Shewry und Tatham, 1990). Letztere kommen bei nahezu allen Organismen vor und unterscheiden sich aufgrund struktureller und funktioneller Eigenschaften.

Das in Soja überwiegend vorkommende Speicherprotein ist das Globulin Glycinin. Es handelt sich dabei um ein hexamer, heterooligomeres Protein mit einem Molekulargewicht von 360 kDa, das aus fünf durch Unterschiede in der Primärstruktur definierten Untereinheiten besteht (Moreira *et al.*, 1979). Die Untereinheiten sind: A1aB1b, A1bB2, A2B1a, A3B4, A5A4B3 (Adachi *et al.*, 2003). Glycinin gehört der 11S-Speicherproteinfamilie an, bei der jede Untereinheit aus einer basischen und einer sauren Peptidkette besteht, die von einem Precursormolekül abstammen und durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (Staswick *et al.*, 1984). Die chemisch-physikalischen Abläufe bei der Synthese der 11S-Speicherproteine sind hinreichend bekannt und beginnen mit der Synthese von Precursormolekülen (auch Präproglycine genannt) an der Oberfläche des Endoplasmatischen Reticulums. Im Lumen desselben findet die strukturelle Umbildung in Trimere statt, nachdem Signalpeptide des Precursor-Moleküls cotranslational abgespalten wurden. Diese trimeren Strukturen werden Proglycine genannt (siehe Abbildung 2). Sie besitzen einen Sedimentationskoeffizienten, der bei  $\approx 8$  S liegt (Adachi *et al.*, 2003). Die endgültige Umformung und Spaltung in die hexamere Endstruktur erfolgt nach einem Transport der Trimere über den Golgi-Apparat in den sogenannten „protein bodies“ der Vakuole (Chrispeels *et al.*, 1982).

Neben dem zur Klasse der Legumine gehörenden Glycinin (40% Anteil am Gesamtprotein) spielt das zur Klasse der Viciline gehörende  $\beta$ -Conglycinin als zweite große Proteinkomponente in Soja eine entscheidende Rolle für die nutritiven, physiologischen und physikochemischen Eigenschaften. Es besitzt eine trimere Struktur und kann zu den 7 S-Globulinen gezählt werden. Drei spezifische Untereinheiten charakterisieren das Molekül. Sie sind als  $\alpha$ -,  $\alpha'$ - und  $\beta$ -Einheit bekannt und weisen homologe Strukturen auf (Maruyama *et al.*, 2001).



**Abb.2:** Das Homotrimer Proglycinin A1aB1b (Aus: <http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/msdlite/atlas/visualization/1fxz.html>).

## 1.2 Allergien

Der Begriff Allergie bezeichnet eine Überempfindlichkeitsreaktion des Körpers gegen spezifische Stoffe (Allergene). Sie ist eine Sonderform der Antigen-Antikörperreaktion (Brockhaus, 1984). Der Wiener Kinderarzt Freiherr Clemens von Pirquet beschäftigte sich bereits 1906 mit dem Phänomen der Allergie und führte auch die Bezeichnung ein (Wikipedia, 2006). Die allergische Reaktion wird durch die Bindung von IgE-Molekülen an ein spezifisches Allergen und dadurch induzierte Entzündungsmediatoren hervorgerufen. Man unterscheidet zwischen einer Sofortreaktion, die hauptsächlich auf der Aktivität von Histaminen beruht, und einer Spätreaktion, die durch Cytokine und Chemokine sowie durch Leukotriene hervorgerufen wird (Janeway *et al.*, 2002).

Die Ursachen für das Auftreten von Allergien sind nicht vollständig bekannt und verstanden. Als wichtige Punkte werden aber eine genetische Disposition, eine Belastung des Körpers durch Umweltschadstoffe, psychosomatische Einflüsse, der Gebrauch von Genußmitteln (z.B. Zigaretten), Medikamenten sowie eine auf den jeweiligen Patienten nicht abgestimmte Diät diskutiert (Wikipedia, 2006). Die provozierten und klinisch relevanten Symptome einer allergischen Reaktion beziehen sich vor allem auf die Atemwege, den Magen-Darm-Trakt, das Auge und die Haut. Zudem können auch Beschwerden wie Kopfschmerzen und Fieber Folge einer allergenen Stimulation sein.

Es gibt verschiedenste Arten von Allergien. Zu den bekanntesten und auch am häufigsten verbreiteten zählen neben den allseits bekannten durch Pollen hervorgerufenen Inhalations-

allergien auch Insektengift-, Tierhaar-, Kontakt-, Hausstaubmilben- und Nahrungsmittelallergien (Wikipedia, 2006). Letztere können sich auf eine Vielzahl von Lebensmitteln beziehen und einige sind auch als Kreuzallergien zwischen Pollen und z.B. verschiedenen Frucht- und Gemüsesorten bekannt, die man als pollenassoziierte Allergien bezeichnet. Von großer Bedeutung sind allerdings Nahrungsmittel, die in verschiedensten Formen in zahlreichen Produkten in prozessierter Form vorkommen. Dazu zählen u.a. Soja, Erdnuß, Mais und unterschiedliche Getreidesorten (Deutscher Allergie- und Asthmabund E.V.-Nahrungsmittel Allergie, 2007).

Die Diagnose von Allergien basiert auf *in vivo*- und *in vitro*-Verfahren. Dazu gehören zunächst Hauttests. Erwähnt werden sollte hier vor allem der Pricktest, bei dem ein auf die Haut aufgetragenes Allergen mit einer Lanzette in die Haut eingeritzt wird. Des Weiteren sind sogenannte Epikutantests (Allergen über ein Heftpflaster mit der Haut in Kontakt gebracht) und Intrakutantests (Allergen wird mit einer Kanüle in die Haut eingespritzt), sowie der Scratch- (Abschaben der Haut) und Reibetest (Allergen wird eingerieben) in Verwendung. Bei den *in vitro*-Verfahren sind unterschiedliche Methoden zur Blutuntersuchung gängige Nachweismöglichkeiten. Hier ist besonders der Immunosorbent-Test mit Anti-IgE-Antikörpern zum Nachweis von Gesamt-IgE in Patientenseren zu nennen (Schwarz, 1999). Eine erfolgreiche Therapie basiert zunächst auf einer Allergenkarrenz. Weitere erfolgreiche Maßnahmen können eine Desensibilisierung und eine medikamentöse Behandlung mit z.B. Antihistaminika sein. Auch eine Therapie mit anti-IgE-Antikörpern ist möglich.

### 1.3 Antikörper

Die Abwehr körperfremder Moleküle geschieht mittels des unspezifischen, angeborenen und des adaptiven Immunsystems. Ersteres dient dem Schutz des Organismus in einer Frühphase der Infektion. Es besteht aus zellulären, phagozytierenden Elementen sowie dem Komplementsystem aus verschiedenen Plasmaproteinen (Löffler G., 1999). Es bedient sich bei seiner Immunantwort verschiedenster Rezeptoren, um spezifische Pathogene zu erkennen. Einige dieser Moleküle stimulieren die Phagozytose direkt, während andere von z.B. Makrophagen sezerniert werden und somit auf indirektem Wege eine Phagozytose des antigenen Moleküls stimulieren. Eine wichtige Funktion kommt diesen Rezeptoren zudem bei der Eindämmung von lokalen Infektionen und dem Auslösen einer adaptiven Immunantwort über einen Signalübertragungsweg (z.B. Toll-Rezeptoren) zu. Zudem lösen sie die Expression

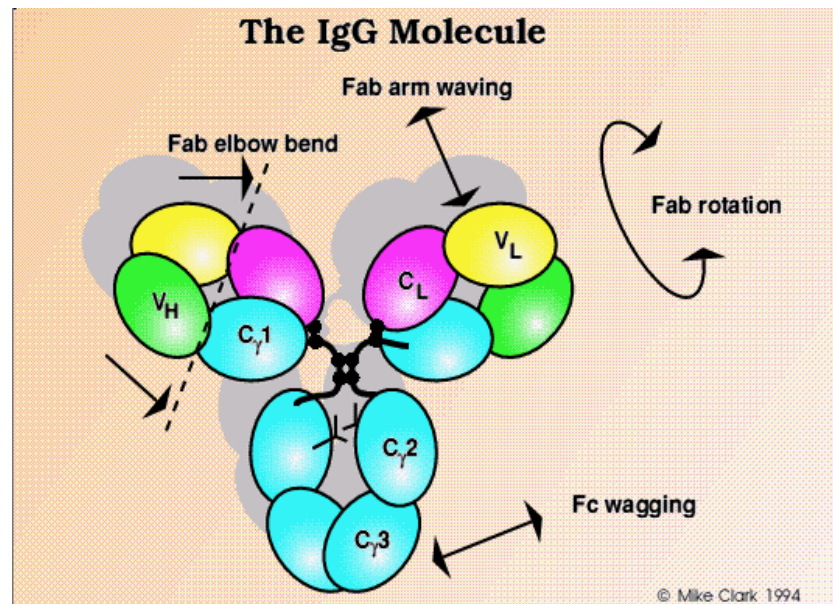
von Molekülen wie Cytokinen und Chemokinen aus, die der Steuerung der adaptiven Immunantwort dienen.

Das adaptive Immunsystem beruht auf der Aktivität von Lymphocyten, die als B- und T-Lymphocyten vorkommen. Diese Form der Immunantwort gewährleistet eine lang anhaltende, spezifische Abwehr des jeweiligen immunogenen Erregers (Janeway *et al.*, 2002). Die Aktivierung beider Zelltypen erfolgt durch einen Kontakt mit Fremdstoffen, die auch Antigene genannt werden. Bei T-Lymphocyten erfolgt die Erkennung der Fremdmoleküle durch Rezeptoren auf der Zelloberfläche der jeweiligen T-Zelle. Sie ist durch die Bindung der verschiedenen Peptidfragmente an Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (major histocompatibility complex, MHC) charakterisiert. Die Antigenerkennung bei B-Zellen erfolgt durch Immunglobuline. Sie können einerseits als sezernierte Antikörper und andererseits als membrangebundene B-Zell-Rezeptoren entstehen (Janeway *et al.*, 2002). Sie besitzen die Fähigkeit mit dem Antigen zu interagieren, es zu binden und damit das Signal zu dessen Eliminierung durch Phagozytose oder durch das Komplementsystem zu geben. Die spezifische Bindung ergibt sich aus der Struktur und den physikochemischen Eigenschaften der Antigenbindungsstelle. Diese Bindungsstelle bezeichnet man als Epitop bzw. antigene Determinante. Bereits 10 Aminosäuren können eine Immunantwort auslösen. Ein vollständiges Proteinmolekül besitzt mehrere solcher Epitope, was die Spezifität der Gesamtreaktion erhöht. Niedermolekulare Verbindungen werden Haptene genannt und können nur gebunden an ein Trägermolekül eine Immunantwort provozieren (Löffler, 1999). Die Wechselwirkung von Immunglobulinen mit spezifischen Epitopen von Antigenen beruht primär auf den hypervariablen Regionen der variablen Bereiche am terminalen Ende der Antikörpermoleküle, die auch Paratop genannt werden (Padlan, 1994). Diese weisen sehr unterschiedliche Sequenzmerkmale auf und bestimmen Affinität und Selektivität des Moleküls. Die Bindung des Antikörpers zum Antigen wird über elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken sowie van-der-Waals-Kräfte vermittelt (Janeway *et al.*, 2002).

#### 1.4 Struktur und Einteilung von Immunglobulinen

Immunglobuline sind Glykoproteine, die aus vier Polypeptidketten bestehen und von Plasmazellen sezerniert werden. Man unterscheidet zwei leichte und zwei schwere Ketten, die durch nichtkovalente Bindungen sowie Disulfidbrücken verbunden werden. Jede Kette besteht aus einer variablen V-Region und einer oder mehreren konstanten C-Regionen. Die

Klasse eines Antikörpers und somit sein Isotyp wird durch die Struktur der C-Regionen seiner schweren Kette festgelegt. Beim Mensch und der für die immunologische Forschung bedeutsamen Maus unterscheidet man fünf Klassen, die als Immunglobulin M (IgM), Immunglobulin D (IgD), Immunglobulin G (IgG), Immunglobulin A (IgA) und Immunglobulin E (IgE) bezeichnet werden. Die Funktionalität von Immunglobulinen konnte durch die Spaltung der Moleküle mit Proteasen (z.B. Papain) charakterisiert werden. Es wurde, wie in Abbildung 3 für das IgG-Molekül ersichtlich, eine Dreiteilung der Immunglobulinmoleküle beobachtet, wobei jeweils zwei Teilstücke für die Antigenerkennung und -bindung zuständig sind und Fab-Fragmente (fragment antigen binding) genannt werden. Das dritte Teilstück, das aufgrund seiner Fähigkeit in den kristallinen Zustand überzugehen, Fc-Fragment (fragment cristallizable) genannt wird, interagiert v.a. mit Effektormolekülen und -zellen (Janeway *et al.*, 2002).



**Abb. 3:** Schematischer Aufbau eines IgG-Moleküls mit einem konstanten (c) und variablen (v) Bereich [leichten (L) und schweren Ketten (H)]. (Aus: <http://www-immuno.path.cam.ac.uk/~mrc7/igs/mikeimages.html>).

## 1.5 Monoklonale Antikörper

Monoklonale Antikörper besitzen eine homogene Struktur mit definierter Selektivität und Affinität zu einem Antigen. Die Methodik der monoklonalen Antikörperproduktion geht auf die bahnbrechenden Arbeiten von George Köhler und Cesar Milstein zurück (Köhler und Milstein, 1975). Sie fusionierten Milzzellen einer immunisierten Maus mit Mausmyelomzellen. Die so entstandenen Hybridzellen bezeichnet man als Hybridome.

Charakteristisch für die Myelomzellen ist ein Fehlen des Enzyms Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT), was eine Selektion auf einem Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin-Medium (HAT-Medium) erst möglich macht. Nur das fusionierte Hybridom, in dem das HGPRT-Gen durch die Milzzelle beigesteuert wird, vermag im HAT-Medium zu überleben. Unfusionierte Myelomzellen und Milzzellen sterben ab, letztere aufgrund ihrer begrenzten biologischen Lebensfähigkeit. Die Fusion wird durch die Zugabe eines Fusogens (Polyethylenglykol) ermöglicht. Die Milzzellen bringen die Fähigkeit zur Sezernierung von spezifischen Antikörpermolekülen mit und die Myelomzellen gewähren die unbegrenzte Teilungs- und Wachstumsfähigkeit des Hybridoms. Man erhält also vom Hybridom als finales Produkt einen sezernierten Antikörper, der eine einheitliche Struktur, dieselbe Antigenbindungsstelle sowie den gleichen Isotyp besitzt und als Klon von einer einzelnen B-Zelle abstammt (Janeway *et al.*, 2002). Damit Monoklonalität erreicht wird, müssen entsprechende Zelllinien kloniert werden. So kann verhindert werden, daß verschieden spezifische Antikörper unterschiedlicher Hybridome sezerniert und polyklonale Seren produziert werden. Die Klonierungen gewährleisten eine gesteigerte Homogenität und Spezifität der sezernierten Antikörper.

Die Produktion monoklonaler Antikörper läßt sich grob durch folgende vier Punkte beschreiben (Sheperd und Dean, 2000).

- a) Generierung spezifischer B-Lymphozyten
- b) Fusion mit einer kontinuierlich wachsenden Myelomzelllinie
- c) Screening der Zellkulturüberstände auf spezifische Antikörper
- d) Isolierung und Klonierung der spezifischen Hybridome

## 1.6 Zielsetzung und methodische Vorgehensweise

In der hier vorliegenden Arbeit sollte ein quantitativer Enzymimmunoassay zur Detektion des allergenen Sojaproteins Proglycinin entwickelt werden. Dazu sollte zunächst eine Aufreinigung des entsprechenden Antigens für die Immunisierung zweier CD-1-Mäuse (Ursprung: Swiss Mäuse) in einer präparativen Gelelektrophorese erreicht werden. Die standardmäßig durchgeführte Fusion von Myelomzellen mit den aus der Milz der Mäuse extrahierten allergenspezifischen B-Lymphozyten stellte einen weiteren Produktionsschritt dar. Die monoklonalen Antikörper wurden hinsichtlich ihrer Spezifität in einer Reihe von Western-Blots getestet. Ein geeigneter, durch Klonierung erhaltener, monoklonaler Antikörper wurde massenproduziert und diente in biotinylierter Form als Detektionsmittel für



spezifische, allergene Sequenzen aufgereinigten Proglycinins. Dieses konnte in einer mit dem monoklonalen Antikörper kovalent verbundenen Sepharosesäule aufgereinigt werden und war Ausgangsbasis für die Etablierung einer Kalibrationskurve.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

**Tabelle 1:** Chemikalien

3-Amino-9-Ethyl-Carbozole (AEC)	Merck KG/Art.-Nr.: A-5754/Charge: 052K1693
Antikörper-Biotinylierungs-Kit	PIERCE/Produktname: EZ-Link Sulfo-NHS- Biotinylation Kit Art.-Nr.: 21425/Charge: 1775.0
Ammoniumperoxodisulfat (Rotipuran)	Carl Roth GmbH/Art.-Nr.: 42834867/ Charge: 1444
Borsäure	Merck KG/Art.-Nr.: K29935665/Charge: 1.00165.1000
Coomassie Brilliantblau G250 (CBB G250)	Serva Feinbiochemika/Art.-Nr.: 17524/ Charge: C.I.42655
Dimethylsulfoxid	SIGMA/Art.-Nr.: D2650/Charge: 41K2352
Dinatriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat	Merck KGaA/Art.-Nr.: 1.06579.1000/ Charge: AG18579 527
Essigsäure, 99-100%	Riedel-de Haën/Art.-Nr.: 01300/2789
Ethanol, 99% (vergällt)	Art.-Nr. : 64-17-5/Charge: 200-578-6
Fermacidal D (Baricidal)	IC Products SA/Art.-Nr.: 58375/Charge: 1024
Freunds Adjuvans komplett	SIGMA/Art.-Nr.: F-5881/Charge: 033K8933
Freunds Adjuvans inkomplett	SIGMA/Art.-Nr.: F-5506/Charge: 79H8937
Formaldehydlösung, >37%	Merck KG/Art.-Nr.: K25899802 848/ Charge: 1.04002.1000
Glycerin	Merck KG/Art.-Nr.: K892 097/Charge: 1.0409.1000
Glycin	Carl Roth GmbH + Co KG/Art.-Nr.: 37573578/Charge: 3908.3
Harnstoffperoxid	Calbiochem Corporation/Art.-Nr.: 666 121/ Charge: 902454
Immuno-Pure <sup>R</sup> Biotinylated Horseradish	PIERCE/Art.-Nr.: 29139/Charge: GI 101194

Kupfer (II) Sulfat Pentahydrat 4% w/v Solution	SIGMA/Art.-Nr.: 072 K5312/ Charge: 2284
L-Glutamin, 200 mM	Gibco-Invitrogen Life Technology/Art.-Nr.: 3092966/Charge: 25030324
2-Mercaptoethanol, 50 mM	Gibco-Invitrogen Corporation/Art.-Nr.: 3096562 / Charge: 31350-010
Methanol	J.T. Baker/Art.-Nr.: 0026910002/Charge: UN1230
Natriumacetat Trihydrat	Merck KG/Art.-Nr.: 6267/Charge: 441TA729067
Natriumazid, 99%	Aldrich-Chemie/Art.-Nr.: 19,993-1/Charge: 00184-044
Natriumcarbonat	E. Merck/Art.-Nr.: 009 A484092 /Charge: 6392.1000
Natriumchlorid	E. Merck/Art.-Nr.: 847 K10819904/Charge: 1.06346.1000
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck KG/Art.-Nr.: A480746431/Charge: 1.06346.1000
Natriumhydrogencarbonat	E. Merck /Art.-Nr.: K20354929 424/Charge: 1.06392.1000
Natriumhydroxide	SIGMA/Art.-Nr.: S-8045/Charge: 29H0140
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Merck KG/Art.-Nr.: K253031116/Charge: 1.06516.0500
NHS-aktivierte Sepharose 4 Fast Flow	Amersham Pharmacia Biotech AB/Art.-Nr.: 286079/Charge: 17-0906-01
N,N-Dimethylformamid	E. Merck/Art.-Nr.: 8539433/Charge: 10983
o-Phosphorsäure, >85%	Carl Roth GmbH/Art.-Nr.: 6366.1/Charge: 03252620
Prosep-rA High Capacity	Millipore/Art.-Nr.: 113112722/Charge: 0250020
Polyethylene Glycol 1500 (PEG 1500)	Roche Diagnostics GmbH/Art.-Nr.: 783641
2-Propanol	E. Merck/Art.-Nr.: 148 K16974334/Charge: 9634.1000

Rotiphorese Gel 32	Carl Roth GmbH + Co/Art.-Nr 08463698/ Charge: 3029.2
Schwefelsäure, 95-97%	Merck/Art.-Nr.: 1650.1000/Charge: 1917M5845
Salzsäure, 37%	Riedel-de Haen/Art.-Nr.: 1789/Charge: 00830
Sodiumdodecylsulfat (SDS) Ultra Pure, >99%	Carl Roth GmbH/Art.-Nr 41149756/Charge: 2326.2
Silbernitrat für Proteinfärbung	Carl Roth GmbH/Art.-Nr.: 6207.1/Charge: 20253402
Tween 20	Merck/Art.-Nr.: 8.22184.0500/Charge:-
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, 98%	SIGMA/Art-Nr.: T2885-5G/Charge: 064K0817
TEMED (N,N,N,N-Tetra-methyl- ethylendiamine)	Carl Roth GmbH/Art.-Nr.: 36835495/Charge: 2367.3
TRIS-Pufferan	Carl Roth GmbH/Art.-Nr.: 4855.2/Charge: 41574655
Trypanblau Solution, 0,4 %	SIGMA/Charge: 73K2420
Wasserstoffperoxid, 30%	Merck KGaA/Art.-Nr.: ZU50041109 512/ Charge: 1.07209.1000
Zitronensäure	Merck Schuchardt OHG/Art.-Nr.: K91221207/Charge: 8.18707.1000

**Tabelle 2: Immunreagenzien**

Antikörper-Subklassenbestimmungs-Kit	Bio-Rad/Produktname: Mouse Typer, Iso- typing Panel/Art.-Nr.: 172-2051/Charge: -
Soja RUR Kit User's Guide	SDI (Strategic Diagnostics Inc.)/Art.-Nr.: 7099999/Charge:-
Ziege-Anti-Mouse-IgG	SIGMA Immuno Chemicals/Art.-Nr.: M589 9/Charge: 099H4865
Ziege-Anti-Maus-IgG-POD (Fc-spezifisch)	SIGMA/Art.-Nr.: A-0168/Charge: 091H- 4809

**Tabelle 3: Zellkulturmedien**

Antibiotic Antimycotic Solution (100x) stabilised	SIGMA/Art.-Nr: 115K2385/Charge: A5955
BM-Condimed H1 Hybridoma Cloning	Roche Diagnostics GmbH/Art.-Nr.: 11232100/Charge: 1088947
Einfriermedium	70 ml RPMI 1640 mit Hepes 20 ml FKS 12 ml DMSO (Dimethylsulfoxid) 1 ml ( $10^{-3}$ mol/l) Mercaptoethanol HAT Media Supplement (50×) SIGMA/Art.-Nr.: H-0262/Charge: 122K8925
Normalmedium	500 ml RPMI 1640 mit Hepes 55 ml FKS (fötales Kälberserum) 5,5 ml l-Glutamin 5,5 ml ( $10^{-3}$ mol/L) Mercaptoethanol
RPMI 1640 Medium ohne Hepes	Gibco-Invitrogen Corporation/Art.-Nr.: 42401-018/Charge:-
RPMI 1640 ohne Hepes	Cell Concepts GmbH/Art.-Nr: M-L4101-I

**Tabelle 4: Proteine und Testsubstanzen für Kreuzreaktivitätsmessungen**

Bio-Weizenmehl Type 1050	Aurora/Art.-Nr./Charge:-
Erdnußmehl	BCR Referenzmaterial Nr.262/Art.-Nr: 00210
Fetal Bovine Serum	Biochrom AG/Art.-Nr: 0555H/Charge: S0115
Geschrumpfte Erbse PROGRESS N.9	Franchi Sementi/Art.-Nr.: 00604
Immuno Pure Avidin (Hühnereiweiß)	PIERCE/Art.-Nr.: GI98302/Charge: 21121
Mais (Sorte Darius)	Advanta/Art.-Nr.:-
Neutravidin <sup>TM</sup> Biotin Binding	PIERCE/Art.-Nr.: 31000/Charge: HC102726
Precision Plus Protein, unstained Standard	Bio-Rad/Art.-Nr: L1610363 Rev B/Charge: 161-0306
Protein Isolate Standard, 0% w/v GM	Leatherhead Food RA/Art.-Nr: 2/99-02 / Charge: 3000138

Protein Isolate Standard, 2,5% w/v GM	Leatherhead Food RA/Art.-Nr: 4/99-03/ Charge: 3000137
Rinder Serum Albumin (BSA)	SIGMA/Art.-Nr: 11 K1253/Charge: 7906
Sojamehl (biologischer Anbau)	SOBO Naturkost/Art.-Nr.:-
Stangenbohne (Sorte S. ANNA)	Franchi Sementi/Art.-Nr.: 97-36
Weizenmehl Type 405	Aurora/Art.-Nr.:-

**Tabelle 5:** Puffersysteme und Lösungen

Boratpuffer	Borsäure (kristallin) 6,2 g NaCl 8,8 g H <sub>2</sub> O ad 1.000 ml mit 5M NaOH auf pH=8,5 einstellen
Bradfordlösung	CBB G250 2,5 mg 1,25 ml Ethanol (99%) 2,50 ml Phosphorsäure (85%) H <sub>2</sub> O ad 25 ml
Carbonatpuffer (50mM)	NaHCO <sub>3</sub> 2,9404 g in 700 ml H <sub>2</sub> O Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 1,8548 g in 250 ml H <sub>2</sub> O auf pH=9,6 einstellen
Citratpuffer	Citronensäure 21,0 g H <sub>2</sub> O ad 1.000 ml mit 5M NaOH auf pH=3,0 einstellen
Elektrophoresepuffer	Sodiumdodecylsulfat 1,0 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan 3,0 g Glycin 14,4 g H <sub>2</sub> O ad 1.000 ml
Entfärberlösung	400 ml H <sub>2</sub> O 500 ml Ethanol 100 ml Eisessig
Entwicklerlösung	Natriumcarbonat 3,0 g Natriumthiosulfat 0,4 mg 50 µl Formaldehyd H <sub>2</sub> O ad 100 ml

Fixierungslösung	40 ml Ethanol (vergällt) 10 ml Eisessig H <sub>2</sub> O ad 100 ml
India Ink-Färbelösung	Tinte „Fount India“ (0,1%) Essigsäure (1%) 0,04% (v/v) Tween 20 auf 30 ml PBS-Puffer auffüllen
Konservierungslösung	Glycerin 10 g Natriumazid 2 mg H <sub>2</sub> O ad 100 ml
Neutravidin-Biotin-Lösung	100 µl Neutravidin 10 µl HRP-Biotin PBS-Puffer ad 10 ml
PBS-Puffer (40 mM)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 50,1396 g in 700 ml H <sub>2</sub> O NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 9,6593 g in 350 ml H <sub>2</sub> O NaCl, 42,5 g auf pH=7,2 einstellen
PBS-Waschpuffer	40 ml PBS-Puffer (40 mmol/L pH 7,2) 1 ml Tween 20 H <sub>2</sub> O ad 2 L
Probenpuffer-Stammlösung (0,5 M)	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan 3,0 g in bidest. H <sub>2</sub> O pH auf 7,5 mit ca. 1,4 ml Essigsäure einstellen Auf 50 ml mit bidest. H <sub>2</sub> O auffüllen
Probenpuffer (reduzierend)	5 ml Probenpuffer-Stammlösung (0,5 M) Sodiumdodecylsulfat 0,5 g Bromphenolblau 5 mg Glycerin (25%) Dithiothreitol (DTT) 250 mg Auf 50 ml mit bidest. H <sub>2</sub> O auffüllen

Probenpuffer (nicht reduzierend)	5 ml Probenpuffer-Stammlösung (0,5 M) Sodiumdodecylsulfat 0,5 g Bromphenolblau 5 mg Glycerin (25%) auf 50 ml mit bidest. H <sub>2</sub> O auffüllen
5 % Sammelgel (4 mL-Ansatzvolumen)	2,70 ml H <sub>2</sub> O 0,67 ml Acryl-Bisacrylamid-Mix (30 %) 0,50 ml 1,5M Tris (pH = 6,8) 0,04 ml Sodiumdodecylsulfat (10 %) 0,04 ml Ammoniumperoxidsulfat (10 %) 0,004 ml Tetramethylbenzidin
Silbernitratlösung (0,01 M)	Silbernitrat 200 mg 20 µl Formaldehydlösung H <sub>2</sub> O ad 100 ml
Stopp-Lösung	Glycin 0,5 g H <sub>2</sub> O ad 100 ml
Substratlösung (ELISA)	TMB-Stammlösung 1 Volumenteil Substratpuffer 2 Volumentteile
Substratlösung (Western-Blot)	3-Amino-9-Ethyl-Carbozole 0,0125 g in 1 ml Formaldehydlösung 49 ml NaH <sub>3</sub> (CO) <sub>2</sub> 20 µl Wasserstoffperoxid
Substratpuffer	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 12 H <sub>2</sub> O 625 mg NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × 1 H <sub>2</sub> O 9,1 g Harnstoffperoxid 141 mg H <sub>2</sub> O ad 500 ml
Thiosulfatlösung (0,8 mM)	Natriumthiosulfat 20 mg H <sub>2</sub> O ad 100 ml
TMB-Stammlösung	Tetramethylbenzidin, 0,375 g 5,0 ml Dimethylsulfoxid ad 25 ml Methanol



Transferpuffer (10-fach)	Glycin 29,0 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan 58,0 g Sodiumdodecylsulfat 3,7 g H <sub>2</sub> O ad 1.000 ml
10% Trenngel (10 ml-Ansatzvolumen)	4,0 ml H <sub>2</sub> O 3,3 ml Acryl-Bisacrylamid-Mix (30%) 2,5 ml 1,5M Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (pH = 8,8) 0,1 ml Sodiumdodecylsulfat (10%) 0,1 ml Ammoniumperoxidsulfat (10%) 0,004 mL Tetramethylbenzidin
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)-Puffer 2M	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan 60,57 g H <sub>2</sub> O ad 250 ml mit 5M HCl auf pH=7,5 einstellen

**Tabelle 6:** Verbrauchsmaterialien

Chromatographiesäulen	Neolab
Combidyn Adapter	NEOLAB
Combitips, 2,5 ml, 5 ml, 10 ml	Eppendorf
Dialyseschlauch	Serva
Einmalküvetten	BRAND / Produktname: PLASTIBAND
Frit Kit	Bio-Rad
Gel-Blotting-Papier (200x200mm)	Schleicher & Schuell/Art.-Nr.: 10426981/ Charge: EZ00 15-1
Immobilon <sup>TM</sup> -P Transfer Membran (Porengröße 0,45µm)	Millipore Corporation/Art.-Nr.: IPVH20200/ Charge: K6JNF161C
Injektionskanülen (1,1x30 mm)	Braun
Kanülen	Rose GmbH, Trier/Produktname: Erosa, steril pyrogenfrei, Luer/NSP
Kryoröhrchen	Greiner/Produktname: Minigrip
6-Loch-Zellkulturplatten	TPP/Produktname: Zellkultur Testplatten 6 F
24-Loch-Zellkulturplatten	TPP/Produktname: Zellkultur Testplatten 24 F

96-Loch-Zellkulturplatten	TPP/Produktname: Zellkultur Testplatten 96 F
96-Loch-Platten	Greiner Bio-One/Produktname: ELISA Platte MICROLON 96K, F-Form, Bindungskapazität hoch
Omega <sup>TM</sup> Ultrafiltration Membrane Disc Filter 25 MM (30 K, 50K)	Pall Corporation
Pipettenspitzen	Eppendorf/Produktname: epTips Standard, 0,5-20 µl
Pipettenspitzen	Eppendorf/Produktname: epTips Standard, 2-200 µl
Pipettenspitzen	Eppendorf/Produktname: epTips Standard, 50-1000 µl
Pipettenspitzen	Eppendorf/Produktname: epTips Standard, 500-2500 µl
Pipettenspitzen (Pipetboy acu)	Sarstedt/Produktname: Serologische Pipette, 50 ml
Pipettenspitzen (Pipetboy acu)	Sarstedt/Produktname: Serologische Pipette, 25 ml
Pipettenspitzen (Pipetboy acu)	Sarstedt/Produktname: Serologische Pipette, 10 ml
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
Spritzen	HLZ Logistik GmbH/Produktname: Einmalspritze, 20ml mit Luer Ansatz
Sterilbank	Gelaire/Produktname: Flow Laboratories HF 60
Sterilfilter	Sartorius/Produktname: 0,8 µm Minisart
Sterilfilter	Schleicher & Schnell/Produktname: 0,2 µm FP 30/0,2 CA-S
Sterilium	Bode Chemie Hamburg/Art.-Nr: 248714/ Charge: 1-6103
Zellkulturflaschen (groß)	Greiner Bio-One/Produktname: Gewebekulturflasche, steril, 550 ml, 175 cm <sup>2</sup> , mit Filter

Zellkulturflaschen (klein)	Greiner Bio-One/Produktname: Gewebekulturflasche, steril, 250 ml, 75 cm <sup>2</sup> , mit Filter
15 ml-Zentrifugenröhrchen	Sarstedt/Produktname: Röhre 15 m, 120x17mm, PP
50 ml-Zentrifugenröhrchen	Sarstedt/Produktname: PP-Röhrchen, steril, 50 ml, 30,0/115 mm

**Tabelle 7:** Geräte

Blot-Platten	Pharmacia Biotech/Produktname: Nova Blot
Blotting-Gerät	Pharmacia Biotech/Produktname: Electrophoresis Power Supply EPS 600
Blot-Wanne	Pharmacia Biotech/Produktname: MultiphorII
Brutschrank	Heraeus/Produktname: CO <sub>2</sub> Auto Zero
Pumpe	Bio-Rad/Produktname: Buffer Recirculation Pump 220/240 V
Bunsenbrenner	Schutt/Produktname: GASI
Drucker X74-X75	Lexmark
Durchflussphotometer	Braun
UV-Monitor	Bio-Rad/Produktname: Econo UV-Monitor
Einfrierbox 5100	Nalgene
Eismaschine	Scotsman/Produktname: AF-10
Elektrophoresegerät	Bio-Rad/Produktname: Power Pac 1000
Elektrophorese-Zelle	Bio-Rad/Produktname: Elektrophorese Mini Protean 3 Cell
Feinwaage	Hersteller: Sartorius/Produktname: Research
Gel-Scanner	Bio-Rad/Produktname: GS-710 Calibrated Imaging Densitometer
Gefriertrocknungsanlage	Nunc GmbH, Inter Med/Produktname: HETOSIC
Heizrührer	IKA/Produktname: RCT basic
Horizontalschüttler	Virion
Lichtmikroskop	Will, Wetzlar/Produktname: Wilovert

Miniperm	Greiner Bio-One/Produktname: miniPERM Classic Test Kit, steril 12,5 KD
Mikrotiterplatten-Photometer	Tecan/Produktname: Sunrise
Mikrotiterplatten-Waschautomat	SLT/Produktname: 96PW
Miniperm-Drehvorrichtung	Heraeus/Produktname: Drehvorrichtung Miniperm RA 40
Schreiber	Bio-Rad/Produktname: Model 1327 Chart Recorder
Gelelektrophorese-Vorrichtung (für präparative Gelelektrophorese)	Bio-Rad/Produktname: Model 491 Prep Cell
Neubauerzählkammer	Labor Optik/Produktname: Neubauer Improved 0,100 mm Tiefe 0,0025 mm <sup>2</sup>
Peristaltische Pumpe P3	Pharmacia
pH-Meter	Knick/Produktname: Portamess
Pipette	Eppendorf/Produktbezeichnung: 0,1-2,5 µl
Pipette	Eppendorf/Produktbezeichnung: 0,5-10,0 µl
Pipette	Eppendorf/Produktbezeichnung: 2-20 µl
Pipette	Eppendorf/Produktbezeichnung: 10-100 µl
Pipette	Eppendorf/Produktbezeichnung: 50-200 µl
Pipette	Eppendorf/Produktbezeichnung: 100-1000 µl
Pipette	Eppendorf/Produktbezeichnung: 500-2500 µl
Pipette	Eppendorf/Produktbezeichnung: 500-5000 µl
Pipettierhilfe	Integra Bioscience/Produktname: Pipetboy acu
Rührzelle	Amicon Corporation/Produktname: Amicon 8010
SDS Gelhalterung	Bio-Rad/Produktname: Mini Trans Blot
SDS-Kämme	Bio-Rad/Produktname: 0,75 mm
SDS-Spacer	Bio-Rad/Produktname: 0,75 mm
Schüttler, Vortex VF	Janke und Kunkel
Stickstofftank	Escher Cryotechnik/Produktname: XC 4711, MVE
Ultraschallbad	Branson/Produktname:

UV/VIS-Photometer	Pharmacia Biotech/Produktname: Ultrospec 4000 UV/visible Light Spectrometer
Wasserbad	Fison S/Produktname: HAAKE C
Wasserbad-Thermostat	Fison S/Produktname: HAAKE F3
Zentrifuge	Heraeus/Produktname: Minifuge RF
Zentrifuge	Eppendorf/Produktname: Zentrifuge 5403

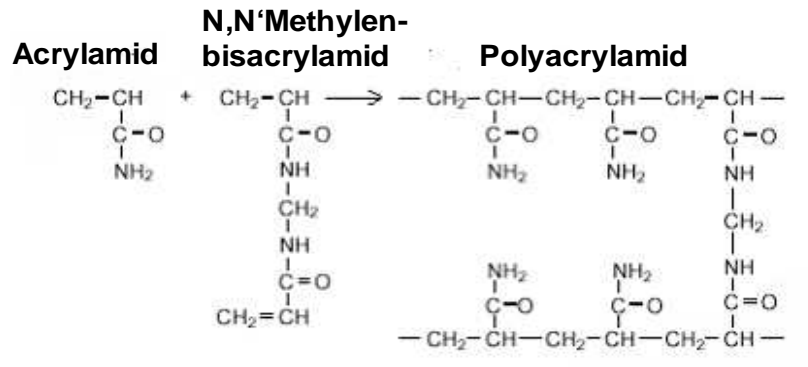
**Tabelle 8:** Software

HP Foto- und Bildbearbeitung-Bildergalerie, Version 1.1	Hewlett-Packard Co.
Microcal (TM) Origin, Version 6.0	Microcal Software Inc.
Quantity One, Version 4.2.3	Bio-Rad
SWIFT-Fraction Analysis, Version 1.02	Pharmacia Biotech
Word 2000	Microsoft
XFluor4, Version 4.50	Tecan (Unterprogramm von Microsoft Excel 2000)

## 2.2 Gelelektrophorese

Bei einer Elektrophorese werden positiv oder negativ geladene Moleküle in einem elektrischen Feld bewegt. Grundvoraussetzung dafür ist die Eigenschaft der entsprechenden Moleküle, ionisierbare Gruppen zu besitzen und deshalb in Lösung als Anionen oder Kationen vorzuliegen. Aufgrund unterschiedlicher relativer Molmassen bei ähnlichen Ladungen entstehen unterschiedliche Ladungsdichten, was die spezifische Wanderung im elektrischen Feld ermöglicht (Bernhardt *et al.*, 2006). Abhängig von ihrer Ladung, ihrer Oberfläche und Größe können sie unterschiedlich schnell eine entsprechende Matrix durchwandern und werden dabei in unterschiedliche Banden aufgetrennt. Diese Matrix wirkt v.a. stabilisierend und unterbindet Diffusion und konvektives Mischen der Banden. Verschiedenste Materialien können verwendet werden. Am häufigsten sind allerdings Agarose und Polyacrylamid in Gebrauch. Mit diesen Komponenten wird auch eine größenabhängige Siebwirkung erreicht. Dabei findet Agarose hauptsächlich bei der Auftrennung von Nukleinsäuren und Polyacrylamid bei der Separation von Proteinen Verwendung (Amersham Biosciences, 1999).

