

**MINIATURISIERTE UND PARALLELISIERTE ASSAYSYSTEME
ZUR CHARAKTERISIERUNG VON BINDEMOLEKÜLEN:
ENTWICKLUNGEN FÜR DEN NACHWEIS
TUMORRELEVANTER MARKERPROTEINE**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2005

vorgelegt von

Jochen M. Schwenk

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2005

Dekan: Prof. Dr. S. Laufer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. S. Stevanović
2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Schwarz

Wenn A für Erfolg steht, gilt die Formel

$$A = X + Y + Z.$$

X ist Arbeit, Y ist Muße und Z heißt Mundhalten.

(Albert Einstein)

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	III
ABKÜRZUNGEN	IV
1. EINLEITUNG	1
1.1 Protein-Mikroarraytechnologie	1
1.1.1 Prinzip der miniaturisierten Ligandenbindungsassays	3
1.1.2 Assaysysteme für Protein-Mikroarrays	5
1.1.3 Bindemoleküle für Protein-Mikroarrays	6
1.1.4 Oberflächen zur Immobilisierung von Proteinen	8
1.1.5 Signalgenerierung – Modifikationen und Nachweisreaktionen	9
1.1.6 Mikroarray-Plattformen	10
1.2 BMBF-Förderprojekt pepART	12
1.3 Applikationsgebiet Brustkrebs	13
1.3.1 Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren	14
1.3.2 EGFR	16
1.3.3 Her2	17
2. ZIELSETZUNG	19
3. MATERIALIEN UND METHODEN	20
3.1 Materialien	20
3.1.1 Geräte, Mikrotiterplatten und Software	20
3.1.2 Chemikalien und Puffersysteme	22
3.1.3 Antikörper und Fängermoleküle	23
3.1.4 Peptide, Proteine und Proben	26
3.2 Biochemische und zellbiologische Methoden	29
3.2.1 Proteinbestimmung nach Bradford	29
3.2.2 SDS-Gelelektrophorese	29
3.2.3 Zellkultur	30
3.2.4 Kopplung von cysteinhaltigen Peptiden an Proteine	31
3.2.5 Proteinextraktion	31
3.3 Peptidsynthese	32
3.3.1 Automatisierte multiple Festphasenpeptidsynthese	33
3.3.2 Einführung von Modifikationen an Aminogruppen	34
3.3.3 Nachweis freier Aminogruppen nach Kaiser	35
3.3.4 Abspaltung der Peptide von den polymeren Trägern	35
3.3.5 Lagerung und Lösen von Peptiden	36
3.4 Qualitätskontrolle der Peptidsynthese	36
3.4.1 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie	36
3.4.2 <i>High performance liquid chromatography</i> (HPLC)	37
3.4.3 Präparative HPLC	38
3.5 Methoden zur Herstellung von Mikroarrays	39
3.5.1 Herstellung von Zell-Mikroarrays	39
3.5.2 Luminex <i>Beads</i> - Beladung und Kontrolle	40
3.6 Zell-Mikroarrays	44
3.6.1 Durchführung von Assays und Immunfluoreszenzmikroskopie	44
3.6.2 Signalanalyse planarer Mikroarrays: Auslesen und Erfassen	45
3.7 Bead-basierende Assaysysteme	45
3.7.1 Charakterisierung peptidspezifischer Antikörperfragmente	46
3.7.2 Multiparametrisches Screening zur Antikörperselektion	50
3.7.3 Ligandenbindungsassay zum Nachweis von EGFR	54

3.7.4	Ankyrine als Fängermoleküle zum Nachweis von Her2.....	55
3.7.5	Auswertung und statistische Analyse.....	56
4.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	62
4.1	Antikörpercharakterisierung mit Zell-Mikroarrays	62
4.1.1	Bestimmung der Übertragungsrate von Zellen	63
4.1.2	Erste Tests von gedruckten Zell-Mikroarrays	65
4.1.3	Anwendung gedruckter Zell-Mikroarrays zur Antikörpercharakterisierung	67
4.1.4	Zusammenfassende Diskussion	69
4.2	Entwicklung bead-basierender Assaysysteme zur Charakterisierung peptidspezifischer Antikörper	71
4.2.1	Affinitätsbestimmung: Entwicklung und Durchführung.....	73
4.2.2	Multiparametrische Epitopkartierung: Beschreibung des Bindungsbereiches peptidspezifischer Antikörper	78
4.2.3	Analyse immobilisierter Fängermoleküle zur Bestimmung von Nachweisgrenzen für Antigene	86
4.2.4	Zusammenfassende Diskussion	Fehler! Textmarke nicht definiert.
4.3	PepART-Projekt: Multiparametrisches Screening und Antikörper-Selektion am Beispiel ausgewählter Peptide von EGFR und Her2.....	96
4.3.1	Kriterien zur Auswahl der Peptidantigene.....	97
4.3.2	Auswahl der Peptidantigene zur Antikörpergenerierung.....	98
4.3.3	Antikörpergenerierung durch MorphoSys: <i>Panning</i> -Strategie und Durchführung	102
4.3.4	Assayentwicklungen für multiparametrisches Screening.....	103
4.3.5	Durchführung des multiparametrischen Screening.....	108
4.3.6	Antikörperexpression in Lysaten der <i>Panning</i> -Ansätze	114
4.3.7	Kompetitionsexperimente zur Selektion von Antikörpern	116
4.3.8	Zusammenfassende Diskussion	120
4.4	Miniaturisierter Ligandenbindungsassay zum Nachweis von funktionellem EGFR	124
4.4.1	Entwicklung eines miniaturisierten Ligandenbindungsassays	125
4.4.2	Untersuchung charakterisierter Tumorproben: Beurteilung des EGFR- Ligandenbindungsassays anhand des klinischen Schwellenwertes.....	127
4.4.3	Zusammenfassende Diskussion	129
4.5	Ankyrine, neuartige Fängermoleküle: Entwicklung eines Sandwich- Immunoassays zum Nachweis von Her2 aus Tumorproben	131
4.5.1	Vergleich der Fängereigenschaften von anti-Her2 Ankyrinen	132
4.5.2	Etablierung eines Sandwich-Immunoassays mit Ankyrinen zum Nachweis von Her2	134
4.5.3	Nachweis von Her2 aus lysierten Zellen.....	136
4.5.4	Quantifizierung der Her2-Expression.....	138
4.5.5	Analyse und Bestimmung des Her2-Gehalts in Gewebeproben	139
4.5.6	Zusammenfassende Diskussion	143
5.	SUMMARY IN ENGLISH	146
6.	LITERATUR.....	148
7.	PUBLIKATIONSLISTE	158
8.	DANKSAGUNG	159
9.	AKADEMISCHE LEHRER.....	160
10.	LEBENS LAUF.....	161

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen des BMBF-Förderprojektes pepART verschiedene miniaturisierte und parallelisierte Assaysysteme entwickelt, die der Charakterisierung von unterschiedlichen Klassen von Bindemolekülen dienen. In entwickelten und etablierten Assays mit Antikörpern und alternativen Bindemolekülen wurden die tumorrelevanten Markerproteine EGFR und Her2 qualitativ und quantitativ bestimmt.

Es wurde eine Methode zur Herstellung planarer Zell-Mikroarrays aus verschiedenen Zelllinien getestet. Diese erlaubte Antikörper zu charakterisieren, die gegen membranständige Proteine generiert worden waren. Die auf Zell-Mikrospots gebunden Antikörper wurden mit einem fluoreszenz-basierenden Reportersystem visualisiert, womit sich die Spezifität und Kreuzreaktivität der Antikörper bestimmen ließ.

Als zentraler Punkt dieser Dissertation wurden *bead*-basierende Assaysysteme zur Charakterisierung peptidspezifischer Antikörper entwickelt. Am Beispiel von scFv-Antikörperfragmenten wurden die methodischen Grundlagen zur Bestimmung der Affinität, des Bindungsbereiches sowie der Fängereigenschaften nach einer Immobilisierung ausgearbeitet. Es gelang hierbei, nicht gereinigte Binder direkt aus Rohextrakten zu charakterisieren. Für Entwicklungen zur peptidspezifischen Proteomanalyse wurden die Modellproteine Her2 und EGFR *in silico* tryptisch verdaut. Aus den erhaltenen Fragmenten wurden in Kooperation mit der MorphoSys AG peptidspezifische Antikörper generiert. In einem multiparametrischen Screening-Ansatz wurden insgesamt 3072 Fab-Antikörperklone hinsichtlich Spezifität, Kreuzreaktivität und Expression analysiert. Mittels Konkurrenzexperimenten wurden peptidspezifische Antikörper identifiziert.

Darüber hinaus wurde ein miniaturisierter Ligandenbindungsassay zum Nachweis von funktionellem EGFR entwickelt. EGFR-Moleküle wurden aus charakterisierten Brusttumorproben bestimmt. Als weitere Klasse von Bindemolekülen wurden Her2-spezifische Ankyrine getestet. Ein sensitiver Her2 Sandwich-Immunoassay wurde aufgebaut, mit dem der Her2-Gehalt von Zell- und Gewebeproben qualitativ und quantitativ bestimmt wurde.

ABKÜRZUNGEN

AR	<i>Ankyrin repeat</i>
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Tissue Culture Collection</i>
AU	<i>Arbitrary units</i> , Willkürliche Einheiten
BRE	Blockierungsreagenz für ELISA
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
CBS	<i>Carboxy block & store buffer</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
C-terminal	Carboxy-terminal
Cy3	Cyanpolymethinfarbstoff 3
DCM	Dichlormethan
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
Doa	8-Amino-3,6-dioxaoctansäure
EDC	Ethylen-Dicarbodiimid
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
eq	Äquivalent
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
Fab	<i>fragment antigen binding</i> , antigenbindendes Antikörperfragment
Fc	<i>fragment crystallization</i> , kristallisierbares Fragment
FCS	<i>fetal calf serum</i> , Fötales Kälberserum
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
Fv	Variables Antikörperfragment
h	Stunde(n)
H ₂ O _{dd}	Deionisiertes Wasser/ Aqua bidest.
HBS	<i>HEPES buffered saline solution</i> , HEPES-gepufferte Kochsalzlösung
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
His ₆	Hexa-Histidin
HOBT	Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
kDa	Kilodalton
MES	Morpholino-Ethansulfonsäure
MFI	Median der Fluoreszenzintensitäten
MFU	<i>median fluorescence units</i> , Median der Fluoreszenzeinheiten
MG	Molekulargewicht
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
min	Minute(n)
MPT	<i>Major panning target</i> , Hauptantigen zur Antikörpergewinnung
M _r	Relatives Molekulargewicht
MW	Mittelwert
nBio	N-terminales Biotin
NBS	<i>Non-binding substrate</i>
NEM	N-Ethylmaleinimid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
N-terminal	Amino-terminal
PBS	<i>Phosphate buffered saline solution</i> , Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
polyA	Poly-Adenosin
RIA	Radio-Immunoassay

R-PE	R-Phycoerythrin
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
scFv	<i>single chain</i> Antikörperfragmente
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SMPB	Succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)-butyrat
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i> , Oberflächenplasmonresonanz
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TFA	Trifluoressigsäure
TFR	Transferrin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Ü/N	Über Nacht
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	<i>Weight per volume</i> , Gewicht pro Volumen

1. EINLEITUNG

1.1 Protein-Mikroarraytechnologie

Die Sequenzierung des menschlichen Genoms [Lander *et al.* 2001, Venter *et al.* 2001] und seine vollständige Entschlüsselung im April 2003 [Pennisi 2003] haben eine große Anzahl an Informationen über maligne Erkrankungen zugänglich gemacht. Es gilt nun durch umfassende Analysen aus den 20.000 – 25.000 protein-codierenden Genen [International Human Genome Sequencing Consortium 2004] Funktion und Bedeutung der Gene und Proteine abzuleiten, um dadurch komplexe biologische und klinisch relevante Prozesse zu verstehen. Auf Genom- und Transkriptions-Ebene werden hierfür heutzutage vermehrt mikroarraybasierte Methoden entwickelt und herangezogen.

So sind es heutzutage vor allem DNA-Mikroarrays, die als bereits etablierte Technologie zum Verständnis vielschichtiger Zusammenhänge beitragen konnten. Das Prinzip dieser Technologie beruht auf miniaturisierten, parallelisierten Ligandenbindungsassays, mit denen in einem einzelnen Experiment eine Vielzahl an Parametern parallel aus einer kleinsten Menge an Probe bestimmt werden können [Templin *et al.* 2003]. Zur Herstellung solcher Mikroarrays können mehrere Tausend kurze Oligonukleotide oder cDNA-Abschnitte auf kleinstem Raum auf der Oberfläche aufgereiht werden. DNA-Moleküle binden auf dem Prinzip der Basenpaarung an komplementäre Stränge, so dass zu jedem Sequenzabschnitt Fängermoleküle vorhergesagt und durch effiziente Syntheseprotokolle und PCR basierende Ansätze hergestellt werden können.

Kommerziell erhältliche DNA-Mikroarrays werden inzwischen routinemäßig zur differentiellen Genexpressionsanalyse (*mRNA-Profiling*) eingesetzt. Sie ermöglichen damit eine gesamtheitliche Erfassung der Aktivität verschiedener Gene. Des Weiteren sind DNA-Mikroarrays in der Entwicklung, mit denen punktuelle Unterschiede der menschlichen DNA-Sequenz zwischen einzelnen Individuen umfassend analysiert werden können (SNP-Analyse). Solche Polymorphismen können an bestimmten Stellen des Genoms auftreten, so dass derartige Untersuchungen mögliche Zusammenhänge zwischen Krankheiten und Genen verständlich und erklärbar machen [Chipping Forecast II 2002].

Die Informationen, die durch Genom- oder Expressionsanalysen gewonnen werden, genügen nicht, um biologische Prozesse und Zustände vollständig analysieren und verstehen zu können. Aus der Vielzahl der molekularen Bestandteile eines Organismus müssen auch diejenigen identifiziert und charakterisiert werden, die direkt an den Prozessen beteiligt sind. Hierbei nehmen Proteine eine bedeutende Funktion ein. Da zwischen der Expression der mRNA und der Menge des entsprechenden Proteins einer Zelle bisher keine Korrelation gezeigt werden konnte [Anderson und Anderson 1998, Gygi *et al.* 1999], und da die Funktion eines Proteins nicht unmittelbar über dessen Expression abgeleitet werden kann, sondern unter anderem von dessen Aktivierungszustand abhängt, besteht ein Bedarf an zusätzlichen durchsatzfähigen Technologien. Neben der Erfassung und Analyse aller Gene („*Genomics*“) soll die Gesamtheit der Proteine („*Proteomics*“) bestimmt werden. Folglich wurden in den letzten Jahren Mikroarray-Technologien entwickelt, die über eine Analyse der DNA und RNA hinausgehen. So wurde in verschiedenen Ansätzen gezeigt, dass Protein-Mikroarrays zur Identifizierung, Quantifizierung und Analyse der Funktionalität von Proteinen verwendet werden können.

Protein-Mikroarrays sind miniaturisierte Analysesysteme, die eine große Anzahl von Parametern über parallele Ligandenbindungsassays bestimmen können und gleichzeitig den Materialverbrauch deutlich reduzieren. Interaktionsstudien für verschiedenste Proteine werden hiermit über immobilisierte Fängermoleküle wie Proteine, Peptide, Oligosaccharide und niedermolekulare Substanzen oder DNA durchgeführt [MacBeath 2002, Templin *et al.* 2003].

Im Gegensatz zu DNA-Molekülen sind Proteine weitaus vielfältigere Moleküle, die als lösliche, membranständige oder membranassoziierte Bestandteile in allen Zellkompartimenten vorkommen. Die enorme strukturelle und funktionelle Diversität der Proteine begründet sich in unterschiedlichen Kombinationen der 20 proteinogenen Aminosäuren und der Assoziation verschiedener Nicht-Proteinbestandteile. Die Konformation der Proteine, die durch ihre Flexibilität eine Anpassung an sich verändernde Situationen erlaubt, wird durch die Aminosäuresequenz bestimmt. Es besteht jedoch bisher keine Möglichkeit, die Bindungseigenschaften der Proteine auf Basis der Primärsequenz vorherzusagen. Die Interaktionen von Proteinen beruhen auf elektrostatischen Kräften, Wasserstoffbrückenbindungen und/oder hydrophoben Van-der-Waals-

Wechselwirkungen oder auf Strukturelementen. Proteine sind des weiteren fähig, über eine Mehrzahl von schwachen Bindungen Komplexe mit großer biologischer Bedeutung zu formen [Jones und Thornton 1996]. Dies deutet zum einen darauf hin, dass Proteine nicht zwangsläufig mono-spezifisch wechselwirken. Zum anderen zeigt es, dass Protein-Protein-Interaktionen über einen sehr großen dynamischen Bereich mit unterschiedlichen Affinitäten ablaufen können. Proteine können im zeitlich regulierten Verlauf im Organismus Modifikationen erfahren. Dies können dynamische oder statische post-translationale Prozesse sein, die eine Glykosylierung, Acetylierung und Phosphorylierung einschließen.

Die Limitierung der Protein-Mikroarraytechnologie beruht somit auf dem Mangel an spezifischen und selektiven Fängermolekülen, durch welche Anwesenheit, Funktion, Interaktion, Regulation und Zusammenspiel einer großen Zahl an Proteinen analysiert werden können [Stoll *et al.* 2004].

1.1.1 Prinzip der miniaturisierten Ligandenbindungsassays

Die grundlegenden Prinzipien zu miniaturisierten Ligandenbindungsassays beschrieb Roger Ekins Ende der 80iger Jahre in seiner „*ambient analyte theory*“ [Ekins 1989, Ekins 1998]. Die Theorie besagt, dass sich durch Miniaturisierung eines oberflächenbasierenden Assays eine höhere Sensitivität erreichen lässt.

Fängermoleküle wurden bei konstanter Dichte auf unterschiedlich kleine Flächen gebracht. Wird nun ein löslicher Ligand über die immobilisierten Fängermoleküle an die feste Phase gebunden, so ist die Summe der gefangenen Moleküle auf Grund des Massenwirkungsgesetzes in einem Mikropot kleiner als die einer vergleichsweise großen Fläche (Makropot). Darüber hinaus ändert sich die Konzentration des gelösten Liganden in einem miniaturisierten Ligandenbindungsassay selbst kaum (*ambient analyte*). Dies ist auch dann der Fall, wenn die Interaktion auf einer hohen Affinität oder auf einer niedrigen Konzentration des Analyten beruht, da nur ein kleiner Anteil des Analyten an die feste Phase gebunden wird. Die Wechselwirkung verläuft somit stets unter quasi hoher Konzentration. Bei vergleichbarer Anzahl an Fängermolekülen nimmt in einem Mikropot die Dichte an gefangenen Molekülen pro Flächeneinheit zu. Hierdurch nähert sich das Verhältnis zwischen Signal und Hintergrundrauschen durch die Miniaturisierung einem

Optimum. So wurden bereits miniaturisierte Ligandenbindungsassays durchgeführt, bei denen noch femtomolare Mengen von Antigenen nachgewiesen werden konnten [Finckh *et al.* 1998].

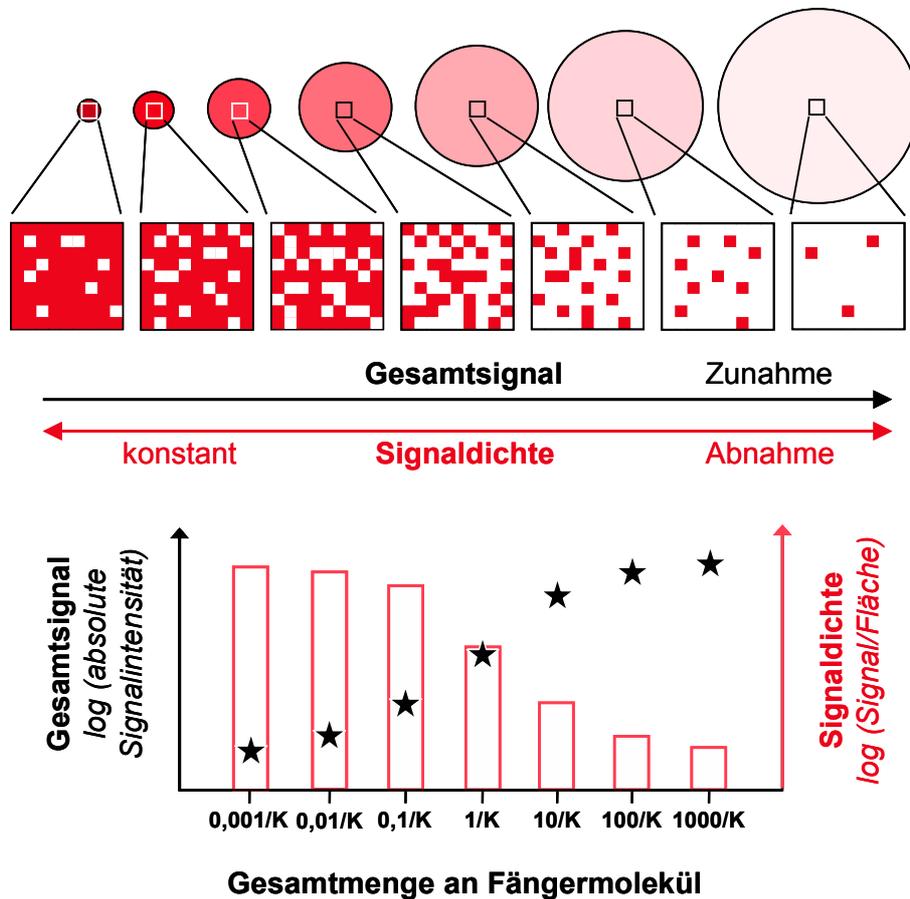


Abbildung 1.1: Signal und Signaldichte in Mikrospots und Makrospots. Es wurden Fängermoleküle bei konstanter Dichte auf unterschiedlich große Flächen (Spots) immobilisiert. Für verschiedene Gesamt mengen an Fängermolekülen wurden die Signaldichte (Signal/Fläche) und das Gesamtsignal (absolute Signalintensität) für einen Liganden gezeigt. Mit zunehmender Größe der Spots nehmen die Anzahl an gefangenem Ligand und damit das Gesamtsignal zu. Dies erreicht ein Maximum, wenn der größte Teil des Liganden aus der Lösung herausgefangen wurde. Im Gegensatz hierzu erhöht sich die Signaldichte mit abnehmender Spotgröße und erreicht bei einer Fängermolekülkonzentration von $< 0,1/K$ konstante Werte. K ist in diesem Fall die Assoziationskonstante der Interaktion von Fänger und Ligand. Diese Abbildung wurde modifiziert nach [Ekins und Chu 1992].

1.1.2 Assaysysteme für Protein-Mikroarrays

Protein-Mikroarrays lassen sich prinzipiell gemäß ihrer Applikation in zwei Kategorien unterteilen [Poetz *et al.* 2005]: Assaysysteme mit Protein-Mikroarrays finden zur Expressions- oder zur Funktionsanalyse Anwendung.

Eine Applikationsmöglichkeit von Protein-Mikroarrays besteht in der gezielten Darstellung und Bestimmung der Proteinexpression aus Proben. Hierbei wird wiederum zwischen zwei prinzipiellen Anordnungen unterscheiden, bei denen die Lokalisation der zu untersuchenden Probe ausschlaggebend ist. Zum einen lässt sich durch die Immobilisierung einer Vielzahl an spezifischen Fängermolekülen in einer Probe eine Vielzahl an Parametern zeitgleich untersuchen. Der qualitative Nachweis der gefangenen Moleküle der Probe kann hierbei über deren direkte Markierung [Haab *et al.* 2001] erfolgen. Durch den Einsatz eines zweiten Antikörpers (Detektionsantikörper), der spezifisch gegen ein anderes Epitop des Analyten gerichtet ist, kann ein solcher Sandwich-Immunoassay über eine Kalibration zur qualitativen Bestimmung von Proteinen dienen [Schweitzer *et al.* 2002].

Neben dieser Art der „*forward-phase*“ Arrays stehen auch sogenannte „*reverse-phase*“ Protein-Mikroarrays zur Verfügung. In diesem Fall wird eine Vielzahl an unterschiedlichen Proben immobilisiert und parallel in einem Assay bezüglich eines bestimmten Parameters verglichen [Paweletz *et al.* 2001, Petricoin und Liotta 2002].

Die zweite Applikationsmöglichkeit von Protein-Mikroarrays ist die Verwendung zur Funktionsanalyse. Hierbei werden Interaktionen von Proteinen mit Proteinen [Zhu *et al.* 2000], DNA [Boutell *et al.* 2004], Lipiden [Zhu *et al.* 2001], Oligosacchariden [Fukui *et al.* 2002] oder Enzym-Substrat-Interaktionen [MacBeath und Schreiber 2000] untersucht. Zudem sind Assaysysteme beschrieben worden, bei denen die Wechselwirkungen zwischen niedermolekularen Substanzen und Proteinen untersucht wurden [MacBeath *et al.* 1999]. So könnten solche miniaturisierte und parallelisierte Ansätze möglicherweise beim Screening nach pharmazeutisch aktiven Substanzen hilfreich sein.

1.1.3 Bindemoleküle für Protein-Mikroarrays

Zur Entdeckung und Identifizierung von neuen, krankheitsrelevanten, molekularen Markern werden standardmäßig die Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-Gel) und eine anschließende Identifizierung über massenspektrometrische Methoden verwendet [Wulfskuhle *et al.* 2003]. Jedoch können Proteine, die nur in geringer Konzentration vorkommen, zu basische oder zu saure Eigenschaften haben oder in Membranen verankert sind, mit dieser Technik nur mit relativ großem Verbrauch an Reagenzien, limitiert oder gar nicht nachgewiesen werden [Gygi *et al.* 2000]. Aus einem Bedarf an alternativen Ansätzen zur Proteomanalyse haben sich hieraus noch empfindlichere und reagenziensparende arraybasierte Methoden entwickelt. Mittlerweile werden auch Protein-Mikroarrays für das serologische Screening von Antikörpern gegen Tumorantigene eingesetzt [Ornstein *et al.* 2004].

Um die Empfindlichkeit der Mikroarraytechnologie zum Nachweis solcher Proteine nutzen zu können, wird eine Vielzahl an Fängermolekülen mit möglichst hoher Spezifität und Affinität benötigt. Zur Etablierung von Protein-Mikroarrays müssen diese Bindemoleküle ihr Antigen aus der Fülle der vorhandenen Proteine einer komplexen Probe erkennen und deren Bestimmung ermöglichen. Es stehen heutzutage eine Reihe unterschiedlicher Moleküle zur Wahl, die auf ihre Verwendbarkeit in miniaturisierten Assaysystemen zu testen sind.

Die wohl bekannteste Klasse an Bindemolekülen sind Antikörper. Sie sind bedeutende Werkzeuge für diagnostische Anwendungen *in vitro* und *in vivo* und werden heute in Einzelanalytassays in der Diagnostik eingesetzt. So können heutzutage gegen fast jedes erdenkliche Antigen hoch spezifische Bindemoleküle gewonnen werden [Köhler und Milstein 1975]. Die Produktion mono- und polyklonaler Antikörper ist jedoch aufwändig und teuer. Der Vorrat an polyklonalen Bindemolekülen ist zudem limitiert. Monoklonale Antikörper (mAb) hingegen bieten durch kontinuierliche Kultivierung von Hybridomazellen ein nahezu unerschöpfliches Reservoir und wurden zur Etablierung verschiedener Antikörper-Mikroarrays herangezogen [Haab *et al.* 2001, Knezevic *et al.* 2001, Sreekumar *et al.* 2001]. Der Aufwand zur Produktion einer großen Anzahl monoklonaler Binder ist jedoch sehr

groß, so dass alternative Technologien entwickelt wurden. Interessante Ansätze beruhen auf der Verwendung künstlicher Genbibliotheken. Die Kombination aller theoretischen synthetischen Varianten kann bis zu einer Diversität von 10^{11} unterscheidbaren Klonen führen. In kürzester Zeit können hieraus Binder gegen das gewünschte Antigen isoliert werden. Dies wird durch die Verknüpfung von Phäno- und Genotyp über Techniken wie *phage display* [McCafferty *et al.* 1990] oder *ribosome display* [Hanes und Plückthun 1997] sowie geeignete Selektions- und Screeningverfahren möglich. Durch weiterführende Maturierungsstrategien kann zudem Einfluss auf die Eigenschaften der rekombinanten Binder genommen werden, so dass Stabilität und Affinität der Moleküle verbessert werden können [Amstutz *et al.* 2001, Schier *et al.* 1996].

Neben der Möglichkeit, Antikörper für eine mikroarraybasierte Proteomanalytik zu verwenden, stehen alternativ neue Bindemoleküle zur Wahl. So führten Ansätze zur Herstellung von Bindemolekülen aus synthetischen Bibliotheken zur Entdeckung der *Aptamere*. Hinsichtlich ihrer molekularen Eigenschaften unterscheiden sich *Aptamere* sehr von Antikörpern; die Interaktionen mit ihren Bindungspartnern beruhen jedoch auf den gleichen grundlegenden Wechselwirkungen. *Aptamere* sind kurze polymere Bindemoleküle, die aus einigen wenigen bis zu mehreren hundert Bausteinen bestehen. Als Bausteine können sowohl Oligonukleotide, Peptide als auch Peptid-Nukleinsäuren (PNA, [Soomets *et al.* 1999]) oder „locked nucleic acids“ (LNA, [Braasch und Corey 2001]) verwendet werden. So wurden zudem kurze Peptide beschrieben, die spezifisch Zielmoleküle erkennen können und dabei hohe Affinitäten aufweisen [Abedi *et al.* 1998, Colas *et al.* 1996, Wilson *et al.* 2001]. Als weitere Bindemoleküle sind „scaffolds“ zu nennen. Es handelt sich hierbei um rekombinante Eiweißmoleküle, die bei Verwendung alternativer Proteingerüste Fängereigenschaften besitzen und ähnlich wie Antikörper über Maturationsverfahren die gewünschten Affinitäten erhalten können. Es zählen hierzu die aus dem Protein A abstammenden Affibodies [Nord *et al.* 1997], Lipocaline [Skerra 2001], Fibronectin Typ III Domänen [Xu *et al.* 2002] oder *Repeat*-Proteine wie Ankyrine [Binz *et al.* 2003] und Leucin-reiche *Repeat*-Proteine [Stumpp *et al.* 2003].

1.1.4 Oberflächen zur Immobilisierung von Proteinen

Die Verwendung von Protein-Mikroarrays verlangt eine möglichst funktionelle Immobilisierung der Fängermoleküle an die Oberfläche der festen Phase. Bei der Herstellung dieser Arrays können die verschiedensten Wechselwirkungen herangezogen werden. Die hierzu eingesetzten Materialien stammen häufig aus etablierten ELISA- oder Western-Blot Systemen.

Als nicht kovalente Möglichkeiten werden hierbei hydrophobe Interaktionen mit Nitrozellulose oder Polystyrol ausgenutzt. Zudem werden Beschichtungen aus positiv geladenen Gruppen wie poly-Lysine oder Aminosilane zur elektrostatischen Anbindung von Proteinen verwendet. Membranen (z.B. Nitrozellulose) besitzen zwar eine hohe Proteinbindekapazität, je nach Ausführung können jedoch eine erhöhte Eigenfluoreszenz und unspezifische Wechselwirkungen mit Proteinen auftreten. Im Gegensatz hierzu müssen reine Glasoberflächen modifiziert werden, so dass sie die Fängerproteine in ausreichendem Maße und irreversibel binden können. Aus der Welt der DNA-Mikroarrays wurden verschiedene etablierte Oberflächen mit Aminosilan-, poly-Lysin- oder Aldehyd-Modifikationen getestet, die einen Erhalt der Funktionalität der Proteine gewährleisten [MacBeath *et al.* 2000]. Bei Immobilisierungsstrategien, die nicht auf einer kovalenten Anbindung beruhen, können sich Fängermoleküle jedoch auf Grund der geringeren Stärke der Wechselwirkung während des Experimentes von der Oberfläche lösen. Es wurden deshalb verschiedene, alternative Konzepte untersucht. So erfolgen kovalente Bindungen durch chemisch aktivierte Oberflächen aus Aldehyden, Epoxiden oder Aktivestern [Blawas und Reichert 1998, Disley *et al.* 1999, Sanders und Manz 2000]. Des Weiteren können Fängermoleküle über spezifische, bimolekulare Interaktionen immobilisiert werden. Zu nennen sind hier das hochaffine Biotin-Streptavidin-System [Dontha *et al.* 1997, Lue *et al.* 2004] oder Nickel-Chelate (Ni-NTA), die eine Abfolge von mehreren Histidinen spezifisch binden.

1.1.5 Signalgenerierung – Modifikationen und Nachweisreaktionen

Zum Nachweis von Bindungsereignissen werden in den meisten Protein-Mikroarray-Assaysystemen zusätzliche, signalgebende Bestandteile benötigt. So können zum einen die interagierenden Moleküle direkt einen Farbstoff tragen, mit dessen Hilfe ein Auslesen der Reaktionen ermöglicht wird. Zudem besteht die Möglichkeit, Wechselwirkungen zwischen Fängermolekülen und Analyten über spezifische Detektionsmoleküle nachzuweisen. Hierbei können die Detektionsmoleküle wiederum direkt markiert sein oder durch weitere, markierte Moleküle erkannt werden [Haab 2003]. Auf der Ebene der Detektionsmoleküle können die Wechselwirkungen über eine direkte Erkennung des Bindungspartners gemäß einer Antigen-Antikörper-Reaktion ablaufen. Als Alternative werden Markierungen oder Modifikationen mit modifikationsspezifischen Molekülen eingesetzt, um eine Signalverstärkung zu erzielen. So können Analyte beispielsweise über biotinylierte Detektionsmoleküle und markiertes Streptavidin noch in geringeren Konzentrationen nachgewiesen werden. Das Biotin kann hierbei zum einen chemisch über N-Hydroxysuccinimid (NHS)-Aktivester an Proteine gekoppelt werden [Cole *et al.* 1987], wobei primäre Amine des Proteins modifiziert werden können. Diese Reaktion kann an allen zugänglichen Lysinen stattfinden und besitzt somit das Potential, Einfluss auf die Eigenschaften der modifizierten Moleküle zu nehmen. Weitere Markierungen können den Molekülen durch Klonierungsansätze angehängt werden und somit neben ihrer Verwendung für affinitätschromatographische Aufreinigungen auch zum Nachweis von Proteinen benutzt werden. Diese auch „tags“ genannten Markierstellen können neben Fusionsproteinen wie Glutathion-S-Transferase (GST) oder dem kristallisierbaren Anteil vom Immunglobulin G unter anderem auch aus kurzen Sequenzabschnitten bestehen. Hierzu zählen der His₆-tag [Müller *et al.* 1998], myc-tag [Fan *et al.* 1998], FLAG-tag [Prickett *et al.* 1989] oder VSV [Battini *et al.* 1998], denen allen das Vorhandensein kommerzieller Antikörper gemein ist. Eine alternative Methode, Biotin in ein Protein einzuführen, beruht auf einem 15 AS langen Avi-tag, der ein Substrat einer Biotin-Ligase ist [Schatz 1993]. In diesem Fall kann Biotin gezielt in ein Protein eingebaut und neben der Detektion auch zur gerichteten Immobilisierung verwendet werden [Nilsson *et al.* 1996].

1.1.6 Mikroarray-Plattformen

Miniaturisierte und parallelisierte Ligandenbindungsassays mit DNA- und Protein-Mikroarrays werden zur Zeit auf zwei unterschiedlichen Plattformen durchgeführt [Stoll *et al.* 2004]: Planare und *bead*-basierende Systeme.

Zum einen werden Mikroarrays häufig auf planaren Substraten oder Trägermaterialien hergestellt. Hierzu werden spezielle Pipettierroboter verwendet, die kontaktfrei oder direkt die unterschiedlichen Fängermoleküle in kleinsten Volumina auf beschichtete oder aktivierte Oberflächen (z.B. von Glasobjektträgern) absetzen. Die entstehenden Mikrospots, die mit einem Durchmesser von ca. 100 – 200 µm räumlich angeordnet werden, ermöglichen eine Analyse einer großen Anzahl an Parametern (2000/cm²) aus einer geringen Probenmenge. Das Auslesen planarer Assaysysteme erfolgt meist über eine Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe bei den Wellenlängen 532 nm und 635 nm, die in Biochip-Scannern erfasst werden können. Gängige Fluorophore, die diesen Nachweis eignen, sind z.B. die Cyanin-Farbstoffe Cy3 und Cy5 (Amersham Bioscience, Freiburg), Alexa532 (Invitrogen) oder Phycoerythrin, ein rotes, photosynthetisches Pigment der Rotalgen. Durch Anregung der Farbstoffe mit einem entsprechenden Laser werden im Biochip-Scanner die Lichtintensitäten von einem Photomultiplier erfasst und digitalisiert. Die Auswertung der Scannerbilder erfolgt anschließend über eine Bildanalyse mit speziellen Programmen.

Eine alternative Methode zur Durchführung miniaturisierter und parallelisierter Assays stellen *bead*-basierende Mikroarrays dar. In den letzten Jahren hat sich hierbei die xMAP® Technologie der Firma Luminex® Corp. (Austin, TX, USA) durchgesetzt. Das System dieser Plattform beruht auf der Verwendung von farbkodierten Kügelchen aus Polystyrol, den sogenannten „*Beads*“. Ein Mikroarray entsteht hierbei durch Mischen dieser unterscheidbaren Kügelchen, wodurch ein parallelisiertes Analysieren von bis zu 100 Parametern ermöglicht werden kann. Anschließend werden diese, im Folgenden stets mit *Beads* bezeichneten, 5,6 µm großen Kügelchen, in der Messzelle eines speziellen Durchflusscytometers vereinzelt und analysiert. Eine Diskriminierung der *Beads* wird dadurch erreicht, dass sie zu unterschiedlichen Verhältnissen mit zwei Farbstoffen gefärbt sind. Die

Anregung der internen Farbstoffe der *Beads* erfolgt durch einen roten Laser der Wellenlänge 635 nm. Zeitgleich werden die *Beads* über einen zweiten, grünen Laser der Wellenlänge 532 nm angeregt, mit dem die Signalintensität der Reporterfarbstoffe bestimmt werden kann. Diese Farbstoffe wurden aus der Reaktionslösung über Interaktionen löslicher Bindungspartner mit den auf der Oberfläche der *Beads* immobilisierten Fängermolekülen gebracht. Die Oberflächenbeladung der *Beads* mit DNA, Proteinen oder Peptiden kann über unterschiedliche Kopplungschemie verlaufen. So können beispielsweise biotinylierte Substrate an mit Streptavidin beschichteten LumAvidin-*Beads* gebunden werden. Als weitere Möglichkeit werden Carboxy-*Beads* durch Aktivierung der Carbonsäurefunktionen dazu verwendet, Proteine oder Peptide über deren primäre Aminogruppen von Lysinseitenketten zu binden. In der Regel werden bei einer Kopplungsreaktion mehr als 100.000 *Beads* beladen, wodurch bei einem Bedarf von ca. 1000 *Beads* pro Messpunkt eine Vielzahl an Experimenten mit gleichem Ausgangsmaterial ermöglicht wird.

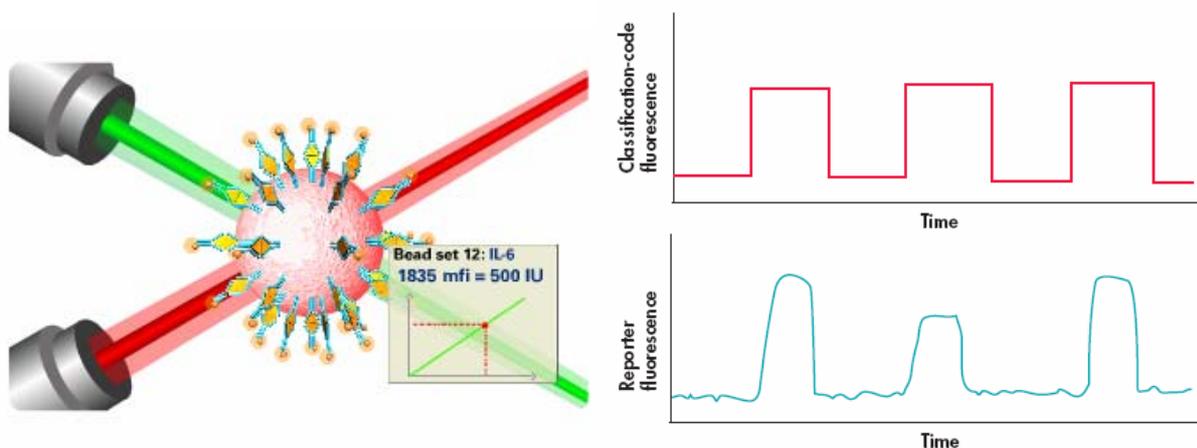


Abbildung 1.2: Prinzip der Lumineszenz-Messung mit Beads. Durch zeitgleiche Klassifizierung der farbkodierten *Beads* und Auslesen der daran gebundenen Menge an Fluorophor wird eine parallele Analyse unterschiedlicher Parameter möglich. (Abbildungen modifiziert nach www.luminexcorp.com und www.qiagen.com)

Durch Detektion der Fluoreszenzintensität über einen Photomultiplier werden die gemessenen Lichtintensitäten der eingebrachten Reporterfluorophore digitalisiert. Für eine Population einer *Bead*-Klassifizierung werden die einzelnen

Signalintensitäten jedes *Beads* erfasst. Der gesamte Datensatz wird im Gerät statistisch ausgewertet. So werden standardmäßig Median, Mittelwert und Standardabweichung der Fluoreszenzintensitäten aller Messereignisse einer Klassifizierung bestimmt.

1.2 BMBF-Förderprojekt pepART

Im Rahmen eines Förderprojektes zur Proteomforschung des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) sollte eine peptidbasierte Proteomanalytik mittels Array-Technologie (pepART) entwickelt und validiert werden. Ziel dieser Arbeiten waren neue parallelisierte, kostengünstige Analysemethoden zur qualitativen und quantitativen parallelen Bestimmung von Proteinen in komplexen Proteingemischen. Dies sollte anhand ausgewählter, relevanter Markerproteine gezeigt werden.

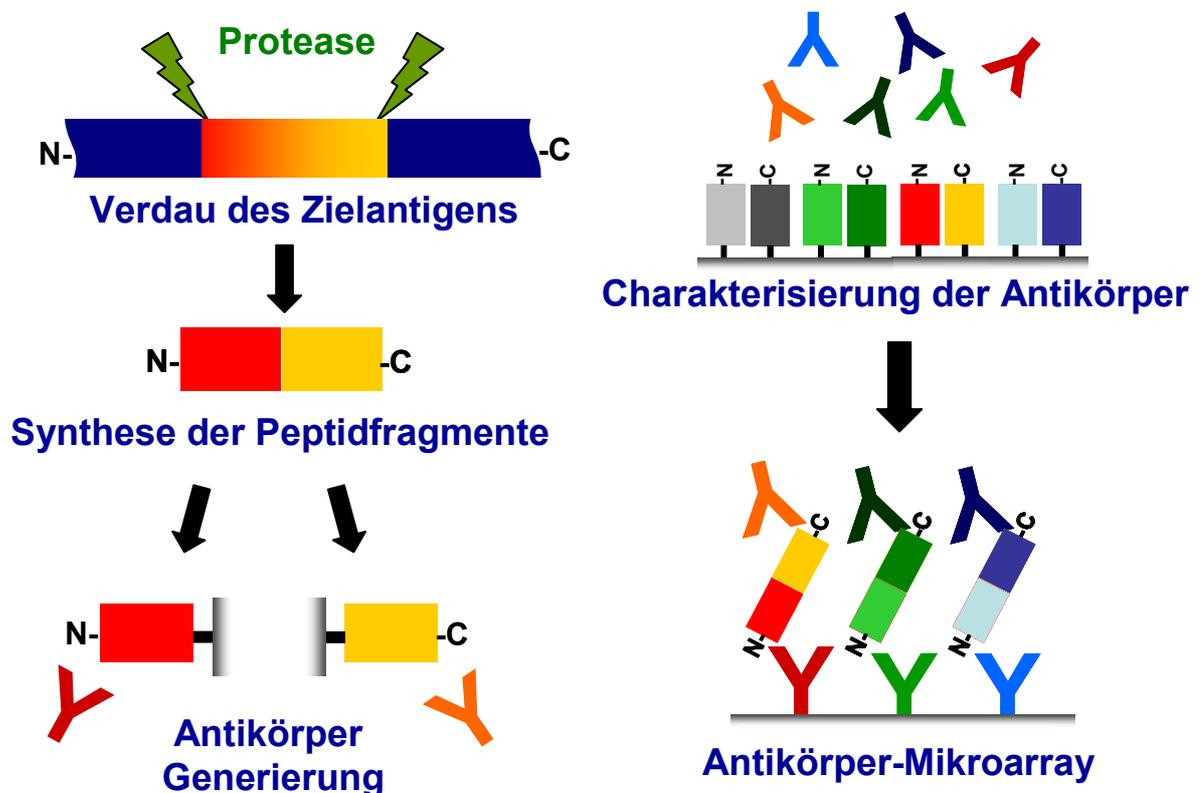


Abbildung 1.3: pepART Prinzip.

Das pepART-Konzept sieht vor, dass aus der Aminosäuresequenz (Primärstruktur) des Analytproteins proteinspezifische Peptide abgeleitet werden, die durch definierte Spaltungsreaktionen aus diesen Proteinen experimentell generierbar sind. Gegen diese Peptide werden anschließend hochaffine Antikörper generiert. Durch eingehende Charakterisierungsverfahren werden geeignete Antikörper selektiert. Diese Binder werden dann in Form von Antikörper-Mikroarrays immobilisiert. Proteingemische aus Zellen oder Geweben werden anschließend durch chemische oder enzymatische Spaltung zu definierten Peptidfragmenten abgebaut und auf den Antikörper-Mikroarrays inkubiert. Proteinspezifische Peptide binden dabei an ihre hochspezifischen Fängermoleküle und werden so parallel qualitativ und quantitativ nachgewiesen.

1.3 Applikationsgebiet Brustkrebs

Die Entwicklungen im Rahmen des pepART-Projekts wurden unter anderem zur Analyse relevanter Markerproteine bei Tumoren der weiblichen Brust durchgeführt. Die Bedeutung dieser Erkrankung lässt sich daran erkennen, dass sie mit einer Million neuer Fälle jährlich weltweit als die häufigste Krebsart bei Frauen gilt.

In 18% aller malignen Erkrankungen bei Frauen handelt es sich um Tumore der Brust. Als bedeutendster auslösender Faktor gilt in diesem Zusammenhang das Alter, da sich das Risiko an Brustkrebs zu erkranken bis zum Eintritt in die Menopause alle 10 Jahre verdoppelt. Des Weiteren gehören geographische Variationen, vorherige gutartige Erkrankungen und genetische Disposition zu den größeren Risikofaktoren [McPherson *et al.* 2000].

Zur Behandlung von Brustkrebs sind deshalb eine eindeutige Diagnose, eine Einordnung des Tumors, die Beurteilung des Krankheitsverlaufs sowie das Ansprechen einer Therapie unabdingbar. Im Allgemeinen werden Tumoren nach TNM-Klassifizierung beurteilt, die der Stadieneinteilung von bösartigen Tumoren dient und dabei die Ausdehnung des Primärtumors (T), das Fehlen bzw. Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen (N) und das von Fernmetastasen (M) beurteilt.

Als weitere potentiell prognostische Untersuchungen werden auffällige Gewebe auch auf sogenannte Tumormarker analysiert. Diese Marker sind Bestandteile bzw.

Stoffwechselprodukte bestimmter Krebszellen, deren Aktivität, Funktion oder Konzentration im Vergleich zu gesundem Gewebe auffällig verändert sind. Hierzu zählen bei Mammakarzinoma unter anderem die Steroidhormonrezeptoren für Östrogen und Progesteron, der Tumorsuppressor p53 die Protease Cathepsin D, das Proto-Oncogen BCL-2, das Protein pS2, der Wachstumsfaktor $TNF\alpha$, sowie die Rezeptoren Her2 und EGFR [Fitzgibbons *et al.* 2000]. Für unterschiedliche Tumoren wird jedoch nur in Ausnahmen ein einziger spezifischer molekularer Marker gefunden werden. Es ist daher eher zu erwarten, dass es zu unterschiedlichen Tumoren einen eigenen Satz potentieller Tumormarker geben wird. Dies lässt systembiologische Analysen des Proteoms von Patienten immer bedeutender werden, da hierdurch eine prädiktive und präventive Individualdiagnostik („*personalized medicine*“) möglich werden kann [Weston und Hood 2004].

Es gibt viele Hinweise darauf, dass die Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren an der Entstehung und der Entwicklung von Tumoren der Brust beteiligt sind [Gullick und Srinivasan 1998]. So ist in 20 – 30% aller Fälle von Brustkrebs eine Überexpression von Her2 beobachtet worden [Slamon *et al.* 1989], was in den meisten Fällen auf eine erhöhte Amplifikation des Genes c-erbB2 zurückgeführt werden kann [Pauletti *et al.* 1996]. In Studien wurde ferner gezeigt, dass eine Überexpression von EGFR und Her2 zu schlechten klinischen Prognosen und verkürzter Überlebensrate führen [Abd El-Rehim *et al.* 2004].

1.3.1 Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren

Die Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren besteht aus den vier eng verwandten Mitgliedern EGFR (c-erbB1), Her2 (c-erbB2), Her3 (c-erbB3) und Her4 (c-erbB4) [Gullick *et al.* 1998]. Diese Typ 1-Rezeptoren sind strukturell homolog aufgebaute Glykoproteine. Sie besitzen eine extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne (~ 620 AS), eine Transmembrandomäne (~ 23 AS) und eine intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne (~ 260 AS), welche von einer juxtamembranen (~ 40 AS) und einer C-terminalen regulatorischen Untereinheit (~ 232 AS) umgeben ist. Die extrazelluläre Domäne wird ihrerseits wiederum in vier Untereinheiten aufgeteilt, wobei sich zwei große homologe, solenoide Bereiche (I & III) und zwei cysteinreiche, stäbchenartige Domänen (II & IV) abwechseln (Abbildung 1.4). Die Ligandenbindung

erfolgt über die Domänen I und III, wohingegen die Domänen II und IV zur Dimerisierung des Rezeptors beitragen (siehe auch Abbildung 1.5). Intrazellulär besitzen bis auf erbB3 alle Rezeptoren eine Tyrosinkinasedomäne. Dieser innerhalb der Familie sehr homologe Abschnitt ist nach erfolgter Ligandenbindung und Rezeptordimerisierung für eine *trans*-Phosphorylierung der regulatorischen C-terminalen Domäne verantwortlich [Burgess *et al.* 2003]. Neben der Möglichkeit, dass ein Dimer aus zwei gleichen Rezeptoren besteht, werden auch Heterodimere beschrieben. Hierbei gilt für die übrigen Familienmitglieder vor allem Her2 als potentieller Interaktionspartner.

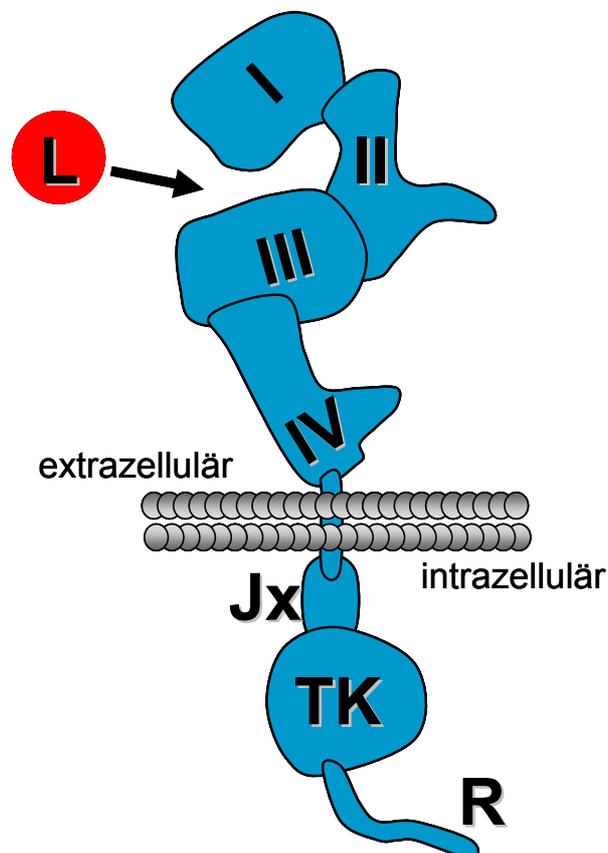


Abbildung 1.4: Aufbau der Rezeptoren der EGFR-Familie. Die vier Rezeptoren der EGFR-Familie sind eng verwandte Glykoproteine, deren extrazellulärer Bereich in vier Untereinheiten aufgeteilt werden kann. So sind die Domänen I und III, als auch die Domänen II und IV homolog. Der Ligand bindet über Domäne I und III an den Rezeptor, woraufhin die Domänen II und IV zur Dimerisierung beitragen. Intrazellulär findet sich eine kurze juxtamembrane Domäne (Jx), die zusammen mit einem regulatorischen C-terminalen Schwanz (R) die Tyrosinkinasedomäne (TK) umschließt. Die Grafik wurde nach Burgess *et al.* 2003 erstellt und modifiziert.

1.3.2 EGFR

Der epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor EGFR (c-erbB1) ist ein 1186 AS großes, glykosyliertes Membranprotein mit einer Masse von 170 kDa. EGFR reguliert die intrazellulären Effekte von Liganden wie des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) und des transformierenden Wachstumsfaktors (TGF α).

Bindet ein Ligand an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors, so bildet dieser ein Dimer. Dies führt intrazellulär zu einer starken Erhöhung der intrazellulären Tyrosinkinaseaktivität, wodurch Tyrosine der gegenüberliegenden C-terminalen Rezeptordomäne durch die EGFR-Kinase phosphoryliert werden. Am Rezeptor bilden sich auf diese Aktivierung hin Komplexe aus mehreren intrazellulären Proteinen, über die der externe Stimulus ins Cytosol weitergeleitet wird. So können die nächsten Schritte der Signalkaskaden beispielsweise über das ras Protein verlaufen und mittels Phosphorylierungen zur Aktivierung der mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinase) führen. Diese Kinase wiederum führt zur Poliferation von ruhenden Zellen [Wells 1999], in dem sie im Nukleus Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen (cdks) aktivieren. Es ist im Besonderen das Cyclin D, welches zusammen mit den cdks nach Aktivierung des EGF-Rezeptors die Zellen aus der Ruhephase lösen und unwiderruflich in die Teilungsphase führen [Lundberg und Weinberg 1999]. Somit kann ein permanent aktiver EGFR zur ständigen Zellteilung führen, wodurch maligne Zellpopulationen unkontrolliert wachsen können.

Zelluläre Prozesse, die durch membranständige Rezeptoren ausgelöst werden, sind nicht auf einzelne, diskrete Signalwege zurückzuführen. Vielmehr wird eine Zellantwort durch komplexe Netzwerke unterschiedlicher Signalkaskaden simultan reguliert [Brugge und McCormick 1999]. So werden dem EGFR neben der Begünstigung des Tumorwachstums auch anti-apoptotische Wirkungen [Karnes *et al.* 1998] und metastasierendes Potential [Price *et al.* 1996] zugeordnet.

1.3.3 Her2

Ein weiteres Mitglied der Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren ist das Protein Her2 (c-erbB2, Her2/neu, sp185). Her2 besteht aus 1234 AS, besitzt ein Molekulargewicht von 185 kDa und weist zu EGFR 53% Sequenzhomologie auf. Im Gegensatz zu den anderen Rezeptoren wurden für Her2 bisher keine Liganden identifiziert, jedoch ist eine starke Tyrosinkinaseaktivität nachgewiesen worden [Burgess *et al.* 2003].

