

Aus dem Forschungszentrum Borstel
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
Abteilung Klinische Medizin
Direktor: Prof. Dr. Peter Zabel

Entwicklung eines Hochdurchsatz-Proteolysetests und Analyse der Proteolyseresistenz von Peptidepitopen

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät -

vorgelegt von

Hans-Heiner Gorris

aus Goch

Lübeck 2005

Erstberichterstatter:

Prof. Dr. Peter K. Müller

Zweitberichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. Andreas Frey

Tag der mündlichen Prüfung:

30. November 2005

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
I Einleitung	1
I.1 Bedarf es eines neuen Proteolysetests?	1
I.2 Etablierte Verfahren	2
I.2.1 Physikalische Trennung	2
I.2.2 Chromogene Substrate	3
I.2.3 FRET-Substrate	3
I.2.4 Immunoverfahren	5
I.2.5 Festphasengebundene Peptidsubstratbibliotheken	6
I.2.6 Enzymfragment-Komplementierung	7
I.3 Proteasestabilität von Schluckimpfstoffen	7
I.3.1 Das Mukosale Immunsystem	7
I.3.2 Vorteile und Schwierigkeiten einer oralen Immunisierung	10
I.4 Hypothese und experimenteller Aufbau eines Proteolysetests	12
II Materialien und Methoden	14
II.1 Materialien und Bezugsquellen	14
II.1.1 Tiere	14
II.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterial	14
II.1.3 Lösungsmittel und Chemikalien für die Peptidsynthese	15
II.1.4 Bausteine für die Peptidsynthese	15
II.1.4.1 Fmoc-geschützte Aminosäurederivate	15
II.1.4.2 Weitere Synthesebausteine	17
II.1.5 Chemikalien	17
II.1.6 Proteine und Peptide	18
II.1.7 Nachweissysteme	19
II.1.8 Software	19
II.2 Häufig verwendete Puffer	20
II.3 Peptidsynthese	21
II.3.1 Vorbereitung der Reagenzien für die Synthese	22
II.3.2 Häufig verwendete Lösungen	24
II.3.3 Derivatisierung der Zellulosefilter	24
II.3.4 Bestimmung des Derivatisierungsgrads der Filter	25

II.3.5 Definition der SPOTs	26
II.3.6 Verlängerung der Peptidketten	28
II.3.6.1 Herstellung der Fmoc-Aminosäure-OBt-Lösungen	28
II.3.6.2 Kupplungsreaktion	28
II.3.7 Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen	29
II.3.8 Abspaltung der Peptide vom Zellulosefilter	30
II.4 Quantifizierung von festphasengebundenen Peptiden	31
II.5 ESI-Massenspektrometrie von gelösten Peptiden	32
II.6 Proteinchemische Arbeiten	32
II.6.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	32
II.6.1.1 Proteinbestimmung nach Lowry	33
II.6.1.2 Proteinbestimmung mit BCA-Assay	33
II.6.2 Gelelektrophorese und Proteinfärbung	33
II.6.2.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	34
II.6.2.2 Coomassie Färbung	35
II.6.2.3 Färbung mit Sypro-Ruby	36
II.7 Arbeiten mit Enzymlösungen	37
II.7.1 Präparation einer Darmlavage	37
II.7.2 Bestimmung von Enzymkonzentrationen	37
II.8 Immunoverfahren	38
II.8.1 Häufig verwendete Lösungen	39
II.8.2 IgA-Bestimmung	40
II.8.3 Fänger-ELISA	41
II.8.4 Proteolysetest	41
III Ergebnisse	43
III.1 Herstellung der Peptide	43
III.1.1 Optimierung der Kupplungseffizienz	43
III.1.2 Abspaltung der Peptide vom Zellulosefilter	45
III.1.3 Analyse der gelösten Peptide mittels ESI-Massenspektrometrie	45
III.2 Konzentration und Reinheit der Fänger-Antikörper	47
III.3 Aufbau und Optimierung des Fänger-ELISAs	49
III.3.1 Anti-DNP- und Anti-2,4-D-Antikörper im Vergleich	51
III.3.2 Einfluß von 2,4-D-Derivaten und -Kombinationen auf die Affinität	54
III.3.3 Einfluß der Länge von 2,4-D-Aminocarbonsäuren auf die Affinität	55

III.4 Anwendbarkeit des Fänger-ELISAs mit beliebigen Sequenzmotiven	56
III.4.1 Peptidsynthesemenge: Einfluß auf MaxOD und Quantifizierung	57
III.4.2 Robustheit des Fänger-ELISAs gegenüber Störsubstanzen	59
III.4.3 Einfluß von Detergenzien	60
III.5 Plattenbindung	61
III.5.1 Ursache der Plattenbindung	63
III.5.2 Beseitigung der Plattenbindung	65
III.6 Proteolysetest	69
III.6.1 Stabilität der Trypsin- und Chymotrypsinlösung	70
III.6.2 Enzymverdünnung gegen Inkubationszeit	70
III.6.3 Inhibitionsmessungen	72
III.6.4 Vollständigkeit des Substratabbaus	73
III.6.5 Einfluß der Flankierungen auf die $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte	74
III.6.6 Vergleich des Proteolysetests mit anderen Verfahren	76
III.7 Präparation einer murinen Darmlavage	78
III.8 Anwendung des Proteolysetests mit einer Darmlavage	78
III.8.1 Stabilität der Peptidmarkierungen und -flankierungen	79
III.8.2 Halbwertszeiten von Peptidpitopen in einer murinen Darmlavage	80
IV Diskussion	83
IV.1 Spezifische und unspezifische Peptidbindung an die Mikrotiterplatte	85
IV.2 Grenzen der enzymkinetischen Auswertung	91
IV.3 Proteolysestabilität von potentiellen Peptidpitopen	92
IV.4 Diagnostische Anwendungsmöglichkeiten des Proteolysetests	94
V Zusammenfassung	95
VI Literaturverzeichnis	96
VII Anhang	102
VII.1 Herleitung der im Ergebnisteil verwendeten Gleichungen	102
VII.1.1 Peptidbindung an den Fängerantikörper	102
VII.1.2 Enzymkinetik	105
VII.1.3 Inhibitionsmessungen	108
VII.2 Aminosäuresequenzen	110
VII.2.1 Modellantigen Ovalbumin	110
VII.2.2 Modellallergen Ara h6	110

VII.3 Überlappende Ovalbuminpeptide im 2er-Vorschub und ihre Halbwertszeiten in einer murinen Darmlavage	111
VIII Danksagung	115
IX Lebenslauf	116

Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren sind nach dem Standard Ein- bzw. Dreibuchstabencode angegeben.

Å	Ångström
A. bidest.	zweifach destilliertes Wasser
α	Sättigungsgrad
Abb.	Abbildung
Acm	Acetamidomethyl
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
ad	bis zu
AIDS	engl.: acquired immunodeficiency syndrome
Ak	Antikörper
ANOVA	Analyse der Varianz
Aun	Aminoundecansäure
BCA	Bicinchoninsäure
BHQ	engl.: Black Hole Quencher
BLU	engl.: Boehringer Light Units
Boc	tertiär-Butoxycarbonyl (t-Boc)
BPB	Bromphenolblau
CD	engl.: cluster of differentiation
cm	Zentimeter
D	lat.: dextro
D-PBS	engl.: Dulbecco's phosphate buffered saline
Δ	Differenz
DABCYL	4-{[4-(Dimethylamino)-phenyl]-azo}-benzoesäure
DICD	Diisopropylcarbodiimid
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNP	Dinitrophenyl
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
2,4-D-Aun	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure-Aminoundecansäure-Konjugat
2,4-DE	2,4-Dichlorphenylessigsäure
2,4-DB	2,4-Dichlorphenoxybuttersäure
[E]	Enzymkonzentration
EC50	effektive Konzentration

EDANS	5-(2-Aminoethylamino)-1-Naphtalinsulfonsäure
ELISA	engl.: enzyme-linked immunosorbent assay
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
et al.	und andere
FAE	Follikel-assoziiertes Epithel
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FRET	Fluoreszenz bzw. Förster Resonanz Energie Transfer
g	Gramm
$\times g$	Vielfaches der Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
HEA	heterogener Enzymassay
Hg	Hintergrund
HIV	engl.: human immunodeficiency virus
HOBt	N-Hydroxybenzotriazol
[I]	Inhibitorkonzentration
IgA	Immunglobulin der Klasse A
ISCOM	Immunstimulierender Komplex
K_a	Assoziationskonstante
k_{cat}	katalytische Konstante
K_i	Inhibitionskonstante
$K_{i,app}$	scheinbare Inhibitionskonstante
K_M	Michaelis-Konstante
l	Liter
L	lat.: laevo
λ	Wellenlänge
L-PBS	engl.: „Lite“ phosphate buffered saline
m	milli (10^{-3})
M	molar
m/z	Masse/Ladung
M-Zelle	engl.: microfold cell / membranous cell
μ	mikro (10^{-6})
mA	milli-Ampere
MaxOD	maximale optische Dichte
MeIm	N-Methylimidazol

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute(n)
MW	Molekulargewicht
n	nano (10^{-9})
n.b.	nicht bestimmt
nm	Nanometer
NMP	1-Methyl-2-Pyrrolidon
OD	optische Dichte
OPfp	Pentafluorphenylester
OtBu	tertiär-Butylester
p	pico (10^{-12})
p.a.	zur Analyse
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
Pe	Peptid
PEG	Polyethylenglycol
PI	Proteaseinhibitor
PLSD	engl.: protected least significant difference
pNA	para-Nitroanilid
RP-HPLC	engl.: Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography
RIA	Radioimmunoassay
RT	Raumtemperatur
s, sec	Sekunde(n)
[S]	Substratkonzentration
SDS	Natriumdodecylsulfat
Seq	Sequenzmotiv
SIF	simulierte Intestinalflüssigkeit
t	Zeit
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
T-Zelle	im Thymus geprägter Lymphozyt
Tab.	Tabelle
tBu	O-tertiär-Butyl
TFA	Trifluoressigsäure
TGF	engl.: transforming growth factor
TIBS	Triisobutylsilan

TMB	Tetramethylbenzidin
Trt	Trityl
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolett
V_0	Reaktionsgeschwindigkeit der nicht inhibierten Reaktion
v_i	Reaktionsgeschwindigkeit der inhibierten Reaktion
WHO	Weltgesundheitsorganisation
% (v/v)	Volumen pro Volumen
% (w/v)	Gewicht pro Volumen

I Einleitung

I.1 Bedarf es eines neuen Proteolysetests?

In den letzten Jahren finden sich wieder vermehrt Arbeiten auf dem Gebiet der Enzymkinetik, insbesondere über Proteasen. So lautet der Titel eines Übersichtsartikels zu diesem Thema: „Protease Degradomics: A New Challenge für Proteomics“ (Lopez-Otin und Overall, 2002). Die Aktualität des Themas ergibt sich aus der Bedeutung, die den Proteasen als eine der wichtigsten Enzymklassen zukommt. Proteasen katalysieren den hydrolytischen Abbau von Proteinen und nehmen eine Schlüsselstellung im Stoffwechsel und bei der Kontrolle biologischer Prozesse bei allen Organismen ein. Selbst für einige Viren sind sie essentiell.

Die Proteasen werden nach ihrem katalytischen Mechanismus in Serin-, Cystein-, Carboxy- und Metalloproteasen eingeteilt. Proteasen, die den Abbau von Peptiden hydrolysieren, werden als Peptidasen bezeichnet, unter denen Exopeptidasen einzelne Aminosäuren von den Enden einer Peptidkette freisetzen und Endopeptidasen ihre Substrate im Inneren der Peptidkette spalten. Der Wirkungsbereich von Proteasen umfaßt einerseits sehr spezifische Proteolysen, die bei der Regulation von Stoffwechselprozessen erforderlich sind und als „Proteolytische Prozessierung“ bezeichnet werden. Auf der anderen Seite gibt es auch relativ unspezifische Proteasen wie zum Beispiel die Verdauungsenzyme des Dünndarms Trypsin, Chymotrypsin und Elastase, die zu den Serinproteasen und Endopeptidasen gehören.

Während in der Vergangenheit die Enzyme selbst sowie ihr katalytischer Mechanismus Hauptgegenstand der Untersuchung waren, richtet sich der Fokus in der medizinischen Anwendung besonders auf ihre Substrate und Inhibitoren, die in möglichst großer Zahl gleichzeitig durch sogenannte Hochdurchsatzverfahren („High-throughput screening“) getestet werden sollten. Für die Entwicklung pharmazeutischer Wirkstoffe auf Peptid- oder Proteinbasis, die zur oralen Verabreichung vorgesehen sind, ist es notwendig, ihre Proteolysestabilität im Gastrointestinaltrakt zu überprüfen. Das gilt insbesondere auch für Impfstoffe auf Peptidbasis, deren Hydrolyseempfindlichkeit gegenüber den Verdauungsenzymen des Dünndarms im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden soll. Die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Immunisierung, zu denen die Proteolysestabilität gehört, werden im zweiten Teil der Einleitung erörtert.

Andere medizinische Anwendungen von Proteolysetests sind die Messung von Proteaseunter- oder -überproduktion im Körper sowie Störungen bei der Kontrolle ihrer enzymatischen Wirkung, die schwerwiegende Erkrankungen auslösen können. Bei einer Unterproduktion wird der Mangel durch Proteasesupplementierung ausgeglichen, bei einer Überfunktion kommen Proteaseinhibitoren zum Einsatz. Die Verwendung von Proteaseinhibitoren bietet sich auch für die Therapie von Infektionskrankheiten an, bei denen Proteasen des Erregers zur Infektion und seiner Vermehrung im Wirt erforderlich sind. Zeigt der Erreger, wie z.B. das HI-Virus (AIDS) (Patick und Potts, 1998) oder *Plasmodium falciparum* (Malaria) (Blackman, 2000), jedoch eine starke genetische Drift, bilden sich rasch Resistenzen gegen bestimmte Inhibitoren aus, und es müssen neue Wirkstoffe entwickelt werden, deren Effizienz mit Proteolysetests überprüft wird.

I.2 Etablierte Verfahren

Für alle Enzymtests ist die genaue Verfolgung der Konzentrationsänderungen von Substrat und Produkt als Grundlage für enzymkinetische Analysen ein zentraler aber auch kritischer Punkt. Da Substrat und Produkt meistens kleine Moleküle sind, die sich zudem nur wenig voneinander unterscheiden, müssen spezifische und empfindliche Nachweisverfahren angewandt werden. Im folgenden wird der Stand der Technik auf dem Gebiet der Proteolysetests vorgestellt.

I.2.1 Physikalische Trennung

Größere Spaltungsfragmente einer proteolytischen Hydrolyse können elektrophoretisch getrennt und anschließend durch Antikörper nachgewiesen werden. Allerdings sind dafür sowohl genaue Kenntnisse über die zu erwartenden Fragmente als auch gegen diese Fragmente gerichtete Antikörper erforderlich. Chromatographische Analysen leiden unter ähnlichen Problemen wie eine elektrophoretische Trennung. Eine gute Trennung von Proteinfragmenten kann aber mit der Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) erfolgen. In Kombination mit massenspektrometrischer Analyse können die Hydrolysefragmente identifiziert werden (Coombs et al., 1996).

I.2.2 Chromogene Substrate

Seit den 1950iger und 60iger Jahren werden chromogene Substrate verwendet, mit denen die Zunahme der Produktkonzentration direkt photometrisch verfolgt werden kann. Bei chromogenen Substraten wird die aminoternale Seite einer Spaltungsstelle von einem definierten Sequenzmotiv gebildet und die carboxyterminale Seite von einer chromogenen Gruppe. Sequenzmotiv und chromogene Gruppe sind über eine Ester- oder Amidbindung konjugiert, so daß die chromogene Gruppe ihre Farbigkeit verliert. Auf diese Weise wird die Spaltungsstelle eines natürlichen Substrates imitiert. Bei der proteolytischen Substratspaltung wird die chromogene Gruppe proportional zum Produkt freigesetzt und photometrisch nachgewiesen. Eine detaillierte Beschreibung dieses Verfahrens und der daraus abgeleiteten Enzymkinetik ist in Bender et al. (1966) enthalten. Die spezifische Erkennung und Bindung einer Peptidkette durch Endopeptidasen wird zwar hauptsächlich durch das Sequenzmotiv auf der aminoterminalen Seite der Spaltungsstelle definiert. Dennoch beeinflußt auch die carboxyterminale Seite der Spaltungsstelle und die Art der chemischen Bindung die Spaltbarkeit. Je nach Art der chromogenen Gruppe und ihrer Bindung an die Aminosäure kann sich die katalytische Effizienz der enzymatischen Umsetzung um mehrere Größenordnungen unterscheiden (Schellenberger et al., 1991). Für die Nachweisbarkeit der chromogenen Gruppe ist es aber unabdingbar, daß sie direkt an die Spaltungsstelle angrenzt, denn nur dann wird sie in der farbigen Form freigesetzt und kann nachgewiesen werden. Der Einsatz chromogener Substrate ist daher auf ein begrenztes Repertoire künstlicher Substrate beschränkt.

I.2.3 FRET-Substrate

Fluoreszenz bzw. Förster Resonanz Energie Transfer (FRET) ist eine entfernungsabhängige Interaktion zwischen den elektronenangeregten Zuständen von zwei Farbstoffmolekülen, bei denen Energie von einem Donor- auf ein Akzeptormolekül übertragen wird, so daß die Lichtemission des Donors in Anwesenheit des Akzeptors verhindert wird („Quenching“). Die ersten Anwendungen von FRET-basierten Proteasesubstraten gehen auf die 1970iger Jahre zurück (Latt et al., 1972; Yaron et al., 1979). Donor und Akzeptor schließen an den beiden Enden einer Peptidkette die Spaltungsstelle ein, und es erfolgt keine Lichtemission. Erst infolge der räumlichen Trennung von Donor und Akzeptor durch Proteolyse der Peptidkette emittiert der Donor Licht, das photometrisch gemessen wird. Dieses Verfahren ist bis heute die bevorzugte Methode zur Messung der Proteaseaktivität,

da es im Gegensatz zu chromogenen Substraten amino- und carboxyterminal eine weitgehend freie Wahl der Spaltungsstelle erlaubt. Allerdings sind auch mit diesem Verfahren einige Nachteile verbunden. Neben der schlechten Wasserlöslichkeit der meisten Donor-Akzeptor-Paare sinkt die Effektivität der strahlungslosen Energieübertragungen zwischen Donor und Akzeptor mit der sechsten Potenz ihrer intramolekularen Entfernung, was sich in einem Anstieg der Hintergrundfluoreszenz bei Verlängerung der Peptidkette bemerkbar macht (Stryer und Haugland, 1967). Eines der effektivsten Donor-Akzeptor-Paare ist 5-(2-Aminoethylamino)-1-Naphtalinsulfonsäure (EDANS) in Kombination mit 4-[[4-(Dimethylamino)-phenyl]-azo]-benzoesäure (DABCYL). DABCYL eignet sich gut als Akzeptor, da es die aufgenommene Energie in Form von Wärme abgibt („Black Hole Quencher (BHQ)“) und das Hintergrundsignal nicht durch Lichtemission des Akzeptors erhöht wird. Mit diesem Paar sind Peptidsubstrate mit einer maximalen Länge von 11 Aminosäuren verwendet worden (Wang et al., 1993). Die Signalauslöschung durch den Akzeptor beschränkt sich jedoch nicht nur auf den gewünschten intramolekularen Effekt, sondern findet in Abhängigkeit von der Substratkonzentration auch zwischen benachbarten Molekülen statt („innerer Filtereffekt“), so daß bei einer Substratkonzentration von über 10 μM ein Korrekturfaktor verwendet werden muß (Matayoshi et al., 1990). Zusammenfassend wird die Substratkonzentration nach unten durch einen relativ hohen Fluoreszenzhintergrund und nach oben durch den zunehmenden „inneren Filtereffekt“ begrenzt. Mit EDANS-DABCYL-markierte Substrate wurden in Konzentrationen von 0,5 bis 25 μM für die Proteolyse eingesetzt (Grahn et al., 1998).

Außer dem FRET-Mechanismus ist ein statisches Auslöschung des Fluoreszenzsignals durch hydrophobe Zusammenlagerung von geeigneten Donor-Akzeptor-Paaren möglich. Hierbei können längere Peptidketten mit bis zu 13 Aminosäuren verwendet werden. Für Peptidsubstrate ist die Bildung eines intramolekularen Dimers allerdings ungünstig, da Enzymaktivität und Substraterkennung sensibel auf die Änderung der Peptidkonformation reagieren (Johansson und Cook, 2003).

Bei Einsatz von Proteaserothpräparationen kann das Hintergrundsignal zusätzlich dadurch erhöht werden, daß darin enthaltene Komponenten Eigenfluoreszenz und Absorptionsverhalten im sichtbaren Wellenlängenbereich aufweisen. Eine ähnliche Wirkung kann auch vom Peptid selbst herrühren und muß für einzelne Substratmoleküle gesondert untersucht werden. Das stellt vor allem für die Entwicklung von FRET-basierten Hochdurchsatzverfahren, bei denen eine Vielzahl von vorher nicht genauer untersuchten Substraten parallel mit Proteaserothpräparationen getestet werden sollen, ein Problem dar. Um FRET-Substrate

dennoch für diesen Zweck einsetzen zu können, wurden von George et al. (2003) Donor-Akzeptor-Paare verwendet, bei denen Absorption und Emission im Rot- und nahen Infrarotbereich erfolgen.

I.2.4 Immunoverfahren

Im Gegensatz zu FRET-basierten Verfahren werden für Immunoverfahren keine Fluoreszenzfarbstoffe benötigt, die unterschiedliche Arten von Interferenzen verursachen. Immunoverfahren sind somit störungsunempfindlicher und unabhängiger von der Kettenlänge des Peptidsubstrats, so daß sie für Hochdurchsatz-Anwendungen besser geeignet sind. Immunoverfahren werden in verschiedenen Formen für Enzymaktivitätsmessungen verwendet. Haber et al. (1969) entwickelten einen in abgewandelter Form bis heute in der klinischen Diagnostik verwendeten kompetitiven Radioimmunoassay (RIA) zur Bestimmung der Blutplasma-*protease* Renin, eines Markers für bestimmte Formen des Bluthochdrucks. Dabei wird der Blutplasma-*probe* eine definierte Menge des Reninsubstrates Angiotensinogen zugesetzt und das gebildete Angiotensin als Kompetitor für radioaktiv markiertes Angiotensin im Radioimmunoassay bestimmt. Durch Vergleich mit einer Renineichlösung läßt sich die absolute Plasmaproteasekonzentration ermitteln.

Bei neueren Verfahren wird die radioaktive Markierung durch ein enzymatisches Verstärkersystem ersetzt, welches ein Farbsubstrat umsetzt („Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)). Bislang wurden ELISAs vor allem eingesetzt, um die Wirksamkeit von Inhibitoren auf die HIV-1-Protease-Aktivität zu untersuchen. Von Yu et al. (1995) wurde ein biotinmarkiertes rekombinantes HIV-1-Protease-Substrat entwickelt, das mit einer HIV-1-Protease-Rohpräparation verwendet werden kann. Nach Beendigung der Proteolyse wird ein Antikörper, der das Sequenzmotiv des ungespaltenen Peptids erkennt, zugegeben. Über die Biotinmarkierung wird das Substrat an eine mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte gebunden. Nach einem Waschschriff werden nur die ungeschnittenen Substratmoleküle über einen enzymgekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen. Bei Zusatz von Inhibitoren während der Proteolyse kann deren Einfluß auf die Proteaseaktivität bestimmt werden.

Häufiger werden allerdings synthetische biotinmarkierte Peptidsubstrate verwendet, die zunächst auf einer mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte gebunden und in Oberflächen-gebundener Form mit einer Proteaselösung hydrolysiert werden. Dabei muß gewährleistet sein, daß Streptavidin nicht durch die Proteaselösung gespalten wird. Der

Nachweis der Spaltung erfolgt über einen Antikörper, der das Sequenzmotiv des ungespaltenen Substrates erkennt, und einen entsprechenden enzymgekoppelten Zweitantikörper (Fournout et al., 1997; Gutierrez et al., 2002). Die Durchführung dieser sogenannten heterogenen Enzymassays (HEA), bei denen eine Protease in Lösung auf ein festphasengebundenes Substrat wirkt, ist auch mit rohen Proteasepräparationen möglich. HEAs haben allerdings den Nachteil, daß keine freie Zugänglichkeit der Protease zum festphasengebundenen Substrat gewährleistet ist. Rückschlüsse auf die Enzymkinetik sind aber mit Einschränkung möglich (Gutierrez et al., 2004).

Diese Immunoverfahren dienen vor allem der Protease- und Inhibitoranalyse. Die Untersuchung verschiedener Peptidsubstrate ist dagegen sehr aufwendig, denn für den Nachweis jedes einzelnen Peptidsubstrats ist ein spezieller Antikörper notwendig, der die Sequenz des jeweiligen Peptides bindet.

I.2.5 Festphasengebundene Peptidsubstratbibliotheken

Kombinatorische Peptidbibliotheken erlauben es, eine Vielzahl unterschiedlicher Peptidsubstrate parallel zu synthetisieren, und sind damit gut für Hochdurchsatz-Anwendungen geeignet. Ein gängiges Verfahren zu Herstellung solcher Bibliotheken ist die SPOT-Synthesetechnik (Frank, 1992). Die Peptidsubstrate bleiben nach ihrer Synthese carboxyterminal an einem Zellulosefilter gebunden und tragen auf der aminoterminalen Seite eine Markierung, deren An- oder Abwesenheit nach Behandlung mit einer Proteaselösung eine Spaltung der Sequenz anzeigt. Kombinatorische Peptidbibliotheken werden auch in Verbindung mit FRET eingesetzt (Dekker et al., 2001). In diesem Fall werden allerdings für den hohen Durchsatz an verschiedenen Substraten die Nachteile von festphasensynthetisierten Peptiden – die schlechte Zugänglichkeit von membrangebundenen, dicht gepackten Substraten, die Verunreinigungen in Form von unvollständigen Syntheseprodukten, die den ohnehin schon hohen Hintergrund von FRET-Systemen weiter erhöhen, und die große Proteasemenge, die benötigt wird, um einen weitgehend vollständigen Substratabbau zu gewährleisten – in Kauf genommen, ohne die Vorteile des FRET-Verfahrens – die genaue Analyse der Enzymkinetik – nutzen zu können.

I.2.6 Enzymfragment-Komplementierung

Ein neuer Ansatz, der im Gegensatz zu FRET-basierten Techniken für längere Substrate entwickelt wurde, bedient sich der sogenannten Enzymfragment-Komplementierung (Naqvi et al., 2004). Ein zyklisches Peptid wird synthetisiert, das einerseits eine Spaltungsstelle für die zu untersuchende Protease enthält und andererseits ein Peptidfragment zur Komplementierung eines ansonsten inaktiven signalgebenden Enzyms. In der zyklischen Form ist die Komplementierung nicht möglich. Erst nach Hydrolyse der Spaltungsstelle entsteht das zur Komplementierung geeignete Fragment, wodurch ein Lichtsignal entsteht. Dabei muß allerdings gewährleistet sein, daß ein zyklisches Peptid ebenso gut gespalten wird wie ein lineares. Das komplementierende Fragment dagegen darf nicht gespalten werden, was insbesondere bei der Verwendung von Proteaserothpräparationen ein Problem darstellen kann. Die relativ aufwendige Herstellung der zyklischen Peptide mit den entsprechenden Reinigungsschritten läßt es fraglich erscheinen, ob dieses Verfahren eine breite Verwendung finden kann. Die Arbeiten in Richtung neuer Proteolysetests zeigen aber, daß dieses Feld weiterhin von großer Bedeutung ist und daß es noch nicht für alle Anwendungen zufriedenstellende Lösungen gibt.

I.3 Proteasestabilität von Schluckimpfstoffen

Für eine orale Immunisierung muß eine Vakzine den Gastrointestinaltrakt passieren, um an den Ort der Immuninduktion zu gelangen. Während es vergleichsweise einfach ist, eine Vakzine in einer verdauungsresistenten Kapsel eingeschlossen durch den Magen zu schleusen, treten Probleme vor allem dann auf, wenn die Vakzine aus der Kapsel freigesetzt wird. Dann beginnt ein Wettlauf darum, was zuerst geschieht: die Proteolyse durch die Verdauungsenzyme des Dünndarms oder das Erreichen der Zellen, in denen die Immunabwehrreaktion in Gang gesetzt wird.

I.3.1 Das Mukosale Immunsystem

Über 90 % der viralen, bakteriellen und parasitären Infektionen beginnen an den Schleimhautoberflächen (Sirard et al., 1999), die beim Menschen eine Ausdehnung von etwa 400 m² haben. Die Schleimhäute bestehen größtenteils aus einer einschichtigen Epithelzellige, die Mikroorganismen sowohl eine gute Lebensgrundlage bietet als auch ein Eindringen mit einer nachfolgenden systemischen Infektion ermöglicht. Die besondere

Gefährdung der Schleimhautoberflächen kommt auch dadurch zum Ausdruck, daß die Anzahl der antikörperproduzierenden Zellen im subepithelialen Bereich der Schleimhäute weitaus größer ist als in der Milz, den Lymphknoten und dem Knochenmark zusammen. Jeden Tag werden 5 bis 15 g Immunglobulin (Ig), fast ausschließlich polymeres IgA, auf die Schleimhautoberflächen sekretiert (Neutra und Kraehenbuhl, 1992).

Im Intestinaltrakt steht das mukosale Immunsystem vor dem Problem, daß wenige Gefahrensignale der Pathogene von einem hohen Hintergrundrauschen harmloser Nahrungsmittelantigene und symbiontischer Bakterien unterschieden werden müssen. Es wäre aber falsch, daraus eine unempfindliche Standardeinstellung des Darms abzuleiten, denn das intestinale Immunsystem befindet sich dauernd im Status einer hohen Aktivität (MacDonald, 2003). Zur Überwachung des Darminhalts werden kontinuierlich Antigenproben aus dem Darmlumen entnommen, über das Darmepithel transportiert und den Immunzellen, insbesondere dendritischen Zellen (Mowat, 2005), übergeben. Der Eintritt luminaler Antigene kann über die Enterozyten des Darmepithels erfolgen oder über spezialisierte Epithelzellen der Peyer'schen Plaques, den M-Zellen (Mowat, 2003). Bei der ersten Route werden Makromoleküle, wie Proteine oder ihre Fragmente, von den Enterozyten hauptsächlich durch Endozytose aufgenommen und durch lysosomalen Abbau weiter prozessiert (Terpend et al., 1998). Die entstehenden Peptide werden an MHC-II-Molekülen gebunden auf der basolateralen Seite als Exosomen abgeschnürt, wo sie mit dendritischen Zellen in der *Lamina propria* interagieren können (Van Niel et al., 2003). Die dendritischen Zellen der *Lamina propria* sind auch direkt in der Lage, mit ihren Dendriten Makromoleküle und Mikroorganismen aus dem Darmlumen zu entnehmen, indem sie die *Zonula occludens* („tight-junctions“) des Darmepithels vorübergehend öffnen (Rescigno et al., 2001). Die M-Zellen der Peyer'schen Plaques dagegen sind auf die schnelle Transzytose partikulärer Antigene in ihre basolaterale Tasche spezialisiert, in der sich antigenpräsentierende Zellen befinden. Um die partikulären Antigene - unter natürlichen Umständen hauptsächlich Bakterien und Viren – weitgehend unmodifiziert weiterzugeben, ist das lysosomale System der M-Zellen nur schwach ausgeprägt (Kraehenbuhl und Neutra, 1992a). Abb. I.1 bietet eine Übersicht über die verschiedenen Aufnahmerouten für Antigene durch das Mukosale Immunsystem im Darm.

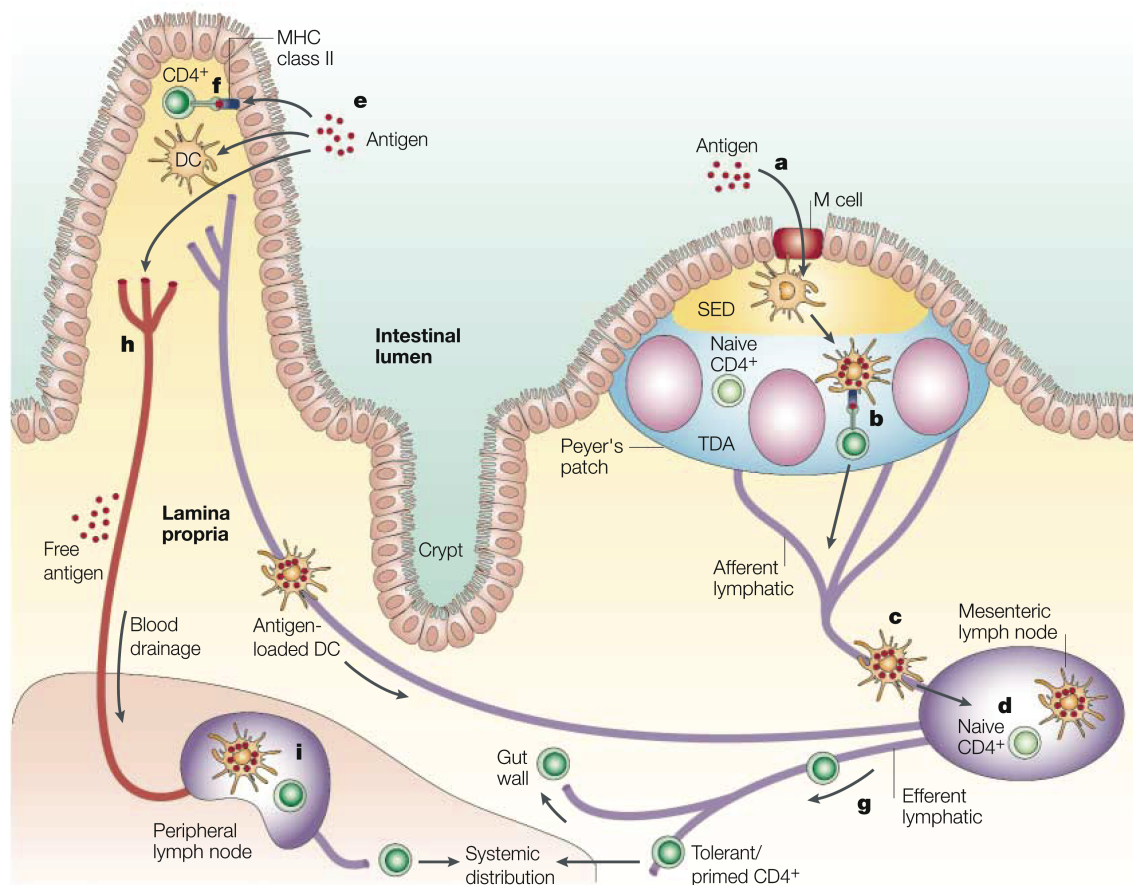


Abb. I.1: Aufnahmerouten für Antigene durch das Mukosale Immunsystem im Darm. Entnommen aus Mowat (2003). Antigene können über M-Zellen in das Follikelassoziierte Epithel (FAE) (a) aufgenommen und nach Transport zu lokalen dendritischen Zellen den T-Zellen in den Peyer'schen Plaques (b) präsentiert werden. Die antigenbeladenen dendritischen Zellen können über die Lymphgefäße (c) in die mesenterischen Lymphknoten (d) gelangen, wo die T-Zell-Erkennung stattfinden kann. Antigene können aber auch über die Enterozyten des Darmepithels aufgenommen werden (e) und an dendritischen Zellen gebunden zu den mesenterischen Lymphknoten gelangen oder die Enterozyten können direkt als antigenpräsentierende Zellen tätig sein (f). Unabhängig von der Aufnahmeroute verlassen die aktivierten CD4⁺ T-Zellen die mesenterischen Lymphknoten über efferente Lymphgefäße (g) und gelangen über den Blutkreislauf in die *Lamina propria* der mukosalen Oberflächen. Aktivierte T-Zellen können darüber hinaus im Blutkreislauf bleiben und dort eine systemische Immunität bewirken. Schließlich kann Antigen auch direkt vom Darm in den Blutkreislauf gelangen (h) und mit T-Zellen in den peripheren Lymphknoten (i) interagieren.

Die Interaktion zwischen antigenpräsentierenden Zellen und CD4⁺ T-Zellen erfolgt in den Peyer'schen Plaques oder den mesenterischen Lymphknoten, wobei die Entscheidung getroffen werden muß, ob Toleranz oder eine Immunreaktion induziert wird. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind komplex und erst wenig bekannt (Jun und Goodnow, 2003). Meistens fällt die Entscheidung zugunsten einer oralen Toleranz, die in zwei Formen auftritt: niedrige Antigendosen induzieren aktive Suppression durch regulatorische T-Zellen, während hohe Dosen klonale Anergie und Deletion hervorrufen (Friedman und Weiner, 1994). Genauer beschrieben ist die Suppression durch regulatorische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Diese Suppressorzellen sekretieren bei wieder-

holter Antigenerkennung unter anderem das suppressive Zytokin TGF- β . Regulatorische T-Zellen werden antigenspezifisch stimuliert, entfalten ihre suppressive Wirkung nach der Abwanderung in die Effektorregion jedoch nicht nur antigenspezifisch, sondern tragen in ihrer Nähe zu einem allgemein suppressiven Zytokinmilieu bei, so daß auch von einer „Bystander-Suppression“ gesprochen wird (Weiner, 2001).

Kommt es dagegen zur Induktion einer Immunantwort, so werden B-Zellen im mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe zur IgA-Produktion determiniert („IgA-switch“). Diese Zellen wandern über den Blutkreislauf in die *Lamina propria* entfernt liegender Schleimhaut- und Drüsenoberflächen, wo sie zu IgA-sekretierenden Plasmazellen differenzieren. Das IgA wird als Dimer von den Epithelzellen von der basolateralen Seite zur apikalen Seite in das Darmlumen oder auf die Oberfläche anderer Epithelien transportiert (Kraehenbuhl und Neutra, 1992b).

Die Aufklärung der Mechanismen, die zur Induktion von Toleranz oder einer Immunantwort führen, ist von medizinischer Bedeutung. Bei einer bestehenden chronischen Entzündung, Autoimmunität oder Allergie wird versucht, Toleranz zu induzieren (Strobel, 2002). Die Induktion einer Immunantwort bildet dagegen die Grundlage der Impfstoffentwicklung.

I.3.2 Vorteile und Schwierigkeiten einer oralen Immunisierung

Obwohl die meisten Pathogene über die Schleimhäute in den Körper eindringen, liegt der Schwerpunkt der Impfstoffentwicklung auf der systemischen Immunisierung. Ein Schluckimpfstoff hat neben der einfachen Verabreichung jedoch den großen Vorteil, daß er sowohl einen Schutz der Schleimhäute als auch einen systemischen Immunschutz bewirken kann, während umgekehrt eine parenterale Vakzine keinen mukosalen Schutz bietet (Lue et al., 1994). Der Grund für den verhältnismäßig geringen Anteil mukosaler Vakzinierungen liegt in den damit verbundenen Schwierigkeiten: dem proteolytischen Abbau des Antigens, dem niedrigen pH-Wert, der starken Verdünnung und Verteilung, der Konkurrenz mit unzähligen verdauungsstabilen Nahrungsbestandteilen, Bakterien, Viren und Staubpartikeln, bevor die Vakzine das Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe erreicht. Die Induktion einer Immunantwort an mukosalen Oberflächen erfordert starke Adjuvantien, um die Immunogenität zu verstärken, und geeignete Trägersysteme, um den proteolytischen Abbau und die Verdünnung zu verringern (Vajdy et al., 2004).

Die Induktion einer Immunreaktion gelingt am einfachsten, wenn der Verlauf einer tatsächlichen Infektion in abgeschwächter Form nachgeahmt wird. Daher gehören Impfungen mit attenuierten Viren und Bakterien, die ihre Virulenz weitgehend verloren haben aber eine subklinisch verlaufende Infektion auslösen können, zu den ältesten Verfahren und werden bis heute verwendet. Ein klassisches Beispiel für diese Lebendvektoren ist die Schluckimpfung mit attenuierten Polioviren (Sabin, 1965). Allerdings gibt es eine geringe aber reale Gefahr der Reversion von der attenuierten zur virulenten Form, so daß diese orale Vakzine in den meisten Industrieländern inzwischen durch eine injizierbare inaktivierte Vakzine ersetzt wurde (Holmgren und Czerkinsky, 2005). Mit Hilfe rekombinanter DNA-Techniken lassen sich verschiedene Antigene, gegen die eine mukosale Immunantwort gewünscht ist, in Lebendvektoren exprimieren. *Salmonella*-Stämme finden hierfür die weiteste Verbreitung (Sirard et al., 1999). Es ist jedoch schwierig, einen Lebendvektor so zu attenuieren, daß er keine Krankheitssymptome wie der Wildtyp verursacht, aber dennoch eine ausreichende Immunität induziert (Tacket et al., 1992).

Als Alternative zu den Lebendvektoren wurden daher synthetische Mikropartikel als Antigenträgersysteme entwickelt: Lipid-basierte Strukturen, wie Liposomen, Immunstimulierende Komplexe (ISCOMs) und sogenannte Cochleate können zum Einschluß von Antigenen verwendet werden und wirken gleichzeitig als Adjuvantien, insbesondere die ISCOMs. Des weiteren kann das Antigen in eine biologisch abbaubare polymere Matrix, z. B. aus Stärke, Alginat oder Poly-(Laktid-co-Glykolid)-Polyester integriert werden (Holmgren und Czerkinsky, 2005), die als Mikropartikel so formuliert werden kann, daß der Abbau der Matrix über mehrere Wochen erfolgt und währenddessen kontinuierlich oder pulsartig Antigen freigesetzt wird. Auf diese Weise können die Partikel nach einmaliger Vakzinapplikation selbständig nachimmunisieren. Die Herstellung der Mikropartikel ist schwierig, denn es sind große Antigenmengen in hochkonzentrierter Lösung notwendig, und bei der Herstellung müssen relativ harsche Methoden eingesetzt werden, die das Antigen schädigen können (Sanchez et al., 1996; Cleland, 1999).