Wie in Abbildung 4 gezeigt, werden Polyacrylamidgele durch Copolymerisation von Acrylamidmonomeren und N,N'-Methylenbisacrylamid gebildet. Die Porengröße wird durch die Acrylamidkonzentration T und den Vernetzungsgrad C festgelegt. Die Polymerisation wird durch Ammoniumperoxidsulfat gestartet (Shi und Jackowski, 1998) und durch TEMED katalysiert. Die Acrylamidkonzentration bestimmt dabei die Länge und die Bisacrylamidkonzentration den Vernetzungsgrad der Polyacrylamidketten.



**Abb. 4:** Polymerisationsreaktion zur Bildung eines Polyacrylamidgels (Aus: [http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin\\_1156.pdf](http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_1156.pdf)).

### 2.3 SDS-PAGE

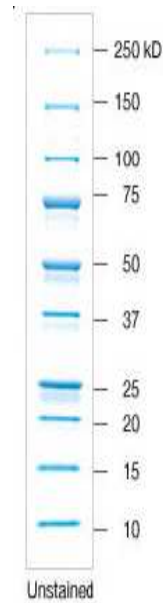
Bei der Natriumdodecylsulfat-PAGE (SDS-PAGE) wird im Gegensatz zur nativen Elektrophorese das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat verwendet. Die unpolaren Enden dringen in die inneren hydrophoben Bereiche der Proteine ein und die polaren hydrophilen Bereiche ragen aus den Proteinen heraus, was eine gegenseitige abstoßende Wirkung und Linearisierung der Polypeptidketten zur Folge hat. Die relative Ladung der einzelnen Moleküle kann der Masseinheit gleichgesetzt werden. Eine SDS-PAGE ist somit durch die Auftrennung nach der Masse charakterisiert. Um genauere Aussagen über Untereinheiten der Proteine treffen zu können, eignet sich die Zugabe von Reduktionsmitteln in Form von niedermolekularen Thiolen (z.B. DTT oder  $\beta$ -Mercaptoethanol), die Disulfidbrücken zwischen den Untereinheiten zu Sulfhydrylgruppen reduzieren (Gassen und Schimpf, 1999). Bei der Denaturierung der Proteine durch Natriumdodecylsulfat verlieren die Moleküle ihre Quartär-, Tertiär-, und teilweise ihre Sekundärstruktur. Der Natriumdodecylsulfat-Protein-Komplex wandert während eines Laufs aufgrund der negativen Ladung zur Anode (Bernhardt *et al.*, 2006).

Das am häufigsten verwendete Sodiumdodecylsulfat-Gelelektrophoresesystem ist das diskontinuierliche Laemmli-System mit Tris-Glycin-Puffern (Bernhardt *et al.*, 2006). Man unterscheidet in diesem System ein Sammel- und ein Trenngel. Die jeweiligen Gelbereiche weisen unterschiedliche pH-Werte auf. Im großporigen Sammelgel wandern die Proteine zwischen einer schnellen Chlorid-Front und einer langsamen Glycin-Front, in der die einzelnen Glycinmoleküle als Zwitterionen vorliegen. Aufgrund des entstehenden Spannungsgradienten kommt es zu einer Aufkonzentrierung der negativ geladenen Proteine, die durch die resultierende Beschleunigung ihrer Bewegung zur schnellen Chlorid-Front aufschließen. Beim Übergang in das Trenngel erhält das Glycin wegen des veränderten pH-Werts eine negative Ladung und überholt die Proteinfrent. Im engporigen Trenngel erfolgt nun eine Auftrennung aufgrund des Siebeffekts (Bernhardt *et al.*, 2006).

Anwendung der Apparatur (siehe Abbildung 5) zur Herstellung einer Standard-Sodiumdodecylsulfat-PAGE:

- ✓ Zunächst wurden der Spacer und eine kleinere Deckplatte gründlich mit Alkohol gereinigt, damit Schmutzreste keine Verunreinigungen bzw. Beschädigungen des Gels hervorrufen konnten.
- ✓ Nach einem leichten Anfeuchten wurden der Spacer und die kleine Deckplatte übereinandergelegt und so in eine Halterung gestellt, daß beide Platten am Boden auf einer Höhe waren und die kleinere Deckplatte nach vorne gerichtet war. Dies ermöglichte anschließend ein korrektes Beladen des Gels.
- ✓ Die Halterung wurde nun auf einen Ständer gestellt, wo sie über einen Klappverschluß fixiert wurde. Der untere Bereich der Anordnung wurde mit einem zuvor leicht befeuchteten Dichtungstreifen versehen, um ein Ausrinnen des Gels während der Polymerisation zu verhindern.
- ✓ Ein 10%iges Trenngel wurde hergestellt, wobei darauf geachtet werden mußte, daß das Temed erst am Schluß dazugegeben wurde, um eine Polymerisation bereits vor dem Gießen zu verhindern.
- ✓ Mit Hilfe einer Pipette konnte nun das Gel vorsichtig bis etwa 2 cm unterhalb der äußeren Deckplatte eingegossen werden.
- ✓ Um ein Austrocknen und eine ungleichmäßige Polymerisation zu verhindern, wurde das Gel mit Isopropanol überschichtet.
- ✓ Es folgte eine Inkubation von 30-60 min bei RT.

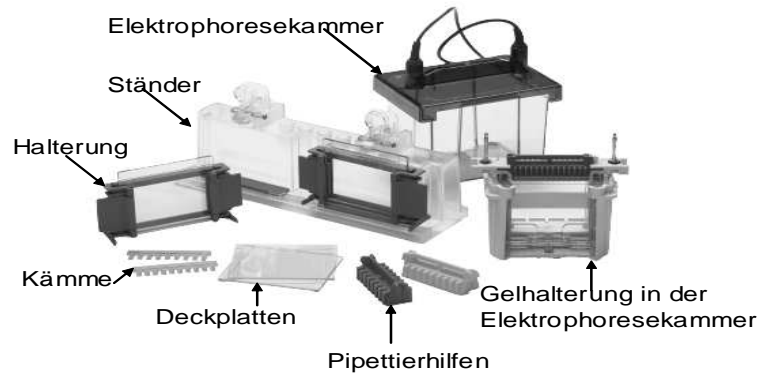
- ✓ Nach beendeter Auspolymerisierung wurde das Isopropanol vorsichtig abgezogen und das frisch angesetzte Sammelgel bis an den Rand der Deckplatte gegossen.
- ✓ Ein geeigneter Kamm wurde gleichmäßig in den schmalen Spalt geschoben und für weitere 30-60 min konnte diesmal das Sammelgel auspolymerisieren.
- ✓ In der Zwischenzeit wurden die entsprechenden Proteinproben und ein Protein-Standard (siehe Abbildung 5) mit einem fünffach konzentrierten Probenpuffer so vermischt, daß der Probenpuffer schließlich in Lösung einfach konzentriert vorlag.



**Abb. 5:** Protein-Standard von Bio-Rad (Aus: [www .biorad.com/B2B/Bio Rad/product /br\\_product.jsp](http://www.biorad.com/B2B/Bio Rad/product /br_product.jsp)).

- ✓ 5 min wurden die Proben nun im Wasserbad bei 97 °C inkubiert.
- ✓ Das Gel wurde aus der Halterung genommen und in der Elektrophoresekammer fixiert. Dabei wurde der Kamm erst nach dem Befüllen der Kammer mit einfach konzentriertem Elektrophoresepuffer entfernt, um ein Austrocknen der Taschen zu verhindern.
- ✓ 5-10 µL des Proteinstandards und 20 µL der Proben (4 µL Probenpuffer und 16 µL Probe) wurden mit einer entsprechenden Pipette in die Taschen gefüllt, wobei das im Probenpuffer enthaltene Glycerin ein zügiges Absinken der Proben bewirkte.
- ✓ Die Elektrophoresekammer wurde an eine Stromquelle angeschlossen und bei 110 V konnte nun die eigentliche elektrophoretische Auftrennung beginnen. Ein durchschnittlicher Lauf dauerte ca. 90 min.





**Abb. 6:** Gelapparatur und Elektrophoresekammer (Aus: [http://www.bio-rad.com/cmc\\_upload/Literature/44432/4006157B.pdf](http://www.bio-rad.com/cmc_upload/Literature/44432/4006157B.pdf)).

Die häufigsten Methoden zum Nachweis der Proteine nach einem Elektrophoreselauf sind die Färbung mit Coomassie-Brilliantblau und die Silberfärbung. Eine weitere Färbemethode, die in dieser Dissertationsarbeit verwendet wurde, ist die India Ink-Färbung. Bei der Coomassie-Färbung werden die Proteine mit einem Ethanol/Essigsäure/Wassergemisch, das zudem das Färbemittel Coomassie-Blau enthält, fixiert. Die Färbung kann innerhalb einer Stunde erfolgen, bedingt allerdings eine zwei- bis dreistündige Entfärbung. Die Empfindlichkeit liegt im Bereich zwischen 200 und 400 ng (pro Bande). In dieser Arbeit fand diese Färbemethode aufgrund ihrer ungünstigen Nachweisgrenze nur zum groben qualitativen Nachweis von Proteinproben Verwendung. Deutlich sensitiver ist die Silberfärbung. Ihre Nachweisgrenze liegt zwischen 5 und 30 ng (Bernhardt *et al.*, 2006). Dabei werden Silber-Ionen durch Proteine gebunden. Es folgt eine Reduktion zu metallischem Silber und eine dunkle Anfärbung im Bereich der Silberkomplexe. Durch eine gezielte Veränderung des pH-Werts kann diese Reaktion anschließend beendet werden (Hempelmann und Kaminsky, 1986). Die India Ink-Färbung bietet den Vorteil, daß sie ohne einen eigentlichen Entfärbeschritt auskommt. Der Hintergrund erfährt keine Farbänderung und muß somit auch nicht durch ein Reduktionsmittel befreit werden.

Ablauf der Silberfärbung:

- ✓ Nach der Auftrennung der Proteine in verschiedene Banden während der Elektrophorese wurde das Gel zunächst für 2×20 min in jeweils frisch angesetzte Fixierlösungen gelegt, die auf einem Schüttler leicht bewegt wurden.
- ✓ Es folgten 3 Waschschrte für 10 min in jeweils gewechseltem, bidest. Wasser.
- ✓ Eine anschließende Inkubation in einer Thiosulfatlösung (0,8 mM) für 1 min ermöglichte eine Sensibilisierung des Gels.

- ✓ Es schloß sich ein Waschschrift von 1 min in bidest. Wasser an.
- ✓ Nun konnte das Gel für 20 min in eine Silbernitratlösung (0,01 M) gegeben werden.
- ✓ Ein erneuter Waschschrift von 1 min mußte durchgeführt werden.
- ✓ In einer Entwicklerlösung wurden nun die Proteinbanden sichtbar. Im Schnitt dauerte dieser Vorgang 5-10 min.
- ✓ Um ein unkontrolliertes Anfärben des Gels zu vermeiden, mußte das Gel für 15 min in eine Stopp-Lösung übertragen werden.
- ✓ Ein 2×20 min dauerndes Waschen mit jeweils gewechseltem, bidest. Wasser schloß die Silberfärbung ab.
- ✓ Optional wurde das Gel zudem im Anschluß in eine Konservierungslösung gelegt, um es längerfristig aufzubewahren.

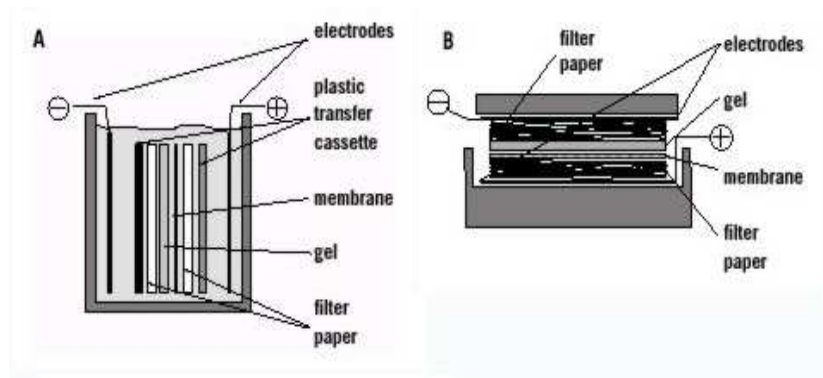
Ablauf der India Ink-Färbung:

- ✓ Das Polyacrylamidgel mit den aufgetrennten Proteinbanden wurde 3×5 min in jeweils gewechseltem, einfach konzentriertem PBS-Waschpuffer gewaschen.
- ✓ Daran anschließend erfolgte die eigentliche Anfärbung in der India Ink-Färbelösung für eine Zeitspanne von mindestens 20 min.
- ✓ Ein Waschschrift in bidest. Wasser beendete die Färbung.

## 2.4 Western-Blot

Zum immunologischen Nachweis bestimmter Moleküle in einem Molekülgemisch kann man sich einer Methode bedienen, die Blotting genannt wird. Dabei werden DNA, RNA oder Proteine eines Agarose- oder Polyacrylamidgels elektrophoretisch auf eine Membran übertragen. Werden DNA-Moleküle geblottet, spricht man nach dem Entdecker des Verfahrens von einem Southern-Blot und beim Transferieren von RNA von einem Northern-Blot. Die elektrophoretische Übertragung von Proteinen aus einer SDS-PAGE oder einem nativen Polyacrylamidgel wird schließlich Western-Blot genannt. Aufgrund der chemisch-physikalischen Konsistenz ist das Arbeiten mit Gelen schwieriger als das Hantieren mit Membranen, bei denen einzelne Waschschriffe und immunchemische Reaktionen ohne Diffusionsprobleme ablaufen. Verschiedenste Materialien können als Membran dienen. Dazu zählen z.B. Nitrocellulose, Polyvinylidenfluorid (PVDF), Nylon und mit Polybren beschichtete Glasfasern. Beim Western-Blot binden die Proteine nicht kovalent an die Membran, was eine Abtrennung der Moleküle ermöglicht und weitere analytische Verfahren

wie z.B. eine MALDI-TOF-Untersuchung ermöglicht (Bernhardt *et al.*, 2006). Beim eigentlichen Blotten wird das Gel auf die Membran gelegt und senkrecht dazu eine Spannung angelegt. Die Proteine werden an die Membran gebunden, was beim sogenannten Naß-Blot in einem vertikalen Puffersystem und beim Semi-Dry-Blot in einem horizontalen System zwischen zwei Graphitelektroden geschieht (siehe Abbildung 7).



**Abb. 7:** A: Naß-Blot, B: horizontaler Semi-Dry-Blot (Aus:[http://www5.amershambio.com/aptrix/upp00919.nsf/\(FileDownload\)?OpenAgent&docid=441122C3FCD058AC1256EB40044A89C&file=80601388.pdf](http://www5.amershambio.com/aptrix/upp00919.nsf/(FileDownload)?OpenAgent&docid=441122C3FCD058AC1256EB40044A89C&file=80601388.pdf)).

Nach einer zuvor festgelegten Zeit kann das geblottete Protein mit spezifischen Antikörpern behandelt werden, was man einen Immunprint oder ein Immunoblotting nennt. Unspezifische Bindungen können durch einen Blockierungsschritt unterbunden werden. Neben Magermilchpulver findet dabei vor allem Rinderserumalbumin (BSA) Verwendung. Der Nachweis der Antikörperbindung erfolgt durch einen enzymmarkierten Antikörper (z.B. mit Meerrettichperoxidase (POD) markiert).

Ablauf des Western-Blots:

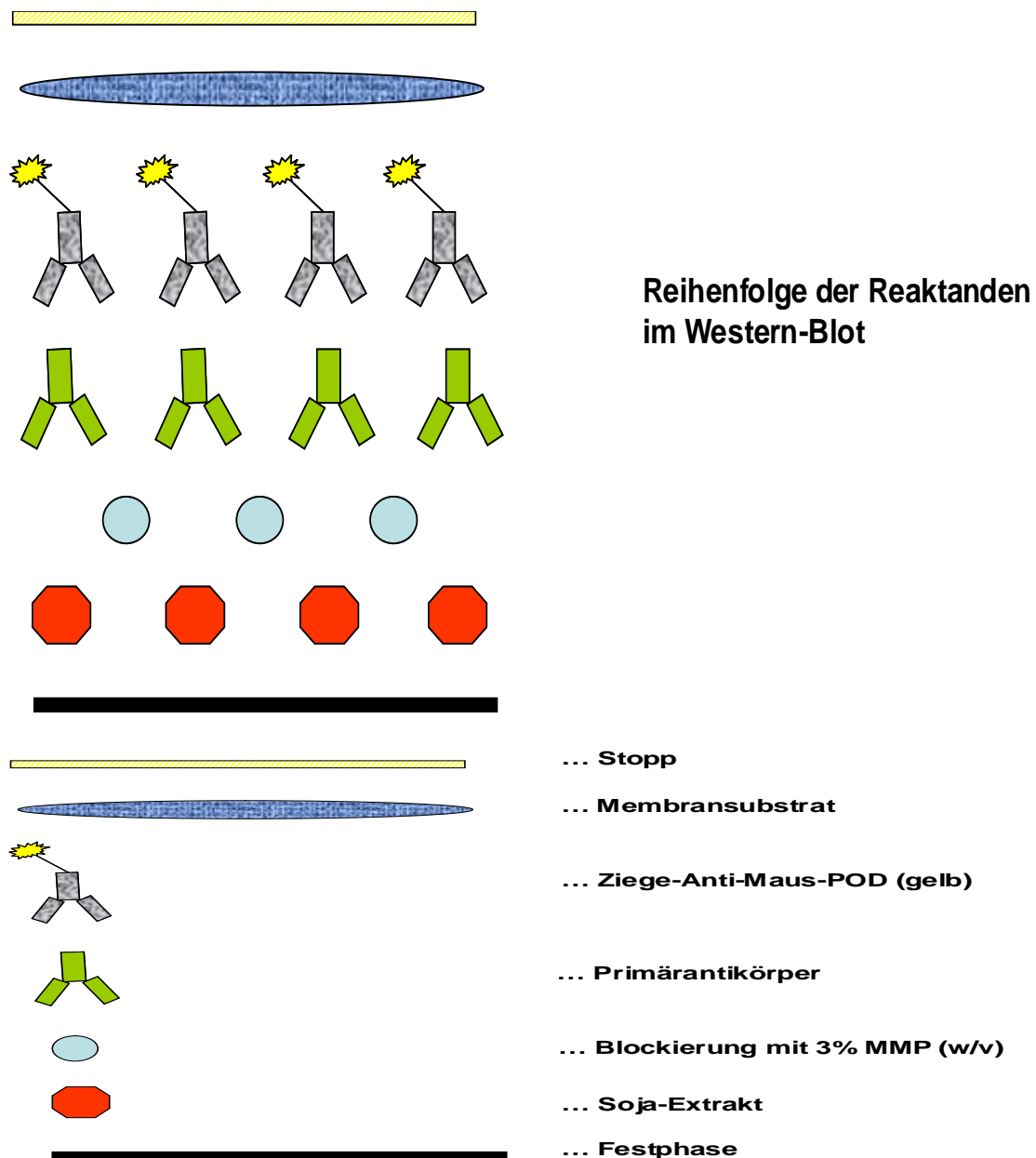
- ✓ Die zu blottenden Proteine wurden zunächst in einer Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt.
- ✓ Acht Lagen Filterpapier und eine Nitrocellulosemembran wurden auf Gelgröße zugeschnitten.
- ✓ Die Nitrocellulosemembran wurde 1 min in Methanol (100% Reinheit) äquilibriert.
- ✓ Anschließend wurde sie für 2 min in ein Wasserbad überführt.
- ✓ Die Filterpapiere, die Membran sowie das Gel wurden für mindestens 5 min in den Transferpuffer gelegt.
- ✓ Die Anode der Blot-Apparatur wurde mit Transferpuffer benetzt. Jeweils eine Lage Filterpapier wurde auf diese Elektrode gelegt und immer mit einem Glasstab glatt-

gestrichen, um die Entstehung von Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten zu vermeiden.

- ✓ Auf vier übereinandergestapelte Filterpapiere konnte die Membran gelegt werden.
- ✓ Nun konnte das Gel vorsichtig mit ausreichend Transferpuffer auf diesem Aufbau positioniert werden.
- ✓ Es folgten weitere vier Lagen Filterpapier in der Anordnung, die auch immer befeuchtet und glattgestrichen wurden.
- ✓ Schließlich wurde die Apparatur verschlossen und eine Stromstärke von  $1,2 \text{ mA/cm}^2$  angelegt.
- ✓ Der Proteintransfer hatte eine Laufzeit von 60 min.

Ablauf des Nachweisverfahrens (siehe Abbildung 8):

- ✓ Die Membran wurde ü.N. bei RT in ca. 30 ml 3% Magermilchpulver (w/v) in PBS inkubiert. Ein konstantes Schütteln verhinderte ein Verklumpen und eine ungleichmäßige Verteilung der Magermilchlösung.
- ✓ Es schlossen sich drei Waschschrte zu je 3 min in einfach konzentriertem PBS-Waschpuffer an.
- ✓ Verschiedene Verdünnungen von Antikörperlösungen (Zellkulturüberstände) wurden in den unterschiedlichen Versuchsanordnungen in einfach konzentriertem PBS für 60 min bei RT inkubiert. Ein leichtes Schütteln ermöglichte auch hier eine gleichmäßige Verteilung.
- ✓ Es folgten erneut drei Waschschrte zu je 3 min in einfach konzentriertem PBS-Waschpuffer.
- ✓ Anschließend wurde die Membran in eine 1:10000 Verdünnung (in PBS) des Sekundärantikörpers (Ziege-anti-Maus-IgG-POD) gelegt. Bei leichtem Schütteln erfolgte eine Inkubation für 60 min bei RT.
- ✓ Drei letzte Waschschrte in einfach konzentriertem PBS-Waschpuffer für je 3 min folgten.
- ✓ 30 ml der Substratlösung (Substratlösung Western-Blot) wurden für 90 min unter leichtem Schütteln für die Farbreaktion verwendet.
- ✓ Die Membran wurde anschließend getrocknet und für verschiedene Analysen verwendet.



**Abb. 8:** Schematischer Ablauf des Western-Blots.

## 2.5 Dot-Blot

Der Western-Blot ist eine zeitaufwendige Methodik. Für schnelle Evaluierungen von verschiedenen immunologischen Reaktionen eignet sich deshalb der Dot-Blot. Dabei wird eine zu untersuchende Probe auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen und getrocknet. Der aus dem Western-Blot bekannte Transfervorgang in einer entsprechenden Apparatur fällt weg. Die immunologische Untersuchung kann nach dem selben Schema wie im Western-Blot ablaufen.

#### Praktischer Ablauf des Dot-Blots:

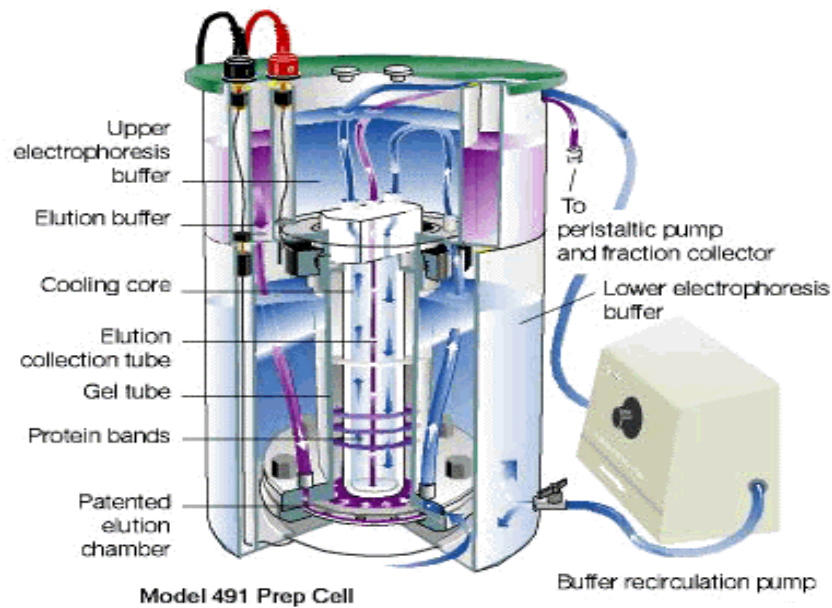
- ✓ Es wurden 1×1 cm große Quadrate einer mit Methanol (100% Reinheit) vorbehandelten (1 min) Blotting-Membran ausgeschnitten. Mit einer Pipette konnten 2 µl einer Probe der aufgereinigten Banden aus der präparativen Gelelektrophorese sowie zwei verschiedene Soja-Extrakte aufgetragen werden. Es handelt sich um einerseits das 0%-Extrakt, das für die verschiedenen Versuchsanordnungen in dieser Dissertationsarbeit verwendet wurde, und andererseits um ein 2,5%-Extrakt, das gentechnisch veränderte Proteine in einer Konzentration von 2,5% (w/w) besitzt. Zweiteres diente als zusätzliche Kontrolle, um zu sehen, ob die untersuchten Zelllinien spezifische Antikörper gegen ein gentechnisch verändertes Protein aufwiesen.
- ✓ Die Membranstücke mit den aufgetragenen Proteinlösungen wurden ca. 60 min luftgetrocknet.
- ✓ Die Membranstücke wurden 120 min bei RT in 3%igem (w/v) Magermilchpulver (in PBS) in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen inkubiert. Ein konstantes Schütteln verhinderte ein Verklumpen und eine ungleichmäßige Verteilung der Magermilchlösung.
- ✓ Es schlossen sich drei Waschschrte zu je 3 min in einfach konzentriertem PBS-Waschpuffer an.
- ✓ Die Membranstücke wurden in 1:10 Verdünnungen (in einfach konzentriertem PBS) der Antikörperlösungen (Zellkulturüberstände) für 60 min bei RT inkubiert. Ein leichtes Schütteln ermöglichte auch hier eine gleichmäßige Verteilung.
- ✓ Es folgten erneut drei Waschschrte zu je 3 min in einfach konzentriertem PBS-Waschpuffer.
- ✓ Anschließend wurde die Membran in eine 1:10000 Verdünnung (in PBS) des Sekundärantikörpers (Ziege-anti-Maus-IgG-POD) gelegt. Bei leichtem Schütteln erfolgte eine Inkubation für 60 min bei RT.
- ✓ Drei letzte Waschschrte in einfach konzentriertem PBS-Waschpuffer für je 3 min folgten.
- ✓ 30 ml der Substratlösung für den Western-Blot konnten auch im Dot-Blot-Ansatz verwendet werden. In einer 90 min-Inkubation konnte eine Farbreaktion unter leichtem Schütteln erzielt werden.
- ✓ Die Membranen wurden getrocknet und die Ergebnisse als Grundlage für weitere Untersuchungen im Western-Blot verwendet.

## 2.6 Präparative SDS-PAGE

Zur Aufreinigung extrahierter Proteinextrakte wurde eine in Abbildung 9 dargestellte „491 Prep Cell“ von Bio-Rad verwendet. Dieses Modell dient der präparativen Abtrennung einzelner Komponenten aus einem Proteingemisch. Im Gegensatz zur analytischen SDS-PAGE ist hier keine optimale Auflösung über ein großes Molekulargewichtsspektrum möglich. Allerdings muß das aufzureinigende Protein innerhalb der vorgegebenen Gellänge klar von seiner ihm gewichtsmäßig nächsten Proteinbande getrennt werden können.

Drei Komponenten bestimmen eine optimale Auflösung in einer präparativen SDS-PAGE (Bio-Rad, 2000):

- a) Größe der Gelporen: Diese Größe wird durch den prozentuellen Anteil der Acrylamidkonzentration bestimmt. Das Molekulargewicht des Zielproteins bedingt eine spezifische Acrylamidkonzentration, um eine optimale Auflösung zu gewährleisten.
- b) Gellänge: Mit Hilfe der Gellänge kann die Auflösung einer Reinigung verbessert werden. Die minimale Gellänge wird durch die Differenz des Molekulargewichts des Zielproteins und der nächsten Verunreinigung bestimmt. Kleine Differenzen bedingen größere Gellängen. Grundsätzlich kann man sagen, daß neben einer variablen Gellänge auch eine verringerte Probenbeladung des Gels zu einer verbesserten Auflösung führt.
- c) Durchmesser des Gelröhrchens: Sowohl die Probenbeladung als auch die Molekulargewichtsdifferenz bestimmen die Wahl des Gelröhrchens. Bio-Rad bietet zwei verschiedene Durchmesser (28 und 37 mm innerer Durchmesser) an. Mit der 37mm-Version kann eine bessere Auflösung erreicht werden. Zudem wird eine erhöhte Probenbeladung möglich.



**Abb. 9:** Aufbau der Model 491 Prep Cell zur präparativen Gewinnung von Proteinen (Aus: <http://www.bio-rad.com>).

Ablauf der präparativen Gelelektrophorese:

- ✓ Das Gelröhrchen wurde auf den für das Gießen des Gels vorgesehenen Ständer geschraubt. Dabei mußte darauf geachtet werden, daß die Schrauben abwechselnd über Kreuz festgezogen wurden, um ein Wackeln der Apparatur beim Eingießen des Gels zu verhindern.
- ✓ Der Kühlstab wurde vorsichtig im Mittelbereich des Gelröhrchens auf einem am Boden des Ständers befindlichen Nagel durch eine leichte Drehbewegung verankert.
- ✓ Anschließend wurden 20 ml eines 10%igen Trenngels mit einer Spritzflasche langsam eingegossen. Es mußte darauf geachtet werden, daß keine Luftblasen entstanden, weil dadurch der Proteinlauf erheblich gestört worden wäre.
- ✓ Durch ein schwaches Klopfen auf die Glaswand des Gelröhrchens konnten trotz vorsichtiger Handhabung entstandene Luftblasen entfernt werden.
- ✓ Das Gel wurde nun mit 1 ml reinem Isopropanol überschichtet, um ein Austrocknen zu verhindern.
- ✓ Die Polymerisation konnte nun für 60 min ablaufen.
- ✓ Anschließend wurde das Isopropanol abgetrennt.
- ✓ Ca. 4 ml des Sammelgels wurden über die Spritzflasche eingegossen und mit einem einfach konzentrierten Elektrophoresepuffer überschichtet.
- ✓ Die Polymerisation konnte nun optional für 60 min oder ü.N. bei 4°C im Kühlschrank ablaufen.



- ✓ Die Dialysemembran, eine Elutionsfritte und eine zusätzlich unterstützende Fritte wurden im einfach konzentrierten Elektrophorespuffer für 10 min inkubiert.
- ✓ Das Gelröhrchen mit dem Kühlstab wurde vom Ständer abgeschraubt und auf der sogenannten Elutionskammer angebracht, die im Wesentlichen aus den Fritten und der Dialysemembran zusammengebaut wurde.
- ✓ Auf diesen Schritt folgend mußte nun die obere Pufferkammer vorsichtig am oberen Teil des Gelröhrchens fixiert werden.
- ✓ Die untere Pufferkammer wurde bis ca. zur Hälfte mit einfach konzentriertem Elektrophorespuffer gefüllt.
- ✓ In diese Kammer konnte die Elutionskammer mit der daran befestigten, oberen Pufferkammer gestellt werden.
- ✓ Auch in die obere Pufferkammer wurde bis zum Rand Elektrophorespuffer gegossen.
- ✓ Die Kühlpumpe wurde angeschlossen.
- ✓ Anschließend konnte eine Mischung von 600 µL der Proteinprobe und 300 µL Probenpuffer mit darin enthaltenem Glycerin über eine Spritze, die mit einem dünnen Plastikschlauch verlängert war, direkt auf das Sammelgel aufgetragen werden. Auch hier konnte die Probe ähnlich dem Ablauf bei der SDS-PAGE problemlos aufgrund des enthaltenen Glycerin absinken.
- ✓ Zur Kontrolle des Durchlaufs wurden ein Photometer und ein Schreiber angeschlossen.
- ✓ Der Deckel des Geräts mit den Stromkabeln wurde angebracht und an eine Stromquelle angeschlossen, nachdem als bestimmende Parameter die Spannung auf 500 V, die Stromstärke auf 50 mA und die Leistung auf 20 Watt eingestellt wurden.
- ✓ Die Laufzeit betrug durchschnittlich 6-8 h.
- ✓ Die verschiedenen Eluate wurden über einen Fraktionskollektor individuell aufgefangen.

Um eine Mindestmenge von 50 µg des Antigens für eine Immunisierung zu erhalten, waren durchschnittlich ca. 10 Läufe mit der präparativen Gelelektrophorese nötig. Die einzelnen Proben wurden zunächst unter Druckluft in einer Rührzelle von Amicon aufkonzentriert. Dabei wurde eine 30 kDa-Membran (Ausschlußgröße) zur Abtrennung unerwünschter Proteinbanden verwendet. Anschließend mußten die Proben in einer Dialyse mit 0,01 M PBS-Lösung umpuffert werden.

## 2.7 MALDI-TOF

MALDI-TOF ist ein massenspektrometrisches Verfahren und steht für „Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight“. Dabei wird ein Analyt in eine Matrix eingebettet, die eine hohe Absorption für auftreffendes Laserlicht besitzt und aus organischen Partikeln besteht. Der Beschuß des Analyten mit Laserlicht verursacht eine Ionisierung desselben. In einem angelegten elektrischen Feld werden die Ionen unterschiedlich schnell beschleunigt und treffen auf einen Detektor, wo eine Umwandlung in ein elektrisches Signal erfolgt und ein exakter massenspezifischer Abgleich mit Datenbanken erfolgt. Die Versuche am Massenspektrometer konnten in Zusammenarbeit mit dem Institut für Proteomik der TU München durchgeführt werden.

## 2.8 Immunisierung

Zur Immunisierung weiblicher CD-1-Mäuse (Ursprung: Swiss Mäuse, Charles River, Sulzfeld) diente eine 1:1 Emulsion mit jeweils 100 µl aus komplettem Freund's Adjuvans und einer immunogenhaltigen (aus der präparativen Gelelektrophorese gewonnenes Immunogen) PBS-Lösung, mit der eine intraperitoneale Injektion über eine 1ml-Spritze in zwei Mäuse erfolgte. Jede Maus erhielt 50 µg des Antigens. Die Stabilität der Emulsion stellte sich in einem einfachen Versuch heraus. Dazu wurde ein Tropfen des Emulgats auf eine Wasseroberfläche abgegeben. Bei einer möglichen Zerstörung des Tropfens mußte die Emulsion neu hergestellt werden. Die Tiere hatten bei der Erstimmunisierung ein Alter zwischen 40 und 50 Tagen. Nur zur Erstimmunisierung war komplettes Freund's Adjuvans in Verwendung. In anschließenden Immunisierungen wurde auf inkomplettes Adjuvans zurückgegriffen. Nach der zweiten Immunisierung wurden erstmals 10-20 µl Blut aus der Schwanzvene der Tiere zur Titerbestimmung entnommen. Das Blut stand 1 h zur Gerinnung bei 4 °C im Kühlschrank, wurde bei 10000 U/min abzentrifugiert, das Serum vorsichtig mit einer Pipette abgezogen und zur weiteren Analyse im ELISA aufbewahrt. Die Maus mit der besseren Immunantwort wurde zuerst für die Entnahme der Milz herangezogen. Sie wurde an drei Tagen vor der Fusion mit jeweils 200 µl in PBS gelöstem Antigen (100 µg/Maus) geboostert. Da die Mindestmenge an Antigen für eine Immunisierung nur über ca. 10 Läufe der präparativen Gelelektrophorese zu erhalten war und sich dieses Verfahren als sehr zeitaufwendig herausstellte, wurde auf eine detaillierte nötige Titeranalyse verzichtet. Das mengenmäßig spärlich vorhandene Antigen wurde nach den jeweiligen

Immunisierungsschritten nur für eine schnelle Positiv-, Negativkontrolle sowohl für das Nullblut als auch für die folgenden Immunisierungsstadien verwendet. Weitere Analysen der Spezifität konnten erst im Western-Blot für die jeweiligen Klone durchgeführt werden.

**Tabelle 9:** Immunisierungsschema für zwei Mäuse

<b>Datum der Immunisierung</b>	<b>Antigenmenge/Maus</b>
19.12.2003	~0.05 mg
23.01.2004	~0.05 mg
08.03.2004	~0.05-0.07 mg
13.04.2004	~0.05-0.07 mg
17.05.2004	~0.05-0.07 mg
20.06.2004	~0.100 mg
21.06.2004	~0.100 mg
22.06.2004	~0.100 mg

## 2.9 Gewinnung der Milzzellen für die Zellfusion

Zur Milzzellgewinnung wurde eine immunisierte Maus zunächst durch Genickbruch getötet und zur Desinfektion mit 70%igem Alkohol abgesprüht. Nach dem Öffnen der Bauchhöhle erfolgte die Entnahme der Milz nach einem Standardprotokoll (Giersch, 1993a und 1993b), wobei besonders darauf zu achten war, den Darm nicht zu verletzen, um mögliche Kontaminationen des Milzgewebes zu verhindern. Anschließend wurde das herauspräparierte

Gewebe mit 5 ml RPMI 1640 abgespritzt, Fettreste entfernt und durch einen weiteren Waschschrift gereinigt. Mit einer Injektionsspritze wurden 15 ml steriles Medium durch das Organ gespült und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einem fünfminütigen Zentrifugationsschritt bei 1000 rpm folgte ein Abdekantieren des Überstands und eine neuerliche Zentrifugation der Zellen in 5 ml RPMI 1640. Der Rückstand konnte anschließend in 20 ml Medium resuspendiert und für die Fusion bereitgestellt werden.