Bisherige Strukturanalysen beschreiben für die extrazelluläre Domäne von Her2 eine räumliche Anordnung der Untereinheiten, die eine Rezeptor-Dimerisierung auch ohne Konformationsänderungen ermöglicht. Somit kann Her2 ohne externen Stimulus unter anderem mit EGFR Heterodimere bilden (Abbildung 1.5). Im Gegensatz zu den anderen erbB-Rezeptoren führt folglich eine Her2 Überexpression auch ohne ein externes Signal durch einen Liganden zur Transformation der Zellen. So korreliert die Überexpression des Her2-Genes unter anderem mit einem besonders aggressiven Phänotyp von Mammakarzinom, wie er in 25% aller Brustkrebsfälle auftritt [Burgess *et al.* 2003]. Die Eigenschaften von Her2 haben dieses Membranprotein zu einem Hauptantigen für die Brustkrebstherapie gemacht und zu der Entwicklung von therapeutischen Antikörpern wie dem humanisierten anti-erbB2/Her2-Antikörper Herceptin [Carter *et al.* 1999] geführt. Durch seine diagnostische und therapeutische Bedeutung ist dieser Rezeptor wohl das am besten untersuchte Mitglied der EGFR-Familie.

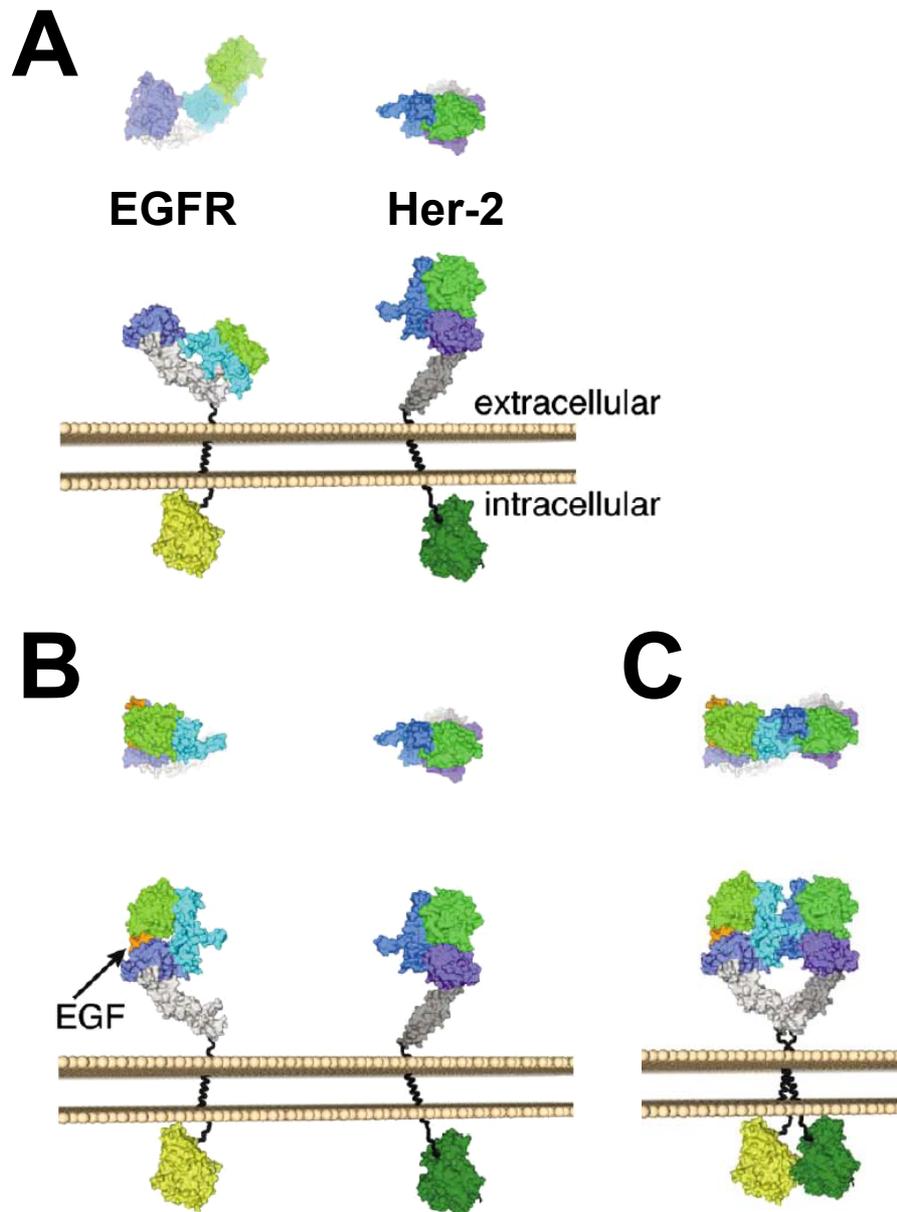


Abbildung 1.5: Heterodimerisierung von EGFR und Her-2 (erbB2). Es ist sowohl die Aufsicht (oben) als auch die Seitenansicht der membranverankerten Rezeptoren dargestellt. **A:** Der geschlossene EGFR-Rezeptor ohne Ligand steht neben dem Rezeptor Her2, der stets eine offene Konformation besitzt. **B:** EGFR erfährt unter Bindung seines Liganden EGF eine Änderung der Konformation. Der Rezeptor geht hierbei in einen offenen Zustand über und ermöglicht eine Dimerisierung. **C:** EGFR und Her2 bilden ein Heterodimer. Die beiden Proteine interagieren hierbei über ihre Dimerisierungshaarnadel, den membrannahen Bereich der Domäne IV und wohl auch über die Transmembranhelizes sowie die intrazellulären Kinasedomänen. Die Abbildung wurde aus Franklin *et al.* (2004) entnommen und modifiziert.

2. ZIELSETZUNG

In dieser Dissertation sollten im Rahmen des BMBF-Forschungsprojektes pepART miniaturisierte und parallelisierte Ligandenbindungsassays zur Charakterisierung und Selektion von Bindemolekülen entwickelt werden. Im Mittelpunkt dieser Bemühungen stand die Ausarbeitung von Assaysystemen mit Protein-Mikroarrays und deren Adaption auf ein multiparametrisches Screening-Verfahren.

In einem ersten Ansatz galt es, membranproteinspezifische Antikörper in einem miniaturisierten Ansatz zu testen. Diese Antikörper sollten hierbei Zellen spezifisch anfärben, welche über die entsprechenden Zelloberflächenantigene verfügen und auf planaren Trägern immobilisiert worden waren.

In dieser Dissertation sollte zudem am Beispiel von Antikörperfragmenten einer Binderbibliothek die Verwendung *bead*-basierender Assaysysteme zur eingehenden und schnellen Charakterisierung peptidspezifischer Bindemoleküle aus Rohextrakten erprobt werden. Ziel war es, Versuchssysteme zur Analyse von Antikörpern hinsichtlich Affinität, Bindungsbereich und Fängereigenschaften zu entwickeln.

Durch Abbaureaktionen der brustkrebsrelevanten Rezeptoren EGFR und Her2 sollten proteinspezifische Peptide definiert, synthetisiert und zur Antikörpergenerierung durch den Kooperationspartner Morphosys AG verwendet werden. Es galt aus einer Vielzahl an generierten Antikörpern potentielle Kandidaten für den Aufbau eines pepART-Assays zu identifizieren und hierbei das entwickelte Assaysystem anzuwenden.

Des Weiteren sollten miniaturisierte Immunoassays etabliert werden, um alternative Nachweismöglichkeiten von EGFR und Her2 zu untersuchen. So sollte EGFR über seinen natürlichen Liganden EGF bestimmt werden. Von Prof. Plückthun, Universität Zürich waren zudem Ankyrine als neuartige Fängermoleküle zugänglich, deren Einsatz zum Nachweis von Her2 analysiert werden sollte. Durch Kooperationen mit dem EOL an der Universitätsfrauenklinik Ulm sollten beide Testsysteme an analysierten Gewebeproben der weiblichen Brust überprüft werden.

3. MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte, Mikrotiterplatten und Software

Tabelle 3.1: Verwendete Geräte

Verwendung	Name und Hersteller
Fluoreszenzmikroskop	Axiophot, Carl Zeiss, Jena
Mikroarrayer	GMS417 Micro-Arrayer, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
Biochip-Scanner	GMS418 Micro-Array Scanner, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
Massenspektrometer	ESI-Q-Tof 1, Micromass, Manchester, UK
HPLC-Anlage	Gynkotec, Germering
Luminex ¹⁰⁰	Luminex®100™, Luminex Corp, Austin, TX, USA
HTS-Luminex	Luminex High Throughput System, Luminex Corp
Microdismembrator	B. Braun Biotech International, Melsungen
Reinstwasseranlage	MembraPure GmbH, Bodenheim
Peptidsyntheseroboter	SyRo I, MultiSynTech, Bochum
Spektrometer	Fluostar OPTIMA, BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg
Vacuum Station	Multiscreen Vacuum Station, Millipore, Billerica, MA, USA
Gelelektrophorese	NuPAGE Gelelektrophorese, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Geldokumentation	Kodak Image Station CF, Kodak Eastman, Rochester, NY, USA
Gefriertrocknungsanlage	Alpha-1, Christ, Osterode
Zentrifugen	Rotanta und Universal 2S Zentrifugen, Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge	5415D Zentrifuge, Eppendorf, Hamburg
Heizblock	Unitek HB-130, SEL Laboratory Products, England

Für bead-basierende Mikroarrays standen verschiedene Mikrotiterplatten zur Verfügung, die in Tabelle 3.1 zusammengestellt sind. Die hierbei eingeführten Synonyme für die unterschiedlichen Plattentypen werden im Folgenden weiter verwendet.

Tabelle 3.2: Mikrotiterplatten für Luminex-basierende Assays.

Synonym	Art (Kavitäten)	Beschichtung/Membran	Hersteller
Halfwell-96	Halfwell (96)	-	Corning, Corning, NY, USA
NBS-96	Halfwell (96)	Non-Binding Substrate	Corning, Corning, NY, USA
NBS-384	(384)	Non-Binding Substrate	Corning, Corning, NY, USA
Multiscreen	Filterplatte (96)	1,2 µm Durapore Membran	Millipore, Billercia, MA, USA
Bioinert	Filterplatte (96)	0,2 µm AcroPrep Nylon Membran	Pall Life Science, Ann Arbor, MI, USA

Tabelle 3.3: Verwendete Software

Verwendung	Name und Hersteller
Massenspektrometrie	Masslynx V3.5, Micromass
Datenanalyse	Origin V6.0, Microcal, Northhampton, MA, USA
Chromatographie	Chromeleon V4.32, DIONEX, Sunnyvale, CA, USA
Luminex ¹⁰⁰	IS 2.2, Luminex Corp.
Luminex HTS	V2.0, Luminex Corp.
planare Mikroarrays	Image V4.0, BioDiscovery, El Segundo, CA, USA
Peptidsynthese	Syro V1.22, MultiSynTech
Spektrometer	Fluostar OPTIMA V1.10-0, BMG Labtechnologies GmbH
Geldokumentation	Kodak Digital Science V3.0.0, Kodak Eastman
Mikroarrayer	Arrayer V1.5.0 Steuerungssoftware GMS417, Affymetrix
Biochip-Scanner	GMS Scanner Software V1.15.0.42, Affymetrix

3.1.2 Chemikalien und Puffersysteme

Alle Standardchemikalien (von analytischem Reinheitsgrad) wurden von Merck KGaA (Darmstadt), Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Taufkirchen) oder Carl Roth (Karlsruhe) bezogen.

Tabelle 3.4: Verwendete Puffer

Abkürzung	Zusammensetzung
PBS	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 8,0 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,4
PBST	0,05% (v/v) Tween®-20 PBS pH 7,4
CBS	1% (w/v) BSA (Fraktion V, Carl Roth, Karlsruhe) PBS pH 7,4
CBST	1% (w/v) BSA 0,1% (v/v) Tween®-20, PBS pH 7,4
BRET*	1% (w/v) Protein, 0,005% (v/v) Tween®-20, 150 NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,4
HBST	0,005% (v/v) Tween®-20, 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7,2

* Die Lösung Blockierungsreagenz für ELISA (BRE, #1112589, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) wurde gemäß der Anleitung hergestellt und gelagert. Der Proteinbestandteil dieses Puffers waren laut Hersteller proteolytische Spaltprodukte von gereinigter Gelatine. Vor Verwendung wurde dieser Puffer mit Tween®-20 versehen.

3.1.3 Antikörper und Fängermoleküle

3.1.3.1 Antikörper für Zell-Mikroarrays

Es wurden sieben monoklonale Antikörper aus Maus getestet. Das Antigen aller Antikörper war das Genprodukte des humanen Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC, *major histocompatibility complex*). Die Antigenspezifität der angeführten Antikörper bezieht sich jeweils auf die humanen Proteine (HLA, *human leukocyte antigen*). HLA-A, -B und -C gehören zu den MHC Klasse-I Molekülen, wohingegen HLA-D den MHC Klasse-II zuzuordnen ist. Des Weiteren wurden Antikörper gegen CD (*cluster of differentiation*)-Antigene verwendet.

Tabelle 3.5: Verwendete Antikörper für Zell-Mikroarrays

Klon	Antigen	Hersteller/Referenz
L243	HLA-DR	[Fong <i>et al.</i> 1981]
TÜ 36	HLA-DR;	Pharmingen, San Diego, CA, USA
TÜ 39	HLA-DR, -DP und -DQ	[Ziegler <i>et al.</i> 1986]
W6/32	HLA-A, -B, -C	Biotrend, Köln; [Barnstable <i>et al.</i> 1978]
GAP A3	HLA-A3	[Berger <i>et al.</i> 1982]
BB7.2	HLA-A2	[Parham und Brodsky 1981]
B1.23.2	HLA-B, -C	[Drouet <i>et al.</i> 1995]
CBL-150	CD3	Cymbus Ltd., Chandlers Ford, England; [Campana <i>et al.</i> 1987]
EO1;	CD45	Diatec, Oslo, Norwegen
Klon 69	CD45	BD Biosciences, San Jose, CA, USA

Zur Detektion wurde stets ein Cy3-konjugierter anti-Maus IgG + IgM aus Ziege (115-165-068, Dianova, Hamburg) eingesetzt.

3.1.3.2 Anti-GCN4 scFv-Fragmente

Aus dem Labor von Prof. Plückthun, Biochemisches Institut, Universität Zürich, wurden verschiedene anti-GCN4 scFv-Antikörperfragmente zur Verfügung gestellt. Für scFv-Fragmente mit N-terminalem FLAG-*tag* waren für das GCN4-Peptid RMKQLEPKVEELLPKNYHLENEVARLKKLVGER (7P14P) Affinitäten von 2,6 nM, 40 pM und 5 pM bestimmt worden. Diese K_D -Werte waren mit BIAcore basierenden Konkurrenzexperimenten ermittelt worden.

Für eine direkte und sensitive Nachweisbarkeit der scFv-Antikörper waren diese im Rahmen dieser Arbeit für den Einsatz in miniaturisierten Experimenten *in vivo* über einen Avi-*tag* biotinyliert [Schatz 1993] worden. Dies wurde an der Universität Zürich durchgeführt. Diese Binder lagen in geringerer Reinheit vor. BIAcore-Affinitätsdaten zu diesen Bindern waren nicht vorhanden. Die scFv-Antikörperfragmente besitzen ein Molekulargewicht zwischen 26 – 27 kDa.

Tabelle 3.6: Anti-GCN4 scFv-Fragmente und deren terminale Modifikationen.

scFv	N-Terminus	C-Terminus	Affinität
C11	FLAG- <i>tag</i>	His ₆ - <i>tag</i>	2,6 nM [Hanes <i>et al.</i> 1998]
C11nBio	Avi- <i>tag</i>	His ₆ - <i>tag</i>	
L34	FLAG- <i>tag</i>	His ₆ - <i>tag</i>	40 pM [Hanes <i>et al.</i> 1998]
L34nBio	Avi- <i>tag</i>	His ₆ - <i>tag</i>	
pRD01	FLAG- <i>tag</i>	His ₆ - <i>tag</i>	
SR4nBio	Avi- <i>tag</i>	His ₆ - <i>tag</i>	*5 pM [Zahnd <i>et al.</i> 2004]

* Die angeführten Affinitäten wurden mit scFv-Fragmenten mit FLAG-*tag* bestimmt.

3.1.3.3 Antikörper zur pepART-Assayetablierung

Zur Etablierung der Screening-Protokolle wurden folgende Antikörper verwendet. Ein anti-EGFR-Antikörper (Klon F4, Maus IgG, Abcam, Cambridge, England), welcher gegen die Sequenz DVVDADEYLIPQ generiert worden war und mit dem R-PE-markierten anti-Maus IgG (Ziege IgG, 115-116-146, Dianova) nachzuweisen war.

Von der Firma MorphoSys wurden zwei Fab-Antikörper (Fab-A; Fab-B) zur Verfügung gestellt. Neben ihrer Bindungseigenschaften, glichen diese Antikörper dem Format der Binder des *Panning*-Ansatzes. Es wurden cysteinmodifizierte Peptidantigene (#61, #62 und #63)¹ hergestellt, zu denen Fab-A und Fab-B spezifisch waren. Zur Detektion wurde ein R-PE markierter, in Ziege generierter anti-human-F(ab)₂-Antikörper (115-116-097, Ziege IgG, Dianova) verwendet.

3.1.3.4 Ankyrine und Antikörper gegen Her2

Alle verwendeten Ankyrine stammen aus dem Labor von Prof. Plückthun, Biochemisches Institut, Universität Zürich. In Tabelle 3.7 sind die jeweiligen Ankyrin-Klone und deren entsprechende Modifikationen aufgelistet. Die 26 – 30 kDa großen Ankyrine verfügten alle über einen *Avi-tag*, so dass sie über Biotin gerichtet immobilisiert werden konnten. Die Menge der Binder an fester Phase konnte anschließend über den *His₆-tag* bestimmt und verglichen werden. Die Binder wurden gegen die extrazelluläre Domäne IV des humanen Her2 generiert. Zur Selektion standen Ankyrine mit einer unterschiedlichen Anzahl an Modulen und Punktmutationen zur Verfügung.

Tabelle 3.7: Verwendete anti-Her2 Ankyrine mit N-terminaler Modifikation.

Klon	N-terminale Kappe	Module
AR-A02	<i>Avi-tag</i> + <i>His₆-tag</i>	2
AR-B03	<i>Avi-tag</i> + <i>His₆-tag</i>	3
AR-D11	<i>Avi-tag</i> + <i>His₆-tag</i>	2
AR-F07	<i>Avi-tag</i> + <i>His₆-tag</i>	3
AR-G03	<i>Avi-tag</i> + <i>His₆-tag</i>	2
AR-G11	<i>Avi-tag</i> + <i>His₆-tag</i>	2

Außerdem wurden die kommerziellen monoklonalen anti-Her2-Antikörper Herceptin (zu 95% humanisierter Antikörper aus Maus, Genentech, San Francisco, CA, USA),

¹ Die Sequenzen der Peptide #61, #62 und #63 unterliegen einer Geheimhaltungsvereinbarung mit MorphoSys AG, München

mAb-07 (Klon N29, Maus IgG, Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA) und sp185 (BMS120, Maus IgG, BenderMed Systems) sowie sp185-Coating (BMS207MSTCA, Maus IgG, BenderMed Systems) verwendet.

3.1.4 Peptide, Proteine und Proben

3.1.4.1 GCN4-Peptide und fluoreszenzmarkierte Antigene

Zur Affinitätsbestimmung wurde das Kompetitorpeptid 7P14P (RMKQLEPKVEELLPKNYHLENEVARLKKLVGER) verwendet. Zur Immobilisierung war zudem eine Variante mit N-terminalem Cystein (Cys-7P14P) vorhanden.

Zur Epitopkartierung der scFv-Antikörperfragmente wurden N- und C-terminal verkürzte sowie mutierte Varianten des *18mer* Peptides PKNYHLENEVARLKKLVG hergestellt. Zur Immobilisierung wurden alle Peptide N-terminal mit einem Cystein modifiziert. Zwischen dem Cystein und der Antigensequenz lag ein *Doa-Spacer*.

Tabelle 3.8: GCN4-Peptide zur Eingrenzung des Epitops. Die Peptide wurden nach Art der Verkürzungen und nach Anzahl an Aminosäuren geordnet. N steht hier für N-terminale und C für C-terminale Verkürzung. Die Zahl entspricht der Anzahl der Aminosäuren im Peptid. Alle Peptide wurden am N-Terminus mit einem *Doa-Spacer* und Cystein versehen.

Peptid	Sequenz	Peptid	Sequenz
N-17	KNYHLENEVARLKKLVG	C-17	PKNYHLENEVARLKKLV
N-16	NYHLENEVARLKKLVG	C-16	PKNYHLENEVARLKKL
N-15	YHLENEVARLKKLVG	C-15	PKNYHLENEVARLKK
N-14	HLENEVARLKKLVG	C-14	PKNYHLENEVARLK
N-13	LENEVARLKKLVG	C-13	PKNYHLENEVARL
N-12	ENEVARLKKLVG	C-12	PKNYHLENEVAR
N-11	NEVARLKKLVG	C-11	PKNYHLENEVA
N-10	EVARLKKLVG	C-10	PKNYHLENEV
N-09	VARLKKLVG	C-09	PKNYHLENE
N-08	ARLKKLVG	C-08	PKNYHLEN
N-07	RLKKLVG	C-07	PKNYHLE
N-06	LKKLVG	18mer	PKNYHLENEVARLKKLVG

Tabelle 3.9: Aminosäuresubstituierte GCN4-Peptide. Peptide mit substituierten Aminosäuren wurden mit Cystein und Doa-Spacer N-terminal modifiziert und entsprechend ihrer Mutation benannt. Die Nummer bezieht sich auf die Position der Substitution im *18mer*.

Peptid	Sequenz
H05Y	PKNY <u>Y</u> LENEVARLKKLVG
H05K	PKNY <u>K</u> LENEVARLKKLVG
L06I	PKNYH <u>I</u> ENEVARLKKLVG
L06K	PKNYH <u>K</u> ENEVARLKKLVG
E09K	PKNYHLEN <u>K</u> VARLKKLVG
E09D	PKNYHLEN <u>D</u> VARLKKLVG
E09Q	PKNYHLEN <u>Q</u> VARLKKLVG
R11K	PKNYHLENEVA <u>K</u> LKKLVG
R11E	PKNYHLENEVA <u>E</u> LKKLVG

Als fluoreszenzmarkierte Antigene wurden Peptide neben einer N-terminalen Modifikation mit Biotin auch mit dem Fluorophor FEW0744 (FEW Chemicals GmbH, Wolfen) synthetisiert. Dieser Fluorophor wurde am N-Terminus von AEEQLISEEDLHHHHHH (FEW-MyHis) und dem GCN4-Peptid 7P14P eingeführt. Beim Peptid FEW-Lys-Biotin hingegen wurde der Fluorophor über zwei Aminocaprinsäure-Gruppen an die ϵ -Aminogruppe von Lysin gekuppelt. Neben Peptiden wurden zur Kontrolle ein Poly-Adenosin-Oligonukleotid (PolyA, 20x Adenosin, MWG, Ebersberg) verwendet, das am 3'-Ende Biotin-TEG (Triethylenglykol) trug. Am 5'-Ende war das Oligonukleotid mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markiert.

3.1.4.2 EGFR-Proben

Zur Untersuchung der EGFR-Expression mit Ligandenbindungsassays wurden Zellen der Brustkrebszelllinie BT-20 (ATCC #HTB-19) von Dr. Deissler, EOL, Universitätsfrauenklinik Ulm bereitgestellt.

Es waren Membranfraktionen von Brusttumorproben von Dr. Robert Zeillinger, EOL, Universitätsfrauenklinik Ulm zur Verfügung gestellt worden. Diese Proben waren bereits in der Klinik über RIA-Experimente auf ihren Gehalt an EGFR bestimmt worden [Zeillinger *et al.* 1993]. Die Proteinkonzentrationen waren ebenfalls bekannt.

Tabelle 3.10: Verwendete Brusttumorproben. Die Proben lagen als Membranfraktionen vor und waren durch RIA-Messungen in ihrem Gehalt an EGFR bestimmt worden.

Probe	EGFR [fmol/mg]	Probe	EGFR [fmol/mg]	Probe	EGFR [fmol/mg]	Probe	EGFR [fmol/mg]
6603	42	6901	8	6963	1	7011	12
6615	38	6906	21	6966	72	7046	3
6621	46	6909	7	6981	9	7050	600
6657	6	6910	16	6986	246	7051	33
6659	12	6923	10	6990	6	7062	66
6667	8	6936	14	6997	10	7063	14
6673	115	6937	122	7000	16	7066	13
6857	46	6940	42	7002	31	7074	0
6862	24	6948	11	7005	135	7076	4
6873	22	6949	13	7006	4	7078	25
6875	82	6950	18	7008	0	7080	5
6877	11	6956	5	7010	2		

3.1.4.3 Her2-Proteine und Gewebeproben

Die extrazelluläre Domäne des humanen Her2-Rezeptors war über zwei rekombinante Antigene zugänglich. Dies waren ebB2/Fc-Chimäre (1129-ER, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), welches als dimeres Fusionsprotein vorlag, und ein monomeres Her2-Standardprotein sp185 (BMS207S, BenderMed Systems, Wien, Österreich). Es wurde zudem Her2 aus Zellen analysiert. Die stark Her2-positiven Brustkrebszellen der Linie SK-BR-03 (ATCC #HTB 30) stammten von Dr. Deissler, EOL, Universitätsfrauenklinik Ulm. Zellen eines epidermalen Karzinoms der Linie A431 (ATCC #CRL 1555) wurden von Dr. Sabine Sturany, Abteilung Molekularbiologie, NMI an der Universität Tübingen zur Verfügung gestellt.

Darüber hinaus wurden Gewebeproben der weiblichen Brust untersucht, die an der Universitätsfrauenklinik Ulm entnommen wurden und von Dr. Deissler zur Verfügung gestellt wurden. Es handelte sich hierbei um Gewebeproben die immunhistochemisch auf ihren Her2-Status (0 – 3+) analysiert worden waren. Von jeder der sechs Patientinnen waren sowohl Tumor- als auch Normalgewebe zugänglich. So waren die Tumorproben #1 und #6 mit Her2-Status 0 (Null) beschrieben, wohingegen das karzinome Gewebe der Patientinnen #2 – #5 einen Her2-Status 3+ hatte.

3.2 Biochemische und zellbiologische Methoden

3.2.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung wurde mittels der Methode nach Bradford durchgeführt [Bradford 1976]. Es wurde eine Standardverdünnungsreihe als Proteinstandard BSA (Fraktion V, Carl Roth, Karlsruhe) vorbereitet. Das Bradford-Reagenz (Bio-Rad, München) wurde vor der Messung 1:5 in destilliertem Wasser verdünnt. Von den Standards und Proben wurden in eine Mikrotiterplatte (PS Microplatte 96-Well, Greiner bio-one, Frickenhausen) je 2,0 µl auf 98 µl verdünntes Bradford-Reagenz gegeben. Die dabei entstehende Farbänderung wurde in einem Spektrometer Fluostar OPTIMA bei 570 nm gemessen. Die Proteinkonzentrationen ergaben sich durch rechnerischen Vergleich der optischen Dichte der Proben mit der Eichkurve.

3.2.2 SDS-Gelelektrophorese

Die diskontinuierliche denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung von Proteingemischen nach der Molekülgröße eingesetzt. Proteine wurden mit einer Elektrophorese-Apparatur der Firma Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) aufgetrennt. Hierzu wurden 4 – 12% Bis-Tris NuPAGE Gele in ein XCell Modul eingespannt und eine XCell SureLock Kammer mit 1X SDS NuPAGE MES (Morpholino-Ethansulfonsäure) Laufpuffer befüllt. Als Stromquelle diente eine Power Ease500 Einheit. Die Proteinauftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 200 V und einer Stromstärke von 70 – 125 mA. Die Proben wurden hierzu gemäß den Angaben des Herstellers behandelt. NuPAGE-LDS-Puffer (2,5 µl, 4x) und NuPAGE-Reduktionsmittel (1 µl, 10x) wurden in einem Reaktionsgefäß mit Probe (1 µg) und H₂O_{dd} auf ein Volumen von 10 µl gebracht und anschließend über 10 min bei 70°C im Heizblock (UNITEK HB-130, SEL Laboratory Products, England) erhitzt. Es wurden Probe (10 µl) und Standardmarker (5 µl, SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen) zur Auftrennung verwendet.

Zur Anfärbung der Proteinbanden wurden alle Gele über 1,5 h in einer Coomassie-Färbelösung aus 0,2% (v/v) Coomassie Blue G 250 (Sigma, Taufkirchen) 50% (v/v) Methanol und 10% (v/v) Essigsäure inkubiert. Die Entfärbung der Gele erfolgte in zwei

Stufen. Nach einem ersten Entfärben in 50% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ über 10 min wurden alle Gele zur weiteren Behandlung in eine zweite Lösung aus 10% (v/v) Ethanol und 5% (v/v) Essigsäure in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ transferiert. Die zweite Entfärberlösung wurde bis zur optimalen Entfärbung mehrfach gewechselt. Alle SDS-Gele wurden mit Hilfe der Kodak Image Station 440CF (Kodak Eastman, Rochester, NY, USA) dokumentiert.

3.2.3 Zellkultur

Es wurden folgende humane Zelllinien in RPMI 1640 mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) in Suspension kultiviert: Die monocytische Zelllinie THP-1 (#ACC 16, DSMZ, Braunschweig), zwei unterschiedliche B-Zell-Linien Boeth Bo (IHW #9031, ECCAC, Salisbury, Wiltshire, England) und WT-51 (IHW #9029), die Lymphoma Zelllinie U937 (DSMZ #ACC-5) sowie Jurkat T-Zellen (DSMZ #ACC-282). Als adhärent wachsende Zellen wurde eine humane Osteosarcoma Zelllinie Saos-2 (#HTB 85, ATCC, Manassas, VA, USA) in modifiziertem McCoy's 5A Medium (BioWhittaker Europe, Vervier, Belgien) 15% FCS kultiviert. Die humane Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y (ATCC #CRL 2266) wurde in 45% HAM F12 und 45% Eagle's Minimalmedium (MEM), 1% MEM mit nichtessentiellen Aminosäuren ohne Glutamin mit 9% FCS kultiviert.

Die humane Nierenzelllinie HEK293 (ATCC #CRL 1573) und die Mäusefibroblastenzelllinie NIH-3T3-Swiss albino (ATCC #CCL 92) wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium mit hohem Anteil an Glukose und 10% FCS kultiviert. Die Zellen der CHO-DUKX Linie (ATCC #CRL 9096), die aus dem Ovar eines chinesischen Hamsters stammen, wurden in MEM- α (BioWhittaker Europe) mit 10% FCS kultiviert. Alle diese Zellen wurden bei 37°C und 5% CO_2 -Gehalt gehalten. Die Rattenzelllinie PC12 (ATCC #CRL 1721) wurde in 82,5% Hank's F12K, 15% Pferdeserum (PAA Laboratories, Cölbe) und 2,5% FCS bei 37°C in 10% CO_2 kultiviert. Alle Kulturmedien waren mit 2 mM Glutamin and 100 Einheiten/ml Penicillin–Streptomycin versehen. Adhärente Zellen wurden durch kurze Behandlung mit Trypsin–EDTA (1 mg/ml, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) vor der Ernte abgelöst. Falls nicht ausdrücklich erwähnt, stammten alle Reagenzien der Zellkultur von GibcoBRL, Eggenstein.

3.2.4 Kopplung von cysteinhaltigen Peptiden an Proteine

Alle Peptide aus Tabelle 4.4 wurden über zwei heterobifunktionale Quervernetzungsreagenzien auf die Trägerproteine BSA und TFR gebunden. Die Kopplung wurde hierbei nach einem modifizierten Protokoll² der MorphoSys AG, München, durchgeführt. Eine Abtrennung der Peptid-Protein-Komplexe von freiem Peptid wurde über Glassäulen (Glass Econo-Column, 1,0 cm x 20 cm, Bio-Rad, München) mit einer Matrix aus Sephadex G-100 Superfine (Amersham Bioscience) durchgeführt. Die Peptid-Protein-Komplexe wurden hinsichtlich Reinheit und Kopplungseffizienz mit SDS-Gelelektrophorese analysiert. Die Proteinkonzentration wurde mit der Bradfordmethode ermittelt.

3.2.5 Proteinextraktion

3.2.5.1 Extraktion von EGFR aus Zellen

Zur Extraktion der Membranproteine wurden tiefgefrorenen BT-20 Zellpellets in 2% (v/v) nichtionischen Detergenz Nonidet P-40 (NP40, Sigma), 50 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris, Sigma), 120 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ und 2% (v/v) Protease-Inhibitor (Sigma) solubilisiert (300 µl). Auf Eis gehaltene Zellen wurden mit einem Ultraschallstab (4x 5 s, Branson Sonifier, Korea) aufgeschlossen. Die Lysate wurden anschließend über 5 min bei 13000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Methode von Bradford verwendet.

3.2.5.2 Extraktion von Her2 aus Zellen und Geweben

Zur Extraktion von membranständigen Proteinen wurden Zellkulturzellen (SK-BR-03 und A431) und Tumor- bzw. Normalgewebe (Patientin #1 - #6) in einem Lysepuffer behandelt. Dieser bestand aus 1% Triton X-100 (Octylphenol-polyethylen Glykolether, Sigma), 150 mM NaCl, 50 mM Tris (pH 7,4), 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂,

² Das genaue Protokoll zur Kopplung der Peptide an die Trägerproteine BSA und TFR unterliegt einer Geheimhaltungsvereinbarung mit MorphoSys AG, München

1% (v/v) Phosphatase-Inhibitor 1 (Sigma), 1% (v/v) Phosphatase-Inhibitor 2 (Sigma) und 2% (v/v) 50x Protease-Inhibitor (Roche, Basel, Schweiz).

In flüssigem N₂ gefrorene Tumore und Normalgewebe der weiblichen Brust wurden durch Behandlung in einem Mikrodismembrator U (B. Braun Biotech International, Melsungen) über 1 min bei einer Frequenz von 2000 Hz pulverisiert. Anschließend wurden alle Proben mit Lysepuffer (500 µl) in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß resuspendiert und auf Eis gebracht. Alle 5 min wurden die Proben durch kurzes Vortexen gemischt. Nach einer Lyse über 60 min konnten die Zellen mit einem Ultraschallstab (Branson Sonifier, Korea) sonifiziert werden, um eine vollständige Auflösung der Zellmembran zu erreichen. Hierzu wurde der Ultraschallstab bei einer Verstärkung 70% und 10 Impulsen pro Sekunde (3x 10 s) in das Lysat getaucht. Anschließend wurden die Lysate 10 min auf Eis belassen, ehe bei 4°C über 5 min und 13000 rpm zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde einer Proteinbestimmung nach Bradford unterzogen. Alle Lysate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.3 Peptidsynthese

Die Herstellung der Peptide erfolgte nach dem von Merrifield entwickelten Prinzip der Festphasensynthese [Merrifield 1963]. Die Synthese wurde automatisiert auf einem RSP 5031 Syntheseroboter (Tecan, Hombrechtikon, Schweiz) mit der Steuerungssoftware Syro 1.22 (MultiSynTech, Bochum, Deutschland) durchgeführt. Peptide wurden hierbei in Ansätzen zu je 15 µmol nach der Fmoc-Strategie [Fields und Noble 1990] hergestellt. Die verwendeten Fmoc-Aminosäure-Derivate wurden von NovaBiochem (Darmstadt), Neosystems (Straßburg, Frankreich) und Bachem (Budendorf, Schweiz) bezogen. Die Standardchemikalien zur Peptidsynthese stammen von Merck KGaA (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze).

3.3.1 Automatisierte multiple Festphasenpeptidsynthese

Durch Einsatz des Syntheseroboters konnten parallel bis zu 288 (3x 96) verschiedene Peptide synthetisiert werden. Als Synthesereaktoren wurden 1 ml Filterspitzen mit hydrophoben Filtereinsätzen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) auf speziell hergestellten Syntheseblöcken mit integrierter Absaugvorrichtung eingesetzt. Die Reaktionsspitzen wurden mit den mit der entsprechenden Aminosäure beladenen Polystyrol-Divenylbenzol (PS-DVB)-Harzen gefüllt. Die durchschnittliche Belegung lag bei ca. 0,5 mmol Aminosäurederivat pro Gramm Harz. Die Kopplungen Fmoc-geschützten Aminosäuren, der ϵ -Aminocaprinsäure und der 8-Amino-3,6-dioxaoctansäure (Doa) erfolgten bei neunfachem Überschuss an Diisopropylcarbodiimid (DIC). Aminosäurederivate und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) wurden in äquimolarer Menge (je 0,55 mol/l) in Dimethylformamid (DMF) gelöst. Bei jedem Kopplungsschritt wurden 240 μ l Lösung auf in DMF vorgequollenes Harz pipettiert. Anschließend wurde einer Lösung DIC (80 μ l, 1,5 mol/l) in Dichlormethan (DCM)/DMF (2:1) hinzupipettiert.

Tabelle 3.11: Ablauf eines Zyklus der Standardpeptidsynthese am multiplen Peptidsynthesizer.

Operation	Reagenzien	Reaktionszeit	Volumen
Waschen	DMF	je 0,5 min	3x 400 μ l
Abspaltung von Fmoc	20% (v/v) Piperidin/DMF	15 min	300 μ l
Waschen	DMF	je 0,5 min	7x 400 μ l
Kopplung	1,5 M DIC in DCM/DMF 2:1 0,55 M Aminosäure-Derivat in 0,55 M HOBt in DCM/DMF 2:1	60 min	80 μ l 240 μ l
Waschen	DMF	je 0,5 min	3x 400 μ l
Acetylierung	1,5 M Diisopropylethylamin in DCM/DMF 2:1 1,5 M Acetanhydrid in DCM/DMF 2:1	30 min	150 μ l 150 μ l

Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte mit 20% (v/v) Piperidin in DMF. Zur Blockierung freier Aminogruppen, die bei unvollständiger Kopplung entstehen können, erfolgte nach jedem Kopplungszyklus eine Acetylierungsschritt (*Capping*). Freie

Aminogruppen wurden dabei durch Zugabe von Diisopropylethylamin (1,5 mol/l, 150 μ l) und anschließender Zugabe von Essigsäureanhydrid (1,5 mol/l, 150 μ l) in DCM/DMF 2:1 (v/v) umgesetzt. Nach Ende der kompletten Synthese wurden die Harze mit Methanol (3x 300 μ l) und Diethylether (3x 300 μ l) gewaschen. Ein kompletter Zyklus zur Standardpeptidsynthese am multiplen Syntheseautomaten für Peptide ist tabellarisch in Tabelle 3.11 zusammengefasst.

3.3.2 Einführung von Modifikationen an Aminogruppen

Modifikationen von Peptiden an Aminogruppen mit Biotin (A0969, Applichem, Darmstadt) oder mit dem Cy3-analogen Fluorophor FEW0744 (FEW Chemicals GmbH, Wolfen) wurde wie folgt durchgeführt. Modifikationen freier ϵ -Aminogruppen und N-terminaler Aminogruppen erfolgten zur Umsetzung von Fluoreszenzfarbstoffen unter Lichtausschluss.

Zur Markierung der Peptide über die ϵ -Aminofunktion von Lysin wurde in der Synthese Fmoc-Lys(Alloc)-OH eingesetzt. Nach Ende der Synthese wurde der freie N-Terminus durch eine *tert.*-Butyloxycarbonyl Schutzgruppe an der N-terminalen Aminofunktion geschützt. Dazu wurden 10eq Diisopropylethylamin in DCM (300 μ l) 1 h bei Raumtemperatur mit dem harzgebundenen Peptid umgesetzt. Anschließende Waschschrte mit DCM (3x 500 μ l), Methanol (2x 500 μ l) und Diethylether (2x 500 μ l) folgten. Die selektive Freisetzung der Allyl-Schutzgruppe von der ϵ -Aminogruppe des Lysins erfolgte durch 10eq Tetrakis-[triphenylphosphin]-palladium in einer Mischung 92,5% (v/v) Chloroform, 2,5% (v/v) N-Methylmorpholin und 5% (v/v) Essigsäure (150 μ l). Das Reaktionsgemisch wurde über drei Stunden permanent geschüttelt. Das Harz wurde anschließend mit Chloroform (3x 500 μ l), 0,5% (v/v) Diisopropylethylamin in DMF (3x 500 μ l), 0,5% (w/v) Dinatriumdiethyldithiocarbamat in DMF (3x 500 μ l) und anschließend mit DMF (3x 500 μ l) gewaschen. Dazu wurde eine Mischung aus 3eq Carboxy-Fluorophor, 3eq O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborat, 3eq HOBt und 6eq Diisopropylethylamin in DCM zum harzgebundenen Peptid gegeben. Das Gesamtvolumen betrug in der Regel 300 μ l. Waschschrte mit DCM (3x 500 μ l), Methanol (2x 500 μ l) und Diethylether (2x 500 μ l) folgten.

N-terminale Modifikationen der Peptide wurden mit Biotin in einem Volumen von 300 μ l und mit FEW0744 in einem Volumen von 100 μ l durchgeführt. Für eine

Biotinylierung wurden die Harze nach der Standardsynthese in N-Methylmorpholin (3x 5 min) quellen gelassen. Eine Mischung aus 5eq Biotin, 5eq O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-tetrafluoroborat, 5eq HOBt und 10eq Diisopropylethylamin in N-Methylmorpholin wurde zum harzgebundenen Peptid gegeben. Zur Einführung des Fluorophores wurden die Harze nach der Standardsynthese in DMF (3x 5 min) quellen gelassen. Es wurde eine Mischung aus 3eq FEW0744, 3eq DIC und 5eq HOBt in DMF zum harzgebundenen Peptid gegeben. Die Vollständigkeit aller Markierungen wurde mittels Kaisertest überprüft. Die Abspaltung vom Harz wurde wie unter 3.3.4 angegeben durchgeführt.

3.3.3 Nachweis freier Aminogruppen nach Kaiser

Zur Überprüfung der Vollständigkeit der Kopplung wurde ein Nachweis freier Aminogruppen durch Umsetzung mit Ninhydrin nach Kaiser [Kaiser *et al.* 1970] durchgeführt. Hierzu wurden drei Lösungen hergestellt: KCN in Wasser (0,66 mg/ml) wurde mit Pyridin 1:50 verdünnt. Für Lösung B wurde Ninhydrin (500 mg) in n-Butanol (10 ml) gelöst. Lösung C: Phenol (80 g) wurde in n-Butanol (20 ml) gelöst. Beim Kaisertest wurde eine Spatelspitze des zu testenden Syntheseharzes in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit je einem Tropfen von Lösung A, B und C versetzt. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße 5 min auf 110°C erhitzt. Bei Anwesenheit primärer Aminogruppen wurde eine intensive Blaufärbung des Harzes detektiert, ansonsten blieb die Lösung farblos. Parallel wurde eine Leerwertkontrolle ohne Harz durchgeführt.

3.3.4 Abspaltung der Peptide von den polymeren Trägern

Die Freisetzung der Peptide vom Trägerharz und die Abspaltung der permanenten Schutzgruppen der Aminosäureseitenketten erfolgten in einem Schritt. Hierzu wurden 300 µl einer Lösung aus 5% (v/v) Ethandithiol, 5% (v/v) H₂O_{dd}, 86% (v/v) Trifluoressigsäure und 4% (v/v) Triisopropylsilan zu 15 µmol harzgebundenem Peptid gegeben. Die Abspaltung erfolgte über 3h. Nach Abtrennung des Syntheseharzes und Überführung der Abspalllösung in ein 10 ml Polypropylenröhrchen wurden die Peptide durch Zugabe von Diethylether (5 ml) ausgefällt. Zur

Verbesserung der Peptidausbeute wurde die Fällungslösung für 1 h bei -20°C durchgeführt. Die ausgefällten Peptide wurden bei 2500 rpm (Rotanta, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) pelletiert und die Etherphase verworfen. Es wurden 2 Waschvorgänge durchgeführt. Dabei wurde der Peptidniederschlag jeweils mit frischem Ether durch intensives Vortexen aufgeschlämmt. Zusätzlich wurden die Peptid-Ether-Suspensionen für 5 min mit Ultraschall behandelt. Nach 2 Waschschritten wurde der Peptidniederschlag in 4:1 (v/v) tert-Butanol und Wasser (5 ml) gelöst. Enthielt die Peptidsequenz Tryptophan, so wurde zum Lösen der Peptidpellets dem Butanol-Wasser-Gemisch noch 0,4% (v/v) Trifluoressigsäure zugesetzt. Nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff wurden die Peptide bis zur vollständigen Trocknung in einer Gefriertrocknungsanlage Alpha-1 (Christ, Ostrode, Deutschland) lyophilisiert.

3.3.5 Lagerung und Lösen von Peptiden

Alle gefriergetrockneten Peptide wurden bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert. Soweit nicht anders erwähnt wurden Anteile der Peptide in 40% Acetonitril/ H_2O gelöst und anschließend bis zur Verwendung der Lösung bei -20°C gelagert.

3.4 Qualitätskontrolle der Peptidsynthese

3.4.1 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie

Zur Bestimmung der Molekülmasse durch Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) wurden die Peptide (6 μg) in 25% (v/v) Isopropanol, 25% (v/v) $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$, 50% (v/v) Acetonitril und 0,05% (v/v) Ameisensäure MS-Lösungsmittel (200 μl) gelöst. Die Einstellungen des ESI-Massenspektrometers (ESI-Q-Tof 1, Micromass, Manchester, UK) zur Analyse synthetischer Peptide waren für die Kapillarspannung 3.2 kV und für den Gradienten an der Konusdüse 20 bis 40 V (200 - 2000 Da). Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Analysesoftware MassLynx (Micromass). Die ESI-MS Spektren wurden mit Hilfe des MaxEnt3 Algorithmus der

MassLynx Software in die Molekülionenspektren $[M+H]^+$ umgewandelt, um die Auswertung zu vereinfachen.

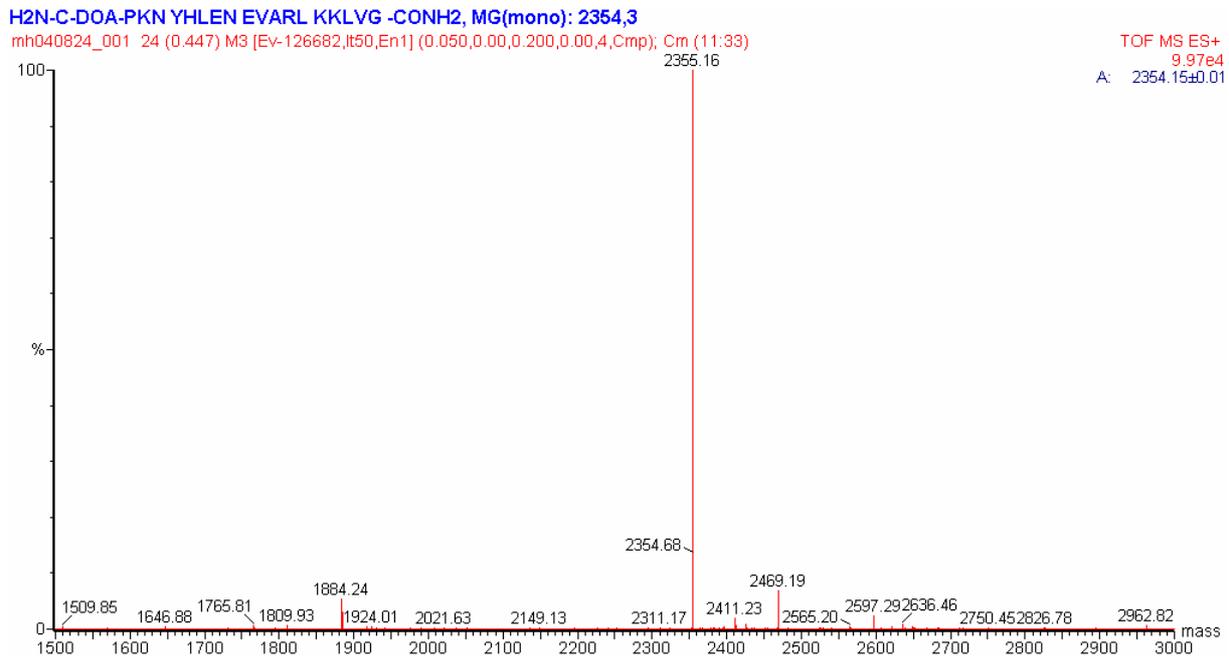


Abbildung 3.1: MaxEnt3 prozessiertes ESI-MS-Spektrum von Cys-Doa-PKNYHLENEVARLKKLG. Das Spektrum zeigt das Signal des einfach geladenen Molekülions $[M+H]^+$ bei 2355,2 Da/e. Somit konnte die Vollständigkeit der Synthese bestätigt werden. Die berechnete Peptidmasse des Produktes lag bei $[M+H]^+$: 2355,3 Da]. Es sind nur geringfügige Signale von Nebenprodukten erkennbar.

3.4.2 High performance liquid chromatography (HPLC)

Die Bestimmung des Reinheitsgrades der synthetisierten Peptide wurde mit einer Anlage für Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC, *high performance liquid chromatography*) von Gynkotek (Germering, Deutschland) durchgeführt. Diese zur analytischen Trennung verwendete HPLC-Apparatur bestand aus einem Autosampler mit 50 Stationen (Gina-50), einer programmierbaren Pumpeneinheit (High Precision Pump Model 480) und einem Diodenarraydetektor (UVD 320 S). Gesteuert wurde die Anlage mit der Software Chromeleon 4.20.

Analytische Trennungen wurden bei einer Flussgeschwindigkeit von 3 ml/min mit einer monolithischen C-18 Säule (RP 18 E 50 x 4.6 mm; Chromolith Speed ROD, Merck, Darmstadt, Deutschland) an reverser Phase durchgeführt. Als mobile Phase dienten Eluent A aus 0,1% (v/v) TFA/H₂O_{dd} und Eluent B aus 0,1% (v/v) TFA/ Acetonitril in

linearen Gradientensystemen. Die Peptide wurden in Eluent A bzw. 4:1 A und B gelöst (1 mg/ml). Zur Analyse wurden 10 µl in die HPLC-Anlage injiziert.

Der Reinheitsgrad der Peptide wurde anhand der Signalfächen der Chromatogramme durch die Absorption des Analyten bei 214 nm bestimmt (Abbildung 3.2).

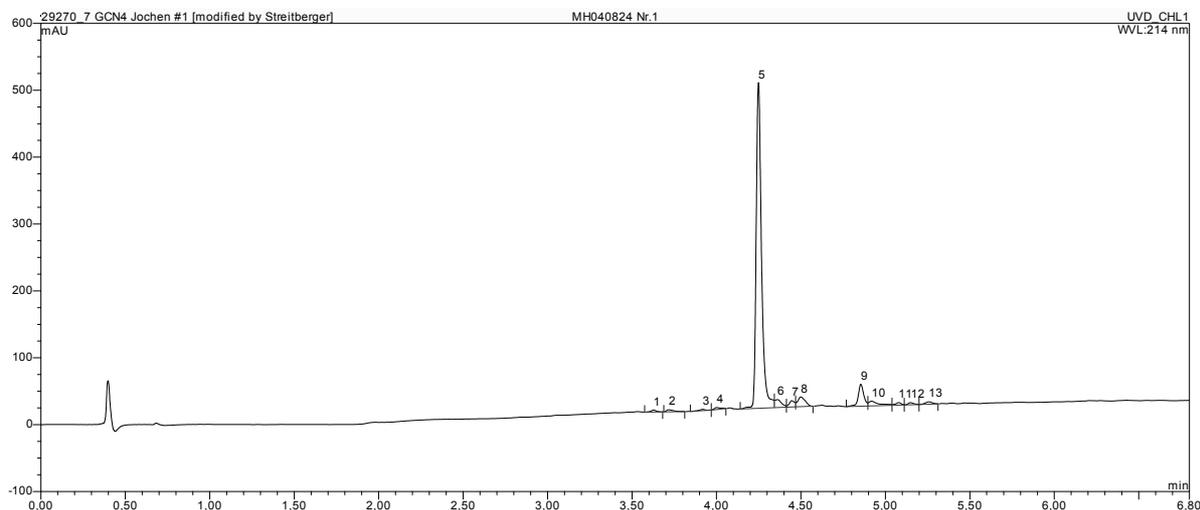


Abbildung 3.2: HPLC-Elutionsprofil des Peptides Cys-Doa-PKNYHLENEVARLKKLG. Das Chromatogramm zeigt die verschiedenen Produkte der Peptidsynthese. Nach Integration der Kurvenflächen ergab sich eine relative Reinheit des Hauptproduktes (5) von 81%. Am linken Ende erkennt man bei ca. 0,5 min ein Signal, das durch Druckschwankungen bei der Injektion der Probe hervorgerufen wurde. Nach 4,3 min eluierte das Hauptprodukt.

Aufgrund ungleicher Extinktionskoeffizienten der verschiedenen Peptide können ohne Kalibrierung keine absoluten Angaben zum Peptidgehalt, zur Menge und zur Reinheit der Peptide getroffen werden. Analysiert wurde deshalb bezüglich eines relativen Reinheitsgrades des Hauptproduktes bezogen auf die Gesamtfläche aller Signalfächen. Signale unter 1% relativer Signalfäche wurden nicht berücksichtigt.

In der Regel wurden die Analysen bei linearem Gradienten von Eluent B von 1,5 min (3% Eluent B) bis 6 min (95% Eluent B) durchgeführt. Die Säule wurde anschließend über 6 – 8 min gespült (95% Eluent B) und 2 min equilibriert (3% Eluent B).

3.4.3 Präparative HPLC

Die Abtrennungen von Synthesenebenprodukte wurde mit einem HPLC-System von Gynkotec (Germering, Deutschland) mit einem UV-Detektor (SP 6 V, Gynkotec) und zwei präparativen Pumpeneinheiten (High Precision Pump Model 480, Gynkotec)

durchgeführt. Nach manueller Injektion der gelösten Probe, verliefen präparative Trennungen bei einer Flussrate von 15 ml/min an einer RP18 Säule (Lichrospher 100, 5 µm Korngröße, 250 x 20 mm, Merck, Darmstadt). Das Laufmittelsystem und die Detektion bei 214 nm wurden analog zur analytischen HPLC beibehalten. Der Gradient und die Anfangskonzentrationen von Eluent A und B wurden für jede Trennung anhand der analytischen HPLC Daten optimiert.

3.5 Methoden zur Herstellung von Mikroarrays

3.5.1 Herstellung von Zell-Mikroarrays

Planare Mikroarrays wurde mit einem Micro-Arrayer GMS 417 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) hergestellt. Vor jedem Druckvorgang wurden die Eintauchtiefe der Ringe und die Standarddruckeinstellung der Nadeln gemäß den Angaben des Herstellers kalibriert. Die Einstellungen des Kontaktdruckvorganges wurden über einen Rechner mit Steuerungssoftware Arrayer (V1.5.0, Affymetrix) vorgenommen, so dass von jeder Probe in einem Abstand von 375 µm mit einem Kontakt der Nadel kleine Flüssigkeitströpfchen, sogenannte *Spots*, abgesetzt wurden.

Es wurden ca. 10^7 Zellen geerntet und 5 min bei 1.000 rpm zentrifugiert (Universal 2 S, Hettich, Tuttlingen). Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden danach in der verbliebenen Flüssigkeit resuspendiert und zur Lagerung mit 0,5% (v/v) Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt) in PBS (1 ml, pH 7,4) für 30 min fixiert. Die fixierten Zellen wurden bei 4°C in PBS (10 ml) maximal bis zu 10 Tagen aufbewahrt, bevor sie zur Herstellung von Zell-Mikroarrays herangezogen wurden. Vor der Überführung der Zellen in die Vorlagegefäße wurden die gelagerten Zellen erneut zentrifugiert (5 min, 1.000 rpm) und der Überstand verworfen. Es wurden direkt aus dem Niederschlag 50 µl an Zellsuspension in eine Mikrotiterplatte mit 384 Kavitäten überführt. Die Sedimentation der dichten Zelllösungen wurde durch Zugabe von Biocoll (2 µl, Biochrom AG, Berlin) verlangsamt, so dass über die Zeit des Druckvorgangs eine möglichst homogene Suspension stabilisiert werden konnte. Zur Drucklösung wurde außerdem 80% (v/v) Glycerin (2 µl, Merck, Darmstadt) in PBS beigefügt, um ein schnelles Austrocknen der abgesetzten Zellen zu verhindern. Als

Negativkontrolle wurden in Vorlagegefäße eine Lösung mit 3% (v/v) Glycerin und 2% (v/v) Biocoll (50 µl, in PBS) befüllt.