Die Wirksamkeit einer Immunisierung kann gesteigert werden, wenn die Vakzine direkt an den Ort der Immuninduktion gelenkt wird. Für dieses sogenannte Targeting eignen sich bei parenteralen Immunisierungen die antigenpräsentierenden dendritischen Zellen selbst (Hawiger et al., 2001). Bei mukosalen Immunisierungen dagegen wird häufig die Aufnahmeroute über die M-Zellen der Peyer'schen Plaques (Frey und Neutra, 1997) gewählt, da sie die aufgenommene Vakzine weitgehend unmodifiziert an antigen-

präsentierende Zellen weitergeben (Neutra et al., 2001). Für das M-Zell-Targeting eignen sich einige pflanzliche Lektine und bakterielle Proteine, wie die B-Untereinheit des Choleratoxins (Olivier et al., 2003), an die das Antigen entweder chemisch oder als Genfusionsprotein befestigt werden kann. Diese Lektine oder Proteine binden unter bestimmten Voraussetzungen spezifisch an Adhäsionsmoleküle der M-Zellen und werden dann zusammen mit dem Antigen aufgenommen (Frey et al., 1996).

Auf dem Weg zu definierteren Vakzinen kann man bakterielle oder virale Proteine, gegen die eine Immunantwort hervorgerufen werden soll, durch einzelne Peptide als B-Zell- und T-Zell-Epitope ersetzen, die auf engem Raum in hoher Kopienzahl angeordnet werden können. Die untere Grenze der T-Zell-Epitoplänge wird durch die MHC-II-Moleküle vorgegeben, die diese Epitope binden müssen, um eine von $CD4^+$ -T-Zellen vermittelte mukosale IgA-Antwort induzieren zu können. Für hochaffine Komplexe mit MHC-II-Molekülen sind Peptide mit mehr als 9 Aminosäuren erforderlich (Siklodi et al., 1998). Neben der experimentellen Bestimmung (Shimonkevitz et al., 1984) kommen inzwischen bioinformatische Verfahren zum Einsatz, um solche T-Zell-Epitope vorherzusagen (Bian et al., 2003).

I.4 Hypothese und experimenteller Aufbau eines Proteolysetests

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Hochdurchsatzverfahren zur Messung der Kinetik der proteolytischen Degradation von Peptiden in Lösung zu entwickeln. Es wurde die Hypothese aufgestellt, daß eine genaue enzymkinetische Beschreibung einer proteolytischen Reaktion möglich sei, wenn ein gelöstes, an beiden Enden markiertes Peptidsubstrat nach einer proteolytischen Spaltungsreaktion über die erste Markierung auf einer Mikrotiterplatte aufgefangen und über die zweite Markierung nachgewiesen wird. Das Modell eines solchen Proteolysetests ist in Abb. I.2 dargestellt.

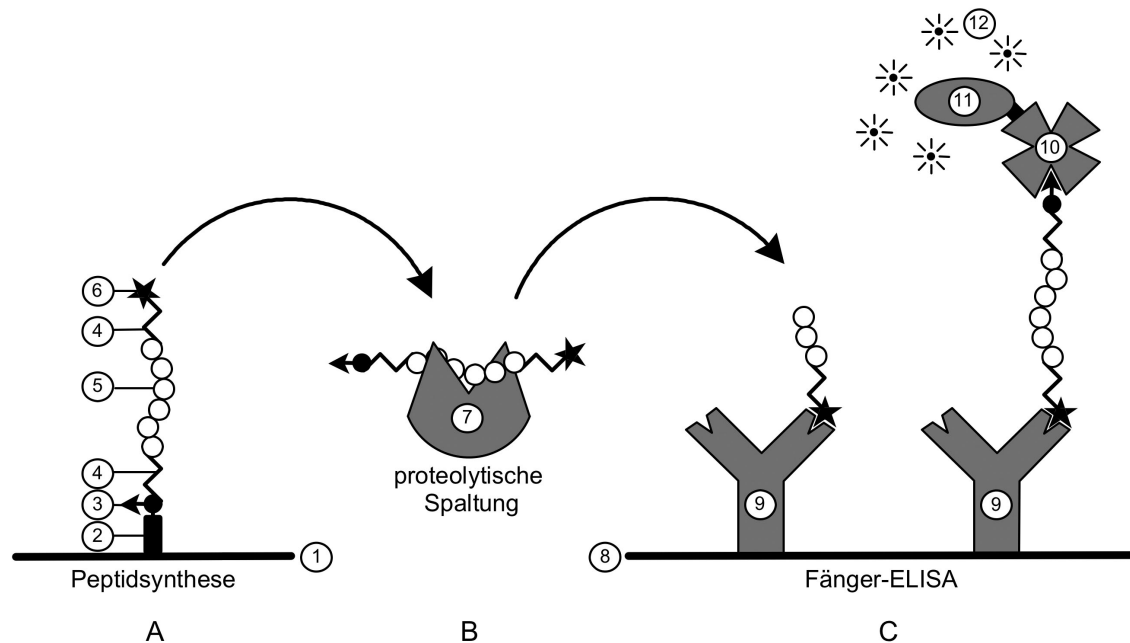


Abb. I.2: Modell eines Proteolysetests.

- (A) Peptidsubstrate werden in der folgenden Reihenfolge auf einem Zellulosefilter (1) synthetisiert: Syntheseanker (2), Biotinmarkierung (3), Abstandshalter (4), Sequenzmotiv des Substrats mit n Aminosäuren (5), Abstandshalter (4) und Haptenmarkierung (6). Die Peptide werden nach Beendigung der Synthese vom Zellulosefilter abgespalten und
- (B) mit einer Proteaselösung (7) inkubiert.
- (C) Der Nachweis von gespaltenem und ungespaltenem Peptidsubstrat erfolgt an einer beschichteten Mikrotiterplatte (8). Der Antikörper (9) fängt das gespaltenes und ungespaltenes Peptidsubstrat zu gleichen Teilen über das Hapten (6) ein. Nicht gebundene Peptide und Peptidbruchstücke werden durch Waschen entfernt. Danach kann ungespaltenes Substrat, das die Biotinmarkierung nicht verloren hat, durch Streptavidin (10), das mit Meerrettichperoxidase (11) konjugiert ist, und einer anschließenden Farbreaktion (12) nachgewiesen werden. Dem gespaltenen Peptidsubstrat fehlt dagegen die Biotinmarkierung, so daß kein Farbsignal gebildet wird. Das Verhältnis des Farbsignals, das nach einem proteolytischen Abbau vorliegt, zu dem Signal, das vom ungespaltenen Peptidsubstrat gebildet wird, ergibt den Grad des proteolytischen Abbaus.

Das in Abb. I.2 gezeigte Modell sollte experimentell umgesetzt und optimiert werden. Ein Proteolysetest, der auf diesem Modell beruht, bietet die Möglichkeit die Stabilität von Peptiden im Hochdurchsatz zu messen. Eine wichtige immunologische Fragestellung, die sich damit beantworten läßt, betrifft die Stabilität von Peptiden gegenüber den Verdauungsenzymen des Dünndarms, denn nur verdauungsresistente Peptide eignen sich für eine orale Applikation, unabhängig davon, ob man Immunisieren oder auch Tolerisieren möchte.

II Materialien und Methoden

II.1 Materialien und Bezugsquellen

II.1.1 Tiere

Weibliche Balb/c Mäuse

Harlan-Winkelmann, Borcheln

Die Mäuse wurden im Tierstall des Forschungszentrums Borstel gehalten und erhielten Wasser und Futter *ad libitum*. Nach Inhalationsanästhesie mit Isofluran wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend erfolgte eine Organentnahme.

II.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterial

Apex II ESI-FT-Massenspektrometer

Bruker Daltonik, Bremen

AutoSpot Pipettierroboter ASP 222

Intavis, Köln

ChemDoc System

Bio-Rad Laboratories, München

Versa Max Mikrotiterplatten-Lesegerät

Molecular Devices, Ismaning

ELISA-Washer Columbus

Tecan, Crailsheim

96-Loch Mikrotiterplatten

hochbindend, Polystyrol, Flachboden

Corning, Wiesbaden

unbehandelt, Polystyrol, Flachboden

Corning

unbehandelt, Polypropylen, Rundboden

Corning

Immulon 2 HB

Thermo Life Sciences, Dreieich

MaxiSorp

Nunc, Wiesbaden

Microton 600

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Lumi-Imager F1

Roche Diagnostics, Mannheim

SpeedVac-Konzentrator SPD121P

ThermoElectron, Frankfurt

Ultraschallgerät Sonorex RK 10S

Bandelin Electronic, Berlin

Zellulosefilter 540 Whatman

Whatman, Madistone, England
über Merck, Darmstadt

Zellulosefilter 3MM

Whatman über Merck

II.1.3 Lösungsmittel und Chemikalien für die Peptidsynthese

Bromphenolblau	Merck
Dichlormethan	Merck
Diisopropylcarbodiimid	Fluka / Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
N,N'-Dimethylformamid	Fluka / Sigma-Aldrich Chemie
Essigsäureanhydrid	Merck
N-Hydroxybenzotriazol	Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan
1-Methyl-2-pyrrolidon	Fluka / Sigma-Aldrich Chemie
N-Methylimidazol	Aldrich / Sigma-Aldrich Chemie
Mischbett-Ionenaustauscher AG 501-X8 (D)	Bio-Rad Laboratories
Molekularsieb, 8-12 mesh Kugeln, Porengröße 4 Å	Fluka / Sigma-Aldrich Chemie
Phosphorpentoxid	Aldrich / Sigma-Aldrich Chemie
Piperidin	Fluka / Sigma-Aldrich Chemie
Silica Gel Blau (Blaugel)	Roth, Karlsruhe
Trifluoressigsäure	Acros Organics, Geel, Belgien
Triisobutylsilan	Fluka / Sigma-Aldrich Chemie

II.1.4 Bausteine für die Peptidsynthese

Alle während der Peptidsynthese verwendeten Bausteine sind wasserfrei und von bester erhältlichlicher Qualität.

II.1.4.1 Fmoc-geschützte Aminosäurederivate

Alanin	Fmoc-Ala-OH	Novabiochem / Merck Biosciences, Schwalbach/Ts.
	Fmoc-D-Ala-OH	Bachem, Weil am Rhein
β-Alanin	Fmoc-β-Ala-OH	Novabiochem
	Fmoc-β-Ala-OPfp	Bachem
Aminobuttersäure	Fmoc-GABA-OH	Fluka / Sigma-Aldrich Chemie
Aminocaprinsäure	Fmoc-6-Ahx-OH	Fluka / Sigma-Aldrich Chemie
Aminodecansäure	Fmoc-10-Adc-OH	Advanced Chemtech Louisville, KY, USA
Aminododecansäure	Fmoc-12-Ado-OH	Advanced Chemtech

Aminoheptansäure	Fmoc-7-Ahp-OH	Peptech, Burlington, MA, USA
Aminononansäure	Fmoc-9-Anc-OH	Advanced Chemtech
Aminooctansäure	Fmoc-8-Aoc-OH	Advanced Chemtech
Aminoundecansäure	Fmoc-11-Aun-OH	Peptides International, Louisville, KY, USA
Aminovaleriansäure	Fmoc-5-Ava-OH	Advanced Chemtech
Arginin	Fmoc-Arg (Pbf)-OH	Novabiochem
	Fmoc-D-Arg (Pbf)-OH	Advanced Chemtech,
Asparagin	Fmoc-Asn (Trt)-OH	Novabiochem
	Fmoc-D-Asn (Trt)-OH	Advanced Chemtech
Asparaginsäure	Fmoc-Asp (OtBu)-OH	Novabiochem
	Fmoc-D-Asp (OtBu)-OH	Advanced Chemtech
Biocytin	Fmoc-Lys (Biotin)-OH	Advanced Chemtech
Carboxyglutaminsäure	Fmoc-Gla (OtBu) ₂ -OH	Iris Biotech, Marktredwitz
Cystein	Fmoc-Cys (Acm)-OH	Novabiochem
Glutamin	Fmoc-Gln (Trt)-OH	Novabiochem
Glutaminsäure	Fmoc-Glu (OtBu)-OH	Novabiochem
	Fmoc-D-Glu (OtBu)-OH	Advanced Chemtech
Glutaminsäure-Biotin	Fmoc-Glu(biot-PEG)-OH	Novabiochem
Glycin	Fmoc-Gly-OH	Novabiochem
Histidin	Fmoc-His (Trt)-OH	Novabiochem
	Fmoc-His (Boc)-OH	Bachem
Isoleucin	Fmoc-Ile-OH	Novabiochem
Leucin	Fmoc-Leu-OH	Novabiochem
	Fmoc-D-Leu-OH	Advanced Chemtech
Lysin	Boc-Lys (Fmoc)-OH	Novabiochem
	Fmoc-Lys (Boc)-OH	Novabiochem
	Fmoc-D-Lys (Boc)-OH	Advanced Chemtech
Methionin	Fmoc-Met-OH	Novabiochem
Phenylalanin	Fmoc-Phe-OH	Novabiochem
	Fmoc-D-Phe-OH	Advanced Chemtech
Polyethylenglycol	Fmoc-amino PEG dieglycolic acid	
	(n = 2, MW 530,6)	Polypure, Oslo, Norwegen
	(n = 9, MW 839)	Polypure

Prolin	Fmoc-Pro-OH	Novabiochem
Serin	Fmoc-Ser (tBu)-OH	Novabiochem
Threonin	Fmoc-Thr (tBu)-OH	Novabiochem
Tryptophan	Fmoc-Trp (Boc)-OH	Novabiochem
	Fmoc-D-Trp (Boc)-OH	Advanced Chemtech
Tyrosin	Fmoc-Tyr (tBu)-OH	Novabiochem
	Fmoc-D-Tyr (tBu)-OH	Advanced Chemtech
Valin	Fmoc-Val-OH	Novabiochem

II.1.4.2 Weitere Synthesebausteine

Biotin-PEG-CO ₂ -NHS (MW 3400)	Nektar Therapeutics, San Carlos, CA, USA
Essigsäure-NHS	Sigma / Sigma-Aldrich Chemie
5(6)-Carboxymethylrhodamin	Fluka / Sigma-Aldrich Chemie
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	Merck
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure-Aminoundecansäure-Konjugat	Dr. S. Bade, Forschungszentrum Borstel
2,4-Dichlorphenoxybuttersäure	Lancaster Synthesis, Morecambe, England
2,4-Dichlorphenylessigsäure	Aldrich / Sigma-Aldrich Chemie
Dinitrophenyl- γ -Aminobuttersäure	MP Biomedicals, Eschwege
Dinitrophenyl- ϵ -Aminocaprinsäure	MP Biomedicals
Dinitrophenyl-Essigsäure	Fluka / Sigma-Aldrich Chemie
Dinitrophenyl-Glycin	MP Biomedicals
Dinitrophenyl-11-Aminoundecansäure	Molecular Biosciences, Boulder, CO, USA
Phenoxyessigsäure	Aldrich / Sigma-Aldrich

II.1.5 Chemikalien

Allgemeine Laborchemikalien	Sigma-Aldrich Chemie
in p.a. Qualität	Roth
Acrylamid 4K Lösung (40 %) Mix 29:1	AppliChem, Darmstadt
AEBSF (4-(2-Aminoethyl)benzol-sulfonylfluorid x HCl)	AppliChem
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Sigma / Sigma-Aldrich Chemie
Cholsäure, Natriumsalz	Fluka / Sigma-Aldrich Chemie

Coomassie Brilliant Blue R250	Fluka / Sigma-Aldrich Chemie
N,N'-Dimethylacetamid	Fluka / Sigma-Aldrich Chemie
EDTA (di-Na-Ethylendiamintetraacetat)	Fluka / Sigma-Aldrich Chemie
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Sigma / Sigma-Aldrich Chemie
TBABH (Tetrabutylammoniumborhydrid)	Fluka / Sigma-Aldrich Chemie
TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)	Aldrich / Sigma-Aldrich Chemie

II.1.6 Proteine und Peptide

BSA, Fraktion V (Rinderserumalbumin)	Sigma / Sigma-Aldrich Chemie
Casein, Hammarsten Qualität	BDH Laboratory Supplies, Poole, England über LGC Promochem, Wesel
Magermilchpulver, Glücksklee	Nestlé, Frankfurt
Streptavidin-Meerrettichperoxidase	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA über Alexis, Grünberg

Antikörper

Ratten-IgG1 (kappa) gegen DNP LO-DNP-1, affinitätsgereinigt	Interchim, Montluçon Cedex, Frankreich über KMF Laborchemie, St. Augustin
Ratten-IgG2a (kappa) gegen DNP LO-DNP-61, affinitätsgereinigt	Interchim
Mäuse-IgG (kappa) gegen 2,4-D E2/G2, Aszites	Dr. M. Fránek, Veterinary Research Institute, Brünn, Tschechien
Mäuse-IgG (kappa) gegen 2,4-D E4/C2, Aszites	Dr. M. Fránek
Mäuse-IgG1 (kappa) gegen 2,4-D F6/C10, Aszites	Dr. M. Fránek
Mäuse-IgG (kappa) gegen 2,4-D B7, Aszites, Protein A gereinigt	Dr. M. Fránek
Ziegen-IgG gegen Mäuse-IgA (alpha Kette)	Southern Biotech, Birmingham, AL, USA über Biozol, Eching
Ziegen-IgG gegen Mäuse-IgA (alpha Kette) Meerrettichperoxidase-markiert	Southern Biotech
Mäuse-IgA Isotypen Kontrolle	Southern Biotech
Mäuse-IgG, polyclonal	Serotec, Oxford, England

Proteasen

Trypsin aus Rinderpankreas TPCK-behandelt	Sigma / Sigma-Aldrich Chemie
--	------------------------------

Chymotrypsin aus Rinderpankreas
TLCK-behandelt

Sigma / Sigma-Aldrich Chemie

Elastase aus Schweinepankreas
Affinitätschromatographisch gereinigt

Sigma / Sigma-Aldrich Chemie

Substrate für Proteasen

Bz-Arg-pNA x HCl

Bachem

Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA

Bachem

Suc-Ala-Ala-Pro-Ala-pNA

Bachem

Proteaseinhibitoren

Aprotinin

AppliChem

Leupeptin Hemisulfat

AppliChem

II.1.7 Nachweissysteme

Lumi Light Western Blotting Substrat

Roche Diagnostics

D_C Protein Assay, Lowry

Bio-Rad Laboratories

Micro BCA Assay

Pierce Biotechnology, Bonn

MultiMark Multi-Colored Standard
Molekulargewichtsstandard

Invitrogen, Karlsruhe

SYPRO Ruby protein gel stain

Molecular Probes, Eugene, OR, USA
über Invitrogen

II.1.8 Software

Adobe Photoshop 7

Adobe Systems, San Jose, CA, USA

AutoSpot Operation Software 3.12

Intavis

CS ChemDraw 9

CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA

ConceptDraw Pro 5

Computer Systems Odessa, Ukraine

GraphPad Prism 4

GraphPad Software, San Diego, CA, USA

EndNote 7

Thomson ResearchSoft, Carlsbad, CA, USA

Image J 1.3

NIH, Bethesda, MD, USA

Microsoft Office 2004

Microsoft, Red Wood City, OR, USA

SoftMax Pro 4.7

Molecular Devices

StatView 4.5

Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA

II.2 Häufig verwendete Puffer

D-PBS (10×) Dulbecco's Phosphate-buffered saline

80 g	NaCl
11,5 g	Na ₂ HPO ₄
2 g	KCl
2 g	KH ₂ PO ₄
ad 1000 ml	A. bidest.

D-PBS (1×) 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 136 mM NaCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, pH 7,3

100 ml	D-PBS (10×)
ad 1000 ml	A. bidest.

D-PBST D-PBS × 0,05 % (w/v) Tween 20

1 l	D-PBS (1×)
5 ml	10 % (w/v) Tween 20

L-PBS "Lite" PBS, 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, 10 mM NaCl

0,584 g	NaCl
1,38 g	NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O
ad 1000 ml	A. bidest.
mit 1 N NaOH auf pH 7,0 eingestellt	

L-PBST L-PBS × 0,005 % (w/v) Tween 20

1 l	L-PBS
500 µl	10 % (w/v) Tween 20

SIF (10×) Simulierte Intestinalflüssigkeit

57,6 g	NaCl
8,67 g	Na ₂ HPO ₄
2,21 g	KCl
2,22 g	KH ₂ PO ₄
ad 1000 ml	A. bidest.

SIF (1×) 8 mM Phosphatpuffer, pH 7,2, 4,6 mM K⁺, 111,3 mM Na⁺, 101,5 mM Cl⁻
 100 ml SIF (10×)
 ad 1000 ml A. bidest.

Nach Lockwood und Randall (1949) dem Elektrolytgehalt und pH-Wert des Dünndarms angepaßt.

SIFT SIF × 0,005 % (w/v) Tween 20
 1 l SIF (1×)
 500 µl 10 % (w/v) Tween 20

SIFTCaCl SIFT × 1 mM CaCl
 900 ml A. bidest.
 1 ml 1 M CaCl
 100 ml SIF (10×)
 500 µl 10 % (w/v) Tween 20

CaCl wurde unter Rühren langsam in A. bidest. gegeben, und danach wurde mit 100 ml 10× SIF aufgefüllt, so daß keine Fällungsreaktion schwerlöslicher Ca-Salze auftrat. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

II.3 Peptidsynthese

Peptidbibliotheken wurden mit der SPOT-Synthese nach Frank (1992) synthetisiert. Bei diesem Verfahren können mehr als 1000 verschiedene Peptide auf einem Zellulosefilter in einem für jedes Peptid genau definierten Areal („SPOT“) in nanomolaren Mengen bis zu einer Kettenlänge von 25 Aminosäuren parallel synthetisiert werden. Die Synthese verläuft im Gegensatz zur Proteinbiosynthese von carboxyterminaler in aminoterminaler Richtung, wobei die carboxyterminale Aminosäure über einen Anker mit dem Zellulosefilter verknüpft ist. Die Synthese der Peptidkette erfolgt dann in einem zyklischen Prozeß, bei dem eine Aminosäure nach der anderen unter Bildung einer Säureamidbindung auf die carboxyterminale Aminosäure der wachsenden Peptidkette aufgebracht wird. Um unerwünschte Nebenreaktionen zu vermeiden, müssen die funktionellen Gruppen der zu kuppelnden Aminosäuren mit Ausnahme des Carboxylatrestes durch Schutzgruppen blockiert sein. Als Schutzgruppe für die α -Aminofunktion wird die Fluorenylmethyloxy-

carbonyl- (Fmoc) Gruppe verwendet, die selektiv durch basische Reagenzien, wie Piperidin, entschützt werden kann, während die Seitenkettenschutzgruppen bis zum Ende der Synthese auf der wachsenden Peptidkette verbleiben. In jedem Zyklus wird zunächst die freie Carboxylatgruppe einer geschützten Aminosäure in eine reaktivere Form („HOBt-Aktivester“) überführt, bevor sie mit dem Aminoterminus der wachsenden Peptidkette verknüpft wird. Nicht reagierte Aminogruppen werden durch Acetylierung mit Essigsäureanhydrid abgesättigt („Capping“), um Deletionen in der Peptidsequenz zu vermeiden. Danach wird die α -Aminofunktion der neu aufgebrachten Aminosäure selektiv entschützt, bevor der Zyklus wieder von neuem beginnt. Am Schluß der Synthese werden die Seitenkettenschutzgruppen abgespalten. Je nach Art der Verankerung in der Filtermembran bleiben die synthetisierten Peptide entweder am Zelluloseträger gebunden oder werden abgespalten.

Alle Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur (RT). Mit dem AutoSpot-Pipettierroboter ASP 222, der mit den gewünschten Peptidsequenzmotiven programmiert werden kann, wurden Aminosäurelösungen mit einer Stahlnadel positionsgenau auf die SPOTs aufgetragen. Alle anderen Arbeitsschritte wurden manuell durchgeführt. Die Waschschritte zwischen den einzelnen Synthesesyklen erfolgten in einer Polypropylenschale auf einem Wippschüttler, wobei immer 2 Filter zusammen in einer Schale behandelt wurden. Das Volumen wurde mit 15 ml je Filter so gewählt, daß die Filter vollständig von der Lösung bedeckt waren. Wenn nicht anders angemerkt, wurden der erste Waschschritt 30 sec und die folgenden Waschschritte jeweils 2 min durchgeführt. Während der Inkubation in den entsprechenden Lösungen wurden die Filter regelmäßig mit einer Pinzette gewendet.

II.3.1 Vorbereitung der Reagenzien für die Synthese

Da bereits kleine Mengen an Verunreinigungen - vor allem durch Wasser - die Syntheseausbeute drastisch reduzieren, wurden alle in der Synthese verwendeten Geräte und Gefäße mit Ausnahme von Kunststoffeinweggefäßen sorgfältig gereinigt und getrocknet. Die Chemikalien wurden in Gegenwart von Trockenmittel in einem luftdichten Gefäß gelagert. Außer Essigsäureanhydrid (Ac_2O), Bromphenolblau (BPB), N,N'-Dimethylformamid (DMF), Ethanol p.a., Dichlormethan, Piperidin, Triisobutylsilan (TIBS) und Trifluoressigsäure (TFA) wurden alle Chemikalien in Gegenwart von Silica Gel Blau (Blaugel) gelagert. N-Hydroxybenzotriazol (HOBt) wurde über Blaugel und Phosphorpentoxid

gelagert. Kleine Behälter mit gekühlt gelagerten Chemikalien wurden vor dem Öffnen mindestens 20 Minuten und große Behälter ÜN auf RT angewärmt.

Folgende Chemikalien zersetzen sich leicht und wurden entsprechend gelagert: Ac_2O ist hydrolyseempfindlich und wurde auf mehrere 250 ml Duranglasflaschen aufgeteilt, im Stickstoffstrom verschlossen und bei RT gelagert. N-Methylimidazol (MeIm) ist stark hygroskopisch und wurde daher zu 200 μl in 500 μl Mikroreaktionsgefäße portioniert und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. TFA ist hygroskopisch, licht- und oxidationsempfindlich und wurde nach dem Öffnen des Originalgefäßes direkt in 50 ml Duranflaschen portioniert und im Stickstoffstrom verschlossen.

Die beiden Lösungsmittel für den Kupplungsansatz, NMP und DMF, wurden deionisiert und entwässert. NMP wurde mit Ionenaustauscherharz (Mischbett-Ionenaustauscher AG 501-X8 (D)) versetzt und mit einem Hantelrührstab langsam gerührt. Nach 2 Stunden wurde eine kleine Menge des Harzes aus der Flasche entnommen und mit Wasser versetzt. Wenn die Ionenbindekapazität des Harzes bereits erschöpft war, erfolgte ein Farbumschlag von blau nach goldgelb. In diesem Fall wurde erneut Harz hinzugefügt. Wenn die Farbe des Ionenaustauscherharzes nicht mehr nach gelb umschlug, wurde ÜN weitergerührt. Anschließend wurde das NMP über eine doppelte Lage Faltenfilter in eine frische Flasche überführt, deren Boden ca. 1 cm hoch mit aktiviertem Molekularsieb, Porengröße 4 Å, bedeckt war. Die ersten 20 – 50 ml NMP wurden verworfen. Zum Durchmischen wurde die Flasche gelegentlich aufgeschüttelt. Nach einer weiteren Filtration am nächsten Tag wurde das NMP zu je 50 ml in 100 ml Duranflaschen portioniert. Das NMP wurde in einer Glasflasche im Stickstoffstrom verschlossen und in einem Exsikkator bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Zum Einfrieren standen die Flaschen nicht direkt auf Blaugel und wurden schräg gestellt, da ansonsten die Gefahr bestand, daß die Glasflaschen beim Einfrieren oder Auftauen platzten. Außerdem wurden mehrere 2 ml-Mikroreaktionsgefäße mit 2 ml NMP gefüllt und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ in einem Exsikkator über Blaugel gelagert.

Das bei der Derivatisierung der Zellulosefilter verwendete DMF wurde in kleinerer Menge analog deionisiert und dehydratisiert.

II.3.2 Häufig verwendete Lösungen

Cappinglösung 2 % (v/v) Ac₂O in DMF

Piperidinlösung 20 % (v/v) Piperidin in DMF

BPB-Stammlösung 1 % (w/v) BPB in DMF

Färbelösung 0,01 % (w/v) BPB in DMF

II.3.3 Derivatisierung der Zellulosefilter

Die Einführung eines Ankers mit Aminofunktion erfolgt durch Veresterung der Zellulose mit einer Fmoc-geschützten Aminosäure. Die Aminosäure wird zunächst in eine Form überführt, in der sie reaktiv genug ist, um mit den Hydroxyl-Gruppen der Zellulose zu einem Ester zu reagieren. Dies geschieht durch die Kondensation der geschützten Aminosäure zu dem entsprechenden Anhydrid, das dann in Gegenwart von Methylimidazol mit der Zellulose umgesetzt wird.

Zellulosefilter aus Whatmanpapier 540 (9 × 13 cm) wurden ÜN im Vakuum getrocknet und anschließend über Blaugel gelagert. Für die Derivatisierung wurden 4 Filter und zwei 1 × 1 cm große Filterschnipsel in einer Polypropylenschale übereinandergelegt. Letztere wurden zur Bestimmung des Derivatisierungsgrads benötigt. Der Stapel wurde mit der jeweiligen Derivatisierungslösung, die immer frisch angesetzt wurde, gleichmäßig befeuchtet. Für Peptide, die in filtergebundener Form analysiert werden sollten, wurde der Filter mit Fmoc-β-Alanin derivatisiert und für Peptide, die nach der Synthese vom Zellulosefilter abgespalten und in Lösung analysiert werden sollten, mit Fmoc-Prolin.

Fmoc-β-Alanin-OH-Anker (für 4 Filter)

[0,2 M Fmoc-β-Ala-OH, 0,26 M DICD, 0,22 M MeIm in DMF]

560 mg	Fmoc-β-Ala-OH
8980 µl	DMF (deionisiert, dehydratisiert)
420 µl	Diisopropylcarbodiimid (DICD)
10 Minuten	Inkubation
180 µl	MeIm

Fmoc-Prolin-OH-Anker (für 4 Filter)

[0,2 M Fmoc-Pro-OH, 0,26 M DICD, 0,46 M MeIm in DMF]

684 mg Fmoc-Pro-OH
8800 μ l DMF (deionisiert, dehydratisiert)
420 μ l DICD
10 Minuten Inkubation
345 μ l MeIm

Die Polypropylenschale wurde verschlossen. Nach Inkubation ÜN wurde der Filterstapel gewendet und für weitere 5 - 8 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Filterschnipsel in ein neues Gefäß überführt und die 4 Filter auf 2 Schalen verteilt. Die Filter wurden 3 $\times$ mit DMF gewaschen. Anschließend wurden die verbliebenen freien Hydroxylgruppen der Zellulose durch 24-stündiges Schwenken in Cappinglösung acetyliert. Die Lösung wurde mehrmals gewechselt und die Filter dabei gewendet. Abschließend wurde 4 $\times$ mit DMF und 3 $\times$ mit Ethanol gewaschen und die Filter im Warmluftstrom eines Föns auf kleinster Stufe zwischen zwei 3MM Whatman-Bögen getrocknet. Die Filter wurden in Folie eingeschweißt und mit Blaugel bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert oder direkt weiterverwendet.

II.3.4 Bestimmung des Derivatisierungsgrads der Filter

Vor der weiteren Synthese muß über eine Quantifizierung der freien Aminogruppen festgestellt werden, ob ein Zellulosefilter in ausreichendem Maße derivatisiert ist.

Die beiden 1 cm^2 großen Filterschnipsel (II.3.3) wurden nach der Derivatisierungsreaktion auf 2 konische Zentrifugenröhrchen verteilt, je 3 $\times$ mit 2 ml DMF gewaschen, und 5 min mit 1 ml Piperidinlösung inkubiert. Anschließend wurde 4 $\times$ mit 2 ml DMF und 3 $\times$ mit 2 ml Färbelösung gewaschen; dabei erhielten die Filterschnipsel eine tiefblaue bis violette Färbung. Die Filterschnipsel wurden 3 $\times$ mit 2 ml Ethanol p.a. gewaschen, im Warmluftstrom getrocknet und anschließend in ein neues konisches Zentrifugenröhrchen überführt. Das filtergebundene BPB wurde mit 2 ml Piperidinlösung pro Filterschnipsel gelöst und anschließend 1:41 in Piperidinlösung verdünnt. Die Extinktion der Entfärbelösung wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 605\text{ nm}$ gegen Piperidinlösung bestimmt.

Die folgende Gleichung beschreibt den Zusammenhang zwischen der Extinktion und der Menge an Aminogruppen pro cm^2 Filterfläche:

$$\text{Amin/cm}^2 = \frac{\text{OD}_{605} \times n \times V}{\epsilon_{605} \times d \times F}$$

Extinktionskoeffizient BPB (ϵ_{605}) = 95000 mol⁻¹ cm⁻¹

Fläche des Filterschnipsels (F) = 1 cm²

Strahlengang (d) = 1 cm

Volumen der Entfärbelösung (V) = 2 ml

Verdünnungsfaktor (n) = 41

Unter Berücksichtigung der oben genannten Werte ergibt sich folgende vereinfachte Gleichung für einen 1 cm² großen Schnipsel:

$$\text{nmol Amin/cm}^2 = \text{OD}_{605} \times 863$$

Zellulosefilter, die mit mindestens 70 nmol Amin pro cm² derivatisiert waren, wurden für die weitere Synthese verwendet.

II.3.5 Definition der SPOTs

Die Ortskoordinaten für die Synthese der einzelnen Peptide werden beim Kuppeln der zweiten Fmoc-geschützten Aminosäure festgelegt. Dies geschieht dadurch, daß der Pipettierroboter die Aminosäuren in kleinen Mengen an den entsprechenden Ortskoordinaten auf den Filter aufbringt. Es bilden sich kleine „SPOTs“ von Dipeptiden, die wieder eine Fmoc-Schutzgruppe am Aminoterminus tragen.

Die Fmoc-geschützten Aminogruppen von β -Alanin bzw. Prolin wurden 5 min mit Piperidinlösung entschützt. Die Lösung wurde dabei nicht erneuert, und die Filter wurden nicht gewendet. Die Filter wurden 5 $\times$ in DMF und 5 $\times$ in Ethanol gewaschen, im Warmluftstrom getrocknet und auf die Teflonplatte des Pipettierroboters gelegt. Als Unterlage diente ein gleichgroßer 3MM Whatman-Filter. Die Filter wurden durch einen Metallrahmen in ihrer Position fixiert. Für β -Alanin-derivatisierte Filter wurde Fmoc- β -Ala-OPfp als zweiter Anker verwendet und für Prolin-derivatisierte Filter Boc-Lys(Fmoc)-OH.

Fmoc- β -Ala-OPfp-Ankerreaktionsmischung (für 4 Filter)[0,3 M Fmoc- β -Ala-OPfp, 0,3 M DICD, 0,06 M HOBt in NMP]

143 mg	Fmoc- β -Ala-OPfp
875 μ l	75 mM HOBt (10 mg HOBt in 990 μ l NMP)
20 μ l	BPB-Stammlösung
50 μ l	DICD

Boc-Lys(Fmoc)-OH-Ankerreaktionsmischung (für 4 Filter)

[0,2 M Boc-Lys(Fmoc)-OH, 0,35 M HOBt, 0,25 M DICD, 0,4 mM Rhodamin in NMP]

100 mg	Boc-Lys(Fmoc)-OH
900 μ l	415 mM HOBt (56 mg HOBt in 944 μ l NMP)
20 μ l	BPB-Stammlösung
2 μ l	0,2 M Rhodaminlösung
41 μ l	DICD

0,2 M Rhodaminlösung: 17,2 mg 5(6)-Carboxytetramethylrhodamin in 182,8 μ l NMP.

Die Lösung wurde bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit Blaugel gelagert. Durch die Beimischung von Rhodaminlösung (1:500) zur Boc-Lys(Fmoc)-OH-Ankerlösung erhielten die SPOTs eine schwache Färbung, wodurch sie nach Beendigung der Synthese sichtbar blieben.

Nach dem Mischen wurde die jeweilige Ankerlösung 45 min inkubiert und 2 min bei $16100 \times g$ zentrifugiert. Zur Definition der SPOTs wurden 0,1 μ l der Ankerlösung in einem Raster von $25 \times 17 = 425$ automatisch aufgebracht. Der Pipettiervorgang wurde dreimal durchgeführt. Durch den in der Ankerreaktionsmischung befindlichen Indikator BPB wurde die Kupplungsreaktion auf den SPOTs überprüft. Die freien α -Aminogruppen wurden im Verlauf der Reaktion mit Fmoc- β -Ala-OPfp bzw. Boc-Lys(Fmoc)-OH in der Kupplungslösung umgesetzt, und die Farbe von BPB auf den SPOTs schlug daher von blau über grün nach gelb um.

Nach dem letzten Pipettiervorgang wurde mindestens 40 min gewartet, bevor die Filter vom Pipettierroboter genommen und in 24 h in Cappinglösung geschwenkt wurden. Die Lösung wurde mehrmals gewechselt. Anschließend wurden die Filter $4 \times$ in DMF, $3 \times$ in Ethanol gewaschen und im Warmluftstrom getrocknet. Die Filter wurden in Folie eingeschweißt und mit Blaugel bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert oder direkt weiterverwendet.

II.3.6 Verlängerung der Peptidketten

II.3.6.1 Herstellung der Fmoc-Aminosäure-OBt-Lösungen

Vor der weiteren Synthese wurden die Aminosäurekupplungslösungen für alle Syntheseschritte vorbereitet. Aus den zu synthetisierenden Peptidsequenzen wurde die Menge der Aminosäurelösungen berechnet, die für die gesamte Synthese benötigt wurden. Es wurden jeweils 0,4 M Lösungen der Aminosäuren in NMP hergestellt, die mit der gleichen Menge einer 0,7 M HOBt-Lösung in NMP gemischt wurden [0,2 M Fmoc-AS-OH, 0,35 M HOBt in NMP]. Die Lösungen wurden für die einzelnen Syntheseschritte auf 500 μ l Mikroreaktionsgefäße verteilt, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum Einsatz in der Synthese bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

II.3.6.2 Kupplungsreaktion

Die Bildung der Säureamid- bzw. Peptidbindung erfolgt unter Abspaltung einer äquimolaren Menge Wasser. Da der Kondensationsvorgang nicht freiwillig abläuft, müssen Reagenzien zugesetzt werden, die dem Reaktionsgemisch Wasser entziehen, indem sie mit dem freiwerdenden Wasser chemisch reagieren. Als wasserentziehendes Mittel kommt dabei DICD zum Einsatz, welches sich mit Wasser unter Bildung von Diisopropylharnstoff irreversibel umsetzt. Um die Kupplungsrate zu erhöhen und zugleich die Racemisierungsrate der Aminosäuren zu senken, führt man die Kupplung über einen HOBt-Aminosäureaktivester durch. Bei der Reaktion des HOBt-Aminosäureaktivesters mit der Aminofunktion der Peptidkette wird HOBt wieder freigesetzt.

Vor jedem Syntheseschritt wurden die vorbereiteten Aminosäurekupplungslösungen mindestens 30 min im Dunkeln auf RT angewärmt und kurz bei $16100 \times g$ zentrifugiert. Anschließend wurden 4 μ l DICD pro 100 μ l (Endkonzentration: 0,25 M) Kupplungslösung zur Aktivierung der Aminosäuren hinzugefügt. Nach kurzem Mischen wurden die Gefäße im Dunkeln bis zum Beginn der Synthese stehengelassen, so daß die Aktivierungszeit ca. 30 min betrug. Vor dem Synthesestart wurden die Kupplungslösungen 1 min bei $16100 \times g$ zentrifugiert, dann wurden die Deckel der Mikroreaktionsgefäße abgeschnitten und die Gefäße in die Halterung des Pipettierroboters einsortiert.

Die 4 vorbereiteten Filter wurden währenddessen $3 \times$ mit DMF gewaschen und zum Entschützen der Aminofunktionen 5 min in je 10 ml 20 % (v/v) Piperidinlösung pro Filter inkubiert. Die Lösung wurde dabei nicht gewechselt, und die Filter wurden nicht

gewendet. Anschließend wurden die Filter $5 \times$ mit DMF gewaschen und danach mit Färbelösung inkubiert, wodurch sich die SPOTs blau färbten. Die Färbelösung wurde so lange gewechselt, bis sie im Überstand gelb blieb. Die Filter wurden $3 \times$ in Ethanol gewaschen, im Warmluftstrom getrocknet und anschließend durch einen Metallrahmen in ihrer alten Position auf der Teflonplatte fixiert, so daß der Pipettierroboter die vorher definierten Syntheseorte wieder genau ansteuern konnte. Auf die SPOTs wurden automatisch $0,2 \mu\text{l}$ des jeweiligen Kupplungsansatzes pipettiert. Das Pipettieren wurde, soweit nicht anders angemerkt, dreimal durchgeführt. Die Farbe der SPOTs schlug während der Kupplungsreaktion von blau nach gelb um. Eine Ausnahme bildeten dabei SPOTs, auf denen Aminosäuren mit basischen Seitenketten vorlagen, wie z. B. Histidin. SPOTs mit diesen Aminosäuren blieben blau, obwohl eine Reaktion stattgefunden hatte. Nach dem letzten Pipettieren blieben die Filter mindestens 40 min auf der Teflonplatte und wurden dann 20 min in Cappinglösung inkubiert. Anschließend wurden die Filter - wie oben beschrieben - entschützt und gefärbt, um sie auf den nächsten Synthesezyklus vorzubereiten. Pro Tag konnten 2 Synthesezyklen erfolgen.

Sollte die Synthese unterbrochen werden, wurden die Filter nach der Inkubation in Cappinglösung $3 \times$ mit DMF, $3 \times$ mit Ethanol gewaschen, im Warmluftstrom getrocknet, in Folie eingeschweißt und in Anwesenheit von Blaugel bei -20°C gelagert.

Im letzten Syntheseschritt wurden Synthesebausteine verwendet, die keine Fmoc-geschützten Aminofunktionen besaßen, so daß aminoterminal keine Aminogruppen vorlagen.

II.3.7 Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen

Im Gegensatz zur Fmoc-Schutzgruppe, die sich unter basischen Bedingungen vom Aminoterminalus löst, erfordert die Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen stark saure Bedingungen sowie die Anwesenheit von Triisobutylsilan (TIBS), um Carbeniumionen, die bei der Abspaltreaktion aus Fragmenten der Seitenkettenschutzgruppen entstehen, abzufangen.

Zur Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen wurden die Filter einzeln $2 \times$ für jeweils 1 h in einer Abspalllösung inkubiert, die immer frisch in der angegebenen Reihenfolge angesetzt wurde. Die Filter wurden während der Inkubation nicht gewendet.

Abspaltungslösung für die Seitenkettenschutzgruppen (für 1 Filter)

[3 % (v/v) TIBS, 2 % (v/v) A. bidest., 50 % (v/v) TFA in Dichlormethan]

10 ml	Dichlormethan
600 µl	TIBS
10 ml	TFA
400 µl	A. bidest.

