

Abteilung Allgemeine Physiologie der Medizinischen Fakultät der
Universität Ulm
Leiter: Prof. Dr. Paul Dietl

**Etablierung eines kompetitiven enzymgekoppelten
Immunoassays zum Nachweis eines kleinen Peptids
in Serum- und Liquorproben**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

von
Chrissoula Kiote-Schmidt
aus Laupheim
2007

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter : Prof. Dr. Reinhardt Rüdell

2. Berichterstatter : Prof. Dr. Heinrich Brinkmeier

Tag der Promotion: 08. Februar 2007

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN	5
1 EINLEITUNG	6
1.1 NACHWEIS VON NEUROINFLAMMATORISCHEN ERKRANKUNGEN MITTELS ELISA-TESTS	6
1.2 PRINZIP DES ENZYMGEKOPPELTEN IMMUNABSORPTIONSASSAYS	8
1.2.1 <i>Anwendung des enzymgekoppelten Immunabsorptionsassays</i>	13
1.2.2 <i>Messung und Auswertung von ELISAs</i>	15
2 MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 MATERIAL	19
2.1.1 <i>Patienten</i>	19
2.1.2 <i>Puffer und Lösungen</i>	19
2.1.3 <i>Enzyme und Antikörper</i>	20
2.1.4 <i>Spezielle Verbrauchsmaterialien und Apparaturen</i>	20
2.1.5 <i>Software</i>	21
2.2 METHODEN	22
2.2.1 <i>Synthese und Aufbereitung des Peptids</i>	22
2.2.2 <i>Herstellung eines peptidspezifischen Antikörpers</i>	23
2.2.3 <i>Kompetitiver Enzymgekoppelter Immunabsorptionsassay (ELISA)</i>	24
2.2.3.1 Auswahl der Mikrotiterplatten	24
2.2.3.2 Beschichtung der Messplatte	24
2.2.3.3 Auswahl der Waschlösung und der Blockierlösung	25
2.2.3.4 Waschvorgang der Mikrotiterplatten	26
2.2.3.5 Auswahl des Verdünnungspuffers	26
2.2.3.6 Probenverdünnung	27
2.2.3.7 Aufbereitung des Patientenmaterials	27
2.2.3.8 Verdrängungsreaktion	28
2.2.3.9 Messung	28
2.2.3.10 Auswertung	28
3 ERGEBNISSE	29
3.1 OPTIMIERUNG DER PLATTENBESCHICHTUNG	29
3.1.1 <i>Auswahl der geeigneten Mikrotiterplatten</i>	29
3.1.1.1 Auswahl der Beschichtungsmethode	30
3.1.2 <i>Auswahl der Beschichtungskonzentration</i>	31
3.2 AUSWAHL DES WASCHPuffers, DER BLOCKIERLÖSUNG UND DES VERDÜNNUNGSPuffers	33
3.3 VERDÜNNUNG DES STANDARDS UND DER PROBEN	34
3.4 VERDÜNNUNG DES 1. ANTIKÖRPERS UND DES KONJUGATES	35
3.5 QUALITÄTSSICHERUNG DES ELISA	36
3.6 WEITERE OPTIMIERUNGSVERSUCHE	37
3.7 ELISA-ABLAUF	39

4	DISKUSSION	42
5	ZUSAMMENFASSUNG	45
6	LITERATUR	46
7	ANHANG	49
8	DANKSAGUNG	50

Abkürzungen

ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
DCM	Dichlormethan
DMF	Dimethylformamid
EMIT	Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique
ESI-MS	Electrospray-Ionization Mass Spectrometry
Fc	Konstante Kette eines Antikörpers
Fmoc/tBu	Fluorenyl methyl oxycarbonyl/ tertiäres Butyl
HOBt	Hydroxy-n-hydroxy-benzotriazol
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IC	Konzentration bei 50 % Inhibition
KLH	Keyhole limpet Hemocyanin
LOD	Limit Of Detection
MWCO	Molecular Weight Cut Off
N	Normal
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
QYNAD	Glutamin-Tyrosin-Asparagin-Alanin-Aspartat
RIA	Radioimmunoassay
TBS	Tris Buffered Saline
TCP	Trichlorpentan
TMB	Tetramethylbenzidin
VK	Variationskoeffizient

1 Einleitung

1.1 Nachweis von neuroinflammatorischen Erkrankungen mittels ELISA-Tests

Viele verschiedene entzündliche Nervenerkrankungen können einen schwerwiegenden und oft chronischen Verlauf entwickeln. Eine frühzeitige Erkennung solcher Erkrankungen ist unerlässlich, um eine adäquate und kostengünstige Therapie anzuwenden. Der heutige Stand der Wissenschaft (Bradl und Hohlfeld, 2003) ermöglicht die Entwicklung neuer und geeigneter Testverfahren zur Diagnosestellung und zur Beobachtung des Krankheitsverlaufes. Durch wiederholte Tests kann sowohl die Wirkung von Medikamenten als auch eine Besserung oder Verschlechterung des Zustandes eines Patienten erfasst werden. In der heutigen Medizin wird sehr darauf geachtet, dass ein Testverfahren sicher und einfach durchzuführen ist, so dass es letztendlich auch als Routinemethode eingesetzt werden kann, ohne den Kostenrahmen zu sprengen.

Bei den entzündlichen Nervenerkrankungen wie z.B. Multipler Sklerose (Petereit und Heiss, 2002; Reske et al., 2005) oder der idiopathischen Polyradikulopathie (Guillain-Barré-Syndrom) (Wurz et al., 1995; Willison, 2005) wurde die Idee geäußert, dass sich in Körperflüssigkeiten Marker ansammeln, die Rückschlüsse auf eine akute Veränderung des Entzündungsprozesses zulassen. Einer der genannten Marker ist das kleine Peptid QYNAD, welches sowohl im Liquor als auch im Blutserum nachweisbar ist (Brinkmeier et al., 2000; Weber et al., 2002; Meuth et al., 2003). Trotz der Zweifel, die in letzter Zeit über QYNAD aufkamen (Brinkmeier et al., 2003; Cummins et al., 2003), hat man sich entschlossen, dieses Peptid zur Entwicklung und zur Optimierung eines Tests zu nehmen, da vermutet wird, dass es ein ähnlich kleines Peptid zu diagnostischen Zwecken gibt (Aulkemeyer et al., 2000). Ein weiterer Grund war, dass QYNAD einfach in der Synthese ist und im Labor schon vorhanden war.

Einleitung

In der vorliegenden Arbeit sollte eine Methode entwickelt werden, mit der sich solche kleinen Peptide, als Marker dienend, in Liquor und Blutserum nachweisen lassen. Eine wichtige Überlegung war, dass das ausgesuchte Testverfahren auch in einem kleinen Labor einfach durchzuführen ist und dass derartige Peptide mit dieser Methode sicher nachweisbar sind. Deshalb entschied man sich für die Methode enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) (Schuurs und Van Weemen, 1977), die auch im Bezug auf die Kostenfrage anderen Methoden überlegen ist und in vielen Labors zur Routinediagnostik gehört.

Vor Beginn der Arbeit wurde entschieden, für die spezielle Entwicklung des Tests vor allem die entzündliche Nervenerkrankung Multiple Sklerose zu verwenden, weil das Peptid QYNAD eine wichtige Rolle im Verlauf der Erkrankung spielen könnte (Meuth et al., 2003).

Der chronisch degenerative Verlauf dieser entzündlichen Nervenerkrankung kann sehr schwerwiegend sein. Es gibt aber noch keine geeignete Methode, um wiederholte Entzündungsschübe rechtzeitig zu erkennen und adäquat zu behandeln. Aus diesem Grund entschied man sich, einen ELISA zu entwickeln, der das kleine Peptid QYNAD oder ähnliche Peptide als Marker nachweist und somit Aufschluss darüber gibt, wie sich der Entzündungsprozess in Bezug auf die klinische Symptomatik verhält, aber auch, in wie weit die Erkrankung fortgeschritten ist, ohne aufwendige und teure Verfahren anzuwenden.

Das große Ziel dieser Arbeit war also, einen kompetitiven indirekten ELISA so zu optimieren, dass das kleine Peptid QYNAD sowohl qualitativ als auch quantitativ nachgewiesen wird. Ein weiterer wichtiger Punkt war auch, den Test so zu entwickeln, dass er einfach und billig durchführbar ist und somit als Routinemethode im Labor eingesetzt werden kann.

Weshalb gerade der kompetitiv indirekte ELISA ausgesucht wurde, wird später noch genauer erläutert.

1.2 Prinzip des enzymgekoppelten Immunabsorptionsassays

Der enzymgekoppelte Immunabsorptionsassay ist ein immunologisches Verfahren. Hierbei werden mit enzymmarkierten Antigenen die entsprechenden Antikörper bzw. im umgekehrten Fall die jeweiligen Antigene nachgewiesen. Es gibt drei Hauptvarianten der ELISA-Technik: den antibody capture assay, den antigen capture assay und den two antibody assay oder sandwich assay. Diese Techniken werden nachfolgend näher erläutert. Die Enzymmarkierung findet deshalb Anwendung, da Enzyme schon in sehr geringen Mengen nachweisbar sind und somit auch eine geringe Menge an Antigenen oder Antikörpern detektierbar ist.

a. Kompetitiver direkter ELISA

Zuerst wird der Antikörper durch unspezifische Adsorption an eine feste Phase gebunden, in der Regel ist dies eine Polystyroloberfläche. Nach dem Entfernen der überschüssigen Antikörper in einem Waschschrift werden mit einer Blockierlösung aktive Stellen gesättigt und nach einem erneuten Waschschrift wird die Probe, die das Antigen enthält, zusammen mit einer definierten Menge an enzymmarkiertem Antigen (Tracer) hinzugefügt. Während der Inkubation konkurrieren das Antigen aus der Probe und der Tracer um die Bindungsstellen der an der Platte angelagerten Antikörper. Nach Inkubation werden überschüssige Komponenten durch einen Waschschrift entfernt. Das Verhältnis, in dem Probenantigen und Tracer die Bindungsstellen besetzen, dient zur Berechnung der Antigenkonzentration aus der Probe (antigen capture assay). Dieses wird durch die Zugabe eines geeigneten Substrates für das gebundene Enzym messbar. Dabei ist das gemessene Signal direkt proportional zur Menge an gebundenem Enzym und umgekehrt proportional zur Menge an Antigen aus der Probe (siehe Abbildung 1-1).

