

**Untersuchungen zur Charakterisierung des gegen
Hepatitis A-Virus gerichteten monoklonalen IgM-
Antikörpers 4E1.**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Gottstein, Martin

2015

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. B. Flehmig

2. Berichterstatter: Professor Dr. K. Klingel

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis	9
Tabellenverzeichnis	12
Versuchsverzeichnis.....	14
1 Einleitung.....	16
1.1 Hepatitis A.....	16
1.1.1 Geschichte	16
1.1.2 Klassifizierung	16
1.1.3 Symptome	17
1.1.4 Immunantwort	17
1.1.5 Transmission.....	18
1.1.6 Epidemiologie.....	18
1.2 IgM-Antikörper.....	19
1.2.1 Allgemein	19
1.2.2 Diagnostische Bedeutung von [monoklonalen] IgM-Antikörpern.....	21
1.2.3 Der gegen HAV gerichtete monoklonale Antikörper IgM 4E1.....	22
1.3 Ziel der Arbeit.....	22
2 Material und Methoden	24
2.1 Materialien.....	24
2.1.1 Verbrauchsmaterialien	24
2.1.2 Laborgeräte.....	28
2.1.3 Chemikalien	29
2.2 Methoden	35
2.2.1 Produktion des monoklonalen Antikörpers IgM 4E1 im Hybridoma- Expressmedium	35
2.2.2 Zentrifugal-Filtration zur Konzentration und partiellen Aufreinigung des Ausgangsmaterials (monoklonaler Antikörper IgM 4E1 im Hybridoma Expressmedium-Zellkulturüberstand)	36
2.2.3 Polyethylenglykol 6000-Präzipitation.....	37
2.2.4 Thiophile Adsorptions-Chromatographie (Thiophilic Adsorption Chromatography)	39

2.2.5	Größenausschluss-Chromatographie (Size Exclusion Chromatography) / Gelfiltrations-Chromatographie (Gel-filtration Chromatography)	41
2.2.6	Pierce Bicinchoninic Acid Protein Assay	44
2.2.7	Bradford Protein Assay	47
2.2.8	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Silberfärbung	50
2.2.9	Pufferaustausch durch Dialyse (Slide-A-Lyzer 10k Dialysis Cassette)...	52
2.2.10	Dot-Blot-Chromatographie	52
2.2.11	ELISA	53
2.2.12	FITC-Markierung und direkte Immunfluoreszenz-Mikroskopie	57
3	Ergebnisse	61
3.1	Herstellung des MAK 4E1 – Zellkultur-Überstandes	61
3.2	Reinigung des monoklonalen Antikörpers IgM 4E1	62
3.2.1	Reinigung mittels Konzentration durch Zentrifugalfiltration	64
3.2.2	Reinigung des Ausgangsmaterials durch PEG 6000-Fällung	67
3.2.3	Reinigung mittels GE Healthcare HiTrap® IgM Purification HP Column TAC	67
3.2.4	Reinigung mittels GE Healthcare Sephacryl S-1000 SEC	82
3.3	Vergleich der Methoden zur Proteinbestimmung: Pierce Bicinchoninic Acid Protein Assay und Bradford Protein Assay	89
3.4	Vergleich des IgM 4E1-HAV-Antigen-ELISA mit dem IgG 7E7-HAV-Antigen-ELISA	94
3.4.1	Extinktionswerte jeder Verdünnung der Positivkontrolle	95
3.4.2	Titerwerte	112
3.5	Darstellung des MAK IgM 4E1 mittels direkter Immunfluoreszenz und FITC-Markierung	119
4	Diskussion	124
4.1	Reinigung des MAK IgM 4E1	124
4.1.1	Zentrifugal-Filtration und PEG 6000 - Präzipitation	126
4.1.2	Reinigung mittels Größenausschluss-Chromatographie (SEC) unter Verwendung von Sephacryl S-1000	129
4.1.3	Reinigung mittels Thiophiler Adsorptions-Chromatographie (TAC) unter Verwendung von HiTrap® IgM Purification HP Column	130
4.2	Vergleich der Methoden zur Proteinbestimmung: BCA und Bradford Protein Assay	132
4.3	Vergleich des IgM 4E1-HAV-Antigen-ELISA mit dem IgG 7E7-HAV-Antigen-ELISA	134
5	Zusammenfassung	138

6	Literaturverzeichnis	140
7	Erklärung	157
8	Danksagung.....	158

Abkürzungsverzeichnis

% μ (E)	Einheit der relativen Spannweite in Prozent des jeweiligen Extinktionsmittelwerts
10 ⁴	Bei einer Membranporengröße von 10.000 kDa und 100.000 kDa zweifach konzentriertes Ausgangsmaterial
10 ⁵	Bei einer Membranporengröße von 100.000 kDa einfach konzentriertes Ausgangsmaterial
°C	Grad Celsius
μ	Mittelwert
μ g	Mikrogramm
μ m	Mikrometer
4E1 abs	Absolute Titerwerte des jeweiligen IgM 4E1-HAV-Antigen-ELISA-Versuches
7E7 abs	Absolute Titerwerte des jeweiligen IgG 7E7-HAV-Antigen-ELISA-Versuches
Abb	Abbildung
AK	Antikörper
BB	Binding Buffer (Bindungspuffer)
BCA	bicinchoninic acid (Bicinchoninsäure)
BSA	Bovines Serum-Albumin
c	Konzentration
CBB G250	Coomassie Brilliant Blue G250 (Farbstoffreagenz)
CV	Column Volume(s) (Säulenvolumen)
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidi-2-phenylindol (Fluoreszenzfarbstoff)

DL	Durchlauf des Doppelkonzentrats bei der Zentrifugalfiltration
E	Extinktion
EB	Elution Buffer (Elutionspuffer)
ELISA / EIA	Enzyme (Linked) Immunosorbent Assay
Fa.	Firma
FCS	Fetal Calf Serum = fetales Kälber-Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat (Fluoreszenzfarbstoff)
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
HAV	Hepatitis A-Virus
HyEx	Hybridoma-Expressmedium-Zellkulturüberstand = unkonzentriertes Ausgangsmaterial
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
kDa	kiloDalton
LFR	Linear Flow Rate [cm/min]
M	Molarität [Mol pro Liter]
MAK	Monoklonaler Antikörper
Max	Maximum der Extinktions- / Titerwerte
min	Minute
Min	Minimum der Extinktions- / Titerwerte
ml	Milliliter
mM	Stoffmengenkonzentration [Millimol pro Liter]
MWCO	Molecular Weight Cut Off [Da]
nm	Nanometer

OD	Optische Dichte = Absorbanz = Extinktion = $E_{\lambda} = \lg\left(\frac{I_0}{I}\right)$
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PEG	Polyethylenglykol
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
R	Statistische Spannweite
RB	Regeneration Buffer (Regenerationspuffer)
RCF	Relative Centrifugal Force [g]
Rneg	Statistische Spannweite vom Mittelwert zum Minimum
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
Rpos	Statistische Spannweite vom Mittelwert bis zum Maximum
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)
SEC	Size Exclusion Chromatography (Größenausschluss-Chromatographie)
TAC	Thiophilic Adsorption Chromatography (Thiophile Adsorptions-Chromatographie)
VFR	Volumetric Flow Rate (Flussgeschwindigkeit)
vgl.	Vergleiche
VP	Verdünnungspuffer (s. 2.2.11)
WP	Waschpuffer (s. 2.2.11)
λ	Formelzeichen für Wellenlänge [nm]

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines IgM-Antikörpers.	20
Abbildung 2: BCA-Reaktion: Bildung des violetten Chelatkomplexes	45
Abbildung 3: Struktur des Coomassie Brilliant Blue G 250 - Moleküls	48
Abbildung 4: Adsorptionsmaxima der Coomassie Brilliant Blue G 250- Moleküle abhängig von der Protonierung	48
Abbildung 5: Mechanismus und Prozess der Nachweisreaktion im ELISA	54
Abbildung 6: Hybridoma-Zellkultur zur Produktion des gegen HAV gerichteten MAK IgM 4E1 in 250facher Vergrößerung.	61
Abbildung 7: Hybridoma-Zellkultur zur Produktion des gegen HAV gerichteten MAK IgM 4E1 in 400facher Vergrößerung.	62
Abbildung 8: Darstellung des Ausgangsmaterials in SDS-PAGE.	63
Abbildung 9: Darstellung des IgM-Gehalts der Fraktionen des Durchlaufs des Doppelkonzentrats bei der Zentrifugalfiltration und Vergleich dessen mit BSA-Verdünnungen.....	66
Abbildung 10: Versuch A1: SDS-PAGE der HiTrap® TAC unter Verwendung von 5 ml des durch die Zentrifugalfiltration hergestellten Einfachkonzentrats versetzt mit 0,8M Ammoniumsulfat, steril filtriert und entgast bei 0,45 µm.	69
Abbildung 11: SDS-PAGE des Versuches A6: HiTrap® TAC unter Verwendung von 10 ml von folgendem Probenmaterial: Die Hauptelutionsfraktionen E3 und E4 von zwei vorhergehenden TAC-Versuchen unter Verwendung des konzentrierten Materials wurden vereinigt, versetzt mit 0,8M Ammoniumsulfat und im Verhältnis 2:3 mit Bindungspuffer verdünnt, anschließend steril filtriert und entgast bei 0,45 µm.....	71
Abbildung 12: Versuch B1: SDS-PAGE (2) der HiTrap® TAC unter Verwendung von 100 ml des unbehandelten Ausgangsmaterials (= Hybridoma-Eypressmedium- Zellkulturüberstand), versetzt mit 0,8M Ammoniumsulfat, anschließend steril filtriert und entgast bei 0,45 µm.....	73
Abbildung 13: Versuch B1: SDS-PAGE (1) der HiTrap® TAC unter Verwendung von 100 ml des unbehandelten Ausgangsmaterials (= Hybridoma-Expressmedium- Zellkulturüberstand), versetzt mit 0,8M Ammoniumsulfat, anschließend steril filtriert und entgast bei 0,45 µm.....	74
Abbildung 14: Versuch B2: SDS-PAGE der HiTrap® TAC unter Verwendung des folgenden Probenmaterials: E3 und E4 von Versuch B1 vereinigt, verdünnt mit sterilem Bindungspuffer im Verhältnis 1:7, versetzt mit 0,8M Ammoniumsulfat, anschließend steril filtriert und entgast bei 0,45 µm..	75
Abbildung 15: Dot-Blot-Chromatographie des Versuches C1: HiTrap®-TAC unter Verwendung von 25 ml des unbehandelten	

	Ausgangsmaterials, versetzt mit 0,8 M Ammoniumsulfat, steril filtriert und entgast bei 0,45 µm.	78
Abbildung 16:	Versuch C1: SDS-PAGE der HiTrap® TAC unter Verwendung von 25 ml des unbehandelten Ausgangsmaterials, versetzt mit 0,8M Ammoniumsulfat, anschließend steril filtriert und entgast bei 0,45 µm.....	80
Abbildung 17:	SDS-PAGE zur Darstellung des Ausgangsmaterials, dessen Einfach- und Doppelkonzentrat sowie der Fraktionen des Pool 19/8.....	81
Abbildung 18:	Dot-Blot-Ergebnisse der SEC unter Verwendung von 5 ml des Ausgangsmaterials in 1:1-Verdünnung mit PBS steril.	84
Abbildung 19:	SDS-PAGE des Ausgangsmaterials und der ausgewählten Elutionsfraktionen der Größenausschlusschromatographie unter Verwendung von 5 ml des im Verhältnis 1:1 mit PBS steril verdünnten Ausgangsmaterials.....	85
Abbildung 20:	Dot-Blot-Ergebnisse der SEC unter Verwendung von 5 ml des unverdünnten Zellkulturüberstandes.....	86
Abbildung 21:	SDS-PAGE des Ausgangsmaterials und der ausgewählten Elutionsfraktionen der Größenausschlusschromatographie unter Verwendung des unverdünnten Ausgangsmaterials.	87
Abbildung 22:	Bestimmung der Proteinkonzentrationen im Ausgangsmaterial und dessen verschiedenen Konzentrate im BCA- und Bradford Protein Assay.....	90
Abbildung 23:	Verlauf der Extinktionswerte der Verdünnungen der Positivkontrolle im IgM 4E1-HAV-Antigen-ELISA.	96
Abbildung 24:	Extinktionswerte der Verdünnungen 1:3, 1:1 und 1:0 der Positivkontrolle im IgM 4E1-HAV-Antigen-ELISA mit jeweils dargestellten Mittelwerten.....	98
Abbildung 25:	Extinktionswerte der Verdünnungen 1:31, 1:15 und 1:7 der Positivkontrolle im IgM 4E1-HAV-Antigen-ELISA mit jeweils dargestellten Mittelwerten.....	99
Abbildung 26:	Relative Spannweiten (= Prozentuale positive und negative Abweichungen vom Extinktionsmittelwert) der Probenverdünnungen im IgM 4E1-HAV-Antigen-ELISA.	100
Abbildung 27:	Verlauf der Extinktionswerte der Verdünnungen der Positivkontrolle im IgG 7E7-HAV-Antigen-ELISA.....	103
Abbildung 28:	Extinktionswerte der Verdünnungen 1:3, 1:1 und 1:0 der Positivkontrolle im IgG 7E7-HAV-Antigen-ELISA.....	104
Abbildung 29:	Extinktionswerte der Verdünnungen 1:31, 1:15 und 1:7 der Positivkontrolle im IgG 7E7-HAV-Antigen-ELISA.....	105
Abbildung 30:	Relative Spannweiten (= Prozentuale positive und negative Abweichungen) vom Extinktionsmittelwert der Probenverdünnungen im IgG 7E7-HAV-Antigen-ELISA.	106
Abbildung 31:	Absolute Spannweiten der Extinktionswerte der Verdünnungen beider ELISA im Vergleich.....	111

Abbildung 32: Absolute Spannweiten jeder Verdünnung in Prozent des Extinktionsmittelwertes (= % $\mu(E)$) der jeweiligen Verdünnung.	112
Abbildung 33: Verlauf der absoluten Titerwerte im IgM 4E1-HAV-Antigen-ELISA mit dargestellter Streuung um den Mittelwert.	113
Abbildung 34: Verlauf der absoluten Titerwerte im IgG 7E7-HAV-Antigen-ELISA mit dargestellter Streuung um den Mittelwert.	115
Abbildung 35: Verläufe der absoluten Titerwerte der IgM 4E1- und IgG 7E7-HAV-Antigen-ELISAs.	117
Abbildung 36: Vergleich der Extrema und Spannweiten der Titerwerte im IgM 4E1- und IgG 7E7-HAV-Antigen-ELISA.	118
Abbildung 37: Darstellung von FITC-markierten MAK IgM 4E1 in einer Fibroblastenkultur (leuchtend grüne Punkte) in 1000facher Vergrößerung. Indirekter HAV-Nachweis durch Immunfluoreszenz.	119
Abbildung 38: Darstellung von FITC-markierten MAK IgM 4E1 in einer Fibroblastenkultur (leuchtend grüne Punkte) in 1000facher Vergrößerung. Indirekter HAV-Nachweis durch Immunfluoreszenz.	120
Abbildung 39: Darstellung von FITC-markierten MAK IgM 4E1 in einer Fibroblastenkultur (leuchtend grüne Punkte) und von DAPI-markierten Zellkernen (blaue Figuren) in 1000facher Vergrößerung. Indirekter HAV-Nachweis durch Immunfluoreszenz.	121
Abbildung 40: Darstellung von FITC-markierten MAK IgM 4E1 in einer Fibroblastenkultur (leuchtend grüne Punkte) in 1000facher Vergrößerung. Indirekter HAV-Nachweis durch Immunfluoreszenz.	122
Abbildung 41: Darstellung von FITC-markierten MAK IgM 4E1 in einer Fibroblastenkultur (leuchtend grüne Punkte) und von DAPI-markierten Zellkernen (blaue Figuren) in 1000facher Vergrößerung. Indirekter HAV-Nachweis durch Immunfluoreszenz.	123

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die Arbeitsschritte der Thiophilen Wechselwirkungs-Chromatographie nach dem Protokoll der Fa. GE Healthcare (modifiziert).....	41
Tabelle 2: Übersicht über die Arbeitsschritte der Größenausschluss-Chromatographie nach dem oben beschriebenen Protokoll. ...	44
Tabelle 3: Belegungsplan der Kontrolllösungen und Verdünnungen auf der 96-well-Mikrotiterplatte im HAV-Antigen-ELISA.....	57
Tabelle 4: Durchschnittswerte der Proteinbestimmungen des Ausgangsmaterials und dessen Konzentrationen im BCA Protein Assay.....	65
Tabelle 5: Proteinkonzentrationen des unbehandelten sowie einfach und doppelt konzentrierten Ausgangsmaterials wie auch der Elutionsfraktionen aus HiTrap®-TAC Versuch C1.....	79
Tabelle 6: Übersicht über die im BCA Protein Assay bestimmten Proteinkonzentrationen der Elutionsfraktionen und des Ausgangsmaterials der Größenausschlusschromatographie unter Verwendung von 5 ml des im Verhältnis 1:1 mit PBS steril verdünnten Ausgangsmaterials.....	84
Tabelle 7: Übersicht über die im BCA Protein Assay bestimmten Proteinkonzentrationen der Elutionsfraktionen und des Ausgangsmaterials der Größenausschlusschromatographie unter Verwendung von 5 ml des unverdünnten Ausgangsmaterials.	86
Tabelle 8: Durchschnittswerte der Proteinbestimmungen des Ausgangsmaterials und dessen verschiedenen Konzentrationen im BCA- und Bradford Protein Assay.....	89
Tabelle 9: Proteinkonzentrationen des unbehandelten sowie einfach und doppelt konzentrierten Ausgangsmaterials wie auch der Elutionsfraktionen aus HiTrap®-TAC Versuch C1.	91
Tabelle 10: Bestimmte Proteinkonzentrationen der Ausgangsmaterialien und der in den TAC-Versuchen C1, C2 und C3 gewonnenen Elutionsfraktionen durch den BCA Protein Assay.	92
Tabelle 11: Bestimmte Proteinkonzentrationen der Ausgangsmaterialien und der in den TAC-Versuchen C1, C2 und C3 gewonnenen Elutionsfraktionen durch den Bradford Protein Assay.....	93
Tabelle 12: Prozentuale Abweichungen der Extinktionsmittelwerte zweier jeweils aufeinander folgenden Verdünnungen im IgM 4E1-HAV-Antigen-ELISA vom Verdünnungsschema in der Übersicht.	96
Tabelle 13: Prozentuale Abweichungen der Extinktionsmittelwerte zweier jeweils aufeinander folgenden Verdünnungen im IgG 7E7-HAV-Antigen-ELISA vom Verdünnungsschema in der Übersicht	102

Tabelle 14: Gegenüberstellung der die Extinktionswerte beider ELISAs charakterisierenden Größen. E _{Max} 1: 0 und E _{Min} 1: 0 = maximaler und minimaler Extinktionswert in der unverdünnten Probe (1:0) in OD.....	109
Tabelle 15: Gegenüberstellung der prozentualen Abweichungen der Extinktionsmittelwerte zweier jeweils aufeinander folgenden Verdünnungen im IgM 4E1 und im IgG 7E7-HAV-Antigen- ELISA vom Verdünnungsschema in der Übersicht.....	110
Tabelle 16: Gegenüberstellung der die Titerwerte beider ELISAs charakterisierenden Größen.....	116

Versuchsverzeichnis

- A1 / A2: HiTrap©-TAC unter Verwendung von 10 ml des bei einer Membranporengröße von 100.000 kDA einfach konzentrierten Ausgangsmaterials (= Hybridoma-Expressmedium-Zellkulturüberstand), versetzt mit 0,8M Ammoniumsulfat, steril filtriert und entgast bei 0,45 µm
- A3 / A4 / A5: HiTrap©-TAC unter Verwendung von 10 ml des bei einer Membranporengröße von 100.000 kDA einfach konzentrierten Ausgangsmaterials, versetzt mit 1M / 1,2M / 1,6M Ammoniumsulfat, steril filtriert und entgast bei 0,45 µm
- A6: HiTrap©-TAC unter Verwendung des folgenden Probenmaterials: Vereinigung der Elutionsfraktionen E3 und E4 der Versuche A1 und A2 (insgesamt also 4 Fraktionen), versetzt mit 0,8M Ammoniumsulfat, verdünnt mit Bindungspuffer im Verhältnis 2:3 (4 ml Probenmaterial verdünnt mit 6 ml Bindungspuffer). Steril filtriert und entgast bei 0,45 µm.
- B1: HiTrap©-TAC unter Verwendung von 100 ml des unkonzentrierten Ausgangsmaterials, versetzt mit 0,8M Ammoniumsulfat, steril filtriert und entgast bei 0,45 µm
- B2: HiTrap©-TAC unter Verwendung des folgenden Probenmaterials: E3 und E4 von Versuch B1 vereinigt, verdünnt mit sterilem Bindungspuffer im Verhältnis 1:7, versetzt mit 0,8M Ammoniumsulfat, anschließend steril filtriert und entgast bei 0,45 µm.
- B3: HiTrap©-TAC unter Verwendung des folgenden Probenmaterials: E5 bis E9 von Versuch B1 vereinigt, verdünnt mit sterilem Bindungspuffer im Verhältnis 1:1, versetzt mit 0,8M Ammoniumsulfat, anschließend steril filtriert und entgast bei 0,45 µm.

- B4: HiTrap©-TAC unter Verwendung des folgenden Probenmaterials:
Durchlauf fraktion von Versuch B1, versetzt mit 0,8M
Ammoniumsulfat, anschließend steril filtriert und entgast bei 0,45
µm.
- C1 / C2 / C3: HiTrap©-TAC unter Verwendung von 25 ml des
unkonzentrierten Ausgangsmaterials, versetzt mit 0,8M
Ammoniumsulfat, anschließend steril filtriert und entgast bei 0,45
µm.
- D1: Sephacryl©-SEC unter Verwendung von 5 ml des unbehandelten
Zellkulturüberstandes in 1:1-Verdünnung mit sterilem PBS
- D2: Sephacryl©-SEC unter Verwendung von 10 ml des unbehandelten
Zellkulturüberstandes in 1:1-Verdünnung mit sterilem PBS
- D3: Sephacryl©-SEC unter Verwendung von 5 ml des unbehandelten
Zellkulturüberstandes

1 Einleitung

1.1 Hepatitis A

1.1.1 Geschichte

Die „katarrhalische Gelbsucht“, ein Synonym für Hepatitiden (1), wurde bereits in der Geschichte im antiken Griechenland und Rom beschrieben (2). Ein Virus wurde erstmals 1908 als möglicher Auslöser erwähnt (3). Eine weitere Differenzierung des bis ins 20. Jahrhundert auch als „Soldatengelbsucht“ bekannten Krankheitsbildes und deren Auslöser wurde durch unterschiedliche Darstellungen von Inkubationszeit, des Infektionsweges und Verlaufs notwendig. 1947 schlug MacCallum zur Unterscheidung dieser beiden Krankheitsbilder und ihrer Erreger die bis heute gebräuchliche Nomenklatur Hepatitis A und B, sowie Hepatitis A bzw. Hepatitis B-Virus vor (4, 5). Die Darstellung und Identifikation des Hepatitis A-Virus (HAV) gelang durch Verwendung des Elektronenmikroskops im Jahre 1973 (6). Die Identifikation legte den Grundstein zur Entwicklung von Methoden zur Kulturanzucht (7, 8), diagnostischen Tests, Entwicklung und Charakterisierung und eines Impfstoffes (9).

1.1.2 Klassifizierung

Das HAV wird zu der Gruppe der Hepatoviren, eine Untergruppe der Picornaviren (11), gerechnet, enthält positiv-einzelsträngige RNA als Erbinformation und besitzt einen Durchmesser von 27 nm (6). Weiterhin ist das Virus auch bei 60°C noch thermostabil und besitzt eine hohe Umweltresistenz. Bei den Infektionen liegt nur ein Serotyp vor, während bisher vier Genotypen (mit Unterklassifizierungen) beschrieben werden konnten (11). Heute ist klar, dass eine infektiöse Hepatitis durch verschiedene Erreger bedingt sein kann – das Spektrum reicht von Viren über Bakterien bis hin zu Pilzen, Protozoen und Würmern. Diejenigen Viren, die Hepatitiden auslösen können, werden heute in der Gruppe der

hepatotropen Viren zusammengefasst. Die einzigen Gemeinsamkeiten aller Viren dieser Gruppe sind zum einen der Hepatozyt als Hauptreplikationsort und das Verursachen eines bestimmten Krankheitsbildes (10).

1.1.3 Symptome

Nach einer mittleren Inkubationszeit von 28 Tagen (5 bis 50 Tage sind möglich) entwickeln sich zunächst unspezifische Symptome des Unwohlseins gefolgt von gastrointestinalen Symptomen wie Fieber, Übelkeit und Erbrechen, ungewollte Gewichtsabnahme, Bauchschmerzen im oberen rechten Quadranten. Hieran schließen sich zumeist spezifischere Symptome wie dunkler Urin und Ikterus an. Alle Symptome können über einen Zeitraum von etwa 2 Monaten erhalten bleiben. Eine Infektion mit HAV verläuft in der Regel selbstlimitierend und zeigt keine Chronifizierung. Dennoch reicht das Spektrum der Verläufe von asymptomatischen Verläufen, über Krankheitsbilder mit Entwicklung aller Symptome, die auch rezidivierend auftreten können, bis hin zu fulminanten Verläufen mit Todesfolge. (14).

1.1.4 Immunantwort

In der ersten Woche nach Infektion entwickelt sich zunächst die Virämie, wobei die Höhe der Viruslast unabhängig vom Genotyp und bei den betroffenen Menschen variabel ist. Nach etwa einer Woche ist das HAV auch im Stuhl und in der Galle nachweisbar, wodurch der Betroffene zum Überträger und Ausscheider wird. In dieser Phase zeigt der Patient meist nur unspezifische oder keine Symptome. Die Virämiezeit kann mehr als ein Jahr betragen und übersteigt damit die Dauer der Exkretion des Virus im Stuhl (27). Erst nach dem Anstieg der Transaminasen (ALAT und ASAT = Alanin-Amino-Transferase und Aspartat-Amino-Transferase) und des anti-HAV-IgM-Titers in der dritten Woche nach Infektion treten Ikterus und die in 1.1.3 genannten Symptome auf und halten durchschnittlich bis Mitte der neunten Woche an. Die Transaminasen erreichen ihr Maximum in der vierten bis fünften Woche, der IgM-Titer in der fünften und sechsten Woche. Mit dem Abfallen des IgM-Titers sinkt auch die Viruslast in Blut und Stuhl, während

der Gesamt-anti-HAV-Titer ansteigt (21). Der anti-HAV-IgG-Titer übersteigt erst in der Genesungsphase nach vier bis sechs Wochen andauernder akuter Erkrankung den anti-HAV-IgM-Titer und vermittelt die lebenslange Immunität nach abgelaufener Infektion (29 / 14).

1.1.5 Transmission

Die Transmission erfolgt primär fäkal-oral, d. h. meist über mit Fäkalien kontaminierte Nahrungsmittel und Trinkwasser. Dieser Infektionsweg ist determiniert durch des Lebenszyklus des Virus innerhalb seines Wirtes: Üblicherweise nach Aufnahme des Virus in den Verdauungstrakt wird es resorbiert und gelangt über den Blutweg zur Leber, wo es sich in den Hepatozyten repliziert. Hierdurch gelangt es in die Gallenflüssigkeit und somit wieder in den intestinalen Trakt, wo es entweder ausgeschieden oder wiederaufgenommen wird (12). Ausscheider sind also die primäre Ursache des fäkal-oralen Infektionsweges. Dieser Umstand wird durch die Tatsache noch verschärft, dass eine Virämie und damit auch eine Exkretion des Virus über den Stuhl schon vor Einsetzen der Symptomatik vorliegen. Eine Infektion kann auch durch Kontakt mit bereits infizierten Personen, wie auch in selteneren Fällen auf parenteralem Wege stattfinden, wie etwa durch Kontamination von Faktor VIII-Konserven (28).

1.1.6 Epidemiologie

Der häufigste Übertragungsweg, die Kontamination von Trinkwasser und Nahrungsmitteln, verdeutlicht die Wichtigkeit des Zugangs zu sanitären Anlagen und sauberem Trinkwasser. Aus diesem Grund ist die Epidemiologie weltweit regional unterschiedlich. In Industrieländern wie Europa und Nordamerika ist die Inzidenzrate sehr niedrig und sinkt stetig ab (Die Inzidenzrate in den USA entsprach 2012 nach Centers for Disease Control and Prevention-Report 0,5 / 100.000 Einwohner / Jahr; die Inzidenzrate entsprach 2008 in Deutschland nach Robert-Koch-Institut = 1,1 / 100.000 Einwohner / Jahr) (30, 31), während sie in Entwicklungsländern, vor allem in der Subsahara in Afrika, in Indien und in Teilen Südost-Asiens,

durch Endemie bedingt unverändert hoch ist. In der Subsahara-Region in Afrika haben nach Daten der WHO aus 2009 annähernd 100% der 20-24-Jährigen eine Immunität gegen HAV aufgrund stattgehabter Infektion entwickelt (32). In Schwellenländern variiert die Infektionsrate je nach Region (33). In Endemiegebieten, wie in den Entwicklungs- und in Teilen der Schwellenländer, findet eine Infektion mit HAV meist schon im frühen Kindesalter statt, in dem eine Infektion meist asymptomatisch verläuft. Daraus ergibt sich, dass die urbane Bevölkerung zum Großteil eine Immunität entwickelt hat (32). In den Industrieländern hingegen findet eine Infektion zumeist gar nicht statt, sodass die Erwachsenen dieser Region, sofern sie nicht geimpft sind, keine Immunität besitzen. Daher kommt es auch in Industrieländern trotz niedriger und weiter abnehmender Inzidenzraten immer noch zu epidemischen Ausbrüchen (35, 36). Dieser Gegensatz ergibt sich auch zwischen den Teilen der Schwellenländer, die unterschiedliche Infektionsraten aufweisen. Daher besteht ein erhöhtes Risiko für die ungeschützte Population von Industrieländern bei Kontakt mit dem Virus (z. B. durch Reisende in Endemiegebiete), da eine Impfung gegen HAV noch nicht als Standard im Impfplan implementiert ist (33, 34). Aus diesem Grund bleibt die Infektion mit HAV auch und gerade in Industrieländern ein epidemisches Risiko, während weltweit jährlich immer noch Millionen Menschen an Hepatitis A erkranken (35).

1.2 IgM-Antikörper

1.2.1 Allgemein

Ein IgM-Antikörper ist ein Pentamer und besteht aus fünf IgM-Monomeren, die jeweils eine dem IgG- und IgA-Antikörper ähnliche Struktur aufweisen. Die Monomere bestehen aus zwei schweren μ -Ketten und zwei leichten α -Ketten, die jeweils durch Disulfid-Brücken untereinander verbunden sind (38). Die äußeren Anteile der beiden leichten Ketten sowie die äußeren Anteile der beiden schweren Ketten bilden die variable, für die Spezifität des Antikörpers verantwortliche Region innerhalb der Antigen-bindenden

Fragmente (Fab). Die konstante Region der Monomere bilden die im Inneren konstanten, kristallisierbaren Fragmente (Fc) (40). Die konstante Region eines Antikörpers unterscheidet ihn von den anderen Antikörper-Isotypen (39). Die fünf Monomere sind ihrerseits wiederum durch Disulfidbrücken an den schweren μ -Ketten und eine J-Kette zu einem Pentamer verbunden. Ein solches Pentamer besitzt eine Masse von ca. 950 kDa (41). Die mittlere Serumkonzentration einer erwachsenen Frau beträgt 40-280 mg/dl, bei einem erwachsenen Mann 40-230 mg/dl. Der Anteil der IgM-Antikörper im Serum beträgt 10% aller im Blut vorhandenen Antikörper (42).

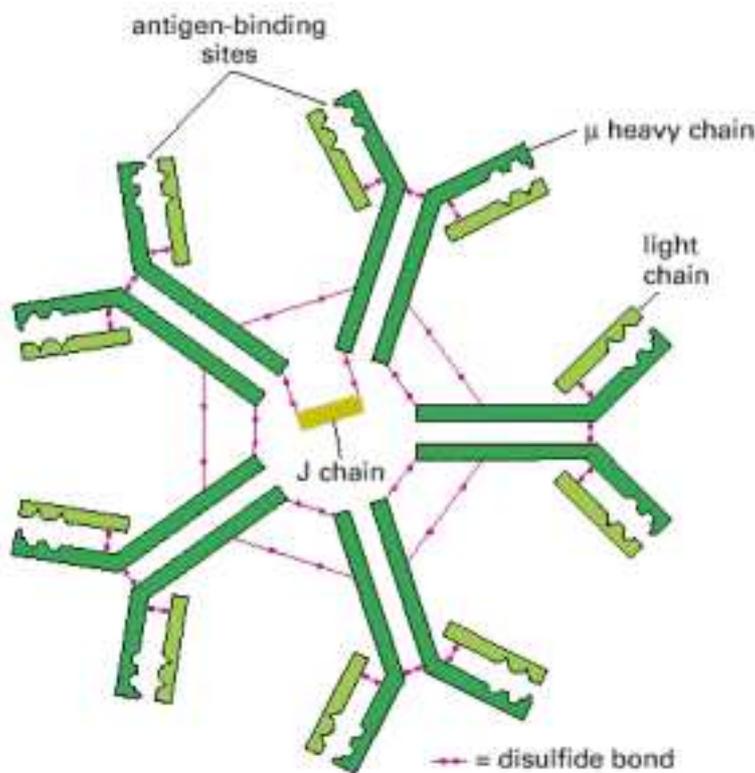


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines IgM-Antikörpers.¹

IgM-Antikörper werden in der T-Helferzellen-unabhängigen sekundären Immunantwort von naiven B-Zellen im Knochenmark als Monomere auf der Zelloberfläche exprimiert. Diese B-Zellen werden folgend in den Blutkreislauf sezerniert. Nach Antigen-Kontakt sind die IgM-Antikörper die ersten Antikörper, die als Immunantwort sezerniert werden. Sie sind darüber hinaus

¹ Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P (2002): Molecular Biology of the Cell, 4th edition. New York: Garland Science.

auch Teil des angeborenen Immunsystems, da sie von den jeweiligen B-Zellen auch ohne vorherigen Antigen-Kontakt sezerniert werden können (43). Die Hauptfunktion des IgM-Antikörpers bildet, wie bei den anderen Antikörpern auch, das spezifische reversible Binden von Antigenen. Dies geschieht durch hydrophobe und ionische Wechselwirkungen. Der Unterschied zu den anderen Antikörpern liegt in der höheren Avidität des IgM-Pentamers durch zehn anstatt von nur zwei oder vier Bindungsstellen. Durch diese Eigenschaften sind die IgM-Antikörper auch in der Lage, mehrere Antigene auf einmal zu binden, wodurch die Antigene zu Komplexen verbunden und immobilisiert, also agglutiniert werden (44). Zusätzlich können die IgM-Antikörper durch ihren Fc-Anteil das Komplement-Protein C1 effizient binden und aktivieren so das Komplementsystem (45).

1.2.2 Diagnostische Bedeutung von [monoklonalen] IgM-Antikörpern

Da die IgM-Antikörper bei einem infektiösen Akutgeschehen die erste Reaktion der sekundären, spezifischen Immunantwort bilden, nutzt man die Detektion von IgM-Antikörpern, qualitativ wie quantitativ, zum Nachweis und Diagnose von Infektionserkrankungen. Dies kann mithilfe von verschiedenen Methoden gelingen (Beispiele: Radioimmunoassay, ELISA, Dot-Blot-Assay, etc.). Auch bei einer Infektion mit HAV gelingt es durch die Bestimmung von IgM und IgG im Zusammenhang mit dem Kenntnis der Klinik des Patienten diagnostisch zwischen einer akuten, einer ausheilenden und einer bereits ausgeheilten Infektion zu unterscheiden. Das Fehlen von IgM-Antikörpern in Kombination mit dem Nachweis von spezifischen IgG-Antikörpern deutet dabei auf eine ausheilende bzw. ausgeheilte Infektion oder eine erfolgreiche Vakzinierung hin (14). Auch werden monoklonale IgM-Antikörper (MAK) zur Therapie von bestimmten Erkrankungen eingesetzt (15) (z. B. Rheumatoide Erkrankungen und bestimmte Krebsarten [16, 17, 18, 19, 20]). Darüber hinaus werden IgM-MAK zur Charakterisierung und Identifikation von bestimmten Zelllinien in der Stammzellforschung (21, 22, 23) verwendet. Aus diesen Gründen besitzt der Markt für monoklonale Antikörper heute ein

großes finanzielles Volumen in der biopharmazeutischen Industrie und ebenso ein enormes Wachstumspotential.

1.2.3 Der gegen HAV gerichtete monoklonale Antikörper IgM 4E1

Ping und Lemon untersuchten in ihrer Arbeit von 1992 (24) die die Neutralisationsfähigkeit von 24 gegen HAV gerichteten, monoklonalen Antikörpern gegenüber 11 Escape-Mutanten des HAV-Virusstrangs HM175/18f. Unter den 22 untersuchten MAK befanden sich ein Antikörper vom IgA-, vier vom IgM- und 17 vom IgG-Isotyp. Einzig der MAK IgM 4E1 zeigte Neutralisationsaktivität gegenüber allen Mutanten. Ferner wurden 22 der untersuchten MAKs hinsichtlich ihrer Bindungsfähigkeit mit den beiden Referenzantikörpern K34C8 und B5B3 verglichen. Diese beiden Referenzantikörper behindern sich bei Verwendung in Kombination nicht bei der Bindung an das Viruskapsid und sind in der Lage, in einem kompetitiven Assay die Bindungsaktivität von polyklonalen anti-HAV-Antikörpern vollständig zu blockieren (25, 26). Der MAK IgM 4E1 war in der Lage, die Bindung beider Referenzantikörper zu blockieren (B5B3 mehr als K34C8). Diese Ergebnisse zeigen, dass der MAK IgM 4E1 deutliche Unterschiede in seiner immunologischen Aktivität verglichen mit den anderen untersuchten MAKs aufweist. Neben der Eigenschaft, als IgM-Isotyp zehn anstatt von nur zwei Antigen-bindenden Epitopen im Vergleich zu IgG-Isotypen zu besitzen, zeigen die Ergebnisse von Ping und Lemon das Potential des MAK IgM 4E1 in seiner Verwendung gegen HAV. (24).

