

Entwicklung von Multiplex-Methoden zur Antikörper-Charakterisierung und Validierung

Timo Ramm

Univ.-Diss.

zur Erlangung des akademischen Grades
"doctor rerum naturalium" (Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin "Bioanalytik"

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
Institut für Biochemie und Biologie
der Universität Potsdam



Angefertigt am Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie
Institutsteil Bioanalytik und Bioprozesse, Potsdam (IZI-BB)



Ort und Tag der Disputation: Potsdam-Golm, 06.09.2022

Soweit nicht anders gekennzeichnet, ist dieses Werk unter einem Creative-Commons-Lizenzvertrag Namensnennung 4.0 lizenziert.
Dies gilt nicht für Zitate und Werke, die aufgrund einer anderen Erlaubnis genutzt werden.
Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>

Hauptbetreuer: PD Dr. Harald Seitz
Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie
Institutsteil Bioanalytik und Bioprozesse, Potsdam (IZI-BB)
AG Biomarkervalidierung und Assayentwicklung
Am Mühlenberg 13
14476 Potsdam

Zweitbetreuerin: Prof. Dr. Katja Hanack
Universität Potsdam
Institut für Biochemie und Biologie
Professur Immuntechnologie
Karl-Liebknecht-Str. 24-25
Haus 29, Raum 1.55
14476 Potsdam

Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Jabs
Berliner Hochschule für Technik Berlin
Fachbereich V – Life Sciences and Technology
Seestraße 64
13347 Berlin

Prüfungskommission: Prof. Dr. Katja Arndt (Vorsitz)
Prof. Dr. Bernd Müller-Rober
Prof. Dr. Ulla Wollenberger

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
<https://doi.org/10.25932/publishup-56153>
<https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-561531>

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Timo Ramm, dass ich die beigefügte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Potsdam-Golm, 11.04.2022

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Ich möchte hier die Chance nutzen, mich bei allen Leuten zu bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Dissertation unterstützt haben:

Ich möchte mich als erstes bei Harald Seitz bedanken, welcher nicht nur die Hauptbetreuung übernommen hat, sondern in dessen Arbeitsgruppe ‘Biomarkervalidierung und Assayentwicklung‘ ich die letzten 4 Jahre mit seiner Unterstützung diese Dissertation erarbeiten und schreiben konnte. Danke an die gesamte Gruppe für die immer gute Arbeitsatmosphäre, den Spaß während der Arbeit und die unzähligen Ausflüge. Danke an Sandra Mükusch für ihre Hilfe und Anleitungen und auf deren Vorarbeiten einige Versuche dieser Arbeit basieren. Weiterer Dank geht an Denise Danne, es war wunderbar mit dir zusammen zu arbeiten und deine Entwicklung verfolgen zu können. Danke auch an Juliane Grimm und Dorothea Hallier, es war mir eine Freude, mir mit euch ein Labor geteilt zu haben.

Weiterer Dank geht an Clemens Bodt, der unter meiner Anleitung ebenfalls Ergebnisse erzielen konnte, auf denen grundlegende Versuche dieser Arbeit basieren.

Ich möchte ebenfalls den Kollegen vom Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie, Institutsteil Bioanalytik und Bioprozesse (IZI-BB) in Potsdam Golm danken, insbesondere Eva Ehrentreich-Förster für die Aufnahme in ihre Abteilung. Danke auch an Martina Obry, Erik Hahn, Michaela Schellhase und Dirk Michel.

Weitergehend möchte ich Katja Hanack für die universitäre Zweitbetreuung danken.

Danke für all die Zusammen- und Zuarbeiten insbesondere durch YUMAB (André Frenzel, Ansgar Eickhoff und Philipp Kuhn), FZMB (Carmen Klein), ArtuVet (Michaela Buchholz), new/era/mabs (Katja Hanack und Nicole Findik), der Pferdeklinik Bargtheide (Volker Sill) und der Universität Kassel (Friedrich Wilhelm Herberg und Jascha Manschwetus).

Besonderer Dank geht auch an meine Freunde und Familie. Dabei ein dickes Danke an Antonio Pellegrino. Ich danke dir für all die offenen Ohren, den Spaß und die Motivation während und vor allem nach der Arbeit!

Danke auch an meine Frau, Franziska Ramm, ohne deren fachliche aber vor allem liebevolle Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ich freu mich auf eine entspannte Zukunft mit dir, Bruce und Gordon.

Zu guter Letzt möchte ich noch meiner Mutter danken. Auch wenn ich jetzt groß und (fast) erwachsen bin, warst du es die, durch ihre jahrelange Unterstützung, den Grundstein für all dies gelegt hat. Danke Mutti!

Zusammenfassung

Antikörper werden in verschiedensten Bereichen, sowohl zu therapeutischen als auch zu diagnostischen und forschungsorientierten Zwecken verwendet. Vor der Verwendung des Antikörpers bedarf es der Charakterisierung seiner Eigenschaften, in Bezug auf sein Epitop und sein Bindeverhalten gegenüber dem Paratop. Gleichzeitig muss, in Abhängigkeit des Einsatzes, der Antikörper, für den gewünschten Gebrauch, validiert werden. Zu diesem Zweck wurden in der vorliegenden Arbeit Bead-basierte, multiplexe Testsysteme entworfen, ausgetestet und etabliert mit dem Ziel, eine einfache Screeningmethode zu entwickeln, um eine hohe Anzahl an Proben beziehungsweise Analyten gleichzeitig bestimmen zu können. Dafür wurden drei verschiedene Herangehensweisen etabliert.

So wurden ein phospho-PKA-Substrat Antikörper, welcher phosphorylierte Bindemotive der PKA der Form RRxpS erkennt, gleichzeitig mit einer Reihe an Peptide getestet, welche Punktmutationen im Vergleich zur Konsensussequenz enthielten, um den Einfluss einzelner Aminosäuren auf die Bindung des Antikörpers zu untersuchen. Es konnte im Multiplex gezeigt werden, dass die Unterschiede im Antikörperbindungsverhalten in Abhängigkeit der Aminosäure an verschiedenen P-Positionen detektierbar waren. Mit dem Bead-basierten Multiplexansatz konnten, durch Messungen von Konzentrationsreihen des Antikörpers, Bindungskinetiken aufgenommen und diese mit bereits etablierten Methoden verglichen werden.

Des Weiteren wurden verschiedene Antikörper, welche essenzielle Bestandteile von Bead-basierten Testsystemen darstellten, validiert. Es wurden dabei verschiedene Antikörper, welche spezifisch THC und CBD erkennen ausgetestet und anschließend ein kompetitiver Assay zur Detektion von THC und CBD in humanem Serum etabliert, und die Nachweisgrenzen bestimmt.

Ferner sollten Pferdeseren von Tieren, welche am Sommerekzem leiden, auf ihren IgE-Gehalt hin bestimmt werden. Dafür wurden relevante Proteine rekombinant hergestellt und durch Immobilisierung an Beads im Multiplex mit Serum inkubiert. Die spezifische Bindung des IgE an die Allergen sollte damit messbar gemacht werden können. Für die Gesamtvalidierung des Testsystems wurden zuvor sämtliche Einzelschritte einzeln validiert, um im Anschluss im multiplexen Screening zu vermessen.

Die Nutzung von Bead-basierten Multiplexmessungen als eine Plattformtechnologie erleichtert die Charakterisierung von Antikörpern sowie ihre Validierung für verschiedene Testsysteme.

Abstract

Antibodies are widely used in different fields, which include therapeutic as well as diagnostic and research applications. Before the antibody can be used, its properties must be characterized with regard to its epitope and its binding behavior to the paratope. At the same time, depending on the application, the antibody must be validated for its desired use. For this purpose, bead-based multiplex assay systems were designed, tested, and established with the aim of developing a simple screening method to simultaneously measure a high number of samples or analytes.

Thus, a phospho-PKA-substrate antibody, which recognizes phosphorylated binding motifs of PKA with the RRxpS motif, was tested. A series of peptides containing point mutations as compared to consensus sequences were used to investigate the influence of individual amino acids on the binding of the antibody. In a multiplex approach it was shown that the differences in the antibody binding behavior were detectable at different P-positions depending on the amino acid. Furthermore, it was possible to measure binding kinetics by the bead-based multiplex approach using dilution series of the antibody, and to compare these with already established methods.

In addition to that, different antibodies, which were applied as essential components of bead-based biosensor systems, were validated. On the one hand, different antibodies specifically recognizing THC and CBD were tested and subsequently a competitive assay for the detection of THC and CBD in human serum was established. The detection limits could be determined. On the other hand, the IgG level in horse sera from animals suffering from sweet itch were determined. For this purpose, relevant proteins were recombinantly expressed, immobilized on beads and incubated with serum in a multiplex approach. The specific binding of IgE to the allergen was measurable. For the overall validation of the test system, all individual steps were partially validated beforehand to allow for a measurement in the multiplex screening system. Thus, using the advantages of bead-based multiplex measurements, a platform for the characterization of antibodies as well as their validation in different test systems was demonstrated.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
Anhangsverzeichnis	XI
Abkürzungsverzeichnis	XII
1. Einleitung	1
1.1. Antikörper	1
1.1.1. Antikörpereigenschaften	1
1.1.2. Immunsystem	3
1.1.3. Antikörperherstellung	6
1.1.4. Antikörpernutzung	8
1.2. Biosensor-Technologien	9
1.2.1. Immobilisierung	9
1.2.2. Singleplex	10
1.2.2.1. ELISA	10
1.2.3. Multiplex	12
1.2.3.1. Mikroarray	12
1.2.3.2. Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie	14
1.2.3.3. bScreen	14
1.2.3.4. Bead-basierte Methoden	15
1.3. Biologische Fragestellungen	17
1.3.1. Antikörpercharakterisierung	17
1.3.1.1. Phospho-PKA-Substrat Antikörper	17
1.3.1.1.1. Epitopemapping	18
1.3.1.1.2. Kinetische Analyse	19
1.3.2. Antikörpervalidierung	20
1.3.2.1. THC & CBD	20
1.3.2.2. Equines Sommerekzem	23
1.4. Zielsetzung	26
2. Material	27
2.1. Chemikalien	27
2.2. Geräte	29
2.3. Programme	29
2.4. Kits	30
2.5. Puffer	30
2.6. Medien	32
2.6.1. Flüssigmedien	32
2.6.2. Platten	33
2.7. Peptide	33

2.8. Bakterienstämme	34
2.9. Seren	34
2.9.1. Leerseren	34
2.9.2. Pferdeseren	34
2.10. Antikörper	35
2.11. Plasmide	36
2.12. Primer	37
2.13. Restriktionsenzyme	37
2.14. Verbrauchsgegenstände	38
3. Methoden	39
3.1. Molekularbiologische Methoden	39
3.1.1. SDS-PAGE	39
3.1.2. Western-Blot	39
3.1.3. Agarose-Gel	40
3.1.4. Nanodrop	41
3.1.5. BCA-Assay	41
3.1.6. Antikörpervalidierung	41
3.1.6.1. Antikörper Labeling	41
3.1.7. Proteinexpression	42
3.1.7.1. Herstellung kompetenter Zellen	42
3.1.7.2. Transformation	42
3.1.7.3. Plasmid- Präparation	43
3.1.7.4. Restriktionsverdau	43
3.1.7.5. Polymerase Kettenreaktion (PCR)	44
3.1.7.6. <i>In vivo</i> Proteinexpression	44
3.1.7.7. <i>In vitro</i> Proteinexpression	45
3.1.7.7.1. <i>E. coli</i> Kit	45
3.1.7.7.2. Insekten Kit	45
3.1.7.7.2.1. RTS 100 Insect Membrane Kit	45
3.1.7.7.2.2. TnT® T7 Insect Cell Extract Protein Expression System	46
3.2. Luminex	46
3.2.1. Kopplung	46
3.2.1.1. Kopplung Epoxy-Beads	46
3.2.1.2. Kopplung Avidin-Beads	47
3.2.1.3. Kopplungsnachweis	47
3.2.2. Luminex Assay	47
3.2.3. Mikroarray	49
3.2.3.1. Spotten	49
3.2.3.2. Inkubation	50
3.2.3.2.1. FAST-Slide	50
3.2.3.2.2. Hybridisierkammer	50
3.2.3.2.3. bScreen	50
3.2.3.3. Auswertung	51
3.2.3.3.1. Fluoreszenz-Scanner	51
3.2.3.3.2. bScreen	51
3.3. Versuchsaufbauten	51
3.3.1. Epitopemapping	51
3.3.1.1. Luminex	51
3.3.1.2. Mikroarray	52
3.3.2. Kinetische Analyse	52
3.3.2.1. Kinase-Assay	52

3.3.2.2.	Kinetische Auswertung	53
3.3.3.	Kompetitiver Assay	53
3.3.3.1.	Kopplung von Biotin-Konjugaten an Avidin-Beads	54
3.3.3.2.	Antikörpervalidierung	54
3.3.3.3.	Kompetitiver Assay	54
3.3.3.4.	Testsystem	55
3.3.4.	Serumscreening	55
3.3.4.1.	Luminex	55
3.3.4.1.1.	Proteinbindung	55
3.3.4.1.2.	Kontrollproben	55
3.3.4.1.3.	Seruminkubation	56
3.3.4.1.4.	Normalisierung und Cut-off Wert Berechnung	56
4.	Ergebnisse	57
4.1.	Antikörpercharakterisierung	57
4.1.1.	Epitopemapping	57
4.1.1.1.	Kopplungskontrolle	58
4.1.1.2.	Multiplex-Versuche	59
4.1.1.3.	Vergleich mit anderen Methoden	60
4.1.2.	Kinetische Analyse	62
4.1.2.1.	Kopplungskontrolle	63
4.1.2.2.	Kinase Assay	64
4.1.2.3.	Vorversuche (Single vs. Multiplex)	65
4.1.2.4.	Verdünnungsreihe	66
4.1.2.5.	Labeling	66
4.1.2.6.	EC ₅₀ als K _D	69
4.1.2.7.	Vergleich mit anderen Methoden	69
4.2.	Antikörpervalidierung	71
4.2.1.	Kompetitiver Assay	71
4.2.1.1.	Kopplungskontrolle	71
4.2.1.2.	Alkyl vs PEG Linker	73
4.2.1.3.	Antikörperscreening	74
4.2.1.4.	Ratio Berechnung	75
4.2.1.5.	Verdünnungsreihen für Top 3 THC/CBD Antikörper	76
4.2.1.6.	Testung kompetitiver Ansatz	78
4.2.1.7.	Serum Spike-In	81
4.2.1.8.	Nachweisgrenze	83
4.2.2.	Identifizierung von IgE in Pferdeserum	87
4.2.2.1.	Kopplung	88
4.2.2.2.	Proteinbindung	89
4.2.2.3.	Proteinexpression	90
4.2.2.3.1.	Template-Generierung	90
4.2.2.3.1.1.	Plasmidisolierung	91
4.2.2.3.1.2.	PCR-Produkt	92
4.2.2.3.2.	<i>In vivo</i> Proteinexpression	93
4.2.2.3.3.	<i>In vitro</i> Proteinexpression	96
4.2.2.3.3.1.	Vergleich der Kits	96
4.2.2.3.3.2.	<i>E.coli</i> HY Kit	97
4.2.2.4.	Unspezifische IgE-Kontrolle	100
4.2.2.5.	Serumscreening	101
4.2.2.5.1.	Messungen	101
4.2.2.5.1.1.	Verwendung von Proteinen aus <i>in vivo</i> Proteinexpression	102
4.2.2.5.1.2.	Verwendung von Proteinen aus <i>in vitro</i> Proteinexpression	103
5.	Diskussion	106

5.1.	Phospho-PKA-Substrat Antikörper	106
5.2.	THC & CBD Antikörper	109
5.3.	Equines IgE	112
5.4.	Multiplex	117
6.	<i>Literatur</i>	122
7.	<i>Anhang</i>	132

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung der Antikörperklassen.....	2
Abbildung 2 Vergleich ELISA Assay Formate.....	11
Abbildung 3 Schematische Darstellung Luminex.....	16
Abbildung 4 Strukturformel THC / CBD.....	21
Abbildung 5 Typ-I Hypersensitivitätsreaktion.....	24
Abbildung 6 Spotting-Targets nach Prozessierungsart	49
Abbildung 7 Kopplungskontrolle der Peptide (Epitopemapping).....	58
Abbildung 8 Phosphorylierungsnachweis (Bead-basiert)	59
Abbildung 9 Phosphorylierungsnachweis (Mikroarray)	61
Abbildung 10 Vergleich der normalisierten maximalen Messwerte.....	62
Abbildung 11 Kopplungskontrolle (Kinetische Analyse).....	63
Abbildung 12 Phosphorylierungskontrolle (Kinetische Analyse).....	64
Abbildung 13 Vergleich der Peptide im Single- und im Multiplex	65
Abbildung 14 Verdünnungsreihe des phospho-PKA-Substrat Antikörpers mit sekundärem RPE-Antikörper.....	66
Abbildung 15 Vergleich der Signale für direkt und indirekt gelabelt.....	67
Abbildung 16 Vergleich der normalisierten Signale für direkt und indirekt gelabelte Antikörper (Verdünnungsreihe)	68
Abbildung 17 Kopplungskontrolle (kompetitiver Assay).....	72
Abbildung 18 Spezifische Antikörperbindung mit Vergleich der Linker	73
Abbildung 19 Antikörperscreening.....	74
Abbildung 20 Ratios für spezifische Antikörper mit unspezifischer Bindung	75
Abbildung 21 Verdünnungsreihen Top 3.....	77
Abbildung 22 Konkurrenz in PBST	78
Abbildung 23 Konkurrenz in Serum	80
Abbildung 24 Serum Spike-In normalisiert	82
Abbildung 25 Serum Spike-In normalisiert (halblogarithmisch).....	84
Abbildung 26 Schematischer Versuchsaufbau des Serumscreenings	88
Abbildung 27 Titrationskurve und Kopplungskontrolle (Serumscreening).....	89
Abbildung 28 Fluoreszenzaufnahmen der Bindung von GFP an Bead.....	90
Abbildung 29 Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte	92
Abbildung 30 Standardkurve für BCA.....	93

Abbildung 31 Immunpräzipitation der <i>in vivo</i> Proteinexpression.....	95
Abbildung 32 Vergleich der <i>in vitro</i> Expressionssysteme	97
Abbildung 33 Western Blots der <i>in vitro</i> Proteinexpression.....	98
Abbildung 34 Immunpräzipitation der <i>in vitro</i> Proteinexpression.....	99
Abbildung 35 Heat-Map der unspezifischen IgE-Bindung.....	100
Abbildung 36 Serum 10 (<i>in vivo</i> Expression)	102
Abbildung 37 Serum 10 (<i>in vitro</i> Expression)	103
Abbildung 38 Arbeitsschritte des Serumscreenings (Sommerekzem).....	113
Abbildung 39 Anzahl positiver Detektionen und Reproduzierbarkeit (Sommerekzem)	114

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Chemikalien.....	27
Tabelle 2 Geräte	29
Tabelle 3 Programme	29
Tabelle 4 Kits	30
Tabelle 5 10 x PBS (1 L).....	30
Tabelle 6 PBST (1 L)	30
Tabelle 7 5 x SDS-Laufpuffer	31
Tabelle 8 5 x CCE Puffer	31
Tabelle 9 TSS Puffer	31
Tabelle 10 Blotting Puffer.....	31
Tabelle 11 10 x TA Puffer.....	32
Tabelle 12 10 x PKA-Puffer.....	32
Tabelle 13 LB-Medium flüssig (1 L)	32
Tabelle 14 2YT-Medium (1 L).....	32
Tabelle 15 LB-Medium fest (1 L)	33
Tabelle 16 Peptide	33
Tabelle 17 Bakterienstämme	34
Tabelle 18 Primärantikörper.....	35
Tabelle 19 Sekundärantikörper	36
Tabelle 20 Plasmide (pEX-A158)	36
Tabelle 21 Plasmide (pEX-A258)	37
Tabelle 22 Primer	37
Tabelle 23 Restriktionsenzyme	37
Tabelle 24 Allgemein	38
Tabelle 25 Beads	38
Tabelle 26 Slides	38
Tabelle 27 Multititerplatten.....	38
Tabelle 28 Errechnete EC ₅₀	69
Tabelle 29 Vergleich der EC ₅₀ auf verschiedenen Plattformen für Kontrollpeptid	70
Tabelle 30 Berechnete Ratios.....	76
Tabelle 31 Berechnete Nachweisgrenzen.....	85
Tabelle 32 Plasmid Konzentrationen bestimmt mittels Nanodrop.....	91

Tabellenverzeichnis

Tabelle 33 PCR-Produkt Konzentrationen bestimmt mittels Nanodrop	92
Tabelle 34 Proteinkonzentrationen bestimmt über BCA-Assay	94
Tabelle 35 Serumscreening der IgE-positiven Seren (durch in vitro Proteinexpression)	104
Tabelle 36 Zusammenfassung der Antikörper	110
Tabelle 37 Vergleich der Multiplex-Systeme	119

Anhangsverzeichnis

Anhang 1 Pferdeseren 132
Anhang 2 Plasmidkarte (pEX-A128) 134
Anhang 3 Plasmidkarte (pEX-A258) 134
Anhang 4 Top 3 Antikörper CBDabs alle 135
Anhang 5 Kompetitiver Ansatz alle PBST..... 136
Anhang 6 Kompetitiver Ansatz alle Serum..... 137
Anhang 7 Restriktionsverdau Plasmide 138

Abkürzungsverzeichnis

1λ-RIDe	1λ-Reflectometric Interference Detection
AC	Adenylatcyclase
ADCC	<i>Antibody-dependent cell-mediated Cytotoxicity</i>
AG	Antigen
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APC	antigenpräsentierenden Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
ARMS	Ankyrin-rich membrane spanning protein
ATP	Adenosintriphosphat
BCA-Assay	Bicinchoninsäure-Assay
BSA	Bovines Serum Albumin
BtMG	Betäubungsmittelgesetz
C ₂ H ₃ KO ₂	Kaliumacetat
cAMP	Zyclisches Adenosinmonophosphat
CBD	Cannabidiol
CBN	Cannabinol
CDC	<i>Complement-dependent Cytotoxicity</i>
CH	Konstante Region (Schwere Kette)
CL	Konstante Region (Leichte Kette)
CREB	cAMP response element-binding protein
Cul n	<i>Culicoides nubeculosus</i>
Cul o	<i>Culicoides obsoletus</i>
DD	Double Discriminator
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodi-Imid
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Fab	Fragment antigen binding

Abkürzungsverzeichnis

Fc	Fragment crystallizable
FDA	Food and Drug Administration
Fv	Antigen-binding site
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GPCR	G-Protein-gekoppelten Rezeptor
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HAT	Hypoxanthin Aminopetrin Thymidin
HC	Schwere Kette
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRT	Histamin-Release Test
IBH	Insekten Biss Hypersensibilität
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
k _a	Assoziationsgeschwindigkeitskonstante
KCl	Kaliumchlorid
K _D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
k _d	Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante
KH ₂ P0 ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LB	lysogeny broth
LC	Leichte Kette
LoD	Nachweisgrenze
mAb	Monoklonaler Antikörper
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MFI	Mittlere Fluoreszenz Intensität
Mg(CH ₃ COO) ₂	Magnesiumacetat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	Haupthistokopabilitätskomplexe
N ₂	Stickstoff
NH ₂ P0 ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OD	Optische Dichte

Abkürzungsverzeichnis

pAb	Polyklonaler Antikörper
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PKA	Proteinkinase A
PMT	Photomultiplier
phospho-PKA-Substrat	Phospho-PKA-Substrat
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
PTM	Posttranslationale Modifikation
RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>
RPA	<i>reverse phase protein microarrays</i>
RPE	R-Phycoerythrin
RU	<i>reference units</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Natrium Dodecyl Sulfat
<i>Sf</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>
Sim v	<i>Simulium vittatum</i>
SPR	Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie
ssDNA	Einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
StGB	Strafgesetzbuch
StVO	Straßenverkehrsordnung
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TH-Zelle	T-Helferzelle
THC	Tetrahydrocannabinol
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VH	Variable Region (Schwere Kette)
VL	Variable Region (Leichte Kette)
WBE	<i>whole body extract</i>

1. Einleitung

1.1. Antikörper

1.1.1. Antikörpereigenschaften

Als erste Entdeckung von Antikörpern gelten die Beobachtungen von Emil von Behring und Shibasaburo Kitasato aus dem Jahre 1890. Diese konnten sehen, dass Versuchstiere nach Erstkontakt mit *Clostridium tetani* bei erneuter Exposition antibakterielle Bestandteile im Serum aufwiesen [1]. Kurz darauf, im Jahr 1891 konnte Paul Ehrlich zeigen, dass diese Bestandteile nicht nur gegen Bakterien, sondern auch gegen nicht-bakterielle Toxine gerichtet sein können [2]. Antikörper wurden in den folgenden Jahren eine humorale mediative Wirkung zugesprochen und die Eigenschaften der Antikörper wie ihre Morphologie, Spezifität sowie Sezernierung weitgehend charakterisiert.

Antikörper, oder auch Immunglobuline (Igs) sind Y-förmige Proteine, die aus vier Aminosäureketten aufgebaut sind. Die Grundstruktur klassischer Antikörper besteht aus jeweils zwei identischen leichten Ketten (engl. light chain, LC) mit einer Größe von 23 kDa und zwei schweren Ketten (engl. heavy chain HC) mit 53- 75 kDa [3]. Die leichten Ketten sind je in eine konstante Region (CL) und eine variable Region (VL) aufgeteilt. Die schweren Ketten bestehen je aus drei konstanten Regionen (CH1, CH2, CH3) und einer variablen Region (VH). CH1 und CH2 sind über die sogenannte Hinge-Region miteinander verbunden. Dabei handelt es sich um eine Polypeptid-Region, die dem Antikörper eine gewisse Flexibilität verleiht.

Die konstanten Regionen der leichten beziehungsweise der schweren Ketten sind innerhalb ihrer Aminosäuresequenz identisch [4].

Die variablen Regionen unterscheiden sich zwischen den Antikörpern, und sind abhängig vom potenziellen Bindungspartner. Es paaren jeweils eine LC mit einer HC und bilden so ein Heterodimer. Zwei Heterodimere bilden über Disulfidbrücken ein Immunglobulin (Siehe Abbildung 1).

Das Immunglobulin lässt sich in drei funktionale Kompartimente unterteilen: Zwei *fragment antigen binding* Domänen (Fab) und das *fragment crystallizable* (Fc).

Die Fab-Fragmente bestehen jeweils aus den CL und den VL der leichten Kette, sowie den VH und dem CH1 der schweren Kette, wobei die VH und die VL, also die variablen Regionen beider Ketten, für die Antigen-Bindung verantwortlich sind, und deswegen als

Antigenbindungsstelle (engl. *antigen-binding site* (fv)) bezeichnet werden. Durch die Hinge Regionen ist es sterisch für den Antikörper möglich, an je einem Fab-Fragment ein Antigen zu binden [5].