Einleitung

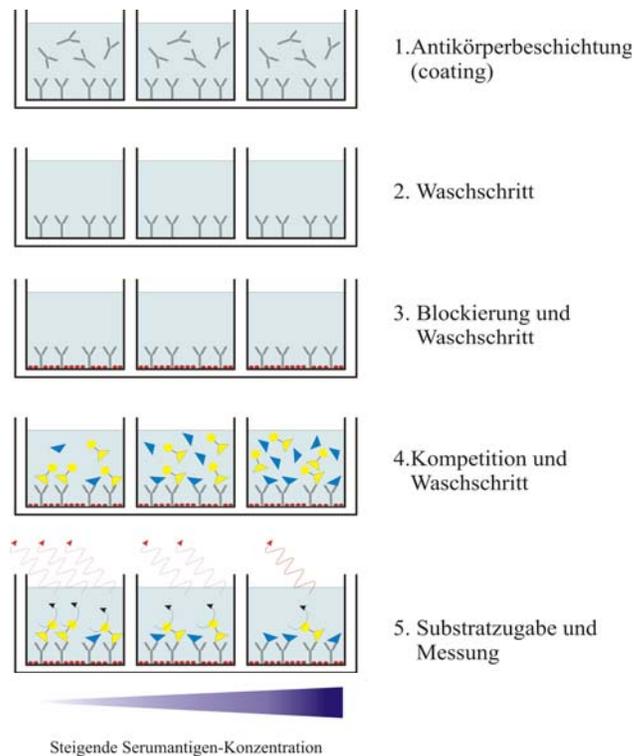


Abbildung 1-1 **Prinzip des kompetitiven, direkten ELISA.** In dieser Abbildung sind die Einzelschritte des Testes dargestellt.

b. Kompetitiver indirekter ELISA

Bei dieser Methode muss das Antigen auf einer Oberfläche beschichtet werden (siehe Abbildung 1-2). Die überschüssigen Antigene werden durch einen Waschschrift entfernt. Anschließend werden aktive Stellen mit einer Blockierlösung gesättigt. Nach dem Waschschrift wird die Probe mit dem zu bestimmenden Antigen und eine definierte Menge Antikörper inkubiert. In diesem Schritt findet eine Konkurrenz zwischen freiem und gebundenem Antigen um die Bindungsstellen der Antikörper statt. Je mehr freies Antigen aus der Probe vorhanden ist, desto weniger Antikörper binden an die gebundenen Antigene auf der Platte. Es folgt ein weiterer Waschschrift, und im Anschluss wird ein enzymmarkierter Sekundärantikörper zugegeben. Dieser Antikörper ist gegen den konstanten Fc Teil des im kompetitiven Schritt eingesetzten Antikörpers gerichtet und dient zur Signalerzeugung. Nicht gebundener Sekundärantikörper wird durch einen weiteren Waschschrift entfernt. Durch Zugabe eines geeigneten

Einleitung

Substrates kann die Reaktion gemessen werden. Auch bei dieser Methode ist die Intensität des Signals umgekehrt proportional zur Menge des Antigens aus der Probe.

Der kompetitive indirekte ELISA wurde in dieser Arbeit eingesetzt.

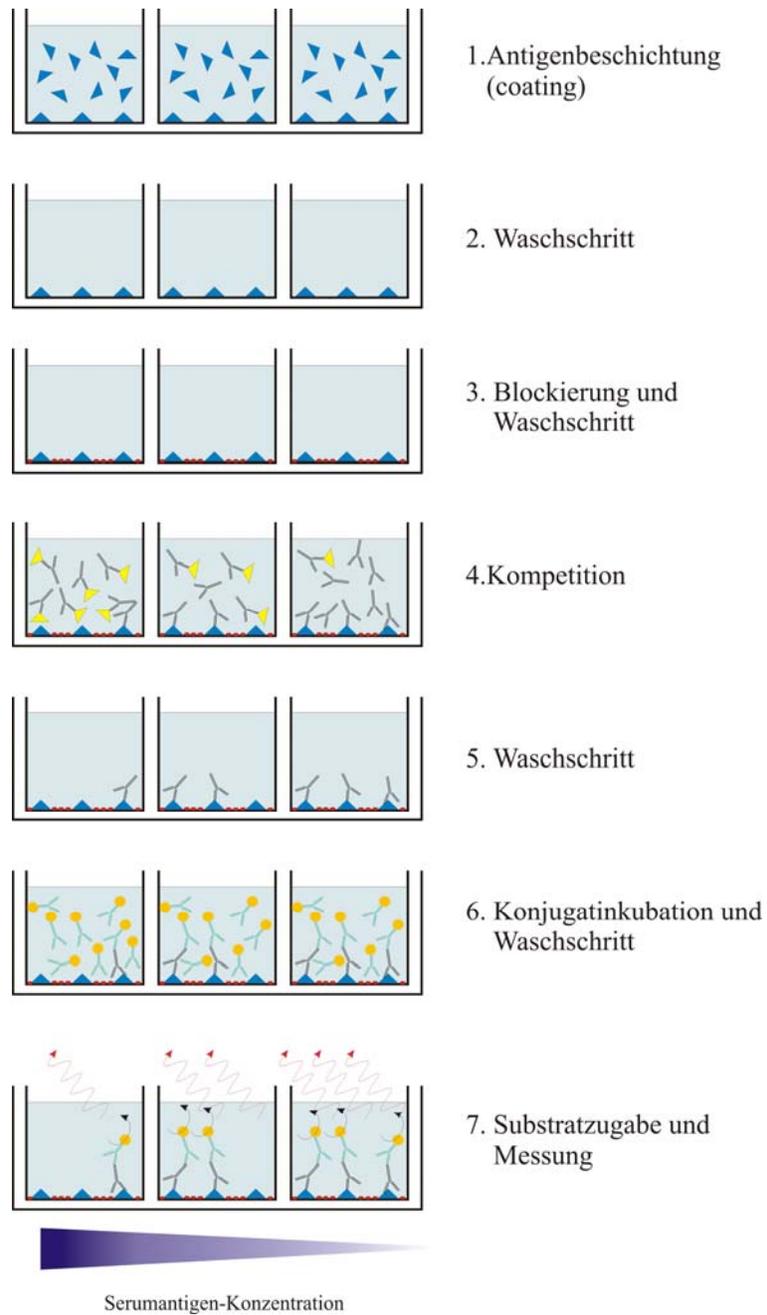


Abbildung 1-2 **Prinzip des kompetitiven, indirekten ELISA**. In dieser Abbildung sind die Einzelschritte des Testes dargestellt.

Direkte und indirekte ELISAs werden auch als heterogene Immunoassays bezeichnet, da mindestens ein Element auf einer festen Phase beschichtet werden muss. Im Gegensatz dazu gibt es auch homogene Immunoassays, die keine Beschichtung benötigen. Alle Reaktionsschritte laufen in Lösung ab, und es sind keine Waschschriffe notwendig, d.h. eine Trennung des gebundenen vom freien Liganden ist nicht erforderlich. Homogene Immunoassays sind zwar einfacher in der Anwendung, dafür sind sie aber störanfälliger und weniger sensitiv. Ein Beispiel für dieses Verfahren ist der EMIT (Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique).

c. Nicht kompetitive ELISAs

Neben den kompetitiven gibt es auch nicht kompetitive ELISAs. Zum einen gibt es den antibody capture assay (siehe Abbildung 1-3a), der hauptsächlich dann zur Anwendung kommt, wenn man den Immunstatus eines Menschen bestimmen will. Dies kann bei einer Infektion notwendig sein oder bei der Titerbestimmung nach einer Impfung. Bei dieser Methode wird das Antigen an eine feste Phase gekoppelt. Anschließend wird die Probe aufgetragen, in der die zu bestimmenden Antikörper enthalten sind. Nach Inkubation folgt ein Waschschriff, und ein enzymmarkierter Sekundärantikörper wird dazugegeben, der an dem konstanten Teil der gebundenen Erstantikörper aus der Probe bindet. Nach einem erneuten Waschschriff wird das Enzymsubstrat für die Quantifizierung zugegeben und anschließend gemessen. Je mehr Antikörper in der Probe enthalten sind, desto höher ist das gemessene Signal.

Bei vielen nicht kompetitiven ELISAs wird mit dem Two Antibody Assay bzw. Sandwich Assay gearbeitet (siehe Abbildung 1-3b). Dieser wird verwendet, wenn aus einem umfangreichen Proteingemisch ein ganz spezielles Protein detektiert werden muss. Beim Sandwich Immunoassay wird ein nicht markierter Antikörper auf die feste Phase beschichtet. Danach wird die Probe zugegeben. Alle Proteine mit dem passenden Epitop binden an den Antikörper, die restlichen werden ausgewaschen. Nun wird ein zweiter enzymmarkierter Antikörper verwendet. Dieser bindet an einem anderen Epitop des bereits gebundenen Proteins. Der Überschuss wird in einem Waschschriff entfernt, und nach Zugabe des Substrates wird die Reaktion gemessen. Man spricht

Einleitung

also von Sandwich Immunoassay, da das Antigen von zwei Antikörpern an verschiedenen Stellen gebunden ist. Auch in diesem Assay ist das gemessene Signal umso höher, je mehr Antigen gebunden worden ist.

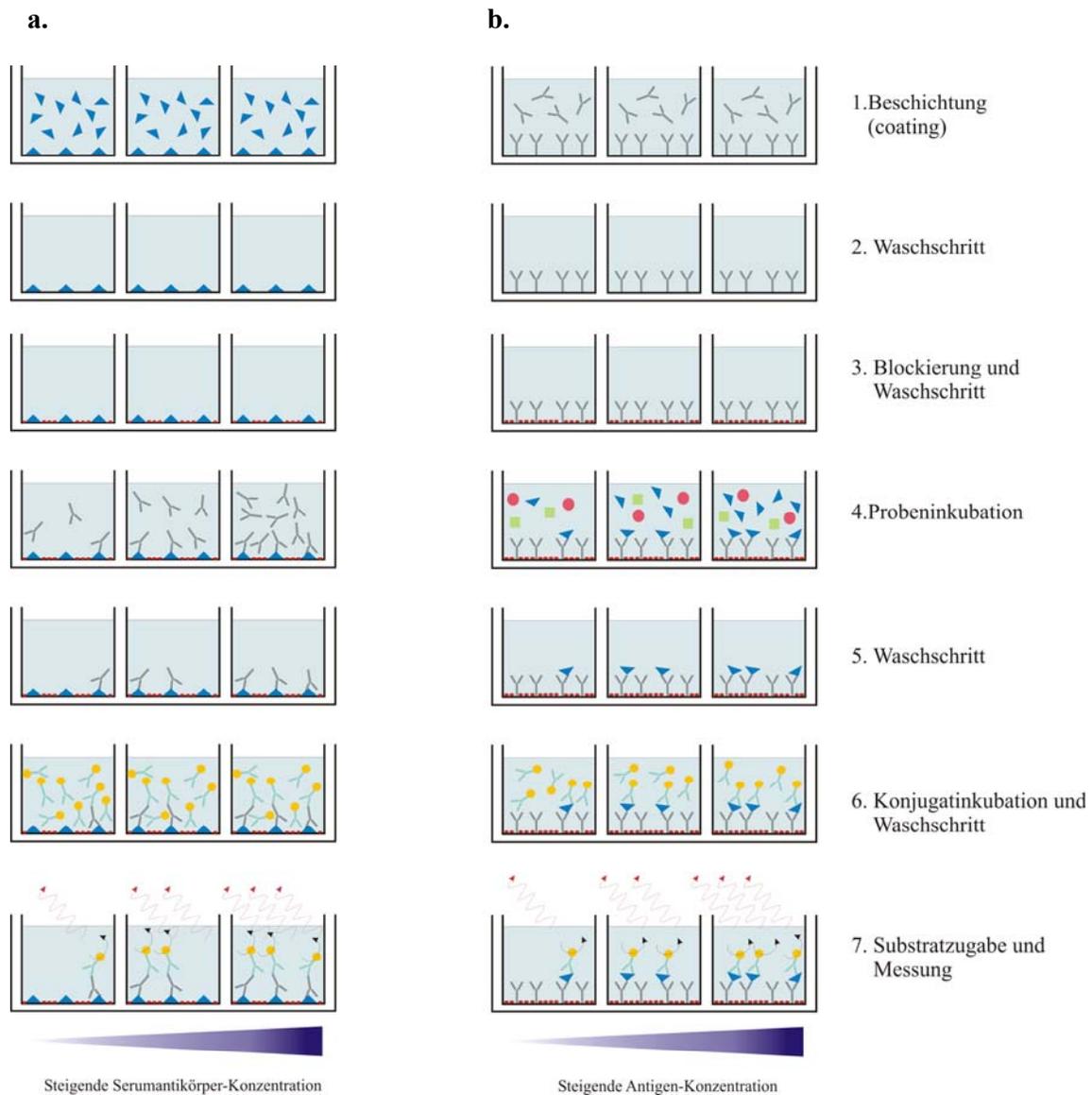


Abbildung 1-3 **Prinzip des nicht kompetitiven ELISA. a. Antibody capture assay. b. Sandwich assay.** In dieser Abbildung sind die Einzelschritte des Testes dargestellt.