Die Zellen wurden durch den GMS 417 Microarrayer in Suspensionen auf Objektträger mit Poly-L-Lysin-Beschichtung (Poly-prep Slides, Sigma, Taufkirchen) mit einem Kontakt pro *Spot* abgesetzt. Dies entsprach einem Flüssigkeitsvolumen von 50 µl pro *Spot*. Hiernach wurden die Objektträger über 60 min bei 37°C gehalten, um das Anbinden der Zellen an die Oberfläche zu gewährleisten. Die Zell-Mikroarrays wurden sodann mit einem Fettstift (PAP Pen, SCI Science Service, München) umrandet und mit Blockierungspuffer aus 1,5% (w/v) BSA (Fraktion V, Carl Roth, Karlsruhe), 5% (w/v) Magermilchpulver (Heierle, Radolfzell) in PBS (30 µl) über 45 min behandelt. Die Arrays wurden hiernach entweder direkt verwendet oder nach Eintrocknung der Blockierungslösung bei 23°C im Dunkeln gelagert. Vor Verwendung gelagerter Zell-Mikroarrays wurden diese mit 0,1% (v/v) Tween®-20 in PBS pH 7,4 (3x 5 min) rehydriert.

3.5.2 Luminex *Beads* - Beladung und Kontrolle

3.5.2.1 Kopplung an LumAvidin-*Beads*

Zur Beladung von LumAvidin-*Beads* (Luminex Corp.) wurden Substrate mit mindestens einer Biotingruppe gekoppelt. Alle Kopplungsschritte wurden bei 23°C unter Lichtausschluss durchgeführt.

Es wurden die *Bead*-Lösungen, in denen die unbeladenen *Beads* gelagert wurden, für 1 min bei 10.000x g zentrifugiert (5415D Zentrifuge, Eppendorf). Nach anschließendem Vortexen und wurden diese Gefäße für 5 s im Ultraschallbad (Bandelin Sonorex, Bandelin Electronics, Berlin) behandelt, wodurch die *Beads* resuspendiert wurden. Es wurde hiernach erneut gevortext. Eine für die Kopplung berechnete Menge an *Beads* (in der Regel 40 µl, 100.000 *Beads*) wurde entnommen und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß aus Polypropylen (Starlab, Ahrensburg, Deutschland) überführt. Die *Beads* wurden zentrifugiert (10.000x g, 1 min) und der Überstand verworfen. Soweit nicht anders erwähnt wurde das biotinylierte Substrat in einem Konzentrationsbereich von 4 – 4.000 nM in CBS gelöst. Durch Zugabe dieser Lösung (250 µl) und anschließender Durchmischung wurde die Kopplung gestartet.

Sie verlief über 30 min unter ständigem Schütteln (Eppendorf Thermomixer, Eppendorf) bei 900 rpm und 23°C. Anschließend wurden Lösung und *Beads* durch Zentrifugation (10.000x g, 1 min) getrennt und in PBST (500 µl) gevortext und im Ultraschallbad resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde wiederholt. Die modifizierten *Beads* wurden bis zur weiteren Verwendung in 0,05% (w/v) Natriumazid (Merck) in CBS (100 µl) bei 4°C gelagert.

3.5.2.2 Kopplung an Carboxy-Beads

Kovalente Kopplungen an aktivierbare Carboxy-*Beads* (Luminex Corp.) wurden mit 5 – 50 µg Protein durchgeführt. Für eine Standardkopplung wurden Carboxy-*Beads* ($2,5 \times 10^6$, 80 µl) durch Zentrifugation (10.000x g, 1 min) vom wässrigen Überstand getrennt und anschließend durch Vortexen und Ultraschallbehandlung resuspendiert. Die Reaktionen fanden in Polypropylen-Reaktionsgefäßen (Starlab, Ahrensburg, Deutschland) statt. Zu Beginn der Kopplung wurden die *Beads* mit Aktivierungspuffer aus 0,1 M Natrium-Phosphat pH 6,2 gewaschen (2x 80 µl). Nach erneuter Zugabe des Aktivierungspuffers (80 µl) wurden Sulfo-N-Hydroxy-Succinimid (10 µl, 50 mg/ml in Aktivierungspuffer, Pierce, Rockford, IL, USA) und Ethylen-Dicarbodiimid (10 µl, 50 mg/ml in Aktivierungspuffer, Pierce) beigefügt. Die *Bead*-Aktivierung, bei der Carboxylgruppen zu einem N-Hydroxy-Succinimidylester modifiziert werden, verlief über 20 min unter Schütteln in einem Thermomixer bei 900 rpm und 23°C. Die *Beads* wurden im Anschluss zentrifugiert (10.000x g, 1 min) und der Überstand wurde verworfen. Die *Beads* wurden in MES-Puffer (3x 500 µl, 50 mM, pH 5, Sigma-Aldrich) gewaschen. Die zu koppelnden Proteine wurden in MES-Puffer bei einer Konzentration von 25 – 250 µg/ml gelöst. Diese proteinhaltige Lösung (250 µl) wurde den aktivierten *Beads* beigemischt und nach Aufschwemmung und Durchmischung über 120 min bei erneut 900 rpm und 23°C inkubiert. Nach erfolgter Kopplung wurden die *Beads* mit PBST (2x 1 ml) gewaschen. Zur Lagerung bei 4°C wurden die Protein-Beads mit 0,05% (w/v) Natriumazid in CBS (100 µl) aufgenommen.

3.5.2.3 Kopplung von cysteinhaltigen Peptiden an BSA-Beads

Zur Beladung von cysteinhaltigen Peptiden wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Protokoll entwickelt, welches eine Durchführung paralleler Kopplungen im

Mikrotiterplattenformat erlaubte. Hierbei wurden diese Peptide über ein bifunktionales Quervernetzungsmolekül, im folgenden auch als „*Linker*“ bezeichnet, auf Proteine gekoppelt, die zuvor auf Carboxy-*Beads* (3.5.2.2) beladen worden waren. Das Trägermolekül der Wahl war hierbei BSA. Zur Beladung von $2,5 \times 10^6$ *Beads* nach Standardprotokoll wurden 25 μg BSA verwendet, was einer BSA-Gesamtmenge von ca. 0,4 nmol BSA pro Ansatz entsprach. Diese BSA-*Beads* wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C in proteinfreiem Puffer (100 μl , PBS) gelagert.

Zur Kopplung der Cystein-Peptide wurden $2,5 \times 10^5$ BSA-beladene *Beads* verwendet. Die *Beads* wurden hierzu in vorbefeuchtete Näpfe einer Multiscreen Filterplatte gegeben. Durch Entleeren der Filterplatte mit einer Absaugvorrichtung (Multiscreen Vacuum Station, Millipore) wurde der Lagerpuffer entfernt. Die *Beads* wurden dann gewaschen, indem sie nach Zugabe von PBS (2x 100 μl) mit minimalem Unterdruck (< 100 mbar) abgesaugt wurden. Jede Kavität wurde dann mit PBS (25 μl) befüllt. Es wurde hierzu eine Lösung von 3,32 mM Sulfo-Succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)-butyrat *Linker*-Lösung (25 μl , 1,52 mg/ml in 10% (v/v) DMSO/PBS, SMPB, KMF, Lohmar) beigefügt. *Beads* und *Linker* wurden bei 23°C und 650 rpm in einem Thermomixer bei geschlossenem Deckel über 60 min inkubiert. Die cysteinhaligen Peptide wurden vor ihrer Anbindung an aktivierte *Beads* mit Tris(2-carboxyethyl)-Phosphin-hydrochlorid (TCEP, Fluka) behandelt, um die eventuell gebildeten Disulfide zu Thiolgruppen zu reduzieren. Da TCEP mit der Maleimidogruppe des verwendeten *Linkers* reagieren konnte [Shafer *et al.* 2000], wurden äquimolare Mengen an TCEP und Peptid eingesetzt. Die Peptide waren in 40% (v/v) Acetonitril/PBS bei einer Konzentration von 600 μM gelöst worden. Die Reduktion der Peptide verlief mit der Peptidlösung (30 μl) und 300 μM TCEP/PBS (60 μl , 0,086 mg/ml) in einer Mikrotiterplatte unter Schütteln bei 250 rpm und 23°C über 20 min. Die aktivierten BSA-*Beads* wurden direkt vor der Zugabe der reduzierten Peptide mit PBS (3x 100 μl) gewaschen, um einen Überschuss an SMPB zu entfernen. Hierauf wurden je 50 μl der reduzierten Peptide zu den *Beads* gegeben. Die Anbindungsreaktion erfolgte durch Inkubation der Reaktionspartner über 60 min bei 23°C und 650 rpm. Abschließend wurden die Peptid-BSA-*Beads* mit PBS (3x 100 μl) gewaschen. Zur Lagerung wurden die *Beads* anschließend in einzelne Reaktionsgefäße überführt. Hierzu wurde in jede Kavität der Multiscreen Filterplatte CBS (50 μl) gegeben, die Suspension für 10 min bei 650 rpm geschüttelt und in Reaktionsgefäße (Starlab) überführt. Dieser Schritt

wurde 3x wiederholt, um einen möglichst vollständigen Transfer der *Beads* sicherzustellen. Die Peptid-BSA-*Beads* wurden abschließend mit 0,05% (w/v) Natriumazid in CBS (50 µl) versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

3.5.2.4 Bestimmung der *Bead*-Anzahl

Zur Bestimmung der Anzahl der *Beads* nach deren Modifikation wurden etwa 2.000 – 4.000 *Beads* in PBST (100 µl) verdünnt und in die Kavitäten einer Halfwell-96 Mikrotiterplatte transferiert. Nach 30 min Schütteln wurde diese im Luminex¹⁰⁰-System ausgelesen.

Die Parameter der Luminex-Messung wurden in der Steuerungssoftware IS2.2 (Luminex) mit einer Messdauer von 80 s und einem Messvolumen von 50 µl definiert. Als maximale Anzahl der gesamten Messereignisse wurde 10.000 angegeben. Aus der Anzahl pro Klassifizierung der gezählten *Beads* (*Counts*), die zwischen 500 und 2.000 *Counts* liegen sollte, ergab sich die Ausbeute an *Beads* einer Kopplung in der Lagersuspension als *Beads*/µl. Hierbei wurden der jeweilige Verdünnungsfaktor und der Korrekturfaktor von 30 für das Totvolumen der Messeinrichtung benötigt:

$$[\text{Beads} / \mu\text{l}] = \frac{[\text{Counts}]}{30} \cdot [\text{Verdünnungsfaktor}]$$

Gleichung 3.1: Berechnung der *Bead*-Anzahl in 1 µl Lagersuspension.

3.5.2.5 Kopplungskontrolle

Waren für immobilisierte Proteine oder Peptide spezifische Bindemoleküle vorhanden, so konnte deren Anbindung an die *Beads* überprüft werden.

Der Nachweis erfolgte hier über fluoreszenzmarkierte Detektionsmoleküle, die ein Protein spezifisch entweder direkt oder über bestimmte Modifikationen erkennen konnten. Am Beispiel der Immobilisierung eines IgG-Antikörpers aus Maus, der auf Carboxy-*Beads* gekoppelt wurde, sei dies exemplarisch beschrieben. Nach einer Standardkopplung bei einer Antikörperkonzentration von 50 µg/ml wurden 1000 *Beads* in PBST (50 µl) über 45 min mit Ziege anti-Maus IgG R-PE (2,5 µg/ml, 50 µl, 115-116-

146, Dianova) in PBST in einer Halfwell-96 Mikrotiterplatte inkubiert. Der Median der Fluoreszenzintensitäten (MFI) von 100 gemessenen Ereignissen betrug bei erfolgreicher Anbindung in etwa 10.000 AU. Dies stellt eine relative Bestimmung dar.

3.6 Zell-Mikroarrays

3.6.1 Durchführung von Assays und Immunfluoreszenzmikroskopie

Standardprotokolle der Immunfluoreszenz wurden auf Zell-Mikroarrays angepasst. Es wurde stets bei Raumtemperatur inkubiert. Die Versuche wurden in einem Puffer aus 1,5% (w/v) BSA Fraktion V, 2,5% (w/v) Magermilchpulver und 0,1% (v/v) Tween®-20 in PBS (30 µl) durchgeführt. Hierzu wurden die primären Antikörper über 45 min in einer feuchten Kammer auf den Zell-Mikroarrays inkubiert. Nach jedem Inkubationsschritt wurde mit PBST (4x 50 µl) kurz gewaschen. Es folgte ein zusätzlicher Waschschrift über 5 min (50 µl). Der Cy3-markierte Nachweisantikörper anti-Maus IgG + IgM wurde bei einer Konzentration von 0,75 µg/ml ebenfalls über 45 min inkubiert. Die Waschprozedur wurde hiernach wiederholt. Die Objektträger wurden vor dem Auslesen im Scanner mit H₂O_{dd} abgespült und unter einem Stickstoffstrom getrocknet.

Tabelle 3.12: Ablauf der Immunfluoreszenzfärbungen von Zell-Mikroarrays.

Inkubation	Komponenten	Volumen
45 min	Primärer Antikörper	30 µl
10 s	PBST	4x 50 µl
5 min	PBST	50 µl
45 min	Detektionsantikörper (Cy3)	30 µl
10 s	PBST	4x 50 µl
5 min	PBST	50 µl

Die Kerne der gedruckten Zellen wurden mit dem Farbstoff Hoechst 33258 (Sigma) angefärbt. Der Farbstoff wurde 1:1000 in H₂O_{dd} verdünnt. Die Zell-Mikroarrays wurden in dieser Lösung (50 µl) über 5 min bei RT inkubiert. Nach Waschen mit H₂O_{dd} (3x 50

µl) wurden die einzelnen Assaypunkte der Zellarrays im Fluoreszenzmikroskop Axiophot (Carl Zeiss, Jena) analysiert.

3.6.2 Signalanalyse planarer Mikroarrays: Auslesen und Erfassen

Alle planaren Mikroarrays wurden mit einem Array-Scanner GMS 418 (Affymetrix) und der GMS Scanner Steuerungssoftware (V1.15.0.42, Affymetrix) bei maximaler Laserintensität und 20% Verstärkung des Photomultipliers ausgelesen. Die Auswertung der Fluoreszenzintensität der einzelnen Arrays erfolgte mit Hilfe der Software ImaGene™ (V4.0, Biodiscovery, El Segundo, CA USA). Für jeden Analysepunkt (*Spot*) wurde aus 177 Pixeln der Median der relativen Fluoreszenzeinheiten (MFU, *median fluorescence units*) gebildet.

3.7 *Bead*-basierende Assaysysteme

Durch die Verwendung von Filterplatten, deren Membranenporen kleiner als 5 µm waren (Tabelle 3.2), konnten *bead*-basierende Experimente als sogenannte „*Wash*“-Assays durchgeführt werden. Hierbei wurden die Analytmoleküle, Puffer und restliche Versuchsbestandteile des Experimentes nach den entsprechenden Reaktionen qualitativ entfernt. Hierfür wurden die Filterplatten auf der Multiscreen Vakuum Station (Millipore) mit minimalem Unterdruck (< 100 mbar) abgesaugt. Zudem ergab sich hierdurch die Möglichkeit, unspezifische und/oder schwächere Wechselwirkungen durch Variation der einzelnen Waschschriffe zu detektieren und gegebenenfalls zu eliminieren. Das Auslesen der Experimente konnte darüber hinaus in Anwesenheit aller vorhandenen Versuchsbestandteile erfolgen. In den Systemen von Luminex wurde nur diejenige Fluoreszenz der Reportermoleküle erfasst, die zusammen mit einem *Bead* auftrat und diesem zugeordnet werden konnte (siehe auch Abbildung 1.2). Somit mussten die Komponenten während des gesamten Experimentes nicht zwangsläufig durch Waschschriffe quantitativ entfernt. Es war somit möglich, Assays durch sukzessive Beimengung der Reaktionsbestandteile durchzuführen. Diese Assays wurden im Folgenden als „*No-Wash*“-Assays bezeichnet.

Es standen das Luminex¹⁰⁰ und das HTS-Luminex-System zur Verfügung. Das Luminex 100 System verfügt über einen XY-Tisch, durch den die 96 Kavitäten einer Mikrotiterplatte unter die Injektionsnadel der Messeinheit gebracht werden. Die Proben wurden bei maximal 1 $\mu\text{l/s}$ injiziert. Das durchsatzfähigere HTS-System besitzt hingegen einen unabhängigen Pipettierroboter, welcher auf Mikrotiterplatten mit 96 und 384 Kavitäten angepasst werden kann. Durch acht Injektionsnadeln wurden die Proben gleichzeitig aufgenommen und über eine Injektionseinheit mit einer Geschwindigkeit von 8 $\mu\text{l/s}$ in die Messeinheit gepumpt.

Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle *bead*-basierenden Experimente unter den folgenden Bedingungen durchgeführt. Alle Inkubationsschritte wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt und auf einem Eppendorf Thermomixer mit MTP-Aufsatz (Eppendorf, Hamburg) unter kontinuierlichem Schütteln bei 650 rpm inkubiert. Pro Kavität wurde die Anzahl der *Beads* so eingestellt, dass beim Auslesen jeweils 100 Ereignisse erfasst werden konnten. Von jeder Population an *Bead*-Klassifizierung wurden für *No-Wash*-Experimente 300 *Beads* (Luminex¹⁰⁰) oder 500 *Beads* (HTS-Luminex) verwendet. In *Wash*-Assays wurden 1.125 *Beads* eingesetzt.

3.7.1 Charakterisierung peptidspezifischer Antikörperfragmente

3.7.1.1 Affinitätsbestimmung

Zur Bestimmung der Affinität von biotinylierten anti-GCN4 Antikörpern wurde das Peptid 7P14P verwendet und in PBS gelöst. Eine N-terminal mit Cystein modifizierte Variante (Cys-7P14P) wurde gemäß 3.5.2.3 an BSA-*Beads* (#87) gekoppelt. Die Affinitätsbestimmung der anti-GCN4 scFv-Fragmente mit *bead*-basierenden Kompetitionsassays wurde in CBS, BRET und HBST Puffersystemen durchgeführt.

Es wurde von den untersuchten Bindern eine Eichreihe aus acht Lösungen mit absteigender scFv-Konzentration in Puffer hergestellt. Die Konzentrationen der Antikörper wurden den entsprechenden Affinitäten angepasst. Die scFv-Lösungen (50 μl) wurde in Kavitäten einer NBS-96 Mikrotiterplatte mit reinem Puffer (50 μl) gemischt. Parallel hierzu wurden zur Konkurrenz acht Verdünnungen des Kompetitorpeptides

(100 nM bis 0,001 nM) in Puffer hergestellt. Die Kompetitorlösungen (50 µl) wurde für jeden Binder über acht Kavitäten verteilt. Diese wurden mit der Lösung einer Konzentration der untersuchten scFv-Fragmente (50 µl) gemischt. Zur Kompetition wurden diejenigen Binderkonzentration eingesetzt, deren MFI-Werte mindestens ein 10- bis 20-faches eines Leerwertes (ohne anti-GCN4 scFv) betragen. Dieser MFI-Wert lag in der Regel bei 100 – 1000 AU. Beide Mischungen wurden zur möglichst vollständigen Einstellung des Gleichgewichtes zwischen Kompetitor und Binder Ü/N bei 20°C inkubiert. Es wurden die Kavitäten der Bioinert-Filterplatte mit Assaypuffer befeuchtet, entleert, mit *Beads* (5 µl) befüllt und abgesaugt. Die Lösungen der Eich- und Kompetitionsreihen wurden komplett in die Filterplatten übertragen und für 60 min bei 20°C inkubiert und anschließend abgesaugt. Die scFv-Fragmente wurden entsprechend ihrer Biotinmodifikation über 30 min mit Streptavidin R-PE (5 µg/ml, 30 µl, 016-110-084, Dianova, Hamburg) detektiert. Zum Auslesen wurden alle Kavitäten mit dem Puffer der Versuchsreihen (75 µl) befüllt.

Tabelle 3.13: Schema der Affinitätsbestimmung biotinylierter anti-GCN4 scFv-Fragmente.

Inkubation	Eichreihe	Kompetition	Volumen
Ü/N	Binder (var.)	Binder (konst.)	50 µl
	+ Puffer	+ Kompetitor (var.)	50 µl
	*↓	*↓	
60 min	<i>Beads</i>	<i>Beads</i>	**0 µl
	Puffer	Puffer	3x 100 µl
30 min	Streptavidin R-PE	Streptavidin R-PE	30 µl
	Puffer	Puffer	3x 100 µl
	Puffer	Puffer	75 µl

* Die Lösungen wurden aus NBS-96 in Bioinert-Mikrotiterplatten übertragen.

** Kavitäten der Bioinert-Filterplatte wurden nach dem Befüllen mit *Beads* abgesaugt.

3.7.1.2 Epitopbestimmung

Zur Charakterisierung des Peptidepitopes von scFv-Antikörpern wurden eine *Bead-Mixtur* aus GCN4-Peptid-*Beads* (siehe Tabelle 3.8 und Tabelle 3.9) und anti-PentaHis-*Beads* (0,25 µl pro Ansatz, scFv-Quant, Qiagen, Hilden) hergestellt. Diese *Bead-Mixtur* (5 µl) wurde mit scFv-Fragmentverdünnungen (45 µl) für 180 min in HBST in NBS-96 inkubiert. Biotinylierte scFv-Fragmente wurden mit Streptavidin R-PE (5 µg/ml, 25 µl) über 30 min inkubiert.

Tabelle 3.14: *Bead-Mixtur* zur Epitopkartierung.

Bead #	Code	Bead #	Code	Bead #	Code
14	18mer	45	N-07	66	C-08
15	N-17	46	N-06	67	C-07
25	N-16	47	C-17	68	H02Y
26	N-15	48	C-16	53	H02K
27	N-14	39	C-15	69	L03I
28	N-13	49	C-14	70	L03K
29	N-12	61	C-13	82	E06K
30	N-11	62	C-12	83	E06D
42	N-10	63	C-11	84	E06Q
43	N-09	64	C-10	85	R09K
44	N-08	65	C-09	86	R09E
				77	anti-PentaHis

Tabelle 3.15: Ablauf der Epitopkartierung von biotinylierten anti-GCN4 scFv-Fragmenten.

Inkubation	Komponenten	Volumen
180 min	Binder	45 µl
	+ <i>Beads</i>	5 µl
30 min	Streptavidin (R-PE)	25 µl

Zum Nachweis von scFv-Fragmenten ohne Biotinmodifikation wurden diese in einem *Wash-Assay* analysiert. Die Lösungen wurden aus der NBS-96 Mikrotiterplatte in eine befeuchtete Bioinert-Filterplatte überführt und mit HBST gewaschen (3x 75 µl). Zum

Nachweis der scFv-Fragmente über deren His₆-tag wurde ein anti-PentaHis-Antikörper (0,1 µg/ml, 30 µl, Maus IgG, Qiagen) für 60 min inkubiert. Anschließend wurde mit HBST gewaschen (3x 75 µl) und mit R-PE-markiertem anti-Maus-IgG-Antikörper (2,5 µg/ml, 30 µl, Ziege IgG, 115-116-146, Dianova) für 45 min inkubiert. Die Lösungen wurden hiernach abgesaugt und mit HBST gewaschen (3x 75 µl) und in Assaypuffer (75 µl) ausgelesen.

Tabelle 3.16: Ablauf der Epitopkartierung für anti-GCN4 scFv-Fragmente.

Inkubation	Komponenten	Volumen
180 min	Binder +	45 µl
	<i>Beads</i>	5 µl
	*↓	
60 min	HBST	3x 75 µl
	Anti-PentaHis-Antikörper	30 µl
45 min	HBST	3x 75 µl
	Anti-Maus-Antikörper (R-PE)	30 µl
	HBST	3x 75 µl
	HBST	75 µl

* Die Lösungen wurden aus NBS-96 in Bioinert-Mikrotiterplatten übertragen.

3.7.1.3 Charakterisierung immobilisierter Fängermoleküle

Es wurden verschiedene peptidspezifische Fängermoleküle über unterschiedliche Immobilisierungsstrategien an *Beads* gekoppelt. Die biotinylierten scFv-Fragmente L34nBio und C11nBio wurden bei 4 µM an LumAvidin-*Beads* gekoppelt. Die IgG Antikörper anti-Biotin (Ziege IgG, Sigma), anti-PentaHis (Maus IgG, Qiagen) und anti-c-myc (Klon 9E10, Maus IgG, Roche) wurden bei 50 µg/ml zum beladen von Carboxy-*Beads* verwendet. Ferner wurden *Beads* mit alternativem, nicht-proteinogenen Fängermolekül Ni-NTA (Qiagen) verwendet.

Tabelle 3.17: Verwendete Fänger-moleküle und deren Kopplung an *Beads*.

Protein	Bead-Typ	Kopplung	Bead #
C11nBio	LumAvidin	4 μ M	74
L34nBio	LumAvidin	4 μ M	75
Streptavidin	LumAvidin	-	23
Ni-NTA	-	-	32
Anti-Biotin	Carboxy	200 μ g/ml	47
Anti-c-myc	Carboxy	50 μ g/ml	51
Anti-PentaHis	Carboxy	-	77

Alle Experimente wurden als *No-Wash-Assays* durchgeführt. Es wurden pro Kavität *Bead*-Mischung (5 μ l) mit Antigenverdünnungen (45 μ l) Ü/N in BRET in NBS-96 Platten inkubiert. Zum indirekten Nachweis unmarkierter Antigene wurden weitere Moleküle zur Detektion verwendet. Der ALEXA532-markierte anti-PentaHis-Antikörper (1 μ g/ml, 25 μ l, Qiagen) wurde über 60 min inkubiert. Unmarkierter anti-PentaHis-Antikörper (0,5 μ g/ml, 25 μ l) wurde für 45 min eingesetzt und anschließend über weitere 45 min von R-PE-markiertem anti-Maus-IgG-Antikörper (2,5 μ g/ml, 25 μ l, aus Ziege) detektiert.

3.7.2 Multiparametrisches Screening zur Antikörperselektion

3.7.2.1 *Beads* für pepART-Screening

Alle Peptid-Protein-Komplexe aus 3.2.4 wurden entsprechend dem Protokoll zur Beladung von Carboxy-*Beads* gekoppelt. Die Beladung der *Beads* mit BSA- und TFR-Komplexen von Peptiden #61, #62 und #63 wurde bei drei Proteinkonzentrationen (20 μ g/ml, 50 μ g/ml, 125 μ g/ml) durchgeführt. Die pepART-Peptide und das Kontrollpeptid wurde nach 4.3.4.1 bei einer Proteinkonzentration von 100 μ g/ml in einem dreifachen Ansatz ($7,5 \times 10^6$ *Beads*) beladen. Zur parallelen Quantifizierung der Binderkonzentration wurde ein anti-human-F(ab)₂-Antikörper (109-005-097, Ziege IgG, Dianova) auf einem weiteren *Bead* bei 50 μ g/ml gekoppelt.

Tabelle 3.18: pepART-Beads. Liste der verwendeten *Bead*-Nummern mit den dazugehörigen Antigenen, Kontrollen und dem Quantifizierungsantikörper. Der Code ergibt sich aus der Syntheseliste und dem Trägerprotein (B steht hier für BSA; T für Transferrin) und findet bei der Analyse der Daten Verwendung.

<i>Bead #</i>	Code	Name	<i>Bead #</i>	Code	Name
12	B35	EGFR-T1097N	66	B22	Her2-T1096N
13	B39	EGFR-T1097C	68	B21	Her2-T1096C
14	T35	EGFR-T1097N	69	T22	Her2-T1096N
18	T39	EGFR-T1097C	70	T21	Her2-T1096C
42	B33	EGFR-T1007N	82	B20	Her2-T713N
43	B34	EGFR-T1007C	83	B19	Her2-T713C
44	T33	EGFR-T1007N	84	T20	Her2-T713N
45	T34	EGFR-T1007C	85	T19	Her2-T713C
46	B03	Her2-T1230N	86	B56	c-myc N-Cys
47	B04	Her2-T1230C	87	T56	c-myc N-Cys
48	T03	Her2-T1230N	88	Anti-Fab	Anti-Fab
62	T04	Her2-T1230C			

Um eine weitere Bestätigung der Antigen-spezifität zu ermöglichen, wurden die Peptide nach 3.5.2.3. über ihr Cystein direkt an aktivierte BSA-Beads gekoppelt. Diese *Beads* werden in dieser Arbeit als NMI-Beads bezeichnet.

Tabelle 3.19: NMI-Beads.

BSA-Bead #	Code	Name
43	B03	Her2-T1230N
45	B04	Her2-T1230C
46	B19	Her2-T713C
47	B20	Her2-T713N
48	B21	Her2-T1096C
49	B22	Her2-T1096N
53	B33	EGFR-T1007N
61	B34	EGFR-T1007C
62	B35	EGFR-T1097N
63	B39	EGFR-T1097C

3.7.2.2 Protokoll zum pepART-Screening

Zur multiparametrischen Analyse der *Panning*-Klone wurden alle Inkubationsschritte unter ständigem Schütteln bei 650 rpm bei 23°C in einem Eppendorf-Thermomixer durchgeführt. Jede Platte wurde über 10 min aufgetaut und initial durchmischt. Nach Entnahme der Proben (2x 192) wurde die Platte bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Für den Standardassay wurden die Lysate (7,5 µl) mit BRET-Puffer (62,5 µl) und *Bead-Mix* (5,0 µl) über 60 min in einer NBS-384 Mikrotiterplatte inkubiert. Der *Bead-Mix* (23-plex) bestand hierbei aus *Panning*-Peptiden (2x 10), dem Kontroll-Peptid (#56, 2x 1) und den *Beads* mit anti-Fab-Antikörper. Diesem Assay wurde anschließend der R-PE-markierte anti-human-F(ab)₂-Detektionsantikörper (6,6 µg/ml, 25 µl) hinzugefügt und über weitere 30 min inkubiert. Zum Auslesen wurden diese Platten soweit nicht anders erwähnt im HTS-Luminex-System ausgelesen. Nach Entnahme aller Klone wurden die Platten bei -20°C eingefroren.

Tabelle 3.20: Ablauf des Assays zum pepART-Screening.

Inkubation	Komponenten	Volumen
60 min	Lysat	7,5 µl
	+ BRET-Puffer	62,5 µl
	+ <i>Beads</i>	5 µl
30 min	Anti-human-F(ab) ₂ -Antikörper (R-PE)	25 µl

3.7.2.3 Konkurrenzexperimente zum pepART-Screening

Als Konkurrenten wurden cysteinfreie *Panning*-Peptide verwendet. In Analogie zur Sequenz der *Panning*-Peptide wurden die Konkurrenten K#03, K#04, K#19/#20, K#21/#22, K#33, K#34, K#35 und K#39 bezeichnet.

Tabelle 3.21: Kompetitorpeptide

Name	Fragment	Sequenz
K#03	Her2-T1230N	DVFAFGGAVENPEYLTPQGGAAPQP
K#04	Her2-T1230C	QPHPPPAFSPAFDNLYYWDQDPPER
K#19/20	Her2-T713N/C	LLQETELVEPLTPSGAMPNQAQMR
K#21/22	Her2-T1096N/C	SPLAPSEGAGSDVFDGDLGMGAAK
K#33	EGFR-T1007N	ALMDEEDMDDVVDAD EYLIPQQGFF
K#34	EGFR-T1007C	MDDVVDAD EYLIPQQGFFSSTSR
K#35	EGFR-T1097N	YSSDPTGALT EDSIDDTFLPVPEYI
K#39	EGFR-T1097C	VPKRPAGSVQNPVYHNQPLNPAPSR

Alle Inkubationsschritte der Konkurrenzexperimente wurden unter ständigem Schütteln bei 650 rpm bei 23°C in NBS-96 Mikrotiterplatten in BRET-Puffer durchgeführt. Für Konkurrenzexperimente wurden Lysat (4,0 µl), Puffer (16 µl) und Kompetitor (20 µl) über 60 min inkubiert. Anschließend wurde eine Mischung der BSA-*Beads* (10-*Plex*) der *Panning*-Peptide (5 µl) hinzugefügt und über 60 min inkubiert. Zur Detektion wurde anti-human-F(ab)₂-Antikörper (6,6 µg/ml, 15 µl) eingesetzt. Nach 30 min wurden die Experimente mit dem Luminex¹⁰⁰ System ausgelesen.

Tabelle 3.22: Ablauf des Konkurrenzassays mit *Panning*-Lysaten.

Inkubation	Komponenten	Volumen
60 min	Lysat +	4 µl
	BRET-Puffer +	16 µl
	Kompetitor	20 µl
60 min	<i>Beads</i>	5 µl
30 min	Anti-human-F(ab) ₂ -Antikörper (R-PE)	15 µl

Zur relativen Quantifizierung der Antikörperkonzentration wurden alle Lysate der Konkurrenzexperimente bei einer Verdünnung (1/800, 40 µl) mit anti-Fab-*Beads* (5 µl) über 60 min in NBS-96 und BRET bei 23°C und 650 rpm inkubiert. Zur Detektion wurde anti-human-F(ab)₂-Antikörper (3,3 µg/ml, 15 µl) eingesetzt.

Tabelle 3.23: Ablauf der Antikörperquantifizierung in *Panning*-Lysaten.

Inkubation	Komponenten	Volumen
60 min	Lysat (1/800)	40 µl
	+ <i>Beads</i>	5 µl
30 min	Anti-human-F(ab) ₂ -Antikörper (R-PE)	15 µl

3.7.3 Ligandenbindungsassay zum Nachweis von EGFR

Alle Ligandenbindungsexperimente wurden in CBS-Puffer in einer Multiscreen-Filterplatte durchgeführt. Als Ligand wurde EGF-X-X-Biotin (#E3477, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) verwendet. Dieser wurde gemäß dem Kopplungsprotokoll an LumAvidin-*Beads* bei 1,2 µM (#02) und 0,4 µM (#05) gekoppelt. Zur Kompetition wurde unmodifizierter EGF (Biomol, Hamburg) verwendet und den zu analysierenden Proben beigemischt. Es wurden *Beads* (30 µl) mit Proben (30 µl) über 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Kavitäten mit Puffer (3x 50 µl, CBS) gewaschen.

Tabelle 3.24: Ablauf des Ligandenbindungsassays zum Nachweis von EGFR.

Inkubation	Komponenten	Volumen
120 min	Probe	30 µl
	+ EGF- <i>Beads</i>	30 µl
60 min	CBS-Puffer	3x 50 µl
	Anti-EGFR-Antikörper	30 µl
45 min	CBS-Puffer	3x 50 µl
	Anti-Maus-Antikörper (R-PE)	30 µl
	CBS-Puffer	3x 50 µl
	CBS-Puffer	75 µl

Zur Detektion der über EGF an *Beads* gebundenen Rezeptoren wurden die Proben mit dem anti-EGFR-Antikörper mAb11 (30 µl, LabVision, Westlinghouse, CA, USA) über 60 min inkubiert. Nach erneutem Waschen (3x 50 µl, CBS) wurden die Proben abschließend mit einem R-PE-markierten anti-Maus-Antikörper (30 µl, 115-116-146,

aus Ziege, Dianova) über 45 min inkubiert. Vor dem Auslesen wurden die Kavitäten mit Puffer (3x 50 µl, CBS) gewaschen und abschließend befüllt (75 µl, CBS).

3.7.4 Ankyrine als Fängermoleküle zum Nachweis von Her2

3.7.4.1 Anti-Her2-Beads

Um die Fängereigenschaften der Ankyrine zu überprüfen, wurden LumAvidin-Beads mit den anti-Her2-Klonen A02, B03, D11, F07, G03 und G11 bei einer Konzentration von 125 nM über 60 min in TBST beladen. Die Antikörper Herceptin, mAb-07 und sp185-Coating wurden an Carboxy-Beads gekoppelt.

Tabelle 3.25: Verwendete anti-Her2-Beads.

Protein	Bead-Typ	Kopplung	Bead #
AR-A02	LumAvidin	125 nM	32
AR-B03	LumAvidin	125 nM	24
AR-D11	LumAvidin	125 nM	33
AR-F07	LumAvidin	125 nM	11
AR-G03	LumAvidin	125 nM	17
AR-G11	LumAvidin	125 nM	34
Herceptin	Carboxy	100 µg/ml	29
mAb-07	Carboxy	50 µg/ml	35
sp185-Coating	Carboxy	50 µg/ml	27

3.7.4.2 Durchführung von anti-Her2 Sandwich-Immunoassays

Alle Inkubationen von Proben (45 µl) und einer Mischung aus Beads (5 µl) der immobilisierten Ankyrinen wurden bei 4°C über Nacht in einer NBS-96 Mikrotiterplatte in BRET-Puffer durchgeführt. Die Lösungen wurden danach in eine Bioinert-Filterplatte transferiert und abgesaugt. Die Beads wurden in einer Lösung mit sp185 (1 µg/ml) oder mAb-07 (1 µg/ml) über 60 min inkubiert und anschließend abgesaugt. Der gebundene Antikörper wurde mit anti-Maus Fc aus Ziege (2,5 µg/ml, 109-116-098, Dianova) über 45 min nachgewiesen. Wurde der Antikörper Herceptin (1 µg/ml) verwendet, so wurde dies anschließend mit R-PE-markiertem anti-human-Fc-

Antikörper (2,5 µg/ml, Ziege IgG, 109-116-098, Dianova) nachgewiesen. Nach Absaugen wurden alle Proben in Puffer (75 µl) aufgenommen und im Luminex¹⁰⁰ System ausgelesen.

Tabelle 3.26: Ablauf des anti-Her2 Sandwich-Immunoassays.

Inkubation	Komponenten	Volumen
Ü/N	Probe +	45 µl
	<i>Beads</i>	5 µl
	*↓	
	absaugen	-
60 min	Anti-Her2-Antikörper	30 µl
	absaugen	
45 min	Detektionsantikörper (R-PE)	30 µl
	absaugen	-
	BRET-Puffer	75 µl

* Die Lösungen wurden aus NBS-96 in Bioinert-Mikrotiterplatten übertragen.

Bei der Verwendung des chimären erbB2-Fc-Proteins wurde nach erfolgter Übernacht-Inkubation zur Detektion ein R-PE-markiertem anti-human-Fc-Antikörper (2,5 µg/ml) verwendet.

3.7.5 Auswertung und statistische Analyse

In der Steuerungssoftware IS2.2 für das Luminex¹⁰⁰ System wurden für jede Kavität der Mikrotiterplatten eine Messdauer von maximal 60 s eingestellt, wobei 75 – 100% des Flüssigkeitsvolumens eingesaugt wurden. Es wurden 100 Ereignisse pro *Bead*-Klassifizierung gezählt. Alle Messergebnisse, bei denen von einer Klasse an *Bead* mehr als 40 Ereignisse erfasst worden waren, konnten zur Auswertung herangezogen werden (persönliche Mitteilung von Sherry A. Dunbar). Diese Parameter und Bedingungen wurden auch auf das HTS-System angewendet.

3.7.5.1 Berechnung der Affinitätskonstante von Antikörpern

Es wurden die Wechselwirkungen der Antikörper an antigenbeladene *Beads* über mehrere Konzentrationen gemessen, bei denen kein Kompetitor anwesend war. Diese Eichreihe wurde durch Kurvenanpassung mit Origin 6.0 (Microcal, Northampton, MA, USA) ausgewertet. Es wurde hierfür eine sigmoidale Anpassung (Modell: Logistisch) gewählt, der folgende Gleichung zugrunde lag:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x / x_0)^p} + A_2$$

Gleichung 3.2: Sigmoidale Kurvenanpassung nach Logistischem Modell. Aus der Kurvenanpassung wurden die Parameter A_1 (untere Grenze), A_2 (obere Grenze), p (Ordnung) und x_0 (EC50) mit Origin 6.0 bestimmt. Die bekannten Parameter waren hierbei x -Wert (Konzentration an Bindemolekül) und der gemessene y -Wert (MFI-Wert).

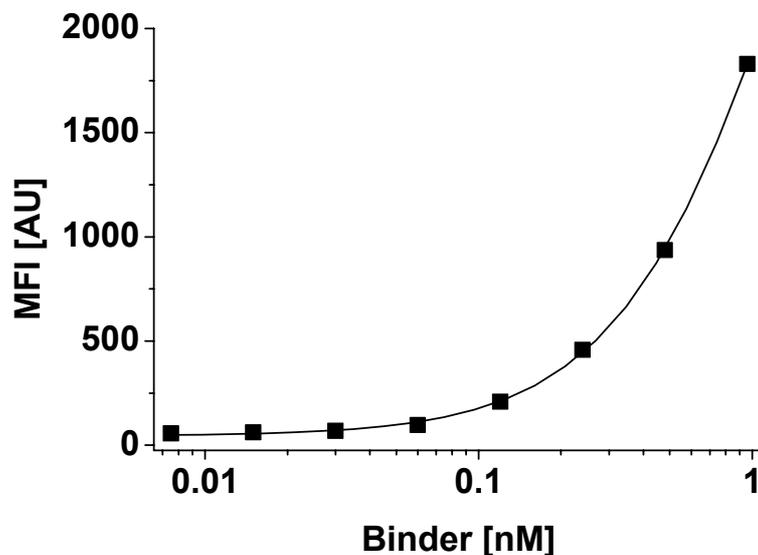
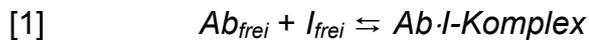


Abbildung 3.3: Beispiel für eine Eichreihe eines monovalenten Binders und sigmoidaler Kurvenanpassung.

Durch Umformulierung der Gleichung 3.3 wurde aus den Messwerten der Kompetitionsreihe die Menge an ungesättigten, freien Bindermolekülen $[Ab_{frei}]$ bestimmt. Über folgende Gleichungen wurde eine Affinitätskonstante berechnet, die auf der Inhibitionkonstante K_I des Kompetitors beruht.

Im Folgenden beschreibt $[I_{frei}]$ die Konzentration an freiem Kompetitor. $[Ab \cdot I]$ stellt die Konzentration des Komplexes aus Binder und Kompetitor dar. Aus der Reaktionsgleichung



war die Inhibitionskonstante im Gleichgewicht definiert als

$$[2] \quad K_I = \frac{[Ab_{frei}] \cdot [I_{frei}]}{[Ab \cdot I]}$$

Hierbei sind die Mengen an freiem Binder und freiem Kompetitor wie folgt definiert:

$$[3a] \quad [Ab_{frei}] = [Ab_{total}] - [Ab \cdot I]$$

$$[3b] \quad [I_{frei}] = [I_{total}] - [Ab \cdot I]$$

Führt man Gleichungen [3a] und [3b] mit Gleichung [2] zusammen, so ergibt sich folgender Term:

$$[4] \quad K_I = \frac{([Ab_{total}] - [Ab \cdot I]) \cdot ([I_{total}] - [Ab \cdot I])}{[Ab \cdot I]}$$

$[Ab \cdot I]$ kann nun als Funktion von K_I , $[Ab_{total}]$ und $[I_{total}]$ dargestellt werden. Über Gleichung [4] wurde nach $[Ab \cdot I]$ aufgelöst und dies in Gleichung [3a] eingesetzt, so dass sich folgende Gleichung ergab:

$$[Ab_{frei}] = [Ab_{total}] - \frac{[Ab_{total}] + [I] + K_I}{2} + \sqrt{\left(\frac{[Ab_{total}] + [I] + K_I}{2}\right)^2 - [Ab_{total}] \cdot [I]}$$

Gleichung 3.4: Gleichung zur Berechnung der Inhibitionskonstante K_I .

In Origin 6.0 wurde Gleichung 3.4 zur Kurvenanpassung verwendet, womit eine Inhibitionskonstante erhalten wurde. Er wurden hierfür $[I]$ als unabhängige Variable (x-Wert) und $[Ab_{frei}]$ als abhängige Variable (y-Wert) gesetzt. Die zu bestimmenden Parameter waren $[K_I]$ und $[Ab_{tot}]$.

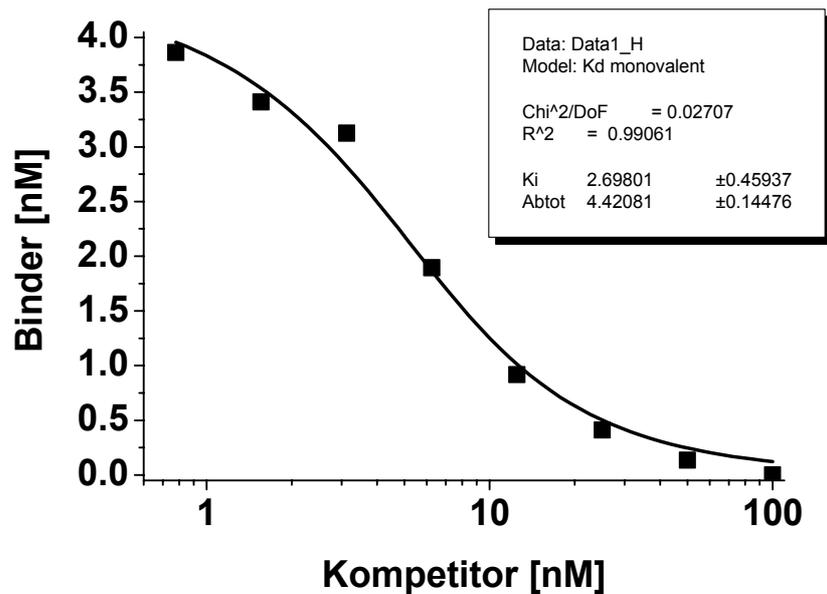


Abbildung 3.4: Beispiel für eine Kurvenanpassung zur Kompetitortitration eines monovalenten Binders. Durch die Kurvenanpassung wurden eine Inhibitionskonstante [K_i] von 2,7 nM und eine eingesetzte Antikörpermenge [Ab_{tot}] von 4,4 nM berechnet.

3.7.5.2 Eptitopkartierung – Eingrenzung des Bindungsbereiches

Zur Bestimmung minimaler Epitope wurden die Wechselwirkungen von biotinylierten scFv-Fragmenten bei verschiedenen Konzentrationen analysiert. Durch den Zusatz von Anti-PentaHis-*Beads* (scFv-Quant) wurde die relative Konzentration der scFv-Fragmente bestimmt. Dazu wurden biotinylierte anti-GCN4-Binder über ihren His₆-*tag* gefangen und mit R-PE-markiertem Streptavidin nachgewiesen (siehe 3.7.1.2). Für jeden Versuchsansatz wurde ein Schwellenwert (S_{cutoff}) definiert, um signifikante Wechselwirkungen zu identifizieren. Die Signalintensitäten der einzelnen Peptid-*Beads* ($MFI\{Peptid\}$) wurden hierzu ins Verhältnis zum Signal der scFv-Quantifizierung der anti-PentaHis-*Beads* ($MFI\{Quant\}$) gesetzt:

$$R = \frac{MFI\{Peptid\}}{MFI\{Quant\}}$$

Aus allen Peptid-Quantifizierungs-Quotienten der Leerwertmessungen (R_0) ohne scFv-Fragmente wurde ein Mittelwert (\bar{x}_0) und Standardabweichung (σ_0) bestimmt. Als Schwellenwerte für signifikante Peptidbindung wurde ein Wert festgelegt, der sich aus der Summe des Mittelwerts und einem Dreifachen der Standardabweichung errechnen ließ:

$$S_{cutoff} = 3 \cdot \sigma_0 + \bar{x}_0$$

Für alle Peptid-Quantifizierungs-Quotienten, die über diesem Schwellenwert lagen, wurden die Wechselwirkungen als relevant eingestuft.

3.7.5.3 Berechnung der Nachweisgrenze von Fängermolekülen

Die Nachweisgrenze (c_{Limit}) wurde mit $n \geq 3$ Leerwerten (ohne Antigen) aus Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (s) definiert. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurden mit den Messwerten der Antigentitrationsreihen eine Kurvenanpassung nach Gleichung 3.2 in Origin 6.0 durchgeführt.

3.7.5.4 PepART-Screening: Bestimmung eines Schwellenwertes

Aus den gemessenen MFI-Werten aller 384 Klone einer kompletten Mikrotiterplatte wurde über alle Peptid-BSA-Komplexe ein Quartilen-Wert von 75% (Q) bestimmt. Die Quartilenwerte der 11 Peptide am Trägerprotein BSA ($Q_{B1} \dots Q_{B11}$) wurden zur Bestimmung eines *Panning*-Ansatzes für jeden spezifischen Schwellenwert S_{BSA} herangezogen. Dieser wurde aus dem Mittelwert der jeweils 11 Quartilenwerte der Peptid-BSA-Komplexe (\bar{x}_{BSA}) und der Standardabweichung (σ_{BSA}) der Mittelwerte wie folgt bestimmt.

$$S_{BSA} = 3 \cdot \sigma_{BSA} + \bar{x}_{BSA}$$

Gleichung 3.5: Berechnung des Schwellenwertes S für die jeweiligen Trägerproteine.

3.7.5.5 Statistische Erfassung mit *Box and whisker plot*

Zur Zusammenstellung einer Datengruppe wurde der *Box and whisker Plot* (Kasten-Schnurrhaardiagramm, [Sachs 1996]) gewählt und über Origin 6.0 dargestellt.

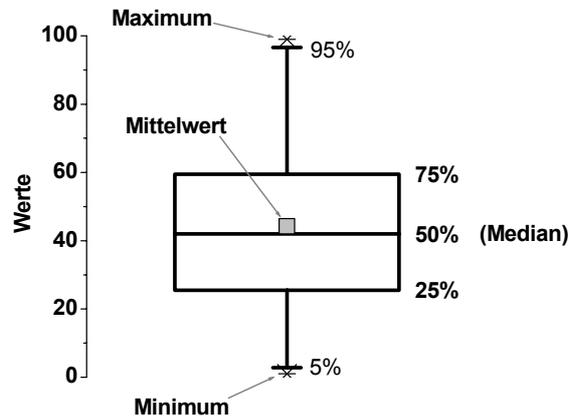


Abbildung 3.5: *Box and Whisker Plot* zur Darstellung von Datengruppen.

3.7.5.6 Quantifizierung des Her2-Gehalts von Proben

Zur Berechnung des Her2-Gehalts von Zellkulturzellen und Geweben wurden zwei Eichreihen mit dem Her2-Standardprotein BMS207S durchgeführt. Die Mittelwerte der Messwerte der Antigenkonzentrationen wurden zur Kurvenanpassung nach Gleichung 3.2 in Origin 6.0 verwendet. Der Mittelwert aus drei Messpunkten der Gewebeproben und der Zellen aus Kulturen wurde berechnet und über die Standardkurve quantifiziert. Zur Bestimmung der Her2-Konzentrationen wurden die Ergebnisse (ng/mg) um den Faktor 1,76 multipliziert. Dieser Korrekturfaktor ergab sich aus den unterschiedlichen Molekülmassen des Her2-Standardproteins BMS207S (105 kDa) und des nativen Her2-Rezeptors (185 kDa).

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Antikörpercharakterisierung mit Zell-Mikroarrays

Zur Charakterisierung membranproteinspezifischer Antikörper wurden parallelisierte und miniaturisierte Ansätze durchgeführt. Durch Immobilisierung ganzer Zellen als „Träger“ membranständiger Antigene wurden verschiedene Tumorzelllinien auf planare Mikroarrays gebracht, um spezifische Wechselwirkungen zwischen den Antigenen und den Antikörpern zu untersuchen.

Mit einer zuvor untersuchten Versuchsanordnung waren die Grundvoraussetzung zur Übertragung verschiedene Zellen und deren Anfärbung mit unterschiedlichen Antikörpern aufgebaut worden [Schwenk 2001]. Das Prinzip beruht hierbei auf der Übertragung von Zellen durch einen Arrayer mit Ring- und Nadeldruckkopf. Durch den Ring werden die Zellen aus dem Vorlagegefäß aufgenommen und vom Durchstoßen des Flüssigkeitsfilmes durch die Nadel auf Glasobjektträger mit Poly-Lysin-Beschichtung abgesetzt. Im Folgenden wurde dieses Prinzip zur Herstellung von Zell-Mikroarrays angewandt. Es wurden verschiedene Zelllinien zur Präsentation membranständiger Proteine und deren Verwendung zur Charakterisierung von unterschiedlichen Antikörpern herangezogen. Im miniaturisierten und parallelisierten Maßstab wurden diese Bindemoleküle auf die Bindung an ihre Epitope untersucht.

Die Verwendung von Zell-Mikroarrays zur Untersuchung von Bindemolekülen gliedert sich in die eingehende Charakterisierung und nachfolgende Auswahl geeigneter Bindemoleküle ein, die eine notwendige Voraussetzung zur Umsetzung von Analysemethoden ist [Stoll *et al.* 2004]. Dies beruht darauf, dass ein potentielles Fängermolekül unter einer großen Vielfalt an unterschiedlichen Molekülen spezifisch und ausschließlich mit seinem Bindungspartner wechselwirken muss. So wurden unter anderem in einen Antikörper-Mikroarray mehrere, spezifische Fängermoleküle eingesetzt, um eine Expressionsanalyse für CD-Oberflächenantigenen mit Leukozyten und leukämischen Zellen durchzuführen [Belov *et al.* 2001]. Zur Charakterisierung von Bindemolekülen ist neben den Bindereigenschaften (Affinität,

Spezifität und Kreuzreaktivität) oft auch die Struktur und Funktionalität des Antigens entscheidend, was für die meisten löslichen Proteine gewährleistet werden kann. Für Proteine mit membrandurchspannender Domäne ist dies jedoch schwieriger [Lueking *et al.* 1999]. So konnten G-Protein-gekoppelte Rezeptorproteine nach Biotinylierung ihrer Zuckerbestandteile in miniaturisierten Systemen in funktionalem Zustand immobilisiert werden [Bieri *et al.* 1999], was sich jedoch bisher auf wenige Moleküle beschränkte. Membranproteine können am besten an ihrem ursprünglichen Ort untersucht werden oder als Antigen dienen.

Eine Methode, Antikörper gegen membranständige Proteine zu untersuchen, beruht auf der Durchflusszytometrie [Salgar *et al.* 1993]. Hierzu werden Antikörperlösungen in eine Suspension aus Zellen gebracht und inkubiert. Nach erfolgter Fluoreszenzmarkierung der Bindermoleküle werden die hiermit markierten Zellen in einer Messzelle unter konstantem Fluss durch zwei Laser analysiert, deren Funktion in der Erfassung der Zellen und der hieran gebundenen Fluoreszenz besteht. Hiermit werden unter anderem Zellen des hämatopoetischen Systems durch passende Antikörper auf die Expression ihrer CD-Antigene untersucht [Freedman 1996].

4.1.1 Bestimmung der Übertragungsrate von Zellen

Bei ersten Untersuchungen wurde ein Fokus auf die Verwendung nicht adhärenter Zellen gelegt. Zur Bestimmung der Übertragungsrate, die einen Aufschluss über die Gleichmäßigkeit des Druckprozesses von Zellen aus einer Aufnahme durch den Druckkopf gibt, wurde exemplarisch die Monozytenzelllinie THP-1 in einer Anordnung von 20x 20 *Spots* gedruckt.

Nach der mikroskopischen Auszählung der mit Hoechst 33258 gefärbten Zellkerne aus Abbildung 4.1 wurde eine durchschnittliche Übertragungsrate von 18 ± 5 Zellen pro *Spot* ermittelt. Somit liegen die Standardabweichungen für die Anzahl der Zellen unter 30%. Aus der Verteilung kann zudem abgeleitet werden, dass zwischen 5 und 38 Zellen pro *Spot* immobilisiert wurden. Hierbei bestanden 80% aller *Spots* aus 25 ± 10 Zellen, wonach in nur 20% aller Fälle weniger als 15 oder mehr als 35 Zellen vorzufinden waren.

Es wurde eine notwendige Mindestanzahl von 10 Zellen pro *Spot* festgelegt, die für die Untersuchung von verschiedenen Antikörpern als ausreichend definiert wurde. In

95% aller *Spots* wurden mehr als 10 Zellen immobilisiert. Folglich waren weniger als 10 Zellen nur in jedem 20. *Spot* zu finden. Dies bedeutete, dass beim Drucken von Zellen in drei *Spots* mit einer Wahrscheinlichkeit von 13,5% ein *Spot* weniger als 10 Zellen besaß. In 0,7% der Fälle wären dies zwei *Spots* mit weniger als 10 Zellen gewesen. Zu 99,9% waren demnach in drei *Spots* mindestens einer mit mehr als 10 Zellen übertragen worden.