Die Fc-Domäne, bestehend aus den CH2 und CH3 Ketten, bindet an diverse Fc-Rezeptoren, und vermittelt so eine zytotoxische Immunantwort.

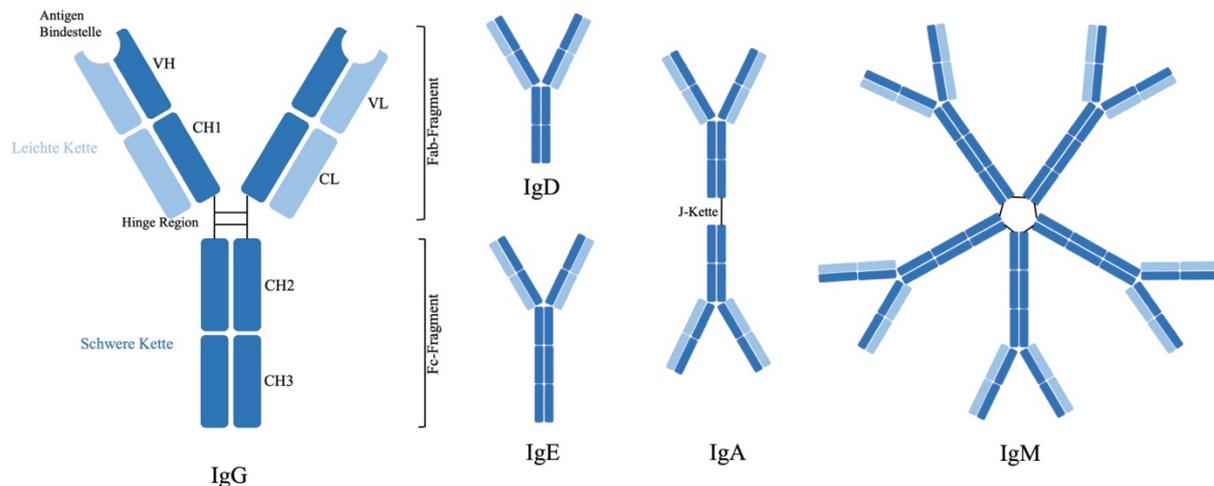


Abbildung 1 Schematische Darstellung der Antikörperklassen

Aufbau von Immunglobulinen mit schweren Ketten (CH; blau) und leichten Ketten (CL; hellblau). Variable Regionen (VL & VH) definieren Antigen Bindungsstelle. Zusammen mit CL1 und CH1 ergeben diese ein Fab-Fragment. Dieses ist über die Hinge Region mit Fc-Fragment (CH2 und CH3) verbunden. IgG, IgD und IgE liegen jeweils als Monomer vor, IgA als Dimer und IgM als Pentamer.

Die Aminosäuresequenz der Fab-Fragmente ist neben der dreidimensionalen Faltungsstruktur auch gleichzeitig für die Bindung der Antikörper an andere Strukturen verantwortlich [6]. Innerhalb der variablen Regionen finden sich sogenannte Hypervariable Regionen. Dabei handelt es sich um etwa 10 Aminosäuren lange Sequenzen, die schleifenförmige Strukturen bilden. Diese Regionen stellen die Antigenbindungsstelle dar, sodass die Aminosäuresequenz auch gleichzeitig die Bindungsspezifität bestimmt [3]. Den gesamten antigenspezifisch-bindenden Teil des Antikörpers bezeichnet man als Paratop. Dieses passt spezifisch auf das zu bindende Epitop (den Bereich der durch den Antikörper erkannt und gebunden wird) des Antigens. Bei nur minimalen Veränderungen des Epitops kann sich die Bindung und damit die Bindungsspezifität deutlich verändern. Man unterscheidet dabei zwischen der Affinität, der Bindung eines Antikörpers an ein Epitop eines Antigens, und der Avidität, der Summe der Bindung mehrerer Antikörper an verschiedene Epitope eines Antigens [7].

Immunglobuline kommen in verschiedenen Klassen vor. Diese unterscheiden sich kaum in ihrem Aufbau jedoch in ihrer Größe, Anordnung und Funktion im Organismus[3][8]. Im menschlichen Körper finden sich fünf verschiedene Antikörperklassen:

1. Das Immunglobulin G (IgG) ist dabei die am häufigsten im Organismus vorkommende Antikörperstruktur. Es kommt als Monomer in dem bisher beschriebenen Antikörperaufbau vor. IgG ist sowohl im Blut als auch in extravaskulären Bereichen zu gleichen Teilen zu finden, und spielt in der Abwehr gegen Mikroorganismen und Viruspartikel eine wichtige Rolle.
2. IgA tritt größtenteils als Dimer, verbunden durch Polypeptidketten sogenannte *joining chains* (J-Ketten) auf. Es ist unter anderem im Intestinaltrakt zu finden, wo es durch Bindung von IgA-Rezeptoren die Anlagerung von Pathogenen an die Epithelien verhindert. Des Weiteren findet man es in Tränenflüssigkeit und anderen Sekreten, wo es den gleichen Zweck erfüllt.
3. IgE findet sich nur in geringer Konzentration im Blut und wird mit allergischen Reaktionen assoziiert. Es kommt ausschließlich als Monomer vor. Im Gegensatz zu IgG besitzt das IgE-Molekül fünf konstante Regionen pro schwere Kette und hat damit eine Größe von etwa 190 kDa.
4. IgD ist dem IgG sehr ähnlich und liegt ebenfalls als Monomer vor. Seine Funktion ist nicht ausreichend geklärt, allerdings wurde es im respiratorischen Trakt und im Mukus nachgewiesen. Es wird zusätzlich vermutet, dass es dort durch Bindung an Immunzellen die antimikrobielle Wirkung stimuliert [9].
5. IgM ist mit 950 kDa das größte Immunglobulin und das erste bei der Immunantwort sezernierte. Es wirkt vor allem antimikrobiell. Das IgM ist ein Pentamer, und besteht aus fünf dem IgE ähnlichen Molekülen, welche über eine J-Kette miteinander verbunden sind. Es besitzt insgesamt zehn identische Antigen-Bindungsstellen, wodurch es hoch-avide Antigene binden und durch Zellen des Immunsystems, eliminieren lassen kann.

1.1.2. Immunsystem

Das Immunsystem schützt den Organismus vor eindringenden Antigenen, Toxinen, Krebszellen und Mikroorganismen wie Bakterien, Viren und Pilzen. Es unterteilt sich dabei in zwei wesentliche Antwortmechanismen, die angeborene und die erworbene Immunität.

Das angeborene Immunsystem besteht aus vier Kompartimenten. Dazu gehören die anatomische Abwehr durch Haut und Schleimhäute, die physiologische durch die Körpertemperatur und einem niedrigen pH-Wert, der endozytischen und der phagozytischen Abwehr, sowie der Entzündungsreaktion [10].

Wurden die anatomischen und die physiologischen Abwehrmechanismen durch ein Pathogen überwunden, so binden regulär vorhandene, körpereigene Immunzellen (Granulozyten, Monozyten und Makrophagen) an sogenannte *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) der Eindringlinge. Dabei handelt es sich um bei einer Vielzahl von Bakterien und Viren gut konservierten Strukturen wie Liposacchariden oder doppelsträngiger RNA. Diese werden von *pattern recognition receptors* (PRRs) auf verschiedenen subzellulären Kompartimenten, wie zellulären und endosomalen Membranen, dem Zytosol sowie als sekretierte Form im Blutkreislauf und extrazellulären Flüssigkeiten gebunden [11]. Dies führt entweder zur Lyse oder zur Phagozytose des eingedrungenen Stoffes.

Ist die Sofort-Abwehrreaktion nicht ausreichend, werden weitere Immunzellen zum Ort der Reaktion rekrutiert.

Dies geschieht durch die Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen, insbesondere Interleukin I (IL-1) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) [12]. Dabei spielen verschiedenste Zellarten eine wichtige Rolle.

Phagozyten, zu denen Makrophagen und Neutrophile gehören, phagozytieren, also nehmen Fremdstoffe und Mikroorganismen in sich auf und zerlegen diese durch verschiedene Mechanismen. Makrophagen haben dabei eine besondere Funktion, sie präsentieren verdaute Teile des Fremdkörpers auf ihrer Oberfläche. Die gleiche Funktion haben auch dendritische Zellen. Diese Zellen bilden die Brücke zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem.

Die Mechanismen der angeborenen Immunantwort sind Fremdstoff unspezifisch, greifen jedoch in die Auslösung der erworbenen beziehungsweise adaptiven Immunantwort ein. Diese wird wichtig, wenn das angeborene Immunsystem nicht in der Lage ist, den Fremdstoff zu eliminieren.

Die Hauptaufgabe der erworbenen Immunantwort ist zwischen körpereigenen und körperfremden Stoffen zu unterscheiden, spezifische Mechanismen zur Fremdstoff-Elimination zu entwickeln und eine langfristige Gedächtnis-Funktion aufzubauen, um bei einer erneuten Exposition mit dem Fremdstoff diesen spezifisch und schnell bekämpfen zu können.

Typische Zellen des erworbenen Immunsystems sind T-Zellen. Diese entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark, und reifen nach der Migration im Thymus. Sie zeichnen sich durch spezifische Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, den sogenannten T-Zell-Rezeptoren (TCRs), aus [13].

TCRs sind spezifisch und benötigen die Bindung zu einer antigenpräsentierenden Zelle (APC). Zu diesen gehören unter anderem Makrophagen und dendritische Zellen des angeborenen Immunsystems. APCs tragen auf ihrer Zelloberfläche Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHCs). Diese bestehen meistens aus Peptiden mit einer Größe von 6-30 Aminosäuren. MHCs können in zwei Gruppen unterteilt werden, MHC I und MHC II.

MHC I Zellen tragen endogene Moleküle, wohingegen MHC II Zellen die zerkleinerten exogenen Moleküle aus phagozytierten Stoffen tragen. Binden diese den TCR, so werden weitere für die Immunantwort wichtige Zytokine sezerniert.

Des Weiteren differenzieren T-Zellen in zytotoxische T-Zellen oder in T-Helferzellen (TH). Zytotoxische T-Zellen sind für die Zerstörung von Fremdkörpern wie Viren und Tumoren verantwortlich, indem sie im Zielort den programmierten Zelltod, also Apoptose einleiten. Die meisten zytotoxischen T-Zellen werden nach der Wirkung selbst phagozytiert, nur wenige bleiben als Gedächtnis-T-Zellen zurück [10].

Dahingegen können TH- Zellen Fremdkörper nicht direkt zytotoxisch oder phagozytierend angreifen. Nach ihrer Differenzierung durch die Bindung von MHC II sekretieren auch diese Zytokine, welche verschiedene Arten von TH-Zellen aktivieren. TH1 Zellen produzieren dabei Interferon-gamma (IFN γ), welches die Aktivität von bakteriziden und antiviralen Makrophagen erhöht. TH2 Zellen schütten Interleukine (IL-4, 5 und 13) aus was sowohl die IgE-Produktion, als auch die Ausschüttung von Basophilen und Mastzellen antreibt.

TH17 ist vor allem entzündungsfördernd, und wird mit chronischen Entzündungen in Verbindung gebracht.

Durch die Ausschüttung von Zytokinen durch TH1 Zellen wird ebenfalls die Differenzierung von B-Zellen angeregt. B-Zellen entstehen durch hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark, welches sie nach der Reifung verlassen. Sie tragen spezifische Antigen-Bindungs-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Im Gegensatz zu T-Zellen benötigen sie keine APCs, um ein Antigen zu binden. Binden sie ein Antigen in seiner nativen Form direkt, so proliferieren und differenzieren sie entweder in eine Antikörper sekretierende Plasma-Zelle oder alternativ in eine Gedächtnis-B-Zelle. Letztere sind sehr langlebig und exprimieren vermehrt Antigen-Rezeptoren, sodass bei erneuter Exposition gegenüber dem Antigen schnell

eine spezifische Immunantwort zur Verfügung steht. Plasma-Zellen hingegen sind sehr kurzlebig und produzieren hauptsächlich Antikörper gegen das Antigen. Nach der Immunantwort gehen sie in Apoptose.

Antikörper üben verschiedene Mechanismen auf die Abwehr aus. Zum einen opsonieren sie das Zielantigen (sowohl Bakterien als auch virusinfizierte Zellen und Tumorzellen), das heißt, sie binden es, um es für Phagozyten zur Elimination zu markieren. Auch bei der Neutralisation werden die Antigene gebunden und es bildet sich ein Immunkomplex.

Gleichzeitig aktivieren Antikörper das Komplementsystem, welches aus etwa 30 verschiedenen Plasmaproteinen besteht und sowohl bakteriolytische Eigenschaften besitzt als auch die Elimination der Immunkomplexe aus dem Blutkreislauf bewirkt.

Durch die B-Gedächtniszellen ist die Produktion spezifischer Antikörper bei Zweitkontakt schneller verfügbar, was zu einer schnelleren Eliminierung der Erreger und damit zu keiner Krankheitsausbildung führt. Dies ist das Prinzip der meisten Impfungen.

1.1.3. Antikörperherstellung

Der Mechanismus der körpereigenen Antikörperproduktion wird sich auch in der industriellen Antikörper-Produktion zu Nutze gemacht. Antikörper werden sowohl in der Medizin als auch in der Forschung verwendet und antigenspezifisch hergestellt. Dabei wird bei kompletten Antikörpern zwischen polyklonalen (pAb) und monoklonalen (mAb) Antikörpern unterschieden.

Polyklonale Antikörper sind heterogen, das heißt, sie binden an mehrere Epitope eines Antigens. Dadurch sind sie zwar unspezifischer, die Chance, dass sie das Antigen wirklich binden, ist jedoch umso höher [14].

Bei polyklonalen Antikörpern wird das Immunogen Versuchstieren wie Kaninchen, Ratten oder Mäusen verabreicht. Ein Immunogen ist ein Stoff, zum Beispiel ein Polypeptid, Polysaccharid, Glykoprotein oder Lipoprotein, der eine Immunantwort im Körper hervorruft. Im Gegensatz dazu ist ein Antigen ein Stoff, an den Antikörper binden. Jedes Immunogen ist ein Antigen, aber nicht jedes Antigen ist ein Immunogen [15].

Die Darreichungsform spielt bei der Verteilung des Antigens im Körper eine große Rolle. Es werden je nach Art des Immunogens intra-arterielle, intra-lymphatische, subkutane, intra-

muskuläre oder auch intra-dermale Wege gewählt. Ziel dabei ist es, eine Immunantwort auszulösen, die sowohl eine hohe Antikörperproduktion (Quantität) als auch affine Antikörper (Qualität) sicherstellt. Durch Produktion von B-Gedächtniszellen werden nach erneuter Gabe des Antigens Antikörper hergestellt und in die Blutbahn sezerniert. Dem Versuchstier wird im Anschluss Blut entnommen und die Antikörper werden über Affinitätschromatographie aufgereinigt [16].

Monoklonale Antikörper binden alle an ein Epitop eines Antigens. Dadurch sind sie im Vergleich zu polyklonalen Antikörpern Antigen-spezifischer.

Monoklonale Antikörper werden über die sogenannte Hybridoma- Technologie hergestellt [17] Dazu werden Mäuse mit dem Antigen, gegen das die Antikörper gerichtet sein sollen, immunisiert. Die Maus produziert antigenspezifische Antikörper-produzierende B-Zellen (Plasma-Zellen), welche ihr aus der Milz entnommen werden. *In vitro* werden die Plasma-Zellen mit kanzerogenen Myeloma Zellen verschmolzen, es entstehen sogenannte Hybridoma-Zellen.

Um auf eine erfolgreiche Fusion zu überprüfen, wird sich das Fehlen der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) der Myeloma-Zellen zu Nutze gemacht. Nach Verschmelzung werden die Zellen in Hypoxanthin Aminopetrin Thymidin (HAT) Medium inkubiert. Unverschmolzene Myeloma-Zellen können dieses nicht verwerten, sodass die Nukleotidsynthese geblockt wird und die Zelle stirbt. B-Zellen besitzen das HGPRT-Gen, haben aber eine sehr kurze Lebensspanne und sterben ebenfalls nach kurzer Zeit ab. Nur die fusionierten B-Zell-Myeloma Hybride vereinen die Eigenschaften beider Zellen und können im Medium wachsen.

Die Zellen werden vereinzelt und in Wells gegeben. Jede einzelne Zelle stellt genau eine Art von Antikörper her, sodass exakte Antikörper-Klone pro Well entstehen, die jeweils genau ein Epitop des Antigens binden. Die produzierten Antikörper können durch zum Beispiel Ionen-Austausch- oder Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt werden.

Eine weitere Methode zur Herstellung monoklonaler Antikörper ist der Einsatz sogenannter Phage-Displays. Das Prinzip des Displays beruht auf Bakteriophagen, also Viren, die Bakterien befallen. Als Modellbeispiel dazu wird die M13 Phage genutzt, welche *E. coli* befällt [18]. Das Genom der M13 Phage enthält 9 Gene, welche für 11 Proteine codieren. 5 dieser Proteine dienen der Phage als Coating Proteine. Eins dieser Proteine, das G3P, bindet an den F Pilus

eines *E.colis*, wodurch es nah genug an die Zelle herankommt, um den TolA Rezeptor zu binden. Durch Tol Proteine wird die Depolymerisierung der Phagenhülle und die somit folgende Translokation des Phagengenoms als Einzelstrang-DNA (ssDNA) in die *E.coli* Zelle initiiert.

Nach Infektion der Zelle wird das einzelsträngige Genom der Phage durch die Host-Zelle in doppelsträngige DNA konvertiert. Der Replikations-Mechanismus der Host-Zelle wird genutzt, um die DNA zu vervielfachen, und weitere Phagen herzustellen und zu sezernieren. Wird in das Genom der Phagen die Sequenz für Single-Chain-Antikörper-Fragmente im Bereich der Hüll-kodierenden Genabschnitte eingebracht, so exprimieren die Phagen diese nach Sezernierung aus *E. coli*, und präsentieren diese auf ihren Oberflächen. Es lassen sich damit viele verschiedene Antikörper-Fragmente, zum Beispiel Fab-Fragmente herstellen und sogenannte Phage-Display Libraries erstellen [19]. Antigene können bei Screening Verfahren auf ihre Bindung zu den Antikörperfragmenten untersucht werden und die am besten bindenden Antikörper können so aus einer Vielzahl ermittelt werden.

1.1.4. Antikörpernutzung

Die Nutzung von Antikörpern ist in vielen naturwissenschaftlichen Tätigkeitsbereichen von großer Bedeutung. Dazu gehören neben der Nutzung von Antikörpern als Therapeutika vor allem Utilisierung von Antikörpern als Biosensoren in der medizinassoziierten Diagnostik oder der Forschung.

Für die therapeutische Anwendung von monoklonalen Antikörpern wurden 2017 bereits 61 verschiedene Moleküle von der FDA zugelassen [20]. Dies lässt sich wohl vor allem auf die Humanisierung der Antikörper zurückführen. Das bedeutet, dass zum Beispiel die konstante Fc-Region eines murinen Antikörpers durch eine humane ersetzt wird und so der Antikörper mit Rezeptoren in menschlichen Zellen interagieren kann, gleichzeitig aber die variablen Bindungsregionen des murinen Antikörpers behält. So ist es möglich, die Antikörper bis zu 90 % zu humanisieren, was die Kompatibilität mit menschlichen Zellen erheblich steigert [21]. Therapeutische Antikörper werden zumeist im Bereich der Immunologie, Hämatologie oder auch der krebsassoziierten Krankheiten eingesetzt. Dabei wird die natürliche Wirkweise von Antikörpern genutzt, die in verschiedene Signalwege eingreift. Zum einen wird sich das Prinzip der Neutralisation zu Nutze gemacht [22]. Durch spezifische Bindung an Oberflächenproteine und Rezeptoren auf Zellen können die Antikörper diese blockieren und so den Signalweg

stören. Ist dies z.B. in Tumorzellen der Fall, so ist das Wachstum und die Proliferation der Zelle gestört, was zur Apoptose führt.

Zum anderen durch die *Antibody-dependent cell-mediated Cytotoxicity* (ADCC). Durch Bindung des Antikörpers an spezifische Antigene auf Zelloberflächen rekrutieren diese Immuneffektorzellen wie Makrophagen oder NK-Zellen, sodass eine Kaskade zur Lyse der gebundenen Zellen aktiviert wird.

Des Weiteren kommt es zur *Complement-dependent Cytotoxicity* (CDC). Durch Bindung des Antikörpers-Antigen-Komplexes an den C1-Komplex wird das Komplementsystem des Immunsystems aktiviert, was die Membran der Zelle angreift und dadurch zur Zellyse führt.

Neben dem direkten Angriff der Zielzellen werden Antikörper ebenfalls zum Transport von konjugierten Stoffen wie Radioisotopen, Toxinen oder Zytokinen genutzt, um eine zielgerichtete Bindung an die Tumorzellen und die damit einhergehende Zerstörung dieser zu ermöglichen.

Antikörper werden außerdem als diagnostisches Mittel genutzt. Dazu gehören unter anderem die Detektion von Infektionen, Allergien oder die Messung von Hormonen oder anderen Biomarkern in Geweben oder Körperflüssigkeiten. Damit einhergehend werden Antikörper als Teil eines Biosensors verwendet.

1.2. Biosensor-Technologien

Bei einem Biosensor wechselwirkt der Analyt mit dem biologischen Anteil der Messmethode, wobei die gemessene Interaktion in ein Signal umgewandelt wird [23].

Wichtig für die Funktion eines antikörperbasierten Biosensors ist neben den Antikörpereigenschaften wie Sensitivität, Selektivität und Stabilität, der Aufbau des Testsystems. Dabei können Antikörper verschiedene Rollen innerhalb dieses Testsystems einnehmen. Der Antikörper kann dabei sowohl als Fängermolekül als immobilisierte Festphase des Systems dienen, als auch als Detektor durch Markierung durch ein Enzym oder ein Fluorophor.

Der Einsatz von Antikörpern in der Bioanalytik ist vielseitig, und in verschiedensten Methoden bereits etabliert und wird dort standardmäßig verwendet.

1.2.1. Immobilisierung

Wird der Antikörper auf der Oberfläche des Biosensors verwendet, so ist die Orientierung und die Homogenität der Immobilisierung von großer Bedeutung [24].

Es gibt verschiedene Strategien zur Immobilisierung von Antikörpern auf funktionalisierten Oberflächen [25]. Dabei wird häufig eine kovalente Bindung durch reaktive Gruppen wie Hydroxyl-, Carboxyl- oder Amino-Gruppen mit dem Antikörper genutzt. Primäre Amine des Antikörpers bilden zum Beispiel mit Succinimid-Estern, welche durch Reaktion von Carboxylgruppen mit 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodi-Imid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) entstehen, eine kovalente Bindung. Allerdings ist die Bindung über Amingruppen stets ungerichtet und nur wenig homogen, durch das Vorhandensein von Lysin in den Antikörpern, welches ebenfalls reaktive Amin-Gruppen enthält.

Eine weitere Variante der Immobilisierung kann durch Affinitäts-Bindung erreicht werden. So können Antikörper, die mit einem Biotin konjugiert sind, an Neutravidin, Avidin oder Streptavidin gebunden werden, womit die Oberflächen funktionalisiert wurden.

1.2.2. Singleplex

Etablierte Messmethoden lassen sich aufgrund der Anzahl gleichzeitig bestimmter Parameter unterscheiden. Singleplex-Analysen beschreiben den Nachweis eines Analyten in einer gegebenen Matrix in einer Probe [26].

1.2.2.1. ELISA

Der am besten etablierte und am häufigsten verwendete Singleplex Assay ist der *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Dieser Assay ist eine einfache, aber sensitive Methode, um Analyten quantifizieren zu können. Voraussetzung dafür ist das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern [27]. ELISA findet breite Anwendung im Bereich der medizinischen Diagnostik, Lebensmittelkontrolle oder auch dem Nachweis von Umweltkontaminanten, sowie Drogen in Blut und anderen Matrices [28]. Außerdem lassen sich verschiedenste Proteine wie Zytokine, Phosphoproteine und rekombinante Proteine leicht nachweisen. Das Prinzip beruht dabei auf der Messung der Interaktion zwischen Antikörper und Antigen innerhalb eines Wells einer 96-Well Mikrotierplatte [29]. Die Bindung kann zum Beispiel kolorimetrisch oder fluoreszent messbar gemacht werden. Dafür wird die optische Dichte (OD) des Flüssigkeitsanteils innerhalb des Wells photometrisch bestimmt. Diese ist nach zum Beispiel kolorimetrischer Reaktion proportional zur Menge an gebundenem Analyten. Durch Verwendung einer Standardgeraden mit Referenzmaterial im geeigneten Konzentrationsbereich ist es so möglich, quantitative Aussagen treffen zu können.

Es lassen sich verschiedene Assay-Aufbauten des ELISAs unterscheiden (siehe Abbildung 2).

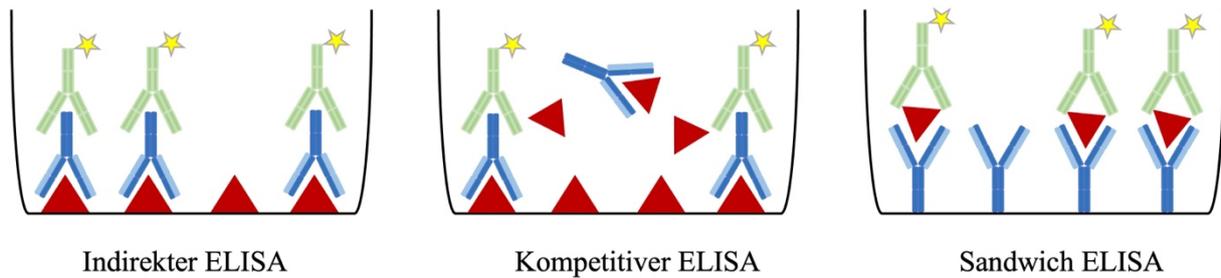


Abbildung 2 Vergleich ELISA Assay Formate

Vergleich der gängigen ELISA Formate mit Antigen (rotes Dreieck), primärer Antikörper (blau) und sekundär markierter Antikörper (grün)

Beim indirekten ELISA werden die Antigene auf der Oberfläche des Wells immobilisiert. Nachdem mit dem Probenmaterial inkubiert wurde, wird der vom Antigen gebundene spezifische Antikörper messbar gemacht zum Beispiel durch eine weitere Inkubation mit einem bindenden Antikörper, welcher enzymatisch, durch Alkalische Phosphatase (AP), gelabelt wurde und durch ein geeignetes Substrat einen Farbumschlag erzeugt. Dieser Farbumschlag lässt sich photometrisch bestimmen. Der Messwert ist im linearen Bereich proportional zum gebundenen Antikörper im Probenmaterial.