1.2.1 Anwendung des enzymgekoppelten Immunabsorptionsassays

Den ersten Erfolg in immunologischen Verfahren erzielten Yalow und Berson. Ihnen gelang es erstmals, durch Hormonmarkierung mit radioaktiven Isotopen einen Radioimmunoassay (RIA) für Insulin herzustellen (Yalow und Berson, 1959). Der Einsatz von radioaktivem Material hat jedoch erhebliche Nachteile. Die markierten Substanzen haben eine begrenzte Haltbarkeit durch den Aktivitätsverlust der radioaktiv markierten Bestandteile und durch die Radiolyse. Außerdem ist die Entsorgung des radioaktiven Abfalls problematisch. Um RIAs durchzuführen, werden ein speziell geschultes Personal und die Einrichtung eines Isotopenlabors benötigt. Auch ist die Gefahr der Kontamination, die ein potentielles Gesundheitsrisiko darstellt, nicht zu vernachlässigen.

Diese Gründe führten zu einer verstärkten Suche nach einem alternativen Markierungssystem. Nakane und Pierce gelang es Enzyme zur Markierung in der Immunhistochemie zu verwenden (Nakane und Pierce, 1967). Schließlich kombinierten Engvall und Perlmann das Verfahren der enzymatischen Markierung mit der Immobilisation von Antikörpern auf Oberflächen und etablierten so den ersten ELISA (Engvall et al., 1971). Durch die einfache Durchführbarkeit mit hoher Selektivität und Sensitivität entwickelte sich der ELISA sehr schnell zu einem Standardverfahren. Die Übertragung des ELISA-Prinzips auf standardisierte Mikrotiterplatten, die die Testdurchführung weiter vereinfachten und eine Automatisierung zuließen, beschleunigte die Verbreitung des ELISAs weiter.

Die Anwendung von ELISAs ist sehr vielfältig. Der wichtigste Einsatzbereich ist die medizinische in-vitro-Diagnostik (Labormedizin) im klinischen, mikrobiologischen, serologischen, gynäkologischen und pharmakologischen Bereich. ELISAs werden unter anderem sehr häufig zum Nachweis von Antikörpern oder Antigenen bei Infektionen verwendet. Auch in der Bestimmung des Immunstatus nach Impfungen spielen sie wie schon erwähnt eine große Rolle.

Aber auch in anderen Bereichen wie z.B. in der Umweltanalytik zur Bestimmung von Pestiziden und Insektiziden in Boden- und Wasserproben oder in der Lebensmittelanalytik werden diese Testsysteme verstärkt eingesetzt (Beyer, 1998; Pfortner, 1998).

Einleitung

Eine Zusammenfassung der verschiedenen ELISA-Prinzipien und Beispiele zur Anwendung sind in der Tabelle 1-1 zu finden.

Tabelle 1-1 **Unterschiede der verschiedenen ELISA Methoden**

Art des ELISAs	Kompetition	Heterogenität	Anwendung
Direkter ELISA	Kompetitiv	Heterogen	Bei der Herstellung von monoklonalen Antikörpern
Indirekte ELISA	Kompetitiv	Heterogen	Nachweis eines bestimmten Antigens aus einer Patientenprobe
Indirekter ELISA	Kompetitiv	Homogen	Nachweis von Pharmaka oder Hormonen aus Patientenproben
Sandwich Assay	nicht kompetitiv	Heterogen	Bestimmung eines speziellen Proteins aus einem umfangreichen Proteingemisch

Als geeignetes Testverfahren haben wir uns für den kompetitiven ELISA entschieden, da bei nicht kompetitiven Verfahren das Antigen aus der Probe zuerst isoliert und dann an die Testplatte gebunden werden müsste. Diese Methode ist experimentell aufwendig und weniger quantitativ.

Unter den kompetitiven Methoden wurde die indirekte Technik ausgewählt, da beim direkten kompetitiven ELISA der Testantikörper an die Mikrotiterplatte gekoppelt werden muss. Dies hat zwei entscheidende Nachteile. Zum einen sind die Testplatten schwieriger und kürzer zu lagern, da gekoppelte Antikörper wesentlich instabiler sind als ein kurzes Peptid. Zum anderen müsste das zu bestimmende Antigen markiert werden oder durch einen markierten Antikörper nachgewiesen werden. Dies erfordert mehrere Zwischenschritte im Testablauf und ist somit anfälliger für Fehler.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der kompetitiv indirekte ELISA sowohl in der Entwicklung als auch im Routinegebrauch weniger kosten- und zeitintensiv ist als die anderen beschriebenen Methoden.

1.2.2 Messung und Auswertung von ELISAs

Um ein Signal bei ELISAs messen zu können, werden verschiedene Enzyme eingesetzt. Am häufigsten wird die Meerretich-Peroxidase verwendet. Die Vorteile dieses Enzyms sind der hohe Reinheitsgrad, die Sensitivität, die Stabilität, aber auch, dass es preisgünstig ist, so dass dieses Enzym die Methode der Wahl zur Markierung darstellt (Porstmann und Kiessig, 1992). Für die Meerretich-Peroxidase stehen verschiedene chromogene, fluorogene und luminogene Substrate zur Verfügung, am häufigsten jedoch wird das chromogene Substrat 3,3', 5,5' Tetramethylbenzidin (TMB) verwendet, da auf der einen Seite die Photometer, die zur Messung notwendig sind, billiger sind als Fluoreszenz- oder Lumineszenz-Geräte. Zum anderen ist TMB weder mutagen noch cancerogen (Bos et al., 1981). In dieser Arbeit wurde auch ausschließlich mit Meerretich-Peroxidase als Markierung gearbeitet.

Für eine quantitative Auswertung von ELISA-Daten muss eine Kalibrierungskurve erstellt werden. In semilogarithmischer Auftragung erhält man dann sigmoidale Kalibrierkurven. Diese Art von Kurve hat sich in der Auswertung etabliert, da Messdaten sich nicht immer gut linear darstellen lassen. Die Funktion, die fast ausschließlich zur Darstellung verwendet wird, lautet:

$$Y = \frac{A - D}{1 + \left(\frac{X}{C}\right)^B} + D$$

- X Konzentration des gesuchten Parameters
- Y Signal
- A Maximales Signal (obere Asymptote)

Einleitung

- D Minimales Signal (untere Asymptote)
- C Testmittelpunkt (IC₅₀, 50 % Wert)
- B Steigung am Testmittelpunkt

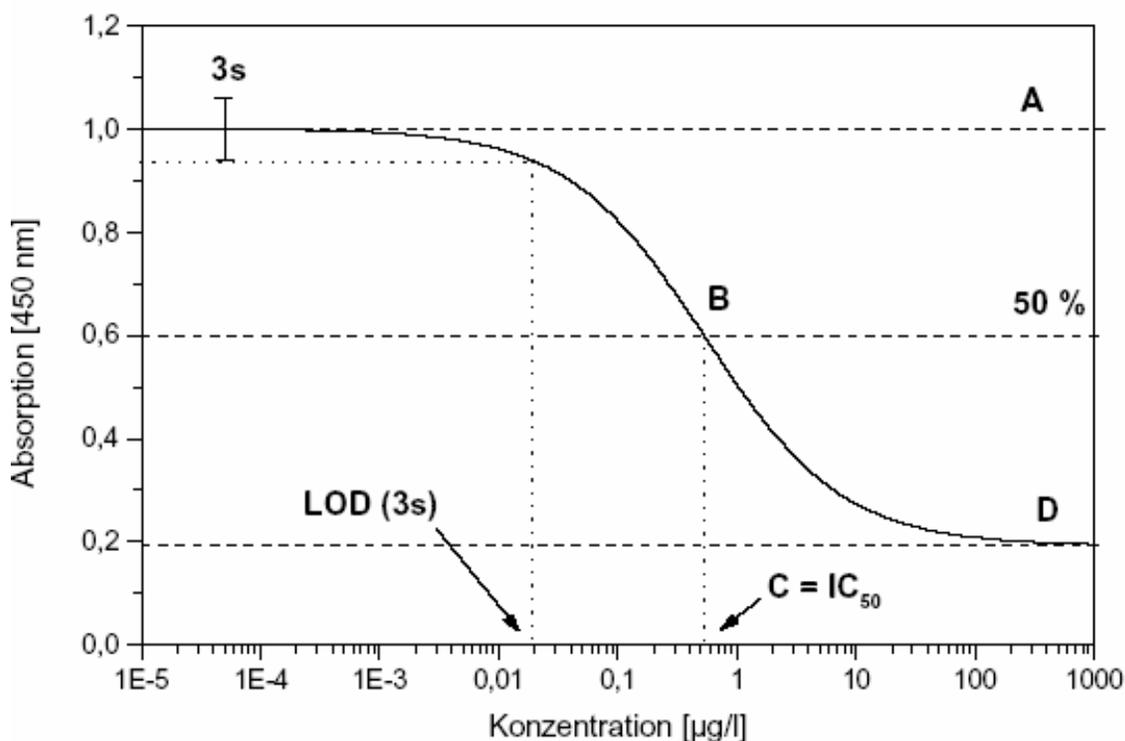


Abbildung 1-4 Typische Kalibrierkurve im ELISA zur Bestimmung der Konzentration einer

Substanz in einer Probe. Die Konstanten und Variablen sind aus der Formel $Y = \frac{A-D}{1 + \left(\frac{X}{C}\right)^B} + D$ zu

entnehmen.

In Abbildung 1-4 ist der typische sigmoidale Verlauf einer Kalibrierkurve dargestellt. Diese ergibt sich aus der Kurvenanpassung der Daten nach der oben genannten Funktion. Die Kurvenanpassung erfolgt dabei durch eine nicht lineare Regression mit Hilfe eines Computerprogramms wie z.B. GraphPad. Die Kurve wird durch die obere und untere Asymptote begrenzt, die durch die Parameter A und D angegeben sind. Der Parameter C stellt den Testmittelpunkt IC₅₀ (concentration of 50 % inhibition) in der Ka-

Einleitung

librierkurve dar. Die Auswertung unbekannter Analytkonzentrationen erfolgt im linearen Bereich um den Testmittelpunkt.

Weitere Faktoren, die für die Etablierung eines ELISAs eine wichtige Rolle spielen, sind die Sensitivität eines Assays, aber auch die Kreuzreaktivität.

Die Sensitivität eines Assays wird neben dem Testmittelpunkt auch durch die Nachweisgrenze (LOD, limit of detection) bestimmt. Die Nachweisgrenze gibt die niedrigste Konzentration des zu bestimmenden Analyten an, mit der ein statistisch signifikanter Wert erzielt werden kann. Im Allgemeinen wird diese Grenze als Mittelwert des Nullwertes angegeben, abzüglich dreier Standardabweichungen (Beyer, 1998; Pfortner, 1998).

Grundlage kompetitiver ELISAs ist die Konkurrenzreaktion zwischen dem in der Lösung befindlichen Antigen und dem beschichteten Antigen. Die Fähigkeit des Antikörpers, auch andere Strukturen als das zu seiner Herstellung verwendete Antigen zu erkennen, bezeichnet man als Kreuzreaktivität oder Querempfindlichkeit. Als häufigste Definition findet man den Vergleich der Testmittelpunkte. Somit wird folgende Gleichung zur Berechnung der Kreuzreaktivität verwendet:

$$KR [\%] = \frac{C_{Analyt}}{C_{KS}} \times 100$$

KR [%] Kreuzreaktivität

C_{Analyt} Testmittelpunkt der Standardsubstanz

C_{KS} Testmittelpunkt der kreuzreaktiven Substanz

Bei der Messung wird die Extinktion einer unbekannt Probe mit der Extinktion einer Standardmischung verglichen und so einer bestimmten Konzentration zugeordnet. Die Folge daraus ist, dass die Extinktion der unbekannt Probe ähnlich oder gleich einer definiert zusammengesetzten Standardlösung ist. Dieses ist nur eine Näherung. Für Screenings ist es aber vollkommen ausreichend, wenn auf das Vorhandensein oder die Abwesenheit eines Stoffes getestet wird. Um die vollständige Zusammensetzung einer

Einleitung

Probe zu ermitteln, werden andere Methoden wie z.B. die Gaschromatographie oder die HPLC verwendet.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patienten

Serum und Liquor von Kontrollpatienten aus der Abteilung Neurologie des Rehabilitationskrankenhauses Ulm (Dr. Tumani) und der Neurologischen Klinik der Universität Greifswald (Dr. A. Dressel).