1.3 Ziel der Arbeit

Aufgrund der hohen Inzidenzrate von Hepatitis A-Infektionen weltweit kommt der Diagnostik von Hepatitis A und dem Nachweis von HAV eine hohe Bedeutung zu. Der durch die Arbeitsgruppe Professor Flehmig entwickelte MAK IgM 4E1 sollte zur weiteren Verwendung durch verschiedene Methoden charakterisiert werden. Nach Herstellung, Reinigung und Konzentration des MAK IgM 4E1 sollte eine qualitative Darstellung durch SDS-PAGE sowie FITC-Markierung und Immunofluoreszenz durchgeführt werden. Dies diente

dem Ziel einen HAV-Antigen-ELISA zu entwickeln, in dem als monoklonaler Primärantikörper nicht ein IgG-Isotyp, sondern der MAK IgM 4E1 verwendet wird. Es galt in der vorliegenden Arbeit zu untersuchen, ob durch die höhere Neutralisationsaktivität des MAK IgM 4E1 und eine eventuell höhere Bindungsfähigkeit des MAK IgM 4E1 eine Verbesserung des ELISA-Nachweistestes möglich ist.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller / Firmensitz
Chamber-Slides 4-well Permanox Cat# 177437, Lot# 548682	Nunc Brand Products, Nalge Nunc International, Part of Thermo Fisher Scientific / USA - Rochester, NY
Einmal-Küvette Eppendorf UVette 200 – 1600 nm (50-2000 µl) Prod# 0030 106.300, Lot# W129721N	Eppendorf AG / Hamburg
Einmalspritze B. Braun Injekt (5 ml) Ph.-Z.# 205790-3, Ref# 0460 6051, Lot# 96L0901A	B. Braun Melsungen AG / Melsungen
Einmalspritze BD Plastipak Luer- Lok (50 ml) Ref# 300865, Lot# 1105223	BD Biosciences Europe / BE – Erembodegem
Filtertips, verschiedene Größen	Biozym Scientific GmbH / Hessisch Oldendorf
HiTrap© IgM Purification HP Column Prod# 17-5110-01, Lot# 10047187	GE Healthcare / München

Kanülen BD Microlance 3 Ref# 301300, Lot# 101205	BD Biosciences Europe / BE – Erembodegem
Klebefolie zum Abdecken der Mikrotiterplatten	Carl Roth GmbH und Co. KG / Karlsruhe
Mikrotiterplatten Nunc Immuno Modules F8 Maxisorb Loose Cat# 468667, Lot# 09030143	Nunc Brand Products, Nalge Nunc International, Part of Thermo Fisher Scientific / USA - Rochester, NY
Multipette Rersearch Plus	Eppendorf AG / Hamburg
Research Pipetten und Pipettenspitzen (verschiedene Größen)	Eppendorf AG / Hamburg
Reaktionsgefäß BD Falcon Polystyrene round-bottom tubes (12 x 75 mm) Prod# 2054	BD Biosciences Europe / BE – Erembodegem
Reaktionsgefäß BD Falcon Polystyrene conical tubes 15 ml (Ref# 352095) und 50 ml (Ref# 352070)	BD Biosciences Europe / BE – Erembodegem
Reaktionsgefäß Cellstar Tubes (50 ml) Cat# 210261	Greiner Bio-One GmbH / Frickenhausen
Stabpipettenröhrchen Costar Stripette – Disposable Serological Pipette (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning Inc. / USA – Corning, NY

<p>Sterilfilter Millipore Stericup & Steritop Filtration and Storage Systems 0,22 µm</p> <p>Cat# SCGPU05RE</p>	<p>Millipore Corp. / USA – Billerica, MA</p>
<p>Sterilfilter Millipore Stericup & Steritop Filtration and Storage Systems 0,45 µm</p> <p>Cat# SCHVU05RE</p>	<p>Millipore Corp. / USA – Billerica, MA</p>
<p>Sterilfilter zum Spritzengebrauch „Minisart“ single use filter unit, non-pyrogenic 0,45 µm</p> <p>Cat# 22002-050</p>	<p>Sartorius stedim Biotech S. A. / F – Aubagne</p>
<p>Vivaspin 6 - Maximum Spin Speed-Zentrifugenröhrchen 10.000 MWCO (Prod# VS0601) und 100.000 MWCO (Prod# VS0641)</p>	<p>Sartorius Stedim Biotech GmbH / Le Pont de Claix, Frankreich</p>
<p>Vivaspin 20 - Maximum Spin Speed-Zentrifugenröhrchen 10.000 MWCO (Prod# 2001) und 100.000 MWCO (Prod# VS2042)</p>	<p>Sartorius Stedim Biotech GmbH / Le Pont de Claix, Frankreich</p>
<p>Rotlabo-Abdeckfolien für Mikrotestpl., Polyester, unsteril, Stärke 50 µm;</p> <p>Prod# EN76.1</p>	<p>Carl Roth GmbH & Co. KG / Karlsruhe</p>
<p>4-15% Mini-Protean TGX Precast Gels 10-well, 30 µl, 8.6 x 6.7 x 0.1 cm (W x L x Thickness)</p> <p>Prod# 456-1083</p>	<p>Bio-Rad Laboratories GmbH / München</p>

Membranpapier BA 83 0,2 µm, Durchmesser = 82 mm Prod# 401316, Lot# 2215/01151	Schleicher & Schuell GmbH / Dassel
Sterilfilter Millex GV Syringe-driven Filter Unit 0,22 µm Cat# SLGV033RS, Lot# R0CA87170, R0CA87170	Millipore Corp./ USA – Billerica, MA
Sterilfilter Sterivex GS Syringe- driven Filter Unit 0,22 µm Cat# SVGS010RS	Millipore Corp. / USA – Billerica, MA
Sterilfilter Millex HA Syringe-driven Filter Unit 0,45 µm Cat# SLHA033SS, Lot# R9AN60101	Millipore Corp./ USA – Billerica, MA
Einmal-Küvetten Plastibrand (1,5 ml halbmikro) Cat# 7591 50, Lot# J080-8	Brand GmbH & Co. KG / Wertheim
Eppendorf Safe-Lock Tubes (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf AG / Hamburg
Dialyse-Kassette Slide-A-Lyzer 10K MWCO, 12-30 ml Prod# 66830, Lot# KF136225, LJ150514	Thermo Fisher Scientific / USA - Rockford, IL

2.1.2 Laborgeräte

Analysewaage MC1 Analytic AC210S	Sartorius AG / Göttingen
Bechergläser und Gewindeflaschen	Schott AG / Mainz
Elektrophoresekammer Criterion	Bio-Rad Laboratories GmbH / München
ELISA-Washer	Tecan Group Ltd. / CH – Maennedorf
Heizblock Dri-Block DB.2A	Techne / UK – Staffordshire
Kühlschränke	Liebherr / Bieberach a. d. Riss Robert Bosch GmbH / Gerlingen Philipp Kirsch GmbH / Offenburg
Laborzentrifuge Hettich Rotixa P	Hettich Zentrifugen / Tuttlingen
Magnetrührer IKAMAG RH	IKA Labortechnik / Staufen
Multifunktionsuhr	Oregon Scientific / Neu-Isenburg
Peristaltische Pumpe Pharmacia / GE Healthcare Pump P-1	Pharmacia LKB /S – Uppsala, Part of GE Healthcare / München
pH-Meter 761 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG / Berlin
Photometer SmartSpec 3000	Bio-Rad Laboratories GmbH / München
Probenschüttler	Bachofer Laboratoriumsgeräte / Reutlingen

Spannungsquelle, DC Power Supply HSI PC 500X	Hoefer Scientific Instruments / USA – San Francisco
Stabpipette Accu-Jet Pro	Brand GmbH & Co KG / Wertheim
Sterile Werkbank Laminair HBB 2448	Haraeus Instruments / Berlin
Tecan Spectra Fluor Microplatereader	Tecan Group Ltd. / CH – Maennedorf
Vortexer MS2 Minishaker	IKA Labortechnik / Staufen
Zentrifuge 5415 und 5415 C	Eppendorf AG / Hamburg

2.1.3 Chemikalien

0,095% Kathon GS; Prod# C9211M, Lot# 5517530	Rohm & Haas Trading ApS / Frankfurt a. M.
2-Mercaptoethanol Prod# M7154-25ML, Lot #105K01050	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH / München
2-Propanol Prod# 1.09634.2511, Lot# K36655734 644	Merck KGaA / Darmstadt
3% FCS (= Foetal Calf Serum); Cat# A15-511, Lot# A51106-0392	PAA Laboratories GmbH / AU - Pasching
Aceton Cat# 107021	Merck KGaA / Darmstadt

Albumin Fraktion V (10 g) >98% pulv. Bovine; M = 69.000 MWCO; Prod #8076.1 Lot# 08148015	Carl Roth GmbH und Co. KG / Karlsruhe
Ammoniumsulfat reinst pro analysi Prod# 357,1000, Lot# 010289	Applichem GmbH / Darmstadt
Anti-HAV-IgM-EIA Prod# E 11, Lot# 260307	Mediagnost GmbH / Reutlingen
Anti-IgM 4E1-Antikörper: Goat-anti-mouse IgM POD, μ -chain- specific, 1:2 mit Glycerol Prod# 115-035-075, Lot# 91177	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. / USA – West Grove, PA
Bradford Reagent Prod# B6916-500ML, Lot# 080M4359	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH / München
BSA, PAA -885; 22.10.10	Mediagnost GmbH / Reutlingen
CN/DAB Substrate (10x); Prod# 1855900, Lot# LJ150981	Thermo Fisher Scientific / USA – Rockford, IL
DAB Substrate Peroxide Buffer; Prod# 11 718 096 001; Lot# 11 765 161 (4)	Roche Diagnostics GmbH / Mannheim
Dinatriumhydrogenphosphat Prod# 1.06559.0500, Lot# F1652559 103	Merck KGaA / Darmstadt

Dinatriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat Prod# P6579, Lot# L610 A80979	Merck KGaA / Darmstadt
Eindeckmedium Fluoprep Cat# 75521, Lot# 822911301	BioMérieux SA / F – Marcy l’Etoile
Essigsäure 100% Prod# 1.00063.1011, Lot# K42028063 107	Merck KGaA / Darmstadt
Ethanol absolute pro analysi Prod# 1.00983.1011, Lot# K41764383 050;	Merck KGaA / Darmstadt
Fermentas Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder Prod# SM1811, Lot# 00069635	Fermentas GmbH / St. Leon-Rot
Fluoreszenzfarbstoff DAPI Bestell# 268298-10MG	Calbiochem / Merck Millipore, Merck KGaA / Darmstadt
Fluoreszenzfarbstoff FITC Isomer 1 Cat# 34321, Lot# D00086528	Calbiochem / Merck Millipore, Merck KGaA / Darmstadt
HAV-Antigen EIA Prod# E12, Lot# 110711, 080811	Mediagnost GmbH / Reutlingen
HAV-Antigen Stamm GBM/HFS Überstand vom 20.04.2011, Zellinhalt 2WS recTrypsin, Titer 1:29.000	Mediagnost GmbH / Reutlingen

2 Material und Methoden

IgG 7E7 gereinigt und sterilfiltriert nach Fällung 08.07.2011 (Negativ-Kontrolle bei Dot-Blot-Assay)	Mediagnost GmbH / Reutlingen
IgM 4E1 Fraktion 17.05.2011, c = 936 µg/ml, 26.05.11 (Positiv-Kontrolle bei Dot-Blot Assay)	Mediagnost GmbH / Reutlingen
Kaliumdihydrogenphosphat Prod# 4873, Lot# L2691202	Merck KGaA / Darmstadt
Laemmli Sample Buffer Prod# 161-0737, Lot# 31007312	Bio-Rad Laboratories / USA – Hercules, CA
Medium 1 zur Anzucht der Zellen für Immunfluoreszenz Medium 199 with Hank's Salts +L-Glutamine +HEPES +Earle's Cat# 177437 und E15-838	Invitrogen GIBCO – Life Technologies GmbH / Darmstadt

<p>Medium 2 zur Anzucht der Zellen für Immunfluoreszenz: Medium +5% FCS</p> <p>+MEM Non-Essential Amino Acids (Cat# 11140 / Invitrogen)</p> <p>+Sodium Pyruvate (Cat# 11360 / Invitrogen)</p> <p>+Penicillin / Streptomycin (Cat# 15140 / Invitrogen)</p> <p>+5% Foetal Bovin Serum Pharma Grade (Cat# A15-511 / PAA Laboratories)</p>	<p>Invitrogen GIBCO – Life Technologies GmbH / Darmstadt</p> <p>PAA Laboratories GmbH / AU - Pasching</p>
<p>Natriumazid reinst</p> <p>Prod# A1430.0010, Lot# 8M005993</p>	<p>Applichem / Darmstadt</p>
<p>Natriumcarbonat</p> <p>Prod# 1.06329.1000, Lot# K41326329 101</p>	<p>Merck KGaA / Darmstadt</p>
<p>Natriumcarbonat (Na_2CO_3)</p> <p>Cat# 1.06392.0500, Lot# A0246792106</p>	<p>Merck KGaA / Darmstadt</p>
<p>Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat Prod# 06346.0500, Lot# A0198346 113;</p>	<p>Merck KGaA / Darmstadt</p>
<p>Natriumhydrogencarbonat</p> <p>Prod# 1.06392.0500, Lot# A0246792 106</p>	<p>Merck KGaA / Darmstadt</p>

2 Material und Methoden

Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$) Cat# 6329, Lot# K13779929	Merck KGaA / Darmstadt
Nonidet P40; Prod# N6507, Lot# 62H2508	Sigma Chemical Co. / USA – St. Louis, MO
PBS 20fach Lot# 240811	Mediagnost / Reutlingen
Phenolrot reinst; Prod# A0680,0010, Lot# 8A000755	AppliChem GmbH / Darmstadt
Pierce BCA Protein Assay Kit Prod# 23225; Lot# MA 152711	Thermo Fisher Scientific / USA - Rockford, IL
Pierce Silver Stain Kit Prod# 24612, Lot# MD156422	Thermo Fisher Scientific / USA - Rockford, IL
Polyethylenglykol 6000 Ph Eur, Prod# 8.17007.5000 , Lot# S4636391628	Merck KGaA / Darmstadt
Sephacryl S-1000 Superfine Prod# 17-0476-01, Lot# 304180	Amersham Biosciences AB / S – Uppsala
Stable Peroxide Substrate Buffer (1x) Prod# 1855910, Lot# LI150626	Thermo Fisher Scientific / USA - Rockford, IL
Tris-HCl, Molecular Biology Grade; Prod# A3452,0500, Lot# 0F004946	AppliChem GmbH / Darmstadt

Tween 20, for molecular biology, Molecular Biology Tested; Prod# 9416-50ML, Lot# 047K00202	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH / München
Zellen zur Infektion für Immunfluoreszenz MRC-5 6x 105/ml vom 14.11.2007	Mediagnost / Reutlingen

2.2 Methoden

2.2.1 Produktion des monoklonalen Antikörpers IgM 4E1 im Hybridoma-Expressmedium

Prinzip:

In der Veröffentlichung von Köhler und Milstein im Jahre 1975 wurde erstmals die Herstellung von Hybridzellen, die spezifische Antikörper produzieren, aus murinen B-Lymphozyten und Myelomzellen durch Sendaivirus-vermittelte Zellfusion beschrieben (46). Bis heute wurden die Techniken zur Induktion von Zellfusionen und zur Herstellung monoklonaler Antikörper etabliert und weiterentwickelt. So stehen derzeit neben der SeV-vermittelten Fusionsmethode als etablierte Methoden auch die Elektrofusion (47) und die PEG-vermittelte Zellfusionsinduktion (48) zur Verfügung. Die Fusion zur Anzucht der Hybridom-Zellen für diese Arbeit erfolgte durch den Einsatz von PEG.

Durch die PEG-vermittelte Zellfusion muriner B-Lymphozyten aus der Milz und Myelomzellen wurden Hybridzellen gezüchtet und selektioniert, die gegen jenes Antigen gerichtet sind, mit dem die Maus zuvor immunisiert wurde (49). Beim MAK IgM 4E1 ist dies das Hepatitis A-Virus.

Besonderer Dank gilt Fr. Dr. Normann (Fa. Mediagnost, Reutlingen) für die Bereitstellung des Hybridoma-Expressmedium-Zellkulturüberstandes.

2.2.2 Zentrifugal-Filtration zur Konzentration und partiellen Aufreinigung des Ausgangsmaterials (monoklonaler Antikörper IgM 4E1 im Hybridoma Expressmedium-Zellkulturüberstand)

Material: Vivaspin 6- und Vivaspin 20-Maximum Spin Speed-Zentrifugenröhrchen (10.000 und 100.000 MWCO); Sartorius Stedim Biotech GmbH

Prinzip:

Die Konzentration und Abtrennung der größeren Moleküle einer Lösung von solchen von geringerer Größe wurden unter anderem zur Charakterisierung bestimmter Moleküle verwendet (50, 51, 52, 53). In dieser Arbeit wurde die Zentrifugal-Filtration jedoch nicht alleinig zur Charakterisierung eingesetzt, sondern auch als initialer Schritt zur Konzentration und begleitenden partiellen Aufreinigung des Ausgangsmaterials im Rahmen weiterer, sich anschließender Charakterisierungsverfahren. Dies erschien sinnvoll, da die in dieser Arbeit zu untersuchenden IgM-Antikörper zu den größeren, im Ausgangsmaterial enthaltenen Molekülen zu rechnen sind (960 kDa).

Dies erfolgte mittels speziellen Zentrifugationsgefäßen (s. Material) der Firma Sartorius. Diese Gefäße bestehen aus einem oberen Teil zur Aufnahme der zu filtrierenden Lösung und einem unteren Auffanggefäß, zwischen denen eine Filtrationsmembran mit Poren unterschiedlicher Größe installiert ist (10.000 und 100.000 MWCO \equiv 10.000 bzw. 100.000 Da; MWCO = Molecular Weight Cut Off). Nach der Zentrifugation finden sich entsprechend die Moleküle, welche aufgrund ihrer geringeren Größe die Poren der Membran passieren können, im Auffanggefäß, während die größeren oberhalb der Filtrationsmembran zurückgehalten werden.

Durchführung:

Hierbei wurden Membranen mit den Porengrößen von 10.000 und 100.000 Da (entspricht 10.000 und 100.000 MWCO) verwendet. Das Ausgangsmaterial wurde im ersten Schritt in den oberen Teil des

Zentrifugierungsröhrchens mit einer Membranporengröße von 100.000 kDa aufgegeben. Danach wurde für eine Stunde bei 3500 rpm (= 616,67 g) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und als Konzentrat bei 100.000 kDa gesammelt. Ebenso wurde der Durchlauf aus dem Auffanggefäß in einer gesonderten Gewindeflasche zur späteren Kontrolle (Proteinbestimmung) und zur weiteren Zentrifugation aufbewahrt. Anschließend wurde der Durchlauf aus dem Auffanggefäß des Zentrifugenröhrchens mit einer Membranporengröße von 100.000 kDa erneut bei einer Membranporengröße von 10.000 kDa zentrifugiert. Die voneinander getrennten Fraktionen wurden daraufhin wie eben beschrieben gesammelt und aufbewahrt.

Die Proteinbestimmung erfolgte mittels BCA Protein Assay (Methode nach Fa. Pierce, s. 2.2.6).

Hiernach erfolgte die optische Darstellung der Proteinkonzentration und der Reinheit der IgM-Antikörper in den durch die Zentrifugation gewonnenen Proben im Vergleich zum Ausgangsmaterial durch SDS-PAGE (Methode nach Firma Mediagnost und Firma Pierce, s. 2.2.8).

2.2.3 Polyethylenglykol 6000-Präzipitation

Prinzip:

Die Präzipitation von großen Proteinen, wie zum Beispiel von IgM-Antikörpern (960 kDa), mit Hilfe von Polymeren, wie etwa Polyethylenglykol (= PEG), basiert auf der Excluded Volume - Theorie. Diese Theorie wurde durch Werner Kuhn 1934 begründet (54) und 1941 durch Paul Flory übertragen auf die Polymer-Chemie (55) und wird stets erweitert (56). Durch sterische Effekte erzeugt die Anwesenheit von Makromolekülen, wie etwa von Polymeren, eine Phasentrennung in Proteinlösungen. Dabei wird das in der Lösung enthaltene Protein aus der Phase verdrängt, in der sich das gelöste Polymer sammelt (56, 57). Bei steigender Polymer-Konzentration verringert sich das Volumen derjenigen Phase, in der das gelöste Protein

vorliegt, bis schließlich das Löslichkeitsprodukt des Proteins überschritten wird und die Präzipitation einsetzt (56). Obgleich der genaue Prozess bis heute nicht bekannt ist, ist die Untersuchung des Mechanismus zur Präzipitation von Proteinen durch PEG Gegenstand zahlreicher Veröffentlichungen (58, 59, 60, 61, 62, 63). Bisher kann diese Theorie jedoch nur qualitativ verwendet werden, so zum Beispiel, um eine Voraussage über die Löslichkeit eines Proteins in einer Polymer-Lösung zu treffen, nicht aber, um die Löslichkeit berechnen zu können (56). Dennoch ist es gelungen, aufgrund von Erfahrungswerten vorangegangener Studien anhand der Größe des zu präzipitierenden Proteins die optimale Größe des zu verwendenden Polymers abschätzen zu können. Somit konnte die Verwendung dessen als Methode zur Aufreinigung von Serumproteinen und Antikörpern etabliert werden (63, 64, 65, 66, 67). Auch identifizierte man PEG 6000 im Gegensatz zu anderen Polymeren als das am besten zur Präzipitation geeignete, da dessen Lösungen am wenigsten störende Viskosität aufweisen und bei Raumtemperatur keine Denaturierung der aufzureinigenden Proteine stattfindet (58). Im Fall eines IgM-Antikörpers kommt somit PEG 6000 zur Anwendung (58, 66, 67). Mit der Etablierung effektiverer Methoden zur Aufreinigung von Antikörpern (s. 2.2.4, 2.2.5) behält die Präzipitation durch PEG ihre Bedeutung als ergänzenden Arbeitsschritt zur Vorreinigung und Anreicherung der Antikörper in mehrstufigen Aufreinigungsverfahren. Die Präzipitation mit PEG 6000 wurde so in Verbindung mit einer anschließenden Ionenaustausch-Chromatographie von Tscheliessnig et al. (65) im Jahre 2009 als zweistufiges Aufreinigungsverfahren beschrieben.

Durchführung:

Es wurden 20% und 25%ige w/v-Lösungen von PEG 6000 in Aqua dest. vorbereitet und mit dem Zellkulturüberstand zu gleichen Anteilen gemischt. Nach einer Inkubationszeit von vier Stunden bei 4 °C wurden die Präzipitate bei RCF 5900 $g \equiv 10826,57$ rpm zentrifugiert und abgegriffen. Das Präzipitat wurde dann in 2 ml des Puffers der entsprechenden Chromatographie gelöst, also entweder in PBS für die SEC mit Sephacryl S-1000 oder in BB + 0,8M Ammoniumsulfat für TAC mit HiTrap® IgM Purification HP Column.

Allgemeiner Hinweis: Alle für die jeweilige Säulenchromatographie verwendeten Puffer wurden durch einen 0,22 µm-Filter filtriert und entgast. Ebenso wurde das Probenmaterial, also die AK-haltigen Lösungen, durch einen 0,45 µm-Filter filtriert und entgast.

2.2.4 Thiophile Adsorptions-Chromatographie (Thiophilic Adsorption Chromatography)

Material: GE Healthcare HiTrap© IgM Purification High Performance Column

Prinzip:

Die „Thiophilic Adsorption Chromatography“ (= TAC) zur Aufreinigung von Proteinen wurde erstmals von Porath et al. im Jahre 1985 formuliert (68). Der dieser Methode zugrunde liegende Mechanismus der thiophilen Adsorption konnte bis heute nicht abschließend aufgeklärt werden, jedoch konnte in den Jahren nach Veröffentlichung dieser Methode eine Theorie erhärtet werden (69, 70, 71, 72). Nach dieser Theorie binden Proteine, und so auch Antikörper (68), über eine Kombination zweier chemischer Prozesse an ein Polymergitter, welches mit thiophilen Molekülen wie etwa Divinylsulfon (71) versetzt wurde. In einem ersten Schritt bindet ein Molekül im Polymergitter das Protein durch einen nukleophilen Angriff an einen Elektronenakzeptor an einer Seitenkette des Proteins (vorstellbar wäre hierbei zum Beispiel ein Atom in einem Indolring, wie in der Aminosäure Tryptophan zu finden). In einem zweiten Schritt findet in der direkten Nachbarschaft dieses nukleophilen Angriffs die thiophile Interaktion zwischen einerseits der Sulfon-Gruppe des Polymergitter-Moleküls und eines Elektronenakzeptors an der Außenseite des Proteins statt. Eine Interaktion durch die Polarität der Wassermolekül-Dipole kann durch Abschirmung des Reaktionsortes durch hydrophobe Seitenketten verhindert werden. In diesem Milieu wird die Salzbindung zwischen Polymermolekül und Protein beim nukleophilen Angriff befördert, was letztendlich den engen Kontakt zwischen beiden beteiligten Molekülen herstellt. In diesem durch die Hydrophobizität der umgebenden Seitenketten unterstützten unpolaren Milieu kann die Bildung eines Elektronendonator-Akzeptorkomplexes stattfinden (thiophile Interaktion) (71).

Durchführung:

In der HiTrap® IgM Purification High Performance Column von GE Healthcare ist 2-Mercaptopyridin als thiophiler Ligand in einer Sepharose-Matrix eingebunden. Die Chromatographie findet unter Anwendung dieser Methode nach GE Healthcare in fünf Hauptschritten statt.

Im ersten Schritt der Equilibrierung werden innerhalb der Säule die entsprechenden Reaktionsbedingungen hergestellt, was hierbei das Einbringen von fünf Column Volumes (= 5 CV \equiv 5 ml) Binding Buffer (20 mM Natriumphosphatpuffer versetzt mit 0,8 M Ammoniumsulfat, pH 7,5) auf die Säule mit einer Flussrate von 1,0 ml/min bedeutet. Im zweiten Schritt wird das Material des Zellkulturüberstandes, welches ebenfalls mit 0,8 M Ammoniumsulfat versetzt wurde, mit einer Flussrate von 0,5 ml/min durch die Sepharosematrix gepumpt. In einem dritten Schritt wird mit 10 CV Binding Buffer bei einer Flussrate von 1 ml/min gewaschen. Die Elution der Antikörper erfolgt mit 12 CV Elution Buffer (20 mM Natriumphosphatpuffer, pH = 7,5) bei 0,5 ml/min. In einem letzten Schritt wird die Säule zur Wiederverwendung präpariert und dazu mit 7 CV Regeneration Buffer bei 1,0 ml/min versetzt (20 mM Natriumphosphatpuffer versetzt mit 30% Isopropanol, pH 7,5).

Im Verlauf der Arbeit wurden zwei weitere Schritte in den Arbeitsablauf eingefügt (s. Tabelle 1, Schritt 4 und 5). Nach Equilibrierung und Aufbringen des Materials wurde das Herauswaschen der ungebundenen Moleküle nicht nur einfach, sondern doppelt ausgeführt. Somit wurde die aufgefangene Waschlösung aus dem Schritt des ersten Waschens unter einer Flussrate von 0,5 ml/min erneut über die Säule gegeben. Anschließend wurde mit 15 CV Binding Buffer erneut gewaschen (Schritt 4 und 5).

Insgesamt ergeben sich hieraus sieben Arbeitsschritte (s. Tabelle 1). Sofern Änderungen an diesem Protokoll vorgenommen wurden, sind diese als solche ausgewiesen und beschrieben.

Tabelle 1: Übersicht über die Arbeitsschritte der Thiophilen Wechselwirkungs-Chromatographie nach dem Protokoll der Fa. GE Healthcare (modifiziert). VFR = Volumetric Flow Rate = Flussrate, BB = Bindungspuffer, EB = Elutionspuffer, RB = Regenerationspuffer.

Schritt	Prozess	Volumen [ml \equiv CV]	VFR [ml/ min]	t [min]
1	Equilibrieren	5 BB	1,0	5
2	Aufgeben des Materials	x	0,5	2x
3	Herauswaschen der ungebundenen Moleküle (1/2)	10 BB	1,0	10
4	Aufgeben der aufgefangenen Waschlösung aus Schritt-Nr. 3	x	0,5	2x
5	Herauswaschen der ungebundenen Moleküle (2/2)	15 BB	1,0	15
6	Elution	12 EB	0,5	24
7	Regeneration	7 RB	1,0	7

2.2.5 Größenausschluss-Chromatographie (Size Exclusion Chromatography) / Gelfiltrations-Chromatographie (Gel-filtration Chromatography)

Material: GE Healthcare Sephacryl S-1000 Superfine (Prod# 17-0476-01, Lot# 304180), Amersham Biosciences AB / S - Uppsala

Prinzip:

Richard L. M. Syngé beschrieb im Jahre 1944 erstmals die Verwendung von Stärke zur Analyse von Proteinen und Aminosäuren durch die Partitions-Chromatographie (73). Die Methode, die Stärke gezielt als Medium zur

Auftrennung von Proteinlösungen nach der Größe ihrer Inhaltsstoffe einzusetzen, wurde 1955 durch Lathe und Ruthven demonstriert (74, 75). In der letztgenannten Veröffentlichung wurde ebenso die erste Theorie zum Mechanismus der Größenausschluss-Chromatographie (Size Exclusion Chromatography = SEC) formuliert, die bis heute zwar Erweiterungen, jedoch keine Widerlegung erfahren hat. So wurden im Folgenden geeignetere Materialien zur Anwendung in der SEC entwickelt, wie etwa Dextran (76) und synthetische Polymer-Acrylamide (77). (78)

Dem Auftrennungsprozess liegt nach dieser Theorie zugrunde, dass die solide Phase (z. B. Stärke oder Sephacryl S-1000) in der Chromatographie-Vorrichtung, üblicherweise eine Säule, nach adäquater Präparation Poren verschiedener Größe ausbildet. Nach der Größe der ausgebildeten Poren wird auch das Material der soliden Phase determiniert. So gibt das Ausschluss-Limit des Materials (exclusion limit) den Durchmesser der größten ausgebildeten Poren an und damit die Größe der Moleküle in der ersten Eluatfraktion. In dieser ersten Fraktion sind entsprechend diejenigen Moleküle zu erwarten, die aufgrund ihrer Größe und der daraus resultierenden sterischen Hinderung keinerlei Poren der soliden Phase passieren können. Sie verbleiben daher in der mobilen Phase und passieren die solide Phase am schnellsten. Weiterhin gibt das Permeations-Limit (permeation limit) den Durchmesser der kleinsten Poren an. Moleküle, die genauso groß oder kleiner sind, sind dahingehend in den letzten Eluatfraktionen zu erwarten. Alle Moleküle, die hinsichtlich ihrer Größe zwischen diesen beiden Werten einzuordnen sind, können durch die SEC separiert werden. Deshalb ist es wichtig, das Material der soliden Phase nach der Größe des zu separierenden Moleküls auszuwählen.

Da in dieser Arbeit die SEC zur Aufreinigung des monoklonalen Antikörpers (= MAK) IgM 4E1 angewendet wird, welcher als pentameres Polymer eine mittlere Größe von etwa 960 kDa aufweist, wurde ein Material zur Anwendung als solide Phase gewählt, das ein hohes Ausschluss-Limit besitzt. Der Zahlenwert im Handelsnamen „Sephacryl S-1000“ bezieht sich zwar auf die Größe des Ausschluss-Limits, ist jedoch ein extrapoliertes Wert,

der nicht direkt auf eine Masseneinheit übertragen werden kann. Durch die Zusammensetzung von Sephacryl S-1000 aus vernetzendem Allyldextran und N,N'-methylenbisacrylamid ist dieses sehr gut zur Verwendung als solide Phase geeignet, da es eine sowohl inerte, als auch stabile Matrix ausbildet (s. a. 76, 77).

Durchführung:

Allgemeiner Hinweis: Jeder verwendete Puffer wurde durch einen 0,22 µm-Filter filtriert und entgast. Die verwendeten Proben, also die AK-haltigen Lösungen wurden durch einen 0,45 µm-Filter filtriert und entgast.

Die Versuche wurden unter Beachtung der Herstellerangaben (79) durchgeführt. Verwendet wurde eine Chromatographie-Säule der Firma GE Healthcare C (8/80) mit einem Volumen von ~14 ml mit zwei Adaptern. Die Befüllung der Säule betrug ~75% des Säulenvolumens. Vor Beginn des Verfahrens wurde das Probenmaterial wie in jedem Versuchsansatz gesondert angegeben mit PBS verdünnt.

Der Prozess gliedert sich in vier Hauptarbeitsschritte. In einem ersten Schritt wird die Säule mit 2 CV (= 2 Column Volumes \equiv 28 ml) bei einer Flussrate von VFR = 1,0 ml/min equilibriert. In dieser Arbeit wurde hierfür PBS verwendet. Anschließend wurde eine variable Menge des Materials bei VFR = 0,5 ml/min aufgebracht. Den dritten Schritt bildet die Elution des Antikörpers, die ebenfalls mit 2 CV des steril filtrierten PBS bei VFR = 1,0 ml/min erfolgte. Abschließend wurde die Säule zur Lagerung mit 2 CV Regenerationspuffer (PBS versetzt mit 20% Ethanol) gespült. (vgl. Tabelle 2).

Tabelle 2: Übersicht über die Arbeitsschritte der Größenausschluss-Chromatographie nach dem oben beschriebenen Protokoll. VFR = Volumetric Flow Rate = Flussrate.

Schritt	Prozess	Gefäß	Volumen [ml]	VFR [ml / min]	t [min]
1	Equilibrierung	Abfall	22 (≙ 2 CV)	1,0	22
2	Aufgeben des Materials	DL	x	0,5	x
3	Elution	ET1-ET22	22 (≙ 2 CV)	0,5	44
4	Regeneration	R1 – R5, Abfall	22 (≙ 2 CV)	1,0	22

2.2.6 Pierce Bicinchoninic Acid Protein Assay

Material: Pierce BCA Protein Assay Kit (Prod# 23225; Lot# MA 152711), Thermo Fisher Scientific / USA - Rockford, IL

Prinzip:

Die Verwendung der Bicinchoninsäure (= BCA) zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen in alkalischen Testansätzen wurde erstmals 1985 durch Smith et al. beschrieben (80). Der Anwendungsbereich dieser Methode wurde seither unter Anderem zur Determination von Proteinkonzentrationen in verschiedenen Medien (81, 82, 83) sowie zum direkten qualitativen und quantitativen Nachweis funktioneller Gruppen bzw. bestimmter Aminosäuren (84), auch unter Anwesenheit bestimmter Detergenzien, wie etwa Natriumdodecylsulfat, reduzierender Zucker und Thioalkoholen (85) erfolgreich erweitert. Der daraus entwickelte Protein Assay wurde in dieser Arbeit nach der Methode der Firma Mediagnost (Reutlingen) zum Zwecke der Determination des Proteingehalts unterschiedlicher Proben in

verschiedenen Medien eingesetzt.

Die Nachweisreaktion beruht auf der Reduktion von zweiwertigen zu einwertigen Kupferionen durch die Bicinchoninsäure, welche ein wasserlösliches, äußerst stabiles und für reduzierte Kupferionen selektives Reagenz darstellt.

In der alkalischen Umgebung des Testansatzes bilden zunächst die Proteine mit den Kupferionen durch die Biuret-Reaktion einen bläulichen Chelatkomplex. Hierbei werden die Kupferionen reduziert. Durch Zugabe der Bicinchoninsäure werden die Proteine verdrängt und bilden unter Inkubation einen tiefvioletten Komplex. Durch die anschließende kolorimetrische Bestimmung kann der Grad der Färbung durch ein Photometer zwischen den Wellenlängen $\lambda = 550$ und $\lambda = 570$ nm gemessen und anhand dessen unter Abgleichen mit der Standardgerade die Proteinkonzentration der zu untersuchenden Lösung bestimmt werden. In Abbildung 2 ist die Reaktion dargestellt.

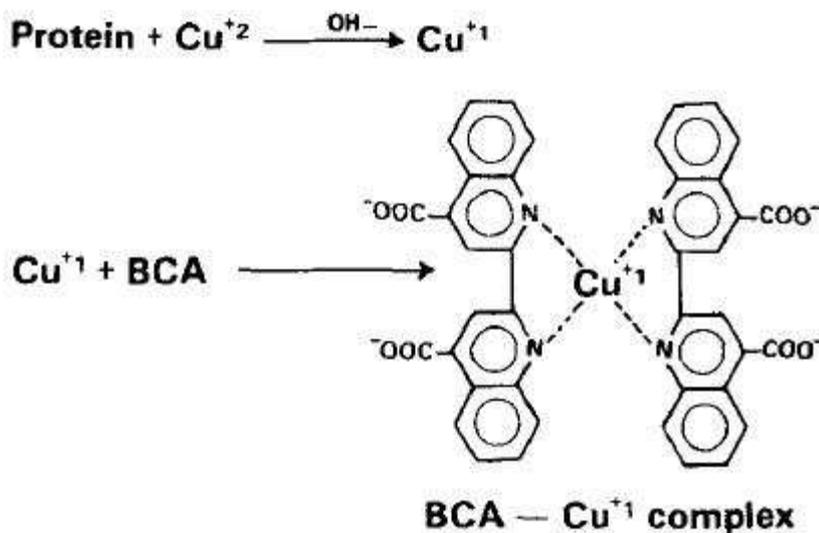


Abbildung 2: BCA-Reaktion: Bildung des violetten Chelatkomplexes²

Da diese Reaktion wesentlich durch die Peptidbindungen der zu bestimmenden Proteine getragen wird, ergeben sich durch die unterschiedliche Zusammensetzung der einzelnen Proteine bzw. der

² Smith PK et al. (1985) Anal Biochem 150: 80

Seitenketten ihrer Aminosäuren eventuelle marginale Abweichungen in der Proteinbestimmung, da im Besonderen die Aminosäuren Cystein, Cystin, Tryptophan und Tyrosin die Reaktion beeinflussen.

Durchführung:

Die Methode wurde nach Herstellerangaben der Fa. Pierce durchgeführt. Dazu erfolgte zunächst die Herstellung einer Standardreihe aus bovinem Serum-Albumin (BSA) in einfach konzentriertem PBS. Die folgenden Konzentrationen wurden verwendet:

0 µg/ml

25 µg/ml

125 µg/ml

250 µg/ml

500 µg/ml

750 µg/ml

1000 µg/ml

1500 µg/ml

In je einem Nöpfchen der 96-well-microtiterplate wurden 25 µl des jeweiligen Standards oder der Probe aufgegeben. Die Bestimmung erfolgte im Doppelansatz. Hierzu wurde je Nöpfchen 200 µl Workingsolution (50 Teile Reagenz A zu 1 Teil Reagenz B) pipettiert und anschließend für 30 Minuten bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Abschließend erfolgte die photometrische Messung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 570 \text{ nm}$ im „Spectrafluor Microplatereader“ der Firma Tecan Group Ltd.

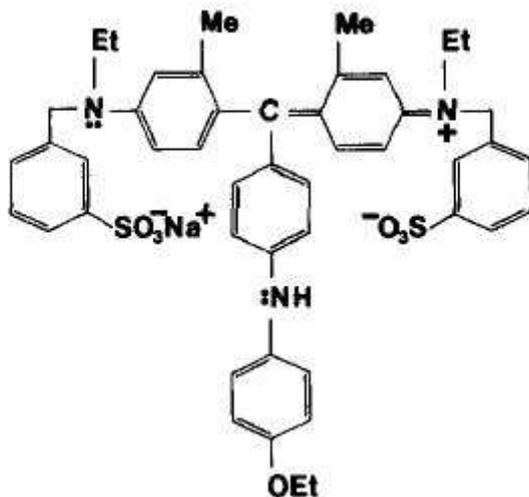
2.2.7 Bradford Protein Assay

Material: Bradford Reagent (Prod# B6916-500ML, Lot# 080M4359) Sigma-Aldrich Biochemie GmbH / München

Prinzip:

Basierend auf den Ergebnissen von Fazekas de St. Groth et al. 1962 (86), in denen zwei Farbstoffe zur qualitativen Proteinbestimmung vorgestellt wurden, entwickelte Bradford 1975 einen quantitativen Protein Assay (87). Das hierbei verwendete Bradford-Reagenz enthält den Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G 250 (= CBB G250, s. Abbildung 3). In den anschließenden Arbeiten zur Verwendung dieses Farbstoffes zur Proteinbestimmung wurde zum einen der Mechanismus der Farbreaktion (88, 89) und zum anderen Gründe für beobachtete Messschwankungen diskutiert (90, 91, 92, 93, 94). Ergebnis dieser Studien war, dass der Bradford Assay in Abhängigkeit des pH-Wertes des Test-Ansatzes und der spezifischen Struktur des zu bestimmenden Proteins bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595$ nm Linearitätsabweichungen aufweisen kann, diese jedoch mit Hilfe der Einstellung des pH-Wertes und gegebenenfalls auch der Wellenlänge behoben werden können (94). Deshalb stellt der Bradford-Assay auch heutzutage noch eine einfach auszuführende und ausreichend sensitive Methode zur Proteinquantifizierung dar, dessen untere Nachweisgrenze bei 1 $\mu\text{g/ml}$ liegt.

Die Moleküle Farbstoffes CBB G250 liegen je nach Grad der Protonierung hinsichtlich ihrer Ladung entweder neutral, als Anion oder als Kation vor (89). Bei einer photometrischen Messung ergeben sich hierdurch spezifische Adsorptionsmaxima (s. Abbildung 4).

Abbildung 3: Struktur des Coomassie Brilliant Blue G 250 - Moleküls³

Im sauren Milieu liegen die ungebundenen Moleküle als Kation vor und besitzen ein Adsorptionsmaximum bei $\lambda = 470$ nm. Diese Lösung wird durch die Farbstoff-Kationen rot gefärbt. Werden zu dem Farbreagenz in saurer Lösung Proteine hinzugegeben, so bilden die CBB G250 – Moleküle Komplexe mit den sauren und unpolaren Seitenketten der Proteine. Durch diese Komplexbildung werden die Farbstoffmoleküle in ihre anionische Form überführt und stabilisiert. Hierdurch ergibt sich eine Blaufärbung des Reaktionsansatzes. Der Grad der Blaufärbung kann durch photometrische Messung im Bereich des Adsorptionsmaximums der anionischen Form des Farbstoffmoleküls ($\lambda = 595$ nm) quantifiziert werden und ist damit ein Maß für die Proteinkonzentration im zu determinierenden Ansatz.

Abbildung 4: Adsorptionsmaxima der Coomassie Brilliant Blue G 250-Moleküle abhängig von der Protonierung⁴³ Compton SJ et al. (1985) Anal Biochem 151: 370⁴ Compton SJ et al. (1985) Anal Biochem 151: 371

Durchführung:

Die Methode wurde nach Herstellerangaben der Firma Sigma-Aldrich (München) in „Standard 3,1 ml Assay Protocol“ und im modifiziertem „Micro 2 ml Assay Protocol“ durchgeführt.

2.2.7.1 Standard 3,1 ml Assay Protocol

Das Bradford-Reagenz wurde zunächst unter leichtem Schütteln auf Raumtemperatur gebracht. Parallel hierzu wurden Proteinstandards (BSA im gleichen Puffer wie das Analysat) folgender Konzentrationen angesetzt:

0,00 mg/ml

0,25 mg/ml

0,50 mg/ml

1,00 mg/ml

1,40 mg/ml

Anschließend erfolgte die Vorbereitung der Analysate, wie etwa Herstellen von Verdünnungsreihen. Hiernach erfolgte das Mischen beider in folgendem Verhältnis: Ein Teil Analysat mit 30 Teilen Reagenz, also 100 µl Analysat mit 3 ml Bradford-Reagenz. Nach Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur für mindestens 20 Minuten wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595$ nm im Photometer „SmartSpec 3000“ von Bio-Rad Laboratories GmbH bestimmt.

2.2.7.2 Micro 2 ml Assay Protocol

Die Durchführung dieses Protokolls entspricht dem 3,1 ml-Assayprotokoll. Hier werden aber 1 ml Probe mit 1 ml Bradfordreagenz gemischt, reinkubiert und dann gemessen.

2.2.8 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Silberfärbung

Material:

4-15% Mini-Protean TGX Precast Gels 10-well, 30 µl, 8.6 x 6.7 x 0.1 cm (W x L x Thickness) (Prod# 456-1083); Bio-Rad Laboratories GmbH / München

Pierce Silver Stain Kit (Prod# 24612, Lot# MD156422) Thermo Fisher Scientific / USA - Rockford, IL

Prinzip:

Die Untersuchung der Reinheit der aufgereinigten Antikörper wurde mit Hilfe der SDS-PAGE nach der von Laemmli 1970 veröffentlichten durchgeführt (95). Laemmli beschrieb hier erstmals die Kombination des Gelsystems aus Trenn- und Sammelgel mit der Verwendung des anionischen Tensids SDS als Detergens zur Spaltung der zu analysierenden Proteine. Bei Erhitzung der Proben auf 95°C werden mit Hilfe des SDS die Wasserstoffbrücken innerhalb des Proteins aufgebrochen und durch Zugabe von 2-Mercaptoethanol die Disulfidbrücken der Proteinkomplexe gespalten. Danach liegen die Proteine in Bruchstücken und in Primärstruktur vor. Das SDS lagert sich an die Proteinbruchstücke an und überdeckt durch seine Eigenschaften die Eigenladungen der Proteine, sodass diese eine konstant negative Ladungsverteilung aufweisen. Die Auftrennung geschieht über das Anlegen der Spannung in der Gelelektrophorese. Durch die Kombination von Sammel- und Trenngel (95) sammeln sich die Proteine an dem Übergang der beiden Geltypen. Weiterhin kann die Auftrennung der Proteine nach ihrer molaren Masse durch die Verwendung eines Gradientengels zusätzlich verbessert werden.

Um das Ergebnis der SDS-PAGE, also die aufgetrennten Proteinbanden, sehen zu können, muss eine zusätzliche Anfärbungsreaktion erfolgen. Die derzeit sensitivste Methode ist die Silberfärbung (96). Ihre Nachweisgrenze liegt bei 0,1 bis 1 ng pro Proteinbande. Dabei werden die Proteinbruchstücke zunächst durch Zugabe von 10% Eisessig und 30% Ethanol denaturiert, was

ein Ausfallen dieser zur Folge hat und eine Diffusion der Proteine aus dem Gel verhindert. Durch Inkubieren des Gels in einer Silbernitratlösung lagern sich die Silberionen an die Proteinbanden an. Durch anschließende Zugabe von Formaldehyd werden die Silberionen zu elementarem Silber reduziert und färben damit die Proteinbanden an.

Durchführung:

In einem ersten Schritt wurde der Probenpuffer aus 9 Teilen Laemmli Sample Buffer und einem Teil 2-Mercaptoethanol hergestellt. Die zu analysierenden Proben im Anschluss daran mit diesem im Verhältnis 1:2 (ein Teil Probenpuffer auf ein Teil Analysat) gemischt. Folgend wurden die Proben bei 95°C für fünf Minuten im Heizblock inkubiert. Nach Präparation der Elektrophoresekammer Criterion™ (Bio-Rad GmbH, München) und des Gradientengels wurden die Proben in die Taschen des Gels einpipettiert. Zur Größenbestimmung wurde bei jedem Gel ein Proteingrößenstandard auf das Gel aufgetragen (Fermentas Page Ruler). Der Marker war ohne vorherige Aufbereitung verwendbar. Die PAGE erfolgte bei 200 V für etwa 25 Minuten im Tris Base / Glycin / SDS-Puffer. Dann wurde das Gel zwei mal fünf Minuten in destilliertem Wasser gewaschen und in 30% Ethanol und 10% Eisessig mindestens zwei Mal 15 Minuten fixiert. Im Anschluss an die Fixation wurde das Gel zunächst zwei Mal fünf Minuten in 10% Ethanol und anschließend zwei mal fünf Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Es folgte die Inkubation des Gels in der „Sensitizer Working Solution“ für eine Minute und erneutem Waschen in destilliertem Wasser für zwei Mal eine Minute. Die Färbung erfolgte durch Inkubation des Gels in der „Stain working solution“ für 30 Minuten mit anschließendem Waschen mit destilliertem Wasser über zwei Mal 20 Sekunden, wonach sofort die „Developer Working Solution“ hinzugegeben wurde. In dieser Lösung wurde das Gel für zwei bis drei Minuten entwickelt. Hiernach wurde die Reaktion durch Zugabe von 5% Essigsäure abgestoppt. Jedes Gel wurde zur digitalen Datensicherung unmittelbar nach dem Versuch eingescannt.

2.2.9 Pufferaustausch durch Dialyse (Slide-A-Lyzer 10k Dialysis Cassette)

Material: Dialyse-Kassette Slide-A-Lyzer 10K MWCO, 30 ml

(Prod# 87732, Lot# KF136225) Thermo Fisher Scientific / USA - Rockford, IL

Prinzip:

Der Pufferaustausch durch Dialyse basiert auf dem Prinzip der semipermeablen Membran und der Diffusion. Verwendet wurden in diesem Fall Slide-A-LyzerTM-Dialysekassetten der Firma Fisher Thermo Scientific. Diese sind mit einer Poren-enthaltenden Membran aus regenerierter Cellulose ausgestattet. Die Porengröße beträgt 50 Å und besitzt einen MWCO von 10.000 kDa. Die Dialysetechnik wurde in dieser Arbeit zum Pufferaustausch der Eluate der Thiophilen Interaktions-Chromatographie verwendet, um das den BCA Protein Assay störende Ammoniumsulfat zu entfernen.

Durchführung:

Die Dialysekassette (30 ml) wurde mit 10 ml an zu dialysierenden Eluaten befüllt und gegen fünf Liter einfachen PBS unter Rühren dialysiert. Der Puffer wurde einmalig nach zwei Stunden gewechselt. Die Dialyse wurde nach 24 Stunden abgeschlossen.

2.2.10 Dot-Blot-Chromatographie

Prinzip:

Im Jahre 1982 beschrieben Hawkes et al die Anwendung eines verkürzten und vereinfachten Western Blot-Verfahrens, um Antikörper qualitativ in einer Lösung nachweisen zu können. Dieses Verfahren wurde als „Dot-Immuno-binding Assay“ bezeichnet (97). Heute bekannt als Dot Blot oder Slot Blot, wird dieses Verfahren auch weiterhin verwendet.

In dieser Arbeit wurde es als vereinfachter Western Blot angewendet. Dabei wird je 1 µl der Lösung auf eine Nitrocellulose-Membran aufgetragen.