## 2.10 Fusion

Ablauf der Fusion:

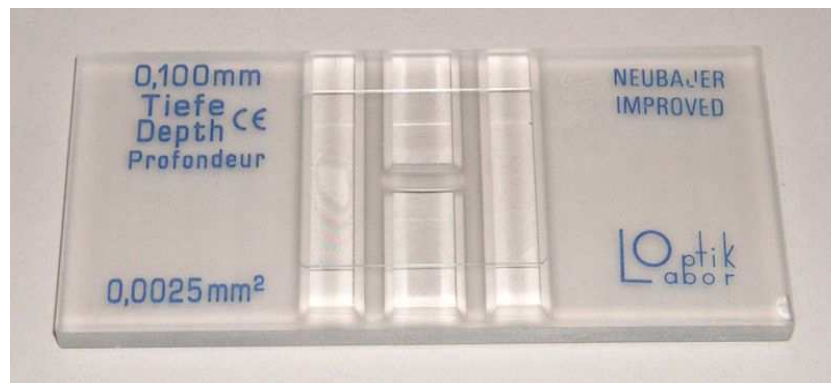
- ✓ Die Tumorzelllinie PAI-B<sub>3</sub> Ag8I wurde bereits 7-10 Tage vor der Fusion in Normalmedium kultiviert. Aufgetaute Myelomzellen wurden dazu aufgetaut und in große Zellkulturflaschen (175 cm<sup>2</sup>) überführt. Die Kultivierung ermöglichte es, die Zellen in ein exponentielles Wachstum zu bringen und somit eine verbesserte Fusionsrate zu gewährleisten. Die gewünschte und für die Fusion notwendige Zahl von  $2 \times 10^7$  Zellen war mit 2-3 stark bewachsenen Zellkulturflaschen erreicht.
- ✓ Diese wurden nun entweder abgeklopft oder die Zellen mit einem Schaber vom Bodenbereich der Flasche entfernt.
- ✓ Die Myelomzellen wurden anschließend für 5 Minuten bei 1000 rpm abzentrifugiert.
- ✓ Es folgte ein erneuter Waschschrift.
- ✓ Nun konnte die Zellzahl mit der in Abbildung 10 gezeigten Neubauer Zählkammer bestimmt werden.

Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer (siehe Abbildung 10):

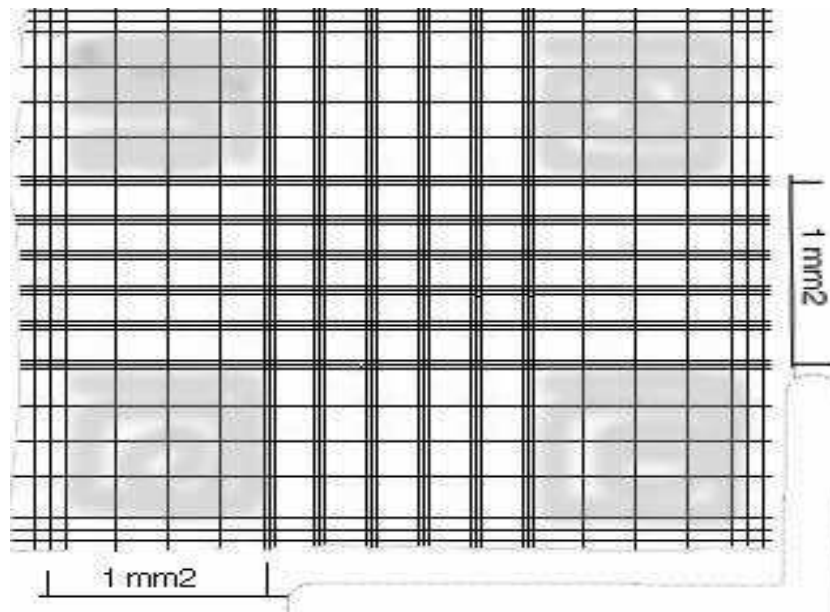
- ✓ Zunächst mußte eine 1:10 Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblau hergestellt werden.
- ✓ Ein Deckglas wurde kurz befeuchtet und langsam mit Druck den Zentralbereich des Hämocytometers entlanggeschoben.
- ✓ Sobald Newtonsche Ringe auf dem Deckglas zu erkennen waren, konnte die 1:10 Verdünnung vorsichtig mit einer am Rand angesetzten Pipette aufgetragen werden. Aufgrund wirkender Kapillarkräfte verteilte sich die Suspension unterhalb des Deckglases.
- ✓ Unter dem Mikroskop wurden nun lebende, goldgelbe Zellen in acht Großquadraten (oberhalb und unterhalb der mittleren Unterbrechung auf der Neubauer-Zählkammer)

gezählt. Tiefblaue, tote Zellen, durch deren defekte Plasmamembran das Trypanblau problemlos durchdiffundieren konnte, wurden für die Berechnung der Zellzahl nicht berücksichtigt. Allerdings wurde darauf geachtet, daß nicht übermäßig viele (>5%) davon anwesend waren, was auf eine ungünstige Entwicklung der Zellkultur hingewiesen hätte.

- ✓ Bei der Berechnung der Zellzahl wurden auf den Rändern der Auszählfelder liegende Zellen immer nur für jeweils zwei Randlinien berücksichtigt (siehe Abbildung 11). Das arithmetische Mittel der Summe der in den acht Quadranten gezählten Zellen mit  $10^4$  multipliziert ( $1 \text{ mm}^2$  Fläche,  $0,1 \text{ mm}$  Tiefe,  $0,1 \text{ }\mu\text{l}$  Volumen pro Quadrat) ergibt die Zellzahl/ml. Der 1:10-Verdünnungsfaktor durch Trypanblau muß allerdings noch berücksichtigt werden.



**Abb. 10:** Neubauer-Zählkammer (Aus:[http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Neubauer\\_improved\\_counting\\_chamber.jpg](http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Neubauer_improved_counting_chamber.jpg)).



**Abb. 11:** Schematischer Aufbau der Gitternetzstruktur einer Neubauer-Zählkammer mit den hier grau markierten Auszählfeldern (Aus: [http://www.mta-labor.info/front\\_content.php?idcat=25&idart=139](http://www.mta-labor.info/front_content.php?idcat=25&idart=139)).

- ✓ Nun konnte die eigentliche Fusion fortgesetzt werden.  $2 \times 10^7$  Myelomzellen wurden in 20 ml serumfreiem Medium und  $10^8$  Milzzellen in gleichem Volumen in einem Zentrifugenröhrchen vermischt.
- ✓ Bei 1000 rpm wurde das Gemisch 5 Minuten abzentrifugiert.
- ✓ Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abgezogen.
- ✓ 1 ml auf 37 °C vorgewärmtes PEG wurde anschließend mit einer Pipette unter ständigem Rühren zu den Zellen innerhalb 1 Minute zugegeben.
- ✓ Daraufhin wurde für weitere 1-2 Minuten vorsichtig weitergerührt, bis schließlich für die gleiche Zeitspanne 1 ml vorgewärmtes (37 °C) RPMI 1640 dazugemischt wurde.
- ✓ Das Volumen sollte in 3 weiteren Minuten um 3 und zuletzt um 10 ml Medium vergrößert werden.
- ✓ Es folgte eine zehnminütige Inkubation bei RT und eine erneute fünfminütige Zentrifugation bei 1000 rpm.
- ✓ Die Zellen wurden in 20 ml Normalmedium resuspendiert.
- ✓ Ein Teil (30%) des Fusionseinsatzes wurde in einer 1:10-Verdünnung der Zellsuspension mit Condimed (10%) auf vier 96er Zellkulturplatten ausgesät (bei 37°C im Brutschrank inkubiert) und der Rest konnte nach einem Tag im Gefrierschrank bzw. anschließend im Stickstofftank bei - 196°C eingefroren werden.

## 2.11 HAT-Selektion

Nach einer Fusion liegen neben den Hybridomen nicht fusionierte Myelomzellen, B-Lymphozyten, Erythrozyten und Fusionsprodukte gleichartiger Zelltypen vor. Außer den Myelomzellen sind die verschiedenen Zelltypen nur begrenzt lebensfähig. Nicht fusionierte Tumorzellen können allerdings Hybridome in kürzester Zeit überwuchern und in ihrem Wachstum stören. Um dies zu verhindern, wird meist auf ein Selektionssystem zurückgegriffen, dessen Wirkung auf Defekte im Nukleinsäurestoffwechsel der Myelomzellen zurückzuführen ist. Zu den gängigsten Selektionsstrategien gehört ein Defekt der Thymidin-Kinase und der in der Arbeit bereits erwähnten Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT).

Grundsätzlich ist eine Nukleinsäuresynthese über einen Haupt- und einen Reserveweg möglich. Nur die Funktion eines der beiden Wege ist für eine erfolgreiche Synthese essentiell. Schaltet man z.B. den Hauptstoffwechselweg durch den Einsatz von Aminopterin aus und versorgt den Reserveweg gleichzeitig mit Hypoxanthin und Thymidin, kann eine vollständig intakte Myelomzelle überleben. Für eine auch im Reserveweg defekte Zelle ist ein solcher Kontakt mit Aminopterin letal. Das Medium, in welchem die Zellen selektiert wurden, bezeichnet man den verwendeten Chemikalien entsprechend HAT-Medium. Da die mit den Myelomen fusionierten Lymphozyten Wildtypen sind, kommt es im Hybridom zu einer sogenannten genetischen Komplementation durch die Dominanz des Lymphozyten-Gens und somit zu einem erfolgreichen Wachstum des Fusionsprodukts (Peters und Baumgarten, 1990). Für die Zellkulturen in diesem Projekt wurden Tumorzellen mit einem HGPRT-Defekt im Reservestoffwechselweg verwendet (PAI-B<sub>3</sub> Ag8I). Durch die gleichzeitige, bereits beschriebene Ausschaltung des Hauptstoffwechselweges konnte eine erfolgreiche Abtötung unerwünschter, nicht fusionierter Myelomzellen erreicht werden.

### Ablauf HAT-Selektion

- ✓ 24 h nach der Fusion wurde in jede Kavität der Aussaatplatten ein Tropfen (50 µl) eines dreifach konzentrierten HAT-Selektionsmediums aufgetragen.
- ✓ Nach einer Woche konnte schließlich ein vollständiger Mediumwechsel erfolgen, der mit einem einfach konzentrierten HAT-Selektionsmedium durchgeführt wurde.
- ✓ Die Selektion wurde über einen Zeitraum von 2 Wochen durchgeführt und der Mediumwechsel lief in einer Frequenz von 48 h ab, bevor ein Umstieg auf Normalmedium erfolgte.

## 2.12 Klonierung und Reklonierung von Hybridomzellen

Da ein monoklonaler Antikörper per Definition gegen ein einzelnes Epitop gerichtet sein muß, werden in normalerweise zwei Klonierungsschritten entsprechende Hybridome mit unspezifischen Bindungseigenschaften ausgemustert. Es soll also nur eine einzige Zelle der Ausgangspunkt einer sich entwickelnden Zellpopulation sein. Am Lehrstuhl für Zellbiologie wird v.a. die Klonierung mittels Limiting-Dilution und das Verfahren der Einzelzellablage angewandt. Bei der Limiting-Dilution wird eine Zellsuspension so verdünnt, daß pro Kavität einer Mikrotiterplatte statistisch entweder eine oder keine Zelle abgelegt wird (Coller und Coller, 1985). Bei der Einzelzellablage werden aus einer Stammsuspension von Hybridomazellen verschiedene Vorverdünnungen auf einer Mikrotiterplatte hergestellt. Aus jener Kavität, bei der unter dem Lichtmikroskop bei mittlerer Vergrößerung ca. zehn Zellen zu sehen sind, werden Aliquote auf leere Kavitäten verteilt. Ziel ist auch hier, eine Zelle pro Kavität abzulegen.

Ablauf der Einzelzellablage und der Reklonierungsschritte:

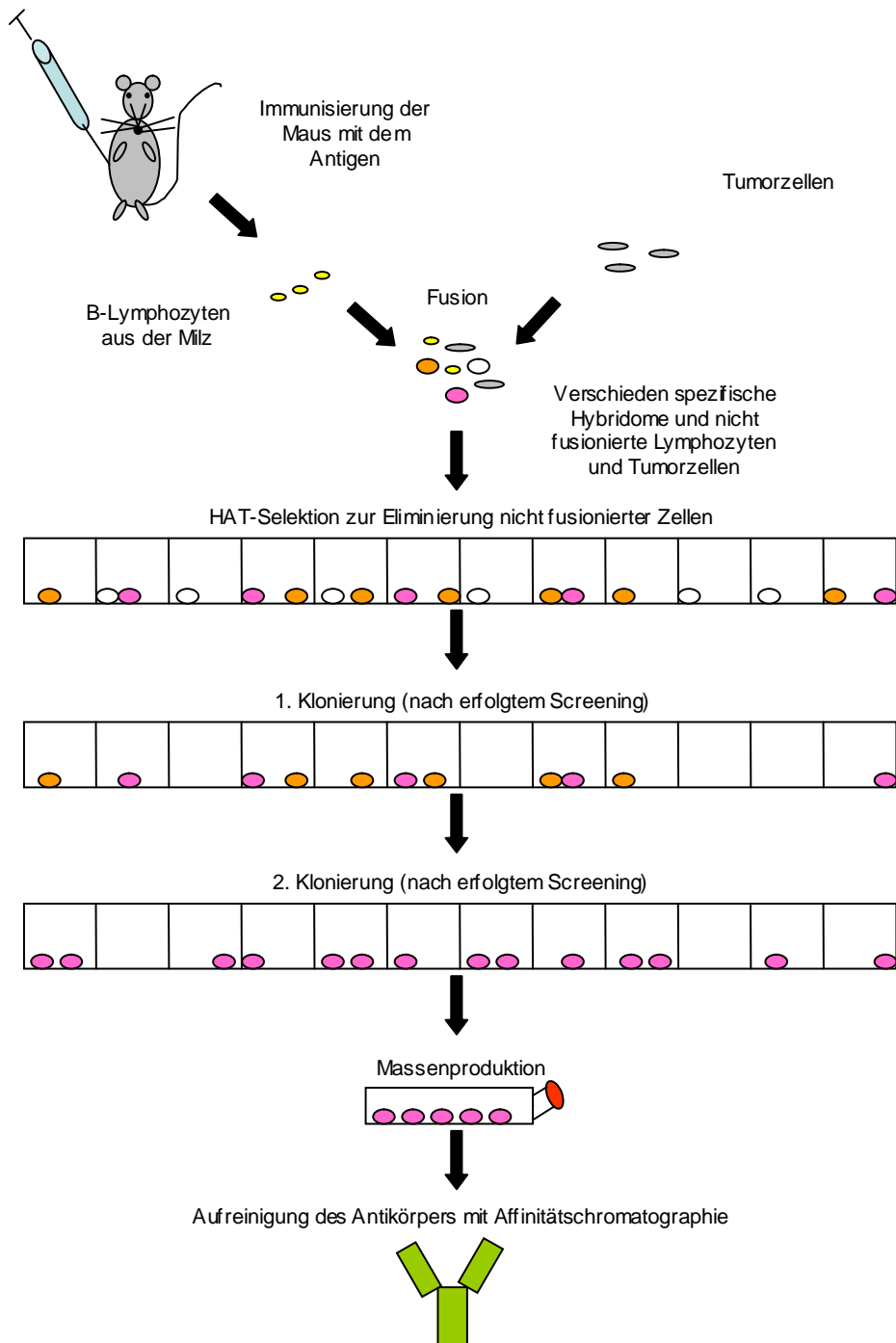
- ✓ Zunächst wurden zur Herstellung einer Vorverdünnung aus einer Stammsuspension an Hybridomazellen 10 µl entnommen und in eine mit Normalmedium befüllte Kavität (2 Tropfen mit einer 10 ml-Pipette) gegeben. Unter dem Lichtmikroskop wurde bei mittlerer Vergrößerung (hundertfach) die Zahl der sichtbaren Zellen für jede Kavität kontrolliert. Eine Verdünnungsreihe (1:10) über drei oder vier bereits mit zwei Tropfen Normalmedium befüllten Kavitäten reichte dabei meistens, um die gewünschte Konzentration zu erhalten.
- ✓ Die Zellen der Stammsuspension wurden aus einer Zellkulturflasche entweder durch einfaches Abklopfen oder unter Zuhilfenahme eines speziell dafür konzipierten Schabers von der Wand der Flasche abgetrennt und in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen durch vorsichtiges Abgießen überführt.
- ✓ Bei einer Zahl von ca. zehn Zellen wurde mit einer 50 µl-Pipette ein ungefähres Volumen von 30-40 µl angezogen und bei leichtem, durch den Daumen erzeugtem Gegendruck wurden kleine Tropfen durch bloße Berührung mit der Wand der Kavität abgegeben. In einem Schritt wurde so zumindest eine Reihe von Kavitäten einer Mikrotiterplatte mit einem Tropfen Suspension benetzt.
- ✓ Unter dem Lichtmikroskop konnte nun die Zahl der Zellen für jede Kavität ermittelt und notiert werden. Von Bedeutung für die Klonierung waren dabei Kavitäten, die



bloß eine Zelle enthielten. Bei einer ungünstig hohen Zahl an Zellen pro Kavität wurde eine andere Vorverdünnung für die Verteilung der Zellen gewählt.

- ✓ Um ein Austrocknen der Kavitäten zu verhindern, wurden unmittelbar im Anschluß an die Zählung zwei Tropfen Normalmedium in jede Kavität gegeben.
- ✓ Das gleiche Procedere erfolgte für die gesamte Mikrotiterplatte.
- ✓ Anschließend wurde die Platte mit einem Parafilmstreifen abgedichtet.
- ✓ Nach einigen Tagen bis zum Teil auch erst nach einer Woche im Brutschrank waren erste, klonale Zellpopulationen sichtbar.
- ✓ Aus Kavitäten mit idealerweise nur einem sich entwickelnden, klar begrenzten Zellhaufen wurde für die Subkultur mit einer 50 µL-Pipette eine Suspension hergestellt. Dazu wurde das Medium durch vorsichtiges Anziehen und Abdrücken der Pipette so in Bewegung versetzt, daß die Zellen aufgewirbelt wurden. Es wurde in der Mitte der Kavität gestartet und am Rand entlang weitergearbeitet.
- ✓ 20-50 µL der Suspension wurden in eine mit 1,5-2 ml Normalmedium gefüllte 24er-Zellkulturplatte überführt, die mit weiteren 1,5-2 ml Normalmedium anschließend aufgefüllt wurde.
- ✓ Nach einigen Tagen war der Bewuchs der Kavität meist so stark, daß auf 6er-Zellkulturplatten nach dem gleichen Schema umgesetzt werden mußte.
- ✓ Von den 6er-Platten ausgehend wurde nach Bedarf auf kleine Zellkulturflaschen (175cm<sup>2</sup>), anschließend auf große Zellkulturflaschen (175cm<sup>2</sup>) und schließlich auf eine Produktion im Miniperm-Bioreaktor zurückgegriffen.
- ✓ Zusätzliche Screeningdurchläufe begleiteten jeden der einzelnen Produktionsschritte, damit eine ungebrochene Funktionsfähigkeit und Spezifität der einzelnen Klone gesichert werden konnte.

In Abbildung 12 sind die verschiedenen Klonierungen mit anderen, bei der monoklonalen Antikörperproduktion grundlegenden Produktionsschritten graphisch dargestellt.



**Abb. 12:** Schematischer Ablauf der monoklonalen Antikörperproduktion.

### 2.13 Gefrierkonservierung von Zellen

Aus mehreren Gründen ist es ratsam, sich Zellvorräte zu sichern. Kontaminationen sind nur eine mögliche Ursache, die Sicherheitskopien notwendig macht. Daneben sind noch vor allem der plötzliche Verlust der Antikörperproduktion durch die Zellen und arbeitstechnische

Gründe (zu große Zahl an zu bearbeitenden Zellkulturplatten bei vollständiger Aussaat der Fusion) entscheidende Faktoren für eine Gefrierkonservierung.

Beim Einfrieren wurde darauf geachtet, daß die Zellen auf mehrere Kryoröhrchen verteilt wurden. Dies ermöglichte einerseits eine Verfügbarkeit kleinerer Zellzahlen und andererseits eine größere statistische Sicherheit bezüglich der Funktionalität der in verschiedenen Röhrchen eingefrorenen Zellen.

Eine Gefahr beim Einfrieren stellt die Entstehung von Eiskristallen dar. Diese können die Zellen in ihrer Funktionalität und Struktur schädigen. Ein Gefrierschutzmittel verhindert eine solche Verletzung allerdings erfolgreich. Neben dem häufig verwendeten DMSO (Wells und Bibb, 1986) kann auch Glycerin, Polyethylenglykol oder Glycerin mit Polyvinylpyrrolidon verwendet werden (Conscience und Fischer, 1985).

Ablauf des Einfrierens:

- ✓ Die Zellen wurden zum Einfrieren zunächst bei 1000 rpm 5 min abzentrifugiert.
- ✓ Sie mußten anschließend in entsprechendem Einfriermedium aufgewirbelt werden, bis sich mit freiem Auge sichtbare Zellcluster aufgelöst hatten und jeweils 1,8 ml in ein Kryoröhrchen überführt werden konnten. Es mußte darauf geachtet werden, daß das Einfriermedium sich in einem Temperaturbereich von 0°C befand, um die Toxizität von DMSO bei höheren Temperaturen zu verhindern.
- ✓ Um ein stufenweises Einfrieren (1°C/min.) zu gewährleisten und den Zellen die Möglichkeit zu geben, über die osmotische Wasserabgabe intrazelluläres Wasser abzugeben, wurde vorher eine mit Isopropanol gefüllte Einfrierbox 30 min. bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Die Zellen wurden in die vorgekühlte Einfrierbox gegeben und bei -80°C im Gefrierschrank für einige Tage bis Monate aufbewahrt. Maximal ist eine Lagerung bei -80°C nur für ein Jahr möglich (Patel und Brown, 1984). Für eine unbegrenzte Lagerung müssen die Kulturen in den Stickstofftank mit -196°C überführt werden.

Ablauf des Auftauens:

- ✓ Zum Auftauen wurden die aus dem Stickstofftank entnommenen Zellen zunächst vorsichtig in 37°C warmen Wasser soweit aufgetaut, bis nur mehr ein kleiner Eisklumpen zu erkennen war.

- ✓ Die Suspension wurde in 10 ml 37°C warmes RPMI1640 gegeben, 10 min dort inkubiert, um ein Herausdiffundieren des DMSO aus den Zellen sicherzustellen, und anschließend in einem entsprechenden Volumen Normalmedium aufgenommen.
- ✓ Nach 24 h erfolgte ein Mediumswechsel.

## 2.14 Massenproduktion der monoklonalen Antikörper

Die Massenproduktion von monoklonalen Ak wurde auf zwei Arten erreicht. In einem frühen Zellkulturstadium wurde hauptsächlich auf große Zellkulturflaschen (175 cm<sup>2</sup>) zurückgegriffen. Einen späteren Schritt stellte die Produktion im sogenannten Miniperm (siehe Abbildung 13) dar. Dieses besteht aus zwei Modulen. Das System umfasst ein Produktionsmodul mit einem Volumen von 40 ml und ein Versorgungsmodul mit einem Fassungsvermögen von 550 ml. Zweiteres besteht aus Polycarbonat und ist autoklavierbar. Das Produktionsmodul ist vom Versorgungsmodul durch eine Dialysemembran mit einer Ausschlußgröße von 12,5 kDa getrennt. Damit wird ein Übertreten der 146 kDa großen IgG-Moleküle in das Versorgungsmodul verhindert. Die semipermeable Membran verhindert eine Diffusion sowohl der IgG-Moleküle als auch anderer makromolekularer Zellprodukte und der Zellen. Nur die notwendige Diffusion von Nährstoffen wie Aminosäuren, Glukose und Vitaminen ist gewährleistet. Wichtige Komponenten wie Gase (z.B. O<sub>2</sub>) und Ionen können ungehindert passieren. Gleichzeitig kommt es auch zu einer Abgabe von toxischen und sauren Stoffwechselendprodukten der Zellen, die vom Medium neutralisiert werden (Greiner Bio-One GmbH, 2005). Den Angaben des Herstellers Greiner Bio-One GmbH entsprechend wurde darauf geachtet, vorgegebene Arbeitsschritte genauestens einzuhalten, um einerseits ein möglichst ertragreiches Zellwachstum zu erreichen, aber auch andererseits keine Verunreinigungen und Kontaminationen mit Bakterien und Pilzen zu riskieren. Dazu zählten vor allem ein sorgfältiges Vorgehen beim Wechseln des Mediums im Versorgungsmodul, bei der Entnahme von Proben aus dem Produktionsmodul, der Einhaltung geeigneter Rotationsgeschwindigkeiten im Brutschrank und der Einhaltung von grundlegenden Regeln sterilen Arbeitens in der Zellkultur. Voraussetzung für den Start einer erfolgreichen Massenproduktion war das Erreichen einer geeigneten Zellzahl in den Zellkulturflaschen von 1 bis 5×10<sup>6</sup> Zellen/ml.

Ablauf am Beginn einer Massenproduktion mit dem Miniperme:

- ✓ Zellen geeigneter Zahl wurden bei 1000 rpm zentrifugiert und in 35 ml Normalmedium resuspendiert.
- ✓ Anschließend erfolgte das Einspritzen der Suspension in das Produktionsmodul des Bioreaktors. Dazu wurde der Bioreaktor so auf einen geeigneten Ständer gestellt, daß sich einer von insgesamt drei Luer-Lock- Verschlüssen an höchster Stelle befand.
- ✓ Vorsichtig wurde der Verschluß geöffnet und eine Spritze mit der Zellsuspension wurde über einen Schraubverschluß befestigt.
- ✓ Der gesamte Reaktor wurde so gedreht, daß ein weiterer Verschluß höher als die anderen beiden lag. Dieser wurde zum Druckausgleich geöffnet und die Zellsuspension langsam eingespritzt. Es mußte darauf geachtet werden, daß dabei keine Luftblasen entstanden.
- ✓ Die oberste Verschlußkappe wurde wieder angebracht, der Bioreaktor in die Ausgangsposition gedreht, die Spritze abgeschraubt und die Öffnung verschlossen.
- ✓ Anschließend wurde das Versorgungsmodul befüllt, indem es zunächst in eine geeignete Ausgangsposition (mit dem Produktionsmodul nach unten gerichtet) auf dem Ständer gebracht wurde.
- ✓ Der Schraubverschluß wurde entfernt und 350-400 ml Normalmedium konnten eingefüllt werden. Um zu starken Druck auf das Produktionsmodul zu verhindern, wurde dieses mit der flachen Hand vorsichtig gedrückt.
- ✓ Mit einer vom Hersteller empfohlenen Geschwindigkeit von 0,1-40 rpm erfolgte die Bewegung der Module im Brutschrank auf einer geeigneten Drehvorrichtung.

Die Handhabung und Vorgehensweise bei den einzelnen Arbeitsschritten orientierte sich an den Angaben des Herstellers ( Greiner Bio-One GmbH, 2005).

In Abständen von 3-5 Tagen wurde das Medium des Produktionsmoduls gewechselt. Eine leichte Verfärbung in ein gelbliches Pink deutete darauf hin, daß die Pufferkapazität des Mediums überschritten war und ein Austausch unumgänglich wurde. Zellkulturüberstände konnten einerseits zur Kontrolle der Zellzahl und andererseits zur Begutachtung der Qualität der Suspension entnommen werden. Der wesentlichste Aspekt dieser Probenentnahme war aber die Ernte der Zellen mit entsprechenden Antikörperdichten. In einer Zentrifugation (5000 rpm) konnten die Hybridomazellen erfolgreich von den Antikörpern getrennt werden. Die Dauer einer Produktion erstreckte sich über einen Zeitraum von bis zu 5-6 Wochen. Der Ertrag war stark von der jeweiligen Zelllinie abhängig.



**Abb. 13:** Miniperm-Bioreaktor zur Massenproduktion von Antikörpern (Aus: [http://www.greinerbioone.com/de/row/files/84228/075050\\_miniPERM.pdf](http://www.greinerbioone.com/de/row/files/84228/075050_miniPERM.pdf)).

## 2.15 Lyophilisierung

Um eine problemlose Lagerung von aufgereinigten Antikörpern und Antigenen zu gewährleisten, war es nötig, sie einer Lyophilisierung zu unterziehen. Dabei wird bei Unterdruck einer Lösung das Wasser entzogen und die festen Bestandteile bleiben als Pulver zurück. Es handelt sich um eine Sublimation bei Unterdruck in einem dabei entstehenden Vakuum. Da die Proben in gefrorenem Zustand in die vorgekühlte Lyophilisationsanlage gestellt werden und ihnen dabei Flüssigkeit entzogen wird, spricht man auch von einer Gefriertrocknung. Weiters erreicht man bei diesem Verfahren eine Aufkonzentrierung der Probe, die bis zur weiteren Verwendung in festem Aggregat-Zustand neben verschiedenen Salzen der in Lösung vorhandenen Puffer als weißes, trockenes Pulver vorliegt.

Praktischer Ablauf der Lyophilisierung mit der Gefriertrocknungsanlage HESICON von Nunc:

- ✓ Die Probenflüssigkeit wurde bis zu etwa der Hälfte des Fassungsvermögens eines Lyophilisiergläschens gefüllt. Die Lösung mußte also für den eigentlichen Trocknungsvorgang auf mehrere dieser Lyophilisiergläschen verteilt werden, um größere Volumina in einem Schritt lyophilisieren zu können. Ziel dieser nicht vollständigen Befüllung war es, ein Austreten von getrockneten Endprodukten aus dem Lyophilisiergläschen zu verhindern. Dieses wurde zwar mit einem Plastik-

verschluß versehen, der allerdings nur so aufgesteckt wurde, daß am unteren Ende Luftlöcher vorhanden waren, um die Sublimation zu ermöglichen.

- ✓ Anschließend wurden die Lyophilisiergläschen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  ü.N. im Gefrierschrank tiefgefroren.
- ✓ Nun wurden sie auf eine vorgekühlte Halterung gegeben und in das Lyophilisiergerät gestellt. Der obere Verschluß dieser Halterung war so konzipiert, daß eine optimale Abdichtung des Bereichs mit den Proben möglich und somit die Bildung des gewünschten Vakuums möglich wurde.
- ✓ Es wurde nun der entsprechende Unterdruck erzeugt, die Kühlung der Proben konstant fortgesetzt und der Trocknungsvorgang gestartet.
- ✓ Nach Beendigung des Vorgangs, der zumindest ü.N. ablief, konnten die Proben entweder im Gefrierschrank bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert, oder für weitere Verwendungen bereitgestellt werden.

## 2.16 Proteinkonzentration

In der biochemischen Analytik sind exakte Konzentrationsbestimmungen unerlässlich und Voraussetzung für zahlreiche quantitative Aussagen. Zudem lassen sich durch eine korrekte Wahl der entsprechenden Wellenlängen auch grobe, qualitative Aussagen treffen. Auch die Reinheit von Molekülen in Lösung kann mit diesen Meßverfahren bestimmt werden. Das Funktionsprinzip eines sogenannten Spektralphotometers beruht auf der Wechselwirkung von Licht einer bestimmten Wellenlänge mit dem Analyten einer homogenen Lösung. Dieser Analyt wird in eine Küvette pipettiert und absorbiert die auftreffenden Lichtstrahlen einer genau definierten Wellenlänge mehr oder weniger stark und bewirkt dadurch ein spezifisches und den Analyten charakterisierendes Meßsignal. Es wird also die Stärke der Absorption festgestellt. Per Definition dient der Begriff Photometer der Beschreibung eines Geräts, welches das Ausmaß einer Absorption mißt (Schwarz, 1999). Ein Spektralphotometer kennzeichnet somit eine Apparatur, welche das Verhältnis auftreffender Lichtintensität und durchgehender (durch die Probe) Lichtintensität für ein bestimmtes Spektrum beschreibt. Für Messungen im UV-Bereich verwendet man Quarzküvetten, die UV-Strahlen problemlos passieren lassen. Für langwelligere Meßbereiche werden hauptsächlich Glas- oder Plastikkuvetten verwendet (Gassen und Schrimpf, 1999).

Die Absorption wird bei durchsichtigen Lösungen durch das Lambert-Beersche Gesetz nach folgender Gleichung umschrieben (Gassen und Schrimpf, 1999):

$$\ln I_0/I = A = -\epsilon cd$$

Dabei ist:

- $I_0$ =Intensität des einfallenden Lichtstrahls spezifischer Wellenlänge
- $I$ =Intensität des durchlaufenden, gemessenen Lichtstrahls
- $A$ =Absorption
- $\epsilon$ =Molarer Absorptionskoeffizient
- $c$ =Konzentration des Analyten
- $d$ =Länge der Meßstrecke (auch als Schichtdicke bekannt)

Es wird also die Intensität eines auf den Analyten auftreffenden Lichtstrahls mit der Intensität eines hinter dem Analyten detektierten Lichtstrahls verglichen.

In dieser Arbeit war es notwendig, die Konzentration von Proteinmolekülen in verschiedenen Puffern zu messen. Die Probenmessungen erfolgten dabei im UV-Bereich bei 280 nm. Bei dieser Wellenlänge absorbieren bevorzugt aromatische Aminosäuren wie Tyrosin und Tryptophan, was eine spezifische Charakterisierung dieser Makromoleküle möglich macht.

Für die zu messenden IgG-Antikörpermoleküle und Proteine wurde in dieser Arbeit eine Absorption von 1,4 bei einer Schichtdicke von 1 cm und einer Konzentration von 1 mg/ml angenommen (Sheperd und Dean, 2000). Diese Absorption dient standardmäßig als Richtwert für IgG-Moleküle. Allerdings gilt es zu beachten, daß aufgrund verschiedener Tyrosin- und Tryptophangehalte in unterschiedlichen Antikörpern und Proteinen diese Werte variieren und zudem noch Störungen durch DNA-Moleküle, Schwankungen des pH-Werts und unterschiedliche Polaritäten störende Elemente einer exakten Messung sein können (Gassen und Schrimpf, 1999).

Ablauf einer Messung:

- ✓ Zunächst wurde 1 ml einer entsprechenden den Analyt enthaltenden Lösung in eine geeignete Küvette pipettiert.
- ✓ Die zu messenden Proben wurden nach einer entsprechenden Anlaufzeit bis zur Funktionsfähigkeit in das Photometer gestellt, wobei eine Küvette nur das Lösungsmittel enthielt, um einen geeigneten Referenzwert zu erhalten.



- ✓ Das Photometer wurde auf einen Meßbereich bei 280 nm eingestellt und die Messung konnte für jeweils eine Küvette beginnen.
- ✓ Die erhaltenen Werte konnten nun durch einen direkt proportionalen Vergleich im Dreisatz für die Berechnung entsprechender Konzentrationen verwendet werden.

## 2.17 Herstellung des Soja-Extrakts

Ein Rohextrakt eines Sojamehls stellte sowohl die Ausgangsbasis für die Gewinnung reinen Proglycinins in der präparativen Gelelektrophorese, verschiedene SDS-PAGEs zur qualitativen Bewertung von Ergebnissen, als auch für verschiedene Immunoassays dar. Basierend auf einer Publikation aus dem Jahr 1998 (Müller *et al.*, 1998) erfolgte die Extraktion des Sojaproteins mit Hilfe von PBS. Verschiedene Parameter der Extraktion wurden entsprechend den gegebenen Fragestellungen angepaßt, um eine größtmögliche Ausbeute an Sojaprotein zu erhalten. Zur Herstellung des Standard-Proteinextrakts wurde Protein Isolate Standard 0% (w/v) GMO-Mehl verwendet. Dieses Mehl war also frei von gentechnisch verändertem Protein. Im Gegensatz dazu beinhaltet das Protein Isolate Standard 2,5% (w/v) GMO-Mehl gentechnisch verändertes Protein mit einem Anteil von 2,5% (w/v) am Gesamtprotein. Dieses Mehl wurde ausschließlich im Dot-Blot verwendet.

Ablauf einer Proteinextraktion:

- ✓ 0,5 g Protein Isolate Standard 0% w/v GM (besitzt keine gentechnisch modifizierten Proteinanteile) wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt.
- ✓ 15 ml PBS wurden zum Mehl pipettiert.
- ✓ Es folgte eine Lösung des Mehls für eine Minute auf dem Vortexer.
- ✓ Anschließend wurde das Gemisch auf einem Schüttler für 30 min bei RT inkubiert.
- ✓ Es schloß sich eine Zentrifugation für 5 min bei 4000 rpm an.
- ✓ Der Überstand wurde durch vorsichtiges Dekantieren abgeführt und konnte im Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt werden.
- ✓ Der Rückstand wurde verworfen.

Die Herstellung von Protein-Proben (Rohextrakten) zur Feststellung der Kreuzreaktivität erfolgte nach dem gleichen Schema.

## 2.18 Affinitätschromatographie

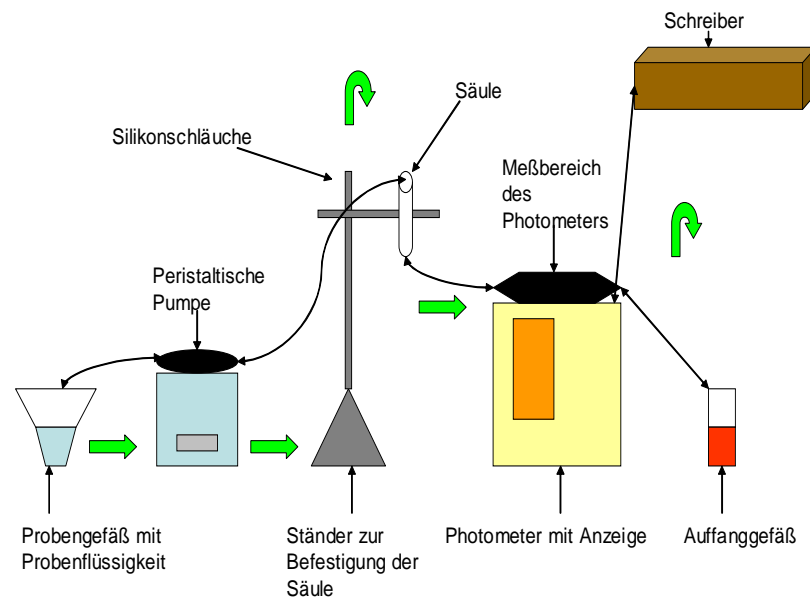
Chromatographische Verfahren stellen eine wesentliche Komponente in der biochemischen Analytik dar. Bei verschiedensten Proteinisolierungen spielen sie eine zentrale Rolle im Trennverfahren. Nicht selten werden unterschiedliche chromatographische Methoden miteinander kombiniert, um ein bestmögliches, analytisches Ergebnis zu erhalten. Die am häufigsten verwendeten Techniken stellen die Gelpermeations-, die Ionenaustauscher-, die hydrophobe und die Affinitätschromatographie dar. Sie können entweder konventionell unter Niederdruck oder Hochdruck (z.B. HPLC) laufen (Gassen und Schrimpf, 1999).

Grundsätzlich dienen chromatographische Techniken der Trennung homogener Gemische oder Lösungen. Dabei geht ein homogenes in ein heterogenes Gemisch über. Eine feste, stationäre Phase adsorbiert verschiedene mobile Phasen mit unterschiedlicher Effektivität. Sie durchfließen die Festphase und es kommt zu einer Retention darin gelöster Stoffe. Neben der beschriebenen Flüssigkeitschromatographie kennt man noch die sogenannte Gaschromatographie. Hierbei wird das zu trennende Gasgemisch mit Hilfe eines Trägergases durch die stationäre Phase geleitet (Mortimer, 1996). In dieser Arbeit wurde hauptsächlich auf affinitätschromatographische Methoden zurückgegriffen.