2.1.2 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung/Firma
PBS	Biochrom, Berlin
Tris-Puffer/TBS	3,028 g Tris/HCl, 4,380 g NaCl, pH 8,0
Karbonatpuffer	100 mM Na ₂ CO ₃ / NaHCO ₃ , pH 9,6
Blockierpuffer	s. 2.2.3.3 Tabelle
Waschpuffer	s. 2.2.3.3 Tabelle
Verdünnungspuffer	s. 2.2.3.5 Tabelle
Stopplösung	4N / 1N H ₂ SO ₄
Stopplösung	Sigma, Deisenhofen
Milchpulver	Biorad, München
Fischgelatine	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Biorad, München

2.1.3 Enzyme und Antikörper

Bezeichnung	Firma
Spezifischer polyklonaler Antikörper gegen das Peptid QYNAD (1. Antikörper)	Davids, Regensburg
Monoklonales anti-Kaninchen Immunglobulin alkalische Phosphatase Konjugat	Sigma, Deisenhofen
Monoklonales anti-Kaninchen Immunglobulin Peroxidase Konjugat	Sigma, Deisenhofen
Anti-Kaninchen IgG Peroxidase Konjugat	Sigma, Deisenhofen
Extravidin alkalische Phosphatase	Sigma, Deisenhofen
Extravidin Peroxidase	Sigma, Deisenhofen
Monoklonales anti-Kaninchen Immunglobulin Biotin Konjugat	Sigma, Deisenhofen
TMB (Tetramethylbenzidin)	Sigma, Deisenhofen

2.1.4 Spezielle Verbrauchsmaterialien und Apparaturen

Bezeichnung	Hersteller
96 Well Immuno Platten Maxisorb	Nunc, Wiesbaden
96 Well Immuno Platten Polysorb	Nunc, Wiesbaden
96 Well ELISA Mikroplatten	Greiner, Frickenhausen
Halbvolumen Mikrotiterplatten	Costar, Schubert-Weiss, München
Probenfilter (3000 MWCO)	Millipore, Schwalbach
Washer	Tecan, Crailsheim
Elisa Reader	Tecan, Crailsheim

2.1.5 Software

Software	Hersteller
Easy fit 7.01	Tecan, Crailsheim
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software Inc., San Diego

2.2 Methoden

2.2.1 Synthese und Aufbereitung des Peptids

Die Synthese des Peptids wurde von der Firma EMC Microcollections (Tübingen) übernommen.

Die Peptidsynthese wurde abgewandelt nach Jung und Beck-Sickinger durchgeführt (Beck-Sickinger et al., 1991). Die synthetischen Peptide wurden mit Hilfe der Fmoc/tBu Festphasensynthese hergestellt. Lösungsmittel, Aminosäuren und Koppelungsreagenzien wurden mit einem robotergestützten Verfahren dosiert (Syro, Multi-SynTech, Bochum). Die Synthese wurde auf einem TCP-Polystyren Trägermaterial (Rapp Polymere, Tübingen) durchgeführt. Fmoc-L Aminosäuren wurden mit den folgenden Seitenketten-Schutzgruppen verwendet: *tert.*-butyl Ether für Tyrosin; *tert.*-butyl Ester für Aspartat; Trityl für Glutamin und Asparagin.

Das Trägermaterial wurde in individuelle Filterröhrchen in 30 mg (15 μ mol) Portionen verteilt und in einem Ventilblock für den nachfolgenden Schritt positioniert. Die Fmoc Entkopplung wurde zweimal für 7 Minuten mit 30 % Piperidin in Dimethylformamid (DMF, 220 μ l) durchgeführt. Es folgten neun Waschschrte mit jeweils 300 μ l DMF. Das Koppelungsreagenz Diisopropylcarbodiimid [1.5 M in DMF: Dichloromethan (DCM) (1:2, v/v), 50 μ l] und die Fmoc-Aminosäuren (200 μ l) wurden auf die Reaktionsgefäße verteilt. Die Fmoc-Aminosäuren (0.5 M) wurden mit HOBt (0.5 M) in DMF gelöst. Zwei Koppelungsschritte von jeweils einer Stunde wurden in offenen Röhrchen durchgeführt. Das Koppelungsreagenz wurde herausgefiltert und das Trägermaterial dreimal mit DMF gewaschen. Die Peptide wurden vom TCP-Polystyren gespalten und die Seitenketten innerhalb von drei Stunden mit 1 ml Trifluoressigsäure:Phenol:Ethandithiol:Thianisol:Wasser (96:2:1:2:1, v/w/v/v/v) entkoppelt. Die Trennung der Produkte vom Trägermaterial erfolgte durch Filtration und anschließende Fällung mit 300 μ l Essigsäure bei 20 °C durch Zugabe von kaltem Diethylether (5 ml). Das Präzipitat wurde zweimal unter Ultraschallbehandlung mit *n*-Heptan:Diethylether (1:1, v/v) gewaschen und anschließend lyophilisiert.

Die Identität der Peptide konnte durch ESI-MS, der Reinheitsgrad (> 90 %) durch HPLC bestimmt werden.

2.2.2 Herstellung eines peptidspezifischen Antikörpers

Der peptidspezifische Antikörper wurde von der Firma Davids (Regensburg) übernommen. Laut ihrem Protokoll erfolgte die Konjugation mit KLH und zwei unterschiedlichen Methoden. Beide Produkte wurden dann gemeinsam 1 + 1 zur Injektion verwendet:

1. Glutaraldehyd 0,02 % zur Konjugation über den N-terminus
2. Bisdiazobenzidin Konjugation über das Tyrosin

Als Wirt für die Antikörperproduktion wurden Kaninchen ausgewählt. Je Injektion wurden 0,1 mg des Konjugates bezogen auf das Peptid verwendet.

Es wurde folgendes Injektionsschema verwendet:

Injektion an Tag

0

14

35

56

86

Danach wurde das Serum durch Ausbluten über die Halsvene der Wirtstiere gewonnen.

2.2.3 Kompetitiver Enzymgekoppelter Immunabsorptionsassay (ELISA)

2.2.3.1 Auswahl der Mikrotiterplatten

Sämtliche Mikrotiterplatten bestanden aus 96 Kavitäten. Die Näpffengeometrie war ein Flachboden. Um Material zu sparen, wurden auch Halbvolumen-Mikrotiterplatten benützt. Die verschiedenen Platten sind unter 2.1.4 aufgeführt.

2.2.3.2 Beschichtung der Messplatte

Die Beschichtung der Messplatte wurde sowohl mit Protokollen der Firma Davids als auch mit eigenen Methoden ausgetestet.

a. Auswahl des Beschichtungspuffers

Für die Beschichtung wurde das Peptid QYNAD in verschiedenen Konzentrationen (200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml) in PBS (pH 7,0; 7,5; 8,0), Tris/HCl (pH 8,5), Karbonatpuffer (pH 9,6) und in destilliertem Wasser aufgelöst. Die Platten wurden mit 100 µl bzw. mit 50 µl (bei Halbvolumen-Mikrotiterplatten) pro Kavität beschichtet. Als Kontrolle diente jeweils die entsprechende Lösung ohne Peptid bzw. die leere Vertiefung.

b. Verschiedene Beschichtungsarten und Beschichtungsbedingungen

Kältebeschichtung

Die Platten wurden ohne Vorbehandlung mit der jeweiligen Peptidlösung bei 4 °C für 24 h inkubiert.

Glutaraldehydmethode

Die Platten wurden mit 100 µl 0,2 %iger Glutaraldehydlösung in PBS (pH 7,4) pro Kavität für 30 min vorbehandelt. Nach Absaugen der Flüssigkeit wurde das Peptid auf die Platte pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Eintrocknenmethode

Die Peptidlösung wurde auf eine unbehandelte Platte pipettiert und bei Raumtemperatur für 72 h getrocknet. Um die Zeit der Eintrocknung zu verkürzen, wurde ein Lüfter ohne Heizung benützt.

2.2.3.3 Auswahl der Waschlösung und der Blockierlösung

Waschpuffer		Blockierlösung	
1	PBS + 0,042 % Tween 20	1	PBS + 2,5 % Milchpulver
2	Destilliertes Wasser	2	TBS + 4 % Milchpulver + 1 % Fischgelatine
3	25 % Blockierlösung 3 + 0,08 % Tween 20	3	TBS + 5 % Milchpulver + 1 % Fischgelatine
4	PBS + 1 % Tween 20		

Es wurden verschiedene Waschpuffer und Blockierlösungen ausgetestet. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist in der oberen Tabelle dargestellt.

2.2.3.4 Waschvorgang der Mikrotiterplatten

Das Waschen der Mikrotiterplatten nach den einzelnen Inkubationsschritten erfolgte mit Hilfe eines 8-Kanal-Waschkammes. Die Kavitäten wurden dreimal mit bis zu 300µl Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die Platte auf Zellstoff ausgeklopft.

Die einzelnen Waschschrte fanden nach Inkubation der Antigenbeschichtung, nach dem Blockieren, nach Inkubation mit dem spezifischen Erstantikörper gegen QYNAD und nach Inkubation mit dem Antikörperkonjugat statt.

2.2.3.5 Auswahl des Verdünnungspuffers

Bezeichnung	Zusammensetzung
Verdünnungspuffer 1	2,5 % Milchpulver, 0,125 % Tween in PBS pH 7,4
Verdünnungspuffer 2	4 % Milchpulver, 1 % Fischgelatine, 0,08 % Tween 20 in TBS pH 8,0
Verdünnungspuffer 3	5 % Milchpulver, 1 % Fischgelatine, in TBS pH 8,0 ; 1:4
Verdünnungspuffer 4	Destilliertes Wasser
Verdünnungspuffer 5	0,9 % NaCl
Verdünnungspuffer 6	PBS pH 7,4

Bei der Auswahl des Verdünnungspuffers wurden verschiedene Lösungen ausgetestet. Die Zusammensetzung ist in der oberen Tabelle aufgelistet.

2.2.3.6 Probenverdünnung

Die Ausgangskonzentration für den Standard war 1 mg QYNAD in 1 ml destilliertem Wasser. Daraus wurden verschiedene Verdünnungen hergestellt, die zwischen 0,01-200 µg/ml lagen.

Um optimale Ergebnisse zu erzielen, mussten die Proben, der 1. Antikörper und das Konjugat in einer geeigneten Verdünnung eingesetzt werden.

Die Proben wurden in den Verdünnungen 1:10, 1:50, 1:100, aber auch unverdünnt verwendet.

Der 1. Antikörper wurde in Verdünnungen zwischen 1:100 und 1:10 000 ausgetestet. Das Antikörperkonjugat wurde nach der Vorschrift des Herstellers in einer Verdünnung von 1:10 000 benützt.

Die ExtrAvidin-Biotin Konjugate wurden in sämtlichen Verdünnungen zwischen 1:1000 und 1:20 000 ausgetestet. Die kovalente Bindung zwischen Biotin und dem Konjugat ermöglicht es, dass das tetramere Protein ExtrAvidin eine hohe Affinität mit seinen vier Bindungsstellen zum Biotin hat. Dies führt zu einer Verstärkung des Signals, so dass diese Technik in den Tests eingesetzt wurde, bei der nur sehr niedrige Werte zu messen waren.