Üblicherweise werden dabei Positiv-Kontrolle und Negativ-kontrolle mitgeführt. Die Membran wird im Folgenden mit einem je nach zu analysierendem Protein geeignetem Puffer abgesättigt und inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe des Detektionsantikörpers mit Enzymaktivität in Verdünnung mit dem angewendeten Puffer. Nach erneuter Inkubationszeit wird die Membran gewaschen, um die ungebundenen Antikörper und den Puffer zu entfernen und die Substratlösung aufzugeben. Nachdem die Dots sichtbar geworden sind, wird das Substrat abgeschüttet und mit Leitungswasser gewaschen.

Durchführung:

Die Nitrocellulosemembran wurde beschriftet und 1 µl der zu analysierenden Lösungen in Doppelbestimmung aufpipettiert. Nach dem Trocknen der aufgegebenen Tropfen wurde die Membran in Dot-Blot-Puffer (bestehend aus 0,1 M Tris-HCl, 0,1% BSA und 0,1% Tween 20) abgesättigt und fünf Minuten bei 37°C auf dem Probenschüttler inkubiert. Hiernach wurde der Puffer abgeschüttet und der Detektionsantikörper (Anti-IgM) in einer 1:1000-Verdünnung mit Dot-Blot-Puffer zur Membran hinzugegeben. Nach erneutem Inkubieren von 30 Minuten bei 37°C auf dem Probenschüttler wurde die Membran mit einfacher PBS-Lösung zwei Mal gewaschen und die Substratlösung aufgegeben. Unter leichtem Schütteln wurden die Dots nach etwa einer Minute sichtbar. Die Reaktion wurde durch Abschütten des Substrats und Waschen der Membran mit Leitungswasser gestoppt.

2.2.11 ELISA

2.2.11.1 Prinzip

Der ELISA wurde Anfang der 70er Jahre von zwei Forschungsgruppen unabhängig voneinander entwickelt. Engvall und Perlmann veröffentlichten 1971 ihre Arbeit zur quantitativen Bestimmung von IgG-Antikörpern in Hasenserum durch alkalische Phosphatase. Im selben Jahr demonstrierten Schuurs und van Weemen die Bestimmung von humanem Choriongonadotropin via ELISA (99). Diese Methode konnte sich in der

folgenden Zeit gegen den Radio-Immunoassay (= RIA) durchsetzen, der bis dorthin, seit seiner Erstbeschreibung durch Yalow und Berson 1959 (100), als erster Typ der Immunoassays zur Konzentrationsbestimmung verschiedener Analyte vorwiegend verwendet wurde. Es konnte in anschließenden Arbeiten gezeigt werden, dass der ELISA dem RIA durch den Verzicht auf teure und gefährliche radioaktive Isotope, durch seine Praktikabilität und vielfältigeren Anwendungsmöglichkeiten überlegen ist (101). Die vielfältigen Anwendungsbereiche ergeben sich aus der Vielfalt an Kombinationen, aus und in denen ein Enzymgekoppelter Detektionsantikörper zusammen- und gegen verschiedene Antigene eingesetzt werden kann (101, 102, 103, 104, 105, 106).

Der verwendete HAV-Antigen-ELISA zur Bestimmung der HAV-Konzentration in verschiedenen Proben wird als heterogener Sandwich-ELISA klassifiziert (101, 58). Hierbei wird jede Vertiefung einer 96-well-Mikrotiterplatte mit dem HAV-spezifischen MAK beschichtet und nach Zugabe des Substrats bzw. der Kontrolllösungen inkubiert. Nach dem anschließenden Abwaschen der ungebundenen Antigene folgt die zweite Inkubation nach Zugabe einer Lösung, welche ein Anti-HAV-AK-Peroxidase-Konjugat enthält. Nach Entfernen der ungebundenen Antikörper mittels Waschen wird durch Zugabe des Substrats eine Farbreaktion initiiert, welche nach ausreichender Inkubationszeit mit Hilfe von Schwefelsäure gestoppt wird, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgt (s. Abbildung 5). Die Extinktion dieser Farbreaktion ist proportional zur Konzentration des zu bestimmenden HAV-Antigens.

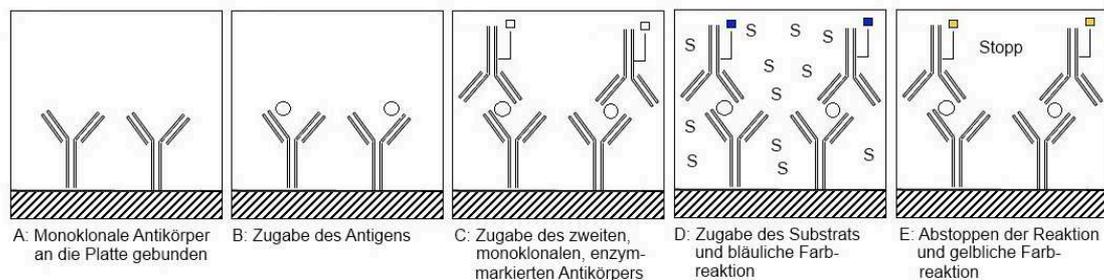


Abbildung 5: Mechanismus und Prozess der Nachweisreaktion im ELISA. S= Substrat.

2.2.11.2 Plattenbeschichtung

Durchführung:

Die gereinigten anti-HAV IgM-Antikörper 4E1 wurden 50 mM Carbonatpuffer (pH = 9,5) verdünnt und an die Böden der Näpfchen einer 96-well-Mikrotiterplatte gebunden (100 µl HAV-Antikörper-Verdünnung pro Vertiefung). Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei Raumtemperatur wurden diese mit einer 10%igen BSA-Lösung mit Zusatz von 0,1% Natriumazid (20 µl pro Vertiefung) abgesättigt und mit einer Klebefolie abgedeckt im Kühlschrank bis zur Verwendung gelagert.

2.2.11.3 HAV-Antigen-ELISA

Material: HAV-Antigen EIA (Prod# E12, Lot# 110711, 080811), Mediagnost GmbH, Reutlingen sowie eigens hergestellte, mit MAK IgM 4E1 beschichtete Platten

Durchführung:

Im ersten Schritt wurden in die Näpfchen der 96-well-Mikrotiterplatte 100 µl der jeweiligen Positiv- bzw. Negativkontrolle oder Probenverdünnung aufgegeben, sodass in jeder Vertiefung 100 µl vorlagen (s. Belegungsplan 2.2.11.3.1). Als Positivkontrolle (= PK) wird eine mit Formaldehyd inaktivierte HAV-Lösung verwendet. Diese wurde entsprechend dem Belegungsplan der 96-well-Mikrotiterplatte verdünnt. Als Proben wurden die im Belegungsplan vermerkten Verdünnungen (1:0, 1:1, 1:3, 1:7, 1:15, 1:31)⁵ der PK verwendet. Als Negativkontrolle wurde Verdünnungspuffer eingesetzt. Sofern eine mit gereinigtem anti-HAV IgM 4E1 beschichtete (s. 2.2.11.2) 96-well-Mikrotiterplatte verwendet wurde, wurde die Platte vor Aufgabe der Proben bzw. Kontrollen drei Mal mit je 300 µl PBS gewaschen. Die Aufgabe der Proben und Kontrollen erfolgte in Mehrfachbestimmung (s. Belegungsplan).

⁵ Hinweis zu den Verdünnungsangaben: Die Angabe 1:31 entspricht einer Verdünnung von einem Teil Komponente A zu 31 Teilen Komponente B. Komponente B ist hierbei der Verdünnungspuffer, Komponente A die im regulären HAV-Antigen-ELISA verwendete Positivkontrolle.

Nach zweistündiger Inkubationszeit bei 37°C wurden die Platte drei Mal mit je 300 µl Waschpuffer (= WP) für je zehn Sekunden gewaschen. Es folgten die Aufgabe von 100 µl Konjugat-Gebrauchslösung pro Vertiefung und eine zweite Inkubationszeit von 2 Stunden bei 37°C. Anschließend wurde wie oben beschrieben gewaschen. Die Zugabe der Substratlösung (100 µl pro Vertiefung) erzeugt in der folgenden Inkubationszeit von 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur eine blaue Farbreaktion an denen mit HAV-Antigen beladenen Antikörpern. Diese Reaktion wurde im Folgenden durch Zugabe von 100 µl 0,25 M Schwefelsäure pro Vertiefung abgestoppt, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgt. Die Extinktion dieser Farbreaktion wurde photometrisch bei $\lambda = 450$ nm quantifiziert und ist proportional zur Konzentration des gesuchten Antigens. Zur Titerbestimmung wurde zunächst der Cutoff-Wert wie folgt berechnet:

$$Cut - Off = \frac{\mu(PK) - \mu(NK)}{10}$$

Hierbei ist μ der Mittelwert entweder der Positivkontrolle (= PK) oder der Negativkontrolle (= NK). Als Cut-Off gilt derjenige Extinktionswert, bei dem gerade noch ein Farbreaktion zu messen ist. Die erhaltenen Extinktionswerte wurden abschließend in ein logarithmisches Koordinatensystem gegen die Verdünnungen aufgetragen, womit der Titer der aufgegebenen Probe (= verschiedene Verdünnungen der PK) bestimmt werden konnte.

2.2.11.3.1 Belegungsplan

Tabelle 3: Belegungsplan der Kontrolllösungen und Verdünnungen auf der 96-well-Mikrotiterplatte im HAV-Antigen-ELISA. PK = Positivkontrolle, NK = Negativkontrolle = Verdünnungspuffer. Eine Verdünnung von 1:31 beschreibt eine Lösung von 1 Teil A zu 31 Teilen B.

NK	PK 1:31	PK 1:31	PK 1:15	PK 1:15	PK 1:7	PK 1:7	PK 1:3	PK 1:3	PK 1:1	PK 1:1	PK 1:0
NK	PK 1:31	PK 1:31	PK 1:15	PK 1:15	PK 1:7	PK 1:7	PK 1:3	PK 1:3	PK 1:1	PK 1:1	PK 1:0
NK	PK 1:31	PK 1:31	PK 1:15	PK 1:15	PK 1:7	PK 1:7	PK 1:3	PK 1:3	PK 1:1	PK 1:1	PK 1:0
NK	PK 1:31	PK 1:31	PK 1:15	PK 1:15	PK 1:7	PK 1:7	PK 1:3	PK 1:3	PK 1:1	PK 1:1	PK 1:0
PK 1:0	PK 1:31	PK 1:31	PK 1:15	PK 1:15	PK 1:7	PK 1:7	PK 1:3	PK 1:3	PK 1:1	PK 1:1	PK 1:0
PK 1:0	PK 1:31	PK 1:31	PK 1:15	PK 1:15	PK 1:7	PK 1:7	PK 1:3	PK 1:3	PK 1:1	PK 1:1	PK 1:0
PK 1:0	PK 1:31	PK 1:31	PK 1:15	PK 1:15	PK 1:7	PK 1:7	PK 1:3	PK 1:3	PK 1:1	PK 1:1	PK 1:0
PK 1:0	PK 1:31	PK 1:31	PK 1:15	PK 1:15	PK 1:7	PK 1:7	PK 1:3	PK 1:3	PK 1:1	PK 1:1	PK 1:0

2.2.12 FITC-Markierung und direkte Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Material: s. o.

Prinzip:

Mit der Untersuchung von autofluoreszierenden Strukturen durch Köhler im Jahre 1904 in den ersten Versuchen zur Ultraviolett-Mikroskopie wurde der Grundstein zur Fluoreszenz-Mikroskopie gelegt (107). Nach Jahren der

Forschung entwickelten Coons und Kaplan im Jahre 1950 eine Methode zur Markierung von Antikörpern mit Fluoreszenzfarbstoffen (108, 109). Auf diesen Erkenntnissen basiert die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung des MAK IgM 4E1. Die Fluoreszenz basiert auf Adsorption und nachfolgender Emission von Lichtenergie durch Moleküle, die aufgrund ihrer spezifischen Struktur hierzu in der Lage sind. Bei der Applikation von Licht auf fluoreszierende Moleküle können diese die Lichtenergie absorbieren und gelangen so auf ein höheres Energie-Niveau. Die Wellenlänge, die zur Exzitation eines fluoreszierenden Moleküls benötigt wird, hängt von dem verwendeten fluoreszierenden Stoff ab. Da der Zustand des Moleküls nach Exzitation sehr instabil ist, fällt es nach sehr kurzer Zeit (10^{-9} bis 10^{-15} Sekunden) wieder auf das ursprüngliche Energie-Niveau zurück. Dabei gibt das Molekül die aufgenommene Energie in Form von Licht wieder ab. Die Wellenlänge des abgegebenen Lichtes ist jedoch länger, als die des aufgenommenen Lichtes (Stokes-Shift). Daher hat das emittierte Licht eine andere Farbe, als das Licht, welches zur Exzitation des Moleküls benötigt wird. Die Farbe des emittierten Lichtes wird bei Verwendung von entsprechenden optischen Filtern unter dem Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar. Wird dauerhaft Licht appliziert, welches der zur Exzitation benötigten Wellenlänge entspricht, so können die fluoreszierenden Moleküle in einen Zyklus gelangen, in dem der beschriebene Vorgang fortwährend wiederholt wird. Nur so ist der Effekt der Fluoreszenz für das menschliche Auge erkennbar. (110).

Vorbereitend wurden zunächst MRC-5 Zellen in Chamber Slides bei 37°C und 5% CO_2 herangezogen, bis ein konfluenten Zellrasen entwickelt war. Anschließend wurden die Zellen mit HAV infiziert und mehrere Wochen inkubiert. Nach ausreichender Infektion wurden die Zellen durch zehnmütiges Einwirken von eiskaltem Aceton permeabilisiert und fixiert. Da Antikörper ohne Hilfsmittel nicht in Fluoreszenz dargestellt werden können, werden diese mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC gekoppelt. Durch Anregung des gekoppelten FITC durch Applikation von Licht mit einer Wellenlänge von 485 nm werden die Antikörper unter dem Mikroskop (bei $\lambda = 514$ nm) als

grüne Punkte sichtbar. Auch die Zellkerne können durch Kopplung von DAPI unter Applikation von Licht der Wellenlänge 358 nm fluoreszierend dargestellt werden und werden bei ($\lambda = 461 \text{ nm}$) blau sichtbar.

Durchführung:

2.2.12.1 Aussähen der Zellen

Vorbereitend wurden 10 ml des Trypsin-EDTA sowie 75 ml des Medium 10% bei 37°C vorgewärmt. Zur Zellverdauung wurden 5 ml des Trypsin-EDTAs in das Medium der Zellkulturflasche aufgegeben, die Flasche kurz geschwenkt und das Trypsin EDTA sofort wieder abgenommen. Nach erneuter Aufgabe von weiteren 5ml Trypsin-EDTA wird das Medium in der Zellkulturflasche drei bis fünf Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Inkubationszeit wurde an der Zeit gemessen, die benötigt wurde, bis sich die Zellen abgelöst haben. Die Feststellung erfolgte durch mikroskopische Kontrolle. Die abgelösten Zellen wurden in 10 ml des Medium 10% aufgenommen und anschließend in ein 50 ml-Zentrifugen-Röhrchen gegeben und die Zentrifugation für acht bis zehn Minuten bei 1250 rpm durchgeführt. Das Zellpellet wurde danach abgenommen, in 60 ml des Medium 10% suspendiert und der Überstand aus dem Zentrifugen-Röhrchen verworfen. Die Zellpellet-Medium 10%-Suspension wurde anschließend auf neue Zellkulturflaschen oder -Platten verteilt und diese Kulturen bei 37°C inkubiert. Um die Kulturen zu erhalten wurde das Medium ein bis zwei Mal pro Woche gewechselt (5%iges Erhaltungsmedium).

2.2.12.2 Infektion von MRC-5 Zellen in Chamber Slides zur Immunfluoreszenz

Um die Zellen mit Hepatitis A zu infizieren, wurden die Zellen zunächst mit Medium ohne FCS gewaschen, dann das Hepatitis A-Antigen in einer Verdünnung von 1:30 auf die Zellen gegeben (200 μl je Vertiefung). Nach einer Inkubationsdauer von 2 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 wurden die Zellen erneut gewaschen und jeweils 600 μl Medium mit 5%FCS pro Vertiefung aufgegeben. Um eine Durchinfizierung zu garantieren, wurden die

Zellen weiterhin bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und wöchentlich ein Mediumwechsel durchgeführt.

2.2.12.3 FITC-Markierung monoklonaler Anti-HAV IgM 4E1-Antikörper

Zur Markierung des MAK IgM 4E1 mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC wurden 10ml Proteinlösung mit 3ml Kopplungspuffer und 8 mg FITC 16 Stunden bei 4°C unter Rühren inkubiert. Um im anschließenden Schritt das nun gebundene FITC zu entfernen, wurde die Suspension 24 Stunden bei Raumtemperatur im Slide-A-Lyzer gegen einfaches PBS dialysiert. Abschließend erfolgte die Sterilfiltration der markierten Antikörper durch einen 0,22 µm-Filter.

2.2.12.4 Immunfluoreszenz mit FITC-markierten MAK 4E1

Die infizierten Zellen wurden vorsichtig mit PBS gewaschen. Um die Zellen am Objektträger zu fixieren, wurden sie acht Minuten mit eiskaltem Aceton inkubiert und anschließend 30 Minuten luftgetrocknet. Danach erfolgte die Kopplung der FITC-markierten MAK 4E1. Dazu wurden 250 µl Antikörperverdünnung je Vertiefung aufgegeben und in einer feuchten Kammer eine Stunde bei 37°C lichtgeschützt inkubiert. Nach Inkubation erfolgte ein weiterer Waschschrift der Zellen mit PBS, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Um die Zellkerne ebenso unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen, wurden die Zellen noch 1 Minute mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI inkubiert. Anschließend wurde erneut ungebundenes Material mit PBS abgewaschen und der Objektträger wird mit Fluoprep eingedeckt. Die Lagerung erfolgte kühl und dunkel. Nach einiger Zeit konnten die infizierten Zellen mit den markierten MAK IgM 4E1 im Fluoreszenzmikroskop eingesehen werden.

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung des MAK 4E1 – Zellkultur-Überstandes

Durch die PEG-vermittelte Zellfusion muriner B-Lymphozyten der Milz und Myelomzellen wurden Hybridzellen gezüchtet und selektioniert (49). In dieser Arbeit produzierten diese Zellen für HAV monoklonalen Antikörper IgM 4E1.

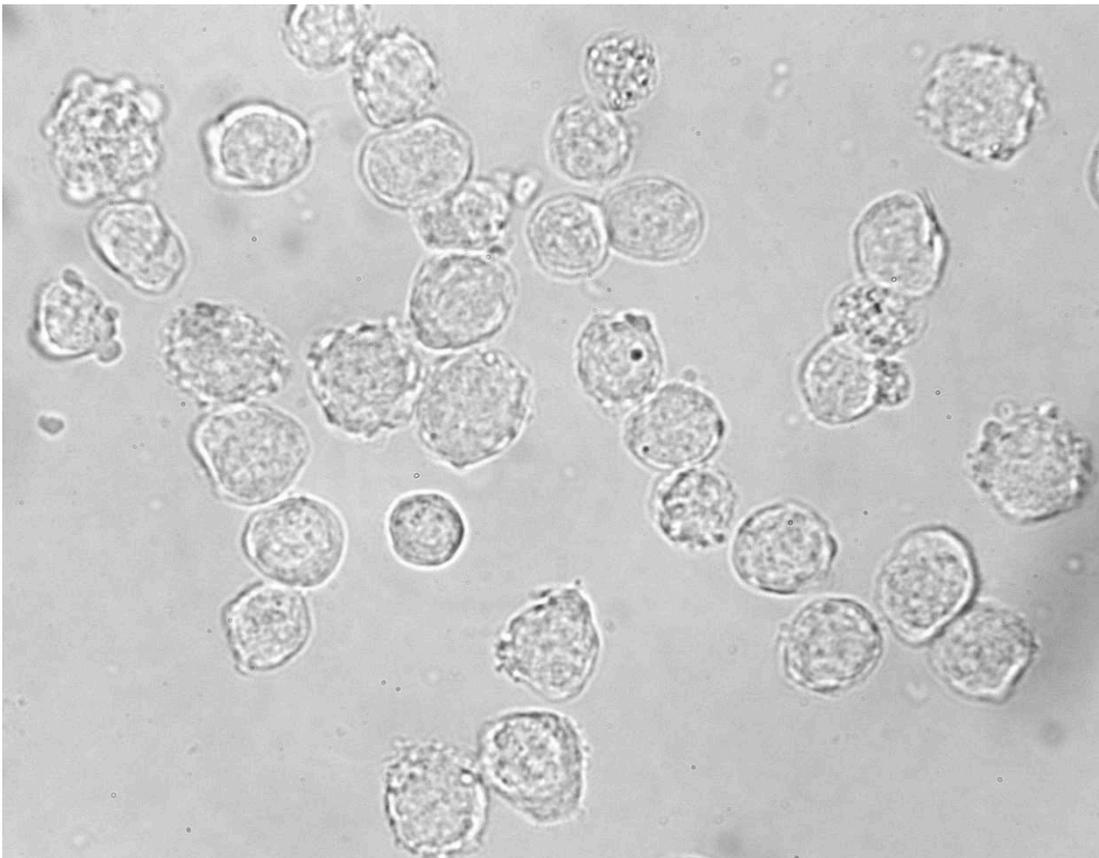


Abbildung 6: Hybridoma-Zellkultur zur Produktion des gegen HAV gerichteten MAK IgM 4E1 in 250facher Vergrößerung.



Abbildung 7: Hybridoma-Zellkultur zur Produktion des gegen HAV gerichteten MAK IgM 4E1 in 400facher Vergrößerung.

3.2 Reinigung des monoklonalen Antikörpers IgM 4E1

Vor der weiteren Verwendung des MAK IgM 4E1 wurde dieser zunächst gereinigt. Zur Reinigung wurden folgende Methoden verwendet: Konzentration mittels Zentrifugalfiltration, Größenausschluss-Chromatographie (= Size Exclusion Chromatography, SEC) und Thiophile Adsorptions-Chromatographie (= Thiophilic Adsorption Chromatography, TAC).

Zur Produktion des gegen HAV gerichteten, MAK IgM 4E1 wurde der Hybridomaklon 4E1 in Kultur genommen. Abbildung 7 zeigt die IgM 4E1-produzierenden Zellen. Diese Zellen wurden im Hybridoma-Expressmedium kultiviert. Das Hybridoma-Expressmedium hat den Vorteil, dass es alle zur Kultivierung von Hybridomazellen notwendigen Faktoren enthält. Daher muss hierfür kein fetales Kälberserum zur Kultur zugesetzt werden, was die Aufreinigung des MAK IgM 4E1 aus dem Zellkultur-Überstand erleichtert. Die

den MAK IgM 4E1 enthaltenden Zellkultur-Überstände wurden als Ausgangsmaterial für die folgenden Versuche verwendet.

In der Darstellung durch SDS-PAGE sind Verunreinigungen zu erkennen (s. Abbildung 8, Geltaschen 2-4), welche besonders deutlich im durch die Zentrifugationsfiltration konzentrierten Ausgangsmaterial zur Geltung kommen (s. Abbildung 8, Geltaschen 4-10). Um eine Interaktion zusätzlicher Proteine zu minimieren, wurde das Ausgangsmaterial gereinigt (s. Abbildung 8).

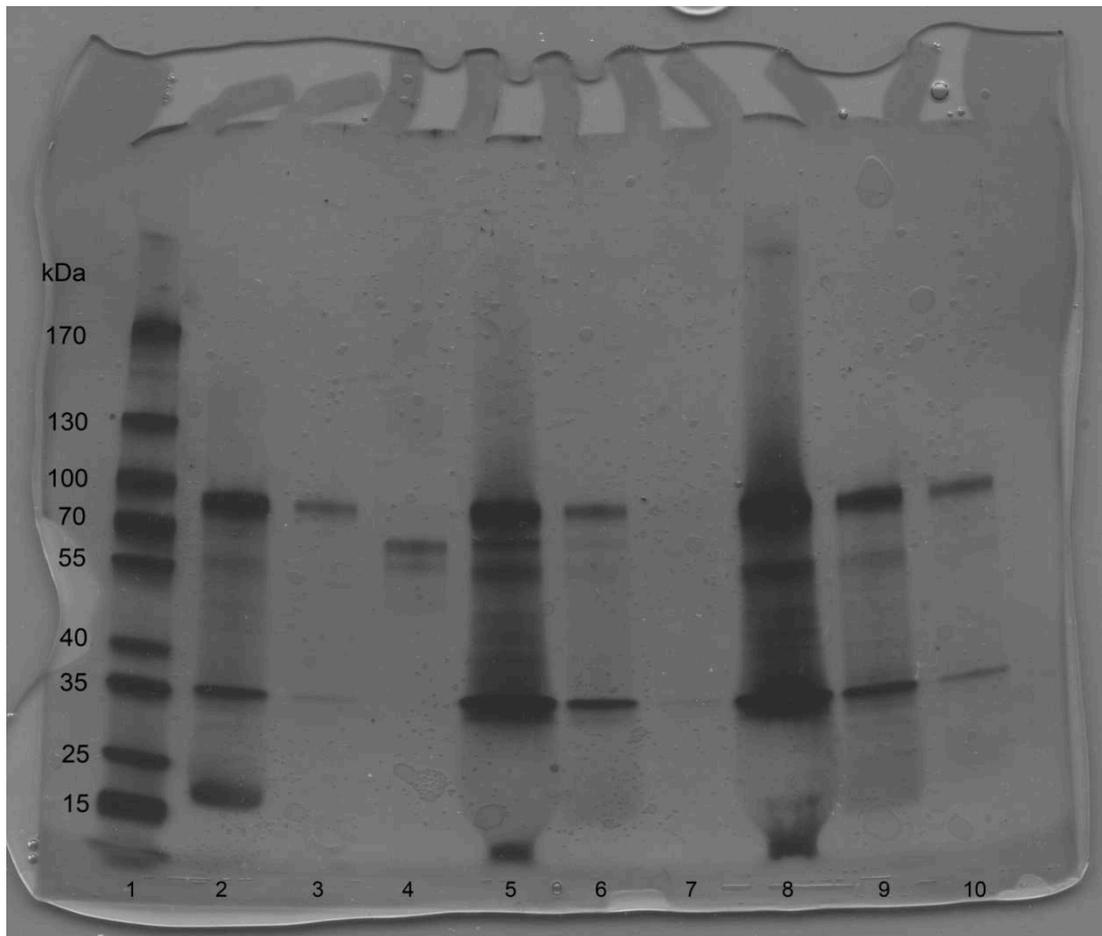


Abbildung 8: Darstellung des Ausgangsmaterials in SDS-PAGE; 1: Marker (s. Material, 2,5 μ l); 2-4: Ausgangsmaterial (= Hybridoma-Expressmedium-Zellkulturüberstand = HyEx) unverdünnt, in 1:9-Verdünnung, in 1:99-Verdünnung, je 5 μ l; 5-7: HyEx konzentriert bei 10k und 100k MWCO unverdünnt, in 1:9-Verdünnung, in 1:99-Verdünnung, je 5 μ l; 8-10: HyEx konzentriert bei 100k MWCO unverdünnt, in 1:9-Verdünnung, in 1:99-Verdünnung, je 5 μ l.

3.2.1 Reinigung mittels Konzentration durch Zentrifugalfiltration

Um bei der angestrebten Aufreinigung bei jedem Versuchsgang eine höhere Ausbeute an gereinigtem Antikörper zu gewinnen, wurde das Ausgangsmaterial (im Hybridoma Expressmedium-Zellkulturüberstand enthaltener MAK IgM 4E1) mittels Zentrifugalfiltration vorgereinigt und konzentriert. Hierzu wurden Membranen mit einer Größe von 100.000 kDa und 10.000 kDa verwendet. In dieser Versuchsanordnung sind 3 Fraktionen zu unterscheiden:

- a. Das Ausgangsmaterial (nicht konzentrierter Hybridoma-Expressmedium-Zellkulturüberstand = HyEx)
- b. Das einfach konzentrierte Ausgangsmaterial ($= 10^5$): bei einer Membranporengröße von 100 kDa zentrifugiert und filtriert
- c. Das doppelt konzentrierte Ausgangsmaterial ($= 10^4$): zunächst bei einer Membranporengröße von 100 kDa, anschließend bei 10 kDa zentrifugiert und filtriert.

Insgesamt wurden auf diese Weise vier Liter des Zellkulturüberstandes konzentriert. Die durch diesen Versuch entstandenen drei Fraktionen des Ausgangsmaterials wurden anschließend zunächst hinsichtlich des Proteingehaltes durch BCA Protein Assay untereinander verglichen. Dies ergab folgendes Ergebnis: $c_{10^5} > c_{10^4} > c_{HyEx}$ (vgl. Tabelle 4).

Abbildung 8 zeigt den anschließenden Vergleich dieser drei Fraktionen hinsichtlich ihres IgM-Gehaltes in einer Darstellung durch SDS-PAGE. Bei Vergleich der Geltaschen 2, 5, und 8 (je 5 μ l der Fraktionen HyEx, 10^5 und 10^4 , unverdünnt) lässt sich in dieser Darstellung Folgendes erkennen:

- a. Die charakteristischen Banden eines IgM-AK bei 96 und 38 kDa
- b. Eine zunehmende Verdichtung der charakteristischen Proteinbanden eines IgM-AK bei 96 und 38 kDa
- c. Eine zunehmende Verdichtung der Proteinbanden zwischen 96 und 38 kDa von Geltasche 2 über 5 nach 8

Zur Kontrolle wurde die Proteinmenge der Durchläufe der Zentrifugalfiltration mittels BCA bestimmt (s. a. 2.2.2). Ebenso wurde der Gehalt an IgM-Antikörpern der Durchläufe durch SDS-PAGE dargestellt (s. Abbildung 9). Es ergab sich dabei eine mittlere Proteinkonzentration der Proben des Durchlaufs von 1214,07 µg/ml und ein extrem niedriger Gehalt an IgM-Antikörpern (s. Abbildung 9, Geltaschen 2 bis 6). Dies lässt den Schluss zu, dass bei der Zentrifugation nur ein marginaler Verlust an IgM-MAK zu verzeichnen ist.

Tabelle 4: Durchschnittswerte der Proteinbestimmungen des Ausgangsmaterials und dessen Konzentraten im BCA Protein Assay. BCA = Bicinchoninsäure Protein Assay, HyEx = Hybridoma Expressmedium Zellkulturüberstand = unkonzentriertes Ausgangsmaterial, 10⁴= durch Zentrifugalfiltration bei einer Membranporengröße von 100.000 Da und 10.000 Da zweifach konzentriertes Ausgangsmaterial, 10⁵= durch Zentrifugalfiltration bei einer Membranporengröße von 100.000 Da einfach konzentriertes Ausgangsmaterial.

Material	Proteingehalt [µg/ml]
HyEx	1335,96
10⁴	1629,31
10⁵	1900,55

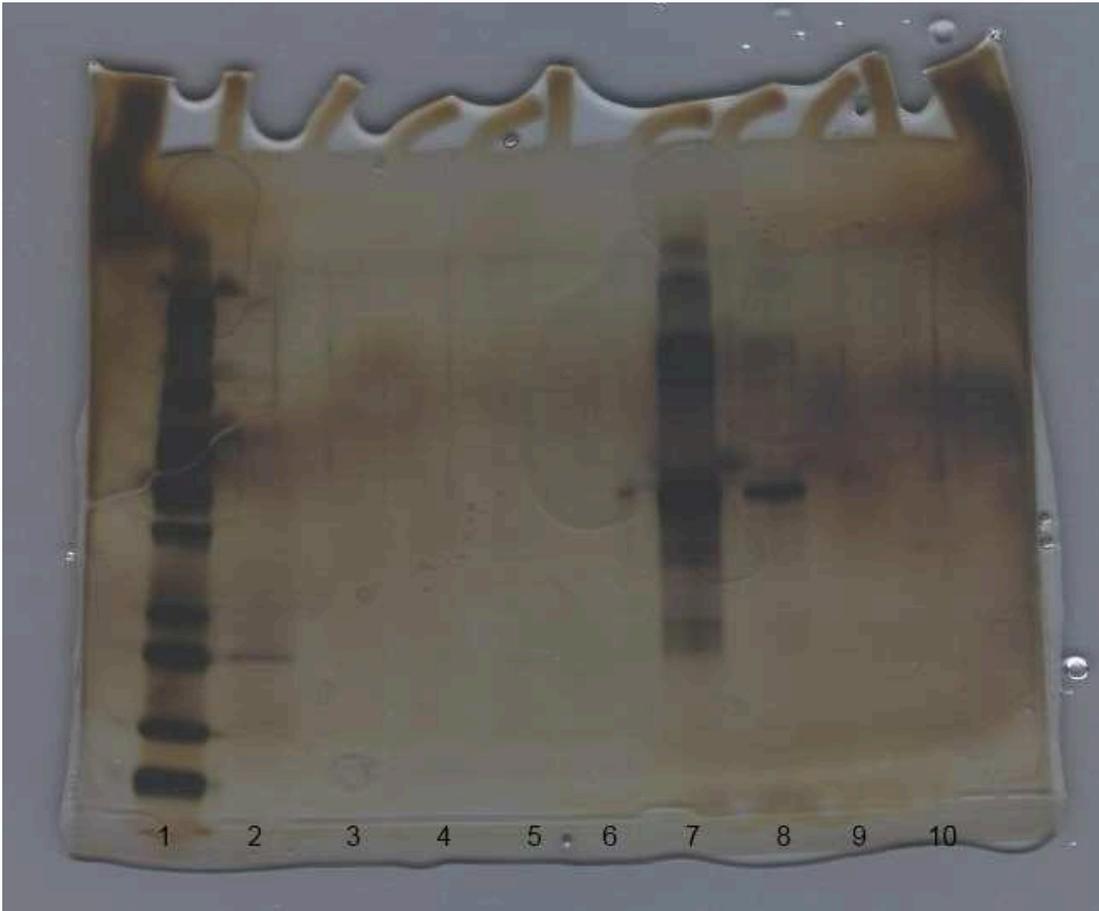


Abbildung 9: Darstellung des IgM-Gehalts der Fraktionen des Durchlaufs des Doppelkonzentrats bei der Zentrifugalfiltration und Vergleich dessen mit BSA-Verdünnungen. 1: Marker (s. Material, 2,5 μ l); 2-6: Durchlauf (DL) des Doppelkonzentrats von 5 verschiedenen Konzentrationsversuchen, je 5 μ l; 7-10: BSA-Verdünnungsreihe in PBS zur Kontrolle (7 = 0,1 mg/ml, 8 = 0,01 mg/ml, 9 = 0,001 mg/ml, 10 = 0,0001 mg/ml).

Bemerkenswert ist bei Betrachtung von Abbildung 8, dass in die in Geltasche 5 enthaltene Fraktion ($= 10^4$) eine vergleichbare Verdichtung der charakteristischen Banden bei 96 und 38 kDa aufweist, wie die in Geltasche 8 enthaltene Fraktion ($= 10^5$), aber eine höhere Verdichtung als die Fraktion in Geltasche 2 (= Ausgangsmaterial = HyEx). Bezieht man dabei den bestimmten Proteingehalt mit ein (vgl. Tabelle 4), so liegt der Schluss nahe, dass in Geltasche 5 eine Fraktion vorliegen muss, die sowohl konzentriert, als auch gereinigt ist.

Bei Betrachtung der 1:9-Verdünnungen jeder der drei Fraktionen (Geltaschen 3, 6, und 9) wird dieser Schluss bestätigt, da in der 1:9-Verdünnung von Fraktion 10^4 (Geltasche 6) die charakteristischen Banden eines IgM-AK

deutlicher zu erkennen sind als in der 1:9-Verdünnung des Ausgangsmaterials (Geltasche 3), aber ohne Verdichtung der Proteinbanden zwischen 96 und 38 kDa, wie in der 1:9-Verdünnung der Fraktion 10^5 erkennbar (Geltasche 9).

Diese Ergebnisse zeigen also, dass durch die Anwendung der Zentrifugalfiltration eine Konzentration des Ausgangsmaterials sowie eine Reinigung dessen erreicht werden konnte. Dennoch erbrachte diese Methode nicht den gewünschten Reinheitsgrad, weshalb weitere Methoden zur Aufreinigung angewendet wurden (s. 3.2.2 und 3.2.3)

3.2.2 Reinigung des Ausgangsmaterials durch PEG 6000-Fällung

Der Gedanke hinter diesem Ansatz war, eine gleichzeitige Konzentration und Reinigung der MAK durch Fällung und anschließende Redilution mittels PEG 6000 zu erreichen. Die Ergebnisse erbrachten wie auch die Zentrifugalfiltration nicht den gewünschten Reinigungseffekt. Die Versuche zur PEG 6000-Fällungsreaktion wurden zugunsten der Etablierung einer Reinigungsmethode ohne einleitenden Arbeitsschritt zur Präzipitation bzw. Verdichtung des Ausgangsmaterials nichts mehr weitergeführt.

3.2.3 Reinigung mittels GE Healthcare HiTrap® IgM Purification HP Column TAC

3.2.3.1 Verwendung des durch die Zentrifugalfiltration konzentrierten Ausgangsmaterials

Um den durch die Zentrifugalfiltration erreichten Reinheitsgrad des Ausgangsmaterials (= HyEx) zu steigern, wurde zunächst die Fraktion 10^5 in der TAC (= Thiophile Interaktions-Chromatographie) verwendet.

Hierzu wurden die Puffer den Herstellerangaben entsprechend vorbereitet und die Probe mit 0,8M Ammoniumsulfat versetzt und anschließend bei 0,45 µm steril filtriert. Es folgte die TAC (Versuch A1) in ihren fünf Hauptschritten,

welche einmalig mit demselben Versuchsaufbau wiederholt wurde (Versuch A2). (s. a. 2.2.4).

Dabei wurde die TAC-Säule zunächst mit Bindungspuffer equilibriert, Im zweiten Schritt wurde eine Menge von 5 CV (= Column Volumes \equiv 5 ml) der Fraktion 10^5 aus der Zentrifugalfiltration (3.2.1) über die Säule gepumpt, wonach im dritten Schritt mit BB die nicht an die Säule gebundenen MAK sowie Verunreinigungen abgewaschen wurden. Mithilfe des Elutionspuffers wurden die gebundenen MAK in Schritt vier wieder von der Säule gelöst und in 12 Fraktionen zu 1 ml getrennt aufgefangen. Als fünfter Schritt folgte die Aufbereitung der Säule für weitere Versuche durch Aufbringen von Regenerationspuffer.

Um zu sehen, welchen Reinheitsgrad dieser Versuch erbrachte, wurden ein Gel angefertigt (Abbildung 10). Das Ausgangsmaterial des Versuches A1 (5 ml der 10^5 -Fraktion aus 3.2.1) befindet sich in Abbildung 10 in Geltasche 2, die Elutionsfraktionen 1 bis 4 in den Geltaschen 3 bis 6. Hierauf folgt der Durchlauf (Schritt 2) in der Geltasche 7 sowie die Waschlösung aus dem dritten Schritt (s. o.) dieser Versuchsanordnung in Geltasche 8.

Die charakteristischen Banden des MAK IgM 4E1 sind in den Geltaschen 2 (Ausgangsmaterial des Versuches A1) sowie in den Geltaschen 5 und 6 (Elutionsfraktionen 3 und 4) zu erkennen (Abbildung 11). Sie liegen bei 96 und 38 kDa. Beim Vergleich dieser Fraktionen fällt auf, dass die Verunreinigungen (engl. „smear“) die noch im Ausgangsmaterial (Geltasche 2) zwischen den beiden charakteristischen Banden des MAK zu sehen sind, in den Elutionsfraktionen 3 und 4 (Geltaschen 5 und 6) deutlich reduziert werden konnten.

Hierbei ist auch die durch die TAC bedingte Konzentration des Ausgangsmaterials von Versuch A1 (= Fraktion 10^5 aus 3.2.1) zu beachten: Das dargestellte Ausgangsmaterial besitzt ein Gesamtvolumen von 5 ml, jede Elutionsfraktion lediglich ein Volumen von 1 ml. Dies spricht dafür, dass in den Elutionsfraktionen eine höhere Konzentration an MAK IgM 4E1 bei gleichzeitig geringerem Proteingehalt vorliegt..

Bei der Verwendung von 5 CV (= Column Volumes \equiv 5 ml) der Fraktion 10^5 aus 3.2.1 konnte eine sichtbare Aufreinigung erreicht werden. Zwar konnte der Reinheitsgrad im Vergleich zur Zentrifugalfiltration gesteigert werden, entsprach aber immer noch nicht dem gewünschten Ergebnis.

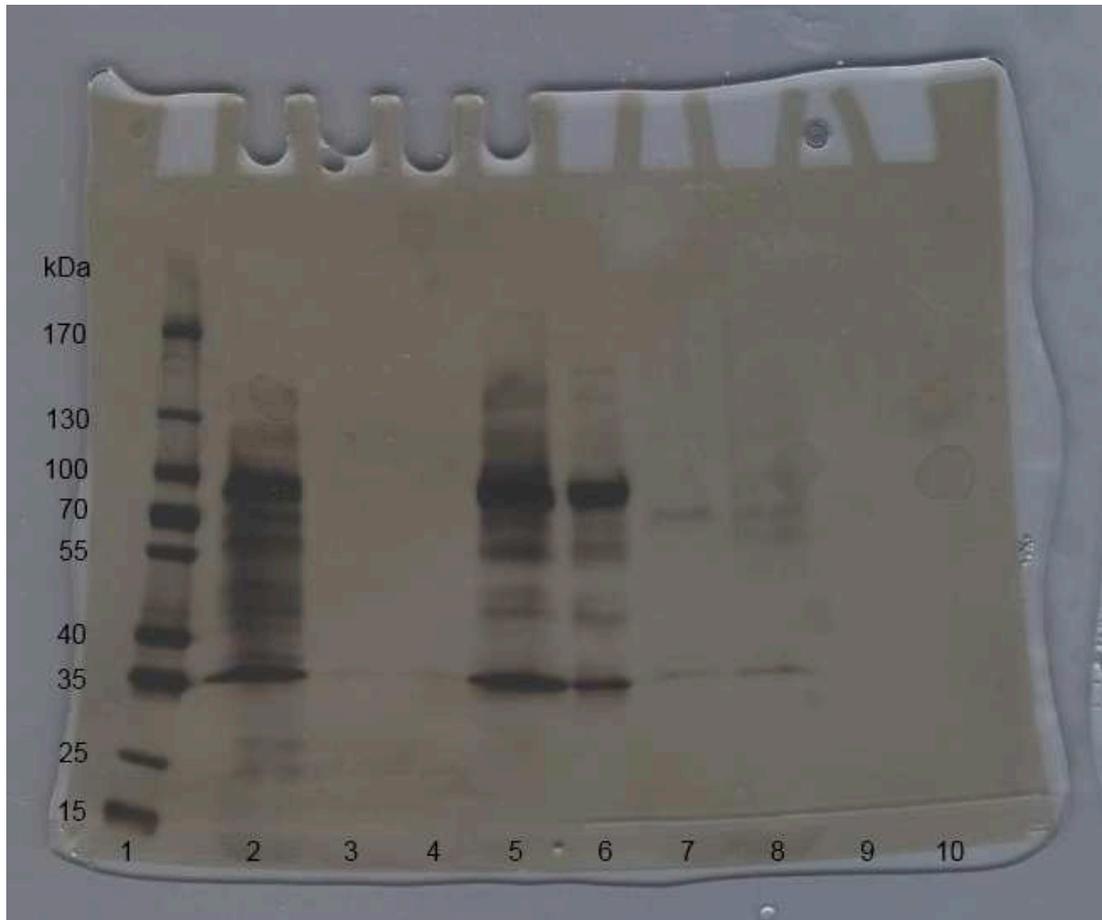


Abbildung 10: Versuch A1: SDS-PAGE der HiTrap® TAC unter Verwendung von 5 ml des durch die Zentrifugalfiltration hergestellten Einfachkonzentrats versetzt mit 0,8M Ammoniumsulfat, steril filtriert und entgast bei $0,45 \mu\text{m}$. kDa = kiloDalton, 1: Marker (s. Material, $2,5 \mu\text{l}$); 2: Ausgangsmaterial ($10 \mu\text{l}$); 3-6: Elutionsfraktionen 1 - 4 (je $15 \mu\text{l}$); 7: Durchlauf ($15 \mu\text{l}$); 8: Waschlösung ($15 \mu\text{l}$).

Um eine bessere Aufreinigung zu erzielen wurde ein weiterer Ansatz durchgeführt. Dazu wurde stufenweise die Molarität des Ammoniumsulfats in Ausgangsmaterial und im Puffer erhöht. Die Molarität wurde zunächst auf 1M, im Weiteren auf 1,2M und 1,6M gesteigert (Versuche A3, A4 und A5). Diese Ansätze konnten in der TAC jedoch nicht verwendet werden, da sofort

nach Zugabe des Ammoniumsulfats eine Fällungsreaktion stattfand, die ebenfalls keinen reinigenden Effekt erbrachte.