Nach der Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen wurden Filter, auf denen Peptide mit nicht-abspaltbaren Peptiden synthetisiert waren, 4 × in 15 ml Dichlormethan, 3 × in 15 ml DMF, 3 × in 15 ml Ethanol, 3 × in 15 ml 1 M Essigsäure (pH 1,9) und 3 × in 15 ml Ethanol gewaschen. Die Filter wurden im Warmluftstrom getrocknet und in Anwesenheit von Blaugel bei -20 °C gelagert. Die festphasengebundenen Peptide konnten in dieser Form für weitere Experimente eingesetzt werden.

Filter, auf denen Peptide für die Abspaltung vom Zellulosefilter vorgesehen waren, wurden zunächst 1 × 1 min und 3 × 10 min mit 30 ml Dichlormethan gewaschen, dann 1 × 1 min und 3 × 20 min mit 30 ml einer methanolischen Salzsäurelösung [0,1 % (v/v) HCl und 50 % (v/v) Methanol in A. bidest.] und schließlich 1 × 1 min und 3 × 20 min mit 30 ml 1 M Essigsäure (pH 1,9) behandelt. Die Filter wurden zwischen Whatman 3MM Papier gelegt und in Gegenwart von NaOH-Plätzchen ÜN im Vakuum getrocknet.

II.3.8 Abspaltung der Peptide vom Zellulosefilter

Beim Entschützen der Aminosäureseitenketten wird gleichzeitig die Boc-Schutzgruppe des abspaltbaren Lysyl-Prolin-Ankers abgespalten. Wenn der pH-Wert durch das Entfernen der Essigsäure im Vakuum auf > 7,0 steigt, lagert sich der Lysyl-Prolin-Anker zu einem Diketopiperazinderivat um und verbleibt am Carboxyterminus der Peptide (Bray et al., 1990). Durch die Umlagerung wird die Esterbindung an den Zellulosefilter gespalten und die Peptide sind nur noch physikalisch am Zellulosefilter adsorbiert.

Bei der Definition der SPOTs (II.3.5) war der Boc-Lys(Fmoc)-Kupplungslösung 1:500 Rhodamin beigemischt worden, so daß die SPOTs nach Fertigstellung der Synthese leicht angefärbt waren. Auf den getrockneten Filtern wurden die SPOTs mit einem Locheisen (3 mm Durchmesser) ausgestanzt und mit einer Pinzette einzeln in ein 2 ml-Mikroreaktionsgefäß gegeben. Zusätzlich wurden zwei Filterstücke, auf denen kein Peptid synthetisiert war, als Referenz ausgestanzt.

Elutionspuffer (für 250 ml)

[0,1 M Triethylammoniumacetat, 20 % (v/v) Ethanol in A. bidest.]

3485 µl Triethylamin

50 ml Ethanol

ad 250 ml A. bidest.

mit Essigsäure auf pH 7,0 – 7,5 eingestellt

Auf jedes ausgestanzte Filterstück wurde 500 µl Elutionspuffer gegeben, und die Filterstücke wurden bei 30 °C geschüttelt. Nach ungefähr 30 min wurde mit den Referenzstücken überprüft, daß der pH Wert des Elutionspuffers sich nicht geändert hatte. Nach einer Inkubation ÜN wurde der Überstand mit dem gelösten Peptid in ein neues 2 ml-Mikroreaktionsgefäß gegeben und auf die ausgestanzten Filterstücke noch einmal für 2 h jeweils 500 µl Elutionspuffer gegeben. Der Überstand wurde erneut abgenommen und mit dem ersten Überstand vereinigt. Die gelösten Peptide wurden in einem Vakuumkonzentrator lyophilisiert.

II.4 Quantifizierung von festphasengebundenen Peptiden

Eine relative Quantifizierung von festphasengebundenen Peptiden auf einem Zellulosefilter erfolgte durch einen Chemilumineszenznachweis. Die Peptide trugen am Amino-terminus eine Biotinmarkierung, die durch Meerrettichperoxidase-gekoppeltes Streptavidin und nachfolgende Inkubation mit einem Chemilumineszenz-Substrat nachgewiesen wurde. Da die Bindung der Peptide an die Zellulose in Gegenwart von Basen hydrolyseempfindlich ist, wurde der D-PBS Puffer mit HCl auf pH 7,0 eingestellt.

Ein Zellulosefilter (II.3.7) wurde in einer Glasschale entsprechender Größe 1 × 10 min mit 30 ml Ethanol und anschließend 3 × 10 min mit 30 ml D-PBS gewaschen. Das Absättigen unspezifischer Bindungsstellen erfolgte für 5 h mit 30 ml 1 % (w/v) Casein in D-PBST. Anschließend wurde der Filter 24 h mit 24 ml 2,5 µg/ml Meerrettichperoxidase-gekoppeltem Streptavidin in Absättigungslösung inkubiert. Es folgten 10-minütige Waschschrte, 4 × mit D-PBST und 2 × mit D-PBS, bevor die Flüssigkeit vom Filter abtropfen gelassen wurde und der Filter auf dem Probentisch eines Chemilumineszenzmeßgerätes (Lumi-Imager) positioniert wurde. Die Entwicklung wurde durch Zugabe von 3 ml eines Chemilumineszenzsubstrates (Lumi Light) gestartet. Nach

unterschiedlich langen Inkubationszeiten (1 – 30 min) wurde das BLU-Chemilumineszenzsignal (Boehringer Light Units) für 10 sec gemessen.

II.5 ESI-Massenspektrometrie von gelösten Peptiden

Die vom Zellulosefilter abgespaltenen Peptide (II.3.8) konnten mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) nachgewiesen werden.

Bei der ESI-MS werden Proben in einer Sprühlösung aufgenommen. Je nach pH-Wert der Sprühlösung lagern sich vorwiegend positive oder negative Ionen an die Probensubstanz an. Die Proben werden in einem kontinuierlichen, fein-dispersen Nebel in ein elektrisches Feld versprüht. Es bilden sich zunächst kleine geladene Tröpfchen. Durch das Verdampfen der Sprühlösung kommt es zu einer erhöhten Ladungsdichte an der Oberfläche der Tröpfchen, die schließlich zu einem spontanen Zerfall der Tröpfchen in Mikrotröpfchen (Coulomb-Explosion) führt. Das hierbei entstehende Spray wird nach dem Masse/Ladungsverhältnis (m/z) aufgetrennt und detektiert.

Da sich für den Nachweis der Peptide eine Messung von positiv ionisierten Teilchen als besser geeignet herausgestellt hatte, wurden die lyophilisierten Peptide in einer Sprühlösung zur positiven Ionisierung gelöst.

Sprühlösung für positive Ionisierung, pH 2,8 (300 µl pro Peptid)

30 ml	A. bidest.
10 ml	Acetonitril
400 µl	Essigsäure

II.6 Proteinchemische Arbeiten

II.6.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Von einer Lösung monoklonaler Antikörper mit unbekannter Konzentration wurde der Gesamtproteingehalt bestimmt. Es wurden zwei Verfahren nach Lowry et al. (1951) und nach Smith et al. (1985) verwendet, die auf einer Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ beruhen. Im ersten Fall erfolgt der Nachweis von Cu^+ mit Folin-Ciocalteu-Reagenz und im zweiten Fall mit Bicinchoninsäure (BCA). Für die Erstellung einer Standardgeraden wurde jeweils BSA verwendet. BSA reagiert anders mit den Reaktionslösungen als Immunglobuline, daher

wurde den Herstellerangaben der Firma Pierce entsprechend der nach Lowry bestimmte Proteingehalt mit 1,2 und der mit BCA bestimmt Proteingehalt mit 1,18 multipliziert.

II.6.1.1 Proteinbestimmung nach Lowry

In einer unbehandelten Mikrotiterplatte mit Flachboden wurden Standardverdünnungen von 1 µg bis 10 µg BSA in einem Gesamtvolumen von 5 µl A. bidest. pro Kavität angefertigt. Von den zu bestimmenden Antikörperproben wurden in einem Gesamtvolumen von 5 µl Verdünnungen von 1:8,3 bis 1:50 in A. bidest. angefertigt. Eine Reaktionslösung von 25 µl Reagenz A+S (49 Volumenteile A + 1 Volumenteil S) und 200 µl Reagenz B der Firma Bio-Rad wurde zu jeder Probe gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde 15 min bei RT inkubiert und danach die Extinktion bei einer Wellenlänge von $\lambda = 750 \text{ nm}$ im Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen. Mittels der BSA-Standardgeraden wurde der Proteingehalt bestimmt.

II.6.1.2 Proteinbestimmung mit BCA-Assay

In einer unbehandelten Mikrotiterplatte mit Flachboden wurden Standardverdünnungen von 1 µg bis 10 µg BSA in einem Gesamtvolumen von 100 µl A. bidest. pro Kavität angefertigt. Von den Antikörperproben wurden je nach Vorabschätzung Verdünnungen von 1:20 bis 1:100 oder 1:200 bis 1:1000 in A. bidest. in einem Gesamtvolumen von 100 µl angefertigt. 100 µl einer frisch bereiteten Reaktionslösung des Micro BCA Assays (25 Volumenteile Lösung A, 24 Volumenteile Lösung B und 1 Volumenteil Lösung C) wurde zu jeder Probe hinzugefügt. Die Mikrotiterplatte wurde 60 min bei 60 °C inkubiert, und nach dem Abkühlen auf RT wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge $\lambda = 562 \text{ nm}$ mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen. Der Proteingehalt der unbekannten Probe wurde aus der BSA-Standardgeraden bestimmt.

II.6.2 Gelelektrophorese und Proteinfärbung

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese dient zur Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht unter reduzierenden Bedingungen (Laemmli, 1970). Durch nachfolgende Anlagerung von Farbstoffen werden die Proteine bzw. Proteinfragmente nachgewiesen. Dazu kann der Farbstoff Coomassie-Brilliant Blau (Weber und Osborn, 1969) oder der Fluoreszenzfarbstoff Sypro-Ruby, der einen Nachweis von 0,25 bis 1 ng Protein erlaubt

(Berggren et al., 2000), verwendet werden. Verunreinigungen der Antikörperlösungen mit Proteinen werden im Gel sichtbar. Beide Farbstoffe erlauben eine Abschätzung der Proteinmengen im Gel und damit der Reinheit der Antikörperlösungen.

II.6.2.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zwei Glasplatten wurden mit Ethanol gereinigt, getrocknet, in einem Kunststoffbeutel übereinandergelegt und so eingespannt, daß durch zwei Abstandhalter zwischen den Platten ein Hohlraum von 1 mm Dicke entstand. Darin wurde bis zu einer Höhe von 7 cm eine Lösung für ein 10 %-iges SDS Polyacrylamidtrenngel gegossen und anschließend mit Isopropanol überschichtet. Nach ca. 30 min Polymerisationszeit wurde das Isopropanol entfernt und mit A. bidest. nachgespült. Anschließend wurde die Lösung für das Sammelgel auf das Trenngel gegossen, der Taschenformer eingesetzt und für mindestens eine halbe Stunde polymerisieren lassen.

Polyacrylamidgellösungen (Mengen für 1 Gel)

	Trenngel	Sammelgel
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	1,88 ml	-
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	-	0,47 ml
10 % SDS (w/v)	75 µl	38 µl
40 % (w/v) Acrylamid / Bis-acrylamid-Lösung (29:1)	2,475 ml	0,623 ml
A. bidest.	3,053 ml	2,625 ml
TEMED	11,25 µl	7,5 µl
10 % (w/v) APS	45 µl	30 µl

Vor dem Auftragen der Proben wurde der Taschenformer aus dem Gel entfernt, das Gel in eine Vertikalgelapparatur eingespannt, die Taschen mit Elektrophoresepuffer gespült und die Apparatur mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Von den Antikörperproben wurden Lösungen von 5 µg (für Gele zur Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blau) bzw. 2,5 µg (für Gele zur Anfärbung mit Sypro-Ruby) Protein in 20 µl Probenauftragspuffer angefertigt und 5 min auf 99 °C erhitzt, bevor sie in die Geltaschen gegeben wurden.

Elektrophoresepuffer

25 mM	Tris-Base
192 mM	Glycin
0,1 % (w/v)	SDS

Probenauftragspuffer (Endkonzentration)

6,25 mM	Tris-HCl, pH 6,75
10 % (w/v)	Glycerin
2 % (w/v)	SDS
20 % (v/v)	Mercaptoethanol
0,001 % (w/v)	BPB

Bei jeder Trennung wurde in einer separaten Tasche ein Molekulargewichtsstandard (MultiMark Multi-Colored Standard) mitgeführt, um eine Zuordnung des Molekulargewichts der Antikörperproben zu ermöglichen. Die elektrophoretische Trennung der Proben erfolgte bei 10 mA, bis das BPB im Probenauftragspuffer aus dem Gel ausgetreten war.

II.6.2.2 Coomassie Färbung

In einer Glasschale wurde soviel Coomassie-Färbelösung auf das Gel gegeben, daß es vollständig bedeckt war. Das Färben erfolgte ÜN bei RT auf einem Wippschüttler. Anschließend wurde die Färbelösung gegen eine Entfärbelösung getauscht und solange geschwenkt, bis die gewünschte Farbintensität erreicht war. Die Zugabe von Aktivkohle in einem Papierbeutel zur Entfärbelösung beschleunigte das Entfärben. Die Entfärbelösung wurde mehrmals gewechselt. Das Gel wurde in A. bidest. aufbewahrt und anschließend mit einem Scanner dokumentiert.

Coomassie-Färbelösung

40 % (v/v)	Methanol
10 % (v/v)	Essigsäure
0,2 % (v/v)	Coomassie Brilliant Blau R250

Entfärbelösung

40 % (v/v)	Methanol
10 % (v/v)	Essigsäure

II.6.2.3 Färbung mit Sypro-Ruby

Auf 1 Gel wurde 50 ml Entwicklerlösung Sypro-Ruby gel stain (Fertiglösung) gegeben und ÜN bei RT auf einem Wippschüttler geschwenkt. Das Gel wurde 3×20 min bei RT gewaschen und mindestens 20 min in A. bidest. gegeben, bevor die Fluoreszenz des Sypro-Ruby-Farbstoffs im ChemDoc System nach UV-Anregung gemessen wurde.

Waschlösung

10 % (v/v)	Methanol
7 % (v/v)	Essigsäure

II.7 Arbeiten mit Enzymlösungen**II.7.1 Präparation einer Darmlavage**

Acht 11 Wochen alte weibliche Balb/c Mäuse wurden 2,5 h mit Wasser *ad libitum* gefastet. Nachdem die Mäuse durch Inhalation von Isofluran narkotisiert waren, wurden sie durch zervikale Dislokation getötet und ihre Bauchdecke geöffnet. Das Duodenum wurde hinter dem Magenausgang mit einem Hämostaten abgeklemmt und zum Magen hin durchtrennt. Der Dünndarm wurde vom umgebenden Gewebe freigelegt und mit einem zweiten Hämostaten kurz vor dem Übergang zum Dickdarm abgeklemmt. Hinter dieser Stelle wurde der Darm ein zweites Mal durchtrennt.

Die anschließenden Präparationsschritte wurden auf einer eisgekühlten Oberfläche durchgeführt. Der beidseitig verschlossene Dünndarm wurde zunächst in eisgekühltem SIF-Puffer geschwenkt, um Blut und andere äußere Verunreinigungen zu entfernen und ihn feucht zu halten. Danach wurde die anhaftende Flüssigkeit abtropfen lassen. Das distale Ende des Dünndarms wurde in ein konisches 15 ml-Zentrifugenröhrchen gehängt und der an dieser Seite befestigte Hämostat entfernt. Anschließend wurde am proximalen Dünndarmende ein seitlicher Schnitt gesetzt, so daß eine mit einer Knopfkanüle versehene Spritze in den spannungsfrei gehaltenen Darm eingeführt werden konnte. Der Dünndarm

wurde zwischen zwei Fingern auf der Kanüle fixiert und abgedichtet. Mit einer vorbereiteten Spritze wurden 2,5 ml SIF und 7,5 ml Luft langsam in den Darm injiziert und an der distalen Darmseite gesammelt. Anschließend wurde die Spritze getauscht und erneut 2,5 ml SIF und 7,5 ml Luft in den Darm injiziert. Die Proben wurden kurz auf Eis aufbewahrt, bevor sie 5 min bei 4 °C mit $4000 \times g$ zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde abgenommen, in ein neues vorgewogenes konisches 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und gewogen. Anschließend wurden die Darmlavage zu jeweils 1 ml portioniert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

II.7.2 Bestimmung von Enzymkonzentrationen

Die Konzentrationsbestimmung der aktiven Enzyme erfolgte durch die Hydrolyse von chromogenen para-Nitroanilid (pNA)-Substraten unter Substratsättigungsbedingungen (1,3 mM). Trypsin wurde mit N- α -benzoyl-Arg-p-nitroanilid (L-BAPA) nachgewiesen, Chymotrypsin mit Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilid (Suc-AAPF-pNA) und Elastase mit Succinyl-Ala-Ala-Pro-Ala-p-nitroanilid (Suc-AAPA-pNA). Die Substrate werden spezifisch und mit vernachlässigbarer Kreuzreaktivität durch die jeweiligen Enzyme hydrolysiert (Laine et al., 1993). Alle Substrat- und Enzymlösungen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Enzymstammlösungen (10 mg/ml)

Trypsin	1 mM HCl $\times$ 20 mM CaCl ₂ $\times$ 0,02 % (w/v) Thimerosal
Chymotrypsin	10 mM NaOAc, pH 4,0 $\times$ 0,02 % (w/v) Thimerosal
Elastase	30 mM NaOAc, pH 5,2 $\times$ 0,02 % (w/v) Thimerosal

pNA-Substrat-Stammlösungen

50 mM	L-BAPA in 50 % (v/v) Aceton
10 mM	Suc-AAPF-pNA in Aceton
10 mM	Suc-AAPA-pNA in Aceton

Alle Messungen wurden auf einer nicht-bindenden Mikrotiterplatte mit Flachboden mit verschiedenen Enzymkonzentrationen durchgeführt. Zur Messung der Trypsinaktivität wurde in eine Kavität 4 μ l der L-BAPA-Stammlösung mit soviel SIFTCaCl gegeben, daß nach Hinzufügen der Enzymlösung jeweils ein Gesamtvolumen von 150 μ l entstand, und

in drei weitere Kavitäten jeweils 2 µl der L-BAPA-Stammlösung mit 73 µl SIFTCaCl. Nach Hinzufügen der Enzymlösung wurde die Reaktionslösung gemischt und mit 75 µl auf den drei weiteren Kavitäten seriell 1:2 verdünnt. Die Aktivitäten von Chymotrypsin und Elastase wurden analog bestimmt. Für Chymotrypsin wurden in eine erste Kavität 20 µl Suc-AAPF-pNA-Stammlösung bzw. für Elastase 20 µl Suc-AAPA-pNA auf 150 µl Gesamtvolumen gegeben, und in drei weitere Kavitäten 10 µl der jeweiligen Substratstammlösungen mit 65 µl SIFTCaCl.

Die Mikrotiterplatten wurden in einem vorgewärmten Mikrotiterplatten-Lesegerät 2 h bei 37 °C inkubiert. Alle 2 min wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405$ nm gemessen. Die Steigung (mOD/min) im steilsten Bereich des enzymatischen Abbaus wurde für die Bestimmung der Enzymaktivität verwendet. Unter Substratsättigungsbedingungen ist die Steigung proportional zur Enzymmenge. Die Werte aus der seriellen Enzymverdünnung wurden mit den entsprechenden Verdünnungsfaktoren multipliziert und gemittelt. Aus dem Verhältnis der Steigungen, die mit Standardenzymkonzentrationen und Darmlavagepräparationen bestimmt wurden, konnte die jeweilige Enzymmenge in den Darmlavagepräparationen bestimmt werden.

II.8 Immunoverfahren

II.8.1 Häufig verwendete Lösungen

Absättigungslösung D-PBS $\times$ 1 % (w/v) Casein

1 g	Casein
ad 100 ml	D-PBS (1 $\times$)

Blotto-PBS D-PBS $\times$ 5 % (w/v) Magermilch

5 g	Magermilchpulver
ad 100 ml	D-PBS (1 $\times$)

Peptidlösung

Synthesemenge eines lyophilisierten SPOTs (II.3.8) in 1,5 ml L-PBST.

Die Peptidlösung wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

PI (100×) Proteaseinhibitorlösung

15,4 µM Aprotinin, 1 mM Leupeptin, 20 mM AEBSF-Hydrochlorid

47 mg	AEBSF-Hydrochlorid
7,84 ml	L-PBS
980 µl	0,1 % (w/v) Aprotinin in L-PBS
980 µl	0,5% (w/v) Leupeptin-Hemisulfat in L-PBS

PI wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

PI-Stopplösung (für 1 Mikrotiterplatte) SIFT × PI × 2 mM EDTA

8 ml	SIFT
160 µl	PI (100×)
32 µl	500 mM EDTA-Lösung

Farblösung für die ELISA-Entwicklung (Frey et al., 2000)

250 mM Kaliumcitratpuffer, pH 4,0

52,5 g	Zitronensäure × H ₂ O
ad 1000 ml	A. bidest.
mit 5 N KOH auf pH 4,0 eingestellt	

Die Lösung wurde sterilfiltriert.

Lösung A 205 mM Kaliumcitratpuffer, pH 4,0 × 3,075 mM H₂O₂

172,2 ml	Kaliumcitratpuffer
ad 210 ml	A. bidest.
66 µl	30 % (w/v) H ₂ O ₂

Lösung A wurde bei 4 °C gelagert.

Lösung B 41 mM TMB $\times$ 8,2 mM TBABH in Dimethylacetamid

52,2 mg TMB

4,38 ml Dimethylacetamid

868 μ l 50 mM TBABH (12,9 mg TBABH in 987 μ l Dimethylacetamid)

Lösung B wurde in Mikroreaktionsgefäßen mit geringem Luftvolumen verschlossen, und die Gefäße wurden in Gegenwart von Trockenmittel bei 4 °C lichtgeschützt gelagert.

Substratlösung (für 1 Mikrotiterplatte)

8 ml Lösung A

200 μ l Lösung B

Die beiden Lösungen wurden auf RT angewärmt und 8 – 30 min vor der Verwendung gemischt.

II.8.2 IgA-Bestimmung

Zur Beschichtung wurden hochbindende Mikrotiterplatten der Firma Corning mit 75 μ l einer 5 ng/ml Anti-IgA-Antikörperlösung in D-PBS pro Kavität für 15 h bei 4 °C behandelt. Anschließend wurde 3 $\times$ mit 300 μ l D-PBST pro Kavität gewaschen und unspezifische Bindestellen mit 250 μ l Blotto-PBS pro Kavität abgesättigt. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 6 h wurde erneut 4 $\times$ mit 300 μ l D-PBST pro Kavität gewaschen. Von einem Standard-IgA-Antikörper wurde eine Lösung von 5 μ g/ml in Blotto-PBS und von den Darmlavageproben jeweils eine 1:5-Verdünnung in Blotto-PBS angefertigt. Davon wurden 150 μ l auf die Mikrotiterplatten aufgetragen und in 75 μ l Blotto-PBS pro Kavität 1:2 seriell verdünnt. Nach einer Inkubationszeit von 15 h bei 4 °C wurde 4 $\times$ mit 300 μ l D-PBST pro Kavität gewaschen. 75 μ l einer 500 ng/ml HRP-markierten Anti-IgA-Antikörperlösung in Blotto-PBS wurde pro Kavität aufgetragen und für 90 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 6 $\times$ mit 300 μ l D-PBST pro Kavität gewaschen und 75 μ l Substratlösung pro Kavität aufgetragen. Nach genau 30 min wurde die Entwicklung durch 125 μ l 1 M H₂SO₄ pro Kavität gestoppt, und die Extinktion bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450$ nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen. Die IgA-Konzentrationen der Darmlavageproben konnten durch den Vergleich der EC₅₀-Werte von Standardantikörper und Darmlavageproben bestimmt werden.

II.8.3 Fänger-ELISA

Zur Beschichtung wurden hochbindende 96-Loch Mikrotiterplatten der Firma Corning mit 75 µl pro Kavität einer monoklonalen Antikörperlösung in L-PBS behandelt. Der Antikörper war entsprechend der Peptidmarkierung entweder gegen 2,4-D oder DNP gerichtet. Die eingesetzte Antikörperkonzentration richtete sich nach der zu erwartenden maximalen Signalhöhe und betrug entweder 30 oder 50 ng/ml. Die Platten wurden ÜN (ca. 15 h) bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 300 µl D-PBST pro Kavität wurden unspezifische Bindestellen mit 250 µl Absättigungslösung (1 % (w/v) Casein in D-PBS) pro Kavität für mindestens 3 h bei RT abgesättigt. Anschließend wurde 4 × mit 300 µl D-PBST pro Kavität gewaschen. Je nach Versuchsanforderung wurden verschiedene Lösungen, die Peptid enthielten, auf die Mikrotiterplatte gegeben. Wenn nicht anders angemerkt, wurden in einer Kavität 3 µl (= 0,1 % der Peptidmenge eines SPOTs) oder 6 µl (= 0,2 % der Peptidmenge eines SPOTs) der Peptidlösung mit SIFT auf ein Gesamtvolumen von 150 µl aufgefüllt, und auf die weiteren Kavitäten wurden jeweils 75 µl SIFT gegeben. Durch Transferieren von jeweils 75 µl mit einer Acht-Kanal-Pipette wurde eine serielle 1:2-Verdünnung der Peptidlösung auf den Mikrotiterplatten angefertigt. Nach einer Inkubationszeit von 2,5 h bei RT wurden die Mikrotiterplatten 4 × mit 300 µl D-PBST pro Kavität gewaschen. In jede Kavität wurde 75 µl von 1 µg/ml Meerrettichperoxidase-markiertem Streptavidin in Absättigungslösung gegeben, und die Mikrotiterplatten wurden für eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Mikrotiterplatten 6 × mit 300 µl D-PBST pro Kavität gewaschen und danach bei RT mit 75 µl Substratlösung pro Kavität inkubiert. Nach genau 30 min wurde die Farbentwicklung durch Zugabe von 125 µl 1 M H₂SO₄ pro Kavität abgebrochen. Innerhalb der nächsten halben Stunde wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450$ nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen.

II.8.4 Proteolysetest

Zur Beschichtung wurden hochbindende 96-Loch Mikrotiterplatten der Firma Corning ÜN (ca. 15 h) bei 4 °C mit 75 µl pro Kavität einer 30 ng/ml anti-2,4-D Antikörperlösung (Klon E2/G2) in L-PBS behandelt. Nach dreimaligem Waschen mit 300 µl D-PBST pro Kavität wurden unspezifische Bindestellen mit 250 µl Absättigungslösung (1 % (w/v) Casein in D-PBS) pro Kavität für mindestens 3 h bei RT abgesättigt.

Während der 3 h wurde parallel auf Mikrotiterplatten aus Polypropylen mit Rundboden, die das gleiche 96-Loch-Format wie die beschichtete Mikrotiterplatte besaßen, ein proteolytischer Abbau durchgeführt. In der ersten Kavität einer Reihe wurden 7,5 µl Peptidlösung und in 10 weiteren Kavitäten jeweils 5 µl Peptidlösung vorgelegt (= 0,33 % der Peptidmenge eines SPOTs pro Kavität). Eine Kavität für die Hintergrundkorrektur blieb leer. Anschließend wurden auf die erste Kavität 60 µl SIFTCaCl, auf die 10 weiteren Kavitäten je 45 µl SIFTCaCl und auf die Kavität ohne Peptidlösung 50 µl SIFTCaCl gegeben. Für Inhibitionsmessungen wurde ein Inhibitor zum SIFTCaCl gegeben. Die proteolytische Reaktion wurde durch Zugabe von 7,5 µl einer Proteaselösung auf die erste Kavität gestartet. Von dieser Mischung wurden 25 µl in die nachfolgende Kavität pipettiert, wieder gemischt, und dieser wurde Schritt so oft wiederholt, daß eine serielle 1:3-Verdünnung der Proteaselösung über insgesamt 10 Kavitäten entstand. In eine Kavität mit Peptidlösung wurde keine Proteaselösung gegeben. In jeder Kavität lag nach der Verdünnungsreihe ein Volumen von 50 µl vor. Die Polypropylenplatten wurden mit einem Noppendeckel verschlossen und 90 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die proteolytische Reaktion mit 50 µl PI-Stopplösung pro Kavität beendet und die Mikrotiterplatten, wurden mit einem Noppendeckel verschlossen. Nach 10 min bei 4 °C wurden die Mikrotiterplatten 10 min auf 90 °C erhitzt und vor der weiteren Verwendung mindestens 5 min auf 0 °C gekühlt.

Die vorbereiteten beschichteten und abgesättigten Mikrotiterplatten wurden 4 × mit 300 µl D-PBST pro Kavität gewaschen. Danach wurden jeweils 75 µl der proteasebehandelten Peptidlösung mit einer Acht-Kanal-Pipette transferiert. Nach einer Inkubationszeit von 2,5 h bei RT wurden die Mikrotiterplatten 4 × mit 300 µl D-PBST pro Kavität gewaschen. In jede Kavität wurde 75 µl von 1 µg/ml peroxidase-markiertem Streptavidin in Absättigungslösung gegeben, und die Mikrotiterplatten wurden für eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Mikrotiterplatten 6 × mit 300 µl D-PBST pro Kavität gewaschen und bei RT mit 75 µl Substratlösung inkubiert. Nach genau 30 min wurde die Farbentwicklung durch Zugabe von 125 µl 1 M H₂SO₄ gestoppt. Innerhalb der nächsten halben Stunde wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450$ nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen.

III Ergebnisse

Die Entwicklung des Proteolysetests und seine Anwendung zur Bestimmung der Verdauungsresistenz von Peptiden erfolgte in mehreren Schritten: Zunächst wurden die Synthesebedingungen zur Herstellung von markierten Peptidsubstraten optimiert, danach wurde ein Fänger-ELISA zum Nachweis dieser Peptide entwickelt. Mit diesem Fänger-ELISA wurde eine enzymkinetische Charakterisierung des proteolytischen Abbaus mit definierten Enzym-Substratpaaren durchgeführt. Nach der Präparation einer murinen Darmlavage wurden mit dem optimierten Proteolysetest die Halbwertszeiten von Peptiden in Darmlavage bestimmt.

III.1 Herstellung der Peptide

Um Peptide in großer Zahl für einen Hochdurchsatz-Proteolysetest herzustellen, bedurfte es zunächst eines geeigneten Syntheseverfahrens. Daher wurde die SPOT-Synthese nach Frank (1992), mit der mehr als 1000 verschiedene Peptide in nanomolaren Mengen parallel hergestellt werden können, für die Synthese löslicher markierter Peptidsubstrate überprüft und optimiert.

III.1.1 Optimierung der Kupplungseffizienz

Peptide wurden hergestellt, indem Kupplungslösungen mit Fmoc-geschützten Aminosäurederivaten von einem Pipettierroboter auf definierte SPOT-Areale eines Zellulosefilters pipettiert wurden. Die Aminosäuren reagieren als sogenannte Aktivester mit den aminoterminal freien Aminfunktionen der auf den SPOTs gebundenen Aminosäureketten. Anhand der drei Aminosäuren Alanin, Prolin und Histidin wurde die Kupplungseffizienz eines Syntheseschritts hinsichtlich der Anzahl der Pipettierdurchgänge mit der Aminosäurekupplungslösung und der anschließenden Reaktionszeit untersucht. Auf eine kurze Peptidsequenz aus dem β -Alanin-Anker und 2 Alaninbausteinen wurde parallel unter verschiedenen Synthesebedingungen entweder Alanin, Prolin, Histidin oder – für die maximal Menge an freien Aminfunktionen – keine Aminosäure gekuppelt. Nach der Reaktionszeit wurden die Reste der Kupplungslösung durch gründliches Waschen entfernt und anschließend eine Lösung von Biotin-PEG-CO₂-NHS (1:50000 mit Essigsäure-NHS verdünnt) pipettiert, das an die übriggebliebenen freien Aminfunktionen kuppeln konnte. Zur Bestimmung des Hintergrunds, z. B. durch die unspezifische

Kupplung von Biotin-PEG-CO₂-NHS an die Hydroxylgruppen der Zellulosemembran, wurde die Biotin-Lösung auch auf eine Sequenz aus dem β -Alanin-Anker und Alanin pipettiert, die aminoterminal acetyliert war und daher keine freien Aminfunktionen enthielt. Der Nachweis der Biotinmarkierungen erfolgte mit einem Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat und einem luminogenen Substrat im Lumi-Imager. Die infolge unterschiedlicher Synthesebedingungen übriggebliebenen freien Kupplungsstellen wurden auf die maximale Menge an freien Kupplungsstellen jeweils nach Hintergrundkorrektur standardisiert. In Abb. III.1 ist der Einfluß der Pipettierdurchgänge und der Reaktionszeit auf die Kupplungseffizienz dargestellt.

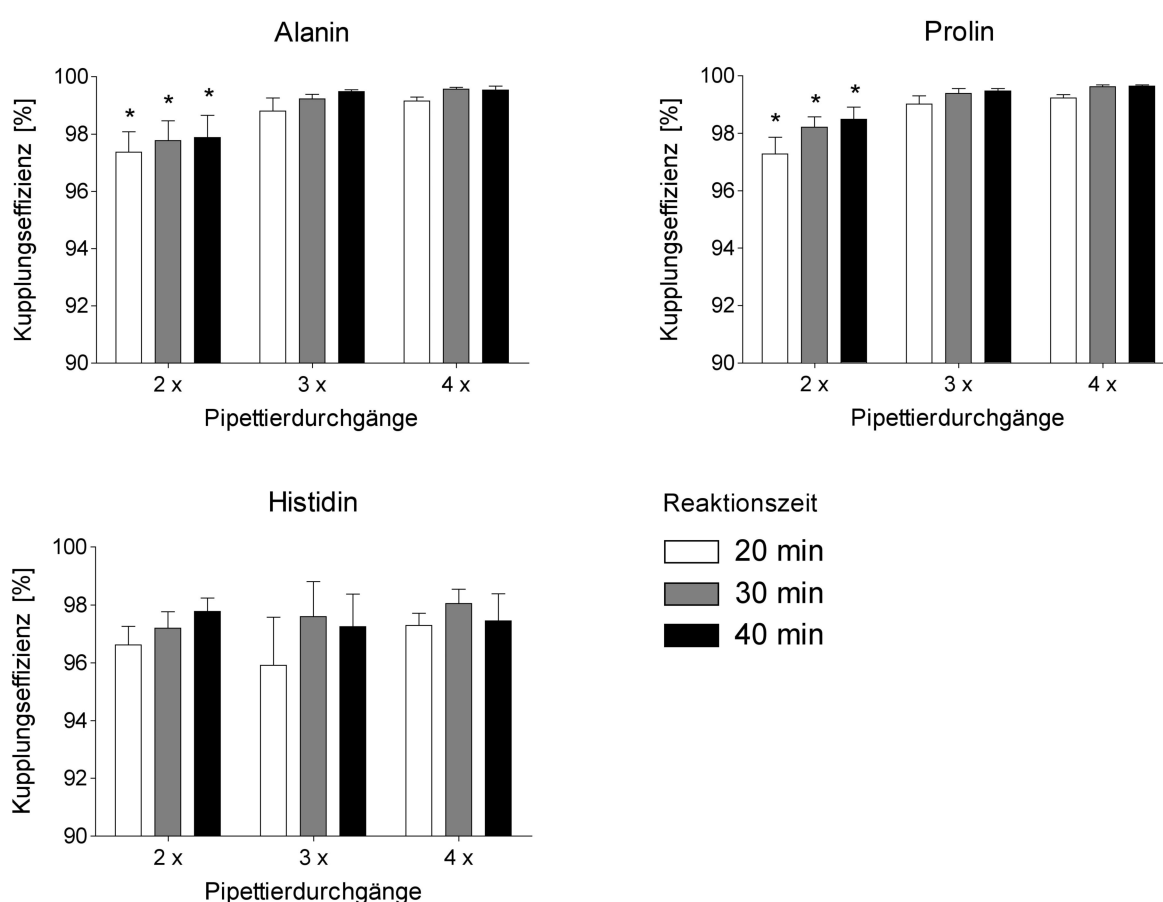


Abb. III.1: Kupplungseffizienzen verschiedener Aminosäuren in Abhängigkeit von der Anzahl der Pipettierdurchgänge und der Reaktionszeit. Mittelwerte und Standardabweichungen von 4 Messungen sind als Säulen mit Fehlerbalken dargestellt. Die mit einem Asterisk gekennzeichneten Kupplungseffizienzen sind signifikant niedriger als die mit 4 Pipettierdurchgängen und 40 min Reaktionszeit erreichten (ANOVA, Fisher's PLSD-Test, $p < 0,05$)

Nach 3 Pipettierdurchgängen mit je 40 min Reaktionszeit lag die Kupplungseffizienz von Alanin bei 99,5 %, von Prolin bei 99,5 % und von Histidin bei 97,2 %. Ein Unterschied zu 4 Pipettierdurchgängen mit 40 min Reaktionszeit (99,5 %, 99,6 % bzw. 97,5 %) liegt im

Bereich der Meßschwankungen, so daß bei den weiteren Synthesen alle Kupplungsschritte mit 3 Pipettierdurchgängen und einer Mindestreaktionszeit von 40 min durchgeführt werden konnten.

Für den Proteolysetest wurden Peptide mit einer Länge von bis zu 25 Aminosäuren benötigt. Die Gesamtsyntheseausbeute, die sich aus der Kupplungseffizienz der Aminosäuren zur Potenz der Anzahl der Kupplungsschritte ergibt, erreicht 75 % bei 25 Syntheseschritten und einer durchschnittlichen Kupplungseffizienz von 98,7 %.

III.1.2 Abspaltung der Peptide vom Zellulosefilter

Für weitere Untersuchungen wurden Peptide benötigt, die nach der SPOT-Synthese vom Zellulosefilter abgespalten wurden. Die Abspaltungseffizienz wurde bestimmt, indem auf mehreren SPOTs eines Filters der spaltbare Lysyl-Prolin-Anker mit einer aminoterminalen Biotin-PEG-CO₂-Markierung, die 1:150000 mit Essigsäure-NHS verdünnt war, synthetisiert wurde. Nach der Fertigstellung der Synthese wurde der Filter geteilt. Ein Filterteil wurde nicht weiterbehandelt, während ein zweiter und dritter Filterteil nach dem Abspaltungsprotokoll für den Lysyl-Prolin-Anker (II.3.7 und II.3.8) behandelt wurden. Der dritte Filterteil wurde während der Inkubation mit dem Elutionspuffer zusätzlich 4 x jeweils 7 min mit Ultraschall behandelt. Der Nachweis der auf dem Zellulosefilter verbliebenen Biotinmarkierungen erfolgte mit einem Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat und einem luminogenen Substrat im Lumi-Imager. Die Abspaltungseffizienz betrug 95 ± 4 % ohne Anwendung von Ultraschall und 92 ± 3 % mit Anwendung von Ultraschall (jeweils geometrischer Mittelwert und Standardabweichung von 8 SPOTs). Bei den folgenden Synthesen wurde das Abspaltprotokoll ohne Ultraschallbehandlung unverändert verwendet.

III.1.3 Analyse der gelösten Peptide mittels ESI-Massenspektrometrie

Abb. III.2 (oben) zeigt die Strukturformel eines SPOT-synthetisierten Peptids, die sich nach der Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen und der Spaltung des Lysyl-Prolin-Ankers ergibt. Das Sequenzmotiv besteht nur aus einem Alanin. Die anderen Teile des Moleküls sind die Reste des spaltbaren Ankers, Abstandshalter und Markierungen. In Abb. III.2 (unten) ist ein Elektrospray-Ionisations-Massenspektrum (ESI-MS) dieses gelösten Peptids dargestellt.

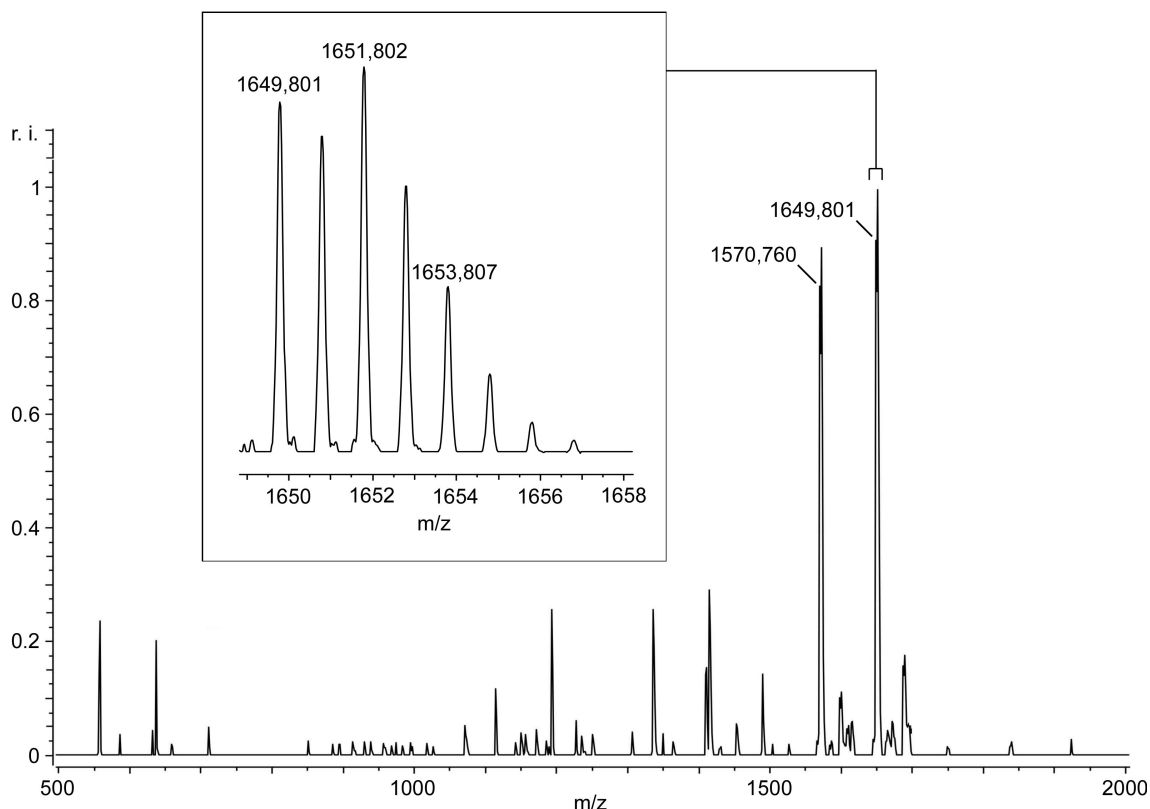


Abb. III.2: Strukturformel (oben) und ESI-Massenspektrum, deconvoluted, (unten) eines SPOT-synthetisierten Peptids. In dem vergrößerten Ausschnitt des Hauptsignals ist das Isotopenmuster zu sehen, das für Moleküle mit Chloratomen charakteristisch ist.