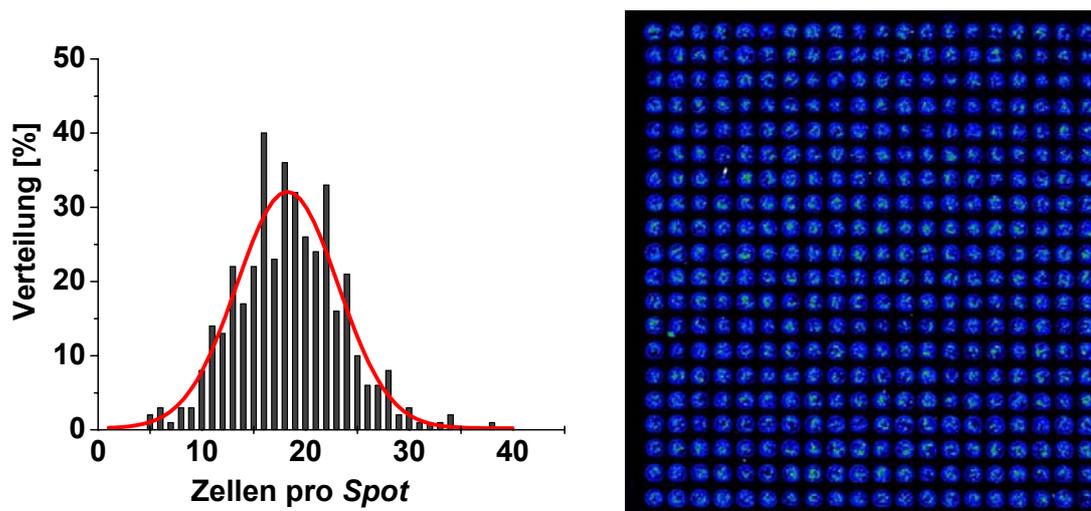


Abbildung 4.1: Verteilung der übertragenen Zellen pro Spot. Aus 400 *Spots* von gedruckten THP-1-Zellen wurde die Übertragungsrate bestimmt. Hierbei wurden die Zellkerne mit dem Farbstoff 33258 angefärbt und ausgezählt. **Links:** Verteilung der Anzahl an Zellen pro *Spot*. Die rote Linie entspricht einer Gauss-Verteilung und besagt, dass im Mittel 18 ± 5 Zellen auf einen *Spot* übertragen wurden. **Rechts:** Biochip-Scanner-Aufnahme. Die immobilisierten Zellen wurden immunhistochemisch mit einem anti-CD45-Antikörper ($1 \mu\text{g/ml}$, Klon-69) angefärbt und über einen anti-Maus-Antikörper ($2,5 \mu\text{g/ml}$) mit Cy3 markiert. Durch diese Abbildung ist die Gleichmäßigkeit der Übertragung zu erkennen.

Durch Anfärbung der immobilisierten Zellen mit einem anti-CD45 Antikörper konnte die Gleichmäßigkeit der Übertragung zudem immunocytochemisch überprüft werden. Durch die Auswertung der Fluoreszenzsignale der Spots aus dem Scannerbild wurde für die *Spots* ein Mittelwert der Fluoreszenzeinheiten (MFU, *median fluorescence units*) von 956 ± 227 AU ermittelt. Bezieht man dies nun auf die Anzahl der gezählten THP-1 Zellen, so wurde für jede Zelle ein MFU-Wert von 54 ± 17 AU errechnet.

4.1.2 Erste Tests von gedruckten Zell-Mikroarrays

Im Folgenden wurden elf verschiedene Zelllinien jeweils in 3 *Spots* pro Array gedruckt. Es sollte hier das Assaysystem getestet und ein Eindruck darüber gewonnen werden, wie sich das Drucken verschiedener Zellen darstellt.

Es wurden Zellen mit einem bekannten aber unterschiedlichen Repertoire an Oberflächenmolekülen benutzt, so dass eine immunocytochemische Bindung spezifischer Antikörper unterscheidbar wurde. So war von MHC-Molekülen der Klasse-II bekannt, dass sie von einigen Leukozyten exprimiert werden [Nelson und Fremont 1999]. Hingegen exprimieren alle somatische Zellen MHC-Moleküle der Klasse-I [Natarajan *et al.* 1999]. Diese Antigene wurden dazu verwendet, in Assays mit Zell-Mikroarrays die Spezifität der Antikörper sowohl hinsichtlich ihrer Zielantigene als auch bezüglich der entsprechenden Spezies zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurden zwei monoklonale Antikörper herangezogen, die gegen die humanen Proteine MHC I und MHC II generiert worden waren. Zudem wurden die Zellkerne der Zellen mit dem Farbstoff Hoechst 33258 angefärbt. Hierdurch sollte die Verteilung der Zellen auf den *Spots* dargestellt werden.

In Abbildung 4.2 sind zwei Zell-Mikroarrays zu erkennen, bei denen zwei anti-MHC-Antikörper zur Anfärbung bestimmter Zellen gemäß deren Antigenexpression verwendet werden konnten. Der anti-MHC Klasse II-Antikörper L243 erkannte vor allem die humanen B-Zelllinien Boeth Bo und WT-51, wobei zudem die Monozyten THP-1 und die Lymphomzelllinie U937 detektiert werden konnten. Durch den anti-MHC Klasse I-Antikörper W6/32 wurden hingegen deutlich mehr Zelllinien erkannt. Dies bezog alle Zellen humaner Zelllinien ein. Die Signale von Rattenzellen der Linie PC12, die auf beiden Abbildungen als Wechselwirkungen mit den Antikörpern erschienen, konnten auf eine unspezifische Interaktion des verwendeten markierten anti-Maus-Antikörpers zurückgeführt werden. Dies wurde durch Inkubation ohne primären Antikörper bestätigt (Daten nicht gezeigt). Für die Untersuchung weiterer Bindemoleküle wurde auf den Einsatz der PC12-Zellen verzichtet. Es wechselwirkte keiner der beiden anti-MHC Antikörper mit den übrigen Zellen der Linien NIH-3T3-S und CHO, die nicht humanen Ursprungs waren.

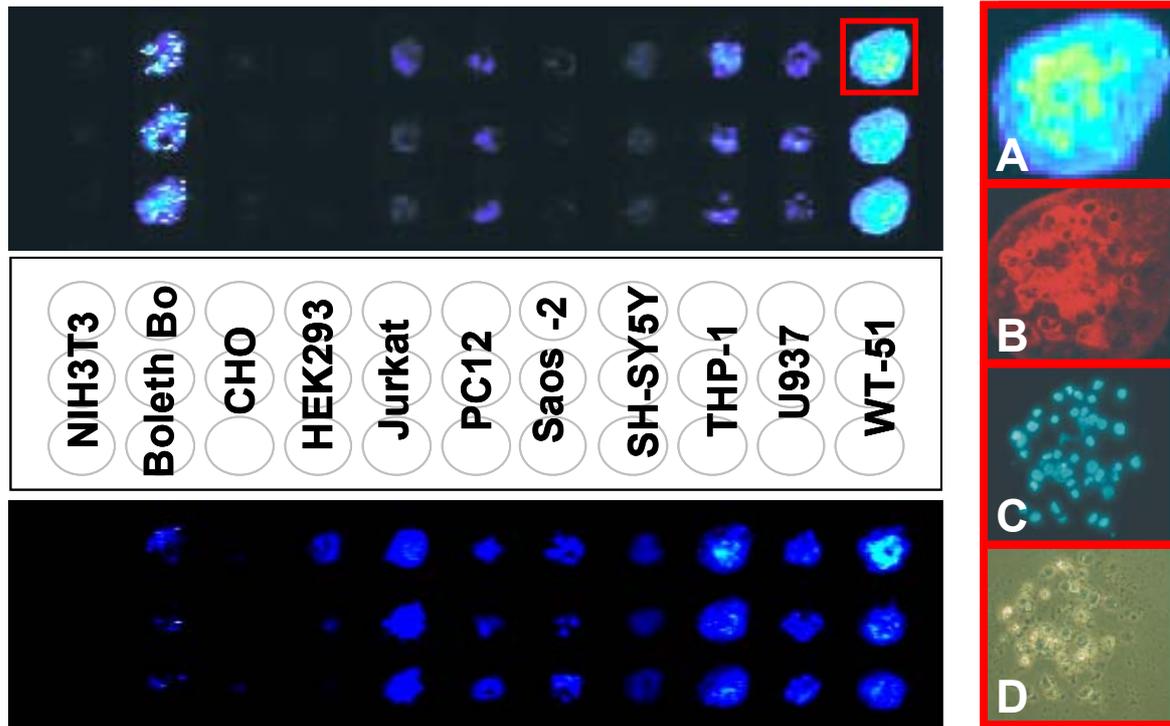


Abbildung 4.2: Zell-Mikroarrays. Es wurden von elf verschiedenen Zelllinien je 3 Mikrospots gedruckt, mit Antikörper gegen MHC II (L243, 1 µg/ml, oben) und MHC I (W6/32, 2,5 µg/ml, unten) angefärbt und mit einem Array Scanner ausgelesen. Ein Spot der Zelllinie WT-51 (rote Umrandung) wurde rechts vergrößert dargestellt. (A) Es handelt um eine Falschfarbendarstellung des Biochip Scanners, wobei die markierten MHC-Moleküle mit Fluoreszenz markiert wurden. Im Fluoreszenzmikroskop erschien derselbe Spot wie in (B) gezeigt. Durch die Anfärbung der Zellkerne mit Hoechst 33258 und Darstellung im Fluoreszenzmikroskop (C) wird die Verteilung der Zellen auf dem Spot deutlich. Dies korreliert mit der Durchlichtaufnahme (D). Zellen des menschlichen Blutsystems wurden präsentiert durch Boleth Bo, Jurkat, THP-1, U937 und WT-51. NIH-3T3-S, CHO und PC12 waren nicht humanen Ursprungs.

Die verwendeten anti-MHC-Antikörper konnten in den gezeigten Systemen spezifisch die Zellen anfärben, von denen auf Grund ihres Repertoires an Oberflächenmolekülen eine Bindung zu erwarten war. Hierdurch konnten die allgemeinen Grundvoraussetzungen zur Analyse weitere Antikörper geschaffen werden.

4.1.3 Anwendung gedruckter Zell-Mikroarrays zur Antikörpercharakterisierung

Das oben beschriebene Testsystem wurde in einem Ansatz zur Charakterisierung von weiteren Antikörpern angewandt. Ein Schwerpunkt waren hierbei Antikörper, die gegen Membranproteine von Blutzellen gerichtet waren.

In einer Druckserie wurden 10 verschiedene Zelllinien immobilisiert und zur immunocytochemischen Markierung verwendet. Alle Zell-Mikroarrays wurden direkt nach dem Drucken mit Blockierungslösung behandelt und im Anschluss getestet. Das Repertoire an Membranproteinen der immobilisierten Zellen war zum Teil bekannt. Es wurden anti-MHC Klasse II-Antikörper L243, TÛ36 und TÛ39 zur immunocytochemischen Bindung an Zelloberflächenproteine verwendet (Abbildung 4.3 A). Alle drei Antikörper färbten hierbei MHC II-positive Zellen Boeth Bo, Jurkat, THP-1, U937 und WT-51. Hingegen waren die Signale für L243 und TÛ39 auf Boeth Bo-Zellen relativ niedrig. Nur auf Zellen der Linie WT-51 konnten für alle drei Antikörper kräftige Signale detektiert werden. Im Gegensatz zu TÛ36 und TÛ39 waren die Wechselwirkungen von L243 selektiv auf MHC Klasse II-positive Zellen beschränkt.

Darüber hinaus wurden vier anti-MHC Klasse I-Antikörper untersucht, die sich alle in ihren Epitopen unterschieden. Der Antikörper W6/32 konnte als einziger hierbei bis auf Boeth Bo-Zellen alle MHC I-positive Zellen anfärben (Abbildung 4.3 B). Diese Ergebnisse beruhen darauf, dass W6/32 alle HLA-Proteine vom MHC-Gencluster der Klasse-I erkennt. Sehr spezifisch erkannte der anti-CD3-Antikörper CBL-150 ausschließlich T-Zellen der Linie Jurkat, die CD3-positiv sind. Der anti-CD45-Antikörper EO1 erkannte selektiv und spezifisch die immobilisierten B-Zellen WT-51, THP-1 und U937 wie auch die T-Zellen der Linie Jurkat. Im Gegensatz hierzu konnten mit dem anti-CD45-Antikörper Klon-69 keine Zellen angefärbt werden (Abbildung 4.3 C).

Alle untersuchten Antikörper zeigten keine Kreuzreaktivität zu Oberflächenproteinen von Zellen anderer Spezies. Die gemessenen Signalintensitäten waren sowohl vom Antikörper als auch von der Antigenexpression auf den Zellen anhängig.

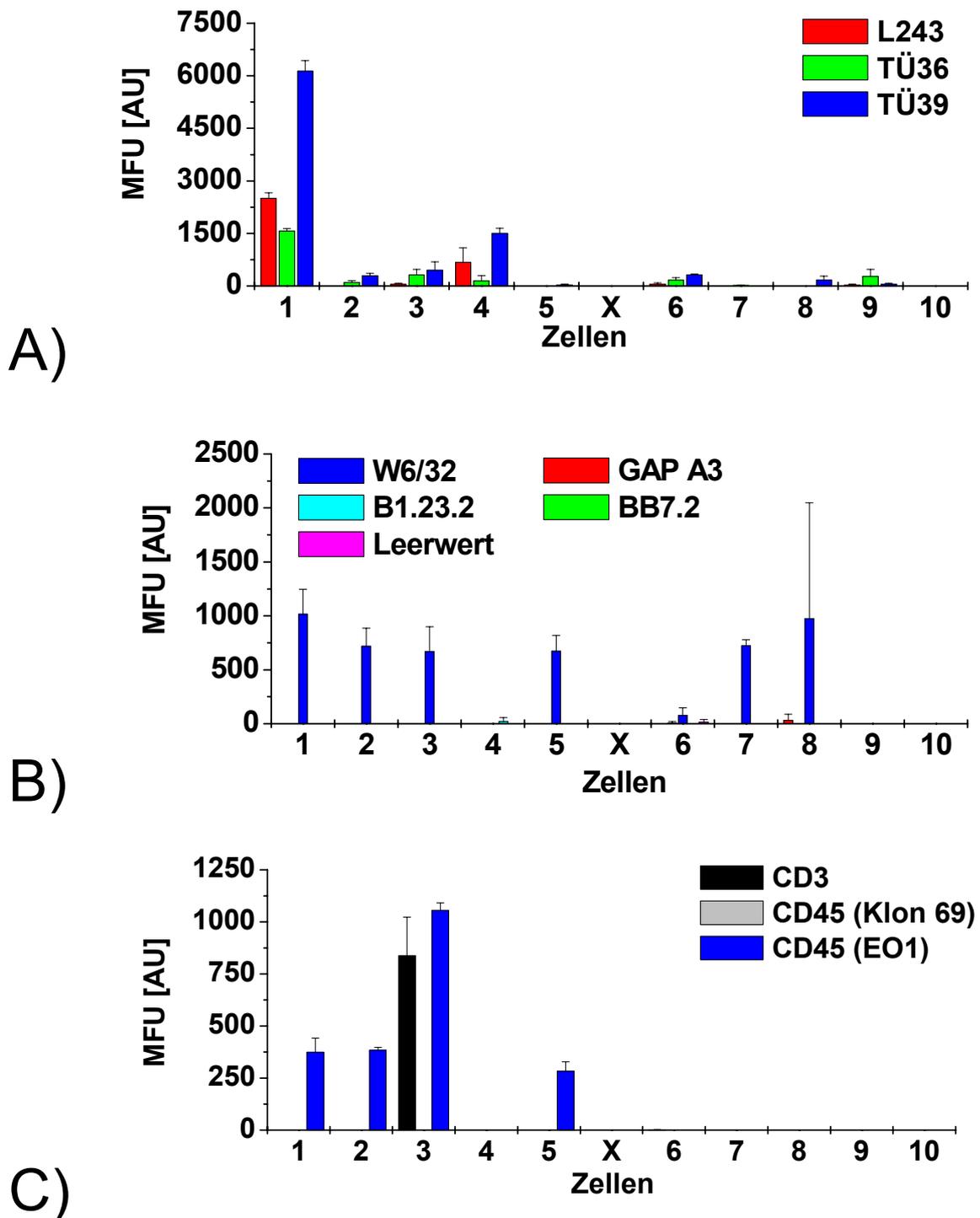


Abbildung 4.3: Charakterisierung von Antikörpern mit Zell-Mikroarrays. Alle Assays wurden gemäß dem Standardprotokoll durchgeführt. Aus den Messwerten der drei Zell-Mikrospots wurde jeweils der Mittelwert aufgetragen. Folgende Antikörper wurden bei den entsprechenden Konzentrationen inkubiert: **A)** Anti MHC II-Antikörper L243 (1,0 µg/ml), Tü36 (1,0 µg/ml) und Tü39 (1,0 µg/ml); **B)** Anti MHC I-Antikörper GAP A3 (2,5 µg/ml), BB7.2 (2,5 µg/ml), W6/32 (2,5 µg/ml), B1.23.1 (1,0 µg/ml) und der Detektionsantikörper ohne primären Antikörper. **C)** Weitere getestete Antikörper waren anti-CD3 (CBL-150), anti-CD45 Klon-69 und Klon-EO1 (je 1,0 µg/ml). Folgende Zellen waren immobilisiert worden: (1) WT-51; (2) THP-1; (3) Jurkat; (4) Boleth Bo; (5) U937; (X) negativ Kontrolle; (6) SH-SY5Y; (7) Saos-2; (8) HEK293; (9) NIH-3T3-S und (10) CHO.

4.1.4 Zusammenfassende Diskussion

In den dargestellten experimentellen „*proof of principle*“-Ansätzen konnte gezeigt werden, dass Zell-Mikroarrays zur Charakterisierung verschiedener Antikörper herangezogen werden konnten. Durch die Verwendung eines Mikroarrayers wurden verschiedene Zellen auf planare Glasobjektträger immobilisiert. Diese Zellen konnten von Antikörpern, deren Antigene plasmamembranständige Proteine sind, immunocytochemisch markiert werden.

In diesem einfachen Versuchsaufbau wurden Zelllinien verwendet, in deren Repertoire an Oberflächenmolekülen das Vorhandensein der Epitope einiger Antikörper zu erwarten war. Somit war es möglich, eine theoretische Vorhersage über das Auftreten von Wechselwirkungen zwischen Antikörper und Antigen zu treffen, die zur Beschreibung der Bindungseigenschaften dienlich war.

Die Ergebnisse zur Antikörpercharakterisierung zeigten, dass die Experimente vor allem eine Unterscheidung von Bindungsereignissen zulassen, bei denen die Kriterien eine erfolgte oder ausbleibende Anfärbung der Zellen war. So konnte zwischen erfolgten oder ausgebliebenen Bindungen differenziert werden. Hierdurch konnten sowohl die Spezifitäten als auch die Kreuzreaktivitäten der verwendeten Antikörper untersucht werden. Die Antigene, welche in ihrer nativen Umgebung präsentiert wurden, waren somit für die verwendeten Antikörper zugänglich.

In einem einzigen Experiment, das in einem Volumen von 30 µl durchgeführt wurde, konnten die Antikörper parallel mit einer Reihe unterschiedlicher Zellen getestet werden. Durch die Miniaturisierung und Parallelisierung der Experimente wurden zudem nur geringe Mengen an Bindemolekülen benötigt, so dass pro Ansatz von jedem Antikörper zwischen 30 – 75 ng benötigt wurden. So kommt diese Methode mit 3 – 7,5 ng an Antikörper pro Zelllinie aus.

Im Allgemeinen zeigten die untersuchten Antikörper, deren Epitope humane Proteine waren, bei erfolgter Anfärbung der Zellen kaum Kreuzreaktivitäten zu Zellen anderer Spezies. Alle anti-MHC Klasse-II-Antikörper konnten die entsprechenden Zellen anfärben, wohingegen von den anti-MHC Klasse-I-Antikörpern nur W6/32 erfolgreich getestet werden konnte. Mit dem anti-CD3-Antikörper CBL-150 konnte eine selektive Anfärbung von T-Zellen erreicht werden.

Es konnte darüber hinaus erkannt werden, dass das Maß an Antigenexpression einer Zelle einen Einfluss auf die Anfärbung durch die Antikörper hatte. So führten besonders bei starker Antigenexpression, gute Übertragungen der Zellen und der Unversehrtheit der Oberflächenantigene zu einer stark positiven Wechselwirkung der Antikörper. Dies wurde bei WT-51-Zellen und der Markierung durch L243 in Abbildung 4.2 deutlich. Des Weiteren schient die Qualität der Arrays besonders direkt nach deren Herstellung für die Charakterisierung geeignet zu sein. Mit dem verwendeten Protokoll konnten die Arrays zwar stabilisiert werden, wobei die Unversehrtheit der Membranproteine über die Zeit nicht gewährleistet werden konnte.

Weiterführende Überlegungen zur Optimierungen dieser Methode betreffen vor allem die Übertragung bzw. Bereitstellung der Zellen. Vorschläge hierfür beinhalten die Entwicklung alternativer Druckmethoden, die durch Verwendung von Kapillaren zu effizienteren Übertragungen der Zellen führen könnten, um somit gleichmäßigere, wenn nicht gar konfluenten Besiedlung von *Spots* zu ermöglichen. Dies wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiterverfolgt. In bisher beschriebenen, alternativen Ansätzen wurde Tintenstrahldrucker benützt, um Zellen zu drucken [Wilson und Boland 2003]. Weitere Optimierungen führten dazu, das dieses System zur Übertragung von lebenden Zellen verwendet werden konnte [Xu *et al.* 2005].

Als eine Methode zur orts aufgelösten Immobilisierung von Zellen verschiedener, stabilisierter Zellen könnte sich die Kultivierung einer Zelllinie auf einem Transfektions-Mikroarray [Ziauddin und Sabatini 2001] anbieten. Zur Antikörpercharakterisierung könnten hierbei unterschiedliche, interessante Oberflächenmoleküle über Expressionsvektoren in lebenden Zellen transfiziert werden. Diese Zellen müssen jedoch dann im untransfizierten Zustand möglichst negativ für die entsprechenden Gene sein. In einem solchen Array aus lebenden Zellen könnten die Unversehrtheit der Membranproteine auf den Zelloberflächen gewährleistet werden. Die Effizienz der Transfektion sollte in diesem Ansatz jedoch zu einer ausreichenden Anzahl an entsprechenden Membranproteinen führen.

Mit den durchgeführten Experimenten konnten erste Erkenntnisse über die Verwendung von Zell-Mikroarrays zur Antikörpercharakterisierung gewonnen werden, die die Durchführbarkeit solcher Assays aufzeigte. Die Vorteile dieser

Methode sind die Miniaturisierung und Parallelisierung der Experimente, wodurch geringe Mengen Antikörper benötigt werden. Die Limitierung dieses Ansatzes liegt jedoch darin, dass die Haltbarkeit der Zell-Mikroarrays beschränkt war und somit die Realisierung von Experimenten mit identischem Ausgangsmaterial nicht erlaubte.

4.2 Entwicklung *bead*-basierender Assaysysteme zur Charakterisierung peptidspezifischer Antikörper

Im folgenden Abschnitt wurden *bead*-basierende Ansätze entwickelt und angewandt, um rekombinante, peptidspezifische Bindemoleküle mit miniaturisierten und parallelisierten Assays hinsichtlich ihrer

- Affinität
- Spezifität und Kreuzreaktivität
- Fängereigenschaften

zu charakterisieren. Im Vordergrund der folgenden Experimente stand die Etablierung von Assaysystemen, die als Grundlagen zur schnellen und einfachen Analyse von Bindemolekülen dienen.

Für diese Methodenentwicklungen wurden *single chain Fv fragment* (scFv)-Antikörperfragmente verwendet. Diese ca. 250 AS großen, monovalenten Proteine entsprechen in etwa einem Fünftel der Masse eines IgG-Moleküls und sind über einen *Linker* zwischen den antigenbindenden, variablen Domänen der schweren und der leichten Kette fusioniert.

Aus einer auf Maus-Antikörpern basierenden anti-GCN4-Binderbibliothek, die gegen ein Peptid aus 33 Aminosäuren des Hefe-Transkriptionsfaktors GCN4 generiert worden waren [Hanes *et al.* 1998], wurden über ribosomales *Display* Affinitätsmaturierungen durchgeführt. Für die gewonnenen anti-GCN4 scFv-Fragmente waren Affinitätskonstanten (K_D) von bis zu 40 pM [Hanes *et al.* 1998] bestimmt worden. Durch gerichtete Evolution [Amstutz *et al.* 2002] mit fehlerbehafteter PCR, *DNA-shuffling* und einer Selektion über die Dissoziation (*off-Rate Selection*) der Bindemoleküle konnten weitere anti-GCN4-Antikörper generiert werden. Die Affinitäten lagen nun im Bereich von bis zu 5 pM [Zahnd *et al.* 2004]. Die zur Maturierung der Bindungseigenschaften erfolgten Mutationen betrafen keine

Aminosäuren, die in direkter Verbindung zur Bindungstasche der Antikörper stehen. Es war zudem gelungen, eine Kristallstruktur eines scFv-Fragmentes mit einem Peptidantigen zu gewinnen. Hieraus wurde unter anderem eine helikale Struktur des Peptides erkennbar, die zur Bindung an den Antikörper nötig scheint.

Die Affinitätskonstanten der scFv-Antikörper waren mit Konkurrenzexperimenten und anschließendem Auslesen über Oberflächenplasmonresonanz (SPR) [Nieba *et al.* 1996] bestimmt worden. Der Vorteil dieser SPR-Methode (BIAcore, Uppsala, Schweden) ist, dass dieser optische Biosensor in Echtzeit die Interaktionen zwischen Bindungspartnern beschreiben kann, ohne dabei auf zusätzlich benötigte Markierungen der Moleküle zurückgreifen zu müssen. Das zugrunde liegende Phänomen dieser Biosensoren beruht auf der einer Reflektion von polarisiertem Licht, wenn dieses auf eine gold-beschichtete Oberfläche trifft. Wechselwirken nun lösliche Interaktionspartner mit Molekülen, welche auf der Sensoroberfläche immobilisiert vorliegen, so ändert sich der Winkel des reflektierten Lichtes. Diese Änderung kann direkt ausgelesen werden [Jonsson *et al.* 1991]. Zur Verwendung dieser weniger sensitiven aber exakten Messmethode müssen die Analyten jedoch in reiner Form vorliegen, da Verunreinigungen das Auslesen beeinflussen können.

Um Analysen von Bindemolekülen ohne deren vorhergehende affinitätschromatographische Aufreinigung zu ermöglichen, sollten miniaturisierte, *bead*-basierende Experimente entwickelt werden. Es wurden kompetitive ELISA-Assays zur Bestimmung einer Rangordnung bezüglich der Binderaffinität (K_D) herangezogen. Es sollte hierdurch ermöglicht werden, hochaffine Klone aus einer Binderbibliothek identifizieren und auswählen zu können.

Zudem konnten anhand kristallographischer Daten diejenigen Aminosäuren des Peptidantigens identifiziert werden, die zur Bindung an den Antikörper beitragen. Es war von Interesse, ob die während einer Affinitätsmaturierung erfolgten Mutationen der Antikörper auch Einfluss auf die Antigenerkennung haben. Durch die Immobilisierung an eine feste Phase sollten die Fängereigenschaften der Antikörper untersucht werden. Die Verwendung eines fluoreszenzmarkierten Antigens sollte den direkten Vergleich zu weiteren Fängermolekülen ermöglichen.

4.2.1 Affinitätsbestimmung: Entwicklung und Durchführung

4.2.1.1 Beschreibung der Methoden zur Affinitätsbestimmung

Das Prinzip dieser Affinitätsmessungen basiert auf Arbeiten von Friguet und Goldberg [Friguet *et al.* 1985] und bedient sich einer ELISA-basierenden Gleichgewichtstitration. In Messreihen erfolgt in Lösung bei konstanter Binder- und variabler Antigenkonzentration eine Gleichgewichtseinstellungen zwischen den Reaktionspartnern. Hierbei sollte die Binderkonzentration nahe oder unter dem K_D -Wert liegen. Anschließend können die freien, ungesättigten Bindemoleküle an einer mit Antigen beschichteten festen Phase quantifiziert werden.

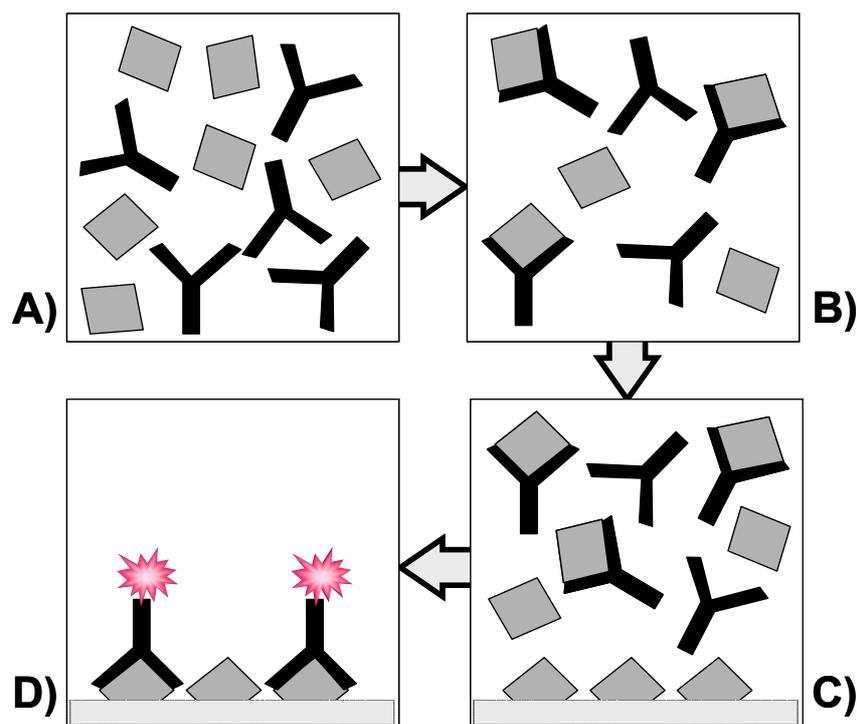


Abbildung 4.4: Prinzip der Affinitätsmessungen durch Gleichgewichtstitration. Das Prinzip dieser Affinitätsbestimmung ist am Beispiel einer Antikörper- und einer Antigenkonzentration aufgezeigt. **A)** Antikörper und lösliches Antigen werden in Lösung miteinander inkubiert. **B)** Es stellt sich ein affinitätsabhängiges Gleichgewicht zwischen gesättigtem und freiem Antikörper ein. **C)** Die Lösung wird anschließend in ein Reaktionsgefäß überführt, in dem das Antigen an fester Phase gebunden vorliegt. **D)** Die freien Antikörper binden nun an die immobilisierten Antigene und können detektiert werden. Die Bestimmung der Affinitätskonstante erfolgt nun über mehrere solcher Messungen, wobei dies bei konstanter Antikörper- und variabler Antigenkonzentration erfolgt.

Zur Analyse von peptidspezifischen Bindemolekülen wurden drei anti-GCN4-scFv-Antikörper herangezogen. Durch die Verwendung *bead*-basierender Kompetition-ELISAs sollten für die verschiedenen scFv-Fragmente Affinitätskonstanten (K_D) bestimmt werden. Ziel war es, eine Rangordnung für Binder aus Rohextrakten bezüglich der Affinität zu erstellen.

4.2.1.2 Methodenentwicklung zur Affinitätsbestimmung

Zu Beginn wurden die Versuchs- und Messbedingungen übernommen, die aus den Vorgaben des Geräteherstellers (Luminex Corp.) für die Durchführung *bead*-basierender Assaysysteme zugänglich waren. Unter Verwendung eines proteinhaltigen Puffersystems (CBS) wurden Messungen in Filterplatten aus Polystyrol durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass der Nachweis von biotinylierten scFv-Fragmenten durch Streptavidin möglich war. Hingegen waren die Messwerte der Kompetitortitrationsreihen bei Peptidkonzentrationen < 1 nM durch starke Schwankungen der Messwerte gekennzeichnet (Daten nicht gezeigt). Durch die Verwendung einer Mikrotiterplatte mit verminderter Proteinbindekapazität (NBS-96) konnten die unspezifischen Wechselwirkungen des Kompetitorpeptides an die Oberfläche der Reaktionsräume verringert werden. Nach Inkubationen von Bindern und Kompetitoren wurden die Lösungen in eine Filterplatte (Bioinert) übertragen. Die Kavitäten dieser Platte war zuvor mit antigenbeladenen *Beads* befüllt und abgesaugt worden. Hierdurch wurde die feste Phase eingebracht, ohne dass sich das Gleichgewicht der Kompetition durch eine Volumenzunahme verändert. Die Menge an Antigen, die durch Zugabe der *Beads* in das System eingebracht wird, lag hierbei im Bereich von wenigen Femtomol. Durch diese geringe Konzentration sollte sich das Gleichgewicht zwischen löslichem Binder und Kompetitor in Kompetitionstitrationen kaum verändern [Friguet *et al.* 1995].

Zur Optimierung der Versuchsbedingungen wurde zudem nach einem geeigneten Puffersystem gesucht. Hierbei wurde neben CBS-Puffer auch ein alternatives Blockierungsreagenz mit Gelatinehydrolaseprodukten in Tris-Puffer (BRET) verwendet. Darüber hinaus wurden in Analogie zu Affinitätsbestimmungen mit BIAcore-basierten Kompetitionsexperimente in proteinfreiem HBST-Puffer durchgeführt.

4.2.1.3 Affinitätsbestimmungen: Messungen und Ergebnisse

Die abgebildeten Verdünnungsreihen zweier scFv-Antikörper (Abbildung 4.5) zeigen eine gute Korrelation der Ergebnisse über drei unabhängige Versuchsansätze. Anhand der Standardabweichung für die einzelnen Messwerte war jedoch zu erkennen, dass eine Durchführung einer Standardreihe zu jeder Messung nötig war. Die Abweichungen waren vor allem im Bereich von 5 – 500 pM scFv am stärksten ausgeprägt.

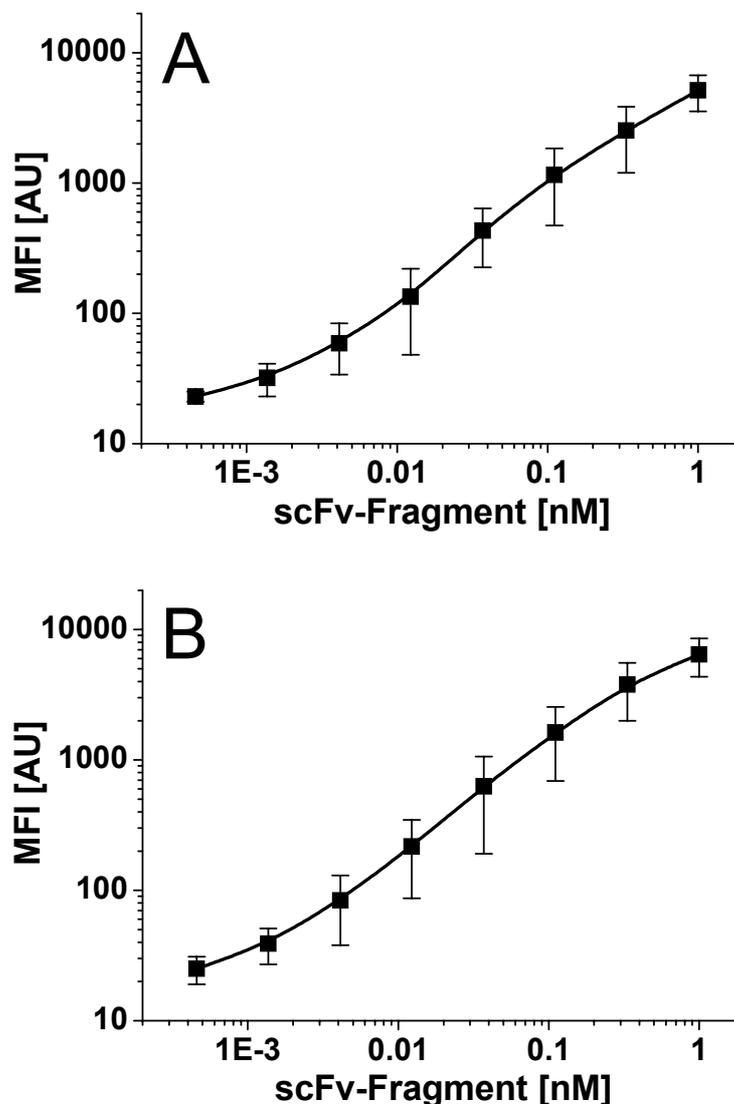


Abbildung 4.5: Verdünnungsreihen der anti-GCN4 scFv-Fragmente L34nBio und SR4nBio. Es wurden die Standardreihen zur Bestimmung der freien, unkompetierten Bindermenge von L34nBio (A) und SR4nBio (B) in HBST durchgeführt. Die Ergebnisse stammen aus (n=3) unabhängigen Experimenten, die in proteinfreiem HBST-Puffer durchgeführt wurden. Es wurde hierbei eine sigmoidale Kurvenanpassung durchgeführt.

Durch diese Quantifizierung zur Bestimmung der Bindermenge, welche nicht durch den löslichen Kompetitor blockiert vorlag, wurden die Daten der Kompetitortitrationen vergleichbar. Als minimale Bindermengen, die zur Competition verwendet werden konnten, eigneten sich bei den angeführten scFv-Fragmenten Konzentrationen zwischen 80 – 200 pM.

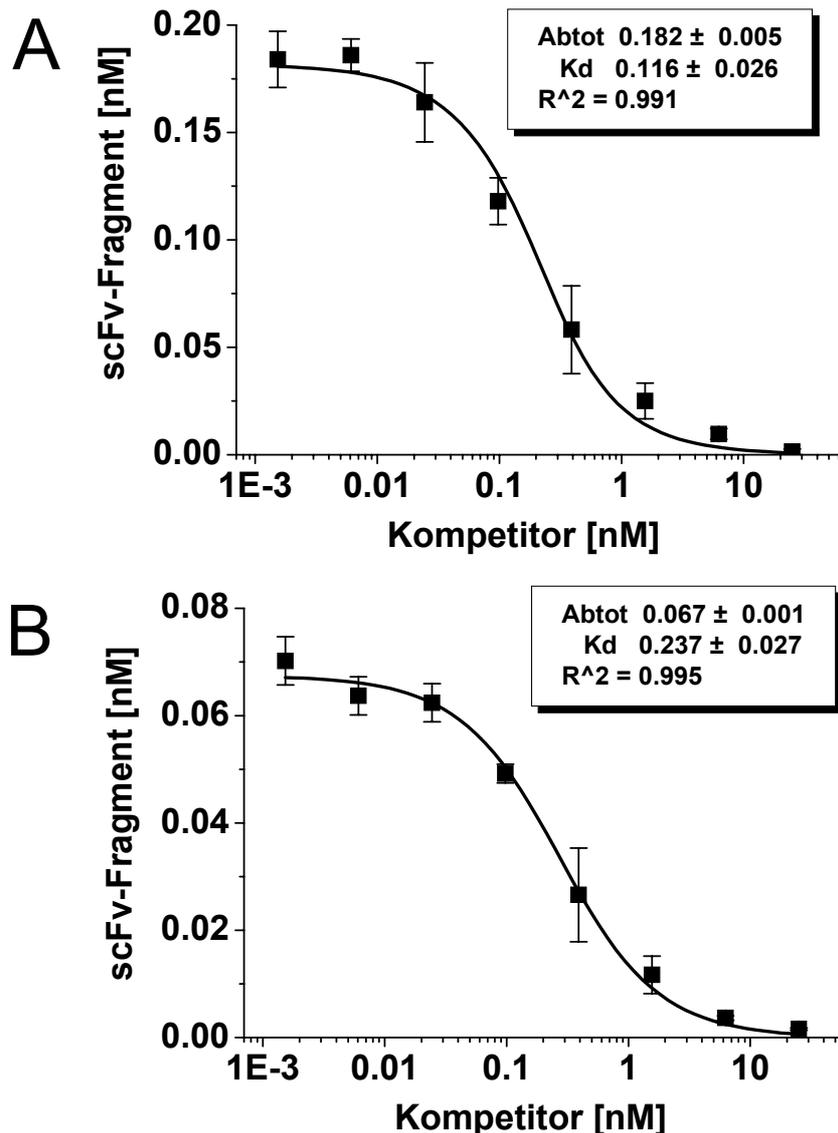


Abbildung 4.6: Kompetitionskurven der anti-GCN4 scFv-Fragmente L34nBio und SR4nBio. Konzentrationen von 0,2 nM L34nBio (**A**) und 0,08 nM SR4nBio (**B**) wurden mit absteigenden Mengen an Kompetitorpeptid in HBST-Puffer gemessen. Es wurden hieraus K_D -Werte von 116 pM für L34nBio und 237 pM für SR4nBio ermittelt. Die Messwerte wurden hierzu aus drei Experimenten gewonnen und jeweils über eine Standardkurve berechnet. Hierdurch kann die Varianz zwischen den einzelnen Experimenten aufgezeigt werden.

Die Messungen zur Konkurrenz wurden auf ihre Varianz untersucht. So sind in Abbildung 4.6 die Messwerte aus drei parallelen Konkurrentitrationen zusammengefasst und zur Affinitätsbestimmung verwendet worden. Es ist zu erkennen, dass die verwendete Gleichung zur Kurvenanpassung mit einem Koeffizienten der Bestimmung ($R^2 \geq 0,99$) nahe 1 liegt und somit eine gute Korrelation aufweist. Die einzelnen Messwerte liegen für alle Konzentrationen an Konkurrentor nahe der Kurve. Für beide Binder war unter den verwendeten Bedingungen die Abweichung in Kurvenbereichen mit größerer Steigung am deutlichsten ausgeprägt. Dies war bei einer Konkurrentorkonzentration von ca. 0,4 nM.

In einer Zusammenfassung der Ergebnisse zur Affinitätsbestimmung in Tabelle 4.1 wird deutlich, dass die verwendeten Puffersysteme Einfluss auf die bestimmten Affinitätskonstanten nehmen.

Tabelle 4.1: Bestimmte Affinitätswerte für anti-GCN4 scFv-Fragmente aus Konkurrenzexperimenten mit bead-basierenden Assaysystemen. Es wurden Konkurrenz-ELISAs (n=3) zur Affinitätsbestimmung herangezogen. Um systematische Fehler auszuschließen, wurden die verwendeten Verdünnungsschritte des Konkurrentors stets unterschiedlich gewählt.

scFv Name	Puffer	scFv Konz. [nM]	K_D [nM]
L34nBio	CBS	1,25	$0,53 \pm 0,31$
C11nBio	BRET	1,75	$7,43 \pm 3,16$
L34nBio	BRET	0,34	$0,46 \pm 0,07$
SR4nBio	BRET	1,20	$2,03 \pm 1,90$
C11nBio	HBST	0,70	$4,25 \pm 1,10$
L34nBio	HBST	0,20	$0,12 \pm 0,06$
SR4nBio	HBST	0,08	$0,25 \pm 0,09$
C11nBio	HBST	1,00	$2,36 \pm 0,13$
L34nBio	HBST	1,00	$0,08 \pm 0,03$
SR4nBio	HBST	1,00	$0,07 \pm 0,04$

So zeigte sich, dass die Werte der Affinitätskonstanten größer waren, wenn im Versuchsmedium Protein vorhanden war. Hingegen liegen die Werte, die bei Messungen in HBST bestimmt wurden, zum Teil deutlich darunter. Des Weiteren war zu erkennen, dass Affinitätskonstanten stets bei Binderkonzentrationen unter 0,7 nM zu bestimmen waren. Die hierbei ermittelten K_D -Werte lagen stets über denen, die für

unbiotinylierte, gereinigte scFv-Antikörper bestimmt worden waren. Wurden die Affinitätsmessungen hingegen bei 1 nM Binder durchgeführt, so wurden für die biotinylierten Klone L34 und SR4 K_D -Werte von unter 100 pM bestimmt. Diese Werte liegen zusammen mit einer K_D von 2,4 nM für C11nBio im Bereich der Affinitäten, die mit BIAcore bestimmt worden waren. Abweichungen der Einzelmessungen ($n=3$) für C11nBio lagen bei ca. 6%, wohingegen diese für die höheraffinen Binder L34nBio und SR4nBio zwischen 35% und 65% lagen.

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung von *bead*-basierenden Konkurrenzexperimenten scFv-Fragmente minderer Reinheit hinsichtlich ihrer Affinität eingeordnet werden können. Als Versuchsmedium eignete sich besonders ein proteinfreier Puffer, der sich somit auch zur Durchführung von *bead*-basierenden Experimenten eignet. Wurden hierbei die Binder wie zur Affinitätsbestimmung mit BIAcore-Experimenten bei einer Konzentration von 1 nM eingesetzt, so bestand eine gute Korrelation zu den aus *bead*-basierenden Messungen ermittelten Affinitätskonstanten.

4.2.2 Multiparametrische Epitopkartierung: Beschreibung des Bindungsbereiches peptidspezifischer Antikörper

Zur näheren Charakterisierung des Bindungsbereiches der anti-GCN4 scFv-Fragmente wurden systematisch verkürzte und mutierte Varianten des Peptidantigens synthetisiert und immobilisiert. In Experimenten wurden die Binder daraufhin untersucht, in wie weit eine Affinitätsmaturierung Einfluss auf die spezifische Erkennung des Antigens hatte. Die multiparametrischen Kartierungen wurden stets bei Reaktionsgleichgewicht in Ansätzen mit 33 *Beads* durchgeführt. Im Folgenden werden die Ergebnisse zur Analyse der Bindemoleküle für Minimierung des Epitops und Aminosäuresubstitution getrennt voneinander beschrieben.

Als Referenz des Bindungsbereiches und zur Vorauswahl von Aminosäuren innerhalb des Peptidantigens wurden die Informationen aus der Kristallstruktur von Antigen und Antikörper [Zahnd *et al.* 2004] verwendet (Abbildung 4.7). Das hierbei verwendete Peptid aus 12 AS hatte die Aminosäuresequenz YHLENEVARLKK.

Zur Beschreibung des Bindungsbereiches der scFv-Antikörper wurde im Folgenden das 12mer C- und N-terminal um je 3 AS verlängert. Ausgehend vom Peptid PKNYHLENEVARLKKLVG (*18mer*) wurden systematisch verkürzte Formen des Epitops hergestellt. Aus den kristallographischen Daten qualifizierten sich die Aminosäuren der Peptidsequenzpositionen His-P2, Leu-P3, Glu-P6 und R-P9 des Antigens für eine eingehende Untersuchung, da sie einen direkten Beitrag zur Wechselwirkung mit dem Binder leisten. Durch Synthese von *18mer* Peptidantigenen, die an diesen Positionen aminosäuresubstituiert wurden, sollte der Einfluss dieser Aminosäuren und deren funktionellen Seitenketten an der Bindung untersucht werden.



Abbildung 4.7: Ausschnitt aus Kristallstruktur von anti-GCN4 scFv-Fragment und Peptidantigen. Die Struktur 1P4B wurde entnommen [Zahnd *et al.* 2004] und mit MDL Chime modifiziert. In der Bindungstasche des scFv-Fragmentes (dunkelblaues Netzwerk) liegt das helikale Peptid (rotes Grundgerüst). Die Aminosäuren des Peptides (P), deren Seitenketten maßgeblich an der Interaktion beteiligt sind und hierbei in die Bindungstasche des Antikörpers (schwere Kette: H; leichte Kette: L) ragen, wurden in der angeführten Sequenz hervorgehoben. Weitere, beteiligte Wassermoleküle wurden nicht gezeigt. So interagiert His-P2 (gelb) über hydrophobe Stapelkräfte mit einem Indol von Trp-H59, über Wasserstoffbrücken mit Asp-H65 und wird weiter über hydrophobe Wechselwirkungen mit Ile-H67 stabilisiert. Leu-P3 (magenta) hingegen erscheint zwischen drei aromatischen Resten (Tyr-L40, Trp-L109 und Trp-L137). Arg-P9 (blau), welches in der benachbarten Wendung der Helix zu Leu-P9 liegt, formt starke, ionische Wechselwirkungen mit Asp-H137. Zudem beeinflusst Arg-P9 die Konformation von Gly-H109 und wird selbst über eine Wasserstoffbrückenbindung von Glu-P6 (grün) konformatiell stabilisiert. Glu-P6 wiederum interagiert mit Gly-H40 wird über ein Wassermolekül [Zahnd *et al.* 2004].

Zur Epitopcharakterisierung wurden alle Peptide gemäß des Protokolls zur Kopplung cysteinhaltiger Peptide auf BSA-Beads gekoppelt. Der Abstand der Peptide von der

Bead-Oberfläche wurde zusätzlich zum verwendeten Kopplungsreagenz durch den Einbau eines *Doa-Spacers* vergrößert. Hierdurch sollte die Zugänglichkeit aller Peptide unabhängig von ihrer eigenen Sequenzlänge für die Bindemoleküle zugänglich werden.

4.2.2.1 Bestimmung eines zentralen Epitopes durch Epitopminimierung: Konzept und Messungen

Der kleinstmögliche Bindungsbereich der verschiedenen scFv-Fragmente wurde an einem Peptidantigen bestimmt, das ausgehend vom einem *18mer* Antigen systematisch verkürzt wurde. Hierzu sollen über C- und N-terminale Minimierungen des Peptides PKNYHLENEVARLKKLVG (Tabelle 3.8) diejenigen Aminosäuren identifiziert werden, die für eine Wechselwirkung mit den Antikörpern essentiell sind.

Zu Beginn wurden drei affinitätsgereinigte scFv-Fragmente (C11cons, L34Ser und pRD01) zusammen mit dem kompletten Satz an Peptidantigenen untersucht. Es sollte der Bindungsbereich der unterschiedlich affinen scFv-Antikörper verglichen werden. Alle Binder wurden bei einer Konzentration von 10 nM untersucht, um eventuelle niederaffinere Wechselwirkungen aufzuzeigen. Aus Abbildung 4.8 wird deutlich, dass alle drei anti-GCN4-Antikörper bei gleicher Konzentration mit den verschiedenen Antigenen unterschiedlich starke Signale generieren konnten. Für alle scFv-Fragmente konnte ein gemeinsamer Bindungsbereich ermittelt werden.

Es wurde ein erster MFI-Schwellenwert von 100 AU bestimmt, der ein Dreifaches des Hintergrundrauschens war und zur einfachen Abschätzung der Bindungsstärken diente. Das kürzeste von allen Bindern noch erkannte Peptid war *C-12* (PKNYHLENEVAR) mit einer Länge von 12 AS. Daneben wurde das N-terminal verkürzte Peptid *N-13* (13 AS) erkannt. Peptide ohne die ersten fünf N-terminalen Aminosäuren PKNYH und Peptide ohne die letzten sechs C-terminalen Aminosäuren LKKLVG waren noch gut detektierbar. Für kürzere Varianten hingegen erreichte die gemessene Signalintensität niedrigere Werte. Das Peptid LENEVAR beschreibt somit das minimale Epitop.

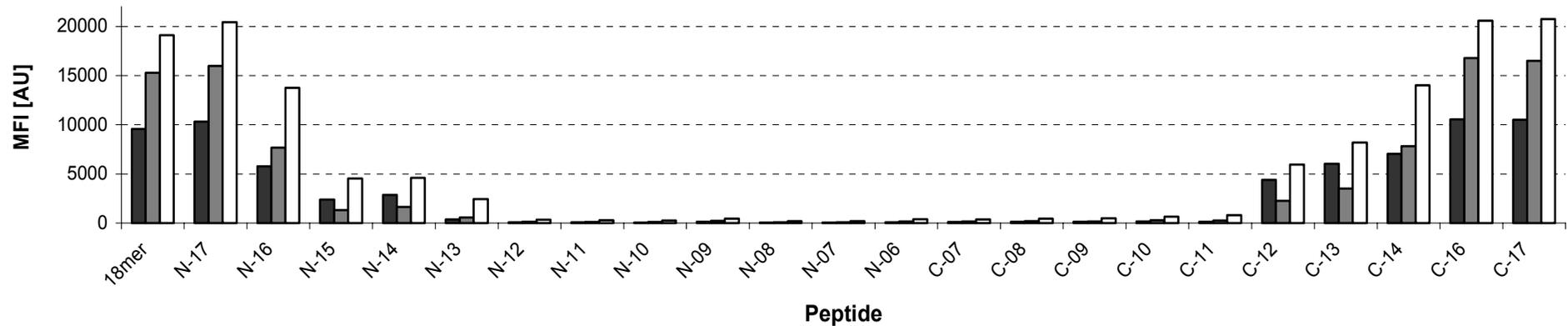


Abbildung 4.8: Minimierung des Epitops durch C- und N-terminale Verkürzung des Peptidantigens. Die scFv-Fragmente C11 (■); pRD01 (■) und L34 (□) wurden jeweils bei einer Konzentration von 10 nM eingesetzt. Zur Detektion wurden die Binder über den His₆-tag nachgewiesen (3.7.1.2). Der Versuch wurde in zwei Stufen als *Wash-Assay* durchgeführt.

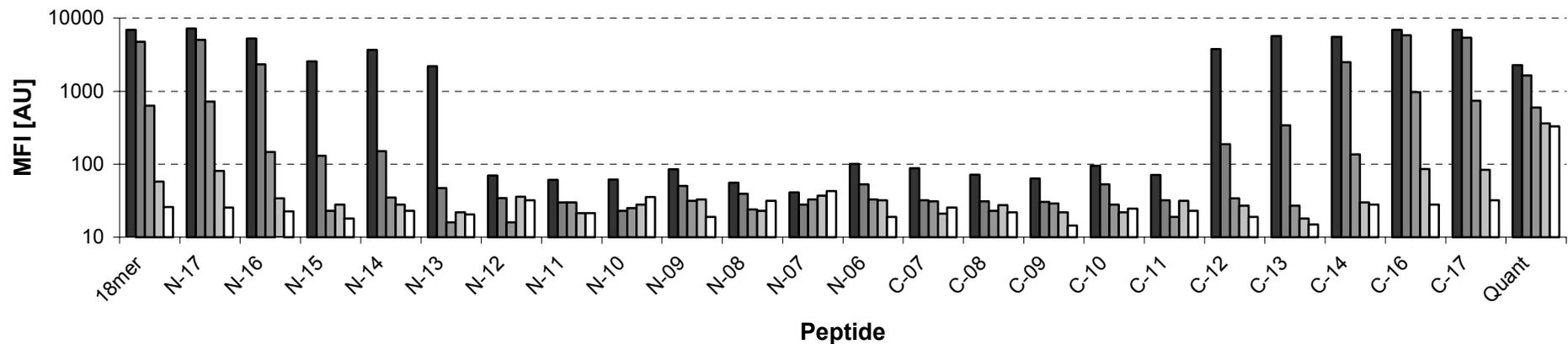


Abbildung 4.9: Minimierung des GCN4-Epitopes für L34nBio. Das scFv-Fragment L34nBio wurden mit N- und C-terminal verkürzten Varianten des Antigenpeptides zur Minimierung des Epitopes untersucht. Die Experimente wurden bei Binderkonzentrationen von 100 nM (■); 10 nM (■); 1 nM (■); 0,1 nM (■) sowie ohne scFv-Fragment (□) durchgeführt. Die Experimente wurden als *No-Wash-Assays* durchgeführt, wobei die Detektion mittels Streptavidin R-PE erfolgte.

Vergleicht man die Signalintensitäten für längere Peptide von C11cons und L34Ser, so geben bereits diese MFI-Werte einen Hinweis auf die Affinitätsrangordnung dieser Antikörper. Die gemessenen MFI-Werte waren für das Peptid *18mer* beim hochaffinen scFv-Fragment L34Ser nahezu um das Zweifache über denen von C11cons.