Im nächsten Ansatz (Versuch A6) wurden insgesamt 4 Hauptelutionsfraktionen von zwei erfolgreichen TAC-Versuchen vereinigt (Versuche A1 und A2, s. o.). In den Versuchen A1 und A2 wurde jeweils als Ausgangsmaterial 5 ml der Fraktion 10^5 aus der Zentrifugalfiltration (s. 3.2.1) verwendet. Nach Verdünnung mit vorbereitetem Bindungspuffer ergab sich ein Volumen von 10 ml. Das Ergebnis stellt sich in Abbildung 11 dar. Die Hauptelutionsfraktionen E3 und E4 dieser TAC (Geltaschen 5 und 6) zeigen gegenüber dem Ausgangsmaterial in Geltasche 2 nicht das gewünschte Ergebnis, auch wenn man hierbei ebenso die Verdichtung des Materials durch die TAC von 10 ml auf 1 ml in jeder Elutionsfraktion berücksichtigt.

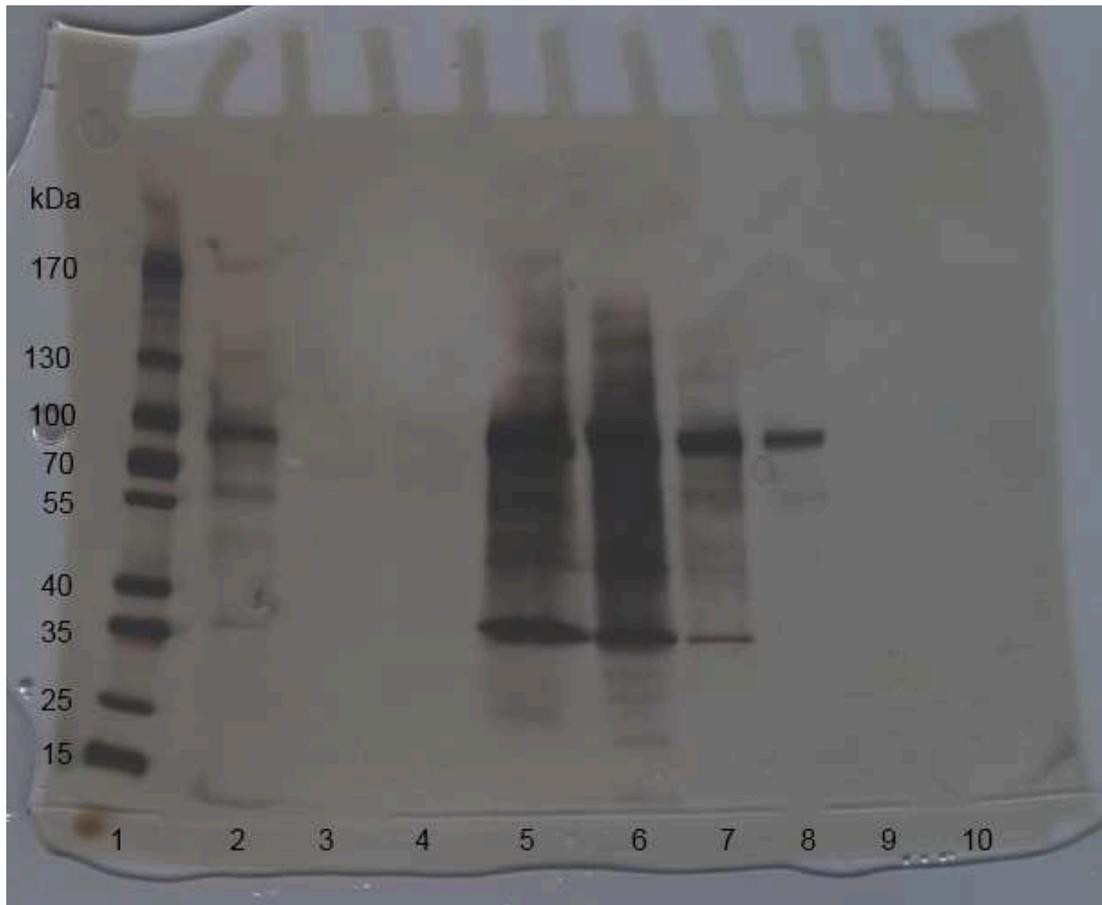


Abbildung 11: SDS-PAGE des Versuches A6: HiTrap® TAC unter Verwendung von 10 ml von folgendem Probenmaterial: Die Hauptelutionsfraktionen E3 und E4 von zwei vorhergehenden TAC-Versuchen unter Verwendung des konzentrierten Materials wurden vereinigt, versetzt mit 0,8M Ammoniumsulfat und im Verhältnis 2:3 mit Bindungspuffer verdünnt, anschließend steril filtriert und entgast bei 0,45 μm . kDa = kiloDalton, 1: Marker (s. Material, 2,5 μl); 2: Ausgangsmaterial (5 μl); 3-9: Elutionsfraktionen 1 - 7 (je 10 μl); 10: Waschlösung (10 μl).

3.2.3.2 Verwendung des unbehandelten Ausgangsmaterials

Da die bisherigen Ergebnisse nicht den gewünschten Reinheitsgrad erbringen konnten, fand das unkonzentrierte Ausgangsmaterial (= Hybridoma-Expressmedium-Zellkulturüberstand) in den nächsten Versuchen Verwendung.

Im ersten Versuch (Versuch B1) dieser Reihe wurden insgesamt 100 ml des Ausgangsmaterials wiederum nach dem Standard des Hersteller-Protokolls aufbereitet (Hinzufügung von 0,8M Ammoniumsulfat und Sterilfiltration mit

Entgasung bei 0,45 μm). In diesem Versuch wurde zum ersten Mal das siebenstufige Versuchsprotokoll angewandt (s. 2.2.4). Dabei werden nach dem Aufbringen des Ausgangsmaterials des jeweiligen Versuches (im Folgenden der unbehandelte Zellkulturüberstand) ebenso wie bisher die nicht gebundenen MAK sowie die anderen Proteine mit Bindungspuffer abgewaschen. Der Durchlauf dieses Arbeitsschrittes wird aufgefangen und anschließend wieder über die Säule gepumpt. Dadurch wird sichergestellt, dass möglichst keine MAK verloren gehen.

Abbildung 12 zeigt die Dokumentation des Ergebnisses von Versuch B1 durch SDS-PAGE. Hierbei ist in den Geltaschen 4 bis 8 eine starke Verdichtung der Proteine zu erkennen. Das besondere Augenmerk gilt dabei den Proben in Geltasche 7 und 8: diese wurden aus dem Durchlauf entnommen. Daher liegt der Schluss nahe, dass die Säule durch das hohe Volumen und die hohe Konzentration an Proteinen im Probenmaterial überladen wurde. Ebenso ist dies in den Elutionsfraktionen 2 bis 5 (Abbildung 12, Geltaschen 3 bis 6) erkennbar.

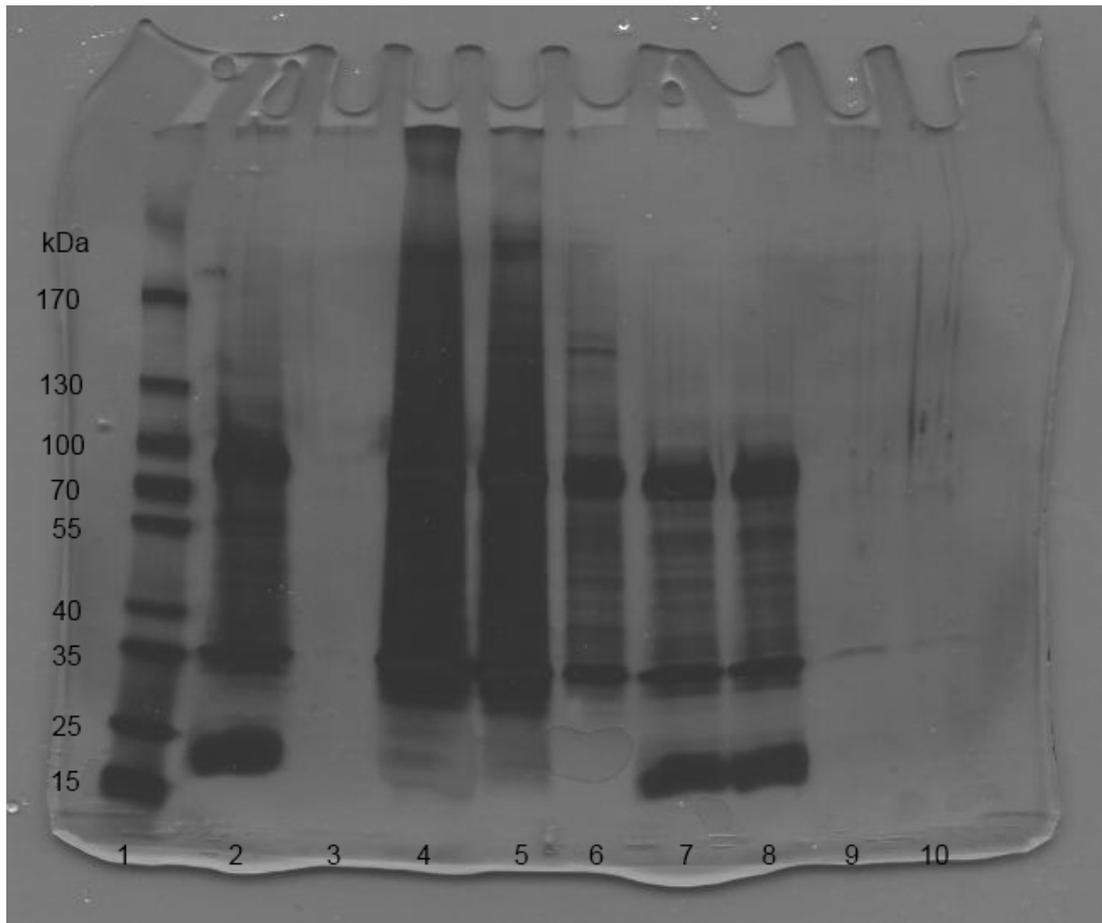


Abbildung 12: Versuch B1: SDS-PAGE (2) der HiTrap® TAC unter Verwendung von 100 ml des unbehandelten Ausgangsmaterials (= Hybridoma-Eypressmedium-Zellkulturüberstand), versetzt mit 0,8M Ammoniumsulfat, anschließend steril filtriert und entgast bei 0,45 µm. kDa = kiloDalton, 1: Marker (s. Material, 2,5 µl); 2: Ausgangsmaterial (10 µl); 3-6: Elutionsfraktionen 2 - 5 (je 7,5 µl); 7 und 8: Durchlauf 1 (je 7,5 µl); 9: Durchlauf 2 (7,5 µl); 10: Waschlösung 2 (7,5 µl).

Die Überladung der Säule zeigt sich in einem zweiten Gel zum selben Versuch weiterhin durch den hohen Gehalt an IgM-Antikörpern in den Elutionsfraktionen 5 bis 9 (Geltaschen 6 bis 10). In den Geltaschen 1 bis 5 ist zum Vergleich eine Verdünnungsreihe des Ausgangsmaterial von Versuch B1 (= unbehandelter Zellkulturüberstand) im Gel entwickelt worden. (s. Abbildung 13).

3 Ergebnisse

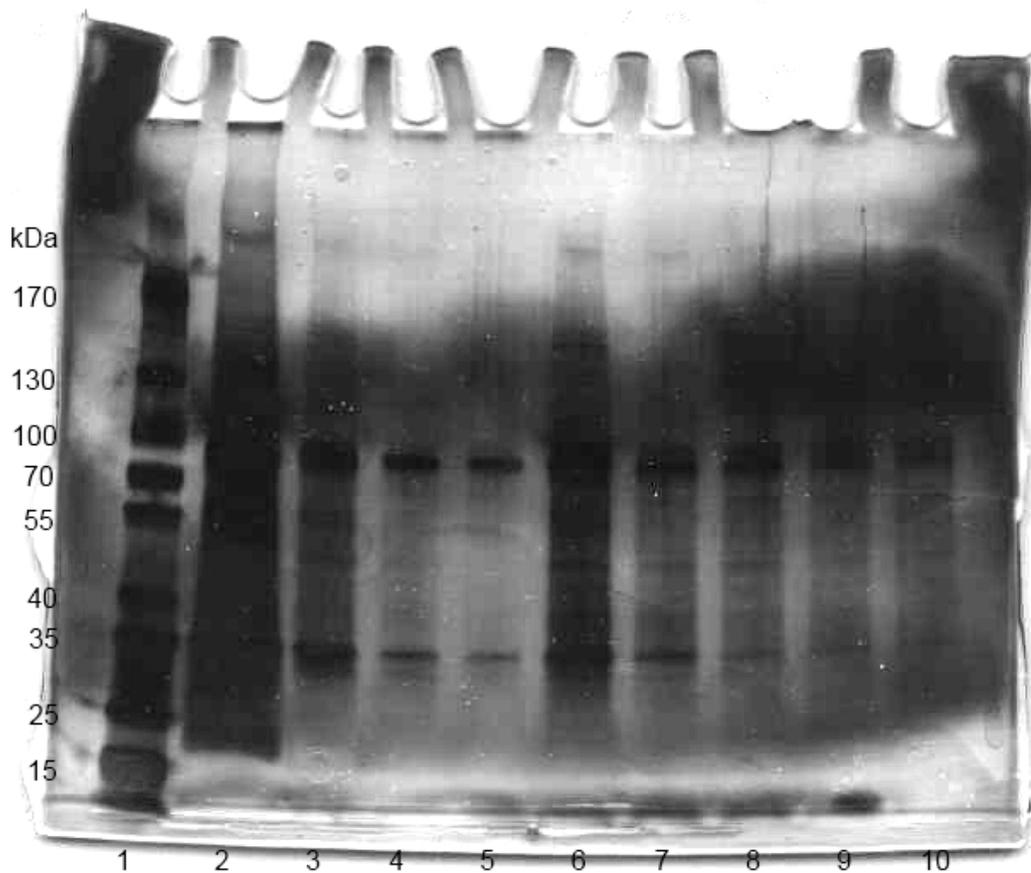


Abbildung 13: Versuch B1: SDS-PAGE (1) der HiTrap® TAC unter Verwendung von 100 ml des unbehandelten Ausgangsmaterials (= Hybridoma-Expressmedium-Zellkulturüberstand), versetzt mit 0,8M Ammoniumsulfat, anschließend steril filtriert und entgast bei 0,45 µm. kDa = kiloDalton, 1: Marker (s. Material, 2,5 µl); 2 - 5: Ausgangsmaterial in den Verdünnungen 1:0, 1:9; 1:49 und 1:99 (je 5 µl); 6 - 10: Elutionsfraktionen 5 – 9 (je 5 µl). In diesem Bild wurden zur besseren Darstellung die Helligkeit und der Kontrast erhöht, um die starke Anfärbung des Hintergrunds abzuschwächen.

In den Versuchen B2, B3 und B4 wurden die Elutionsfraktionen E3 bis E9 sowie der Durchlauf des Versuches B1 (s. Abbildung 13) als Ausgangsmaterial verwendet. Dabei wurden diese aber in unterschiedlichen Verhältnissen mit Bindungspuffer verdünnt. Insofern wurden diese Fraktionen doppelt durch die TAC gereinigt. Da in den Elutionsfraktionen E3 und E4 der höchste Proteingehalt enthalten war (s. Abbildung 12, Geltaschen 4 und 5) wurden diese im Verhältnis 1:7, die Elutionsfraktionen E5 bis E9 im Verhältnis 1:1 verdünnt. Der Durchlauf wurde unverdünnt aufgegeben.

Der Reinheitsgrad der Eluate dieser Versuche wurde jeweils wiederum durch die SDS-PAGE dargestellt. Abbildung 14 zeigt das Ergebnis des Versuches B2.

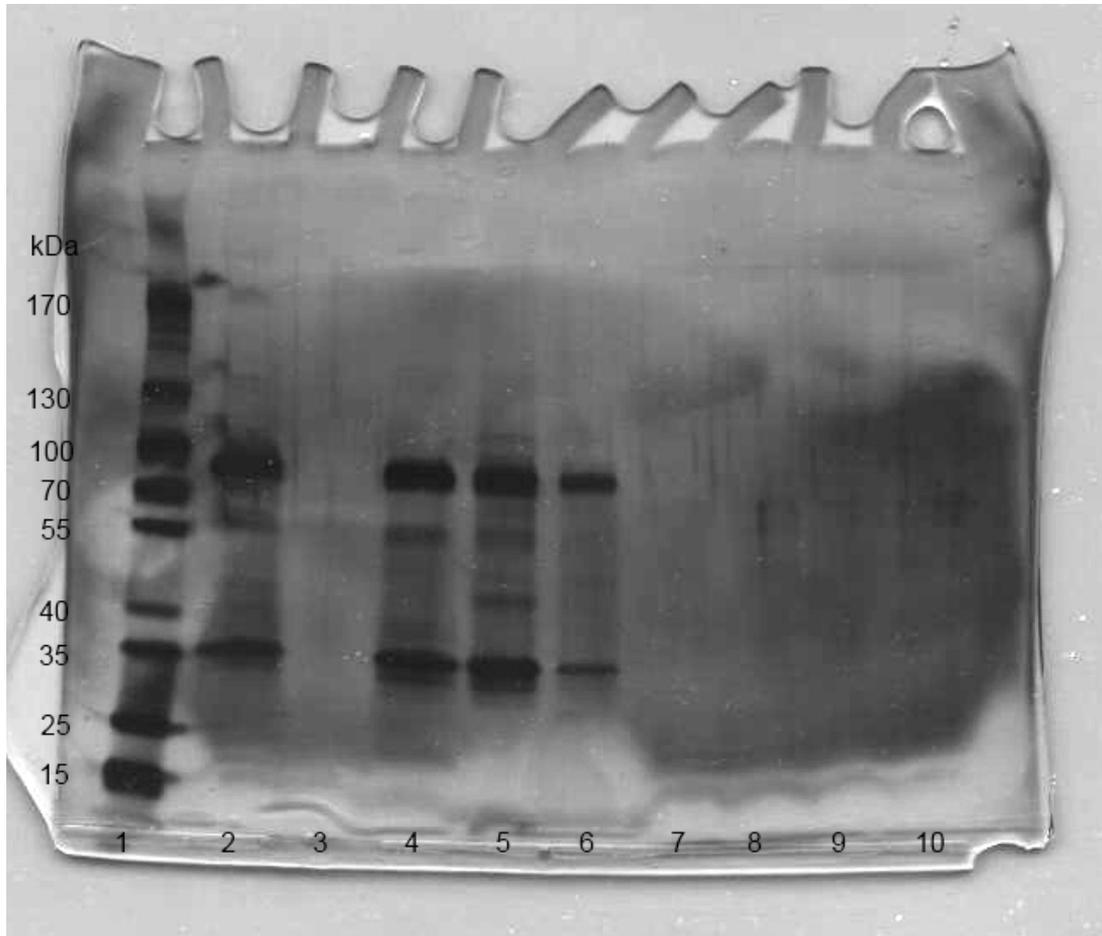


Abbildung 14: Versuch B2: SDS-PAGE der HiTrap® TAC unter Verwendung des folgenden Probenmaterials: E3 und E4 von Versuch B1 vereinigt, verdünnt mit sterilem Bindungspuffer im Verhältnis 1:7, versetzt mit 0,8M Ammoniumsulfat, anschließend steril filtriert und entgast bei 0,45 μm . kDa = kiloDalton, 1: Marker (s. Material, 2,5 μl); 2: Ausgangsmaterial (5 μl); 3 - 6: Elutionsfraktionen 2 - 5 (je 5 μl); 7: Durchlauf 1 (5 μl); 8: Waschlösung 1 (5 μl); 9: Waschlösung 2 (5 μl); Durchlauf 2 (5 μl). In diesem Bild wurden zur besseren Darstellung die Helligkeit und der Kontrast erhöht, um die starke Anfärbung des Hintergrunds abzuschwächen.

Insgesamt wurde in Versuch B2 ein Probenvolumen von 4 ml bei einer Flussrate von 0,2 ml/min über die Säule gegeben. In den bisherigen Versuchen wurde eine Flussrate von 1 ml/min verwendet. Bei einer Verteilung des IgM-Gehalts über die Elutionsfraktionen E3, E4 und teilweise über E5 (je 1 ml) ist von einer Konzentration des aufgegebenen

Probenvolumens auszugehen. Betrachtet man hierzu die Stärke der charakteristischen Banden bei eines IgM-AK bei 96 kDa und 38 kDa in den Elutionsfraktionen E3 und E4 (s. Abbildung 14, Geltaschen 4 und 5) im Vergleich zum Ausgangsmaterial von Versuch B2 (Geltasche 2) so fällt eine Verdichtung dieser Banden auf. Dabei ist auch das unterschiedliche Volumen dieser Fraktionen zu beachten: Während insgesamt 10 ml des Ausgangsmaterials vorliegen (Abbildung 14, Geltasche 2), beschränkt sich das Volumen von E3 und E4 auf je 1 ml (Geltaschen 4 und 5). Der Gehalt an für einen IgM-AK nicht-charakteristischen Banden ist aber trotzdem vergleichbar. Daher ist anzunehmen, dass sowohl eine Konzentration, als auch eine Aufreinigung des Ausgangsmaterials stattgefunden hat.

Vergleichbare Ergebnisse lieferten auch die Versuche B3 und B4. Die Hauptfraktionen der Versuche B2, B3 und B4 wurden im Pool 19/5 vereinigt (s. a. Abbildung 16, Geltasche 10). Daraus konnte ein Gesamtvolumen von etwa 8,0 ml an gereinigten MAK IgM 4E1-Antikörpern zur weiteren Anwendung in ELISA-Testreihen gewonnen werden.

3.2.3.3 Etablierung der Methode zur Aufreinigung des unbehandelten Ausgangsmaterials

Die bisherige Methode zur Aufreinigung beschränkte sich auf die Durchführung der TAC mit anschließender Kontrolle des Reinheitsgrades durch Anfertigung eines Gels (s. o.). Um den Prozess zu beschleunigen, wurde in den folgenden Versuchen nach der TAC zunächst ein Dot-Blot-Assay angefertigt. Dieser diente dazu, einen schnelleren Überblick über die Verteilung der MAK über die 12 Elutionsfraktionen zu gewinnen. So konnte sichergestellt werden, dass die Hauptfraktionen in der anschließenden SDS-PAGE in jedem Fall dargestellt wurden. Um den Gehalt an MAK IgM 4E1 in den jeweiligen Fraktionen genauer beurteilen zu können, wurde anschließend ein BCA Protein Assay zur Quantifizierung der enthaltenen Proteine angefertigt (s. a. Tabelle 5).

Demnach bestand die etablierte Methode zur Herstellung von gereinigtem MAK IgM 4E1-Antikörpern aus folgenden Schritten:

1. HiTrap®-TAC mit unbehandeltem Ausgangsmaterial (= Hybridoma-Expressmedium-Zellkulturüberstand).
2. Dot-Blot-Chromatographie zum qualitativen Nachweis der IgM-Konzentrationen in den einzelnen Fraktionen aus der TAC.
3. BCA Protein Assay zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentrationen in den einzelnen Fraktionen aus der TAC.
4. SDS-PAGE zur qualitativen Analyse des Reinheitsgrades der einzelnen Fraktionen aus der TAC.

Insgesamt wurden nach dieser Methode drei Aufreinigungsprozesse durchgeführt (Versuche C1, C2 und C3). Diese Versuche wurden alle nach denselben Vorgaben durchgeführt.

In Versuch C1 wurden 25 ml des unbehandelten Ausgangsmaterials entsprechend des Protokolls (s. 2.2.4) vorbereitet und in der TAC als Probe verwendet. Der anschließende Dot-Blot-Assay identifizierte die Verteilung des IgM-Gehalts auf die Elutionsfraktionen E3 bis E6, wobei die Hauptfraktion der MAK in E5 zu finden ist (s. Abbildung 15). Durch den BCA Protein Assay konnten die in Tabelle 5 ersichtlichen Werte ermittelt werden.

3 Ergebnisse

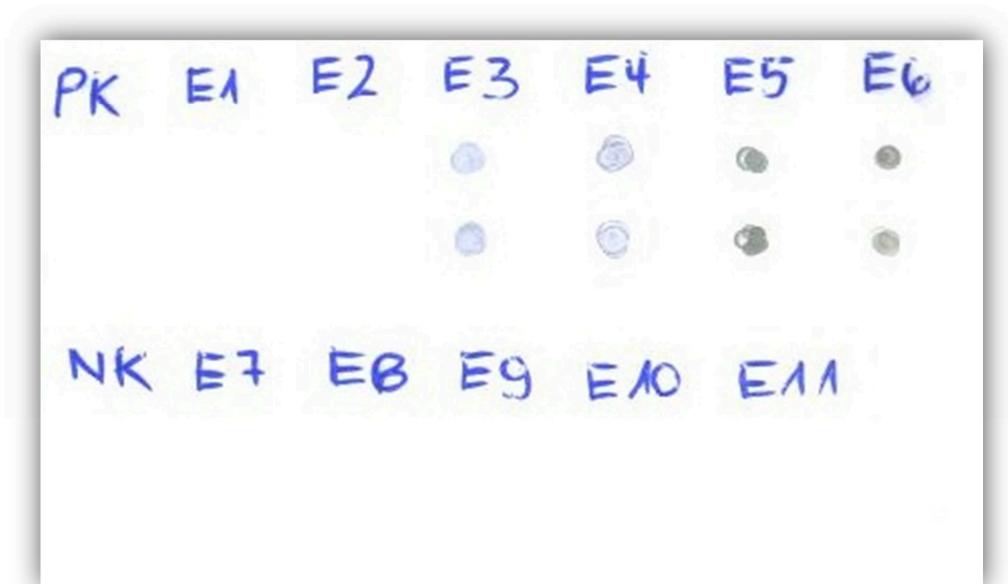


Abbildung 15: Dot-Blot-Chromatographie des Versuches C1: HiTrap®-TAC unter Verwendung von 25 ml des unbehandelten Ausgangsmaterials, versetzt mit 0,8 M Ammoniumsulfat, steril filtriert und entgast bei 0,45 µm. PK = Positivkontrolle = Goat-anti-mouse IgM POD, µ-chain-specific, 1:2 mit Glycerol; NK = Negativkontrolle = MAK IgG 7E7; E1 – E11 = Elutionsfraktionen von Versuch C1.

Tabelle 5: Proteinkonzentrationen des unbehandelten sowie einfach und doppelt konzentrierten Ausgangsmaterials wie auch der Elutionsfraktionen aus HiTrap®-TAC Versuch C1. HyEx = unbehandeltes Ausgangsmaterial = Hybridoma-Expressmedium-Zellkulturüberstand; 10^4 = durch Zentrifugalfiltration bei einer Membranporengröße von 100.000 kDa und 10.000 kDa zweifach konzentriertes Ausgangsmaterial, 10^5 = durch Zentrifugalfiltration bei einer Membranporengröße von 100.000 kDa einfach konzentriertes Ausgangsmaterial, Pool 19/5 = Vereinigte Hauptfraktionen der Versuche B2, B3 und B4.

Probe	BCA Protein Assay
HyEx [µg/ml]	1331,40
10^4 [µg/ml]	1664,92
10^5 [µg/ml]	1957,12
E3 [µg/ml]	12,01
E4 [µg/ml]	210,91
E5 [µg/ml]	91,833
E6 [µg/ml]	12,27
Pool 19/5	310,88

Abbildung 16 zeigt die das im Anschluss angefertigte Gel zur Beurteilung des Reinheitsgrades der Hauptfraktionen.

Die Hauptfraktion der MAK IgM 4E1 befindet sich, wie in Abbildung 15 zu sehen, in Elutionsfraktion E5 (Geltasche 5). Zu erkennen sind dabei die charakteristischen Banden eines IgM-AK, während der „smear“, also die nicht-charakteristischen Proteinbanden, auf ein Minimum reduziert werden konnten (vgl. das Ausgangsmaterial in Geltasche 2). Der BCA Protein Assay bestimmte die Proteinmenge in der Hauptfraktion E5 auf 91,833 µg/ml und die des Ausgangsmaterials auf 1331,40 µg/ml (s. Tabelle 5). Also konnte die absolute Proteinmenge in der Hauptfraktion verringert und der Reinheitsgrad gesteigert werden.

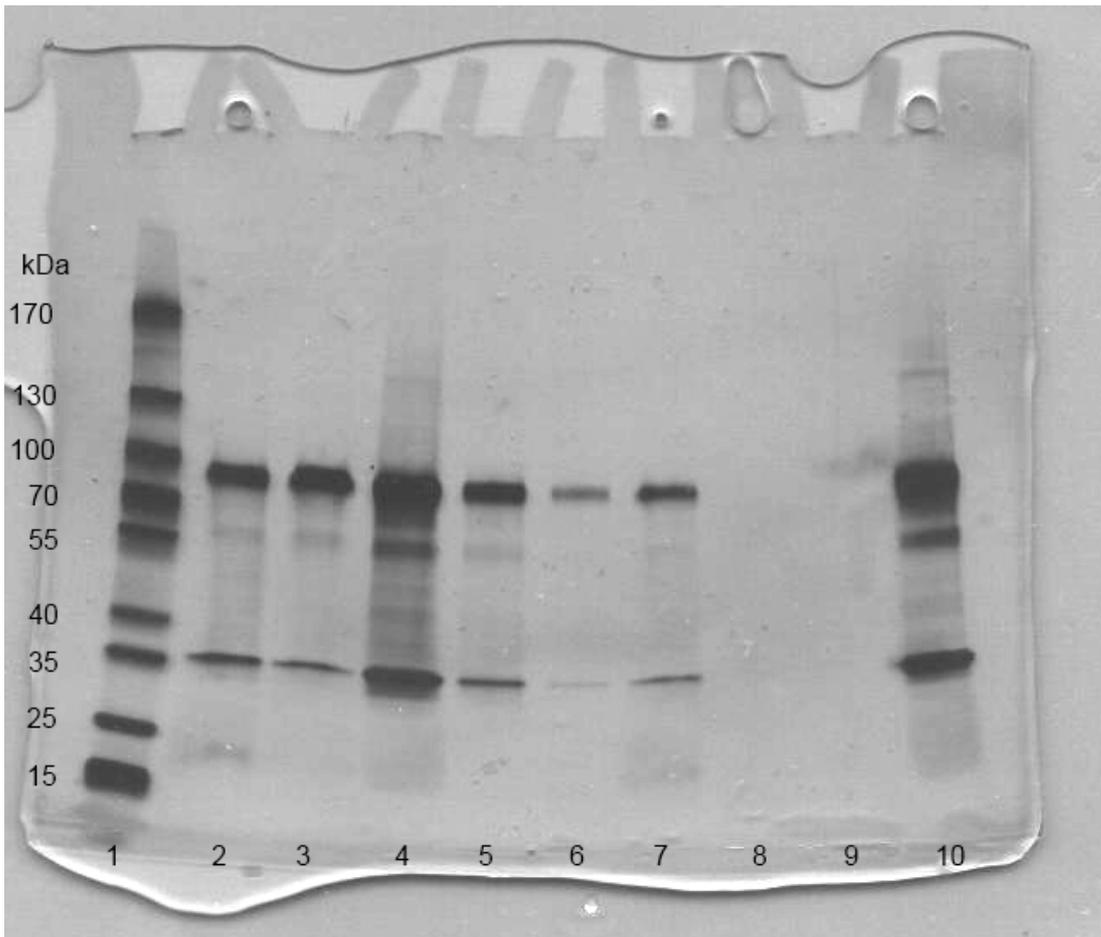


Abbildung 16: Versuch C1: SDS-PAGE der HiTrap® TAC unter Verwendung von 25 ml des unbehandelten Ausgangsmaterials, versetzt mit 0,8M Ammoniumsulfat, anschließend steril filtriert und entgast bei 0,45 µm. kDa = kiloDalton, 1: Marker (s. Material, 2,5 µl); 2: Ausgangsmaterial (5 µl); 3 - 6: Elutionsfraktionen 3 – 6 (je 5 µl); 7: Durchlauf 1 (5 µl); 8: Durchlauf 2 (5 µl); 9: Waschlösung 2 (5 µl); 10: Pool 19/5 (5 µl).

Diese Methode wurde dreimal durchgeführt (Versuche C1, C2 und C3) und erbrachte unter Zusammenführen der Hauptfraktionen dieser Versuche mit dem Rest des Pool 19/5 (s. o.) in Pool 19/8 (s. Abbildung 17) eine Gesamtmenge von 4,0 ml. Mit einer mittleren Konzentration von 241,81 µg/ml entspricht dies einer Gesamtmenge von etwa 1 mg reiner MAK IgM 4E1-Antikörper. Dieses Material wurde für die weiteren Versuche in 3.3 verwendet.

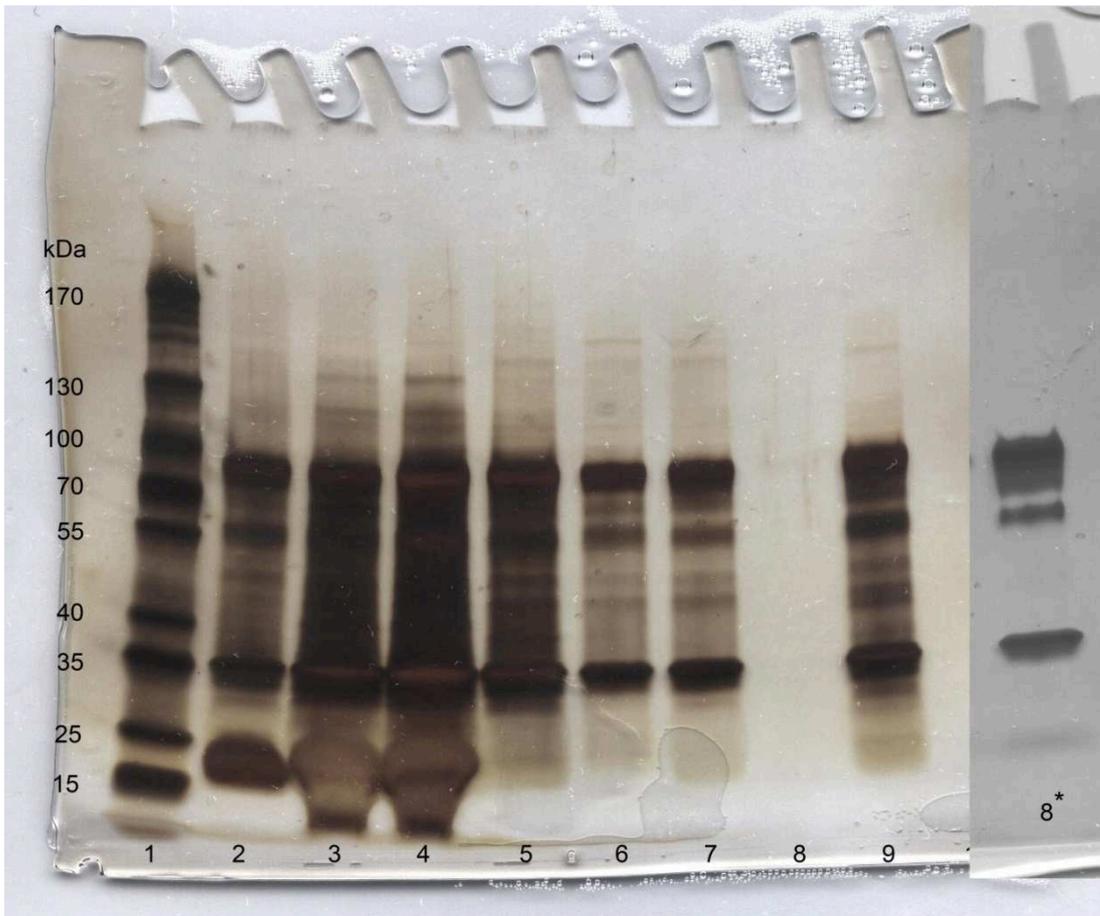


Abbildung 17: SDS-PAGE zur Darstellung des Ausgangsmaterials, dessen Einfach- und Doppelkonzentrat sowie der Fraktionen des Pool 19/8. kDa = kiloDalton. 1: Marker (s. Material, 2,5 μ l); 2: unbehandeltes Ausgangsmaterial (= Hybridoma-Expressmedium-Zellkulturüberstand) (5 μ l); 3: 10^4 = durch Zentrifugalfiltration bei einer Membranporengröße von 100.000 kDa und 10.000 kDa zweifach konzentriertes Ausgangsmaterial (5 μ l); 4: 10^5 = durch Zentrifugalfiltration bei einer Membranporengröße von 100.000 kDa einfach konzentriertes Ausgangsmaterial (5 μ l); 5 – 7: Hauptelutionsfraktionen der TAC-Versuche C1, C2 und C3 (je 5 μ l); 9: Pool 19/5 (5 μ l); 8*: Pool 19/8 (5 μ l).

In Abbildung 17 ist das Ergebnis der Aufreinigungen dargestellt. Die charakteristischen Banden des MAK IgM 4E1 sind in jeder aufgegebenen Probe klar erkennbar. In den Geltaschen 2 bis 4 sind zum Vergleich das unbehandelte Ausgangsmaterial (= Hybridoma-Zellkulturüberstand), sowie die Fraktionen 10^4 und 10^5 aus 3.2.1 dargestellt. Die Verunreinigungen sind zwischen charakteristischen Banden des MAK IgM 4E1 deutlich zu erkennen. Die in den Pool 19/8 eingebrachten Fraktionen sind in den Geltaschen 6, 7 und 9 zu sehen. Der Pool 19/8 als Gesamtergebnis ist in der

Geltasche 8* aufgegeben worden. Besonders der direkte Vergleich der Banden in Geltasche 2 und der Banden in Geltasche 8* zeigt deutlich den Unterschied im Reinheitsgrad und damit den Effekt der Reinigungen.

3.2.4 Reinigung mittels GE Healthcare Sephacryl S-1000 SEC

3.2.4.1 Allgemeines Vorgehen bei der SEC

Nach Vorbereitung des Materials (z. B. Verdünnung mit PBS), sofern im Ansatz vorgesehen, wurde das Ausgangsmaterial über die SEC-Säule geleitet (Methodik s. 2.2.5). Im Anschluss an das Aufreinigungsverfahren wurden Ausgangsmaterial, Durchlauf, Elutions- und Regenerationsfraktionen qualitativ auf ihren Gehalt an IgM-Antikörpern untersucht. Anschließend wurde ein BCA Protein Assay zur quantitativen Bestimmung der Proteinmenge in den genannten Fraktionen durchgeführt. Anhand dieser Ergebnisse wurden diejenigen Fraktionen, in denen der größte Proteingehalt bestimmt wurde in SDS-PAGE dargestellt, um den Grad der Aufreinigung qualitativ beurteilen zu können.

3.2.4.2 Ergebnisse der SEC

Zur Reinigung mittels SEC wurden insgesamt 3 verschiedene Versuchsansätze durchgeführt:

1. Versuch D1: SEC-Ausgangsmaterial = 2,5 ml des Hybridoma-Zellkulturüberstandes, 1:1 verdünnt mit PBS; Gesamtmenge = 5 ml
2. Versuch D2: SEC-Ausgangsmaterial = 5 ml des Hybridoma-Zellkulturüberstandes, 1:1 verdünnt mit PBS; Gesamtmenge = 10 ml
3. Versuch D3: SEC-Ausgangsmaterial = 5 ml des Hybridoma-Zellkulturüberstandes

In den Versuchsansätzen wurde ausschließlich die Menge des aufgegebenen Ausgangsmaterials durch Verdünnung mit PBS variiert. Begonnen wurde mit der Verwendung des mit PBS verdünnten Ausgangsmaterials, um eine Überladung der Säule zu vermeiden.

3.2.4.2.1 Aufreinigung des verdünnten Ausgangsmaterials mittels SEC

Nach Verdünnung des Ausgangsmaterials mit steril filtriertem PBS im Verhältnis 1:1 wurden 5 ml bei einer Flussrate von 0,5 ml/min nach Protokoll (s.0) über die Säule gegeben. Der Dot-Blot-Assay zeigte eine Streuung der IgM-AK über die Elutionsfraktionen ET1 bis ET9 (s. Abbildung 18) [Anmerkung: Die Elutionsfraktionen der SEC werden mit „ET“ bezeichnet, um sie im Text besser von den Elutionsfraktionen der TAC abgrenzen zu können]. Als Hauptfraktionen wurden die Elutionsfraktionen ET2 bis ET6 durch den BCA Protein Assay ermittelt. Als Hauptfraktionen galten Fraktionen mit einem Proteingehalt von mehr als 500 µg/ml (s. Tabelle 6) und einem entsprechendem Nachweis im Dot-Blot-Assay (s. Abbildung 18). Daher wurden in Versuch D1 zur Darstellung im Gel neben dem die Fraktionen ET1 bis ET8 ausgewählt (s. Abbildung 19).

Die schwere Kette (ca. 96 kDa) und die leichte Kette (ca. 38 kDa) des MAK IgM 4E1 sind in den Geltaschen 2 bis 10 zu erkennen. Im Unterschied zum Ausgangsmaterial stellt sich in den Elutionsfraktionen (Geltaschen 3 bis 10) die Proteinbande bei ca. 60 kDa deutlich schwächer dar. Dies ist bei Betrachtung der Banden in Geltasche 5 bemerkenswert, da die Proteinkonzentration der Elutionsfraktion ET5 beinahe die des Ausgangsmaterials aufweist (s. Tabelle 6). Dies spricht für eine Aufreinigung des Ausgangsmaterials.

Bei der Verwendung von 10 ml des verdünnten Materials in Versuch D2 zeigte sich im Dot-Blot-Assay eine Streuung der IgM-Antikörper über die Elutionsfraktionen ET1 bis ET18 mit jeweils geringer Konzentration, was sich im anschließenden SDS-PAGE bestätigte.

3 Ergebnisse

Tabelle 6: Übersicht über die im BCA Protein Assay bestimmten Proteinkonzentrationen der Elutionsfraktionen und des Ausgangsmaterials der Größenausschlusschromatographie unter Verwendung von 5 ml des im Verhältnis 1:1 mit PBS steril verdünnten Ausgangsmaterials. c = Konzentration, ET = Elutionsfraktion, HyEx = Hybridoma-Expressmedium-Zellkulturüberstand = Ausgangsmaterial.

Fraktion	ET 1	ET 2	ET 3	ET 4	ET 5	ET 6
c [µg/ml]	362,04	684,15	808,77	799,36	739,34	658,25
Fraktion	ET 7	ET 8	ET 9	ET 10	ET 11	HyEx
c [µg/ml]	472,42	140,65	0	0	0	843,75

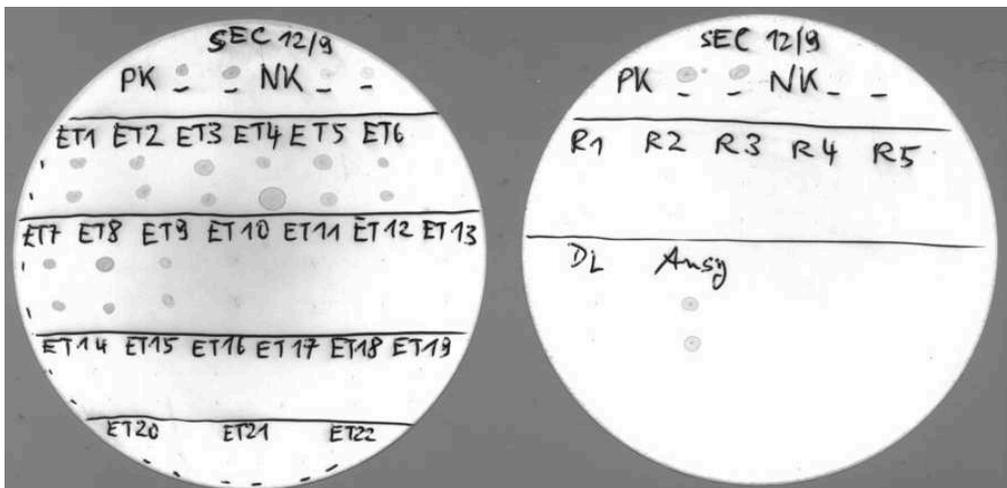


Abbildung 18: Dot-Blot-Ergebnisse der SEC unter Verwendung von 5 ml des Ausgangsmaterials in 1:1-Verdünnung mit PBS steril. NK = Negativkontrolle, PK = Positivkontrolle, ET = Elutionsfraktion, R = Regenerationsfraktion, DL = Durchlauf, Ausg = Ausgangsmaterial = Hybridoma-Expressmedium-Zellkulturüberstand, SEC = Size Exclusion Chromatography = Größenausschlusschromatographie.