Das Peptid PyroQYNAD wurde zwischen 0,01 µg/ml und 100 µg/ml eingesetzt, Bradykinin wurde mit 200 µg/ml verwendet.

2.2.3.7 Aufbereitung des Patientenmaterials

Es wurde Patientenmaterial aus dem Rehabilitationskrankenhaus Ulm (Abteilung Neurologie) und aus der Universität Greifswald (Institut für Pathophysiologie) verwendet. Als Kontrolle dienten Proben von Patienten ohne pathologischen Befund. Die Proben wurden durch Lumbalpunktion und Blutentnahme gewonnen.

Um störende hochmolekulare Proteine aus dem Material zu entfernen, wurden sowohl die Liquor- als auch die Serumproben filtriert (<3000 MWCO, Fa. Millipore).

2.2.3.8 Verdrängungsreaktion

Bei der Verdrängungsreaktion wurden Standard bzw. Probe und der Antikörper gegen QYNAD zu gleichen Teilen pipettiert. Dadurch entstand eine Konkurrenz zwischen Erstantikörper, an der Platte gebundenem Peptid und freiem Peptid aus der Probe.

Der Standard wurde in den Konzentrationen 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml und 50 µg/ml in destilliertem Wasser hergestellt und als dreifache Bestimmung zu je 50 bzw. 25 µl pipettiert.

Die Probe wurde unverdünnt eingesetzt und auch als dreifache Bestimmung zu je 50 bzw. 25 µl pipettiert. Bei einer zu hohen Extinktion, die eine Konzentrationsbestimmung nicht ermöglichte, wurde die Probe 1:10 und 1:100 verdünnt und in einem weiteren Test erneut eingesetzt.

2.2.3.9 Messung

Die Messung der OD-Werte in den einzelnen Kavitäten der 96er Mikrotiterplatte erfolgte mit dem ELISA Reader der Firma Tecan. Es wurde ein Filter mit 450 nm verwendet.

2.2.3.10 Auswertung

Die Auswertung der Platte konnte mit dem Programm Easy Fit 7.01 erstellt werden. Die graphische Darstellung und statistische Auswertung der Messwerte erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 5.0.

3 Ergebnisse

3.1 Optimierung der Plattenbeschichtung

3.1.1 Auswahl der geeigneten Mikrotiterplatten

Für die Etablierung der optimalen Bedingungen der Methode mussten auch verschiedene Typen von Mikrotiterplatten getestet werden (siehe Tabelle unter 2.1.4). Dies gestaltete sich relativ schwierig, denn die Auswahl an verfügbaren Platten ist relativ groß. Bei der Austestung lagen die OD-Werte auf den MaxiSorp™-Platten höher als bei den PolySorp™, allerdings war der OD-Wert des Leerwertes (Hintergrund-Absorption) auf den MaxiSorp™ Platten ebenfalls hoch, so dass PolySorp™ anfangs die geeignetere Platte zu sein schien. Es stellte sich jedoch heraus, dass die OD-Werte trotz verschiedener Konzentrationen der Antigenbeschichtung kaum eine Abstufung zeigten. Von der Firma Davids wurde die ELISA Mikroplatte der Firma Greiner ausgetestet mit dem Resultat, dass die OD-Werte des Leerwertes (Hintergrund-Absorption) niedrig waren und die OD-Werte je nach verwendeter Antigenkonzentration eine gute Abstufung zeigten. Um Material zu sparen, wurden äquivalente Halbvolumen-Mikrotiterplatten der Firma Costar verwendet.

Ergebnisse

Tabelle 3-1 **Vergleich der verschiedenen Mikrotiterplatten.** OD-Werte von ELISA-Tests in Abhängigkeit vom Plattentyp und der Beschichtungskonzentration mit Antigen. Es wurden je drei Versuche pro Testgruppe durchgeführt und Mittelwert mit Standardabweichung angegeben.

	Nunc Maxisorb Mikrotiterplatte [OD]	Nunc Polysorb Mikrotiterplatte [OD]	Greiner / Costar Mikrotiterplatte [OD]
8 µg/ml	0,242 0,239 0,257	0,098 0,105 0,109	0,191 0,204 0,199
Mittelwert	0,246 ± 0,010	0,104 ± 0,0056	0,198 ± 0,0066
1 µg/ml	0,245 0,241 0,255	0,096 0,098 0,094	0,176 0,177 0,178
Mittelwert	0,247 ± 0,007	0,096 ± 0,002	0,177 ± 0,001
Leerwert	0,220 0,242 0,258	0,080 0,060 0,088	0,046 0,043 0,049
Mittelwert	0,240 ± 0,019	0,076 ± 0,0144	0,046 ± 0,0032

3.1.1.1 Auswahl der Beschichtungsmethode

Im nächsten Schritt wurden die Bedingungen für die optimale Beschichtung der Platte mit dem Peptid ausgetestet (siehe Tabelle 3-2). Die Auflösung des Peptids QYNAD in verschiedenen Puffern ergab, dass PBS (pH 7,0; 7,5; 8,0) ein geeigneter Beschichtungspuffer für die Glutaraldehydmethode war, nicht jedoch für die Eintrockenmethode oder die Kältemethode. Die OD-Werte mit dem Tris-Puffer als Beschichtungslösung waren bei allen drei Methoden für eine Auswertung nicht hoch genug. Es stellte sich heraus, dass destilliertes Wasser nur bei der Eintrockenmethode gute OD-Werte lieferte, jedoch war Karbonatpuffer als Beschichtungspuffer bei der Eintrockenmethode am geeignetsten, da die OD-Werte des Standards sehr hoch und die OD-Werte der Leerproben sehr niedrig lagen.

Ergebnisse

Nachdem ich mich für Karbonatpuffer als Beschichtungspuffer entschieden hatte, konnte die passende Konzentration des Peptids ermittelt werden. Die günstigsten OD-Werte erhielt man mit einer Konzentration von 25 µg/ml, die aus der Stammlösung 1 mg/ml hergestellt wurde. Pro Kavität sind 100 µl bzw. 50 µl pipettiert worden.

Tabelle 3-2 **Vergleich der verschiedenen Beschichtungsmethoden mit unterschiedlichen Beschichtungspuffern.** Alle Testplatten (Greiner/Costar) wurden mit 50 µg/ml Peptid beschichtet. Eine genaue Beschreibung der Beschichtungsmethoden ist im Text zu finden. Es zeigte sich, dass die Eintrockenmethode mit dem Karbonatpuffer (pH 9,6) die höchsten OD-Werte lieferte.

Beschichtungspuffer	Glutaraldehyd- methode OD Mittelwert	Eintrockenme- thode OD Mittelwert	Kältemethode OD Mittelwert
PBS pH 7,0	0,833	nicht auswertbar	0,248
Dest. Wasser	nicht auswertbar	0,288	nicht auswertbar
Karbonatpuffer pH 9,6	nicht auswertbar	1,910	0,116
Tris-Puffer	nicht auswertbar	nicht auswertbar	0,128

3.1.2 Auswahl der Beschichtungskonzentration

Um die Methode zu standardisieren, ist es auch notwendig, die optimale Beschichtungskonzentration des Peptids zu finden. In den ersten Versuchen wurde die Beschichtungskonzentration mit 200 µg/ml sehr hoch angesetzt, um die Affinität des Erstantikörpers zum Peptid auszutesten. Als dieses geklärt war, konnte an der Optimierung der Konzentration gearbeitet werden. Dazu wurden die Platten mit verschiedenen Peptidkonzentrationen beschichtet und nach der Testdurchführung gemessen. In der nachfolgenden Graphik (Abbildung 3-1) sind die Unterschiede der verschiedenen Beschichtungskonzentrationen dargestellt.

Ergebnisse

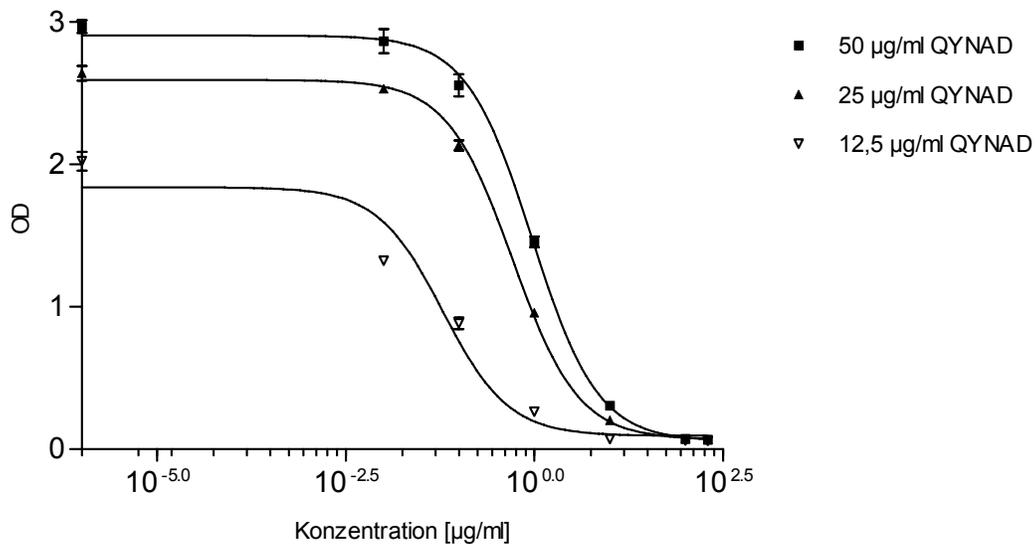


Abbildung 3-1 **Optimierung der Beschichtungskonzentration.** Aufgetragen wurde die OD in Abhängigkeit von der Konzentration des Peptids, die zur Beschichtung der Platte verwendet wurde. Die Peptidkonzentration ist logarithmisch dargestellt. Die optimale Beschichtungskonzentration mit 25 µg/ml ergab einen guten linearen Bereich. Die Standardabweichung wurde aus drei unabhängigen Messwerten bestimmt.

Im nächsten Versuch wurde die Eigenabsorption der Mikrotiterplatte mit einer beschichteten Platte verglichen. Dafür wurde für die „Beschichtung“ der Kontrollplatte nur Karbonatpuffer verwendet (Abbildung 3-2).

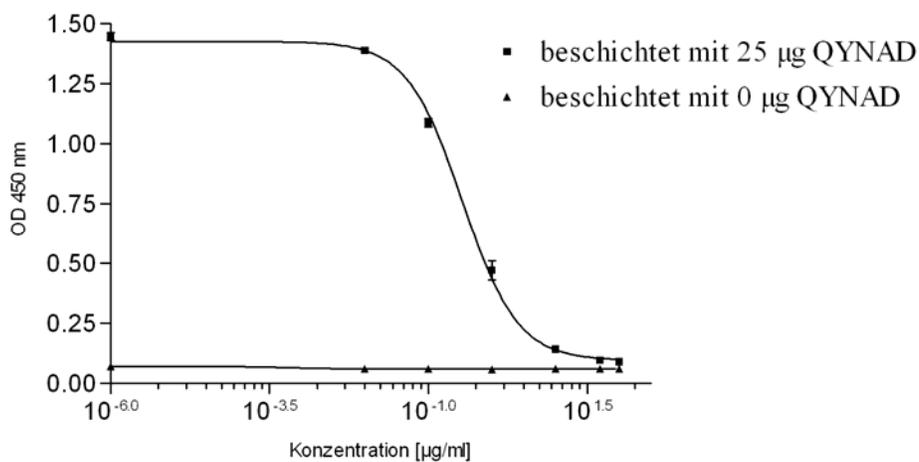


Abbildung 3-2 **Kontrollexperiment zur Überprüfung der Eigenabsorption der Mikrotiterplatte.** Aufgetragen wurde die OD_{450} in Abhängigkeit von der Konzentration des Peptids, die zur Beschichtung der Platte verwendet wurde. Die Peptidkonzentration ist logarithmisch dargestellt. Als Kontrolle diente eine nicht beschichtete Platte (Pufferkontrolle). Die Werte der nicht beschichteten Kavitäten zeigten konstante niedrige Absorption im Gegensatz zur beschichteten Platte mit sinkender optischer Dichte. Die Standardabweichung wurde aus drei unabhängigen Messwerten bestimmt.

