

2. BIOSENSOR SYMPOSIUM

TÜBINGEN 2001

<http://barolo.ipc.uni-tuebingen.de/biosensor2001>

Epitop-Mapping der Transglutaminase mit paralleler markierungsfreier

Detektion

K. Kröger¹, J. Bauer², F.von der Muelbe², Dr. B. Fleckenstein², G. Jung², G. Gauglitz¹
Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Universität Tübingen¹, Auf der Morgenstelle 8,
D-72076 Tübingen
Institut für Organische Chemie, Universität Tübingen², Auf der Morgenstelle 18, D-72076 Tübingen
Tel. 07071-29-73048

kerstin.kroeger@ipc.uni-tuebingen.de www.barolo.ipc.uni-tuebingen.de/

Registriernummer der Online-Anmeldung: 147

Poster

Glidine aus dem Glutenprotein des Weizen sind Auslöser der Autoimmunerkrankung Zöliakie. Das Immunsystem entwickelt Antikörper gegen einen Antigenen Komplex aus Gliadin und Gewebs-Transglutaminase [1]. Ein schneller diagnostischer Test zum frühestmöglichen Zeitpunkt durch Nachweis des bei Zöliakie-Patienten verstärkt auftretenden Antikörpers gegen Gewebs-Transglutaminase im Blutserum ist wünschenswert. Zur Entwicklung eines klinischen Tests auf Grundlage eines Chips wurde zunächst ein Epitopfeinmapping durchgeführt, dessen Ergebnisse als Grundlage für Seren-Untersuchungen dienen sollen. Hierzu wurde eine parallele markierungsfreie Detektion beruhend auf der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie gewählt. Der Vorteil liegt u.a. darin, ohne Markierung auszukommen und so die Bindungseigenschaften der zu untersuchenden Spezies nicht zu beeinflussen. Es wird ein bildgebendes Verfahren eingesetzt, die direkte Abbildung des Transducers auf einen flächenhaften CCD-Detektor. Hierzu erfolgt eine sequentielle Aufnahme des Chips bei sechs verschiedenen Wellenlängen. Dies wird durch ein Filterrad mit Interferenzfiltern realisiert. Aus der Bestimmung der Intensität für jede Wellenlänge und jede Probenposition lässt sich das Interferogramm und somit die optische Schichtdicke für jede Probenposition berechnen. Es wird eine Auflösung von 20 pm Schichtdicke erreicht, was einer Belegung von etwa 50 pg/mm² entspricht. Dies sind weniger als 1 % einer Protein-Monolage [2].

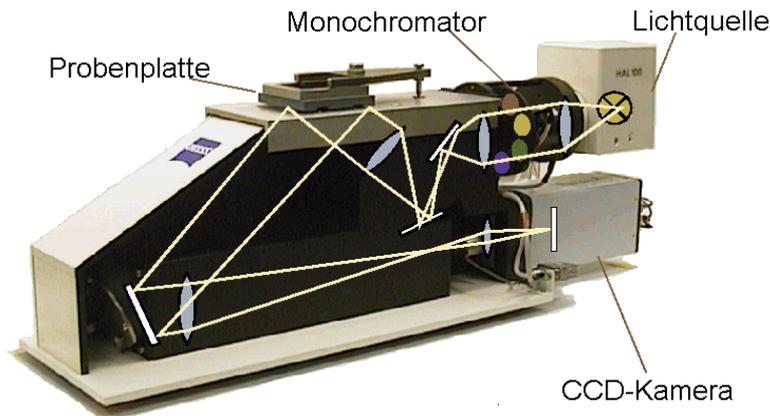


Abb. 1: Aufbau des parallelen RfS-Prototypen

Ein zuvor im ELISA auf Bindung des Antikörpers getestetes Peptid wurde auf dem gesamten Chip immobilisiert. Mit der Transglutaminasebindungsstelle des untersuchten Antikörpers wurde ein Epitopmapping durchgeführt. Eingesetzt wurden 15 mer Peptide, die Sequenz wurde jeweils um eine Aminosäure verschoben. Dies ergab 21 unterschiedliche Peptide. Für den kompetitiven Assay wurden 5 $\mu\text{g/ml}$ Antikörper und jeweils 20 $\mu\text{g/ml}$ des entsprechenden Peptides vorgelegt. Diese wurden mit dem parallelen RfS-System als Inhibierungstest vermessen. Die Peptide 5-12, die beim ersten Versuch inhibiert wurden, wurden nochmals mit dem Screening-Modul mit einer geringeren Peptidkonzentrationen inhibiert. Für diese 8 Peptide wurde eine jeweils eine Dreifachbestimmung in drei unterschiedlichen Wells gewählt, so dass insgesamt 24 Wells von den 96 benötigt wurden. Die Bindungskurven zeigen eine gute Homogenität der Platte (Abb.2 links).