Bei kompetitiven ELISA wird das Antigen auf der Oberfläche des Wells immobilisiert. Ziel ist der Nachweis vom gleichen Antigen im Probenmaterial. Das Probenmaterial wird im Well mit dem Antikörper inkubiert. Anschließend wird die Menge an gebundenen Antikörper am immobilisierten Antigen gemessen. Auch hier wird dies über einen weiteren gelabelten Antikörper erreicht. Um die Konkurrenz durch das im Probenmaterial vorhandene Antigen zu sehen, wird das Messsignal mit der Kontrollprobe ohne freies Antigen verglichen. Ist im Probenmaterial Antigen enthalten, so sinkt das gemessene Signal, da die spezifischen Antikörper sowohl immobilisiertes als auch freies Antigen gebunden haben.

Der Antikörper Sandwich-ELISA ist der am weitesten verbreitete ELISA, da die Sensitivität um ein Vielfaches höher ist als bei den Antigen-gebundenen. Hierbei wird der Fänger-Antikörper direkt immobilisiert. Wird mit dem Probenmaterial inkubiert, so bindet das darin enthaltene Antigen an die immobilisierten Antikörper. Durch Inkubation mit einem weiteren spezifischen Nachweis-Antikörper, sowie dem Nachweis durch einen gelabelten Antikörper, kann die Konzentration des Antigens bestimmt werden. Zu beachten ist bei diesem Aufbau, dass der Fänger-Antikörper und der Nachweis-Antikörper an verschiedene Epitope des Antigens binden, da sie sonst gegenseitig die Bindung behindern würden.

Obwohl der ELISA eine robuste Methode ist, finden sich dennoch Limitierungen. Die Anzahl der aus einer Probe nachweisbaren Analyten liegt pro Well bei eins, das heißt, dass sehr viel Probenvolumen nötig ist, um in einer Probe mehrere Analyten nachzuweisen. Gleichzeitig steigt nicht nur der Aufwand, sondern auch das zu verwendende Material wie Antikörper, Puffer oder Enzymsubstrat.

1.2.3. Multiplex

Die gleichzeitige Detektion mehrerer Analyten aus einer Probe bezeichnet man als multiplexe Detektionsverfahren. Dazu sind bereits mehrere Verfahren, sowohl auf planaren Oberflächen als auch auf Beads, etabliert. Die Methoden unterscheiden sich hauptsächlich in der Immobilisierung sowie in der Detektion der Bindung.

1.2.3.1. Mikroarray

Mikroarrays sind ein weit genutztes planares Format, mit dem die gleichzeitige Detektion von bis zu mehreren Tausend Analyten möglich ist. Sie reichen in der Anwendung von Protein- und Peptidarrays über Nukleotidarrays hin zu ganzen Zellarrays [30]. Dementsprechend reicht das Anwendungsspektrum neben medizinischen Fragestellungen, wie der Krankheitsdiagnostik, dem Allergenscreening und der Detektion von Biomarkern, auch über Lebensmittelkontrolle und umwelttoxikologische Schwerpunkte hinaus [31]. Die Funktionalität von Mikroarrays lässt sich in drei Gruppen beschreiben [32]. Analytische Mikroarrays können als Screeningverfahren gesehen werden. Die Analyten wie Peptide, DNA oder Antikörper, werden mit hoher Dichte auf dem Substrat, welches von Glasslides über Membranen oder auch Multititerplatten reicht, aufgebracht. Durch Inkubation mit der Probenlösung wird die Bindung zu spezifischen Bindern gemessen.

Auf funktionellen Mikroarrays hingegen werden Analyten wie ganze Proteine aufgebracht. So werden nach Probeninkubation die Bindeeigenschaften der nativen Proteine untersucht, um so deren Bindung an andere Proteine, kleine Moleküle oder auch DNA zu zeigen. Die aufgetragenen Proteine lassen sich so in ihren natürlich vorkommenden Faltungsstrukturen aufbringen, was die natürlichen Bindungseigenschaften und die damit resultierende Funktionalität besser darstellt.

Des Weiteren werden sogenannte *reverse phase protein microarrays* (RPA) hergestellt. Dabei werden keine aufgereinigten Einzelanalyten auf den Glasslide aufgebracht sondern das gesamte Spektrum an Proteinen aus dem rohen Lysat einer Zellkultur, eines Gewebes oder eines

kompletten Organismus. Vorteil dieser Methode ist die Analyse der Zusammenspiele der einzelnen Analyten als Komplex mit dem Probenmaterial [33].

Die Untersuchung mittels Mikroarrays lässt sich in zwei Schritte aufteilen. Als erstes müssen die Analyten aufgetragen werden.

Mikroarrays bestehen zumeist aus einem Glasslide mit einer funktionalisierten Oberfläche mit zum Beispiel reaktiven Epoxy- oder Aldehydgruppen [34]. Die zu untersuchenden Analyten werden auf die Glasslides gespottet. Dafür stehen Kontakt- und Nicht-Kontaktverfahren zur Verfügung. Beide Dispensionsverfahren werden maschinell gesteuert. Beim Kontaktpotting werden die Analyten über sogenannte Pins mit Hilfe von Kapillarkräften aufgenommen. Die Abgabe der Analyten erfolgt durch Aufsetzen der Pins auf den Glasslide.

Beim Nicht-Kontaktverfahren erfolgt die Probenaufnahme über ein Vakuum. Die Probenabgabe erfolgt über einen Piezzo-Kristall. Dieser ist elektrisch ansteuerbar und verformt sich je nach angelegter Spannung. Dadurch entstehen periodische Schwingungen des Kristalls, welche zu einer gleichmäßigen Tropfenabgabe der Analyten führen. Das Muster der Probenaufbringung, sowie die eventuelle Unterteilung in Subarrays ist vorher zu beachten und an die jeweiligen Anforderungen des experimentellen Aufbaus anzupassen.

Die Mikroarrays können auf verschiedenen Wegen prozessiert werden. Je nach adressierter Fragestellung und nach Anzahl der Analyten und Proben ist eine einheitliche Inkubation des gesamten Arrays möglich. Dazu kann eine automatisierte Hybridisierstation verwendet werden. Mit dieser wird unter konstantem Fluss die Probe über den Array gegeben, sodass sämtliche Bereiche des Slides unter gleichen Bedingungen mit einer Probe inkubiert werden können.

Alternativ ist die Verwendung verschiedener Aufsätze für eine manuelle Inkubation der Glasslides möglich. Dabei kann der Slide in bis zu 16 Subarrays unterteilt werden, die allesamt den gleichen Probenauftrag beinhalten, sodass eine parallele Inkubation von 16 verschiedenen Proben möglich ist. Der Probenauftrag, das Waschen der Slides und weitere Inkubationen erfolgen dabei händisch.

Für die Detektion der auftretenden Bindung werden zum Beispiel fluoreszenz-markierte Antikörper verwendet. Diese sind gegen den bindenden Bestandteil in der Probe gerichtet. Mit Hilfe eines Fluoreszenz-Scanners werden die Glasslides digitalisiert und die Fluoreszenzintensität jedes Spots gemessen. Damit erhält man pro Spot einen Endpunkt-Messwert.

1.2.3.2. Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie

Die Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (engl. *surface plasmon resonance spectroscopy* (SPR)) ist eine Methode, die die labelfreie Detektion von Bindungen ermöglicht. Dafür wird Fluoreszenz-Markierung benötigt. Vorteil dieser Art der Detektion ist, dass eventuelle Reporter-Moleküle die Bindung nicht sterisch behindern oder sogar die Struktur des Binders ändern können, sodass die Bindung viel mehr einer nativen Bindung entspricht [35].

Das SPR gilt als Goldstandard in der Biochemie wenn es um Bindungsanalysen und Bindungscharakterisierung geht. Das liegt neben der labelfreien Detektionsweise an der hohen Sensitivität und Versatilität [35]. So lassen sich neben Antikörper-Antigen-Bindungen zum Beispiel auch Liganden-Rezeptor und Enzym-Substrat Reaktionen messen.

Das Prinzip beruht auf dem evaneszenten Feld. Dieses entsteht durch die Einstrahlung von Licht aus einem optisch dichteren Medium im Winkel α auf eine Grenzfläche eines optisch weniger dichten Mediums. Der Lichtstrahl wird total reflektiert, wobei am Reflexionspunkt durch Strahlungsenergie ein elektrisches Feld entsteht.

Die Analyten werden auf Gold-Chips immobilisiert. Die Goldschicht mit einer Dicke von etwa 40-50 nm [36] dient der Verstärkung des evaneszenten Feldes. Die freien Elektronen werden während der Totalreflexion angeregt (Oberflächenplasmon) [37]. Je stärker das evaneszente Feld ist, desto sensitiver können Bindungen bestimmt werden.

Die zu messenden Proben werden über ein Fließsystem auf den Gold-Chip geleitet [38]. Bei gängigen Systemen gibt es drei bis vier Flusszellen, durch die verschiedene Proben über den Chip gegeben werden können. Polarisiertes, monochromatisches Licht wird durch ein Prisma gebündelt und auf den Chip gestrahlt. Im Einfallswinkel α kommt es zur Totalreflexion an der Grenzfläche und es bildet sich das evaneszente Feld aus. Durch die Bindung vom immobilisierten Analyten und Probenbestandteil ändert sich der Brechungsindex und somit der Einfallswinkel, unter dem das Minimum der Totalreflexion bestimmt wird, welcher von Detektor aufgenommen wird.

Die Differenz zwischen den Einfallswinkeln wird als *reference units* (RU) angegeben und ist direkt proportional zur Menge an gebundenen Probenbestandteilen.

Werden die RUs gegen die Zeit aufgetragen, so ergibt sich auch hier ein Kurvenverlauf, mit dem eine kinetische Auswertung der Bindung möglich ist.

1.2.3.3. bScreen

Das bScreen vereint Eigenschaften des Mikroarray Assays mit der labelfreien Detektion des SPR. Der Glasslide, auf dem die Analyten immobilisiert wurden, wird unter konstantem

Flüssigkeitsfluss mit gesetztem Volumen und Geschwindigkeit mit der Probe inkubiert. Die dabei auftretende Bindung von Probenbestandteilen an den einzelnen Spots wird aufgezeichnet. Das Gerät basiert auf dem Prinzip der 1λ -Reflectometric Interference Detection (1λ -RIDE). Monochromatisches Licht wird dabei konstant auf den Slide gestrahlt. Mit Bindung der Bestandteile aus den Proben an die Spots kommt es zur Änderung der Oberflächendicke und einer daraus resultierenden Änderung des zurückstrahlenden monochromatischen Lichtes. Das Gerät macht über die Messzeit Aufnahmen des kompletten inkubierten Feldes. Durch die graphische Auswertung dieser Daten ist die Generierung eines Kurvenverlaufes möglich, der die spezifische Bindung der Probe an jeden Spot zeigt und so eine kinetische Auswertung ermöglicht.

1.2.3.4. Bead-basierte Methoden

Bead Technologien basieren auf kleinen Polysterolkugeln, sogenannten Beads. Diese sind mit einer funktionalisierten Oberfläche gecoatet, zumeist mit Epoxy- oder mit Avidingruppen. Der Analyt kann dadurch auf der Bead-Oberfläche immobilisiert werden.

Besonderheit einiger Beads ist, dass sie magnetisch sind. Sie liegen in Suspension vor, können aber durch eine magnetische Halterung an die Wand ihres Reaktionsgefäßes gezogen werden, sodass ein Lösungswechsel vollzogen werden kann. Dies ermöglicht ihre Verwendung in einem Assay. Man nennt dies auch einen *in solution* ELISA.

Die Firma Luminex entwickelte magnetische Beads mit einem Durchmesser von durchschnittlich $5,5\ \mu\text{m}$, welche zwei interne Fluoreszenz-Farbstoffe innehaben. Der eine emittiert im roten Wellenlängenbereich, der zweite Farbstoff im infraroten [39]. Durch ein spezifisches Mischverhältnis der beiden ist es möglich, zwischen verschiedenen Beads zu diskriminieren. Es gibt 500 verschiedene Mischverhältnisse, welche als Bead Regionen bezeichnet werden. So ist es möglich, anders als beim *in solution* ELISA, bei dem nur im Singleplex gemessen werden kann, bis zu 500 Regionen mit verschiedenen Analyten simultan mit einer Probe zu inkubieren, und dadurch auf mehrere Parameter gleichzeitig zu testen.

Die Analytenbehandlung und die Probeninkubation erfolgt in einem Well einer 96 oder 384-Well Platte, sodass nur ein geringes Probenvolumen von minimal $50\ \mu\text{L}$ benötigt wird. Der Lösungswechsel und die Waschschrte erfolgen über magnetische, automatisierte Waschstationen, sodass sämtliche Proben analog behandelt werden können.

Die Beads werden als Suspension aufgenommen und ähnlich einem Durchflusszytometer behandelt (siehe Abbildung 3). Es erfolgt eine Einzelbetrachtung der Beads. Sind Agglomerate von mehreren Beads vorhanden, so werden diese von der Messung ausgeschlossen.

Zur Detektion einer möglichen Bindung trägt der Detektionsbinder, meist ein Antikörper, ein R-Phycoerythrin (R-PE). Dies ist ein Fluorophor, welches bei 488 bis 561nm anregbar ist und bei 578 nm emittiert.

Die optische Detektion der Proben erfolgt über zwei Laser. Der rote Laser, der sogenannte Klassifizierungs-Laser, regt die Bead internen Farbstoffe bei einer Wellenlänge von 635 nm an. Der grüne Laser, der Reporter-Laser, hingegen regt die an die Analyten gebundenen Fluorophore bei 532 nm an. Über Photodioden Detektoren werden die Emmissions-Intensitäten gemessen. So wird für jeden Bead im Well sowohl die Regions-Zuordnung als auch die Fluoreszenz-Intensität gleichzeitig bestimmt. Es werden als Ausgangseinstellung mindestens 100 Beads pro Region vermessen.

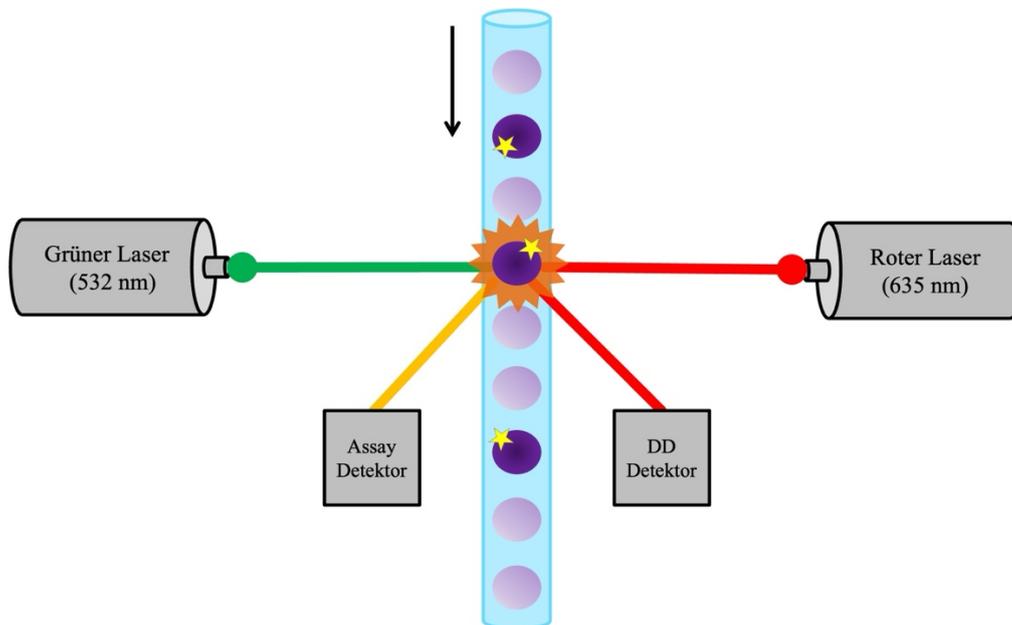


Abbildung 3 Schematische Darstellung Luminex

Beads werden im Fließkanal analysiert. Der rote Laser (635 nm) mit DD-Detektor erlaubt Zuordnung der Bead Region, der grüne Laser (532 nm) mit Assay-Detektor misst Fluoreszenz-Intensität von möglicherweise gebundenem R-Phycoerythrin

Durch die Vielseitigkeit des Versuchsaufbaus gibt es neben den selbst entwickelten Assays bereits eine Vielzahl an unterschiedlichen kommerziell erhältlichen Kits. Besonders im Bereich der Diagnostik, als auch im Bereich des Monitorings von klinischen Studien ist der Einsatz durch die Anzahl gleichzeitig bestimmbarer Parameter, sowie die Diversität verwendbarer

Matrizes (Serum, Plasma [40], Urin [41], Cerebrospinalflüssigkeit [42], etc.) oftmals angewandt und publiziert worden.

1.3. Biologische Fragestellungen

Die Charakterisierung und Validierung der Antikörper geht der Anwendung als Biosensor voraus und ist ein essenzieller Bestandteil [43]. Üblicherweise werden für die Charakterisierung etablierte Methoden wie ELISA, SPR oder Mikroarray angewandt.

Es wurden verschiedene Fragestellungen mit biologischer Relevanz ausgewählt, um die Antikörpercharakterisierung und die Antikörpervalidierung darzustellen.

1.3.1. Antikörpercharakterisierung

Die Antikörpercharakterisierung beschreibt die gegebenen Eigenschaften des verwendeten Antikörpers. Dazu gehören neben dem Organismus, dem er entstammt, auch seine Art, also ob es sich um Antikörperfragmente, monoklonale Antikörper oder um polyklonale Gemische handelt. Binden sämtliche Antikörpermoleküle desselben Gemisches das gleiche Epitop des Antigens, so ist die Sequenz dieses wichtig. Gleichzeitig auch, ob es sich um ein lineares oder um ein strukturelles Epitop handelt. Ebenso sollte die Affinität und dazugehörige kinetische Parameter mit der eben dieses Epitop gebunden wird, gemessen werden.

1.3.1.1. Phospho-PKA-Substrat Antikörper

Proteinkinasen sind Enzyme, die Proteine postranslational phosphorylieren können [44]. In Säugern kodieren etwa 2 % des Gesamtgenoms für Proteinkinasen, was translatiert einer Anzahl von 518 verschiedenen humanen Kinasen entspricht. Diese werden auf Grund ihrer Targetspezifität und der Homologie ihrer katalytischen Untereinheit in verschiedene Klassen eingeteilt [45][46][47]. Dabei ist die am besten charakterisierte Kinase der AGC-Klasse, zu der 60 verschiedene Kinasen gehören, die Proteinkinase A (PKA) oder auch cAMP-abhängige Proteinkinase. Sie phosphoryliert spezifisch Serin und Threonin Motive der Form RRxS/T [48]. Sie ist nachweislich involviert in wichtigen biologischen Prozessen, wie dem Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel [49], der Angiogenese [50] und der Apoptose [51].

Die Aktivierung der Proteinkinase A wird durch die Bindung eines extrazellulären Liganden an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR) initiiert. Dieser besteht aus sieben Transmembran-Helices, welche an ein G-Protein gekoppelt sind, das seinerseits aus der $G\alpha$, $G\beta$ und $G\gamma$ -Untereinheit besteht. Durch Ligand-Rezeptorbindung dissoziiert $G\alpha$ vom G-

Proteinkomplex ab. Dabei ist die Wirkung der $G\alpha$ Untereinheit abhängig von ihrer Form. Man kann zwischen $Gs\alpha$ und $Gi\alpha$ unterscheiden, wobei erstere stimulierend und letztere inhibierend auf Adenylatcyclasen (AC) wirken. Bindet $Gs\alpha$ die AC, so wird die Umwandlung von Adenosintriophosphat (ATP) zu zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) katalysiert. Jeweils zwei cAMP-Moleküle aktivieren ihrerseits die PKA durch Bindung ihrer regulatorischen Untereinheiten, wodurch es zur Dissoziation der katalytischen Untereinheiten kommt [52].

N-Terminal besitzt die katalytische Untereinheit eine Bindungsdomäne für ATP, C-Terminal eine Bindungsstelle für das Protein mit Targetmotiv. Die PKA bindet an diese und katalysiert den Übertrag des γ -Phosphats vom ATP auf das Targetprotein.

Da die PKA in diversen biochemischen Prozessen mitwirkt, ist der Nachweis ihrer Aktivität an verschiedensten Stellen von Interesse. Phosphorylierungen haben durch punktuelle Ladungsänderungen und sich daraus ergebender Änderungen der Proteinfaltung erheblichen Einfluss auf die Struktur des Proteins. Die Wechselwirkungen und das Bindungsverhalten des Proteins mit anderen Molekülen, Proteinen oder Nukleinsäuren ändern sich. Um Phosphorylierungen an Bindemotiven der PKA nachzuweisen, wird ein monoklonaler Antikörper verwendet, der spezifisch Motive der Form RRxpS/T bindet. Dieser phospho-PKA-Substrat Antikörper wird in der PKA-assoziierten Forschung oftmals zur Identifizierung von PKA-Targets und Kontrolle des Phosphorylierungsstatus verwendet. Dabei erkennt der Antikörper mehrere Epitope, was eine genauere Untersuchung seiner Bindeeigenschaften nötig macht, und er deswegen als Modell-Antikörper ausgewählt wurde.

1.3.1.1.1. Epitopemapping

Epitopemapping beschreibt die genaue Untersuchung eines Antigens, genauer seiner Bindestelle zu einem Antikörper. Historisch wurden dafür die Antigene enzymatisch verdaut oder anderweitig chemisch gespalten, um kleine Fragmente nach Bindungen untersuchen zu können [53][54]. Heutzutage werden zu untersuchende Proteine zumeist als Peptide synthetisiert. Epitope liegen in Proteinen meist in zwei Formen vor: als lineares Epitop und als diskontinuierliches Epitop [55][56]. Beim linearen Epitop liegt die Erkennungssequenz fortfolgend vor, sodass eine Antikörperbindung nur von der Primärstruktur abhängig ist. Wenn das Protein im nativen Zustand vorliegt, ist jedoch auch die Möglichkeit gegeben, dass das Epitop durch Proteinfaltung nicht zugänglich ist und es zur Antikörperbindung erst denaturiert werden muss. Beim diskontinuierlichen Epitop hingegen sind die zu erkennenden

Aminosäuren nicht nebeneinanderliegend, sodass die Faltung des Proteins, durch z.B. posttranslationale Modifikationen, die Aminosäuren des Epitops erst räumlich zusammenführt und die Antikörperbindung erfolgen kann.

Lineare Epitope lassen sich durch Synthese von überlappenden Peptiden erschließen. Die Peptide enthalten dabei etwa 9-15 der Aminosäuren von Interesse, zuzüglich eventuellen Tags zur Immobilisierung oder zum Nachweis. Ist das Epitop bereits bekannt, so können über *site-directed* Mutagenese einzelne Aminosäuren in diesem ausgetauscht werden, um so die Einflüsse der einzelnen Aminosäuren in Bezug auf die Bindungsstärke hin untersucht werden kann [57].

Zu den gängigen Methoden der Analyse gehören der ELISA oder auch Mikroarrays.

Die Identifikation diskontinuierlicher Epitope ist aufwändiger und kann z.B. durch den Einsatz von randomisierten Peptid-Libraries erreicht werden [58].

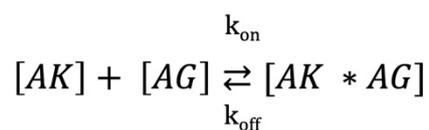
1.3.1.1.2. Kinetische Analyse

Die kinetische Charakterisierung von Antikörpern beschreibt die Bindeeigenschaften dieser zu seinem Epitop.

Ein typischer kinetischer Kurvenverlauf folgt zwei Phasen. In der ersten Phase wird der Antikörper über die immobilisierten Antigene gegeben (auch andersherum möglich). Dabei steigt das Signal an, da es zur Ausbildung von Antikörper-Antigen-Komplexen kommt. Diese Bindung erreicht bei Sättigung ein Plateau. Man nennt dies die Assoziationsphase.

In der zweiten Phase wird mit dem systemischen Puffer gespült. Während dieser Dissoziationsphase lösen sich teilweise die Bindungen zwischen Analyten und Probe. Je nach Stärke der Bindung ist der Kurvenverlauf mehr oder weniger flach [59].

Die verschiedenen Phasen der kinetischen Bindungsanalyse können mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes mit folgender Formel berechnet werden.



Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) wird beschrieben durch das Verhältnis von $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$. Der k_{on} -Wert ist eine Konstante und drückt aus, wie schnell der Antikörper an sein Antigen bindet. Der k_{off} -Wert hingegen charakterisiert, wie schnell der Antikörper wieder von seinem Target dissoziiert.

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$

K_D als Verhältniskonstante zwischen beiden Größen beschreibt nun, bei welcher Antikörpermenge der Antikörper-Antigen-Komplex und die ungebundenen Antikörper und Antigene im Gleichgewicht vorliegen. Es ergibt sich daraus, dass je kleiner dieser Wert, desto affiner bindet der Antikörper an sein Antigen [60].

Am häufigsten wird das SPR zur Untersuchung von Bindungskinetiken verwendet. Dabei wird das Signal in RU gegen die Laufzeit aufgetragen und es ergibt sich eine Kurve mit der durch Plotten sowohl die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_a) als auch die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_d) bestimmt und K_D dadurch berechnet werden kann. Alternativ ist eine kinetische Untersuchung mittels Sandwich-Immunoassay durch den ELISA möglich [61]. Dafür werden verschiedene Konzentrationen an Antikörper mit gesetzter Konzentration an Antigen inkubiert. Die Signalintensitäten werden gegen die logarithmierte Konzentration an Antikörper aufgetragen, sodass sich eine sigmoidale Kurve ergeben wird. Unter Betrachtung, dass bei halbmaximalem Signal ein Gleichgewicht zwischen Antikörper-Antigen-Komplex und ungebundenen Antikörper und Antigen vorliegt, ergibt die Berechnung des EC_{50} die Konzentration des K_D [62].

1.3.2. Antikörpervalidierung

Die Validierung der Antikörper bezieht sich auf den Beweis der experimentellen Funktionalität im spezifischen Einsatzbereich [63]. Die Eignung des Antikörpers auf der jeweiligen Plattform muss ausgetestet werden. Mit verschiedenen Technologien zeigen Antikörper mitunter verschiedene Bindungsverhalten, durch zum Beispiel Änderung ihrer nativen in eine denaturierte Form. Es müssen eventuelle Effekte, welche durch die verwendete Matrix, in dem der Antikörper oder die Probe vorliegt, entstehen können, untersucht werden. Der Antikörper muss auf Selektivität hin getestet werden und, ob es möglicherweise Kreuzreaktionen mit anderen Bestandteilen des Versuchsaufbaus gibt [64]. Gleichzeitig sollte die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gezeigt werden.