Das ESI-MS in Abb. III.2 (unten) zeigt zwei Hauptsignale bei den Massen von 1570,760 m/z und 1649,801 m/z. Die genaue Masse von 1633,81 g/mol ist allerdings nicht zu sehen. Um der Ursache dafür auf den Grund zu gehen, wurden verschiedene Biotinderivate mittels ESI-MS untersucht. Es zeigte sich, daß alle Biotinderivate eine Massenzunahme von +16 m/z aufwiesen. Das ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß das Sulfid im Biotin oxidationsempfindlich ist und bei der Peptidsynthese oder der Peptidabspaltung vollständig zu Biotinsulfoxid oxidiert wird. Der zweite Massenunterschied von -79 m/z im Vergleich zum oxidierten Peptid ist auf die Spaltung des Lysyl-Prolin-Ankers

zurückzuführen. Dieser Anker sollte sich während der Spaltung durch eine interne Umlagerung zu einem Diketopiperazinderivat umlagern, so wie es in der Strukturformel (Abb. III.2 oben) zu sehen ist. Die Umlagerung war aber unvollständig, und ein Teil der Peptide wurde so abgespalten, daß sie carboxyterminal Prolin verloren. Beide Modifikationen sind für den Einsatz der Peptide im Fänger-ELISA und Proteolysetest jedoch unproblematisch, da das Biotinsulfoxid von Streptavidin gebunden wird (Lichstein und Birnbaum, 1965) und die Ankerreste außerhalb der beiden Peptidmarkierungen liegen. Darüber hinaus fehlte den meisten kleineren Massensignalen das für Chlor charakteristische Isotopenmuster (vergrößerter Ausschnitt in Abb. III.2 unten). Chlor kam ausschließlich in der 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)-Markierung vor, mit der die Peptide durch den Fängerantikörper auf der Mikrotiterplatte gebunden wurden. Eine Reinigung von diesen unmarkierten Molekülen geschah somit, wenn vollständig markierte Peptide auf der Mikrotiterplatte gebunden wurden, während die unmarkierten Moleküle beim anschließenden Waschen entfernt wurden. Auf eine weitere Reinigung der Peptide, etwa durch HPLC, konnte daher verzichtet werden.

III.2 Konzentration und Reinheit der Fängerantikörper

Für die Optimierung des Fänger-ELISAs wurden zum einen 2 affinitätsgereinigte monoklonale Anti-DNP-Antikörper der Firma Interchim verwendet, die in einer Konzentration von 1 mg/ml geliefert wurden, und zum anderen 4 monoklonale Anti-2,4-D-Antikörper, die freundlicherweise von Dr. Milan Fránek (Veterinary Research Institute, Brünn, Tschechien) zur Verfügung gestellt wurden. Die Herstellung und Charakterisierung der Anti-2,4-D-Antikörper ist in Fránek et al. (1994) beschrieben. Um die Antikörper vergleichen zu können, war es notwendig, die Konzentration für die Beschichtung der Mikrotiterplatten zu kennen. Während für die beiden affinitätsgereinigten Anti-DNP-Antikörper genaue Konzentrationsangaben des Herstellers vorlagen, mußte die Konzentration der Anti-2,4-D-Antikörper, die aus Aszites gewonnen wurden, bestimmt werden. Eine Konzentrationsbestimmung des Gesamtproteins erfolgte nach Lowry und mit einem BCA-Assay. Da der Gesamtproteingehalt auch Proteinverunreinigungen einschließt, war es notwendig, zusätzlich die Reinheit der Antikörperlösungen zu überprüfen. Proteinverunreinigungen können im SDS-Polyacrylamidgel sichtbar gemacht werden (Abb. III.3).

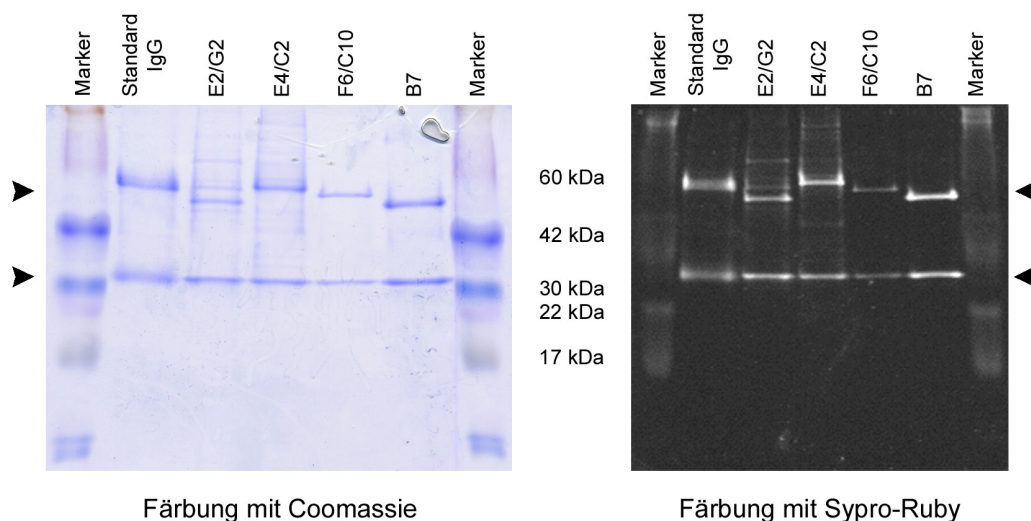


Abb. III.3: Elektrophoretische Trennung verschiedener Antikörperpräparationen im 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel. Pro Spur wurden auf dem linken Gel jeweils 5 µg und auf dem rechten jeweils 2,5 µg Protein aufgetragen. Der Proteinnachweis erfolgte links mit Coomassie Brilliant Blau und rechts mit dem Fluoreszenzfarbstoff Sypro-Ruby. Leichte und schwere Ketten der Antikörper sind mit Pfeilspitzen markiert.

Ein Antikörper zerfällt unter denaturierenden Bedingungen in die leichten und schweren Ketten, die als definierte Banden detektiert werden können. Die Signalintensitäten dieser beiden Banden können zu der summierten Signalintensität der kontaminierenden Banden nach der jeweiligen Hintergrundkorrektur ins Verhältnis gesetzt werden. Dieses Verhältnis ergibt den Anteil an Proteinverunreinigungen, der von der Proteinkonzentration subtrahiert wird (Tab. III.1).

Antikörperklon	Lowry [mg/ml]	BCA-Assay [mg/ml]	Gesamtprotein [mg/ml]	Verunreinigung [%]	Antikörper [mg/ml]
E2/G2	9,3 ± 1,3	8,5 ± 0,8	8,9	5	8,5
E4/C2	5,7 ± 0,3	4,9 ± 0,5	5,3	11	4,7
F6/C10	12,2 ± 1,1	11,4 ± 0,8	11,8	-	11,8
B7	0,64 ± 0,01	0,57 ± 0,13	0,61	-	0,61

Tab. III.1: Proteinkonzentrationsbestimmung der Antikörperlösungen. Der Gesamtproteingehalt wurde je 3x nach Lowry und mit einem BCA-Assay bestimmt. Von den drei Messungen sind Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben. Die nach beiden Verfahren bestimmten Werte wurden gemittelt. Für die Bestimmung der Antikörperkonzentration wurden die Verunreinigungen, die sich aus der SDS-Polyacrylamidgel-Analyse (Abb. III.3) ergeben haben, von der Gesamtproteinkonzentration subtrahiert.

Der Anteil der Proteinverunreinigungen an der Gesamtproteinkonzentration liegt bei maximal 11 % (E4/C2). Die in Tab. III.1 aufgelisteten Antikörperkonzentrationen wurden für die Angabe der Beschichtungsmengen der Mikrotiterplatten zugrunde gelegt. Antikörper B7 wurde wegen der geringen verfügbaren Menge nicht weiterverwendet.

III.3 Aufbau und Optimierung des Fänger-ELISAs

Mit dem Fänger-ELISA wurden Peptide nachgewiesen, die an beiden Enden eine Markierung trugen: Die Peptide wurden über eine Haptenmarkierung von einem Fängerantikörper an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte gebunden und über eine Biotin-Markierung von einem Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat mit Hilfe eines chromogenen TMB-Substrates nachgewiesen. Das Sequenzmotiv der Peptide bestand jeweils aus einer Aminosäure (Alanin). Auf der aminoterminalen Seite des Sequenzmotivs wurden unterschiedliche Haptene und Abstandshalter für die Optimierung des Fänger-ELISAs verwendet. Auf der carboxyterminalen Seite des Sequenzmotivs wurden jeweils der gut wasserlösliche PEG-9-Abstandshalter und Biocytin verwendet, so wie es in Abb. III.2 oben dargestellt ist. Auf eine detaillierte Untersuchung des Biotin-Streptavidin-Bindepaars wurde verzichtet, da es eine der höchsten Affinitätskonstanten besitzt, die bekannt sind (Green, 1990). Das Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat unterliegt außerdem keiner Teildenaturierung, wie sie bei der Adsorption des Fängerantikörpers an die Mikrotiterplatte möglich ist.

Für den Fänger-ELISA ist eine möglichst hochaffine spezifische Bindung des Peptids über seine Haptenmarkierung durch den Fängerantikörper an die Oberfläche der Mikrotiterplattenkavitäten erforderlich. Damit die optischen Dichten (OD) vergleichbar waren, wurde zur Beschichtung jeweils eine Lösung von 50 ng/ml Fängerantikörper gegen die entsprechende Haptenmarkierung der Peptide verwendet. Die nach Peptidbindung, Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Bindung und Farbreaktion erhaltenen ODs wurden durch nicht-lineare Regression mit Hilfe einer logistischen 4-Parameter-Gleichung (III.1) ausgewertet (Rodbard und Hutt, 1974).

$$y = \frac{a - d}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b} + d \quad \text{Gleichung (III.1)}$$

- Variablen:** x = Peptidkonzentration
y = OD 450nm
- 4 Parameter:** a = oberes Plateau (MaxOD)
b = Steigung bei $\frac{1}{2}$ MaxOD - Hintergrund
c = Peptidkonzentration bei $\frac{1}{2}$ MaxOD - Hintergrund (EC50-Wert)
d = unteres Plateau (Hintergrund)

Die 4-Parameter-Gleichung läßt sich aus dem Massenwirkungsgesetz ableiten (s. Anhang VII.1.1). Im unteren Plateau ist so wenig Peptid vorhanden, daß alle Bindestellen des Fängerantikörpers frei sind und nur das Hintergrundsignal gemessen wird. Im Wendepunkt der Kurve (EC50-Wert) ist die Hälfte der Antikörperbindestellen belegt und im oberen Plateau sind die Antikörperbindestellen vollständig abgesättigt, so daß ein Maximalsignal (MaxOD) erreicht wird. Die Affinität von Antikörper und Haptenmarkierung des Peptids kommt durch 2 Kriterien zum Ausdruck: Zum einen wird nach dem Massenwirkungsgesetz bei einer hohen Antikörper-Hapten-Affinität das Gleichgewicht von Antikörper und Hapten zugunsten des Antikörper-Hapten-Komplexes, der als OD gemessen wird, verschoben. Somit kann die Peptidmenge, die zum Erreichen der MaxOD benötigt wird, reduziert werden. Da der Übergang in den Bereich der MaxOD fließend ist und nicht genau festgelegt werden kann, ist es üblich den Testmittelpunkt (EC50-Wert) der Ausgleichskurve als Maß für die Affinität von Antikörper und Hapten anzugeben: Je geringer der EC50-Wert ist, desto höher ist die Affinität. Zum anderen steigt aber auch die MaxOD mit der Bindungsaffinität (Steward und Lew, 1985), was aus der 4-Parameter-Gleichung alleine nicht ersichtlich ist. Da sich die OD proportional zur Antikörperkonzentration verhält, mit der die Mikrotiterplatte beschichtet wird, bedeutet das, daß bei einer höheren Affinität von Antikörper zur Haptenmarkierung des Peptids die Antikörperkonzentration zum Beschichten der Mikrotiterplatten reduziert werden kann.

III.3.1 Anti-DNP- und Anti-2,4-D-Antikörper im Vergleich

Die drei Anti-2,4-D-Antikörper E2/G2, E4/C2 und F6/C10 wurden den beiden kommerziell erhältlichen Anti-DNP-Antikörpern LO-DNP-1 und LO-DNP-61 als Fängerantikörper im ELISA gegenübergestellt und bei der gleichen Beschichtungskonzentration hinsichtlich der MaxOD und des EC50-Wertes verglichen. Das Hapten 2,4-Dinitrophenyl (DNP) entsteht bei Umsetzung von Proteinen mit 2,4-Dinitrofluorbenzol (Sanger's Reagenz). Das eigentliche Hapten ist deshalb mit großer Wahrscheinlichkeit 2,4-Dinitrophenyl-N-alkylanilin, wobei der Einfluß der Länge der Alkylkette auf die Bindungseffizienz der Anti-DNP-Antikörper noch nicht bekannt ist. Es wurden daher vier unterschiedlich lange Aminoalkylcarbonsäuren, die das DNP-Strukturelement enthalten, sowie 2,4-Dinitrophenylessigsäure, bei welcher der Stickstoff zwischen Aromat und Alkylkette fehlt, zur Bestimmung der Bindungseffizienz der Anti-DNP-Antikörper getestet. Dem DNP-System gegenübergestellt wurde das Hapten 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure. Auch hier ist nicht das freie organische Molekül das Hapten, sondern das Säureamid des 2,4-D, da 2,4-D-Proteinkonjugate zur Antikörpergewinnung eingesetzt wurden (Franek et al., 1994). Zur besseren Vergleichbarkeit wurde auch hier das 2,4-D über eine Aminoalkylcarbonsäure mit dem Peptid verbrückt.

Um des weiteren den Einfluß der Synthesebedingungen auf die MaxOD und den EC50-Wert zu untersuchen, wurden Peptide verwendet, die aus 3 verschiedenen Peptidsynthesen stammten. In Abb. III.4 ist die Abhängigkeit der OD von der Peptidmenge bei Verwendung verschiedener Antikörper und Hapten-Aminocarbonsäure-Kombinationen dargestellt.

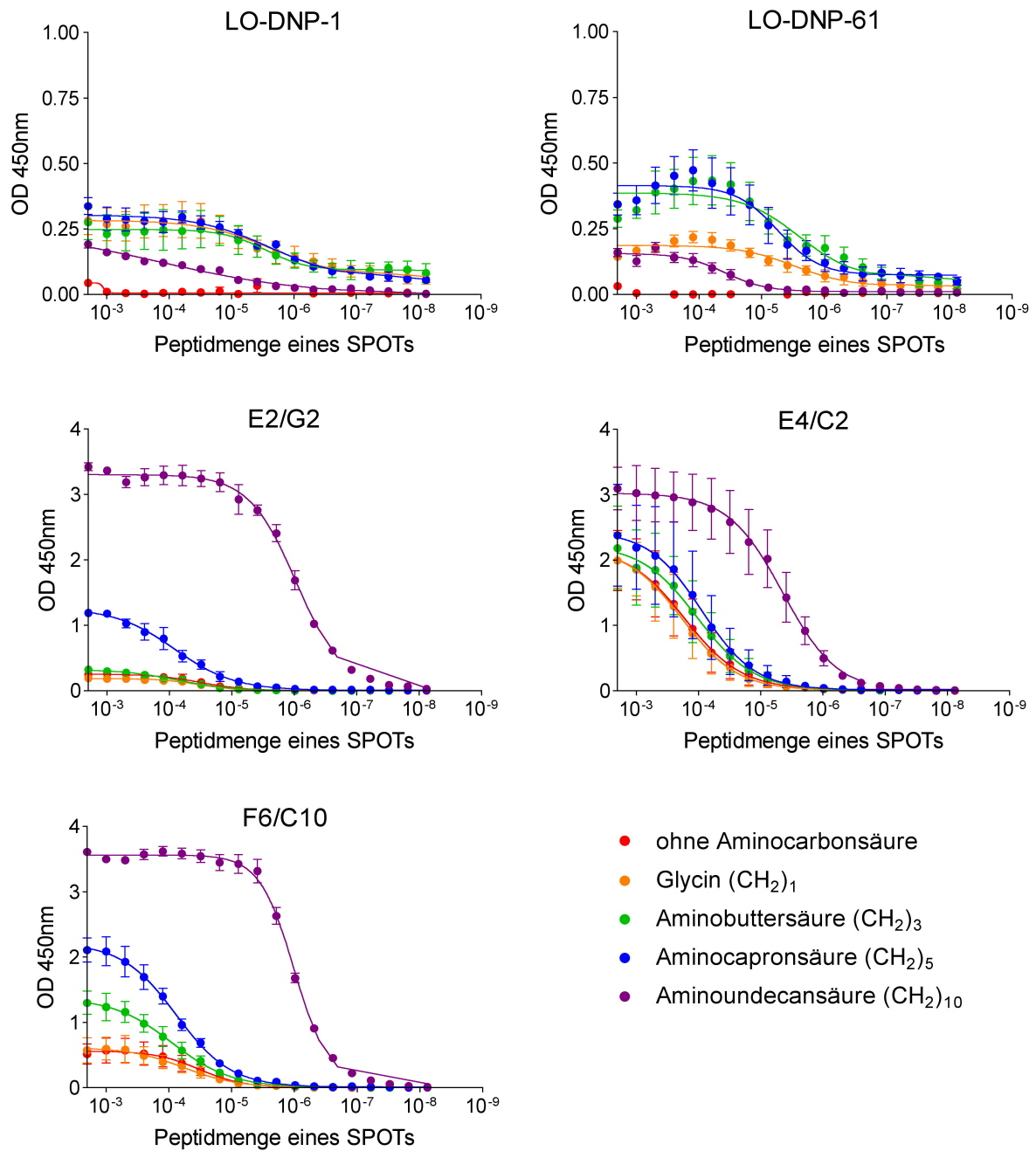


Abb. III.4: Analyse unterschiedlicher Antikörper und Hapten-Aminocarbonsäure-Kombinationen im Fänger-ELISA. Die Beschichtung der Mikrotiterplatten erfolgte mit Anti-DNP (LO-DNP-1 oder LO-DNP-61) bzw. Anti-2,4-D (E2/G2, E4/C2 oder F6/C10) Antikörpern. Kombinationen von DNP bzw. 2,4-D mit unterschiedlich langen Aminocarbonsäuren wurden als Haptenmarkierung der Peptide verwendet. Die Verdünnungsreihen wurden mit Peptiden aus 3 unabhängigen Peptidsynthesen jeweils dreimal durchgeführt. 3-fach-Messungen des Fänger-ELISAs mit Peptiden aus einer Synthese wurden zusammengefasst. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardfehler von 3 Synthesen. Die Ordinaten der Regressionskurven für die beiden Anti-DNP-Antikörper wurden wegen der geringeren OD-Werte nur bis zu einer OD von 1 skaliert.

Hapten	Antikörper		ohne Amino- carbonsäure	Glycin	Aminobut- tersäure	Aminoca- pronsäure	Aminoun- decansäure
DNP	LO-DNP-1	MaxOD	0,04	0,28	0,25	0,30	0,25
		EC50	$1,1 \times 10^{-3}$	$2,2 \times 10^{-6}$	$2,8 \times 10^{-6}$	$2,4 \times 10^{-6}$	$1,4 \times 10^{-4}$
	LO-DNP-61	MaxOD	0,12	0,19	0,39	0,41	0,16
		EC50	$2,5 \times 10^{-3}$	$3,0 \times 10^{-6}$	$2,5 \times 10^{-6}$	$5,5 \times 10^{-6}$	$3,9 \times 10^{-5}$
2,4-D	E2/G2	MaxOD	0,26	0,19	0,33	1,26	3,30
		EC50	$3,2 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-5}$	$7,5 \times 10^{-5}$	$8,3 \times 10^{-5}$	$9,4 \times 10^{-7}$
	E4/C2	MaxOD	2,19	2,20	2,24	2,44	3,02
		EC50	$1,7 \times 10^{-4}$	$1,8 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-4}$	$8,9 \times 10^{-5}$	$4,5 \times 10^{-6}$
	F6/C10	MaxOD	0,56	0,62	1,37	2,22	3,56
		EC50	$3,3 \times 10^{-5}$	$5,9 \times 10^{-5}$	$9,0 \times 10^{-5}$	$7,6 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-6}$

Tab. III.2: MaxOD und EC50-Wert aus Abb. III.4. Optimale Hapten-Aminocarbonsäure-Kombinationen sind fett hervorgehoben.

Bei allen Fängerantikörpern zeigte sich ein Unterschied in der MaxOD und dem EC50-Wert in Abhängigkeit von der Hapten-Aminocarbonsäure-Kombination, mit der das Peptid markiert war. Die beiden Anti-DNP-Antikörper wiesen bei der Verwendung von DNP-Buttersäure und DNP-Caprinsäure als Peptidmarkierung sowohl in bezug auf eine hohe MaxOD als auch einen niedrigen EC50-Wert ein Optimum auf. Bei den Anti-2,4-D-Antikörpern dagegen war die Verwendung von 2,4-D-Aminoundecansäure (Aun) als Peptidmarkierung optimal, um eine hohe MaxOD und einen niedrigen EC50-Wert zu erreichen. Allerdings ist nicht zu erkennen, ob 2,4-D-Aun die optimale Hapten-Aminocarbonsäure-Kombination ist, das Optimum zwischen 2,4-D-Aminocaprinsäure und 2,4-D-Aun liegt oder erst mit längeren 2,4-D-Aminocarbonsäuren erreicht wird. Die Unterschiede in der Erkennung von 2,4-D-Aun durch alle drei Anti-2,4-D-Antikörper waren nur geringfügig. Auch die beiden Anti-DNP-Antikörper verhielten sich bei der Erkennung verschiedener DNP-Kombinationen jeweils ähnlich.

Während mit den Anti-2,4-D-Antikörpern und 2,4-D-Aun im Durchschnitt eine 10 x höhere MaxOD als mit Anti-DNP-Antikörpern und DNP-Buttersäure oder DNP-Caprinsäure erreicht wurde, unterschieden sich die EC50-Werte nicht so stark. Daher wurde mit einem ungepaarten 2-seitigen t-test untersucht, ob das Antikörper-Hapten-Paar mit dem niedrigsten EC50-Wert ($9,4 \times 10^{-7}$): E2/G2 mit 2,4-D-Aun im Vergleich der 3 Synthesen signifikant ($p < 0,05$) niedrigere EC50-Werte lieferte als die anderen Paare. Es zeigte sich, daß dies weitgehend der Fall war. 2,4-D-Aun lieferte mit E2/G2 signifikant

niedrigere EC50-Werte als alle anderen Paare mit Ausnahme von LO-DNP-61 mit DNP-Glycin oder DNP-Aminobuttersäure und F6/C10 mit 2,4-D-Aun. Aufgrund der mit Abstand höheren MaxOD und der weitgehend niedrigeren EC50-Werte wurden die weiteren Untersuchungen auf die Anti-2,4-D-Antikörper beschränkt.

III.3.2 Einfluß von 2,4-D-Derivaten und -Kombinationen auf die Affinität

Wegen der starken Abhängigkeit der MaxOD und des EC50-Werts von der Länge der Aminocarbonsäure, mit der 2,4-D kombiniert war, wurden weitere 2,4-D-Derivate auf ihre Eignung als Peptidmarkierung für die Anti-2,4-D-Fängerantikörper hin untersucht. Analoge Strukturen von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D): 2,4-Dichlorphenylessigsäure (2,4-DE) und 2,4-Dichlorphenoxybuttersäure (2,4-DB) wurden in Kombination mit Aun und einer längeren nicht aliphatischen Kette aus 9 Polyethylenglycoleinheiten (PEG-9) synthetisiert. Außerdem wurde die Anfangssequenz von Thyreoglobulin (NIFYEQ) in Kombination mit 2,4-D synthetisiert. Thyreoglobulin war für die Herstellung der Anti-2,4-D-Antikörper als Trägermolekül zur Immunisierung verwendet worden (Franek et al., 1994), und eine mögliche Derivatisierungsstelle des Trägermoleküls mit 2,4-D könnte der Aminoterminus gewesen sein. Wenn 2,4-D vom Antikörper nicht nur alleine gebunden wird, sondern vor allem in Kombination mit dem Trägermolekül, dann sollte mit 2,4-D in Kombination mit der Anfangssequenz eventuell eine Steigerung der Affinität zu sehen sein.

Anti-körper		2,4-D Aun	2,4-D PEG-9	2,4-DE Aun	2,4-DE PEG-9	2,4-DB Aun	2,4-DB PEG-9	Thyreoglobulin
E2/G2	MaxOD	3,35	0,18	-	-	-	-	0,08
	EC50	$2,8 \times 10^{-5}$	$4,5 \times 10^{-3}$	-	-	-	-	$3,3 \times 10^{-3}$
E4/C2	MaxOD	3,08	-	-	-	-	-	-
	EC50	$4,8 \times 10^{-4}$	-	-	-	-	-	-
F6/C10	MaxOD	3,23	0,90	-	-	-	-	0,35
	EC50	$4,1 \times 10^{-5}$	$5,9 \times 10^{-3}$	-	-	-	-	$1,6 \times 10^{-4}$

Tab. III.3: MaxOD und EC50-Wert verschiedener Anti-2,4-D-Antikörper und Hapten-Kombinationen. Es sind Mittelwerte von 3 Messungen mit Peptiden aus einer Synthese angegeben. Bei den mit „-“ gekennzeichneten Werten konnte keine MaxOD und kein EC50-Wert bestimmt werden, da kein oberes Plateau der Meßwerte für eine Regression an die 4-Parameter-Gleichung erreicht wurde.

Vergleichbar hohe MaxODs bzw. niedrige EC50-Werte wie bei 2,4-D-Aun wurden von keiner anderen Hapten-Kombination erreicht. Am ungünstigsten wirkte es sich aus, wenn

statt 2,4-D chemisch leicht modifizierte Derivate eingesetzt wurden. In diesem Fall konnte mit den Meßwerten keine Regression an die 4-Parameter-Gleichung durchgeführt werden. Zum Erreichen einer hohen MaxOD und eines niedrigen EC50-Wertes war es somit notwendig, eine Kombination von 2,4-D mit einer aliphatischen Aminocarbonsäure als aminoterminal Peptidmarkierung einzusetzen. Welcher Anti-2,4-D-Antikörper jeweils verwendet wurde, war dabei zweitrangig. Für die folgenden Experimente wurde nur der Antikörper E2/G2 verwendet.

III.3.3 Einfluß der Länge von 2,4-D-Aminocarbonsäuren auf die Affinität

Wie in Abb. III.4 zu sehen, gibt es eine Korrelation zwischen den mittels Fänger-ELISA bestimmten MaxODs und EC50-Werten und der Länge der Aminocarbonsäure, mit der 2,4-D kombiniert ist. Um diese Beziehung weiter zu analysieren, wurden Peptide verwendet, die mit 2,4-D in Kombination mit allen unverzweigten Aminocarbonsäuren von 1 bis 11 CH₂-Einheiten markiert waren. Lysin war die bevorzugte Derivatisierungsstelle bei der Kupplung von 2,4-D an das Trägermolekül Thyreoglobulin, so daß von einer Peptidmarkierung mit Lysin, an dessen Seitenkette aus 4 CH₂-Einheiten 2,4-D konjugiert ist, die höchste Affinität zu erwarten wäre. Darüber hinaus wurden Peptide verwendet, die nur mit 2,4-D markiert waren oder mit 2,4-D in Kombination mit einem kurzen (PEG-2) oder langen (PEG-9) nicht-aliphatischen Polyethylenglycolbaustein. In Abb. III.5 ist der Einfluß dieser Derivate auf MaxOD und EC50-Wert dargestellt.

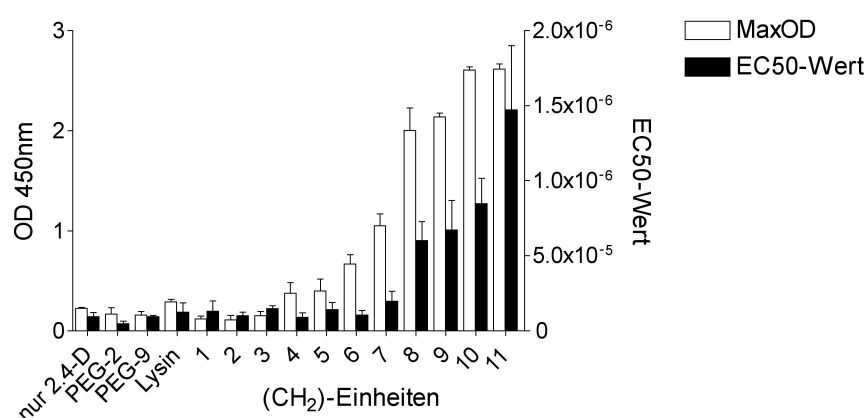


Abb. III.5: Einfluß unterschiedlicher 2,4-D-Kombinationen als Peptidmarkierung auf die MaxOD und den EC50-Wert bei Verwendung des Anti-2,4-D-Antikörpers E2/G2. Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler von 3 Durchführungen des Fänger-ELISAs mit Peptiden aus einer Synthese.

Während 2,4-D in Kombination mit nicht-aliphatischen Ketten im Vergleich zu 2,4-D alleine keine oder nur eine geringfügige Erhöhung der MaxOD bzw. Reduzierung des

EC50-Wertes bewirkte, war bei den Kombinationen von 2,4-D mit Aminocarbonsäuren eine kontinuierliche Verbesserung mit steigender Anzahl ihrer CH₂-Einheiten festzustellen. Eine Peptidmarkierung mit 2,4-D- ϵ -Lysin bewirkte eine ähnliche Erkennung durch den Antikörper wie eine Markierung mit 2,4-D-Aminovaleriansäure, die eine vergleichbare aliphatische Kette aus 4 CH₂-Einheiten besitzt. 2,4-D- ϵ -Lysin war somit nicht die optimale Kombination, sondern 2,4-D in Kombination mit der längsten untersuchten Variante, 2,4-D-Aminododecansäure (11 CH₂-Einheiten). Allerdings ist die Verbesserung der MaxOD durch 2,4-D-Aminododecansäure im Vergleich zu 2,4-D-Aun nicht mehr so stark wie bei den Aminocarbonsäuren mittlerer Länge, sondern nähert sich einer Asymptote. Beim EC50-Wert ist ein ähnliches Bild mit größeren Meßschwankungen zu sehen.

Bei der Auswahl der optimalen Hapten-Aminocarbonsäure-Kombination wurde noch ein weiterer Aspekt berücksichtigt: die Löslichkeit des Peptides in wässrigen Puffern. Diese nimmt mit zunehmender Länge der Aminocarbonsäure ab. Aus diesem Grund und weil sich mit 2,4-D-Aun die MaxOD nahe an der Asymptote befindet, wurde im folgenden die Kombination von 2,4-D mit Aminoundecansäure als optimale Peptidmarkierung für den Fängerantikörper E2/G2 verwendet. Der Aufbau eines optimierten Peptids ist in Abb. III.2 (oben) dargestellt. Aminoterminal tragen Peptide 2,4-D-Aun, dann folgt das Sequenzmotiv, und auf der carboxyterminalen Seite schließt sich PEG-9 und Biocytin an.

III.4 Anwendbarkeit des Fänger-ELISAs mit beliebigen Sequenzmotiven

Ein Proteolysetest sollte universell einsetzbar sein und je nach Versuchsanforderung mit unterschiedlichen Peptidsubstraten und Enzymfraktionen durchgeführt werden können. Daher war es erforderlich, die Durchführbarkeit des Fänger-ELISAs mit beliebigen Sequenzmotiven sicherzustellen und zu optimieren. Es wurden fünf Sequenzmotive mit einer Länge von 16 Aminosäuren zufällig generiert. Diese Zufallspeptide wurden zum einen vollständig und zum anderen aminoterminal auf 13, 10 und 6 Aminosäuren verkürzt anstelle von Alanin als Sequenzmotiv mit den optimierten Peptidmarkierungen synthetisiert. Der Fängerantikörper E2/G2 wurde in einer Konzentration von 30 ng/ml eingesetzt. Nach einer Quantifizierung der SPOT-Synthesemengen wurde der Einfluß potentieller Störsubstanzen und Detergenzien auf die Durchführbarkeit des Fänger-ELISAs überprüft.

III.4.1 Peptidsynthesemenge: Einfluß auf MaxOD und Quantifizierung

Die Peptidmenge, die auf einem SPOT synthetisiert wird, kann abhängig von der Aminosäuresequenz und der Länge des Peptids variieren. Im Bereich der MaxOD werden die Syntheseschwankungen jedoch vom Fängerantikörper ausgeglichen, denn der Fängerantikörper bindet nur eine kleine Menge der angebotenen Peptide aus der Lösung, so daß es keine Rolle spielt, ob aufgrund von unterschiedlichen Synthesemengen etwas mehr oder weniger Peptid in der Lösung vorliegt. Um eine Information darüber zu erhalten, wie gut mit der eingesetzten Peptidmenge die MaxOD erreicht wird, wurden die fünf 16mer Zufallspeptide und die entsprechend verkürzten 6mer Peptide einer Verdünnungsanalyse unterzogen. Ausgehend vom EC50-Wert (50 % Sättigung des Fängerantikörpers) kann nach dem Massenwirkungsgesetz für jede Peptidkonzentration der Sättigungsgrad des Fängerantikörpers mit Peptid bestimmt werden (s. Anhang VII.1.1). Ein Sättigungsgrad von 100 % entspricht der MaxOD. EC50-Werte und Sättigungsgrad α des Fängerantikörpers bei 0,33 % der Peptidmenge, die von einem SPOT eluiert wurde, sind in Tab. III.4 zusammengefaßt.

Zufallspeptid	Sequenzmotiv	EC50-Wert	Sättigungsgrad [α] des Fängerantikörpers
1	HQEQPT	$8,2 \times 10^{-4} \pm 6,9 \times 10^{-4}$	$99,59 \pm 0,22 \%$
	AKENGMLYEFHQEQPT	$2,3 \times 10^{-5} \pm 1,3 \times 10^{-5}$	$99,85 \pm 0,09 \%$
2	VRTRSA	$1,3 \times 10^{-5} \pm 7,4 \times 10^{-4}$	$99,74 \pm 0,13 \%$
	VHNMDKPWLSVRTRSA	-	-
3	VWNELA	$4,4 \times 10^{-5} \pm 3,0 \times 10^{-5}$	$99,92 \pm 0,04 \%$
	WMLCRMQRFWVWNELA	-	-
4	AEQPAA	$2,4 \times 10^{-5} \pm 1,0 \times 10^{-5}$	$99,87 \pm 0,06 \%$
	FLHMWLLTIFAEQPAA	-	-
5	GDFQRT	$2,2 \times 10^{-5} \pm 1,5 \times 10^{-5}$	$99,84 \pm 0,12 \%$
	GTEKPFVEAGGDFQRT	$1,5 \times 10^{-5} \pm 7,6 \times 10^{-4}$	$99,79 \pm 0,08 \%$

Tab. III.4: EC50-Werte und Sättigungsgrad bei 0,33 % der Peptidmenge eines SPOTs. 5 Zufallspeptide (16 Aminosäuren und aminoterminal auf 6 Aminosäuren verkürzt) wurden seriell verdünnt und die Meßwerte an die 4-Parameter-Gleichung angeglichen. Bei 3 Sequenzmotiven war keine Regression möglich („-“). Aus dem EC50-Wert wurde der Sättigungsgrad α bestimmt: $\alpha = 100/[1 + (\text{Peptidverdünnung}/\text{EC50})]$. Es wurden jeweils geometrischer Mittelwert und Standardabweichung von 3 Messungen mit Peptiden aus einer Synthese angegeben.

In allen Fällen, in denen eine Regression an die 4-Parameter-Gleichung möglich war, lag der Sättigungsgrad des Fängerantikörpers bei über 99,5 %, so daß bei Verwendung von 0,33 % der Peptidmenge eines SPOTs Syntheseschwankungen über einen weiten Konzen-

trationsbereich ausgeglichen werden. In 3 Fällen war allerdings keine Regression der Meßwerte an die 4-Parameter-Gleichung möglich. Auf dieses Phänomen wird in Kapitel III.5 näher eingegangen. Für die folgenden Experimente, einschließlich des Proteolyse-tests, wurden die Peptidkonzentrationen so gewählt, daß der Fängerantikörper weitgehend abgesättigt wurde ($\alpha > 99\%$).

Wegen der geringen Peptidmenge, die von einem SPOT eluiert wird, ist eine Quantifizierung der Synthesemenge schwierig. Durch Competition der Peptide mit freier 2,4-D-Aun, die von Herrn Dr. Steffen Bade (Forschungszentrum Borstel) synthetisiert und für die vorliegenden Untersuchungen zur Verfügung gestellt wurde, läßt sich die Peptidmenge jedoch abschätzen. Eine definierte Lösung von 2,4-D-Aun wurde in einer Lösung, die 0,33 % der Peptidmenge eines SPOTs enthielt, seriell verdünnt und die unterschiedlichen Mischungen auf eine beschichtete Mikrotiterplatte gegeben. Es war eine Signalreduktion in Abhängigkeit von der 2,4-D-Aun-Konzentration zu beobachten, und die 4-Parameter-Gleichung wurde für die Regression der Meßwerte verwendet. Unter der Bedingung, daß der Fängerantikörper das mit 2,4-D-Aun markierte Peptid ebenso gut bindet wie den Kompetitor, liegen Peptid und freie 2,4-D-Aun beim EC50-Wert in der gleichen Konzentration vor. In Tab. III.5 sind die SPOT-Peptidmengen aufgeführt.

Zufalls-peptid	Sequenzmotiv	SPOT-Gesamt-peptidmenge [nmol]	0,33 % der SPOT-Peptidmenge [pmol]
1	HQEQPT	$0,957 \pm 0,047$	$2,87 \pm 0,14$
	AKENGMLYEFHQEQPT	$0,791 \pm 0,134$	$2,37 \pm 0,4$
2	VRTRSA	$0,972 \pm 0,161$	$2,92 \pm 0,48$
	VHNMDKPWLSVRTRSA	-	-
3	VWNELA	$1,145 \pm 0,169$	$3,43 \pm 0,51$
	WMLCRMQRFWWNELA	-	-
4	AEQPAA	$0,696 \pm 0,07$	$2,09 \pm 0,21$
	FLHMWLLTIFAEQPAA	-	-
5	GDFQRT	$0,921 \pm 0,144$	$2,76 \pm 0,43$
	GTEKPFVEAGGDFQRT	$0,502 \pm 0,082$	$1,51 \pm 0,25$

Tab. III.5: Quantifizierung der Peptidmenge, die von einem SPOT eluiert wird. Die Peptidmengen von 5 Zufallspeptiden (16 Aminosäuren und aminoterminal auf 6 Aminosäuren verkürzt) wurden durch Competition des Peptids mit dem freien Hapten 2,4-D-Aun bestimmt und die Meßwerte zur Regression an die 4-Parameter-Gleichung verwendet. Beim EC50-Wert liegen Peptid und freie 2,4-D-Aun im äquimolaren Verhältnis vor. 3 Sequenzmotive erlaubten keine Regression der Meßwerte an die 4-Parameter-Gleichung („-“). Es ist die Gesamtpeptidmenge, die von einem SPOT eluiert wurde, und die Menge angegeben, die auf einer Mikrotiterplattenkavität eingesetzt wird (0,33 % der Peptidmenge eines SPOTs). Es wurden jeweils geometrischer Mittelwert und Standardabweichung von 3 Messungen mit Peptiden aus einer Synthese gebildet.

Die Peptidausbeute pro SPOT betrug ca. 0,5 bis 1 nmol. Peptide mit 16 Aminosäuren zeigten im Vergleich zu den entsprechenden Peptiden mit 6 Aminosäuren eine etwas geringere Ausbeute. Die gleichen Peptide wie bei der Verdünnungsanalyse ließen sich auch hier nicht auswerten.

III.4.2 Robustheit des Fänger-ELISAs gegenüber Störsubstanzen

Die 5 vollständigen und aminoterminal auf 13, 10 und 6 Aminosäuren verkürzten Zufallspeptide wurden für die Bestimmung der Robustheit des Fänger-ELISAs gegenüber 3 potentiellen Störsubstanzen verwendet. Es wurden serielle Verdünnungsreihen der Störsubstanzen in der Peptidlösung (0,33 % der Peptidmenge eines SPOTs) angefertigt. Da das Peptid über das Hapten 2,4-D vom Antikörper eingefangen wird, kann freies 2,4-D eine Reduktion des Signals bewirken. Auf der anderen Seite kann kein quantitativer Nachweis durch Streptavidin erfolgen, wenn freies Biotin vorliegt. Biotin ist ein Vitamin und 2,4-D ein Pestizid, so daß beide Substanzen unter Umständen in Enzymrohfraktionen vorkommen können. Eine weitere mögliche Störsubstanz sind Cu^{2+} Ionen. Cu^{2+} kann Aminosäuren in einer Biuret-Reaktion komplexieren, so daß ein vom Fängerantikörper gebundenes Peptid sich mit weiteren Peptiden, die jeweils eine Biotinmarkierung tragen, zusammenlagern. Somit wäre eine Signalverstärkung zu erwarten.

In Gegenwart einer 2,4-D-Konzentration von bis zu 1 μM zeigte sich kein Einfluß auf die MaxOD. Bei höheren Konzentrationen trat eine Signalreduktion ein. Der Höchstwert für 2,4-D im Trinkwasser liegt laut EU-Richtlinie bei 0,1 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 0,45 nM und nach der WHO-Richtlinie bei 30 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 135 nM. Eine Beeinflussung durch 2,4-D aufgrund von Kontamination ist daher weitgehend ausgeschlossen. Beim Biotin war der Einfluß noch geringer. Er zeigte sich erst ab einer Konzentration von 100 μM . Eines der biotinreichsten Lebensmittel ist Hammelleber mit einer Biotinkonzentration von 130 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 5,3 μM . Selbst wenn eine Rohfraktion aus der Leber für den Proteolysetest verwendet werden sollte, ist keine Beeinflussung durch Biotin zu erwarten. Cu^{2+} zeigte bereits ab einer Konzentration von 10 nM eine Verstärkung der Signalintensität, die jedoch je nach Sequenzmotiv bei unterschiedlichen Konzentrationen begann und unterschiedlich stark ausgeprägt war. Dieser Wert liegt unter der EU- und WHO-Richtlinie von 2 mg/ml bzw. 31,4 μM . Für die meisten Anwendungen werden Enzymrohfraktionen aber stark verdünnt, so daß auch der Einfluß von Cu^{2+} auf den Fänger-ELISA nur gering ist.