Um die biotinylierten Bindemoleküle mit geringerer Reinheit zu analysieren, wurde das Bindungsverhalten über einen Konzentrationsbereich von 100 – 0,1 nM untersucht. In Tabelle 4.2 wurden die Ergebnisse der Epitopminimierung für vier verschiedene scFv-Verdünnungsstufen an drei Antikörpern beschrieben. Am Beispiel des L34nBio aus Abbildung 4.9 wurde gezeigt, dass die Erkennung der Peptide zum einen von deren Länge abhängt. Mit abnehmender Bindermenge werden sukzessiv mehr Aminosäuren des Peptidantigens benötigt, so dass die gemessenen Signalstärken den Schwellenwert (siehe 3.7.5.2) erreichen. So konnte die Erkennung mancher Peptide nur durch die Anwesenheit höherer Binderkonzentrationen bestimmt werden.

Tabelle 4.2: Zusammenhang zwischen der Binderkonzentration und dem minimalen Epitop. Drei unterschiedlich affine scFv-Fragmente wurden bei gleichen Konzentrationen zur Bestimmung des minimalen Epitops verglichen. Nach 3.7.5.2 wurde ein Signalschwellenwert von 28% bestimmt. Wurde dieser Wert für die relativen Signalintensitäten der Antigene nicht erreicht, so war das Epitop nicht zu definieren (n.d.). Die Aminosäuren, die für die entsprechenden scFv-Verdünnungen als zusätzliche Bestandteile des Peptidantigens identifiziert wurden, wurden zur Verdeutlichung unterstrichen.

scFv [nM]	L34nBio	C11nBio	SR4nBio
100	LENEVAR	LENEVAR	LENEVAR
10	<u>NYH</u> LENEVAR <u>L</u>	<u>NYH</u> LENEVAR <u>L</u>	<u>H</u> LENEVAR
1,0	NYHLENEVAR <u>LKK</u>	<u>KNYH</u> LENEVAR <u>LKKL</u>	<u>NYH</u> LENEVAR <u>LKK</u>
0,1	<u>KNYH</u> LENEVAR <u>LKKL</u>	n. d.	<u>KNYH</u> LENEVAR <u>LKKL</u>

Für die hier untersuchten biotinylierten scFv-Antikörper korreliert das minimale Epitop der Sequenz LENEVAR gut mit den Ergebnissen, die mit affinitätsgereinigten Bindern ermittelt wurden. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die messbaren Bindungen neben der Peptidlänge auch von der Antikörperkonzentration und deren Affinität abhing. Bei geringen Binderkonzentrationen waren die zusätzlichen Aminosäuren NYH am N-Terminus und LKK am C-Terminus für eine Erkennung erforderlich. N-terminales Lys und C-terminales Leu waren diejenigen Aminosäuren

der 17 AS-Peptide, die für die Bindung der hochaffinen Klone L34nBio und SR4nBio bei 0,1 nM notwendig waren. Das Peptid *18mer* wurde bei sehr niedrigen Konzentrationen nicht zwingend besser erkannt als *N-17* oder *C-17*. Die Bedeutung der terminalen Aminosäuren Pro und Gly auf die Bindung war somit als geringer einzustufen.

Alle untersuchten scFv-Fragmente erkannten im Peptidantigen die gleiche Sequenz LENEVAR als zentrales Epitop. Die Erkennung der Antigene hing von der Peptidlänge und der Konzentration der verwendeten Binder ab. Die Unterschiede der Antigenbindung waren beim Ansatz zur Epitopminimierung primär affinitätsabhängig.

4.2.2.2 Aminosäure-Substitutionen im Peptidepitop: Untersuchungen zum Einfluss bestimmter Aminosäuren auf die Antikörperbindung

Durch die Substitution einzelner Aminosäuren im Peptidepitop können Informationen über die Bedeutung bestimmter Sequenzpositionen, den Beitrag ihrer funktionellen Gruppen und somit über die Stringenz einer Bindung zwischen Antikörper und Antigen gewonnen werden. Die Auswirkungen, die einem Austausch einzelner Bausteine durch Aminosäuren mit ähnlichen oder unterschiedlichen Eigenschaften folgen, sind bei einer Antikörpercharakterisierung hinsichtlich dessen Spezifität und Selektivität dienlich und machen somit die Wechselwirkung kontrollierbar. Es kommen hierbei Eigenschaften der Aminosäureseitenketten wie Polarität, Ladung und Größe zum tragen.

In multiparametrischen Ansätzen wurden einzelne Epitopbestandteile hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Wechselwirkung mit den Antikörpern untersucht. Die hierzu verwendeten Peptidantigene besaßen alle die gleiche Länge.

Es wurden drei biotinylierte scFv-Fragmente C11nBio, L34nBio und SR4nBio verwendet, um die Bedeutung der physikalisch-chemischen Eigenschaften bestimmter Positionen im Antigen durch einen Aminosäureaustausch zu beschreiben. Das Verhältnis der Messwerte der untersuchten mutierten Peptide zum *18mer* Antigenpeptid zeigt hierbei die Auswirkungen der Substitution auf die Bindungseigenschaften auf. Über die Quantifizierung wurde ein Schwellenwert ermittelt, der in Leerwertmessungen bei 23% lag (3.7.5.2). Für alle drei untersuchten

scFv-Fragmenten lag der Messwert für das *18mer* Antigenpeptid mindestens 6-fach über dem Schwellwert.

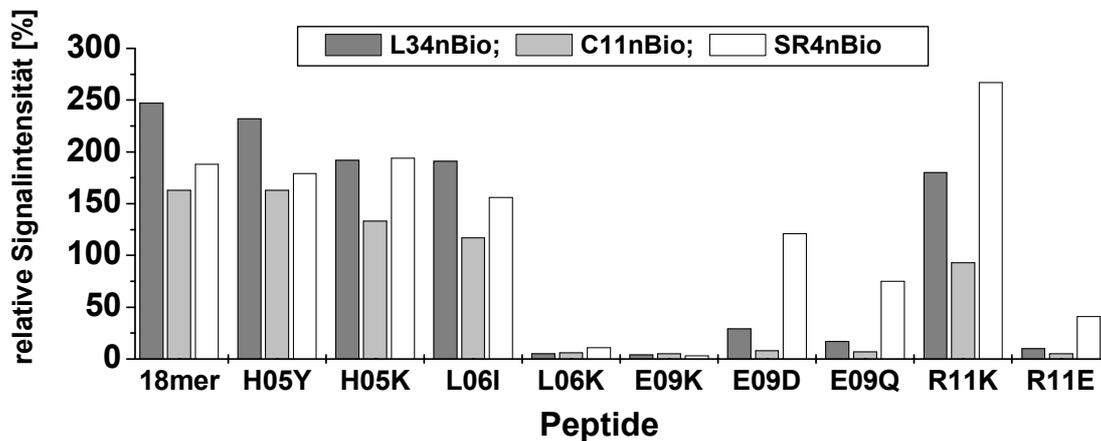


Abbildung 4.10: Effekte der Substitution von Aminosäuren im Peptidantigen auf die Bindung von scFv-Fragmenten. Die Antikörper L34nBio, C11nBio und SR4nBio wurden bei 80 nM eingesetzt, um den Einfluss bestimmter Aminosäuren an der Bindung zu untersuchen. Für das jeweilige Peptid und die entsprechende scFv-Quantifizierung wurden die relativen Signalverhältnisse der Messungen normiert (siehe 3.7.5.2). Der Schwellenwert lag bei dieser Messung bei 23%. Der Versuch wurde als *No-Wash-Assay* durchgeführt, so dass auch schwächere Wechselwirkungen erkannt werden sollten.

Die Bindung aller Antikörper war kaum beeinflusst, wenn die Aminosäure Histidin (aromatisch und basisch) an Position P-5 entweder durch Tyrosin (H05Y, aromatisch und ungeladen) oder durch Lysin (H05K, aliphatisch und basisch) ersetzt wurde. Hingegen führte die Substitution von Leucin zu Lysin (L06K), d.h. die Einführung einer positiv geladenen Aminosäure zu einem deutlichen Abfall der Signalintensität. Die Auswirkung des Austausches von Ile für Leu, die sich in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften sehr ähneln, war indessen gering. Für die Glutaminsäure an Position P-9 wurde beobachtet, dass sowohl die Verkürzung der Seitenkette (Glu → Asp), als auch der Verlust der Säurefunktion (Glu → Gln) sich bei allen Bindern in einer reduzierten Signalstärke bemerkbar machte. Besonders interessant waren hier die Auswirkungen von Substituenten, die zu einer Umkehr des Ladungszustandes an dieser Position führten. Dies war sowohl für Glutaminsäure (Glu → Lys) als auch für Arginin an Position P-11 (Arg → Glu) der Fall. Auffällig nach Veränderung im Antigen durch Substitution einer basischen mit einer anderen basischen Aminosäure (Arg → Lys) war das unterschiedliche Verhalten der scFv-Fragmente gegenüber dieser

Mutation. Bei den untersuchten Binderkonzentrationen zeigte das Peptid *R11K* für SR4nBio eine höhere Bindungsstärke als das *18mer*.

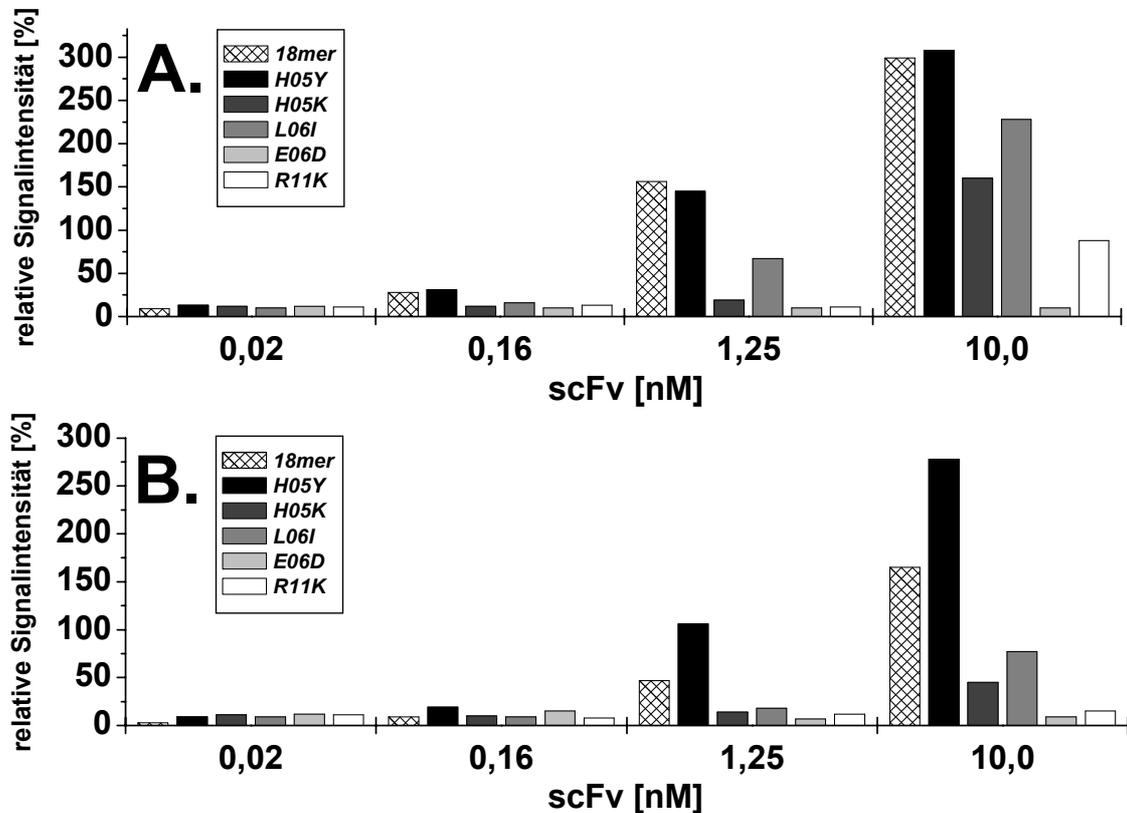


Abbildung 4.11: Verdünnungsreihen von anti-GCN4 Bindern zur Untersuchung von Peptid-scFv-Interaktionen. Die Peptide *18mer*, *H05Y*, *H05K*, *L06I*, *E06D* und *R11K* wurden über mehrere Konzentrationen mit den scFv-Fragmenten SR4nBio (A) und C11nBio (B) inkubiert. Der Schwellenwert lag bei dieser Messung bei 23%.

Die Interaktionen einiger ausgewählter Peptide wurden über mehrere scFv-Verdünnungsstufen verfolgt (Abbildung 4.11). Es konnte gezeigt werden, dass eine Wechselwirkung der Peptide *R11K* und *E06D* nur bei höherer Antikörperkonzentration von SR34nBio und C11nBio erfolgte und somit niederaffiner Natur war. Die Effekte der Substitution bei Peptid *H05K* und *L06I* waren hingegen weniger deutlich. Zu keiner Verschlechterung der Antikörperbindung führte die Substitution bei Peptid *H05Y*. Von beiden scFv-Fragmenten wurde dieses Antigen gleich gut erkannt wie das *18mer*. Ein ähnliches Bindungsverhalten konnte auch für L34nBio beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Mit *bead*-basierenden, multiparametrischen Assaysystemen wurden in den dargestellten Experimenten scFv-Fragmente hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften eingehender untersucht. So konnten die Bindungen hinsichtlich der Bedeutung einzelner Aminosäuren des Antigens aufgelöst werden. Die Aminosäure Histidin an Position 5 war hiernach nicht zwingend als ein Kernbestandteil des Epitopes zu definieren.

4.2.3 Analyse immobilisierter Fängermoleküle zur Bestimmung von Nachweisgrenzen für Antigene

Die detaillierte Charakterisierung spezifischer und hochaffiner Fängermoleküle ist eine Grundvoraussetzung für die Entwicklung von empfindlichen Assaysystemen, die dem gezielten Nachweis von Antigenen dienen.

Im Folgenden wurden peptidspezifische Bindemoleküle an fester Phase immobilisiert und hinsichtlich ihrer Fängereigenschaften untersucht. Die Durchführung von Titrationsreihen der Antigene wurde zur Bestimmung der Nachweisgrenzen für verschiedene Fängermoleküle verwendet. Darüber hinaus war es von Interesse, in wie weit die Signalgenerierung den Nachweis eines Antigens beeinflusst.

Es wurden biotinylierte anti-GCN4 scFv-Antikörper bei gleicher Konzentration an LumAvidin-*Beads* gekoppelt. Darüberhinaus wurden zwei peptidspezifische Antikörper und ein anti-Biotin-Antikörper nach kovalenter Immobilisierung getestet. Eine weitere Möglichkeit zum Herausfangen von löslichen Molekülen wurde mit Ni-NTA-*Beads* untersucht. Der Ni-Metal-Chelat-Komplex bindet selektiv an einen His₆-tag. Als Referenz wurde das Biotin- und Streptavidinsystem auf Grund seiner hochaffinen Wechselwirkung [Diamandis und Christopoulos 1991] und der Zugänglichkeit des immobilisierten Streptavidins gewählt.

Durch Synthese direkt fluoreszenzmarkierter Pepidantigene konnten die Fängereigenschaften unterschiedlicher Bindemoleküle einfach untersucht und verglichen werden. Der Effekt, den eine Modifikation auf die Bindungseigenschaften haben kann, wurde hierbei nicht berücksichtigt. Alternativ wurden zur Signalgenerierung gefangener Peptide weitere Detektionsmoleküle verwendet, die das Antigen über eine zweite Bindungsstelle erkennen konnten.

Bei der Untersuchung der Fängereigenschaften von immobilisierten anti-GCN4 scFv-Fragmenten wurden stark überlappende Bindungskurven (Abbildung 4.12) beobachtet. Dies war trotz der unterschiedlichen Affinität der Binder L34nBio und C11nBio stets der Fall und wurde bei der Verwendung verschiedener Puffersysteme und erneuten Kopplungen bestätigt (Daten nicht gezeigt). Die ermittelte Nachweisgrenze des fluoreszenzmarkierten GCN4-Peptides lag für C11nBio bei 5,9 pM und für L34nBio bei 3,7 pM. Dies war um den Faktor 7 - 10 über dem des Biotin-Streptavidin-Systems (0,5 pM).

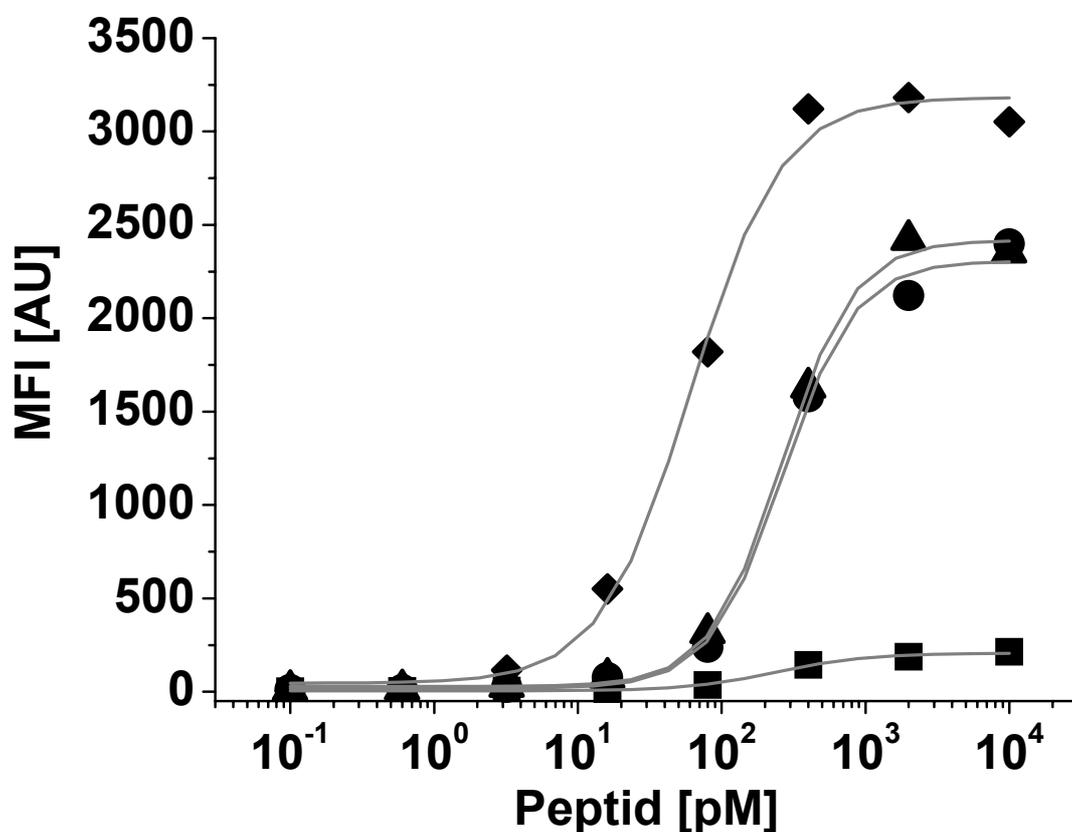


Abbildung 4.12: Immobilisierte Fängermoleküle und direkter Nachweis. Durch Verdünnungen von fluoreszenzmarkierten Antigenen wurden Fängermoleküle verglichen. Das direkt markierte GCN4-Peptid FEW-7P14P wurde über die immobilisierten scFv-Antikörper L34nBio (▲) und C11nBio (●) gefangen. Daneben wurden die unspezifischen Wechselwirkungen, die das Peptid mit LumAvidin-Beads (■) eingeht gezeigt. Desweiteren wurde der Nachweis von FEW-Lys-Biotin mit LumAvidin-Beads (◆) vergleichend dargestellt.

Es war zu erkennen, dass in einem Versuchsansatz das GCN4-Peptid unspezifisch mit dem unbeladenen LumAvidin-*Bead* wechselwirkte. Die maximale Signalintensität, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff FEW-0744 ermittelt werden konnte, lag bei ca. 3300 AU.

Aus Abbildung 4.13 wurde der starke Einfluss deutlich, den das gewählte Detektionssystem auf die Nachweisbarkeit von löslichen Antigenen hat. So konnte durch die Verwendung indirekter Nachweissysteme die Nachweisgrenze für Biotin und dem Fängermolekül Streptavidin von 0,5 pM auf 0,01 pM verbessert werden. Zudem führte die Verwendung von des anti-PentaHis-Antikörpers und anschließender Detektion mit R-PE-markiertem anti-Maus-Antikörper zu einer deutlichen Erhöhung der maximalen Signalintensität (8000 AU bei 0,4 nM). Bei diesem Beispiel war zudem zu erkennen, dass die Signalintensität bei den höchsten Konzentrationen wieder abnahm und darauf zurückzuführen war, dass die Menge an freiem, nicht gebundenen Antigen mit dem Detektionssystem reagiert und damit die verfügbare Konzentration des Detektionsantikörpers zum Nachweis *bead*-gebundener Antigene vermindert.

Hingegen liegen die Messwerte eines anti-Biotin-Antikörpers bei einer Antigenkonzentration von 3,7 nM bei 130 AU zwar kaum über dem Hintergrund, es wurde jedoch hierbei eine Nachweisgrenze von 19,1 pM bestimmt.

Es wurde eine Reihe von weiteren Fängermolekülen untersucht. Die Ergebnisse wurden in Tabelle 4.3 zusammengefasst. Es konnte die Beobachtung gemacht werden, dass sich manche der immobilisierten Bindermoleküle auf Grund von Nachweisgrenzen von über 1 nM weniger gut als Fänger von Peptiden eigneten. Zudem fiel der Einfluss der Detektionsreagenzien auf, die zur Signalgenerierung unmarkierter, gefangener Antigene eingesetzt wurden. So waren Interaktionen, die indirekt über ein fluoreszenzmarkiertes Detektionsmolekül nachgewiesen wurden, bei niedrigeren Konzentrationen detektierbar. Dies wurde am Beispiel von Streptavidin und Ni-NTA gezeigt. So waren die Nachweisgrenzen FEW-markierter Antigene um den Faktor 10 – 50 (Streptavidin) oder 73 (Ni-NTA) schlechter als bei der Verwendung indirekter Nachweissysteme. Als kleinste noch detektierbare Teilchenmenge konnten ca. 300.000 Moleküle von biotinyliertem MycHis-Peptid mit

LumAvidin-*Beads* bestimmt werden, dessen Bindung über einen anti-PentaHis-Antikörper und einen R-PE-markierten anti-Maus-IgG Antikörper nachgewiesen wurden.

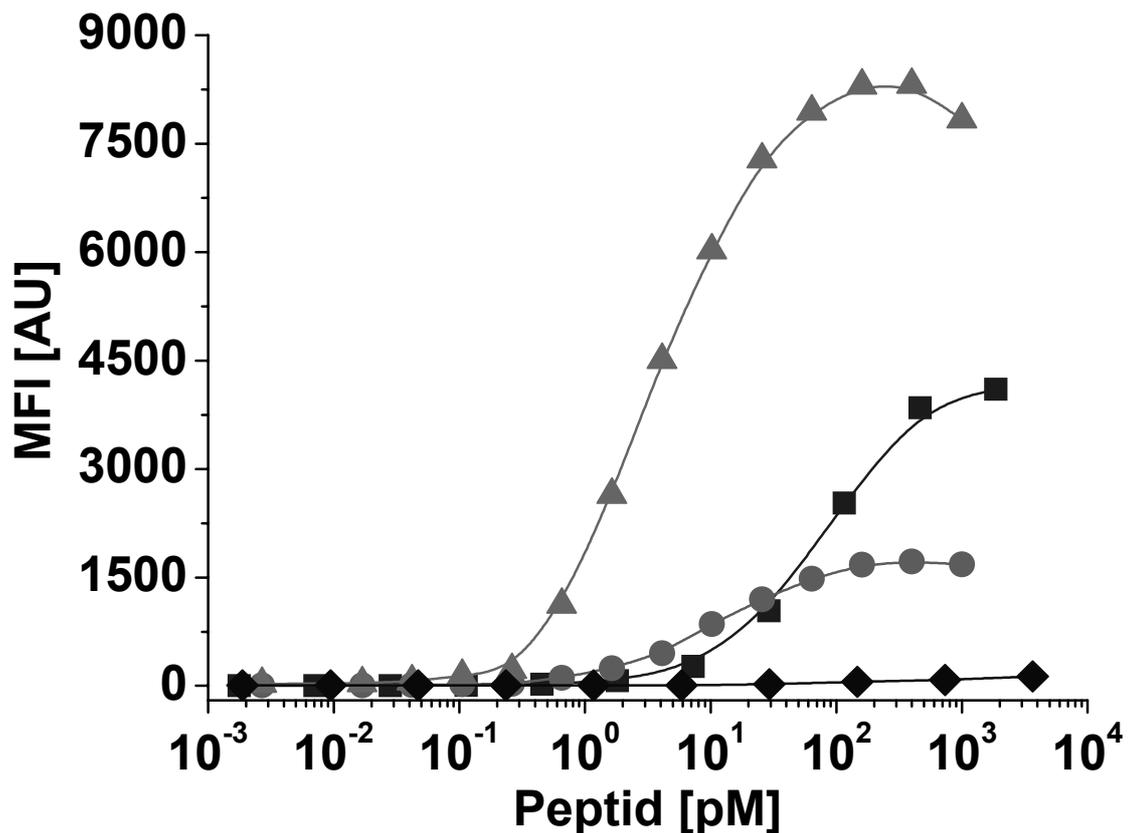


Abbildung 4.13: Immobilisierte Fänger-moleküle und Nachweissysteme. Es wurden verschiedene Detektionssysteme zum Nachweis von gefangenen Peptiden verglichen. Das Peptid Biotin-MycHis (▲) wurde mit anti-PentaHis-Antikörper (0,5 µg/ml) und einem R-PE-markierten anti-Maus-Antikörper (2,5 µg/ml) nachgewiesen. Biotin-MycHis wurde zudem direkt mit ALEXA532-markiertem anti-PentaHis-Antikörper (1 µg/ml) (●) nachgewiesen. Das fluoreszenzmarkierte Peptid FEW-Lys-Biotin wurde zum einen über Streptavidin (■), zum anderen mit einem anti-Biotin-Antikörper (◆) herausgefangen.

Tabelle 4.3: Gemessene Nachweisgrenzen. Die Zusammenstellung zeigt die verschiedenen Nachweisgrenzen (c_{Limit}), die für unterschiedliche Fängermolekül-Antigen-Systeme bestimmt wurden. Neben den hierbei verwendeten Fluorophoren bzw. Detektionssystemen wurde die Menge an Teilchen aufgezeigt, die sich aus der Nachweisgrenze und dem Assay-Volumen (50 μ l) berechnen lässt.

Fänger	Antigen	Detektion	Fluorophor	c_{Limit} [pM]	Teilchenmenge
C11nBio	7P14P	Direktmarkierung	FEW0744	5,9	$1,8 \times 10^8$
L34nBio	7P14P	Direktmarkierung	FEW0744	3,7	$1,1 \times 10^8$
Anti-Biotin	Lys-Biotin	Direktmarkierung	FEW0744	19,1	$5,8 \times 10^8$
Anti-PentaHis	MycHis	Direktmarkierung	FEW0744	1566,4	$4,7 \times 10^{10}$
Anti-c-myc	MycHis	Direktmarkierung	FEW0744	14660,0	$4,4 \times 10^{11}$
Streptavidin	Lys-Biotin	Direktmarkierung	FEW0744	0,5	$1,5 \times 10^7$
Streptavidin	MycHis	Anti-PentaHis + anti-Maus	R-PE	0,01	$3,0 \times 10^5$
Streptavidin	MycHis	Anti-PentaHis	Alexa532	0,05	$1,5 \times 10^6$
Streptavidin	PolyA-Biotin	Direktmarkierung	Cy3	0,4	$1,2 \times 10^7$
Ni-NTA	MycHis	Direktmarkierung	FEW0744	298,2	$9,0 \times 10^9$
Ni-NTA	MycHis	Biotin-Streptavidin	P-PE	4,1	$1,2 \times 10^8$

4.2.4 Zusammenfassende Diskussion

In diesem Abschnitt wurden drei peptidspezifische scFv-Fragmente charakterisiert, deren Antigen ein Abschnitt des Hefe-Transkriptionsfaktors GCN4 ist. Neben der Bestimmung der Affinität in Konkurrenzexperimenten wurde über Verkürzungen und Mutationen im Antigen der Bindungsbereich der Antikörperfragmente untersucht. Durch Immobilisierung der Binder und Fluoreszenzmarkierung des Peptidantigens wurden die Fängereigenschaften dieser Moleküle mit weiteren Bindemolekülen verglichen.

Die hierbei etablierten Assays sollten als Grundlage zur Charakterisierung der pepART-Binder in 4.3 dienen.

Durch die Optimierung der Versuchsbedingungen konnten für die drei untersuchten biotinmodifizierten scFv-Klone eine Affinitätsrangordnung SR4nBio > L34nBio > C11nBio erstellt werden. Die Binder lagen hierbei nicht affinitätsgereinigt vor. Die gemessenen Affinitätskonstanten korrelierten gut zu den Werten der Daten, die über BIAcore-Messungen bestimmt worden waren.

Ein entscheidender Einfluss auf die in *bead*-basierenden Konkurrenzassays bestimmten Affinitätswerte hatte das Vorhandensein von Pufferproteinen. Die Resultate einer Affinitätsbestimmung mit diesen Konkurrenzexperimenten hängen direkt von der verfügbaren Konkretorkonzentration ab. In proteinhaltigen Puffersystemen wurden erhöhte Affinitätswerte vermutlich auf Grund von unspezifischen Wechselwirkung zwischen Konkretor und Pufferproteinen bestimmt, da ein Anteil der Peptide nicht mehr zur Bindung/Konkretion an die Antikörper zugänglich war. Für kleiner werdende Konzentrationen an Konkretor war die eingesetzte nicht mit der wirksamen Konkretormenge gleichzusetzen. Hier war vermutlich der Überschuss an Pufferprotein zu groß, so dass die Zugänglichkeit der Peptide für die Bindemoleküle erschwert war.

Der Einfluss der Puffersubstanzen (PBS, Tris und HEPES) wurde im Einzelnen nicht untersucht, obwohl diese Substanzen ebenfalls einen Beitrag zum Aktivitätszustand der Bindemoleküle und der Antigene haben könnten.

Es waren bei der Verwendung des proteinfreien Puffersystems keine Verluste an Binder- oder Konkretormolekülen durch unspezifische Adsorption an die Wände der Reaktionsräume festgestellt werden. Dies konnte wiederum durch beschichtete

Mikrotiterplatten (NBS) ermöglicht werden, deren Oberfläche eine geringe Proteinbindekapazität aufwies. Durch den Einsatz eines Puffers ohne den Zusatz von Protein konnten für die hochaffinen Binder Affinitäten bestimmt werden, die mit < 250 pM in einem Bereich lagen, der auf Grund der Werte unbiotinylierter anti-GCN4-Binder zu erwarten war.

Zur Adaption der scFv-Fragmente an *bead*-basierende Assaysysteme waren diese Moleküle über eine *in vivo* Biotinylierung modifiziert worden. Es war bekannt, dass Mutationen, die während der Affinitätsmaturierung der scFv-Fragmente auftraten, dem Proteingerüst und nicht direkt der Bindungstasche zugeordnet werden konnten [Zahnd *et al.* 2004]. Somit kann möglicherweise die eingefügte Modifikation eine Veränderung der Bindungskonstante dieser Binder hervorrufen und eine Diskrepanz der BIAcore und *bead*-basierenden Ergebnisse erklären. Zur Klärung würden BIAcore-Messungen biotinylierter scFv-Fragmente dienlich sein.

Es konnte ferner eine Abhängigkeit der gemessenen Affinitätskonstante von der zur Konkurrenz eingesetzten Binderkonzentration beobachtet werden. In proteinfreiem Puffer wurden bei Binderkonzentrationen von 1 nM, welche für hochaffine Binder weit über der erwarteten K_D lag, Affinitätswerte < 100 pM bestimmt. Diese Bedingungen entsprechen einerseits zwar denen der Konkurrenzassays im BIAcore-Ansatz [Hanes *et al.* 1998, Zahnd *et al.* 2004], andererseits widerspricht dies nach Friguet und Goldberg [Friguet *et al.* 1985] den Voraussetzungen zur Affinitätsbestimmung im Konkurrenz-ELISA. In der Theorie führt eine Binderkonzentration über der K_D zu einem größeren Fehler bei der Berechnung der Bindungskonstante. In der Praxis hingegen ergaben die Affinitätsmessungen bei einer Mindestkonzentration an Binder über deren K_D jedoch Werte, die über drei unabhängige Messreihen tendenziell geringere Fehler aufwiesen und näher an den Erwartungswerten lag. Mögliche Erklärungen hierfür können in der geringen Stabilität der scFv-Fragmente und einem möglichen Dimerisierungspotential liegen, was schlussendlich zur Bestimmung fehlerhafter K_D -Werte führen könnte.

In ähnlichen experimentellen Ansätzen zur Affinitätsbestimmung durch Gleichgewichtstitration in Lösung wurde mit hochaffinen Fab-Antikörperfragmenten und Proteinantigenen die Abhängigkeit zwischen Binderkonzentration und berechneter Affinität untersucht [Haenel *et al.* 2005]. Bei diesen mikrosphären-basierenden Experimenten, deren Ausleseverfahren über Dekontaminationsantikörper und einer auf elektrochemilumineszenz-beruhenden Signalgenerierung verlief, waren vor

allem bei Anwesenheit niedriger Bindermengen während der Konkurrenz Affinitäten zu bestimmen, die mit BIAcore Daten übereinstimmten.

Bead-basierende Assaysysteme scheinen sich gut zur parallelen Kartierung des Bindungsbereiches peptidspezifischer Antikörper zu eignen. Hierbei stellen sie eine durchsatzfähige und flexible Alternative zu beschriebenen Systemen dar, wie sie für planare Mikroarrays beschrieben wurden [Reineke 2003]. Die Vorteile der *bead*-basierende Systeme liegen unter anderem darin begründet, dass nach einer Kopplung qualitätskontrollierter Peptide Peptid-*Beads* für mehrere Hundert parallelisierte Messungen zur Verfügung stehen. Durch die Möglichkeit, Assays ohne Waschschriffe (*No-Wash-Assays*) durchzuführen, konnten auch schwache Wechselwirkungen aufgezeigt werden. Eine parallel zur Charakterisierung erfolgte Quantifizierung der Bindermengen verschiedener Antikörper ermöglichte einen Vergleich der Bindungseigenschaften.

In miniaturisierten und parallelisierten Ansätzen zur Epitopminimierung wurden die Bindungssequenz und die Größe des Bindungsbereiches bestätigt, welche aus einer Kristallstruktur von GCN4-Peptid und scFv-Fragment zugänglich waren. Es konnte für alle Binder ein gemeinsames zentrales Epitop, nämlich LENEVAR bestimmt werden. Die Peptide waren hierbei mit Cystein N-terminal über einen Doa-*Spacer* und einen SMPB-*Linker* auf BSA-*Beads* in einem parallelisierten Verfahren immobilisiert worden.

Die Länge des erkannten Peptides hing direkt von der Konzentration der Binder ab. Bei einer schrittweisen Verringerung der scFv-Konzentration wurden stets längere Peptide zur eindeutigen Erkennung benötigt. Es scheint somit einen Zusammenhang zwischen Peptidlänge und Affinität zum Binder zu geben. Als mögliche Einschränkung zur Beschreibung des Epitopes könnten die N-terminalen Verkürzungen der Peptide beitragen. Bei Peptiden einer C-terminalen Verkürzung werden die Aminosäuren auf der zur Oberfläche abgewandten Seite entfernt, wobei ein Grundgerüst aus Cystein, *Spacer* und den ersten Aminosäuren stets erhalten und unverändert bleibt. Durch N-terminale Verkürzung hingegen verändert sich der Übergang von Epitop und *Spacer*. Befindet sich nun eine bindungsrelevante Aminosäure des Antigens am N-terminalen Übergang zum *Spacer*, so könnte dessen Zugänglichkeit für den Binder erschwert sein und diese Position als eventuell nicht-essentiell beschreiben. Ob die unterschiedlichen Grundgerüste einen Einfluss auf die

Struktur nehmen und ob dieser Beitrag größer ist als bei einer Veränderung des C-Terminus, konnte jedoch nicht gemessen werden.

Durch die Verwendung mutierter Peptide wurde zudem der definierte Einfluss einzelner an der Bindung beteiligter Aminosäuren untersucht. Die potentiell bindungsrelevanten Positionen und deren Wechselwirkung waren aus der Kristallstruktur bekannt. Da alle Peptide hierfür sich nur in einer Aminosäure vom *18mer* Antigen PKNYHLENEVARLKLVG unterschieden, konnten die Auswirkungen und Bedeutung der entsprechenden Seitenketten direkt aufgezeigt werden. So wurden bei Substitutionen Aminosäuren mit vergleichbaren oder divergenten Seitenkettenfunktionen verwendet. Es konnte beobachtet werden, dass bei den Bindern die meisten Peptidmutationen zu schwächeren Wechselwirkungen führten und somit als essentiell für die Antigen-Antikörper-Bindung eingestuft werden konnten. Dies wurde zudem durch Verdünnungsreihen der Binder bestätigt. Bei einem Austausch von His gegen Tyr an Position P-5 wurden hingegen vergleichbare Interaktionen nachgewiesen wie im Urpeptid. Beide Aminosäuren besitzen eine aromatische Seitenkette, so dass der Substituent Tyr wahrscheinlich die Wechselwirkungseigenschaften übernehmen kann, die ursprünglich zwischen His und dem Antikörper entdeckt wurden.

Der dritte Teil der Bindercharakterisierung beschäftigte sich mit den Fängereigenschaften peptidspezifischer und weiterer Bindemoleküle. Es wurden dazu verschiedene Fängermoleküle an die feste Phase gekoppelt und zum Nachweis von Peptiden und biotinmodifizierten Molekülen herangezogen.

Diesbezüglich wurden die zwei anti-GCN4 scFv-Fragmente C11nBio ($K_D = 2,4$ nM) und L34nBio ($K_D = 0,08$ nM) mit dem fluoreszenzmarkierten Peptid 7P14P untersucht. Trotz der unterschiedlichen Affinitätskonstanten wurden für beide Fänger mit ca. 5 pM annähernd gleiche Nachweisgrenzen bestimmt. Es kann spekuliert werden, ob durch die Immobilisierung die Bindungseigenschaften dieser scFv-Antikörper beeinträchtigt wurden. Hierbei könnte für die Bindungstasche der Abstand von der Oberfläche und deren Zugänglichkeit, die sich aus der Orientierung des Binders auf der festen Phase ergibt, die Fängereigenschaften beeinflussen. In wie weit sich eine verminderte Stabilität dieser immobilisierten Fängermoleküle auf Oberfläche auswirkt, und ob Verlust an Freiheitsgraden einen Einfluss auf das Bindungsverhalten hatte, mag eingehender untersucht werden. Es scheint jedoch,

dass sich dieses Binderformat weniger als immobilisierte Fänger für diagnostische Assays eigne, sondern vielmehr auf Grund ihrer geringeren Größe in therapeutischen Ansätzen Verwendung finden könnten.

Der Einfluss des signalgenerierenden Systems auf die Nachweisgrenze (C_{Limit}) wurde für weitere untersuchte Fängermoleküle deutlich. So konnte die Verwendung von zusätzlichen Detektionsmolekülen zu einer Verbesserung der Nachweisgrenzen führen. Dies war zum einen in der Amplifikation des Signals einer Bindung begründet, da somit mehrere Reporterfluorophore ein Bindungsereignis nachweisen. Dies erscheint vorteilhaft gegenüber einem direkt markierten Antigen, dessen Bindung nur durch ein Reportermolekül detektiert wird. Zudem nehmen die verwendeten Fluorophore Einfluss auf die noch detektierbaren Mengen an gebundenem Antigen. Dies kann unter anderem auf die unterschiedlichen Quantenausbeuten der Farbstoffe zurückgeführt werden. Von Seiten des Herstellers Luminex wurde eine detektierbare Menge über Hintergrund von 100 Molekülen für das 240 kDa große Rotalgenprotein Phycoerythrin (R-PE, relative Quantenausbeute von 0,8) bestimmt. Die Fluorophore Alexa532 (28% der Fluoreszenzintensität von R-PE) und Cy3 (50% der Signalintensität von Alexa532 und R-PE) sind hingegen sind weitaus kleinere Moleküle mit geringeren Quantenausbeuten [Qiagen 2003].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch die entwickelten *bead*-basierenden Assays eine Charakterisierung von peptidspezifischen Bindemolekülen möglich ist.

Vor allem die multiparametrische Epitopkartierung von Bindern aus Rohextrakten kann für das im Folgenden beschriebenen pepART-Screening angewandt werden. Zudem war die Nachweisbarkeit von Antigenen in einem Sandwich-Immunoassay gegenüber einer Direktmarkierung der Peptide vorteilhaft. Somit sollten für eine mögliche Entwicklung eines Sandwich-Assay für jedes Peptid zwei unterschiedlich spezifische Antikörper generiert werden.

4.3 PepART-Projekt: Multiparametrisches Screening und Antikörper-Selektion am Beispiel ausgewählter Peptide von EGFR und Her2

Ziel des pepART-Ansatzes ist es, ein Markerprotein aus einer enzymatisch verdauten Probe über die entstandenen Peptidfragmente mittels peptidspezifischer Antikörper nachzuweisen. In diesem Abschnitt wurden für die brustkrebsrelevanten Antigene EGFR und Her2 Peptidfragmente eines tryptischen Verdaus identifiziert, ausgewählt, synthetisiert und zur Gewinnung peptidspezifischer Bindemoleküle herangezogen. Aus einer Vielzahl an gewonnenen Antikörpern wurden in einem multiparametrischen Screening Binder hinsichtlich ihrer

- Antigenpezifität
- Kreuzreaktivität
- relative Expression

analysiert. In weiterführenden Selektionsexperimenten wurden aus dem Satz an ausgewählten Bindern diejenigen identifiziert, deren

- Peptidspezifität
- Potential einer Konkurrenz mit Peptiden

eine Etablierung der Nachweisreaktion gemäß des pepART-Prinzips auf Basis eines peptidspezifischen Sandwich-Immunoassays ermöglichen sollten.

Durch die Verwendung *bead*-basierender Mikroarrays sollte ein einfaches, schnelles und paralleles Analysieren von Bindemolekülen gewährleistet werden. Hierbei galt es ein Versuchssystem zu entwickeln, das generierte Antikörper direkt aus Rohextrakten analysieren kann und dabei die potentiellen Kandidaten für den Nachweis von Peptiden ermitteln kann. Ein robuster Versuchsaufbau sollte etabliert werden, in dem die Kombination aus Beladung der *Beads*, Konzentration des Detektionssystems und Verdünnung an Rohextrakt ein multiparametrisches Screening ermöglicht.

4.3.1 Kriterien zur Auswahl der Peptidantigene

Zur Gewinnung peptidspezifischer Binder aus der HuCAL[®]-Gold Bibliothek [Knappik *et al.* 2000] wurden Sequenzstücke aus den Zielproteinen EGFR und Her2 gemäß der Kriterien ausgewählt:

- Fragment aus Trypsinverdau
- Mindestlänge von 20 AS
- Keine Glykosylierung
- Keine Cysteine.

Diese Auswahlkriterien werden im Folgenden einzeln beschrieben.

Die gesuchten Peptidfragmente sollten aus einem enzymatischen Verdau der Rezeptoren hervorgehen. Um alle theoretisch möglichen Spaltprodukte darzustellen, wurden die Proteinsequenzen gemäß der Proteasespezifität von bovinem Trypsin (EC.3.4.21.4) durch C-terminale Spaltung nach Lysin und Arginin *in silico* verdaut.

Es wurden nur diejenigen Verdauprodukte ausgewählt, deren Länge mindestens 20 Aminosäuren beträgt, da für jedes Fragment ein C- und ein N-terminaler Teil zur Generierung terminusspezifischer Antikörper verwendet werden sollte. Für den EGF-Rezeptor verblieben somit 18 Fragmente und für Her2 21 Fragmente.

Ein weiteres Selektionskriterium waren mögliche Glykosylierungsstellen [Zhen *et al.* 2003]. Derartige Modifikation betreffen den extrazellulären Bereich der Rezeptoren und wären sehr aufwändig in der Peptidsynthese. Darüber hinaus stellen diese Zuckermoleküle ein zusätzliches potentiell Antigen dar, gegen welches im Verlauf der Antikörpergenerierung spezifische Binder entstehen könnten. Würden Binder gegen reine Peptide von Fragmenten mit Glykosylierungsstellen gewonnen werden, so müssten im Protein diese Modifikationen vor der Nachweisreaktion entfernt werden, um eine Erkennung der Peptidsequenz durch den Antikörper zu gewährleisten. Auf die Verwendung von Peptiden mit potentiellen Zuckermodifikationen wurde verzichtet, da eine zusätzliche Behandlung der Proben mit Glykosylasen die Prozedur der Probenaufbereitung erschweren würde.

Eine weitere bekannte posttranslationale Modifikation der Modellproteine EGFR und Her2 ist die Phosphorylierung von intrazellulären Domänen. Hierbei handelt es sich um eine dynamische Veränderung, die unter anderem eine Aussage über die enzymatische Aktivität einer Rezeptordomäne ermöglicht. Da beide Zielproteine über

eine zytosolische Tyrosinkinasedomäne verfügen, könnten intrazelluläre Serine, Threonine und Tyrosine phosphoryliert vorliegen. Eine Selektion der Binder über phosphorylierte oder dephosphorylierte Peptide stand jedoch nicht im Vordergrund. Zur Antikörpergenerierung wurden nur unphosphorylierte Peptide verwendet.

Ein weiteres Kriterium für die Auswahl der Peptidfragmente war, dass sie keine Cysteine enthalten sollten. Diese Aminosäure war zur Kopplung der Peptide an Trägerproteine vorgesehen und sollte terminal angehängt werden. Pro Fragment wurde für den freien C-Terminus und für den freien N-Terminus je ein Peptid hergestellt. Bei allen Peptiden liegen die Cysteine hierbei jeweils am nicht-freien, internen Abschnitt des Verdaustückes. Hierdurch sollten vor allem die freien Enden der synthetischen Spaltprodukte als potentielle Epitope der Binder während der Antikörpergenerierung dienen. Hierdurch könnte gegen ein einzelnes Verdaufragment ein Paar terminusselektive Binder generiert werden und der Aufbau eines Sandwich-Immunoassays ermöglicht werden. Die Aminosäure Cystein besitzt zudem die Fähigkeit zur Ausbildung von Disulfidbrücken, welche beim pepART-Ansatz unerwünscht sind. Sind fragmentinterne Cysteine jedoch nicht zu vermeiden, so sollten diese modifiziert werden. Eine Cysteinmodifikation ist bei einem enzymatischen Verdau in der Regel ein geläufiger Arbeitsschritt. Nach Reduktion und damit einhergehender Spaltung der Disulfidbrücken werden die freien Sulfhydrylgruppen z.B. mit Iodacetamid blockiert [Zhen *et al.* 2003]. Dies dient zur Freilegung von Bereichen des Proteins, die im nativen Zustand durch disulfidbrücken-basierende Strukturelemente für die Protease unzugänglicher wären. Für die Festphasenpeptidsynthese scheinen derart modifizierte Cysteine weniger gut geeignet zu sein.

4.3.2 Auswahl der Peptidantigene zur Antikörpergenerierung

Die Sequenzen der Modelantigene EGFR (*primary accession number* P00533) und Her2 (P04626) wurden aus einer Sequenzdatenbank [Swiss-Prot und TrEMBL 2003] entnommen. Die Spaltstücke eines Trypsinverdau wurden für EGFR und Her2 bioinformatisch berechnet [SRS 2003]. Es wurden nach den unter 4.3.1 angeführten Kriterien für den EGF-Rezeptor sechs Spaltstücke ausgesucht, von denen vier zur intrazellulären Domäne gehören. Für den Rezeptor Her2 wurden insgesamt elf Verdauprodukte bestimmt.

Alle Peptide wurden wie unter 3.3 beschrieben synthetisiert, analysiert und nach 3.2.4 an die Trägerproteine gekoppelt. Weitere Ausschlusskriterien waren die Peptidsynthese- und Kopplungsprodukte der Peptide eines Spaltfragmentes. Nach der Kopplung der Peptide an die Trägerproteine und einer Proteinbestimmung wurden in SDS-Gelen Reinheit und Kopplungseffizienz der Peptid-Protein-Komplexe bestimmt. So indizierte eine Verschiebung der Banden zu größeren Molekulargewichten zwischen den aktivierten Trägerproteinen und den Protein-Peptid-Komplexen eine erfolgreiche Kopplung des Peptides an die Trägerproteine (Abbildung 4.14). Ferner waren Verunreinigungen durch freie, nicht gebundene Peptide erkennbar, so dass diese Proben nicht für die Antikörpergenerierung eingesetzt wurden.

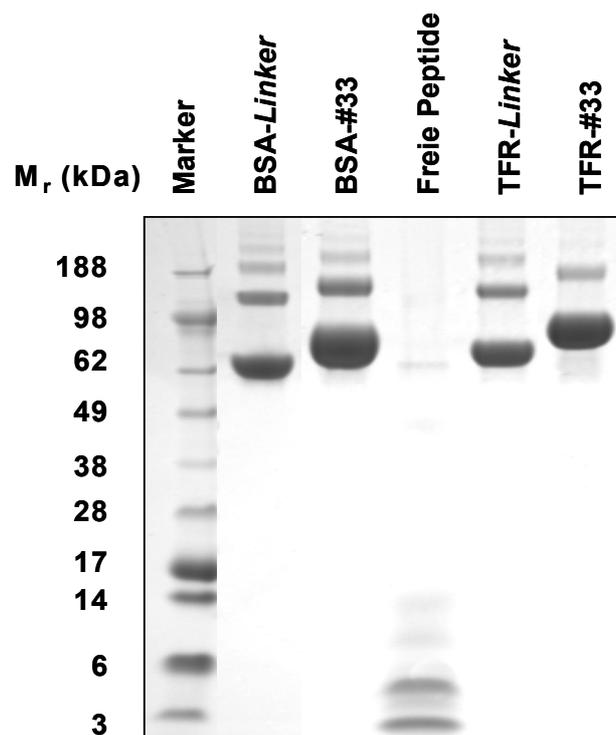


Abbildung 4.14: Beispiel eines SDS-Gels zur Kopplungskontrolle und Reinheitsbestimmung. Anhand des Gels lassen sich Verschiebungen der aktivierten Trägerproteine zu höheren Molekulargewichten und damit kovalente Anbindung des Peptides erkennen. Für BSA-Konjugate ist dies von ca. 65 kDa zu ca. 75 kDa; bei TFR verläuft dies von ca. 75 kDa bis hin zu nahezu 100 kDa. Potentielle Verunreinigungen durch freie Peptide sind zudem ersichtlich.

Aus den insgesamt 17 Fragmenten wurden abschließend 5 Fragmente ausgewählt, die bezüglich folgender Eigenschaften viel versprechend waren:

- Einzigartigkeit der Sequenz
- Reinheit der Syntheseprodukte
- Kopplungseffizienzen an BSA und TFR
- Proteinkonzentrationen der BSA- und TFR-Komplexe.

Hiernach wurden zwei Fragmente aus EGFR und drei Fragmente aus Her2 als potentielle Antigene zum *Panning* ausgewählt (Tabelle 4.4). Alle Peptide gehören zu intrazellulären Domänen der Rezeptoren. So stammten die Peptide #35/#39 und #33/#34 aus EGFR. Zu Her2 gehörten die Peptide #03/#04, #19/#20 und #21/#22. Die meisten Fragmente waren der regulatorischen C-terminalen Domäne der Rezeptoren zuzuordnen. Das Verdaustück #19/#20 aus Her2 gehörte zur Tyrosinkinasedomäne. Die ausgewählten Peptide wurden zudem auf Sequenzhomologien untersucht (Abbildung 4.15), um potentielle Kreuzreaktivität im Experiment auszuschließen, beziehungsweise *a priori* zu identifizieren. Die kürzeren Verdaufragmente (#33/#34, #21/#22 und #19/#20) überlappten im Vergleich zu den Fragmenten #35/#39 und #03/#04 stark. Als Hauptantigen (MPT, *major panning target*) wurde das EGFR-Fragment #35/#39 gewählt. Ein multipler Sequenzabgleich der Peptide wurden mit T-COFFEE [Notredame *et al.* 2000, T-Coffee V 1.41 2002] durchgeführt, um mögliche Sequenzmotive darzustellen. Abbildung 4.15 zeigt, dass die verschiedenen Fragmente untereinander keine größeren Ähnlichkeiten besitzen, wodurch mögliche Kreuzreaktivitäten auf Basis der Primärstruktur nur bedingt zu erwarten sind.

Tabelle 4.4: Panning Antigen. Die aufgelisteten Peptide wurden zur Herstellung von Antikörpern und zu deren Spezifitätsanalyse im multiparametrischen Screening verwendet. Hierbei wurden die Abschnitte im Protein und die Sequenz dargestellt. Der Fragment-Name beinhaltet zum einen das Antigen des Verdaufragmentes, sowie den nach Immobilisierung freien Terminus des Peptides.

Abschnitt	Sequenz	Fragment-Name	Peptid
1183 -1207	DVFAFGGAVENPEYLTPQGGAAPQPC	Her2-T1230N	#03
1206 -1230	CQPHPPPAFSPAFDNLYYWDQPPER	Her2-T1230C	#04
691 - 713	CLLQETELVEPLTPSGAMPNQAQMR	Her2-T713C	#19
691 - 713	LLQETELVEPLTPSGAMPNQAQMRC	Her2-T713N	#20
1072 -1096	CSPLAPSEGAGSDVFDGDLGMGAAK	Her2-T1096C	#21
1072 -1096	SPLAPSEGAGSDVFDGDLGMGAAKC	Her2-T1096N	#22
976 - 1000	ALMDEEDMDDVVDADADEYLIPQQGFFC	EGFR-T1007N	#33
983 - 1007	CMDDVVDADADEYLIPQQGFFSSPSTSR	EGFR-T1007C	#34
1045 - 1069	YSSDPTGALTEDSIDDTFLPVPEYIC	EGFR-T1097N	#35
1073 - 1097	CVPKRPA GSVQNPVYHNQPLNPAPSR	EGFR-T1097C	#39

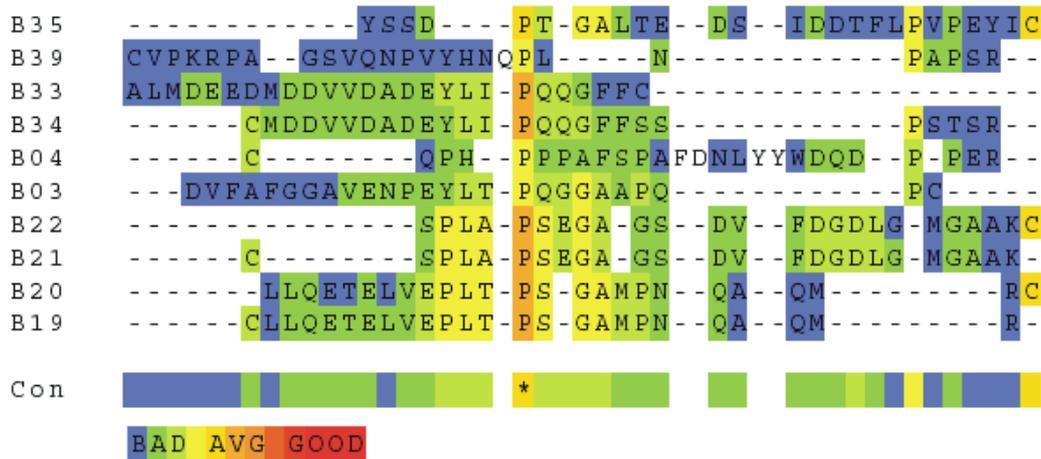


Abbildung 4.15: Multipler Sequenzabgleich der Panning-Peptide. Zur Bestimmung von Sequenzhomologien wurde eine multiple Sequenzanalyse über alle Peptide mit T-COFFEE durchgeführt. Für die MPT-Peptide #35 und #39 ergaben sich zu anderen Antigenen kaum Ähnlichkeiten. Die Farben der Darstellung deuten das Maß der Homologien hin. Dies verläuft von schlechter (BAD: blau, grün) über mittlerer (AVG: gelb, orange) bis hin zu guter (GOOD: rot) Übereinstimmung der Sequenzen. Die Peptide #19/#20 und #21/22 weisen hingegen mit dem Sequenzmotiv PxLxPSxG gewisse Ähnlichkeiten auf. Die zentralen Proline aller Peptide zeigen die größte Übereinstimmung.