1.3.2.1. THC & CBD

Zu der Gruppe der Cannabinoide gehören sämtliche Liganden der Cannabinoidrezeptoren, wozu sowohl Tetrahydrocannabinol (THC) als auch Cannabidiol (CBD) gehören [65]. Beide

Substanzen werden exogen konsumiert (zumeist oral oder inhalatorisch) und vom Körper verstoffwechselt.

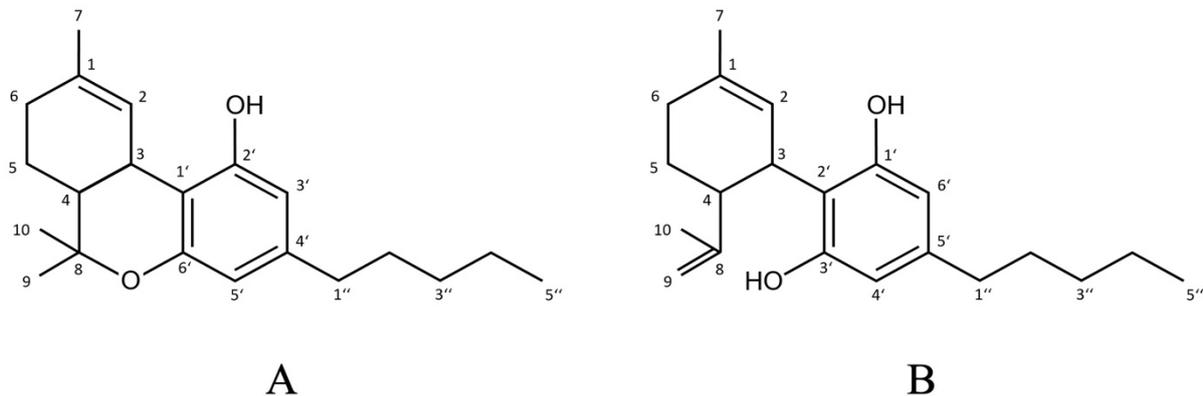


Abbildung 4 Strukturformel THC / CBD

Strukturformeln von Tetrahydrocannabinol (**A**) und Cannabidiol (**B**) mit Nummerierung der C-Atome im Monoterpenoidsystem. Unterschied der beiden Moleküle besteht am Tetrahydropyran-Ring, der am C₈ beim THC zwei Hydroxylgruppen trägt und geschlossen ist, beim CBD jedoch geöffnet vorliegt und die zwei Methylgruppen durch eine Ketogruppe und eine Hydroxylgruppe ersetzt ist. (nach [66])

Beide Stoffe haben neben einer identischen Summenformel C₂₁H₃₀O₂ und derselben molaren Masse von 314,5 g/mol auch strukturell viele Ähnlichkeiten (Abbildung 4).

Laut Betäubungsmittelgesetz (BtMG) Anlage I (zu § 1 Abs. 1) gehören neben Cannabis (Marihuana, Pflanzen und Pflanzenteile der zur Gattung Cannabis gehörenden Pflanzen) auch Cannabisharz (Haschisch, das abgesonderte Harz der zur Gattung Cannabis gehörenden Pflanze) zu nicht verkehrsfähigen Betäubungsmitteln. Neben diesen sind weitere Isomere des Tetrahydrocannabinols aufgelistet. Der Anbau, Herstellung, Handel oder der Besitz sind laut BtMG § 29 strafbar, der eigentliche Konsum jedoch nicht. Erst im Straßenverkehrsgesetz (StVG § 24a Abs. 2) wird der Konsum geahndet, wenn unter Substanz-Einfluss ein Kraftfahrzeug geführt wird. Gleiches gilt laut Strafgesetzbuch (StGB § 315 c, 316) wenn der Fahrzeugführer nach Konsum durch Führung eines Verkehrsmittels eine Gefahr darstellt.

Die aktive Substanz leitet sich vom THC ab, die in der Pflanze zumeist als Säure (THC-COOH) vorliegt und erst durch Erhitzen, und die damit folgende Decarboxylierung, in den aktiven Zustand übergeht. THC wird im Körper hauptsächlich über Cytochrom P450 Isoenzyme zu 11-Hydroxy-THC (11-OH-THC) und weiter zu 11-Carboxy-THC (11-COOH-THC) abgebaut und renal sowie über den Kot ausgeschieden [67]. Es sind jedoch mehr als 100 Neben-Metabolite

bekannt [65]. Die Metabolite sind, abhängig vom jeweiligen Abbaumechanismus, über mehrere Tage im Blut nachweisbar und können daher als Nachweis über einen eventuellen Gesetzesverstoß analysiert werden. Ab einer Blutkonzentration von 1 ng/mL THC wird von einem positiven Ergebnis gesprochen.

CBD hingegen fällt nicht unter das BtMG, da nach Konsum eine psychoaktive Wirkung ausbleibt. Somit ist nach Konsum auch das Führen von Fahrzeugen möglich.

Die strukturelle Ähnlichkeit beider Moleküle macht eine Differenzierung schwierig. Mittel der Wahl ist beispielsweise die Gaschromatographie, wobei sich hierbei die unterschiedliche Polarität der Moleküle zu Nutze gemacht wird [68]. Massenspektrometrische Methoden eignen sich ebenfalls zur sehr genauen Unterscheidung, sind jedoch sowohl zeit-, als auch kostenaufwändig [69].

Für einen immunologischen Nachweis von Betäubungsmitteln werden zumeist Antikörper verwendet. Diese sollen den jeweiligen Analyten spezifisch binden. Die Herstellung dieser erweist sich im Fall von THC und CBD aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit beider Moleküle als schwierig. Neben der kleinen Größe der Moleküle muss das Epitop genau das C₈ des jeweiligen Moleküls beinhalten, da dies die sich unterscheidende Stelle ist. Einsatz finden bereits etablierte Antikörper unter anderem in allgemeinen Drogen-Schnelltests gegen mehrere Betäubungsmittel. Diese basieren auf Lateral-Flow-Assays [70] welche am Einsatzort meist zum Nachweis der Analyte in Urin eingesetzt werden. Urin stellt dabei keine Körperverletzung des Testenden dar und kann von diesem selbst, ohne geschultes Personal, entnommen werden. Bei der Testung wird das Prinzip eines kompetitiven Assays genutzt. Sind Drogen im Probenmaterial vorhanden, so konkurrieren diese mit präparierten Referenz-Drogen um die Bindung von hinzugegebenen Antikörpern. Bei Vorhandensein von Drogen in einer Konzentration über der Nachweisgrenze (Cut-off-Wert) bleibt ein Signal für die Referenz-Drogen-Antikörper-Bindung aus. Die Kompetition erfolgt, wenn der Antikörper die Droge mindestens genauso spezifisch bindet wie die Referenz-Droge.

Für einen Labor-Nachweis in Form eines ELISA nutzt man das gleiche kompetitive Prinzip. Die Referenzdroge wird hierbei an die stationäre Phase eines Wells über einen Linker (z.B: Bovinem Serum Albumin (BSA)) gebunden. Spezifischer Antikörper und Probe werden zusammen im Well inkubiert. Ist die Droge im Probenmaterial vorhanden, so ist kein Signal für die Referenz-Drogen-Antikörper-Bindung messbar.

Immunologische Messungen sind zwar vor Gericht nicht verwertbar, gelten aber als Grundlage für die Befugnis weitere genauere Blutuntersuchungen durchführen zu dürfen, um den Verdacht des Verstoßes gegen das StVG oder StGB zu bestätigen.

Kreuzreaktivität von Antikörpern beruhen auf der strukturellen Ähnlichkeit von THC und CBD. Binden diese an ein Epitop der Moleküle, welches gleich ist, so würde auch bei erlaubtem Konsum von CBD ein positives Ergebnis für den Konsum von THC erhalten werden. Daher ist eine Generierung CBD bzw. THC-spezifischer Antikörper, sowie deren Testung auf Affinität zum jeweiligen Molekül von großem Interesse.

1.3.2.2. Equines Sommereczem

Allergische Reaktionen bezeichnen eine Überempfindlichkeitsreaktion des Immunsystems, bei der Abwehrstoffe gegen den vermeintlichen eingedrungenen Angreifer gebildet werden. Je nach Verteidigungsmechanismus wird in vier Typen unterschieden.

Bei Typ-I Reaktionen spielt gebildetes IgE sowie die Freisetzung von Histamin aus Mastzellen und Basophilen eine große Rolle. Typ-II ist bedingt durch Antikörper-vermittelte zytotoxische Reaktionen. Typ-III Allergien weisen erhöhte IgGs gegen lösliche Antigene auf und damit eine Immunkomplexbildung und Komplementaktivierung. An Typ-IV Allergien sind T-Zell-vermittelte Antikörper-unabhängige Reaktionen beteiligt [12].

Allergische Reaktionen sind nicht nur beim Menschen festzustellen. Auch Pferde zeigen Überempfindlichkeiten gegenüber manchen Stoffen. Am besten beobachtet bei Pferden ist die sogenannte Insekten Biss Hypersensibilität (IBH) oder auch Sommereczem genannt [71]. Dabei handelt es sich um eine Reaktion des Körpers auf bestimmte Proteine, die im Speichel einiger Mückenarten (Culicoides, Simulium) enthalten sind. Stechen die weiblichen Mücken die Pferde, so gelangen die Speichelproteine in die Blutbahn der Pferde und lösen eine Typ-I Allergie aus (siehe Abbildung 5). Diese ist gekennzeichnet durch einen symptomfreien Erstkontakt. Das Antigen-Protein wird von dendritischen Zellen aufgenommen. Die Zellen migrieren zu den Lymphknoten, wo sie als APC Fragmente des Antigens über MHC-II Moleküle T-Helfer Zellen präsentieren. Diese veranlassen als TH2-Zellen die Ausschüttung von Zytokinen, unter anderem Interleukin-4, was seinerseits die B-Zell-Produktion von spezifischem IgE stimuliert. Dieses bindet an Fcε Rezeptoren von Mastzellen [72].

Bei erneuter Exposition mit dem Antigen binden Mastzellen über zwei auf der Oberfläche gebundene IgEs das Antigen. Diese Kreuzverbindung führt zur Degranulation der Mastzellen. Entzündungsmediatoren wie Histamin werden freigesetzt. Histamin ist für die sofortige

Symptomatik bei allergischen Reaktionen verantwortlich. Gleichzeitig werden Leukotriene und Prostaglandine freigesetzt, welche die Entzündungsreaktion und damit die langfristigen chronifizierten Beschwerden initiieren.

Weitere Zytokine aus der degranulierten Mastzelle stimulieren die B-Zell Produktion von spezifischen IgE-Molekülen, welche wiederum an neue Mastzellen binden, sodass die Reaktion auf das Antigen bei erneuter Exposition die gleiche ist.

Diese Reaktionen finden vor allem lokal am Ort der Exposition statt. Durch den Mückenbiss kommt es bei betroffenen Pferden zu atopischen Ekzemen, die mit Juckreiz einhergehen. Als Reaktion darauf, entfernen sich Pferde durch Beißen die Haare an betroffenen Stellen. Es kommt zu offenen Wunden, die sich weiter entzünden, was für das Tier großes Leid zur Folge hat.

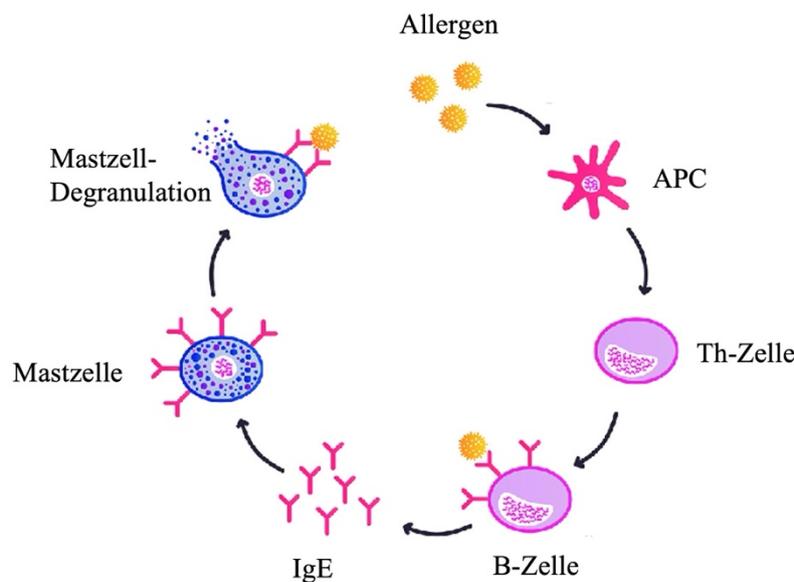


Abbildung 5 Typ-I Hypersensitivitätsreaktion

Nach Allergen-Erstexposition werden Teile dieses von APCs aufgenommen und über MHC-II Moleküle TH-Zellen präsentiert. Diese stimulieren Entwicklung spezifischer IgE-produzierender B-Zellen, welche bei erneuter Exposition IgE ausschütten, welches an Mastzellen bindet. Bindung des Allergens veranlasst Degranulation und Ausschüttung von Mediatoren. (nach [73])

Das Sommerekzem ist in Europa weit verbreitet, und unter allen Pferdearten zu gleichen Teilen vertreten. Ausnahme dabei bilden auf Island geborene und nicht exportierte Isländer, da es die Mückenarten dort nicht gibt. Werden Pferde dieser Art nach Europa importiert, so zeigen diese jedoch ebenfalls Reaktionen auf den Mückenbiss [74]. Die Symptome der Pferde zeigen einen saisonalen Anstieg, da sie vor allem im Sommer den Mücken mehr ausgesetzt sind.

Die Diagnostik einer Sensitivierung durch die Allergene wird als intrakutane Testform vollzogen. Dafür werden die Allergene als *whole body extract* (WBE) der Mückenarten in die Haut von zu testenden Pferden gegeben [75] und beobachtet, ob es zu Schwellung oder Rötung kommt. Zusätzlich dazu gibt es bestimmte *in vitro* Testungen wie zum Beispiel den Histamin-Release Test (HRT) bei dem per Antigen-Provokation die Freisetzung von Histamin durch basophile Granulozyten in Vollblut-Proben gemessen wird [76].

Des Weiteren kann über den ELISA das Vorhandensein von IgE im Blutserum bestimmt werden. Dafür werden WBEs oder rekombinante Proteine, welche potenzielle Antigene sind, immobilisiert und mit Pferdeserum inkubiert. Das gebundene spezifische IgE wird mittels equinem IgE bindenden Antikörpern detektiert.

Nachteil bei der Inkubation mit WBE ist, dass keine spezifischen Proteine unterschieden werden können und gleichzeitig ist die Standardisierung der Extrakte nicht möglich. Die rekombinante Herstellung der Proteine hat den Vorteil, dass eine spezifische Menge des Proteins zur Testung eingesetzt werden und das Allergen genauestens bestimmt werden kann [77]. Der limitierende Faktor dabei ist die Vielzahl an möglichen Mücken-Spezies und den vorhandenen Proteinen.

Es wurden bereits verschiedene Allergene aus *Culicoides obsoletus*, *Culicoides nubeculosus* und *Simulium vittatum* beschrieben und in der Einzelanalytik untersucht. Auffällig dabei war unter anderem die Homologie zwischen den Proteinen der unterschiedlichen Mückenarten, sodass Kreuzreaktivität des spezifischen IgEs auftrat [71]. Die Herstellung von rekombinanten Allergenen sowie der standardisierte Einsatz als Multiplex-Messung mit Proteingemischen wäre zum Schnellscreening und Nachweis von Allergien von großem Interesse.

1.4. Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Bead-basierten multiplexen Messmethode, mit der die Charakterisierung von Antikörpern ermöglicht werden soll. Dafür wurde sich auf zwei Antikörpereigenschaften konzentriert. Zum einen wurde das Epitop eines phospho-PKA-Substrat Antikörpers, welcher Motiv-spezifisch binden soll, untersucht. Es sollten verschiedene Peptide mit leicht variierenden Sequenzmutationen gleichzeitig vermessen, und mögliche Unterschiede im Bindungsverhalten detektiert werden. Des Weiteren sollten durch die Entwicklung eines geeigneten Aufbaus eines Testsystems Bindungskinetiken zwischen dem Antikörper und weiteren Peptiden gemessen und ausgewertet werden. Die Messungen sollten mit bereits etablierten Goldstandard-Methoden verglichen werden, um die Ergebnisse zu verifizieren.

Weiterführend soll anhand von zwei biologischen Fragestellungen die Antikörpervalidierung in multiplexen Systemen gezeigt werden.

Im ersten Teil sollte die Antikörperspezifität gegenüber THC beziehungsweise CBD gezeigt werden. Davon ausgehend soll ein kompetitives Testsystem aufgebaut werden, in dem in gegebener Matrix durch Zugabe von Referenzsubstanz eine Konkurrenz erreicht werden soll, ohne dass es zu Kreuzreaktivitäten der Analyten kommt.

Des Weiteren sollte ein Testsystem geschaffen werden, in dem der Nachweis von Allergenspezifischem IgE aus equinen Serumproben erzielt wird. Dafür sollen die relevanten Antigene rekombinant synthetisiert und an die Beads gebunden werden. Nach Probeninkubation sollte die Bindung der Antigene an das spezifische IgE detektiert werden.

Bei der Entwicklung der Antikörpercharakterisierungsverfahren sollen die Vorteile von Bead-basierten Messungen genutzt werden, um vergleichbare Ergebnisse mit bereits etablierten Methoden zu erzielen. Gleichzeitig soll durch die Adressierung von biologischen Fragestellungen die Antikörpervalidierung im multiplexen Testansatz erfolgen, um den versatilen Einsatz der Methoden und der Testmöglichkeiten zu unterstreichen.

2. Material

2.1. Chemikalien

Tabelle 1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Artikelnummer
1-Ethyl-3- [3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochlorid (EDC)	Pierce	77149
1kB DNA Ladder	New England Biolabs	NO468S
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Sigma	M-8250
4-Chloro-1-Naphtol	Sigma	C8890
6x DNA Loading Dye (Purple)	New England Biolabs	B7024S
Acrylamid (37,5:1)	Merck	1.00639
Adenosintriphosphat (ATP)	Roche Diagnostic GmbH	10127523001
Agarose (bakt)	Alfa Aesar	J10906
Agarose (universal)	VWR Chemicals	35-1020
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad	1610700
Ampicillin	Thermo Fisher	J.60977.14
Bacto Yeast Extract	Difco	212750
Biotin-Alkyl-CBD	TU Braunschweig	
Biotin-Alkyl-THC	ETH Zürich	
Biotin-PEG-CBD	TU Braunschweig	
Biotin-PEG-THC	ETH Zürich	
Bovines Serum Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth	T844.3
BPer Reagent	Thermo Scientific	78243
Bromphenolblau	Sigma	B0126
Cannabidiol	Cerilliant	C-045-1ML
Dithiothreitol (DTT)	Roche	DTT-RO
Dronabinol	LGC GmbH	LGCAMP1088.00-02
Glycerol	VWR Chemicals	44448513

Chemikalie	Hersteller	Artikelnummer
Instant Blue	abcam	Ab119211
Isopropanol	Merck	1.0966341011
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	VWR Chemicals	437144N
Kaliumacetat (C ₂ H ₃ KO ₂)	Carl Roth	T874.1
Kaliumchlorid (KCl)	Merck	104936
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck	1.04873.1000
Magnesiumacetat (Mg(CH ₃ COO) ₂)	Carl Roth	P026.1
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth	3532.1
Methanol	VWR Chemicals	83638.320
N-Hydroxysulfosuccinimid (Sulfo-NHS)	Pierce	24520
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	VWR Chemicals	0761-100ML
Natrium Dodecyl Sulfate (SDS)	Merck	1.13760
Natriumchlorid (NaCl)	VWR Chemicals	27810.295
Natriumdihydrogenphosphat (NH ₂ PO ₄)	Merck	1.06346.100
PAGE Ruler Prestained Plus	Thermo Scientific	26616
PKA Ca, murin	Proteinkinase.de	685677/15
SYBR Green	Lonza	50513
Tetracyclin	Sigma	T-3383
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Merck	1.08219.1000
Tryptone	VWR Chemicals	84610.0500
Tween 20	Carl Roth	9127.1
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck	1.07209.0250
Western Blue	Promega	S3841

2.2. Geräte

Tabelle 2 Geräte

Name	Hersteller
Stromquelle (PS300-B)	Hoefler
Blotter (TE77XP)	Hoefler
Typhoon Trio Variable Mode Imager	GE Healthcare
Nanodrop (ND-1000)	peqLab
Mastercycler Gradient	Eppendorf
Axon GenePix 4300 A Scanner	Molecular Devices
Automatisierte Waschstation Bio-Plex Pro II	Biorad
FlexMAP3D	Luminex
iONE	M2 Automation
BScreen	Biametrics
FLUOstar Omega Plattenreader	BMG Labtech GmbH
Zentrifuge 5804 K	Eppendorf
Konfokales Lasermikroskop LSM 510	Zeiss
Heizblock Thriller	peqLab
Hybridisierkammer	Fraunhofer IZI-BB

2.3. Programme

Tabelle 3 Programme

Name	Hersteller
GenePixPro V7	Molecular Devices
Microsoft Office	Microsoft Corp.
xPonent	Luminex
Prism 8	GraphPad Software, Inc
Mendeley	Elsevier
ImageJ	Wayne Rasband

2.4. Kits

Tabelle 4 Kits

Name	Hersteller	Artikelnummer
RTS 100 Insect Membrane Kit	biotechrabbit	BR1401501
RTS 100 E. coli HY Kit	biotechrabbit	BR1400106
TnT® T7 Insect Cell Extract Protein Expression System	Promega	L1101
PE / R-Phycoerythrin Conjugation Kit – Lightning-Link®	abcam	ab102918
BCA Protein Assay Kit	Pierce	23225
PCR Phusion HF	VWR	F-5535
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	MACHEREY-NAGEL	REF 740609.50
NucleoSpin® Plasmid	MACHEREY-NAGEL	REF 740588.50

2.5. Puffer

Tabelle 5 10 x PBS (1 L)

Chemikalie	Konzentration
NaCl	1,37 M
KH ₂ PO ₄	14,7 mM
Na ₂ HPO ₄ (2 H ₂ O)	78,1 mM
KCl	26,8 mM

Tabelle 6 PBST (1 L)

Chemikalie	Konzentration
10 x PBS	1 x
Tween 20	0,005%
ddH ₂ O	Auf 1 L auffüllen

Tabelle 7 5 x SDS-Laufpuffer

Chemikalie	Konzentration
TRIS (pH 8,3)	623,24 nM
Glycin	6,26 M
SDS	0,5 % 8v/v)

Tabelle 8 5 x CCE Puffer

Chemikalie	Konzentration
TRIS (pH 6,8)	1 M
SDS	5,7 %
Glycerol	14 %
β -Mercaptoethanol	7 %
Bromphenolblau	Spatelspitze

Tabelle 9 TSS Puffer

Chemikalie	Menge
PEG 8000	20 % (w/v)
DMSO	10 % (w/v)
MgCl ₂	100 mM
LB-Medium	auffüllen

Tabelle 10 Blotting Puffer

Chemikalie	Menge
Glycin	39 mM
TRIS	48 mM
SDS	0,0375 % (v/v)
Methanol	20 % (v/)

Tabelle 11 10 x TA Puffer

Chemikalie	Menge
TRIS	330 mM
C ₂ H ₃ KO ₂	660 mM
Mg(CH ₃ COO) ₂	100 mM
DTT	5 mM

Tabelle 12 10 x PKA-Puffer

Chemikalie	Menge
TRIS (pH 7,7)	50 mM
MgCl ₂	10 mM

2.6. Medien

2.6.1. Flüssigmedien

Tabelle 13 LB-Medium flüssig (1 L)

Chemikalie	Menge
Bacto-Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g

Tabelle 14 2YT-Medium (1 L)

Chemikalie	Menge
Bacto-Trypton	16 g
Hefeextrakt	10 g
NaCl	5 g

2.6.2. Platten

Tabelle 15 LB-Medium fest (1 L)

Chemikalie	Menge
Bacto-Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Agarose	15 g

2.7. Peptide

Sämtliche Peptide wurden von Dr. Sandra Mükusch im Zuge ihrer Dissertation designend und von Peps4LS synthetisiert.

Tabelle 16 Peptide

Name	Sequenz
ARRSS	HVPHGESARRS S HTELPKGKPIP NPLLGLDST
ARRSS*	HVPHGESARRS S*HTELPKGKPIP NPLLGLDST
ARRS*S	HVPHGESARRS*S HTELPKGKPIP NPLLGLDST
ARRS*S*	HVPHGESARRS*S*HTELPKGKPIP NPLLGLDST
ARRAS	HVPHGESARRA S HTELPKGKPIP NPLLGLDST
ARRAS*	HVPHGESARRA S*HTELPKGKPIP NPLLGLDST
ARASS*	HVPHGESARAS S*HTELPKGKPIP NPLLGLDST
AARSS*	HVPHGESAARS S*HTELPKGKPIP NPLLGLDST
ARKSS*	HVPHGESARKS S*HTELPKGKPIP NPLLGLDST
AKRSS*	HVPHGESAKRS S*HTELPKGKPIP NPLLGLDST
GKKSS	HGSKLLPGKKS S ERPSLGKPIP NPLLGLDST
GKKSS*	HGSKLLPGKKS S*ERPSLGKPIP NPLLGLDST
GKKS*S	HGSKLLPGKKS* SERPSLGKPIP NPLLGLDST
GKKS*S*	HGSKLLPGKKS*S*ERPSLGKPIP NPLLGLDST
GKKAS	HGSKLLPGKKA S ERPSLGKPIP NPLLGLDST
GKKAS*	HGSKLLPGKKA S*ERPSLGKPIP NPLLGLDST

Name	Sequenz
SRRPS	HQKRREILS RRPS YRKILNDLGKPIPPELLGLDST
SRRPS*	HQKRREILS RRPS*YRKILNDLGKPIPPELLGLDST
S*RRPS	HQKRREILS*RRPS YRKILNDLGKPIPPELLGLDST
S*RRPS*	HQKRREILS*RRPS*YRKILNDLGKPIPPELLGLDST
A	HGSKTALNRRDITYRRRQGKPIPPELLGLDST
B	HAPHGEPARRASHNELPGKPIPPELLGLDST
C	HQKAYNLNRTPTSTVTLNGKPIPPELLGLDST
D	HGIQYFLQRRPSMKTLFGKPIPPELLGLDST
E	HKEKDRSLRRITRMVLVGKPIPPELLGLDST
F	HESVSSDRRNSGATFTGKPIPPELLGLDST
G	HAMIAKMNRQRTNSIGHNPGKPIPPELLGLDST

2.8. Bakterienstämme

Tabelle 17 Bakterienstämme

Name	Eigenschaften	Resistenz
XL1-1blue	F'lac: lacIq, del(lacZ)M15, Tn10(Tc), proA+, proB+	Tetrazyclin
BL21CodonPlus(DE3)	RP-X; p15A, Cm, genes for rare codons argU (AGA, AGG), proL (CCC)	Tetrazyclin

2.9. Seren

2.9.1. Leerseren

Name	Hersteller	Artikelnummer
SeraCon II (Defibrinated Human Plasma)	Seracare	1800-0011

2.9.2. Pferdeseren

Die verwendeten Pferdeseren sind im Detail in Anhang 1 aufgelistet.