3.2 Auswahl des Waschpuffers, der Blockierlösung und des Verdünnungspuffers

Bei der Austestung des Waschpuffers wurde auf die Schwankung der Leerwerte geachtet. Die geringsten OD-Differenzen des Leerwertes lieferte PBS + 1 % Tween 20. Die anderen aufgelisteten Waschpuffer zeigten höhere Schwankungen und wurden deshalb nicht mehr verwendet.

Die deutlichsten OD-Unterschiede zwischen beschichteten und nicht beschichteten Kavitäten erreichte man mit der Blockierlösung 3, d.h. TBS (pH 8) + 5 % Milchpulver + 1 % Fischgelatine.

Um den geeigneten Verdünnungspuffer für die Standards und Proben zu finden, wurden die in Tabelle 2.2.3.5. aufgelisteten Puffer ausgetestet. Die höchsten OD-Werte erhielt man mit destilliertem Wasser. Es stellte sich jedoch heraus, dass destilliertes Wasser nicht als Verdünnungspuffer für den 1. Antikörper und für das Konjugat geeignet war, so dass Verdünnungspuffer 3, d.h. TBS (pH 8.0) + 5 % Milchpulver + 1 % Fischgelatine ohne Tween 1:5 verdünnt, die besten Ergebnisse für den Erstantikörper und für das Konjugat lieferte.

Letztendlich wurden also zwei verschiedene Verdünnungspuffer verwendet. Die Verdünnung von Standard und Proben erfolgte in destilliertem Wasser, die von Erstantikörper und Antikörperkonjugat in Verdünnungspuffer 3.

3.3 Verdünnung des Standards und der Proben

Um eine geeignete Verdünnung des Standards zu ermitteln, wurden verschiedene Kalibrierkurven hergestellt, die zur Konzentrationsbestimmung der Proben anwendbar waren. Dabei lieferten die Standardverdünnungen mit der Konzentration 0,01 $\mu\text{g/ml}$, 0,1 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ und 50 $\mu\text{g/ml}$ in destilliertem Wasser eine Kalibrierkurve mit einem breiten linearen Bereich um den Testmittelpunkt, die zur Ermittlung der Konzentration unbekannter Proben geeignet war (siehe Abbildung 3-3).

Die Proben wurden unverdünnt eingesetzt. Da die OD-Werte von verschiedenen Proben nach der Konzentrationsbestimmung zu hoch lagen, wurden diese in den Verdünnungen 1:10 und 1:100 nochmals eingesetzt.

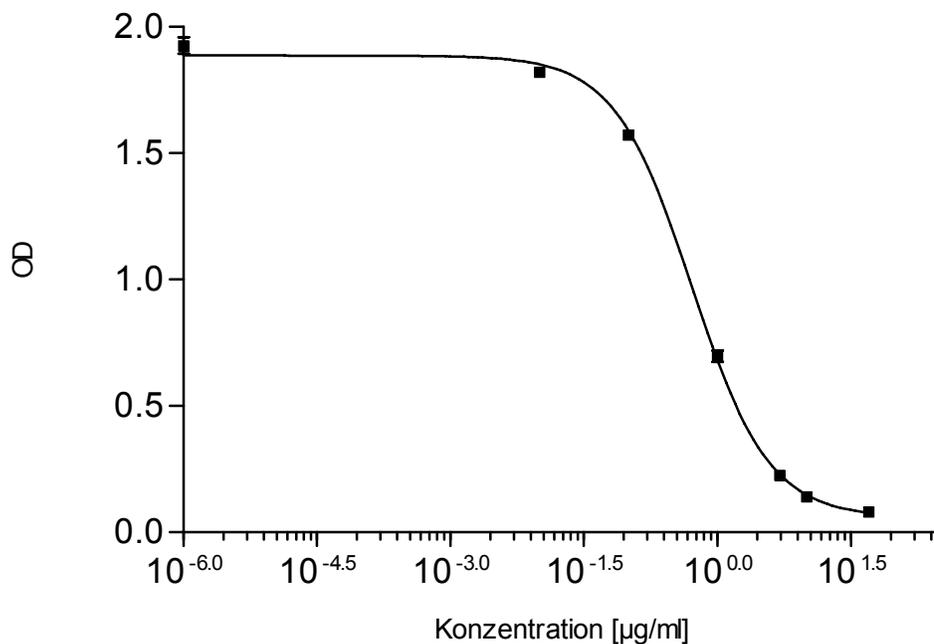


Abbildung 3-3 **Kalibrierkurve für die Konzentrationsbestimmung des Peptids Glutamin-Tyrosin-Asparagin-Alanin-Aspartat (QYNAD) in Lösung.** Es wurden folgende Standardkonzentrationen verwendet: 0,01 μg ; 0,1 μg ; 1 μg ; 5 μg ; 10 μg und 50 μg QYNAD / ml in destilliertem Wasser. Aufgetragen wurde die OD_{450} in Abhängigkeit von der Konzentration des Peptids, die zur Beschichtung der Platte verwendet wurde. Die Peptidkonzentration ist logarithmisch dargestellt. Die Standardabweichung wurde aus drei unabhängigen Messwerten bestimmt.

3.4 Verdünnung des 1. Antikörpers und des Konjugates

Für die Auswahl der Verdünnung des 1. Antikörpers wurden folgende Verdünnungen ausgetestet: 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:10 000 (Abbildung 3-4). Die besten Ergebnisse mit einer guten Abstufung und einem geringen Verbrauch des Materials erhielt man mit der Verdünnung 1:10 000.

Eine unspezifische Bindung des 1. Antikörpers wurde mit Hilfe eines anderen Peptids (Bradykinin) überprüft. Zudem wurde eine unspezifische Bindung an die Platte durch das Mitführen geeigneter Kontrollen ausgeschlossen.

Zu Beginn der Entwicklung des Tests wurden ein Konjugat, das mit alkalischer Phosphatase, und ein Konjugat, das mit Peroxidase gekoppelt war, ausgetestet. Die OD-Werte lagen mit dem Peroxidasekonjugat etwas höher, jedoch nicht zufrieden stellend. Deshalb wurde ein Biotin-Konjugat eingesetzt, das die OD-Werte erhöhen sollte. ExtrAvidin wurde einmal mit Peroxidase und einmal mit alkalischer Phosphatase gekoppelt und ausgetestet. In diesem Fall waren die OD-Werte mit dem Biotin-Konjugat und ExtrAvidin-Peroxidase deutlich höher, so dass nun die passende Verdünnung für den Test untersucht wurde. Das Biotin-Konjugat wurde in den Verdünnungen 1:5000, 1:10 000, 1:20 000, 1:40 000 eingesetzt. ExtrAvidin-Peroxidase wurde 1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000 verdünnt. Die höchsten OD-Werte erlangte man mit der Verdünnung des Biotin-Konjugates 1:5000 und einer Verdünnung des ExtrAvidin-Peroxidase 1:1000.

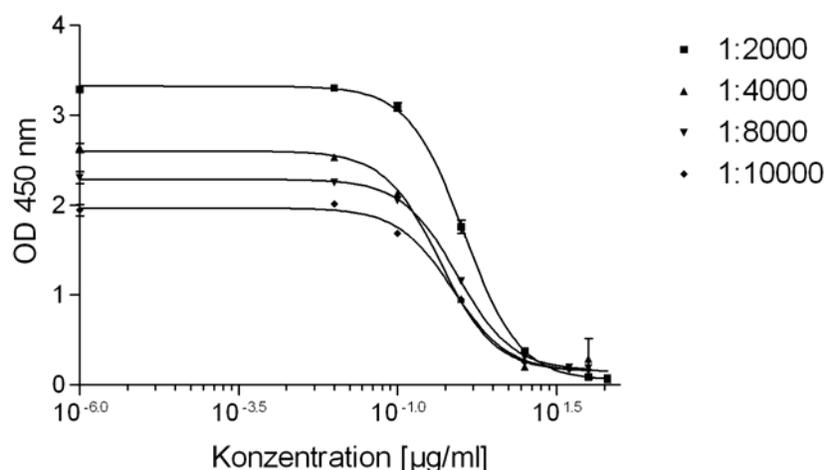


Abbildung 3-4 **Optimierung der Verdünnung des ersten Antikörpers gegen das Peptid Glutamin-Tyrosin-Asparagin-Alanin-Aspartat (Anti-QYNAD)**. Aufgetragen wurde die OD₄₅₀ in Abhängigkeit von der Konzentration des Peptids, die zur Beschichtung der Platte verwendet wurde. Die Peptidkonzentration ist logarithmisch dargestellt. Die optimale Antikörperverdünnung von 1:10000 ergab einen guten linearen Bereich. Die Standardabweichung wurde aus drei unabhängigen Messwerten bestimmt.

Im Laufe der Entwicklung bzw. der Optimierung der Analyse wurde ein weiteres Peroxidase-Konjugat ausgetestet, welches hohe Werte lieferte, so dass man auf das verstärkende Biotin-Konjugat in den weiterführenden Experimenten verzichten konnte.

3.5 Qualitätssicherung des ELISA

Um die Güte eines Tests bzw. Messverfahrens zu bestimmen, gibt es verschiedene Möglichkeiten, unter anderem die Bestimmung der Intra- und Interassayvariabilität (Intra- und Interplate-Variationskoeffizient).

Bei der Intraassay-Variabilität wird die gleiche Probe innerhalb eines Messansatzes mehrfach gemessen und bestimmt, wie stark die Messwerte dieser Probe schwanken. Als sinnvolles Maß dient dabei der Variationskoeffizient (VK), der den Quotienten von Standardabweichung und Mittelwert darstellt.

Bei der Betrachtung der Interassay-Variabilität wird dieselbe Probe zwischen verschiedenen Messdurchgängen mehrfach gemessen und bestimmt, wie stark die einzelnen Messwerte voneinander abweichen. Auch hierfür erlaubt die Angabe des Variationskoeffizienten eine sinnvolle Aussage.

Auch bei diesem ELISA zum Nachweis des Peptids QYNAD wurden eine Intra- und eine Interassay-Variabilität bestimmt. Die Intraassay-Variabilität des Tests betrug $< 6 \%$, die Interassay-Variabilität betrug $< 15 \%$.

Im Rahmen dieser Qualitätssicherung wurde auch die Genauigkeit der verschiedenen Pipetten untersucht. Die geringste Genauigkeit konnte mit der 8-Kanal-Pipette nachgewiesen werden. Bei der Multipette sind bessere Werte gemessen worden, jedoch waren die Werte mit der Einzelpipette am besten. Dies hat aber wiederum zur Folge, dass der Pipettiervorgang bei vielen Proben zu lange dauerte. Deshalb musste je nach Anzahl der Proben zwischen der Multipette und der Einzelpipette gewechselt werden.

3.6 Weitere Optimierungsversuche

Nur kurz erwähnt werden sollten hier einige Optimierungsversuche, die im Laufe der Entwicklung des ELISA ausgetestet wurden.