III.4.3 Einfluß von Detergenzien

Um eine gleichbleibend gute Löslichkeit von beliebigen Peptiden zu gewährleisten, wurde der Peptidlösung das Detergenz Tween 20 (0,005 % (w/v)) zugesetzt. Es sollte im folgenden überprüft werden, ob sich bei Verwendung anderer Detergenzien höhere MaxODs und niedrigere EC50-Werte im Fänger-ELISA erreichen ließen. Es wurden jeweils 2 Konzentrationen der Detergenzien (0,005 % und 0,05 % (w/v)) verwendet. Zum einen wurden die gängigen nicht-ionischen Detergenzien Tween 20 und Triton-X-100 verwendet und zum anderen die im Dünndarm vorkommende Cholsäure. Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Detergenz untersucht. Es wurden vier unterschiedliche Zufallspeptide mit einer Sequenzmotivlänge von 6, 10, 13 und 16 Aminosäuren ausgewählt. Der Einfluß unterschiedlicher Detergenzien und ihrer Konzentration auf die MaxOD und den EC50-Wert war nur geringfügig. Falls die Peptide jedoch die im nächsten Kapitel näher beschriebene Tendenz zeigten, sich unspezifisch an die Platte anzulagern, wurde diese Tendenz ohne Detergenz verstärkt und war bei Verwendung von Cholsäure am stärksten ausgeprägt. Im folgenden wurde daher Tween 20 (0,005 % (w/v)) verwendet.

III.5 Plattenbindung

Verschiedene Sequenzmotive mit einer Länge von 16 Aminosäuren wurden aus dem Modellantigen Ovalbumin (s. Anhang VII.2.1) ausgewählt, mit den optimierten Peptidmarkierungen synthetisiert und einer Verdünnungsanalyse unterzogen. Während mit dem Großteil der Peptide bei einer seriellen Verdünnung eine ähnliche Regression an die 4-Parameter-Gleichung möglich war wie mit Peptiden, die nur Alanin als Sequenzmotiv enthielten, kam es bei einigen Peptiden zu Abweichungen: Die Meßwerte der Verdünnungsreihe ließen sich bei diesen Peptiden nicht für eine Regression an die 4-Parameter-Gleichung verwenden. Die seriellen Verdünnungsreihen von drei ausgewählten Peptiden sind in Abb. III.6 dargestellt.

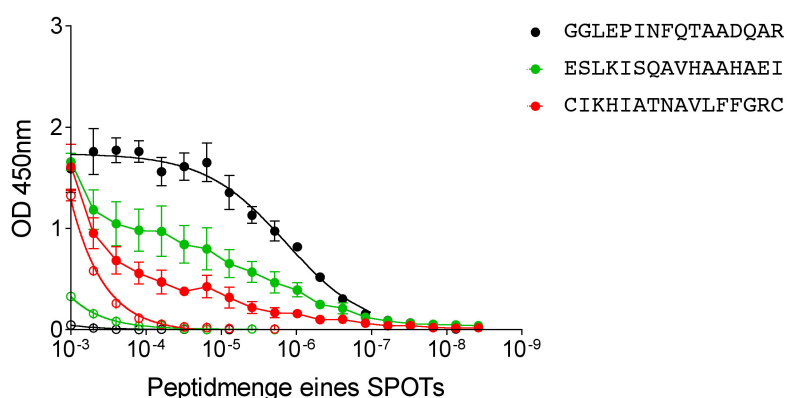


Abb. III.6: Serielle Verdünnungsreihen von Peptiden mit drei unterschiedlichen Sequenzmotiven mit einer Länge von jeweils 16 Aminosäuren. Neben den Peptiden mit 2,4-D-Aun (volle Kreise) wurden analoge Moleküle verwendet, bei denen 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure durch Phenoxyessigsäure (hohle Kreise) ersetzt wurde. Es sind Mittelwerte und Standardfehler von 3-fach Messungen mit Peptiden aus einer Synthese angegeben.

In Abb. III.6 konnte nur die schwarze Kurve (volle Kreise) durch Regression der Meßwerte einer seriellen Peptidverdünnung an die 4-Parameter-Gleichung erhalten werden. Bei den Meßwerten der beiden anderen Peptide (grüne und rote Kurve mit vollen Kreisen) war keine Regression möglich, denn es wurde auch bei hohen Peptidkonzentrationen keine MaxOD erreicht. Um die Ursache für den kontinuierlichen Anstieg der ODs bei höheren Peptidkonzentrationen aufzuklären, wurden Peptidmarkierungen verwendet, bei denen 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (volle Kreise) durch Phenoxyessigsäure (hohle Kreise) ersetzt wurde. Diese Moleküle, die am Aromaten nicht halogeniert sind, unterscheiden sich von den chemischen Eigenschaften des Gesamtmoleküls her nur geringfügig, werden aber vom Fängerantikörper nicht gebunden. Das ist in Abb. III.6 an der unteren schwarzen Kurve (hohle Kreise) des Peptids

GGLEPINFQTAADQAR zu sehen, die sich nicht von der Abszisse abhebt. Wenn dagegen die Konzentrationen der Peptide ESLKISQAVHAAHAEI und CIKHIATNAVLFFGRC, die mit Phenoxyessigsäure markiert waren (grüne und rote Kurve mit hohlen Kreisen), erhöht wurden, zeigte sich ab einer bestimmten Peptidkonzentration ein immer weiter ansteigendes Signal, das nicht durch die spezifische Bindung an den Fängerantikörper verursacht wird. Durch die Verwendung verschiedener Absättigungsbedingungen konnte ausgeschlossen werden, daß sich bestimmte Peptide unspezifisch an die Absättigungsreagenzien anlagern und auf diese Weise an die Mikrotiterplatte gebunden werden. Die Eigenschaft bestimmter Peptide, sich trotz vorangegangener Inkubation der Mikrotiterplatte mit Absättigungslösung und Beimischung eines Detergenz zur Peptidlösung unspezifisch an die Oberfläche der Kavitäten anzulagern, wird im folgenden als „Plattenbindung“ bezeichnet. Die Plattenbindung war bei verschiedenen Peptiden unterschiedlich stark ausgeprägt: CIKHIATNAVLFFGRC zeigte eine stärkere Plattenbindung als ESLKISQAVHAAHAEI. Additiv zur Plattenbindung fand bei Peptiden, die mit 2,4-D markiert waren, gleichzeitig eine Bindung durch den Antikörper statt: Wenn man die Signale der Peptide, die mit Phenoxyessigsäure markiert waren, von den Signalen der Peptide, die 2,4-D markiert waren, subtrahiert, wird ein oberes Plateau erreicht, und die Werte können für die Regression an die 4-Parameter-Gleichung verwendet werden. Die Höhe des oberen Plateaus nahm allerdings mit zunehmender Stärke der Plattenbindung ab. Bei Peptid CIKHIATNAVLFFGRC beträgt die MaxOD nur noch 20 % der MaxOD von Peptid GGLEPINFQTAADQAR.

Ein weiterer Nachteil der Plattenbindung wird erst bei der Anwendung dieses Fänger-ELISAs für Proteolysetests deutlich: Wenn ein Peptid gespalten wird und dennoch an die Mikrotiterplatte bindet, ist es nicht mehr möglich, gespaltenes und nicht-gespaltenes biotinmarkiertes Peptid zu unterscheiden. Es war daher notwendig, die unspezifische Plattenbindung zu beseitigen.

III.5.1 Ursache der Plattenbindung

Die unspezifische Plattenbindung ließ sich weder durch andere Absättigungsbedingungen der Mikrotiterplatte noch durch weitere, in Kapitel III.4.3 nicht aufgeführte Detergenzien beheben. Eine chemische oder physikalische Oxidation der Oberfläche der Mikrotiterplattenkavitäten führte zwar dazu, daß keine Plattenbindung mehr auftrat, allerdings ließ sich auch der Fängerantikörper nicht mehr adsorbieren und verschiedene Versuche zur kovalenten Bindung des Antikörpers an die oxidierte Oberfläche blieben erfolglos. Daher wurde versucht, durch einen systematischen Ansatz die Ursache der Plattenbindung zu finden. Es wurden alle Sequenzmotive des Modellantigens Ovalbumin und des Modellallergens ara-h6 aus der Erdnuß überlappend mit einem Vorschub von zwei Aminosäuren und einer Länge von 10, 13 und 16 Aminosäuren mit 2,4-D-Aun und PEG-9-Biocytyl als Peptidmarkierungen synthetisiert. Die Sequenzen der Gesamtmoleküle von Ovalbumin und ara-h6 sind im Anhang (VII.2.1 und VII.2.2) aufgeführt. Die 732 Peptide wurden in bezug auf die Plattenbindung untersucht, indem ein polyklonaler Mäuse-IgG-Antikörper, der das Hapten 2,4-D nicht erkennt, für die Beschichtung der Mikrotiterplatte verwendet wurde (50 ng/ml). Nach dem Beschichten erfolgte wie zuvor eine Inkubation mit 1% (w/v) Casein in D-PBS. Wenn auch die Plattenbindung der Peptide hierdurch nicht verhindert werden konnte, so war die Inkubation aber nötig, um eine unspezifische Bindung des Nachweissystems zu blockieren. Über dem Plattenhintergrund liegende Signale konnten so eindeutig auf die unspezifische Anlagerung der Peptide an die Mikrotiterplatte zurückgeführt werden. Es wurde keine serielle Verdünnung der Peptide angefertigt, sondern pro Peptid nur 2 Konzentrationen aufgetragen (0,2 und 0,02 % der Peptidmenge eines SPOTs). Es zeigte sich, daß die Plattenbindung unabhängig von der Länge des Aminosäuresequenzmotivs bei bestimmten Sequenzmotiven mit einer Länge von 10, 13 und 16 Aminosäuren auftrat. Es gab eine starke Ähnlichkeit in der Plattenbindung von Peptiden mit überlappenden Sequenzmotiven. Für die weitere Analyse wurden alle 732 Peptide zusammengefaßt. Die Aminosäuren der Sequenzmotive wurden den Kategorien Hydrophobizität, Hydrophilizität, positive oder negative Ladung zugeordnet. Es wurde eine Korrelationsanalyse zwischen der Häufigkeit von Aminosäuren einer bestimmten Kategorie im Sequenzmotiv und der Plattenbindung durchgeführt, die in Abb. III.7 dargestellt ist.

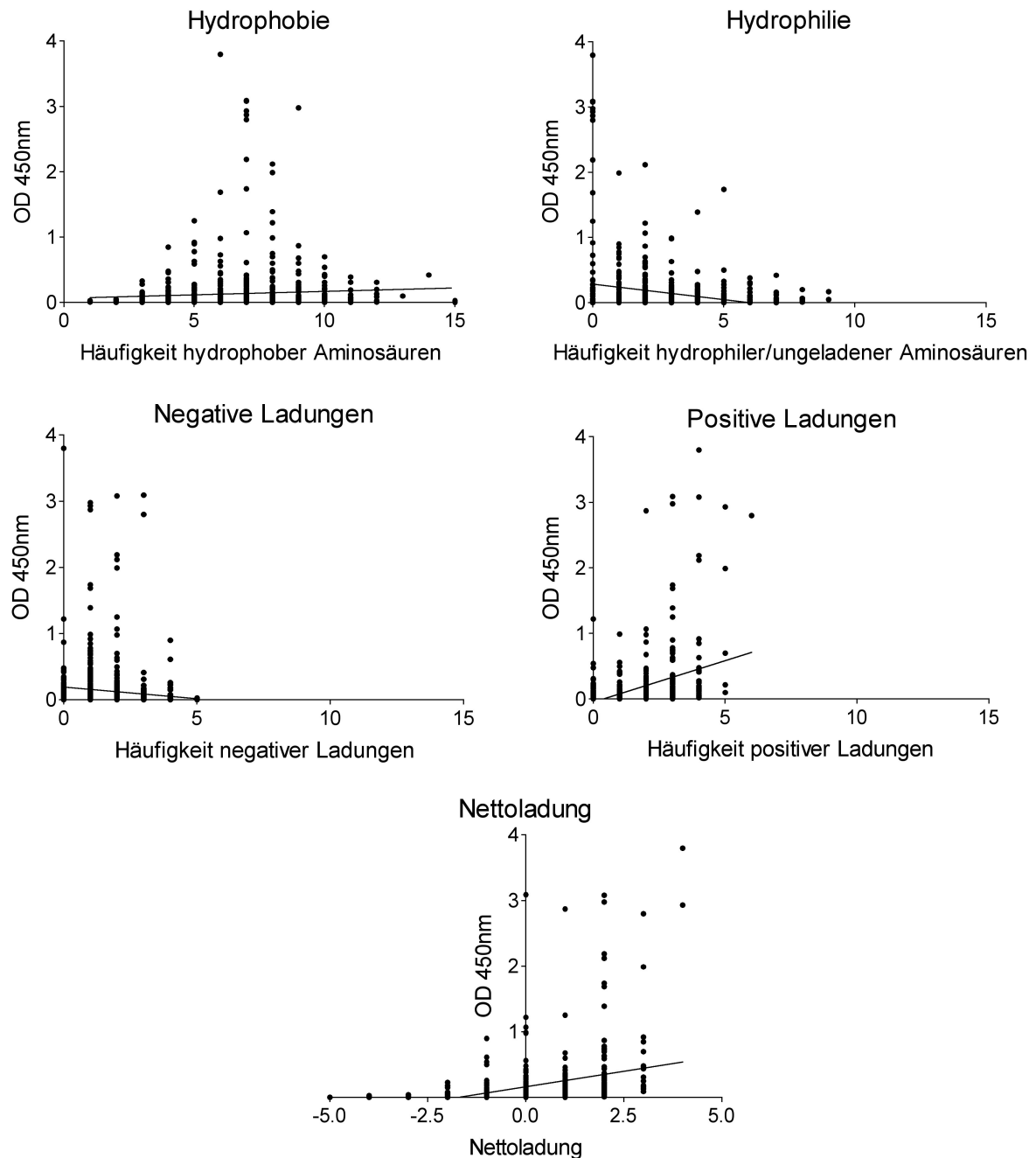


Abb. III.7: Korrelation von Plattenbindung und Aminosäurekategorien. Jede Aminosäure im Sequenzmotiv der 732 untersuchten Peptide wurde einer von folgenden vier Kategorien zugeteilt: hydrophob (Ala, Cys(Acm), Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Val, Trp und Tyr), hydrophil (Asn, Gln, Ser und Thr), positiv (Arg, His und Lys) und negativ (Asp und Glu) geladen. Für die Angabe der Häufigkeit wurden die Aminosäuren einer bestimmten Kategorie in jedem Sequenzmotiv addiert. Für die Nettoladungen wurden positive und negative Ladungen addiert. Die auf der Plattenbindung beruhende OD 450nm bei Verwendung von 0,2 % der Peptidmenge eines SPOTs ist jeweils als Punkt dargestellt. Die Regressionsgerade ergibt sich aus allen 732 Meßwerten. Durch die Regressionsgerade wurde überprüft, ob die Plattenbindung mit den untersuchten Aminosäurekategorien korreliert. Außer bei der Hydrophobie zeigte sich in Abhängigkeit von allen Aminosäurekategorien eine signifikante Korrelation zur Plattenbindung (F-Test: $p < 0,05$)

Eine positive Korrelation zur Plattenbindung zeigte sich in Abhängigkeit von der Häufigkeit positiv geladener Aminosäuren im Sequenzmotiv. Zwischen der Plattenbindung und ungeladenen/hydrophoben sowie negativ geladenen Aminosäuren im Sequenzmotiv war dagegen eine negative Korrelation festzustellen. Außerdem besteht eine positive Korrelation zwischen Plattenbindung und Nettoladung. Das gibt einen Hinweis darauf, daß es möglich sein müßte, den Einfluß von positiven Ladungen durch das Einfügen von negativen Ladungen aufzuheben. Im folgenden wurde daher versucht, die Plattenbindung bestimmter Peptide dadurch zu verringern, daß das Sequenzmotiv von hydrophilen oder negativ geladenen Aminosäuren flankiert wurde.

Um auszuschließen, daß die Plattenbindung von bestimmten Herstellungsverfahren abhängig war, wurden hochbindende Mikrotiterplatten von 3 weiteren Herstellern für die Untersuchung der Plattenbindung von ausgewählten Peptiden verwendet. Es zeigte sich bei allen hochbindenden Mikrotiterplatten aus Polystyrol die gleiche Abhängigkeit der Plattenbindung von positiv geladenen Aminosäuren im Sequenzmotiv.

III.5.2 Beseitigung der Plattenbindung

Für die Untersuchung verschiedener hydrophiler und negativer Flankierungen des Sequenzmotivs wurden von den 732 untersuchten Peptiden 21 ausgewählt: jeweils 7 Peptide mit einer Länge des Sequenzmotivs von 10, 13 oder 16 Aminosäuren. Unter den 7 Peptiden waren die 3 Peptide, die die stärkste Plattenbindung zeigten, 2 Peptide, die eine mittlere Plattenbindung zeigten, und die beiden Peptide, die die geringste Tendenz zur Plattenbindung zeigten. Mit dieser Verteilung kann überprüft werden, ob sich bei Verwendung einiger Flankierungen unter Umständen eine Verstärkung der Plattenbindung von Peptiden ergibt, die vorher eine mittlere oder niedrige Plattenbindung zeigten. Die 21 ausgewählten Peptide wurden mit insgesamt 40 verschiedenen Flankierungen auf amino- und carboxyterminaler Seite des Sequenzmotivs synthetisiert, die in Tab. III.6 dargestellt sind.

	Flankierung-N	Sequenzmotiv	Flankierung-C		Flankierung-N	Sequenzmotiv	Flankierung-C	
1			PEG-9 Biocytin	21	PEG-2		PEG-2	
2				22			PEG-9	
3			D-Glu	23	PEG-9			
4	D-Glu			24	PEG-9		PEG-9	
5	D-Glu		D-Glu	25	PEG-2		PEG-2 D-Glu	
6			D-Glu D-Glu	26	PEG-2		PEG-2 Gla(2-)	
7	D-Glu		D-Glu D-Glu	27	D-Glu PEG-2		PEG-2	
8	D-Glu D-Glu		D-Glu	28	Gla(2-) PEG-2		PEG-2	
9	D-Glu D-Glu			29	D-Glu PEG-2		PEG-2 D-Glu	
10	D-Glu D-Glu		D-Glu D-Glu	30	Gla(2-) PEG-2		PEG-2 Gla(2-)	
11			Gla(2-)	31	PEG-2		D-Glu	
12	Gla(2-)			32	PEG-2		D-Glu D-Glu	
13	Gla(2-)		Gla(2-)	33	PEG-2		Gla(2-)	
14			Gla(2-) Gla(2-)	34	PEG-2		Gla(2-) Gla(2-)	
15	Gla(2-)		Gla(2-) Gla(2-)	35	D-Glu PEG-2			
16	Gla(2-) Gla(2-)		Gla(2-)	36	D-Glu PEG-2		D-Glu	
17	Gla(2-) Gla(2-)			37	D-Glu PEG-2		D-Glu D-Glu	
18	Gla(2-) Gla(2-)		Gla(2-) Gla(2-)	38	Gla(2-) PEG-2			
19			PEG-2	39	Gla(2-) PEG-2		Gla(2-)	
20	PEG-2			40	Gla(2-) PEG-2		Gla(2-) Gla(2-)	
				41	D-Glu D-Glu PEG-2		PEG-2 D-Glu D-Glu	

Tab. III.6: Amino (N)- und carboxy (C)-terminale Flankierungen des Sequenzmotivs. Variante 1 stellt das vorher verwendete Peptid dar. Für die weiteren Varianten 2 bis 41 wurde nicht Biocytin, sondern Glu(biotin-PEG) als Synthesebaustein verwendet, das eine kurze PEG-Kette trägt und somit gleichzeitig den PEG-9 Baustein ersetzen kann. 2 bis 10 sind Varianten mit der negativ geladenen Glutaminsäure, die als D-Isomer eingesetzt wurde, und daher kein natürliches Substrat für Proteasen ist. Entsprechend aufgebaut sind Varianten 11 bis 18, in denen statt der einfach negativ geladenen D-Glutaminsäure die zweifach negativ geladene Carboxyglutaminsäure (Gla(2-)) verwendet wurde. In den Varianten 19 bis 24 wurden zwei hydrophile Flankierungen verwendet; ein kurzes PEG-2 und ein langes PEG-9. Die Varianten 25 bis 40 sind Kombinationen aus den vorherigen Varianten.

Die Flankierungsvarianten sollten hinsichtlich dreier Kriterien untersucht werden: die Plattenbindung zu unterdrücken, ein stabiles und möglichst hohes oberes Plateau für die Bestimmung der MaxOD zu erreichen und einen möglichst geringen Einfluß auf die proteolytische Spaltungsreaktion zu nehmen. Die Bestimmung der Plattenbindung wurde analog zu III.5 mit zwei Peptidkonzentrationen (0,2 und 0,02 % der Peptidmenge eines SPOTs) und dem Fänger-Antikörper, der das Hapten 2,4-D nicht erkennt, durchgeführt.

Es war in keinem Fall eine Verstärkung der Plattenbindung von Peptiden zu beobachten, die vorher eine mittlere oder niedrige Plattenbindung zeigten. Für die folgende Auswertung, die in Abb. III.8 dargestellt ist, wurden daher nur die 9 stärksten Plattenbinder (jeweils 3 Peptide mit einer Sequenzmotivlänge von 10, 13 und 16 Aminosäuren) verwendet.

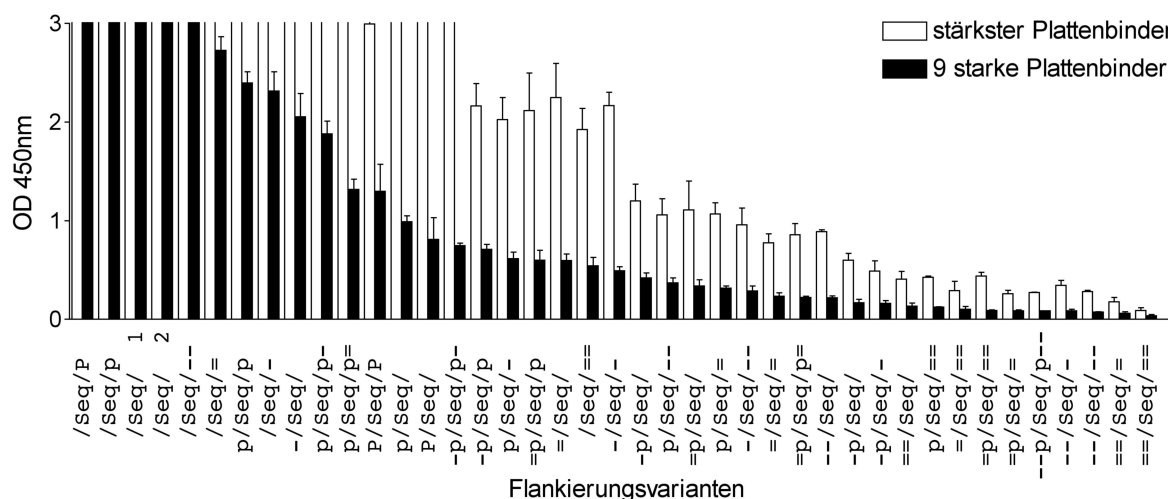


Abb. III.8: Unspezifische Plattenbindung in Abhängigkeit von den in Tab. III.6 aufgeführten Flankierungsvarianten. Die beiden hydrophilen Bausteine PEG-2 und PEG-9 sind durch ein kleines „p“ bzw. großes „P“ symbolisiert, der einfach negativ geladene Baustein D-Glutamat mit einem „-“, das doppelt negativ geladene Carboxyglutamat durch ein „=“ und das Sequenzmotiv mit Seq. Ohne Flankierung sind das ursprüngliche Peptid mit Biocytin (1) und die Variante mit Glutaminsäure(Biotin-PEG) (2) angegeben. Die Signale bei Verwendung von 0,2 % der Peptidmenge eines SPOTs sind nur bis zu einer OD von 3 angegeben, die das Nachweissystem noch zuverlässig auflösen kann. Die Flankierungsvarianten wurden nach der mittleren unspezifischen Bindung von 9 starken Plattenbindern sortiert. Die Plattenbindung verhielt sich proportional zu der eingesetzten Peptidmenge. Daher wurden Werte > 3 OD durch die entsprechenden Werte bei Verwendung von 0,02 % der Peptidmenge eines SPOTs ersetzt und mit 10 multipliziert, so daß alle Flankierungsvarianten in die korrekte Reihenfolge gebracht werden konnten. Es wurden jeweils Mittelwerte und Standardfehler von 3 Messungen der Plattenbindung mit Peptiden aus einer Synthese angegeben.

In Abb. III.8 ist eine deutliche Reduktion der unspezifischen Plattenbindung vor allem in Abhängigkeit von den negativen Ladungen in den Flankierungen der Sequenzmotive zu erkennen. Der Einfluß der hydrophilen Bausteine ist dagegen wesentlich geringer. Es ist eine direkte Beziehung zur Anzahl der negativen Ladungen zu sehen, und die Flankierungsvariante $==/Seq/==$ (Definition: s. Abb. III.8) mit insgesamt 8 negativen Ladungen zeigt die geringste Neigung zur unspezifischen Plattenbindung. 2 Bausteine mit einfacher Ladung bewirkten eine stärkere Reduktion der Plattenbindung als 1 Baustein mit doppelter Ladung (z. B. $--/Seq/--$ im Vergleich zu $=/Seq/=$). Schließlich ist ebenfalls zu sehen, daß der Einfluß der negativen Ladungen und der PEG-Bausteine auf der aminoterminalen Seite stärker war als auf der carboxyterminalen Seite.

In den folgenden Versuchen wurden nur noch diejenigen Flankierungsvarianten weiter untersucht, deren Verwendung die Plattenbindung auf eine OD von maximal 0,5 reduzierte oder die einen symmetrischen Aufbau zeigten: $-/Seq/-$, $=/Seq/=$, $-p/Seq/p-$, $-p/Seq/p-$ und $--p/Seq/p--$. Als Kontrolle dienten die beiden Varianten 1 und 2 ohne Flankierungen. Die MaxOD wurde bestimmt, indem eine Mikrotiterplatte mit 30 ng/ml Antikörper E2/G2 beschichtet wurde und die insgesamt 17 Flankierungsvarianten

mit allen 21 Sequenzmotiven in 2 Verdünnungen aufgetragen wurden (0,2 und 0,02 % der Peptidmenge eines SPOTs). Die bei diesen Peptidmengen erhaltenen Meßwerte liegen bei Peptiden, die nicht unspezifisch an die Platte binden, beide im oberen Plateau der 4-Parameter-Kurve. Hiermit war eine Kontrolle möglich, ob sich bei den untersuchten Flankierungsvarianten eine stabile MaxOD ergibt. Außer bei den Kontrollen ohne Flankierungen wurde durch alle ausgewählten Flankierungsvarianten eine stabile MaxOD erreicht. Es ergaben sich aber Unterschiede in der Höhe dieser MaxODs. Die Schwankungen in der Höhe der MaxODs in Abhängigkeit von den Flankierungsvarianten sind in Abb. III.9 dargestellt.

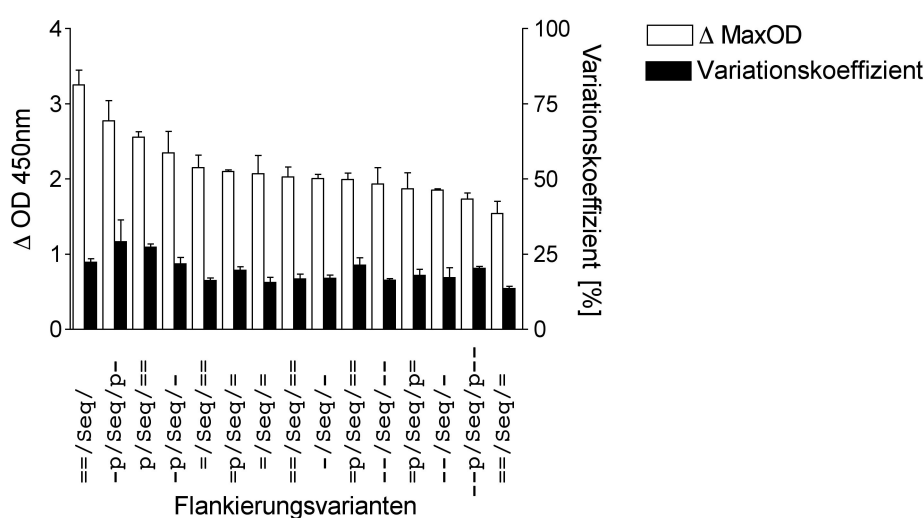


Abb. III.9: Schwankungen in der Höhe der MaxODs. Die beiden Kontrollen ohne Flankierungen sind nicht dargestellt, da für diese Varianten keine MaxOD bestimmt werden konnte. Die Bezeichnung der Flankierungsvarianten ist analog zu Abb. III.8. Die Differenz (Δ) wurde aus der höchsten und der niedrigsten MaxOD von Peptiden mit 21 verschiedenen Sequenzmotiven (gemessen bei Verwendung von 0,2 % der Peptidmenge eines SPOTs) gebildet. Mit dem Variationskoeffizienten wurde zusätzlich die Streuung der MaxOD einer Flankierungsvariante in Abhängigkeit von den 21 verschiedenen Peptiden berücksichtigt. Es wurden jeweils Mittelwerte und Standardfehler von 3 Messungen mit Peptiden aus einer Synthese angegeben.

Bei den besten Flankierungsvarianten waren Schwankungen in Höhe von 1,5 bis 2 OD zwischen der höchsten und niedrigsten MaxOD zu sehen. Die Varianten mit den stärksten negativen Ladungen in den Flankierungen lieferten hierbei nicht unbedingt die geringsten Schwankungen. Die geringsten Schwankungen in der MaxOD wurden durch die Flankierungsvarianten ==/Pep/= mit insgesamt 6 negativen Ladungen und -p/Seq/p- mit insgesamt 4 negativen Ladungen in den Flankierungen erreicht.

Abschließend mußte mit dem Proteolysetest überprüft werden, ob die 17 Flankierungsvarianten einen Einfluß auf die Spaltbarkeit des Sequenzmotivs haben.

III.6 Proteolysetest

Nachdem mit dem Fänger-ELISA die Grundlage geschaffen war, um ungespaltene Peptide empfindlich nachzuweisen, wurde der Proteolysetest etabliert. Zunächst wurden reine Enzymlösungen von Trypsin und Chymotrypsin und ihre entsprechenden Peptidsubstrate verwendet. Die Peptide wurden in der ursprünglichen Form aminoterminal mit 2,4-D-Aun und carboxyterminal mit PEG-9-Biocyten aber ohne Flankierungen synthetisiert, da die verwendeten Sequenzmotive nur wenige positive Ladungen trugen und der Einfluß der Flankierung auf den proteolytischen Abbau noch nicht geklärt war.

Die Peptidsubstrate (0,33 % der Peptidmenge eines SPOTs) wurden 90 min mit einer seriell verdünnten Enzymlösung inkubiert, dann wurde die proteolytische Spaltung durch Inaktivierung der Proteasen beendet und die Lösung auf eine mit dem Fängerantikörper E2/G2 beschichtete Mikrotiterplatte gegeben. Während das ungespaltene Peptid über Biotin nachgewiesen werden konnte, fehlte dem gespaltenen Peptid das Biotin. Da aber der Fängerantikörper gespaltenes und ungespaltenes Peptid mit gleicher Affinität über die 2,4-D-Markierung bindet, ließ sich über die OD 450nm in jeder Kavität der prozentuale Anteil des gespaltenen Peptids bezogen auf eine Kavität, in der nur ungespaltenes Peptid vorliegt (ohne Enzym inkubiert), bestimmen.

Die Peptidsubstratkonzentration wurde mit ca. 3 pmol (Tab. III.5) in 50 µl (= 60 nM) so gewählt, daß sie weit niedriger als der K_M -Wert guter Trypsin- oder Chymotrypsin-substrate ist ($[S] \ll K_M$). In diesem Fall kann von einer Enzymkinetik pseudo-erster Ordnung ausgegangen werden und die Meßwerte der seriellen Enzymverdünnung für eine nicht-lineare Regression an eine Exponentialfunktion verwendet werden:

$$y = (a - b) \times e^{\left(-t[E]_{\text{gesamt}} \frac{k_{\text{cat}}}{K_M}\right)} + b \quad \text{Gleichung (III.2)}$$

Konstante: $t = 90 \text{ min}$

Variablen: $y = \text{OD } 450\text{nm}$

$[E]_{\text{gesamt}} = \text{Gesamtenzymkonzentration}$

Parameter: $a = \text{ungespaltenes Peptidsubstrat}$

$b = \text{vollständig gespaltenes Peptidsubstrat (Hintergrund)}$

$k_{\text{cat}}/K_M = \text{katalytische Effizienz}$

Die Herleitung von Gleichung (III.2) aus der Michaelis-Menten-Gleichung ist im Anhang (VII.1.2) beschrieben. Durch Gleichung (III.2) läßt sich die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) des proteolytischen Substratabbaus bestimmen.

III.6.1 Stabilität der Trypsin- und Chymotrypsinlösung

Die Auswertung der Enzymkinetik nach pseudo-erster Ordnung setzt voraus, daß die Enzymaktivität während der Inkubationszeit t konstant bleibt. Die folgenden Versuche wurden mit den Serinproteasen Trypsin und Chymotrypsin, die für einen Großteil des proteolytischen Abbaus der Nahrungsproteine im Dünndarm verantwortlich sind, durchgeführt. Verschiedene Konzentrationen dieser Enzyme wurden unterschiedlich lang bei 37 °C inkubiert und anschließend ihre Enzymaktivität überprüft, indem die Geschwindigkeit des Umsatzes von entsprechenden pNA-Substraten gemessen wurde. Die Aktivität von 0,5 µg/ml Chymotrypsin unterschied sich nach 90 min nicht signifikant (dreifach Messung; ungepaarter t-Test: $p < 0,05$) von der anfänglichen Enzymaktivität und auch nach 7 Tagen war immer noch mehr als die Hälfte der Ausgangsaktivität vorhanden. Die Aktivität von 1,25 µg/ml Trypsin zeigte nach 90 min Inkubationszeit eine mittlere Reduktion auf 86 ± 4 % der Ausgangsaktivität und nach 40 h sank sie auf die Hälfte der Ausgangsaktivität ab. 1 µg/ml Enzymlösung (= 40 nM) war die höchste Konzentration, die für die Bestimmung der katalytischen Effizienz eingesetzt wurde. Bei niedrigeren Enzymkonzentrationen war der Aktivitätsverlust noch geringer. Für die folgenden Berechnungen wurde daher über 90 min von einer konstant bleibenden Enzymkonzentration ausgegangen.

III.6.2 Enzymverdünnung gegen Inkubationszeit

Wie aus Gleichung (III.2) ersichtlich, sind die Substratumsätze, die bei Variation der Enzymgesamtkonzentration ($[E]_{\text{gesamt}}$) oder der Inkubationszeit (t) gemessen werden, proportional zueinander. Es ist üblich, etwa bei FRET-basierten Verfahren, den Substratabbau in Abhängigkeit von der Zeit zu verfolgen („real-time“). Da für die Messung des Substratabbaus mit dem Fänger-ELISA der enzymatische Abbau nach einer bestimmten Zeit ohnehin beendet werden muß, ist es vorteilhaft, den Peptidabbau in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration anstelle von der Inkubationszeit zu betrachten. Durch eine Verdünnungsreihe (logarithmisch) des Enzyms bei gleichbleibender Inkubationszeit kann ein wesentlich breiteres Spektrum der k_{cat}/K_M -Werte unterschiedlicher Peptidsubstrate bestimmt werden als durch die Variation der Inkubationszeit (linear) bei einer festen Enzymkonzentration. So müßte für eine 1:3-Verdünnungsreihe des Enzyms mit 10 Schritten (3^{10}) Inkubationszeiten von einer Minute bis zu 40 Tagen verwendet werden. Über diesen Zeitraum hinweg ist jedoch keine gleichbleibende Enzymaktivität bei 37 °C gewährleistet.

Im folgenden soll auch experimentell gezeigt werden, daß sowohl die Variation der Enzymkonzentration wie auch der Inkubationszeit analoge $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte liefern. Dafür wurde für Trypsin und Chymotrypsin jeweils ein kurzes Modellpeptid (GPAPLA bzw. GVPFPG) mit einer entsprechenden Spaltungsstelle für die Enzyme verwendet. Durch einen Vorversuch wurde die Inkubationszeit abgeschätzt, bei der der Abbau in einem verfolgbaren Meßbereich liegt, und die Enzymkonzentration daran angepaßt. Bei der Variation der Enzymkonzentration war das nicht nötig. Hier konnte der Abbau des Trypsin- und Chymotrypsinsubstrats jeweils mit der gleichen Ausgangsenzymkonzentration gemessen werden. Der Verlauf des Substratabbaus ist in Abb. III.10 dargestellt.

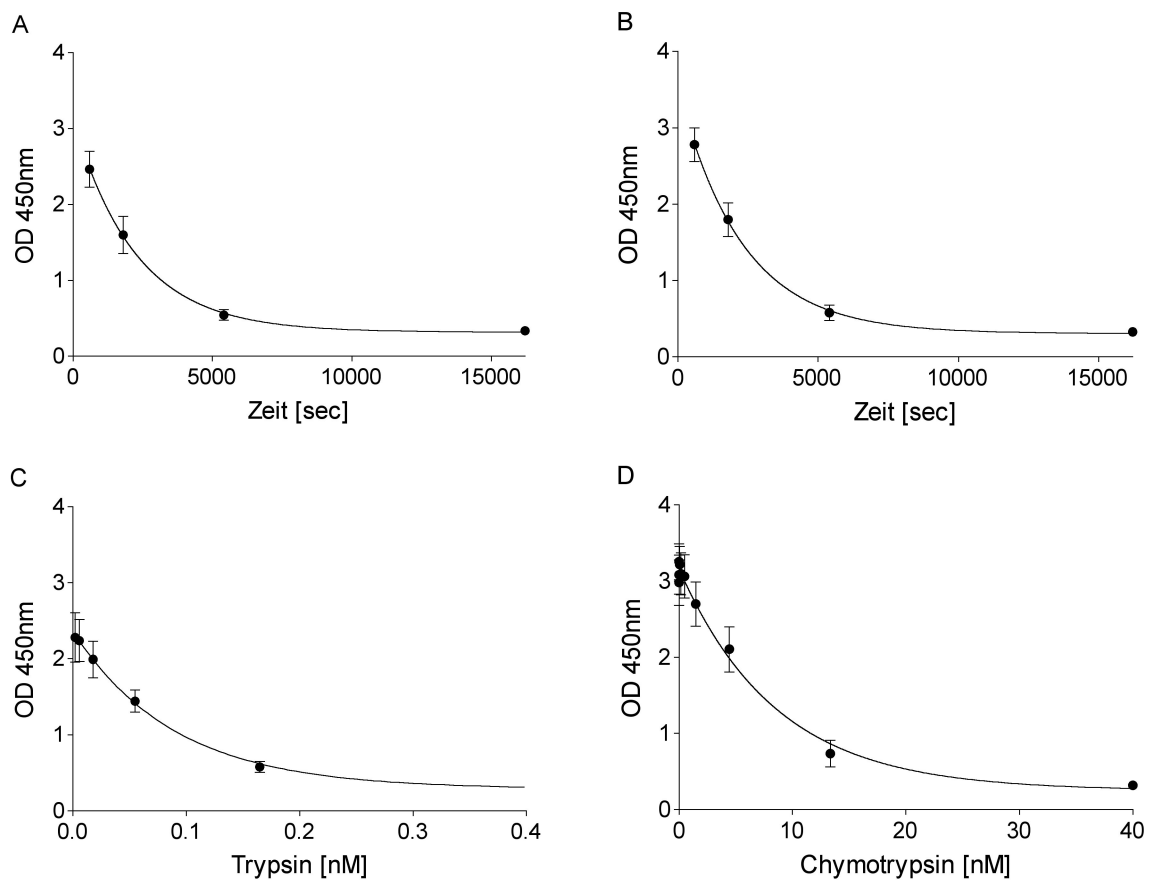


Abb. III.10: Enzymkinetik nach pseudo-erster Ordnung. Der Abbau des Substrats GPAPLA durch Trypsin (A und C) und von GVPFPG durch Chymotrypsin (B und D) ist gezeigt. Die Bestimmung der $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte erfolgte in A und B durch Variation der Inkubationszeit t bei gleichbleibender Enzymkonzentration $[E]$ (Trypsinkonzentration: 0,2 nM; Chymotrypsinkonzentration: 20 nM). In C und D dagegen wurde $[E]$ variiert und t konstant gehalten (jeweils 90 min). Die Parameter OD_0 , OD_{max} und $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ wurden durch Regression der Meßwerte an die Gleichung III.2 bestimmt. Die $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte (geometrische Mittelwerte und Standardabweichungen von fünf Messungen) von Trypsin betrugen $1,9 \times 10^6 \pm 0,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Zeitvariation) bzw. $2,0 \times 10^6 \pm 0,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Enzymvariation) und von Chymotrypsin $1,9 \times 10^4 \pm 0,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Zeitvariation) bzw. $2,3 \times 10^4 \pm 0,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Enzymvariation). Die erhaltenen Werte unterscheiden sich jeweils nicht signifikant voneinander (5-fach Messung; ungepaarter t-Test: $p > 0,05$).

Sowohl bei Variation der Inkubationszeit als auch bei Variation der Enzymmenge (Trypsin bzw. Chymotrypsin) ist der exponentielle Verlauf einer Reaktion pseudo-erster Ordnung zu erkennen und in beiden Fällen können analoge Werte für k_{cat}/K_M bestimmt werden. Im folgenden konnten daher die k_{cat}/K_M -Werte durch eine Enzymverdünnung bei einer Inkubationszeit von 90 min bestimmt werden.

III.6.3 Inhibitionsmessungen

Für viele Anwendungen ist es notwendig, Inhibitionskonstanten zu bestimmen. Die Eignung des Proteolysetests zur Bestimmung von Inhibitionskonstanten sollte anhand der Inhibition von Trypsin und Chymotrypsin durch den kompetitiven Inhibitor Aprotinin demonstriert werden. Als Substrate wurden die Modellpeptide GPARLA für Trypsin und GVPFGP für Chymotrypsin verwendet. Es wurden jeweils zwei Verdünnungsreihen der Enzyme angefertigt. In einer Verdünnungsreihe wurde dem Puffer eine definierte Menge Aprotinin zugesetzt, in einer weiteren dagegen nicht.