4.3.3 Antikörpergenerierung durch MorphoSys: *Panning*-Strategie und Durchführung

Von der Firma MorphoSys AG, München wurde eine Strategie zur Antikörpergenerierung definiert. Im Allgemeinen verläuft die bei MorphSys wie folgt:

„...In vitro-Antikörperbibliotheken enthalten bereits vorgefertigt mehr als 10 Milliarden unterschiedliche Antikörperspezifitäten. Diese liegen entweder in E. coli oder in Phagen vor. Im wesentlichen wird bei MorphoSys die strukturelle Vielfalt des menschlichen Antikörperrepertoires durch 49 Gerüststrukturen abgebildet. Durch das Einfügen hochvariabler genetischer Kassetten in diese Gerüststrukturen lässt sich das riesige Antikörperrepertoire des Menschen reproduzieren. Die so entstandenen Antikörperspezifitäten treffen im sogenannten Panning (zu deutsch: Goldwäsche) auf das Ziel-Antigen. Hierbei wird das sogenannte Huckepack-Verfahren genutzt: Jeder Phage verhält sich wie derjenige Antikörper, dessen DNA-Sequenz er „huckepack“ in sich trägt. So ermöglicht das Panning, die wenigen Tausend Phagen relativ zügig zu identifizieren, die an das Antigen binden. Darüber hinaus ermöglicht das patentierte Verfahren auch die Identifizierung der dazugehörenden DNA-Sequenzen. MorphoSys hat die Methode des Phagen Display durch den Einbau spaltbarer Disulfidbrücken zwischen dem Phagen und dem Antikörpermolekül indes verfeinert. Die Disulfidverbindung kann durch Zugabe von Reduktionsmittel gespalten werden und hängt daher nicht von der Bindungsstärke des jeweiligen Antikörpers ab. Im nächsten Schritt, dem Screening, erfolgt die Auswahl einer Handvoll gutbindender Antikörper (Panel)...“ Auszug aus [Lingelbach 2003].

Die Strategie zum pepART-*Panning* sah unter anderem vor, dass mehr als ein Antigen pro *Panning* verwendet wurde. Die beiden Peptide des MPT-Fragments wurden somit je einzeln, als auch zusammen in einem Ansatz zum *Panning* verwendet. Für ein Einzel-*Panning* wurden je 384 Klone gepickt, wohingegen aus dem Doppel-*Panning* 2x 384 Klone zur Verfügung standen. Aus dem *Panning*-Ansatz, in dem alle 10 Peptide als Antigen verwendet wurden, wurden 4x 384 Klonen erhalten (siehe Tabelle 4.7)

Alle Antikörperklone sollten darüber hinaus als Extrakte aus Bakterienlysaten vorliegen, so dass ein Screening ohne vorherige Aufreinigungsschritte durchgeführt werden sollte. Insgesamt wurden 3072 Antikörperklone in 8 Mikrotiterplatten zur Verfügung gestellt.

Tabelle 4.5: pepART-Panning. Die für die vier *Panning*-Ansätze verwendeten Antigene wurden aufgelistet. Pro Platte waren 384 Antikörperklone vorhanden.

<i>Panning</i>	Antigene	Platten (St.)
P19.1	#35	1
P19.2	#39	1
P19.3	#35 + #39	2
P19.4	#35 + #39 + #03 + #04 + #19 + #20 + #21 + #22 + #33 + #34	4

Die Extrakte eines jeden *Panning* entstammen einer Hauptplatte, die auf mehrere Sub-Platten (EP1.1 – EP1.4) verteilt wurden. Pro Platte standen drei Aliquots mit je 60 µl Lysat pro Well zur Verfügung. Alle Platten wurden bei -20°C gelagert.

4.3.4 Assayentwicklungen für multiparametrisches Screening

Im Folgenden werden die grundlegenden Experimente dargestellt, die zur Entwicklung des Ansatzes zur Bestimmung der Binderspezifität verwendet wurde. Es sollte hiermit zunächst die Belegungsdichte der *Beads* bestimmt werden, wonach die Eigenschaften der Mischung aus pepART-*Beads* untersucht werden konnte. Abschließend wurden einige Lysate des *Panning* untersucht, um die optimale Verdünnung für den Screening-Ansatz festzulegen.

4.3.4.1 Bestimmung der Belegungsdichte der *Beads*

Zur Bestimmung der optimalen Belegungsdichte der *Beads* wurden Peptid-Trägerprotein-Komplexe bei Proteinkonzentrationen von 20 µg/ml, 50 µg/ml und 125 µg/ml an Carboxy-*Beads* nach Standardprotokoll gekoppelt. Zu den Peptiden der Kontrollantigene #60, #61 und #62, die bereits getestet wurden, waren spezifische

Binder Fab-A und Fab-B vorhanden, deren Proteingrundgerüst und Format ähneln denen der Antikörper aus den *Panning*-Ansätzen waren.

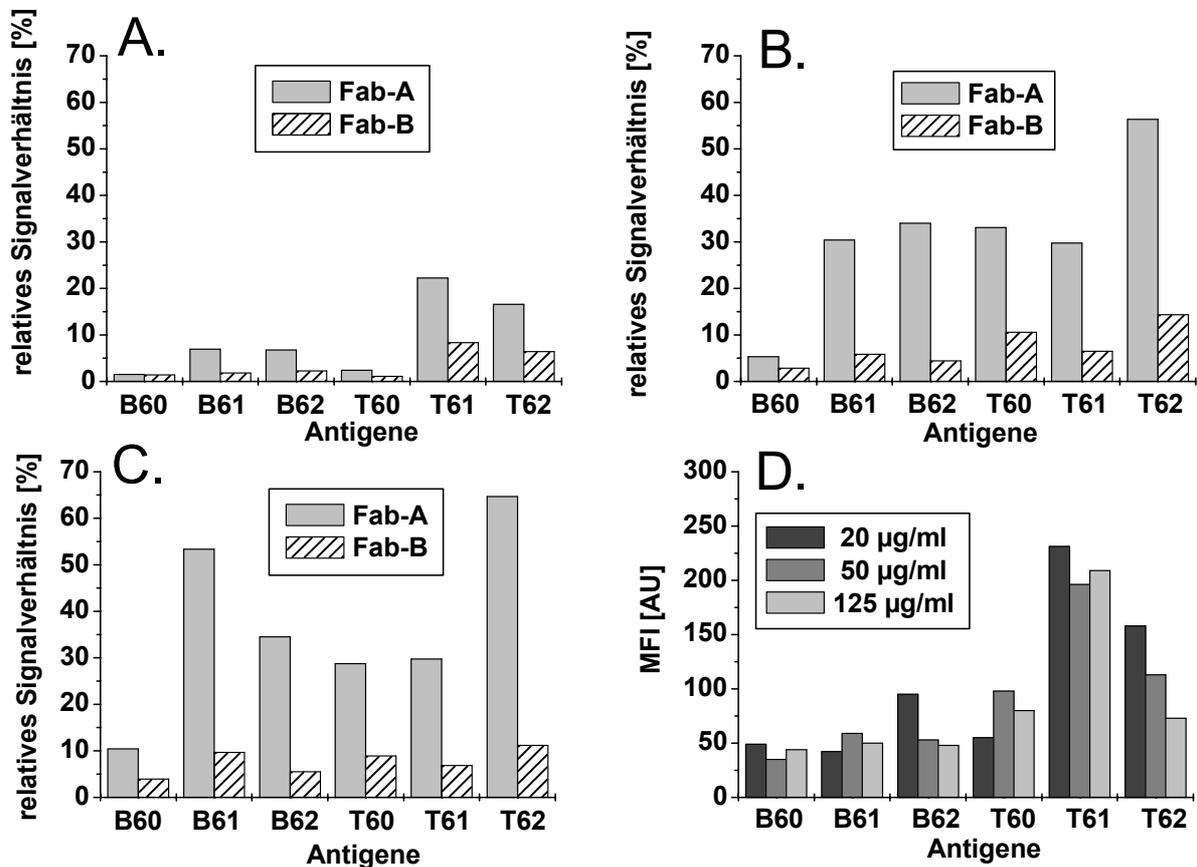


Abbildung 4.16: Einfluss der Belegungsdichte. In Graphen A. – C. sind die relativen Signalverhältnisse (Signal zu Leerwert) für zwei peptidspezifische Fabs bei unterschiedlichen Belegungsdichten der *Beads* (A. = 20 µg/ml; B. = 50 µg/ml und C. = 125 µg/ml) abgebildet. Graph D. zeigt den Hintergrund (Inkubation ohne Fabs) bei den unterschiedlichen Belegungsdichten.

Es konnte gezeigt werden, dass bei gleicher Fab-Konzentration für eine Beladungsdichte zwischen 50 – 125 µg/ml größere Unterschiede zwischen Signal und Hintergrund erreicht wurden. Dies konnte zudem bei der Untersuchung des Leerwertes bestätigt werden, da der Hintergrund bei größeren Kopplungskonzentrationen nicht anstieg. Für die Beladung der *Beads* zum pepART-Screening wurde hiernach eine Konzentration von 100 µg/ml gewählt.

4.3.4.2 Test der gekoppelten pepART-Beads

In Abbildung 4.17 sind einige Vorversuche zusammengefasst, durch die die Funktionalität der Mischung der pepART-Beads (Tabelle 3.18) belegt werden konnte.

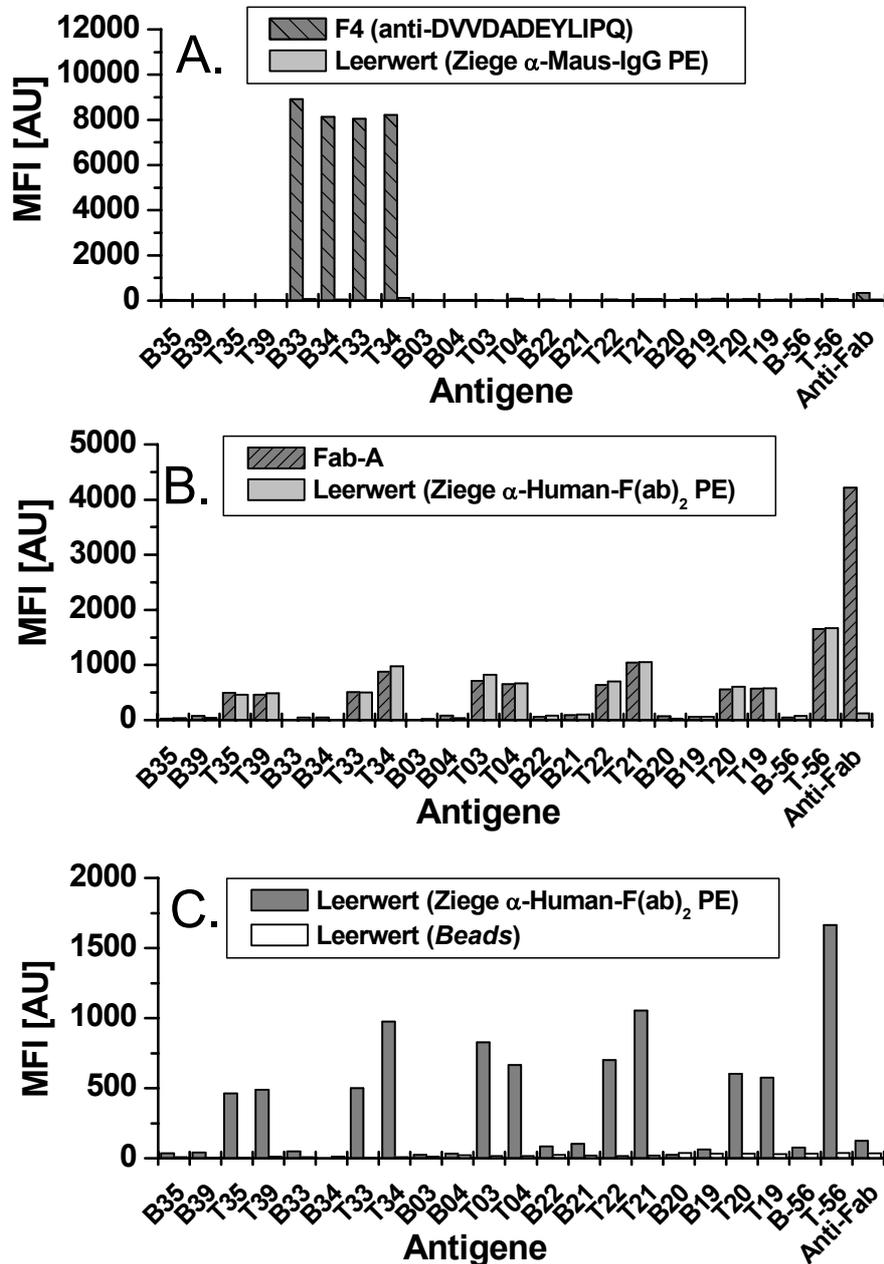


Abbildung 4.17: Test der pepART-Beads. In Graph A. sind die Ergebnisse mit einem kommerziell erhältlichen, peptidspezifischen anti-EGFR-Antikörper (1:1560, Klon F4) gezeigt. Gemäß seiner Spezifität reagiert dieser Binder mit Antigen #33 und #34. Der Detektionsantikörper wechselwirkte nur geringfügig unspezifisch. Graph B. zeigt die Ergebnisse mit dem Kontrollbinder Fab-A. Dieser Antikörper kann über das anti-Fab-Bead detektiert werden. Die deutlich erkennbaren Signale der TFR pepART-Beads werden ausschließlich durch das Detektionssystem (6,6 μ g/ml, 25 μ l, anti-Human F(ab)₂ aus Ziege) hervorgerufen. Dies wird ferner durch Graph C. erkennbar. Inkubiert man die pepART-Beads ohne Antikörper und Detektionssysteme, so weisen sowohl BSA- als auch TFR-Beads nur geringe Eigenfluoreszenzen (MFI \leq 40 AU) auf.

Es wurden die pepART-*Beads* als komplette Mischung mit verschiedenen Antikörpern getestet (Abbildung 4.17). Ein kommerziell erhältlicher, peptidspezifischer anti-EGFR-Antikörper (Klon F4, Maus IgG) erkannte spezifisch die Peptide #33 und #34, welche das F4-Epitop enthielten. Auf den beiden BSA- und den beiden TFR-*Beads* wurden von diesem Antikörper gleiche Mengen an Peptid nachgewiesen. Der Kontrollbinder Fab-A zeigte erwartungsgemäß keine spezifischen Wechselwirkungen mit den Peptid-Protein-*Beads*, wohingegen er über das Anti-Fab-*Bead* nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz zu dem anti-Maus IgG Detektionsantikörper (Ziege IgG) waren für den anti-human Fab-Nachweisantikörper (Ziege IgG) Signale mit TFR-*Beads* gemessen worden. Eine Leerwertmessung zur Bestimmung der Eigenfluoreszenz der pepART-*Beads* ergab für alle *Beads* akzeptable MFI-Werte < 40 AU.

Zum Screening der Antikörper der *Panning*-Ansätze wurde der anti-Fab-Antikörper aus Ziege trotz seiner Kreuzreaktivität zu TFR verwendet. Über weitere Versuchsansätze konnte bestätigt werden, dass diese unspezifische Wechselwirkung weder durch die Komposition der pepART-*Beads*, den Puffer, die Reaktionsgefäße oder das Auslesen verursacht wurde (Daten nicht gezeigt). Zudem war dieser Antikörper auf Grund seiner Bindungseigenschaften zum Nachweis von Antikörpern des Fab-Formates geeignet. Zur Quantifizierung der Antikörper erwies sich ein Fab-Konzentrationsbereich von 1 – 100 ng/ml als optimal.

4.3.4.3 Bestimmung der Lysatverdünnung für einen Standardassay

Für die Fab-Antikörper wurde eine mittlere Expressionsrate von 1 – 10 µg/ml angenommen (persönliche Mitteilung Dr. R. Ostendorp, MorphoSys). Zur Etablierung eines Standardassays mit *Panning*-Lysaten wurden 96 Klone aus P19.1 getestet. Hiervon wurden Klone mit Antigen-spezifität in mehreren Verdünnungen untersucht. Die gemessenen Signale von Antigen- und Quantifizierungs-*Beads* wurden verglichen.

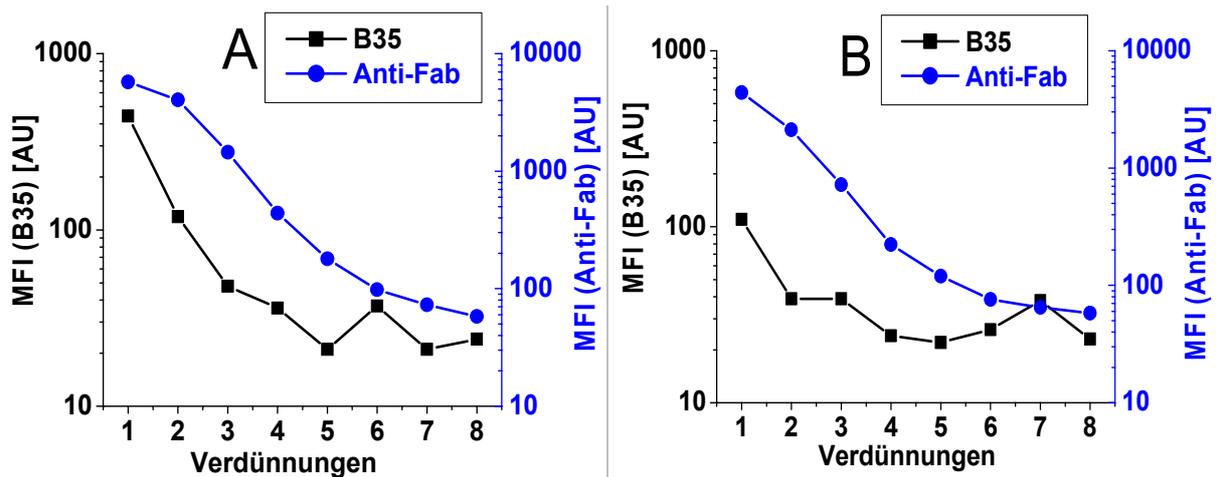


Abbildung 4.18: Antigen- und Quantifizierungssignale bei Lysat-Verdünnung. Die Graphen repräsentieren die Ergebnisse der Verdünnungsexperimente mit Klonen aus Kavität 05F (A) und 06A (B), die mit einem kompletten Satz an pepART-Beads getestet wurden. Es wurden die Messwerte der Quantifizierung (anti-Fab) und der Peptid-Beads (B35) dargestellt. Die verschiedenen Messpunkte wurden nach einer initialen 1/10 Verdünnung (1) um den Faktor 4 weiter verdünnt (2-8).

Anhand der Ergebnisse (Abbildung 4.18) wurde deutlich, dass eine eindeutige Antigenspezifität bei den dargestellten Klonen nur bei einer relativ hohen Konzentration an Extrakt erkennbar wurde. Im Gegensatz hierzu war eine vergleichende Quantifizierung der Antikörper über einen größeren Konzentrationsbereich durchführbar. Um hierbei jedoch bei einem Vergleich der Antikörpermengen in verschiedenen Proben Effekte durch mögliche Sättigung des Signals auszuschließen, wären Verdünnungen von $\geq 1/200$ nötig gewesen. Da die Identifizierung von Antigenspezifität Priorität hatte, wurden die Lysate zum Screening 1/10 mit Assaypuffer und Beads verdünnt. Somit konnte zudem die einfache und schnelle Verarbeitung der Rohextrakte gewährleistet werden, ohne von den Proben Vorverdünnungen entnehmen zu müssen. Es wurden für das Screening 7,5 μl an Probe verwendet (siehe Tabelle 3.20). Im pepART-Screening wurde demnach die Quantifizierung der Binder primär zum Nachweis und zur Einschätzung der Antikörperexpression eingesetzt.

4.3.5 Durchführung des multiparametrischen Screening

Im Folgenden werden die Ergebnisse aus den Screening-Experimenten dargestellt. Es wurden in *bead*-basierenden Assays insgesamt 3072 Fab-Antikörperklone aus Bakterienextrakten hinsichtlich ihrer Spezifität und Kreuzreaktivität analysiert.

Zur Identifizierung potentieller Bindemoleküle wurde aus den Messergebnissen ein Schwellenwert definiert. Dieser wurde zu jeder Messreihe (384 Klone) für beide Trägerproteine (BSA und TFR) über alle Peptidantigene und Proben bestimmt. Diejenigen Klone, deren peptidspezifisches Signal auf beiden Trägerproteinen über den entsprechenden Schwellenwerten lag, wurden als positive Signale („Hits“) erkannt. Aus den Vorversuchen war bekannt, dass TFR und das verwendete Detektionssystem unspezifische Interaktionen eingehen (4.3.4.2). Somit wurden die Ergebnisse der Wechselwirkungen mit TFR-*Beads* vorwiegend zur Validierung eines auf BSA-*Beads* auftretenden Signals verwendet. Hiermit sollten zudem Wechselwirkungen der Binder mit den Trägerproteinen und den *Linker*-Molekülen identifiziert werden.

Pro Tag wurden 384 Klone untersucht. Hierzu wurde eine Platte in zwei Ansätze zu je 192 Messungen aufgeteilt. Dies sollte zu möglichst ähnlichen Inkubationszeiten und Bedingungen für alle Klone führen. Pro Klon (Kavität) benötigt die HTS-Luminex zum Auslesen und Erfassen aller *Beads* ca. 17 s. Die Messung von 192 Kavitäten dauerte somit im Schnitt 55 min. Dies beschreibt den zeitlichen Abstand zwischen der Messung der ersten und denen der letzten Klone. Es war für diesen Zeitraum keine Zunahme der Signalintensität bestimmt worden (Daten nicht gezeigt).

4.3.5.1 Screening der Binder aus 1-fach *Panning* gegen #35 (P19.1)

Es wurden 384 Klone getestet. Bei 42 Proben wurden spezifische Signale für das Peptidantigen #35 gefunden, die über dem Schwellenwert ($S_{BSA} \geq 121$ AU) lagen.

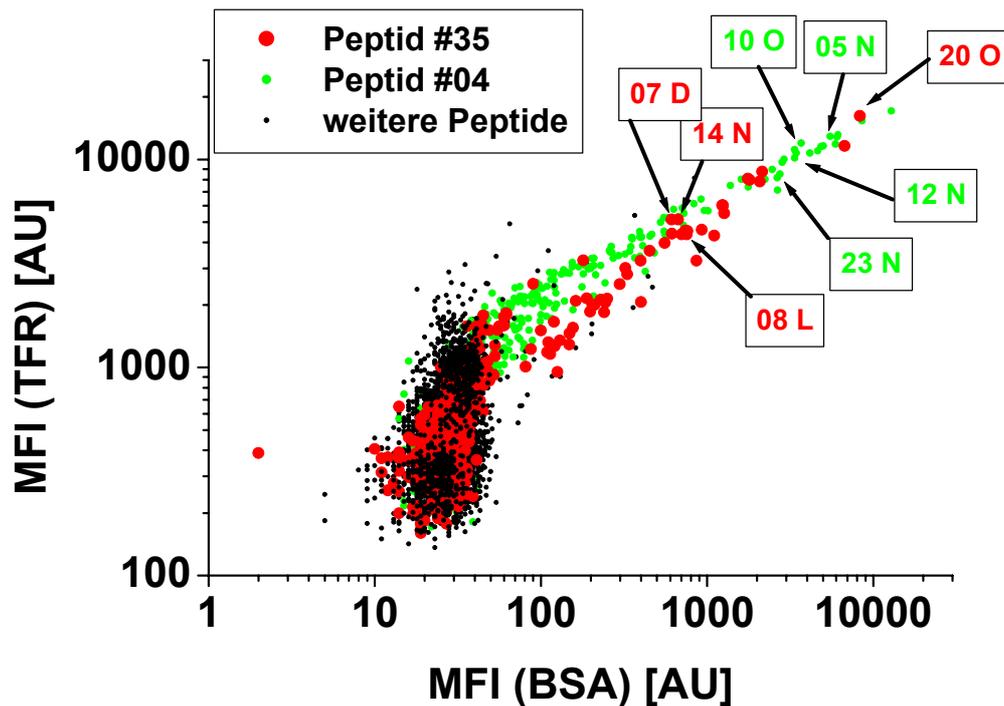


Abbildung 4.19: Direkte Darstellung der Signale für BSA- gegen TFR-Beads von P19.1. Pro Antikörperklon (Kavität) wurden die Signale für alle 11 Antigene aufgetragen. Diese Abbildung fasst somit insgesamt mehr als 4200 Datenpunkte zusammen. Anhand dieser direkten Darstellung konnte in erster Näherung eine Aussage über Spezifität jedoch nicht über Kreuzreaktivität getroffen werden. Liegen die Punkte der Wolke nach rechts verschoben, so beschreibt dies vermehrte Spezifität für BSA. Bei TFR würde die Wolke nach oben wandern. Die X-Y-Diagonale beschreibt alle Antigene, für die signifikante Spezifität gemessen werden konnte (#35 in rot; #04 in grün). Die hervorgehobenen Klone wurden im weiteren Verlauf näher untersucht (siehe Abbildung 4.26).

Darüber hinaus wurden 93 Binder identifiziert, die spezifische Interaktionen mit Antigen #04 aufwiesen. Bezüglich ihrer Sequenz ähneln sich die Antigene #35 und #04 jedoch nur geringfügig (Abbildung 4.20).

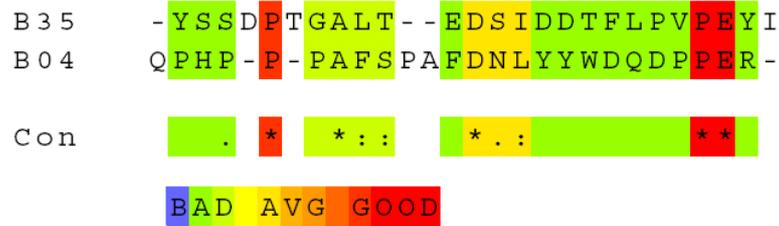


Abbildung 4.20: Sequenzabgleich von #35 und #04. Der Abgleich wurde wie bei Abbildung 4.15 mit T-COFFEE durchgeführt und zeigt nur für einzelne, kurze Abschnitte eine Übereinstimmung auf.

Es wurden nur drei Klone gefunden, denen keine eindeutige Spezifität zugeordnet werden konnte. In Abbildung 4.21 wurden die Messergebnisse von vier Bindern mit allen Peptid-Protein-Komplexen exemplarisch dargestellt.

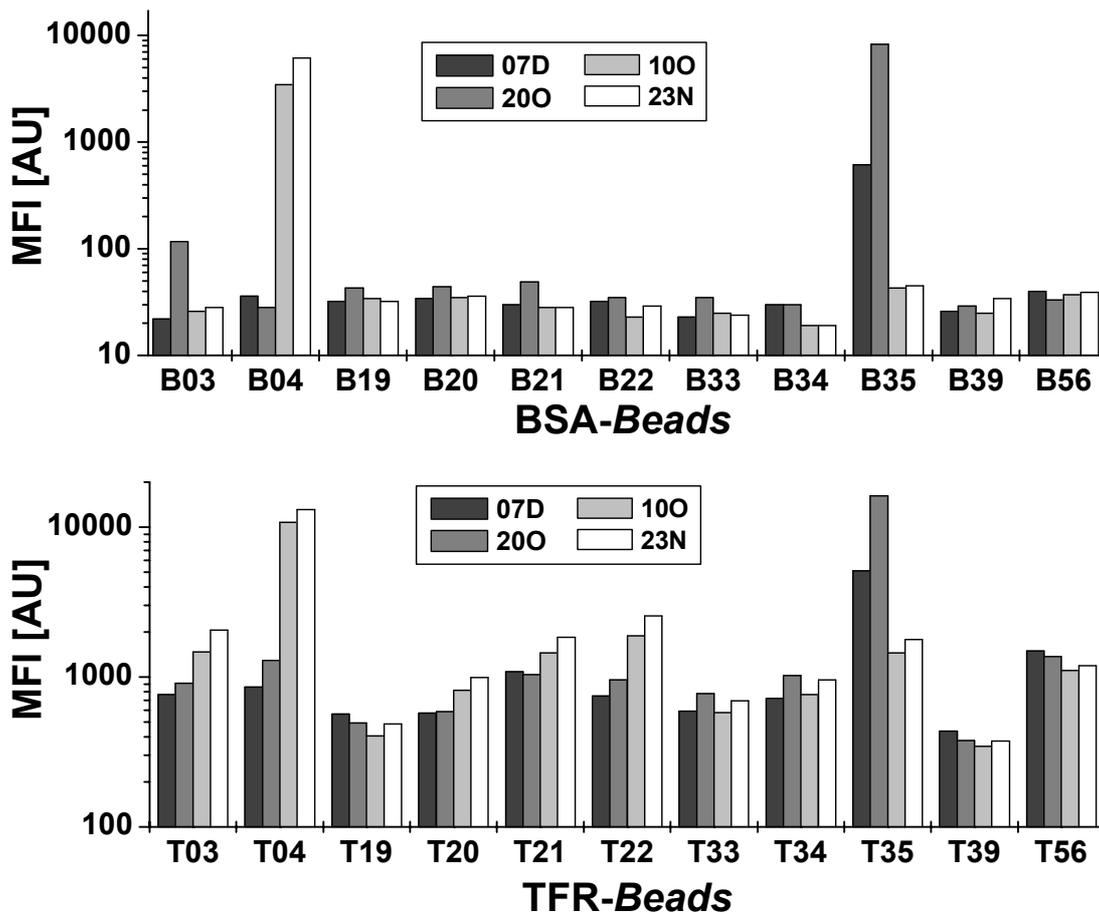


Abbildung 4.21: Spezifität auf beiden Trägerproteinen. Für vier spezifische Binder aus P19.1 wurden die Wechselwirkungen mit allen 10+1 Peptidantigenen auf BSA- und TFR-Beads dargestellt. Es sind die Ergebnisse von zwei #35-spezifischen und zwei #04-spezifischen Fab-Klone gezeigt. Die erhöhten Signale für TFR-Beads stammen von unspezifischen Interaktionen des Detektionsantikörpers (siehe auch 4.3.4.2).

Neben den zwei Klonen aus den Kavitäten 07D und 20O, die für das Peptid #35 spezifisch waren, wurden auch zwei #04 erkennende Klone gezeigt. Zudem war festzustellen, dass mit Ausnahme der spezifischen Signale für TFR-Peptid-Komplexe ca. 10x höhere Messwerte als für BSA-Peptid-Komplexe bestimmt wurden. Diese vermehrte Wechselwirkung war aus den Vorexperimenten (4.3.4.2) bekannt und beruht auf unspezifischer Erkennung durch den Detektionsantikörper.

4.3.5.2 Screening der Binder aus 1-fach *Panning* gegen #39 (P19.2)

Hier wurden 384 Klone getestet. Für einen Klon wurde ein Signal spezifisch für #39 über dem Schwellenwert ($S_{BSA} \geq 229$ AU) gefunden. Für weitere Lysate und Peptide wurden Messwerte über dem Schwellenwert bestimmt. Bei diesen Bindern wurde jedoch eine ausgeprägte Kreuzreaktivität zu weiteren Peptidantigenen und dem Trägerprotein BSA gefunden. Bei den Ergebnissen zu diesem *Panning*-Ansatz fiel auf, dass im Vergleich zu P19.1 (Abbildung 4.19) deutlich mehr Binder mit BSA-Spezifität vorzufinden waren. Dies war an einer Verschiebung der Wolke nach rechts zu erkennen (Abbildung 4.22) und spiegelte sich zudem in der Erhöhung des Schwellenwertes wider. Unerwartete Spezifitäten gegen ein weiteres Peptid wie beim *Panning* gegen #35 (P19.1) wurden nicht gefunden.

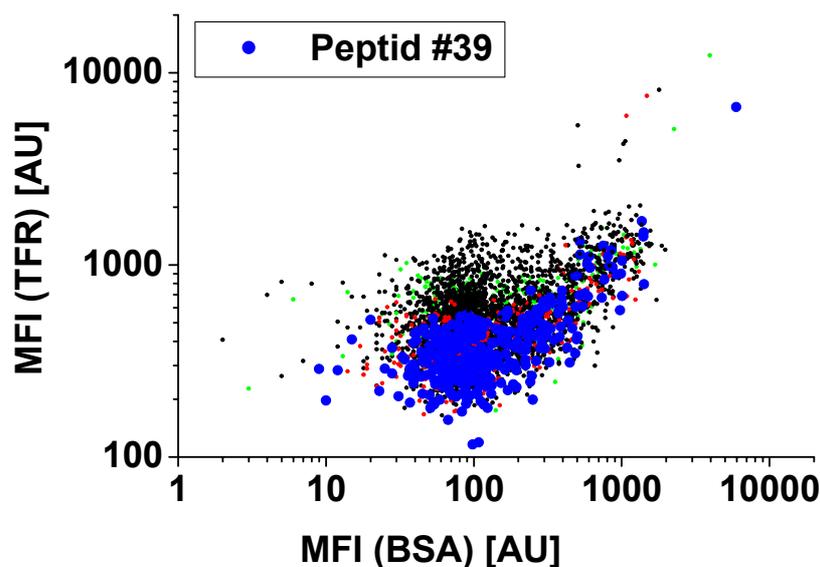


Abbildung 4.22: Direkte Darstellung der BSA- gegen TFR-Signale von P19.2. Die Wolke ist tendenziell nach rechts verschoben und deutet auf vermehrte Spezifität für BSA hin (#35 in rot; #04 in grün, #39 in blau).

4.3.5.3 Screening der Binder aus 2-fach *Panning* gegen #35 und #39 (P19.3)

Hier wurden 384 Klone aus zwei Platten getestet. Aus den Darstellungen für EP1.1 und EP1.2 in Abbildung 4.23 war eine jeweils größere Population an Klonen identifiziert worden, die das Peptid #39 erkannten (blaue Punkte). Daneben war eine niedrige Anzahl an #35-Bindern als im Einzel-*Panning* (P19.1) identifiziert worden. Es wurden Schwellenwerte (S_{BSA}) von 1909 AU (EP1.1) und 1296 AU (EP1.2) bestimmt.

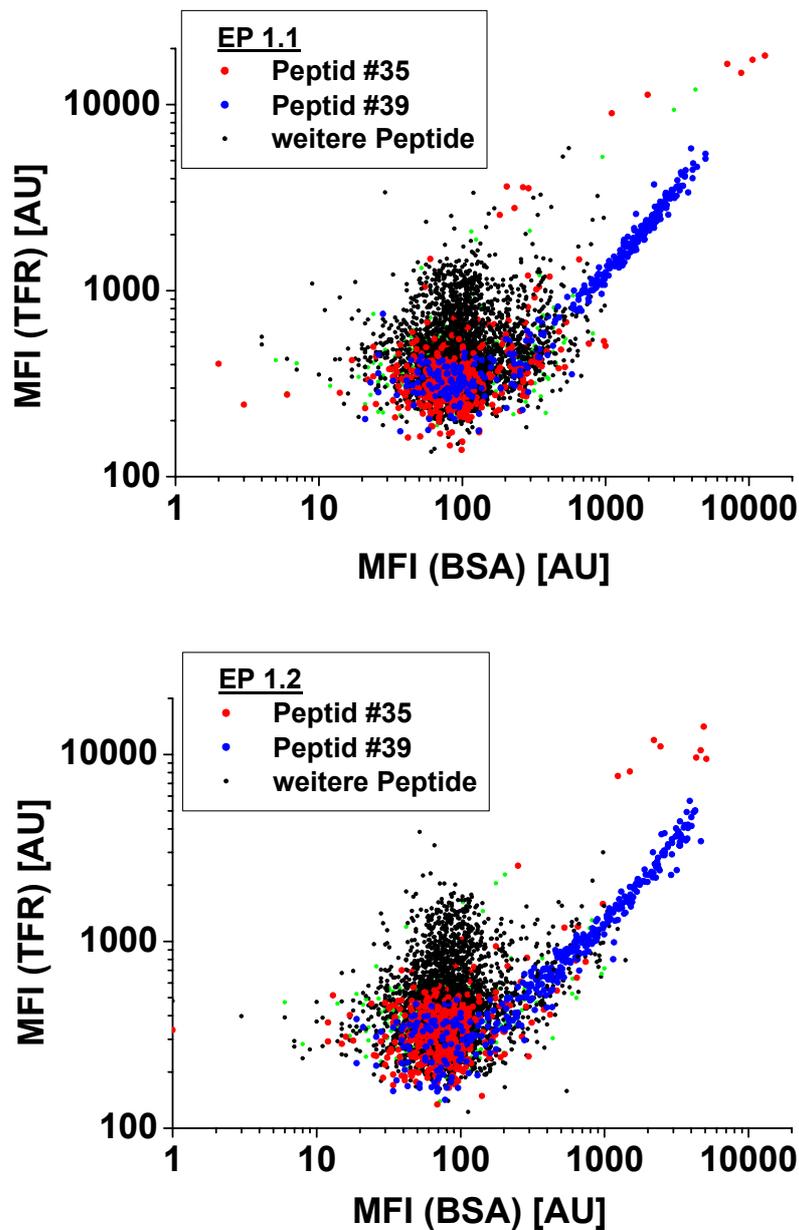


Abbildung 4.23: Direkte Darstellung der BSA- gegen TFR-Signale der Platten EP1.1 und EP1.2 aus dem *Panning*-Ansatz P19.2. Es fallen deutlich die vielen #39-Signale (blau) auf. Hingegen sind wenige #35-spezifische Signale (rot) und kaum #04-Signale (grün) zu erkennen.

Da dies für beide Mikrotiterplatten auf die große Anzahl an hohen Messwerten für das Peptid #39 zurückzuführen war, wurden neue Schwellenwerte ohne das Peptidantigen #39 bestimmt. Der Schwellenwert lag hierbei für EP1.1 bei 149 AU und für EP1.2 bei 131 AU.

Für das weitere Peptidantigen #35 wurden in diesem Ansatz in EP1.1 insgesamt 6 und in EP1.2 insgesamt 8 spezifische Klone identifiziert. Für das Antigen #39 wurden 184 peptidspezifische Klone in EP1.1 und 114 in EP1.2 mit Signalen über dem Schwellenwert gefunden. Somit wurde für das jeweilige Antigen auf den beiden untersuchten Platten eine ähnliche Menge an peptidspezifischen Bindern gefunden.

4.3.5.4 Screening der Binder aus 10-fach *Panning* (P19.4)

In diesem Ansatz wurden vier Platten getestet. Es wurden aus diesen primären Screening-Ansätzen in 1536 Klonen keine Binder mit eindeutiger Peptidspezifität identifiziert.

Es wurden Schwellenwerte (S_{BSA}) von 119 AU (EP1.1), 142 AU (EP1.2), 170 AU (EP1.3) und 428 AU (EP1.4) bestimmt. Dies korreliert mit der von EP1.1 nach EP1.4 zunehmenden Anzahl an BSA-spezifischen Bindern und kann anhand der dargestellten Wolken (Abbildung 4.24) in einer Verschiebung nach rechts erkannt werden. In diesem Ansatz war für eine Reihe an Klonen ein Erkennungsmuster festgestellt worden. Hierbei wechselwirkten die Binder dieser Klone mit drei Peptiden, die über C-terminales Cystein immobilisiert worden waren. Entsprechend der gemessenen Signalintensität aufgereiht waren dies die Peptide #03 > #22 > #20 (> #35). Es war zwischen diesen Antigenen keine Sequenzhomologie festgestellt worden (siehe Abbildung 4.15).

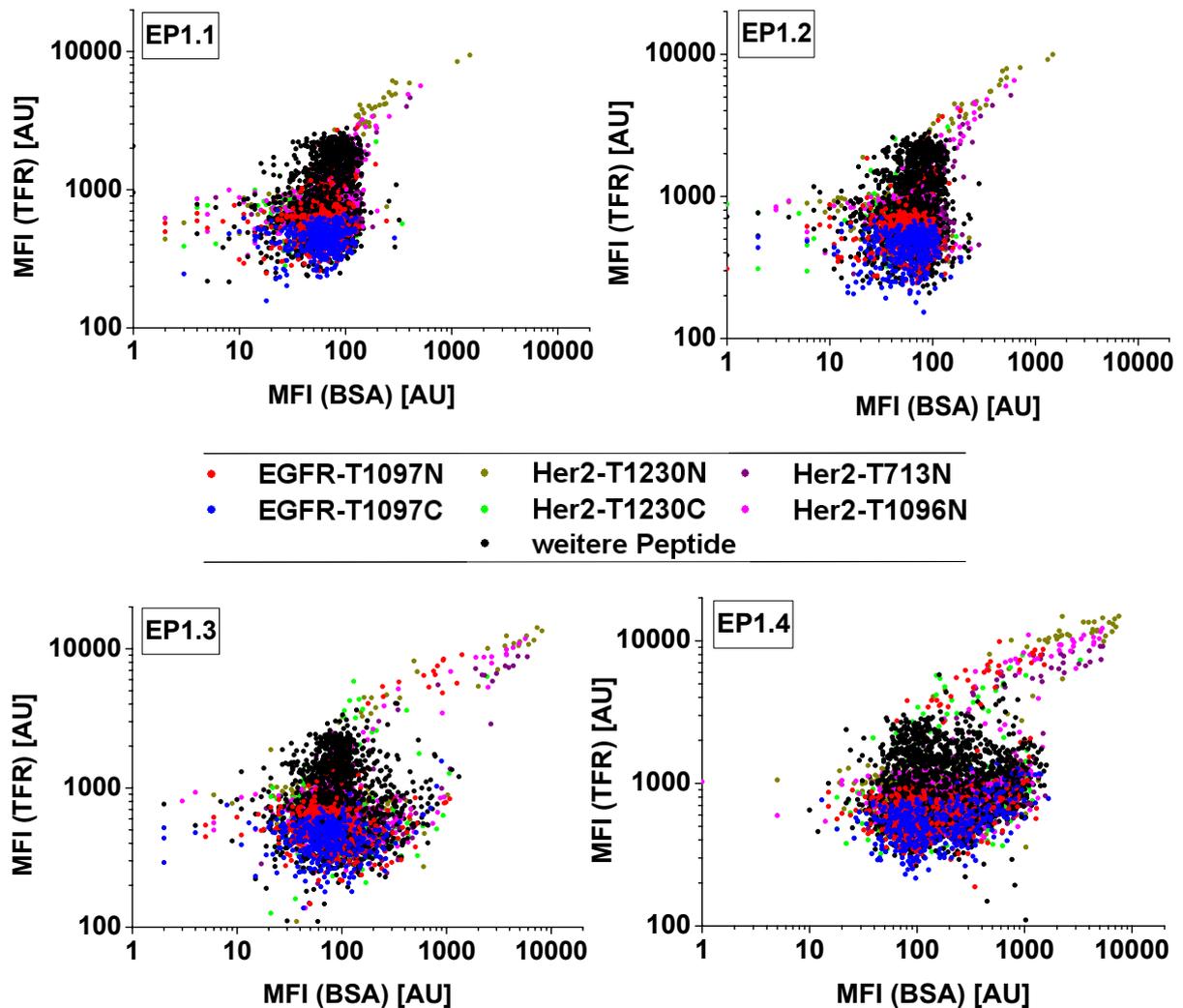


Abbildung 4.24: Direkte Darstellung der BSA- gegen TFR-Signale der vier Platten von P19.4. Die oberen beiden Diagramme (EP1.1 und EP1.2) lassen nur wenige Spezifitäten erkennen. Bei EP1.3 und EP1.4 hingegen tauchten deutlich vermehrt signifikante Signale auf. Bei EP1.4 war die Wolke zusätzlich nach rechts verschoben, so dass zunehmende Spezifität für BSA zu erkennen war. Es wurde demnach von P19.4 ausschließlich EP1.3 eingehender untersucht.

4.3.6 Antikörperexpression in Lysaten der *Panning*-Ansätze

Der Zusatz von *Beads*, die mit anti-Fab-Antikörper geladen waren, ermöglichte eine Übersicht über die Antikörperexpression aller Klone. Aus den Erkenntnissen der Vorexperimente war die Lysatkonzentration für Spezifitätsanalyse optimiert worden, so dass die dargestellten Ergebnisse eine Tendenz der Expression der 3072 Bakterienlysate aus den unterschiedlichen *Panning*-Ansätzen erkennen lassen.

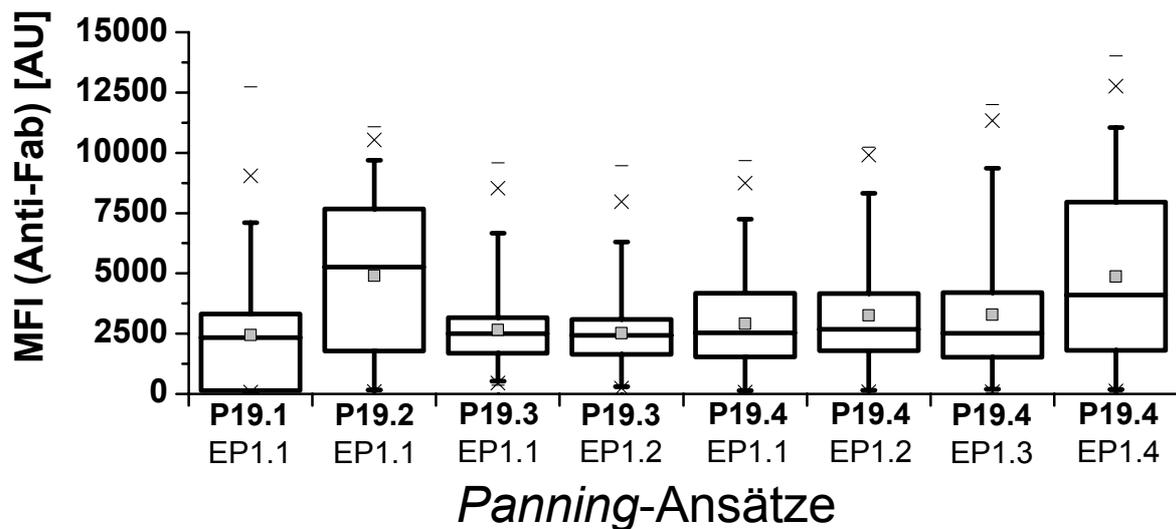


Abbildung 4.25: Relative Antikörperexpression. Aus den vier *Panning*-Ansätzen P19.1 – P19.4 wurden alle Mikrotiterplatten auf die Expression der Antikörper in den Bakterienlysaten (Verdünnung 1/10) untersucht. Es wurden jeweils die Messergebnisse der 384 Klone der anti-Fab-Beads zusammenfassend dargestellt

Die Bestimmung der relativen Antikörperexpression ergab Messwerte zwischen 60 – 14.000 AU und einen Mittelwert (MW) von 3360 AU. In P19.1 (MW = 2450 AU) wurden vergleichsweise mehr Klone mit MFI-Werten ≤ 2000 AU bestimmt. Hingegen zeigte sich bei P19.2 (MW = 4900 AU) und P19.4.4 (MW = 4860 AU) eine vermehrte Anzahl an Extrakten mit Quantifizierungssignalen ≥ 4000 AU. Die Bestimmung der relativen Antikörperkonzentrationen der übrigen Platten ergab ähnliche Verteilungen der Expressionswerte. Für alle Klone der untersuchten Ansätze konnten vergleichbare Mengen an exprimiertem Fab-Antikörper bestimmt werden. Dies war zum einen Hinweis auf die gleichbleibende Beschaffenheit des Ausgangsmaterials und zudem Beleg dafür, dass über eine Vielzahl an Proben vergleichbare Versuchs- und Messbedingungen geschaffen werden konnten.

4.3.7 Konkurrenzexperimente zur Selektion von Antikörpern

Zur Selektion von Bindern wurden Konkurrenzexperimente mit entsprechenden Peptiden durchgeführt, um die Peptidspezifität und die damit verbundene Verwendbarkeit für einen pepART Sandwich-Immunoassay zu identifizieren. Aus der primären Analyse wurden Klone nach folgenden Kriterien ausgewählt:

- Antigen-spezifität
- Kreuzreaktivität
- Messwerte der Peptid-BSA-Komplexe
- Relative Expression.

Für Konkurrenzexperimente wurden sowohl die Restbestände der für den primären Screening-Ansatz verwendeten Lysate gebraucht als auch eine zweite Platte frisch aufgetaut. Dies diente zum einen zur Überprüfung und Validierung der Ergebnisse der ersten Messung als auch zur Gewährleistung der bestmöglichen Materialqualität. Begründet ist diese Maßnahme in der Stabilität und Unversehrtheit der Binder im Rohextrakt, die durch die theoretisch noch vorhandenen Proteasen beeinträchtigt sein konnte. Nach einer Vorinkubation mit löslichem Peptid wurden NMI-*Beads* beigefügt, um die noch freien Binder herauszufangen. Anhand des Potentials einer Konkurrenz ließ sich eine Aussage über eine relative Affinität treffen. Die relative Konkurrenz beschreibt im Folgenden auf welchen Anteil des unkonkurrenzierten Signals der Messwert durch eine Konkurrenz zurückgeht. Das lösliche Peptidantigen diente zudem als Beweis für eine peptidspezifische Interaktion der Binder. Als Konkurrenten wurden zudem Komplexe aus Trägerprotein und Peptid verwendet. Hiermit konnten die Binder, die nicht mit reinen Peptiden an der Bindung an die *Beads* gehindert werden konnten, als zwar spezifisch, jedoch nicht als rein peptidspezifisch identifiziert werden.

4.3.7.1 Antikörper aus 1-fach *Panning* gegen #35

Bei weiterführenden Experimenten wurden für #35-spezifische Binder 27 spezifische Klone untersucht (Abbildung 4.26). Die meisten Binder wurden noch bei

der Anwesenheit von $3,19 \mu\text{M}$ an Kompetitor inhibiert. Es wurden für drei Klone gute Konkurrenzseigenschaften bestimmt. Hier reduzierte sich die gemessene Signalintensität bei Anwesenheit des Kompetitors auf $< 20\%$ des Messwertes ohne Kompetitor. Bei den weiteren Bindern lag die relative Konkurrenz bei $> 20\%$. Zudem wurde ein Klon (200) untersucht, für den bei geringer, relativer Expression ein großer Wert für die Signalintensität mit dem Peptidantigen #35 gemessen wurde. Dieser Binder erwies sich demgegenüber nur im geringen Maße als kompetierbar.

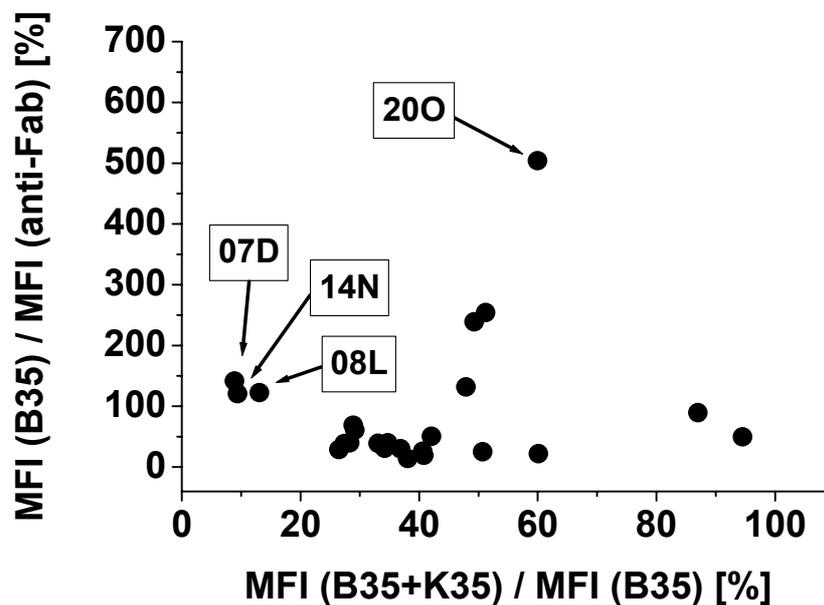


Abbildung 4.26: Selektion nach Konkurrenz und Expression von 19.1 für #35. Zur qualitativen Analyse antigenspezifischer Klone wurde das Verhältnis zwischen den Messwerten bei Anwesenheit von $3,16 \mu\text{M}$ Kompetitor K35 (B35+K35) und ohne Kompetitor (B35) bei einer Lysatverdünnung (1/10) gebildet. Je kleiner der x-Wert, desto effizienter war die Konkurrenz. Zudem wurde für jeden Klon ein Quotient zwischen den Messwerten des Peptidantigens B35 (Lysat-Verdünnung 1/10) und der Quantifizierung mit den anti-Fab-Beads (Lysat-Verdünnung 1/200) gebildet (y-Achse). Der y-Wert gab Hinweise darauf, durch welche relative Menge an Binder ein Antigen signal generiert wurde. Die in Abbildung 4.19 dargestellten Klone sind hier erneut gezeigt.

Aus dem *Panning* gegen #35 wurden ferner 28 Klone analysiert, die eine Spezifität für das Peptid #04 aufwiesen. Unspezifische Wechselwirkungen dieser Klone mit dem Peptidantigen #04 wurden durch die Ergebnisse der Konkurrenz mit dem entsprechenden Peptid #04 ausgeschlossen. Diese Binder erwiesen sich als eher mäßig zu kompetieren ($> 40\%$, Abbildung 4.27).

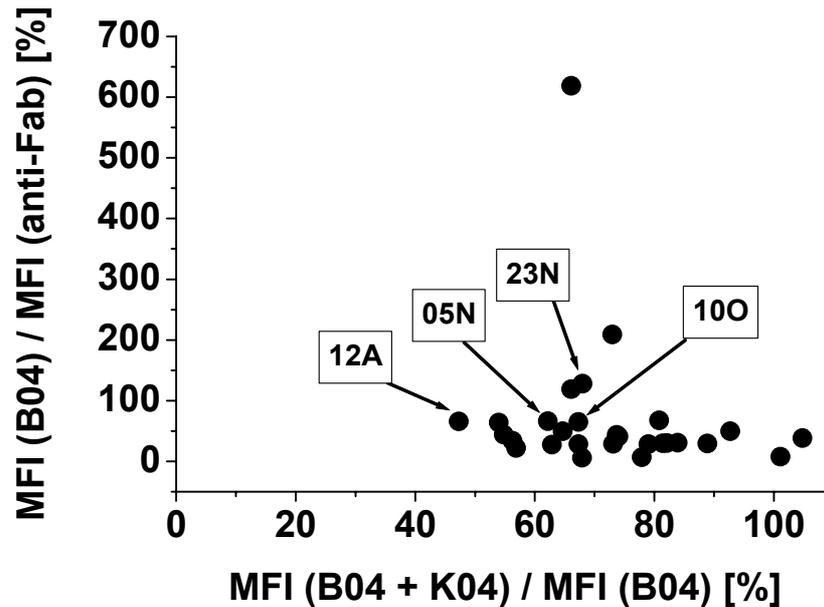


Abbildung 4.27: Selektion nach Konkurrenz und Expression von 19.1 für #04. Zur qualitativen Analyse der positiven Klone wurden hier 3,16 μM an Kompetitor K04 verwendet. Die in Abbildung 4.19 dargestellten Klone sind hier erneut aufgezeigt.

4.3.7.2 Antikörper aus 1-fach *Panning* gegen #39

Der einzige peptidspezifische Klon gegen Antigen #39 dieser Platte erwies sich auf Grund der Konkurrenzexperimente als schlecht kompetierbar. Bei einer Konkretorkonzentration von 3,16 μM wurde das Signal nur um 30% reduziert (siehe Abbildung 4.28).