Bei der Affinitätschromatographie binden Proteine aufgrund von Protein-Ligand-Wechselwirkungen an die stationäre Phase des Systems (Gassen und Schrimpf, 1999). Solche Liganden können z.B. spezifische Proteine oder Antikörper sein, die mit mehr oder weniger großer Affinität Antikörper bzw. Antigene aus einer Lösung adsorbieren können. Man spricht entsprechend der in diesem Fall beteiligten Molekülwechselwirkungen von einer Immunitätschromatographie. Häufig verwendete Liganden zur Antikörperaufreinigung sind sowohl Protein A als auch Protein G. Protein G ist ein Zellwandprotein von Bakterien der Gattung *Streptococcus*. Protein A seinerseits ist ein Zellwandprotein von *Staphylococcus aureus*. Das in dieser Arbeit verwendete Protein A wird rekombinant in *Escherichia coli* produziert und ist ein nicht glykosiliertes Molekül. Es bindet die konstanten Fc-Regionen von Antikörpern verschiedener Säugetiere der Klasse IgG und einige Antikörper der Klasse IgM und IgA. In dieser Arbeit wurde Protein A zur Aufreinigung monoklonaler Antikörper der Zelllinie G17E verwendet. Das Affinitätschromatographie-Medium ProSep-rA High Capacity Medium von Millipore diente als stationäre Phase für die Aufreinigung. Desweiteren wurde anschließend der gereingte, monoklonale Antikörper kovalent an NHS-aktivierte Sepharose gekoppelt, um spezifisch das Antigen Proglycinin zu gewinnen. Proteine und Peptide können

über ihre primären Aminogruppen an die mit NHS veresterten Carboxylgruppen der Matrix binden.

In Abbildung 14 werden die für die Affinitätschromatographie verwendeten Geräte schematisch dargestellt.



**Abb. 14:** Darstellung der benötigten Geräte und der funktionellen Ablaufrichtung (grüne Pfeile) bei einer Affinitätschromatographie.

Ablauf der Affinitätschromatographie mit Prosep-rA High Capacity Medium:

- ✓ Zunächst wurden 2 ml Prosep-rA High Capacity Medium in eine entsprechende Chromatographiesäule von Neolab gegossen. Entsprechend den Angaben im Handbuch von Millipore wurde das Medium in kleinen Schritten in die Säule pipettiert. Dabei mußte darauf geachtet werden, daß sich keine Luftblasen bildeten. Ein leichtes händisches Klopfen an die Säulenwand bewirkte einen Austritt der Blasen aus dem Medium. Um einen Durchfluß des Puffers im Medium zu gewährleisten, wurde der untere Verschuß der Säule geöffnet. Ein Trockenlaufen der Säule sollte dabei aber auf jeden Fall vermieden werden.
- ✓ Sobald sich die festen Bestandteile des Mediums in der Säule verdichtet hatten, wurde die Vorrichtung am unteren und oberen Ende verschlossen und bei 4°C über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Ein leichter Pufferüberstand verhinderte ein Austrocknen.
- ✓ Der aufzureinigende Zellkulturüberstand wurde vor der Reinigung bei 5000 U/min 10 min bei RT zentrifugiert.
- ✓ Anschließend mußte der Überstand mit einem 0,2 µm Sterilfilter filtriert und der Niederschlag verworfen werden.

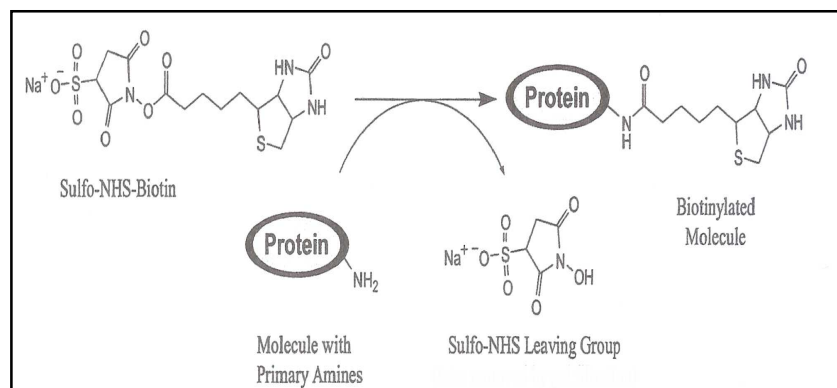
- ✓ Der pH-Wert wurde mit 2 oder 5 M Natronlauge auf 8-8,5 eingestellt, wobei ein Farbumschlag in einen violetten Ton zu beobachten war (diente als Marker für den Durchlauf des Überstands), und die Antikörperlösung bis zur Aufreinigung in den Kühlschrank gestellt. Es wurde allerdings darauf geachtet, möglichst bald die Aufreinigung zu starten, um die Qualität der Antikörpermoleküle nicht negativ zu beeinflussen.
- ✓ Die Säule wurde mit Boratpuffer (5-10faches Säulenvolumen) äquilibriert. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug anfangs 5 ml/min und wurde nach finaler Etablierung des Vorgangs auf 1 ml/min eingestellt. Zur qualitativen Kontrolle der Eluate wurde der Schreiber auf eine Aufzeichnungsgeschwindigkeit von 6 cm/h und eine Sensitivität von 100 mV eingestellt.
- ✓ Nachdem der Boratpuffer einige Zeit durch die Säule gelaufen war, stellte sich auf dem Schreiber eine konstant verlaufende Kurve ein, die als Basislinie für die Aufreinigung diente.
- ✓ Nun konnte der Zellkulturüberstand über die Säule laufen. Ein möglicher Durchbruch des Antikörpers sollte dabei natürlich verhindert werden. Eine geeignete Durchlaufgeschwindigkeit von 0,75 ml/min gewährleistete dies im Zusammenspiel mit dem geeigneten pH-Wert jedoch reibungslos.
- ✓ Nach erfolgtem Durchlauf konnte ein 10faches Säulenvolumen an Boratpuffer wieder eine Rückkehr zu den Basisbedingungen gewährleisten. Das Verschwinden des Phenolrots (aus dem Zellkulturmedium) sorgte dabei auch für eine rein optische Kontrollmöglichkeit des Ablaufs.
- ✓ Der gebundene Antikörper wurde mit Citratpuffer eluiert.
- ✓ Das Eluat konnte entweder in einem Volumen, oder mit einem Fraktionskollektor getrennt, aufgefangen werden. Zweitere Möglichkeit dient allerdings mehr der Trennung unterschiedlicher Moleküle und hätte in diesem Fall nur zum Sammeln verschieden hoch konzentrierter Eluate dienen können und wurde deshalb auch nur während der Etablierungsphase verwendet.
- ✓ Mit einer 2 M Tris-Lösung wurde der pH-Wert des Eluats auf 7-7,5 eingestellt. Die eluierte Fraktion wurde bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.
- ✓ Nach der Elution wurde die Säule erneut mit einem 10fachen Säulenvolumen an Boratpuffer äquilibriert und bei 4°C bis zum nächsten Gebrauch aufbewahrt. Optional wurde sie zuerst mit HCl (pH 1,5) und dann mit PBS gespült und anschließend in

0,002% (v/v)  $\text{NaN}_3$  (in PBS) aufbewahrt. Mit dieser zusätzlichen Reinigung sollte eine Kontamination mit Pilzen und Bakterien vermieden werden.

## 2.19 Antikörper-Biotinylierung

Mit Hilfe des EZ-Link-Sulfo-NHS-Biotinylation-Kits von Pierce wurde der gewonnene Antikörper G17E biotinyliert. Biotin ist ein Vitamin, das eine hohe Affinität zu den Proteinen Avidin und Streptavidin aufweist. Es besitzt nur eine Größe von 244 Da und kann deshalb leicht an Proteine gebunden werden. Die biologische Aktivität der Proteine wird dabei kaum beeinflusst. N-Hydroxysuccinimid (NHS)-aktivierte Biotinmoleküle reagieren mit primären Aminogruppen in Puffern mit einem pH, der sich in einer Spanne von 7-9 befinden sollte. Funktionelle Lysin-Gruppen spielen neben dem N-Terminus des Proteins die Hauptrolle bei der Reaktion mit den Biotinmolekülen (Pierce, 2006).

Avidin seinerseits besitzt vier Bindungsstellen für Biotin. Diesen Umstand verdankt es der Tatsache, daß es als Tetramer vorkommt, was bedeutet, daß pro Untereinheit genau eine Bindungsmöglichkeit für Biotin besteht. In Immunoassays spielt diese Bindung, wie bereits bei der allgemeinen Beschreibung der ELISA-Technik erwähnt, eine entscheidende Rolle.



**Abb. 15:** Schematischer Ablauf der Biotinylierung eines Proteins (Aus: <http://www.pierce.net.com/files/1775as4.pdf>).

Ablauf der Biotinylierung:

- ✓ Es wurde zunächst die Menge an Sulfo-NHS-Biotin-Lösung zur Biotinylierung des Antikörpers nach den Instruktionen eines Protokolls des Herstellers (Pierce, 2006) berechnet. Die Menge des zu biotinylierenden Antikörpers wurde in mg, das Volumen der Antikörperlösung in ml und das Molgewicht des Antikörpers (150.000 mg/ mmol) mit der hier angeführten Gleichung berechnet:

$$V(\text{Antikörper})[\text{ml}] \times c(\text{Antikörper}) \frac{[\text{mg}]}{[\text{ml}]} \div M(\text{Antikörper}) \frac{[\text{mg}]}{[\text{mmol}]} \times \frac{20\text{mmol}(\text{Biotin})}{n(\text{Antikörper})[\text{mmol}]} = n(\text{Biotin})[\text{mmol}]$$

Daraus ergibt sich rechnerisch:

$$V(\text{Antikörper})[\text{ml}] \times \frac{m(\text{Antikörper})[\text{mg}]}{V(\text{Antikörper})[\text{ml}]} \times \frac{n(\text{Antikörper})[\text{mmol}]}{m(\text{Antikörper})[\text{mg}]} \times \frac{20\text{mmol}(\text{Biotin})}{n(\text{Antikörper})[\text{mmol}]} = n(\text{Biotin})[\text{mmol}]$$

Unter Einbezug der molaren Masse von Biotin erhält man die Formel:

$$n(\text{Biotin})[\text{mmol}] \times \frac{443\text{mg}}{\text{mmol}} \times \frac{500\mu\text{l}}{2,2\text{mg}} = V(\text{Sulfo - NHS - Biotin - Lösung})[\mu\text{l}]$$

Ablauf der eigentlichen Biotinylierung (Pierce, 2006):

- ✓ Zunächst wurde das Sulfo-NHS-Biotin auf RT äquilibriert.
- ✓ 10 mg/ml des lyophilisierten Antikörpers wurden in 1 x PBS-Puffer gelöst.
- ✓ Direkt vor dem Gebrauch mußte eine 10 mM Sulfo-NHS-Biotin-Lösung hergestellt werden. Dabei wurden 2,2 mg Sulfo-NHS-Biotin in 500 µl destilliertem Wasser gelöst.
- ✓ Das errechnete Volumen an Sulfo-NHS-Biotin-Lösung wurde zur Antikörperlösung gegeben und das Gemisch 2 h auf Eis inkubiert.
- ✓ Von einer „Zebra™ Desalt Spin Column“ wurde der Verschluss abgebrochen und die Säule in einem 15 ml-Röhrchen bei 2500 rpm für 2 min abzentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen.
- ✓ Auf die Säule wurden 2,5 mL 1 x PBS-Puffer pipettiert und bei 2500 rpm für 2 min abzentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen.
- ✓ Dieser Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt.
- ✓ Die biotinylierte Antikörper-Lösung wurde auf die so gewaschene Säule gegeben. Die Lösung sollte hierbei in das Säulenmaterial eindringen. Danach wurde die Säule bei 2500 rpm für 2 min abzentrifugiert und der den biotinylierten Antikörper enthaltende Durchlauf aufbewahrt.

## 2.20 Herstellung einer Immunaффinitätschromatographiesäule

Zur Herstellung einer Immunaффinitätschromatographiesäule wurde ein aufgereinigter, monoklonaler Antikörper mit konstanter Geschwindigkeit über das gewaschene Säulenmaterial gepumpt. Anschließend konnte der gekoppelte Antikörper dann für die Aufreinigung des Progycinin-Standards zur Etablierung einer Kalibrationskurve (siehe Kapitel 3.11) verwendet werden.

#### Ablauf der Antikörperkopplung:

- ✓ Zunächst wurde das NHS-aktivierte Sepharose-Säulenmaterial (5 ml) durch eine Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min grob vom Isopropanol, in dem es gelöst war, befreit und der Rückstand zur weiteren Bearbeitung verwendet.
- ✓ Das Rückstand wurde in 5 ml 1mM Salzsäure resuspendiert und erneut für 5 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt viermal durchgeführt.
- ✓ Nun erfolgte eine viermalige Waschung des Materials mit Carbonatpuffer (pH 7,0). Die Parameter wie das Volumen und die Zentrifugationsbedingungen waren die selben wie im ersten Waschzyklus. Der pH-Wert des Puffers wurde auf pH 7 eingestellt, um ein Hydrolisieren der veresterten Gruppen zu verhindern.
- ✓ Das Säulenmaterial wurde anschließend in Carbonatpuffer aufgenommen und in die entsprechenden Säulen gegossen. Dieses Beladen der Säule funktionierte nach den gleichen Kriterien und Bedingungen, die für die Herstellung der Prosep-rA High Capacity-Säulen gegolten hatten.
- ✓ Für den eigentlichen Kopplungsvorgang wurde die Säule auf Eis gestellt, was eine verlängerte Kopplungszeit ermöglichte.
- ✓ Unter Druck wurde das Säulenmaterial nun in einem kontinuierlichen Pufferstrom (Carbonatpuffer, pH 7) verdichtet. Die Laufgeschwindigkeit betrug dabei 1 ml/min.
- ✓ Die Basislinie wurde festgesetzt, nachdem ein konstanter Verlauf der Kurve auf dem Schreiber erreicht war.
- ✓ Die Antikörperlösung mit einer Maximalkonzentration von 1 mg/ml wurde direkt auf die Säule pipettiert, indem der Pufferstrom kurz unterbrochen wurde und der aufgereinigte und lyophilisierte Antikörper, der zuvor in einem Carbonat- oder PBS-Puffer bei pH 7-7,5 gelöst worden war, vorsichtig an den Rand der Säule aufgetragen wurde, damit er, ohne die Konsistenz der beladenen Säule zu zerstören, an der Plastikhülle abrinnen konnte.
- ✓ Die Laufgeschwindigkeit dieser Lösung betrug 0,125 ml/min.
- ✓ Der Durchlauf wurde sofort wieder über die Säule gepumpt. Damit dieser Vorgang ohne Probleme und möglichst zügig ablaufen konnte, mußte zuvor ein geschlossener Kreislauf über verschiedene Schläuche hergestellt werden. Gleichzeitig sollte allerdings auch darauf geachtet werden, daß die Weg des Pufferstroms möglichst kurz gehalten wurden, um die Beladungszeit nicht unnötig in die Länge zu ziehen und damit das Ergebnis zu verschlechtern.
- ✓ Insgesamt dauerte die Beladung 30 min.

- ✓ Die Säule konnte ü.N. bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt werden.
- ✓ Alle Gruppen an der Säule, die nicht eine Bindung mit dem Antikörper eingegangen waren, mußten noch abgesättigt werden, um später bei der Antigenaufreinigung unspezifische Bindungen zu verhindern. Dazu wurde die Säule je dreimal für 10 min mit Boratpuffer (pH 8,5) und Citratpuffer (pH 3,0) bei einer Pumpgeschwindigkeit von 1 ml/min gewaschen.
- ✓ Anschließend wurde die Säule erneut mit einem Carbonatpuffer (pH 7) äquilibriert.
- ✓ In diesem Zustand konnte die Säule sowohl bei 4 °C gelagert, oder auch direkt im Anschluß zur Antigenaufreinigung verwendet werden. Auch hierfür wurden die Säulenapparatur sowie die verwendeten Puffer und Lösungen auf Eis gekühlt.

## 2.21 Aufreinigung des Proglycinin-Standards

- ✓ Zunächst wurde die Säule mit Carbonatpuffer (pH 7) zur Einstellung der Basislinie der Absorption am Schreiber äquilibriert.
- ✓ Ein Soja-Extrakt mit einer Konzentration von 0,5 g/ml wurde mit einem 0,8 µm Sterilfilter von evtl. vorhandenen größeren Partikeln und Pilzspuren befreit.
- ✓ Anschließend konnte das Soja-Extrakt bei einer Laufgeschwindigkeit von 0,125 ml/min über die Säule gepumpt werden. Da es sich herausstellte, daß ein einmaliger Lauf zu ungenügenden Ergebnissen führte, wurde diese Prozedur zumindest einmal wiederholt. Die Ausbeute an gebundenem Standard konnte dadurch entscheidend erhöht werden.
- ✓ Anschließend mußte die Säule mit Carbonatpuffer (pH 7) erneut gewaschen werden, bis die Absorption der Basiseinstellung wieder erreicht war, das nicht gebundene Protein des Soja-Extrakts also vollständig ausgewaschen war. Die Laufgeschwindigkeit dieses Vorgang belief sich auf 1,0 ml/min.
- ✓ Mit einem Citratpuffer (pH 7) wurden Verunreinigungen durch nicht spezifisch an den Antikörper gebundene Proteine ausgewaschen, ohne gleichzeitig Proglycininmoleküle mitzureißen. Die Laufgeschwindigkeit betrug 1 ml/min.
- ✓ Nun konnte das spezifisch gebundene Proglycinin bei einer Laufgeschwindigkeit von 1 ml/min mit einem Citratpuffer (pH 3) eluiert werden. In einem ersten Ansatz stellte sich heraus, daß ein zehnminütiger Lauf unzureichend war. Deshalb wurde die zeitliche Spanne und somit das durchgepumpte Säulenvolumen deutlich erhöht. Eine stärkere Belastung des Antikörpers bei diesem niederen pH-Wert konnte dabei



allerdings nicht verhindert werden. Trotzdem war die Säule für mehrere Läufe funktionsfähig.

- ✓ Das Eluat wurde mit 2- und 5 M Natronlauge auf einen pH-Wert von 7-7,5 eingestellt.
- ✓ Im Photometer erfolgte anschließend eine quantitative Bestimmung des gewonnenen Proglycinins.
- ✓ Für weitere Verwendungen wurde der Proglycinin-Standard zunächst tiefgefroren, dann lyophilisiert und anschließend wiederum bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.
- ✓ Die Säule wurde mit Carbonatpuffer (pH 7) äquilibriert und bei 4°C bis zum nächsten Gebrauch im Kühlschrank gelagert.

## 2.22 Bradford-Assay

Der Bradford-Assay ist eine Färbemethode zur Quantifizierung von Proteinen und wurde von Bradford (Bradford, 1976) entwickelt. Mit Hilfe des Farbstoffs Coomassie Brilliantblau G250 kann dabei eine quantitativ unterschiedliche Anfärbung von Proteinen erzielt werden, die anschließend im Photometer gemessen wird. Coomassie Brilliantblau G250 hat normalerweise bei einer Wellenlänge von 470 nm im Photometer sein Absorptionsmaximum. Bindet der Farbstoff allerdings an Aminosäuren eines Proteins, verschiebt sich das Absorptionsmaximum auf 595 nm. Besonders die Aminosäure Arginin stellt einen spezifischen Bindungspartner für Coomassie Brilliantblau G250 dar. Daneben kommen aber durchaus auch Bindungen zu Tyrosin, Tryptophan, Histidin und Phenylalanin vor. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 1-20 µg/ml ([http://www.-class.unl.edu/biochem/protein\\_assay.htm](http://www.-class.unl.edu/biochem/protein_assay.htm)). Im Test werden die Ergebnisse der Bindung von Coomassie Brilliantblau G250 an BSA in einer Verdünnungsreihe als Referenz verwendet und die resultierenden Absorptionen für die Verdünnungsreihe einer spezifischen Probe damit verglichen.

Praktischer Ablauf des Bradford-Assays:

- ✓ Zunächst wurde eine BSA-Stammlösung (1mg/ml in PBS) hergestellt.
- ✓ Eine 1:10 Verdünnungsreihe für insgesamt acht Verdünnungen sowohl für die BSA-Stammlösung als auch für die eigentlichen Proben (ebenfalls in PBS) mußte angesetzt werden.
- ✓ 200 µl/Kavität der BSA-Verdünnungen und Proben sollte anschließend auf eine Mikrotiterplatte pipettiert werden.

- ✓ Unmittelbar darauf folgte das Auftragen von 200 µl Bradfordlösung. Die Inkubation erfolgte für 2 min bei Raumtemperatur.
- ✓ Eine abschließende Messung im Photometer bei  $\lambda=595$  nm schloß den Test ab.

## 2.23 Immunoassays

Grundsätzlich werden all jene Techniken, bei denen eine Wechselwirkung eines Antikörper mit einem Analyten stattfindet, immunochemische Methoden genannt. Eine herausragende Rolle in der immunochemischen Analytik spielt dabei der ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Die spezifische Quantifizierung und der eigentliche Nachweis eines Analyten erfolgt bei solchen Immunoassays über verschiedene Enzyme. Dazu zählen hauptsächlich Enzyme wie Meerrettichperoxidase (POD), alkalische Phosphatase und  $\beta$ -Galaktosidase. Über geeignete Substrat- Chromogengemische erfolgt eine Farbreaktion, die dann im Spektralphotometer bei einer geeigneten Wellenlänge ein quantitatives Meßsignal ergibt. Neben diesen Möglichkeiten des Nachweises wird in Immunoassays vor allem auch auf Markierungen mit Radioisotopen, fluoreszenzaktiven und chemilumineszenten Reagenzien gesetzt (Schwarz, 1999).

Es werden grundsätzlich kompetitive und nicht kompetitive Immunoassays unterschieden. Diese können auf homogenen oder heterogenen Phasenverhältnissen beruhen. Weiters finden auch sogenannte Sandwich-ELISAs breite Anwendung. Charakterisierende Größen für Immunoassays sind vor allem das Detektionslimit, welches die Mindestmenge nachweisbarer Analyten darstellt. Die Sensitivität ist ein Maß für die Änderung des Signals im Verhältnis zur Analytkonzentration. Die Selektivität stellt eine Verbindung des gemessenen Signals bei einem spezifischen Analytnachweis und der Negativkontrolle her (Tijssen, 1985).

Nicht kompetitive, heterogene Immunoassays stellen eine der beliebtesten Varianten dar. Dabei wird das zu detektierende Antigen an eine Festphase gebunden und direkt mit einem markierten Primärantikörper oder indirekt mit einem markierten Sekundärantikörper nachgewiesen. Beim nicht kompetitiven, homogenen ELISA kommt es zu keiner Phasentrennung. Zwei unterschiedlich markierte Antikörper, die unterschiedliche Epitope eines Antigens erkennen, kommen in homogener Lösung mit dem Analyten in Kontakt. Das Enzym des ersten Antikörpers stellt dabei das Substrat für das Enzym des zweiten Antikörpers dar. Ein entsprechendes Meßsignal ist hierbei nur dann möglich, wenn beide Antikörper an das Antigen binden und sich ihre Markierungen möglichst nahe kommen. Bei ungenügender Annäherung der Enzyme wird bloß ein schwaches, bei ausbleibender Bindung

an das Antigen kein Signal generiert. Als Enzyme für diese Variante finden z.B. Glucose-Oxidase und Peroxidase Verwendung. Beim kompetitiven, homogenen ELISA wird ein Tracer (z. B. ein markiertes Hapten) eingesetzt, der mit dem eigentlichen Analyten um die begrenzte Anzahl an freien Bindungsstellen des Antikörpers konkurriert. Bei steigenden Analytkonzentrationen ist eine verminderte Bindung des Tracers an den Antikörper festzustellen. Bei der Bindung des Tracers an den Antikörper kommt es zu einer sterischen Hinderung des Substrates (Tijssen, 1985).

Der kompetitive, heterogene ELISA zeichnet sich durch ein Immobilisieren eines Antikörpers bzw. eines Antigens an einer Festphase aus. Ein Antikörper wird an einer Festphase immobilisiert. Die Bindung des Antikörpers mit einem enzymmarkierten Antigen wird durch freies Antigen inhibiert. Es kommt also zu einer Konkurrenzsituation zwischen den beiden Antigen-Typen um die begrenzt vorhandenen Bindungsmöglichkeiten am Antikörper. Die begrenzte Antikörperzahl bedingt eine Absenkung der Enzymaktivität. Es wird ein zur Konzentration des freien Antigens indirekt proportionales Signal generiert. In einem anderen Ansatz kann das Antigen an der Festphase immobilisiert werden und der Antikörper wird mit einem Enzym markiert. Zusammen mit dem Antikörper zugegebenes, freies Antigen konkurriert bei diesem Ansatz mit dem an die Festphase gebundenen Antigen um die begrenzten Bindungsstellen des Antikörpers.

Der sogenannte Sandwich-ELISA stellt eine weitere Möglichkeit bei der Detektion eines bestimmten Antigens dar. Das zu bindende Antigen bindet dabei an einen immobilisierten Antikörper und durch einen markierten Sekundärantikörper kann dann ein erfolgreicher Nachweis erfolgen. Allerdings ist bei einem indirekten Ansatz zu beachten, daß der Sekundärantikörper anderer Herkunft als der immobilisierte Antikörper ist. Dadurch soll verhindert werden, daß es zu ungewünschten Interaktionen zwischen diesen Molekülen kommt und damit das Meßergebnis verfälscht wird (Tijssen, 1985).

Eine Besonderheit stellt der Einsatz von Vermittlersystemen, wie dem Streptavidin-Biotin-System (zeichnet sich durch eine hohe Affinität aus) zur Erhöhung der Sensitivität dar. Durch Biotinylierung z.B. eines Antikörpers, der an ein bestimmtes Antigen bindet, kann eine Signalgenerierung durch die Anbindung eines markierten Streptavidins erreicht werden. In dieser Arbeit wurde an Stelle des Streptavidins Neutravidin verwendet, das eine deglykosilierte Form von Avidin darstellt.

Um unspezifische Bindungen von sekundären und weiteren Reaktanden an die Festphase des Immunoassays zu verhindern, werden jene Bindungsstellen, die nicht durch den

immobilisierten Reaktanden besetzt sind, durch eine Inkubation mit z.B. BSA, MMP und Tween blockiert.

Als eine wesentliche Voraussetzung für erfolgreiche Tests mit der ELISA-Technik gilt die Wahl einer geeigneten Festphase (meistens eine Mikrotiterplatte). Zahlreiche Anbieter stellen verschiedenste Kunststoffplatten her, die sich durch unterschiedliche Oberflächeneigenschaften wie z.B. unterschiedliche hydrophil-polare und hydrophob-apolare Charakteristika auszeichnen.

In dieser Arbeit kamen nicht kompetitive, heterogene Immunoassays sowie Sandwich-ELISAs (direkter und indirekter Natur) zum Einsatz.

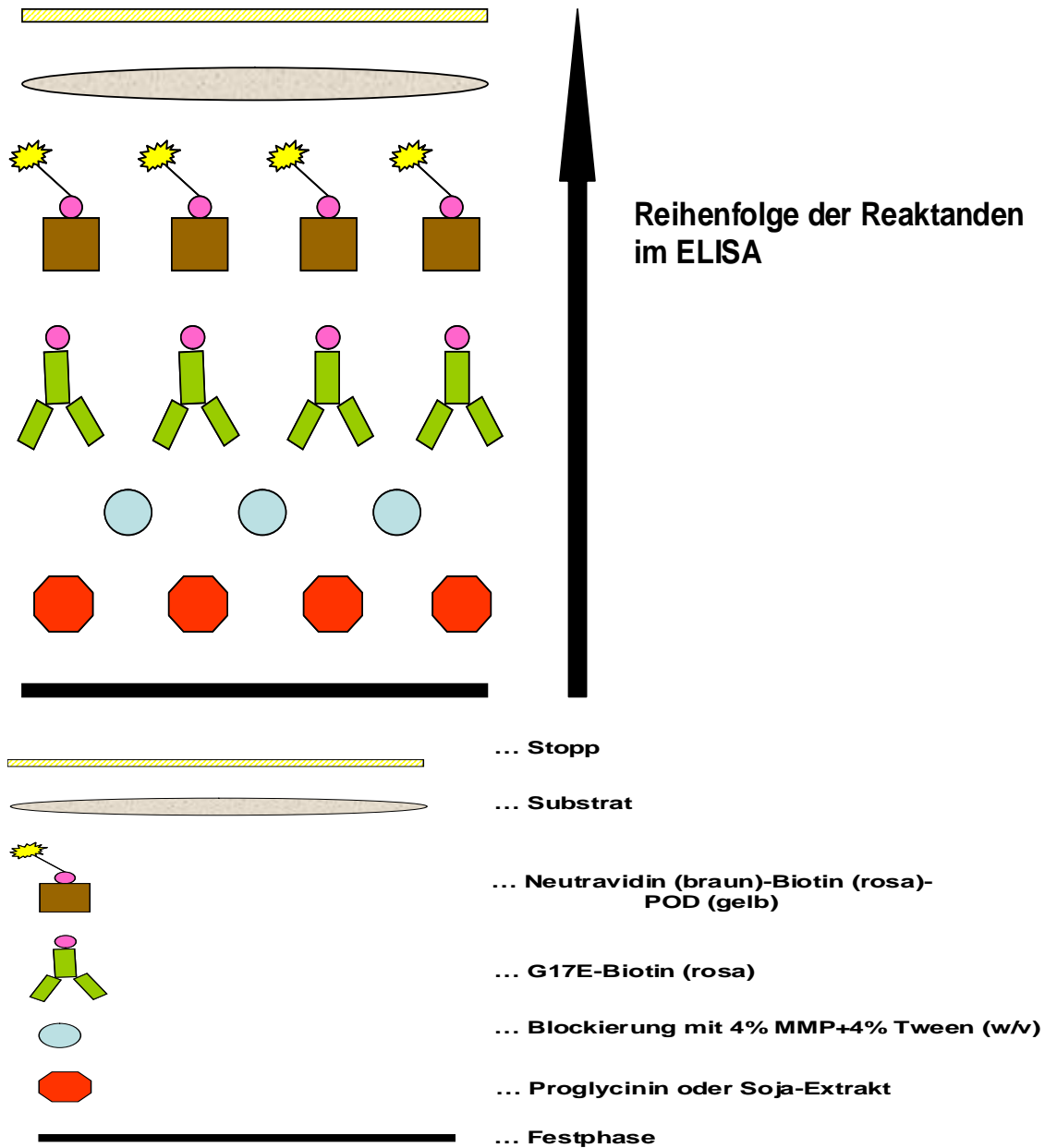
a) Verlauf des nicht kompetitiven, heterogenen ELISAs als Positivkontrolle für verschiedene Zelllinien der Zellkultur auf Soja-Extrakt:

- ✓ Coaten: 100 µL einer 1:10-Verdünnungsreihe Soja-Extrakt in Carbonatpuffer (pH 9,6, 50 mM), ü.N., 4°C
- ✓ Waschen: 3×300 µl Waschpuffer
- ✓ Blockierung: 300 µl 4% (w/v) MMP + 4 % Tween (w/v) in PBS, 120 min, RT
- ✓ Waschen: 3×300 µl Waschpuffer
- ✓ 1. Immunreaktion: 100 µl Antikörper-Zellkulturüberstand (1:2 in PBS), 60 min, RT
- ✓ Waschen: 3×300 µl PBS-Waschpuffer
- ✓ 2. Immunreaktion: 100 µl Ziege-Anti-Maus-IgG-POD (1: 10000 in PBS), 60 min, RT
- ✓ Waschen: 3×300 µl Waschpuffer
- ✓ 100 µl Substratlösung, 5 min, RT
- ✓ 25 µl Stopp-Lösung
- ✓ Messung: Photometer  $\lambda=450$  nm

b) Verlauf des nicht kompetitiven, heterogenen ELISAs für aufgereinigtes Proglicinin und Rohextrakt aus Soja (siehe Abbildung 16):

- ✓ Coaten: 100 µl einer 1:10-Verdünnungsreihe aufgereinigtes Proglicinin (1000 µg/L; 6 Verdünnungsschritte) oder 1:10-Verdünnungsreihe Soja-Extrakt (12 Verdünnungsschritte) in Carbonatpuffer (pH 9,6, 50 mM), ü.N., 4°C
- ✓ Waschen: 3×300 µl Waschpuffer
- ✓ Blockierung: 300 µl 4% (w/v) MMP + 4% Tween (w/v) in PBS, 120 min, RT
- ✓ Waschen: 3×300 µl Waschpuffer
- ✓ Immunreaktion: 100 µl biotinylierter G17E-Antikörper (10 µg/ml), 60 min, RT

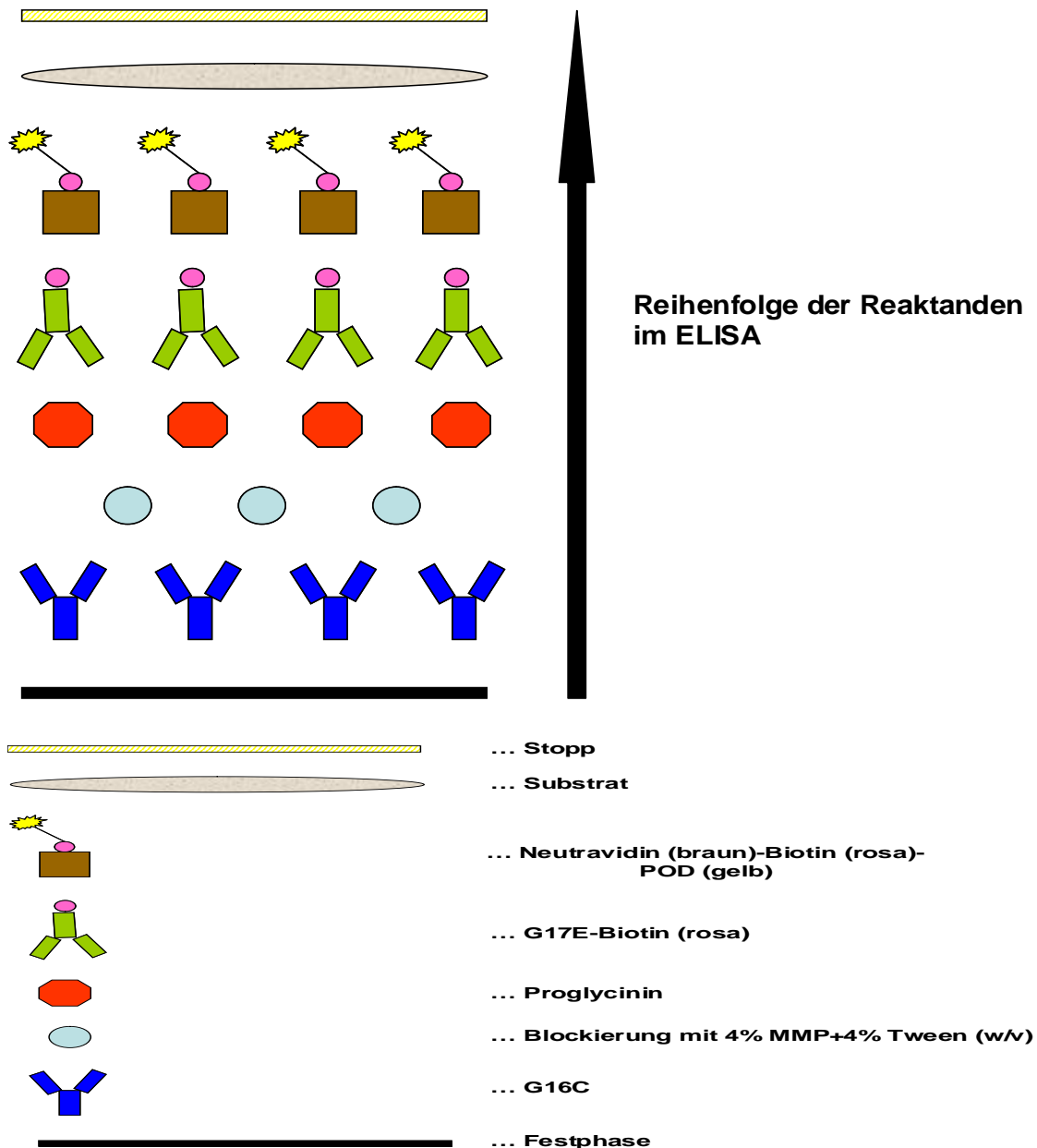
- ✓ Waschen: 3×300 µl PBS-Waschpuffer
- ✓ 100 µl Neutravidin-Biotin-POD-Lösung, 60 min, RT
- ✓ Waschen: 3×300 µl PBS-Waschpuffer
- ✓ 100 µl Substratlösung, 5 min, RT
- ✓ 25 µl Stopp-Lösung
- ✓ Messung: Photometer  $\lambda=450$  nm



**Abb. 16:** Schematischer Verlauf des nicht kompetitiven, heterogenen ELISAs für gereinigtes Progylcinin und Rohextrakt aus Soja.

c) Verlauf des Sandwich-ELISA (siehe Abbildung 17):

- ✓ Coaten: 100  $\mu$ L einer 1:10-Verdünnungsreihe G16C- oder 39.1-Antikörper (50  $\mu$ g/ml; 6 Wiederholungen) in Carbonatpuffer (pH 9,6, 50 mM), ü.N., 4°C
- ✓ Waschen: 3×300  $\mu$ l Waschpuffer
- ✓ Blockierung: 300  $\mu$ l 4% MMP (w/v) + 4% Tween (v/v) in PBS, 120 min, RT
- ✓ Waschen: 3×300  $\mu$ l Waschpuffer
- ✓ 100  $\mu$ L einer 1:10-Verdünnungsreihe Soja-Extrakt (6 Verdünnungsschritte) in PBS, 120 min, RT
- ✓ Waschen: 3×300  $\mu$ l PBS-Waschpuffer
- ✓ Immunreaktion: 100  $\mu$ l biotinylierter G17E-Antikörper (10  $\mu$ g/ml), 60 min, RT
- ✓ Waschen: 3×300  $\mu$ l PBS-Waschpuffer
- ✓ 100  $\mu$ l Neutravidin-Biotin-POD-Lösung, 60 min, RT
- ✓ Waschen: 3×300  $\mu$ l PBS-Waschpuffer
- ✓ 100  $\mu$ l Substratlösung, 5 min, RT
- ✓ 25  $\mu$ l Stopp-Lösung
- ✓ Messung: Photometer  $\lambda=450$  nm



**Abb. 17:** Schematischer Ablauf des Sandwich-ELISAs.

## 2.24 Auswertung der Immunoassays

Die Assays zeigten in dieser Arbeit einen reaktionsabhängigen Verlauf. Zur Erstellung der Standardkurven wurden die Konzentrationswerte logarithmiert und auf der X-Achse aufgetragen. Die y-Werte umfaßten die Absorptionswerte der verschieden konzentrierten Proben. Das Ergebnis war immer eine Kurve mit einem sigmoiden Verlauf. Diese so erhaltenen Kurven enthielten absolute Meßwerte. Zu Vergleichszwecken und auch um Schwankungen verschiedenster Parameter (z.B. Temperatur) zu standardisieren, wurden die

Kurven nach dem 4-Parameter-logistischen Modell (Rodbard und Hutt, 1974; Dudley et al., 1985) normiert. Es sollen %B/B<sub>0</sub>-Werte erhalten werden, die Absorptionen der jeweiligen Proben im Verhältnis zu den Nullwerten beschreiben. Dies erfolgte durch eine Transformation der erhaltenen Daten mit folgender Formel:

$$\%B/B_0 = (A-A_0)/(A_{\max}-A_0)*100$$

Dabei ist:

- A=Absorption der Probe
- A<sub>0</sub>=Absorption ohne Probe
- A<sub>max</sub>=Absorption bei maximaler Probenmenge

Die %B/B<sub>0</sub>-Werte sind prozentuale Angaben und befinden sich dementsprechend in einem Bereich von 0 bis 100%. Der Bereich von 20-80% ist der eigentliche Meßbereich, wobei bei 20 % (IC<sub>20</sub>) die untere und bei 80% (IC<sub>80</sub>) die obere Nachweisgrenze liegt. Bei 50% (IC<sub>50</sub>) befindet sich der Testmittelpunkt, wo die genaueste Messung möglich ist.