Die Inhibitionskonstante für kompetitive Inhibitoren läßt sich nach Gleichung (III.3) bestimmen, deren Herleitung im Anhang (VII.1.3) aufgeführt ist.

$$\frac{v_0}{v_i} = 1 + \frac{[I]_{\text{ges}}}{K_i} \quad \text{Gleichung (III.3)}$$

v_0	= Reaktionsgeschwindigkeit der nicht inhibierten Reaktion
v_i	= Reaktionsgeschwindigkeit in Gegenwart des Inhibitors
$[I]_{\text{ges}}$	= Inhibitorgesamt-konzentration
K_i	= Inhibitionskonstante

Aus den Verdünnungsreihen ohne und mit Inhibitor ließen sich die Reaktionsgeschwindigkeiten der nicht inhibierten (v_0) und der inhibierten (v_i) Reaktion berechnen. Diese Werte wurden ins Verhältnis gesetzt und nach der Inhibitionskonstante aufgelöst.

Der enzymatische Abbau von GPARLA durch Trypsin wurde durch Aprotinin mit einer Inhibitionskonstanten von $1,5 \times 10^{-9} \pm 8,0 \times 10^{-10}$ M inhibiert und der Abbau von GVPFGP durch Chymotrypsin mit $4,6 \times 10^{-7} \pm 7,1 \times 10^{-8}$ M (geometrischer Mittelwert und Standardabweichung einer 3-fach Messung). Der Proteolysetest eignet sich somit auch für die Berechnung der Inhibitionskonstanten von kompetitiven Inhibitoren.

III.6.4 Vollständigkeit des Substratabbaus

Die Peptidmenge, die nach einer vollständigen Substratspaltung übrigbleibt, verursacht zusammen mit der Lichtabsorption der Mikrotiterplatte das Hintergrundsignal und entspricht dem Parameter b in Gleichung (III.2). Um eine hohe Meßbereichsdynamik zu gewährleisten, sollte b möglichst gering sein.

Bei der Peptidsynthese wurden Aminosäurebausteine eingesetzt, deren Seitenketten teilweise Schutzgruppen trugen. Diese Schutzgruppen wurden nach der Fertigstellung der Synthese abgespalten; falls die Abspaltung aber unvollständig geblieben sein sollte, würde das zu modifizierten Aminosäuren im Sequenzmotiv der Peptidsubstrate führen, die unter Umständen von den Enzymen nicht gespalten werden können und dementsprechend den Hintergrund erhöhen. Weiterhin könnte während der Peptidsynthese eine Racemisierung von L in D-Aminosäuren auftreten, was ebenfalls zu einem höheren Hintergrund führen würde. Um den Einfluß dieser möglichen Störungen zu untersuchen, wurden Aminosäuren, die von Trypsin gespalten werden, in das Sequenzmotiv GPAXLA synthetisiert und Aminosäuren, die von Chymotrypsin gespalten werden, in das Sequenzmotiv GVPXGP synthetisiert, wobei X jeweils als Platzhalter für die Aminosäure steht, an der die Spaltung erfolgt. Die Aminosäure Alanin, die keine Spaltungsstelle darstellt, diente als Kontrolle. Ein Teil dieser Aminosäuren trug während der Peptidsynthese Seitenkettenschutzgruppen. Außerdem wurden die Aminosäuren jeweils als L- und als D-Isomer verwendet. In einer Trypsin- bzw. Chymotrypsinkonzentration von 10 µg/ml wurden die Restpeptidmengen nach 90 min, 24 h und 7 Tagen bestimmt. In Tab. III.7 sind die Restpeptidmengen nach 24 h angegeben, wenn der Abbau zu dieser Zeit abgeschlossen war.

Enzym / Peptidsubstrat	Spaltungsstelle X	L-Aminosäure	D-Aminosäure
Trypsin GPAXLA	Alanin	92,5 ± 3,3	96,7 ± 5,8
	Arginin(Pbf)	6,7 ± 1,6	95,9 ± 5,2
	Lysin(Boc)	5,3 ± 2,4	100,2 ± 4,1
Chymotrypsin GVFXGP	Alanin	93,1 ± 6,8	nicht bestimmt
	Asparagin(Trt)	unvollständiger Abbau	91,5 ± 2,8
	Leucin	4,9 ± 1,8	89,7 ± 1,7
	Phenylalanin	2,7 ± 0,8	89,5 ± 3,2
	Tryptophan(Boc)	12,0 ± 1,2	89,1 ± 12,0
	Tyrosin(tBu)	3,6 ± 0,1	92,7 ± 4,6

Tab. III.7: Restpeptidmengen [%] verschiedener Spaltungsstellen. Peptide (0,1 und 0,02 % der Peptidmenge eines SPOTs) wurden 24 h bei 37 °C mit 10 µg/ml Trypsin und Chymotrypsin inkubiert. Parallel dazu wurde der gleiche Ansatz ohne Enzym inkubiert. Aus beiden Ansätzen wurde das prozentuale Verhältnis gebildet ($100 \times \text{Ansatz mit Enzym} / \text{Ansatz ohne Enzym}$). Seitenkettenschutzgruppen sind in Klammern angegeben. Geometrischer Mittelwert und Standardabweichung wurden von Peptiden aus 3 unterschiedlichen Peptidsynthesen gebildet. Die Werte wurden nur verwendet, wenn nach 24 h kein signifikanter Abbau mehr stattfand (ungepaarter t-Test der Restpeptidmengen nach 24 h und nach 7 Tagen: $p > 0,05$).

Die verwendeten Trypsin- bzw. Chymotrypsinspaltungsstellen wurden als L-Isomer wie erwartet gespalten, waren als D-Isomer jedoch weitgehend stabil (ca. 90 %). Außer bei Asparagin war die Spaltung nach 24 h abgeschlossen. Eine erhöhte Restpeptidmenge von 12 %, die sich auf die Seitenkettenschutzgruppe zurückführen ließe, fand sich nur bei Tryptophan(Boc). Von dieser maximalen Restpeptidmenge ist keine Beeinträchtigung der Meßbereichsdynamik des Proteolysetests zu erwarten.

III.6.5 Einfluß der Flankierungen auf die $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte

Flankierungen des Sequenzmotivs mit negativ geladenen Aminosäuren konnten eine unspezifische Plattenbindung verhindern (III.5.2). Mit dem Proteolysetest konnte der Einfluß der Flankierungsvarianten auf die katalytische Effizienz ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$) bestimmt werden. Es wurden nur die 6 Peptide untersucht, die die geringste Plattenbindung zeigten, so daß es auch bei Peptiden ohne Flankierungen keine Beeinträchtigung beim Nachweis der Proteolysefragmente durch die Plattenbindung gab. Die 6 Peptide wurden in 2 Gruppen aufgeteilt, von denen die eine mit Trypsin und die andere mit Chymotrypsin untersucht wurde. Jede Gruppe enthielt jeweils ein Peptid mit einer Sequenzmotivlänge von 10, 13 und 16 Aminosäuren. Die Zuordnung der Peptide zu einer der beiden Gruppen erfolgte nach möglichen Trypsin- bzw. Chymotrypsinspaltungsstellen im Aminosäuresequenzmotiv.

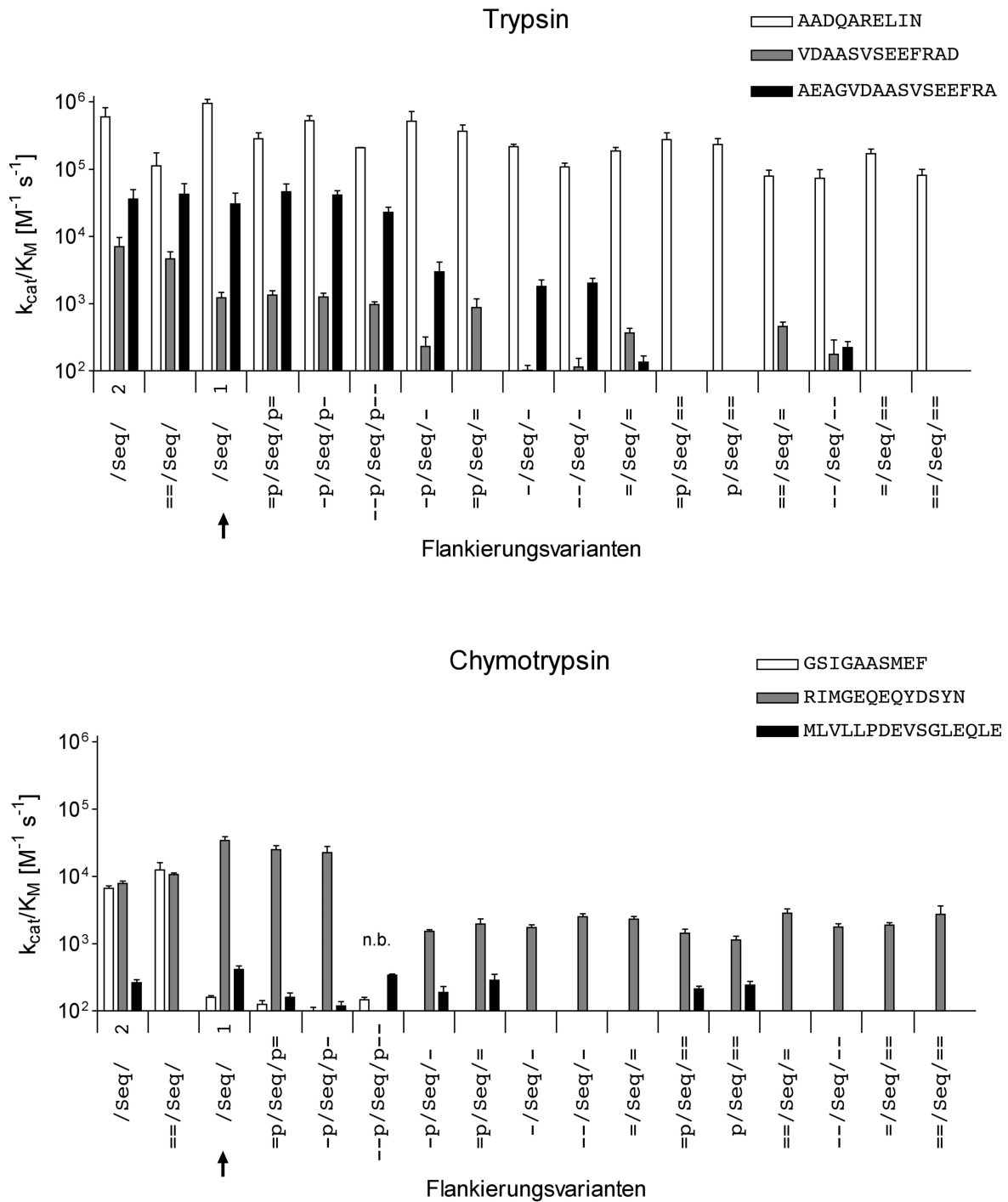


Abb. III.11: Einfluß der Flankierungsvarianten auf die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M). Mit dem Versuchsaufbau ließ sich k_{cat}/K_M ab $100 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bestimmen. Entsprechend wurde die Skalierung der Ordinate gewählt. Die Bezeichnung der Flankierungsvarianten ist analog zu Abb. III.8. Außer mit -p/Seq/p- - wurden mit jeder Variante 6 Peptide untersucht, die die geringste Plattenbindung zeigten: 3 Peptide wurden mit Trypsin und 3 Peptide mit Chymotrypsin untersucht. Es sind jeweils geometrische Mittelwerte und Standardfehler von 3 Messungen mit Peptiden aus einer Synthese angegeben. Die Flankierungsvarianten wurden in der oberen und unteren Abbildung nach dem geometrischen Mittelwert der katalytischen Effizienz von 5 Peptiden sortiert (Das Sequenzmotiv RIMGEQEYQYDSYN wurde nicht für die Sortierung verwendet, da es nicht in allen Flankierungsvarianten untersucht wurde; der fehlende Wert ist mit n.b. gekennzeichnet). Die ursprüngliche Variante (/Seq/ 1) ohne Flankierung ist mit einem Pfeil markiert.

In Abb. III.11 zeigt sich eine Abhängigkeit der katalytischen Effizienz von den ausgewählten Flankierungsvarianten. Wenn das Sequenzmotiv direkt an negative Ladungen grenzt, wird die katalytische Effizienz des Substratabbaus sowohl durch Trypsin als auch durch Chymotrypsin am stärksten reduziert. Sequenzmotive mit diesen Flankierungsvarianten stellen somit schlechtere Substrate für die Enzyme dar als die ursprüngliche Variante ohne Flankierungen. Auf der anderen Seite führt die Verwendung von 2 Flankierungsvarianten im Vergleich zu der ursprünglichen Variante dazu, daß einige Sequenzmotive bessere Substrate darstellen. Die katalytische Effizienz der Proteolyse des Sequenzmotivs AEAGVDAASVSEEFRA durch Trypsin verschlechterte sich bei ungünstigen Flankierungen um 3 Größenordnungen. Wenn aber ein kurzes PEG zwischen der negativen Ladung und dem Sequenzmotiv eingefügt wurde, dann war der Einfluß der negativen Ladungen deutlich geringer.

Die Flankierungsvariante $-p/Seq/p-$ konnte die Plattenbindung von allen untersuchten Sequenzmotiven weitgehend unterdrücken (s. Abb. III.8) und lieferte bei der Variabilität der MaxOD die zweitbesten Ergebnisse (s. Abb. III.9). Bei fünf mit Trypsin bzw. Chymotrypsin untersuchten Sequenzmotiven kam es nur beim besten Substrat mit dem höchsten k_{cat}/K_M -Wert zu einer signifikanten Reduktion von k_{cat}/K_M bei Verwendung von $-p/Seq/p-$ im Vergleich zu der Variante ohne Flankierung (dreifach Messung; ungepaarter t-Test: $p < 0,05$).

Die Untersuchung der Proteolysestabilität von Peptidpitopen sollte mit dem Ziel erfolgen, stabile Peptide mit einem niedrigen k_{cat}/K_M -Wert bzw. langen Halbwertszeit zu identifizieren. Unterschiede bei guten Substraten waren daher von untergeordneter Bedeutung, so daß die Flankierungsvariante $-p/Seq/p-$ für die Bestimmung der Proteolysestabilität von Peptidpitopen verwendet werden kann.

III.6.6 Vergleich des Proteolysetests mit anderen Verfahren

Die katalytische Effizienz der Hydrolyse von Peptidsubstraten, die in der Literatur beschrieben sind, wurde mit dem Proteolysetest gemessen, um die Meßgenauigkeit des Proteolysetests im Vergleich mit anderen Verfahren zu bestimmen. Es wurde das Trypsinsubstrat GGSGPFGRSALVPEE aus Coombs et al. (1996) ausgewählt. Der Substratabbau war nach Beendigung der proteolytischen Reaktion durch einen Nachweis der Fragmente mittels RP-HPLC bestimmt worden. Des weiteren waren Mutationsvarianten des Sequenzmotivs untersucht worden, die unter anderem den Austausch von

Aminosäuren durch das negativ geladene Aspartat in der Nähe der Spaltungsstelle umfaßt hatten. Das ursprüngliche Sequenzmotiv und die Varianten mit Austausch gegen Aspartat wurden synthetisiert und mit dem Proteolysetest untersucht. Darüber hinaus wurde das Trypsinsubstrat GPARLAIG ausgewählt (Grahn et al., 1998), dessen proteolytischer Abbau mit FRET-Markierungen bestimmt worden war. Als Chymotrypsinsubstrat wurde PAPFAAA aus Bauer (1976) ausgewählt. Die Spaltungsfragmente des Peptids PAPFAAA waren nach Beendigung der proteolytischen Reaktion durch Dünnschichtchromatographie nachgewiesen worden. Die ausgewählten Peptidsubstrate wurden einerseits ohne eine Flankierung aus negativ geladenen Aminosäuren und andererseits mit der besten Flankierungsvariante $-p/Seq/p-$ untersucht, um den Einfluß von negativen Ladungen auf die Proteolyse näher zu charakterisieren. Abb. III.12 zeigt die katalytische Effizienz des Abbaus verschiedener Peptidsubstrate durch Trypsin bzw. Chymotrypsin.

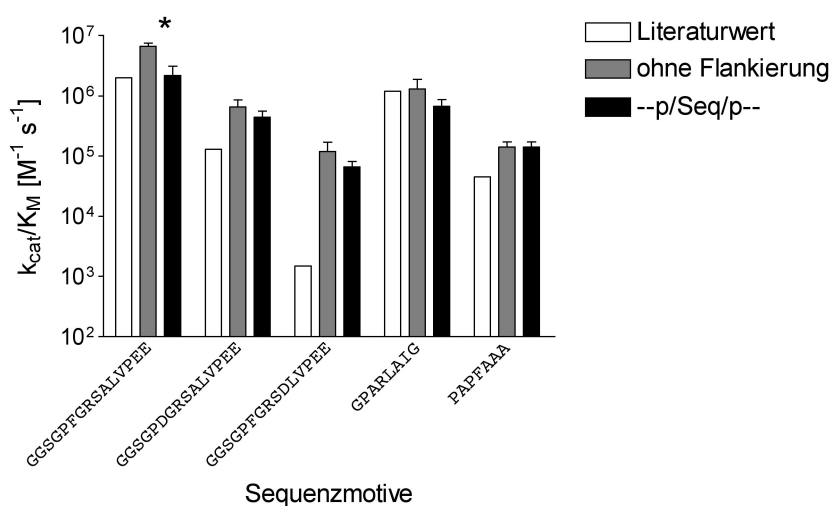


Abb. III.12: Vergleich der katalytischen Effizienz (k_{cat}/K_M) von Substraten, die in der Literatur beschrieben sind. Die ersten vier Peptidsubstrate wurden durch Trypsin und PAPFAAA durch Chymotrypsin abgebaut. Geometrische Mittelwerte und Standardfehler einer 4-fach Messung sind angegeben. Der Asterisk kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen der katalytischen Effizienz, die bei Verwendung der Flankierung $-p/Seq/p-$ bestimmt wurde, und der katalytischen Effizienz, die ohne Verwendung einer Flankierung bestimmt wurde (4-fach Messung; ungepaarter t-Test: $p < 0,05$).

Die beste Übereinstimmung der katalytischen Effizienz gab es im Vergleich zu der Bestimmung mit dem FRET-Substrat GPARLAIG. Die beiden chromatographischen Verfahren lieferten jeweils niedrigere Werte. Es war eine Reduktion der katalytischen Effizienz in Abhängigkeit von im Peptidsubstrat enthaltenen negativen Ladungen zu beobachten. Diese trat sowohl bei Verwendung der Flankierungsvariante $-p/Seq/p-$

auf als auch dann, wenn eine einzelne Aminosäure im Sequenzmotiv durch die negativ geladene Aminosäure Aspartat ersetzt wurde.

III.7 Präparation einer murinen Darmlavage

Die Stabilität von Peptidepitopen in einer Enzymrohpräparation aus dem Mäusedünndarm sollte untersucht werden. Dafür wurde zunächst von 8 Mäusen eine Darmlavage durch Ausspülen des Dünndarms mit dem wäßrigen Puffer SIF gewonnen. Beim Ausspülen trat eine Verdünnung der intestinalen Enzyme auf. Der Verdünnungsfaktor kann am verlässlichsten durch den IgA-Gehalt in der Enzympräparation bestimmt werden. In intestinalem murinen Sekret beträgt die IgA-Konzentration 310 µg/ml (Bade, S., Gorris, H. H., Koelling, S. und Frey, A. *In vivo* activities of digestive enzymes in murine small intestinal juices indicate a compartmentalization of proteolytic activity within the small intestinal lumen. Manuskript in Vorbereitung). Die IgA-Konzentrationen in den Darmlavagepräparationen von acht Mäusen betrugen durchschnittlich $18,5 \pm 4,8$ µg/ml (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung). Somit konnte ein Verdünnungsfaktor der Darmlavages von 16,8 bestimmt werden. In den Präparationen wurden die Enzymaktivitäten der drei wichtigsten Enzyme des Dünndarms, Trypsin, Chymotrypsin und Elastase mit pNA-Substraten bestimmt, die für die jeweiligen Enzyme spezifisch waren. Die Enzymaktivitäten der Präparationen wurden zu definierten reinen Enzymlösungen ins Verhältnis gesetzt, so daß die jeweiligen Enzymkonzentrationen bestimmt werden konnten. In der präparierten Darmlavage betrug die Konzentration von Trypsin $35,2 \pm 8,6$ µg/ml, von Chymotrypsin $39,0 \pm 8,6$ µg/ml und von Elastase $14,3 \pm 3,8$ µg/ml. Vor der weiteren Verwendung wurden die 8 Darmlavages vereinigt.

III.8 Anwendung des Proteolysetests mit einer Darmlavage

Mit dem optimierten Proteolysetest sollte die Abbaukinetik von beliebigen, vorher nicht näher untersuchten Peptidsubstraten in einer Enzymrohpräparation bestimmbar sein. Rohpräparationen bestehen aus einer Mischung mehrerer Enzyme, wobei der Beitrag der einzelnen Enzyme zum Substratabbau von untergeordneter Bedeutung ist. Wichtiger ist dagegen, wie lange ein Peptid in der Enzympräparation stabil ist. Daher wird nicht die katalytische Effizienz, sondern die Halbwertszeit von Peptiden bestimmt:

$$y = (a - b) \times 0,5^{\left(\frac{t \times x}{t_{1/2}}\right)} + b \quad \text{Gleichung (III.4)}$$

Konstante: $t = 90 \text{ min}$

Variablen: $y = \text{OD } 450\text{nm}$

$x = \text{Verdünnung der Enzympräparation}$

Parameter: $a = \text{ungespaltenes Peptidsubstrat}$

$b = \text{vollständig gespaltenes Peptidsubstrat (Hintergrund)}$

$t_{1/2} = \text{Halbwertszeit}$

Die Herleitung von Gleichung (III.4) aus der Michaelis-Menten-Gleichung ist im Anhang (VII.1.2) beschrieben. Mit der Gleichung läßt sich die Halbwertszeit des Peptidabbaus in einer Enzymrohpräparation bestimmen.

III.8.1 Stabilität der Peptidmarkierungen und -flankierungen

Bevor die murine Darmlavage für die Stabilitätsbestimmung von Sequenzmotiven eingesetzt werden konnte, mußte ausgeschlossen werden, daß das Peptid außerhalb des Sequenzmotivs geschnitten wird. So wäre z. B. die Biotinmarkierung des Peptides eine mögliche Spaltungsstelle für im Darm vorhandenen Biotinidasen. Die Stabilität wurde mit zwei Peptiden überprüft, deren Sequenzmotive nur aus einem D-Alanin bestanden. Diese Sequenzmotive wurden zum einen mit der Variante ohne Flankierung und zum anderen mit der Flankierung $-p/seq/p-$, die im folgenden für die Stabilitätsbestimmungen eingesetzt werden sollte, untersucht. Die Inkubation der Peptide (0,27 % der Peptidmenge eines SPOTs) erfolgte 90 min bei 37 °C in einer 2:3-Verdünnung der Darmlavagepräparation von 8 Mäusen in SIFT. Als Kontrolle diente ein Ansatz, in dem die Darmlavage durch den Puffer SIFT ersetzt wurde. Das Gesamtvolumen jedes Ansatzes betrug 12 µl. Die enzymatische Hydrolyse wurde analog zum Proteolysetest mit der gleichen Menge 2× PIC nach 90 min gestoppt und die Peptide mit dem Fänger-ELISA nachgewiesen. Es zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle bei keinem der untersuchten Peptide eine signifikante Reduktion der OD infolge eines enzymatischen Abbaus der Flankierungen oder Markierungen durch die Darmlavagepräparation (dreifach Messung; ungepaarter t-Test: $p > 0,05$).

III.8.2 Halbwertszeiten von Peptidepitopen in einer murinen Darmlavage

Peptidische Antigene, die zur Entwicklung mukosaler Vakzine verwendet werden sollen, müssen sowohl immunogen sein als auch eine ausreichende Stabilität gegenüber Darmproteasen aufweisen. Eine wichtige Anwendung des etablierten Proteolysetests ist daher die Charakterisierung der Proteolyseresistenz von potentiellen Peptidepitopen.

Um reale Bedingungen zu simulieren, wurden Peptidepitope einer Stabilitätsstudie in einer repräsentativen Darmlavage von 8 Mäusen unterzogen. Lineare Peptidepitope wurden dadurch erhalten, daß das Modellantigen Ovalbumin in überlappenden Fragmenten von jeweils 10 und 16 Aminosäuren mit einem Vorschub von zwei Aminosäuren synthetisiert wurde. Als T-Zell-Epitope eignen sich Peptide ab einer Länge von mindestens 10 Aminosäuren, um an MHC-II-Moleküle gebunden T-Zell-Rezeptoren präsentiert zu werden. Darüber hinaus können Peptide mit einer Länge von 10 und 16 Aminosäuren auch als B-Zell-Epitope verwendet werden. Die Sequenzen des Ovalbumin-Gesamtmoleküls und der synthetisierten überlappenden Fragmente sind im Anhang (VII.2.1 bzw. VII.2.3) aufgeführt. Aus der Sequenz des Gesamtmoleküls ergaben sich im 2er-Vorschub 189 überlappende Peptide mit einer Länge von je 10 Aminosäuren und 186 Peptide mit einer Länge von je 16 Aminosäuren, die auf ihre Verdauungsstabilität in einer murinen Darmlavage hin untersucht wurden. Es wurde eine 1:10-Verdünnung der Darmlavage als Ausgangskonzentration verwendet, die in 10 Schritten seriell 1:3 verdünnt wurde. Die Halbwertszeiten wurden durch Regression der Meßwerte an Gleichung (III.4) bestimmt. Bei 16 % der Peptide konnte die Halbwertszeit aus der Abbaukurve nicht zuverlässig bestimmt werden, weil der Abbau der Peptide zu langsam oder zu schnell verlief. Diese Peptide wurden mit weiteren seriellen 1:3-Verdünnungen bei Verwendung einer höheren bzw. niedrigen Ausgangskonzentration der Darmlavage erneut analysiert. In Abb. III.13 sind die Halbwertszeiten der einzelnen Peptidepitope dargestellt. Eine Liste der Halbwertszeiten aller Peptide ist im Anhang (VII.2.3) aufgeführt.

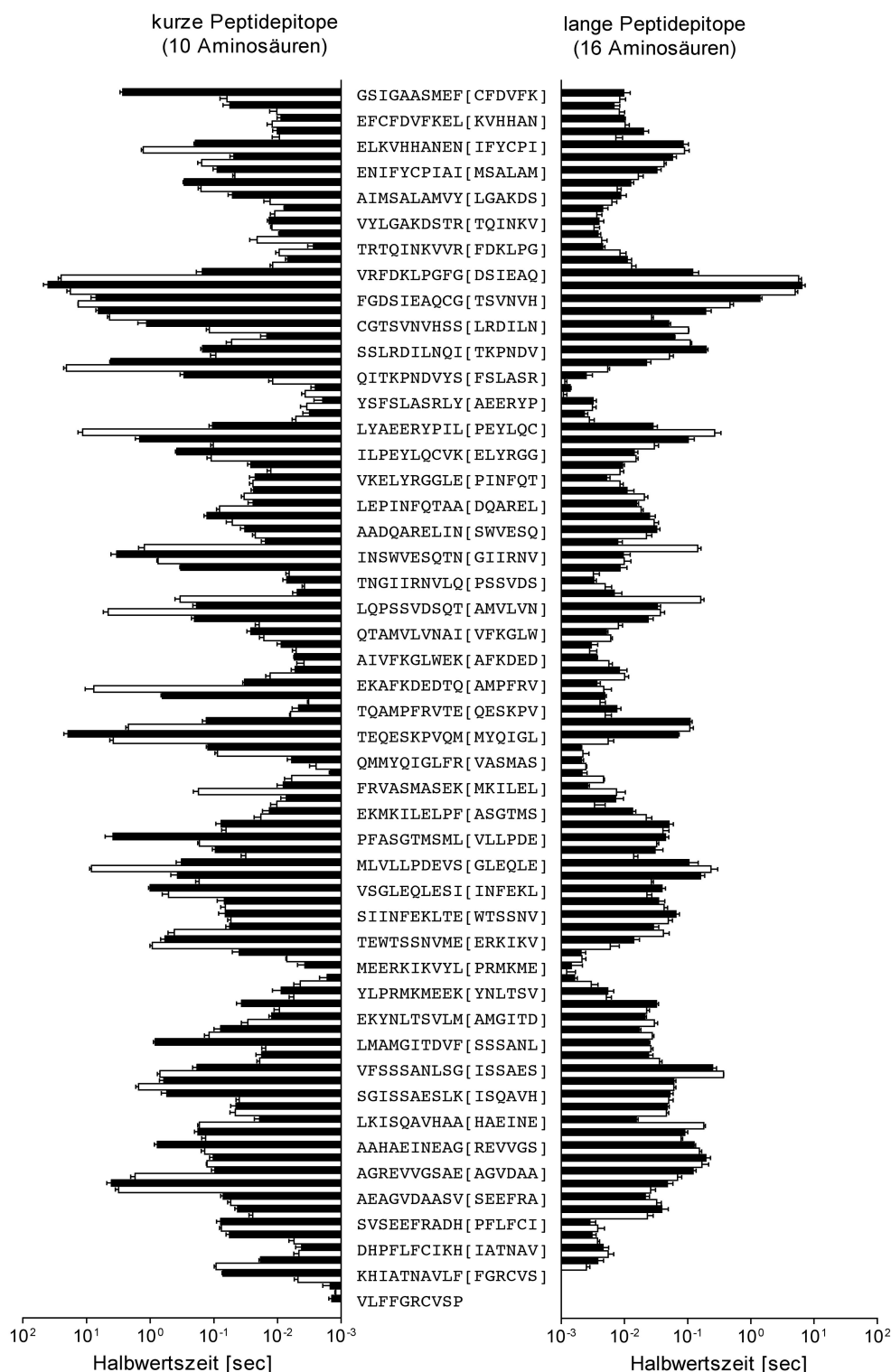


Abb. III.13: Halbwertszeiten von möglichen 10mer und 16mer Peptidepitopen im Dünndarm. Mit dem Verdünnungsfaktor von 16,8, der bei der Präparation der Darmlavage aufgetreten war, konnten die Halbwertszeiten auf die *in vivo* Situation im Dünndarm zurückgerechnet werden. Überlappende Ovalbumin-Peptide mit einem Vorschub von 2 Aminosäuren sind gezeigt. Das Sequenzmotiv jedes zweiten schwarzen Balkens ist in der Mitte angegeben. Die Balken stellen die geometrischen Mittelwerte und Standardfehler einer 3-fach Messung der Halbwertszeiten dar. Es sind nur Werte > 1 msec gezeigt. Auf der linken Seite sind die Halbwertszeiten der Peptide mit 10 Aminosäuren gezeigt. Hier umfaßt das Sequenzmotiv nur die ersten 10 Aminosäuren der aufgeführten Sequenz. Rechts sind die Halbwertszeiten der Peptide mit 16 Aminosäuren gezeigt. Hier umfaßt das Sequenzmotiv auch die Aminosäuren in der Klammer.

Abb. III.13 zeigt einen Unterschied in der Stabilität der Peptide von 5 Größenordnungen (1 msec bis 100 sec). Die Ähnlichkeit des Abbauprofils der entsprechenden 10mer und 16mer Peptide ist zu erkennen. Benachbarte Peptide, die sich nur um zwei Aminosäuren unterscheiden, zeigen ebenfalls ein ähnliches Abbauverhalten.

Für Immunisierungsstudien sind vor allem stabile Peptide von Interesse, die in der logarithmischen Darstellung von Abb. III.13 nicht stark hervortreten. Die Halbwertszeiten der zehn stabilsten 10mer und 16mer Peptide sind daher in Tab. III.8 zusammengefaßt.

10mer Peptide		16mer Peptide	
Peptidsequenz	Halbwertszeit	Peptidsequenz	Halbwertszeit
1. KLPFGGDSIE	40,1 sec	1. KLPFGGDSIEAQCGTS	6,4 sec
2. FDKLPFGGDS	25,2 sec	2. FDKLPFGGDSIEAQCG	5,7 sec
3. LNQITKPNDV	20,7 sec	3. PGFGGDSIEAQCGTSVN	5,0 sec
4. TEQESKPVQM	19,5 sec	4. FGDSIEAQCGTSVNVH	1,4 sec
5. PGFGGDSIEAQ	17,8 sec	5. DSIEAQCGTSVNVHSS	0,5 sec
6. DSIEAQCGTS	13,5 sec	6. SSSANLSGISSAESLK	0,4 sec
7. AEERYPILPE	11,5 sec	7. AEERYPILPEYLQCVK	0,3 sec
8. VLLPDEVSGL	8,4 sec	8. VFSSSANLSGISSAES	0,2 sec
9. AFKDEDTQAM	7,7 sec	9. VLLPDEVSGLEQLESI	0,2 sec
10. FGDSIEAQCG	7,1 sec	10. SSLRDILNQITKPNDV	0,2 sec

Tab. III.8: Halbwertszeiten der 10 stabilsten 10mer und 16mer Ovalbumin-Peptide im Dünndarm.

Das stabilste 10mer Peptid ist nach 40 sec und das 16mer Peptid nach 6 sec zur Hälfte von den Verdauungsenzymen des Dünndarms abgebaut. Bei den beiden jeweils stabilsten Peptiden handelt es sich um überlappende Sequenzmotive. Allgemein wurden 10mer Peptide weniger schnell abgebaut, da sie weniger potentielle Schnittstellen für die Verdauungsenzyme besitzen als die 16mer Peptide.

Von den insgesamt 375 untersuchten Peptiden konnte von allen die Halbwertszeit bestimmt werden. Damit konnte die universelle Anwendbarkeit des Proteolysetests als Hochdurchsatzverfahren zur Bestimmung der Enzymkinetik von beliebigen Peptidsequenzen mit Enzymrohfraktionen gezeigt werden.

IV Diskussion

Enzymtests sind unentbehrliche Hilfsmittel der Medizin und Biochemie. Es existieren eine Reihe von Möglichkeiten, den enzymatischen Abbau von Substraten zu überprüfen. Die verwendeten Verfahren lassen sich grob in zwei Gruppen aufteilen: Die eine Gruppe umfaßt Verfahren, mit denen sich genaue Aussagen hinsichtlich der Enzymkinetik machen lassen. Zu ihnen gehören beispielsweise die Verfahren, die chromogene oder FRET-Substrate verwenden. Die andere Gruppe dagegen umfaßt Verfahren, die sich für die parallele Untersuchung einer großen Anzahl von Substraten eignen. Bei letzterer Gruppe werden Substrate verwendet, die nach erfolgtem Abbau z. B. durch physikalische Trennmethode analysiert werden oder die an einer Festphase, wie z. B. einer Mikrotiterplatte gebunden sind. Während aber die erste Gruppe sich wegen hoher und sequenzabhängiger Hintergrundsignale nur eingeschränkt für die Verwendung von Proteaserohrpräparationen und für Hochdurchsatzanwendungen eignet, ist die genaue Charakterisierung der Enzymkinetik von Substrat und Enzym mit der zweiten Gruppe unzureichend. An dieser Stelle kommen die Vorteile des in Abb. II.2 vorgestellten Modells eines Proteolysetests zum Tragen. Einerseits erlaubt der Proteolysetest eine genaue Bestimmung der Enzymkinetik, da sich sowohl Substrat als auch Enzym während der proteolytischen Spaltung in Lösung befinden und sich serielle Verdünnungen von definierten Enzymlösungen anfertigen lassen. Die hohe Meßgenauigkeit des Proteolysetests kommt auch dadurch zum Ausdruck, daß die gemessenen $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte die höchste Übereinstimmung im Vergleich zu den $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werten zeigen, die mit einem FRET-basierten Verfahren bestimmt wurden (s. Abb. III.12). Andererseits ist der Nachweis der gespaltenen und ungespaltenen Peptidsubstrate durch einen Fänger-ELISA hochsensitiv und robust. Mit der vorliegenden Arbeit konnte die experimentelle Durchführbarkeit des Proteolysetests für allgemeine Anwendungen optimiert und mit einigen Beispielen demonstriert werden. In Abb. IV.1 ist der optimierte Aufbau des Proteolysetests dargestellt.

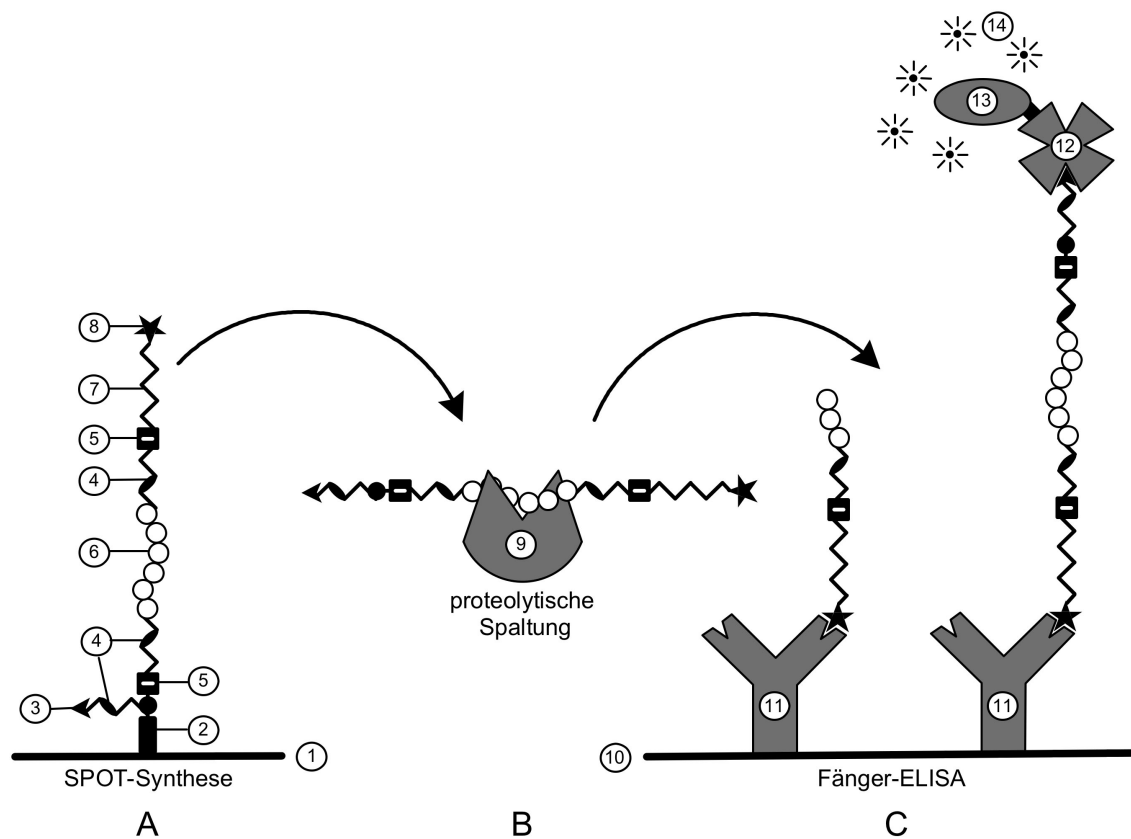


Abb. IV.1: Optimierter Proteolysetest.

- (A) SPOT-Peptidsynthese auf einem Zellulosefilter (1): Syntheseanker (2), Biotinmarkierung (3), PEG-Abstandshalter (4), negative Ladungen (5), Sequenzmotiv des Substrats mit n Aminosäuren (6), Aminoundecansäure (7) und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäuremarkierung (8). Die Peptide werden nach Beendigung der Synthese vom Zellulosefilter abgespalten und
- (B) mit einer Proteaselösung (9) inkubiert.
- (C) Der Nachweis von gespaltenem und ungespaltenem Peptidsubstrat erfolgt an einer hochbindenden Mikrotiterplatte (10), die mit dem Anti-2,4-D-Antikörper E2/G2 (11) beschichtet ist. Dieser Antikörper (11) fängt das gespaltene und ungespaltene Peptidsubstrat zu gleichen Teilen über 2,4-D (8) in Kombination mit Aminoundecansäure (7) ein. Nicht gebundene Peptide und Peptidbruchstücke werden durch Waschen entfernt. Danach kann ungespaltenes Substrat, das die Biotinmarkierung nicht verloren hat, durch Streptavidin (12), das mit Meerrettichperoxidase (13) konjugiert ist, und anschließende Farbreaktion (14) nachgewiesen werden. Dem gespaltenen Peptidsubstrat fehlt dagegen die Biotinmarkierung, so daß kein Farbsignal gebildet wird. Das Verhältnis des Farbsignals, das nach einem proteolytischen Abbau vorliegt, zu dem Signal, das vom ungespaltenen Peptidsubstrat gebildet wird, ergibt den Grad des proteolytischen Abbaus.

Im folgenden sollen einige unerwartete Ergebnisse und Grenzen des Proteolysetests diskutiert werden, die im Verlauf der Arbeit erklärt bzw. überwunden werden konnten.

IV.1 Spezifische und unspezifische Peptidbindung an die Mikrotiterplatte

Maximalsignal (MaxOD) und EC50-Wert sind von der Affinität des Haptenderivats zum Antikörper abhängig. Das wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl für Anti-DNP- als auch für Anti-2,4-D Antikörper (Abb. III.4) gezeigt. Weitere Untersuchungen von 2,4-D-Kombinationen zeigten außerdem eine Zunahme der MaxOD und Verringerung des EC50-Werts ausschließlich bei 2,4-D in Kombination mit zunehmend längeren aliphatischen Aminocarbonsäuren. Nicht-aliphatische Ketten aus Polyethylenglycol (PEG) dagegen hatten keinen Einfluß auf MaxOD und EC50-Wert (Abb. III.5). Daß die Affinität eines Haptens in Kombination mit zunehmender Länge einer aliphatischen Verbindung steigen kann, ist in der Literatur als Brückenbindeeffekt bekannt (Franek, 1987). Dieser Effekt wird mit der Antikörperherstellung erklärt: Bei einer Immunisierung muß das Hapten, gegen das ein Antikörper gewünscht wird, an ein Trägerprotein gekuppelt appliziert werden. Meistens findet die Kupplung über Amine an der Oberfläche des Trägerproteins statt. Bis auf das aminotermiale Ende der Aminosäurekette sind die Seitenketten von Lysin die einzigen Derivatisierungsstellen, die dafür zur Verfügung stehen. So wurde für die Immunisierung mit 2,4-D die Carboxylatfunktion von 2,4-D an Aminfunktionen des Trägermoleküls Thyreoglobulin gekuppelt (Franek et al., 1994). Wenn ein Antikörper das Hapten erkennt, liegt das Hapten als Konjugat mit dem Aminoterminal oder mit Lysin vor, das eine aliphatische Seitenkette mit 4 CH₂-Einheiten besitzt. Bei der Beschichtung mit den beiden Anti-DNP-Antikörpern werden die höchsten MaxODs bzw. niedrigsten EC50-Werte dann erreicht, wenn das DNP über Aminobuttersäure oder Aminocaprinsäure an das Peptid gekuppelt angeboten wird. Aminobuttersäure und Aminocaprinsäure besitzen mit 3 bzw. 5 CH₂-Einheiten eine ähnliche Kettenlänge wie die Seitenkette von Lysin (Abb. III.4). Bei 2,4-D ist der Zusammenhang jedoch anders, denn hier treten gewissermaßen „superoptimale“ Antikörper auf, die 2,4-D in Kombination mit zunehmend längeren aliphatischen Aminocarbonsäuren mit immer höherer Affinität binden. Beim Fänger-ELISA wirkt sich das in steigenden MaxODs und niedrigeren EC-50-Werten aus, die sich bei längeren Aminocarbonsäuren ((CH₂)_n, n ≥ 10) einer Asymptote annähern.