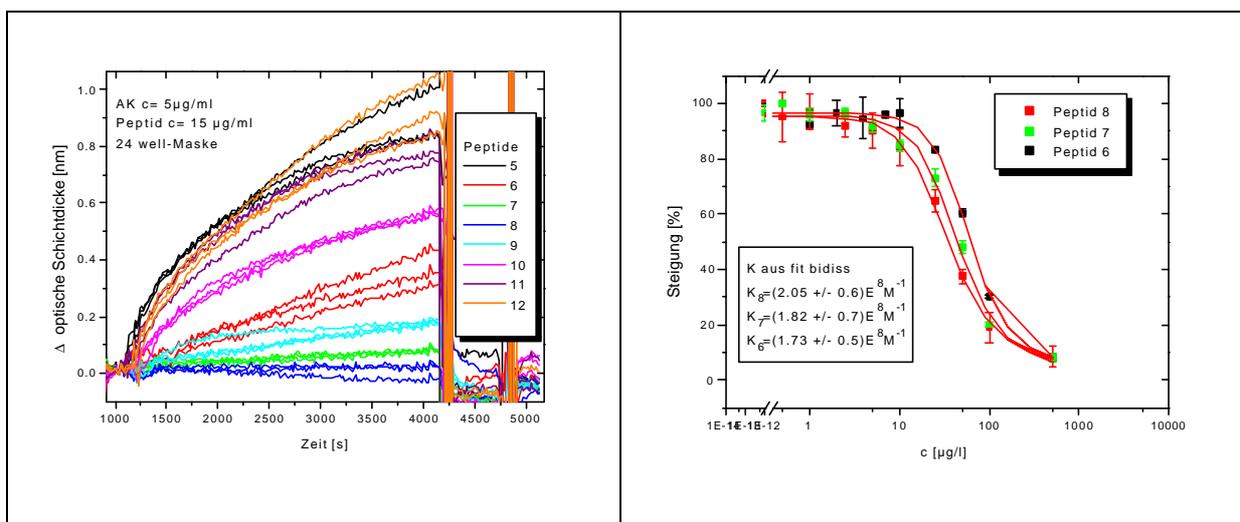


Abb.2: Epitopmapping links Messungen im Screeningmodul, rechts Messungen im Einkanalsystem

Bei einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ Antikörper und einer Peptidinhibitorkonzentration von 15 $\mu\text{g/ml}$ konnte eindeutig die stärkste Inhibierung mit dem Peptid 8 verzeichnet werden. Von Peptid 6,7 und 8 wurden dann im hochauflösenden RfS-Einkanalsystem [3] die Affinitätskonstanten im Bindungshemmttest quantitativ über Konzentrationsreihen bestimmt (Abb.2: rechts). Die Messungen belegen die Aussagekraft der parallelen Detektionseinheit: Je stärker die am parallelen System

gemessene Inhibierung, desto höher wird die Affinität im Einkanalsystem (3) bestimmt. Ein weiterer Vorteil ist, dass ohne Änderung des Assays von semiquantitativen Messungen im Screening-Modul direkt zum hochauflösenden quantitativen Einkanalsystem übergegangen werden kann. In diesem Fall wurden aus 21 Peptiden in nur drei Versuchen das Peptid mit der höchsten Affinität gefunden und die Affinitätskonstante mit $2,05 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ bestimmt. Somit konnte das gesamte Epitop der Transglutaminase für diesen Antikörper untersucht werden und ein Beitrag zum Aufschluß über den vermuteten Mechanismus der Bildung des antigenen Komplexes für die B-Zell-Differenzierung geleistet werden.

Literatur

- [1] Marsh, M.N., Nature Medicine, 1997, 3, 725-726
- [2] Rothmund, M., Brecht, A., Berthel, G., Gräfe, D., Schütz, A., Gauglitz, G. (1997) *Fresenius J. Anal. Chem.* 359, 15-22
- [3] Schmitt, H.-M. , Brecht A., Piehler,J., Gauglitz, G., (1997) *Biosen. & Bioelectron.* 12, 219 - 233

- [a] <http://www.barolo.ipc.uni-tuebingen.de/projects/librarian/index.html/>