Pro Probe wurden bei den verschiedenen Testsystemen jeweils drei Wiederholungen auf einer Mikrotiterplatte zur Bestimmung des Mittelwertes eines jeweiligen Meßpunkts herangezogen (Giersch, 1993b). Die statistische Signifikanz wurde mit den sich allgemein eingebürgerten Signifikanzniveaus von 5% bzw. auch 0,3% (hochsignifikant) berücksichtigt. Dazu eignete sich ein auch auf dem Statistikprogramm Origin enthaltener t-Test.

## 2.25 Bestimmung der Immunglobulin-Subklassen

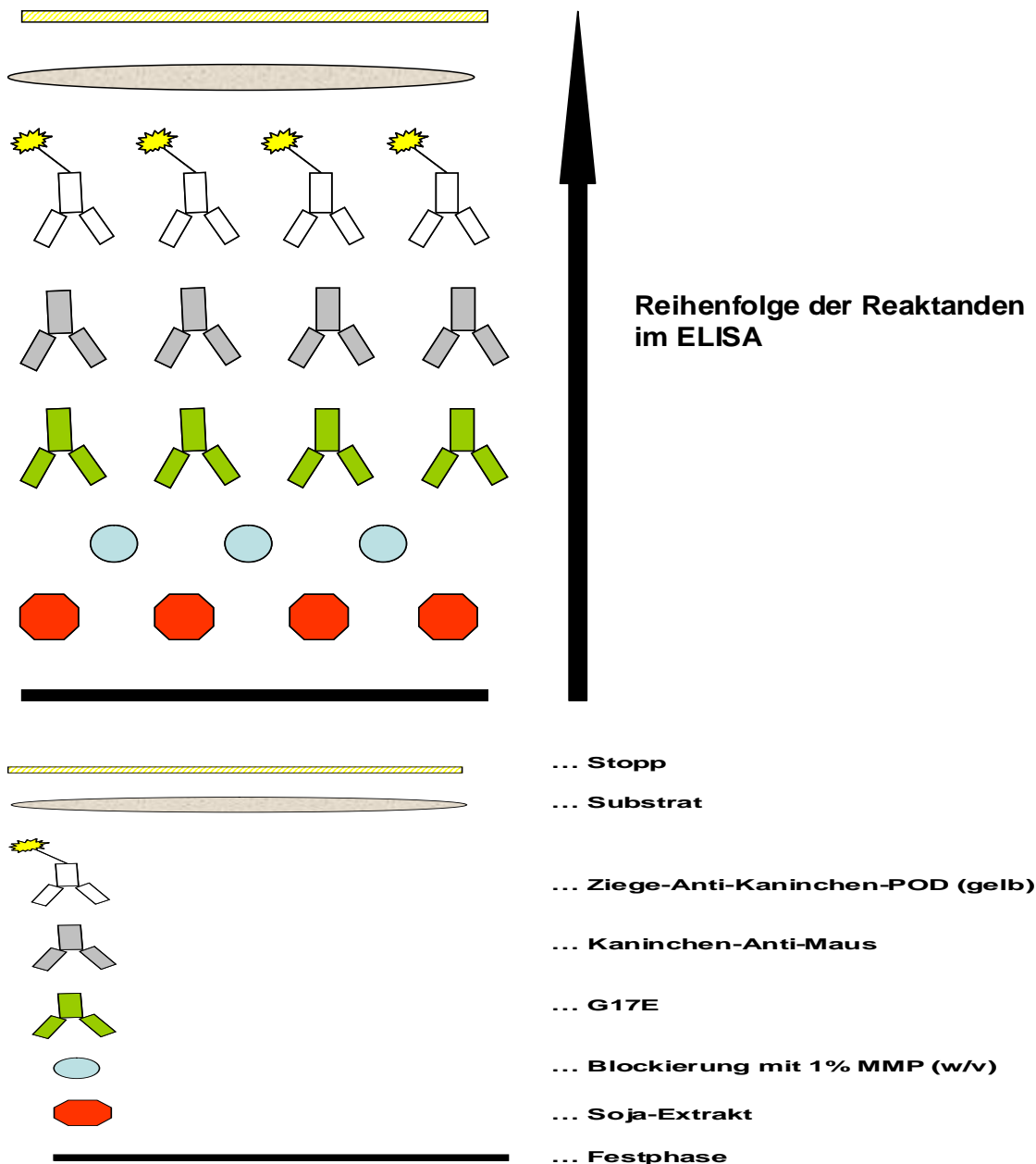
Die Bestimmung der Klasse und Subklasse eines spezifischen Immunglobulins stellt einen wichtigen Parameter bei der Charakterisierung eines Antikörpermoleküls dar. Sowohl chemische als auch biologische Eigenschaften der einzelnen Klassen und Subklassen sind verschieden und betreffen Unterschiede in der Löslichkeit und in ihrer Fähigkeit zur intermolekularen Interaktion mit anderen Biomolekülen. Die Reaktivität mit Protein A hatte für affinitätschromatographische Untersuchungen in dieser Dissertationsarbeit eine besondere Bedeutung. Da beim Screening der Zellkulturüberstände ein IgG-spezifischer Sekundärantikörper verwendet wurde, wurde eine gesonderte Bestimmung der Klasse nicht durchgeführt. Die Subklasse und der Leichtkettentyp wurden mit einem Sub-Isotyping Kit von Bio-Rad identifiziert. Dieser enthält ultrareine subklassenspezifische Anti-Seren für das Maus-IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, IgA, die κ- und λ-Kette.



Ablauf der Subklassenbestimmung (gemäß den Vorgaben des Herstellers):

- ✓ Coaten: 100 µL Soja-Extrakt (20 µg/mL Gesamtprotein) in PBS, 60 min, RT
- ✓ Waschen: 3×300 µl Waschpuffer
- ✓ Blockierung: 300 µl 1% Magermilch (w/v) in PBS, 30 min, RT
- ✓ Waschen: 3×300 µl Waschpuffer
- ✓ 1. Immunreaktion: 100 µl Zellkulturüberstand der Zelllinie G17E, 60 min, RT
- ✓ Waschen: 3×300 µl PBS-Waschpuffer
- ✓ 2. Immunreaktion: 100 µL subklassenspezifisches Kaninchen-Anti-Maus (1:3000 in PBS), 60 min, RT Waschen: 3×300 µl PBS-Waschpuffer
- ✓ 3. Immunreaktion: 100 µL Ziege-Anti-Kaninchen-POD (1:3000 in PBS), 60 min, RT
- ✓ Waschen: 3×300 µl PBS-Waschpuffer
- ✓ Enzymreaktion 100 µL Substratlösung, 10 min, RT
- ✓ Abstoppen: 50 µL Stopp-Lösung.
- ✓ Messung: Photometer  $\lambda=415$  nm

Jeweils eine Reihe auf der ELISA-Platte wurde für Nullwerte des Substrats bzw. des Serums verwendet.



**Abb. 18:** Schematischer Ablauf des Assays zu Bestimmung der Subklassen eines Antikörpers.

## 2.26 Kreuzreaktivität

Um genauere Aussagen zur Selektivität eines Antikörpers machen zu können, stellt der Test möglicher kreuzreagierender Substanzen ein Muß dar. Um Kreuzreaktivität handelt es sich im eigentlichen Sinne des Wortes, wenn der zu testende Antikörper entweder strukturell unterschiedliche Epitope bindet, oder wenn gleiche Epitope auf unterschiedlichen Antigenen erkannt werden (Tijssen, 1985). Es werden also unterschiedliche Proben (Protein-Extrakte,

siehe Kapitel 3.12) in einem Immunoassay getestet und die Kreuzreaktivität mit folgender Formel errechnet:

$$\text{KR (\%)} = \frac{[P]}{[kP]}$$

Dabei ist:

- KR (%)=Kreuzreaktivität in Prozent
- [P]=Konzentration der Probe bei  $IC_{50}$
- [kP]=Konzentration der kreuzreagierenden Probe bei  $IC_{50}$

Ablauf eines Immunoassays zur Feststellung der Kreuzreaktivität (Schema des heterogenen, nicht kompetitiven ELISAs zur Etablierung einer Kalibrationskurve, siehe Kapitel 2.23, b):

- ✓ Coaten: 1:10-Verdünnungsreihe des Soja-Extrakts und verschiedener Proteinproben (gleiche Extraktionsmethode, die für das Soja-Extrakt verwendet wurde) in Carbonatpuffer (pH 9,6, 50 mM), ü. N., 4°C
- ✓ Waschen: 3×300 µl Waschpuffer
- ✓ Blockierung: 300 µl 4% MMP + 4% Tween (w/v) in PBS, 120 min, RT
- ✓ Waschen: 3×300 µl Waschpuffer
- ✓ Immunreaktion: 100 µl biotinylierter G17E-Antikörper (10 µg/ml), 60 min, RT
- ✓ Waschen: 3×300 µl PBS-Waschpuffer
- ✓ 100 µl Neutravidin-Biotin-Lösung, 60 min, RT
- ✓ Waschen: 3×300 µl PBS-Waschpuffer
- ✓ 100 µl Substratlösung, 5 min, RT
- ✓ 25 µl Stopp-Lösung
- ✓ Messung: Photometer  $\lambda=450$  nm

## 2.27 Epitopmapping

Zur weiteren Charakterisierung des gewonnenen monoklonalen Antikörpers G17E wurde auf ein sogenanntes Epitopmapping zurückgegriffen. Aufbauend auf der These, daß ein monoklonaler Antikörper nur ein bestimmtes Epitop spezifisch erkennt, kann diese Methode dazu verwendet werden, selektiv nach der Spezifität eines Antikörpers zu suchen. Da solche Antikörper zum Teil nur wenige Aminosäuren lange Epitope erkennen, kann es vorkommen, daß Antigene ähnlicher Konformation oder solche, bei denen die Epitopsequenz für ähnliche Funktionen des exprimierten Epitops steht, vom Antikörper kreuzreaktiv gebunden werden.

Ablauf des ELISAs (ähnliches Schema wie beim bereits beschriebenen Sandwich-ELISA in Kapitel 2.23, c):

- ✓ Coaten: 200 µl Ziege-Anti-Maus-IgG (5µg/ml in PBS), ü. N., 4°C
- ✓ Waschen: 3×300 µl Waschpuffer
- ✓ Blockierung: 300 µl 4% (w/v) MMP + 4% Tween (w/v) in PBS, 120 min, RT
- ✓ Waschen: 3×300 µl Waschpuffer
- ✓ Immunreaktion: 200 µl biotinylierter G17E-Antikörper (0,1 µg/ml in PBS), 60 min, RT
- ✓ Waschen: 3×300 µl PBS-Waschpuffer
- ✓ 200 µl jeweils Epitop A1 (10 µg/ml), Epitop B1 (10 µg/ml), Epitop 3 (10 µg/ml), Leerwert (PBS), 60 min, RT
- ✓ 200 µL Neutravidin-Biotin-POD-Lösung, 60 min, RT
- ✓ Waschen: 3×300 µl PBS-Waschpuffer
- ✓ 200 µL Substratlösung, 5 min, RT
- ✓ 50 µL Stopp-Lösung
- ✓ Messung: Photometer  $\lambda=450$  nm

## 3 Ergebnisse

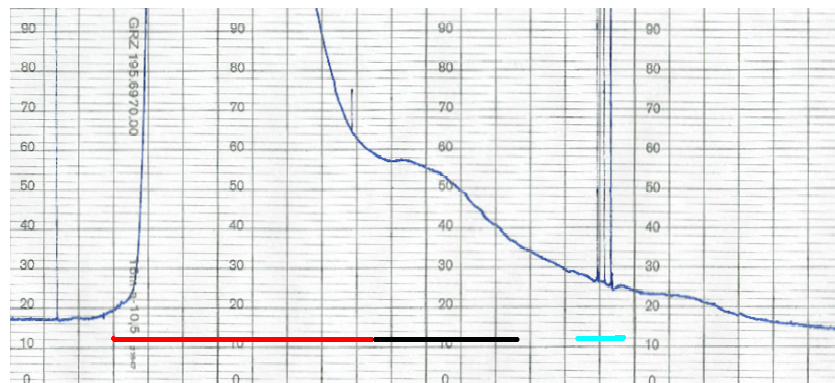
Im Ergebnisteil meiner Arbeit soll der chronologische Ablauf zur Gewinnung eines monoklonalen Antikörpers gegen ein allergenes Epitop von Proglycinin aufgezeigt werden. Einer der zentralen Punkte zur Generierung entsprechender Resultate war zunächst die Antigenaufreinigung. Das Screening der von verschiedenen Zelllinien produzierten Antikörper im Western-Blot ermöglichte eine spezifische Charakterisierung und Selektion derselben. Die Etablierung einer Kalibrationskurve mit einem ausgewählten monoklonalen Antikörper stellte eine unumgängliche Voraussetzung sowohl für den quantitativen Nachweis von aufgereinigtem Proglycinin als auch von in Soja-Extrakt enthaltenem Proglycinin dar. Die Selektivität bezüglich eines allergenen Epitops und der Nachweis möglicher Kreuzreaktivität mit verschiedenen Protein-Extrakten waren wichtige Parameter für eine aussagekräftigere Charakterisierung des ausgewählten Antikörpers.

Des Weiteren soll im Ergebnisteil auch gezeigt werden, daß verschiedene experimentelle Strategien (siehe Entwicklung geeigneter ELISA-Formate) verfolgt wurden, um zu bestmöglichen Ergebnissen zu gelangen.

### 3.1 Antigenaufreinigung

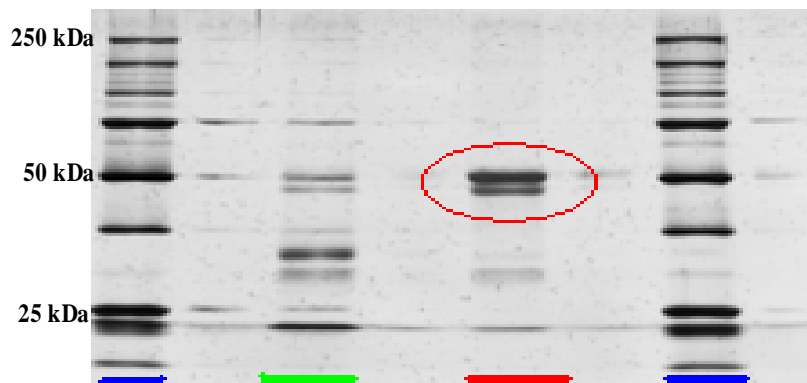
Die Antigenaufreinigung erstreckte sich über mehrere Arbeitsschritte und startete mit der Herstellung des Soja-Extrakts. Die Gewinnung der Soja-Proteine beruhte auf einer PBS-Extraktion (siehe Kapitel 2.17). Das Ausgangsmaterial war ein entfettetes und von gentechnischen Veränderungen freies Standard-Sojamehl (Protein Isolate Standard 0%). Dieses Extrakt wurde nun für einen weiteren Aufreinigungsschritt in der präparativen Gelelektrophorese (siehe Abbildung 9) verwendet. Der Verlauf einer typischen Aufreinigung des Soja-Extrakts über die präparative SDS-PAGE ist in Abbildung 19 dokumentiert. Das Ergebnis daraus konnte in einer SDS-PAGE qualitativ erfaßt werden. Zwei Banden (siehe Abbildung 20) konnten in einem nicht reduzierenden Probenpuffer mit Hilfe der Coomassie-Färbung sichtbar gemacht werden. Sie lagen beide im Bereich von 50 kDa. Da sie sehr eng beieinander lagen, eine Trennung mit den verwendeten Apparaturen somit nicht möglich war und zusätzliche Aufreinigungsschritte zeitlich zu aufwendig gewesen wären, erschien es sinnvoll, bei ausreichend vorhandenen Mengen mit beiden Proteinen zu immunisieren. Anschließend wurden mit den in der Zellkultur gewonnenen Antikörpern, weitere

Selektionsschritte unternommen. Eine qualitative Bewertung der Proteine mußte allerdings zuvor noch mit einer MALDI-TOF-Untersuchung unternommen werden.



**Abb. 19:** Verlauf einer typischen Proteinaufreinigung mit der präparativen Gelelektrophorese . Dabei symbolisiert:

- Die rote Linie den Verlauf des Markers.
- Die schwarze Linie den Bereich der Antigenbanden.
- Die cyan–blaue Linie eine durch Luftblasen verursachte Störung.



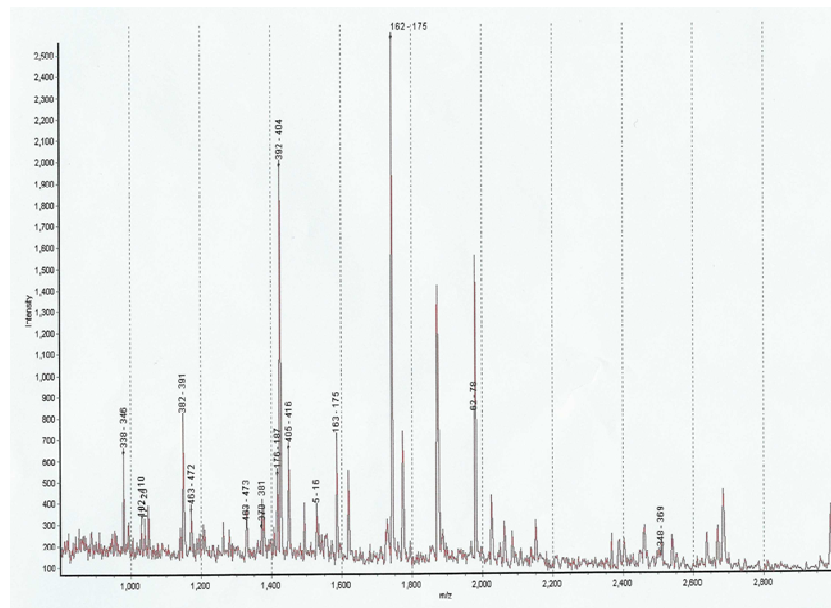
**Abb. 20:** Darstellung der erhaltenen Produkte aus der präparativen Gelelektrophorese in einer SDS-PAGE (Silberfärbung).

- Dabei symbolisieren die blauen Linien den Proteinstandard.
- Die grüne Linie eine Probe in reduzierendem Probenpuffer.
- Die rote Linie die Probe in nicht reduzierendem Probenpuffer. Die beiden erhaltenen Banden sind zusätzlich rot gekennzeichnet.

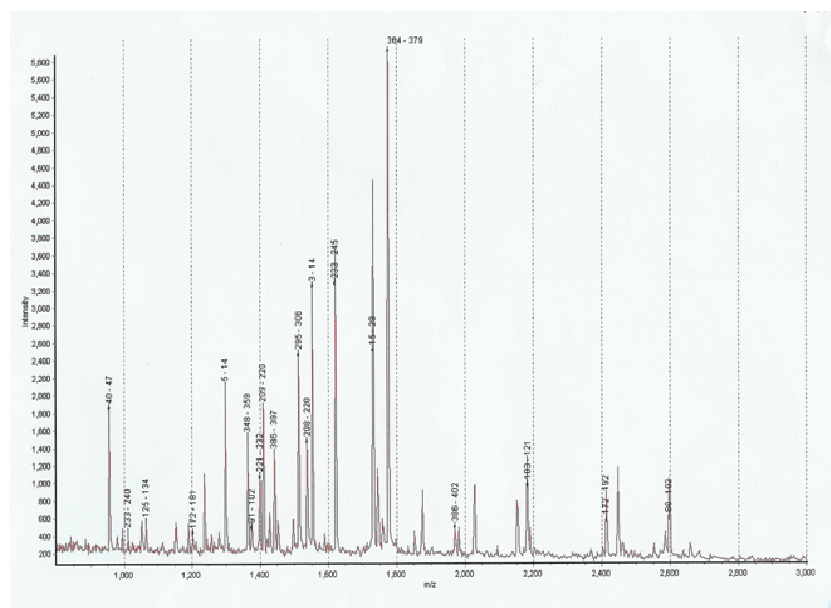
### 3.2 MALDI-TOF

Die MALDI-TOF-Untersuchung wurde in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Proteomik der TU München ausgeführt. Aus einem SDS-Gel wurde jeweils eine der beiden Banden vorsichtig mit einem Skalpell ausgeschnitten, mit etwas Wasser in ein Eppendorf-

Reaktionsgefäß gegeben und dem Institut zur eigentlichen massenspektroskopischen Begutachtung übergeben. Es konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß es sich bei der oberen Bande um das gesuchte, homotrimere Protein Proglycinin [mit der Untereinheit A1aB1b sowie einem Molekulargewicht von 53,61 kDa (ohne die abgespaltenen Signalpeptide)] und bei der unteren Bande um  $\beta$ -Conglycinin (47,89 kDa) handelte (siehe Abbildung 20).



**Abb. 21:** Darstellung der massenspektroskopischen Untersuchung der oberen Bande (siehe Abbildung 20, rot gekennzeichnete Spur), die dem Molekül Proglycinin entspricht.



**Abb. 22:** Darstellung der massenspektroskopischen Untersuchung der unteren Bande (siehe Abbildung 20, rot gekennzeichnete Spur), die dem Molekül  $\beta$ -Conglycinin entspricht.

### 3.3 Produktion von Hybridomazellen und Screening verschiedener Zelllinien im ELISA

Mit diesen beiden Proteinen wurden zwei CD-1-Mäuse (Ursprung: Swiss Mäuse) immunisiert (siehe Kapitel 2.8). Die aus der Milz der Mäuse extrahierten B-Lymphozyten konnten für die Fusion mit Myelomzellen zu Hybridomen verwendet werden (siehe Kapitel 2.10). In einem nicht kompetitiven, heterogenen ELISA-Format sollte eine Vorauswahl von Antikörper produzierenden Hybridomen vorgenommen werden, die eine Selektivität für das Soja-Extrakt aufwiesen (siehe Kapitel 2.23, a und 3.3).

Zunächst mußte sichergestellt werden, daß die von den Hybridomen gebildeten Antikörper verschiedener Kavitäten der drei ausgesäten Zellkulturplatten auch tatsächlich positiv auf eines der beiden Sojaproteine reagierten. Dazu wurde ein bereits beschriebenes, nicht kompetitives, heterogenes ELISA-Testformat verwendet (siehe 2.23, a). Die einzelnen Ergebnisse werden hier nicht einzeln angeführt, da sie in den Western-Blots Berücksichtigung finden, bzw. genauer definiert werden.

Insgesamt läßt sich sagen, daß 30 Zelllinien identifiziert wurden, die eine Selektivität für das Soja-Extrakt aufwiesen. Ob eine Affinität zu Proglycinin oder zu  $\beta$ -Conglycinin bestand, galt es in einem Screening im Western-Blot nachzuweisen (siehe Kapitel 2.4 und 3.5).

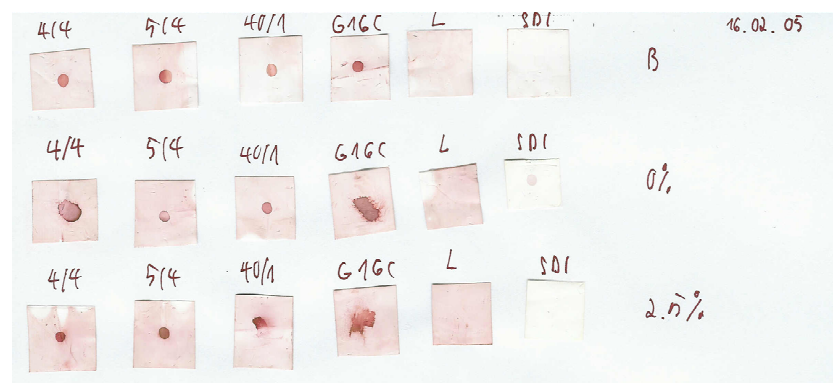
### 3.4 Screening verschiedener Zelllinien im Dot-Blot

In einem Dot-Blot konnten anschließend an die Screeningversuche mit den Zellkulturüberständen Positivklone zusätzlich auf ihre Selektivität überprüft werden. Dieser Test konnte allerdings keine spezifische Interaktion mit einem der beiden Proteine bestätigen. Er war vielmehr dazu gedacht, unnötige, sehr viel aufwendigere Western-Blots bei entsprechenden Negativergebnissen oder schwachen Farbsignalen auf der Membran, zeitsparend zu verhindern. In einem Standardverfahren wurden verschiedene Klone mit den in der präparativen Gelelektrophorese aufgereinigten Proteinbanden, einem 0%-Soja-Extrakt und einem 2,5%-Soja-Extrakt in Kontakt gebracht. Eine Protein-Probe wurde auf eine Membran aufgetragen. Nach einem Trocknungsvorgang erfolgte anschließend die immunchemische Charakterisierung mit verschiedenen Antikörper-Zellkulturüberständen als Primär- und einem zweiten Antikörper (Ziege-Anti-Maus-IgG-POD) als Sekundärantikörper (siehe Kapitel 2.5). Zur Kontrolle wurden auch ein Primär- und Sekundärkonjugat von SDI verwendet. Die Bezeichnung SDI (siehe Abbildung 23) umschreibt die Anwendung des GMO-spezifischen



Antikörpers (Primärkonjugat) zur Detektion von CP4EPSPS, einem gentechnisch in die Pflanze eingeführten Protein, das eine Resistenz gegen das Herbizid Glyphosat ermöglicht. Dieser Antikörper war Teil eines Kits der Firma SDI (Strategic Diagnostics Inc.) Die verschiedenen Bezeichnungen wie 4/4, 5/4... benennen die entsprechenden Klone aus der Zellkultur.

Die beiden Soja-Extrakte dienten als Positiv-Kontrollen. Bei der Negativ-Kontrolle (Leerwert) wurde der Coatingschritt mit reinem PBS vollzogen.



**Abb. 23:** Verschiedene, exemplarische Klone in Wechselwirkung mit drei verschiedenen Antigenen, die alle die entsprechenden Proteine Proglycinin und  $\beta$ -Conglycinin enthielten. Dabei entspricht:

B ... aufgereinigtes Protein-Extrakt (beide Banden)

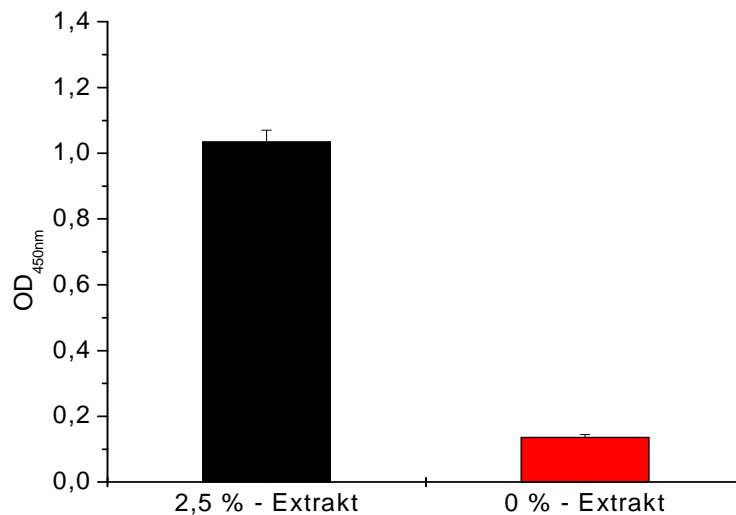
0% ... 0% - Soja-Extrakt

2,5% ... 2,5%-Soja-Extrakt

L ... Leerwert

Eine schwache Färbung beim 0%-Soja-Extrakt und keine Anfärbung beim 2,5%-Soja-Extrakt, die mit dem GMO-spezifischen SDI-Antikörper behandelt wurden, stellt ein Beispiel für eine unspezifische Bindung beim 0%-Soja-Extrakt dar, da es sich bei dem von der Firma SDI verwendeten Antikörper um einen CP4EPSPS-spezifischen Antikörper handeln sollte. Die nicht geglückte Bindung des CP4EPSPS-spezifischen Antikörpers an das 2,5%-Soja-Extrakt könnte auf verschiedene Gründe zurückzuführen sein. Sehr wahrscheinlich ist eine Inkubation des Membranstücks in einem falschen Reagenz. Unter Anwendung des nicht kompetitiven, heterogenen ELISA-Protokolls (siehe Kapitel 2.23, b) sollte das theoretisch zu erwartende Ergebnis (Bindung des CP4EPSPS-Antikörpers an das 2,5%-Extrakt und keine Bindung an das 0%-Extrakt) bestätigt werden. Dazu wurde allerdings auf eine 1:10-Verdünnungsreihe für das Soja-Extrakt verzichtet und nur eine 1:1000-Verdünnung verwendet. Für die erste und zweite Immunreaktion wurde das CP4EPSPS-spezifische Primär- und ein zusätzliches

Sekundärkonjugat von SDI herangezogen. Es konnte gezeigt werden, daß sich nun die erwarteten Ergebnisse einstellen (siehe Abbildung 24). Die Verwendung des SDI-Antikörpers in diesem Dot-Blot-Format erbrachte nicht die gewünschten Ergebnisse. Mit den verschiedenen Zellkulturüberständen konnte allerdings bestätigt werden, daß eine genauere Charakterisierung aller Zelllinien im Western-Blot durchgeführt werden sollte.



**Abb. 24:** Vergleich der Absorptionen im ELISA eines 2,5%-Extrakts mit einem 0%-Extrakt nach Inkubation mit einem SDI-Primär- und Sekundärkonjugat.

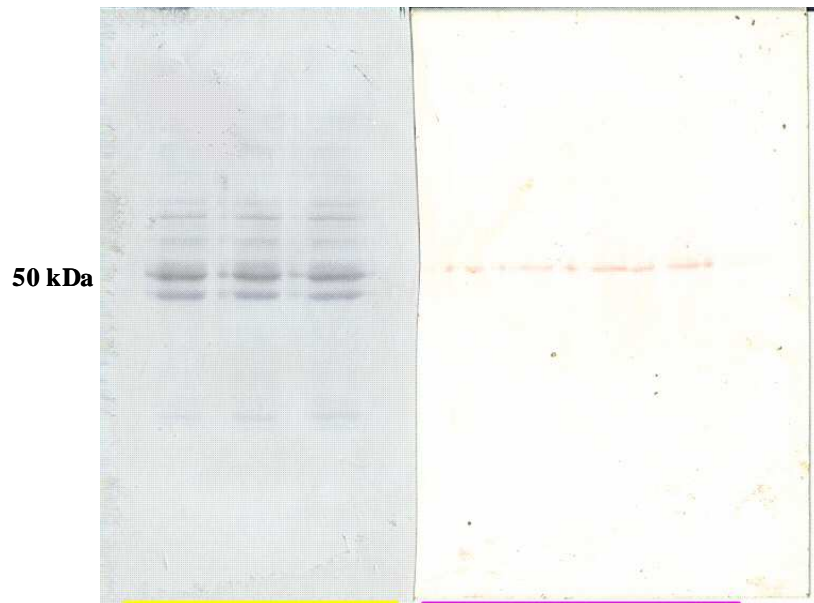
### 3.5 Screening verschiedener Zelllinien im Western-Blot

Die Western-Blots dienen zur genaueren spezifischen Charakterisierung ausgewählter Zelllinien. Mit ihnen sollte die Spezifität der Antikörper für eine der aufgereinigten Proteinbanden in den Zellkulturüberständen untersucht werden. Zunächst mußte allerdings ein Referenzantikörper gesucht werden. Der Klon G17E stellte sich als besonders geeignet heraus. Eine höhere OD (bei 450 nm) im Zellkultur-Screening im nicht kompetitiven, heterogenen ELISA (siehe Kapitel 2.23, a) machten ihn zu einer probaten Referenz. Das Auffinden weiterer Proglycinin-spezifischer Antikörper war allerdings aus vor allem zwei Gründen interessant. Einerseits war es damit möglich, auf ein Repertoire von Antikörpern zurückzugreifen, die möglicherweise verschiedene Epitope von Proglycinin erkennen und damit für die Etablierung eines Sandwich-ELISA-Protokolls herangezogen werden konnten. Andererseits sollten Antikörper identifiziert werden, deren Selektivität für  $\beta$ -Conglycinin in zukünftigen Arbeiten Möglichkeiten der Anwendung gewährleisten werden.

Ablauf des Referenz-Western-Blots (siehe Abbildung 25) [grobes Schema des Ablaufs wurde bereits in den Kapiteln SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.3) und Western-Blot (siehe Kapitel 2.4) erwähnt]:

- ✓ Ein 0%-Soja-Extrakt (1 : 1000 in PBS) wurde in einer SDS-PAGE auf insgesamt sechs Spuren aufgetrennt (10%iges Trenngel) und in einem Semidry-Verfahren geblottet.
- ✓ Die Membran wurde in der Mitte durchgeschnitten (3 Proteinspuren jeweils).
- ✓ Anschließend erfolgte für eine Hälfte (drei Spalten) der Blottingmembran die Immunreaktion mit einer 1:1000-Verdünnung (in PBS) des Antikörper-Zellkulturüberstandes G17E für 60 min bei RT. Die andere Hälfte wurde in einer India-Ink-Färbelösung entwickelt.
- ✓ Es schlossen sich drei Waschschrte zu je 3 min in einfach konzentriertem PBS-Waschpuffer an.
- ✓ Anschließend wurde die Membran in eine 1:10000-Verdünnung (in PBS) des Sekundärantikörpers (Ziege-anti-Maus-IgG-POD) gelegt. Bei leichtem Schütteln erfolgte eine Inkubation für 60 min bei RT.
- ✓ Drei letzte Waschschrte in einfach konzentriertem PBS-Waschpuffer für je 3 min folgten.
- ✓ 30 ml des Membransubstrats wurden für 90 min unter leichtem Schütteln für die Farbreaktion verwendet.
- ✓ Die Membran wurde anschließend getrocknet.

Die India-Ink-Färbung ermöglichte eine Visualisierung aller aus der SDS-PAGE transferierten Proteine. In der anderen Hälfte wurde nur das Antigen Proglycinin vom Antikörper G17E spezifisch markiert. Durch das exakte Zusammenlegen der zuvor getrennten Hälften konnte eine Linie von der immunologisch angefärbten Proteinbande zur Bande gleicher Molekülmasse und gleicher horizontaler Lage der India-Ink-gefärbten Membran gezogen werden. Eine eindeutige Zuordnung zur oberen Bande der Proteinaufreinigung und somit zu Proglycinin war damit möglich (vgl. Abbildung 25).



**Abb. 25:** Darstellung der Etablierung eines Referenz-Western-Blots mit dem Antikörper G17E.

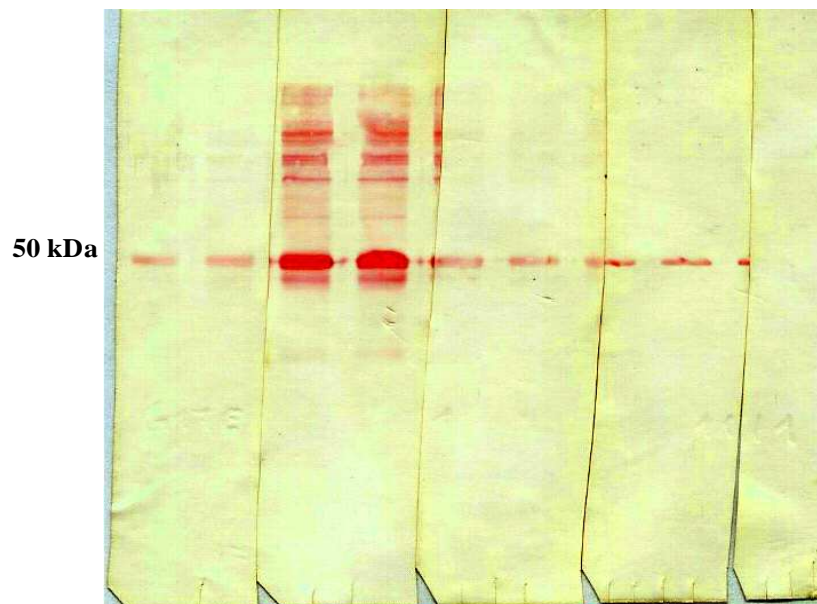
- Die gelbe Linie symbolisiert dabei die India-Ink-angefärbte linke Hälfte der Membran.
- Die violette Linie die mit dem Antikörper G17E inkubierte rechte Hälfte der Membran.

Ablauf des Western-Blots zum Auffinden möglicher, alternativer Antikörper zu G17E [grobtes Schema des Ablaufs bereits in den Kapiteln zur SDS-Page (siehe Kapitel 2.3) und zum Western-Blot (siehe Kapitel 2.4) erwähnt]:

- ✓ Ein 0%-Soja-Extrakt (1 : 1000 in PBS) wurde in einer SDS-PAGE auf insgesamt zehn Spuren aufgetrennt (10%iges Trenngel) und in einem Semidry-Verfahren geblottet.
- ✓ Die Membranen wurden in jeweils drei Teile geschnitten. Der erste Teil umfasste dabei zwei Proteinspalten, der zweite und dritte jeweils drei.
- ✓ Anschließend erfolgte für den ersten Teil (zwei Spuren) der Blottingmembran die Immunreaktion mit einer 1:1000 Verdünnung (in PBS) des Antikörper-Zellkulturüberstandes G17E für 60 min bei RT. Der zweite Teil wurde weiters halbiert und jede Hälfte mit einem Zellkulturüberstand einer zu testenden Zelllinie in verschiedenen Verdünnungen 60 min bei RT inkubiert (1:100 und 1:1000 in PBS). Auf gleiche Weise wurde mit dem dritten Teil der Blottingmembran mit dem Zellkulturüberstand einer anderen Zelllinie verfahren.
- ✓ Es schlossen sich drei Waschschrte zu je 3 min in einfach konzentriertem PBS-Waschpuffer an.

- ✓ Anschließend wurden die Membranteile in eine 1:10000 Verdünnung (in PBS) des Sekundärantikörpers (Ziege-anti-Maus-IgG-POD) gelegt. Bei leichtem Schütteln erfolgte eine Inkubation für 60 min bei RT.
- ✓ Drei letzte Waschrinne in einfach konzentriertem PBS-Waschpuffer für je 3 min folgten.
- ✓ 30 ml des Membransubstrats wurden für 90 min unter leichtem Schütteln für die Farbreaktion verwendet.
- ✓ Die Membran wurde anschließend getrocknet.