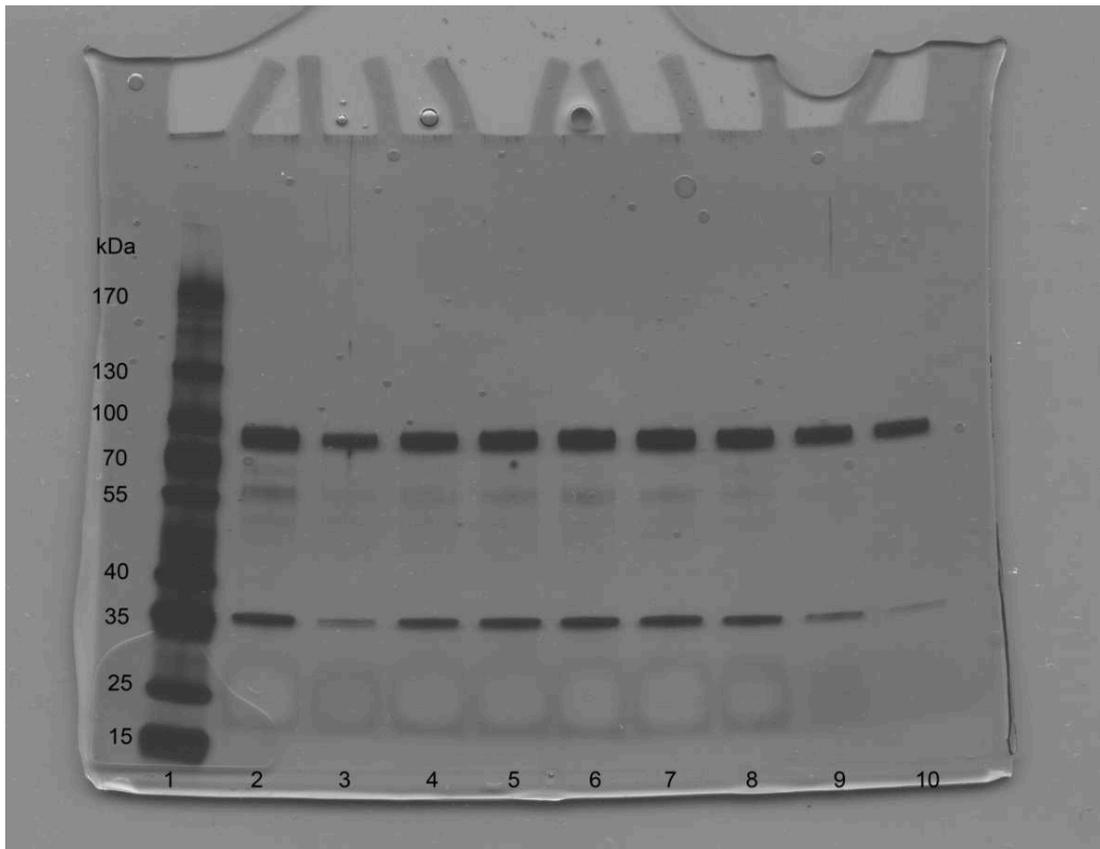


Abbildung 19: SDS-PAGE des Ausgangsmaterials und der ausgewählten Elutionsfraktionen der Größenausschlusschromatographie unter Verwendung von 5 ml des im Verhältnis 1:1 mit PBS steril verdünnten Ausgangsmaterials. 1: Marker (s. Material, 2,5 μ l); 2: Ausgangsmaterial = unverdünnter Hybridoma-Expressmedium-Zellkulturüberstand (5 μ l); 3-10: Elutionsfraktionen 3-10 (je 5 μ l). kDa = kiloDalton.

3.2.4.2.2 Aufreinigung des unverdünnten Ausgangsmaterials mittels SEC

In Versuch D3 wurde der unbehandelte Zellkulturüberstand verwendet. Hierbei wurden 5 ml bei einer Flussrate von 0,5 ml/min nach Protokoll aufgegeben (s. 0). In der Dot-Blot-Chromatographie zeigte sich eine Streuung der Antikörper über die Elutionsfraktionen 1 -11 (s. Abbildung 20). Der anschließende BCA Protein Assay identifizierte die Elutionsfraktionen 3 - 7 als Hauptfraktionen (s. Tabelle 7).

Entsprechend wurden in SDS-PAGE (s. Abbildung 21) neben dem Ausgangsmaterial alle Elutionsfraktionen dargestellt, um sie untereinander vergleichen zu können.

3 Ergebnisse

Tabelle 7: Übersicht über die im BCA Protein Assay bestimmten Proteinkonzentrationen der Elutionsfraktionen und des Ausgangsmaterials der Größenausschlusschromatographie unter Verwendung von 5 ml des unverdünnten Ausgangsmaterials. c = Konzentration, ET = Elutionsfraktion, HyEx = Hybridoma-Expressmedium-Zellkulturüberstand = Ausgangsmaterial.

Fraktion	ET 1	ET 2	ET 3	ET 4	ET 5	ET 6
c [$\mu\text{g/ml}$]	11,89	216,06	733,53	1025,43	1072,53	1009,40
Fraktion	ET 7	ET 8	ET 9	ET 10	ET 11	HyEx
c [$\mu\text{g/ml}$]	663,81	124,62	12,28	0	0	1205,60

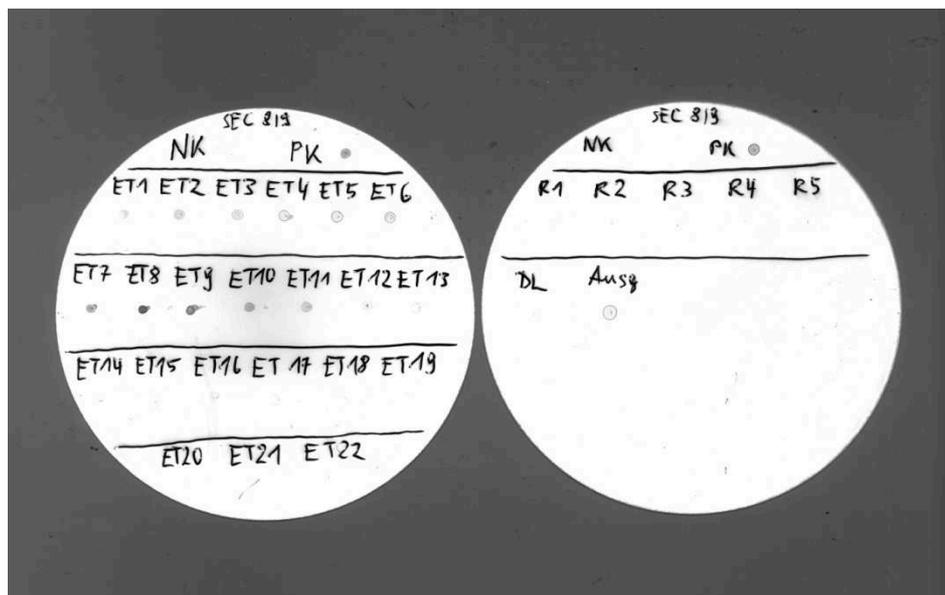


Abbildung 20: Dot-Blot-Ergebnisse der SEC unter Verwendung von 5 ml des unverdünnten Zellkulturüberstandes. NK = Negativkontrolle, PK = Positivkontrolle, ET = Elutionsfraktion, R = Regenerationsfraktion, DL = Durchlauf, Ausg = Ausgangsmaterial = Hybridoma-Expressmedium-Zellkulturüberstand, SEC = Size Exclusion Chromatography = Größenausschlusschromatographie.

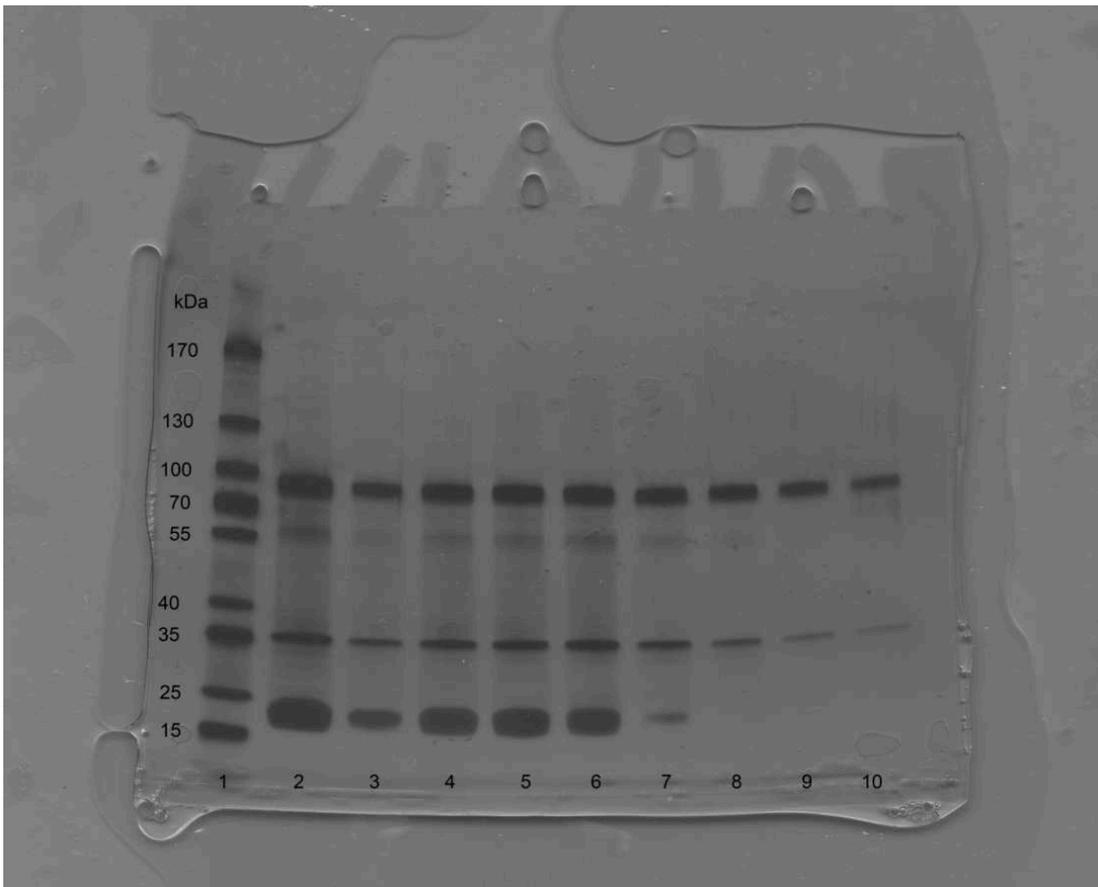


Abbildung 21: SDS-PAGE des Ausgangsmaterials und der ausgewählten Elutionsfraktionen der Größenausschlusschromatographie unter Verwendung des unverdünnten Ausgangsmaterials. 1: Marker (s. Material, 2,5 μ l); 2: Ausgangsmaterial = unverdünnter Hybridoma-Expressmedium-Zellkulturüberstand (5 μ l); 3-10: Elutionsfraktionen 3-10 (je 5 μ l). kDa = kiloDalton.

Bei Betrachtung des Gels (s. Abbildung 21) sind neben dem Marker in allen aufgegeben Proben die schwere Kette (ca. 96 kDa) und die leichte Kette (ca. 38 kDa) des MAK IgM 4E1 entwickelt. Ebenso sind die Elutionsfraktionen 3 bis 7 der SEC (Geltaschen 3-7) anhand ihrer Stärke leicht von den Nebenfraktionen zu unterscheiden. Dort ist auch die akzessorische Proteinbande bei ca. 60 kDa im Gegensatz zum Ausgangsmaterial nur noch schwach zu erkennen. Darüber hinaus sind nicht-charakteristische Banden zwischen den beiden charakteristischen bei 96 und 38 kDa in den Elutionsfraktionen auch bei etwa gleicher Konzentration (s. v. a. Geltasche 5 in Abbildung 21) sichtbar schwächer ausgeprägt. Beides spricht für eine Aufreinigung des Ausgangsmaterials.

3.2.4.2.3 Vergleich der Ergebnisse

In beiden Versuchen, in denen 5 ml des Ausgangsmaterials verwendet wurden, konnte mit Hilfe der SEC eine zufriedenstellende Aufreinigung des Ausgangsmaterials erzielt werden. Dabei lieferte die SEC bei Verwendung der unverdünnten Probe eine vergleichbare Steigerung des Reinheitsgrads wie diejenige bei Verwendung der verdünnten Probe. Sie lieferte dabei aber Elutionsfraktionen mit einem höheren IgM-Gehalt. Demzufolge hat in allen Versuchen eine Reinigung stattgefunden, bei Verwendung des unbehandelten Zellkulturüberstandes zusätzlich noch eine Konzentration.

3.3 Vergleich der Methoden zur Proteinbestimmung: Pierce Bicinchoninic Acid Protein Assay und Bradford Protein Assay

Zur Bestimmung des Proteingehaltes des Ausgangsmaterials (unbehandelter Zellkulturüberstand) sowie der durch Zentrifugalfiltration konzentrierten Proben (s. 3.2.1) wurde der BCA-Protein Assay verwendet. Bei den Versuchen A1 bis A6 bestimmte dieser jedoch negative Werte, weshalb zunächst als alternative Methode zur Proteinbestimmung der Bradford Protein Assay verwendet wurde. Mit diesem gelangen die Proteinbestimmungen der Versuche A1 bis A6. Jedoch konnte in einem vergleichenden Versuch zur Proteinbestimmung (vgl.

Tabelle 8 und Abbildung 22) festgestellt werden, dass der Bradford Protein Assay dem BCA Protein Assay hinsichtlich der Sensitivität deutlich unterlegen ist (der Bradford Protein Assay bestimmte im Vergleich zum BCA Protein Assay bis zu 15fach niedrigere Werte).

Tabelle 8: Durchschnittswerte der Proteinbestimmungen des Ausgangsmaterials und dessen verschiedenen Konzentrationen im BCA- und Bradford Protein Assay. BCA = Bicinchoninsäure Protein Assay, Bradford = Bradford Protein Assay, HyEx = Hybridoma Expressmedium Zellkulturüberstand = unkonzentriertes Ausgangsmaterial, 10^4 = durch Zentrifugalfiltration bei einer Membranporengröße von 100.000 kDa und 10.000 kDa zweifach konzentriertes Ausgangsmaterial, 10^5 = durch Zentrifugalfiltration bei einer Membranporengröße von 100.000 kDa einfach konzentriertes Ausgangsmaterial.

Ausgangsmaterial	BCA	Bradford
HyEx [µg/ml]	1335,96	86,80
10^4 [µg/ml]	1629,31	255,90
10^5 [µg/ml]	1900,55	698,35

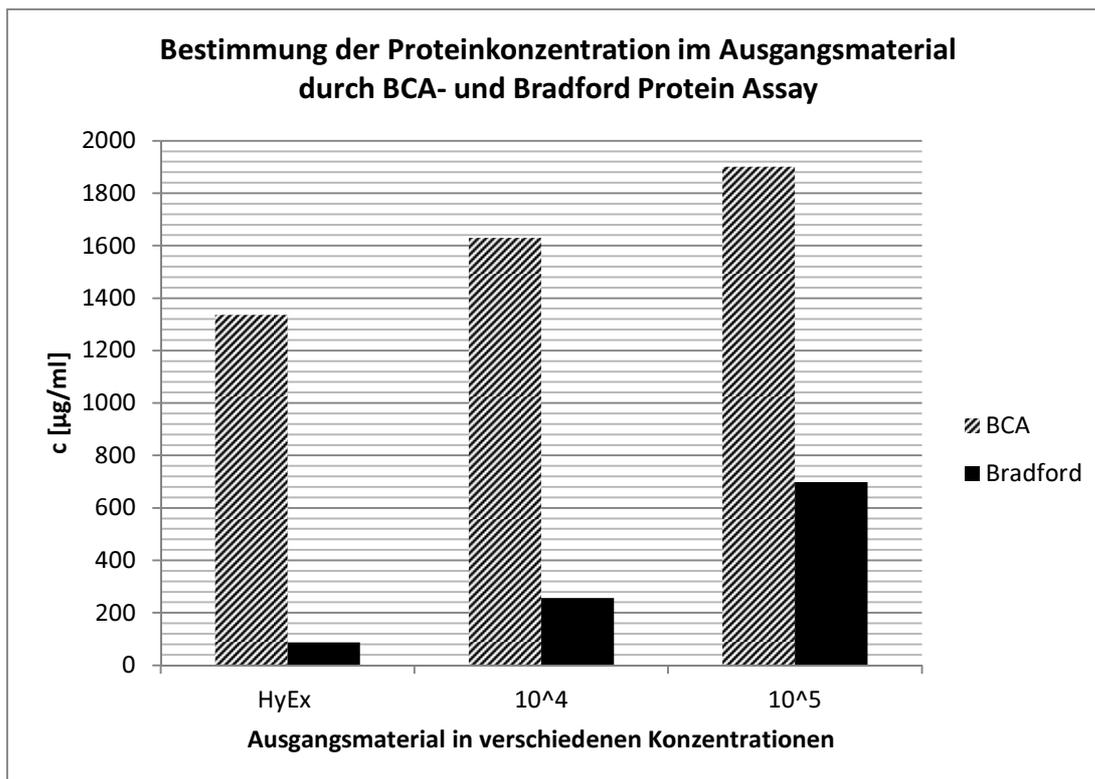


Abbildung 22: Bestimmung der Proteinkonzentrationen im Ausgangsmaterial und dessen verschiedenen Konzentrate im BCA- und Bradford Protein Assay. c = Konzentration, HyEx = Hybridoma Expressmedium Zellkulturüberstand = unkonzentriertes Ausgangsmaterial, 10^4 = durch Zentrifugalfiltration bei einer Membranporengröße von 100.000 kDa und 10.000 kDa zweifach konzentriertes Ausgangsmaterial, 10^5 = durch Zentrifugalfiltration bei einer Membranporengröße von 100.000 kDa einfach konzentriertes Ausgangsmaterial.

Da die Bestimmung des Ausgangsmaterials (unbehandelter Zellkulturüberstand) sowie dessen Konzentrationen durch den BCA Protein Assay problemlos gelang, wurde vermutet, dass das zugesetzte Ammoniumsulfat im Pool 19/5 (vereinigte Hauptfraktionen der TAC-Versuche B1-3) mit dem Farbreagenz des BCA Protein Assay interagiert und somit eine Proteinkonzentrationsbestimmung verhinderte. Deshalb wurde mit dem Pool 19/5 eine Umpufferung vorgenommen. Erst durch diese Umpufferung (s. 2.2.9) mit Hilfe der Dialyse-Kammer Slyde-A-Lyzer® der Firma Fisher Thermo Scientific konnte letztendlich eine Proteinbestimmung des Pool 19/5 im BCA Protein Assay erfolgreich durchgeführt werden (310,88 µg/ml). Die Herstellerangaben der Firma Fisher Thermo Scientific geben einen problemlosen Versuchsablauf im BCA Protein Assay bis zu einer

Konzentration von 1M Ammoniumsulfats im Analysat an. Als Konsequenz wurden alle verwendeten Puffer neu angesetzt. Bei erneutem Versuch zur Proteinbestimmung von Fraktionen der TAC durch den BCA Protein Assay im Zuge Etablierung einer Aufreinigungsmethode mittels HiTrap®-TAC (s. 3.2.3.3) gelang die Bestimmung auch unter Beimischung des Ammoniumsulfats (s. Tabelle 9, Tabelle 10 und Tabelle 11), wodurch sich die Vermutung der Interaktion des Ammoniumsulfats mit dem Farbreagenz des BCA Protein Assay bestätigte.

Tabelle 9: Proteinkonzentrationen des unbehandelten sowie einfach und doppelt konzentrierten Ausgangsmaterials wie auch der Elutionsfraktionen aus HiTrap®-TAC Versuch C1. HyEx = unbehandeltes Ausgangsmaterial = Hybridoma-Expressmedium-Zellkulturüberstand; 10^4 = durch Zentrifugalfiltration bei einer Membranporengröße von 100.000 kDa und 10^5 = durch Zentrifugalfiltration bei einer Membranporengröße von 100.000 kDa einfach konzentriertes Ausgangsmaterial, Pool 19/5 = Vereinigte Hauptfraktionen der Versuche B2, B3 und B4.

Probe	BCA Protein Assay	Bradford Protein Assay
HyEx [$\mu\text{g/ml}$]	1331,40	0
10^4 [$\mu\text{g/ml}$]	1664,92	294,4
10^5 [$\mu\text{g/ml}$]	1957,12	759,3
E3 [$\mu\text{g/ml}$]	12,01	0
E4 [$\mu\text{g/ml}$]	210,91	159,2
E5 [$\mu\text{g/ml}$]	91,833	0
E6 [$\mu\text{g/ml}$]	12,27	0
Pool 19/5	310,88	/

3 Ergebnisse

Tabelle 10: Bestimmte Proteinkonzentrationen der Ausgangsmaterialien und der in den TAC-Versuchen C1, C2 und C3 gewonnenen Elutionsfraktionen durch den BCA Protein Assay. HyEx = unbehandeltes Ausgangsmaterial = Hybridoma-Epressmedium-Zellkulturüberstand, 10^4 = durch Zentrifugalfiltration bei einer Membranporengröße von 100.000 kDa und 10.000 kDa zweifach konzentriertes Ausgangsmaterial, 10^5 = durch Zentrifugalfiltration bei einer Membranporengröße von 100.000 kDa einfach konzentriertes Ausgangsmaterial, E1 bis E12 = in den TAC-Versuchen gewonnene Elutionsfraktionen.

Probe	Konzentrations- werte BCA Versuch C1 [mg/ml]	Konzentrations- werte BCA Versuch C2 [mg/ml]	Konzentrations- werte BCA Versuch C3 [mg/ml]
HyEx	1,331	1,372	1,251
10^4	1,664	1,766	1,665
10^5	1,957	1,971	1,959
E1	0,045	0,015	0,014
E2	0,051	0,017	0,014
E3	0,012	0,020	0,014
E4	0,211	0,370	0,204
E5	0,092	0,160	0,284
E6	0,012	0,046	0,037
E7	0	0,007	0,008
E8 – E12	0	0	0

Tabelle 11: Bestimmte Proteinkonzentrationen der Ausgangsmaterialien und der in den TAC-Versuchen C1, C2 und C3 gewonnenen Elutionsfraktionen durch den Bradford Protein Assay. HyEx = unbehandeltes Ausgangsmaterial = Hybridoma-Epressmedium-Zellkulturüberstand, 10^4 = durch Zentrifugalfiltration bei einer Membranporengröße von 100.000 kDa und 10.000 kDa zweifach konzentriertes Ausgangsmaterial, 10^5 = durch Zentrifugalfiltration bei einer Membranporengröße von 100.000 kDa einfach konzentriertes Ausgangsmaterial, E3 bis E6 = in den TAC-Versuchen gewonnene Elutionsfraktionen.

Probe	Konzentrationswert im Bradford Protein Assay [mg/ml]
HyEx	0
10^4	0,294
10^5	0,759
E3 C1	0
E4 C1	0,159
E5 C1	0
E6 C1	0
E3 C2	0
E4 C2	0,608
E5 C2	0
E6 C2	0
E3 C3	0
E4 C3	0,648
E5 C3	0
E6 C3	0

Aus den in Tabelle 9, Tabelle 10 und Tabelle 11 aufgeführten Werten ist eindeutig ersichtlich, dass der BCA Protein Assay dem Bradford Assay in diesem Zusammenhang eindeutig überlegen ist. Ab der Durchführung des

Versuches D1 konnten alle Proteinkonzentrationsbestimmungen durch den BCA Protein Assay problemlos durchgeführt werden.

3.4 Vergleich des IgM 4E1-HAV-Antigen-ELISA mit dem IgG 7E7-HAV-Antigen-ELISA

Um den MAK IgM 4E1 auf seine Vergleichbarkeit zum MAK IgG 7E7 hinsichtlich seiner Eigenschaften als Primärantikörper im HAV-Antigen-ELISA zu untersuchen, wurden je 24 HAV-Antigen-ELISA-Experimente für jeden der beiden Antikörpertypen angesetzt. Hiervon konnten 24 Datensätze für den IgG 7E7 und 20 Datensätze für den IgM 4E1 ausgewertet werden. Zur Untersuchung des Verhaltens des IgM 4E1 fanden eigens beschichtete Mikrotiterplatten nach der in 2.2.11.2 beschriebenen Methode Verwendung. Für den Vergleich mit dem IgG 7E7 konnten käuflich erwerbbar Testkits verwendet werden. Die Extinktionswerte jeder der sechs Verdünnungen der Positivkontrolle (1:0, 1:1, 1:3, 1:7, 1:15, 1:31)⁶ jedes Testansatzes wurden zunächst für die beiden Antikörper spezifisch gemittelt und anschließend hinsichtlich ihres Verlaufs, ihrer Streuung um den Mittelwert und ihrer absoluten und relativen Spannweite beschrieben und verglichen. Die Spannweite gibt dabei die Differenz zwischen maximalem und minimalem Extinktionswert an. Die relativen Spannweiten geben die maximale positive und negative Abweichung vom Mittelwert in Prozent des Mittelwertes an. Auch die Titerwerte wurden nach der Bestimmung der absoluten Mittelwerte ebenfalls im Hinblick auf ihren Verlauf, ihre Streuung um den absoluten Mittelwert, der relativen und absoluten Spannweiten und ihre jeweiligen Standardfehler beschrieben und anschließend miteinander in Beziehung gesetzt.

⁶ Hinweis zu den Verdünnungsangaben: Die Angabe 1:31 entspricht einer Verdünnung von einem Teil Komponente A zu 31 Teilen Komponente B. Komponente B ist hierbei der Verdünnungspuffer, Komponente A die im regulären HAV-Antigen-ELISA als Positivkontrolle verwendete HAV-Zellverdünnung.

3.4.1 Extinktionswerte jeder Verdünnung der Positivkontrolle

3.4.1.1 Verlauf der Extinktionswerte im IgM 4E1-HAV-Antigen-ELISA

Um die ELISAs mit dem jeweiligen Antikörper vergleichen zu können, wurde als aufzugebende Probe die im IgG 7E7-HAV-Antigen-ELISA als Positivkontrolle verwendete HAV-Zellverdünnung ausgewählt (s. a. 2.2.11.3). Weiterhin wurden neben der Durchführung auch die angesetzten Probenverdünnungen und der Belegungsplan der 96-well-Mikrotiterplatten standardisiert (s. 2.2.11.3.1 Belegungsplan). Zur Herstellung der Verdünnungen wurde der Verdünnungspuffer aus den gekauften Testkits eingesetzt. Nach Ausführung eines Tests wurde für jede Verdünnungsfraction der arithmetische Mittelwert des Extinktion bestimmt, welcher zur Bestimmung des Titers diente (s. a. 2.2.11.3).

Der Verlauf der für jede einzelne Platte gemittelten Extinktionswerte im IgM 4E1-HAV-Antigen-ELISA ist in Abbildung 23, Abbildung 24 und Abbildung 25 dargestellt. Die Sortierung der Extinktionswerte im Ergebnis entspricht der Sortierung nach Grad der Verdünnung. So liegt der Wert der Extinktion der niedrigeren Verdünnung (z. B. 1:0) in jedem Fall über dem der nächsthöheren Verdünnung (z. B. 1:1, s. Abbildung 23). Weiterhin ist der Entwurf der Verdünnungsreihe (Halbierung der vorhergehenden Verdünnung) in den entsprechenden Werten des jeweiligen Versuches deutlich wiederzuerkennen. So beträgt beispielsweise in Versuch 12 der Extinktionsmittelwert der 1:1-Verdünnungen $E = 0,7305$ OD, was 49,66 % des Extinktionsmittelwertes der nächsthöheren, in diesem Fall der unverdünnten Probe (1:0) entspricht ($E = 1,6273$ OD). Im Mittel liegt der Extinktionswert der nächstniedrigeren Verdünnung bei 57,34 % der nächsthöheren (vgl. Tabelle 12). Die im Test bestimmten Extinktionswerte lieferten also verglichen mit den aufgegebenen Probenverdünnungen die erwarteten Ergebnisse.

Tabelle 12: Prozentuale Abweichungen der Extinktionsmittelwerte zweier jeweils aufeinander folgenden Verdünnungen im IgM 4E1-HAV-Antigen-ELISA vom Verdünnungsschema in der Übersicht. $\mu(E_x/E_y)$ gibt die prozentuale Abweichung des Abstandes zwischen den Verdünnungen x und y im Vergleich zum in 2.2.11.3 beschriebenen Verdünnungsschema an; $\mu(E_x/E_y)_{Gesamt}$ die darauf bezogene mittlere Abweichung.

IgM 4E1	x = 1: 1, y = 1: 0	x = 1: 3, y = 1: 1	x = 1: 7, y = 1: 3	x = 1: 15, y = 1: 7	x = 1: 31, y = 1: 15
$\mu(E_x/E_y)_{4E1}$	45,27%	57,51%	57,05%	65,52%	61,36%
$\mu(E_x/E_y)_{4E1\ Ges}$	57,34%				

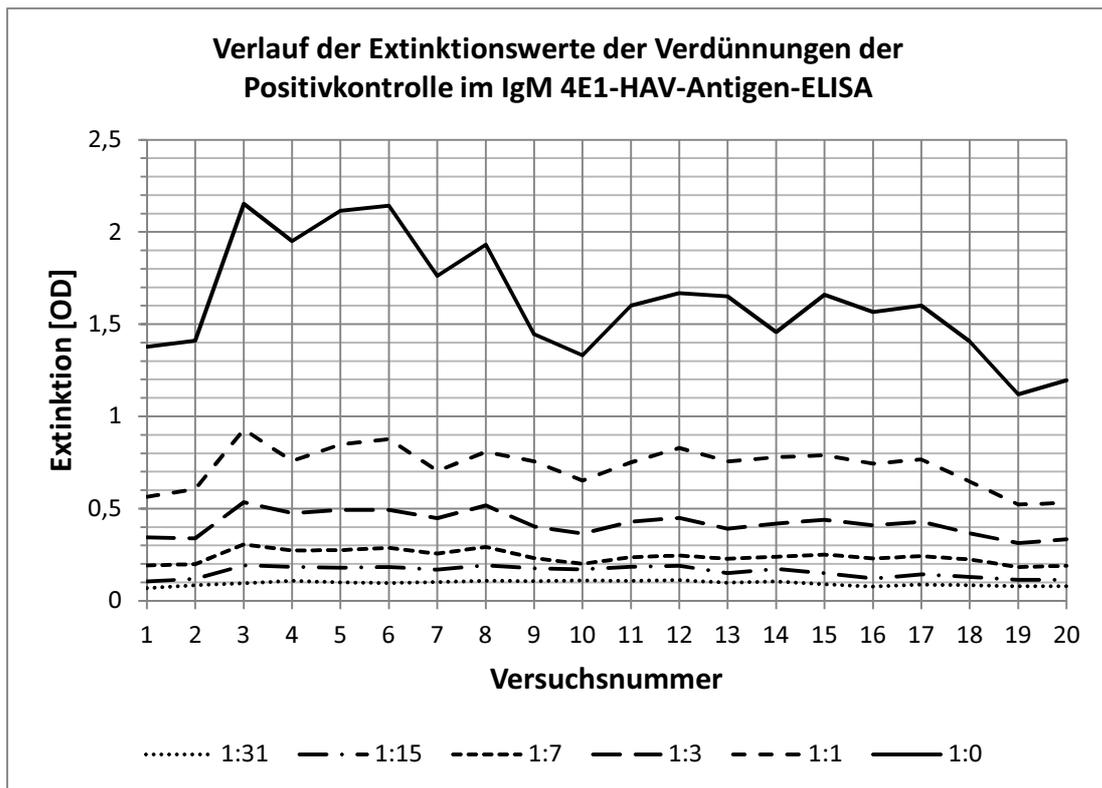


Abbildung 23: Verlauf der Extinktionswerte der Verdünnungen der Positivkontrolle im IgM 4E1-HAV-Antigen-ELISA. Die Verdünnungsangabe 1:31 beschreibt eine Lösung aus einem Teil A zu 31 Teilen B. Die Einheit der Extinktion ist $[OD] = \text{Optische Dichte} = \text{Absorbanz} = \text{Extinktion} = E_\lambda = \lg\left(\frac{I_0}{I}\right)$.

Bei Betrachtung der Kurvenverläufe ist das Minimum der Extinktionswerte jeder Verdünnung in den Versuchen 3 und 4 (s. a. Abbildung 23) unmittelbar auffallend, an welches sich direkt das Maximum der Extinktionswerte dieser Versuchsreihe in Versuch 5 anschließt. An dieser Stelle wie auch im weiteren Verlauf wird die große absolute Spannweite, also der numerische Abstand zwischen dem minimalen und maximalen Extinktionsmittelwert der Testergebnisse im IgM 4E1-ELISA anschaulich (s. a. Abbildung 31, schraffierte Balken). Dabei ist das Maximum dieser Spannweiten bei der 1:0-Verdünnung mit $E = 1,7164$ OD festzustellen, das Minimum bei der 1:31-Verdünnung mit $E = 0,0769$ OD. Um diese Daten miteinander vergleichen zu können, wurden sie in Prozent des Extinktionsmittelwertes der jeweiligen Verdünnung umgerechnet. Damit liegt das Maximum bei $112,24\% \mu(E)$, das Minimum bei $85,87 \% \mu(E)$ des jeweilig spezifischen arithmetischen Extinktionsmittelwertes.

Die relative positive Spannweite gibt den Ausschlag vom Mittelwert zum Maximum in Prozent des Extinktionsmittelwertes der jeweiligen Probenverdünnung an, die relative negative Spannweite beschreibt entsprechend den Ausschlag vom Mittelwert zum Minimum. Diese Werte wurden für den Kurvenverlauf jeder einzelnen Verdünnung berechnet. In Abbildung 26 sind diese Werte für den IgM 4E1-HAV-Antigen-ELISA ersichtlich. Im Mittel liegt die relative positive Spannweite bei $34,02 \% \mu(E)$ des jeweiligen Extinktionsmittelwertes, wohingegen die relativ-negative einen Wert von $67,75 \% \mu(E)$ erreicht.

Die Streuung um den Mittelwert ist in den Kurvenverläufen in Abbildung 25 und Abbildung 24 nachzuvollziehen.

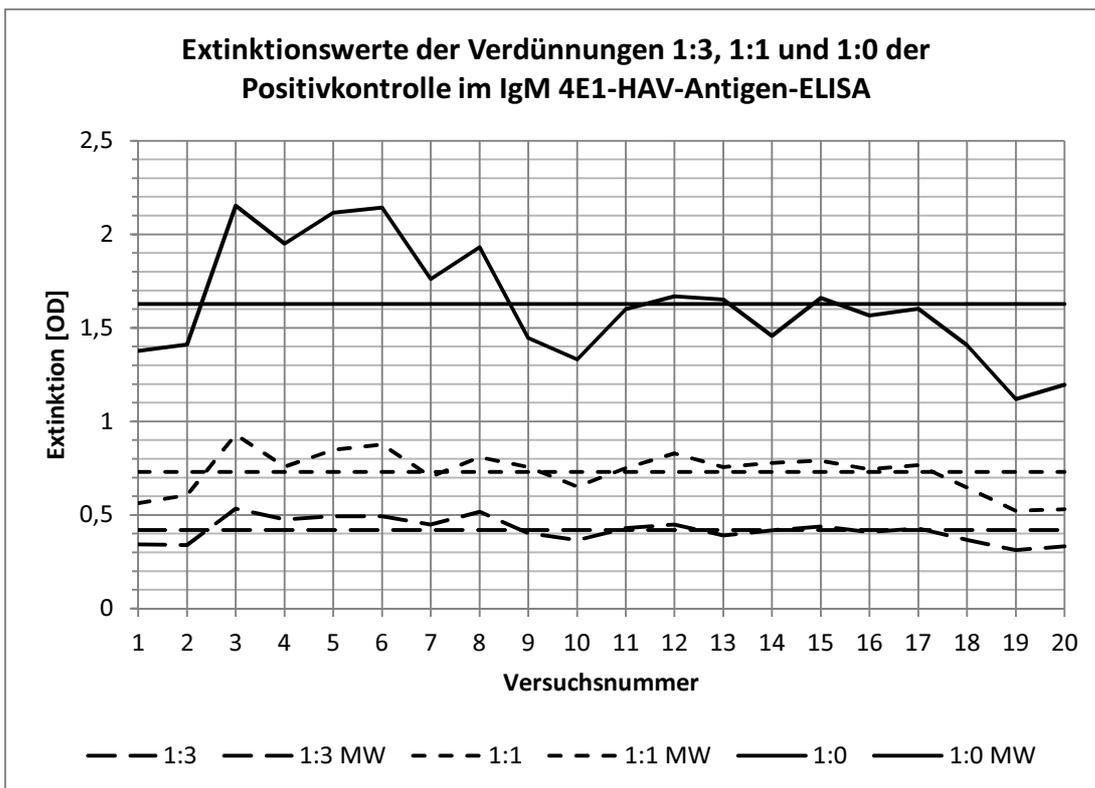


Abbildung 24: Extinktionswerte der Verdünnungen 1:3, 1:1 und 1:0 der Positivkontrolle im IgM 4E1-HAV-Antigen-ELISA mit jeweils dargestellten Mittelwerten. Die Einheit der Extinktion ist $[OD] = \text{Optische Dichte} = \text{Absorbanz} = \text{Extinktion} = E_{\lambda} = \lg\left(\frac{I_0}{I}\right)$.

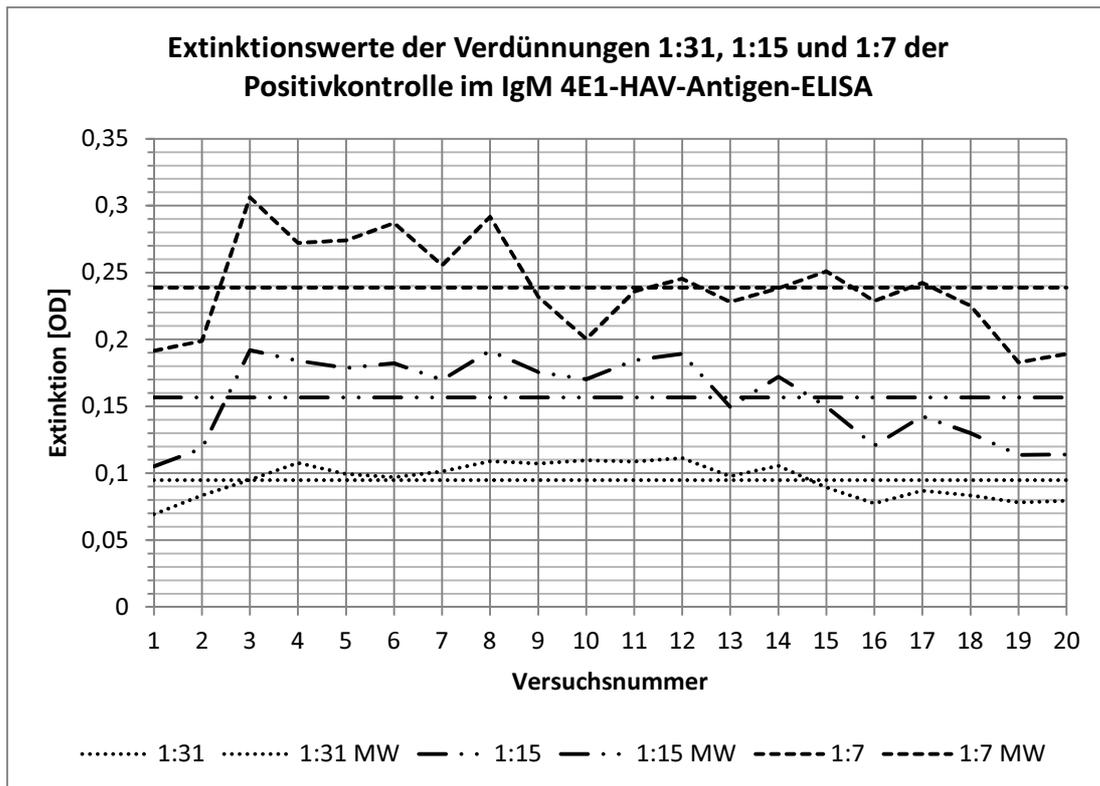


Abbildung 25: Extinktionswerte der Verdünnungen 1:31, 1:15 und 1:7 der Positivkontrolle im IgM 4E1-HAV-Antigen-ELISA mit jeweils dargestellten Mittelwerten. Die Einheit der Extinktion ist $[OD] = \text{optische Dichte} = \text{Absorbanz} = \text{Extinktion} = E_\lambda = \lg\left(\frac{I_0}{I}\right)$.

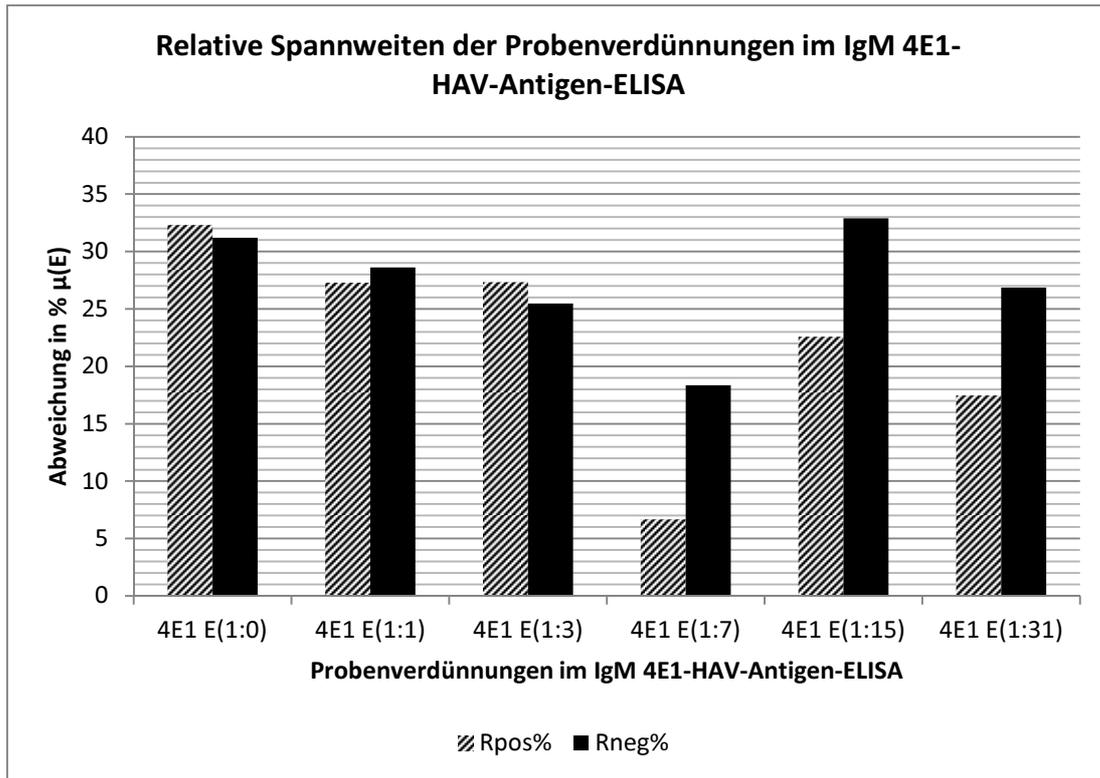


Abbildung 26: Relative Spannweiten (= Prozentuale positive und negative Abweichungen vom Extinktionsmittelwert) der Probenverdünnungen im IgM 4E1-HAV-Antigen-ELISA. Rpos% = relative Spannweite vom Mittelwert bis zum maximalen Extinktionswert der jeweiligen Verdünnung, angegeben in $\% \mu(E)$ = Prozent des Extinktionsmittelwerts; Rneg% = relative Spannweite vom Mittelwert bis zum minimalen Extinktionswerte der jeweiligen Verdünnung.

Bei Betrachtung der in Abbildung 26 enthaltenen Werte der relativen Spannweiten im IgM 4E1-HAV-Antigen-ELISA ist ein negativer Trend der Spannweiten mit Zunahme des Verdünnungsgrades zu verzeichnen. So beträgt beispielweise die relativ positive Spannweite bei einer Verdünnung von 1:31 der Positivkontrolle mit einem Wert von $E = 0,0218$ OD und damit $24,33 \% \mu(E)$ des Mittelwertes nur noch $59,62 \%$ des Spannweitenwertes der unverdünnten Probe ($E = 0,6240$ OD $\equiv 40,81 \% \mu(E)$). Im Falle der relativ negativen Spannweiten ist dieser Trend zwar weniger ausgeprägt, aber immer noch erkennbar vorhanden: auch hier liegt die prozentuale Abweichung vom mittleren Extinktionswert der 1:31-Verdünnung ($E = 0,0551$ OD $\equiv 61,54 \% \mu(E)$) bei $94,83 \%$ des Spannweitenwertes der unverdünnten Probe ($E = 1,0924$ $\equiv 71,44 \% \mu(E)$).