4.3.7.3 Antikörper aus 2-fach *Panning* gegen #35 und #39

Aus der Vielzahl an #39-spezifischen Lysaten aus P19.3 EP1.1 wurden exemplarisch 42 Fab-Klone in Konkurrenzexperimenten untersucht (Abbildung 4.28). Es wurden 20 Klone identifiziert, deren Bindung an das Peptid-*Bead* durch die Anwesenheit des Konkretors um 95% reduziert werden konnte. Bei 3 Klone wurde durch das Konkretorpeptid das Signal auf 1% des Ausgangswertes reduziert. Alle untersuchten Klone aus diesem Ansatz wurden durch die Inhibition mit freiem Peptid auf $\leq 25\%$ des nichtkompetierten MFI-Wertes reduziert.

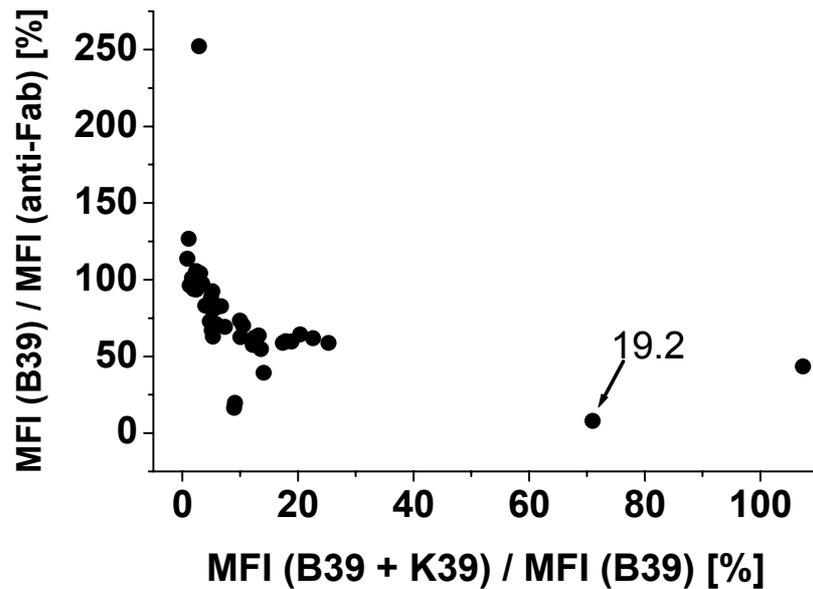


Abbildung 4.28: Selektion nach Konkurrenz und Expression von 19.2 und 19.3 für #39. Gemäß Abbildung 4.26 wurden hier die Hits aus zwei *Panning*-Ansätzen zusammengeführt.

4.3.7.4 Antikörper aus 10-fach *Panning*

Im 10-fachen *Panning* wurden keine eindeutig spezifischen Fab-Klone identifiziert. Hingegen waren Binder mit einem Erkennungsmuster gefunden worden, die mit mehreren *Bead*-Typen wechselwirkten. Es wurden Lysate der Platte P19.4 EP1.3 exemplarisch ausgewählt und untersucht. Im Vergleich zu den anderen Mikrotiterplatten wurden hier die höchsten Signalintensitäten bei geringerer BSA-Spezifität gemessen.

Zur Analyse wurden 24 Klone ausgewählt und mit *NMI-Beads* getestet. Es wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt, bei denen eine Mischung aus mehreren Konkurrenten zum Einsatz kam, wobei jedes Peptid bei 1 μM und die Konkurrentenpeptide bei 10 μM eingesetzt wurde. Es konnte jedoch bei keinem Assay die Anbindung durch freies Peptid an die *Beads* verhindert werden (Daten nicht gezeigt). Wurden hingegen die entsprechenden Peptide als Proteinkonjugat zur Konkurrenz verwendet, so konnte die Bindung inhibiert werden. Es wurde hierfür 1 μM an Protein verwendet. Dies entsprach ca. 10 μM Peptid.

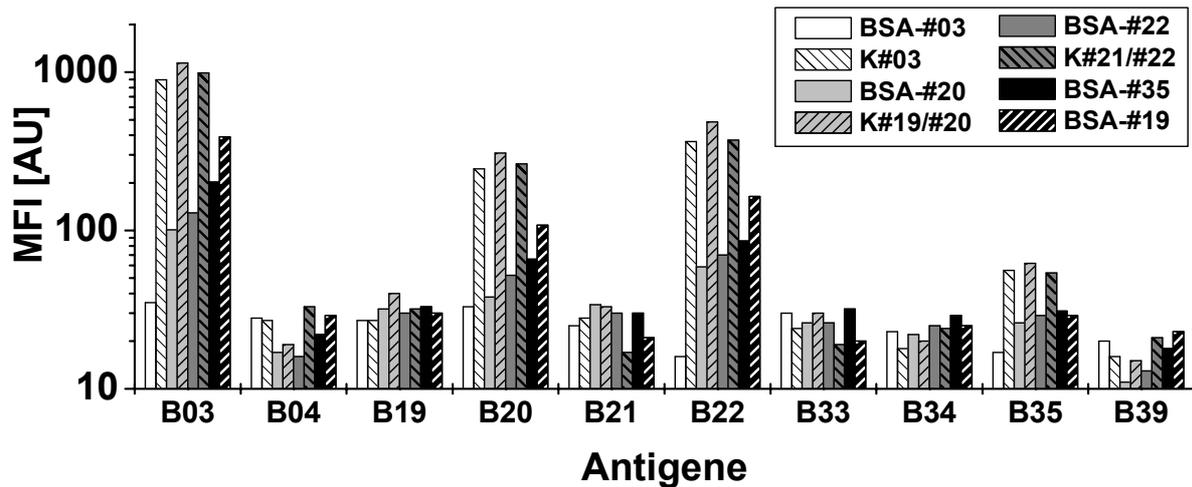


Abbildung 4.29: Konkurrenz mit Peptiden und Peptid-Protein-Komplexen. Mit einem Klon aus 19.4 EP1.3 wurde gezeigt, dass sich dessen Bindung nur durch Peptid-Protein-Komplexe (BSA-#03; BSA-#20; BSA-#22 und BSA-#35) kompetieren lässt. Hingegen konnten keine inhibitorischen Effekte durch reines Peptid als Konkurrent (K#03; K#19/#20 und K#21/K#22) gezeigt werden. Die Vorinkubationen zur Konkurrenz wurden mit 10 μM Peptide oder 1 μM Peptid-Protein-Komplexen durchgeführt.

Bei der Verwendung verschiedener Konjugate konnte eine Konkurrenz hervorgerufen werden, die sich unabhängig von Peptid, *Linker* und Trägerprotein darstellte. Die erkannten Peptide waren alle über C-terminales Cystein immobilisiert worden. Alle Peptide bis auf die Paare #19 + #20 und #21 + #22, sind in ihren Sequenzen nicht homolog (Abbildung 4.15).

4.3.8 Zusammenfassende Diskussion

In multiparametrischen Ansätzen wurden insgesamt mehr als 3000 Klone auf Wechselwirkungen mit 10 potentiellen Antigenen untersucht. Durch Konkurrenzexperimente konnten für die zwei Peptide des Hauptantigenfragmentes peptidspezifische Antikörperklone identifiziert werden. Ziel war es gewesen, nach dem pepART-Ansatz peptidspezifische Bindemoleküle für die Etablierung eines Sandwich-Immunoassays zu identifizieren. Hierfür waren spezifisch Verdaufragmente der Proteine EGFR und Her2 synthetisiert und zur Antikörpergenerierung verwendet worden.

Für die Modellantigene EGFR und Her2 wurden Spaltfragmente ausgewählt und synthetisiert, die aus einem Verdau mit der Protease Trypsin hervorgehen sollten.

Aus allen Spaltstücken wurden diejenigen Peptide ausgewählt, die bei einer Mindestlänge von 20 AS keine Glykosylierungsstellen und keine Cysteine aufweisen sollten. Hiernach wurden für eine Reihe an Fragmenten N- und C-terminal cysteinmodifizierte Peptide synthetisiert und an Trägerproteine gekoppelt. Hieraus wurden diejenigen Peptide ausgewählt, die nach effizienter Kopplung und guter Reinheit des Kopplungsproduktes in ausreichender Menge vorlagen. Es standen primär Auswahlkriterien im Vordergrund, deren Ziel es war, einzigartige Spaltfragmente zweier homologer Proteine bereitzustellen. Die geringe Anzahl an Verdaufragmenten, die diesen Kriterien gerecht wurden, ließ jedoch keine Vorauswahl der Peptide hinsichtlich Antigenität, Oberflächenwahrscheinlichkeit oder Hydrophobizität zu.

Die Strategie zur Gewinnung von peptidspezifischen Bindern aus einer Binderbibliothek wurde von MorphoSys definiert und in vier verschiedenen Ansätzen durchgeführt. So wurden zum einen Binder gegen die zwei terminalen Peptide des Hauptantigenfragmentes jeweils unabhängig voneinander gewonnen (P19.1 und P19.2). Daneben waren in einem weiteren Ansatz beide Peptide zusammen verwendet worden (P19.3). Zudem wurde eine Mischung aller 10 Antigene zum *Panning* verwendet (P19.4).

Nach der Entwicklung eines Standard-Assays konnten die Klone, welche in Rohextrakten vorlagen, analysiert werden. Pro Tag wurden hierbei je 384 Klone in einem Assay mit 23 verschiedenen *Beads* untersucht. Hierbei wurde neben der Bestimmung der Binderspezifität gegen Peptidantigene auch eine Analyse der relativen Expression durchgeführt. Das Assaysystem war hinsichtlich der Spezifitätsbestimmung so ausgerichtet worden, dass die Bestimmung der Fab-Menge in den untersuchten Lysaten hauptsächlich eine Übersicht über die Antikörperexpression der Klone geben konnte. In einem primären Screening konnten Informationen über das generelle Vorhandensein von Spezifitäten gewonnen werden. Dadurch, dass Peptid- und Kontrollantigene auf zwei Proteine gekoppelt worden waren, waren zudem potentielle Wechselwirkungen zu den Trägerproteinen schnell identifizierbar. Die Auswertung der ersten Analyse war dahingehend ausgerichtet, in der Vielzahl an untersuchten Klonen diejenigen zu identifizieren, die antigenspezifisch waren. Zu jeder Messung und beiden Trägerproteinen wurden

Schwellenwerte bestimmt. Somit konnte über das eine Protein (BSA) eine Spezifität aufgezeigt werden, welche durch das zweite Trägerprotein (TFR) bestätigt werden sollte. Die Ergebnisse korrelierten zudem gut mit einem von MorphoSys durchgeführten ELISA, der die Binderspezifität jeweils für ein Antigen untersuchte (Daten nicht gezeigt).

Neben den gezielten Spezifitäten wurden beim Ansatz P19.1 einige Klone gefunden, deren Antigen nicht zur Gewinnung verwendet worden war. Es bestand keine Sequenzhomologie zwischen dem Zielantigen #35 und dem „Nebenantigen“ #04. Der Grund für das Auftreten dieser Spezifität kann nicht über eine Verunreinigung während der Herstellung der Peptidantigene erklärt werden, da die Kopplungsansätze der Peptide #35 und #04 über unterschiedliche Chromatographie-Säulen gereinigt wurden. Die Spezifität der anti-#04-Klone wurde zwar über eine Peptidkompetition bestätigt, jedoch scheinen diese Binder schwächere Wechselwirkungen einzugehen. Interessant waren darüber hinaus die Ergebnisse für das zweite Peptid des Hauptantigens (#39). So wurden in einem *Panning* gegen die zwei MPT-Peptide (P19.3) pro Platte mehr als 100 anti-#39-Binder gefunden. Hingegen wurde im Ansatz P19.2 nur ein positiver Klon bestimmt. Aus der Vielzahl an spezifischen Klonen aus P19.3 wurden in exemplarischen Kompetitionsexperimenten sehr starke Effekte des Peptides auf die Bindung der Antikörper an die *Beads* festgestellt. Diese Klone sind damit für eine Verwendung in einem Sandwich-Immunoassay interessant. Die große Anzahl an anti-#39 Bindern könnte auf Antikörper mit homologen Primärsequenzen und damit ähnlichen Bindungseigenschaften zurückzuführen sein. Durch eine Sequenzanalyse könnte dies genauer beschrieben werden (in Arbeit bei MorphoSys). Bis zum heutigen Datum standen jedoch noch keine Daten zur Bestätigung dieser Hypothese zur Verfügung. Bei der Verwendung von 10 Peptiden zur Gewinnung von Antikörpern (P19.4) waren keine eindeutigen Spezifitäten zu ermitteln. Ein auffälliges Merkmal war neben einer ausgeprägten Spezifität für die Trägerproteine zudem eine Art Erkennungsmuster, welches drei Peptid-Protein-Komplexe (#03; #21; #22) einbezog.

Die durchgeführten Kompetitionsexperimente konnten am eindeutigsten interessante Klone für mögliche Sandwich-Immunoassays definieren. Zum einen konnte über das Potential einer Kompetition ein direkter Bezug zur Affinität hergestellt werden. Ferner

wies die Wahl des Kompetitors darauf hin, mit welchem Anteil des immobilisierten Antigens die Binder interagieren. So konnte gezeigt werden, dass in den einfachen und doppelten *Panning*-Ansätzen (P19.1 – P19.3) rein peptidspezifische Klone zu identifizieren waren. Daneben wurden für Klone des 10-fachen *Pannings* (P19.4) jedoch auch Wechselwirkungen identifiziert, die sich nur durch Peptid-Protein-Komplexe inhibieren ließen.

Zur vollständigen Durchführung eines Nachweisverfahrens gemäß des pepART-Ansatzes scheinen sich verschiedene Klone gegen die MTP-Peptide #35 und #39 anzubieten. Es bedarf jedoch vorher einer Sequenzanalyse, detaillierter Bindercharakterisierung und der Etablierung eines Sandwich-Immunoassays, um das Potential dieser Methode zufriedenstellend beurteilen zu können. Dies war bis zum heutigen Zeitpunkt nicht vollständig durchführbar. Trotzdem scheinen die in dieser Arbeit verwendeten Peptidantigene hinsichtlich ihrer Einzigartigkeit eine gezielte Wiederfindung der Proteine ermöglichen zu können. Es wäre darüber hinaus interessant, welche Resultate ein vergleichbarer Ansatz bei der Verwendung von Proteinen oder Proteindomänen anstelle von Peptiden erbracht hätte.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das hier entwickelte System ein äußerst effektives Verfahren zur schnellen Analyse einer Vielzahl von Bindern darstellt.

Die hier vorgestellten Ergebnisse liefern eine Grundlage für die Weiterentwicklung von multiparametrischen und *bead*-basierenden Screening-Systemen zur durchsatzfähigen Charakterisierung von Bindemolekülen. Solche Systeme können in naher Zukunft die Auswahl von Antikörperkandidaten zur diagnostischen und therapeutischen Zwecken wesentlich erleichtern und beschleunigen.

4.4 Miniaturisierter Ligandenbindungsassay zum Nachweis von funktionellem EGFR

Im Folgenden wurde in miniaturisierten Bindungsassays überprüft, ob ein Nachweis von EGFR aus Zelllysaten über den an *Beads* immobilisierten Liganden EGF erfolgen kann. Hierzu wurde ein Assay zur Detektion des Rezeptors in EGFR-positiven Zellen entwickelt und anschließend zur Messung von charakterisierten Proben aus Brusttumoren herangezogen.

Die verschiedenen interessanten Antigene eines Systems oder einer Probe werden häufig über generierte Bindemoleküle durch spezifische Reaktionen nachgewiesen. Als eine weitere Möglichkeit und alternative Methode können hierfür zudem natürliche Wechselwirkungspartner eingesetzt werden, die *in vivo* Bindungen mit dem Protein von Interesse eingehen. Hierzu zählen unter anderem die Interaktionen zwischen Rezeptor und Ligand, Enzym und Substrat sowie DNA-Protein-Wechselwirkungen.

Das Transmembranprotein EGFR wird in einer Vielzahl an Tumoren durch Promotion des Rezeptorgens c-erbB1 aktiviert, was zur Überexpression [Arteaga 2002] oder zu Mutationen [Jungbluth *et al.* 2003] des Rezeptors führen kann. Bei Brustkrebs wurde eine EGFR-Überexpression nachgewiesen, die sich gegenläufig zur Hormonrezeptorexpression darstellt und mit einer verschlechterten Prognose des Krankheitsverlaufes in Verbindung gebracht wird. Ein klinisch relevanter Schwellenwert der EGFR-Expression wurde deshalb bei 10 fmol/mg Rezeptor pro Membranprotein definiert [Nicholson *et al.* 1988]. Eine Bestimmung der EGFR-Konzentration kann neben den molekularbiologischen Methoden auch mit spezifischen Antikörpern in Sandwich-Immunoassays oder über die Bindung seines Liganden EGF erfolgen. Das 53 AS große Polypeptid EGF bindet mit einer Affinität von $K_D \leq 12$ nM über die extrazellulären Domänen I und III an den Rezeptors [Ullrich und Schlessinger 1990]. Diese Rezeptor-Liganden-Wechselwirkung wird zum Beispiel in einem Radioimmunoassay (RIA) zum Nachweis von EGFR verwendet. Hierbei werden Rezeptor und Ligand in Lösung miteinander inkubiert und die über ^{125}I markierten Tyrosine des Liganden nachgewiesen und ausgelesen [Zeillinger *et al.* 1993]. Andere Methoden,

bei denen der Ligand zum Nachweis des Rezeptors verwendet werden kann, dienen der Untersuchung von Gewebeschnitten oder Zellkulturen. Hierbei kann nach Modifizierung von EGF mit Biotin die Expression des Rezeptors in bestimmten Zonen von Geweben oder Zellkompartimenten analysiert und beurteilt werden [Spitzer *et al.* 1989].

4.4.1 Entwicklung eines miniaturisierten Ligandenbindungsassays

Nach Immobilisierung des biotinylierten Liganden EGF an LumAvidin-Beads wurden dessen Potential zum Herausfangen des Rezeptors über mehrere Lysatkonzentrationen von Brustkrebszellen der Linie BT-20 untersucht. Bei dieser Zelllinie war eine starke EGFR-Expression festgestellt worden, die bei $1,5 \times 10^6$ Rezeptoren pro Zelle oder 400 fmol/mg Membranprotein [Brotherick *et al.* 1994] lag. Zur anschließenden Detektion des Rezeptors wurde ein anti-EGFR-Antikörper ausgewählt, dessen Bindung keinen Einfluss auf die Ligandenbindung hatte. Der Ligand wurde in zwei Konzentrationen gekoppelt.

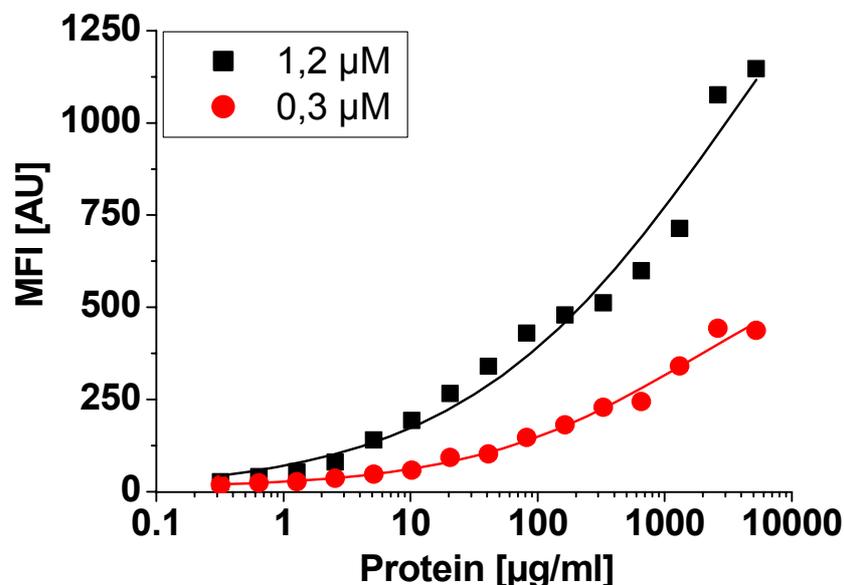


Abbildung 4.30: Abhängigkeit der EGFR-EGF-Wechselwirkung von der EGF-Kopplungskonzentration. EGF-Beads, die in zwei Konzentrationen beladen worden waren, wurden über mehrere Konzentrationen an lysierten BT-20-Zellen untersucht. Es wurde der anti-EGFR-Antikörper mAb11 (0,31 µg/ml) zur Detektion verwendet und mit einem R-PE-markierten anti-Maus Antikörper (2 µg/ml) nachgewiesen.

Aus Abbildung 4.30 ist zu erkennen, dass die Kopplungskonzentration des Liganden Einfluss auf die Nachweisbarkeit des funktionellen Rezeptors nimmt. Gegenüber 0,3 μM führte eine Konzentration des Liganden während der Kopplung von 1,2 μM in den gezeigten Messreihen stets zu höheren Messwerten, einem besseren Signal-Rausch-Verhältnis und dadurch zu einer besseren Unterscheidbarkeit der nachzuweisenden Mengen an EGFR. Es wurden deshalb für weiterführende Messungen *Beads* verwendet, die bei 1,2 μM EGF gekoppelt worden waren. So liegt die relative Fluoreszenz, die bei einer EGF-Kopplung von 1,2 μM und einer Proteinkonzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ erreicht werden kann, bei einem MFI-Wert von ca. 500 AU. Dieser Wert liegt um den Faktor 29 über dem Leerwert. Der „dynamische“ Bereich der Verdünnungsreihe verläuft von 5 – 5000 $\mu\text{g/ml}$ über drei Zehnerpotenzen. Zur Bestimmung der EGFR-Expression von Proben, deren Expressionsraten geringer als die der BT-20-Zellen sind, wurde demnach eine Proteinkonzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ gewählt und zur Untersuchung von Membranfraktionen mehrerer Tumorproben herangezogen. Dies entsprach 15 μg an Gesamtprotein pro Messung.

Zur Bestätigung der Spezifität der Bindung des Rezeptors an den immobilisierten Liganden wurde ein Konkurrenzexperiment durchgeführt. Hierbei wurden die Zellextrakte mit und ohne den löslichen Liganden zusammen mit den EGF-*Beads* inkubiert.

Durch Anwesenheit von löslichem EGF konnte die messbare Interaktion zwischen Rezeptor und immobilisiertem Ligand verringert werden. Bei Anwesenheit von 2 μM EGF wurde das gemessene Signal um 89% reduziert. Der Messwert bei 11,5 μM EGF entsprach noch 4% des unkompetierten Versuchsansatzes. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass diese Wechselwirkung inhibiert werden kann und somit die Rezeptoren spezifisch an immobilisierte Liganden binden.

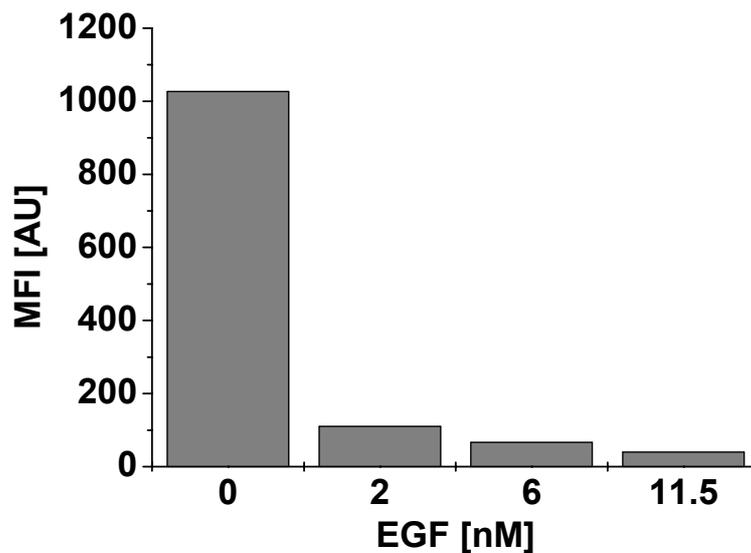


Abbildung 4.31: Wettbewerbsassays mit löslichem EGF. EGF-Beads wurden mit und ohne löslichen Liganden EGF bei 0,5 mg/ml BT-20-Zellhomogenat untersucht. Zur Detektion wurden die Antikörper mAb11 (1,25 µg/ml) und R-PE-markierter anti-Maus-Antikörper aus Ziege (5 µg/ml) verwendet.

4.4.2 Untersuchung charakterisierter Tumorproben: Beurteilung des EGFR-Ligandenbindungsassays anhand des klinischen Schwellenwertes

Nachfolgend wurden Messungen an 46 verschiedenen Tumorproben durchgeführt. Es war von Interesse, in wie weit ein klinisch relevanter Schwellenwert der EGFR-Expression von 10 fmol/mg in *bead*-basierenden Messungen bestätigt werden kann. Bei einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml wurden Membranfraktionen von Proben verwendet, deren EGFR-Status über RIA-basierende Ligandenbindungsexperimente charakterisiert worden war. Nach einer Einteilung der Proben in Gruppe A ($[EGFR]_{RIA} \leq 10$ fmol/mg) und Gruppe B ($[EGFR]_{RIA} > 10$ fmol/mg) sollte der Zusammenhang zwischen den gemessenen MFI-Werten der miniaturisierten Ligandenbindungsexperimente und der definierten Schwelle betrachtet werden.

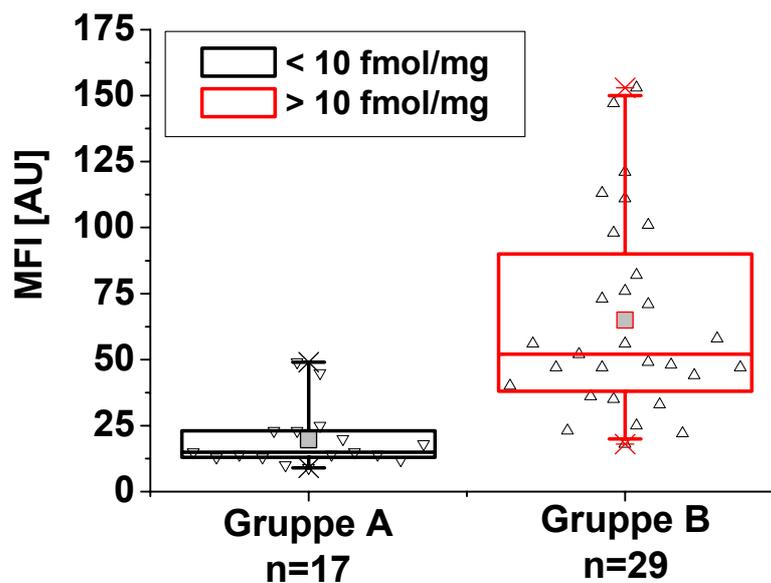


Abbildung 4.32: Vergleich zwischen RIA-Daten und *bead*-basierenden Messungen. Es wurden 46 Proben in zwei Gruppen gemäß ihrer in RIA-Messungen bestimmten EGFR-Expression aufgeteilt. Als Schwelle wurde 10 fmol EGF-Rezeptor pro mg Membranprotein verwendet [Nicholson et al. 1988]. 17 Proben der Gruppe A mit RIA-Werten von ≤ 10 fmol/mg EGFR wurden 29 Proben der Gruppe B gegenübergestellt, deren EGFR-Konzentrationen zwischen 11 und 246 fmol/mg lag. Alle Lysate wurden bei einer Konzentration von 0,5 mg/ml in *bead*-basierenden Ligandenbindungsexperimenten untersucht. Der anti-EGFR-Antikörper mAb11 (0,31 $\mu\text{g/ml}$) und ein R-PE-markierter anti-Maus-Antikörper (2 $\mu\text{g/ml}$) wurden zur Detektion verwendet. Es wurde ein Ausreißer der Messreihe nicht berücksichtigt, dessen RIA-Messwert (EGFR = 600 fmol/mg) und dessen Ergebnis zur Messung einer *bead*-basierenden Ligandenbindung (MFI = 1084 AU) um mehr als das Dreifache der Standardabweichung vom Mittelwert aller Proben abwich.

In Abbildung 4.32 sind Membranfraktionen mit EGFR-Konzentrationen der Gruppe A (EGFR-Konzentration ≤ 10 fmol/mg) Proben der Gruppe B (EGFR-Konzentration 11 – 246 fmol/mg) gegenübergestellt. Für Gruppe A ergab sich im miniaturisierten Ligandenbindungsexperiment im Mittel ein MFI-Wert von 24 AU (± 14 AU), wohingegen die Proben der Gruppe B mit 65 AU (± 37 AU) bestimmt wurden. Aus den Messwerten zwischen den beiden Gruppen wurde in einem t-Test ein *P*-Wert von $< 0,01$ ermittelt. Es war zu erkennen, dass Proben mit einem MFI-Wert ≥ 50 AU stets der Gruppe B zuzuordnen waren. Dies waren 52% aller Proben innerhalb dieser Gruppe. Der Mittelwert der EGFR-Konzentration für Proben mit Messwerten ≥ 50 AU lag bei 70,7 fmol/mg. Die maximale EGFR-Konzentration für Proben mit einem MFI-Wert < 50 AU lag indes bei 42 fmol/mg, wobei hier das Mittel bei 21 fmol/mg lag. Für 88% (15 aus 17) der Proben aus Gruppe A wurden MFI-Werte ≤ 25 AU gemessen.

4.4.3 Zusammenfassende Diskussion

Zum Nachweis des EGF-Rezeptors wurde ein Bindungsassay mit dem natürlichen Liganden EGF durchgeführt. Dieser wurde hierfür über dessen N-terminale Biotinmodifikation auf LumAvidin-Beads immobilisiert. Durch die Verwendung von lysierten BT-20-Zellen, von denen eine starke EGFR-Expression bekannt war, konnte eine spezifische Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Ligand über einen breiten Lysatkonzentrationsbereich beobachtet werden. Gebundene Rezeptoren wurden in diesem Ansatz durch einen anti-EGFR-Antikörper nachgewiesen. Dieser Assay wurde zudem mit Membranfraktionen von Gewebeproben der weiblichen Brust durchgeführt, um die nach der EGFR-Expression aufgeteilten Proben zu analysieren. Die Klassifikation nach der klinischen Schwelle von 10 fmol/mg EGFR konnte hierbei zum Teil bestätigt werden.

Ein deutlicher Unterschied war hinsichtlich der Kopplungskonzentration des Liganden festzustellen. Dies war unerwartet, da die Kopplung bei Ligandenkonzentrationen über 4 nM verliefen und somit laut Hersteller (Luminex Corp.) bei sättigender Substratmenge durchgeführt wurden. Bei einer Ligandenkonzentration von 1,2 µM und 2 mg/ml an Zelllysat wurde für die Wechselwirkung mit EGFR ein MFI-Wert von ca. 1000 AU gemessen. Somit wurde aus einer großen Menge an Ausgangsmaterial einer stark exprimierenden Zelllinie und bei einer zu erwartenden Wechselwirkungskonstante zwischen Rezeptor und Ligand von ca. 10 nM eine vergleichsweise geringe Signalintensität gemessen. Zudem verlief die Kurve, die aus der Verdünnungsreihe resultierte, relativ flach. Hierdurch war eine klare Unterscheidung von Proben mit ähnlichen Antigenkonzentrationen schwierig. Einen Einfluss hierauf hatten zudem die Lysebedingungen der BT-20-Zellen, welche auf schnelle und einfache (durchsatzfähige) Extraktion der Membranproteine abgestimmt worden waren.

Es wurden darüber hinaus Membranfraktionen von Tumorproben untersucht. Zur Analyse dieser charakterisierten Gewebeproben war eine Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml nötig. Gemäß ihrer RIA-Daten waren diese Proben an einer klinisch relevanten Schwelle von 10 fmol/mg EGFR gruppiert worden. In Experimenten mit *bead*-basierender Ligandenbindung wurde eine gemäß dieser Einteilung

vergleichbare Einordnung möglich. Eine direkte Gegenüberstellung beider Messmethoden ergab gemäß der EGFR-Expression der Proben keine gute Vergleichbarkeit. Es scheint in diesem Zusammenhang jedoch prinzipiell problematisch zu sein, die Ergebnisse der zwei Messmethoden direkt zu vergleichen. Zum einen wurden die Proben nicht zum gleichen Zeitpunkt parallel vermessen. So waren die Membranfraktionen nach der RIA-Messung bis zur Durchführung des miniaturisierten Ligandenbindungsassays für mindestens zwei Jahre zwischengelagert worden. Zum anderen beruht die RIA-Messung auf der Interaktion zweier löslicher Bestandteile, dem Rezeptor und dessen Liganden. Die Immobilisierung von EGF an eine feste Phase (*Beads*) könnten seine Bindungseigenschaften beeinflussen, was sich unter anderem in beschränkter Zugänglichkeit des Liganden auswirken würde. Wäre zudem eine bestimmte räumliche Orientierung von EGF für die Wechselwirkung mit dem Rezeptor notwendig, so könnte die durch Anbindung verminderte freie Beweglichkeit des Liganden das Auftreten von Bindungsereignissen zudem erschweren. Es darf zudem vermutet werden, dass die Konformation des Rezeptors bei der Bindung des Liganden im Gegensatz zu einer Wechselwirkung mit einem spezifischen Antikörper größere Bedeutung hat. So wird diskutiert, dass die Bindung von EGF am Rezeptor Konformationsänderungen induziert, bei denen sich die EGFR-Domänen I und II um die Verbindung von Domäne II/III um 130° drehen [Burgess *et al.* 2003].

Ein Nachweis des EGF-Rezeptors über seinen immobilisierten Liganden EGF war unter den hier untersuchten Bindungen möglich. Dieser Assay stellt eine Alternative zu kommerziell erhältlichen Kits (z.B. Sandwich-Immunoassays wie Total EGF-Receptor BeadmatesTM, # 46-606, Upstate, Dundee, UK) für eine relative Bestimmung von EGFR dar. Jedoch waren vor allem die geringe Sensitivität und Dynamik des Assays und die daraus resultierende große benötigte Probenmenge ausschlaggebend dafür, dass keine weiterführenden Experimente folgten.

4.5 Ankyrine, neuartige Fängermoleküle: Entwicklung eines Sandwich-Immunoassays zum Nachweis von Her2 aus Tumorproben

Um die Einsatzmöglichkeiten neuartiger Binder in miniaturisierten Assaysystemen zu prüfen, wurden Ankyrine in *bead*-basierenden Experimenten als Fängermoleküle eingesetzt. Ziel war es, mit Ankyrinen einen spezifischen Sandwich-Immunoassay für das Tumormarkerprotein Her2 zu entwickeln. Her2 sollte hiermit in verschiedenen Zell- und Gewebelysaten nachgewiesen werden. Es standen hierzu 6 anti-Her2-Ankyrine zur Verfügung, die nach gezielter Auswahl einer geeigneten Modifikation gerichtet und spezifisch immobilisiert wurden, um eine Selektion gemäß den Fängereigenschaften in multiparametrischen Ansätzen vornehmen zu können.

Die hier verwendeten Ankyrine gehören zu der Klasse der *Repeat*-Proteine [Forrer *et al.* 2003]. Sie stellen zusammen mit Affibodies [Nord *et al.* 1997], weiteren Repeat-Proteinen [Sedgwick und Smerdon 1999], Aptameren [Cohen *et al.* 1998], Lipocalinen [Beste *et al.* 1999] oder Trinectinen [Xu *et al.* 2002] rekombinante Bindemoleküle dar, die aus alternativen Proteingerüsten bestehen und neben Antikörpern oder Antikörperfragmenten als alternative Hilfsmittel zum Nachweis von Antigenen dienen können.

Ankyrin *Repeats* (AR) wurden aus einer kombinatorischen Proteinbibliothek gewonnen und sind lösliche, stabile und gut zu exprimierende Proteine [Binz *et al.* 2003]. Ihr linearer Aufbau ist in mehrere Struktureinheiten, die so genannten *Repeats* aufgeteilt. Ankyrine besitzen N- und C-terminalen Kappen, die eine Reihe von zentralen, 33 AS großen Modulen umschließen, welche wiederum für das Bindungsverhalten der Ankyrine ausschlaggebend sind. Die Interaktionen der Ankyrine werden durch die über den Helices liegenden Bereichen der Schleifen und β -turns ermöglicht (Abbildung 4.33). Die Interaktion, die ein untersuchtes Ankyrin mit seinem Bindungspartner einging, war mit natürlichen heterodimeren Protein-Protein-Wechselwirkungen vergleichbar [Binz *et al.* 2004]. Die Struktur der an der Antigenbindung beteiligten Untereinheiten ist durch eine β -turns gefolgt von zwei antiparallelen α -Helices und einer abschließenden Schleife gekennzeichnet.

Die Spezifität der Ankyrine kann zum einen durch Mutationen bestimmter AS-Reste verändert werden. Darüber hinaus besteht bei diesen *Repeat*-Proteinen zusätzlich die Möglichkeit, durch Mischen, Austausch, Einfügen oder Entfernen bestimmter Module die Bindungseigenschaften zu variieren.

Ankyrine sind zudem cysteinfreie Proteine. Dies macht sie unter anderem für den intrazellulären Einsatz interessant, da sie auch unter den reduzierenden Bedingungen des Cytosols ihre Struktur behalten könnten.

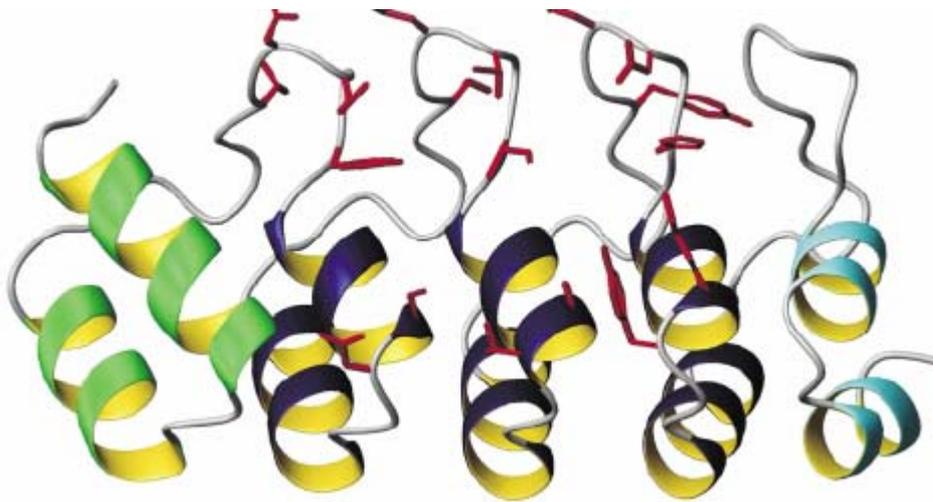


Abbildung 4.33: Kristallstruktur eines Ankyrins. Die Grafik wurde aus [Binz *et al.* 2003] entnommen und modifiziert. Zwischen den N-terminalen (grün) und C-terminalen (türkis) Kapfen liegen die Module, die dem Protein die Bindungseigenschaften verleihen. In rot gehalten sind diejenigen Reste, durch deren Mutationen eine Änderung der Ankyrinspezifität erreicht werden kann.

4.5.1 Vergleich der Fängereigenschaften von anti-Her2 Ankyrinen

Alle 6 Ankyrine wurden bei der gleichen Konzentration über ihre Biotinfunktion an LumAvidin-*Beads* gekoppelt und hinsichtlich ihrer Kopplungsausbeute überprüft. Diese *Beads* wurden mit verschiedenen Konzentrationen an rekombinantem erbB2-Fc getestet. Zur Kontrolle und zum Vergleich der Fängereigenschaften wurden diesem Ansatz immobilisierte anti-Her2-Antikörpern beigefügt. Der Nachweis des chimären Antigens wurde über dessen Fc-Anteil durchgeführt. Hierdurch wurde ein direkter Vergleich der Fängereigenschaften möglich, da die Bindung des Antigens an die Fängermoleküle und der anschließende Nachweis über das Detektionssystem sich nicht gegenseitig beeinflussen.

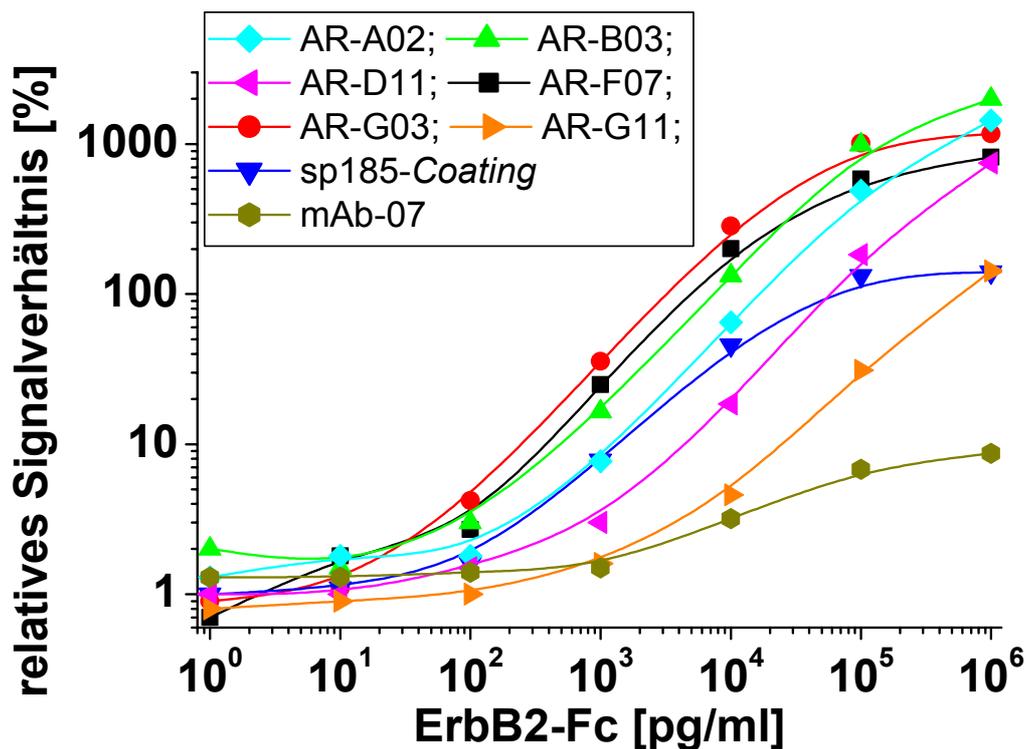


Abbildung 4.34: Nachweis von dimerem Her2 (erbB2-Fc). Die Ankyrine AR-F07; AR-G03; AR-B03; AR-A02; AR-D11 und AR-G11 sowie zwei monoklonale Antikörper (sp185 und mAb-07) wurden in einem multiparametrischen Ansatz mit einer absteigenden Konzentrationsreihe an dimerem Her2-Protein erbB2-Fc getestet. Das gebundene Antigen wurde hierbei über einen anti-human Fc-spezifischen, R-PE-markierten Detektionsantikörper nachgewiesen. Über das relative Signalverhältnis aus Leer- und Messwert wurden Informationen über die Fängereigenschaften der verschiedenen Binder gewonnen.

Die Ergebnisse in Abbildung 4.34 zeigen, dass vor allem die Ankyrine AR-G03, AR-F07 und AR-B03 sich zum Nachweis von erbB2-Fc eigneten. Hierfür war das Verhältnis zwischen den Messwerten bei 10³ pg/ml erbB2-Fc und den Signalen der Hintergrundmessungen größer als ein Faktor von 10. Im Vergleich zu einem kovalent immobilisierten, monoklonalen Antikörper sp185-Coating fiel bei den Ergebnissen der Ankyrine zudem ein breiter dynamischer Bereich von bis zu vier Zehnerpotenzen (für AR-G03 von 10¹ – 10⁵ pg/ml) auf.

4.5.2 Etablierung eines Sandwich-Immunoassays mit Ankyrinen zum Nachweis von Her2

Zur Analyse des Antigens in seiner natürlichen Form musste die Detektion des gefangenen Analyten über eine zweite antigenspezifische Bindung erfolgen. Sollten nun die Ankyrine zum Nachweis von Her2 aus Zellen oder Gewebeproben herangezogen werden, so musste ein geeignetes Detektionsmolekül zur Etablierung eines Sandwich-Immunoassays ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Her2-spezifische monoklonale Antikörper in Kombination mit Ankyrin-*Beads* und dem Antigen erbB2-Fc getestet. Als Detektionsantikörper wurden sp185 und mAb-07, monoklonale Antikörper aus Maus, und Herceptin analysiert. Die entsprechende Detektion erfolgte durch R-PE-markierte Nachweisantikörper.

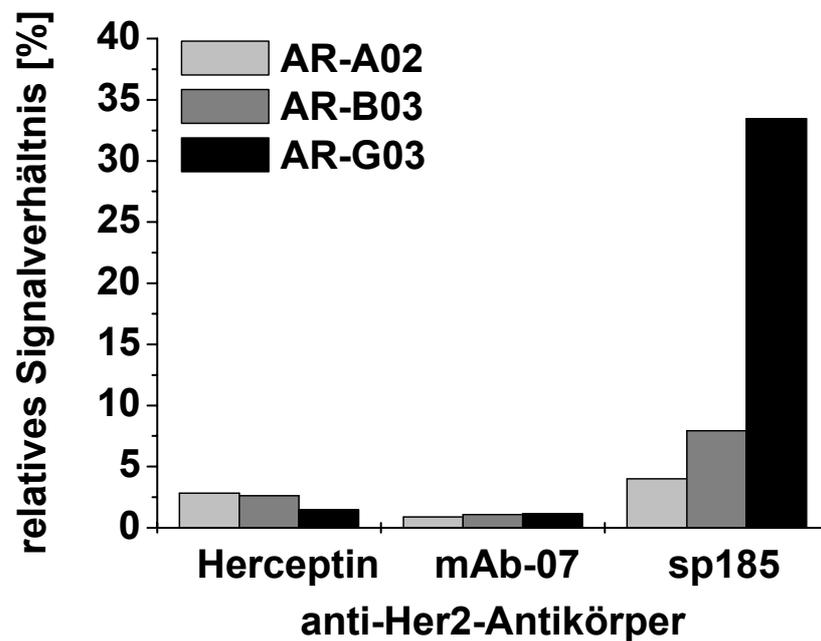


Abbildung 4.35: Auswahl von Antikörpern zur Detektion von dimerem Her2 (erbB2-Fc). Für drei exemplarische Ankyrine AR-A02, AR-B03 und AR-G03 wurden aus einem multiparametrischen Ansatz die Ergebnisse für den Nachweis von 2,5 ng/ml erbB2-Fc dargestellt. Die anti-Her2-Antikörper Herceptin, mAb-07 und sp185 wurden bei 1 µg/ml eingesetzt und entsprechend ihrer Spezies mit R-PE-markierten Detektionsantikörpern (2,5 µg/ml) nachgewiesen. Für alle Antikörper wurde ein Verhältnis zwischen Signal und Hintergrund bestimmt.

Wie sich am größten Verhältnis zwischen Signal und Hintergrund zeigte (Abbildung 4.35), eignete sich besonders der Antikörper sp185 zum Nachweis von erbB2-Fc. Als ein weiteres rekombinantes Antigen stand monomeres Her2 (BMS207S) zur Verfügung, welches laut Hersteller der extrazellulären Domäne (p105) von Her2 entspricht. Dies würde die Möglichkeit eröffnen, den Sandwich-Immunoassay mit Ankyrinen und dem Antikörper sp185 zur quantitativen Analyse von Her2 zu nutzen. In einem Versuchsansatz mit einem Herceptin- und sechs Ankyrin-*Beads* wurden absteigende Konzentrationen von monomerem Her2 BMS207S getestet.

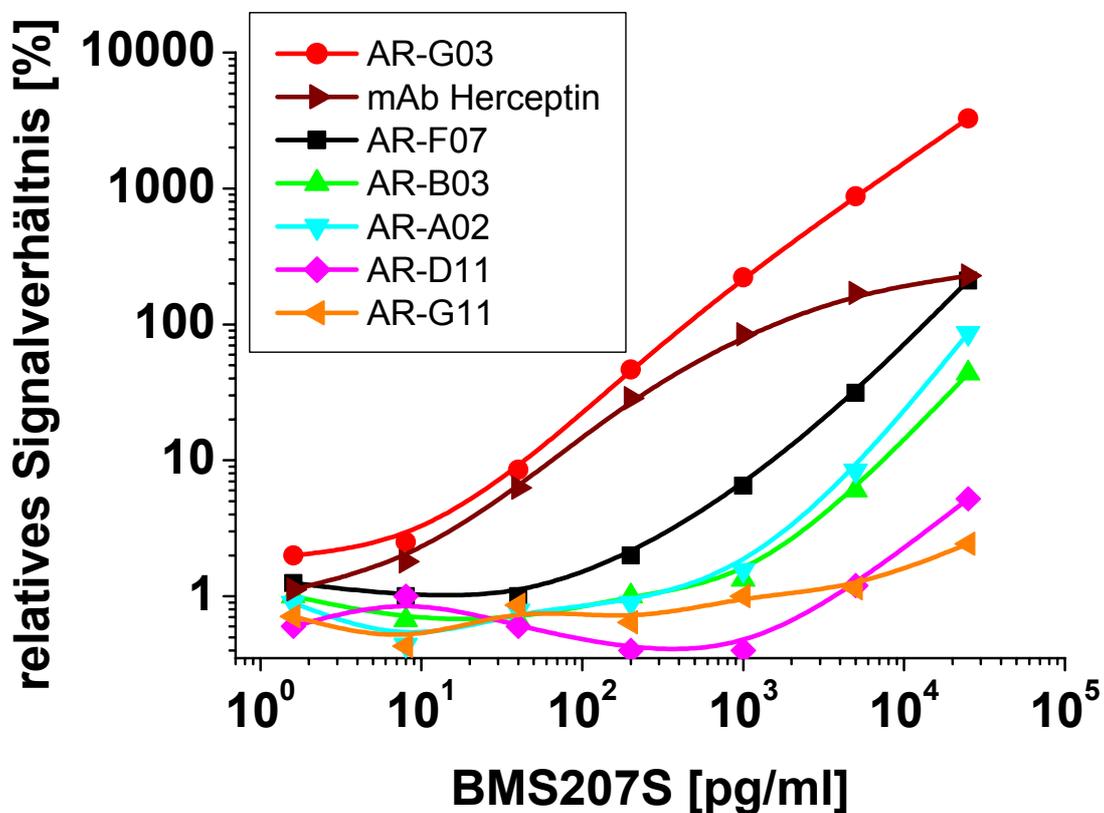


Abbildung 4.36: Nachweis von monomerem Her2 (BMS207S). In einer parallelisierten Analyse wurde das monomere Her2-Protein BMS207S mit 6 anti-Her2-Ankyrinen und Herceptin untersucht. Zur Detektion wurde sp185 (1 µg/ml) und R-PE-markierter anti-Maus-Fc aus Ziege (2,5 µg/ml) durchgeführt. Für alle Fängermoleküle wurden die Verhältnisse zwischen Signalen und Hintergrund bestimmt und aufgetragen.

Das Ankyrin AR-G03 erwies sich als besonders geeignet zum Nachweis des rekombinanten Her2-Standardproteins (Abbildung 4.36), da der dynamische Bereich der Nachweisreaktion sich über drei Zehnerpotenzen erstreckt. Zudem lag das Signal

bei einer BMS207S-Konzentration von 15,6 pg/ml immer noch ein Fünffaches über dem Hintergrund. Vergleicht man diese Messungen mit den Ergebnissen von dimerem erbB2-Fc (Abbildung 4.34), so zeigt sich nun weitaus deutlicher, dass der Klon AR-G03 der am besten geeignete Fänger war.

4.5.3 Nachweis von Her2 aus lysierten Zellen

Unter Verwendung des oben beschriebenen Sandwich-Immunoassays sollte untersucht werden, ob die anti-Her2-Ankyrine auch als Fängermoleküle zum Nachweis von Her2 aus Zell- und Gewebelysaten Einsatz finden können.

Zu diesem Zweck wurden Zellen zweier Zelllinien lysiert und in absteigenden Konzentrationen mit Ankyrinen untersucht. Zum einen wurde die humane Zelllinie SK-BR-03 verwendet. Es war bekannt, dass diese Zellen Her2 überexprimieren [Konecny *et al.* 2003]. Daneben sind humane A431-Zellen für einen basalen Gehalt an Her2 und ihre Überexpression von EGFR (Her1) bekannt [Waterfield *et al.* 1982], so dass potentielle Kreuzreaktivitäten der Ankyrine mit dem zu Her2 nahe verwandten Rezeptor deutlich werden könnten.

Nach Extraktion und Bestimmung des Proteingehaltes wurden die Lysate in absteigenden Konzentrationen in einem Assay mit 6 Ankyrinen als Fängermoleküle untersucht. Die Proteinmengen der Proben, in denen die Messungen durchgeführt wurden, betrug hierbei zwischen 10 – 0,01 µg.

Die Bestimmung von Her2 aus Zelllysaten ließ sich mit anti-Her2-Ankyrinen über mehrere Gesamtproteinkonzentrationen durchführen. Abbildung 4.37A zeigt, dass in SK-BR-03 Zelllysaten eine große Menge an Her2 wieder gefunden wurde. In Lysaten aus A431-Zellen (Abbildung 4.37B) hingegen wurden eher moderate Mengen an Her2 detektiert. Ein Einfluss der Überexpression von EGFR konnte bei dieser Kontrolle nicht festgestellt werden. Mit dem immobilisierten Ankyrin AR-G03 war es möglich, das Antigen über eine lineare Signalzunahme in einem Konzentrationsbereich von drei Zehnerpotenzen zu detektieren. Im Folgenden wurde bei der Analyse von weiteren Proben hauptsächlich das Ankyrin AR-G03 verwendet.

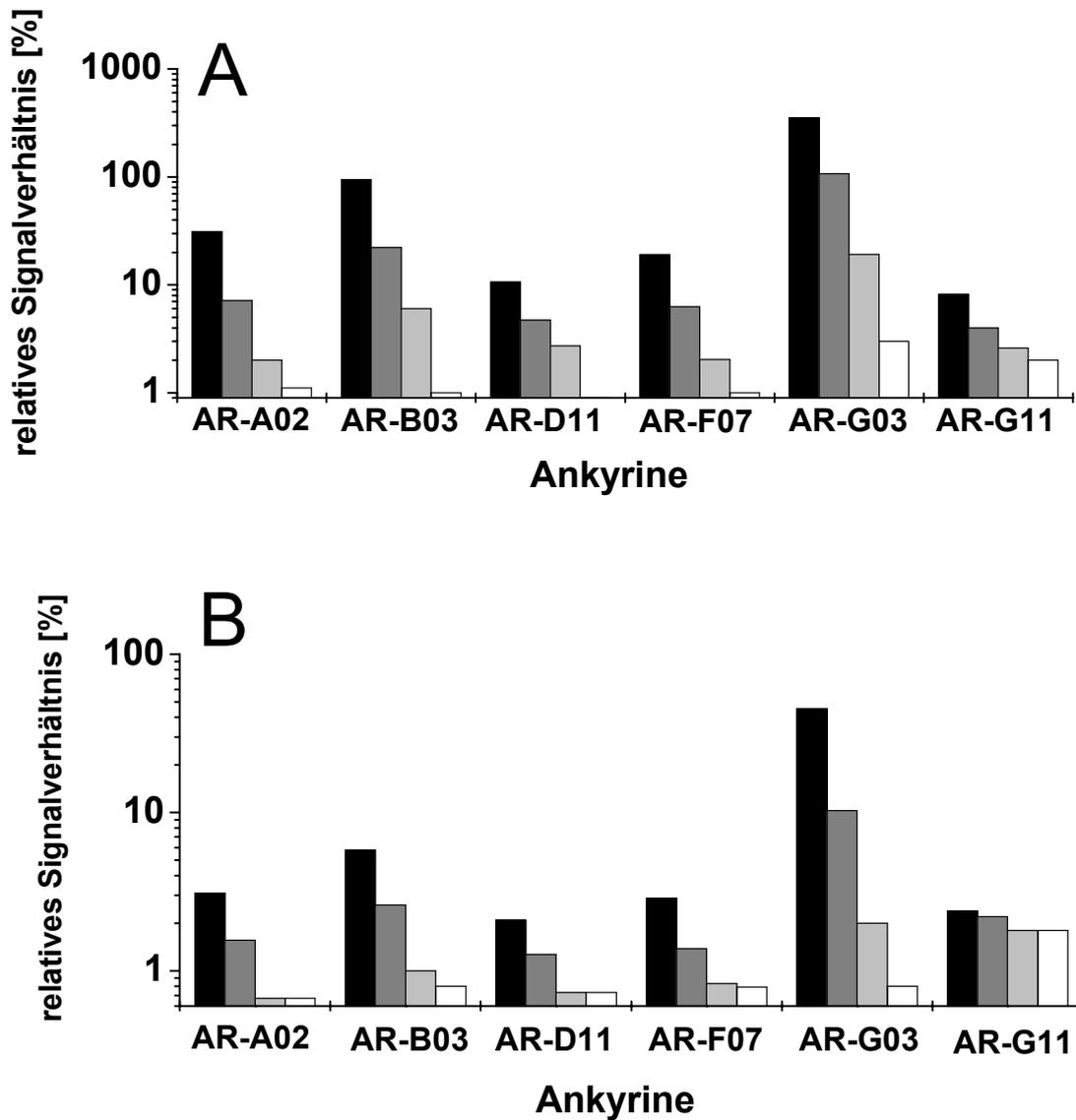


Abbildung 4.37: Nachweis von Her2 in Lysaten von SK-BR-03- und A431-Zellen. Extrakte von Zellen der Linien (A) SK-BR-03 und (B) A431 wurden in vier verschiedenen Probenkonzentrationen von 10 µg (■), 1,0 µg (■), 0,1 µg (■) und 0,01 µg (□) pro Ansatz mit AR-G03 untersucht. Die gebundene Menge an Her2 wurde über sp185 (1µg/ml) und R-PE-markiertem anti-Maus-Fc-Antikörper (2,5 µg/ml) nachgewiesen. Als Ergebnisse wurden die Verhältnisse der Messwerte zum Hintergrund aufgetragen.