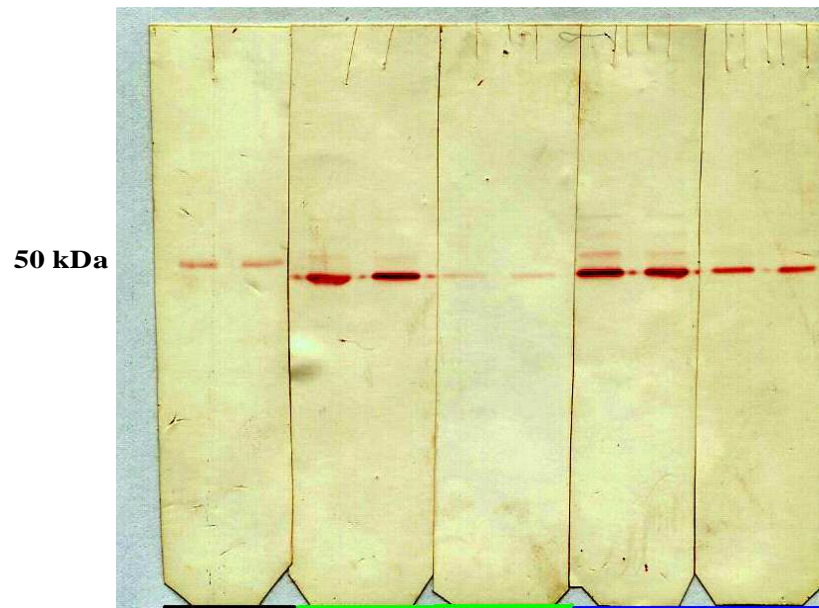
Bei der Suche nach alternativen Antikörpern zu G17E konnten auch solche gefunden werden, die eine Selektivität für  $\beta$ -Conglycinin aufwiesen. In den folgenden vier Abbildungen (siehe Abbildungen 26, 27, 28, 29) soll exemplarisch für ausgewählte Klone das Ergebnis eines solchen Screenings im Western-Blot gezeigt werden. In jeder Abbildung wird mit einer schwarzen Linie eine 1:1000-Verdünnung (in PBS) des Antikörpers G17E als Referenz angezeigt. Die grüne und blaue Linie bezeichnen jeweils zwei Verdünnungen (1:100 und 1:1000 in PBS) eines Zellkulturüberstandes. Eine Spur beinhaltet also eine Verdünnung eines Zellkulturüberstandes (siehe Ablauf des Western-Blots zum Auffinden möglicher, alternativer Antikörper zu G17E in Kapitel 3.5)



**Abb. 26:** Darstellung eines Screenings mit den Zellkulturüberständen zweier Zelllinien im Western-Blot. Beide Zelllinien bilden Proglycinin-spezifische Antikörper.

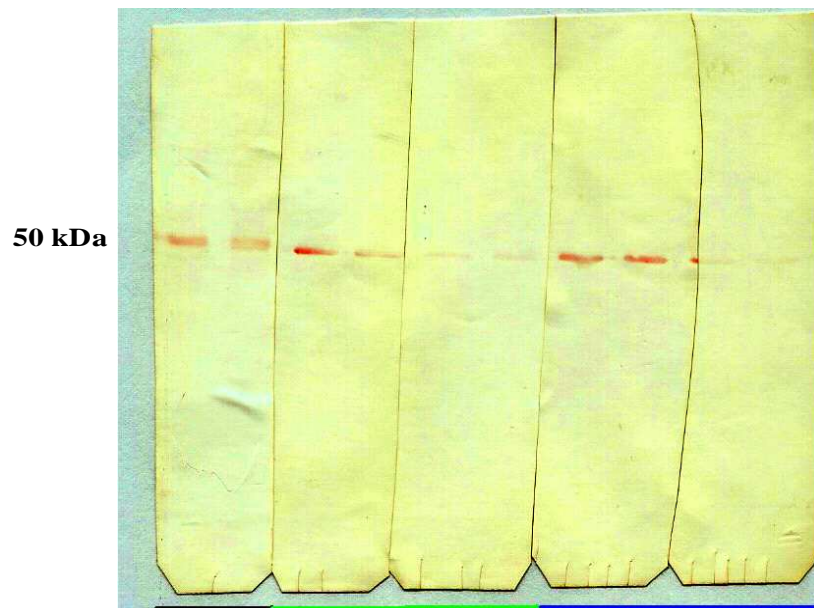
- Die schwarze Linie kennzeichnet den Referenz-Antikörper G17E.
- Die grüne Linie symbolisiert den Zellkulturüberstand der Zelllinie 36.1 (1:100 und 1:1000-Verdünnung in jeweils zwei Spuren).

- Die blaue Linie stellt den Zellkulturüberstand der Zelllinie 39.1 dar (kein Nachweis bei 1:1000).



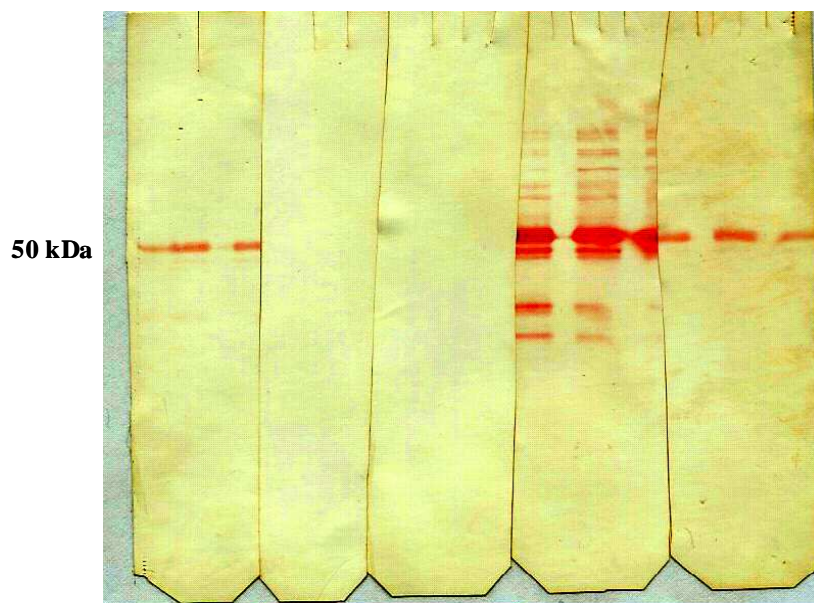
**Abb. 27:** Darstellung eines Screenings mit den Zellkulturüberständen zweier Zelllinien im Western-Blot. Beide Zelllinien bilden  $\beta$ -Conglycinin-spezifische Antikörper.

- Die schwarze Linie kennzeichnet den Referenz-Antikörper G17E.
- Die grüne Linie symbolisiert den Zellkulturüberstand der Zelllinie 4.4 (1:100 und 1:1000 in jeweils zwei Spuren).
- Die blaue Linie stellt den Zellkulturüberstand der Zelllinie 5.4 (1:100 und 1:1000 in jeweils zwei Spuren) dar.



**Abb. 28:** Darstellung eines Screenings mit den Zellkulturüberständen zweier Zelllinien im Western-Blot. Beide Zelllinien bilden Proglycinin-spezifische Antikörper.

- Die schwarze Linie kennzeichnet den Referenz-Antikörper G17E.
- Die grüne Linie symbolisiert den Zellkulturüberstand der Zelllinie 41.1 (1:100 und 1:1000 in jeweils zwei Spuren).
- Die blaue Linie stellt den Zellkulturüberstand der Zelllinie 42.1 (1:100 und 1:1000 in jeweils zwei Spuren) dar.



**Abb. 29:** Darstellung eines Screenings mit den Zellkulturüberständen zweier Zelllinien im Western-Blot.

- Die schwarze Linie kennzeichnet den Referenz-Antikörper G17E.
- Die grüne Linie stellt ein Negativergebnis einer Zelllinie dar.
- Die blaue Linie stellt den Zellkulturüberstand der Zelllinie G16C (1:100 und 1:1000 in jeweils zwei Spuren) dar, die gegen Proglycinin Antikörper zu bilden scheint.

In Summe wurden über 30 verschiedene Zelllinien getestet. Die hier angeführten Ergebnisse umfassen die insgesamt gesehen interessanteren Zelllinien. Damit ist vor allem gemeint, daß es sich um Zelllinien handelt, deren Antikörper einerseits spezifisch an nur eine Bande binden und andererseits damit ein starkes Farbsignal entwickelt werden kann. Die neben der eigentlich gewünschten Proglycinin- oder  $\beta$ -Conglycinin-Bande auftretenden Anfärbungen in den niederen Verdünnungen (1:100) sind Folge unspezifischer Bindung, die durch zu hoch konzentrierten Antikörper zustande kommen.

### 3.6 Massenproduktion des Antikörpers G17E im Miniperm

Die Massenproduktion des Antikörpers G17E erstreckte sich über fünf Wochen. Dabei konnten 40 mg monoklonalen Antikörpers gewonnen werden. Eine Ernte lieferte durchschnittlich 1 mg/ml Antikörper (siehe auch Kapitel 4.8).

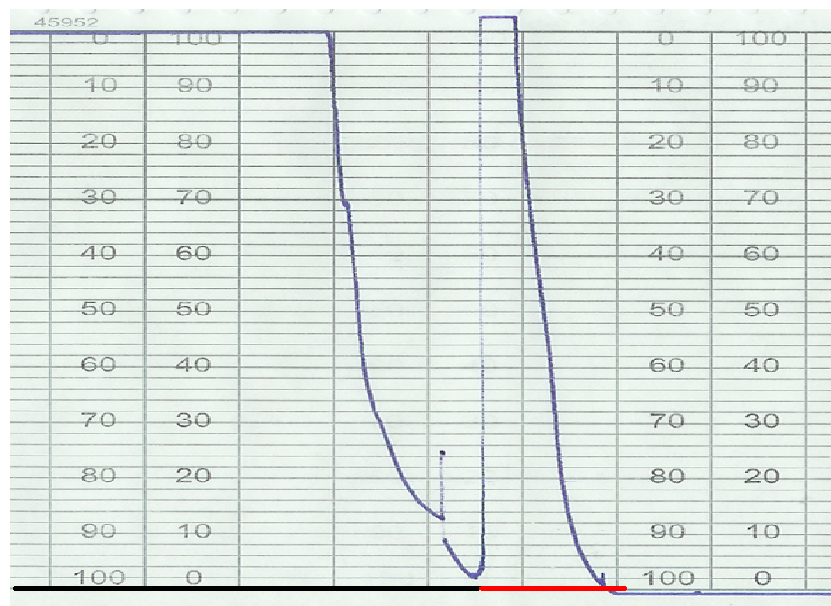
### 3.7 Antikörperaufreinigung

Der im Miniperm masenproduzierte Antikörper G17E war unmittelbar nach der Produktion noch im Zellkulturmedium. Um ihn von diesem abzutrennen war eine Aufreinigung nötig. Eine solche Abtrennung hat den Zweck, den Antikörper frei von verschiedenen Bestandteilen des Mediums (vor allem Proteinen) verwenden zu können. Ein nicht gereinigter Antikörper würde vor allem in ELISAs zu unnötigen Kreuzreaktivitäten führen. Zudem wäre eine exakte Quantifizierung des Antikörpers im Photometer nicht möglich, da andere Proteinstrukturen das Ergebnis verfälschen würden.

In einer Affinitätschromatographie konnte die Aufreinigung erfolgen. Dazu wurde eine mit Prosep-rA High Capacity Medium gefüllte Säule verwendet. Die Bindung der Antikörper-Moleküle beruhte auf der Affinität von Protein A zu verschiedenen Immunglobulinen (siehe Kapitel 2.18). Das Ergebnis einer solchen Immunaффinitätschromatographie ist graphisch in



Abbildung 30 veranschaulicht. Der Graph stammt vom Schreiber der Aufreinigungsanlage. Solche Aufreinigungen wurden mehrmals durchgeführt.



**Abb. 30:** Darstellung der Aufreinigung des Antikörpers G17E mit der Affinitätschromatographie.

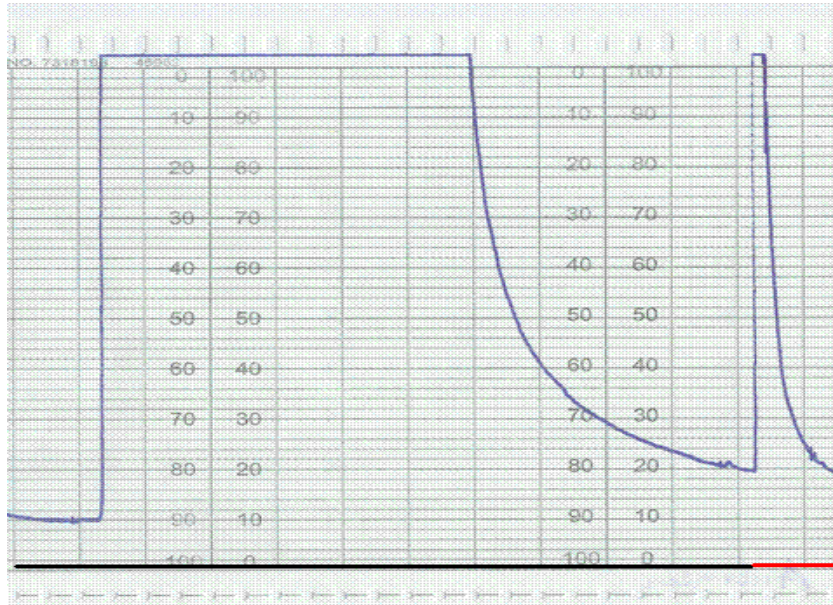
- Die schwarze Linie markiert den Verlauf des violetten, aufgereinigten Zellkulturüberstandes.
- Die rote Linie beschreibt die Elution der eigentlichen Antikörpermoleküle.

### 3.8 Aufreinigung des Proglycinin-Standards

Um eine möglichst effektive Aufreinigung des Proglycinin-Standards zu erreichen, wurden zwei verschiedene Methoden getestet. Im ersten Ansatz wurde der aufgereinigte Antikörper mit der gewaschenen, präaktivierten Sepharose inkubiert und anschließend zur Aufreinigung von Proglycinin verwendet. Diese Vorgehensweise lieferte allerdings keine zufriedenstellenden Ergebnisse, was zur Erprobung einer weiteren Methodik führte. Dabei wurde der Antikörper mit konstanter Geschwindigkeit über das gewaschene Säulenmaterial gepumpt. Der Antikörper G17E konnte damit an das Säulenmaterial gekoppelt und für die Aufreinigung des Standards herangezogen werden.

Das Proglycinin wurde in Form eines sterilfiltrierten Soja-Extrakts (siehe Kapitel 2.17) über die Säule mit dem gekoppelten Antikörper G17E geschickt. Die Herstellung der Säule und Aufreinigung des Säulenstandards im Anschluß daran, wurde in den Kapiteln 2.20 und 2.21 ausführlich beschrieben. Es waren insgesamt drei konsekutive Läufe mit den jeweiligen

Elutionsprodukten aus der vorhergehenden Aufreinigung nötig, um möglichst reines Standardprotein für die Kalibrationskurve (siehe Kapitel 3.11) zu erhalten. In den Abbildungen 31 und 32 sind drei konsekutive Elutionsprofile für Progycinin vom Schreiber aufgezeichnet worden.



**Abb. 31:** Erste Elution des Progycinins von der mit G17E gekoppelten Immunaффinitätssäule.

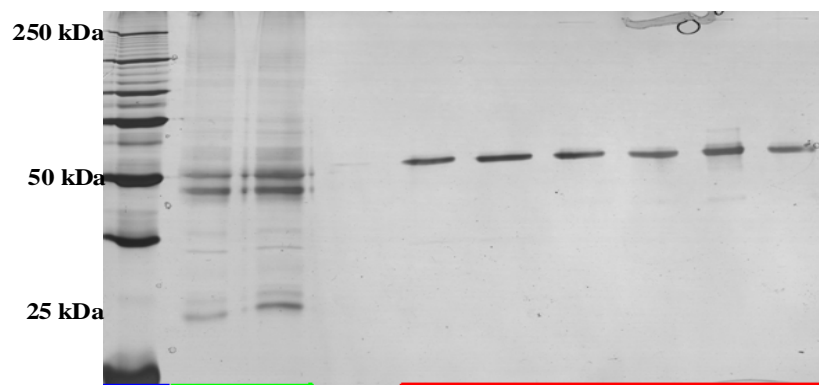
- Die schwarze Linie steht für den Durchlauf des sterilfiltrierten Soja-Extrakts.
- Die rote Linie charakterisiert das bei pH 3 eluierte Progycinin.



**Abb. 32:** Beispielhafte Elution für zweite (Fraktion des Elutionspeak in Abbildung 31 eingesetzt) und dritte Elutionsschritte von Progycinin an der Immunaффinitätssäule bei pH 3.

- Dabei stellt die violette Linie eine Korrektur der Ebene für die Basislinie am Schreiber dar.
- Die daran anfolgende grüne Linie symbolisiert die eigentliche Elution des gebundenen Proglycinins bei pH 3.
- Die gelbe Linie weist auf eine kurzfristige Unterbrechung der Elution mit Bindungspuffer hin, die dazu genutzt hätte werden können, ein mögliches, fehlerhaftes Verhalten der Elutionsparameter zu berichtigen. Es handelt sich also nur um eine zwischenzeitliche Kontrolle. Anschließend konnte die Elution wieder aufgenommen werden.

Der aufgereinigte Proglycinin-Standard wurde in einer Standard-SDS-PAGE qualitativ auf die An- bzw. Abwesenheit von Verunreinigungen untersucht. Eine Silberfärbung machte eine möglichst genaue Begutachtung möglich. Es konnten keine Spuren von Verunreinigungen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 33).



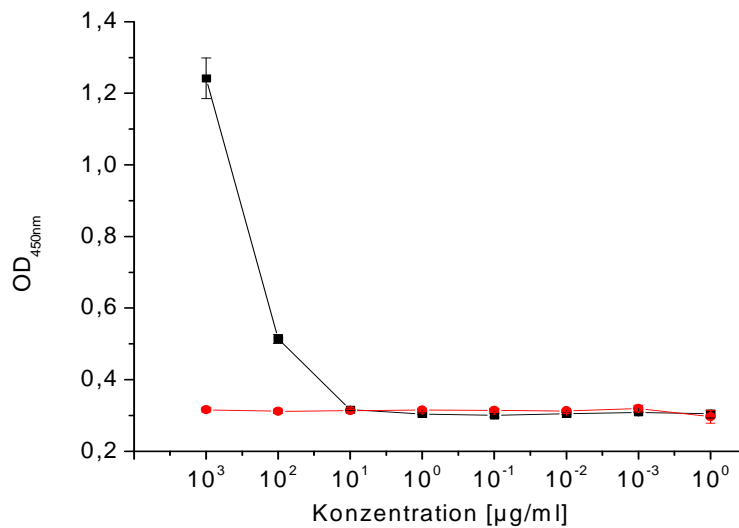
**Abb. 33:** SDS-PAGE mit dem aufgereinigten Proglycinin-Standard (Silberfärbung).

- Die blaue Linie benennt den Proteinstandard.
- Die grüne Linie charakterisiert den Lauf zweier Proben eines 1:1000 Soja-Extraktes (in PBS).
- Der rote Bereich umfaßt schließlich sechs Spalten mit aufgereinigtem Proglycinin (nach drei Elutionsschritten).

### 3.9 Bradford-Assay

Mit Hilfe des Bradford-Assays sollte eine Abschätzung der aus der Immunchromatographie gewonnenen Proglycinin-Mengen (siehe Kapitel 3.8) ermöglicht werden. Eine BSA-Verdünnungsreihe mit definierten Proteinmengen diente dabei als Referenz (siehe Kapitel

2.22). Eine Verdünnungsreihe des Proglicinin-Standards wurde mit dieser Referenz zur genaueren Gewichtsbestimmung verglichen.

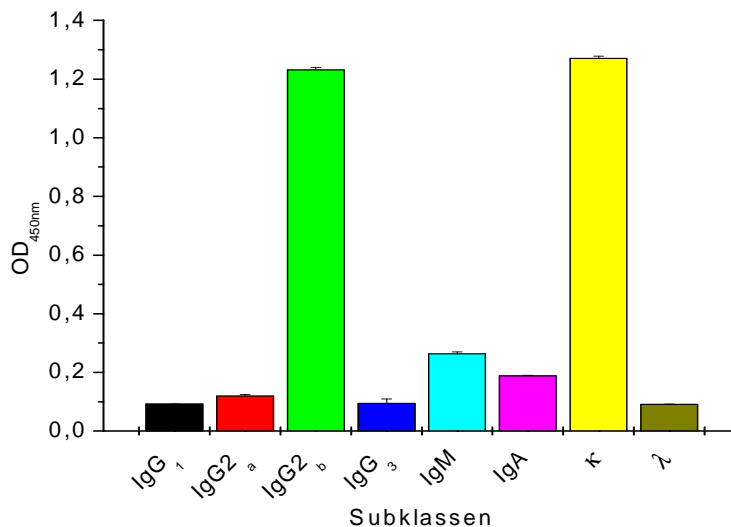


**Abb. 34:** Vergleich einer BSA-Verdünnungsreihe (schwarz) mit der Verdünnungsreihe des aus einer Aufreinigung erhaltenen Proglicinins (rot).

Der Vergleich der beiden Kurven zeigt (siehe Abbildung 34), daß es sich bei den aufgereinigten Proglicinin-Mengen nach einem Aufreinigungslauf um sehr geringe, mit dieser Methode nicht spezifisch quantifizierbare Werte handelte. Die Mengenbestimmung der Proteine konzentrierte sich deshalb auf die Quantifizierung im Photometer und auf eine grobe Abschätzung der silbergefärbten Proteinbanden der SDS-PAGEs (Nachweisgrenze zwischen 2 und 30 ng, siehe Kapitel 2.3). Die Ergebnisse dieser Bestimmungen waren zur Erstellung der Verdünnungsreihen mit definierten Proglicinin-Mengen für eine Kalibrationskurve notwendig. Es konnten insgesamt 2 mg reinen Proglicinins gewonnen werden. Die Quantifizierung des Proteins wurde dabei durch Abschätzung der Protein-Mengen in den einzelnen Banden der SDS-PAGE bestätigt.

### 3.10 Subklassenbestimmung

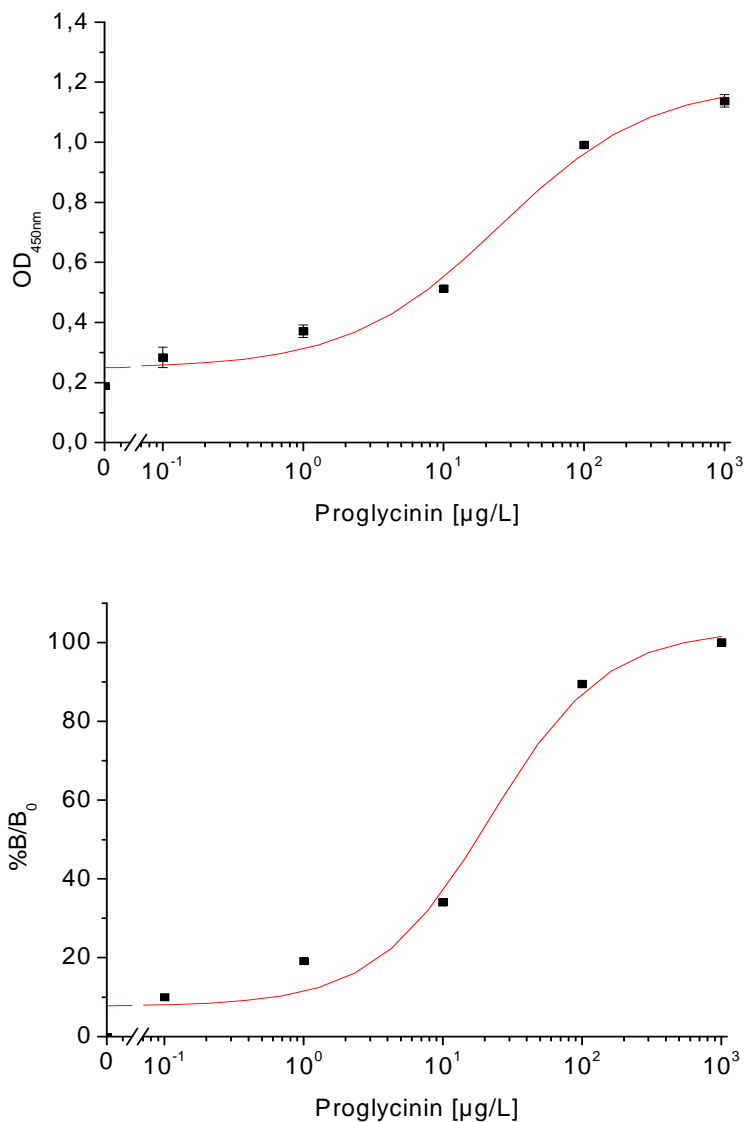
Die Bestimmung der Subklasse und des Leichtkettentyps des verwendeten Antikörpers in einem eigenen ELISA-Format stellte einen wichtigen Punkt bei der Charakterisierung des Antikörpers G17E dar. Es handelt sich um einen Antikörper der Subklasse IgG<sub>2b</sub> mit einer  $\kappa$ -Leichtkette (siehe Abbildung 35).



**Abb. 35:** Darstellung der Ergebnisse aus der Subklassenbestimmung (siehe Kapitel 2.25) des Antikörpers G17E (Subklasse: IgG<sub>2b</sub>; Leichtkette:  $\kappa$ ).

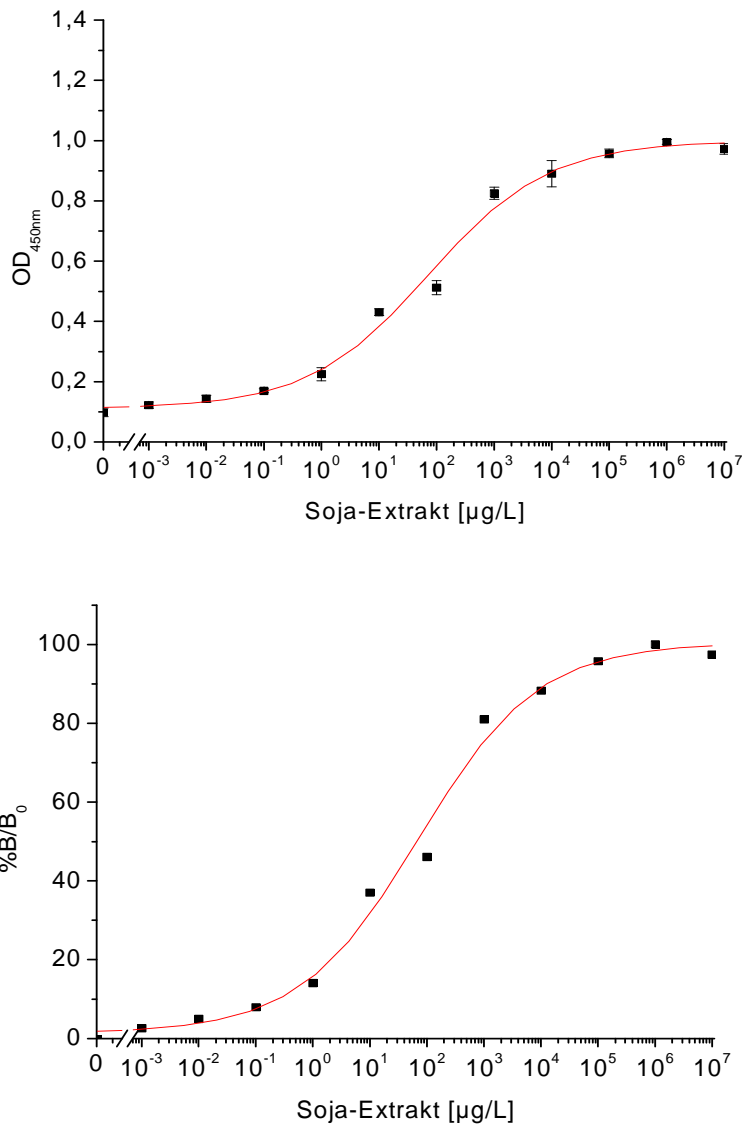
### 3.11 Etablierung einer Kalibrationskurve

Zur Etablierung einer Kalibrationskurve wurde ein nicht kompetitives, heterogenes ELISA-Protokoll verwendet. Eine Verdünnungsreihe des aufgereinigten Proglycinin-Standards wurde dabei zum Beschichten einer Mikrotiterplatte herangezogen. Der immunchemische Nachweis erfolgte mit einem biotinylierten G17E-Antikörper. Eine Neutravidin-Biotin-POD-Lösung ermöglichte eine Sekundär-Bindung des biotinylierten Antikörpers (nachdem er bereits zuvor an das Proglycinin gebunden hatte) unter Ausnutzung der Affinität zwischen Biotin und Neutravidin. Die Meerrettich-Peroxidase war Voraussetzung für eine Signalgenerierung im Substrat. Der genaue Ablauf des ELISAs ist im Kapitel 2.23 (b) beschrieben. In Abbildung 36 sind eine absolute und eine normierte Kalibrationskurve mit aufgereinigtem Proglycinin zu sehen. Der Testmittelpunkt (IC<sub>50</sub>-Wert) befindet sich bei 13  $\mu\text{g/L}$ , die untere Nachweisgrenze (IC<sub>20</sub>) bei 1  $\mu\text{g/L}$  und die obere Nachweisgrenze (IC<sub>80</sub>) bei 96  $\mu\text{g/L}$ .



**Abb. 36:** Kalibrationskurve mit aufgereinigtem Proglicinin. Der obere Graph stellt die absolute und der untere die normierte Kalibrationskurve dar.

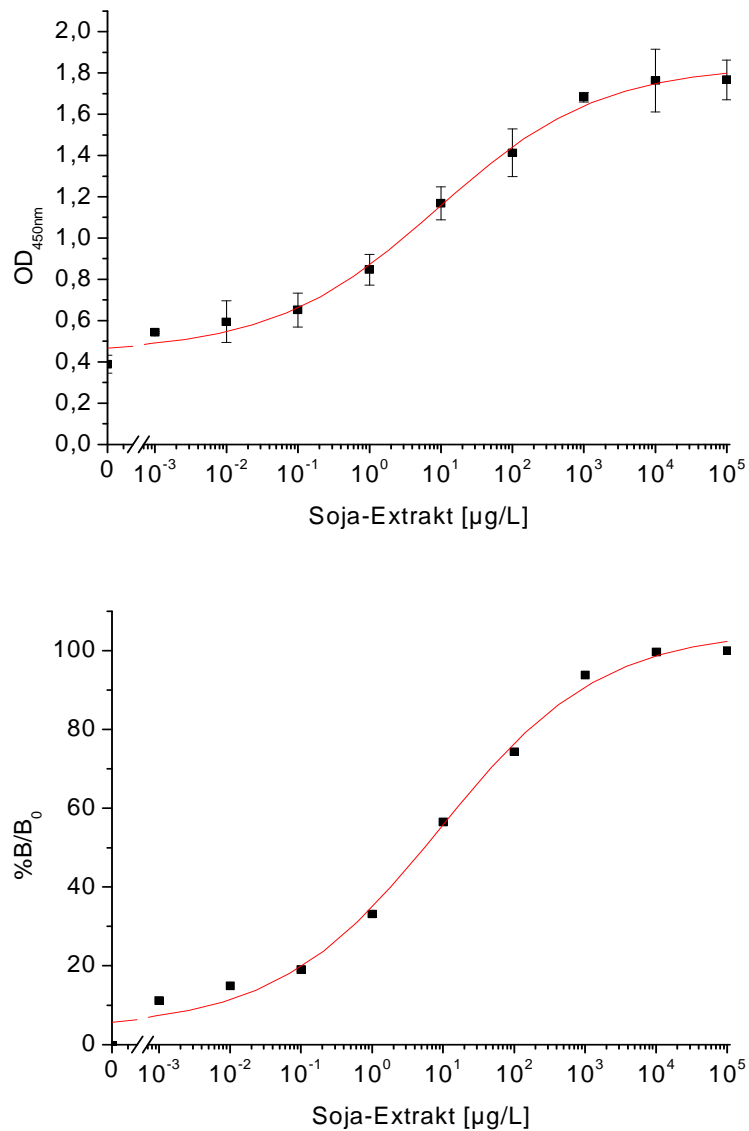
Eine Kalibrationskurve mußte auch für das Soja-Extrakt erstellt werden, um das Verhalten des Proglicinins im Gesamtproteinkomplex der Soja-Proteine zu charakterisieren. Dazu wurde das identische, heterogene, nicht kompetitive ELISA-Format wie für die Kalibrationskurve mit Proglicinin herangezogen (siehe Kapitel 2.23, b). Der einzige Unterschied war die Verwendung einer Soja-Extrakt-Verdünnungsreihe, anstelle einer Verdünnungsreihe mit aufgereinigtem Proglicinin. Bei der in Abbildung 37 dargestellten Kurve befindet sich der Testmittelpunkt (IC<sub>50</sub>-Wert) bei 107 µg/L, die untere Nachweisgrenze (IC<sub>20</sub>) bei 1 µg/L und die obere Nachweisgrenze (IC<sub>80</sub>) bei 989 µg/L.



**Abb. 37:** Kalibrationskurve mit dem Soja-Extrakt. Der obere Graph stellt die absolute und der untere die normierte Kalibrationskurve dar.

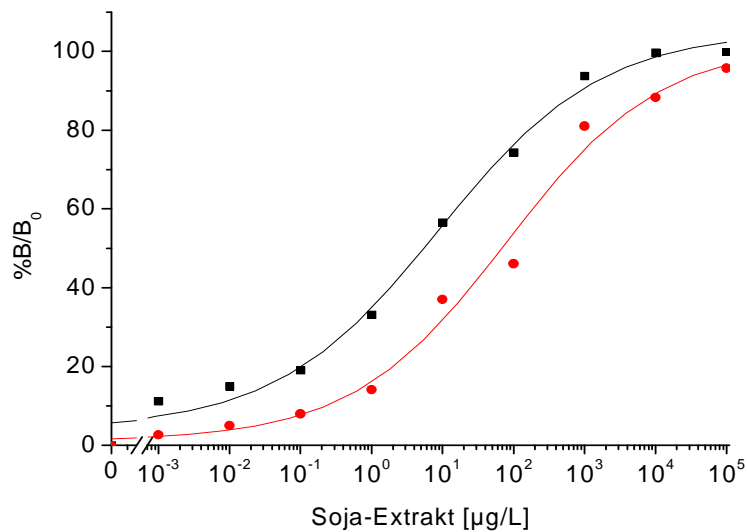
Zu Vergleichszwecken und auch, um möglicherweise Sensitivitätsverbesserungen zu erzielen, wurden im Zuge der Etablierung geeigneter ELISA-Protokolle verschiedene Parameter verändert. Eine sowohl quantitative als auch qualitative Veränderung von Reagenzien zur Blockierung in den ELISAs, verschiedene Sekundärmarkierungen (siehe Abbildungen 37, 38, 39) und verschiedene Inkubationszeiten der unterschiedlichen Reagenzien in den ELISA-Formaten wurden dabei angepaßt. Exemplarisch für diese Bestrebungen soll hier der Vergleich zwischen der Anwendung des biotinylierten G17E-Antikörpers und eines Ziege-Anti-Maus-POD-Antikörpers als Sekundärantikörper dargestellt werden (siehe Abbildung 39). In Abbildung 38 ist zunächst eine absolute und normierte Kalibrationskurve mit

aufgereinigtem Proglycinin unter Verwendung des Ziege-Anti-Maus-POD-Antikörpers als Sekundärantikörper zu sehen. Auch hier wurde das in Kapitel 2.23 (b) beschriebene ELISA-Format verwendet. Anstelle des biotinylierten Antikörpers G17E als Primärantikörper wurde allerdings ein nicht biotinylierter G17E-Antikörper verwendet. Der Testmittelpunkt ( $IC_{50}$ -Wert) befindet sich bei  $9 \mu\text{g/L}$ , die untere Nachweisgrenze ( $IC_{20}$ ) bei  $0,1 \mu\text{g/L}$  und die obere Nachweisgrenze ( $IC_{80}$ ) bei  $107,5 \mu\text{g/L}$ .



**Abb. 38:** Kalibrationskurve mit dem Soja-Extrakt unter Anwendung des Ziege-Anti-Maus-POD-Antikörpers. Der obere Graph stellt die absolute und der untere die normierte Kalibrationskurve dar.

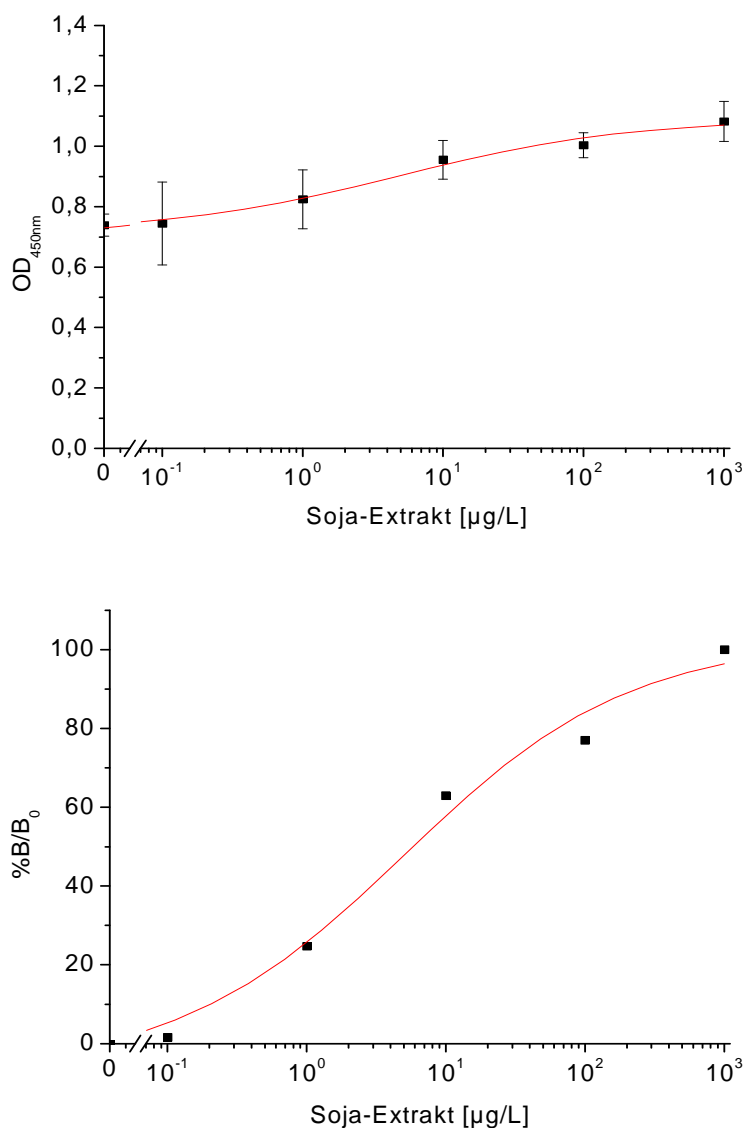




**Abb. 39:** Vergleich der normierten Kalibrationskurven mit dem Soja-Extrakt unter Anwendung des Ziege-anti-Maus-POD-Antikörpers (schwarz) und des biotinylierten G17E-Antikörpers (rot).

Beim Vergleich der beiden Detektionssysteme kann man deutlich erkennen, daß die Standardabweichungen des Ziege-Anti-Maus-POD-Systems deutlich ausgeprägter sind als jene des Neutravidin-Biotin-POD-Systems. Die untere Nachweisgrenze bei Verwendung des Ziege-Anti-Maus-POD-Antikörpers ( $IC_{20}=0,1 \mu\text{g/L}$ ) liegt allerdings unterhalb jener des Neutravidin-Biotin-POD-Systems ( $IC_{20}=1 \mu\text{g/L}$ ). Aufgrund der günstigeren Standardabweichungen fiel die Wahl trotzdem auf das letztere System.