Bei Betrachtung der Extinktionswert-Ergebnisse für die durchgeführte IgM 4E1-HAV-Antigen-ELISA-Versuchsreihe kann also Folgendes festgehalten werden:

1. Die in der Versuchsreihe bestimmten Extinktionswerte korrelieren klar ersichtlich mit der aufgegebenen Verdünnungsreihe HAV-Zellverdünnung. Der Kurvenverlauf jeder Verdünnung ist durch ein Minimum bei Versuch 4 und ein Maximum bei Versuch 5 geprägt. Vgl. Abbildung 23 und Tabelle 12.
2. Das Maximum der absoluten Spannweitenwerte liegt bei einem Wert von $E = 1,7164$ OD und findet sich bei der unverdünnten Probe (1:0). Dies entspricht $112,24 \text{ } \mu(E)$ des Extinktionsmittelwertes der unverdünnten Probe. Der minimale absolute Spannweitenwert liegt bei der höchsten Verdünnung (1:31) und beträgt $E = 0,0769$ OD bzw. $85,87 \text{ } \mu(E)$ des Extinktionsmittelwertes der 1:31-Verdünnung. Vgl. Abbildung 31 und Abbildung 32.
3. Die Schwankungen der Extinktionswerte (vgl. Abb. 8, 9 und 10) um den Extinktionsmittelwert wurden mit Hilfe der Berechnung der relativen Spannweiten quantifiziert. Die positive Spannweite beträgt im Mittel $34,02 \text{ } \mu(E)$ des Extinktionsmittelwertes und entspricht damit $134,02 \text{ } \%$ des Extinktionsmittelwertes. Demgegenüber liegt die mittlere negative Spannweite bei $67,75 \text{ } \mu(E)$ des Extinktionsmittelwertes, was $32,25 \text{ } \%$ desselben entspricht. Damit ergibt sich eine Schwankung in einem Bereich von $32,25 \text{ } \mu(E)$ bis $134,02 \text{ } \mu(E)$ des Extinktionsmittelwertes. Betrachtet man den Verlauf der Werte sowohl der negativen als auch der positiven Spannweite von der niedrigsten (1:0) hin zur höchsten Verdünnung (1:31), so ist ein negativer Trend festzustellen. Dieser ist im Falle der relativ-positiven Spannweite stärker ausgeprägt als bei den Werten der relativ-negativen Spannweite.

3.4.1.2 Verlauf der Extinktionswerte der Verdünnungen im IgG 7E7-HAV-Antigen-ELISA

Hinsichtlich der Durchführung wurden dem Aufbau der Versuchsreihe des IgG 7E7-HAV-Antigen-ELISA dieselben Maßstäbe zugrunde gelegt wie IgM 4E1-basierten ELISA. Die Auswertung folgte dem zu Anfang dieses Abschnitts beschriebenen Vorgehen (vgl. 3.3 und 3.4.1.1).

Die Verläufe der gemittelten Extinktionswerte jeder Probenverdünnung sind in Abbildung 27, Abbildung 28 und Abbildung 29 zu entnehmen. Wie auch im IgM 4E1-basierten ELISA entspricht die Sortierung der Testergebnisse dem Grad der Probenverdünnungen und spiegelt ebenso den Entwurf der Verdünnungsreihe. Im IgG 7E7-HAV-Antigen-ELISA liegt der Extinktionswert im Schnitt bei 57,85% der nächsthöheren (vgl. Tabelle 13).

Tabelle 13: Prozentuale Abweichungen der Extinktionsmittelwerte zweier jeweils aufeinander folgenden Verdünnungen im IgG 7E7-HAV-Antigen-ELISA vom Verdünnungsschema in der Übersicht. $\mu(E_x/E_y)$ gibt die prozentuale Abweichung des Abstandes zwischen den Verdünnungen x und y im Vergleich zum in 2.2.11.3 beschriebenen Verdünnungsschema an; $\mu(E_x/E_y)_{Gesamt}$ die darauf bezogene mittlere Abweichung.

IgG 7E7	x = 1: 1, y = 1: 0	x = 1: 3, y = 1: 1	x = 1: 7, y = 1: 3	x = 1: 15, y = 1: 7	x = 1: 31, y = 1: 15
$\mu(E_x/E_y)_{7E7}$	52,60%	57,66%	54,97%	62,90%	61,14%
$\mu(E_x/E_y)_{7E7\ Ge.}$	57,85%				

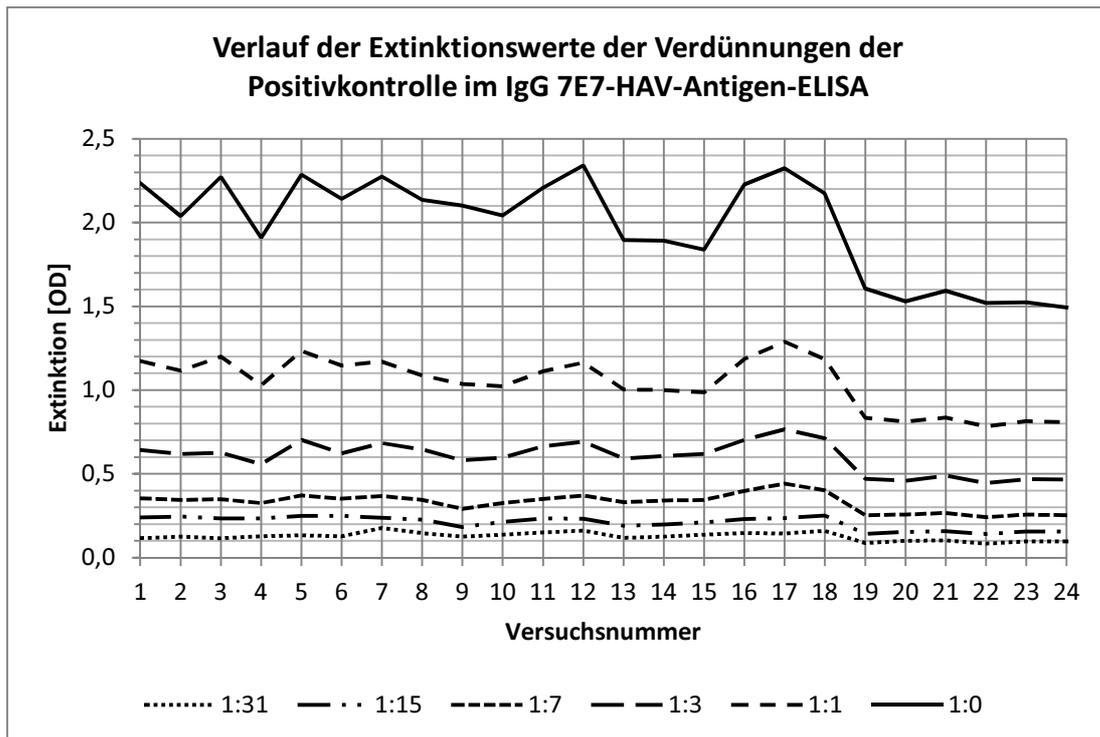


Abbildung 27: Verlauf der Extinktionswerte der Verdünnungen der Positivkontrolle im IgG 7E7-HAV-Antigen-ELISA. Die Einheit der Extinktion ist $[OD] = \text{Optische Dichte} = \text{Absorbanz} = \text{Extinktion} = E_\lambda = \lg\left(\frac{I_0}{I}\right)$.

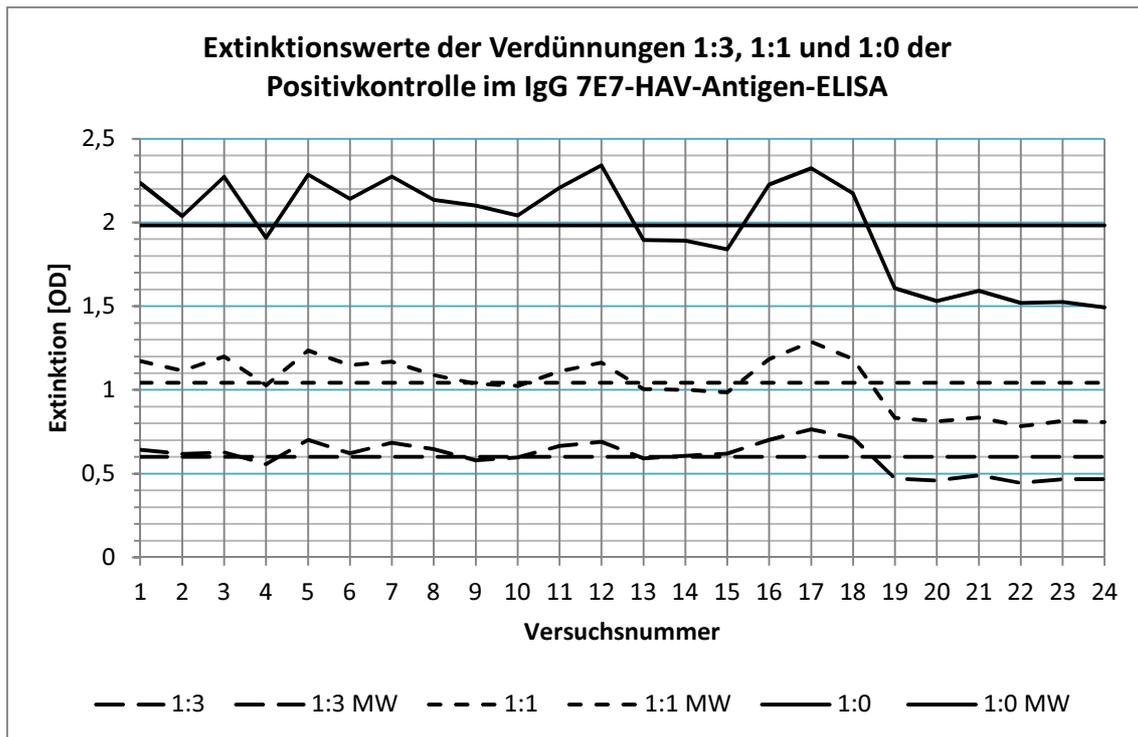


Abbildung 28: Extinktionswerte der Verdünnungen 1:3, 1:1 und 1:0 der Positivkontrolle im IgG 7E7-HAV-Antigen-ELISA. Die Einheit der Extinktion ist $[OD] = \text{Optische Dichte} = \text{Absorbanz} = \text{Extinktion} = E_\lambda = \lg\left(\frac{I_0}{I}\right)$.

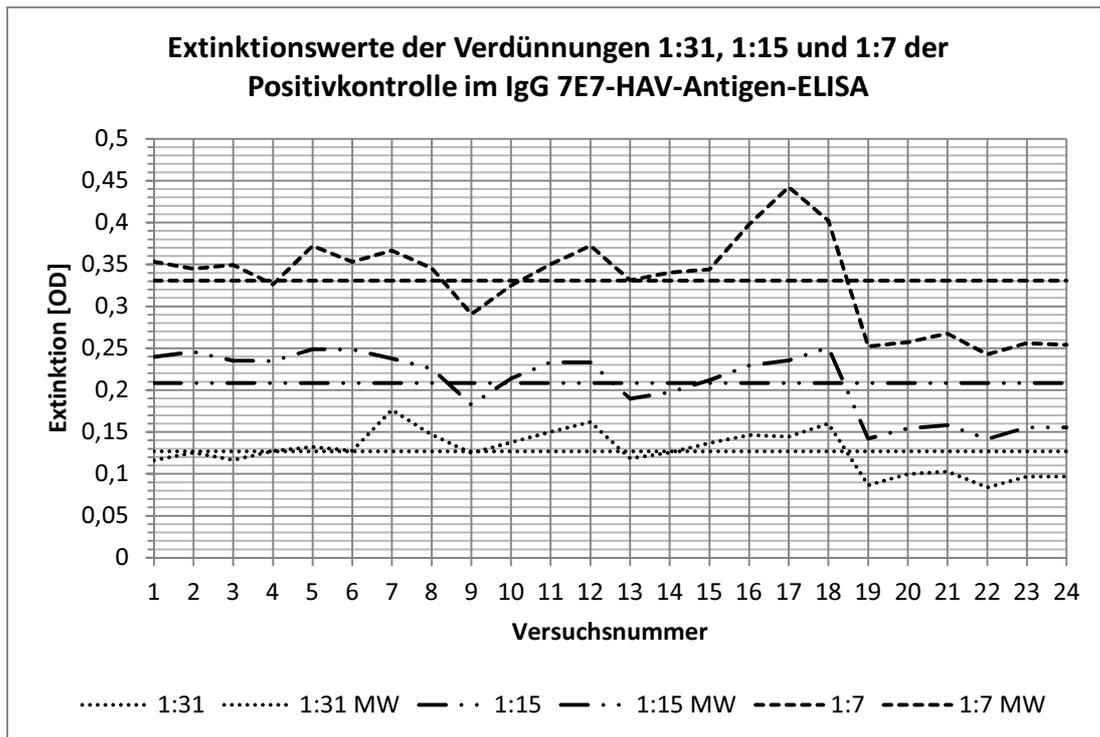


Abbildung 29: Extinktionswerte der Verdünnungen 1:31, 1:15 und 1:7 der Positivkontrolle im IgG 7E7-HAV-Antigen-ELISA. Die Einheit der Extinktion ist [OD] = *Optische Dichte* =

$$\text{Absorbanz} = \text{Extinktion} = E_{\lambda} = \lg\left(\frac{I_0}{I}\right).$$

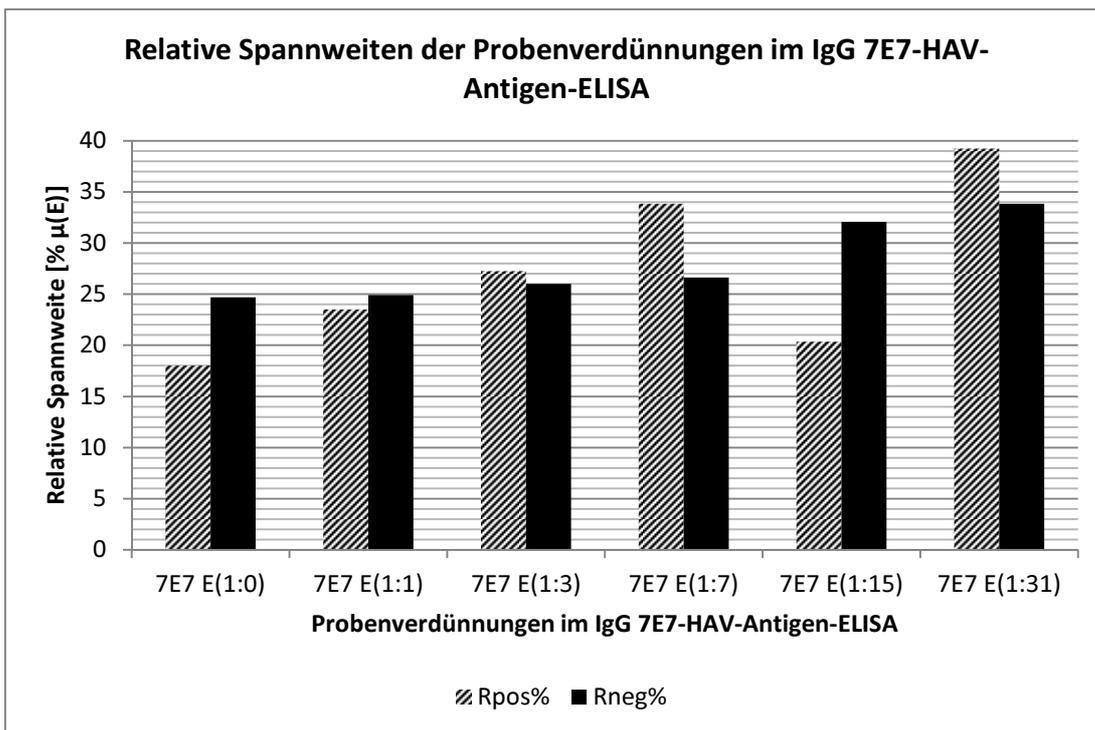


Abbildung 30: Relative Spannweiten (= Prozentuale positive und negative Abweichungen) vom Extinktionsmittelwert der Probenverdünnungen im IgG 7E7-HAV-Antigen-ELISA. Rpos% = relative Spannweite vom Mittelwert bis zum maximalen Extinktionswert der jeweiligen Verdünnung, angegeben in % μ (E) = Prozent des Extinktionsmittelwerts; Rneg% = relative Spannweite vom Mittelwert bis zum minimalen Extinktionswerte der jeweiligen Verdünnung.

Im Verlauf der Extinktionsmittelwerte (s. Abbildung 27) ist in den ersten 18 Versuchen eine gleichmäßige Kurve mit einer minder große Schwankung um etwa $E = 2,1$ OD zu sehen, welche durch die Werte der Versuche 19 - 24 leicht abfällt. Die Schwankungen um die jeweiligen Mittelwerte der für jede Verdünnung spezifischen Verlaufskurve sind in Abbildung 28 und Abbildung 29 dargestellt. Verlauf und Schwankungen wurden wie auch beim IgM 4E1-ELISA durch die Bestimmung der absoluten und relativen Spannweiten quantifiziert.

Das Maximum der absoluten Spannweite ist mit $E = 0,8471$ OD bei der niedrigsten Verdünnung (1:0) festzustellen, das Minimum mit $E = 0,0926$ OD bei der höchsten Verdünnung (1:31). Diese Werte entsprechen in dieser Reihenfolge 42,71 % μ (E) (1:0) bzw. 73,09 % μ (E) ihres jeweiligen Extinktionsmittelwertes.

Die Werte der relativen Spannweiten zur genaueren Beschreibung der Abweichungen vom Extinktionsmittelwert jeder Verdünnung wurden für jede Verdünnungsfraction berechnet und sind in Abbildung 30 dargestellt. Bei Betrachtung der Werte von niedrigsten (1:31) zur höchsten Verdünnung (1:0) ist im Falle der relativ-positiven deutlich ein positiver Trend zu verzeichnen. Der relativ-positive Spannweitenwert der unverdünnten Probe (1:0) beläuft sich dabei auf $E = 0,3574$ OD, was $18,02 \% \mu(E)$ des spezifischen Extinktionsmittelwertes entspricht, und damit auf $45,91 \%$ desgleichen in der höchstverdünnten Probe (1:31, $E = 0,0497$ OD $\equiv 39,25 \% \mu(E)$). Ebenso verhält sich der Werteverlauf der relativ-negativen Spannweitenwerte: so beläuft sich der Spannweitenwert der unverdünnten Probe (1:0) auf $E = 0,4897$ OD und damit $24,69 \% \mu(E)$, was wiederum $72,96 \%$ desgleichen in der höchstverdünnten Probe (1:31) entspricht ($E = 0,0429$ OD $\equiv 33,84 \% \mu(E)$).

Somit kann für den sich anschließenden Vergleich der Extinktionswerte beider ELISAs Folgendes festgehalten werden:

1. Die in der Versuchsreihe bestimmten Extinktionswerte korrelieren klar mit dem Design der aufgegebenen Verdünnungsreihe. Der Verlauf zeigt sich einer gleichmäßigen, vergleichsweise niedrigeren Schwankung um den Extinktionsmittelwert in den Versuchen 1-18 und als zwar gleichmäßig, aber mit deutlich größeren Schwankungen um den Extinktionsmittelwert behaftet in den Ergebnissen der Versuche 19-24.
2. Das Maximum der absoluten Spannweite ist in den Werten der unverdünnten Probe zu finden und beläuft sich auf $E = 0,8471$ OD $\equiv 42,01 \% \mu(E)$. Das Minimum zeigt sich bei Betrachtung der höchstverdünnten Probe (1:31) ($E = 0,0926$ OD $\equiv 73,09 \% \mu(E)$). Vgl. Abbildung 31.
3. Die Werte der relativen Spannweiten quantifizieren die Schwankungen um den Extinktionsmittelwert (vgl. Abbildung 27, Abbildung 28 und Abbildung 29) folgendermaßen: Die positive Spannweite erstreckt sich

im Mittel auf 27,03 % μ (E) und entspricht damit 127,03 % des Mittelwertes. Die negative Spannweite beläuft sich demgegenüber auf 28,02 % μ (E), also auf 71,98 % des Mittelwertes. Somit ist ein Schwankungsbereich von 71,98 % bis 127,03 % des Mittelwertes festzustellen. Im Überblick ist bei Betrachtung des Werteverlauf beider relativer Spannweitendatensätze von der unverdünnten (1:0) bis zur höchstverdünnten Probe (1:31) gleichermaßen ein positiver Trend zu verzeichnen. Vgl. Abbildung 30.

3.4.1.3 Vergleich der Extinktionsparameter in beiden ELISAs

Beim Vergleich der erhobenen Daten konnten folgende Feststellungen getroffen werden:

1. Die gemessenen Extinktionswerte spiegeln sowohl im Fall des IgM 4E1- und des IgG 7E7-ELISA das Design der Verdünnungsreihe (vgl. Tabelle 15) wider. Sie lieferten damit die erwarteten Ergebnisse.
2. Der IgM 4E1 erreicht in seiner Verwendung als Primärantikörper im HAV-Antigen-ELISA ein vergleichbares Maximum der Extinktionswerte gemessen am IgG 7E7. Hierfür wurden exemplarisch die Maxima der Extinktionswerte der unverdünnten Probe aufgeführt (vgl. Tabelle 14). Das Minimum hingegen stellt im IgM 4E1-ELISA jedoch einen deutlich niedrigeren Wert dar.
3. Die Schwankungen um den Extinktionsmittelwert jeder Verdünnung (relativ positive und negative Spannweiten) sind im IgM 4E1-ELISA deutlich größer als im IgG 7E7-ELISA. (vgl. Tabelle 14).
4. Die absolute Spannweite wird in beiden Fällen durch eine negative Tendenz mit ansteigender Verdünnungsrate charakterisiert. Dabei liegen die Werte der absoluten Spannweite im IgM 4E1-ELISA mit Ausnahme der höchsten Verdünnung (1:31) in jedem Fall über denen des IgG 7E7-ELISA (vgl. Abbildung 31).

5. Betrachtet man die relativen Spannweiten beider Tests, so fällt eine Annäherung der Abweichungen mit steigender Verdünnungsrate auf (vgl. Abbildung 32).

Tabelle 14: Gegenüberstellung der die Extinktionswerte beider ELISAs charakterisierenden Größen. $E_{Max}(1:0)$ und $E_{Min}(1:0)$ = maximaler und minimaler Extinktionswert in der unverdünnten Probe (1:0) in OD, R_{Max} und R_{Min} = Maximaler und minimaler Wert der absoluten Spannweite in % $\mu(E)$, $\mu(R_{pos}\%)$ und $\mu(R_{neg}\%)$ = Maximaler und minimaler Wert der relativen Spannweite in % $\mu(E)$, Schwankungsbereich $\mu(R_{neg}\%) - \mu(R_{pos}\%)$ = Schwankungsbereich zwischen Maximum und Minimum der relativen Spannweitenwerte um den Extinktionsmittelwert.

	IgM 4E1-ELISA	IgG 7E7-ELISA
$E_{Max}(1:0)$	2,1532 OD	2,3408 OD
$E_{Min}(1:0)$	1,1197 OD	1,4937 OD
R_{Max}	$R_{(1:0)} = 1,034 OD$ $\equiv 61,51\% \mu(E)$	$R_{(1:0)}$ $= 0,8471 OD$ $\equiv 42,01\% \mu(E)$
R_{Min}	$R_{(1:31)} = 0,0420 OD$ $\equiv 44,41\% \mu(E)$	$R_{(1:31)}$ $= 0,0926 OD$ $\equiv 73,09\% \mu(E)$
$\mu(R_{pos}\%)$	22,28% $\mu(E)$	27,03% $\mu(E)$
$\mu(R_{neg}\%)$	27,24% $\mu(E)$	28,02% $\mu(E)$
Schwankungsbereich $\mu(R_{neg}\%)$ $- \mu(R_{pos}\%)$	77,72% $\mu(E)$ bis 127,24% $\mu(E)$	71,98% $\mu(E)$ bis 127,03% $\mu(E)$

3 Ergebnisse

Tabelle 15: Gegenüberstellung der prozentualen Abweichungen der Extinktionsmittelwerte zweier jeweils aufeinander folgenden Verdünnungen im IgM 4E1 und im IgG 7E7-HAV-Antigen-ELISA vom Verdünnungsschema in der Übersicht. $\mu(E_x/E_y)$ gibt die prozentuale Abweichung des Abstandes zwischen den Verdünnungen x und y im Vergleich zum in 2.2.11.3 beschriebenen Verdünnungsschema an; $\mu(E_x/E_y)_{Gesamt}$ die darauf bezogene mittlere Abweichung.

IgG 7E7 vs IgM 4E1	x =	x =	x =	x =	x =
	1: 1,	1: 3,	1: 7,	1: 15,	1: 31,
	y =	y =	y =	y =	y =
	1: 0	1: 1	1: 3	1: 7	1: 15
$\mu(E_x/E_y)_{7E7}$	52,60%	57,66%	54,97%	62,90%	61,14%
$\mu(E_x/E_y)_{4E1}$	45,27%	57,51%	57,05%	65,52%	61,36%
$\mu(E_x/E_y)_{7E7\ Ges}$	57,85%				
$\mu(E_x/E_y)_{4E1\ Ges}$	57,34%				

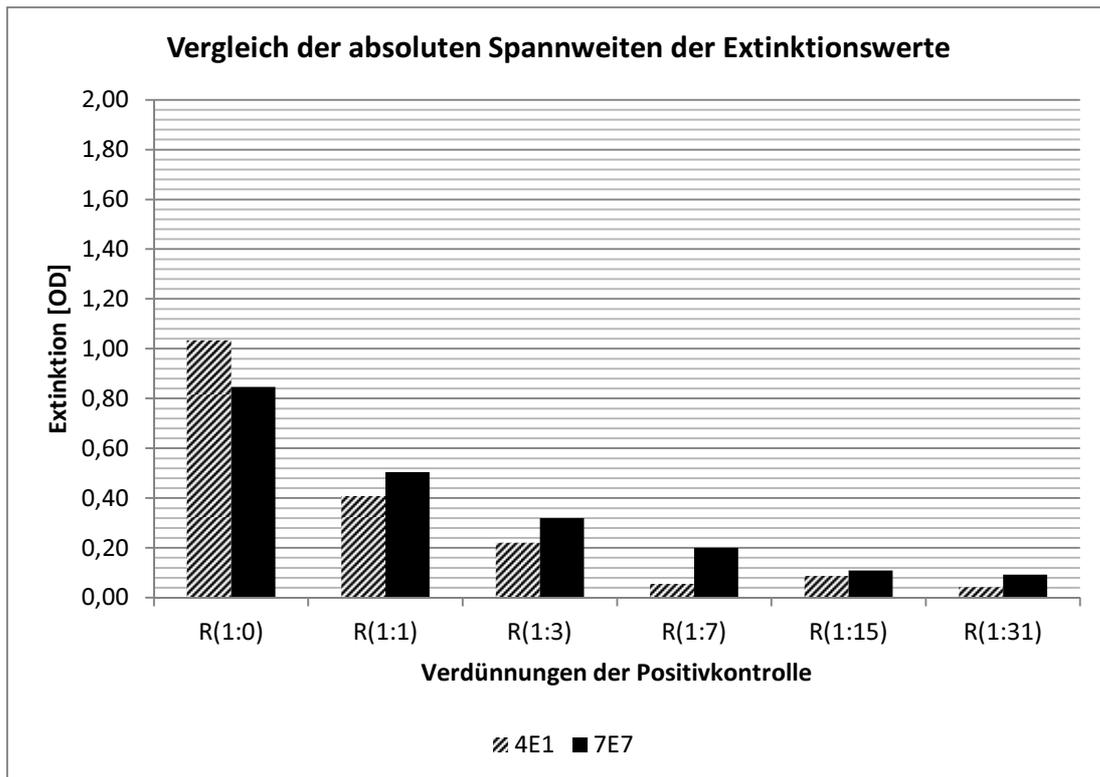


Abbildung 31: Absolute Spannweiten der Extinktionswerte der Verdünnungen beider ELISA im Vergleich. R = Spannweite. Die Spannweite gibt den Abstand zwischen dem minimalen und maximalen Extinktionswert der Versuchsreihe an und besitzt die Einheit der Extinktion. Die Einheit der Extinktion ist $[OD] = \text{Optische Dichte} = \text{Absorbanz} = \text{Extinktion} = E_\lambda = \lg\left(\frac{I_0}{I}\right)$.

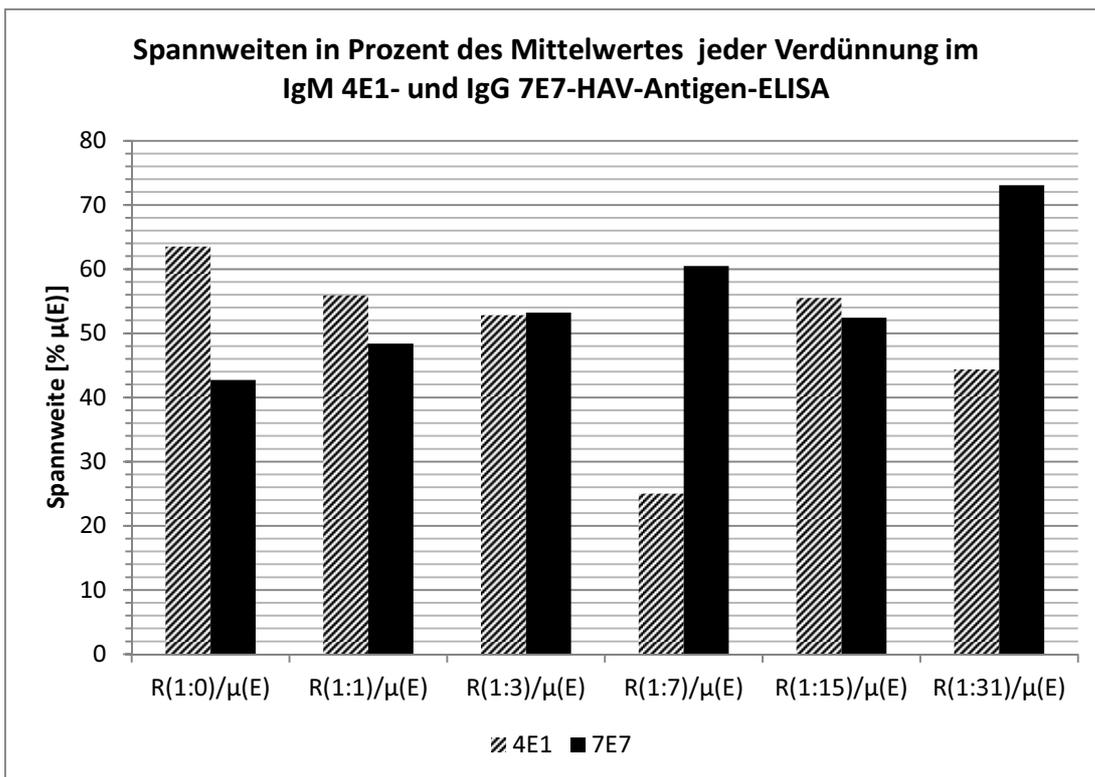


Abbildung 32: Absolute Spannweiten jeder Verdünnung in Prozent des Extinktionsmittelwertes ($= \% \mu(E)$) der jeweiligen Verdünnung. $(R(1:x)) / (\mu(E)) =$ Absoluter Spannweitenwert der jeweiligen Verdünnung in Bezug zum jeweiligen Extinktionsmittelwert.

3.4.2 Titerwerte

Durch graphische Auswertung der Extinktionswerte im Bezug zur jeweiligen Verdünnung wurde der Titer der aufgegebenen Probe für jeden ELISA neu bestimmt. Als aufzugebende Proben dienten in jedem Fall Verdünnungen der HAV-Zellverdünnung (s. o.). Diese Zellverdünnung wird im regulären HAV-Antigen-ELISA vor ihrer Verwendung als Positivkontrolle (PK) entsprechend dem Belegungsplan der 96-well-Mikrotiterplatte mit Verdünnungspuffer (VP) des Testkits verdünnt (s. 2.2.11.3) Entsprechend wurde auch im Vergleich der beiden ELISAs verfahren. Da die aufgegebenen Proben Verdünnungen der Stammlösung der PK darstellen, wurde zwischen relativen und absoluten Titerwerten unterschieden. Die relativen Titerwerte sind demnach die durch die graphische Auswertung unmittelbar bestimmten Werte. Durch Einbeziehung der Konzentration der Stammlösung ergeben sich die

absoluten Titerwerte. Im Folgenden werden ausschließlich die absoluten Titerwerte dargestellt und verglichen.

3.4.2.1 Verlauf der Titerwerte im IgM 4E1- und IgG 7E7-HAV-Antigen-ELISA

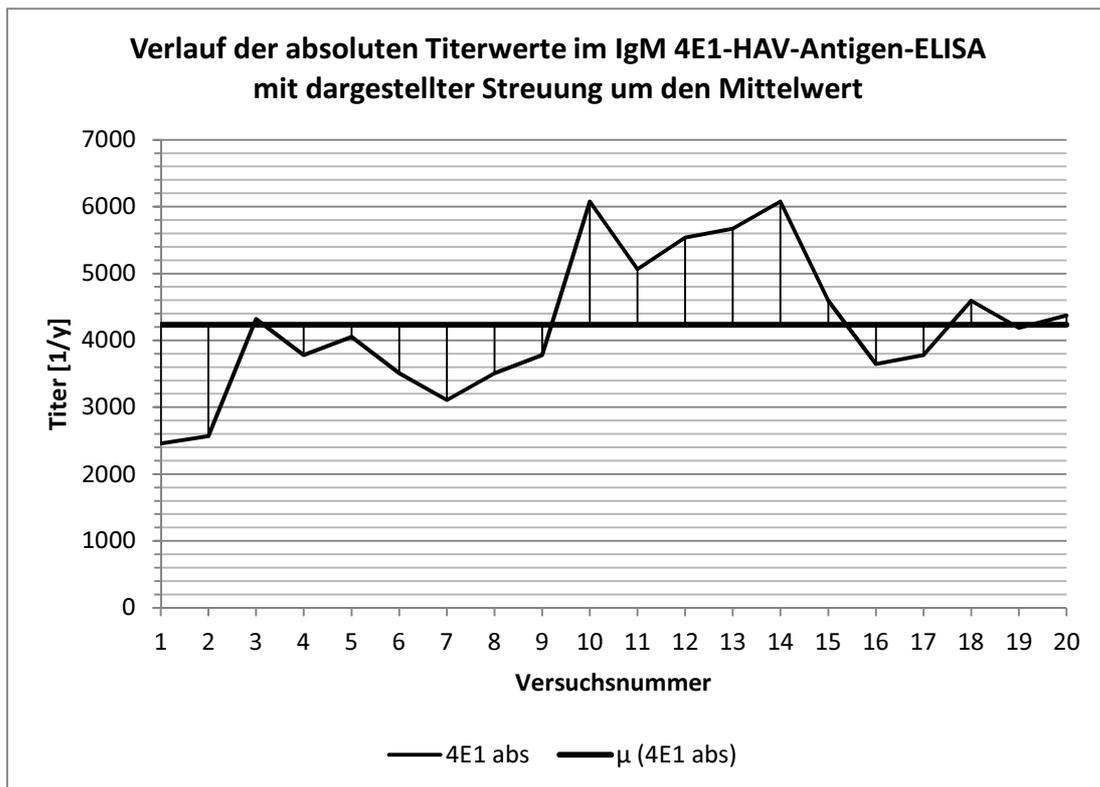


Abbildung 33: Verlauf der absoluten Titerwerte im IgM 4E1-HAV-Antigen-ELISA mit dargestellter Streuung um den Mittelwert. Auf der Abszisse sind der jeweilige Titerwert in $1/y$, auf der Ordinate die jeweilige Versuchsnummer aufgetragen. 4E1 abs = Absolute Titerwerte der IgM 4E1-HAV-Antigen-ELISA-Versuchsreihe im Verlauf, $\mu(4E1\ abs)$ = Mittelwert der in 4E1 abs beschriebenen Titerwerte.

Der Verlauf der absoluten Titerwerte im IgM 4E1-HAV-Antigen-ELISA wird charakterisiert durch ein Minimum von 1:2457 in Versuch 1 und durch ein Maximum von 1:6075 in Versuch 16. In allen Versuchen wurde ein und dieselbe Probe verwendet (HAV-Zellverdünnung). Bei einem Mittelwert bei 1:4197,9 liegt die relativ-positive Spannweite bei 1877,1 Titerwerteinheiten, was 44,72 % μ (E) entspricht, die relativ-negative bei 1740,9 Titerwerteinheiten (\equiv 41,47 % μ (E)). Somit beläuft sich die absolute Spannweite auf 3618,0 Titerwerteinheiten (\equiv 86,19 % μ (E)). Vgl. Abbildung 33 und Abbildung 36.

Für den Titerwertverlauf im IgG 7E7-HAV-Antigen-ELISA ergeben sich folgende Werte: das Minimum ist in Versuch 14 zu erkennen und liegt bei 1:3645, das Maximum in Versuch 15 mit einem Wert von 1:4860. Um den Mittelwert von 1:4248,0 erstreckt sich die relativ-positive Spannweite auf 612 (\equiv 14,41 % μ (E)) und die relativ-negative auf 603 (\equiv 14,19 % μ (E)) Titerwerteinheiten. Damit beträgt die absolute Spannweite 1215 (\equiv 28,60 % μ (E)) Titerwerteinheiten. Vgl. Abbildung 34 und Abbildung 36.

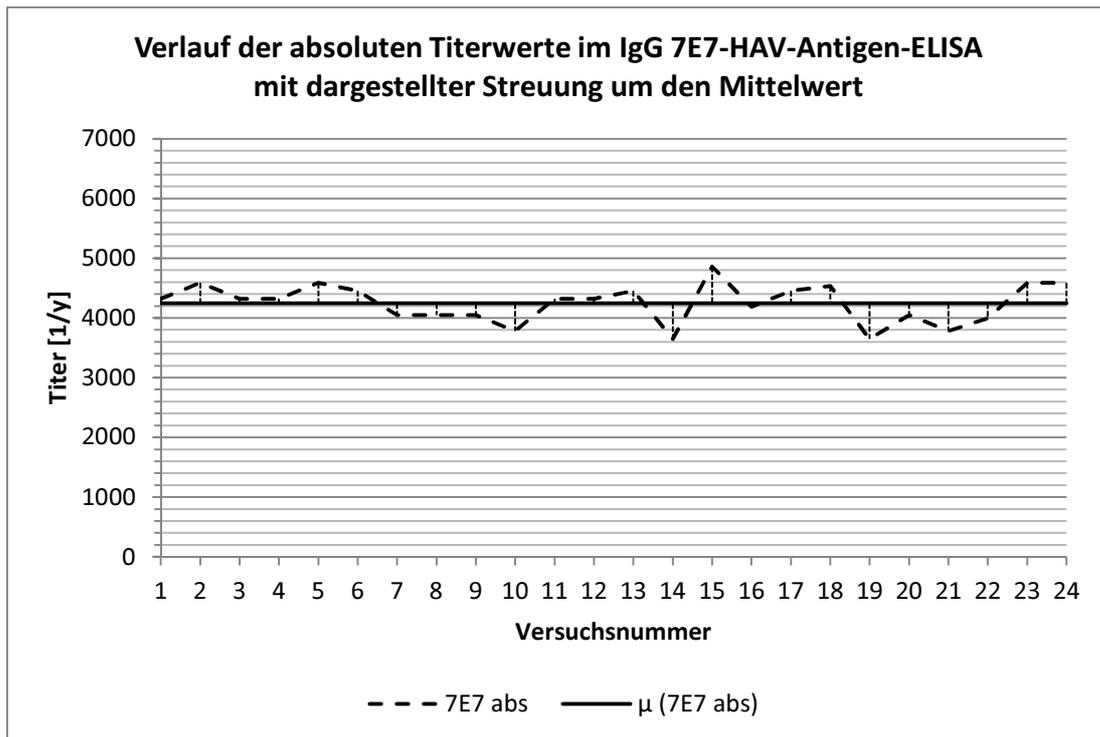


Abbildung 34: Verlauf der absoluten Titerwerte im IgG 7E7-HAV-Antigen-ELISA mit dargestellter Streuung um den Mittelwert. Auf der Abszisse sind der Titerwert in $1/y$, auf der Ordinate die jeweilige Versuchsnummer. 7E7 abs = Absolute Titerwerte der IgG 7E7-HAV-Antigen-ELISA-Versuchsreihe im Verlauf, $\mu(7E7 \text{ abs})$ = Mittelwert der in 7E7 abs beschriebenen Titerwerte.

3.4.2.2 Vergleich der Titerwertbestimmungen in beiden ELISAs

Bei vergleichender Betrachtung der jeweiligen Titerwerte sind folgende Beobachtungen festzuhalten:

1. Der Kurvenverlauf der absoluten Titerwerte stellt sich schon ohne Beachtung der genauen Daten im IgG 7E7-HAV-Antigen-ELISA deutlich konstanter dar als derjenige im IgM 4E1-HAV-Antigen-ELISA (s. Abbildung 33, Abbildung 34 und Abbildung 35).
2. Im Hinblick auf den Mittelwert der Titerwerte unterscheiden sich die beiden ELISAs nur geringfügig ($\mu_{4E1} = 1:4197,9$ und $\mu_{7E7} = 1:4248,0$; s. Tabelle 16 und Abbildung 36).
3. Sowohl Maximum als auch Minimum der Titerwerte erreichen bei Verwendung des IgM 4E1 als Primärantikörper im HAV-Antigen-

3 Ergebnisse

ELISA deutlich höhere bzw. niedrigere Werte als bei Einsatz des IgG 7E7. Ein eben solcher Effekt zeigt sich hinsichtlich der absoluten und relativen Spannweiten, welche die Streuung um den Mittelwert quantifizieren. (s. Abbildung 36 und Tabelle 16).

Tabelle 16: Gegenüberstellung der die Titerwerte beider ELISAs charakterisierenden Größen. V=Versuch, Min=Minimum, Max= Maximum, μ =Mittelwert, R(%)=Absolute Spannweite (in % des Mittelwerts), Rpos(%)=Relativ-positive Spannweite (in % des Mittelwerts), Rneg(%)=Relativ-negative Spannweite (in % des Mittelwerts).

	IgM 4E1-ELISA		IgG 7E7-ELISA	
Min	V1	1:2457,0	V14	1:3645,0
Max	V14	1:6075,0	V15	1:4860,0
μ	1:4232,9		1:4248,0	
R	1:3618,0		1:1215,0	
R% [% μ(E)]	85,47		28,60	
Rpos	1:1842,1		1:612,0	
Rpos% [% μ(E)]	43,52		14,41	
Rneg	1:1775,9		1:603,0	
Rneg% [% μ(E)]	41,95		14,19	

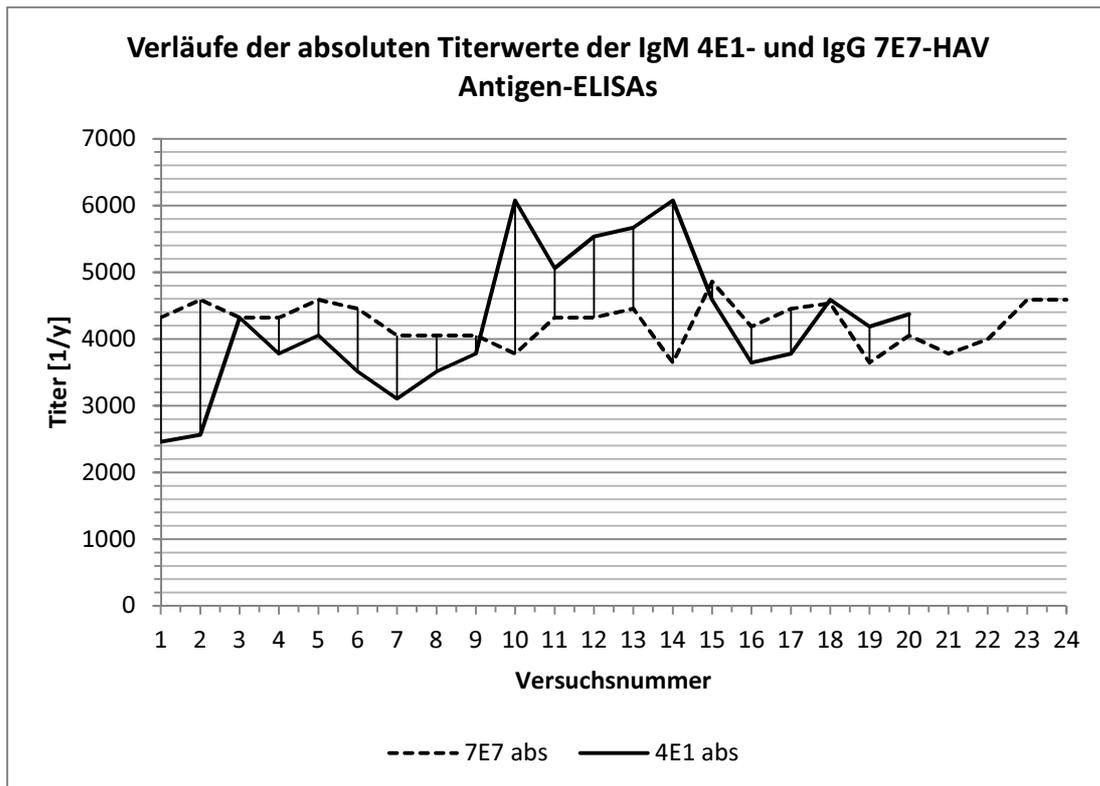


Abbildung 35: Verläufe der absoluten Titerwerte der IgM 4E1- und IgG 7E7-HAV-Antigen-ELISAs. Auf der Abszisse sind der Titerwert in $1/y$, auf der Ordinate die jeweilige Versuchsnummer. 7E7 abs = Absolute Titerwerte der IgG 7E7-HAV-Antigen-ELISA-Versuchsreihe im Verlauf, 4E1 abs = Absolute Titerwerte der IgM 4E1-HAV-Antigen-ELISA-Versuchsreihe im Verlauf.