2.10. Antikörper

Tabelle 18 Primärantikörper

Name	Spezies	Hersteller	Artikelnummer
V5 Tag Antikörper	Rabbit Polyklonal	Bethyl Laboratories, Inc.	A190-120A
phospho-PKA- Substrat Antikörper	Rabbit Monoklonal	Cell Signaling	9624
Anti-THC Antikörper	Mouse Monoklonal	acris	BM2701
Anti-THC Antikörper	Mouse Monoklonal	YUMAB	YU615-A02
Anti-THC Antikörper	Mouse monoklonal	YUMAB	YU615-B04
Anti-THC Antikörper	Mouse monoklonal	YUMAB	YU615-D04
Anti-THC Antikörper	Mouse monoklonal	YUMAB	YU615-A01
Anti-THC Antikörper	Mouse monoklonal	YUMAB	YU615-D01
Anti-CBD Antikörper	Mouse monoklonal	YUMAB	YU616-A03
Anti-CBD Antikörper	Mouse monoklonal	YUMAB	YU616-C02
Anti-CBD Antikörper	Mouse monoklonal	YUMAB	YU616-D01
Anti-CBD Antikörper	Mouse monoklonal	YUMAB	YU616-G03
Anti-horse IgE Antikörper	Mouse monoklonal	BioRad	MCA5983GA
Anti-FLAG Antikörper	Mouse monoklonal	Pierce	PA1-984B

Tabelle 19 Sekundärantikörper

Name	Spezies	Hersteller	Artikelnummer
Anti-rabbit RPE	Goat	invitrogen	P2771MP
Anti-mouse RPE	Goat	invitrogen	P852
Anti-mouse Alexa555	Goat	Life Technology	A21422
Anti-goat RPE	rabbit	Sigma	P9787
Goat anti-mouse Biotin	Goat	Sigma	B9904
Anti-rabbit AP	Goat	Sigma	A3687
Anti-horse IgE - Biotin	rabbit	Genetex	GTX77209
Anti-rabbit AP	goat	Sigma	A3687
Anti-mouse AP	goat	Sigma	A3562

2.11. Plasmide

Die Plasmide wurden nach folgendem Vorbild designend:



Die Plasmidkarten für die verwendeten Expressionsvektoren befinden sich im Anhang 2 und Anhang 3.

Tabelle 20 Plasmide (pEX-A158)

Name	Größe (Insert)	Hersteller	GenBank
Cul o 3	629 bp	Eurofins	JX512275.1
Cul o 5	731 bp	Eurofins	KC339675.2
Cul o 6	644 bp	Eurofins	KC339676.1
Cul o 7	653 bp	Eurofins	KC339677.1
A5SP	1361 bp	Eurofins	EU978920.1

Name	Größe (Insert)	Hersteller	GenBank
Cul n 7	746 bp	Eurofins	HM145955.1
Sim v 4	950 bp	Eurofins	EU930294

Tabelle 21 Plasmide (pEX-A258)

Name	Größe (Insert)	Hersteller	GenBank
Cul n 3	1361 bp	Eurofins	HM145951.1
Cul n 2 V 1	1385 bp	Eurofins	EU978926.1
Cul n 2 V 2	1384 bp	Eurofins	HM145950.1
Cul n 5	1394 bp	Eurofins	HM145953.1
Sim v 3	1598 bp	Eurofins	EU930236

2.12. Primer

Tabelle 22 Primer

Name	Sequenz	Hersteller
pEX-For	5'-ggAgCAgACAAgCCCgTCagg	TIB MOLBIOL
pEX-Rev	5'-CAggCTTTACTTTATgCTTCCggC	TIB MOLBIOL

2.13. Restriktionsenzyme

Tabelle 23 Restriktionsenzyme

Name	Hersteller	Artikelnummer
<i>BamHI</i>	New England Biolabs	R0136
<i>NotI</i>	New England Biolabs	R3189
<i>XhoI</i>	Thermo Fisher	ER0692
<i>EcoRI</i>	New England Biolabs	R0101

2.14. Verbrauchsgegenstände

Tabelle 24 Allgemein

Name	Hersteller	Artikelnummer
Nitrocellulosemembran	GE Healthcare	100600016
Protein LowBind Tubes 1,5 mL	Eppendorf	0030108.116

Tabelle 25 Beads

Region	Oberfläche	Hersteller	Artikelnummer
12	Epoxy	Luminex	MC12001-12
13	Epoxy	Luminex	MC12001-13
14	Epoxy	Luminex	MC12001-14
15	Epoxy	Luminex	MC12001-15
18	Epoxy	Luminex	MC12001-18
19	Epoxy	Luminex	MC12001-19
20	Epoxy	Luminex	MC12001-20
26	Epoxy	Luminex	MC12001-26
29	Epoxy	Luminex	MC12001-29
34	Epoxy	Luminex	MC12001-34
46	Epoxy	Luminex	MC12001-46
52	Epoxy	Luminex	MC12001-52
65	Epoxy	Luminex	MC12001-65
39	Avidin	Luminex	MA-A039-01
43	Avidin	Luminex	MA-A043-01

Tabelle 26 Slides

Name	Oberfläche	Hersteller
Glymo	Epoxy	Fraunhofer IZI-BB

Tabelle 27 Multititerplatten

Name	Hersteller	Artikelnummer
384-Well plate	Molecular Devices	X6004
96-Well plate (weiß)	Thermo Fisher	P735-0528

3. Methoden

3.1. Molekularbiologische Methoden

3.1.1. SDS-PAGE

Mittels Sodium Dodecyl Sulfat–Polyacrylamide Gel Elektrophorese (SDS-PAGE) konnten Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Die Prozentigkeit des SDS-Gels bestimmt dabei den Auftrennungsbereich der Proteine. Es wurden 12 % Gele verwendet. Ein Gel besteht aus einem Sammel- und einem Trenngel. Es wurden jeweils zwei Gele gleichzeitig hergestellt. Für das Trenngel wurden 4,9 mL H₂O, 6,0 mL 30 % Acrylamid Mix (37,5:1), 3,8 mL 1,5 M Tris (pH 8,8), 0,15 mL 10 % SDS und 0,15 mL 10 % APS gemischt. Nach weiterer Zugabe von 6 µL TEMED wurde das Gemisch in zwei Gel-Gieß-Apparaturen aufgeteilt und mit 70 % Isopropanol überschichtet. Nach Auspolymerisieren wurde das Isopropanol verworfen.

Für das Sammelgel wurden 3,4 mL H₂O, 0,83 mL 30 % Acrylamid Mix (37,5:1), 0,63 mL 1 M Tris (pH 6,8), 0,5 mL 10 % SDS, 0,5 mL 10 % APS gemischt und 20 µL Bromphenolblau hinzugegeben. Nach weiterer Zugabe von 5 µL TEMED wurde das Gemisch aufgeteilt und der Kamm sofort eingesetzt. Nach vollständiger Auspolymerisation wurden die Gele bei 4°C für maximal 2 Wochen unter Feuchtigkeit gelagert.

Der Gel-Lauf erfolgte in Hoefer-Vorrichtungen, in der jeweils zwei Elektrophoresen gleichzeitig betrieben werden konnten. Die Gele wurden vertikal eingespannt und mit Lauf-Puffer (Tabelle 7) umschichtet. Der Kamm wurde vorsichtig entnommen und mittels geeigneter Pipette gespült.

Die Proben wurden mit 5x CCE-Puffer (siehe Tabelle 8) versetzt und bei 90 °C für 5 min denaturiert. In die erste Tasche wurden 5 µL Marker (PAGE Ruler Prestained Plus) gegeben, in die restlichen Taschen 10 µL des Proben-Gemisches. Es wurde eine Spannung von 120 V für etwa 60 min angelegt. Die Gelelektrophorese wurde durch Unterbrechung der Stromzufuhr beendet, sobald die Lauffront etwa 1 cm vom unteren Gel-Rand entfernt war.

Das Gel wurde im Anschluss aus der Apparatur entfernt und in einem Schälchen für 1 h mit Instant Blue inkubiert, um unspezifisch Proteine nachzuweisen. Anschließend konnte das Gel gescannt und in Wasser gelagert werden.

3.1.2. Western-Blot

Für einen spezifischen Proteinnachweis wurden Western-Blots verwendet. Dabei wurden die aufgetrennten Proteine der SDS-PAGE (aus 3.1.1) durch Semi-Dry Western Blotting auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Es wurden sechs Whatman-Paper mit dem ungefähren

Maß von 6 x 8 cm (Größe des SDS-Gels) sowie eine Nitrocellulose-Membran in der gleichen Größe vorbereitet. Diese wurden in Blotting-Puffer (siehe Tabelle 10) eingelegt. Das Gel wurde nach dem Lauf aus der Apparatur herausgenommen, die Taschen und unbenutzte Bahnen wurden vorsichtig entfernt. Auf dem Blotter wurden drei in Blotting-Puffer eingeweichte Whatman-Paper und die Membran gestapelt. Darauf wurde das SDS-Gel in Auftragsrichtung gelegt. Das Ganze wurde von drei weiteren Whatman-Papern bedeckt. Luftblasen wurden vorsichtig mit einem Glasstab entfernt. Der Blotting Prozess dauerte 90 min bei 48 mA (1 mA / cm²). Die angelegte Stromstärke und die Anordnung der Blottingbestandteile war abhängig von der Polung des jeweiligen Gerätes.

Im Anschluss wurde die Membran vorsichtig aus dem Aufbau entfernt. Um zu überprüfen, ob der Prozess erfolgreich war, war die Sichtbarkeit des aufgetragenen Markers auf der Membran ein erstes Indiz. Ob die Proteine mit übertragen wurden, konnte durch eine unspezifische Ponceau-Färbung gesehen werden. Dafür wurde die Membran für etwa 30 sek mit Färbereagenz überschichtet und im Anschluss mit destilliertem Wasser (dH₂O) gewaschen. Erfolgreich geblottete Proteinbanden erschienen Rot.

Die Membran wurde mit 5 % BSA in PBST für 45 min bei 35 rpm in einem 50 mL Reaktionsgefäß geblockt und im Anschluss dreimalig für 15 min mit PBST gewaschen.

Die Membran wurde nachfolgend in einem frischen 50 mL Reaktionsgefäß mit 8 mL einer Lösung mit primär Antikörper in geeigneter Konzentration für 1 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach wiederholtem Waschschrift wurde die Inkubation mit einem markierten Sekundärantikörper durchgeführt.

Die Detektion des Sekundärantikörpers war abhängig von seinem Konjugat. Fluoreszenzmarkierte Antikörper wurden mittels Fluoreszenzscanner (Typhoon Scanner) bei geeigneter Wellenlänge aufgenommen. Bei Enzym-konjugierten Antikörpern musste zusätzlich noch ein Farbstoff dazugegeben werden, der erst durch enzymatischen Umsatz sichtbar wurde. Dabei wurden für Alkalische-Phosphatase (AP) konjugierte Antikörper Western Blue verwendet. Die enzymatische Reaktion wurde mittels dH₂O abgestoppt, um das Hintergrundsignal der Membran nicht unspezifisch zu binden. Die Membranen wurden flach getrocknet und eingescannt.

3.1.3. Agarose-Gel

Für den elektrophoretischen Nachweis von DNA oder RNA wurden Agarose-Gele verwendet. Diese wurden je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente in verschiedenen Prozentigkeiten hergestellt. Dafür wurden für ein 2 % Agarose-Gel 2 g Agarose in 100 mL TBE-Puffer gelöst.

Um ein homogenes Gemisch zu erhalten, wurde die Lösung auf einem Heizpilz unter Rühren bei 60 °C gemischt. Das Gel wurde in einer speziellen Apparatur heiß gegossen, und der Kamm wurde sofort eingesetzt. Nach Erkalten auf RT festigte sich das Gel.

Zu untersuchende Proben wurden mit 6 x DNA-Loading-Dye und 1 µL einer 1:1000 Verdünnung von SYBR-Green versetzt und in die Taschen pipettiert. Es wurden 60 V für etwa 60 min angelegt. Der Gel-Lauf wurde durch Unterbrechung der Stromzufuhr beendet, sobald die unterste Bande des Loading-Dyes etwa 2 cm vom unteren Ende des Gels entfernt war.

Das Gel wurde unterm Scanner bei 495 nm angeregt, und bei 510 nm detektiert und aufgenommen.

3.1.4. Nanodrop

Mit Hilfe des Nanodrops konnten DNA oder Proteinkonzentrationen photometrisch bestimmt werden. Dazu wurde das Gerät mit 1 µL dH₂O equilibriert. Im Anschluss wurde mit 1 µL des Puffers, in dem sich die Probe befand, kalibriert. Nacheinander wurden jeweils 1 µL der Probe gemessen.

3.1.5. BCA-Assay

Mittels Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) wurden Proteinkonzentrationen bestimmt. Es wurde nach Handbuch des Herstellers gearbeitet. Es wurde eine Eichgerade mit bekannter Proteinkonzentration von Bovinem Serum-Albumin (BSA) erstellt. Diese umfasste einen Konzentrationsbereich von 2000 – 0 µg/mL. Die zu messenden Proben wurden 1:1000 verdünnt und jeweils 25 µL in ein Well einer durchsichtigen 96-Well Platte gegeben. Pro Well wurden 200 µL der Working Solution hinzugegeben. Die Platte wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben im Plattenreader bei 562 nm gemessen. Die Konzentration der Proteine wurde durch die Steigungsformel der Eichgeraden ermittelt.

3.1.6. Antikörpervalidierung

3.1.6.1. Antikörper Labeling

Die Fluoreszenzmarkierung von Antikörpern mit R-Phycoerythrin wurde mittels PE/R_Phycoerythrin Conjugation Kit – Lightning Link durchgeführt. Dabei wurde nach Handbuch des Herstellers gearbeitet.

Es wurden 60 µL des phospho-PKA-Substrat Antikörpers mit 6 µL Modifier Reagenz durch vortexen gemischt. Anschließend wurde das Gemisch in den lypholisierten R-Phycoerythrin

Conjugation Mix pipettiert und dieses durch auf- und abpipettieren resuspendiert. Es wurde für 3 h dunkel bei RT inkubiert. Anschließend wurden 6 µL Quencher Reagenz hinzugegeben, um nicht gebundenes PE-Konjugat zu binden. Der gelabelte Antikörper wurde bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.1.7. Proteinexpression

3.1.7.1. Herstellung kompetenter Zellen

Für die Herstellung chemisch kompetenter Bakterien wurden Glycerolstocks betreffender Stämme auf einer mit Antibiotika behandelten LB-Platte (dabei die spezifische Antibiotika-Resistenz der Stämme beachten) zur Vereinzelnung ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Einzelkolonie gepickt und in 50 mL LB-Medium bei 37 °C, 600 rpm auf eine OD von 0,2-0,3 wachsen lassen. Hatten die Zellen die gewünschte Dichte erreicht, wurde die Kultur weitere 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Kultur in ein geeignetes Gefäß überführt und bei 4 °C für 5 min bei 5600 rpm zentrifugiert. Das Medium wurde verworfen und das Zellpellet in 1,5 mL TSS-Puffer (Tabelle 9) resuspendiert. 100 µL Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C gelagert.

3.1.7.2. Transformation

100 µL der kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in dünnwandige PCR-Tubes pipettiert. Nach Zugabe von 100 ng des zu transformierenden Plasmids wurde die Bakteriensuspension für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschritt bei 42 °C für 3 min auf dem Heizblock. Die Suspension wurde zu 500 µL 2YT-Medium gegeben und weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 100 µL auf einer geeigneten LB-Platte mit je 100 ng/mL der entsprechenden Antibiotika (Resistenz vom Stamm und Plasmid) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Am Folgetag wurde eine Einzelkolonie gepickt und in 5 mL LB-Medium bei 37 °C und 600 rpm über Nacht wachsen gelassen.

Aus dieser wurden 1,2 mL der Kultur mit 400 µL Glycerol versetzt und als Glycerolstock bei -80 °C weggefroren.

Für den jeweiligen Zweck wurden dabei verschiedene Bakterienstämme verwendet. Der *Escherichia coli* (*E.coli*) Stamm XL-1blue wurde für eine hohe Plasmid-Replikation und nachfolgende Plasmid-Präparation genutzt, BL21-CodonPlus-D3 für eine Protein-Expression.

3.1.7.3. Plasmid- Präparation

Die Plasmid-Präparation erfolgte gemäß dem Protokoll von MACHEREY-NAGEL 07/2010 NucleoSpin® Plasmid (Isolation of high-copy plasmid DNA from *E. coli*). Dafür wurden 3 mL der Übernachtskultur des transformierten XL-1blue Stammes für 30 sec bei 11000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 250 µL A1-Puffer durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Anschließend wurden 250 µL A2-Puffer hinzugegeben und durch wiederholtes Invertieren gemischt. Es wurde 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 300 µL A3-Puffer und wiederholtem invertieren wurde für 5 min bei 11000 x g zentrifugiert.

Der Überstand wurde im Anschluss in die NucleoSpin® Plasmid Column überführt und mit einem Sammelröhrchen für 1 min bei 11000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Die Säule wurde mit 500 µL AW-Puffer, welcher zuvor auf 50 °C erwärmt wurde, gewaschen und anschließend für 1 min bei 11.000 x g zentrifugiert. Nach Zugabe von 600 µL A4-Puffer auf die Säule wurde zwei Mal für 1 min bei 11000 x g zentrifugiert.

Das Plasmid wurde anschließend durch Zentrifugation bei 11.000 x g für 1 min mit 50 µL AE-Puffer von der Säule in ein sauberes Gefäß eluiert, durch Zentrifugation bei 11.000 x g für 1 min. Das eluierte Plasmid wurde nach Konzentrationsbestimmung mittels Nanodrop bei -20 °C bis zur weiteren Nutzung gelagert.

3.1.7.4. Restriktionsverdau

Für die Kontrolle des präparierten Plasmids wurde dieses durch Inkubation mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut und anschließend durch Gelelektrophorese getrennt.

Dafür wurden 500 ng des zu untersuchenden Plasmids mit 1 µL Enzym 1 und 1 µL Enzym 2 (nur bei Doppelverdau) sowie 2 µL 10x TA-Puffer gemischt, und mit dH₂O auf 20 µL aufgefüllt. Es wurde für 90 min bei 37 °C inkubiert (Temperatur abhängig vom Optimum der Restriktionsenzyme). Die verwendeten Plasmide enthielten zwei verschiedene Expressionsvektoren, sodass unterschiedliche Enzyme verwendet wurden (pEX-A128 *Bam*HI sowie *Not*I und pEX-A258 *Xho*I sowie *Eco*RI). Zur Kontrolle wurden neben dem Doppelverdau auch unverdautes Plasmid sowie einzel-Enzym Restriktionen angesetzt.

Nach Inkubation wurden die Proben mit jeweils 4 µL 6x DNA-Loading-Dye, sowie mit 1 µL einer 1:1000 Verdünnung von SYBR-Green versetzt und auf ein 2 % Agarosegel aufgetragen.

3.1.7.5. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Vervielfältigung der entsprechenden Plasmidabschnitte wurde eine PCR durchgeführt. Dazu wurden mit dem pEX-Vektor kompatible Vorwärts- sowie Rückwärts-Primer designed und in einer Konzentration von 100 pmol/ μ L verdünnt. Es wurde das PCR High Fidelity Phusion Kit der Firma VWR Chemicals verwendet. In einem dünnwandigen PCR-Tube wurden pro Ansatz 35,5 μ L dH₂O, 10 μ L Puffer, 1 μ L dNTPS, je 1 μ L Primer, 10 pmol Plasmid (entspricht 1 μ L aus Vorverdünnung) sowie 0,5 μ L Polymerase gemischt. Für die Denaturierung des Plasmids wurde in einem Thermo-Cycler bei 96 °C für 30 sec inkubiert. Es folgten eine Primerhybridisierung bei 62 °C für 30 sec sowie die Elongationsphase bei 72 °C für 2,5 min. Diese Schritte wurden für eine Gesamtanzahl von 35 Zyklen wiederholt. Anschließend wurden die Proben auf 5 °C gekühlt.

Es erfolgte eine Aufreinigung des PCR-Produktes gemäß dem Protokoll von MACHEREY-NAGEL 07/2010 NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (PCR clean-up). Dafür wurden 50 μ L des PCR-Produktes mit 100 μ L NTI-Puffer gemischt. Dies wurde auf eine NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up Säule gegeben und für 30 sec bei 11000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend wurden 700 μ L NT3-Puffer auf die Säule gegeben, um diese zu waschen. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 30 sec bei 11.000 x g. Die Säule wurde durch wiederholte Zentrifugation für 1 min getrocknet. Im Anschluss wurde die DNA durch Zugabe von 30 μ L NE-Puffer mit einer Zentrifugation für 1 min bei 11.000 x g eluiert.

Die Konzentration der aufgereinigten PCR-Produkte wurde mittels Nanodrop bestimmt. Anschließend wurden diese bei -20 °C gelagert.

3.1.7.6. *In vivo* Proteinexpression

Für die *in vivo* Proteinexpression wurden mit entsprechendem Plasmid transformierte BL21-CodonPlus-D3 (siehe 3.1.7.2) verwendet. Dafür wurde je eine 30 mL LB-Kultur mit Ampicillin und Tetracyclin (jeweils 100 ng/ μ L) mit den transformierten Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 600 rpm inkubiert. Am Folgetag wurden 25 mL dieser Kultur in 250 mL frisches LB-Medium gegeben, und bei 37 °C bei 600 rpm bis zu einer OD von 0,5-0,6 wachsen gelassen. Anschließend wurde 100 μ L IPTG zu der Kultur hinzugegeben, sodass dieses am Ende in einer Konzentration von 1 mM enthalten war. Nach 4,5 h Inkubation bei 37 °C und 600 rpm, wurde die Kultur für weitere 20 min auf Eis gestellt. Die Kulturen wurden im Anschluss bei 4 °C bei 4000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Pellets wurden gewogen und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

Für die Zellyse wurde BPer Reagent verwendet. Pro Gramm Zellpellet wurden 4 mL Lysepuffer hinzugegeben und resuspendiert. Anschließend wurden die Lysat-Suspensionen mittels Ultraschallfinger für 3 x 30 sec bei 30 % Power aus Eis ultraschallbehandelt. Nach anschließender 5 min Zentrifugation bei 15.000 x g wurde der Überstand vorsichtig entnommen, in 500 µL aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA-Assay bestimmt.

3.1.7.7. *In vitro* Proteinexpression

Für die *in vitro* Proteinexpression wurden sowohl die Plasmide aus der Plasmid-Präparation (aus 3.1.7.3), als auch die PCR-Produkte (aus 3.1.7.5) verwendet. Es wurden verschiedene Kits zur zellfreien Proteinsynthese ausgetestet.

3.1.7.7.1. *E. coli* Kit

Für die Proteinsynthese mittels *E. coli* Kit wurde nach dem Handbuch des Hersteller (biotechrabbit) für RTS *E. coli* HY Kit gearbeitet. Transkription und Translation der Synthese finden als gekoppelte Reaktion statt. Es wurden pro Ansatz 12 µL *E. coli* Lysat, 10 µL Reaktions Mix, 12 µL Aminosäure Mix, 1 µL Methionin, 5 µL Rekonstitutionspuffer sowie 0,5 ng des Templates in 10 µL dH₂O verdünnt, zusammen pipettiert. Es wurde für 6 h bei 30 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Ansätze über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank gelagert, um eine höhere Effizienz bei der Proteinfaltung zu erzielen.

3.1.7.7.2. Insekten Kit

Für die Proteinsynthese mittels Insekten-Kit wurden zwei verschiedene Hersteller ausgetestet.

3.1.7.7.2.1. RTS 100 Insect Membrane Kit

Es wurde nach Handbuch des Herstellers (biotechrabbit) gearbeitet. Die Reaktionen unterteilen sich in die *in vitro* Transkription und in die *in vitro* Translation. Für die Transkription wurden 8,75 µL RNase/DNase freies Wasser, 5 µL 5x Transkriptions Puffer, 5 µL dNTP Mix, 1,25 µL 20x Enzym Mix und 1,5 ng Plasmid DNA in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben und gevortext. Es wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde bei 12.000 x g für 1 min zentrifugiert, und der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß übertragen. Der Transkriptionsmix wird anschließend auf die DyeEx 2.0 Säule gegeben, und für 3 min bei 750 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde für die Translations-Reaktion mit 5 µL Reaktions-Puffer, 20 µL Insekten Extrakt und 5 µL Energie-Mix gemischt und für 90 min bei 27 °C und 500 rpm inkubiert.

3.1.7.7.2.2. TnT® T7 Insect Cell Extract Protein Expression System

Es wurde nach Handbuch des Herstellers (promega) gearbeitet. Transkription und Translation der Synthese finden als gekoppelte Reaktion statt. In einem Reaktionsgefäß wurden 40 µL des T7 Master Mixes mit 4 µg des Plasmids gemischt und mit Nuclease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 50 µL aufgefüllt. Das Reaktionsgemischt wurde bei 30 °C für 4 h inkubiert.

3.2. Luminex

3.2.1. Kopplung

Für die Kopplung von Peptiden, Antikörpern und Konjugaten wurden magnetische Beads mit spezieller Oberflächenbeschichtung verwendet. Die Kopplung an diese Oberflächen erfolgte nach Handbuch des Herstellers.

3.2.1.1. Kopplung Epoxy-Beads

Vor der Entnahme wurden die Beads gevortext und durch Ultraschallen resuspendiert. Es wurden pro Kopplung 1.000.000 Beads einer Region verwendet (80 µL des Stocks). Die Beads wurden in ein LowBind Tube übertragen und mit Hilfe des magnetic separators dreimalig mit 100 µL dH₂O gewaschen. Nach dem Waschvorgang wurden die Beads in 80 µL 0,1 M Natriumphosphat aufgenommen. Es wurden 10 µL 50 mg/mL Sulfo-NHS und 10 µL 50 mg/mL EDC (beides frisch angesetzt in dH₂O) hinzugegeben und für 20 min auf dem Rotations-Rad lichtgeschützt inkubiert.