Bisher ist der Brückenbindeeffekt in der Literatur selten systematisch untersucht worden, weil er für fast alle Anwendungen, insbesondere Kompetitionsassays, auf jeden Fall verhindert werden muß. So beschränkte sich die Auswahl von Konjugaten auf solche, die keine Brückenbindung zeigen. Hatzidakis et al. (2002) beschreiben eine Affinitätsänderung des Antikörpers E2/G2 zu bestimmten 2,4-D-Konjugaten aufgrund einer unerwünschten

Brückenbindung. In der vorliegenden Arbeit konnte der Brückenbindeeffekt im positiven Sinne genutzt und für die Entwicklung eines empfindlichen Nachweissystems verwendet werden.

Obwohl die Affinitätsänderung durch den Brückenbindeeffekt erklärt werden kann, ist es dennoch ungewöhnlich, wie sie sich auf den Fänger-ELISA auswirkt. Nach dem Massenwirkungsgesetz, aus dem Rodbard und Hutt (1974) die 4-Parameter-Gleichung abgeleitet haben, sollte bei gleichbleibender Beschichtungskonzentration und immer weiter steigender Peptidkonzentration bei jeder Haptenkombination die gleiche MaxOD erreicht werden, unabhängig davon ob die Affinitätskonstante hoch oder niedrig ist. Der Sättigungsgrad der Antikörperbindestellen geht bei steigender Peptidkonzentration asymptotisch auf 100 % zu. Falls die eingesetzte Menge an Peptid aber nicht reichen würde, um die Sättigung zu erreichen – z. B. bei sehr geringer Affinität –, dürfte auch kein oberes Plateau erreicht werden. Somit tritt ein Widerspruch zu der Annahme auf, daß Peptide über ihre Haptenmarkierung einfach entsprechend dem Massenwirkungsgesetz an die Antikörper auf der Mikrotiterplattenoberfläche binden. Das Phänomen unterschiedlich hoher MaxODs ist auch in der Literatur beschrieben (Lew, 1984): In einem umgekehrten Versuchsaufbau wurde eine Mikrotiterplatte mit dem Hapten DNP, das an BSA gekuppelt war, beschichtet. Anschließend fing das Hapten unterschiedliche monoklonale Antikörper ein. Auch hier zeigte sich eine höhere MaxOD bei Antikörpern, die eine höhere Affinität zu DNP besaßen. Es wurde festgestellt, daß die Affinität einen Einfluß auf die MaxOD hat, eine Erklärung blieb aber aus. Zusammengenommen scheint es sich bei dem Phänomen also weniger um eine Auswirkung des gewählten Fängersystems zu handeln, als vielmehr um ein allgemeines Phänomen bei der antikörpervermittelten Bindung an eine Mikrotiterplatte.

Nygren et al. (1985) konnten zeigen, daß die Bindung eines markierten Antikörpers an ein oberflächengebundenes Antigen praktisch irreversibel ist: 69 h nach dem Einfangen war noch keine signifikante Dissoziation feststellbar. Es wurde die Schlußfolgerung gezogen, daß sich der Antigen-Antikörper-Komplex an der Festphase nicht im Zustand eines dynamischen Gleichgewichts mit der Lösung befindet. Auch von dieser Seite her wurde die Gültigkeit des Massenwirkungsgesetzes, auf das die 4-Parameter-Gleichung bezogen ist, für festphasengebundene Antigen-Antikörper-Komplexe in Frage gestellt. Trotzdem eignet sich die 4-Parameter-Gleichung empirisch am besten zur Kurvenanpassung für Immunoverfahren (Rodbard und Hutt, 1974).

Bei der Etablierung des Proteolysetests traten aber Fälle auf, in denen sich die Meßwerte nicht an die 4-Parameter-Gleichung anpassen ließen (Abb. III.6): Es wurde keine MaxOD erreicht, sondern die Werte stiegen immer weiter an. Dieses Phänomen konnte auf eine unspezifische Plattenbindung, die unabhängig vom Fängerantikörper stattfindet, zurückgeführt werden. Sie ließ sich durch keine der getesteten Blockierungsreagenzien oder Detergenzien verhindern und wurde durch positive Ladungen im Aminosäuresequenzmotiv verursacht (Abb. III.7). Das war insofern ungewöhnlich, als normalerweise davon ausgegangen wird, daß eine Bindung an eine Mikrotiterplatte, die aus dem hydrophoben Material Polystyrol besteht, vor allem durch hydrophobe Wechselwirkungen stattfindet. So wäre eine starke Bindung von Peptiden mit vielen hydrophoben Seitenketten im Sequenzmotiv zu erwarten gewesen. Von Loomans et al. (1997) wurde der Zusammenhang zwischen positiven Ladungen und Plattenbindung erkannt und für die direkte Beschichtung von Peptiden, die mit verzweigten Lysinketten, sogenannten Lysyl-Dendrimeren konjugiert waren, verwendet. Es wurde die Hypothese vorgeschlagen, daß die sp^2 -hybridsierten Phenylgruppen im Polystyrol ihre 6 π -Elektronen in höherer Dichte auf beiden Seiten des aromatischen Rings lokalisieren. So wäre eine Interaktion zwischen den positiv geladenen Seitenketten von Lysin und Arginin und der hohen π -Elektronendichte möglich. Diese Hypothese deckt sich mit den Ergebnissen aus Untersuchungen in der physikalisch-organischen Chemie (Ma und Dougherty, 1997). Die Kation- π -Interaktion würde auch erklären, warum negativ geladene Aminosäuren die Plattenbindung reduzieren. Weiterhin war festzustellen, daß die unspezifische Plattenbindung linear von der Konzentration des Peptids abhängig war, denn eine Reduzierung der Peptidmenge um den Faktor 10 (von 0,2 auf 0,02 % der Peptidmenge eines SPOTs) bewirkte auch eine 10-fache Reduktion des Signals.

Wenn die spezifisch durch den Fängerantikörper vermittelte und die unspezifische Bindung an die Mikrotiterplatte unabhängige Vorgänge wären, so sollten die Meßwerte eines Plattenbinders, die um die Werte der Plattenbindung bereinigt sind, die gleiche Kurve ergeben wie ein Peptid, das keine Tendenz zur Plattenbindung zeigt. Das heißt, in Abb. III.6 müßten sich für jedes Peptid die Meßwerte der antikörpervermittelten Bindung um die Meßwerte der unspezifischen Bindung korrigieren lassen. Bei der Korrektur der Meßwerte um die unspezifische Plattenbindung zeigt sich zwar ein oberes Plateau, aber die MaxOD kann abhängig von der Stärke der unspezifischen Plattenbindung bis auf 20 % des Plateaus eines Nicht-Plattenbinders absinken. Somit sind die spezifische und die unspezifische Bindung der Peptide an die Mikrotiterplatte keine unabhängigen Vorgänge.

Schließlich läßt sich auch folgende Beobachtung, die nicht gesondert im Ergebnisteil aufgeführt wurde, nicht mit einer einfachen Bindung der Peptide an den Fängerantikörper nach dem Massenwirkungsgesetz erklären: Bei Verwendung von Peptiden, die einen hohen Anteil an positiven Ladungen tragen – höher als sie in natürlichen Sequenzen auftreten würden, z. B. bei einem Sequenzmotiv, das nur aus 5 Lysinen besteht – lassen sich die Meßwerte einer Peptidverdünnungsreihe nach Korrektur um die unspezifische Plattenbindung zwar für eine Regression an die 4-Parameter-Gleichung verwenden, aber es ergibt sich ein um den Faktor 1000 niedrigerer EC50-Wert als bei Peptiden mit geringer positiver Ladung. Das heißt diese Peptide werden durch den Fängerantikörper auch dann noch spezifisch gebunden, wenn nur ein Tausendstel der Peptidmenge eingesetzt wird, die bei Peptiden mit anderen Sequenzmotiven notwendig ist. Wird die positive Ladung noch weiter erhöht, z. B. bei einem Sequenzmotiv aus 16 Lysinen, ist keine spezifische Bindung durch den Fängerantikörper mehr zu beobachten, sondern nur noch die unspezifische Plattenbindung.

Aufgrund all dieser Beobachtungen soll hier eine Hypothese vorgestellt werden, die das Konzept der einfachen Bindung von Peptiden aus der Lösung durch den Fängerantikörper durch ein erweitertes Konzept ersetzt:

Peptide werden nicht nur vom Fänger-Antikörper gebunden, sondern gehen auch eine Wechselwirkung mit der Polystyrolmatrix der Mikrotiterplatte ein. Es stellt sich ein reversibles Peptidgleichgewicht zwischen niederaffiner, „polyvalenter“ Polystyrolmatrix und hochaffinem, divalentem Fängerantikörper ein, das sich mit dem Massenwirkungsgesetz beschreiben läßt. Eventuell wird das Gleichgewicht über einen Übergangszustand stabilisiert, in dem das Peptid sowohl vom Antikörper als auch vom Polystyrol gebunden vorliegt. In Abb. IV.1 ist das Modell dargestellt.

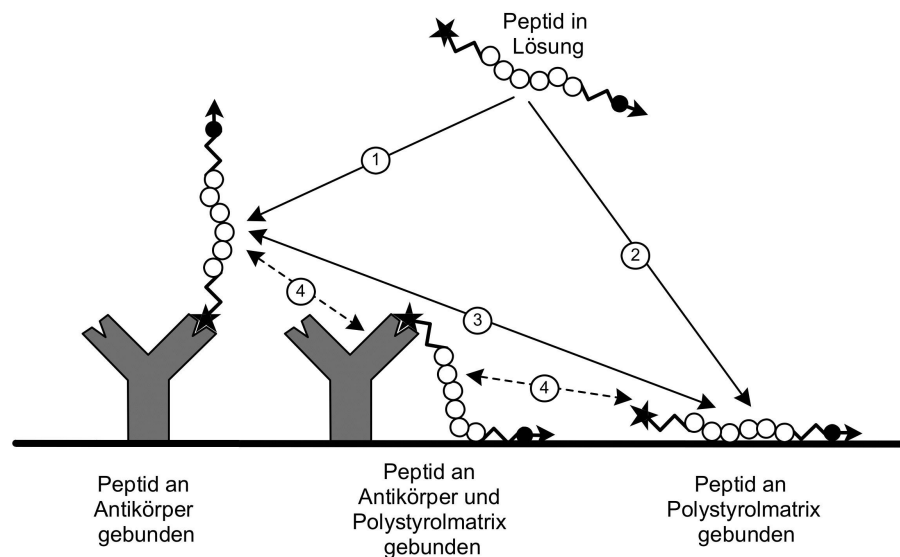


Abb.IV.1: Bindung von Peptiden an eine Mikrotiterplatte. Ein Peptid wird an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte gebunden, indem es eine spezifische Bindung mit dem Antikörper eingeht (1) oder unspezifisch an die Polystyrolmatrix gebunden wird (2). Die unterschiedlich gebundenen Peptide befinden sich in einem Gleichgewicht (3), das möglicherweise durch einen Übergangszustand stabilisiert wird (4).

Unter der Annahme, daß ein Peptid am Fängerantikörper gebunden für das Nachweissystem besser erreichbar ist als an der Polystyrolmatrix, lassen sich mit diesem Modell die aufgeführten Phänomene in Einklang bringen:

1. Die Verwendung von hochaffinen Peptid-Antikörper-Paaren - wie z. B. Peptiden, die mit 2,4-D-Aun markiert sind, und Anti-2,4-D-Antikörpern - führt im Fänger-ELISA zu höheren MaxODs als sie von weniger affinen Peptid-Antikörper-Paaren erreicht werden. Bei einer Peptidkonzentration, die ausreicht, um die MaxOD zu erzielen, ist nach einer definierten Inkubationszeit die maximale Peptidmenge erreicht, die vom Fängerantikörper aus der Peptidlösung gebunden werden kann. Von der Polystyrolmatrix wird in der gleichen Zeit ebenfalls eine definierte Menge Peptid an die Oberfläche gebunden, so daß eine bestimmte Menge an Peptid für eine Gleichgewichtsreaktion zwischen den beiden Formen der Bindung zur Verfügung steht. Wenn nun ein hochaffines Peptid-Antikörper-Paar verwendet wird, führt dies bei einer gegebenen Menge an Oberflächen-gebundenem Peptid zu einer Verschiebung des Gleichgewichts von der Polystyrolmatrix zum Fängerantikörper, wo das Peptid gut für das Nachweissystem erreichbar ist.
2. Peptide, die positive Ladungen tragen, werden besser an die Polystyrolmatrix gebunden als andere Peptide, so daß positiv geladene Peptide ab einer bestimmten Konzentration auch ohne Fängerantikörper nachgewiesen werden. Es wird kein oberes Plateau erreicht,

da mit zunehmender Peptidkonzentration immer mehr Peptid an die Polystyrolmatrix gebunden wird. Allerdings ist die Peptidkonzentration für vergleichbare Signale wie bei einer spezifischen Bindung wesentlich höher, da polystyrolgebundene Peptide schlechter für das Nachweissystem zu erreichen sind.

3. Spezifische und unspezifische Bindung an die Mikrotiterplatte sind insofern voneinander abhängig, als bei Peptiden ab einer bestimmten Anzahl an positiven Ladungen im Sequenzmotiv eine höhere Affinität zur Polystyrolmatrix auftritt, so daß das Gleichgewicht von gebundenem Peptid stärker auf der Seite der Polystyrolmatrix liegt, wo es nur schlecht für das Nachweissystem zugänglich ist. Daher ist bei diesen Peptiden die MaxOD nach der Korrektur um die Plattenbindung geringer als bei Peptiden, die nur eine geringe Affinität zur Polystyrolmatrix aufweisen.

4. Im Vergleich zu Peptiden mit einer natürlichen Ladungsverteilung wird bei einer hohen positiven Ladung des Sequenzmotivs (z. B. mit einem Sequenzmotiv von 5 Lysinen) eine wesentlich größere Menge an Peptid durch die Interaktion des Sequenzmotivs mit dem π -Elektronensystem von Polystyrol auf der Polystyrolmatrix gebunden. Diese große Menge ist aber an der Polystyrolmatrix gebunden für das Nachweissystem nur schlecht zu erreichen. Erst wenn infolge der Gleichgewichtseinstellung Peptid von der Polystyrolmatrix an den Fängerantikörper weitergegeben wird, wird gebundenes Peptid effektiv vom Nachweissystem detektiert. Daraus resultiert eine Verschiebung des EC50-Werts in Richtung niedrigerer Peptidkonzentration.

5. Das in bezug auf die positive Ladung extremste untersuchte Peptid mit einem Sequenzmotiv von 16 Lysinen zeigt auf einer mit Antikörper beschichteten Mikrotiterplatte keine spezifische Bindung mehr. In diesem Fall ist zwar die Beladungsdichte der Polystyrolmatrix am höchsten und es steht am meisten Peptid für die Gleichgewichtsreaktion zur Verfügung. Das Gleichgewicht liegt aber so stark auf Seiten der Bindung an die Polystyrolmatrix, daß kein Peptid auf dem Fängerantikörper nachgewiesen werden kann. Es tritt nur noch die unspezifische Plattenbindung in Erscheinung.

Der Proteolysetest wurde von der Interaktion der Peptide mit der Polystyrolmatrix nicht beeinträchtigt. Ein Signal durch unspezifische Plattenbindung konnte gegebenenfalls durch Flankierungen des Sequenzmotivs mit negativen Ladungen verhindert werden.

IV.2 Grenzen der enzymkinetischen Auswertung

Der Aufbau des vorgestellten Proteolysetests bietet den Vorteil, daß der Substratabbau nach einer Kinetik erster Ordnung verläuft: Die Substratkonzentration wird nach einem definierten Zeitintervall jeweils halbiert, unabhängig davon, wie hoch die genaue Substratkonzentration zu einem bestimmten Zeitpunkt ist. Eine genaue Bestimmung der Substratkonzentration ist daher nicht notwendig. Die Michaelis-Menten-Gleichung, aus der die Gleichungen III.2 und III.4 abgeleitet wurden, besitzt nur in gewissen Grenzen Allgemeingültigkeit. Es wird eine höhere Substrat- als Enzymkonzentration ($[S] \gg [E]$) vorausgesetzt, so daß die eingesetzte Substratmenge mit der nicht enzymgebundenen Substratmenge gleichgesetzt werden kann ($[S]_{\text{ges}} \approx [S]_{\text{frei}}$). Diese Bedingung ist bei klassischen Enzymtests ohnehin erfüllt, da alleine für das Nachweissystem schon eine hohe Menge an Substrat benötigt wird. Bei pNA-Substraten werden Konzentrationen bis zu 1 mM eingesetzt; in diesem Fall erfolgt die Abbaukinetik nach einer Reaktion nullter Ordnung. Da das Nachweissystem des vorgestellten Proteolysetests wesentlich empfindlicher ist, kann auch eine geringere Menge an Substrat nachgewiesen werden. Die Peptidsubstratkonzentration betrug jeweils etwa 60 nM (0,33 % der Peptidmenge eines SPOTs in 50 µl) in jeder Kavität, und die Proteaselösung wurde seriell verdünnt. Bei mäßigen und guten Substraten ist die Bedingung $[S] \gg [E]$ erfüllt. Bei schlechten bis hin zu proteolyse-resistenten Substraten muß die Enzymmenge jedoch immer weiter erhöht werden, um die Kinetik des Abbaus noch verfolgen zu können. In der Darmlavage wurden die Enzymkonzentrationen bestimmt. Die Konzentration von Trypsin betrug 35,2 µg/ml bzw. 1,4 µM, von Chymotrypsin 39,0 µg/ml bzw. 1,6 µM und von Elastase 14,3 µg/ml bzw. 0,6 µM. Somit ist die Bedingung $[S] \gg [E]$ verletzt. Segel (1988) konnte aber zeigen, daß die Bedingung $[S] \gg [E]$ unnötig restriktiv ist. Statt dessen ist es ausreichend, wenn gilt: $[S] + K_M \gg [E]$. K_M -Werte für gute natürliche Trypsin- und Chymotrypsinsubstrate liegen bei 50 µM (Bauer, 1976; Coombs et al., 1996). Bei schlechten Substraten, für die hohe Enzymkonzentrationen eingesetzt werden müssen, liegt der Wert höher. Daraus ergibt sich, daß die Gleichungen für alle eingesetzten Enzymkonzentrationen gültig sind.

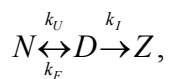
Eine Reaktionskinetik nach pseudo-erster Ordnung erfordert zusätzlich, daß die Substratkonzentration kleiner ist als die Michaelis-Konstante ($[S] \ll K_M$). Bei $[S] \approx 40$ nM und $K_M > 50$ µM kann diese Bedingung uneingeschränkt als erfüllt angesehen werden.

IV.3 Proteolysestabilität von potentiellen Peptidpitopen

Die maximale Halbwertszeit von linearen Peptiden im Dünndarm beträgt bei Sequenzen aus 16 Aminosäuren 6 sec und bei Sequenzen aus 10 Aminosäuren, der Mindestlänge für eine effektive MHC-II-Bindung, 40 sec. Derart geringe Halbwertszeiten ermöglichen es einer Vakzine kaum, den Ort der Immuninduktion zu erreichen, bevor sie bereits proteolytisch gespalten ist. Damit kann zwar die hohe katalytische Effizienz der Proteasen im Dünndarm demonstriert werden, aber der Ansatz, mit löslichen Peptiden Immunisierungen durchzuführen, erscheint fraglich. Allerdings wurde die Bestimmung der Proteolysestabilität in gewisser Weise unter idealisierten Bedingungen durchgeführt. *In vivo* liegt nicht alleine das Substrat vor, sondern es wird von vielen Nahrungsbestandteilen begleitet, die mit einer potentiellen Peptidvakzine kompetitieren und somit einen Teil der Proteaseaktivität von der Vakzine fernhalten.

Verglichen mit den Halbwertszeiten der einzelnen Peptide war das Ovalbumin-Gesamtmolekül in einer Pankreatinlösung (10 mg/ml), in der Trypsin, Chymotrypsin und Elastase vorhanden sind, wesentlich stabiler (Takagi et al., 2003). Der Nachweis der Abbaufragmente erfolgte mit einem SDS-Polyacrylamidgel. Die Menge des Gesamtmoleküls nahm bereits nach 2 min deutlich ab, aber es bildete sich ein stabiles geringfügig verkürztes Fragment, das auch nach 2 h noch vorhanden war. Das scheint zunächst ungewöhnlich, da in dem Gesamtmolekül wesentlich mehr Spaltungsstellen vorhanden sind als in den einzelnen Peptiden. In der Untersuchung wurde von Takagi aber gleichzeitig festgestellt, daß bereits nach 2 min kein einziges Abbaufragment mehr nachweisbar war, wenn Ovalbumin vor der Inkubation mit dem Enzymgemisch für 5 min auf 100 °C erhitzt, also denaturiert wurde.

Von Lumry und Eyring (1954) wurde folgendes Modell für den Zusammenhang von Denaturierung und einer irreversiblen Folgereaktion, wie etwa der Proteolyse, vorgeschlagen:



wobei N das native Protein darstellt, D das denaturierte Protein und Z den Endzustand. Zwischen N und D existiert ein reversibles Gleichgewicht mit der Entfaltungskonstanten k_U und der Faltungskonstanten k_F . Nur im Zustand D kann eine Protease das Protein in einem irreversiblen Schritt (I) spalten und dem Gleichgewicht entziehen. Gilt $k_I \gg k_F$, so ist nur die Entfaltung des Proteins geschwindigkeitsbestimmend. Mit diesem Modell läßt

sich die unterschiedliche Stabilität von nativem und hitzedenaturiertem Ovalbumin erklären: Für den Abbau des nativen Proteins ist die Entfaltung geschwindigkeitsbestimmend. Das hitzedenaturierte Protein dagegen liegt bereits im Zustand D vor. In diesem Zustand wird es eher gespalten als zurückgefaltet. Eine biochemische Erklärung für den schnelleren Abbau von hitzedenaturierten Proteinen ist eine bessere Zugänglichkeit der Spaltungsstellen in der Protein-Aminosäuresequenz für Proteasen.

Vor diesem Hintergrund liegen lineare Peptide in der maximal entfalteten Struktur vor und sind infolgedessen auch wesentlich proteolyseempfindlicher als gefaltete Proteine.

Die starke Hydrolyseempfindlichkeit von einzelnen Peptidfragmenten hebt die Bedeutung von M-Zellen hervor, die eine der wichtigsten Aufnahmerouten für Antigene durch das Mukosale Immunsystem darstellen (s. Abb. I.1). Die M-Zellen sind in der Lage, Proteine oder Pathogene als ganzes aufzunehmen und weitgehend unmodifiziert weiterzugeben. Erst die antigenpräsentierenden Zellen in der basolateralen Tasche der M-Zellen prozessieren die Proteine gezielt für die Präsentation an MHC-II-Molekülen. Die im Darmlumen vorhandenen Peptidfragmente wären für die Antigenpräsentation zu instabil.

Für eine Verwendung als Schluckimpfstoffe ist es empfehlenswert, Peptide gegen den Angriff von Proteasen zu stabilisieren. Bracci et al. (2003) konnten beispielsweise eine höhere Proteasestabilität gegenüber Trypsin und Chymotrypsin erreichen, indem nicht einzelne lineare Peptide eingesetzt wurden, sondern Peptiddendrimere, d. h. Peptide an den Enden von verzweigten Lysinstrukturen. Vermutlich sind Oberflächen-gebundene Peptide allgemein schlechter für Proteasen zugänglich und damit besser gegen einen proteolytischen Abbau geschützt. Eine andere Möglichkeit bietet die Verwendung von sogenannten „Retro-inverso“ Peptiden (Van Regenmortel und Muller, 1998). Das sind Peptide, in denen alle L-Aminosäuren gegen die entsprechenden D-Aminosäuren ausgetauscht sind und deren Aminosäureabfolge umgekehrt ist. Auf diese Weise entsteht ein doppelt gespiegeltes Molekül. Aufgrund der Anwendung von D-Aminosäuren sind diese Peptide weitgehend proteasestabil, was mit den Ergebnissen in Tab. III.7 bestätigt werden konnte. Die doppelte Spiegelung bewirkt, daß diese Peptide in vielen Fällen eine Immunantwort gegen das ursprüngliche Peptid induzieren können, denn die chirale Spezifität von Antikörpern ist nicht vollkommen. Aus frühen Immunisierungsversuchen wurde zunächst gefolgert, daß Peptide aus D-Aminosäuren nicht immunogen sind, bis sich herausstellte, daß die angenommene Unreaktivität nicht auf fehlende Immunogenität zurückzuführen ist

(Sela und Zisman, 1997). Wenn die gleichen Mengen von L- und D-Peptiden für eine Immunisierung verwendet werden, sind die L-Peptide so proteaselabil, daß effektiv eine wesentlich geringere Menge von L- als von D-Peptiden bis zum Ort der Immuninduktion gelangt. Infolgedessen ist die Menge an D-Peptiden so hoch, daß eine Immuntoleranz induziert wird. Dieser Befund macht noch einmal die Bedeutung klar, die die Proteolysestabilität von Peptidimpfstoffen für eine erfolgreiche Immunisierung hat.

Eine weitere Möglichkeit, die Proteolysestabilität von Peptiden zu erhöhen, läßt sich aus Abb. III.11 erschließen: das Einfügen von negativ geladenen Aminosäuren direkt neben dem Sequenzmotiv. Dieser Ansatz bedarf allerdings weiterer Voruntersuchungen; so müßte unter anderem geklärt werden, ob mit negativen Ladungen flankierte Aminosäuresequenzen ihre Immunogenität behalten.

IV.4 Diagnostische Anwendungsmöglichkeiten des Proteolysetests

Der in dieser Arbeit vorgestellte Proteolysetest kann auf verschiedenen Gebieten in der medizinischen Diagnostik eingesetzt werden. Da in der Diagnostik häufig Enzymrohpräparationen wie etwa Blutproben untersucht werden, ist hier vor allem die Robustheit des Proteolysetests vorteilhaft. So könnte beispielsweise der Radioimmunoassay zum Nachweis der Blutplasmaprotease Renin, deren Konzentration ein Marker für einige Formen von Bluthochdruck ist, abgelöst und so Arbeiten mit radioaktivem Material vermieden werden. Weitere diagnostische Möglichkeiten bieten Inhibitionsmessungen, deren Durchführbarkeit im Rahmen dieser Arbeit demonstriert werden konnte. Ein wichtiges Beispiel dafür ist die Bestimmung der Inhibitionskonstanten von Inhibitoren der HIV-Protease, um festzustellen, gegen welche pharmazeutischen Inhibitoren eine Resistenz des Erregers vorhanden ist. Die Durchführung könnte, wie in Kapitel III.6.3 beschrieben, erfolgen. Mehrere parallele HIV-Protease-Verdünnungsreihen werden angefertigt, wobei jeweils definierte Mengen unterschiedlicher Proteaseinhibitoren zum Substrat gegeben werden. Die Inhibitionskonstante jedes einzelnen pharmazeutischen Inhibitors auf die HIV-Protease ließe sich somit bestimmen. Die antivirale Therapie kann an die eventuell vorhandenen Resistenzen angepaßt werden.

V Zusammenfassung

Proteasen sind essentiell für alle Organismen. Da Proteasen an verschiedenen Stoffwechselerkrankungen beteiligt sind und Pathogenitätsfaktoren von Erregern darstellen, sind sie außerdem von hoher medizinischer Bedeutung.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein robuster und sensitiver Proteolysetest entwickelt und optimiert werden, mit dem eine genaue Bestimmung der enzymkinetischen Konstanten (k_{cat}/K_M) bzw. der Halbwertszeit von beliebigen Enzym-Substrat-Paaren im Hochdurchsatz möglich ist. Bei Zusatz kompetitiver Inhibitoren kann die Inhibitionskonstante (K_i) bestimmt werden. Peptidsubstrate wurden mit einer aminoterminalen Haptenmarkierung und einer carboxyterminalen Biotinmarkierung parallel auf einem Zellulosefilter synthetisiert und anschließend vom Filter abgespalten. Die gelösten Peptidsubstrate wurden mit einer Proteaselösung inkubiert. Der Nachweis der proteolytischen Spaltung erfolgte auf einer Mikrotiterplatte, die mit einem gegen das Hapten gerichteten Antikörper beschichtet war. Sowohl ungespaltene als auch gespaltene Peptidsubstrate wurden vom Antikörper gebunden. Aber nur das ungespaltene Peptidsubstrat trug die Biotinmarkierung, die mit einem Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat und einem TMB-Farbsubstrat nachgewiesen wurde. Durch den Vergleich des Farbsignals, das nach einem proteolytischen Abbau vorlag, zu dem Signal, das vom ungespaltenen Peptid gebildet wurde, konnte der Grad des enzymatischen Abbaus bestimmt werden. Der empfindlichste Peptidnachweis wurde erreicht, wenn ein Konjugat des Haptens 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) mit Aminoundecansäure als aminoterminaler Peptidmarkierung verwendet wurde und die Mikrotiterplatte mit dem Anti-2,4-D-Antikörper E2/G2 beschichtet wurde. Die unspezifische Bindung einiger Peptidsubstrate an die Mikrotiterplatte ließ sich durch Einfügen von negativ geladenen Aminosäuren auf beiden Seiten des Sequenzmotivs unterdrücken.

Mit dem Proteolysetest wurden die Halbwertszeiten von überlappenden 10mer und 16mer Peptidepitopen des Modellantigens Ovalbumin in einer murinen Darmlavage bestimmt, um die Eignung von löslichen Peptiden für orale Immunisierungen zu untersuchen. Die maximale Halbwertszeit von 10mer Peptiden betrug 40 Sekunden und von 16mer Peptiden nur 6 Sekunden. Dieses Ergebnis zeigt, wie wichtig es ist, Schluckimpfstoffe auf Peptidbasis gegen den Angriff von Proteasen zu stabilisieren.

VI Literaturverzeichnis

- Bauer, C. A. (1976) The active centers of *Streptomyces griseus* protease 3 and alpha-chymotrypsin. Enzyme-substrate interactions beyond subsite S'1. *Biochim Biophys Acta* **438**, 495-502.
- Bender, M. L., Begue-Canton, M. L., Blakeley, R. L., Brubacher, L. J., Feder, J., Gunter, C. R., Kezdy, F. J., Killheffer, J. V., Jr., Marshall, T. H., Miller, C. G., Roeske, R. W. und Stoops, J. K. (1966) The determination of the concentration of hydrolytic enzyme solutions: alpha-chymotrypsin, trypsin, papain, elastase, subtilisin, and acetylcholinesterase. *J Am Chem Soc* **88**, 5890-5913.
- Berggren, K., Chernokalskaya, E., Steinberg, T. H., Kemper, C., Lopez, M. F., Diwu, Z., Haugland, R. P. und Patton, W. F. (2000) Background-free, high sensitivity staining of proteins in one- and two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using a luminescent ruthenium complex. *Electrophoresis* **21**, 2509-2521.
- Bian, H., Reidhaar-Olson, J. F. und Hammer, J. (2003) The use of bioinformatics for identifying class II-restricted T-cell epitopes. *Methods* **29**, 299-309.
- Blackman, M. J. (2000) Proteases involved in erythrocyte invasion by the malaria parasite: function and potential as chemotherapeutic targets. *Curr Drug Targets* **1**, 59-83.
- Bracci, L., Falciani, C., Lelli, B., Lozzi, L., Runci, Y., Pini, A., De Montis, M. G., Tagliamonte, A. und Neri, P. (2003) Synthetic peptides in the form of dendrimers become resistant to protease activity. *J Biol Chem* **278**, 46590-46595.
- Bray, M. B., Maeji, N. J. und Geysen, H. M. (1990) The simultaneous multiple production of solution phase peptides; assesement of the Geysen method of simultaneous peptide synthesis. *Tetrahedron Letters* **31**, 5811-5814.
- Cleland, J. L. (1999) Single-administration vaccines: controlled-release technology to mimic repeated immunizations. *Trends Biotechnol* **17**, 25-29.
- Coombs, G. S., Dang, A. T., Madison, E. L. und Corey, D. R. (1996) Distinct mechanisms contribute to stringent substrate specificity of tissue-type plasminogen activator. *J Biol Chem* **271**, 4461-4467.
- Dekker, N., Cox, R. C., Kramer, R. A. und Egmond, M. R. (2001) Substrate specificity of the integral membrane protease OmpT determined by spatially addressed peptide libraries. *Biochemistry* **40**, 1694-1701.
- Fournout, S., Roquet, F., Salhi, S. L., Seyer, R., Valverde, V., Masson, J. M., Jouin, P., Pau, B., Nicolas, M. und Hanin, V. (1997) Development and standardization of an immuno-quantified solid phase assay for HIV-1 aspartyl protease activity and its application to the evaluation of inhibitors. *Anal Chem* **69**, 1746-1752.
- Franek, M. (1987) Structural aspects of steroid-antibody specificity. *J Steroid Biochem* **28**, 95-108.

- Franek, M., Kolar, V., Granatova, M. und Nevorankova, Z. (1994) Monoclonal ELISA for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid: characterization of antibodies and assay optimization. *J Agric Food Chem* **42**, 1369-1374.
- Frank, R. (1992) Spot-Synthesis: An easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* **48**, 9217-9232.
- Frey, A., Giannasca, K. T., Weltzin, R., Giannasca, P. J., Reggio, H., Lencer, W. I. und Neutra, M. R. (1996) Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal epithelial cells: implications for microbial attachment and oral vaccine targeting. *J Exp Med* **184**, 1045-1059.
- Frey, A., Meckelein, B., Externest, D. und Schmidt, M. A. (2000) A stable and highly sensitive 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays. *J Immunol Methods* **233**, 47-56.
- Frey, A. und Neutra, M. R. (1997) Targeting of Mucosal Vaccines to Peyer's Patch M Cells. *Behring Institute Mitteilungen* **98**, 376-389.
- Friedman, A. und Weiner, H. L. (1994) Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 6688-6692.
- George, J., Tear, M. L., Norey, C. G. und Burns, D. D. (2003) Evaluation of an imaging platform during the development of a FRET protease assay. *J Biomol Screen* **8**, 72-80.
- Grahn, S., Ullmann, D. und Jakubke, H. (1998) Design and synthesis of fluorogenic trypsin peptide substrates based on resonance energy transfer. *Anal Biochem* **265**, 225-231.
- Green, N. M. (1990) Avidin and streptavidin. *Methods Enzymol* **184**, 51-67.
- Gutierrez, O. A., Chavez, M. und Lissi, E. (2004) A theoretical approach to some analytical properties of heterogeneous enzymatic assays. *Anal Chem* **76**, 2664-2668.
- Gutierrez, O. A., Salas, E., Hernandez, Y., Lissi, E. A., Castrillo, G., Reyes, O., Garay, H., Aguilar, A., Garcia, B., Otero, A., Chavez, M. A. und Duarte, C. A. (2002) An immunoenzymatic solid-phase assay for quantitative determination of HIV-1 protease activity. *Anal Biochem* **307**, 18-24.
- Haber, E., Koerner, T., Page, L. B., Kliman, B. und Purnode, A. (1969) Application of a radioimmunoassay for angiotensin I to the physiologic measurements of plasma renin activity in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* **29**, 1349-1355.
- Hatzidakis, G. I., Tsatsakis, A. M., Krambovitis, E. K., Spyros, A. und Eremin, S. A. (2002) Use of L-lysine fluorescence derivatives as tracers to enhance the performance of polarization fluoroimmunoassays. A study using two herbicides as model antigens. *Anal Chem* **74**, 2513-2521.

- Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J. V., Steinman, R. M. und Nussenzweig, M. C. (2001) Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* **194**, 769-779.
- Holmgren, J. und Czerkinsky, C. (2005) Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med* **11**, S45-53.
- Johansson, M. K. und Cook, R. M. (2003) Intramolecular dimers: a new design strategy for fluorescence-quenched probes. *Chemistry* **9**, 3466-3471.
- Jun, J. E. und Goodnow, C. C. (2003) Scaffolding of antigen receptors for immunogenic versus tolerogenic signaling. *Nat Immunol* **4**, 1057-1064.
- Kraehenbuhl, J. P. und Neutra, M. R. (1992a) Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiol Rev* **72**, 853-879.
- Kraehenbuhl, J. P. und Neutra, M. R. (1992b) Transepithelial transport and mucosal defence II: secretion of IgA. *Trends Cell Biol* **2**, 170-174.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Laine, J., Beattie, M. und LeBel, D. (1993) Simultaneous kinetic determinations of lipase, chymotrypsin, trypsin, elastase, and amylase on the same microtiter plate. *Pancreas* **8**, 383-386.
- Latt, S. A., Auld, D. S. und Vallee, B. L. (1972) Fluorescence determination of carboxypeptidase A activity based on electronic energy transfer. *Anal Biochem* **50**, 56-62.
- Lew, A. M. (1984) The effect of epitope density and antibody affinity on the ELISA as analysed by monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* **72**, 171-176.
- Lichstein, H. C. und Birnbaum, J. (1965) Combinability of avidin and streptavidin with analogs of biotin. *Biochem Biophys Res Commun* **20**, 41-45.
- Lockwood, J. S. und Randall, H. T. (1949) The place of electrolyte studies in surgical patients. *Bull N Y Acad Med* **25**, 228-239.
- Loomans, E. E., Petersen-van Ettekoven, A., Bloemers, H. P. und Schielen, W. J. (1997) Direct coating of poly(lys) or acetyl-thio-acetyl peptides to polystyrene: the effects in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Anal Biochem* **248**, 117-129.
- Lopez-Otin, C. und Overall, C. M. (2002) Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 509-519.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. und Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.

- Lue, C., van den Wall Bake, A. W., Prince, S. J., Julian, B. A., Tseng, M. L., Radl, J., Elson, C. O. und Mestecky, J. (1994) Intraperitoneal immunization of human subjects with tetanus toxoid induces specific antibody-secreting cells in the peritoneal cavity and in the circulation, but fails to elicit a secretory IgA response. *Clin Exp Immunol* **96**, 356-363.
- Lumry, B. und Eyring, H. (1954) Conformation changes of proteins. *Journal of Physical Chemistry* **58**, 110-120.
- Ma, J. C. und Dougherty, D. A. (1997) The Cation- π -Interaction. *Chem Rev* **97**, 1303-1324.
- MacDonald, T. T. (2003) The mucosal immune system. *Parasite Immunol* **25**, 235-246.
- Matayoshi, E. D., Wang, G. T., Krafft, G. A. und Erickson, J. (1990) Novel fluorogenic substrates for assaying retroviral proteases by resonance energy transfer. *Science* **247**, 954-958.
- Mowat, A. M. (2003) Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* **3**, 331-341.
- Mowat, A. M. (2005) Dendritic cells and immune responses to orally administered antigens. *Vaccine* **23**, 1797-1799.
- Naqvi, T., Lim, A., Rouhani, R., Singh, R. und Eglen, R. M. (2004) Beta galactosidase enzyme fragment complementation as a high-throughput screening protease technology. *J Biomol Screen* **9**, 398-408.
- Neutra, M. R. und Kraehenbuhl, J. P. (1992) Transepithelial transport and mucosal defence I: the role of M cells. *Trends Cell Biol* **2**, 134-138.
- Neutra, M. R., Mantis, N. J. und Kraehenbuhl, J. P. (2001) Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat Immunol* **2**, 1004-1009.
- Nygren, H., Czerkinsky, C. und Stenberg, M. (1985) Dissociation of antibodies bound to surface-immobilized antigen. *J Immunol Methods* **85**, 87-95.
- Olivier, V., Meisen, I., Meckelein, B., Hirst, T. R., Peter-Katalinic, J., Schmidt, M. A. und Frey, A. (2003) Influence of targeting ligand flexibility on receptor binding of particulate drug delivery systems. *Bioconjug Chem* **14**, 1203-1208.
- Patick, A. K. und Potts, K. E. (1998) Protease inhibitors as antiviral agents. *Clin Microbiol Rev* **11**, 614-627.
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J. P. und Ricciardi-Castagnoli, P. (2001) Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* **2**, 361-367.

- Rodbard, D. und Hutt, D. M. Statistical analysis of radioimmunoassays and immunoradiometric (labelled antibody) assays: a generalized weighted, iterative, least-squares method for logistic curve fitting.
In: *Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine*.
Internationale Atomenergiebehörde, Wien. 165-192, Unipub, New York, 1974.
- Sabin, A. B. (1965) Oral poliovirus vaccine. History of its development and prospects for eradication of poliomyelitis. *J Am Med Assoc* **194**, 872-876.
- Sanchez, A., Gupta, R. K., Alonso, M. J., Siber, G. R. und Langer, R. (1996) Pulsed controlled-released system for potential use in vaccine delivery. *J Pharm Sci* **85**, 547-552.
- Schellenberger, V., Braune, K., Hofmann, H. J. und Jakubke, H. D. (1991) The specificity of chymotrypsin. A statistical analysis of hydrolysis data. *Eur J Biochem* **199**, 623-636.
- Segel, L. A. (1988) On the validity of the steady state assumption of enzyme kinetics. *Bull Math Biol* **50**, 579-593.
- Sela, M. und Zisman, E. (1997) Different roles of D-amino acids in immune phenomena. *FASEB* **11**, 449-456.
- Shimonkevitz, R., Colon, S., Kappler, J. W., Marrack, P. und Grey, H. M. (1984) Antigen recognition by H-2-restricted T cells. II. A tryptic ovalbumin peptide that substitutes for processed antigen. *J Immunol* **133**, 2067-2074.
- Siklodi, B., Vogt, A. B., Kropshofer, H., Falcioni, F., Molina, M., Bolin, D. R., Campbell, R., Hammerling, G. J. und Nagy, Z. A. (1998) Binding affinity independent contribution of peptide length to the stability of peptide-HLA-DR complexes in live antigen presenting cells. *Hum Immunol* **59**, 463-471.
- Sirard, J. C., Niedergang, F. und Kraehenbuhl, J. P. (1999) Live attenuated Salmonella: a paradigm of mucosal vaccines. *Immunol Rev* **171**, 25-26.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. und Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85.
- Steward, M. W. und Lew, A. M. (1985) The importance of antibody affinity in the performance of immunoassays for antibody. *J Immunol Methods* **78**, 173-190.
- Strobel, S. (2002) Oral tolerance, systemic immunoregulation, and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci* **958**, 47-58.
- Stryer, L. und Haugland, R. P. (1967) Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc Natl Acad Sci USA* **58**, 719-726.
- Tacket, C. O., Hone, D. M., Curtiss, R., 3rd, Kelly, S. M., Losonsky, G., Guers, L., Harris, A. M., Edelman, R. und Levine, M. M. (1992) Comparison of the safety and immunogenicity of delta aroC delta aroD and delta cya delta crp Salmonella typhi strains in adult volunteers. *Infect Immun* **60**, 536-541.