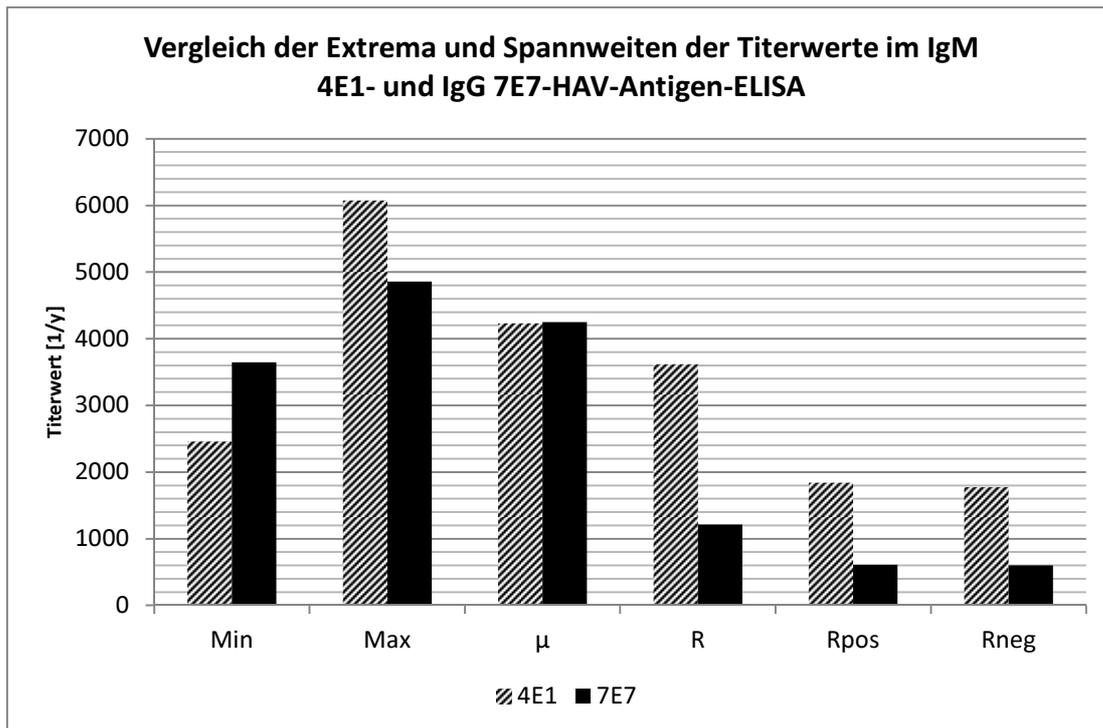


Abbildung 36: Vergleich der Extrema und Spannweiten der Titerwerte im IgM 4E1- und IgG 7E7-HAV-Antigen-ELISA. Min = Minimum, Max = Maximum, μ = Mittelwert, R = Spannweite, Rpos = Maximale relative Spannweite vom Mittelwert zum Maximum, Rneg = Maximale relative Spannweite vom Mittelwert zum Minimum. Die Einheit der Extinktion ist $[OD] = \text{Optische Dichte} = \text{Absorbanz} = \text{Extinktion} = E_\lambda = \lg\left(\frac{I_0}{I}\right)$

3.5 Darstellung des MAK IgM 4E1 mittels direkter Immunfluoreszenz und FITC-Markierung

Durch Markierung des MAK IgM 4E1 mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC konnte dieser in direkter Immunfluoreszenz erfolgreich dargestellt werden. Da der MAK IgM 4E1 nur gegen Hepatitis A-Virus gerichtet ist, konnte dabei auch dieses nachgewiesen werden. In den unten stehenden Abbildungen erscheinen die markierten MAK IgM 4E1 in einer Fibroblastenkultur als leuchtend grüne Punkte. Zur besseren Abgrenzbarkeit wurden die Zellkerne zusätzlich mit DAPI-Blau markiert (Abbildung 39, Abbildung 41, s. a. 2.2.12).

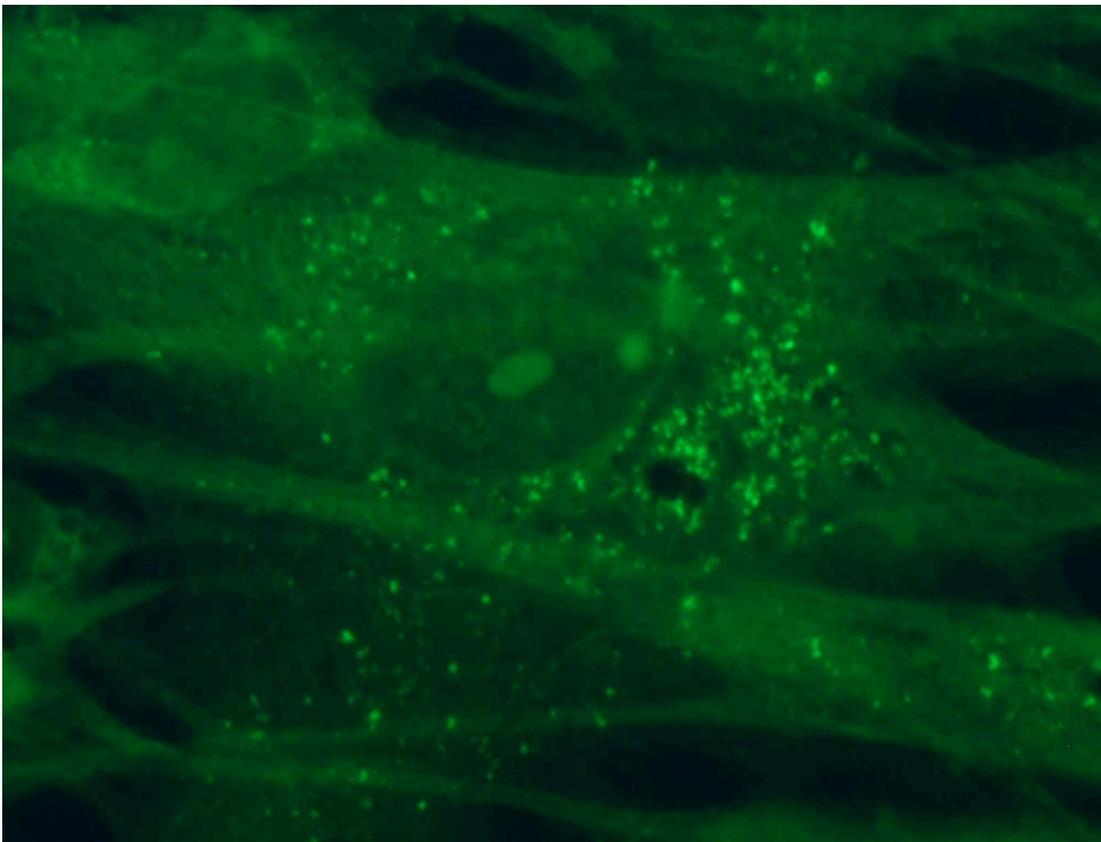


Abbildung 37: Darstellung von FITC-markierten MAK IgM 4E1 in einer Fibroblastenkultur (leuchtend grüne Punkte) in 1000facher Vergrößerung. Indirekter HAV-Nachweis durch Immunfluoreszenz.

3 Ergebnisse

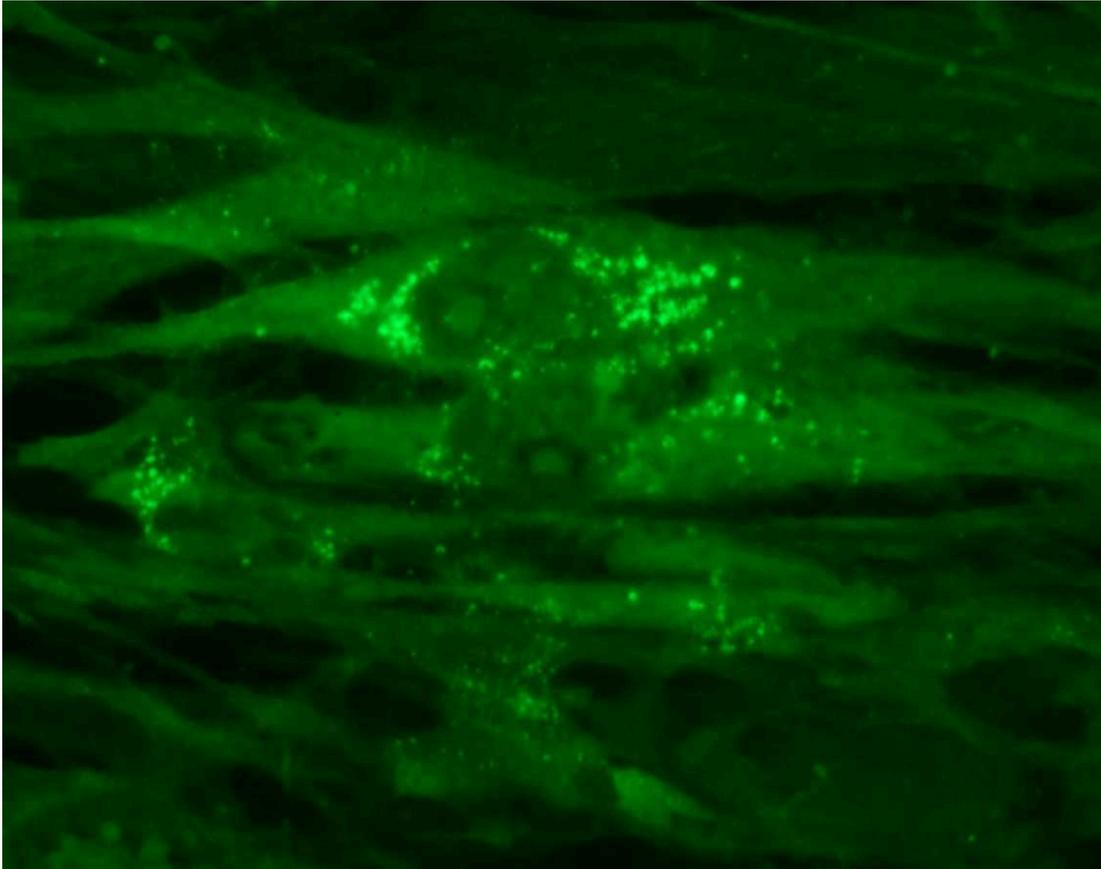


Abbildung 38: Darstellung von FITC-markierten MAK IgM 4E1 in einer Fibroblastenkultur (leuchtend grüne Punkte) in 1000facher Vergrößerung. Indirekter HAV-Nachweis durch Immunfluoreszenz.

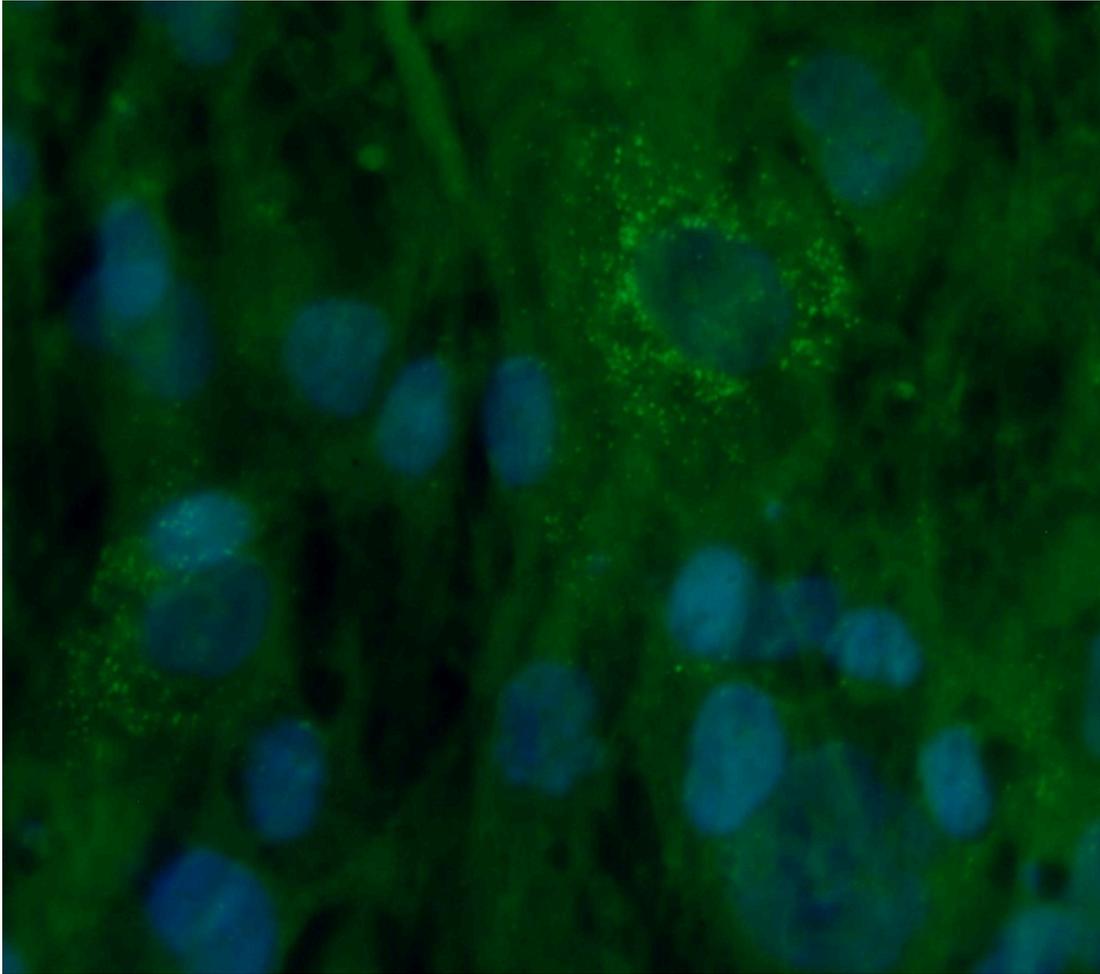


Abbildung 39: Darstellung von FITC-markierten MAK IgM 4E1 in einer Fibroblastenkultur (leuchtend grüne Punkte) und von DAPI-markierten Zellkernen (blaue Figuren) in 1000facher Vergrößerung. Indirekter HAV-Nachweis durch Immunfluoreszenz.

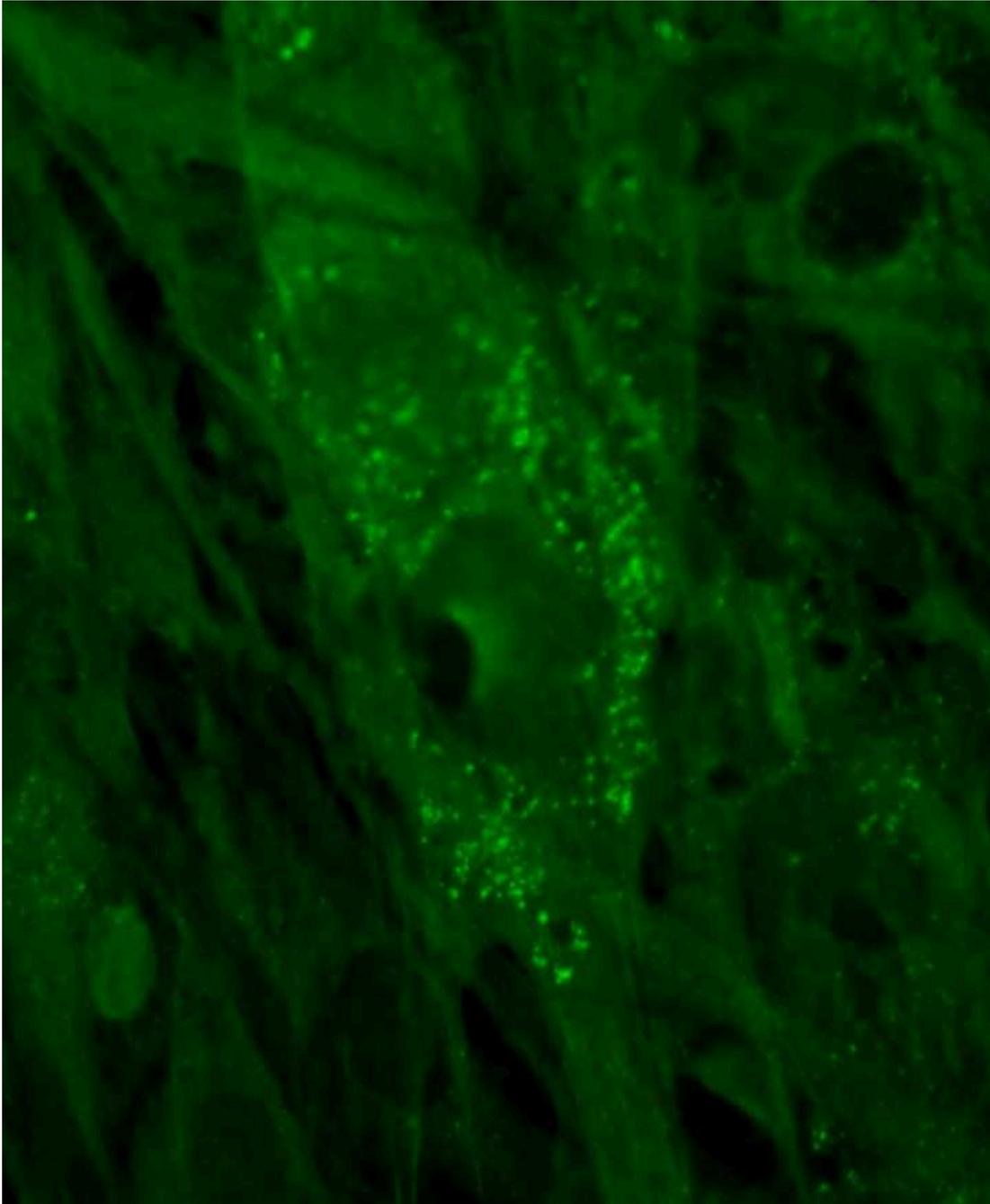


Abbildung 40: Darstellung von FITC-markierten MAK IgM 4E1 in einer Fibroblastenkultur (leuchtend grüne Punkte) in 1000facher Vergrößerung. Indirekter HAV-Nachweis durch Immunfluoreszenz.

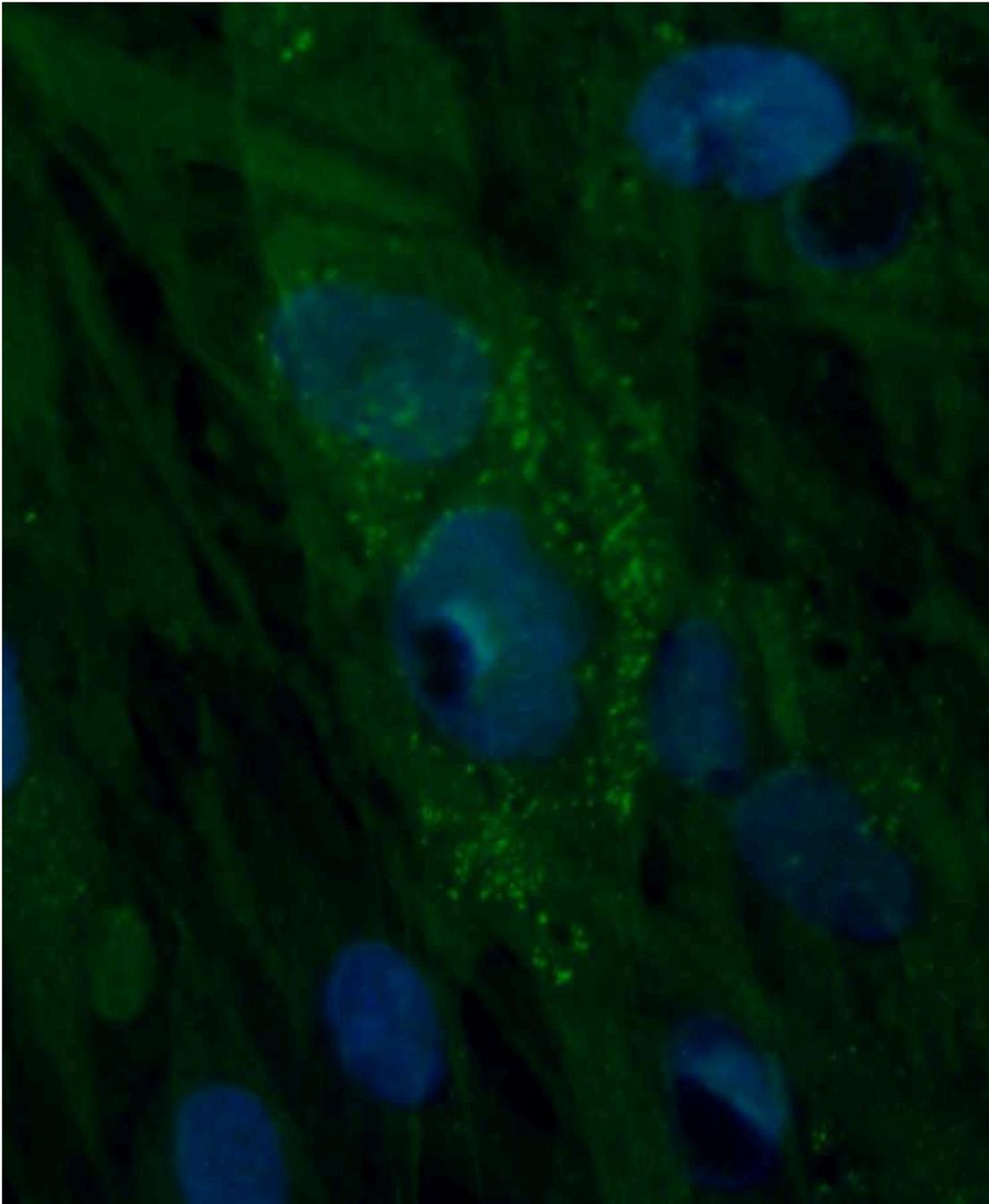


Abbildung 41: Darstellung von FITC-markierten MAK IgM 4E1 in einer Fibroblastenkultur (leuchtend grüne Punkte) und von DAPI-markierten Zellkernen (blaue Figuren) in 1000facher Vergrößerung. Indirekter HAV-Nachweis durch Immunfluoreszenz.

4 Diskussion

Die Infektionen durch das Hepatitis A-Virus ist ein bleibendes globales Problem. In weiten Teilen von Afrika, Süd-Ost-Asien, Süd- und Mittelamerika sind jährlich Millionen Menschen im Alter bis 20 Jahren betroffen. Durch die Diversität der Seroprävalenzraten zwischen Industrie- und Entwicklungsländern ergibt sich ebenso eine Infektionsgefahr für Populationen, die weder geimpft sind, noch durch eine abgelaufene Infektion eine Immunität erworben haben. Aus diesem Grund ist ein Ausbruch von HAV-Infektionen nach Einschleppung (z. B. durch Reisende in Endemiegebiete) eine bestehende Gefahr für ungeschützte Populationen (z. B. West-Europa, Australien und Nordamerika) (32). Nach Entdeckung und Identifikation des HAV durch Feinstone et al. Im Jahre 1973 (5) konnten Methoden zur Kulturanzucht und zur Charakterisierung als auch Impfstoffe und diagnostische Nachweistests entwickelt werden. Seit Jahren kommt dem Einsatz von monoklonalen Antikörpern in Labordiagnostik und klinischer Therapie eine außerordentliche Bedeutung zu. Auch die Entwicklung von Immunoassays wie etwa des ELISAs wäre ohne monoklonale Antikörper undenkbar. Während bei MAK-basierten diagnostischen Verfahren und so auch in der HAV-Diagnostik zumeist IgG-Antikörper untersucht und verwendet werden, wurde in dieser Arbeit der gegen Hepatitis A gerichtete, monoklonale Antikörper IgM 4E1 hinsichtlich seiner Eigenschaften im Reinigungsprozess und seiner Verwendbarkeit in einem IgM-basierten HAV-Antigen-ELISA untersucht.

4.1 Reinigung des MAK IgM 4E1

Um den MAK IgM 4E1 nach seiner Produktion im Hybridoma-Expressmedium-Zellkulturüberstand für seine weitere Verwendung aufzubereiten, musste dieser zunächst von Kontaminationen gereinigt werden. Die Reinigung von IgM-AK stellt auch heute noch eine Herausforderung dar. Dies liegt auch in ihrer im Vergleich zu IgG-AK geringeren Spezifität, dennoch aber hohen Avidität begründet. (112, 113,

114). Die Spezifität steht in diesem Zusammenhang für die spezifische Bindung eines bestimmten Antigens, die Avidität hingegen für die Fähigkeit, ein Antigen binden zu können. Das Bindungsverhalten eines IgM-AK ist damit im Vergleich zu anderen AK demnach schwerer zu antizipieren und zu beeinflussen. Weiterhin bilden sowohl die Komplexität des IgM-Moleküls hinsichtlich seiner Struktur, seine Größe als auch die im Vergleich zu anderen AK geringere Stabilität von IgM-AK weitere Herausforderungen (114, 115, 116). In den vergangenen Jahren wurden viele verschiedene Methoden speziell für die Reinigung von IgM-AK entwickelt. Bis heute hat sich keine Methode alleinig durchsetzen können, sodass eine Menge von Alternativen zu diesem Zweck zur Verfügung stehen (117). Daher verwundert es nicht, dass Mahassni et al. 2009 zu dem Schluss kamen, dass es aufgrund des einzigartigen Verhaltens eines IgM-Antikörpers notwendig ist, die angewandten Reinigungsmethoden für jeden IgM-Antikörper individuell genau anzupassen und zu modifizieren, um gute Ergebnisse erzielen zu können (118). Einen Ansatz zur Separation und Reinigung bildet die Präzipitation von IgM-AK, beispielsweise mittels PEG (119, 120, 65), Ammoniumsulfat (121), Ultrazentrifugation (112) oder durch isoelektrisches Fokussieren (122) mit oder ohne ergänzende Schritte. Einen selektiveren Ansatz bilden die chromatographischen Methoden wie beispielsweise die Ionen-Austausch-Chromatographie (115, 118, 64, 123, 124), die Hydroxyapatit-Chromatographie (125, 126, 127), die Größenausschluss-Chromatographie (128, 129, 112), die Monolithische Ionenaustausch-Chromatographie (116) und die Thiophile Adsorptions-Chromatographie (130, 131, 72, 132, 133, 134) mit oder ohne ergänzende Schritte. Speziell für die Reinigung von IgM-Antikörpern sind vorrangig Methoden geeignet, die den Erhalt eines möglichst neutralen pH erlauben und den Einsatz von hydrophoben Oberflächen vermeiden. Beides führt entweder zur ungewollten Präzipitation oder zur Denaturierung von IgM-Antikörpern (116). Da die IgM-Antikörper aber eine hohe Elektrolytkonzentration gut tolerieren und durch ihre Größe ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal zu den meisten anderen Proteinen aufweisen, erscheinen die Methoden der SEC und TAC

neben Hydroxyapatit-, Kationen-Austausch-Chromatographie und Monolithischer Ionenaustausch-Chromatographie besonders geeignet.

In dieser Arbeit wurden zur Reinigung des MAK IgM 4E1, hergestellt im Hybridoma-Expressmedium, als vorbereitende Anreicherungs- und Reinigungsschritte die Ultrazentrifugation und PEG 6000-Präzipitation verwendet, sowie als chromatographische Reinigungsmethoden die Größenausschluss-Chromatographie mittels Sephacryl S-1000 (s. Material) sowie die Thiophile Adsorptions-Chromatographie mittels HiTrap IgM Purification Column HP (s. Material).

4.1.1 Zentrifugal-Filtration und PEG 6000 - Präzipitation

Ein vorbereitender Arbeitsschritt zur Anreicherung und Reinigung des Ausgangsmaterials ist seit Jahrzehnten eine anerkannte Methode in dem Prozess zur Reinigung von IgM-Antikörpern aus verschiedenen Medien. Induziert wurden dabei Fällungsreaktionen durch Zugabe z. B. von Ammoniumsulfat (112, 119), Euglobulin (135, 119), Zinksulfat (136) und PEG 6000 (65, 119) entweder alleinig oder in Kombination mit Zentrifugalfiltration (112). Bei der Reinigung von IgM-MAK aus Zellkulturüberständen wurden bisher vorwiegend PEG 6000 und Ammoniumsulfat verwendet. Novales-Li stellte 1995 eine Methode zur Reinigung von monoklonalen IgM-Antikörpern vor, die im Zellkulturüberstand produziert worden waren. Diese Methode bestand aus initialer Ammoniumsulfat-Präzipitation mit anschließender SEC. Hierbei konnte durch anschließende Versuche sowohl ein hoher Reinheitsgrad, als auch erhaltene immunologische Funktionsfähigkeit der gereinigten IgM-Antikörper nachgewiesen werden (112). Um eine Beeinträchtigung der strukturellen Integrität und / oder der Funktionalität zu vermeiden, wurde in der vorliegenden Arbeit in diesem Ansatz auf einen Präzipitationsschritt verzichtet und ausschließlich die Zentrifugalfiltration zur Verdichtung und Reinigung des IgM 4E1-Zellkulturüberstandes eingesetzt. Um auch bei der Zentrifugation das Risiko einer mechanischen Schädigung der IgM 4E1-Antikörper zu minimieren, wurde verglichen mit anderen Arbeiten niedriger Umdrehungszahl zentrifugiert (3500 rpm \equiv 616,67 g). Um

den Reinigungseffekt dieser Methode zu erhöhen, wurde das Ausgangsmaterial doppelt filtriert. Zunächst in einem Zentrifugenröhrchen mit einer Membranporengröße von 100 kDa, anschließend mit einer Membranporengröße von 10 kDa. Der oberhalb der Membran verbliebene Überstand wurde abgegriffen als gereinigtes Konzentrat gesammelt. Hiernach erfolgte eine Proteinbestimmung durch den BCA Protein Assay und die Darstellung des Reinheitsgrades durch SDS-PAGE (s. 2.2.2). Es zeigte sich, dass durch die Filtration ein partieller, wenn auch nicht der gewünschte Reinigungseffekt erzielt werden konnte (s. 3.2.1). Daher entstand der Entschluss, diesen Reinigungsschritt mit der TAC zu kombinieren. Die Überprüfung des Reinheitsgrades durch BCA Protein Assay und SDS-PAGE erbrachte eine weitere partielle Aufreinigung, die wiederum nicht dem gewünschten Ergebnis entsprach. Auch nach Versuch zur Anpassung des Gehaltes an Ammoniumsulfat im Puffer und der aufgegebenen Menge wie auch der Flussgeschwindigkeit blieb das Ergebnis gleich (s. 3.2.3.1). Als mögliche Gründe sind folgende Annahmen denkbar: Durch Zentrifugation unter Verwendung der Membranporengrößen von 10 bzw. 100 kDa können zwar diejenigen Moleküle, die kleiner sind als der MAK IgM 4E1 (ca. 960 kDa) herausgefiltert werden, nicht aber solche, die eine ähnliche Größe aufweisen, wie etwa das α -2-Makroglobulin (720 kDa). In der anschließenden Reinigung des durch die Zentrifugalfiltration konzentrierten Materials durch die TAC ist weiterhin eine Überladung der Säule durch zu hohe Dichte von Antikörpern und verbliebenen Proteinen denkbar. Darüber hinaus ähnelt z. B. das α -2-Makroglobulin einem IgM-Antikörper nicht nur hinsichtlich seiner Größe, sondern auch in seiner Löslichkeit und seiner Ladungseigenschaften (136). Dass die Ladungseigenschaften des α -2-Makroglobulins und eines IgM-Antikörper nicht vollständig übereinstimmen können, zeigen andere Arbeiten (z. B. 65, 128, 137, 138), deren verschiedene Methoden im Ergebnis einen hohen Reinheitsgrad der monoklonalen IgM-Antikörper darlegen. Auch die vorliegende Arbeit zeigt, dass bei Vermeidung einer Überladung der HiTrap-Säule eine erfolgreiche

chromatographische Reinigung des MAK IgM 4E1 mittels TAC erreicht werden kann.

Mit ähnlichem Ergebnis wie Novales-Li 1995 (112) stellten Tschliessnig et al. 2009 (65) eine Methode zur Reinigung von monoklonalen IgM-Antikörpern produziert im Hybridomamedium vor. Diese bestand aus initialer PEG 6000-Präzipitation, Redilution und anschließender Anionenaustausch-Chromatographie. Auch hierbei konnten ein hoher Reinheitsgrad und erhaltene Funktionalität der gereinigten monoklonalen IgM-Antikörper erzielt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden 20% und 25% w/v-Lösungen von PEG 6000 mit destilliertem Wasser vorbereitet und zu gleichen Anteilen mit unbehandeltem Zellkulturüberstand gemischt. Nach 4 Stunden Inkubationszeit bei 4 °C wurden die Lösungen bei 5900 g zentrifugiert und die Präzipitate abgegriffen. Anschließend wurden diese in dem für die SEC oder TAC entsprechendem Puffer gelöst und die SEC oder TAC durchgeführt (s. 2.2.3). Bei Verwendung des unbehandelten (also unkonzentrierten) Zellkulturüberstandes zeigte sich, dass die Präzipitate, sofern vorhanden, in nicht ausreichender Größe vorlagen, sodass eine weitere Verwendung erschwert wurde. Die anschließend durchgeführten Untersuchungen zeigten keine zufriedenstellende Steigerung des Reinheitsgrades. Als möglicher Grund für die geringe Größe bzw. Menge der Präzipitate liegt nahe, dass die Konzentration an Proteinen, respektive an IgM-Antikörpern im unkonzentrierten Zellkulturüberstand zu gering ist, um eine Fällung herbeizuführen. Diese Annahme stützen auch die Untersuchungen von Shimada et al. 2008 (133), die in ihrer Arbeit die gleiche These für die Anwendung der Ammoniumsulfat-Präzipitation bei unbehandelten Zellkulturüberständen formulierten. Die Versuche zur Anwendung der PEG 6000-Präzipitation wurden nach Gewinnung dieser Erkenntnis zugunsten der Etablierung einer Reinigungsmethode ohne vorbereitenden Arbeitsschritt zur Präzipitation und Konzentration nicht weitergeführt.

4.1.2 Reinigung mittels Größenausschluss-Chromatographie (SEC) unter Verwendung von Sephacryl S-1000

Nach der Erstbeschreibung der Methode der Größenausschluss-Chromatographie (SEC) durch Lathe und Ruthven 1955 (74) wurde sie seitdem zur Reinigung von verschiedenen Proteinen und Proteinkomplexen eingesetzt. Neben beispielsweise Viren (139, 140) und Plasmiden (141) sind auch (monoklonale) Antikörper Untersuchungsgegenstand zahlreicher erfolgreicher Reinigungsmethoden (142, 143, 144, 145, 146), darunter auch IgM-Antikörper (118, 119, 129, 116, 147, 148). Diesen Arbeiten folgend sollte eine Methode zur Reinigung des MAK IgM 4E1 aus dem Zellkulturüberstand etabliert werden. Hierzu wurde zunächst unkonzentrierter Zellkulturüberstand in Verdünnung von 1:1 mit PBS in der SEC verwendet. Als SEC-Matrix wurde Sephacryl S-1000 in einer Chromatographie-Säule mit einem Volumen von ~14 ml verwendet (s. Material). Danach folgte der Einsatz von unverdünntem Zellkulturüberstand. Nach Proteinbestimmung durch BCA und IgM-Nachweis durch Dot-Blot-Assay, wurde der Reinheitsgrad der Fraktionen durch SDS-PAGE beurteilt (s. 2.2.5). Sowohl bei Verwendung des verdünnten, als auch des unverdünnten Zellkulturüberstandes konnte eine zufriedenstellende Aufreinigung erzielt werden (s. 3.2.4.2). Bei Verwendung von dem durch Zentrifugalfiltration konzentriertem Ausgangsmaterial konnte jedoch auch nach mehreren Versuchen zur Anpassung von Flussgeschwindigkeit und Menge der aufgegebenen Probe keine ausreichende Reinigung erzielt werden. Ebenso gelang es auch bei Verwendung des verdünnten und unbehandelten Zellkulturüberstandes nicht, die Flussraten mit vergleichbaren Ergebnissen zu steigern. Wie auch Coppola et al. 1989 (119) sowie Lee et al. 2009 (129) berichteten, so waren auch bei SEC in der vorliegenden Arbeit niedrige Flussraten von 1 - 2 ml/min notwendig, um die gewünschte Reinigung erreichen zu können. Ein denkbarer Grund ist die Zerstörung der strukturellen Integrität der IgM-Antikörper durch Erhöhung des hydrostatischen Druckes in der Matrix der SEC-Chromatographie-Säule, die durch zu hohe Flussraten entsteht. Hierfür spricht, dass bei deutlicher Erhöhung der Flussrate, insbesondere bei

Aufbringen des Probenmaterials im Dot-Blot-Assay eine Streuung über nahezu alle Elutionsfraktionen zu beobachten war. Damit bleibt diese Methode zwar generell erfolgreich für die Aufreinigung von MAK IgM 4E1 aus Hybridoma-Zellkulturüberstand, aber auch zeitaufwändig (Dauer bei Verwendung von 2 CV = 24 ml Probenmaterial: 114 Minuten). Wie in der Arbeit von Gagnon et al 2008 (116) und Gautam und Loh 2011 (15) beschrieben, so zeigen auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die SEC in dieser Form für die Verarbeitung von größeren Mengen an Ausgangsmaterial aufgrund des hohen Zeitaufkommens nur bedingt geeignet ist.

4.1.3 Reinigung mittels Thiophiler Adsorptions-Chromatographie (TAC) unter Verwendung von HiTrap® IgM Purification HP Column

Seit der Erstbeschreibung dieser Methode durch Porath et al. 1985 (68) wurde die TAC zur Reinigung verschiedener Proteine verwendet, insbesondere für Immunglobuline. Die Methode konnte bereits u. A. zur Reinigung von IgG-Antikörpern (149, 150, 70), IgG-Fragmenten (151, 152), IgA- (153) und IgM-Antikörpern (154, 130, 132, 72) aus verschiedenen Medien eingesetzt werden, wie auch zur Reinigung von anderen Proteinen wie etwa PSA (155) und bakteriellen Antigenen (156). Die TAC beruht auf der Affinität eines in der Matrix immobilisierten, schwefelhaltigen Liganden, der in einer Umgebung mit hoher Konzentration an lyotropen Salzen mit schwefelhaltigen Elementen von Proteinen in Wechselwirkung tritt und eine reversible Bindung erzeugt. Die Elution beruht auf der Senkung der Konzentration dieser Salze (z. B. Ammoniumsulfat, Kalium- oder Natriumsulfat). (157). Dies geschieht unter milden pH-Bedingungen, weshalb sich diese Methode zur Reinigung von IgM-Antikörpern eignet. Der genaue Reaktionsmechanismus ist jedoch bisher unbekannt (158). Dies ist offensichtlich ein Grund dafür, dass Untersuchungen zur TAC zumeist mit der Entwicklung einer neuen Kombination aus einem bestimmten Liganden

und einer Matrix und deren Verwendung befasst sind (z. B. Knudsen KL 1992 [150]).

Hutchens et al. etablierten 1990 eine Methode zur Selektion von Immunglobulinen (IgA, IgG und IgM) aus der Muttermilch von Schweinen durch die Verwendung der TAC (130). Hinsichtlich der Trennung zwischen Immunglobulinen und anderen Proteinen erzielte diese Methode ein gutes Ergebnis durch einen hohen Reinheitsgrad und erhaltene Funktionalität der Antikörper. Jedoch zeigt dieses Ergebnis auch, dass die alleinige Verwendung der TAC nicht zur vollständigen Reinigung eines einzelnen Antikörpertypen aus einem Medium geeignet ist, in dem verschiedene Typen von Antikörpern vorliegen, da alle Antikörper aus dem Ausgangsmaterial an die Liganden in der Matrix binden können. Der gesuchte Antikörpertyp läge im Eluat zwar gereinigt von Proteinen der Muttermilch vor, aber trotzdem zusammen mit den anderen Antikörpertypen in Lösung. Um einen bestimmten Antikörpertypen zu isolieren, wären weitere Schritte notwendig. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit der Verwendung von Ausgangsmaterialien, die einen möglichst geringen Kontaminationsgrad aufweisen, sofern die Isolierung eines einzelnen Antikörpertypen angestrebt wird. Aus diesem Grund erschien die Verwendung von Hybridoma-Zellkulturüberständen in der vorliegenden Arbeit sinnvoll, um ein gereinigtes Konzentrat herzustellen, welches ausschließlich IgM-Antikörper enthält. Dennoch ist die TAC wie auch die SEC (s. 4.1.2) durch Kontaminanten, die ähnliche Eigenschaften wie der gesuchte Antikörper aufweisen, limitiert. So kann z. B. das Alpha-2-Makroglobulin oder andere Antikörper auch bei dieser Methode nicht ausgeschlossen werden (15, 136, 159), was wiederum dafür spricht, bei Isolation und Reinigung eines einzelnen Moleküls möglichst Medien mit geringer Kontamination zu verwenden. Daher erscheint die Verwendung von serumfreien Medien wie etwa Zellkulturüberstände aus Hybridoma-Kulturen sinnvoll, da diese im Gegensatz zu Serum und Aszites eine geringere Konzentration an Kontaminanten aufweisen. Die Limitierung dieser Methode zur Reinigung von Immunglobulinen ergibt sich auch aus dem Umstand, dass der Reaktionsmechanismus nicht vollständig verstanden

ist. Weitere Untersuchungen hierzu könnten dazu beitragen, dieses Problem zu überwinden. Rapoport et al. (154) gelang 1995 die Isolation und Reinigung von IgG- und IgM-Antikörpern aus Aszites mit Hilfe der TAC, allerdings wurde für die Reinigung von IgM-Antikörpern ein zweiter Schritt der Gelfiltration notwendig, um einen hohen Reinheitsgrad zu erreichen.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Verfahren zur effektiven Reinigung und Konzentration des MAK IgM 4E1 etabliert werden, die aus einer chromatographischen Methode besteht und bei dem keine vorbereitenden Schritte zur Anreicherung notwendig sind. Es besteht aus insgesamt sieben Einzelschritten mit einem Zeitaufwand von 66 bis 71 Minuten bei Verwendung von 5 bis 10 ml Probenmaterial. Die Methode wurde auf eine möglichst effiziente Reinigung des unbehandelten Ausgangsmaterials ausgelegt, was einen höheren Zeitaufwand, aber auch eine höhere Ausbeute und einen höheren Reinheitsgrad erbringt. Im Hinblick auf die Herstellerangaben sind zwei Schritte ergänzt worden. Sie folgen nach den Schritten 1 bis 3 (1: Equilibrieren, 2: Aufgeben des Probenmaterials, 3: Auswaschen des ungebundenen Materials) und bestehen aus dem Aufbringen der aufgefangenen Waschlösung aus Schritt 3 mit einem anschließenden weiteren Auswaschen, um die Ausbeute an gereinigten IgM-Antikörpern zu verbessern (s. 2.2.4). Durch dieses, wenn auch zeitaufwändige, Verfahren konnte ein hoher Reinheitsgrad der MAK IgM 4E1 und eine Konzentration des Ausgangsmaterials erreicht werden (s. 3.2.3.3).