Es folgten zwei weitere Waschschrte mit jeweils 250 µL 50 mM MES, pH 5,0. Die Beads wurden anschließend in 100 µL 50 mM MES pH 5,0 aufgenommen. Je nach zu koppelndem Molekül wurden verschiedene Konzentrationen hinzugegeben. Es wurden jeweils 2,5 µg Peptid pro 1.000.000 Beads dazu pipettiert. Für Antikörper wurden nach Titrationsbestimmung 5 µg also Kopplungskonzentration bestimmt. Das Volumen wurde auf 500 µL mit 50 mM MES, pH 5,0 aufgefüllt. Es wurde für 2h bei RT auf dem Rotations-Rad lichtgeschützt inkubiert.

Nach Inkubation wurden die Beads dreimal mit jeweils 250 µL PBS gewaschen, und anschließend in 1 mL PBST mit 0,1% BSA aufgenommen.

Es erfolgte eine Bead-Zählung mittels Thoma-Zählkammer.

3.2.1.2. Kopplung Avidin-Beads

Vor der Entnahme wurden die Beads gevortext und durch Ultraschallen resuspendiert. Es wurden pro Kopplung 500.000 Beads einer Region verwendet (200 μ L des Stocks). Die Beads wurden in ein LowBind Tube übertragen, und mit Hilfe des magnetic separators dreimalig mit 100 μ L PBS gewaschen. Nach dem Waschvorgang wurden die Beads in 250 μ L PBS aufgenommen. Es wurden je nach Molekül entweder 2,5 μ g Antikörper, oder 5 μ g biotinyliertes Konjugat hinzu pipettiert und für 30 min auf dem Rotations-Rad lichtgeschützt inkubiert.

Nach Inkubation wurden die Beads dreimal mit jeweils 250 μ L PBS gewaschen und anschließend in 500 μ L PBST mit 0,1% BSA aufgenommen.

Es erfolgte eine Bead-Zählung mittels Thoma-Zählkammer.

3.2.1.3. Kopplungsnachweis

Der Nachweis der Kopplung erfolgte in Abhängigkeit des gekoppelten Moleküls.

Um die erfolgreiche Kopplung eines der Peptide nachzuweisen, wurden 5000 Beads in ein Well einer 96-Well-Platte pipettiert und mittels automatisierter Waschstation gewaschen. Es wurden 100 μ L 1 μ g/mL rabbit anti-V5-Tag Antikörper hinzugegeben und lichtgeschützt für 1 h bei RT und 800 rpm inkubiert. Sämtliche gekoppelte Peptide trugen einen V5-Tag, gegen den der Antikörper gerichtet war.

Es erfolgte ein weiteres automatisiertes Waschen. Die Beads wurden in 100 μ L 1 μ g/mL anti-rabbit RPE Antikörper resuspendiert und 1h bei RT und 800 rpm inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Beads in 100 μ L PBST aufgenommen und gemessen.

Um die erfolgreiche Kopplung von Antikörpern zu zeigen, wurden 5000 Beads in ein Well einer 96-Well-Platte pipettiert und mittels automatisierter Waschstation gewaschen. Es wurden 100 μ L 1 μ g/mL RPE-gelabelten Antikörper, gerichtet gegen die Spezies des gekoppelten Antikörpers, hinzugegeben und lichtgeschützt für 1 h bei RT und 800 rpm inkubiert.

Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Beads in 100 μ L PBST aufgenommen und gemessen.

3.2.2. Luminex Assay

Der Luminex-Assay wurde in einer weißen 96-Well Platte mit möglichst dünnem Boden durchgeführt, damit die magnetischen Beads bestmöglich durch einen Magneten angezogen werden konnten und nur wenige Beads dabei verloren gehen. Es wurde zwischen Singleplex-

und Multiplexverfahren unterschieden. Beim Singplex wurden je 5000 Beads einer Region in je ein Well pipettiert. Beim Multiplex wurden je 5000 Beads einer Region zusammen in ein Well gegeben. Um Kreuzreaktivitäten zwischen den gekoppelten Substanzen, oder die Beeinflussung durch die Messung mehrerer Bead-Regionen gleichzeitig ausschließen zu können, wurden die Signalintensitäten zwischen Single- und Multiplexmessungen verglichen. Für einen Multiplex-Ansatz wurde zunächst ein Mastermix bestehend aus den verwendeten gekoppelten Bead-Regionen hergestellt. Dieser wurde gut gemischt und zu gleichen Teilen auf die benötigte Anzahl an Wells aufgeteilt. Die 96-Well Platte wurde auf der automatischen Waschstation befestigt und es wurde 2 min gewartet, bis sich die magnetischen Beads, angezogen durch die magnetische Waschstation, an den unteren Rändern der Wells gesammelt hatten. Es wurde ein zweimaliges Waschen der Wells gestartet, das den Lagerpuffer der Beads wegwusch.

Im Anschluss wurde die Analytenlösung zu den Beads pipettiert. Dabei wurden entweder Serum (für ein Serumscreening), Proteine oder Antikörper verwendet. Beispielfhaft wird hier die Inkubation mit Antikörpern beschrieben. Eventuelle Änderungen zu anderen Verfahren werden an gegebener Stelle beschrieben.

Die Antikörper wurden in geeigneter Verdünnung in PBST mit jeweils 100 μL pro Well dazugegeben. Es wurde 1 h bei 800 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf der automatisierten Waschstation, wie bereits beschrieben, dreimalig gewaschen. Eine weitere Inkubation mit 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ eines RPE-markierten Antikörpers für 1 h bei 800 rpm, gerichtet gegen die Spezies des primären Antikörpers, folgte. Nach wiederholtem Waschen wurden die Beads in PBST aufgenommen und gemessen.

In der Gerätesoftware ließen sich Protokolle erstellen, sodass die Messungen pro Versuchsreihe einheitlich waren. Es wurden jeweils mindestens 100 Beads pro Region pro Well vermessen. Diese wurden nur als messbar identifiziert, wenn das Gating zwischen 5000 und 20.000 lag, um beispielsweise verklumpte Beads, deren Signal verfälscht sein könnte, nicht in die Messung mit einzubeziehen.

Die Messwerte wurden in einer .csv Datei ausgegeben.

Für die Auswertung der Daten wurde der getrimmte Mittelwert verwendet. Dieser Wert beschreibt den Mittelwert der Messwerte, wobei jeweils 2,5 % der höchsten und niedrigsten Messpunkte verworfen werden, um mögliche Ausreißer zu eliminieren.

3.2.3. Mikroarray

3.2.3.1. Spotten

Für die Herstellung von Mikroarrays wurden die Proben mit Hilfe des nicht-Kontakt-Spotting Verfahrens auf speziell beschichtete Epoxy-Glasslides aufgetragen. Es wurde mittels M2 iOne eine Piezzo-Kristall betriebene Nozzle verwendet. Die zu spottenden Proben wurden verdünnt und in eine 394-Well Platte gegeben. Es wurde eine Spannung von 63 V, eine Pulsdauer von 35 μ s und eine Frequenz von 300 Hz angelegt, um eine einheitliche Tropfengröße von 100 pL zu erreichen. Pro Spot wurden 10 Tropfen abgegeben, sodass sich ein Spotvolumen von 1 nL ergab. Die Spots hatten einen ungefähren Durchmesser von 450 μ m (abhängig von der Probe) sowie einen Spot-zu-Spot Abstand von 550 μ m. Der zu bedruckende Bereich sowie die daraus resultierende Spot Anzahl war abhängig von der Inkubationsmethode (siehe Abbildung 6).

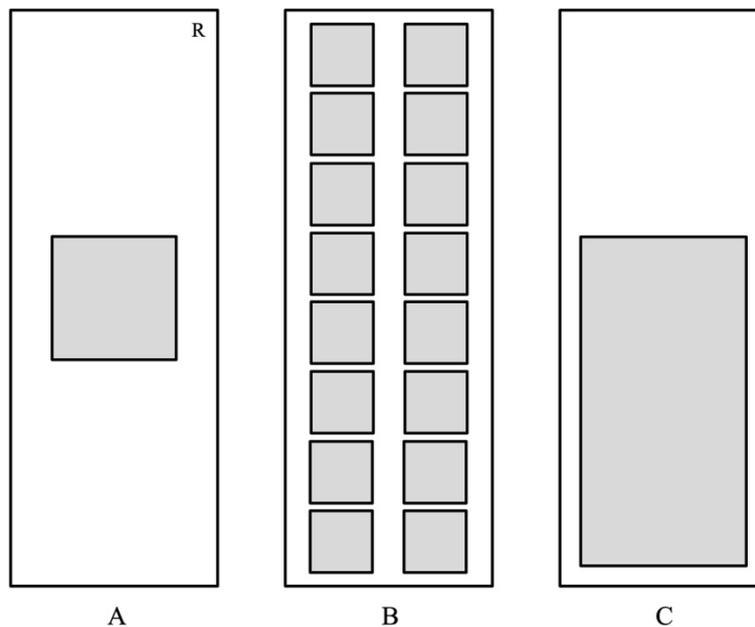


Abbildung 6 Spotting-Targets nach Prozessierungsart

Bedruckbarer Bereich (grau) der Glas-Mikroarrays abhängig von Inkubationsart für **A** BScreen mit maximal 24 x 24 Spots; **B** FAST-Slide Format mit 16 Inkubationskammern mit maximal 8 x8 Spots pro Kammer und **C** für die automatisierte Hybridiersierkammer mit maximal 30 x 80 Spots

Nach Probenauftrag wurden die Slides vakuumverpackt und lichtgeschützt für 48 h bei 4°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.2.3.2. Inkubation

Vor Nutzung der gespotteten Arrays wurden diese zunächst mit dH₂O dreimalig für 10 min gewaschen und anschließend unter N₂ getrocknet. Um eine unspezifische Bindung der Oberfläche zu verhindern, wurde diese mit 50 mM Ethanolamin für 1h bei 200 rpm geblockt. Anschließend wurde dreimalig mit dH₂O für 10 min gewaschen.

Die Inkubation der Slides und die verwendeten Volumina waren abhängig von der jeweiligen Inkubations-Methode.

3.2.3.2.1. FAST-Slide

Im FAST-Slide Formate stehe durch einen Aufsatz 16 verschiedene Inkubationskammern zur Verfügung. Pro Kammer wurden 50 µL der zu untersuchenden Analyten-Lösung verwendet. Der Einfachheit halber wird auch hier eine einfache Antikörper Inkubation beschrieben, und auf eventuelle Änderungen an gegebener Stelle hingewiesen.

Die Antikörperverdünnung wurde für 1h bei 200 rpm in der gegebenen Kammer inkubiert. Im Anschluss wurde dreimalig mit 100 µL PBST für 10 min gewaschen. Es folgte die Inkubation mit einem geeigneten sekundären Antikörper für 1 h bei 200 rpm. Nach wiederholtem Waschen mit PBST wurde der Aufsatz vorsichtig vom Slide entfernt, und durch N₂ getrocknet.

3.2.3.2.2. Hybridisierkammer

Der Inkubationsprozess konnte mittels Hybridisierkammer automatisiert erfolgen. 1 mL der Antikörperlösung wurde gleichmäßig über den Slide verteilt. Die Antikörperkonzentrationen und die Inkubationszeiten entsprechen dabei denen aus 3.2.3.2.1. Nach dem Waschen wurden die Slides aus der Kammer entnommen und durch N₂ getrocknet.

3.2.3.2.3. bScreen

Die Inkubation des Slides mittels bScreen fand automatisiert statt. Der Slide wurde zuerst mit 2 mL PBST mit einer Fließgeschwindigkeit von 2 µL/s gewaschen. Anschließend wurden 1 mL der Antikörperlösung mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 µL/s über den Slide gegeben. Danach folgte ein Waschschritt mit PBST von 2 mL mit einer Fließgeschwindigkeit von 2 µL/s, welcher als Dissoziation bezeichnet wurde. Es folgte ein Regenerationsschritt mittels 10 % SDS Lösung, um die Bindungen zwischen Probe und Analyt wieder zu trennen um den Slide mehrmals verwenden zu können.

3.2.3.3. Auswertung

3.2.3.3.1. Fluoreszenz-Scanner

Die Glasslides, welche mit einem fluoreszenz-gelabelten Antikörper (Alexa 555) inkubiert wurden, wurden mittels GenePix 4300 A Scanner bei einer Wellenlänge von 532 nm gemessen. Es wurde eine Einstellung von 400 PMT sowie einer Laserstärke von 40 % als Ausgangspunkt gewählt. Bei nicht differenzierbaren Signalen wurden diese Einstellungen angepasst.

Die Spots wurden einzeln betrachtet und der Messwert des lokalen Hintergrundes vom Proben-Messwert abgezogen. Es wurde mit den hintergrundbereinigten mittleren Fluoreszenzwerten gearbeitet.

3.2.3.3.2. bScreen

Da es sich beim bScreen um eine lautfreies Messprinzip handelt, war die Verwendung eines fluoreszenz-markierten Antikörpers nicht von Nöten. Es wurde die Änderungen der Lichtbrechung an den Spots pro Sekunde gemessen, und vom Signal des lokalen Hintergrundes bereinigt. Es wurden für jede Sekunde die Hintergrund-bereinigten Messwerte der einzelnen Spots ausgegeben.

3.3. Versuchsaufbauten

Es wurden verschiedene Test-Systeme zur Antikörpercharakterisierung und der Anwendung von antikörperbasierten Systemen im Multiplex-Format auf dem Luminex entwickelt. Die Ergebnisse wurden in Vergleich zu anderen gängigen Methoden gestellt.

3.3.1. Epitopemapping

Die Bindung des phospho-PKA-Substrat Antikörpers an verschiedene Peptide, welche die Konsensussequenz RRxS/T trugen wurden untersucht. Dafür wurden ausgehend vom ARMS und von CREB Protein verschiedene Peptide mit bekannten PKA-Target Sequenzen entworfen, die zum Teil vor-phosphoryliert vorlagen. Es wurde die Bindung des Antikörpers an diese untersucht.

3.3.1.1. Luminex

Die Peptide wurden, wie in 3.2.1.1 beschrieben, an je eine Region magnetischer Epoxy-Beads gekoppelt. Die Kopplungskontrolle erfolgte über den V5-Tag an den Peptiden. Es wurde geprüft, ob es Unterschiede im Single- und Multiplex-Ansatz gibt. Dafür wurde für den

Singleplex-Ansatz je 5000 Beads einer Beadregion pro Well eingesetzt, für den Multiplex-Ansatz wurden 5000 Beads pro Region zusammen in ein Well eingesetzt. Es wurden 100 μL einer 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Verdünnung des phospho-PKA-Substrat Antikörpers pro Well eingesetzt und für 1 h bei 800 rpm inkubiert. Nach automatisierten drei Waschschritten wurden mit 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ R-Phycoerythrin gelabelten anti rabbit Antikörper für 1 h bei 800 rpm inkubiert. Die Messeinstellungen entsprachen im Anschluss denen aus 3.2.2.

Entsprachen die Ergebnisse des Single und des Multiplexes einander, so wurden die Versuche im Multiplex-Format repliziert.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem getrimmten Mittelwert mittels GraphPad.

3.3.1.2. Mikroarray

Die zu untersuchenden Peptide wurden, wie in 3.2.3.1 beschrieben, auf die Oberfläche eines Epoxy-Slides im Hybridisierkammerformat immobilisiert. Dabei wurde jedes Peptid in 30 Replikaten gespottet. Das Blocken der Slides mit 50 mM Ethanolamin erfolgte händisch. In der Hybridisierkammer wurde der Slide anschließend mit 1 mL einer 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Verdünnung des phospho-PKA-Substrat Antikörpers für 1 h inkubiert. Nach 20 min Waschen mit PBST erfolgte eine weitere Inkubation mit 1 mL einer 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Verdünnung eines anti-rabbit Alexa 555 Antikörpers für 1h. Nach weiteren 20 min Waschen mit PBST wurde der Slide mit N_2 getrocknet und vermessen.

Die Datenauswertung erfolgte per GenePixPro, wobei für jeden Spot der Messwert des lokalen Hintergrundes vom Messsignal abgezogen wurde.

3.3.2. Kinetische Analyse

Peptide die bekannte PKA Targets darstellen wurden, wie in 3.2.1.1 beschrieben, an Epoxy-Beads verschiedener Regionen gekoppelt. Die Kopplung wurde über den an den Peptiden vorhandenen V5-Tag überprüft.

3.3.2.1. Kinase-Assay

Da die Peptide in unphosphorylierter Form an die Beads gekoppelt wurden, wurden diese in einem Kinase-Assay *in vitro* phosphoryliert.

Dazu wurden die Beads zuerst mit Hilfe einer magnetbasierten Apparatur, zur Trennung der Beads von der Flüssigkeit, mit jeweils 200 μL PBST dreimalig gewaschen. Pro Reaktionsgefäß

wurde im Anschluss 10 μL 10 x Kinasepuffer, 0,6 μL ATP (100 mM) sowie 89,4 μL dH_2O und 1 μL muriner PKA hinzugegeben. Es wurde für 30 min bei 30 °C und 300 rpm inkubiert.

Die Phosphorylierung wurde nach Waschen im Reaktionsgefäß sowohl im Single- als auch im Multiplex überprüft. Für den Singleplex-Ansatz wurden 5.000 Beads der Regionen in je ein Well pipettiert, für den Multiplex-Ansatz wurden 5000 Beads jeder Region zusammen in ein Well gegeben. Es folgte eine Inkubation mit 100 μL einer 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Verdünnung des phospho-PKA-Substrat Antikörper, sowie nachfolgend eine Inkubation mit einem RPE-gelabelten anti-rabbit Antikörper. Als Vergleich wurden die gekoppelten Peptide in unphosphorylierter Form vermessen.

3.3.2.2. Kinetische Auswertung

Es wurde ein Mastermix aus den Beads mit phosphorylierten Peptiden hergestellt und gut gemischt. Zusätzlich dazu wurden Beads mit gekoppeltem phosphoryliertem Standardpeptid hinzugegeben, welches bereits durch verschiedene Methoden charakterisiert wurde. Der Mastermix wurde so aufgeteilt, dass jedes Well 5000 Beads jeder Region enthielt. Es wurde mit verschiedenen Konzentrationen des phospho-PKA-Substrat Antikörpers pro Well mit einem Volumen von 100 μL für 1h bei 800 rpm inkubiert. Nach dem Waschen wurde mit einer 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Verdünnung eines RPE-markierten anti-rabbit Antikörpers für 1h bei 800 rpm inkubiert.

Um zu sehen, ob der sekundäre Antikörper die Detektion des Bindungsverhaltens des primären Antikörpers verfälscht, wurde der phospho-PKA-Substrat Antikörper, wie in 3.1.6.1 beschrieben, direkt markiert. Es wurden die gleichen Verdünnungen wie beim doppelten Antikörper Ansatz verwendet. Es wurden jeweils 100 μL verwendet und für 1 h bei 800 rpm inkubiert. Nach dem Waschschrift wurden die Beads in je 100 μL PBST resuspendiert und mit den Geräteeinstellungen aus 3.2.2 vermessen.

Die getrimmten Daten wurden mit GraphPad ausgewertet.

3.3.3. Kompetitiver Assay

Es wurden verschiedene Antikörper getestet, die spezifisch THC- bzw. CBD-Biotin Konjugate binden. Nach der Antikörper-Validierung sollte ein kompetitiver Test entwickelt werden.

3.3.3.1. Kopplung von Biotin-Konjugaten an Avidin-Beads

Die biotinylierten Konjugate wurden, wie in 3.2.1.2 beschrieben, an Avidin-Beads gekoppelt. Dafür wurden 5 µg Konjugat pro 500.000 Beads verwendet. Ein Kopplungsnachweis wurde mittels zwei Varianten versucht. Einerseits wurde ein anti-THC Antikörper verwendet, welcher in 1:500 Verdünnung mit 5000 Beads in einem Well für 1 h bei 800 rpm inkubiert wurde. Im Anschluss wurde nach dem Waschen mit einem anti-mouse RPE- gekoppelten Antikörper für 1 h bei 800 rpm inkubiert, und anschließend im Luminex vermessen.

Andererseits wurden gekoppelte Beads, sowie ungekoppelte Beads jeweils im Singleplex mit biotinyliertem goat anti-mouse und im Anschluss mit einem RPE-Konjugierten anti-mouse Antikörper inkubiert und der Unterschied in der Signalintensität auf Grund der freien Avidin-Gruppen betrachtet.

3.3.3.2. Antikörpervalidierung

Die zu testenden Antikörper wurden in jeweils einem Well mit 5000 Beads pro Region für 1 h bei 800 rpm in einer 1 µg/mL Verdünnung inkubiert, um ihre generelle Bindung an die gekoppelte Konjugate nachzuweisen. Zur Detektion wurde mit einer 1 µg/mL Verdünnung eines anti-mouse RPE-markierten Antikörpers für 1h bei 800 rpm inkubiert. Die Geräteeinstellungen waren definiert wie in 3.2.2.

Die Spezifität der Antikörper zu ihrem jeweiligen Konjugat wurde in Konkurrenz zur Kreuzreaktivität auf das jeweils andere Konjugat gesetzt und es wurden Ratios berechnet. Mit den jeweils drei spezifischsten Antikörpern wurde weitergearbeitet.

Es wurden Verdünnungsreihen der Antikörper hergestellt und mit jeweils 5000 Beads pro Region für 1 h bei 800 rpm inkubiert. Nach dem Waschen wurden jeweils 100 µL einer 1 µg/mL Verdünnung von anti-mouse RPE-gekoppeltem Antikörper für 1 h bei 800 rpm inkubiert. Aus den sich ergebenden Messwerten wurden mittels GraphPad die Bindungskinetiken berechnet.

3.3.3.3. Kompetitiver Assay

Es wurden jeweils 5000 Beads pro Region pro Well vorgelegt. Pro Well wurden 100 µL PBST pipettiert. Im Anschluss wurden Droge beziehungsweise Drogenkonjugat in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben. Es wurde ein molekulares Verhältnis zwischen Droge(-nkonjugat) und Antikörper berechnet. Nach dem Mischen wurde der Antikörper hinzugegeben und für 1 h bei 800 rpm inkubiert. Es wurde mit 1 µg/mL eines anti-mouse RPE-gekoppeltem Antikörpers für 1 h bei 800 rpm inkubiert und anschließend vermessen.

Dieser Ansatz wurde zusätzlich, anstatt in PBST, in humanem Leerserum wiederholt.

3.3.3.4. Testsystem

Um die validierten Antikörper auf Grenzen hin zu testen, wurden THC-Konzentrationen entsprechend des StVG verwendet. Dem Leerserum wurden Konzentrationen von 0-50.000 ng an THC bzw. CBD beigefügt und zusammen mit je 5000 Beads pro Region in ein Well pipettiert. Es wurden 100 µL des zu testenden Antikörpers in einer 1 µg/mL Verdünnung hinzugegeben und für 1 h bei 800 rpm inkubiert. Nach dem Waschen wurde mit einem anti-mouse RPE-gekoppelten Antikörper in 1 µg/mL Verdünnung bei 800 rpm für 1 h inkubiert.

3.3.4. Serumscreening

Für das Serum-IgE Screening wurden insgesamt 12 verschiedene potenzielle Allergene ausgewählt. Diese wurden auf verschiedene Weisen rekombinant hergestellt (siehe 3.1.7.6 und 3.1.7.7)

3.3.4.1. Luminex

3.3.4.1.1. Proteinbindung

Um die in 3.1.7.6 und 3.1.7.7 synthetisierten Proteine an den Beads zu immobilisieren, wurden deren V5-Tag benutzt. Es wurden an entsprechender Anzahl an Bead Regionen anti-V5-Antikörper gekoppelt (Konzentration bestimmt durch Titration). Es wurden jeweils 500.000 Beads mit 5 mg (*in vivo* Expression) bzw. mit 100 µL (*in vitro* Expression) Ansatz über Nacht bei 4 °C auf dem Rotationsinkubator inkubiert. Anschließend wurden die Beads dreimalig mit jeweils 100 µL PBST mit Hilfe des magnetic separators gewaschen und in 500 µL PBST resuspendiert.

3.3.4.1.2. Kontrollproben

Für einen generellen Nachweis an equinem IgE im Serum wurden 5 µg eines biotinylierten rabbit anti-horse IgE Antikörper an MagAvidin Beads gekoppelt und mittels anti-rabbit RPE-gekoppelten Antikörpers bestätigt.

Für die Ermittlung eines möglichen Hintergrundsignals durch Herstellungskomponenten der Proteine wurden Negativkontrollen mitgeführt, die kein zugegebenes Plasmid enthielten und demnach kein Protein mit V5-Tag exprimieren konnten.

3.3.4.1.3. Seruminkubation

Es wurde ein Mastermix aus den verschiedenen Bead-Regionen, welche durch den gekoppelten anti-V5 Antikörper die Proteine gebunden haben, hergestellt. Es wurden pro Region 2500 Beads in ein Well pipettiert. Pro Well wurden jeweils 100 μL des zu untersuchenden Pferdeserums unverdünnt hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation für 8 Stunden bei 4 °C und 800 rpm.

Die Beads wurden im Anschluss gewaschen, und mit einem mouse anti-horse IgE Antikörper inkubiert. Dafür wurden pro Well 100 μL der 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Verdünnung hinzugegeben und für 1 h bei 800 rpm inkubiert. Nach weiterem Waschen wurde mit einer 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Verdünnung eines anti-rabbit RPE-gekoppelten Antikörpers, ebenfalls für 1h bei 800 rpm, inkubiert.

Die Messung erfolgte nach weiterem Waschen und Resuspendierung der Beads in je 100 μL PBST mit den Geräteeinstellungen analog zu 3.2.2.

3.3.4.1.4. Normalisierung und Cut-off Wert Berechnung

Es wurde mit dem getrimmten Mittelwert der Messwerte gearbeitet. Die jeweiligen Messwerte der einzelnen Protein-Beads wurden durch das Signal der Negativkontroll-Beads normalisiert. Es wurde für jedes Well ein Cut-Off Wert, der sich aus dem Mittelwert des Negativansatzes plus 3 x seiner Standardabweichung ergab, berechnet. Normalisierte Messwerte, die über dem Cut-Off Wert lagen, wurden als positiv gewertet.

4. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse, die während dieser Arbeit erzielt wurden, dargestellt. Ziel war es, ein Bead-basiertes multiplexes Messsystem für die Charakterisierung von Antikörpern zu etablieren und mit vorhandenen Messmethoden zu vergleichen. Anschließend wurden zwei verschiedene multiplexe Methoden zur Antikörpervalidierung mit verschiedenen biologisch relevanten Fragestellungen entworfen und getestet.

4.1. Antikörpercharakterisierung

Für die Etablierung der Antikörpercharakterisierung wurde ein phospho-PKA-Substrat Antikörper verwendet. Dieser bindet laut Hersteller spezifisch an RRxS/T Motive, und damit an phosphorylierte Targets der PKA. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass der Antikörper auch andere Targets jenseits der Konsensussequenz mehr oder weniger gut erkennt und bindet [78]. Um falschen Interpretationen auf Grund der Ergebnisse vorzubeugen, sollte ausgetestet werden, wie sich der Antikörper an verschiedenen Targets verhält und welche Aminosäuren ausschlaggebend für eine Bindung sind.