Mit Hilfe eines im Methodenteil erläuterten Sandwich-ELISAs (siehe Kapitel 2.23, c) sollte eine Sensitivitätsverbesserung erzielt werden. Zwei aus dem Screening der Zellkulturüberstände im Western-Blot getestete Antikörper wurden dazu verwendet (G16C und 39.1). Es erfolgte zunächst eine Beschichtung einer Mikrotiterplatte mit einem der beiden Antikörper. Daran schloß sich eine Inkubation mit dem Soja-Extrakt und zur Vervollständigung des Sandwich-Formats eine Inkubation mit dem biotinylierten Antikörper G17E an. Der detaillierte Ablauf des ELISAs ist im Kapitel 2.23 (c) beschrieben. Hier soll exemplarisch das Ergebnis eines ELISAs mit dem Antikörper G16C veranschaulicht werden.



**Abb. 40:** Kalibrationskurve eines Sandwich-ELISAs unter Verwendung des Antikörpers G16C. Der obere Graph stellt die absolute und der untere die normierte Kalibrationskurve dar.

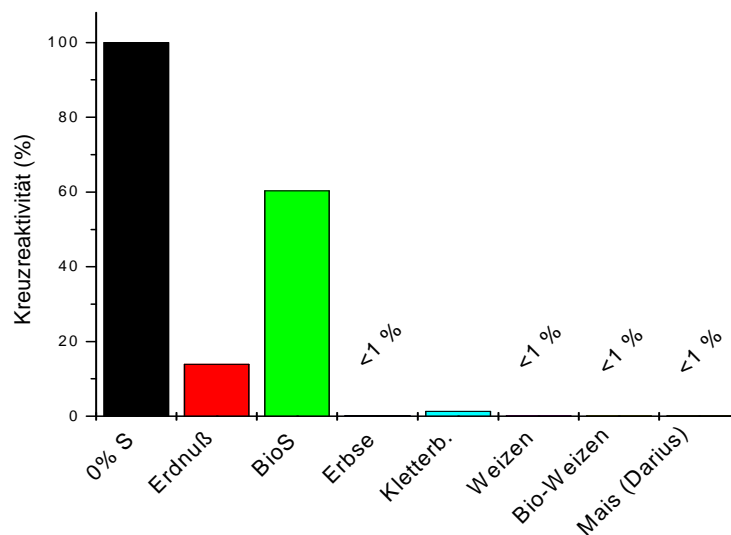
Man kann bei diesem Sandwich-ELISA ein äußerst großes Hintergrundrauschen und damit verbunden, eine dementsprechend große Standardabweichung bemerken. Die Verwendung dieses Modells zur Detektion von Proglycinin wurde daher nicht in Betracht gezogen.

### 3.12 Kreuzreaktivität

Bei den Ergebnissen der Kreuzreaktivitätstests wurde vor allem auf den Vergleich zwischen den Soja-Extrakten und dem Erdnuß-Extrakt geachtet. Sehr ähnliche Epitope mußten hier berücksichtigt werden (Beardslee *et al.*, 2000). Das in Kapitel 2.23 (b) verwendete ELISA-Format diente als Grundlage für den hier verwendeten Assay. Mit verschiedenen Mehl-Extrakten wurde eine Mikrotiterplatte beschichtet. Es folgte eine Inkubation mit dem biotinylierten G17E-Antikörper und daran anschließend mit der Neutravidin-Biotin-POD-Lösung. Die Protein-Extraktion für die verschiedenen Mehle verlief nach dem gleichen Schema (siehe Kapitel 2.17). Die Protein-Extrakte folgender Pflanzen wurden zur Kreuzreaktivitätsbestimmung verwendet: 0%-Soja, Erdnuß, Bio-Soja (BioS), Kletterbohne, Weizen, Bio-Weizen, Mais. In Tabelle 10 werden diese mit der jeweiligen Konzentration am Testmittelpunkt charakterisiert. Die massenbezogene Berechnung der Kreuzreaktivität erfolgte nach dem in Kapitel 2.24 beschriebenen Schema. Sie beschreibt das Bindungsverhalten des Antikörpers G17E zu kreuzreagierenden Analyten im Vergleich zum Zielanalyten. In Abbildung 41 sind die verschiedenen Kreuzreaktivitäten der einzelnen Protein-Extrakte in einem Säulen-Diagramm dargestellt. Als Zielanalyt diente das 0% Soja-Extrakt. Erwartungsgemäß verhielt sich Bio-Soja mit einer massenbezogenen Kreuzreaktivität von 60,3% sehr ähnlich. Mit einer Kreuzreaktivität von 13,9% blieb die in der Literatur erwähnte Kreuzreaktivität zur Erdnuß unter den erwarteten hohen Werten (Beardslee *et al.*, 2000).

**Tabelle 10:** Kreuzreaktivität des monoklonalen Antikörpers G17E

Kreuzreagierendes	Konzentration bei 50% B/B <sub>0</sub> (µg/L)	Kreuzreaktivität, massenbezogen (%)
0% Soja-Extrakt	107	100
Erdnuß	770	13,9
Bio-Soja	177,5	60,3
Erbse	69457	0,2
Kletterbohne	8513	1,3
Weizen	97771	0,1
Bio-Weizen	97643	0,1
Mais (Darius)	124463	<0,1



**Abb. 41:** Vergleich der Kreuzreaktivitäten von G17E (mit dem Soja-Extrakt als Referenz) mit verschiedenen Protein-Extrakten. Der Testmittelpunkt beträgt 50% B/B<sub>0</sub>=107 µg/L für das Soja-Extrakt als Bezugssubstanz.

### 3.13 Epitopmapping

Ein Epitopmapping war ein weiterer Schritt bei der Charakterisierung selektiver Eigenschaften des Antikörpers G17E.

In einer Publikation von Beardslee (Beardslee *et al.*, 2000) konnten bei Soja zwei allergene Determinanten gefunden werden. Es wurden sechs Fusions-Proteine konstruiert, die

überlappende Regionen des Precursormoleküls G1 (Primäre Zugangsnummer bei Swiss-Prot: P04776) aufwies, das eben die A1aB1b-Untereinheit besitzt und nach Abspaltung der Signalpeptide zu einem trimeren Proglycinin wird. Mit verschiedenen Patientenseren konnte nun die Reaktivität der IgE-Moleküle mit den jeweiligen Proben getestet und damit gemeinsame, allergene Determinanten identifiziert werden. Dazu wurde im methodischen Teil vor allem auf Immunoblotting und Sandwich-ELISAs zurückgegriffen. Es konnten zwei allergene Epitope identifiziert werden, die auch Ähnlichkeit mit dem Allergen Ara h3 der Erdnuß (*Arachis hypogaea*) Kreuzreaktivität aufweisen (Beardslee *et al.*, 2000):

- Epitop A (GGSILSGFTLEFLEHAFSV) entspricht der Position im Molekül von Aminosäure 217-235
- Epitop B (GAIIVTKGGLSVI) entspricht der Position im Molekül von Aminosäure 253-265

In meiner Arbeit wurden diese Epitope nun jeweils an den Enden um einige Aminosäuren verlängert, damit vor allem im ELISA eine bessere Exposition der Epitope erzielt werden konnte. Am N-terminalen Ende wurden die Sequenzen zudem biotinyliert, um eine entsprechende Reaktion mit Neutravidin im ELISA zu gewährleisten.

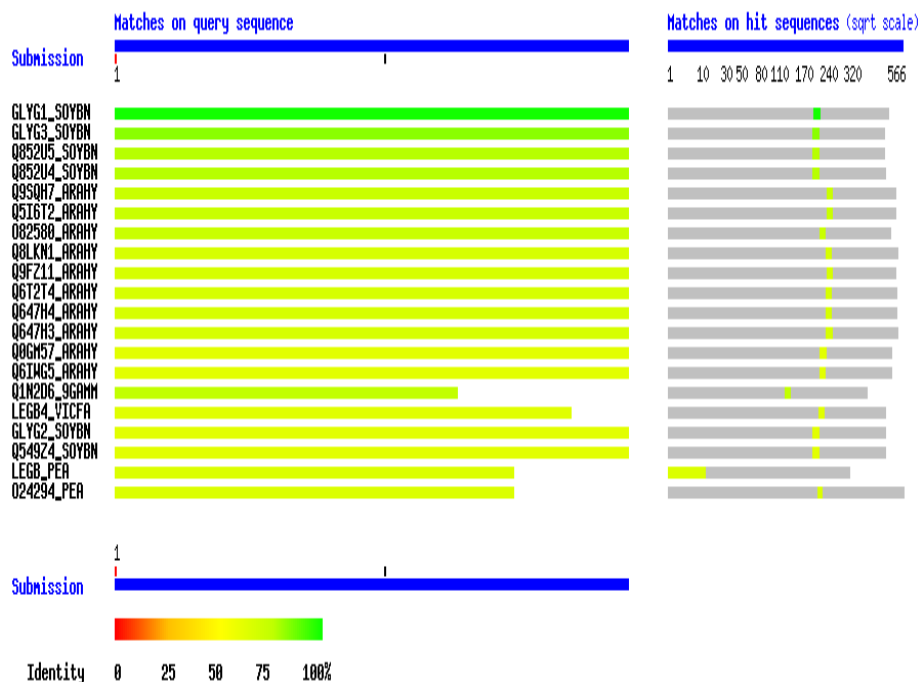
Die Synthese erfolgte durch die Firma INBIOS S.r.l. und umfasste folgende zwei Sequenzen:

- Epitop A1 (ENEGGSILSGFTLEFLEHAFSVDKQIA)
- Epitop B1 (EGEDKGAIIVTKGGLSVIKPPTD)

Um Sequenzvergleiche der besagten Epitope mit anderen Proteinmolekülen anstellen zu können, wurde auf eine Proteindatenbank zurückgegriffen. Die Untersuchung sollte Aufschluß darüber geben, inwieweit der Antikörper G17E evtl. kreuzreaktiv ähnliche Sequenzen erkennen könnte. Es wurden jeweils für die Epitope A, A1, B und B1 in der SWISS-PROT-Datenbank Sequenzvergleiche unter Verwendung eines spezifischen Programms (BLAST) durchgeführt. Das Programm BLAST vergleicht dabei eine spezifische Aminosäuresequenz mit allen in der entsprechenden Proteindatenbank enthaltenen Sequenzen. Der Vergleich sollte sowohl für die ursprünglich in der Publikation von Beardslee (Beardslee *et al.*, 2000) erwähnten Sequenzen, als auch für die modifizierten Sequenzen angewendet werden. Zusätzliche bzw. weniger zu befürchtende Kreuzreaktivität durch die für das ELISA-Format durchgeführten Abänderungen (Sequenzverlängerung und Biotinylierung) sollte damit entsprechend sichtbar werden.

Die Sequenzvergleiche der verschiedenen Epitope in der erwähnten Proteindatenbank (SWISS-PROT) lieferten folgende Ergebnisse:

a) Epitop A: Es ist deutlich zu erkennen, daß dieses Epitop Ähnlichkeiten mit vor allem der Erdnuß aufweist (siehe Bezeichnung ARAHY in der linken Spalte von Abbildung 42). Eine Kreuzreaktivitätsuntersuchung mit dieser Spezies war somit nötig. Wie bereits erwähnt, war dieser Umstand keinesfalls überraschend, da bereits Beardslee (Beardslee et al., 2000) diese Homologie aufgezeigt hatte.

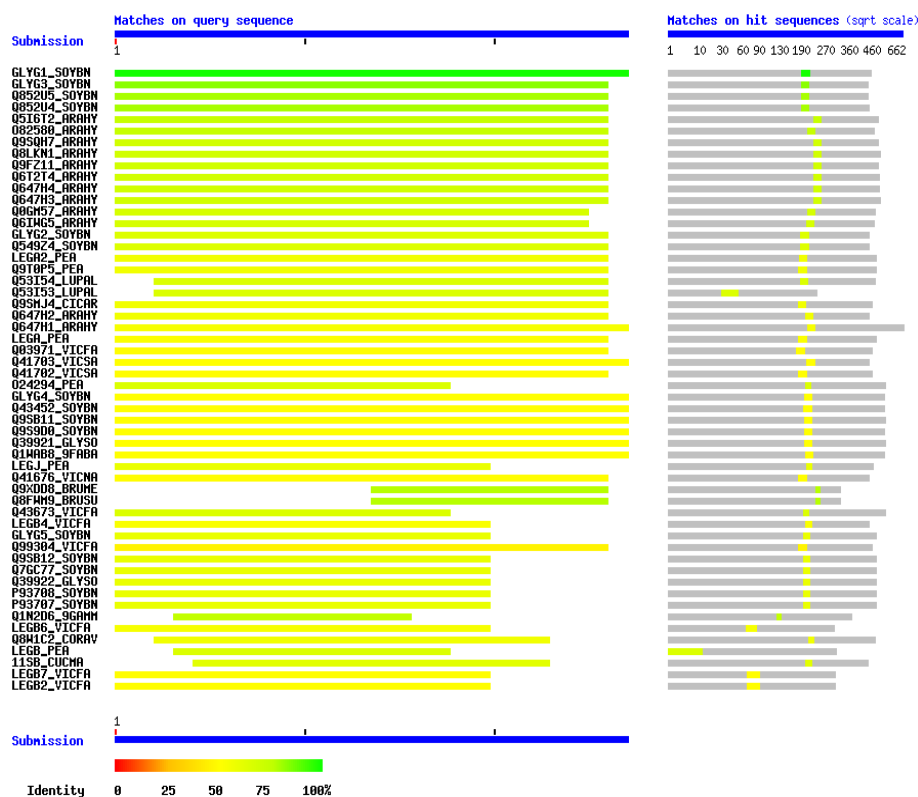


**Abb. 42:** Vergleich von Epitop A mit verschiedenen Spezies der Proteindatenbank SWISS-PROT (Aus: <http://www.expasy.org/cgi-bin/blast.pl>). Die Übereinstimmung nimmt von grün nach rot ab.

Im der Graphik (siehe Abbildung 42) sind am linken Rand in schwarzer Farbe verschiedene Kennnumern von Protein-Sequenzen in der SWISS-Prot-Datenbank angegeben. Mit der Umschreibung „Matches on query sequence“ sind jene Sequenzen gemeint, die eine mehr oder weniger große Ähnlichkeit mit der untersuchten Sequenz besitzen. Zudem wird hier angezeigt (durch die Dimension der Querbalken), in welcher Region die Sequenzen übereinstimmen. Die Farbe grün gibt eine 100%ige (alle Aminosäuren sind identisch), die Farbe rot eine 0%ige (alle Aminosäuren unterscheiden sich an den einzelnen Positionen)

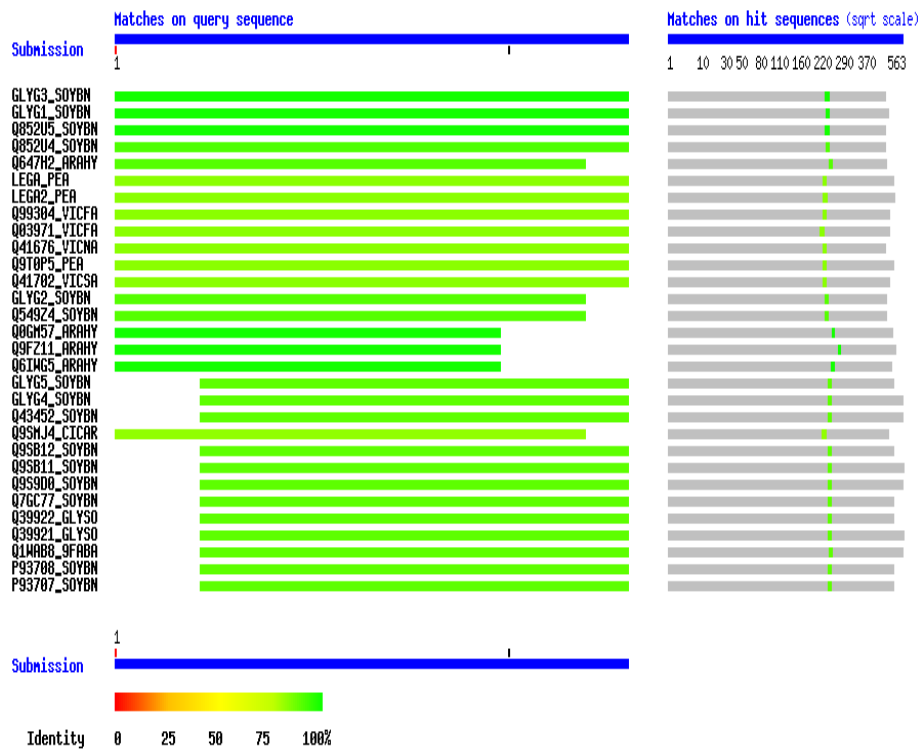
Übereinstimmung an. Die Bezeichnung „Matches on hit sequence“ beschreibt, welche Position des mit der untersuchten Sequenz verglichenen Proteins eine signifikante Ähnlichkeit aufweist. Standardmäßig werden 25% als untere Grenze für die Signifikanz angenommen (Claverie und Notredame, 2003). Die vorgenommenen Beschreibungen gelten neben Abbildung 42 auch für Abbildung 43, 44 und 45.

b) Epitop A1: Die Sequenzähnlichkeit zur Erdnuß konnte auch durch die Modifikation nicht wesentlich verändert werden. Allerdings war das auch nicht ein prioritäres Ziel, da der Antikörper sowieso nur die eigentliche Zielsequenz (Epitop A oder B) erkennen sollte.



**Abb. 43:** Vergleich von Epitop A1 mit verschiedenen Spezies der Proteindatenbank SWISS-PROT (Aus: <http://www.expasy.org/cgi-bin/blast.pl>). Die Übereinstimmung nimmt von grün nach rot ab.

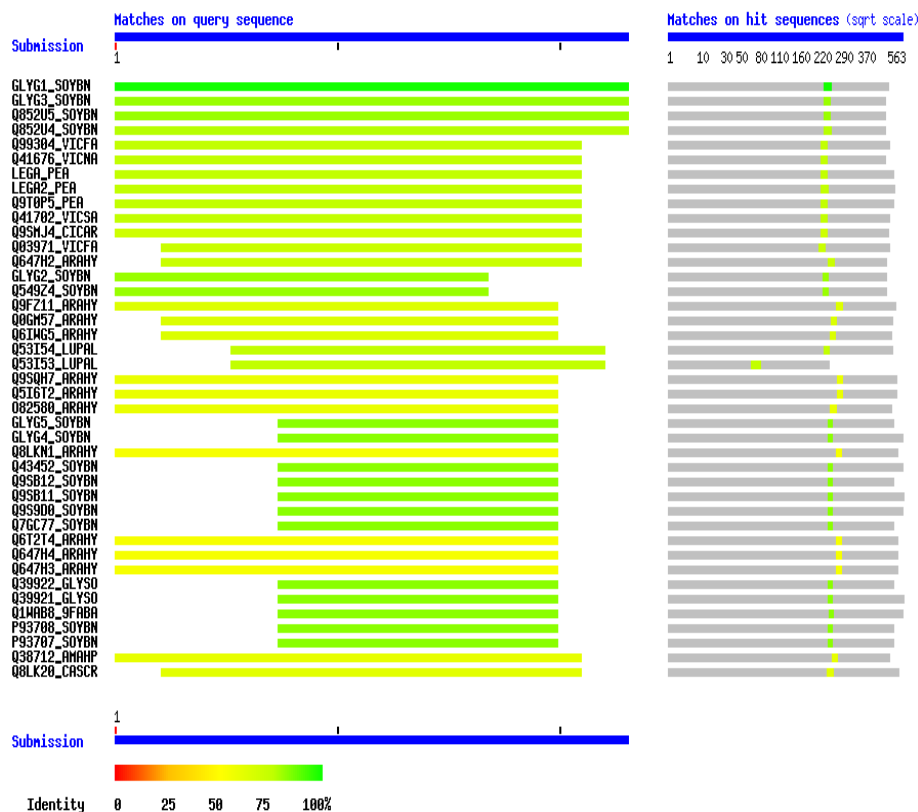
c) Epitop B: Hier erkennt man wesentlich deutlichere Übereinstimmungen zur Erdnuß aber auch zu verschiedenen Soja-Proteinen. Als Beispiel sei das Protein Q549Z4\_SOYBN (Kennnummer bei SWISS-PROT)



**Abb. 44:** Vergleich von Epitop B mit verschiedenen Spezies der Proteindatenbank SWISS-Prot (Aus: <http://www.expasy.org/cgi-bin/blast.pl>). Die Übereinstimmung nimmt von grün nach rot ab.



d) Die Ähnlichkeit mit anderen Protein-Sequenzen nimmt insgesamt ab. Die Zahl an verschiedenen Spezies mit einer geringen Ähnlichkeit nimmt allerdings zu.



**Abb. 45:** Vergleich von Epitop B1 mit verschiedenen Spezies der Proteindatenbank SWISS-Prot (Aus: <http://www.expasy.org/cgi-bin/blast.pl>). Die Übereinstimmung nimmt von grün nach rot ab.

Die Ergebnisse aus allen Sequenzvergleichen können wie folgt zusammengefaßt werden:

Die Ähnlichkeit der Sequenzen von Epitop A und B der Sojabohne zur Erdnuß war aus besagter Publikation von Beardslee (Beardslee *et al.*, 2000) bekannt. Die Ergebnisse der Kreuzreaktivitätsmessungen mit einem Protein-Extrakt dieser Pflanze wurden in dieser Arbeit betrachtet (siehe Kapitel 3.12). Die zum Teil vorhandene Ähnlichkeit der Epitope A und B mit Sequenzen anderer Leguminosen wurde erwartet, da ja auch diese Spezies Proglycinin als Speicherprotein verwenden. Auch zu diesem Punkt wurden Kreuzreaktivitätsmessungen mit entsprechenden Extrakten durchgeführt, um die selektive Sequenzerkennung des Antikörpers G17E im Proteom zu verfestigen. Insgesamt ergibt sich eine günstigere Ausgangslage für das Epitop A1. Es scheint eine geringere Sequenzähnlichkeit zu anderen Proteinen aufzuweisen und deshalb verstärkte Kreuzreaktivität auszuschließen. Die Affinität von G17E zu diesem

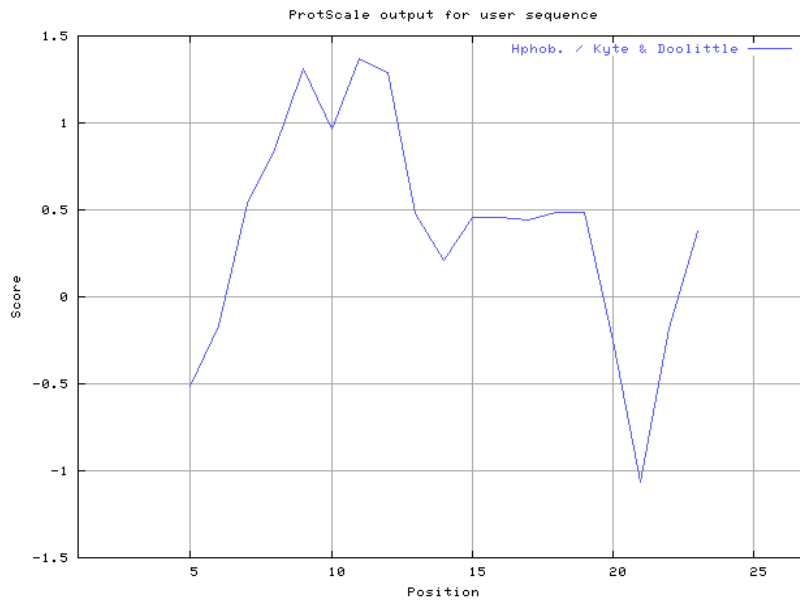
Epitop konnte eindeutig, wie im Anschluß gezeigt wird, nachgewiesen werden. Gleichzeitig konnte eine Affinität zu B1 ausgeschlossen werden.

Zudem wurde auch eine Hydrophobizitätsbestimmung (Funktion nach Kyte und Doolittle in Swiss-Prot) für die beiden Epitope A1 und B1 vorgenommen. Für ein weiteres, biotinyliertes Peptid 3 (NGLEELRVKESDRLSA), das am Lehrstuhl zuvor für andere Zwecke verwendet wurde, konnte wie für A1 und B1 mit der Hydrophobizitätsbestimmung ein charakterisierender Parameter untersucht werden, um eine mögliche Abweichung im Assay genauer definieren zu können. Für das Peptid 3 erfolgte aufgrund der Kürze des Moleküls keine graphische Auswertung.

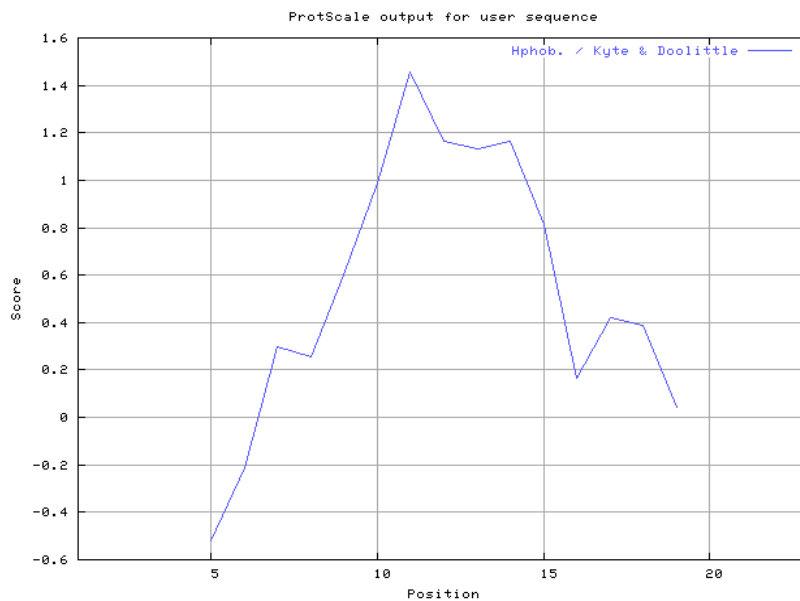
Eine weitere Charakterisierung der Epitope A1 und B1 durch die Bestimmung ihrer Hydrophobizität war aus folgenden Gründen notwendig:

- Einerseits sollte damit das richtige Mikrotiterplatten-Material gefunden werden (geeignete hydrophile oder hydrophobe Oberflächeneigenschaften). Bei einem stark hydrophilen Molekül vereinfacht eine zum Beispiel hydrophile Oberfläche der Platte eine Anbindung des Moleküls. Mit einer Mikrotiterplatte von Greiner (MICROLON 96K) mit sowohl hydrophoben als auch hydrophilen Eigenschaften konnte für die weder übermäßig hydrophilen noch hydrophoben Epitope A1, B1 (siehe Abbildungen 46 und 47) und Epitop 3 ein geeignetes Bindungsmaterial gefunden werden.
- Andererseits konnte mit der Hydrophobizitätsbestimmung ausgesagt werden, ob eine entsprechende Interaktion mit den hydrophilen Außenbereichen des Proteins Proglicinin zu erwarten war, was mit den in Abbildung 46 und 47 dargestellten, im Schnitt negativen Hydrophobizitätswerten (nur leicht positiv bei Epitop A1) bestätigt werden konnte.

Die Untersuchung der Hydrophobizitätswerte für Epitop A1 und B1 ergab die in Abbildung 46 und 47 graphisch dargestellten Ergebnisse. Die in den Graphen vorhandene Bezeichnung „Position“ gibt die Position einer Aminosäure im Peptid an.



**Abb. 46:** Hydrophobizitätsskala nach Kyte und Doolittle für Epitop A1 (Aus: <http://www.expasy.org/cgi-bin/blast.pl?1>)

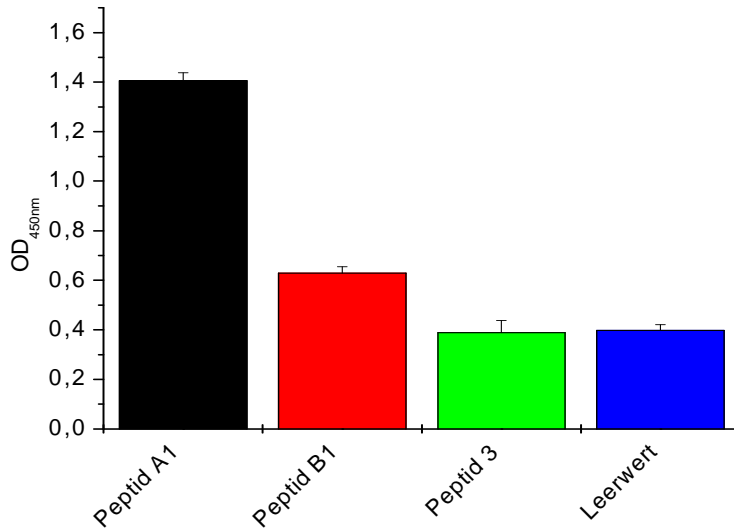


**Abb. 47:** Hydrophobizitätsskala nach Kyte und Doolittle für Epitop B1 (Aus: <http://www.expasy.org/cgi-bin/blast.pl?1>)

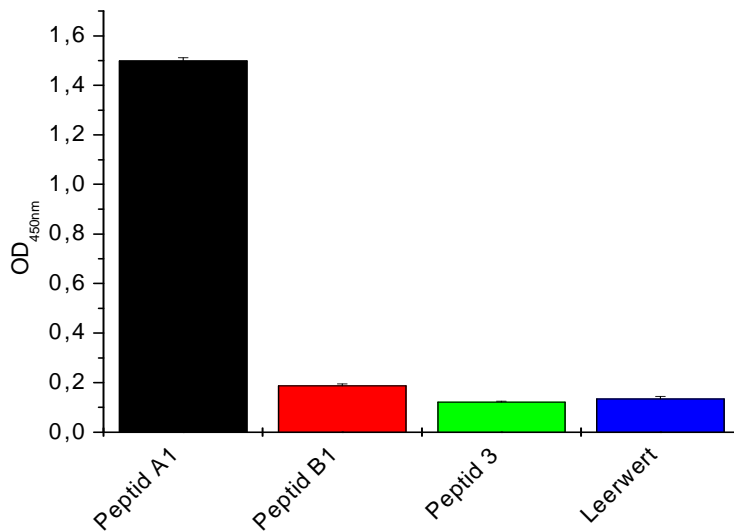
Die Hydrophobizitätsbestimmungen bestätigten eine durchschnittliche Hydrophobizität von 0,026 für das Epitop A1 und -0,239 für Epitop B1 sowie -0,544 für das zur Kontrolle verwendete Peptid 3.

Die Bindungseigenschaften von G17E mit den verlängerten Epitopen A1 und B1 und für Peptid 3 konnten im angeführten Immunoassay (siehe Kapitel 2.27) charakterisiert werden. Das Peptid 3 sollte idealerweise kein signifikantes Signal im ELISA entwickeln und damit

eine Bestätigung für eine nicht vorhandene Kreuzreaktivität des Antikörpers mit Molekülen nur aufgrund ähnlicher Größe und damit ähnlichen Interaktionsmöglichkeiten im Elisa sein. Um entsprechend aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, war es nötig, das ELISA-Protokoll durch Veränderung verschiedener Parameter zu verbessern. Hierzu zählten vor allem die Optimierung der Konzentration des Primärantikörpers, des Blockierungsmittels und des biotinylierten G17E-Antikörpers. Besonders auffällig war die Änderung der Konzentration des biotinylierten Antikörpers G17E (siehe Abbildungen 48 und 49). Zusammenfassend läßt sich sagen, daß das Peptid A1 eine signifikante Wechselwirkung mit dem Antikörper G17E eingeht (siehe Abbildung 49).



**Abb. 48:** Vergleich verschiedener Epitope zur Spezifitätsbestimmung des Antikörpers G17E (10 µg/ml G17E).



**Abb. 49:** Vergleich verschiedener Epitope zur Spezifitätsbestimmung des Antikörpers G17E (0,1 µg/ml G17E).

## 4 Diskussion

### 4.1 Allgemeine Betrachtungen zur Arbeit

In der hier durchgeführten Arbeit, sollte ein monoklonaler Antikörper gegen das allergene Protein Proglycinin und ein Testsystem zum Nachweis desselben entwickelt werden. Dazu wurde das entsprechende Protein biochemisch (aus einem Soja-Extrakt, siehe Kapitel 2.17) mit einer präparativen Gelelektrophorese aufgereinigt. Aufgrund der massenmäßigen Ähnlichkeit zum globulären Speicherprotein  $\beta$ -Conglycinin und der sich damit ergebenden Schwierigkeiten (Auftrennung nur über zusätzliche Aufreinigungsschritte zum Beispiel mit einer isoelektrischen Fokussierung möglich) bei der spezifischen Gewinnung nur eines der beiden Proteine, wurden die ungetrennten Produkte der Elektrophorese beide zur Immunisierung zweier Mäuse verwendet. Diese Vorgehensweise bot den Vorteil, daß durch Selektion in der Zellkultur und mit Hilfe der Western-Blots neben Proglycinin-spezifischen Antikörpern auch solche gegen  $\beta$ -Conglycinin gefunden werden konnten. Letztere könnten sich in zukünftigen Arbeiten der Identifizierung von  $\beta$ -Conglycinin in unterschiedlichen Matrices (zum Beispiel Mehl-Extrakten), als interessante Nebenprodukte für verschiedenste, in der Diskussion im Anschluß erwähnten, Anwendungen herausstellen.

Die experimentelle Vorgehensweise erstreckte sich zunächst auf die ausschließliche Gewinnung ausreichender Antigenmengen für die Immunisierung zweier Mäuse. Nach Erhalt entsprechender Mindestmengen konnte diese ausgeführt werden. Einer ersten Maus wurde die Milz entnommen, die B-Lymphozyten gewonnen und eine Fusion mit Tumorzellen vorgenommen. Die erhaltenen Hybridome konnten in der Zellkultur vermehrt, einer ersten Selektion unterzogen und subkloniert werden. Einen weiteren und sehr aussagekräftigen Selektionsschritt zur Selektivitätsbestimmung der Antikörper verschiedener Zelllinien stellten die zahlreichen Western-Blots dar. Die einzelnen Zelllinien sollten bezüglich ihrer Selektivität für Proglycinin bzw.  $\beta$ -Conglycinin charakterisiert werden. Zur Etablierung eines Testsystems fiel die Wahl auf den Proglycinin-spezifischen Antikörper G17E. Dieser wurde auch in größeren Mengen im Miniperm-System gewonnen. In einer Protein A-Affinitätschromatographie konnte eine Aufreinigung erfolgen. Eine Immunaффinitätschromatographie mit dem Antikörper ermöglichte eine Gewinnung hochreinen Antigens, das zur Etablierung einer Kalibrationskurve im ELISA verwendet wurde. Diese Methodik zeichnet sich durch eine kurze Testdauer, einfache Präparation der Proben und eine hohe Sensitivität aus (Bauer und Gareis, 1989). Daraus folgend muß bei der Entwicklung eines Immunoassay-Protokolls

besonderes Augenmerk auf die Gewährleistung eben dieser Sensitivität aber auch der Selektivität gelegt werden (Kramer, 2002). Eine Biotinylierung von G17E war Ausgangspunkt der Entwicklung eines optimierten Detektionssystems im ELISA. Dabei wurde die natürliche Affinität zwischen Neutravidin und Biotin ausgenutzt. Ein nicht aufgereinigtes Soja-Extrakt diente dazu, die Wechselwirkung des Antikörpers mit dem in das gesamte Proteom eingebundenen Proglycinin zu beschreiben. Die Untersuchung möglicher kreuzreagierender Proteinstrukturen stellte einen weiteren, wichtigen Punkt bei der Charakterisierung des Antikörpers dar. Der Nachweis einer Epitopspezifität ermöglichte schließlich eine noch genauere Einordnung des immunchemischen Verhaltens von G17E.

## 4.2 Präparative Gelelektrophorese

Mit der präparativen Gelelektrophorese sollte die Voraussetzung für ein möglichst reines Immunogen gelegt werden. Die Aufreinigung stellte sich als sehr zeitaufwendig heraus. Gleichzeitig benötigte man für ausreichende Antigenmengen zur Erstimmunisierung einer Maus bis zu zehn Läufe. Trotz des Aufwands gelang es nicht, die Parameter der Aufreinigung so zu verändern, daß die beiden Proteinbanden von Proglycinin und  $\beta$ -Conglycinin getrennt werden konnten und trotzdem ausreichende Mengen zur Verfügung standen. Glücklicherweise konnte dieses Problem erfolgreich umgangen werden, indem beide Proteine in einem Gemisch für die Immunisierung verwendet wurden und erst später die Klone der Zellkultur bezüglich ihrer Spezifität für eines der beiden Antigene in einem Screening im Western-Blot zugeordnet wurden. Insgesamt gesehen stellte die präparative Gelelektrophorese eine durchaus geeignete Methode zur Aufreinigung von Proteinen dar. Eine entsprechende Apparatur war am Lehrstuhl bereits vorhanden. Die Einstellung der nötigen Parameter für den Lauf konnten unter Anwendung von Referenzpunkten aus einem Handbuch von Bio-Rad bewerkstelligt werden. Alternativen unter den gegebenen, methodischen Voraussetzungen wären eine präparative isoelektrische Fokussierung, die aus Kostengründen bei der Neubeschaffung nicht in Betracht gezogen wurde und das präparative Ausschneiden der entsprechenden Proteinbanden aus SDS-Gelen. Dieses Verfahren hätte allerdings weitere Reinigungsschritte zur Entfernung ungewünschter, bei der Immunisierung für die Mäuse zusätzlich toxischer Substanzen, erfordert. Zudem wären pro Bande nicht mehr als ca. 200 ng (maximale untere Nachweisgrenze bei Coomassie Färbung) zu gewinnen gewesen. Größere Mengen an Soja-Extrakt als Ausgangsmaterial hätten bloß ein Verschmieren oder eine Überlagerung der Banden bewirkt.

### 4.3 SDS-Gele

Die Herstellung geeigneter SDS-Gele basierte auf zum Teil bereits etablierten Protokollen. Aufbauend auf diesen konnten Variationen in Konzentration (vor allem von Acrylamid) und anderen Parametern wie Spannung, Stromstärke und Laufzeit vorgenommen werden. Zur Anfärbung der Gele wurde hauptsächlich auf die Silberfärbung zurückgegriffen. Ihre sehr viel sensitivere Nachweisgrenze (5-30 ng) im Gegensatz zur Coomassie-Färbung (200-400 ng) machte sie besonders bei der qualitativen Analyse der aufgereinigten Proglycininmengen zur Methode erster Wahl. Nebenbei wurde die India-Ink Färbung als einfache Färbemethode zur Anfärbung von auf Western-Blot transferierte Proteine verwendet. Der Vorteil dieser Anfärbung liegt im schnellen und unkomplizierten Ablauf (nicht mehrere Entwicklungsschritte nötig, siehe Kapitel 2.3)

### 4.4 Western-Blot

Der Western-Blot stellte in dieser Arbeit ein wichtiges Hilfsmittel bei der Auffindung von Proglycinin-spezifischen, Antikörper-produzierenden Zelllinien dar. In einem Semidry- Blot-Verfahren konnte auf einfache Art und Weise die Selektivität der Antikörper einzelner Zelllinien für einzelne Proteine nachgewiesen werden. Daß tatsächlich, wie in der theoretischen Grundüberlegung vor der Immunisierung vermutet, auch Zelllinien mit  $\beta$ -Conglycinin-spezifischen Antikörpern gebildet wurden, könnte sich für zukünftige Arbeiten als günstiger Startpunkt erweisen. Die Abdeckung mehrerer allergener Proteinstrukturen aus Soja mit spezifischen Antikörpern könnte sich als ein interessantes Fernziel herausstellen.