4.2 Vergleich der Methoden zur Proteinbestimmung: BCA und Bradford Protein Assay

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl der BCA Protein Assay als auch der Bradford Protein Assay zur Quantifizierung der Proteinmenge verwendet. Beide Methoden wurden seit ihrer Entdeckung bisher in vielen Arbeiten zur Proteinquantifizierung eingesetzt. Während der BCA Protein Assay auf der Reduktion von Kupfer-Ionen und auf der anschließenden Reaktion derer mit BCA beruht, basiert der Bradford Protein Assay durch die Stabilisation des

CBB G250-Moleküls in seiner anionischen Form durch Bindung an bestimmte Aminosäuren eines Proteins. In beiden Verfahren wird die durch die photometrische Messung der Extinktion auf die Proteinkonzentration anhand einer Standardgerade zurückgeschlossen. Im jeweiligen Standardprotokoll besitzt der BCA Protein Assay einen größeren Messbereich (20-2000 µg/ml nach Herstellerangaben der Fa. Fisher Thermo Scientific, Rockford, Illinois / USA) als der Bradford Protein Assay (100-1400 µg/ml nach Herstellerangaben der Fa. Sigma-Aldrich GmbH, München, s. a.155). Als interferierende Substanzen wurden beim BCA Protein Assay reduzierende Stoffe (z. B. β-Mercaptoethanol, reduzierende Zucker, Sucrose und Dithiothreitol) als auch Chelbildner (z. B. EDTA) angegeben (162, 163, 164). Für den Bradford Protein Assay hingegen werden Detergenzien, Flavonoide, basische Proteinpuffer sowie bioreaktive Substanzen wie etwa Enzyme als obligate Störfaktoren angegeben (89, 165). In dieser Arbeit wurden im unbehandelten Zellkulturüberstand, im konzentrierten Zellkulturüberstand und in den Fraktionen der SEC und TAC Proteinkonzentrationen ermittelt. Keine der oben aufgeführten interferierenden Substanzen befanden sich in den untersuchten Proben. Einzig das in der TAC verwendete Ammoniumsulfat bildet ab einer Konzentration von 1M bei beiden Verfahren ein Risiko zur Beeinflussung der Ergebnisse. Da in den in 3.3 verglichenen Fraktionen der TAC aber lediglich eine Ammoniumsulfat-Konzentration von 0,8M vorlag, ist es unwahrscheinlich, dass dies einen Störfaktor darstellte.

Bei Vergleich der Konzentrationswerte in Tabelle 8, Tabelle 9, Tabelle 10 und Tabelle 11 fällt auf, dass vom Bradford Protein Assay ermittelten Werte größtenteils zwar proportional mit den Werten des BCA Protein Assay übereinstimmen, aber bei beinahe allen analysierten Proben eine deutlich geringere Proteinkonzentration ermittelt wurde. Bei Vergleich von Tabelle 10 und Tabelle 11 fällt daneben auch auf, dass in vielen Hauptfraktionen und auch im Ausgangsmaterial überhaupt keine Proteinkonzentration ermittelt wurde. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die Sensitivität des Bradford Protein Assay deutlich niedriger ist, als die des BCA Protein Assay.

Zu diesem Schluss gelangt auch Krohn 2011 (160). Noble et al. kommen beim Vergleich verschiedener Proteinbestimmungsmethoden unter anderem zu dem Ergebnis, dass der BCA Protein Assay im Vergleich zum Bradford Protein Assay eine höhere Konstanz der Messwerte bei Messungen verschiedener Proteine in gleicher Konzentration aufweist. Ebenso sei der BCA Protein Assay eher geeignet als der Bradford Protein Assay, wenn die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von Interesse ist (161). Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen die Erkenntnisse von Krohn und Noble et al. Es zeigte sich im direkten Vergleich mehrerer verschiedener Proben, dass der BCA Protein Assay dem Bradford Assay hinsichtlich seiner Sensitivität und Anwendbarkeit im Rahmen dieser Arbeit überlegen ist.

4.3 Vergleich des IgM 4E1-HAV-Antigen-ELISA mit dem IgG 7E7-HAV-Antigen-ELISA

Seit der Entwicklung des ELISA-Prinzips Anfang der 70er Jahre wurde die Methode zum Nachweis verschiedener Antigene in der Labordiagnostik etabliert. Auch wurden viele verschiedene Modifikationen dieses Prinzips entwickelt, wie etwa der Kompetitive ELISA, der Sandwich-ELISA und der indirekte ELISA. Der IgM 4E1- und der IgG 7E7-HAV-Antigen-ELISA zählen beide zu dem Typ der Sandwich-ELISAs. Dabei werden sogenannte „capture antibodies“, also Primärantikörper, auf den Boden eines Nöpfchens in einer 96-well-Mikrotiterplatte gebunden. Diese sind üblicherweise vom IgG-Isotyp. In dieser Arbeit wurden im IgM 4E1-HAV-Antigen-ELISA als „capture antibodies“ bzw. Primärantikörper IgM-Isotypen verwendet. Insgesamt konnten 20 Datensätze des IgM 4E1- und 24 Datensätze des IgG 7E7-HAV-Antigen-ELISAs ausgewertet und verglichen werden. Aus der Korrelation der Ergebnisse ergaben sich folgende Beobachtungen:

1. Die Mittelwerte der Extinktions- und daraus berechneten Titerwerte unterscheiden sich nur geringfügig (s. Tabelle 16 und Abbildung 36).
2. Der Verlauf der absoluten Titerwerte ist in den Ergebnissen des IgG 7E7-HAV-Antigen-ELISAs deutlich konstanter, als der im IgM 4E1-HAV-Antigen-ELISA (s. Abbildung 33, Abbildung 34 und Abbildung 35).
3. Die ermittelten Titerwerte im IgM 4E1-HAV-Antigen-ELISA weisen sowohl ein größeres Maximum, als auch ein kleineres Minimum verglichen mit dem IgG 7E-HAV-Antigen-ELISA auf.

Im Hinblick auf das Maximum der Titerwerte konnte der IgM 4E1-ELISA mehrfach einen höheren Wert ermitteln als der IgG 7E7-ELISA. Aufgrund der strukturellen Eigenschaften des IgM-MAKs als Pentamer mit zehn anstatt von zwei Fab-Regionen kann vermutet werden, dass der IgM 4E1 als Primärantikörper größere Mengen an HAV bei gleicher Primärantikörper-Konzentration binden kann. Betrachtet man die gemittelten Titerwerte, so fällt auf, dass sie in beiden ELISAs nur marginal unterschiedlich ausfielen. Jedoch sind die Werte bei Verwendung des IgG 7E7 als Primärantikörper durch die höhere Konstanz erkennbar an geringerer Streuung um den Mittelwert gekennzeichnet. Trotzdem nähern sich die Werte der absoluten Spannweiten der Extinktionsmittelwerte mit steigendem Verdünnungsgrad aneinander an. Dies könnte einer höheren Avidität des IgM 4E1 verglichen mit dem IgG 7E7 begründet liegen. Der IgG 7E7 liefert also in der Verwendung als Primärantikörper in einem Sandwich-ELISA bisher Ergebnisse mit höherer Reproduktivität. Das Potential des IgM 4E1 liegt in der Annahme, in einem ELISA zum einen größere Mengen Antigen binden zu können als ein IgG-Antikörper, und zum zweiten diese Mengen durch höhere Avidität sensitiver zu binden. Ebenso zeigten Ping und Lemon in ihrer Arbeit von 1992 (24), dass der MAK IgM 4E1 in der Lage ist, auch bei den 22 untersuchten Escape-Mutanten eines HAV neutralisierende Aktivität zu entfalten, während der MAK IgG 7E7 sowie alle anderen untersuchten MAK dazu nicht in der Lage waren. Also kann der MAK IgM 4E1 auch solche

Mutanten erkennen, binden und neutralisieren, die der MAK IgG 7E7 nicht erkennt. Ein solcher IgM 4E1-basierter HAV-Antigen-ELISA könnte in der Hepatitis A-Diagnostik zu Frühdiagnostik eingesetzt werden, um kleinere Mengen des Virus und auch die ebenda beschriebenen Escape-Mutanten nachweisen zu können.

Während IgM-Antikörper in IgM-Nachweis-Tests wie etwa der IgM capture ELISA vielfach zur Frühdiagnostik von Infektionserkrankungen genutzt werden (z. B. Syphilis [166], Dengue-Fieber [167], Ebola [168], Malaria [169] und West-Nil-Fieber [170]) ist die Verwendung von IgM-Antikörpern als Primärantikörper in einem ELISA ist bisher nur Gegenstand weniger Arbeiten. Abebe et al. (171) verwendeten 2006 zwei monoklonale, gegen *Alternaria alternata* gerichtete IgM-Antikörper als Primärantikörper in einem Sandwich-ELISA. *Alternaria alternata* als Antigen konnte der Induktion von IgE-vermitteltem Asthma zugeordnet werden (172) und spielt damit eine Rolle in der Diagnostik von Erkrankungen dieses Formenkreises. Nur einer der beiden MAK gegen *Alternaria alternata* konnte dabei das rekombinante, aber nicht das native Antigen in einem Sandwich-ELISA detektieren. Auch ein MAK vom IgG-Isotyp wurde in einem Sandwich-ELISA gegen dieses Antigen verwendet und erbrachte in Kombination mit den verwendeten monoklonalen IgM-Antikörpern kein positives Ergebnis. Die Produktion der gegen *Alternaria alternata* gerichteten monoklonalen IgM- und IgG-Antikörper erfolgte in Komponentem-freien Medium, die Reinigung derer geschah unter Anwendung einer Präzipitation mittels Ammoniumsulfat im Eisbad mit anschließender Zentrifugation und Redilution in PBS. Ein möglicher Grund für die ungenügende Detektion der nativen Variante von *Alternaria alternata* könnte eine Beeinträchtigung der Funktionalität v. A. des monoklonalen IgM-Antikörpers durch den Präzipitationsvorgang sein. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl SEC als auch TAC eingesetzt, um einen Präzipitationsschritt zu vermeiden, um damit eine möglichst optimale Funktionalität des MAK IgM 4E1 zu erhalten. Sowohl der MAK IgG 7E7 als auch der MAK IgM 4E1 als Primärantikörper in einem Sandwich-ELISA erfolgreich eingesetzt werden. Die Abbildungen 37 bis 41 zeigen sehr schön, dass der MAK 4E1 gut

geeignet ist, das Hepatitis A-Antigen in der Immunfluoreszenz darzustellen. Die perinukleär hellgrün erscheinenden Punkte sind typisch für die Ansammlung von neu gebildetem Hepatitis A-Antigen in den menschlichen Fibroblasten-Zellen. Die Möglichkeiten zur Anwendbarkeit des MAK IgM 4E1 in der Hepatitis A-Diagnostik könnten Gegenstand zukünftiger Forschungsarbeiten sein.

5 Zusammenfassung

Die hohe Kontagiosität und jährlich Millionen Fälle von Neuerkrankungen von Hepatitis A durch Infektionen mit HAV demonstrieren auch nach der Entwicklung eines gut wirksamen Impfstoffes Ende der 1980er Jahre die gesundheitsökonomische Relevanz dieser Infektionskrankheit. Besonders die Diskrepanz der Immunität zwischen Bewohnern von Endemiegebieten, wie etwa in Subsahara-Afrika, und der Bevölkerung in Industrieländern birgt eine Gefahr epidemischer Ausbrüche in ungeschützten Populationen, wie etwa durch Einschleppung der Viren durch Reisende. Besonders zur differentialdiagnostischen Abgrenzung zu anderen Hepatitiden, wie zu Infektionen durch HBV und HCV, kommt der Diagnostik von Hepatitis A eine hohe Bedeutung zu. Das Ziel dieser Arbeit richtete sich auf die Charakterisierung des monoklonalen gegen HAV gerichteten Antikörpers IgM 4E1 in der Labordiagnostik.

In dieser Arbeit wurden zwei Methoden entwickelt, um den im Hybridoma-Expressmedium produzierten monoklonalen Antikörper (MAK) IgM 4E1 hoch zu reinigen. Dies gelang mit Hilfe der Größenausschluss-Chromatographie (SEC) und der Thiophilen Adsorptions-Chromatographie (TAC). Sowohl mit SEC als auch mit TAC konnte ein Verfahren zur systematischen Aufreinigung des Zellkulturüberstandes mit hohem Reinheitsgrad und erhaltener Funktionalität des MAK etabliert werden. Der Reinheitsgrad wurde mit Hilfe von SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung sowie Bestimmung der Proteinkonzentration durch BCA- und Bradford Protein Assay bestimmt.

Bei Vergleich der beiden Methoden zur Bestimmung der Proteinkonzentration sowohl im konzentrierten und unbehandelten Zellkulturüberstand als auch in der SEC und TAC zeigte sich, dass der BCA Protein Assay dem Bradford Protein Assay aufgrund eines größeren Arbeitsbereiches, höherer Sensitivität und besserer Reproduzierbarkeit überlegen ist.

Die Verwendbarkeit des MAK IgM 4E1 in der Hepatitis A-Diagnostik wurde durch die Herstellung eines IgM-basierten HAV-Antigen-Sandwich-ELISA

charakterisiert, in dem der MAK IgM 4E1 als Primärantikörper verwendet wurde. So konnte auch der Erhalt der Funktionalität des Antikörpers nach der Reinigung nachgewiesen werden. Der MAK IgM 4E1-basierte HAV-Antigen-Sandwich-ELISA wurde mit dem MAK IgG 7E7-basierten ELISA verglichen. Die Fragestellung bei diesem Vergleich richtete sich nach dem Bindungsverhalten des IgM 4E1 in seiner Verwendung als Primärantikörper. Dabei sollte untersucht werden, ob der IgM 4E1 als Pentamer-Antikörper mit höherer Avidität im Vergleich zum IgG 7E7 als Monomer-Antikörper in der Lage sei, eine größere Menge Antigen binden zu können. Insgesamt wurden 44 Testansätze der beiden unterschiedlichen Sandwich-ELISAs zur Bestimmung des Titers in einer HAV-Zellverdünnung mit bekannter Konzentration eingesetzt und die Ergebnisse verglichen. Dabei zeigte sich, dass der IgM 4E1-basierte ELISA in der Lage war, höhere Titerwerte zu bestimmen, was für die Annahme der höheren Bindungsfähigkeit spricht. Der über die Versuche bestimmte, gemittelte Titerwert der beiden ELISAs unterschied sich allerdings nur marginal, jedoch wies der IgM 4E1-basierte ELISA größere Schwankungen in der Bestimmung des Titerwertes auf, als der IgG 7E7-basierte ELISA, weshalb die Verwendung des MAK IgM 4E1 keine Vorteile gegenüber der Verwendung des MAK IgG 7E7 erbringt.

Darüber hinaus wurde der MAK IgM 4E1 mittels der auf FITC-Markierung basierender Immunfluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop erfolgreich dargestellt.

6 Literaturverzeichnis

1. Altschule MD and Gilligan DR (1944) Chronic Latent Hepatitis Following Catarrhal Jaundice. *N Engl J Med* 231: 315-317.
2. Cockayne EA (1912) Catarrhal jaundice, sporadic and epidemic, and its relation to acute yellow atrophy of the liver. *Q J Med* 6: 1-29
3. McDonald S (1908) Acute yellow atrophy of the liver. *Edin J Med* 1: 83-88
4. McCallum FO et al. (1944) Transmission of infective hepatitis to human volunteers. *Lancet* 244(6311): 228.
5. Gust ID and Feinstone SM (1988) Hepatitis A. Boca Raton / Florida / USA, CRC Press: 6-7.
6. Feinstone SM et al. (1973) Hepatitis A: Detection by Immune Electron Microscopy of a Viruslike Antigen Associated with Acute Illness. *Science* 182(116): 1026-1028.
7. Provost PJ and Hilleman MR (1979) Propagation of human Hepatitis A virus in cell culture in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med* 160: 213-221.
8. Flehmig B (1980) Hepatitis A-Virus in cell culture: I – Propagation of different hepatitis A-virus isolates in a fetal rhesus monkey kidney cell line (Frhk-4). *Med Microbiol Immunol* 168(4): 239-248.
9. Flehmig B et al. (1987) Immunogenicity of a hepatitis A virus vaccine. *J Med Virol* 22(1): 7-16.
10. Lemon SM (1997) Type A viral hepatitis: epidemiology, diagnosis, and prevention. *Clin Chem* 43(8 Pt. 2): 1494-1499.
11. Cuthbert JA (2001) Hepatitis A: Old and New. *Clin Microbiol Rev* 14(1): 38-58.
12. Vallbracht A and Fleischer B (1992) Immune pathogenesis of hepatitis A. *Arch Virol Suppl* 4: 3-4.

13. White DO and Fenner FJ (1994) *Medical Virology*, 4th ed., London u. A., Academic Press: 400-405.
14. *Zum vorherigen Absatz:* Nainan OV et al. (2006) Diagnosis of Hepatitis A Virus Infection: a Molecular Approach. *Clin Microbiol Rev* 19(1): 63-79.
15. Gautam S and Loh K (2011) Immunoglobulin M purification – Challenges and perspectives. *Biotechnol Adv* 29: 840-849.
16. David K et al. (1996) Growth arrest of human neuroblastoma xenografts in nude rats by natural IgM from healthy humans. *Nat Med* 2:686-689.
17. Brandlein S et al. (2003) Cysteine-rich fibroblast growth factor receptor 1, a new marker for precancerous epithelial lesions defined by the human monoclonal antibody PAM-1. *Cancer Res* 63: 2052-2061.
18. Bieber MM et al. (2007) Effects of human monoclonal antibody 216 on B-progenitor acute lymphoblastic leukemia in vitro. *Pediatr Blood Cancer* 48: 380-386.
19. Vollmers HP et al. (1998) Adjuvant therapy of gastric adenocarcinoma with the apoptosis-inducing human monoclonal antibody SC-1: first clinical and histopathological results. *Oncol Rep* 5: 549-552.
20. Horneman DA et al. (2007) Surfactant-aided size-exclusion chromatography for the purification of immunoglobulin G. *J Chrom A* 1157: 237-245.
21. Jung JG et al. (2007) Identification, culture and characterization of germlike stem-cell like cells in chicken testes. *Biol Reprod* 76: 173-183.
22. Kaneko R et al. (2009) Immunohistochemical localization of the STRO-1 antigen in developing rat teeth by light microscopy and electron microscopy. *J Electron Microscop* 58: 363-373.

23. Takehara T et al. (2008) Rho-associated kinase inhibitor Y-27632 promotes survival of cynomolgus monkey embryonic stem cells. *Mol Hum Reprod* 14: 627-634.
24. Ping L and Lemon SM (1992) Antigenic Structure of Human Hepatitis A Virus Defines Analysis of Escape Mutants Selected against Murine Monoclonal Antibodies. *J Virol* 66(4): 2208-2216.
25. Ping et al. (1988) Identification of an immunodominant antigenic site involving the capsid protein VP3 of Hepatitis A virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 8281-8285.
26. Stapleton JT and Lemon SM (1987) Neutralization escape mutants define a dominant immunogenic neutralization site on Hepatitis A virus. *J Virol* 61: 491-498.
27. Normann A, Jung C, Vallbracht A and Flehmig B (2004) Time Course of Hepatitis A Viraemia and Viral Load in the Blood of Human Hepatitis A Patients. *J Med Virol* 72: 10-16.
28. Normann A et al. (1992) Detection of hepatitis A virus RNA in commercially available factor VIII preparations. *Lancet* 340: 1232-1233.
29. Oba IT et al. (2000) Detection of Hepatitis A Antibodies by ELISA Using Saliva as Clinical Samples. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 42(4): 197-200.
30. CDC-Report (2010) Viral Hepatitis Surveillance – United States, 2010. <http://www.cdc.gov/hepatitis/Statistics/2010Surveillance/PDFs/2010HepSurveillanceRpt.pdf> (12.06.2015).
31. RKI - Epidemiologisches Bulletin 44/2008, 379-381. http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2008/Ausgaben/44_08.pdf;jsessionid=3F241F079B2BA9953ACB728091B79552.2_cid298?_blob=publicationFile (12.06.2015).

32. Jacobsen KH and Mason G (2009) The global prevalence of hepatitis A virus infection and susceptibility: a systematic review. Genf, Schweiz; World Health Organization.
33. Jacobsen KH and Wiersma ST (2010) Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005. *Vaccine* 28(41): 6653-6657.
34. Payne L (2009) Hepatitis A in the European Union: Responding to Challenges Related to New Epidemiological Patterns. *Eurosurveillance* 14(3): 63-64.
35. Hutin JF et al. (1999) A multistate foodborne outbreak of Hepatitis A. *New Engl J Med* 340(8): 595-601.
36. Chironna M et al. (2004) Outbreak of infection with hepatitis A virus (HAV) associated with a foodhandler and confirmed by sequence analysis reveals a new HAV genotype IB variant. *J Clin Microbiol* 42(6): 2825-2828.
37. Wasley A et al. (2006) Hepatitis A in the Era of Vaccination. *Epidemiol Rev* 28: 101-111.
38. Onoue K et al. (1967) Structure of Human Immunoglobulin M II. *J Immunol* 100(2): 238-244.
39. Davies AC et al. (1988) On the structure of polymeric IgM. *Eur J Immunol* 18: 1001-1008.
40. Lüllmann-Rauch R (2006) *Histologie*. 2. Aufl. Stuttgart, Thieme: 286-287.
41. Kishimoto T et al. (1967) Structure of Human Immunoglobulin M III. *J Immunol* 100(5): 1032-1040.
42. Thomas L (2007) *Labor und Diagnose*. 7. Aufl. Frankfurt a. M: Th-Books.
43. Grönwall C et al. (2012) Protective roles of natural IgM antibodies. *Front Immunol* 3(1): 1-10.

44. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R (2008) Duale Reihe Biochemie, 2. Aufl. Stuttgart, Thieme, 706-707.
45. Murphy KP et al. (2008) in: Janeway's Immunobiology 7th ed, New York: Garland Science.
46. Köhler G and Milstein C (1975) Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature* 256: 495-497.
47. Kubiak J and Tarkowski A (1985) Electrofusion of Mouse Blastomers. *Exp Cell Res* 157(2): 561-566.
48. Kao KN and Michayluk M (1974) A Method for High-Frequency Intergeneric Fusion of Plant Protoplasts. *Planta* 115(4): 355-367.
49. Shirahata S, Katakura Y and Teruya K (1998) Cell Hybridization, Hybridomas, and Human Hybridomas, 111-145, in: Barnes D and Mather JP (ed.) *Methods in Cell Biology* Vol. 57, London: Academic Press.
50. Schachman HK (1957) Ultracentrifugation, Diffusion and Viscometry. *Meth Enzym* 4: 32-103.
51. Teller DC (1973) Characterization of Proteins by Sedimentation Equilibrium in the Analytical Ultracentrifuge. *Meth Enzym* 27: 346-441.
52. Eskeland T (1974) IgM Reassociation in Vitro: No Influence of J Chain on the Amount of Polymers. *Scand. J. Immunol.* 3: 757-768.
53. Eskeland T and Christensen TB (1975) IgM Molecules with and without J Chain in Serum and after Purification, studied by Ultracentrifugation, Electrophoresis, and Electron Microscopy. *Scand J Immunol* 4(3): 217-228.
54. Kuhn W (1934) Über die Gestalt fadenförmiger Moleküle in Lösungen (On the Shape of filamentary Molecules in Solutions). *Kolloid-Zeitschrift* 68(1): 2-15.
55. Flory PJ (1941) Thermodynamics in Polymer Solutions. *J Chem Phys* 10: 51-61.

56. Hall D and Minton AP (2003) Macromolecular Crowding: Qualitative and Semiquantitative Successes, Quantitative Challenges. *Biochim Biophys Acta* 1649: 127-139.
57. Mahadevan H and Hall CK (1990) Statistical-Mechanical Model of Protein Precipitation by Nonionic Polymer. *AIChE J* 36(10): 1517-1528.
58. Juckes IRM (1970) Fractination of Proteins and Viruses with Polyethylene Glycol. *Biochim Biophys Acta Prot Struct* 229(3): 535-546.
59. Hermans J (1982) Excluded-Volume Theory of Polymer-Protein Interactions Based on Polymer Chain Statistics. *J Chem Phys* 77(4): 2193-2203.
60. Knoll D and Hermans J (1983) Polymer-Protein Interactions. *J Biol Chem* 258(9): 5710-5715.
61. Chesebro B and Svehag SE (1968) Precipitation of Human Serum Proteins by Polyethylenglycol. *Clin Chim Acta* 20(3): 527-529.
62. Polson A et al (1964) The Fractination of Protein Mixtures by Linear Polymers of High Molecular Weight. *Biochim Biophys Acta Gen Subjects* 82(3): 463-475.
63. Atha DH and Ingham KC (1981) Mechanism of Precipitation of Proteins by Polyethylene Glycols. *J Biol Chem* 256(23): 12108-12117.
64. Neoh SH et al (1986) The Purification of Mouse Monoclonal Antibodies from Ascetic Fluids. *J Immunol Meth* 91(2): 231-235.
65. Tscheliessnig A et al (2009) Engineering of a Two-Step Purification Strategy for a Panel of Monoclonal Immunoglobulin M Directed Against Undifferentiated Human Embryonic Stem Cells. *J Chrom A* 1216(45): 7851-7864.

66. Cripps AW et al (1983) Isolation of human IgA and IgM from normal serum using polyethylene glycol precipitation and affinity chromatography. *J Immunol Meth* 57(1-3): 197-204.
67. Neoh SH et al (1984) A simple one-step procedure for preparation of C1-deficient human serum. *J Immunol Meth* 69(2): 277-280.
68. Porath J et al. (1985) Thiophilic Adsorption – A New Method for Protein Fractination. *FEBS Lett* 185: 306-310.
69. Hutchens TW and Porath J (1987) Thiophilic Adsorption: A Comparison of Model Protein Behaviour. *Biochemistry* 26: 7199-7204.
70. Finger UB et al. (1996) Investigations on the Specificity of Thiophilic Interaction for Monoclonal Antibodies of Different Subclasses. *J Chrom B* 675: 197-204.
71. Porath J and Belew M (1987) “Thiophilic” Interaction and the Selective Adsorption of Proteins. *Tibtech* 5(8): 225-229.
72. Bergenströhle A and Heijbel A (1999) One-step Purifications of IgM and IgY with HiTrap Purification Columns. *Life Science News* 3: 1-2.
73. Synge RLM (1944) Analysis of a Partial Hydrolysate of Gramicidin by Partition Chromatography with Starch. *Biochem J* 38(4): 285-294.
74. Lathe GH and Ruthven CR (1955) The separation of substances on the basis of their molecular weights, using columns of starch and water. *Biochem J* 60(4): xxxiv.
75. Lathe GH and Ruthven CR (1956) The separation of substances and estimation of their relative molecular sizes by the use of columns of starch in water. *Biochem J* 62(4): 665-674.
76. Porath J and Flodin P (1959) Gel filtration: A method for desalting and group separation. *Nature* 183(4676): 1657-1659.
77. Hjertén S and Mosbach R (1962) “Molecular –Sieve” Chromatography of Proteins on Columns of Cross-linked Polyacrylamide. *Anal Biochem* 3(2): 109-118.

78. *Zum vorherigen Absatz:* Eisenstein M (2006) A look back, adventures in the matrix. *Nature Methods* 3(5): 410.
79. GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire UK (2006) *Illustra Sephacryl S-1000 – Product Booklet*, Code: 17-0476-01 (750 ml)
80. Smith PK et al. (1985) Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem* 150: 76-85.
81. Tuszynski GP and Murphy A (1990) Spectrophometric Quantitation of Anchorage-Dependent Cell Numbers Using the Bicinchoninic Acid Protein Assay Reagent. *Anal Biochem* 184(1): 189-191.
82. Stich TM (1990) Determination of Protein Covalently Bound to Agarose Supports Using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem* 191: 343-346.
83. Ju T et al (2002) Cloning and Expression of Human Core 1 β 1,3-Galactosyltransferase. *J Biol Chem* 277: 178-186.
84. Tyljanakis PE et al (1994) Direct Colorimetric Determination of Solid-Supported Functional Groups and Ligands Using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem* 219(2): 335-340.
85. Gates RE (1991) Elimination of Interfering Substances in the Presence of Detergent in the Bicinchoninic Acid Protein Assay. *Anal Biochem* 196(2): 290-295.
86. Fazekas de St. Groth S et al (1963) Two New Staining Procedures for Quantitative Estimation of Proteins on Electrophoretic Strips. *Biochim Biophys Acta* 71: 377-391.
87. Bradford M (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
88. Righetti PG and Chillemi F (1978) Isoelectric Focusing of Peptides. *J Chromatogr A* 157: 243-251.

89. Compton SJ and Jones CG (1985) Mechanism of Dye Response and Interference in the Bradford Protein Assay. *Anal Biochem* 151: 369-374.
90. Pierce J and Suelter CH (1977) An Evaluation of the Coomassie Brilliant Blue G-250 Dye-Binding Method for Quantitative Protein Determination. *Anal. Biochem.* 81: 478-480.
91. Van Kley H and Hale SM (1977) Assay for Protein by Dye Binding. *Anal Biochem* 81: 485-487.
92. Tal M et al (1980) Why Does Coomassie Brilliant Blue R Interact Differently with Different Proteins? A Partial Answer. *J Biol Chem* 260(18): 9976-9980.
93. Read SM and Northcote DH (1981) Minimization of Variation in the Response to Different Proteins of the Coomassie Blue G Dye-Binding Assay for Protein. *Anal Biochem* 116: 53-64.
94. Splittgerber AG and Sohl J (1989) Nonlinearity in the Protein Assays by the Coomassie Blue Dye-Binding Method. *Anal Biochem* 179: 198-201.
95. Laemmli UK (1970) Clavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
96. Switzer RC et al (1979) A Highly Sensitive Silver Stain for Detecting Proteins and Peptides in Polyacrylamide Gels. *Anal Biochem* 98(1): 231-237.
97. Hawkes et al (1982) A Dot-Immunobinding Assay for Monoclonal and other Antibodies. *Anal Biochem* 119(1): 142-147.
98. Engvall E and Perlmann P (1971) Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA). Quantitative Assay of Immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8(9): 871-874.

99. Van Weemen BK and Schuurs AHWM (1971) Immunoassay Using Antigen-Enzyme Conjugates. FEBS Letters 15(3): 232-236.
100. Yalow RS and Berson SA (1959) Assay of Plasmainsulin in Human Subjects by Immunological Methods. Nature 184(4699): 1648-1649.
101. Schuurs AHWM and van Weemen BK (1980) Enzyme-Immunoassay: A Powerful Tool [Review]. J Immunoassay 1(2): 229-249.
102. Engvall E and Perlmann P (1972) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Elisa: III. Quantitation of Specific Antibodies by Enzyme-labelled Anti-Immunoglobulin in Antigen-Coated Tubes. J Immunol 109: 129-135.
103. Belanger L et al. (1973) Enzyme-Linked Immunoassay for Alpha-Fetoprotein by Competitive and Sandwich Procedures. Clin Chim Acta 48: 15-18.
104. Wolters G et al. (1976) Solid-Phase Enzyme-Immunoassay for Detection of Hepatitis B Surface Antigen. J Clin Path 29: 873-879.
105. Van der Waart M et al. (1978) Enzyme-Immunoassay in the Diagnosis of Hepatitis with Emphasis on the Detection of „e“ Antigen (HBeAG). J Med Virol 3: 43-49.
106. Mathiesen LR et al. (1977) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Hepatitis A Antigen in Stool and Antibody to Hepatitis A Antigen in Sera: Comparison with Solid-Phase Radioimmunoassay, Immuni Electron Microscopy, and Immuno Adherence Hemagglutination Assay. J Med Microbiol 7(2): 184-193.
107. Köhler A (1904) Mikrophotographische Untersuchungen mit ultraviolettem Licht. Zeits f Wiss Mik 21(1): 129-165, 273-304.
108. Coons AH und Kaplan MH (1950) Localization of antigen in tissue cells. J Exp Med 93(2): 173-188.

109. Coons AH (1960): Immunofluorescence. Public Health Reports 75(10): 937-943.
110. Young MR (1961) Principles and Technique of Fluorescence Microscopy. Quarterly Journal of Microscopical Science 102(4): 419-449.
111. Davies C (2001) Introduction to Immunoassay Principles, 3-37, in: Wild D (ed.) The Immunoassay Handbook, 2nd ed, London: Nature Publ Group
112. Novales-Li P (1995) Purification of Murine Immunoglobulin M from Spent Tissue Culture Supernatant by One-step Gel Filtration Chromatography Procedure. Biomed Chrom 9: 42-47.
113. Palombo G et al. (1998) Affinity purification of Immunoglobulin M using a novel synthetic ligand. J Chrom B 715: 137-145.
114. Jacobin MJ et al. (2004) Production of a human monoclonal IgM directed against human cardiac myosin in a hollow-fiber bioreactor for membrane anion exchange chromatography one-step purification. Human Antibodies 13: 69-79.
115. McCarthy E et al. (1996) Rapid purification of immunoglobulin M from ascites by perfusion ion-exchange chromatography. J Chrom A 743: 163-170.
116. Gagnon P et al. (2008) Purification of IgM Monoclonal Antibodies. BioPharm International Supplements March 2nd 2008: <http://www.biopharminternational.com/biopharm/Downstream+Processing/Purification-of-IgM-Monoclonal-Antibodies/ArticleStandard/Article/detail/499148>; (12.06.2015).
117. Andrew SM (2001) Purification of Immunoglobulin M and Immunoglobulin D, Curr Protoc Immunol Chapter 2: Unit 2.9
118. Mahassni SH et al. (2009) Purification of a Murine IgM Monoclonal Antibody. Hybridoma 28(3): 189-197.

119. Coppola G et al. (1989) High-Performance Liquid Chromatography of Amino Acids, Peptides and Proteins – XCIII: Comparison of Methods for the Purification of Mouse Monoclonal Immunoglobulin M Antibodies. *J Chrom A* 476: 269-290.
120. Cripps AW (1983) Isolation of human IgA and IgM from normal serum using polyethylene glycol precipitation and affinity chromatography. *J Immunol Meth* 57(1-3): 197-204.
121. Knutson VP (1991) Purification of a murine monoclonal antibody of the IgM class. *J Immunol Meth* 136(2): 151-157.
122. Steindl F et al. (1986) Isoelectric precipitation and gel chromatography for purification of monoclonal IgM. *Enzyme Microb Technol* 9(6): 361-364.
123. Tornøe I et al. (1997) Pilot scale purification of human monoclonal IgM (COU-1) for clinical trials. *J Immunol Meth* 205(1): 11-17.
124. Brne P (2007) Fast and efficient separation of immunoglobulin M from immunoglobulin G using short monolithic columns. *J Chrom A* 1144(1): 120-125.
125. Henniker AJ and Bradstock KF (1997) Purification of two murine monoclonal antibodies of the IgM class by hydroxyapatite chromatography and gel filtration. *Biomed Chrom (BMC)* 7(3): 121-125.
126. Yamakawa Y and Chiba J (1988) High-Performance Liquid Chromatography of Mouse Monoclonal Antibodies on Spherical Hydroxyapatite Beads. *J Liquid Chrom* 11(3): 665-681.
127. Aoyama K and Chiba J (1993) Separation of different molecular forms of mouse IgA and IgM monoclonal antibodies by high-performance liquid chromatography on spherical hydroxyapatite beads. *J Immunol Meth* 162(2): 201-210.

128. Roggenbuck D et al. (1994) Purification and immunochemical characterization of natural human polyreactive monoclonal IgM antibody. *J Immunol Meth* 167(1-2): 207-218.
129. Lee J et al. (2009) Adaptation of hybridomas to protein-free media results in a simplified two-step immunoglobulin M purification process. *J Chrom A* 1216(13): 2683-2688.
130. Hutchens TW et al. (1990) Secretory IgA, IgG and IgM immunoglobulins isolated simultaneously from colostral whey by selective thiophilic adsorption. *J Immunol Meth* 128(1): 89-99.
131. Rapoport EM et al. (1995) Purification of monoclonal antibodies to Le(y) and Le(d) carbohydrate antigens by ion-exchange and thiophilic-adsorption chromatography. *Bioseparation* 5(3): 141-146.
132. Hall M et al. (2006) One-step purification of monoclonal IgM from cell culture supernatants. *GE Healthcare* 18-1134-82 AB 12/2006
133. Shimada Y et al. (2008) Development of a two-step chromatography procedure that allows the purification of a high-purity anti-histone H1 monoclonal Immunoglobulin M antibody with immunosuppressant activity. *Biomed Chrom (BMC)* 22(1): 13-19.
134. Belew M et al. (1987) A one-step purification method for monoclonal-antibodies based on salt-promoted adsorption chromatography on a thiophilic absorbent. *J Immunol Meth* 102(2): 173-182.
135. Garcia-Gonzales M et al. (1988) Purification of murine IgG3 and IgM monoclonal antibodies by euglobulin precipitation. *J Immunol Meth* 111(1): 17-23.
136. Cambier JC and Butler JE (1974) A rapid method for the purification of immunoglobulin M (IgM) from the sera of certain mammalian species. *Prep Biochem* 4(1): 31-46.

137. Wichman A and Borg H (1977) Purification of human immunoglobulin M by affinity chromatography on protamine-sepharose. *Biochim Biophys Acta* 490: 363-369.
138. Bouvet JP and Pirès R (1991) One-step purification of murine monoclonal antibodies of the IgM class. *J Immunol Meth* 145: 263-266.
139. Nagano H et al. (1989) Purification of Infectious Bronchitis Coronavirus by Sephacryl S-1000 Gel Chromatography. *Vet Microbiol* 21: 115-123.
140. Loa CC et al. (2002) Purification of turkey coronavirus by Sephacryl size-exclusion chromatography. *J Virol Meth* 104: 187-194.
141. Van Helden PD and Hoal EG (1988) Chapter 7: Plasmid Preparation on Sephacryl S1000, 69-74, in: Walker JM (ed.) *Methods in Molecular Biology Volume 4 – New Nucleic Acid Techniques*. Clifton, New Jersey: Humana Press.
142. Ishihara T et al. (2010) Evaluation of new affinity chromatography resins for polyclonal, oligoclonal and monoclonal antibody pharmaceuticals. *J Chrom B* 878: 2141-2144.
143. Horneman DA et al. (2007) Surfactant-aided size-exclusion chromatography for the purification of immunoglobulin G. *J Chrom A* 1157: 237-245.
144. Ahrer K et al. (2003) Analysis of aggregates of human immunoglobulin G using size-exclusion chromatography, static and dynamic light scattering. *J Chrom A* 1009: 89-96.
145. Hawe A et al. (2008) Online fluorescent dye detection method for the characterization of immunoglobulin G aggregation by size exclusion chromatography and asymmetrical flow field fractionation. *Anal Biochem* 378: 115-122.
146. Horak J et al. (2010) Quantification of immunoglobulin G and characterization of process related impurities using coupled Protein A

- and size exclusion high performance liquid chromatography. *J Chrom A* 1217: 5092-5102.
147. Lim YP and Josic D (2005) Antibodies – Non-affinity and chromatographic methods, 592-293, in: Gooding KM and Regnier FE (ed.) *HPLC of Biological Macromolecules*, 2nd ed., Basel: Marcel Dekker AG.
148. Josic D and Lim YP (2001) Analytical and Preparative Methods for Purification of Antibodies. *Food Technol Biol* 39(3): 215-226.
149. Konecny P et al. (1994) Chromatographic purification of immunoglobulin G from bovine milk whey. *J Chrom A* 673: 45-53.
150. Knudsen KL et al. (1992) Sulfone-Aromatic Ligands for Thiophilic Adsorption Chromatography: Purification of Human and Mouse Immunoglobulins. *Anal Biochem* 201: 170-177.
151. Yurov GK et al. (1994) Thiophilic adsorption: rapid purification of F(ab)₂ and Fc Fragments of IgG1 antibodies from murine ascetic fluid. *J Immunol Meth* 177: 29-33.
152. Fiedler M and Skerra A (1999) Use of thiophilic adsorption chromatography for the on step purification of a bacterially produced antibody Fab fragment without the need for an affinity tag. *Prot Expr Purif* 17: 421-427.
153. Leibl H et al. (1995) Isolation of human serum IgA using thiophilic adsorption chromatography. *Prot Expr Purif* 6: 408-410.
154. Rapoport EM et al. (1995) Purification of monoclonal antibodies to Le(y) and Le(d) carbohydrate antigens by ion-exchange and thiophilic adsorption chromatography. *Bioseparation* 5(3): 141-146.
155. Cadha KC et al. (2001) Thiophilic interaction chromatography of prostate-specific antigen. *J Chrom B* 754: 521-525.

156. Rosenkrands I et al. (1998) Identification & characterization of a 29 kD protein from *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate. *Infect Immun* 66: 2728-2735.
157. Matejtschuk P (2004) Thiophilic Affinity Chromatography and Related Methods, 195-204, in: Cutler P (ed.) *Protein Purification Protocols*, 2nd edition. Totowa, New Jersey: Humana Press.
158. Kreutz FT et al. (1998) Efficient bispecific monoclonal antibody purification using gradient thiophilic affinity chromatography. *J Chrom B* 714: 161-170.
159. Hardouin J et al. (2007) Thiophilic adsorption revisited. *J Chrom B – Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 845(2): 226-231.
160. Krohn RI (2011) Colorimetric Detection and Quantitation of Total Protein. *Curr Protoc Cell Biol Appendix 3H*: 1-28.
161. Noble JE et al. (2007) A Comparison of Protein Quantitation Assays for Biopharmaceutical Applications. *Mol Biotechnol* 37(2): 99-111.
162. Brown RE et al. (1989) Protein Measurement Using Bicinchoninic Acid: Elimination of Interfering Substances. *Anal Biochem* 180(1): 136-139.
163. Fountoulakis M et al. (1992) Comparison of the Coomassie brilliant blue, bicinchoninic acid and Lowry quantitation assays, using non-glycosylated and glycosylated proteins. *J Biochem Biophys Meth* 24(3-4): 265-274.
164. Alterman M et al. (2003) AAARG2003 Study: Quantitation of proteins by amino acid analysis and colorimetric assays. ARBF Meeting in Denver, CO 2003: Translating Biology Using Proteomics and Functional Genomics.
165. Sapan CV (1999) Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnol Appl Biochem* 29(Pt 2):99-108.

166. Ijsselmuiden OE et al. (1989) An IgM capture enzyme linked immunosorbent assay to detect IgM antibodies to treponemes in patients with syphilis. *Genitourin Med* 65: 79-83.
167. Shu P (2003) Comparison of Capture Immunoglobulin M (IgM) and IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Nonstructural Protein NS1 Serotype-Specific IgG ELISA for Differentiation of Primary and Secondary Dengue Virus Infections. *Clin Diag Lab Immunol* 10(4): 622-630.
168. Ksiazek TG (1999) ELISA for the Detection of Antibodies to Ebola Viruses. *J Infect Dis* 179 Supplement 1: S192-198.
169. Park J (2008) Diagnosis of vivax malaria using an IgM capture ELISA is a sensitive method, even for low levels of parasitaemia. *Parasitol Res* 103: 625-631.
170. Wang T (2001) Immunization of Mice Against West Nile Virus with Recombinant Envelope Protein. *J Immunol* 167: 5273-5277.
171. Abebe et al. (2006) Detection of recombinant Alt a1 in a two-site, IgM based, sandwich ELISA opens up possibilities of developing alternative assays for the allergen. *J Immunol Meth* 312: 111-117.
172. Aas K (1970) Bronchial provocation tests in asthma. *Arch Dis Child* 45(240): 221-228.

7 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Unterschrift

8 Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Flehmig für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe meine Dissertation anfertigen zu können. Für die herausragende Einarbeitung, Betreuung und Unterstützung möchte ich mich hiermit bei Prof. Dr. Flehmig und ebenso bei Dr. Andrea Normann ganz herzlich bedanken.

Besonderer Dank für die alltägliche, praktische Unterstützung im Labor gilt Anna Schlömp. Für Kollegialität und die Beantwortung meiner Fragen danke ich weiterhin Tanja Martinez, Mechthild Pfisterer und Janine Elit. Ich kann jedem weiteren Doktoranden nur wünschen, eine solch umfassende Betreuung zu erhalten, wie ich sie erfahren habe.

Für die Ermöglichung meines Studiums und für tausend andere Dinge danke ich meinen Eltern. Für die Unterstützung ebenso meiner Schwester und meinen Großeltern. Danke, dass ihr alle an mich glaubt und immer für mich da seid.