4.1.1. Epitopemapping

Um Unterschiede im Bindungsverhalten des Antikörpers zu zeigen, wurden Peptide ausgehend von Sequenzen aus dem *Ankyrin-repeat rich membrane spanning* Protein (ARMS) und *cAMP response element-binding* Protein (CREB) verwendet. Diese Proteine wurden ausgewählt, da vorangegangene Arbeiten zeigten, dass beide Proteine eine Vielzahl an unterschiedlichen potenziellen und bekannten PKA-Bindemotiven enthalten. Ausgehend von der Konsensussequenz ARRSS* wurden Mutanten verwendet, welche leichte Abweichungen vom Motiv zeigten. Dabei wurden sowohl Punktmutationen einzelner Aminosäuren als auch variierende Einzel- und Doppelphosphorylierungen von vorhandenen Serinen vermessen. Es wurde verglichen, ob phosphorylierte Peptide durch den Antikörper besser gebunden werden als die nicht phosphorylierten Formen. Insgesamt wurden 23 verschiedene Peptide vermessen. Die Nomenklatur der Peptide entspricht dem potenziellen Bindemotiv, die vollen Sequenzen sind

Tabelle 16 zu entnehmen. Die Kopplung der Peptide an die Epoxy-Oberfläche der Beads erfolgte über die N-Terminale Aminogruppe. C-Terminal trugen die Peptide zur Kopplungskontrolle alle einen V5-Tag.

4.1.1.1. Kopplungskontrolle

Es erfolgte für die Kopplung und Vermessung die Einteilung der Peptide in zwei verschiedene Sets, ausgehend vom Motiv. So wurde unterteilt in Arginin (R) und Lysin (K) Motive.

Die Kopplung erfolgte nach Luminex Cookbook [79]. Es wurden 5 µg Peptid pro 1.000.000 Beads gekoppelt.

Um die erfolgreiche Kopplung der Peptide an die Beads nachzuweisen, wurden 5000 Beads einer Region zusammen in ein Well einer 96-Well Platte gegeben. Dabei wurde die Unterteilung in die zwei Sets beachtet, um eine Dopplung von zu vermessenden Bead-Regionen zu vermeiden. Es wurden jeweils mit 100 µL einer 1 µg/mL V5-Tag Antikörper Verdünnung inkubiert. Durch anschließende Inkubation mit einem RPE-konjugierten anti-rabbit Antikörper konnte die Bindung gemessen werden.

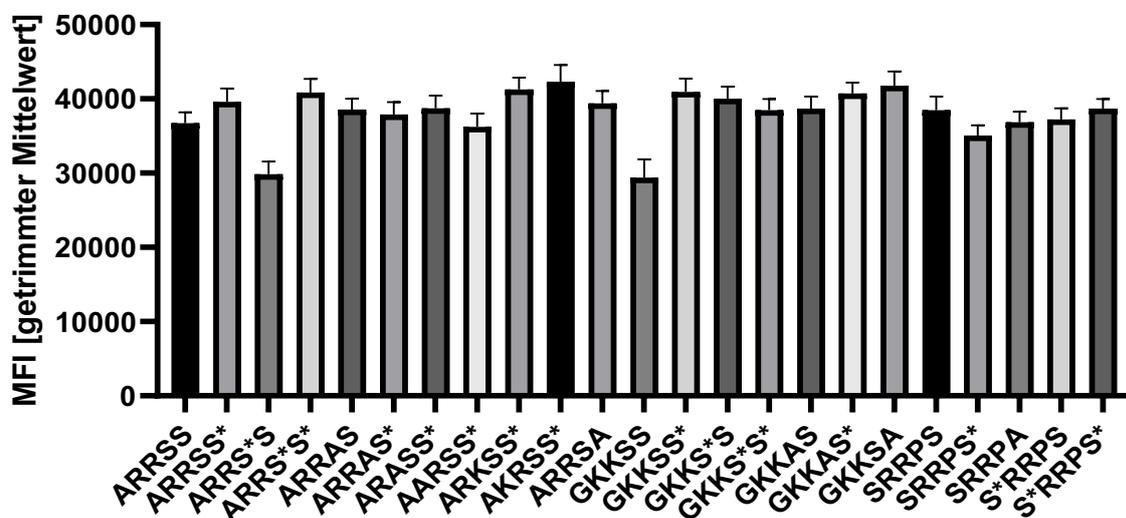


Abbildung 7 Kopplungskontrolle der Peptide (Epitopemapping)

Es wurden 5 µg Peptid an 1.000.000 Beads gekoppelt. Der Nachweis der Kopplung erfolgte durch Adressierung des C-terminalen V5-Tags durch Inkubation mit 1 µg/mL rabbit anti-V5 Antikörper gefolgt von 1 µg/mL goat anti-rabbit RPE Antikörper. Es wurden pro Region mindestens 100 Beads im Multiplex-Ansatz vermessen. Aufgetragen wurde der getrimmte Mittelwert der mittleren Fluoreszenz Intensitäten (MFI) mit Standardabweichung.

Zur besseren Übersicht wurden die Peptide in Abbildung 7 sowie in den Folgeabbildungen nicht nach gemessenem Set, sondern nach Sequenz-Homogenität innerhalb der Phosphorylierungsstelle geordnet und in einer gemeinsamen Grafik dargestellt.

Es ließen sich für die Peptide Signale im Bereich von 36.000 bis 42.000 MFI ermitteln. Damit erkenntlich war eine gleiche Verteilung der Signale, und damit eine homogene Kopplung der Peptide an die jeweilige Bead-Region. Einzig bei ARRS*S sowie GKKSS sind die Signale etwas geringer und liegen nur bei 30.000. Es sollte beobachtet werden, ob sich dies auf eventuelle spätere Messergebnisse auswirkt. Dies könnte auf eine geringere Beladungsdichte durch gekoppelte Peptide zurückzuführen gewesen sein, etwa durch unzureichende Mischung während des Kopplungsprozesses.

4.1.1.2. Multiplex-Versuche

Die Peptide wurden auch hier in zwei Sets, abhängig vom Arginin oder Lysin im potenziellen Bindemotiv, vermessen. Dafür wurden 5000 Beads pro Peptid im Multiplex in einem Well mit 100 μ L einer 1 μ g/mL Verdünnung des phospho-PKA-Substrat Antikörper inkubiert. Diese Antikörperkonzentration wird ebenfalls vom Hersteller empfohlen und zeigte sich bei vorangegangenen Versuchen als optimal. Anschließend wurde mit 1 μ g/mL eines RPE-konjugierten anti-rabbit Antikörpers inkubiert.

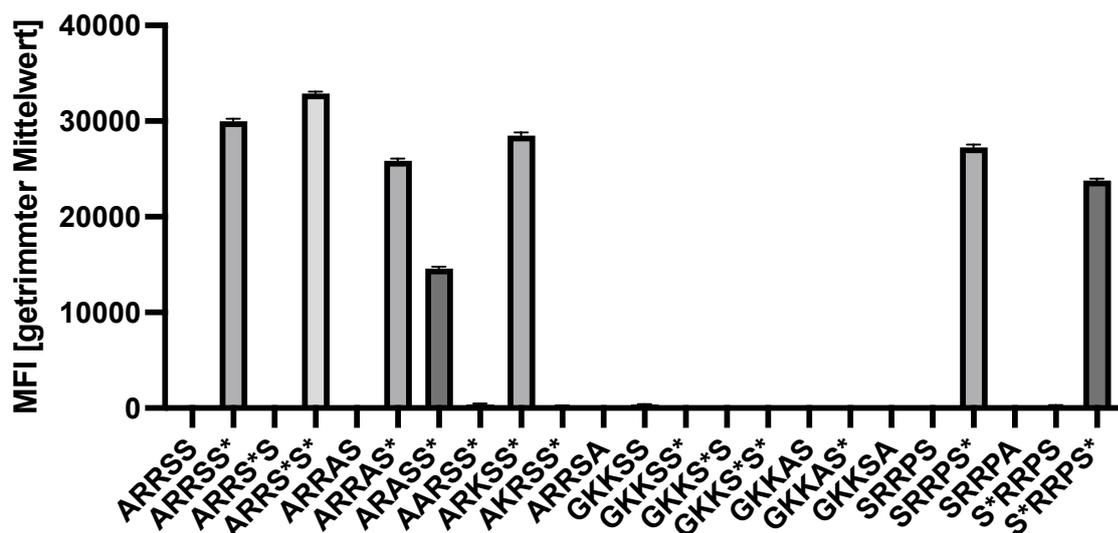


Abbildung 8 Phosphorylierungsnachweis (Bead-basiert)

Die Peptide wurden im Multiplex mit 1 μ g/mL phospho-PKA-Substrat Antikörper gefolgt von 1 μ g/mL goat anti-rabbit RPE Antikörper inkubiert. Es wurden pro Region mindestens 100 Beads vermessen. Aufgetragen wurden der getrimmte Mittelwert der mittleren Fluoreszenz Intensitäten (MFI) mit Standardfehler des Mittelwertes. Bei den positiven Signalen handelt es sich bei allen Peptiden um phosphorylierte Formen.

In Abbildung 8 wird deutlich, dass der Antikörper nur phosphorylierte Targets erkennt und bindet. Es sind deutliche Signale bis zu 30.000 MFI für die Sequenzen ARRSS* und SRRPS* zu messen, die dem angegebene Bindemotiv des Antikörpers entsprechen. Auch für ARRSS*S*, ARRAS*, ARASS*, ARKSS* sowie S*RRPS* lassen sich deutliche Signale von 15.000 bis 30.000 MFI detektieren, wobei das Signal für ARASS* um etwa die Hälfte geringer ausfällt. Für ARRSS, ARRAS, AARSS, ARRSA sowie für GKKSS, GKKAS, GKKSA, SRRPS und SRRPA sind keine signifikanten Signale detektierbar. Ausschlaggebend für die Bindung war jedoch auch die Position der Phosphorylierung. Obwohl ARRSS*S, GKKSS*S, sowie S*RRPS phosphoryliert vorlagen, war kein deutliches Signal messbar. Dies verdeutlicht, dass die P-0 Position, also die Position, an der die Phosphorylierung sitzt, von großer Bedeutung für die Bindung ist. Selbst bei einer doppelten Phosphorylierung wie bei GKKSS*S* findet keine Antikörperbindung statt. Auffällig ist ebenfalls, dass durch Änderung der P-3 Position, also die Aminosäure, die drei Positionen vor der Phosphorylierung sitzt, wie im Fall von AARSS* und GKKSS* von R zu A beziehungsweise K, ebenfalls kein Signal mehr messbar war.

Betrachtet man die in Abbildung 7 geringeren Signale von ARRSS*S und GKKSS, so fällt auf, dass diese im Folgenden vernachlässigt werden können, da der Antikörper an diese gar nicht bindet.

4.1.1.3. Vergleich mit anderen Methoden

Zur Validierung der Ergebnisse wurden die Peptide mittels Peptidmikroarray und Biacore (SPR) untersucht. Für die Mikroarrays wurden pro Peptid 30 Replikate mittels Nicht-Kontakt Dispensierverfahren auf eine Epoxy-Glasoberfläche gespottet. Jeder Spot hatte ein Volumen von etwa 1 nL und enthielt 50 pg/Spot des Peptids.

Der Glasslide wurde mit Hilfe einer automatisierten Hybridisierungskammer mit einer 1 µg/mL Verdünnung des phospho-PKA-Substrat Antikörper inkubiert. Im Anschluss wurde mit 1 µg/mL eines Alexa 555-konjugierten Antikörpers inkubiert.

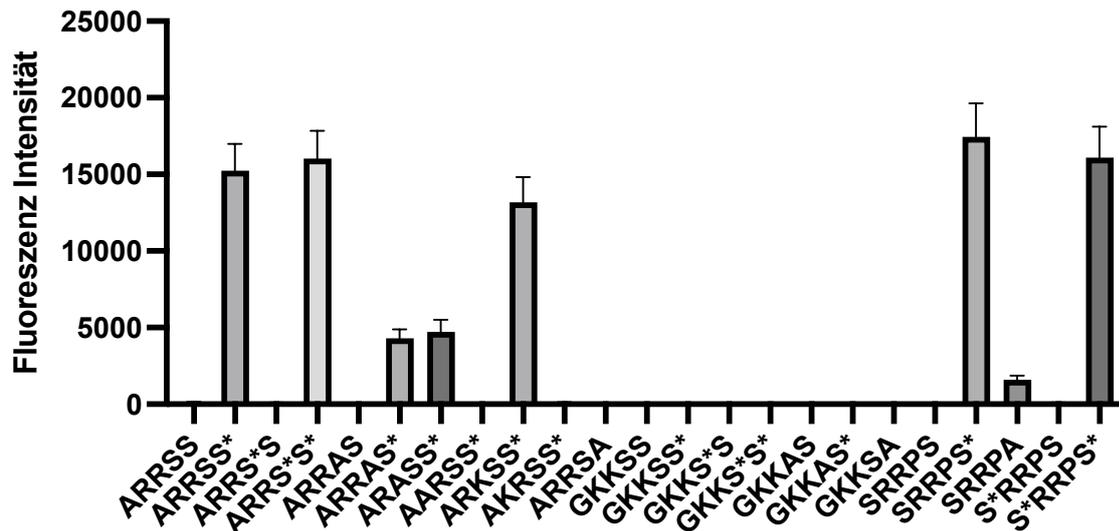


Abbildung 9 Phosphorylierungsnachweis (Mikroarray)

Die Peptide wurden mit 1 µg/mL phospho-PKA-Substrat Antikörper gefolgt von 1 µg/mL goat anti-rabbit Alexa 555 Antikörper inkubiert. Pro Peptid wurden 30 Replikate vermessen. Aufgetragen wurde der hintergrundbereinigte Mittelwert der Fluoreszenzintensität mit Standardfehler des Mittelwertes. Bei den positiven Signalen handelt es sich bei allen Peptiden um phosphorylierte Formen, mit Ausnahme von SRRPA.

Wie auch in 4.1.1.2 ist in Abbildung 9 zu sehen, dass unphosphorylierte Peptide vom Antikörper nicht gebunden wurden. Abweichend vom Bead-basierten Versuch zeigt sich beim Mikroarray ein kleines Signal um 1000 für SRRPA, welches im Verhältnis zu den eindeutig positiven Signalen jedoch sehr gering ist. Wie in der vorangegangenen Messung zeigten sich auch hier positive Signale für ARRSS*, ARRSS*S*, ARRAS*, ARASS*, ARKSS* sowie SRRPS* und S*RRPS*. Auffällig hierbei ist, dass die Signale für ARRAS* und ARASS* im Verhältnis zu den Bead-basierten Versuchen nochmals geringer sind und nur bei etwa 5000 MFI liegen.

Da die Signale zwischen den Messmethoden durch unterschiedliche Maximalsignale nicht vergleichbar waren, wurden diese durch das Signal der Konsensussequenz, welche der Antikörperbeschreibung am ähnlichsten ist, also ARRSS*, normalisiert. Zusätzlich zu den Bead-basierten und Mikroarray Messwerten wurde mit dem jeweiligen maximalen Bindungssignal, welches durch SPR-Messungen erhalten wurde, die sieben positiven Antikörper-Binder dargestellt.

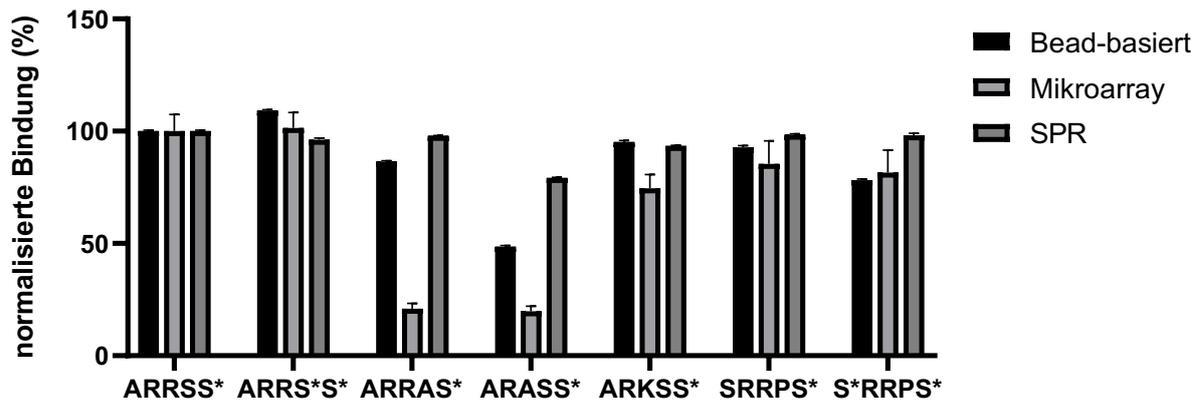


Abbildung 10 Vergleich der normalisierten maximalen Messwerte

Die in vorangegangenen Messungen als positiv bewerteten Peptide wurden auf das Signal der Standardsequenz ARRSS* normalisiert. Die maximalen Signale der verwendeten Messtechniken (Bead-basiert, Mikroarray, SPR) sowie deren Standardabweichung wurden dabei gegenübergestellt. Die normalisierten Signale stimmen für die drei Methoden für alle Peptide außer für ARRAS* und ARASS* überein.

In Abbildung 10 ist die relative Bindung des Antikörpers an die Peptide im Verhältnis zur Bindung von ARRSS* in Prozent zu sehen. Dabei zeigte sich, dass sich die Signale im Verhältnis für ARR*S*, AARKSS*, SRRPS* und S*RRPS* in allen drei Messmethoden nicht voneinander unterscheiden. Lediglich für ARRAS* war das Signal, welches durch Mikroarray gemessen wurde, um 75 % geringer als für die anderen beiden Methoden. Für ARASS* weichen alle drei Methoden voneinander ab, sodass für die Bead-Basierte Methode ein Signalwert von etwa 50 %, für die Mikroarrays von etwa 25 % und für die SPR Messungen 80 % im Vergleich zu ARRSS* gemessen werden konnte.

Damit lässt sich im Bead-basierten Screeningverfahren eine Aussage treffen, wie gut die Antikörper an ihr jeweiliges Epitop binden und, dass auch kleine Mutationen durch Signaländerungen im Bead-basierten Multiplexsystem detektierbar sind. Durch den Vergleich der Messmethoden sieht man jedoch auch, dass diese Unterschiede aufweisen, und jeweils in Relation innerhalb der Methode gesetzt werden muss.

4.1.2. Kinetische Analyse

Für die kinetische Auswertung des phospho-PKA-Substrat Antikörpers wurden verschiedene Peptide verwendet, welche nachgewiesene Targets der PKA sind. Sämtliche Peptide hatten eine Länge von etwa 30 Aminosäuren und beinhalteten Sequenzen, welche in Schmerzrezeptoren vorkommen. C-Terminal trugen sie zum Nachweis einen V5-Tag.

4.1.2.1. Kopplungskontrolle

Es wurden 7 verschiedene Peptide (A-G) verwendet, deren Sequenz Tabelle 16 zu entnehmen ist. Gemäß Luminex Cookbook [79] wurden 5 µg Peptid pro 1.000.000 Beads gekoppelt. Für jedes Peptid wurde zur späteren Unterscheidung eine andere Bead-Region verwendet.

Um die erfolgreiche Kopplung der Peptide an die Beads nachzuweisen, wurden 5000 Beads einer Region in je ein Well einer 96-Well Platte gegeben. Es wurden jeweils mit 100 µL einer 1 µg/mL V5-Tag Antikörper Verdünnung inkubiert. Durch anschließende Inkubation mit 1 µg/mL eines RPE-konjugierten anti-rabbit Antikörpers konnte die Bindung gemessen werden.

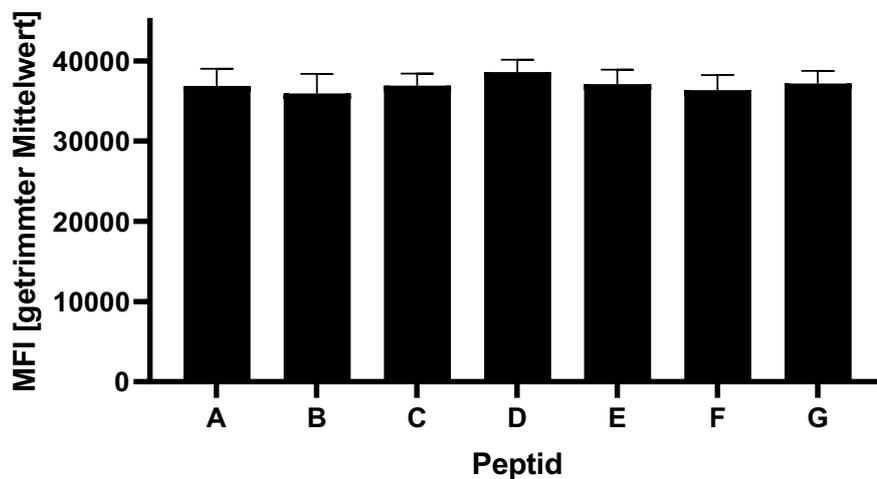


Abbildung 11 Kopplungskontrolle (Kinetische Analyse)

Es wurden 5 µg Peptide an 100.000 Beads gekoppelt. Der Nachweis der Kopplung erfolgte durch Adressierung des C-terminalen V5-Tags durch Inkubation mit 1 µg/mL rabbit anti-V5 Antikörper gefolgt von 1 µg/mL goat anti-rabbit RPE Antikörper. Es wurden pro Region mindestens 100 Beads im Singleplex-Ansatz vermessen. Aufgetragen wurde der getrimmte Mittelwert der mittleren Fluoreszenz Intensitäten mit Standardabweichung.

Durch die Kopplungskontrolle sieht man in Abbildung 11, dass gleiche Mengen an Peptid an der jeweiligen Bead-Region immobilisiert wurden und es keine Unterschiede zwischen der Peptid-Beladung gab. Für alle Peptide lag der Messwert bei ungefähr 39.000 MFI. Die Abhängigkeit möglicherweise nachfolgender Schwankungen der Antikörper-Bindung konnte damit ausgeschlossen werden.

4.1.2.2. Kinase Assay

Der phospho-PKA-Substrat Antikörper bindet nur an phosphorylierte Motive der Form RRxS/T. Die verwendeten Peptide lagen bei Kopplung jedoch in unphosphorylierter Form vor. Es wurden 50.000 Beads pro Peptid entnommen und in einem neuen Reaktionsgefäß gemäß 3.3.2.1 phosphoryliert.

Der Phosphorylierungsstatus der Peptide wurde im Anschluss als Singleplex-Messung ausgetestet. 5000 der potenziell phosphorylierten und auch die unphosphorylierten gekoppelten Peptide wurden in je einem Well mit 100 µL einer 1 µg/mL Verdünnung des phospho-PKA-Substrat Antikörper inkubiert. Anschließend wurde mit 1 µg/mL eines RPE-konjugierten anti-rabbit Antikörpers inkubiert.

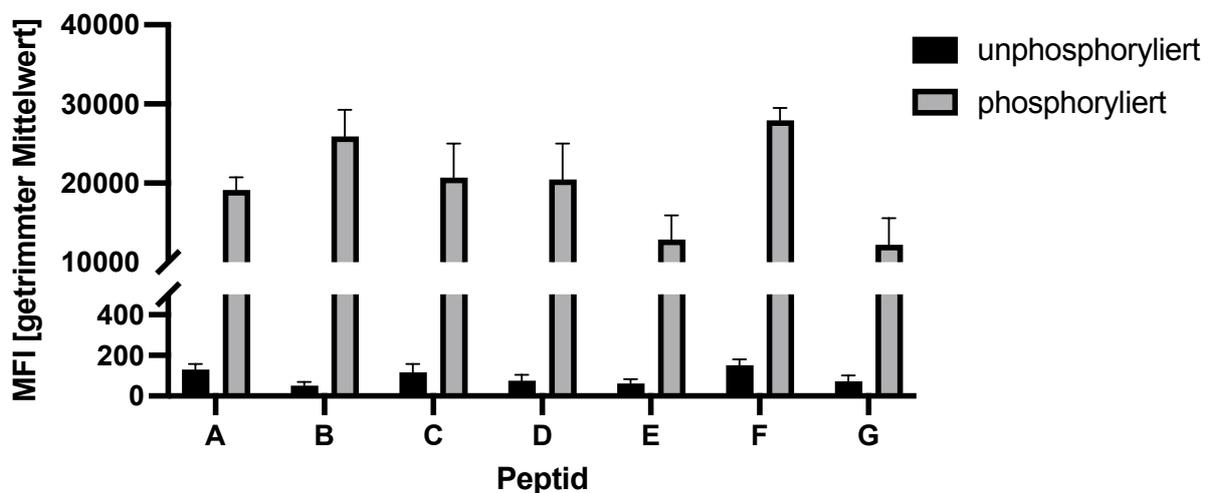


Abbildung 12 Phosphorylierungskontrolle (Kinetische Analyse)

Die Peptide wurden jeweils vor (schwarz) und nach (grau) Kinase-Assay mit 1 µg/mL phospho-PKA-Substrat Antikörper gefolgt von 1 µg/mL goat anti-rabbit RPE Antikörper inkubiert. Es wurden pro Region mindestens 100 Beads im Singleplex vermessen. Aufgetragen wurde der getrimmte Mittelwert der mittleren Fluoreszenz Intensitäten (MFI) mit Standardabweichung. Während vor Phosphorylierung nur geringes Hintergrundsignal an den Peptiden zu detektieren war, zeigten alle Peptide nach Phosphorylierung ein hohes Signal um 20.000 MFI.

Wie in Abbildung 12 zu sehen, wurden Signale im Bereich von 100 bis 150 MFI für die unphosphorylierten Peptide gemessen. Im Gegensatz dazu waren Signale bei phosphorylierten Peptiden von 15.000 bis 25.000 MFI messbar. Eine unspezifische Bindung des Antikörpers an nicht-phosphorylierte Peptide sowohl durch den primären als auch durch den sekundären Antikörper ist damit ausgeschlossen. Gleichzeitig ist auffällig, dass das Bindungssignal, trotz gleichem Signal bei der Kopplungskontrolle, Unterschiede in den Signalintensitäten zeigte.

Diese wurden bei weitergehenden kinetischen Untersuchungen des Antikörpers an den Peptiden ersichtlich.

Im Folgenden wurde mit den phosphorylierten Varianten der Peptide weiter gearbeitet.

4.1.2.3. Vorversuche (Single vs. Multiplex)

Bei den nachfolgenden Versuchen sollte die Inkubation und Messung der Beads nicht in separierten Wells, sondern im Multiplex in einem Well stattfinden. Deswegen wurde getestet, ob sich die Peptide bei beiden Inkubations- und Messmethoden gleich verhalten.