Die Etablierung geeigneter Parameter für die effektive, immunochemische Analyse der Spezifität von Antikörpern setzte allerdings eine aufwendige Vorbereitungsphase voraus. In zahlreichen Experimenten wurden die Konzentrationen der beteiligten Reaktanden variiert, Laufzeiten des Blotting-Verfahrens angepaßt und verschiedene Blockierungsmöglichkeiten (zeitlicher und qualitativer Natur) durchgespielt. So konnte z.B. die Erhöhung der Konzentration des Magermilchpuvers zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen auf der Blotting-Membran von 2% auf 4% (w/v) eine entscheidende Verminderung des Hintergrundrauschens bewirken.



## 4.5 Immunisierung

Eine erfolgreiche Immunisierung war eine wichtige Voraussetzung für die Gewinnung möglichst sensitiver und spezifischer Antikörper. Dementsprechend sorgfältig mußte sie mit jeweils genügenden Mengen an Immunogen ablaufen. Die aus der Immunisierungstabelle (siehe Tabelle 9) ersichtlichen zeitlichen Schwankungen hängen mit der nicht immer rechtzeitig vorhandenen Menge immunogenen, aufgereinigten Proteins zusammen. Die eigentliche, praktische Vorgehensweise bei der Immunisierung basierte auf Informationen aus entsprechender Literatur (Peters und Baumgarten, 1990) und den Erfahrungswerten am Lehrstuhl tätiger Mitarbeiter. Die in PBS gelösten Antigene, mußten mit einem Freund's Adjuvans vermischt werden. Der Zweck dieses Adjuvans ist eine Maximierung der Immunantwort durch eine verlangsamte Abgabe des Antigens an den Körper und somit eine optimale Exposition desselben. Das inkomplette Freund'sche Adjuvans (iFA) stellt eine einfache Wasser-in-Öl Emulsion, die aus dem in PBS gelösten Antigen, einem Mineralöl und einem Emulgator besteht. Die Zugabe von getrockneten und hitzeinaktivierten-*Mycobacterium-tuberculosis*-Erregern führt zum sogenannten kompletten Freund'schen Adjuvans (cFA). Eine Aktivierung der Makrophagen, Anlockung der Lymphocyten zum Antigen, verbesserte Antigenpräsentation und eine Depotbildung sind Gründe für eine optimale Wirkung des Adjuvans (Peters und Baumgarten, 1990). Bei der Erstimmunisierung empfiehlt sich zur Steigerung der Immunantwort eine Verwendung von cFA. Darauf folgende Immunisierungen sollten mit iFA durchgeführt werden (Hu *et al.*, 1989). Eine erfolgreiche Immunisierung muß normalerweise über mehrere Monate hindurch durchgeführt werden, da anfangs hauptsächlich IgM sezernierende B-Lymphocyten angeregt werden (Roitt *et al.*, 1987). In Gen-Segmenten, die für die Antigen-Bindungsseite codieren, kommt es zu Hypermutationen, die für die Affinitätsreifung des Antikörpers verantwortlich sind. Es werden affine B-Lymphocyten gebildet, die sich mit zunehmender zeitlicher Dauer der Immunisierung vermehrt teilen und eine höhere Affinität zum Antigen bewirken (Weinand, 1990).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die nicht immer ausreichend vorhandene Menge an aufgereinigtem Antigen und somit eine teilweise unregelmäßige Immunisierung ein limitierender Faktor im zeitlichen Ablauf der Immunisierung war. Trotz dieses Umstandes konnten allerdings nach relativ kurzen Perioden zufriedenstellende Immunreaktionen der Tiere erzielt werden. Neben den zeitlichen Verschiebungen beschränkte die geringe

Antigenmenge die Immunisierung auf zwei Tiere, was mit einem größeren Risiko verbunden war, tatsächlich aber den Ausgang des Projekts nicht gefährdete.

## 4.6 Zellkultur

Zur Gewinnung der für die Zellfusion nötigen B-Lymphozyten mußte zunächst einer Maus erfolgreich die Milz entfernt werden. Bei einem Scheitern der Fusion und einer erfolglosen Verwendung von eingefrorenen B-Lymphozyten hätte auf die zur Sicherheit weitergezogene Maus zurückgegriffen werden können. Die Maus konnte durch Genickbruch schnell getötet werden. Beim Herausschneiden der Milz war besonders darauf zu achten, daß es zu keinen größeren Verletzungen des Darms kam, was eine erhöhte Kontaminationsgefahr mit vor allem bakteriellen Keimen und Pilzen zur Folge gehabt hätte. Die B-Lymphozyten wurden unter Zuhilfenahme des Fusogens Polyethylenglykol mit der Myelomzelllinie PAI-B<sub>3</sub> Ag8I fusioniert. Die verwendete Myelomzelllinie zeichnet sich durch einen, wie bereits im praktischen Teil ausführlich beschriebenen, genetischen Defekt aus, der die Nukleinsäuresynthese beeinflusst und die Bildung des Enzyms Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) verhinderte. Dadurch war die Selektion auf einem Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin-Medium (HAT-Medium) in der Zellkultur möglich. Diese Zelllinie zeichnet sich zudem durch hohe Fusionsraten und einen besonders günstigen Wachstumsverlauf aus (Giersch, 1993b). Die Bestimmung der durch ein entsprechendes Protokoll von Roche empfohlenen Konzentration sowohl an Myelomzellen als auch an B-Lymphozyten erfolgte mit der Neubauer Zählkammer.  $10^8$  Milzzellen sollten idealerweise mit  $2 \times 10^7$  Myelomzellen in entsprechenden Volumina für die Fusion verwendet werden. Die als Fusionsprodukt erhaltenen Hybridome mußten in der Zellkultur einer HAT-Selektion unterzogen werden, um schnell wachsende, unfusionierte Myelomzellen selektiv abzutöten. Die tägliche Kontrolle der Zellkulturplatten war Garant für ein möglichst frühzeitiges Auffinden von sich rund ausbreitenden Zellpopulationen. Die Verwendung geeigneter Zellkulturmedien und der regelmäßige Wechsel derselben sicherte einen problemlosen Wachstumsprozeß der Zellen. Die einzelnen Kavitäten wurden parallel zu den kulturtechnischen Behandlungen einem Screening durch einen heterogenen, nicht kompetitiven ELISA unterzogen (siehe Kapitel 2.23, a). Kavitäten mit möglichst geeigneten Klonen, die sich durch eine hohe OD bei 450 nm auszeichneten, wurden in größere Zellkulturplatten umgesetzt, erneut getestet und weitervermehrt.

## 4.7 Screening der Zelllinien im Western-Blot

Die verschiedenen aus der Zellkultur durch Selektion erhaltenen Zelllinien mußten auf ihre Selektivität bezüglich Proglycinin getestet werden. Dazu wurden die Zellkulturüberstände zur Detektion einer im Western-Blot transferierten Proglycininbande verwendet (siehe Kapitel 2.4 und 3.5). Nebenbei konnten mit dieser Technik auch jene Zelllinien identifiziert werden, die eine spezifische Affinität für das Speicherprotein  $\beta$ -Conglycinin aus Soja zeigten. Diese Antikörper wurden allerdings aus Zeitgründen nicht weiters charakterisiert. Allerdings könnten auch sie in Zukunft ein interessantes Forschungsobjekt und Ausgangspunkt für verschiedenste Anwendungen (wie der entwickelte Proglycinin- Antikörper selbst) sein.

Die Zelllinie G17E wurde sehr spezifisch an die gewünschte Proteinbande Proglycinin gebunden und war damit prädestiniert, eine effektive Detektion des Allergens Proglycinin zu gewährleisten. Neben dieser Zelllinie wurden auch die Zelllinie G16C und 39.1 für die Entwicklung eine Sandwich-Elisas verwendet. Es war davon auszugehen, daß der Antikörper G17E nicht exakt die gleichen Epitope wie die beiden anderen Antikörper erkennen würde. Die Etablierung eines Sandwich-Systems mit einer hohen Sensitivität sollte somit eigentlich möglich sein, was allerdings aufgrund großen Hintergrundrauschens im ELISA nicht gelang. Große Standardabweichungen konnten nicht vermieden werden (siehe Abbildung 40). Eine ungünstige Blockierung (4% (w/v) Magermilchpulver und 4% (w/v) Tween) könnte neben falschen Konzentrationen sowohl des Primär- als auch des Sekundärantikörpers der Grund für das Fehlschlagen des Assays sein (siehe verwendete Konzentrationen verschiedener Reagenzien in Kapitel 2.23, c).

## 4.8 Massenproduktion in Zellkulturflaschen und im Miniperm

Der Antikörper G17E wurde massenproduziert, um für weitere Anwendungen in ausreichendem Maße vorhanden zu sein. Dazu bediente ich mich sowohl der 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen als auch des Miniperm-Systems, das sich auf unkomplizierte und dementsprechend schnelle Art und Weise für die Produktion größerer Mengen eignet, ohne jedoch mit für die industrielle Produktion verwendeten Fermentern vergleichbar zu sein. Problematisch bei der Produktion von Antikörpern im Miniperm ist die Kontaminationsgefahr. Die Module dürfen nicht mit Alkohol behandelt werden und das Abflammen von Deckeln und den verschiedenen Öffnungen ist nach Herstellerangaben (Greiner Bio-One GmbH, 2005) untersagt. In Summe konnte mit diesen beiden

Möglichkeiten der Massenproduktion eine beachtliche Menge von ca. 40 mg Antikörper gewonnen werden. Dabei konnte durchschnittlich eine Menge von bis zu 1 mg/ml bei einer Zellzahl von bis zu  $10^7$  Zellen/ml pro Ernte dem Bioreaktor entnommen werden. Im Vergleich dazu wurden bei Antikörpern gegen Triazin bei einer Zellzahl von bis zu  $1,2 \times 10^7$  Zellen/ml maximal 0,8-2 mg/ml gewonnen (Giersch und Schäpermeier, 1998), was einer größeren Produktionsleistung entspricht, doch durchaus zeigt, daß sich die Ausbeute an G17E in einem nicht ungewöhnlichen Toleranzbereich befand.

#### 4.9 Aufreinigung des monoklonalen Antikörpers G17E

Die Aufreinigung des monoklonalen Antikörpers erfolgte standardmäßig mit einer Protein-A Affinitätschromatographiesäule. Dabei nützt man die Affinität zwischen Protein A und verschiedenen Immunglobulinen darunter eben auch IgG- Molekülen aus. Dieses Verfahren stellte sich in der Handhabung als leicht zu bedienende und effiziente Methode heraus.

#### 4.10 Subklassenbestimmung von G17E

Die Bestimmung der Subklasse war ein wichtiger Schritt, um das IgG-Molekül als solches zu identifizieren und auch eine entsprechende Beschreibung vorhandener Untereinheiten zu erhalten. In einem ELISA-Format (siehe Kapitel 2.25 und 3.10) konnte die An- bzw. Abwesenheit verschiedener Subklassen nachgewiesen werden. Die Anwesenheit anderer Immunglobuline hätte auf einen nicht ausreichend klonierten oder aufgereinigten Antikörper hingewiesen und damit den Antikörper seiner monoklonalen Identität beraubt. Wie erwartet konnte allerdings die Immunglobulinklasse IgG bestätigt werden. Dieser Umstand war allerdings bereits durch die Verwendung des Ziege-Anti-Maus-IgG-Antikörpers im Zellkulturscreening gewährleistet. Die Subklasse IgG<sub>2b</sub> und eine  $\kappa$ -Leichtkette konnten als weitere charakterisierende Parameter nachgewiesen werden.

#### 4.11 Gewinnung von reinem Proglycinin

Die Gewinnung reinen Standard-Proglycinins war die Voraussetzung für die Etablierung einer Kalibrationskurve. Eine aufwendige Arbeit stellte dabei die kovalente Kopplung des monoklonalen Antikörpers an das NHS-aktivierte Sepharose Säulenmaterial dar. Zwei Methoden wurden zu diesem Zweck getestet. In einem Ansatz wurde der Antikörper mit dem

Säulenmaterial vorinkubiert, abgesättigt und dann in die Plastiksäule gegossen. Jeder dieser einzelnen Vorgänge wurde durch Zentrifugations- und Waschschriffe begleitet. In einem anderen Ansatz (schließlich auch dem verwendeten) wanderte der Antikörper in einem von einer Pumpe angetriebenen Pufferstrom über das bereits in eine Säule gegossene, aktivierte Sepharosematerial. Eine Absättigung mit geeigneten Puffern bewirkte ein Hydrolisieren der reaktiven Gruppen und damit den Verlust der Bindungsfähigkeit für die Antikörpermoleküle. Die Säule konnte im Kühlschrank bei 4 ° C längere Zeit und für mehrere Aufreinigungen des Antigens verwendet werden.

Zur eigentlichen Aufreinigung von Proglicinin diente ein das gesamte Proteom enthaltendes Soja-Extrakt als Ausgangsbasis. Der Antikörper konnte spezifisch die in einem Pufferstrom durch die Säule fließenden Proglicinin-Moleküle binden. Bei der Etablierung der experimentellen Vorgehensweise stellte sich heraus, daß das durchgelaufene Eluat mindestens zweimal erneut über die Säule laufen mußte, um den gewünschten Erfolg zu erzielen. Gleichzeitig mußten exzessive Inkubationszeiten vermieden werden, damit der gebundene Antikörper nicht zu sehr v.a. erhöhten Temperaturen und einer daraus folgenden Denaturierung zum Opfer fiel. Das Ergebnis der so durchgeführten Aufreinigungen konnte in einer SDS-PAGE dargestellt werden. Die Reinheit des Proglicinins wurde durch die hohe Sensitivität der Silberfärbung (Nachweisgrenze bei 5 ng) bestätigt. Neben den gewünschten Proglicinin-Banden konnten keine anderen Proteinstrukturen nachgewiesen werden. Insgesamt wurde eine Menge von 2 mg an reinem Antigen gewonnen, wobei etwa 500 µg für die Entwicklung einer Kalibrationskurve verwendet wurden.

#### 4.12 Etablierung der Immunoassays

Die Entwicklung entsprechender Test-Formate zum Nachweis von Proglicinin stellte einen zentralen Tätigkeitsbereich in dieser Arbeit dar. Besondere Wichtigkeit hatte dabei die Klärung von Qualität und Quantität bzw. Konzentration verschiedener Immunreagenzien, Analyten und Blockierungsmittel. Die Verwendung eines geeigneten Blockierungsmittels zur Eliminierung unspezifischen Hintergrundrauschens stellte sich dabei als besondere Herausforderung heraus. Mit der Verwendung von 4%igem MMP (w/v) mit 4% Tween (w/v) in PBS konnte jedoch eine sehr effektive Lösung des Problems gefunden werden. Die verschiedenen in der Arbeit beschriebenen ELISA-Protokolle sind die jeweils beste, experimentell optimierte Endversion von zahlreichen Verbesserungsschritten.

Ein heterogener, nicht kompetitiver ELISA war die Grundlage einer aussagekräftigen Kalibrationskurve. Das verwendete Protokoll war auch Voraussetzung für quantitative Bestimmungen von Proglycinin in einem Soja-Extrakt und Kreuzreaktivitätsmessungen mit verschiedenen Reagenzien. Der erhaltene Testmittelpunkt ( $IC_{50}$ -Wert) der Kalibrationskurve befand sich bei 13  $\mu\text{g/L}$ , die untere Nachweisgrenze ( $IC_{20}$ ) bei 1  $\mu\text{g/L}$  und die obere Nachweisgrenze ( $IC_{80}$ ) bei 96  $\mu\text{g/L}$ . Eine Beschreibung des Verhaltens von G17E bei Anwesenheit von in das gesamte Proteom von Soja integriertem Proglycinin lieferte aufschlußreiche Referenzpunkte für Proben, wie sie wohl in möglichen, anwendungsorientierten Testverfahren hps. vorkommen. Der Testmittelpunkt ( $IC_{50}$ -Wert) befand sich hier bei 107  $\mu\text{g/L}$ . Die untere Nachweisgrenze ( $IC_{20}$ ) lag unverändert bei 1  $\mu\text{g/L}$  und die obere Nachweisgrenze ( $IC_{80}$ ) stieg auf 989  $\mu\text{g/L}$ . Diese Veränderung des Testmittelpunkts und der oberen Nachweisgrenze läßt sich auf die veränderten Matrixbedingungen zurückführen.

#### 4.13 Quantifizierung von Antikörpern und Proteinen

Die Quantifizierung der Proteine und Antikörpermoleküle erfolgte hauptsächlich mit dem Photometer bei 280 nm. Es wurde eine standardmäßige Absorption von 1,4 für Antikörper und Proteine verwendet (Sheperd und Dean, 2000). Die möglichen Fehlerquellen bei solchen quantitativen Absorptionsmessungen betreffen vor allem evtl. unreine Proben, die zum Beispiel DNA-Moleküle enthalten können, Luftblasen und ungeeignete Lösungsmittel für die jeweiligen Proteine. Zudem muß darauf geachtet werden, daß die Referenz auch tatsächlich jene chemischen Komponenten enthält, die für ein mögliches Hintergrundrauschen verantwortlich sein könnten. Parallel dazu wurden die Ergebnisse durch grobe visuelle Konzentrationsabschätzungen über die Nachweisgrenze aus den Proteinbanden der SDS-Gele bestätigt. Der Versuch mit Hilfe des Bradford-Assays zu einer aussagekräftigen Quantifizierung der aufgereinigten Antigenmengen zu gelangen, funktionierte nur für größere Proteinmengen, da die Nachweisgrenze des Tests nicht entsprechend ausreichend war.

#### 4.14 Kreuzreaktivität

Die Bestimmung der Kreuzreaktivität ist ein unumgänglicher Parameter bei der exakten Charakterisierung eines monoklonalen Antikörpers. Dabei wird die Wechselwirkung des Antikörpers mit vor allem strukturell und in der Sequenz sehr ähnlichen Substanzen (hier Proteinen) beschrieben. Eine genauere Definition grundlegender Parameter und eine

Auflistung der Meßbedingungen der absolvierten Kreuzreaktivitätsversuche wurde im Methoden- als auch im Ergebnisteil eingehend erläutert. Bei den Ergebnissen läßt sich feststellen, daß das Biosoja-Produkt eine hohe Kreuzreaktivität aufweist, was allerdings durchaus plausibel erscheint, da es sich natürlich auch bei dieser Substanz um ein zur Bezugssubstanz nahezu identisches, Proglycinin enthaltendes Soja-Extrakt handelt. Die befürchtete starke Kreuzreaktivität zur Erdnuß, die auf spezifischen, zu Soja sequenzgleichen Epitopen hätte beruhen können (Beardslee *et al.*, 2000), fand in den erhaltenen Ergebnissen keine Bestätigung.

#### 4.15 Epitopmapping

Eine genauere Betrachtung der Epitopspezifität stellte eine Möglichkeit dar, die tatsächlich monoklonale Natur des Antikörpers durch eine weitere Bestätigung zu unterstreichen. Gleichzeitig war es damit möglich, die Fähigkeit des Antikörpers allergene Sequenzen zu erkennen, in einem ELISA nachzuweisen. Ziel war es, die spezifische Bindung des Antikörpers an allergene Sequenzen (Beardslee *et al.*, 2000) zu bestätigen. Die bereits beschriebenen Epitope A1, B1 und ein Kontroll-Peptid 3 wurden in einem eigens etablierten Sandwich-ELISA bezüglich ihrer Bindungsfähigkeit an den Antikörper G17E getestet. Es stellte sich heraus, daß eine dominierende Affinität zum Epitop A1 bestand. Das Hintergrundrauschen im Sandwich-ELISA konnte durch den Einsatz eines geeigneten Ziege-Anti-Maus-Primärantikörpers erfolgreich auf eine nicht signifikante Ebene reduziert werden. Zudem stellte sich heraus, daß die etwas hydrophilere Natur von Peptid 3 zu keinen unerwünschten Randsignalen führte und deshalb dieses Peptid als Kontroll-Peptid geeignet war.

#### 4.16 Anwendungsmöglichkeiten des Antikörpers G17E

Als mögliche Anwendungsgebiete des Antikörpers und der hier entwickelten Detektionssysteme könnten vor allem zwei Bereiche in Frage kommen. Einerseits wären zahlreiche Verwendungszwecke in der Allergiediagnostik vorstellbar. Andererseits könnten damit zusammenhängend effektive Ansätze zum Nachweis allergener Sequenzen in Lebensmitteln bewerkstelligt werden. Mittlerweile sind nach Aussagen des Deutschen Allergie- und Asthmabundes fünf bis sieben Prozent der Bevölkerung von Nahrungsmittelallergien betroffen (Aus: <http://www.daab.de/nahrung.php>). In der von der EU initiierten

Novel Food Verordnung aus dem Jahre 1997 wird bereits auf die Notwendigkeit hingewiesen, vor allem das Inverkehrbringen von gentechnisch veränderten Lebensmitteln zu regeln. Zudem sollten Lebensmittel mit neuartigen chemischen Strukturen und verschiedenen neuen Herstellungsprozessen aber auch Produkte mit allergenem Potential gekennzeichnet und etikettiert werden (Jany *et al.*, 1997). Dazu müssen allerdings geeignete Detektionsmethoden und Nachweisverfahren etabliert werden. Der in dieser Arbeit entwickelte Antikörper würde sich besonders in der Detektion des spezifischen Antigens Proglycinin in Biosensoren eignen. Über die Möglichkeit der Anwendung von Antikörpern als Bindungsproteine in Biosensoren wurde in der Literatur hingewiesen (Hock *et al.*, 2002). Biosensoren sind Geräte, die ein mit einem Transducer-System verbundenes biologisches Element (z.B. Antikörper) zur Generierung eines Meß-Signals verwenden. Die Stärke des Signals ist dabei proportional zur Konzentration eines durch den Antikörper gebundenen Liganden (Campbell, 1991).

Die bereits erwähnte Anwendungsmöglichkeit des Antikörpers in der Allergiediagnostik ist vor allem indirekter Natur. Das mit dem Antikörper aufgereinigte Proglycinin könnte bei der Anamnese zur Erstellung einer aussagkräftigen und sehr spezifischen Diagnose verwendet werden. Die bereits in der Einleitung erwähnten und kurz beschriebenen Diagnoseverfahren wie der Prick-Test, Epi- und Intrakutantests und der Reibetest wären hier sicherlich ein geeignetes Anwendungsgebiet.



## 5 Zusammenfassung

Die zunehmende Notwendigkeit im Interesse von Allergikern verschiedene Lebensmittel im Hinblick auf ihr allergenes Potential sichtbar und für jeden verständlich zu beschreiben, setzt die Entwicklung dementsprechender Detektionsmethoden voraus. Zudem ist in der medizinischen Diagnostik die Verfügbarkeit von Allergenen in hochreiner Form von entscheidender Bedeutung. In der hier vorliegenden Arbeit wurde sowohl ein gegen das Allergen Proglycinin (aus Soja) gerichteter, monoklonaler Antikörper entwickelt als auch durch ihn gebundenes Antigen in hochreiner Form erhalten.

Dazu wurde zunächst in einer präparativen Gelelektrophorese das Antigen aus einem Soja-Extrakt gewonnen. Über eine präparative SDS-PAGE wurden zwei Proteinbanden isoliert, die in der massenspektrometrischen Untersuchung als Proglycinin und  $\beta$ -Conglycinin identifiziert werden konnten. Da eine weitere Auftrennung der massenmäßig eng nebeneinander liegenden Proteine (53,61 kDa Molekulargewicht bei Proglycinin und 47,89 kDa bei  $\beta$ -Conglycinin) mit hohem methodischen und zeitlichen Aufwand verbunden gewesen wäre, wurden zwei CD-1 Mäuse mit einer Mischung beider Proteine immunisiert. Die aus der Milz der Mäuse extrahierten B-Lymphozyten wurden mit PAI-B<sub>3</sub> Ag8I-Myelomzellen fusioniert und die entstandenen Hybridome vermehrt und kloniert. Zelllinien, die Antikörper unterschiedlicher Spezifität gegen die beiden Soja-Proteine sezernierten, konnten im Screening mit Western-Blot identifiziert werden. Bei Zellkulturen, die eine Entwicklung entweder Pro- oder  $\beta$ -Conglycinin-spezifischer Zelllinien ermöglichten, konnten zwei gegen diese Proteine gerichtete Antikörper generiert werden. Die Antikörper gegen  $\beta$ -Conglycinin konnten im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht charakterisiert werden. Künftige Arbeiten mit diesen Zelllinien dürften allerdings zufriedenstellende Möglichkeiten für den Nachweis dieses Speicherproteins aus Soja ergeben.

Im Anschluß an die Auswahl einer Proglycinin-selektiven Zelllinie erfolgte eine Massenproduktion des entsprechenden Antikörpers G17E im Zellkulturfermenter miniPERM. Dabei konnte ein Ertrag von 40 mg an Antikörper erzielt werden. Eine Affinitätschromatographische Aufreinigung mit einer Protein-A Säule gewährleistete die Produktion einer möglichst von Fremdproteinen aus der Zellkultur freien Antikörperlösung. Diese Antikörper dienten in einer Immunaффinitätschromatographie als kovalent an NHS-aktivierte Sepharose gebundene Bindungspartner für Proglycininmoleküle. Diese konnten aus Soja-Extrakten extrahiert und mit Hilfe eines Citratpuffers (pH 3) von der Säule eluiert werden.

Eine Menge von 10 mg des Antikörpers wurde biotinyliert und für die Entwicklung eines ELISAs zum quantitativen Nachweis von in der Immunaффinitätschromatographie gewonnenem Proglycinin verwendet (die Ausgangsbasis für die Entwicklung einer Standardkurve). Ein heterogenes, nicht kompetitives ELISA-Format erwies sich als geeignetes quantitatives Nachweisverfahren für das allergene Proglycinin. Die Detektion unter Ausnutzung der natürlichen Affinität zwischen Biotin (über den biotinylierten Antikörper) und Neutravidin konnte als besonders geeignetes Verfahren identifiziert werden. Die untere Nachweisgrenze im optimierten ELISA beträgt 1 µg/L. Der Testmittelpunkt liegt bei 13 µg/L. Versuche zur Kreuzreaktivität mit verschiedenen auf gleiche Art und Weise extrahierten Protein-Extrakten bestätigten eine sehr spezifische Bindungsfähigkeit des monoklonalen Antikörpers G17E für Proglycinin. Eine Bestimmung der Subklasse und des Leichtkettentyps (Subklasse IgG<sub>2b</sub> und κ-Leichtkette) stellte einen weiteren Charakterisierungsschritt des Antikörpers G17E dar. Durch Epitopmapping konnte schließlich eindeutig die spezifische Affinität des Antikörpers G17E für ein allergenes Epitop von Proglycinin bestätigt werden.

## 6 Literatur

ADACHI, M., KANAMORI, J., MASUDA, T., YAGASAKI, K., KITAMURA, K., MIKAMI, B., UTSUMI, S. (2003) Crystal structure of soybean 11 S globulin: Glycinin A3B4 homo-hexamer. PNAS. 100: 7395-7400

AMERSHAM BIOSCIENCES EUROPE GMBH (1999) Protein Electrophoresis Technical Manual. Freiburg

ARGOS, P., NIELSEN, N.C. (1985) Structural similarity between legumin and vicilin storage proteins from legumes. Embo Journal. 4: 1111-1117

BAUER, J., GAREIS, M. (1989) Analytical methods for mycotoxins. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 96: 346-50

BEARDSLEE, T.A., ZEECE, M.G., SARATH, G., MARKWELL, J.P. (2000) Soybean glycinin G1 acidic chain shares IgE epitopes with peanut allergen Ara h 3. International Archives of Allergy and Immunology. 123: 299-307

BERNHARDT, R., HANNEMANN, F., HWANG, K. (2006) Grundpraktikum Biowissenschaften für Bioinformatiker ([http://209.85.135.104/search?q=cache:SK2eTet-z\\_QJ:www.unisaarland.de/fak8/heinzle/de/teaching/GrundPraktikum\\_Bioinf/V4\\_Bernhardt\\_2006.pdf+diskontinuierliche+proteinelektrophorese+im+sds+polyacrylamidgel&hl=de&ct=clnk&cd=2](http://209.85.135.104/search?q=cache:SK2eTet-z_QJ:www.unisaarland.de/fak8/heinzle/de/teaching/GrundPraktikum_Bioinf/V4_Bernhardt_2006.pdf+diskontinuierliche+proteinelektrophorese+im+sds+polyacrylamidgel&hl=de&ct=clnk&cd=2)) Stand: 23.01.2007

BIORAD (2000) Model 491 Prep Cell Instruction Manual. München

BRADFORD, M.M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254

BROCKHAUS, F.A. GmbH (1984) Der neue Brockhaus-Lexikon u. Wörterbuch in fünf Bänden. Neue Stalling GmbH, Oldenburg

CAMPBELL, A.M. (1991) Monoclonal antibody and immunosensor technology. Elsevier Science Publishers, Amsterdam

CHRISPEELS, M.J., HIGGINS, T.J.V., SPENCER, D. (1982) Assembly of storage protein oligomers in the endoplasmic reticulum and processing of the polypeptides in the protein bodies of developing cotyledones. *Journal of Cell Biology*. 93: 306-313

CLAVERIE, J.M., NOTREDAME, C. (2003) *Bioinformatics for Dummies*. Wiley Publishing Inc., New York

COLLER, H., COLLER, B. (1983) Poisson statistical analysis of repetitive subcloning by the limiting dilution technique as a way of assessing hybridoma monoclonality. In: "Methods in Enzymology", J.J., Langone, H., Van Vunakis (Hrsg.), Academic Press, New York, 412-417

CONSCIENCE, J.F., FISCHER, F. (1985) An improved preservation technique for cells of hemopoietic origin. *Cryobiology*. 22: 495-498

DEUTSCHER ALLERGIE- UND ASTHMABUND e.V.-NAHRUNGSMITTEL ALLERGIE (2007) *Nahrungsmittel-Allergie* (<http://www.daab.de/nahrung.php>) Stand: 23.01. 2007

DUDLEY, R.A., EDWARDS, P., EKINS, R.P., FINNEY, D.J., MC KENZIE, I.G.M., RAAB, G.M., RODBARD, D., ROGERS, R.P.C. (1985) Guidelines for immunoassay data processing. *Clinical Chemistry*. 31: 1264-1271

GASSEN, H.G., SCHRIMPF, G. (1999) *Gentechnische Methoden*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

GIERSCH, T. (1993a) A new monoclonal antibody for the sensitive detection of atrazine with immunoassay in microtiter plate and dipstick format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41: 1006-1011

GIERSCH, T. (1993b) *Monoklonale Antikörper für die Umweltanalytik-Herstellung und Anwendung monoklonaler Antikörper gegen Triazinherbizide*. Habilitationsschrift, Fakultät

für Landwirtschaft und Gartenbau, Technische Universität München in Freising-Weihenstephan

GIERSCH, T., SCHÄPERMEIER, S. (1998) Monoclonal antibody production in serum-free medium. GIT International Edition. 1: 113-117

GREINER BIO-ONE (2005) Instruction Manual Miniperm. Frickenhausen

HEMPELMANN, E., KAMINSKY, R., (1986) Electrophoresis. 7: 481-481

HOCK, B., SEIFERT, M., KRAMER, K. (2002) Engineering receptors and antibodies for biosensors. Biosens. Bioelectron. 17: 239-49

HU, J.G., DIE, A., YOKOYAMA, T., KITAGAWY, T. (1989) Studies on the optimal immunization schedule of mouse as an experimental animal. The effect of antigen dose and adjuvant type. Chemical Pharmaceutical Bulletin. 37: 3042-3046

JALIL, M.E. (1971) Sojabohne. In: Handbuch der Landwirtschaft und Ernährung in den Entwicklungsländern. P. v. BLANCKENBURG, H.D. CREMER (Hrsg.), Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 371-378

JANEWAY, C.A., TRAVERS, P., WALPORT, M., SHLOMCHIK, M. (2002) Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH (Gustav Fischer), Heidelberg, Berlin

JANY, K.L., KIENER, G., TOMICIC, G., GREINER, R. (1997) Novel Food Verordnung (EC) Nr. 258 / 97 Kennzeichnung und Nachweisverfahren von neuartigen Lebensmitteln. Molekularbiologisches Zentrum der Bundesforschungsanstalt für Ernährung (Wissenschaftskreis Grüne Gentechnik). Karlsruhe

KÖHLER, G., MILSTEIN, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 256: 495-497

KRAMER, K. (2002) Evolutionary affinity and selectivity optimization of a pesticide-selective antibody utilizing a hapten-selective immunoglobulin repertoire. *Environ. Sci. Technol.* 36: 4892-8

LÖFFLER, G. (1999) *Basiswissen Biochemie*. Springer-Verlag, Berlin

MARUYAMA, N., ADACHI, M., TAKAHASHI, K., YAGASAKI, K., KOHNO, M., MOREIRA, M.A., HERMODSON, M.A., LARKINS, B.A., NIELSEN, N.C. (1979) Partial characterization of the acidic and basic polypeptides of glycinin. *Journal of Biological Chemistry*. 254: 9921-9926

MORTIMER, C.E. (1996) *Chemie: Das Basiswissen der Chemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

MÜLLER, U., WEBER, W., HOFFMANN, A., FRANKE, S., LANGE, R., VIETHS, S. (1998) Commercial soybean lecithins: a source of hidden allergens? *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung*. 207: 341-351

ORTHOEFER, F.T. (1978) Processing and Utilization. In: *Soybean Physiology, Agronomy and Utilization*. A.G. NORMAN (Hrsg.), Academic Press, New York, 219-246

OSBORNE, T.B. (1924) *The Vegetable Proteins*. Longmans, New York

PADLAN, E.A. (1994) Anatomy of the antibody molecule. *Molecular immunology*. 31: 169-217

PATEL, R., BROWN, J.C. (1984) Hybridoma preservation at -70°C: a simple and economical procedure for the short-term storage and individual recovery of hybridomas. *Journal of Immunological Methods*. 71: 211-215

PETERS, J.H., BAUMGARTEN, H. (1990) *Monoklonale Antikörper-Herstellung und Charakterisierung*. Springer-Verlag, Berlin

PIERCE (2006) *Instructions EZ-Link Sulfo-NHS-Biotinylation Kit*. Rockford

POEHLMAN, I.M. (1979) Breeding Field Crops. Avi Publishing Company, Westport/ Connecticut

RODBARD, D., HUTT, D.M. (1974) Statistical analysis of radioimmunoassays and immuno-radiometric (labelled antibody) assay: A generalized weighted, iterative, least-squares method for logistic curve fitting. In: Radio-immunoassay and related procedures in Medicine, Vol.1, International Atomic Energy Agency, Wien, 165-192

ROITT, I.M., BROSTOFF, J., MALE, D.K. (1987) Kurzes Lehrbuch der Immunologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

SCHUSTER, W. H. (2000) Sojabohne. In: Leguminosen zur Kornnutzung. W.H. SCHUSTER (Hrsg.), J. ALKÄMPER, R. MARQUARD, A. STÄHLIN, L. STÄHLIN (<http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2000/320/>) Stand: 23.01.2007

SCHWARZ, S. (1999) Labordiagnostische Methoden. STUDIA, Innsbruck

SDI (Stand 2005) Soja RUR Kit User's Guide 7099999, Newark (USA)

SHEPHERD, P., DEAN, C. (2000) Monoclonal Antibodies. Oxford University Press, Oxford

SHEWRY, P.R., TATHAM, A.S. (1990) The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. Biochemistry Journal. 267: 1-12

SHI, Q., JACKOWSKI, G. (1998) One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach. B.D. HAMES (Hrsg.) Oxford University Press, Oxford

STASWICK, P.E., HERMODSON, M.A., NIELSEN, N.C. (1984) Identification of the cystines that link the acidic and basic components of the glycin subunits. Journal of Biological Chemistry. 259: 13431-13435

TAKENAKA, Y., OKUDA, E., NAKAGAWA, S., MIKAMI, B., UTSUMI, S. (2001) Crystal structures of recombinant and native soybean  $\beta$ -Conglycinin  $\beta$  homotrimers. Eur. J. Biochem. 268: 3595-3604

TIJSEN, P. (1985) Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology-practice and theory of enzyme immunoassays. Elsevier Science Publishers, Amsterdam

WEINAND, R.G. (1990) Somatic Mutation, affinity maturation and the antibody repertoire: A computer model. Journal of theoretical Biology. 143: 343-382

WELLS, D.E., BIBB, W.F. (1986) A method for freezing hybridoma clones in 96-well microculture plates. Methods in Enzymology. 121: 417-422

WIKIPEDIA (2006) Allergie (<http://de.wikipedia.org/wiki/Allergie>) Stand: 13.07.2006



## 7 Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich beim Leiter des Instituts für Zellbiologie Herrn Prof. Dr. Bertold Hock bedanken, der mir die Möglichkeit gab, mich mit dieser interessanten, wissenschaftlichen Thematik zu befassen. Die stets wohlwollenden Ratschläge und Tips trugen sehr zur erfolgreichen Klärung zahlreicher fachlicher Problemstellungen bei.

Ein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Karl Kramer, der als Doktorvater stets bemüht war, mit Zuckerbrot und Peitsche das Gelingen der Arbeit zu gewährleisten. Seine zahlreichen Ratschläge und konstruktive Kritik ermöglichten ein zügiges und effektives Vorankommen bei verschiedensten Fragestellungen und den Erhalt aussagekräftiger Ergebnisse.

Überaus dankbar bin ich dem Lehrstuhl für Proteomik der TU München unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Dr. Angelika Görg. Die dort vorgenommene massenspektrometrische Untersuchung meiner Produkte aus der präparativen Gelelektrophorese durch Herrn Dr. Gerold Reil war Garant für ein Weiterkommen in einer essentiellen Fragestellung.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Ralph Lausterer, der mich in die praktische Entwicklung monoklonaler Antikörper einweihte. Seine hilfsbereite und unkomplizierte Art ermöglichten einen schnellen Einstieg in die wissenschaftliche Arbeitsweise.

Herrn Dr. Holger Geue danke ich für die hilfreiche Einführung in die biochemische Methodik.

Besonders hervorheben und mich bei ihr bedanken möchte ich Frau Andrea Hubauer, die mich mit großem Engagement beim Arbeiten in der Zellkultur unterstützte und zudem den reibungslosen Ablauf bürokratischer Aufgaben gewährleistete.

Keinesfalls vergessen möchte ich die hilfsbereite und zuvorkommende Art von Frau Michaela Krötz-Fahning.

Weiters bedanke ich mich bei allen am Lehrstuhl für Zellbiologie tätigen Dissertanten: Martin Alberti, Kathrin Huber, Ulf Kausch, Carolin Kraft, Katja Neuberger, Julia Wiebe, Nicola Wolf. Ihre mir gegenüber stets entgegenkommende Haltung ermöglichte ein angenehmes

Arbeitsklima. Außerdem bewirkte der fachliche Austausch von Erfahrungswerten neue Sichtweisen und Ideen bei verschiedenen Problemen fachlicher Natur.

Erwähnen möchte ich zudem die Unterstützung meiner Arbeit durch Praktikanten, Bachelorstudenten und Diplomanden. Besonders hervorzuheben sind dabei Herr Simon Leuchs und Herr Achim Schäffauer. In Teamarbeit konnten zu einem entscheidenden Zeitpunkt gegen Ende der praktischen Arbeit zahlreiche protokollarische Verbesserungen und daraus resultierend, überzeugende Ergebnisse gemeinsam erzielt werden.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie für die Unterstützung in den gesamten Jahren der beruflichen Ausbildung bedanken.