4.5.4 Quantifizierung der Her2-Expression

Der in 4.5.2 beschriebene Sandwich-Immunoassay mit AR-G03 als Fängermolekül und einer Detektion über sp185 und anti-Maus-Fc sollte zur Bestimmung der Antigenexpression in Lysaten eingesetzt werden. Dies sollte über eine Kurvenanpassung einer Standardreihe des monomeren Her2-Standardproteins BMS207S ermöglicht werden.

Um die Quantität der Her2-Expression zu bestimmen, wurde das Standardprotein in Gegenwart von Lysaten und Lysepuffer nachgewiesen. So wurden Verdünnungsreihen des monomeren Her2-Proteins BMS207S in Gewebelysaten eines Her2-negativen Normalgewebes untersucht. Pro Ansatz wurden zwischen 5,0 µg und 0,04 µg Gewebelysat beigefügt. Dies entspricht einem Proteinkonzentrationsbereich von 100 µg/ml – 0,8 µg/ml an Lysat. Als beigemengtes Gewebelysat wurde das Extrakt des Normalgewebes von Patientin #06 verwendet, das sich in Vorversuchen als nahezu Her2-negativ erwies.

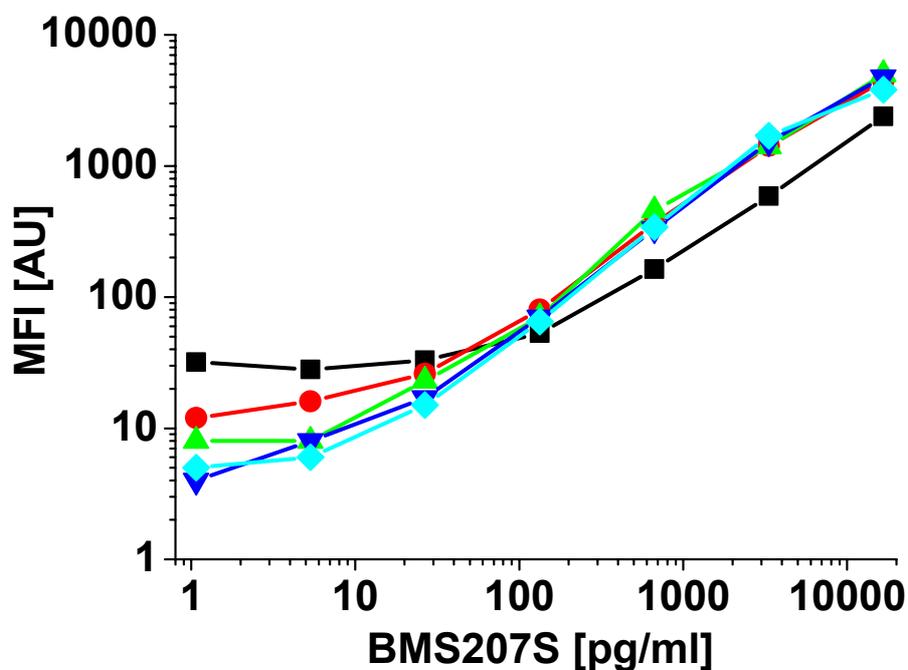


Abbildung 4.38: Nachweis von Her2-Standardprotein unter verschiedenen Mengen an Lysaten. Monomeres Her2-Standardprotein (BMS207S) wurde mit AR-G03 unter 5,0 µg (■), 1,0 µg (●), 0,2 µg (▲), 0,04 µg (▼) und ohne (◆) Normalgewebelysat von Patientin #06 pro Ansatz analysiert. Der Nachweis erfolgte mit sp185 (1 g/ml) und PE-markiertem anti-Maus-Fc-Antikörper (2,5 µg/ml).

Für eine Quantifizierung von Her2 durch das Ankyrin AR-G03 eigneten sich vor allem Ansätze mit Probenmengen $\leq 1 \mu\text{g}$. Wie in Abbildung 4.38 zu erkennen ist, deckten sich die unter diesen Bedingungen bestimmten Messergebnisse ab 100 pg/ml an Standardprotein mit den Werten bei einem Nachweis ohne Anwesenheit von Gewebelysat. Die Abweichungen für niedrige Standardproteinkonzentrationen $< 100 \text{ pg/ml}$ waren durch eine basale Her2-Expression des Lysates zu erklären: Für die Leerwerte wurden bei absteigender Menge an Lysat MFI-Werte von 31, 10, 7 und 4 AU bestimmt. In reinem Puffer wurde ein MFI-Wert von 5 AU gemessen. Für eine Konzentration an Gewebelysat von 5 μg pro Ansatz veränderte sich zudem die untere Nachweisgrenze der Standardreihe. So waren erst für Standardproteinkonzentrationen $> 100 \text{ pg/ml}$ signifikante Signalunterschiede zu messen.

Mit einer Eichreihe zwischen 15 – 15000 pg/ml BMS207S war es nun theoretisch möglich, die Her2-Expression quantitativ zu analysieren. Da es sich bei dem Standardprotein um den extrazellulären Anteil (MG = 105 kDa) des Gesamtproteins Her2 (MG = 185 kDa) handelte, musste für die Angaben der Her2-Expression der Korrekturfaktor 1,76 eingebracht werden. Somit konnte die Expression des Antigens in ng/mg Gesamtproteinmenge bestimmt werden.

Hierdurch wurde die Her2-Expression in Zellen aus Kulturen bei Gesamtproteinkonzentrationen von $\leq 1 \mu\text{g}$ pro Ansatz quantifiziert. Für SK-BR-03 wurde mit AR-G03 ein Wert von $739,4 \pm 143,2 \text{ ng/mg}$ (3997 fmol/mg) bestimmt, wohingegen die Proteinmenge an Her2 in A431 bei $60,8 \pm 5,0 \text{ ng/mg}$ (324 fmol/mg) lag.

4.5.5 Analyse und Bestimmung des Her2-Gehalts in Gewebeproben

Es wurden Gewebeproben der weiblichen Brust auf ihren Her2-Gehalt untersucht. Von insgesamt sechs Patientinnen waren Tumor- und Normalgewebe zur Triton-X-100-Extraktion zugänglich. Die Proben wurden mit dem Ankyrin AR-G03 als Fängermolekül im oben beschriebenen Assay untersucht. Von jeder Probe wurde 1 μg pro Ansatz eingesetzt.

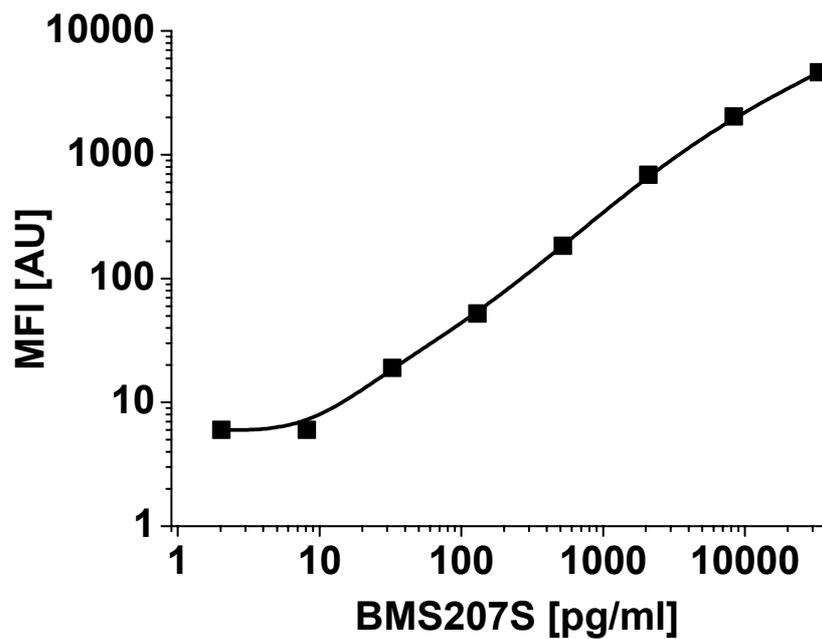


Abbildung 4.39: Standardreihe zur Quantifizierung der Her2-Expression. Das Ankyrin AR-G03 wurde zur Doppelbestimmung des Standardproteins BMS207S verwendet. Die gezeigten Werte wurden aus den Mittelwerten erhalten. Gebundenes Antigen wurde mit sp185 (1 $\mu\text{g/ml}$) und -PE-markiertem anti-Maus-Fc-Antikörper (2,5 $\mu\text{g/ml}$) nachgewiesen. Es wurde eine sigmoidale Kurvenanpassung durchgeführt.

Die Standardkurve in Abbildung 4.39 ergab einen dynamischen Bereich zwischen ca. 20 – 20000 pg/ml Her2 und bestätigte somit die bisherigen Messergebnisse.

Die direkte Auftragung der Messergebnisse zur Her2-Bestimmung in Gewebeproben (Abbildung 4.40) spiegelt die Ergebnisse der immunhistochemischen Bestimmung wider. So konnten die Tumore der Patientinnen #2 bis #5 als stark Her2-exprimierend bestätigt werden. Zudem konnte festgestellt werden, dass in Normalgewebe basale bis erhöhte Mengen an Antigen zu detektieren waren. Mit den hierbei gewonnen Daten wurde ein t-Test durchgeführt. Als Zuordnung der Gruppen wurden die Vorgaben aus den immunhistochemischen Bestimmungen verwendet. Es wurde zwischen Her2-positivem und Her2-negativem Gewebe ein P -Wert $< 0,002$ bestimmt.

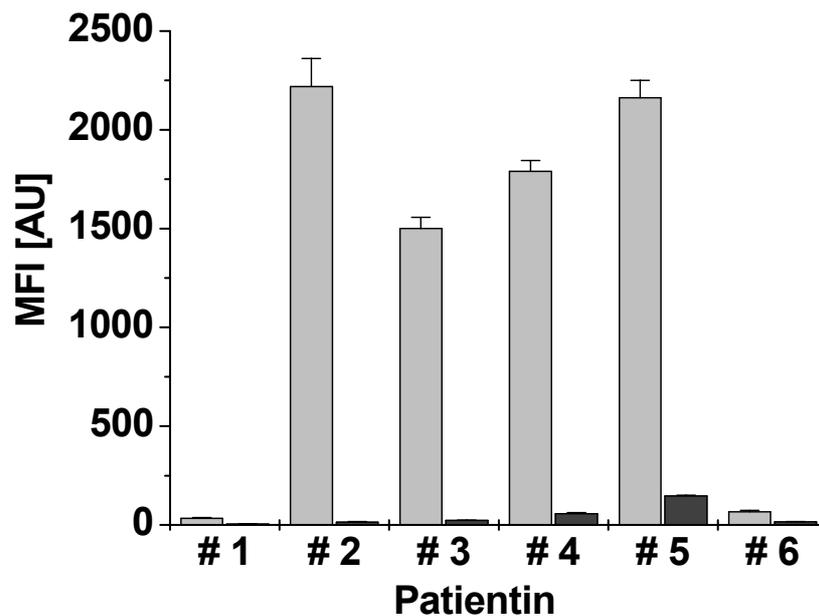


Abbildung 4.40: Messung des Her2-Gehalts von Gewebeproben. Mit AR-G03 wurden Patientinnenproben bei 1 µg Gesamtprotein pro Ansatz dreifach bestimmt. In der direkten Auftragung sind die Messergebnisse von Tumoren (■) und Normalgeweben (■) dargestellt. Der Hintergrund dieser Messung lag bei einem MFI-Wert von 4 AU.

Durch die Standardkurve wurde zudem die Her2-Expression der Proben bestimmt (Tabelle 4.6). Für alle Proben ergab sich in dieser Dreifachbestimmung eine Standardabweichung von < 15%. Die nach immunhistochemischer Analyse mit dem Status 3+ bestimmten Proben #2 - #5 wurden alle mit einer Her2-Expression > 400 ng/mg (2160 fmol/mg) gemessen. Die Antigenkonzentration der sehr stark Her2-exprimierenden Proben #2 und #5 lagen mit > 700 ng/mg im Bereich der SK-BR-03-Zellen. Die Her2-negativen Tumor- und Normalgewebeproben enthielten im Mittel 8,8 ng/mg (48 fmol/mg) und stets weniger als 40 ng/mg (216 fmol/mg). Die Her2-Expression dieser Proben wurde in einem Bereich von 0,4 – 31,1 ng/mg bestimmt.

Tabelle 4.6: Quantifizierung der Her2-Expression von Gewebeproben der weiblichen Brust.

Patientin	Tumorgewebe Her2 [ng/mg]		Normalgewebe Her2 [ng/mg]	
#1	6,0 ±	0,9	0,4 ±	0,2
#2	742,0 ±	68,6	2,3 ±	0,5
#3	435,7 ±	21,4	4,0 ±	0,4
#4	549,6 ±	22,7	11,0 ±	1,4
#5	714,6 ±	41,9	31,1 ±	1,0
#6	13,1 ±	1,8	2,6 ±	0,4

Durch die Verfügbarkeit von Tumor- und Normalgewebe einer Patientin kann direkt Bezug auf die veränderte Her2-Expression in malignen Geweben genommen werden. In Abbildung 4.41 wurde dies zusammengefasst, so dass für alle Patientinnen eine Erhöhung des Her2-Gehaltes in Tumorproben festgestellt werden konnte. Die Expression von Her2 war um das 5 – 320-fache erhöht.

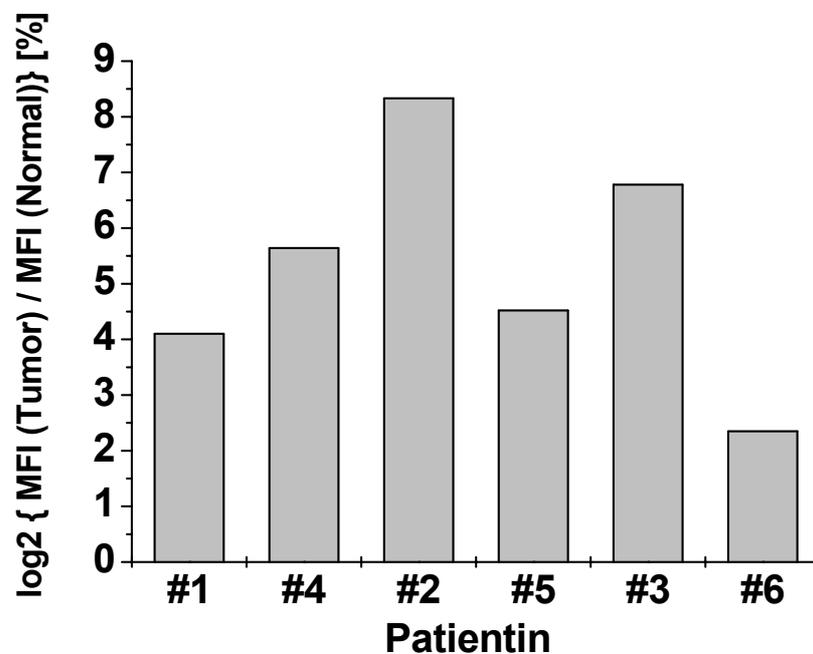


Abbildung 4.41: Verhältnis der Her2-Expression zwischen Tumor- und Normalgeweben. Zur linearen Darstellung der Unterschiede der Expression von Tumor- und Normalgeweben wurde die Logarithmierung zur Basis 2 gewählt.

4.5.6 Zusammenfassende Diskussion

Ankyrine stellen eine neuartige, interessante Klasse an Fängermolekülen dar. Die Implementierung dieser Bindemoleküle sollte in dieser Arbeit an einem parallelisierten und miniaturisierten Assay untersucht werden. Für den Nachweis eines brustkrebsrelevanten Proteins wurden hierzu 6 anti-Her2-Ankyrine analysiert und gemäß ihrer Fängereigenschaften selektioniert. Hierbei wurde durch eine gerichtete Immobilisierung der Ankyrine und Auswahl an rekombinanten Antigenen ein Sandwich-Immunoassay etabliert, bei dem ein passendes Detektionssystem bestimmt werden konnte. Dieser Versuchsaufbau erlaubte eine Quantifizierung von Her2 in Zelllysaten und Tumorproben.

Die verwendeten Ankyrine wurden alle über ein *in vivo* eingeführtes Biotin an LumAvidin-*Beads* gekoppelt und in einem Versuchsansatz mit einem rekombinanten, dimeren Antigen getestet, welches unabhängig von seiner Ankyrinbindungsstelle über einen Fc-*tag* nachgewiesen werden konnte. Drei Ankyrine (AR-B03; AR-F07; AR-G03) wurden identifiziert, die hinsichtlich der Nachweisgrenze und des dynamischen Bereiches hervorstachen.

Um einen Sandwich-Immunoassay zu etablieren, wurden alle Ankyrine mit drei antigenspezifischen Nachweisantikörpern getestet, wobei der Antikörper sp185 ausgewählt wurde. Das Ankyrin AR-G03 wurde als das Molekül mit der besten Fängereigenschaft im Sandwich-Immunoassay für das monomere Standardprotein bestimmt. Dies spiegelt auch die herausragenden Bindungseigenschaften dieses Ankyrin-Klons wider, dessen Affinität zum Antigen bei 80 pM liegt [Zahnd *et al.* 2005]. Die immunhistochemisch hinsichtlich ihres Her2-Status bestimmten Tumor- und Normalgewebe von Patientinnen mit Tumoren der Brust wurden bei einer Gesamtproteinkonzentration von 1 µg pro Ansatz (0,02 mg/ml) untersucht.

Immobilisierte Ankyrine scheinen sich trotz ihrer geringen Größe gut als Fängermoleküle zu eignen. Dies könnte im Vergleich zu Bindern ähnlicher Größe wie z.B. scFv-Fragmente (\pm 250 AS) im direkten Zusammenhang mit der Stabilität der Moleküle stehen. Des Weiteren könnte die Art der Wechselwirkung hier eine Rolle spielen. Die für Ankyrine bisher beschriebenen Interaktionen, die sie mit ihren Bindungspartner eingehen ähneln klassischen Protein-Protein-Wechselwirkungen

[Binz *et al.* 2004]. So lag die Nachweisgrenze des monomeren Standardproteins mit dem Ankyrin AR-G03 bei ca. 16 µg/ml. Die Nachweisgrenze des Assays verschlechterte sich nach kovalenter Immobilisierung der Ankyrine um mehr als den Faktor 100 (Daten nicht gezeigt). Mit dem kovalent immobilisierten Antikörper Herceptin (\pm 1350 AS), dessen K_D -Wert für Her-2 mit 0,1 nM bestimmt wurde [Carter *et al.* 1992], konnte das Standardprotein bis zu Konzentrationen \leq 20 ng/ml nachgewiesen werden.

Die Bestimmung der Her2-Expression in Lysaten wurde mit Zellen der Linien SK-BR-03, einem Her2-Modellsystem, und A431-Zellen, die für die Überexpression an EGFR bekannt waren, etabliert. Es konnte der hohe Expressionsgrad an Her2 in SK-BR-03-Zellen bestätigt werden. Für A431 wurde eine basale Menge an Her2 nachgewiesen, wodurch die Kreuzreaktivität des Ankyrins AR-G03 zu EGFR in lysiertem Probenmaterial als minimal einzustufen war.

Durch Beimengung des monomeren Standardproteins BMS207S in ein Lysat, dessen Her2-Gehalt als sehr gering eingestuft worden war, wurde eine Probenkonzentration von \leq 1 µg pro Ansatz zur Quantifizierung der Her2-Expression als optimal bestimmt. Bei Proteinkonzentrationen $>$ 1 µg traten Effekte auf, die zur Abweichung der Standardkurve von lysatfreier Titration führten. Diese Effekte beruhen möglicherweise auf Bestandteilen der Probenmatrix, deren Vorhandensein ab einem bestimmten Konzentrationsbereich zu den verschiedenen negativen Nebenwirkungen führen kann. Ob dies Lipide, andere Proteine oder Nukleotide sind konnte nicht geklärt werden. Ein Effekt kann sicherlich auch dem Lysepuffer zugeordnet werden. In den Messungen bei 1 µg Probe pro Ansatz lag der Lysepuffer in der Regel 1/200 verdünnt vor.

Eine Quantifizierung der Her2-Expression mit AR-G03 über BMS207S ergab für SK-BR-03-Zellen 0,74 µg/mg und für A431 0,06 µg/mg. Von Konecny wurde für SK-BR-03 eine Her2-Konzentration von 1,69 µg/mg bestimmt [Konecny *et al.* 2003]. Dieser Wert wurde in einem kommerziell erhältlichen Sandwich-ELISA mit Antikörpern nach 12 h Triton X-100-Behandlung (1%) und anschließender Ultrazentrifugation (100.000x g) bestimmt. Von der Firma Oncogene Science wurde ein ELISA entwickelt, mit dem in SK-BR-03 0,83 µg/mg und A431 0,02 µg/mg Her2 nachgewiesen wurden [Oncogene Science 2005]. Die Extraktion von Proteinen wurde hier über 5 min Triton X-100 (6%) und 15.000x g erreicht. Somit lagen die

Ergebnisse der Quantifizierung mit dem Ankyrin AR-G03, dem Standardprotein BMS207S und dem Detektionsantikörper sp185 in vergleichbaren Größenordnungen.

Die abschließenden Untersuchungen von Geweben der weiblichen Brust konnten zu 100% den Her2-Status aus der immunhistochemischen Analyse bestätigen. Es wurden für Her2-positive Gewebe (Status 3+) Konzentrationen $> 0,4 \mu\text{g}/\text{mg}$ bestimmt, wohingegen Her2-negatives Gewebe mit $< 0,04 \mu\text{g}/\text{mg}$ gemessen werden konnte. Darüber hinaus wurden in Her2-negativen Proben mit einem Sandwich-Immunoassay Unterschiede in der basalen Expression gefunden. Alle als Her2-negativ eingestuften Gewebeproben lagen zudem unter einem klinisch relevanten Schwellenwert der Her2-Expression von $0,09 \mu\text{g}/\text{mg}$ ($500 \text{ fmol}/\text{mg}$) [Konecny *et al.* 2003].

Eine weitere Möglichkeit, Tumorgewebe anhand der Expression eines Markerproteins zu identifizieren, war der direkte Vergleich zum Normalgewebe der gleichen Patientin. Die basale Antigenexpression in Normalgeweben, die sich von Patientin zu Patientin unterscheiden kann, kann somit stets als interner Standard dienen. Somit spielen externe Faktoren wie Geschlecht, Alter oder Herkunft bei dem Versuch die Antigenexpression der einzelnen Patientinnen zu bewerten eine geringere Rolle. Durch Logarithmierung der gewonnenen Messwerte zur Basis 2 erscheinen Verdopplungen der Expression als eine Erhöhung um 1 und die Halbierung der Expression als -1. So zeigte sich für alle untersuchten Patientenproben eine stärkere Her2-Expression in Tumoren.

Die gezeigten Ergebnisse deuten generell darauf hin, dass sich das Format der Ankyrine als potentielle Fängermoleküle zum Nachweis in miniaturisierten Assaysystemen eignet und somit für weiterführende, parallelisierte Ansätze als eine interessante Alternative zu Antikörpern anbietet.

5. SUMMARY IN ENGLISH

The thesis “MINIATURISED AND PARALLELISED ASSAY SYSTEMS FOR THE CHARACTERISATION OF BINDING MOLECULES: DEVELOPMENTS TOWARDS THE DETECTION OF TUMOUR RELEVANT MARKER PROTEINS” is addressed to provide fast and efficient methods for the characterisation and selection procedures of binding molecules. For these purposes methods were developed for and with protein microarray based approaches. Antibodies and alternative binding molecules were used to develop an assay to analyse tumour relevant target proteins like EGFR and Her2.

In a first approach, a cell microarray based approach was tested to characterize cell surface specific antibodies. Cells were immobilised in microspots on a planar support and used to present their membrane bound antigens. Antibodies that bound to cell surface molecules were visualised with a fluorescent-based reporter system. This study shows the system’s capability to determine antibodies’ cross-reactivity and selectivity but lacks a long-term usage.

A focus of this thesis was the design of a screening procedure to examine binding properties of proteins from crude extracts using bead-based microarrays. Studying anti-GCN4 peptide specific single chain (scFv) antibodies as a model system, strategies and protocols for affinity determination, multiplexed epitope mapping and analysis of capture activity were developed. This was applied to the concept of the BMBF funded pepART project, where antibody microarrays are to be used for a peptide based proteome analysis. Signature peptides derived from an *in silico* tryptic digestion of the breast cancer marker proteins EGFR and Her2 were chosen, synthesized and selected for the generation of antibodies from the phage display library of the project partner MorphoSys AG. A total number of 3072 antibody clones were screened for specificity, cross-reactivity and expression using multiplexed bead based approaches. A panel of peptide specific binders for the major panning fragment could be selected from different panning protocols.

An approach to study functionality of cell surface receptors is the application of naturally interacting binding partners. Here, EGF had been immobilised on beads and

was utilised to capture functionally active EGFR in a ligand-binding assay. Characterised breast cancer patient samples were available and grouped at a clinical EGFR cut-off. Experimental results from the bead-based assay showed that a MFI-value of more than 50 AU always correlated with an EGFR expression level above cut-off. However, this assay system required membrane fractions of the tumour samples to achieve appropriate results and lacked sensitivity.

As binding molecules with an alternative scaffold, ankyrin repeat proteins specific for Her2 were studied. Directed immobilisation strategy and multiplexed bead-based assay were employed to select ankyrin clones as capture reagents for Her2 detection. An ankyrin-antibody sandwich immunoassay was developed and a standard protein was detected with sensitivity below 0.2 pM. Patient tissue samples were analyzed and 1 μ g of total protein lysate per assay was used to confirm the Her2 status of breast cancer samples that had been analysed in a routine clinical laboratory.

The assay developments for the characterisation of specific and affine binding molecules presented in this thesis employs and aids the progression of protein micorarray based approaches.

6. LITERATUR

Abd El-Rehim D. M., Pinder S. E., Paish C. E., Bell J. A., *et al.* (2004), Expression and co-expression of the members of the epidermal growth factor receptor (EGFR) family in invasive breast carcinoma. Br J Cancer **91**: 1532-1542.

Abedi M. R., Caponigro G. und Kamb A. (1998), Green fluorescent protein as a scaffold for intracellular presentation of peptides. Nucleic Acids Res **26**: 623-630.

Amstutz P., Forrer P., Zahnd C. und Plückthun A. (2001), In vitro display technologies: novel developments and applications. Curr Opin Biotechnol **12**: 400-405.

Amstutz P., Pelletier J. N., Guggisberg A., Jermutus L., *et al.* (2002), In vitro selection for catalytic activity with ribosome display. J Am Chem Soc **124**: 9396-9403.

Anderson N. L. und Anderson N. G. (1998), Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. Electrophoresis **19**: 1853-1861.

Arteaga C. L. (2002), Overview of epidermal growth factor receptor biology and its role as a therapeutic target in human neoplasia. Semin Oncol **29**: 3-9.

Barnstable C. J., Bodmer W. F., Brown G., Galfre G., *et al.* (1978), Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. Cell **14**: 9-20.

Battini J. L., Danos O. und Heard J. M. (1998), Definition of a 14-amino-acid peptide essential for the interaction between the murine leukemia virus amphotropic envelope glycoprotein and its receptor. J Virol **72**: 428-435.

Belov L., de la Vega O., dos Remedios C. G., Mulligan S. P. und Christopherson R. I. (2001), Immunophenotyping of leukemias using a cluster of differentiation antibody microarray. Cancer Res **61**: 4483-4489.

Berger A. E., Davis J. E. und Cresswell P. (1982), Monoclonal antibody to HLA-A3. Hybridoma **1**: 87-90.

Beste G., Schmidt F. S., Stibora T. und Skerra A. (1999), Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold. Proc Natl Acad Sci U S A **96**: 1898-1903.

Bieri C., Ernst O. P., Heyse S., Hofmann K. P. und Vogel H. (1999), Micropatterned immobilization of a G protein-coupled receptor and direct detection of G protein activation. Nat Biotechnol **17**: 1105-1108.

Binz H. K., Amstutz P., Kohl A., Stumpp M. T., *et al.* (2004), High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries. Nat Biotechnol **22**: 575-582.

Binz H. K., Stumpp M. T., Forrer P., Amstutz P. und Plückthun A. (2003), Designing repeat proteins: well-expressed, soluble and stable proteins from combinatorial libraries of consensus ankyrin repeat proteins. J Mol Biol **332**: 489-503.

Blawas A. S. und Reichert W. M. (1998), Protein patterning. Biomaterials **19**: 595-609.

Boutell J. M., Hart D. J., Godber B. L., Kozlowski R. Z. und Blackburn J. M. (2004), Functional protein microarrays for parallel characterisation of p53 mutants. Proteomics **4**: 1950-1958.

Braasch D. A. und Corey D. R. (2001), Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. Chem Biol **8**: 1-7.

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.

Brotherick I., Lennard T. W., Wilkinson S. E., Cook S., *et al.* (1994), Flow cytometric method for the measurement of epidermal growth factor receptor and comparison with the radio-ligand binding assay. Cytometry **16**: 262-269.

Brugge J. S. und McCormick F. (1999), Cell regulation intracellular networking. Curr Opin Cell Biol **11**: 173-176.

Burgess A. W., Cho H. S., Eigenbrot C., Ferguson K. M., *et al.* (2003), An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. Mol Cell **12**: 541-552.

Campana D., Thompson J. S., Amlot P., Brown S. und Janossy G. (1987), The cytoplasmic expression of CD3 antigens in normal and malignant cells of the T lymphoid lineage. J Immunol **138**: 648-655.

Carter P., Fendly B. M., Lewis G. D. und Sliwkowski M. X. (1999), Development of herceptin. Breast Dis **11**: 103-111.

Carter P., Presta L., Gorman C. M., Ridgway J. B., *et al.* (1992), Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. Proc Natl Acad Sci U S A **89**: 4285-4289.

Chipping Forecast II (2002), Nat Genet **32 Suppl**: 461-552.

Cohen B. A., Colas P. und Brent R. (1998), An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library. Proc Natl Acad Sci U S A **95**: 14272-14277.

- Colas P., Cohen B., Jessen T., Grishina I., *et al.* (1996), Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2. Nature **380**: 548-550.
- Cole S. R., Ashman L. K. und Ey P. L. (1987), Biotinylation: an alternative to radioiodination for the identification of cell surface antigens in immunoprecipitates. Mol Immunol **24**: 699-705.
- Diamandis E. P. und Christopoulos T. K. (1991), The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. Clin Chem **37**: 625-636.
- Disley D. M., Morrill P. R., Sproule K. und Lowe C. R. (1999), An optical biosensor for monitoring recombinant proteins in process media. Biosens Bioelectron **14**: 481-493.
- Dontha N., Nowall W. B. und Kuhr W. G. (1997), Generation of biotin/avidin/enzyme nanostructures with maskless photolithography. Anal Chem **69**: 2619-2625.
- Drouet M., Aussel L., Drenou B. und Fauchet R. (1995), Quantification and molecular analysis of plasmatic HLA-BCw molecules with a locus B and Cw HLA specific mAb (B1.23.2 mAb). Eur J Immunogenet **22**: 363-370.
- Ekins R. und Chu F. (1992), Multianalyte microspot immunoassay. The microanalytical 'compact disk' of the future. Ann Biol Clin (Paris) **50**: 337-353.
- Ekins R. P. (1989), Multi-analyte immunoassay. J Pharm Biomed Anal **7**: 155-168.
- Ekins R. P. (1998), Ligand assays: from electrophoresis to miniaturized microarrays. Clin Chem **44**: 2015-2030.
- Fan H., Villegas C., Chan A. K. und Wright J. A. (1998), Myc-epitope tagged proteins detected with the 9E10 antibody in immunofluorescence and immunoprecipitation assays but not in western blot analysis. Biochem Cell Biol **76**: 125-128.
- Fields G. B. und Noble R. L. (1990), Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. Int J Pept Protein Res **35**: 161-214.
- Finckh P., Berger H., Karl J., Eichenlaub U., *et al.* (1998), Microspot - an ultrasensitive microarray-based ligand assay system. A practical application of ambient analyte assay theory. Proc UK NEQAS Meeting **3**: 155-165.
- Fitzgibbons P. L., Page D. L., Weaver D., Thor A. D., *et al.* (2000), Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. Arch Pathol Lab Med **124**: 966-978.
- Fong S., Tsoukas C. D., Pasquali J. L., Fox R. I., *et al.* (1981), Fractionation of human lymphocyte subpopulations on immunoglobulin coated Petri dishes. J Immunol Methods **44**: 171-182.

- Forrer P., Stumpp M. T., Binz H. K. und Plückthun A. (2003), A novel strategy to design binding molecules harnessing the modular nature of repeat proteins. FEBS Lett **539**: 2-6.
- Freedman A. S. (1996), Cell surface antigens in leukemias and lymphomas. Cancer Invest **14**: 252-276.
- Friguet B., Chaffotte A. F., Djavadi-Ohanian L. und Goldberg M. E. (1985), Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. J Immunol Methods **77**: 305-319.
- Friguet B., Chaffotte A. F., Djavadi-Ohanian L. und Goldberg M. E. (1995), Under proper experimental conditions the solid-phase antigen does not disrupt the liquid phase equilibrium when measuring dissociation constants by competition ELISA. J Immunol Methods **182**: 145-150.
- Fukui S., Feizi T., Galustian C., Lawson A. M. und Chai W. (2002), Oligosaccharide microarrays for high-throughput detection and specificity assignments of carbohydrate-protein interactions. Nat Biotechnol **20**: 1011-1017.
- Gullick W. J. und Srinivasan R. (1998), The type 1 growth factor receptor family: new ligands and receptors and their role in breast cancer. Breast Cancer Res Treat **52**: 43-53.
- Gygi S. P., Corthals G. L., Zhang Y., Rochon Y. und Aebersold R. (2000), Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. Proc Natl Acad Sci U S A **97**: 9390-9395.
- Gygi S. P., Rochon Y., Franza B. R. und Aebersold R. (1999), Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. Mol Cell Biol **19**: 1720-1730.
- Haab B. B. (2003), Methods and applications of antibody microarrays in cancer research. Proteomics **3**: 2116-2122.
- Haab B. B., Dunham M. J. und Brown P. O. (2001), Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. Genome Biol **2**: RESEARCH0004.
- Haenel C., Satzger M., Ducata D. D., Ostendorp R. und Brocks B. (2005), Characterization of high-affinity antibodies by electrochemiluminescence-based equilibrium titration. Anal Biochem **339**: 182-184.
- Hanes J., Jermutus L., Weber-Bornhauser S., Bosshard H. R. und Plückthun A. (1998), Ribosome display efficiently selects and evolves high-affinity antibodies in vitro from immune libraries. Proc Natl Acad Sci U S A **95**: 14130-14135.
- Hanes J. und Plückthun A. (1997), In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. Proc Natl Acad Sci U S A **94**: 4937-4942.

- International Human Genome Sequencing Consortium (2004), Finishing the euchromatic sequence of the human genome. Nature **431**: 931-945.
- Jones S. und Thornton J. M. (1996), Principles of protein-protein interactions. Proc Natl Acad Sci U S A **93**: 13-20.
- Jonsson U., Fagerstam L., Ivarsson B., Johnsson B., *et al.* (1991), Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology. Biotechniques **11**: 620-627.
- Jungbluth A. A., Stockert E., Huang H. J., Collins V. P., *et al.* (2003), A monoclonal antibody recognizing human cancers with amplification/overexpression of the human epidermal growth factor receptor. Proc Natl Acad Sci U S A **100**: 639-644.
- Kaiser E., Colescott R. L., Bossinger C. D. und Cook P. I. (1970), Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. Anal Biochem **34**: 595-598.
- Karnes W. E., Jr., Weller S. G., Adjei P. N., Kottke T. J., *et al.* (1998), Inhibition of epidermal growth factor receptor kinase induces protease-dependent apoptosis in human colon cancer cells. Gastroenterology **114**: 930-939.
- Knappik A., Ge L., Honegger A., Pack P., *et al.* (2000), Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. J Mol Biol **296**: 57-86.
- Knezevic V., Leethanakul C., Bichsel V. E., Worth J. M., *et al.* (2001), Proteomic profiling of the cancer microenvironment by antibody arrays. Proteomics **1**: 1271-1278.
- Köhler G. und Milstein C. (1975), Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature **256**: 495-497.
- Konecny G., Pauletti G., Pegram M., Untch M., *et al.* (2003), Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. J Natl Cancer Inst **95**: 142-153.
- Lander E. S., Linton L. M., Birren B., Nusbaum C., *et al.* (2001), Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature **409**: 860-921.
- Lingelbach D. (2003), Neuartige Forschungs-Antikörper aus Bibliotheken durch Phagen Display. Laborwelt **3**: 38-39.
- Lue R. Y., Chen G. Y., Hu Y., Zhu Q. und Yao S. Q. (2004), Versatile protein biotinylation strategies for potential high-throughput proteomics. J Am Chem Soc **126**: 1055-1062.

Lueking A., Horn M., Eickhoff H., Bussow K., *et al.* (1999), Protein microarrays for gene expression and antibody screening. Anal Biochem **270**: 103-111.

Lundberg A. S. und Weinberg R. A. (1999), Control of the cell cycle and apoptosis. Eur J Cancer **35**: 1886-1894.

MacBeath G. (2002), Protein microarrays and proteomics. Nat Genet **32 Suppl**: 526-532.

MacBeath G., Koehler A. und Schreiber S. (1999), Printing small molecules as microarrays and detecting protein-ligand interactions en masse. J.Am.Chem.Soc. **121**: 7967-7968.

MacBeath G. und Schreiber S. L. (2000), Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. Science **289**: 1760-1763.

McCafferty J., Griffiths A. D., Winter G. und Chiswell D. J. (1990), Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. Nature **348**: 552-554.

McPherson K., Steel C. M. und Dixon J. M. (2000), ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. Bmj **321**: 624-628.

Merrifield R. B. (1963), The Synthesis of a Tetrapeptide. J Am Chem Soc **85**: 2149-2154.

Müller K. M., Arndt K. M., Bauer K. und Plückthun A. (1998), Tandem immobilized metal-ion affinity chromatography/immunoaffinity purification of His-tagged proteins--evaluation of two anti-His-tag monoclonal antibodies. Anal Biochem **259**: 54-61.

Natarajan K., Li H., Mariuzza R. A. und Margulies D. H. (1999), MHC class I molecules, structure and function. Rev Immunogenet **1**: 32-46.

Nelson C. A. und Fremont D. H. (1999), Structural principles of MHC class II antigen presentation. Rev Immunogenet **1**: 47-59.

Nicholson S., Sainsbury J. R., Needham G. K., Chambers P., *et al.* (1988), Quantitative assays of epidermal growth factor receptor in human breast cancer: cut-off points of clinical relevance. Int J Cancer **42**: 36-41.

Nieba L., Krebber A. und Plückthun A. (1996), Competition BIAcore for measuring true affinities: large differences from values determined from binding kinetics. Anal Biochem **234**: 155-165.

Nilsson J., Larsson M., Stahl S., Nygren P. A. und Uhlen M. (1996), Multiple affinity domains for the detection, purification and immobilization of recombinant proteins. J Mol Recognit **9**: 585-594.

Nord K., Gunneriusson E., Ringdahl J., Stahl S., *et al.* (1997), Binding proteins selected from combinatorial libraries of an alpha-helical bacterial receptor domain. Nat Biotechnol **15**: 772-777.

Notredame C., Higgins D. G. und Heringa J. (2000), T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. J Mol Biol **302**: 205-217.

Oncogene (2005), HER-2/neu Mikrotiterplate ELISA (for Research Use Only), Bayer HealthCare, Zugriff auf http://oncogene.com/pdfs/HER2text_ruo.pdf erfolgte am 29.03.2005

Ornstein D. K., Rayford W., Fusaro V. A., Conrads T. P., *et al.* (2004), Serum proteomic profiling can discriminate prostate cancer from benign prostates in men with total prostate specific antigen levels between 2.5 and 15.0 ng/ml. J Urol **172**: 1302-1305.

Parham P. und Brodsky F. M. (1981), Partial purification and some properties of BB7.2. A cytotoxic monoclonal antibody with specificity for HLA-A2 and a variant of HLA-A28. Hum Immunol **3**: 277-299.

Pauletti G., Godolphin W., Press M. F. und Slamon D. J. (1996), Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. Oncogene **13**: 63-72.

Pawletz C. P., Charboneau L., Bichsel V. E., Simone N. L., *et al.* (2001), Reverse phase protein microarrays which capture disease progression show activation of pro-survival pathways at the cancer invasion front. Oncogene **20**: 1981-1989.

Pennisi E. (2003), Human genome. Reaching their goal early, sequencing labs celebrate. Science **300**: 409.

Petricoin E. F. und Liotta L. A. (2002), Proteomic analysis at the bedside: early detection of cancer. Trends Biotechnol **20**: S30-34.

Poetz O., Schwenk J. M., Kramer S., Stoll D., *et al.* (2005), Protein microarrays: catching the proteome. Mech Ageing Dev **126**: 161-170.

Price J. T., Wilson H. M. und Haites N. E. (1996), Epidermal growth factor (EGF) increases the in vitro invasion, motility and adhesion interactions of the primary renal carcinoma cell line, A704. Eur J Cancer **32A**: 1977-1982.

Prickett K. S., Amberg D. C. und Hopp T. P. (1989), A calcium-dependent antibody for identification and purification of recombinant proteins. Biotechniques **7**: 580-589.

Qiagen (2003), LiquiChip™ Applications Handbook for protein-based suspension arrays, Qiagen GmbH, Zugriff auf http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/PDF/Protein/Assay/LC_LiquiChip/1025177_HB_LCH_0703.pdf erfolgte am 24.02.2005

Reineke U. Antibody Engineering (2003), Antibody Epitope Mapping Using Arrays of Synthetic Peptides. Methods Mol Biol, Humana Press, Totowa **248**: 443-463.

Sachs L. (1996), Angewandte Statistik, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York; **8**: 149 ff.

Salgar S. K., Paape M. J. und Alston-Mills B. (1993), Enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometric methods to screen hybridoma culture supernatants for antibodies to bovine neutrophil surface antigens, and monoclonal antibody production and characterization. Am J Vet Res **54**: 1415-1425.

Sanders G. H. W. und Manz A. (2000), Chip-based microsystems for genomic and proteomic analysis. Trends in Analytical Chemistry **19**: 364-378.

Schatz P. J. (1993), Use of peptide libraries to map the substrate specificity of a peptide-modifying enzyme: a 13 residue consensus peptide specifies biotinylation in Escherichia coli. Biotechnology (N Y) **11**: 1138-1143.

Schier R., McCall A., Adams G. P., Marshall K. W., *et al.* (1996), Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site. J Mol Biol **263**: 551-567.

Schweitzer B., Roberts S., Grimwade B., Shao W., *et al.* (2002), Multiplexed protein profiling on microarrays by rolling-circle amplification. Nat Biotechnol **20**: 359-365.

Schwenk J. M. (2001), Diplomarbeit: Zellbasierende Mikroarrays - orts aufgelöste Immunoassays zum Nachweis von Zelloberflächenmolekülen. Fakultät für Chemie und Pharmazie, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.

Sedgwick S. G. und Smerdon S. J. (1999), The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. Trends Biochem Sci **24**: 311-316.

Shafer D. E., Inman J. K. und Lees A. (2000), Reaction of Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) with maleimide and alpha-haloacyl groups: anomalous elution of TCEP by gel filtration. Anal Biochem **282**: 161-164.

Skerra A. (2001), 'Anticalins': a new class of engineered ligand-binding proteins with antibody-like properties. J Biotechnol **74**: 257-275.

Slamon D. J., Godolphin W., Jones L. A., Holt J. A., *et al.* (1989), Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science **244**: 707-712.

Soomets U., Hallbrink M. und Langel U. (1999), Antisense properties of peptide nucleic acids. Front Biosci **4**: 782-786.

Spitzer E., de Los Angeles M., Perez R. und Grosse R. (1989), Binding properties of biotinylated epidermal growth factor to its receptor on cultured cells and tissue sections. J Cell Biochem **41**: 47-56.

Sreekumar A., Nyati M. K., Varambally S., Barrette T. R., *et al.* (2001), Profiling of cancer cells using protein microarrays: discovery of novel radiation-regulated proteins. Cancer Res **61**: 7585-7593.

SRS (2003), Sequence Retrieval System - Digest Tool, LION Bioscience AG, Zugriff auf <http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz> erfolgte am 16.12.2003

Stoll D., Bachmann J., Templin M. F. und Joos T. O. (2004), Microarray technology: an increasing variety of screening tools for proteomic research. Targets **3**: 24-31.

Stoll D., Bachmann J., Templin M. F. und Joos T. O. (2004), Microarray technology: an increasing variety of screening tools for proteomic research. Drug Discov Today **9**: S10-S17.

Stumpp M. T., Forrer P., Binz H. K. und Plückthun A. (2003), Designing repeat proteins: modular leucine-rich repeat protein libraries based on the mammalian ribonuclease inhibitor family. J Mol Biol **332**: 471-487.

Swiss-Prot (2003), Datenbank für Proteinsequenzen, Swiss Institute of Bioinformatics, Zugriff auf <http://au.expasy.org/> erfolgte am 16.12.2003

T-Coffee (2002), Sequence Alignment, Swiss node of EMBnet, Zugriff auf <http://www.ch.embnet.org/software/TCoffee.html> erfolgte am 14.06.2004

Templin M. F., Stoll D., Schwenk J. M., Poetz O., *et al.* (2003), Protein microarrays: promising tools for proteomic research. Proteomics **3**: 2155-2166.

Ullrich A. und Schlessinger J. (1990), Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. Cell **61**: 203-212.

Venter J. C., Adams M. D., Myers E. W., Li P. W., *et al.* (2001), The sequence of the human genome. Science **291**: 1304-1351.

Waterfield M. D., Mayes E. L., Stroobant P., Bennet P. L., *et al.* (1982), A monoclonal antibody to the human epidermal growth factor receptor. J Cell Biochem **20**: 149-161.

Wells A. (1999), EGF receptor. Int J Biochem Cell Biol **31**: 637-643.

Weston A. D. und Hood L. (2004), Systems biology, proteomics, and the future of health care: toward predictive, preventative, and personalized medicine. J Proteome Res **3**: 179-196.

Wilson D. S., Keefe A. D. und Szostak J. W. (2001), The use of mRNA display to select high-affinity protein-binding peptides. Proc Natl Acad Sci U S A **98**: 3750-3755.

Wilson W. C., Jr. und Boland T. (2003), Cell and organ printing 1: protein and cell printers. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol **272**: 491-496.

Wulfkühle J. D., Liotta L. A. und Petricoin E. F. (2003), Proteomic applications for the early detection of cancer. Nat Rev Cancer **3**: 267-275.

Xu L., Aha P., Gu K., Kuimelis R. G., *et al.* (2002), Directed evolution of high-affinity antibody mimics using mRNA display. Chem Biol **9**: 933-942.

Xu T., Jin J., Gregory C., Hickman J. J. und Boland T. (2005), Inkjet printing of viable mammalian cells. Biomaterials **26**: 93-99.

Zahnd C., E. W., Schwenk J. M., Steiner D., *et al.* (2005), A designed ankyrin repeat protein with picomolar affinity to Her2 (in Vorbereitung).

Zahnd C., Spinelli S., Luginbühl B., Amstutz P., *et al.* (2004), Directed in vitro evolution and crystallographic analysis of a peptide-binding single chain antibody fragment (scFv) with low picomolar affinity. J Biol Chem **279**: 18870-18877.

Zahnd C., Spinelli S., Luginbühl B., Jermutus L., *et al.* (2004), Three-Dimensional Structure Of A Single Chain Fv Fragment Complexed With The Peptide Gcn4(7P-14P), Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB), Zugriff auf <http://www.rcsb.org/pdb/index.html> erfolgte am 18.11.2004

Zeillinger R., Kury F., Speiser P., Sliutz G., *et al.* (1993), EGF-R and steroid receptors in breast cancer: a comparison with tumor grading, tumor size, lymph node involvement, and age. Clin Biochem **26**: 221-227.

Zhen Y., Caprioli R. M. und Staros J. V. (2003), Characterization of glycosylation sites of the epidermal growth factor receptor. Biochemistry **42**: 5478-5492.

Zhu H., Bilgin M., Bangham R., Hall D., *et al.* (2001), Global analysis of protein activities using proteome chips. Science **293**: 2101-2105.

Zhu H., Klemic J. F., Chang S., Bertone P., *et al.* (2000), Analysis of yeast protein kinases using protein chips. Nat Genet **26**: 283-289.

Ziauddin J. und Sabatini D. M. (2001), Microarrays of cells expressing defined cDNAs. Nature **411**: 107-110.

Ziegler A., Heinig J., Müller C., Götz H., *et al.* (1986), Analysis by sequential immunoprecipitations of the specificities of the monoclonal antibodies TU22,34,35,36,37,39,43,58 and YD1/63.HLK directed against human HLA class II antigens. Immunobiology **171**: 77-92.

7. PUBLIKATIONSLISTE

- * Zahnd C, Wyler E, Schwenk JM, Steiner D, Ward C, Pecorari F, Joos TO and Plückthun A (2005) A designed ankyrin repeat protein with picomolar affinity to Her2 (in Vorbereitung)
- Poetz O, Ostendorp R, Brocks B, Schwenk JM, Stoll D, Joos TO and Templin MF (2005) Protein Microarrays for Antibody Profiling: Specificity and Affinity Determination on a Chip. *Proteomics* (im Druck)
- Poetz O, Schwenk JM, Kramer S, Templin MF and Joos TO (2005) Protein Microarrays: Catching the Proteome. *Mechanisms of Ageing and Development* 126(1): 161 – 170
- Templin MF, Stoll D, Schwenk JM, Poetz O, Kramer S and Joos TO (2003) Protein Microarrays: Promising tool for proteomic research. *Proteomics* 3: 2155 – 2166
- Schwenk JM and Poetz O (2003) Cell Microarrays – Present and Future Applications. *Screening* 5(4): 36 – 37
- * Schwenk JM, Stoll D, Templin MF and Joos TO (2002) Cell Microarrays: An Emerging Technology for the Characterization of Antibodies. *Biotechniques* S33: 54 – 61

Teile dieser Arbeit sind in die mit * markierten Publikationen eingegangen.

8. DANKSAGUNG

Prof. Dr. Stefan Stevanović gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des interessanten Themas und die exzellente Betreuung während der Durchführung dieser Arbeit. **Prof. Dr. Michael Schwarz** danke ich die Bereitschaft, das Zweitgutachten dieser Dissertation zu übernehmen.

Mein besonderer Dank gilt **Dr. Thomas Joos, Dr. Dieter Stoll** und **Dr. Markus Templin** (Reutlingen) und deren immerwährender Unterstützung in menschlicher, fachlicher und finanzieller Hinsicht, was zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Für die unermüdliche Hilfsbereitschaft bei Peptidsynthese und Analytik danke ich **Markus Hermann**. Für die großartige Arbeitsatmosphäre und fruchtbare Unterstützungen danke ich meinen Kollegen **Oliver Pötz, Michael Hartmann, Stefan Kramer** und **Dr. Stefan Pabst**. Danke an alle **Mitgliedern der Arbeitsgruppe Biochemie am NMI**, die zwar namentlich nicht erwähnt wurden, aber ihren unterstützenden Beitrag zu meiner Arbeit geleistet haben.

Christian Zahnd, Kaspar Binz, Beatrice Lunginbühl und **Prof. Dr. Andreas Plückthun** (Zürich) danke ich für die ausgezeichnete Kooperation und die Bereitstellung der Binder. **Dr. Ralf Ostendorp, Dr. Achim Weidmann, Dr. Bodo Brocks** und **Dr. Achim Knappik** (MorphoSys) danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit im Rahmen des pepART-Projektes. Bei **Dr. Nicole Schneiderhan-Marra, Dr. Helmut Deissler** und **Dr. Robert Zeillinger** (Ulm) möchte ich mich für die Bereitstellung und Aufarbeitung der Tumorproben bedanken.

Meinen Freunden gilt für ihre aktive und passive Unterstützung besonderer Dank.

Meinen Eltern gebührt durch ihre fortwährende seelische und moralische Unterstützung herzlichster Dank.

Andrea verdient Dank für so viele Dinge, besonders aber dafür, dass sie mir immer zur Seite stand.

9. AKADEMISCHE LEHRER

Dr. Albert	Dr. Jung	Dr. Rammensee
Dr. Bayer	Dr. Kalbacher	Dr. Reinecke
Dr. Bisswanger	Dr. Kissling	Dr. Reutter
Dr. Bock	Dr. Lindner	Dr. Schwarz
Dr. Bohley	Dr. Mayer	Dr. Stevanović
Dr. Breyer-Pfaff	Dr. Mecke	Dr. Stoeva
Dr. Buchmann	Dr. Münzel	Dr. Strähle
Dr. Dringen	Dr. Nakel	Dr. Voelter
Dr. Eisele	Dr. Oberhammer	Dr. Voigt
Dr. Gauglitz	Dr. Overath	Dr. Weber
Dr. Günzl	Dr. Pfaff	Dr. Wegmann
Dr. Häfelinger	Dr. Pfeiffer	Dr. Werringloer
Dr. Hagenmaier	Dr. Pommer	Dr. Weser
Dr. Hamprecht	Dr. Poralla	Dr. Wiesinger
Dr. Hanack	Dr. Probst	

10. LEBENS LAUF

NAME JOCHEN MARTIN SCHWENK

Geburtsdatum 11. September 1974

Geburtsort München

03/2002 – 06/2005 DOKTORARBEIT

“Miniaturisierte und parallelisierte Assaysysteme zur Charakterisierung von Bindemolekülen: Entwicklungen für den Nachweis tumorrelevanter Markerproteine”

Betreuer: Prof. Dr. S. Stevanović

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Zellbiologie in der Abteilung für Immunologie der Universität Tübingen und am NMI in Reutlingen durchgeführt.

04/2001 – 12/2001 DIPLOMARBEIT

“Zellbasierende Mikroarrays – orts aufgelöste Immunoassays zum Nachweis von Zelloberflächenmolekülen”

Betreuer: Prof. Dr. U. Weber

04/1996 – 12/2001 DIPLOM IN BIOCHEMIE

Eberhard Karls Universität Tübingen

10/1994 – 12/ 1995 ZIVILDIENTST

Arbeiterwohlfahrt, Karlsruhe

09/1985 – 06/1994 GYMNASIUM

1991 – 1994 Helmholtz-Gymnasium, Karlsruhe

1985 – 1991 Gymnasium am Schelmenbusch, Karlsbad

09/1981 – 06/1985 GRUNDSCHULE

Anne-Frank Grundschule, Waldbronn