- Takagi, K., Teshima, R., Okunuki, H. und Sawada, J. (2003) Comparative study of in vitro digestibility of food proteins and effect of preheating on the digestion. *Biol Pharm Bull* **26**, 969-973.
- Terpend, K., Boisgerault, F., Blaton, M. A., Desjeux, J. F. und Heyman, M. (1998) Protein transport and processing by human HT29-19A intestinal cells: effect of interferon gamma. *Gut* **42**, 538-545.
- Vajdy, M., Srivastava, I., Polo, J., Donnelly, J., O'Hagan, D. und Singh, M. (2004) Mucosal adjuvants and delivery systems for protein-, DNA- and RNA-based vaccines. *Immunol Cell Biol* **82**, 617-627.
- Van Niel, G., Mallegol, J., Bevilacqua, C., Candalh, C., Brugiere, S., Tomaskovic-Crook, E., Heath, J. K., Cerf-Bensussan, N. und Heyman, M. (2003) Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice. *Gut* **52**, 1690-1697.
- Van Regenmortel, M. H. und Muller, S. (1998) D-peptides as immunogens and diagnostic reagents. *Curr Opin Biotechnol* **9**, 377-382.
- Wang, G. T., Chung, C. C., Holzman, T. F. und Krafft, G. A. (1993) A continuous fluorescence assay of renin activity. *Anal Biochem* **210**, 351-359.
- Weber, K. und Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* **244**, 4406-4412.
- Weiner, H. L. (2001) Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect* **3**, 947-954.
- Yaron, A., Carmel, A. und Katchalski-Katzir, E. (1979) Intramolecularly quenched fluorogenic substrates for hydrolytic enzymes. *Anal Biochem* **95**, 228-235.
- Yu, S. L., Wang, N., Liou, C. Y. und Syu, W. J. (1995) Assay of HIV-1 protease activity by use of crude preparations of enzyme and biotinylated substrate. *J Virol Methods* **53**, 63-73.

VII Anhang

VII.1 Herleitung der im Ergebnisteil verwendeten Gleichungen

VII.1.1 Peptidbindung an den Fängerantikörper (Gleichung III.1)

Die Bindung eines Hapten (2,4-D bzw. DNP)-markierten Peptids (Pe) an den Fängerantikörper (Ak) auf einer Mikrotiterplatte kann nach Rodbard und Hutt (1974) als Gleichgewichtsreaktion nach dem Massenwirkungsgesetz beschrieben werden:



Die Gleichgewichtskonstante der Assoziation K_a ist definiert als:

$$K_a = \frac{[AkPe]}{[Ak][Pe]} \quad (\text{VII.2})$$

[Ak] = Konzentration des Antikörpers

[Pe] = Konzentration des Hapten-markierten Peptids

[AkPe] = Konzentration des Antikörper-Peptid-Komplexes

Der Grad der Sättigung des Antikörpers (α) ist definiert als Anteil der belegten Bindestellen des Fängerantikörpers zu den insgesamt verfügbaren Bindestellen des Fängerantikörpers:

$$\alpha = \frac{[AkPe]}{[AkPe] + [Ak]} \quad (\text{VII.3})$$

Wird Gleichung (VII.2) nach $[AkPe] = K_a[Ak][Pe]$ umgeformt und in Gleichung (VII.3) eingesetzt, so erhält man:

$$\alpha = \frac{K_a[Ak][Pe]}{K_a[Ak][Pe] + [Ak]} \quad (\text{VII.4})$$

$$\Leftrightarrow \alpha = \frac{1}{1 + \frac{1}{K_a[Pe]}} \quad (\text{VII.5})$$

Wenn in einer Mikrotiterplattenkavität eine definierte Menge Peptid vorliegt, so stellt sich entsprechend dem Massenwirkungsgesetz ein Gleichgewicht ein zwischen gebundenem und ungebundenem Peptid. Meßbar ist aber nur die Menge an Antikörper-Peptid-Komplex [AkPe]. Drei Meßwerte sind von besonderer Bedeutung und können aus einer Verdünnungsreihe des haptenmarkierten Peptids bestimmt werden:

1. [AkPe] bei vollständiger Sättigung des Fängerantikörpers ([AkPe] = [Ak]_{gesamt}); das ist dann der Fall, wenn [Pe] >> K_a ist. In diesem Fall entsteht das maximal mögliche Signal (MaxOD), das durch die Menge an Fängerantikörper einstellbar ist.
2. [AkPe] bei vollständig unbelegtem Fängerantikörper ([AkPe] = 0); das ist dann der Fall, wenn [Pe] << K_a ist. In diesem Fall entsteht das Hintergrundsignal (Hg), das beispielsweise durch die Absorption der Mikrotiterplattenkavität entsteht.
3. [AkPe] in der jeweiligen Mikrotiterplattenkavität.

Der Sättigungsgrad α läßt sich durch diese drei Meßwerte ausdrücken:

$$\alpha = \frac{OD - Hg}{MaxOD - Hg} \quad (\text{VII.6})$$

OD = optische Dichte

Hg = Hintergrund

MaxOD = maximale optische Dichte

Wird Gleichung (VII.6) in Gleichung (VII.5) eingesetzt, so erhält man:

$$\frac{OD - Hg}{MaxOD - Hg} = \frac{1}{1 + \frac{1}{K_a[Pe]}} \quad (\text{VII.7})$$

$$\Leftrightarrow OD = \frac{MaxOD - Hg}{1 + \frac{1}{K_a[Pe]}} + Hg \quad (\text{VII.8})$$

Der Kehrwert der Assoziationskonstanten K_a ist gleich der Peptidkonzentration, bei der die Hälfte des Fängerantikörpers belegt ist: der Testmittelpunkt bzw. EC50-Wert. Außerdem ist der Kehrwert der Peptidkonzentration die Peptidverdünnung. Je nachdem ob man auf der Abszisse die Peptidkonzentration oder die Peptidverdünnung angibt, beginnt die Kurve zum Koordinatenursprung hin mit dem Hintergrund oder mit der MaxOD. In beiden Fällen erhält man sigmoide Kurven, die zueinander spiegelsymmetrisch sind. Die 4-Parameter-Gleichung ist für einen Kurvenverlauf angegeben, der mit der MaxOD beginnt. Entsprechend wird bei der Verwendung von Peptiden im Fänger-ELISA nicht die Peptidkonzentration, sondern die Peptidverdünnung angegeben. Die Parameter der 4-Parameter-Gleichung sind folgendermaßen definiert: a = MaxOD, c = Testmittelpunkt und d = Hintergrund, und man erhält:

$$y = \frac{a-d}{1 + \frac{x}{c}} + d \quad (\text{VII.9})$$

Gleichung (VII.9) ist nur dann gültig, wenn die Bindung an die Mikrotiterplattenkavität ausschließlich durch das Gleichgewicht von Peptid in Lösung und Peptid-Antikörper-Komplex bestimmt wird. Das ist aber nur eingeschränkt der Fall, wie auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Gleichung (VII.9) kann aber um einen Ausdruck erweitert werden, der als Hill-Faktor bekannt ist und der ursprünglich dazu verwendet wurde, kooperative Wechselwirkung von mehreren Bindestellen zu beschreiben.

$$y = \frac{a-d}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b} + d \quad (\text{VII.10})$$

Gleichung (VII.10) ist die 4-Parameter-Gleichung. Der Parameter b ist ein Ausdruck für die Steigung der Kurve im Testmittelpunkt. Wenn $b = 1$ ist, verhält sich die Bindung nicht kooperativ. In diesem Fall entspricht Gleichung (VII.10) Gleichung (VII.9). Der Parameter b ermöglicht es, die 4-Parameter-Gleichung als ein empirisches Anpassungsverfahren zur allgemeinen Beschreibung von Bindekurven zu verwenden.

VII.1.2 Enzymkinetik (Gleichung III.2 und III.4)

Ausgangspunkt für die Herleitung des Regressionsverfahrens zur enzymkinetischen Auswertung der Meßwerte ist die Michaelis-Menten-Gleichung:

$$v = \frac{k_{cat}[E]_{ges}[S]}{[S] + K_M} \quad (VII.11)$$

- v = Reaktionsgeschwindigkeit
 k_{cat} = katalytische Konstante bzw. Wechselzahl
 $[S]$ = Substratkonzentration
 $[E]_{ges}$ = Gesamtenzymkonzentration
 K_M = Michaelis-Menten Konstante

Voraussetzung für die Michaelis-Menten-Gleichung ist eine höhere Substrat als Enzymkonzentration: $[S] \gg [E]$ oder nach Segel (1988): $[S] + K_M \gg [E]$. Unter den Bedingungen, die beim Proteolysetest verwendet werden, daß nämlich $[S] \ll K_M$ ist, vereinfacht sich Gleichung (VII.11) zu:

$$v = \frac{k_{cat}[E]_{ges}[S]}{K_M} \quad (VII.12)$$

Die Reaktionsgeschwindigkeit v kann als Änderung der Substratkonzentration nach der Zeit betrachtet werden. Daher läßt sich Gleichung (VII.12) als Differentialgleichung schreiben:

$$\frac{\delta[S]_t}{\delta t} = \frac{-[S]_t[E]_{ges}k_{cat}}{K_M} \quad (VII.13)$$

- $[S]_t$ = Substratkonzentration nach der Zeit t
 t = Zeit

Durch Integration ergibt sich aus Gleichung (VII.13) die Exponentialfunktion:

$$[S]_t = [S]_0 \times e^{\left(-t[E]_{\text{ges}} \frac{k_{\text{cat}}}{K_M}\right)} \quad (\text{VII.14})$$

$[S]_0$ = Substratkonzentration ohne proteolytischen Abbau

Die Enzymkinetik folgt einer Reaktion erster Ordnung, wobei $([E]_{\text{ges}} \times k_{\text{cat}} / K_M)$ die Geschwindigkeitskonstante darstellt. $[E]_{\text{ges}}$ hat ebenfalls einen Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit, wird aber konstant gehalten und beeinflußt den exponentiellen Verlauf des Abbaus daher nicht. Dieser Fall wird als Reaktion pseudo-erster Ordnung bezeichnet.

Der Anteil α an Substrat $[S]_t$, der nach Beendigung der Spaltungszeit t nicht in Produkt umgewandelt wurde, ist:

$$\alpha = \frac{[S]_t}{[S]_0} \quad (\text{VII.15})$$

Sowohl gespaltene als auch ungespaltene Peptide tragen das Hapten und werden daher proportional vom Fängerantikörper gebunden, aber nur die ungespaltenen Peptide erzeugen über die Biotinmarkierung ein Signal. Daher ergibt sich der Grad des proteolytischen Abbaus α aus:

$$\alpha = \frac{[S]_t}{[S]_0} = \frac{OD_t - Hg}{OD_0 - Hg} \quad (\text{VII.16})$$

OD_t = Signal nach der Zeit t

Hg = Signal bei vollständigem Substratabbau (Hintergrund)

OD_0 = Signal ohne proteolytischen Abbau

Wird die OD statt $[S]$ in Gleichung (VII.14) eingesetzt, so ergibt sich:

$$OD_t = (OD_0 - Hg) \times e^{\left(-t[E]_{\text{ges}} \frac{k_{\text{cat}}}{K_M}\right)} + Hg \quad (\text{VII.17})$$

Da das Signal eine Funktion von t ist, können durch Bestimmung der OD nach verschiedenen Reaktionszeiten die 3 Parameter OD_0 , Hg und die Geschwindigkeitskonstante ($[E]_{ges} \times k_{cat} / K_M$) durch Regression an Gleichung (VII.17) bestimmt werden. $[E]_{ges}$ ist bekannt und wird bei allen Messungen konstant gehalten. Die katalytische Effizienz (k_{cat} / K_M) ist bestimmbar.

Alternativ ist es möglich, nicht die Zeit sondern die Enzymmenge zu variieren. In diesem Fall wird $(t \times k_{cat} / K_M)$ als Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung angesehen und $[E]$ als Variable:

$$OD_{[E]} = (OD_0 - Hg) \times e^{\left(-t[E]_{ges} \frac{k_{cat}}{K_M}\right)} + Hg \quad (VII.18)$$

$OD_{[E]}$ = Signal bei einer bestimmten Enzymkonzentration

OD_E , OD_0 und Hg , werden gemessen, und $(t \times k_{cat} / K_M)$ wird durch die Kurve bestimmt.

Katalytische Effizienz (k_{cat} / K_M) und Halbwertszeit ($t_{1/2}$) stehen in folgendem Zusammenhang und lassen sich ineinander umrechnen:

$$\frac{1}{2}[S]_0 = [S]_0 \times e^{\left(-t_{1/2}[E]_{ges} \frac{k_{cat}}{K_M}\right)} \quad (VII.19)$$

$$\Leftrightarrow \ln\left(\frac{1}{2}\right) = -t_{1/2}[E]_{ges} \frac{k_{cat}}{K_M} \quad (VII.20)$$

$$\Leftrightarrow t_{1/2} = \frac{\ln(2)K_M}{[E]_{ges}k_{cat}} \quad (VII.21)$$

Setzt man Gleichung (VII.21) in Gleichung (VII.17) ein, so erhält man:

$$OD_t = (OD_0 - Hg) \times e^{\left(\frac{-t \ln(2)}{t_{1/2}}\right)} + Hg \quad (VII.22)$$

$$\Leftrightarrow OD_t = (OD_0 - Hg) \times 0,5^{\left(\frac{t}{t_{1/2}}\right)} + Hg \quad (VII.23)$$

In Gleichung (VII.23) kommt weder die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) noch die genaue Enzymkonzentration $[E]$ vor. Für die Untersuchung von Enzymrohpräparationen wie der Darmlavage ist die Berechnung der Halbwertszeit $t_{1/2}$ vorteilhaft, denn der Beitrag einzelner Enzyme zum Substratabbau kann nicht genau aufgelöst werden. Die mit Gleichung (VII.23) bestimmte Halbwertszeit bezieht sich auf die verwendete Enzympräparation. Da die Substratumsätze, die bei Variation der Enzymmenge oder der Inkubationszeit (t) gemessen werden, proportional zueinander sind, solange die Bedingungen einer Reaktion erster Ordnung eingehalten werden, ist es möglich die Enzympräparation zu verdünnen, statt die Inkubationszeit zu variieren, und daraus folgt:

$$OD_x = (OD_0 - Hg) \times 0,5^{\left(\frac{tx}{t_{1/2}}\right)} + Hg \quad (\text{VII.24})$$

x = Verdünnung der Enzympräparation

VII.1.3 Inhibitionsmessungen (Gleichung III.3)

Ist die zur Erzielung einer Inhibition eingesetzte Inhibitorkonzentration viel größer als die Enzymkonzentration, spricht man von einem „klassischen“ Inhibitionsmechanismus. In diesem Fall darf bei der Auswertung nach der Michaelis-Menten-Kinetik die im Enzym-Inhibitor-Komplex gebundene Inhibitormenge vernachlässigt und $[I]_{\text{frei}} = [I]_{\text{ges}}$ gesetzt werden. Bei einem kompetitiven Inhibitor ergibt sich die Geschwindigkeitsgleichung:

$$v_i = \frac{k_{cat}[E]_{\text{ges}}[S]}{[S] + K_M \left(1 + \frac{[I]_{\text{ges}}}{K_{i,app}}\right)} \quad (\text{VII.25})$$

v_i = Reaktionsgeschwindigkeit in Gegenwart des Inhibitors

$[I]_{\text{ges}}$ = Gesamtinhibitorkonzentration

$K_{i,app}$ = scheinbare Inhibitionskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes bei einer gegebenen Substratkonzentration

$K_{i,app}$ wird durch Gleichung (VII.26) definiert:

$$K_{i,app} = K_i \left(1 + \frac{[S]}{K_M}\right) \quad (\text{VII.26})$$

K_i = Inhibitionskonstante

Unter den Reaktionsbedingungen pseudo-erster Ordnung ($[S] \ll K_M$) ergibt sich aus den Gleichungen (VII.25) und (VII.26) für die Reaktionsgeschwindigkeit der inhibierten Reaktion:

$$v_i = \frac{k_{cat}[E]_{ges}[S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]_{ges}}{K_i} \right)} \quad (\text{VII.27})$$

Gleichung (VII.27) unterscheidet sich von Gleichung (VII.12) dadurch, daß in Gegenwart eines Inhibitors die Michaelis-Menten-Konstante K_M durch den erweiterten Term $K_M (1 + [I]_{ges} / K_i)$ ersetzt wird. Wird bei der inhibierten Reaktion $K_M (1 + [I]_{ges} / K_i)$ für K_M in Gleichung (VII.21) eingesetzt, gilt analog für die Halbwertszeit:

$$t_{1/2,i} = \frac{\ln 2 K_M \left(1 + \frac{[I]_{ges}}{K_i} \right)}{[E]_{ges} k_{cat}} \quad (\text{VII.28})$$

$t_{1/2,i}$ = Halbwertszeit der inhibierten Reaktion

Reaktionsgeschwindigkeit und Halbwertszeit sind umgekehrt proportional zueinander. Zur Bestimmung der Inhibitionskonstanten werden die Reaktionsgeschwindigkeiten oder Halbwertszeiten der inhibierten und der nicht inhibierten Reaktion ins Verhältnis gesetzt, und man erhält:

$$\frac{v_0}{v_i} = \frac{t_{1/2,i}}{t_{1/2,0}} = 1 + \frac{[I]_{ges}}{K_i} \quad (\text{VII.29})$$

v_0 = Reaktionsgeschwindigkeit der nicht inhibierten Reaktion

$t_{1/2,0}$ = Halbwertszeit der nicht inhibierten Reaktion

VII.2 Aminosäuresequenzen

VII.2.1 Modellantigen Ovalbumin

Swiss-Prot-Datenbank (URL: <http://www.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?P01012>)

```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
GSIGAASMEF CFDVFKELKV HHANENIFYC PIAIMSALAM VYLGAKDSTR TQINKVVRFD

      70      80      90     100     110     120
      |      |      |      |      |      |
KLPGFGDSIE AQCGTSVNVH SSLRDILNQI TKPNDVYSFS LASRLYAEER YPILPEYLQC

      130     140     150     160     170     180
      |      |      |      |      |      |
VKELYRGGLE PINFQTAADQ ARELINSWVE SQTNGIIRNV LQPSSVDSQT AMVLVNAIVF

      190     200     210     220     230     240
      |      |      |      |      |      |
KGLWEKAFKD EDTQAMPFRV TEQESKPVQM MYQIGLFRVA SMASEKMKIL ELPFASGTMS

      250     260     270     280     290     300
      |      |      |      |      |      |
MLVLLPDEVS GLEQLESIIIN FEKLTEWTSS NVMEERKIKV YLPRMKMEEK YNLTSVLMAM

      310     320     330     340     350     360
      |      |      |      |      |      |
GITDVFSSSA NLSGISSAES LKISQAVHAA HAEINEAGRE VVGSAEAGVD AASVSEEFRA

      370     380     385
      |      |      |
DHPFLFCIKH IATNAVLFFG RCVSP

```

VII.2.2 Modellallergen Ara h6

Swiss-Prot-Datenbank (URL: <http://www.expasy.org/uniprot/Q9SQG5>)

```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
AHASAMRRER GRQGDSSSCE RQVDGVNLKP CEQHIMQRIM GEQEYQDSYN FGSTRSSDQQ

      70      80      90     100     110     120
      |      |      |      |      |      |
QRCCDELNEM ENTQRCMCEA LQQIMENQCD GLQDRQMVQH FKRELMNLPQ QCNFGAPQRC

      129
      |
DLDVSGGRC

```

VII.3 Überlappende Ovalbuminpeptide im 2er-Vorschub und ihre Halbwertszeiten in einer murinen Darmlavage

Sequenz (10mer) $t_{1/2}$ [sec]			Sequenz (16mer) $t_{1/2}$ [sec]		
1	GSIGAASMEF	2,7013	1	GSIGAASMEFCFDVFK	0,0097
2	IGAASMEFCF	0,0629	2	IGAASMEFCFDVFKEL	0,0084
3	AASMEFCFDV	0,0556	3	AASMEFCFDVFKELKV	0,0068
4	SMEFCFDVFK	0,0103	4	SMEFCFDVFKELKVHH	0,0084
5	EFCFDVFKEL	0,0088	5	EFCFDVFKELKVHHAN	0,0098
6	CFDVFKELKV	0,0122	6	CFDVFKELKVHHANEN	0,0103
7	DVFKELKVHH	0,0101	7	DVFKELKVHHANENIF	0,0201
8	FKELKVHHAN	0,0094	8	FKELKVHHANENIFYC	0,0074
9	ELKVHHANEN	0,1969	9	ELKVHHANENIFYCPI	0,0851
10	KVHHANENIF	1,2897	10	KVHHANENIFYCPIAI	0,0892
11	HHANENIFYC	0,0485	11	HHANENIFYCPIAIMS	0,0575
12	ANENIFYCPI	0,1557	12	ANENIFYCPIAIMSAL	0,0425
13	ENIFYCPIAI	0,0890	13	ENIFYCPIAIMSALAM	0,0327
14	IFYCPIAIMS	0,0469	14	IFYCPIAIMSALAMVY	0,0167
15	YCPIAIMSAL	0,2911	15	YCPIAIMSALAMVYLG	0,0125
16	PIAIMSALAM	0,1596	16	PIAIMSALAMVYLGAK	0,0077
17	AIMSALAMVY	0,0512	17	AIMSALAMVYLGAKDS	0,0088
18	MSALAMVYLG	0,0132	18	MSALAMVYLGAKDSTR	0,0063
19	ALAMVYLGAK	0,0077	19	ALAMVYLGAKDSTRTQ	0,0045
20	AMVYLGAKDS	0,0111	20	AMVYLGAKDSTRTQIN	0,0037
21	VYLGAKDSTR	0,0135	21	VYLGAKDSTRTQINKV	0,0040
22	LGAKDSTRTQ	0,0122	22	LGAKDSTRTQINKVVR	0,0033
23	AKDSTRTQIN	0,0092	23	AKDSTRTQINKVVRFD	0,0038
24	DSTRTQINKV	0,0210	24	DSTRTQINKVVRFDKL	0,0044
25	TRTQINKVVR	0,0027	25	TRTQINKVVRFDKLPG	0,0045
26	TQINKVVRFD	0,0094	26	TQINKVVRFDKLPGFG	0,0085
27	INKVVRFDKL	0,0069	27	INKVVRFDKLPGFGDS	0,0111
28	KVVRFDKLPG	0,0119	28	KVVRFDKLPGFGDSIE	0,0131
29	VRFDKLPGFG	0,1526	29	VRFDKLPGFGDSIEAQ	0,1209
30	FDKLPGFGDS	25,2445	30	FDKLPGFGDSIEAQCG	5,6930
31	KLPGFGDSIE	40,1296	31	KLPGFGDSIEAQCGTS	6,4211
32	PGFGDSIEAQ	17,8114	32	PGFGDSIEAQCGTSVN	5,0348
33	FGDSIEAQCG	7,1220	33	FGDSIEAQCGTSVNVH	1,3951
34	DSIEAQCGTS	13,4815	34	DSIEAQCGTSVNVHSS	0,4688
35	IEAQCGTSVN	6,4814	35	IEAQCGTSVNVHSSLR	0,1930
36	AQCGTSVNVH	4,3435	36	AQCGTSVNVHSSLRDI	0,0267
37	CGTSVNVHSS	1,1378	37	CGTSVNVHSSLRDILN	0,0499
38	TSVNVHSSLR	0,1177	38	TSVNVHSSLRDILNQI	0,1029
39	VNVHSSLRDI	0,0148	39	VNVHSSLRDILNQITK	0,0614
40	VHSSLRDILN	0,0527	40	VHSSLRDILNQITKPN	0,1104
41	SSLRDILNQI	0,1504	41	SSLRDILNQITKPNV	0,1963
42	LRDILNQITK	0,0939	42	LRDILNQITKPNVYS	0,0514
43	DILNQITKPN	4,1593	43	DILNQITKPNVYSFS	0,0223
44	LNQITKPNV	20,6999	44	LNQITKPNVYSFSLA	0,0054
45	QITKPNVYS	0,2963	45	QITKPNVYSFSLASR	0,0025
46	TKPNVYSFS	0,0120	46	TKPNVYSFSLASRLY	0,0011
47	PNDVYSFSLA	0,0026	47	PNDVYSFSLASRLYAE	0,0014
48	DVYSFSLASR	0,0037	48	DVYSFSLASRLYAEER	0,0011

	Sequenz (10mer)	t _{1/2} [sec]
49	YSFSLASRLY	0,0019
50	FSLASRLYAE	0,0035
51	LASRLYAEER	0,0031
52	SRLYAEERYP	0,0052
53	LYAEERYPIL	0,1052
54	AEERYPILPE	11,4998
55	ERYPILPEYL	1,4660
56	YPILPEYLC	0,1016
57	ILPEYLCVK	0,3817
58	PEYLCVKEL	0,1101
59	YLCVKELYR	0,0263
60	QCVKELYRG	0,0128
61	VKELYRGGLE	0,0225
62	ELYRGGLEPI	0,0244
63	YRGGLEPINF	0,0238
64	GGLEPINFQT	0,0336
65	LEPINFQTAA	0,0242
66	PINFQTAAQ	0,0812
67	NFQTAAQAR	0,1293
68	QTAADQAREL	0,0514
69	AADQARELIN	0,0325
70	DQARELINSW	0,0224
71	ARELINSWVE	0,0156
72	ELINSWVESQ	1,2344
73	INSWVESQTN	3,3348
74	SWVESQTNGI	0,7564
75	VESQTNGIIR	0,3309
76	SQTNGIIRNV	0,0066
77	TNGIIRNVLQ	0,0072
78	GIIRNVLQPS	0,0038
79	IRNVLQPSSV	0,0049
80	NVLQPSSVDS	0,3384
81	LQPSSVDSQT	0,1866
82	PSSVDSQTAM	4,5647
83	SVDSQTAMVL	0,2013
84	DSQTAMVLVN	0,0195
85	QTAMVLVNAI	0,0264
86	AMVLVNAIVF	0,0165
87	VLVNAIVFKG	0,0087
88	VNAIVFKGLW	0,0051
89	AIVFKGLWEK	0,0054
90	VFKGLWEKAF	0,0039
91	KGLWEKAFKD	0,0053
92	LWEKAFKDED	0,0131
93	EKAFKDEDTQ	0,0329
94	AFKDEDTQAM	7,6573
95	KDEDTQAMPF	0,6468
96	EDTQAMPFRV	0,0033
97	TQAMPFRVTE	0,0047
98	AMPFRVTEQE	0,0063
99	PFRVTEQESK	0,1310
100	RVTEQESKPV	2,1948

	Sequenz (16mer)	t _{1/2} [sec]
49	YSFSLASRLYAEERYP	0,0032
50	FSLASRLYAEERYPIL	0,0031
51	LASRLYAEERYPILPE	0,0023
52	SRLYAEERYPILPEYL	0,0028
53	LYAEERYPILPEYLC	0,0281
54	AEERYPILPEYLCVK	0,2682
55	ERYPILPEYLCVKEL	0,1018
56	YPILPEYLCVKELYR	0,0298
57	ILPEYLCVKELYRGG	0,0143
58	PEYLCVKELYRGGLE	0,0152
59	YLCVKELYRGGLEPI	0,0093
60	QCVKELYRGGLEPINF	0,0085
61	VKELYRGGLEPINFQT	0,0052
62	ELYRGGLEPINFQTAA	0,0085
63	YRGGLEPINFQTAAQ	0,0110
64	GGLEPINFQTAAQAR	0,0207
65	LEPINFQTAAQAREL	0,0155
66	PINFQTAAQARELIN	0,0183
67	NFQTAAQARELINSW	0,0247
68	QTAADQARELINSWVE	0,0297
69	AADQARELINSWVESQ	0,0322
70	DQARELINSWVESQTN	0,0223
71	ARELINSWVESQTNGI	0,0078
72	ELINSWVESQTNGIIR	0,1455
73	INSWVESQTNGIIRNV	0,0095
74	SWVESQTNGIIRNVLQ	0,0099
75	VESQTNGIIRNVLQPS	0,0085
76	SQTNGIIRNVLQPSSV	0,0032
77	TNGIIRNVLQPSSVDS	0,0033
78	GIIRNVLQPSSVDSQT	0,0050
79	IRNVLQPSSVDSQTAM	0,0069
80	NVLQPSSVDSQTAMVL	0,1618
81	LQPSSVDSQTAMVLVN	0,0332
82	PSSVDSQTAMVLVNAI	0,0371
83	SVDSQTAMVLVNAIVF	0,0236
84	DSQTAMVLVNAIVFKG	0,0080
85	QTAMVLVNAIVFKGLW	0,0051
86	AMVLVNAIVFKGLWEK	0,0061
87	VLVNAIVFKGLWEKAF	0,0030
88	VNAIVFKGLWEKAFKD	0,0028
89	AIVFKGLWEKAFKDED	0,0037
90	VFKGLWEKAFKDEDTQ	0,0057
91	KGLWEKAFKDEDTQAM	0,0084
92	LWEKAFKDEDTQAMPF	0,0101
93	EKAFKDEDTQAMPFRV	0,0037
94	AFKDEDTQAMPFRVTE	0,0047
95	KDEDTQAMPFRVTEQE	0,0049
96	EDTQAMPFRVTEQESK	0,0041
97	TQAMPFRVTEQESKPV	0,0076
98	AMPFRVTEQESKPVQM	0,0050
99	PFRVTEQESKPVQMMY	0,1097
100	RVTEQESKPVQMMYQI	0,1086

	Sequenz (10mer)	t _{1/2} [sec]
101	TEQESKPVQM	19,4782
102	QESKPVQMMY	3,8079
103	SKPVQMMYQI	0,1240
104	PVQMMYQIGL	0,0880
105	QMMYQIGLFR	0,0060
106	MYQIGLFRVA	0,0025
107	QIGLFRVASM	0,0015
108	GLFRVASMAS	0,0060
109	FRVASMASEK	0,0082
110	VASMASEKMK	0,1745
111	SMASEKMKIL	0,0072
112	ASEKMKILEL	0,0103
113	EKMKILELPF	0,0135
114	MKILELPFAS	0,0183
115	ILELPFASGT	0,0767
116	ELPFASGTMS	0,0648
117	PFASGTMSML	3,8440
118	ASGTMSMLVL	0,1692
119	GTMSMLVLLP	0,0949
120	MSMLVLLPDE	0,0317
121	MLVLLPDEV	0,3230
122	VLLPDEVSGL	8,3587
123	LPDEVSGLEQ	0,3722
124	DEVSGLEQLE	0,1719
125	VSGLEQLESI	1,0014
126	GLEQLESIIN	0,5162
127	EQLESIINFE	0,0686
128	LESIINFEKL	0,0663
129	SIINFEKLTE	0,0667
130	INFEKLTEWT	0,0541
131	FEKLTEWTSS	0,0563
132	KLTEWTSSNV	0,4176
133	TEWTSSNVME	0,5842
134	WTSSNVMEER	0,9286
135	SSNVMEERKI	0,0399
136	NVMEERKIKV	0,0072
137	MEERKIKVYL	0,0037
138	ERKIKVYLPR	0,0008
139	KIKVYLPRMK	0,0017
140	KVYLPRMKME	0,0044
141	YLPRMKMEEK	0,0088
142	PRMKMEEKYN	0,0056
143	MKMEEKYNLT	0,0367
144	MEEKYNLTSV	0,0093
145	EKYNLTSVLM	0,0124
146	YNLTSVLMAM	0,0294
147	LTSVLMAMGI	0,0787
148	SVLMAMGITD	0,1194
149	LMAMGITDVF	0,8333
150	AMGITDVFSS	0,0154
151	GITDVFSSSA	0,0178
152	TDVFSSSANL	0,0190

	Sequenz (16mer)	t _{1/2} [sec]
101	TEQESKPVQMMYQIGL	0,0696
102	QESKPVQMMYQIGLFR	0,0055
103	SKPVQMMYQIGLFRVA	0,0020
104	PVQMMYQIGLFRVASM	0,0022
105	QMMYQIGLFRVASMAS	0,0021
106	MYQIGLFRVASMASEK	0,0025
107	QIGLFRVASMASEKMK	0,0021
108	GLFRVASMASEKMKIL	0,0047
109	FRVASMASEKMKILEL	0,0026
110	VASMASEKMKILELPF	0,0075
111	SMASEKMKILELPFAS	0,0073
112	ASEKMKILELPFASGT	0,0034
113	EKMKILELPFASGTMS	0,0134
114	MKILELPFASGTMSML	0,0220
115	ILELPFASGTMSMLVL	0,0507
116	ELPFASGTMSMLVLLP	0,0410
117	PFASGTMSMLVLLPDE	0,0444
118	ASGTMSMLVLLPDEV	0,0325
119	GTMSMLVLLPDEVSGL	0,0306
120	MSMLVLLPDEVSGLEQ	0,0139
121	MLVLLPDEVSGLEQLE	0,1049
122	VLLPDEVSGLEQLESI	0,2344
123	LPDEVSGLEQLESIIN	0,1597
124	DEVSGLEQLESIINFE	0,0265
125	VSGLEQLESIINFEKL	0,0393
126	GLEQLESIINFEKLTE	0,0228
127	EQLESIINFEKLTEWT	0,0345
128	LESIINFEKLTEWTSS	0,0424
129	SIINFEKLTEWTSSNV	0,0653
130	INFEKLTEWTSSNVME	0,0497
131	FEKLTEWTSSNVMEER	0,0286
132	KLTEWTSSNVMEERKI	0,0414
133	TEWTSSNVMEERKIKV	0,0139
134	WTSSNVMEERKIKVYL	0,0060
135	SSNVMEERKIKVYLPR	0,0021
136	NVMEERKIKVYLPRMK	0,0021
137	MEERKIKVYLPRMKME	0,0014
138	ERKIKVYLPRMKMEEK	0,0012
139	KIKVYLPRMKMEEKYN	0,0016
140	KVYLPRMKMEEKYNLT	0,0030
141	YLPRMKMEEKYNLTSV	0,0054
142	PRMKMEEKYNLTSVLM	0,0051
143	MKMEEKYNLTSVLMAM	0,0321
144	MEEKYNLTSVLMAMGI	0,0225
145	EKYNLTSVLMAMGITD	0,0211
146	YNLTSVLMAMGITDVF	0,0298
147	LTSVLMAMGITDVFSS	0,0170
148	SVLMAMGITDVFSSSA	0,0276
149	LMAMGITDVFSSSANL	0,0241
150	AMGITDVFSSSANLSG	0,0262
151	GITDVFSSSANLSGIS	0,0240
152	TDVFSSSANLSGISSA	0,0361

	Sequenz (10mer)	$t_{1/2}$ [sec]
153	VFSSSANLSG	0,1849
154	SSSANLSGIS	0,7012
155	SANLSGISSA	0,6149
156	NLSGISSAES	1,5216
157	SGISSAESLK	0,5455
158	ISSAESLKIS	0,0401
159	SAESLKISQA	0,0451
160	ESLKISQAVH	0,0465
161	LKISQAVHAA	0,0192
162	ISQAVHAAHA	0,1691
163	QAVHAAHAEI	0,1777
164	VHAAHAEINE	0,1356
165	AAHAEINEAG	0,7772
166	HAEINEAGRE	0,1388
167	EINEAGREVV	0,1025
168	NEAGREVVGS	0,1284
169	AGREVVGSAE	0,0967
170	REVVGSAEAG	1,7169
171	VVGSAEAGVD	4,0618
172	GSAEAGVDAA	3,1271
173	AEAGVDAASV	0,0711
174	AGVDAASVSE	0,0548
175	VDAASVSEEF	0,0426
176	AASVSEEFRA	0,0246
177	SVSEEFRADH	0,0788
178	SEEFRADHPF	0,0759
179	EFRADHPFLF	0,0569
180	RADHPFLFCI	0,0056
181	DHPFLFCIKH	0,0042
182	PFLFCIKHIA	0,0046
183	LFCIKHIATN	0,0185
184	CIKHIATNAV	0,0929
185	KHIATNAVLF	0,0719
186	IATNAVLFVG	0,0048
187	TNAVLFVGRC	0,0015
188	AVLFFGRCVS	0,0012
189	VLFFGRCVSP	0,0014

	Sequenz (16mer)	$t_{1/2}$ [sec]
153	VFSSSANLSGISSAES	0,2471
154	SSSANLSGISSAESLK	0,3682
155	SANLSGISSAESLKIS	0,0601
156	NLSGISSAESLKISQA	0,0601
157	SGISSAESLKISQAVH	0,0526
158	ISSAESLKISQAVHAA	0,0502
159	SAESLKISQAVHAAHA	0,0475
160	ESLKISQAVHAAHAEI	0,0463
161	LKISQAVHAAHAEINE	0,0154
162	ISQAVHAAHAEINEAG	0,1789
163	QAVHAAHAEINEAGRE	0,0901
164	VHAAHAEINEAGREVV	0,0783
165	AAHAEINEAGREVVG	0,1269
166	HAEINEAGREVVGSAE	0,1531
167	EINEAGREVVGSAEAG	0,1950
168	NEAGREVVGSAEAGVD	0,1676
169	AGREVVGSAEAGVDAA	0,1212
170	REVVVGSAEAGVDAASV	0,0694
171	VVGSAEAGVDAASVSE	0,0475
172	GSAEAGVDAASVSEEF	0,0261
173	AEAGVDAASVSEEFRA	0,0214
174	AGVDAASVSEEFRADH	0,0322
175	VDAASVSEEFRADHPF	0,0389
176	AASVSEEFRADHPFLF	0,0233
177	SVSEEFRADHPFLFCI	0,0029
178	SEEFRADHPFLFCIKH	0,0038
179	EFRADHPFLFCIKHIA	0,0031
180	RADHPFLFCIKHIATN	0,0038
181	DHPFLFCIKHIATNAV	0,0046
182	PFLFCIKHIATNAVLF	0,0055
183	LFCIKHIATNAVLFVG	0,0038
184	CIKHIATNAVLFVGRC	0,0025
185	KHIATNAVLFVGRCVS	0,0008
186	HIATNAVLFVGRCVSP	0,0009

VIII Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die direkt und indirekt zum Gelingen der vorliegenden Dissertation beigetragen haben:

... bei meinem Doktorvater PD Dr. Andreas Frey für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung der Arbeit und die gemeinsame Zeit, mit vielen spannenden Diskussionen über die Arbeit und darüber hinaus.

... bei Herrn Prof. Dr. Peter K. Müller für die Berichterstattung über diese Dissertation.

... bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Ernst Th. Rietschel für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

... bei meiner Labor- und Bürogruppe: Fabian, Hanne, Heidi, Imke, Katrin, Naho, Niels, Thurid, Steffen und Verena für eine gute Stimmung, gegenseitige Hilfsbereitschaft und natürlich für die eine oder andere Tasse gemeinsamen Tees, wenn auch noch nicht jeder auf den Geschmack gekommen ist.

Ohne die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente von Hanne, Heidi, Imke, Ricardo, Iris, Denise, Vitali und Marie-Luise wäre eine Arbeit in diesem Umfang wohl noch lange nicht fertig geworden. Vielen Dank, daß Ihr die Arbeitspakete so gut verdaut habt! Barbara, Katrin, Niels, Steffen und Thurid danke ich außerdem für das Durchlesen der und Anregungen zur Arbeit.

... bei Prof. Dr. M. Alexander Schmidt und dem gesamten IFI-Arbeitskreis für die Unterstützung während der Zeit in Münster. Besonders die gemeinsame Zeit mit Christian und Eike bleibt unvergessen.

... bei Eike außerdem für die Hilfe, den Proteolysetest auf ein solides mathematisches Fundament zu stellen.

... bei Steffen für das 2,4-D-Konjugat und die gemeinsamen Experimente.

... bei Niels für die gemeinsamen Schwimlabende.

... bei Herrn Dr. Milan Fránek für die Anti-2,4-D-Antikörper.

... bei Brigitte Kunz für die Anfertigung und Buko Lindner für die Hilfe bei der Interpretation der ESI-Massenspektren.

... bei Jiun, daß Du Geduld und Verständnis für die lange Zeit in Borstel aufgebracht hast.

... bei meinen Eltern, daß Ihr mich lange Jahre hindurch unterstützt und motiviert habt.

IX Lebenslauf

Name: Hans-Heiner Gorris
Geburtsdatum / -ort: 26. August 1974 in Goch
Eltern: Gisberta Gorris, geb. Deckers
Johannes Albert Gorris
Familienstand: ledig

Schulbildung

1981 – 1985 St. Stephanus Grundschule in Hasselt
1985 – 1994 Collegium Augustinianum Gaesdonck,
Bischöfliches Gymnasium in Goch
Mai 1994 Abitur

Studium

1994 – 2001 Diplom-Studium der Biologie
an der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster
September 1996 Diplom-Vorprüfung
September 1997 – Juli 1998 Auslandsstudium an der University of York in England
Januar 2000 – Januar 2001 Diplomarbeit unter Betreuung von PD Dr. A. Frey und Prof.
Dr. M. A. Schmidt am Institut für Infektiologie des Zentrums
für Molekularbiologie der Entzündung in Münster
Januar 2001 Diplom-Hauptprüfung
ab April 2001 Promotion unter Betreuung von PD Dr. A. Frey
April 2001 – Juni 2002 am Institut für Infektiologie des Zentrums für
Molekularbiologie der Entzündung in Münster
ab Juni 2002 in der Abteilung Klinische Medizin des Leibniz-Zentrums für
Medizin und Biowissenschaften in Borstel

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorgelegte Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt und daß ich noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Borstel, den 28. September 2005