Zum einen wurde versucht, die Inkubationszeit zu verkürzen. Dabei wurde nicht 2 Stunden je Antikörper inkubiert, sondern auf jeweils 1 Stunde verkürzt. Das Ergebnis war nicht zufrieden stellend, da die OD-Werte zum einen niedriger waren als mit der vorgesehenen Inkubationszeit, zum anderen schwankten die Werte untereinander.

Die Abstoppreaktion wurde mit 1 N, 4 N Schwefelsäure und dem Abstoppreagenz der Firma Sigma ausgetestet. Sehr gute Ergebnisse lieferte das Stoppreagenz der Firma Sigma und wurde daraufhin in den weiterführenden Tests verwendet.

Ein weiterer Versuch bestand darin, die eingetrocknete Platte bei Raumtemperatur über mehrere Wochen zu lagern, und mit den Platten, die nur 72 Stunden getrocknet wurden, zu vergleichen. Nachdem die OD Werte bei beiden Platten nur eine geringfügige Abweichung gezeigt haben, war bestätigt worden, dass die Lagerung der Platten kein Problem darstellt (Abbildung 3-5).

Ergebnisse

Als nächstes wurde überprüft, ob die Temperatur der verschiedenen Reagenzien einen Einfluss auf das Testsystem hat. Dazu wurden der Waschpuffer, der Verdünnungspuffer und das TMB sowohl mit 4 °C als auch bei Raumtemperatur eingesetzt. Signifikante Unterschiede wurden beim Waschpuffer gemessen. Der Waschpuffer lieferte mit 4 °C die besseren Ergebnisse als bei Raumtemperatur (Abbildung 3-6).

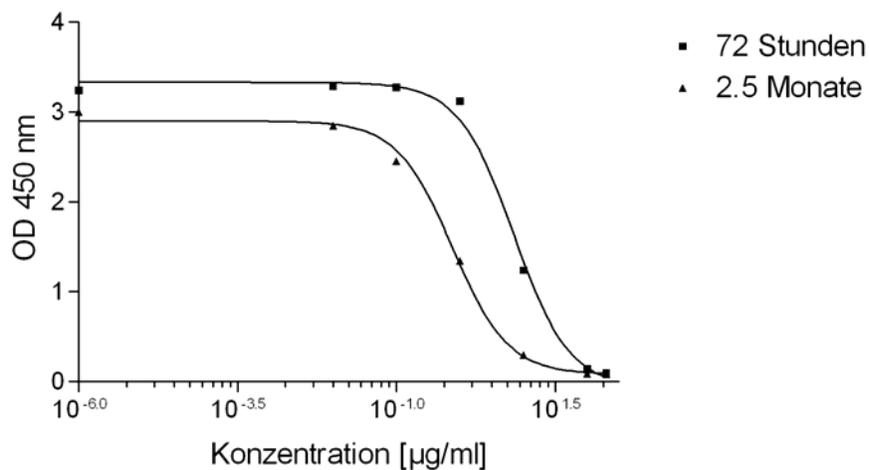


Abbildung 3-5 **Untersuchung der Lagerungszeit der beschichteten Platten.** Aufgetragen wurde die OD₄₅₀ in Abhängigkeit von der Konzentration des Peptids, die zur Beschichtung der Platte verwendet wurde. Die Peptidkonzentration ist logarithmisch dargestellt. Die Standardabweichung wurde aus drei unabhängigen Messwerten bestimmt.

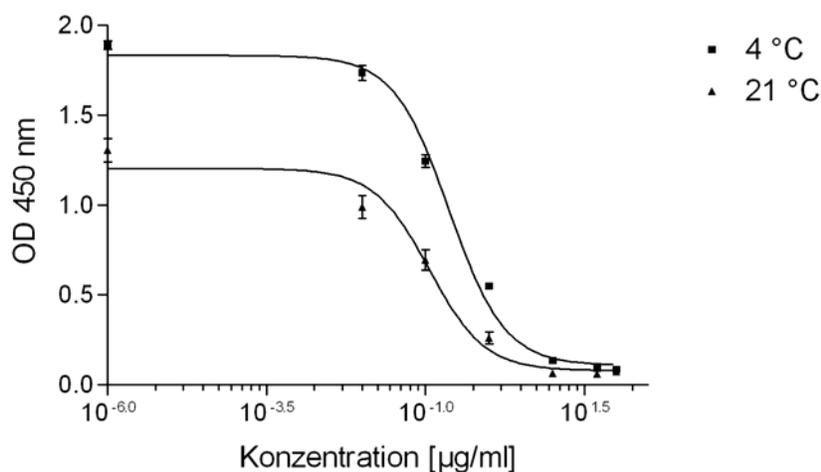


Abbildung 3-6 **Optimierung der Temperaturbedingungen.** Aufgetragen wurde die OD₄₅₀ in Abhängigkeit von der Konzentration des Peptids, die zur Beschichtung der Platte verwendet wurde. Die Peptidkonzentration ist logarithmisch dargestellt. Die optimale Temperatur der Reagenzien lag bei 4 °C. Die Standardabweichung wurde aus drei unabhängigen Messwerten bestimmt.

3.7 ELISA-Ablauf

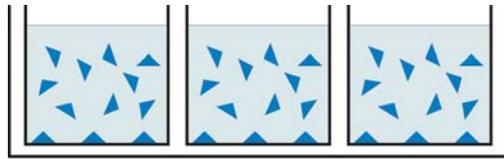
Aufgrund der zahlreichen Untersuchungen und ihrer Auswertung wurde folgendes ELISA Testsystem festgelegt:

Als Festphase wurde hauptsächlich die Platte der Firma Costar verwendet, da bei Halbvolumen-Mikrotiterplatten Material gespart werden kann. Die Mikrotiterplatte der Firma Greiner lieferte äquivalente Ergebnisse. Das Peptid wurde in 0,05 M Karbonatpuffer aufgelöst, pro Kavität 50 µl mit einer Konzentration von 25 µg/ml auf die Platte beschichtet und bei Raumtemperatur eingetrocknet. Vor der Blockierung wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer (PBS pH 7,4 + 1 % Tween 20) gewaschen. In jede Vertiefung wurden 100 µl Blockierlösung, mit 5 % Milchpulver und 1 % Fischgelatine in Tris Puffer pH 8,0 aufgelöst, pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte dreimal gewaschen und auf Zellstoff ausgeklopft. Die Proben bzw. der Standard wurden in destilliertem Wasser aufgelöst und gleichzeitig mit dem Erstantikörper (Verdünnung 1:10 000 in Verdünnungspuffer) zu je 25 µl pipettiert. Nach 2 Stunden Inkubationszeit bei Raum-

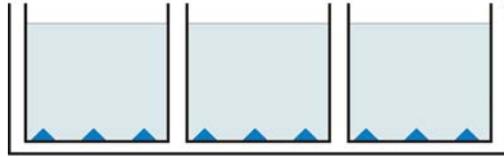
Ergebnisse

temperatur wurde dreimal gewaschen und auf Zellstoff ausgeklopft. Das Konjugat wurde in der Verdünnung 1:10 000 eingesetzt, zu je 50 µl pipettiert und 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Es folgte wieder ein dreimaliger Waschschrift. Nach dem Ausklopfen wurde in jede Kavität 50 µl Substrat TMB pipettiert und für 13 Minuten unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Die Reaktion wurde mit 50 µl Stopplösung der Firma Sigma abgestoppt. Anschließend wurden die Extinktionen der Lösungen in den Kavitäten im ELISA Reader bei 450 nm gemessen und mit dem Programm Easy Fit 7.01 der Firma Tecan ausgewertet. Die verschiedenen Graphen wurden mit dem Programm GraphPad erstellt.

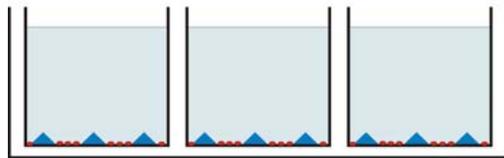
Ergebnisse



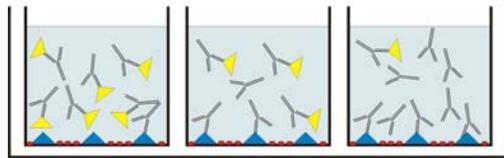
1. Beschichtung mit QYNAD
(25 µg/ml in 0.05 M Karbonatpuffer)



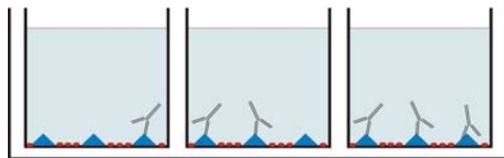
2. Dreimal waschen mit Waschpuffer
(PBS pH 7.4, 1 % Tween 20)



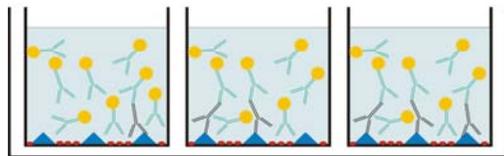
3. Blockierung mit 5 % Milchpulver +
1 % Fischgelatine in Tris Puffer pH 8.0



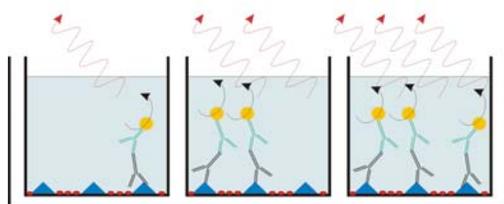
4. Inkubation mit Probe und Erstantikörper
gegen QYNAD (1:10 000)



5. Dreimal waschen mit Waschpuffer



6. Konjugatinkubation (1:10 000) und
dreimal waschen



7. Substratzugabe (TMB) und
Detektion



Serumantigen-Konzentration

Abbildung 3-7 **Graphische Darstellung des ELISA Ablaufes.** In dieser Abbildung sind die einzelnen Schritte des etablierten ELISA Tests dargestellt.

4 Diskussion

Bei der Entwicklung eines neuen ELISAs ist der erste wichtige Schritt, für das gewünschte Antigen eine geeignete Mikrotiterplatte zu finden. Zu diesem Zweck wurden, wie im Ergebnisteil geschildert, verschiedene Mikrotiterplatten ausgetestet. Die Schwierigkeit liegt darin, das geeignete Material für die Immobilisierung des gewünschten Peptids auszuwählen, welches unter bestimmten Reaktionsbedingungen das geringste Hintergrundsignal, aber hohe OD-Werte liefert. Einige der ausgewählten Platten zeigten bei der Messung einen hohen Hintergrund und auch keine Konzentrationsabstufung nach der Beschichtung mit unterschiedlichen Mengen des Testpeptids. Die Ursache für diese Unterschiede kann zum einen in der unterschiedlichen Beschaffenheit des Plattenmaterials liegen, welches zur schlechteren Bindung des gewünschten Peptids führen kann. Neben dem Material der Platte spielt natürlich auch die Oberflächenladung und aktive Seitenketten der Bindungsfläche der Kavitäten eine entscheidende Rolle. Es hat sich gezeigt, dass Platten aus dem Material Polystyren mit einer hydrophoben/ionischen Oberfläche der Firma Costar am besten für die Analyse geeignet sind.

Neben der Beschaffenheit der Platten spielt für die Beschichtung der Oberfläche auch die Zusammensetzung der Lösungen eine wichtige Rolle. Eine ungeeignete Pufferzusammensetzung kann zur schlechten Bindung des Peptids oder zu einem hohen Hintergrund führen. Dies kann daran liegen, dass die Blockierlösung nicht alle unspezifischen Bindungsstellen blockiert, so dass unspezifische Substanzen gebunden werden. Um dies zu überprüfen, wurden die ausgesuchten Mikrotiterplatten mit den verschiedenen Blockierlösungen ausgetestet. Es wurden mehrere ELISAs durchgeführt, und dadurch konnte durch den deutlichen Unterschied zwischen beschichteten und nicht beschichteten Kavitäten eine geeignete Platte gefunden werden, die einen niedrigen Hintergrund zeigte und auch eine gute Konzentrationsabstufung. Um für die weiteren Tests Material zu sparen, wurden Halbvolumen-Mikrotiterplatten verwendet.

Nachdem nun die geeignete Mikrotiterplatte festgelegt worden war, sollten nun verschiedene Beschichtungsarten zur Optimierung der Methode ausgetestet werden. Wie im Ergebnissteil zu sehen ist, erbrachte die Kältemethode mit den verschiedenen Beschichtungspuffern sehr niedrige Werte. Dies kann an einer erniedrigten Bindungsrate bei 4 °C liegen, d.h., dass das zu bindende Peptid durch die relativ niedrige Temperatur in seiner Molekülbewegung eingeschränkt wird und dadurch die Bindung an die Platte erschwert wird. Ein anderer Grund ist, dass das Peptid eine bestimmte Temperatur benötigt, damit eine optimale Interaktion zwischen Platte und Peptid stattfinden kann. Diese Behauptung wurde auch durch die Beschichtungsarten, die bei Raumtemperatur stattgefunden haben, mit eindeutigen Ergebnissen bestätigt. Ein weiterer wesentlicher Faktor zur Bestimmung der Beschichtungsart war die Auswahl des geeigneten Beschichtungspuffers. Die unterschiedlichen Ergebnisse kann man sich dadurch erklären, dass die Löslichkeit des Peptids durch verschiedene Eigenschaften der Pufferlösungen beeinflusst werden kann. Dabei spielen der pH-Wert, die Elektrolytkonzentration und das Lösungsmittel eine große Rolle. Durch diese Komponenten kann das Peptid in seiner Struktur verändert oder auch ungleichmäßig auf die Platte verteilt bzw. beschichtet werden, und dadurch schlechter gebunden werden.

Als nächster Schritt sollte ein geeigneter Verdünnungspuffer für die verschiedenen Bestandteile des ELISAs ausgesucht werden. Auch hier konnte nachgewiesen werden, dass der pH-Wert, die Elektrolytkonzentration und das Lösungsmittel zu verschiedenen Ergebnissen führen können. Aus diesem Grund wurden, auch wie schon erwähnt, zwei verschiedene Verdünnungspuffer benützt. Sowohl der Erstantikörper als auch das Zweitantikörper-Konjugat zeigten in einem Tris-Puffer deutlich bessere Ergebnisse.

Der schwierigste Teil dieser Arbeit war der Nachweis und die Konzentrationsbestimmung des Peptids in Liquor- und Serumproben. Um die Qualität der Methode zu überprüfen, wurden anfangs Kontrollen mit einer bestimmten Menge an Peptid hergestellt und im Testsystem eingesetzt. Es wurden verschiedene Verdünnungen dieser Proben ausgetestet, die sowohl qualitativ als auch quantitativ gute Ergebnisse lieferten. Es gab aber Schwierigkeiten, als Liquor- und Serumproben von Patienten eingesetzt wurden. Der entwickelte ELISA konnte zwar alle Proben qualitativ eindeutig erkennen,

Diskussion

bei der Konzentrationsbestimmung waren aber alle gemessenen Werte höher als die massenspektrometrisch bestimmte Menge. Ein Grund für diese Problematik könnte sein, dass die Zusammensetzung von Liquor und Serum das Testsystem beeinflusst, diese beeinflussenden Faktoren aber in einer massenspektrometrischen Messung nicht erfasst werden.

In dieser Arbeit konnte eine ELISA für den Nachweis eines kleinen Peptids aus Liquor- und Serumproben etabliert werden. Es wurde gezeigt, dass diese Methode für den qualitativen Nachweis geeignet ist. In weiteren Versuchen können nun die Bedingungen verändert werden, so dass dieses Testsystem auch geringere, quantitative Unterschiede im Patientenmaterial erkennen kann.

5 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines Immunoassays für den spezifischen Nachweis eines kleinen Peptids aus Liquor- und Serumproben. Für die Analyse wurden verschiedene Mikrotiter-Assayplatten in Verbindung mit unterschiedlichen Pufferlösungen ausgetestet. Es konnte gezeigt werden, dass Polystyren-Platten mit einer hydrophoben Oberfläche in Kombination mit Karbonatpuffer bei Raumtemperatur die beste Bindung des Testpeptids lieferten.

Desweiteren wurden die Bedingungen für den Nachweis des Peptids mit einem spezifischen, polyklonalen Antikörper optimiert. Durch verschiedene experimentelle Modifikationen konnten die besten Bedingungen für die Analyse und Detektion bestimmt werden. Es wurde gezeigt, dass alle Schritte unter Raumtemperatur die optimalen Ergebnisse lieferten.

Schließlich konnte mit diesem Testverfahren das gewünschte Antigen auch aus Patientenmaterial wie Liquor- und Serumproben nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe eines Immunoabsorptions-Assays kleine Peptide spezifisch aus Liquor- und Serumproben nachgewiesen werden können.

6 Literatur

Aulkemeyer P, Hausner G, Brinkmeier H, Weber F, Wurz A, Heidenreich F, Ruedel R
The small sodium-channel blocking factor in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients is probably an oligopeptide. J Neurol Sci 172:49-54. (2000)

Beck-Sickinger AG, Durr H, Jung G **Semiautomated T-bag peptide synthesis using 9-fluorenyl-methoxycarbonyl strategy and benzotriazol-1-yl-tetramethyluronium tetrafluoroborate activation.** Pept Res 4:88-94. (1991)

Beyer **Entwicklung und Charakterisierung eines Enzymimmunoassays für die Analyten Benzol, Toluol und Xylole (BTX).** Chemische Fakultät, München TU München. (1998)

Bos ES, van der Doelen AA, van Rooy N, Schuurs AH **3,3',5,5' - Tetramethylbenzidine as an Ames test negative chromogen for horse-radish peroxidase in enzyme-immunoassay.** J Immunoassay 2:187-204. (1981)

Bradl M, Hohlfeld R **Molecular pathogenesis of neuroinflammation.** J Neurol Neurosurg Psychiatry 74:1364-1370. (2003)

Brinkmeier H, Aulkemeyer P, Wollinsky KH, Ruedel R **An endogenous pentapeptide acting as a sodium channel blocker in inflammatory autoimmune disorders of the central nervous system.** Nat Med 6:808-811. (2000)

Brinkmeier H, Weber F, Aulkemeyer P, Wollinsky KH, Ruedel R **The pentapeptide QYNAD does not block voltage-gated sodium channels.** Neurology 60:1871; author reply 1871-1872. (2003)

Cummins TR, Renganathan M, Stys PK, Herzog RI, Scarfo K, Horn R, Dib-Hajj SD, Waxman SG **The pentapeptide QYNAD does not block voltage-gated sodium channels.** Neurology 60:224-229. (2003)

Engvall E, Jonsson K, Perlmann P **Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes.** Biochim Biophys Acta 251:427-434. (1971)

Law **Immunoassay: A Practical Guide.** London: Taylor & Francis. (1996)

Meuth SG, Budde T, Duyar H, Landgraf P, Broicher T, Elbs M, Brock R, Weller M, Weissert R, Wiendl H **Modulation of neuronal activity by the endogenous pentapeptide QYNAD.** Eur J Neurosci 18:2697-2706. (2003)

Nakane PK, Pierce GB, Jr. **Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens.** J Cell Biol 33:307-318. (1967)

Peter G. Wells KL, Christian Blaise **Immunoassays: Applications for the Aquatic Environment.** Boston: CRC Press. (1998)

Petereit HF, Heiss WD **New diagnostic criteria for multiple sclerosis.** Ann Neurol 51:533-534; author reply 534. (2002)

Pfortner **Entwicklung von Enzymimmunoassays (ELISA) zur Bestimmung von Huminstoffgebundenen Nitroaromaten.** Chemische Fakultät, München: TU München. (1998)

Porstmann T, Kiessig ST **Enzyme immunoassay techniques. An overview.** J Immunol Methods 150:5-21. (1992)

- Reske D, Petereit HF, Heiss WD **Difficulties in the differentiation of chronic inflammatory diseases of the central nervous system-value of cerebrospinal fluid analysis and immunological abnormalities in the diagnosis.** Acta Neurol Scand 112:207-213. (2005)
- Schuurs AH, Van Weemen BK **Enzyme-immunoassay.** Clin Chim Acta 81:1-40. (1977)
- Weber F, Ruedel R, Aulkemeyer P, Brinkmeier H **The endogenous pentapeptide QYNAD induces acute conduction block in the isolated rat sciatic nerve.** Neurosci Lett 317:33-36. (2002)
- Willison HJ **The immunobiology of Guillain-Barre syndromes.** J Peripher Nerv Syst 10:94-112. (2005)
- Wurz A, Brinkmeier H, Wollinsky KH, Mehrkens HH, Kornhuber HH, Ruedel R **Cerebrospinal fluid and serum from patients with inflammatory polyradiculoneuropathy have opposite effects on sodium channels.** Muscle Nerve 18:772-781. (1995)
- Yalow RS, Berson SA **Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods.** Nature 184 (Suppl 21):1648-1649. (1959)

7 Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1	Prinzip des kompetitiven, direkten ELISA.
Abbildung 1-2	Prinzip des kompetitiven, indirekten ELISA.
Abbildung 1-3	Prinzip des nicht kompetitiven ELISA.
Abbildung 1-4	Typische Kalibrierkurve im ELISA zur Bestimmung der Konzentration einer Substanz in einer Probe.
Abbildung 3-1	Optimierung der Beschichtungskonzentration.
Abbildung 3-2	Kontrollexperiment zur Überprüfung der Eigenabsorption der Mikrotiterplatte.
Abbildung 3-3	Kalibrierkurve für die Konzentrationsbestimmung des Peptids Glutamin-Tyrosin-Asparagin-Alanin-Aspartat (QYNAD) in Lösung.
Abbildung 3-4	Optimierung der Verdünnung des ersten Antikörpers gegen das Peptid Glutamin-Tyrosin-Asparagin-Alanin-Aspartat (Anti-QYNAD).
Abbildung 3-5	Untersuchung der Lagerungszeit der beschichteten Platten.
Abbildung 3-6	Optimierung der Temperaturbedingungen.
Abbildung 3-7	Graphische Darstellung des ELISA Ablaufes.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1	Unterschiede der verschiedenen ELISA Methoden
Tabelle 3-1	Vergleich der verschiedenen Mikrotiterplatten.
Tabelle 3-2	Vergleich der verschiedenen Beschichtungsmethoden mit unterschiedlichen Beschichtungspuffern.

8 Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Rüdel bedanken, der mir diese Doktorarbeit ermöglicht hat. Für seine Betreuung, Unterstützung und Ermutigung, aber auch für seine Kritik danke ich ihm sehr.

Weiterhin danke ich Prof. Brinkmeier für seine Unterstützung und seine Diskussionsbereitschaft, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke Christiane Buchholz, Helga Brauchle, Sylvia Gabriel und Erhard Schoch, die mich durch ihre kollegiale Zusammenarbeit und ihrer freundschaftlichen Atmosphäre während meiner Doktorarbeit sehr unterstützt haben.

Zudem möchte ich mich bei Prof. Bachem bedanken, der für meine Fragen stets ein offenes Ohr hatte.

Firma Sension und Herrn Schneider danke ich für die Unterstützung und Hilfe.

Mein besonderer Dank gilt meiner gesamten Familie, die mich stets unterstützt, ermutigt und immer an mich geglaubt hat.

Mein größter Dank gilt meinem Ehemann Enrico. Ohne seine uneingeschränkte Unterstützung und seine Kritik hätte ich dies alles nicht geschafft. Seine Geduld und seine Liebe haben mir die nötige Kraft gegeben mein Ziel und meine Träume zu verwirklichen.