Dafür wurden jeweils 5000 Beads pro Peptid einzeln, als auch in einem Gemisch, bestehend aus 5000 Beads jeder Region, mit 100 μL einer 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Verdünnung des phospho-PKA-Substrat Antikörper inkubiert. Anschließend wurde mit einem RPE-konjugierten anti-rabbit Antikörper inkubiert.

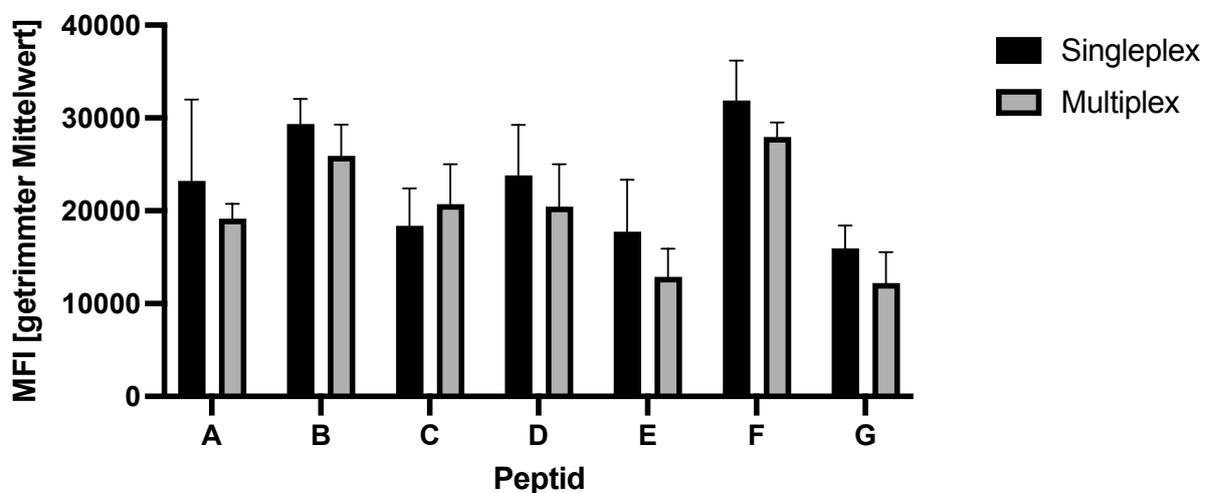


Abbildung 13 Vergleich der Peptide im Single- und im Multiplex

Die phosphorylierten Peptide wurden jeweils im Singleplex (schwarz) mit je einer Region pro Well und Multiplex (grau) mit allen Regionen in einem Well mit 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ phospho-PKA-Substrat Antikörper gefolgt von 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ goat anti-rabbit RPE Antikörper inkubiert. Es wurden pro Region mindestens 100 Beads vermessen. Aufgetragen wurde der getrimmte Mittelwert der mittleren Fluoreszenz Intensitäten (MFI) mit Standardabweichung. Die Signale zeigten für beide Verfahren gleiche Intensitäten.

Man sieht in Abbildung 13 deutlich, dass die Messungen, die im Singleplexverfahren und im Multiplexverfahren inkubiert und vermessen wurden, sich nicht voneinander unterschieden. Die Signalstärken betragen für die einzelnen Peptide zwischen 15000 und 30000 MFI. Die Messungen wurden im Folgenden im multiplexen Format prozessiert.

4.1.2.4. Verdünnungsreihe

Das Ziel war, die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) des phospho-PKA-Substrat Antikörpers zu den verschiedenen Peptiden zu bestimmen. Dafür wurden Verdünnungsreihen des Antikörpers erstellt. Jeweils 5000 Beads jeder Region wurden im Multiplex mit 100 μ L der jeweiligen Verdünnung inkubiert. Anschließend wurde mit einem RPE-konjugierten anti-rabbit Antikörper inkubiert.

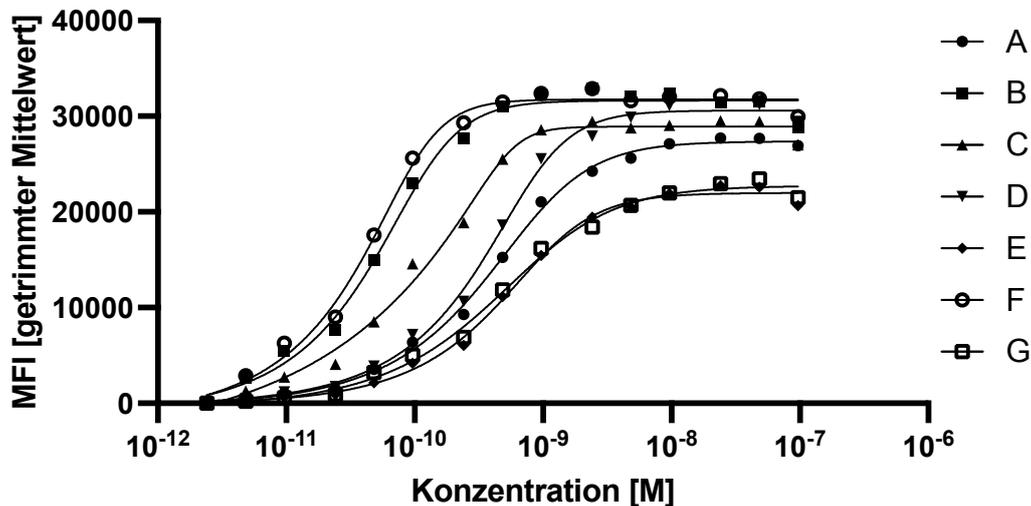


Abbildung 14 Verdünnungsreihe des phospho-PKA-Substrat Antikörpers mit sekundärem RPE-Antikörper

Halblogarithmische Auftragung der Verdünnungsreihe des phospho-PKA-Substrat Antikörpers in Molarität, jeweils im Multiplex vermessen, gefolgt von der Inkubation mit 1 μ g/mL goat anti-rabbit RPE Antikörper. Es wurden pro Region pro Antikörperkonzentration mindestens 100 Beads vermessen. Aufgetragen wurde der getrimmte Mittelwert der mittleren Fluoreszenz Intensitäten (MFI). Es ergeben sich sigmoide Kurvenverläufe für alle Peptide.

In Abbildung 14 sieht man in halblogarithmischer Auftragung die sigmoide Bindungskurven des Antikörpers für die Peptide. Es sind vertikale Verschiebungen der Kurven zu erkennen, die auf die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten des Antikörpers an die Motive in den Peptiden hindeuten. Der größte Unterschied findet sich zwischen Peptid F und Peptid G, wobei dieser bei etwa $10^{1,2}$ liegt. Ab einer Antikörperkonzentration von 10^{-8} liegen sämtliche Peptide komplett in der Sättigung vor und der Kurvenverlauf zeigt ein Plateau.

4.1.2.5. Labeling

Um einen Einfluss des RPE-gelabelten sekundär-Antikörpers auszuschließen, wurde der phospho-PKA-Substrat Antikörper direkt mit R-Phycoerythrin markiert. Dazu wurde das PE /

R-Phycoerythrin Conjugation Kit – Lightning-Link® der Firma abcam verwendet und nach Handbuch gearbeitet.

Es wurden Verdünnungsreihen des gelabelten phospho-PKA-Substrat Antikörpers analog zu 4.1.2.4 hergestellt. 5000 Beads pro Peptid wurden zusammen in einem Well mit jeweils 100 μL der Antikörperverdünnung inkubiert und vermessen.

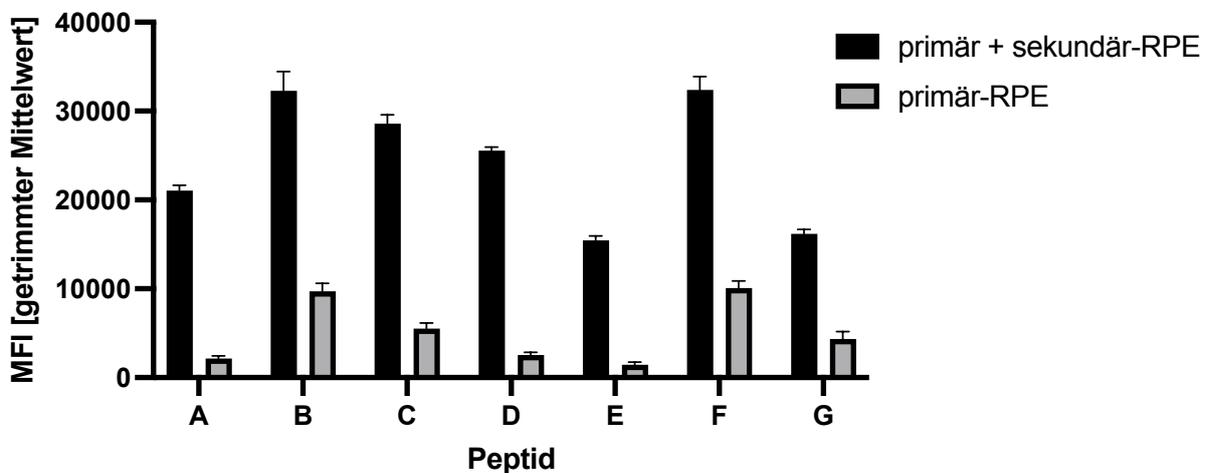


Abbildung 15 Vergleich der Signale für direkt und indirekt gelabelt

Die Peptide wurden jeweils im Multiplex mit 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ phospho-PKA-Substrat Antikörper gefolgt von 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ goat anti-rabbit RPE Antikörper (schwarz) oder mit 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ direkt mit RPE markiertem phospho-PKA-Substrat Antikörper (grau) inkubiert. Es wurden pro Region mindestens 100 Beads vermessen. Aufgetragen wurde der getrimmte Mittelwert der mittleren Fluoreszenz Intensitäten (MFI) mit Standardabweichung. Es sind Unterschiede in den Signalintensitäten der beiden Markierungsarten zu sehen.

Auf den ersten Blick sieht es in Abbildung 15 so aus, als würde es große Unterschiede zwischen den Arten der Markierung geben. Die Werte für den primär- und sekundär-RPE Ansatz zeigen Signale im Bereich von 15.000 bis 35.000 MFI, wohingegen die Signale vom direkt gelabelten Antikörper deutlich niedriger im Bereich von 1500 bis 10.000 MFI für die verwendete Antikörperkonzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ liegen. Betrachtet man jedoch die Verhältnisse der Signale der einzelnen Peptide zueinander, so wird offensichtlich, dass diese annähernd identisch war. Es ist also davon auszugehen, dass die Verwendung eines sekundär gelabelten Antikörpers zwar das Signal verstärkt, dies jedoch gleichmäßig für alle Peptide tut und die Signale somit nach Normalisierung vergleichbar sind. Das bedeutet, dass die Signalintensität, beziehungsweise die experimentell bestimmten K_D -Werte, in normalisierter Form nicht von der Bindung des sekundären Antikörpers abhängen oder beeinflusst werden.

Es wurden im Folgenden Verdünnungsreihen des ungelabelten sowie des gelabelten Antikörpers gemäß 4.1.2.4 erstellt. 5000 Beads pro Peptid wurden zusammen in ein Well gegeben und im Multiplex mit je 100 μL der Antikörperverdünnungen inkubiert und vermessen. Der ungelabelte primäre Antikörper wurde zusätzlich noch mit einem RPE-konjugierten anti-rabbit Antikörper inkubiert.

Zusätzlich zu den Peptiden A-G wurde eine Beadregion mit einem Kontrollpeptid verwendet. Das Kontrollpeptid hat das PKA-Bindemotiv SRRPS*, liegt also bereits in phosphorylierter Form vor und wird, wie in 4.1.1.2 zu sehen, durch den Antikörper erkannt.

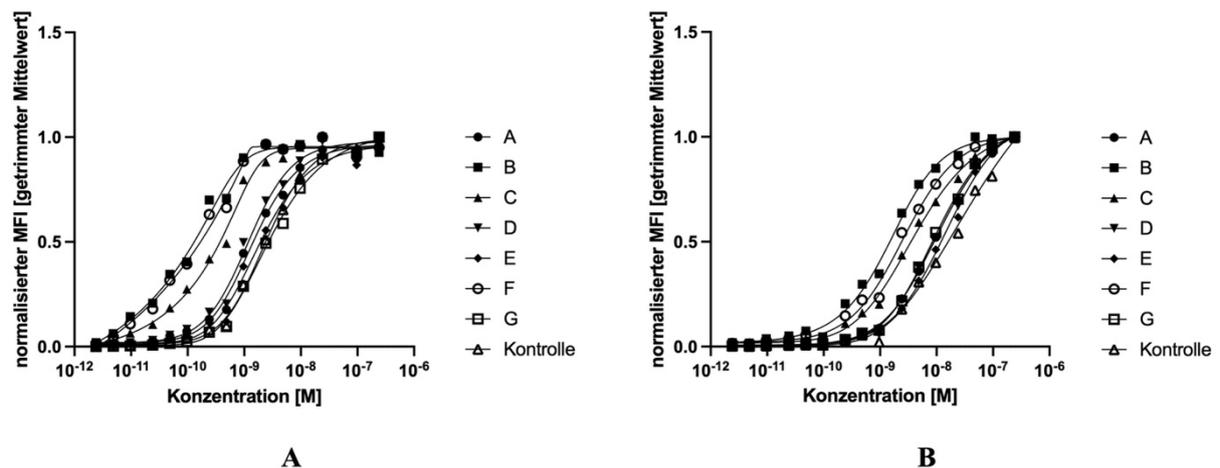


Abbildung 16 Vergleich der normalisierten Signale für direkt und indirekt gelabelte Antikörper (Verdünnungsreihe)

A: Halblogarithmische Auftragung der Verdünnungsreihe des phospho-PKA-Substrat Antikörpers in Molarität, jeweils im Multiplex vermessen, gefolgt von der Inkubation mit 1 $\mu\text{g/mL}$ goat anti-rabbit RPE Antikörper. Messwerte wurden jeweils auf höchstes Signal pro Peptid normalisiert.

B: Halblogarithmische Auftragung der Verdünnungsreihe des RPE-markierten phospho-PKA-Substrat Antikörpers in Molarität, jeweils im Multiplex vermessen. Messwerte wurden jeweils auf höchstes Signal pro Peptid normalisiert.

Es wurden pro Region mindestens 100 Beads vermessen. Aufgetragen wurde der normalisierte getrimmte Mittelwert der mittleren Fluoreszenz Intensitäten.

Die Signale in Abbildung 16 wurden jeweils auf den höchsten Signal-Messwert normalisiert. Es ergeben sich dabei für beide Verdünnungsreihen bei halblogarithmischer Auftragung sigmoidale Kurvenverläufe. Sowohl bei der Inkubation mit dem direkt gelabelten als auch bei dem indirekt gelabelten Antikörper, waren vertikale Verschiebungen der Kurven zu sehen, sodass Unterschiede des Bindungsverhaltens zu erkennen sind. Kurven, die im Diagramm weiter links liegen, zeigen dabei eine höhere Bindungsaffinität als jene, die rechtsverschoben sind.

4.1.2.6. EC₅₀ als K_D

Zur Berechnung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) wurde der EC₅₀ der Bindungskurven verwendet. Der EC₅₀-Wert entspricht dem Wendepunkt der sigmoidalen Kurve und wurde mittels Nonlinear Regression – Asymmetric (five parameter) – Best-fit Values in GraphPad Prism Version 8.4.3 berechnet.

Tabelle 28 Errechnete EC₅₀

	A	B	C	D	E	F	G	Kontrolle
EC₅₀ (1+2)	1,389 10 ⁻⁹ M	1,101 10 ⁻¹⁰ M	3,264 10 ⁻¹⁰ M	1,162 10 ⁻⁹ M	1,854 10 ⁻⁹ M	1,347 10 ⁻¹⁰ M	2,828 10 ⁻⁹ M	2,413 10 ⁻⁹ M
EC₅₀ (1)	7,254 10 ⁻⁹ M	5,954 10 ⁻¹⁰ M	1,758 10 ⁻⁹ M	5,300 10 ⁻⁹ M	8,796 10 ⁻⁹ M	1,375 10 ⁻⁹ M	3,746 10 ⁻⁹ M	5,792 10 ⁻⁸ M

Wie in Tabelle 28 zu sehen, wurde sowohl für die Inkubation mit dem direkt gelabelten phospho-PKA-Substrat Antikörper (1) als auch für die indirekte Markierung durch RPE-gelabelten sekundären Antikörper (1+2) der K_D mit Hilfe des EC₅₀ bestimmt. Man sieht, dass sich beide Werte für jeweils ein Peptid kaum voneinander unterscheiden. Für die Peptide A, E und G liegt der K_D bei beiden Labeling-Varianten im einfachen Nanomolaren Bereich, Peptid B liegt nochmals um den Faktor 10 darunter. Die Unterschiede in den Kurven durch Vertikalverschiebung, lassen sich auch in Abbildung 16 deutlich erkennen. Die Messwerte für Peptid C und F zeigen für den indirekt markierten Ansatz K_D-Werte im Bereich von 10⁻¹⁰ M, bei den direkt markierten Antikörpern im Bereich von 10⁻⁹ M. Auch das Kontrollpeptid liegt im Nanomolaren Bereich. Bei der direkten Antikörpermarkierung ist dieses sogar um den Faktor 10 erhöht und zeigt einen K_D-Wert bei 10⁻⁸ M. Es war demnach möglich, Unterschiede in den Bindungsaffinitäten mittels Bead-basierter Ansatz zu detektieren.

4.1.2.7. Vergleich mit anderen Methoden

Um den im Bead-basierten Multiplexverfahren ermittelten K_D-Wert zu verifizieren, wurde das Kontrollpeptid mittels SPR und BScreen mit dem phospho-PKA-Substrat Antikörper vermessen und der K_D-Wert mittels gerätespezifischer Software berechnet.

Tabelle 29 Vergleich der EC₅₀ auf verschiedenen Plattformen für Kontrollpeptid

	Luminex	Biacore (SPR)	BScreen
EC₅₀ (1+2)	2,413 10 ⁻⁹ M	/	/
EC₅₀ (1)	5,792 10 ⁻⁸ M	6,2 10 ⁻⁸ M	2,2 10 ⁻⁸ M

Da es sich beim SPR sowie beim BScreen um labelfrei detektierende Geräte handelt, liegt der Vergleich mit dem direkt markierten Antikörper (1) am nächsten. Bei allen drei Methoden ist ein K_D-Wert im Bereich um 10⁻⁸ M zu ermitteln. Die Messwerte zwischen den Methoden liegen dabei im Bereich von 2,2 bis 6,2 10⁻⁸ M, mit dem Bead-basierten Ansatz bei 5,7 10⁻⁸ M. Man kann durch diese Bestätigung der Messwerte des Kontrollpeptids davon ausgehen, dass die K_D-Werte für die Peptide A-G ebenfalls in diesem molaren Bereich liegen.

Obwohl die errechneten K_D-Werte für das direkte und das indirekte Labeling sich nur unwesentlich voneinander unterscheiden, lässt sich im Falle des Kontrollpeptids trotzdem sagen, dass das direkte Markieren des primären Antikörpers den Werten der Referenzmethoden vergleichbarere Werte ergibt.

Es konnte damit erfolgreich ein Testaufbau etabliert werden, mit dem es möglich war, Bindungsaffinitäten im multiplexen Ansatz an Beads zu bestimmen.

4.2. Antikörpervalidierung

Für die Antikörpervalidierung mittels Bead-basierter Multiplex-Messungen wurden zwei verschiedene biologische Fragestellungen adressiert, durch welche beispielhaft verschiedene Test-Strategien untersucht wurden. Zum einen wurde ein kompetitives Testsystem zur Detektion von THC beziehungsweise CBD entwickelt und ausgetestet, zum anderen wurde ein immunologischer Aufbau zum spezifischen Nachweis von IgE aus equinen Serumproben schrittweise validiert und mit realen Proben vermessen.

4.2.1. Kompetitiver Assay

Das Führen von Kraftfahrzeugen ist unter Einfluss von Drogen laut Betäubungsmittelgesetz strafbar. Wird bei einer Straßenverkehrskontrolle der Verdacht des Konsums erhoben, so ist die Verwendung sogenannter Schnelltests das Mittel der Wahl, um diesen in erster Instanz zu bestätigen. Bei den Schnelltests handelt es sich um sogenannte Antikörperbasierte Lateral-Flow-Assays, wobei die Aussagekraft dieser auf der Spezifität der Antikörper basiert. Die Wirkungsunterschiede, und damit die Legalität, von Betäubungsmitteln, können auf minimalen Strukturunterschieden der Moleküle beruhen. Im Falle von THC (illegal) und CBD (legal) besteht der Unterschied nur an einer funktionellen Gruppe an einem Kohlenstoffatom. Bindet der verwendete Antikörper nicht an diesem Unterschied, so kann das Ergebnis falsch-positiv ausfallen, und zumindest weitere Blutuntersuchungen zur Folge haben.

Um die immunologische Unterscheidung zwischen THC und CBD treffen zu können, wurden Antikörper gegen die Moleküle mittels Phage-Display durch die Firma YUMAB synthetisiert. Diese sollten mittels Bead-basierter Multiplexanalyse auf ihre Spezifität gegenüber THC beziehungsweise CBD hin untersucht werden. Mit den spezifischsten Antikörpern beider Substanzen wurde ein kompetitiver Test in Serum aufgebaut und deren Funktionalität getestet.

4.2.1.1. Kopplungskontrolle

Zur Immobilisierung von THC und CBD wurden diese als Konjugate synthetisiert. Das jeweilige Molekül wurde durch einen Linker an Biotin konjugiert. Als Linker wurde entweder eine Alkylkette oder Polyethylenglykol (PEG) verwendet, sodass sich pro Analyt zwei zu testende Konjugate ergaben.

Es wurden zunächst 100.000 Avidin-Beads gemäß Luminex Cookbook [79] mit jeweils 1 µg des Konjugats gekoppelt. Für THC bzw. CBD wurden jeweils verschiedene Bead-Regionen verwendet.

Für die Kopplungskontrolle wurden jeweils 5000 Beads pro Region verwendet. Je nach Art des Linkers wurden diese im Multiplex vermessen. Es wurden zwei Strategien des Nachweises betrachtet. Zum einen wurde ein anti-THC Antikörper verwendet. Dafür wurde in jedem Well 100 μL einer 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Verdünnung inkubiert. Anschließend wurde mit einem RPE-konjugierten anti-mouse Antikörper inkubiert.

Zum anderen wurden die gekoppelte Konjugate jeweils einzeln in einem Well mit einer ungekoppelten Referenzregion vermessen. Dafür wurden jeweils 5000 Beads pro Region in ein Well gegeben und mit biotinyliertem goat anti-mouse Antikörper inkubiert. Anschließend wurde mit einem RPE-markiertem anti-goat Antikörper inkubiert. Das Ziel war, die Detektion einer Signalabnahme anhand der Kompetition des biotinylierten Antikörpers durch das bereits gekoppelte Konjugat.

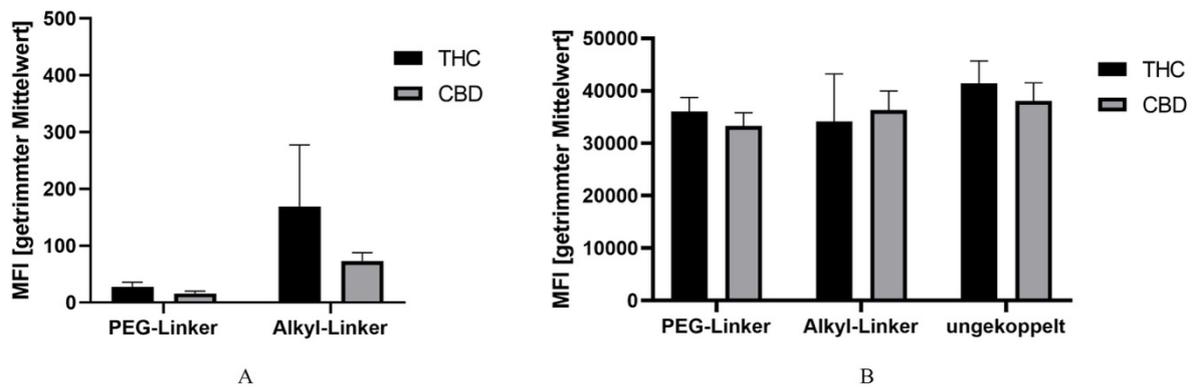


Abbildung 17 Kopplungskontrolle (kompetitiver Assay)

Kopplungsnachweis der Konjugate an Avidin-Beads mit

A: Inkubation mit 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mouse anti-THC Antikörper gefolgt von 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ goat anti-mouse RPE Antikörper.

B: Inkubation mit 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ biotinyliertem goat anti-mouse Antikörper gefolgt 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ von anti-goat RPE Antikörper.

Es wurde jeweils paarweise gemessen. Es wurden pro Region mindestens 100 Beads vermessen. Aufgetragen wurde der getrimmte Mittelwert der mittleren Fluoreszenz Intensitäten (MFI) mit Standardabweichung. Es konnte kein Kopplungsnachweis erfolgen, weder bei A durch Bindung noch bei B durch Kompetition.

Wie in Abbildung 17 A zu sehen ist, war ein Nachweis der Kopplung nicht möglich. Man sieht, dass der anti-THC Antikörper weder an die Konjugate mit THC noch an die Konjugate mit CBD gebunden hat, unabhängig vom Linker.

Gleichzeitig sieht man in B, dass es keine Signalreduktion von ungekoppelten zu gekoppelten Beads gibt. Es besteht so die Möglichkeit, dass trotz Kopplung noch zu viel freies Avidin an den Beads vorliegt, sodass der biotinylierte Antikörper trotzdem binden konnte.

Da keine weitere Möglichkeit bestand die Kopplung nachzuweisen, wurde mit den zu testenden Antikörpern inkubiert.

4.2.1.2. Alkyl vs PEG Linker

Die zu testenden Antikörper wurden mittels Phage-Display gegen THC beziehungsweise CBD gerichtet von der Firma YUMAB synthetisiert. Es wurde eine Auswahl an fünf Antikörpern gegen THC (YU615) und vier Antikörpern gegen CBD (YU616) im Bead-basierten Multiplex-Assay getestet. Es wurden jeweils 5000 Beads pro Well als Singleplex vermessen, wobei die THC-spezifischen Antikörper zunächst nur an den verschiedenen THC-Konjugaten, und die CBD-spezifischen Antikörper nur an den CBD-Konjugaten getestet wurden. Es wurde mit jeweils 100 μL einer 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Verdünnung des jeweiligen Antikörpers inkubiert. Anschließend wurde mit einem RPE-konjugierten anti-mouse Antikörper inkubiert.

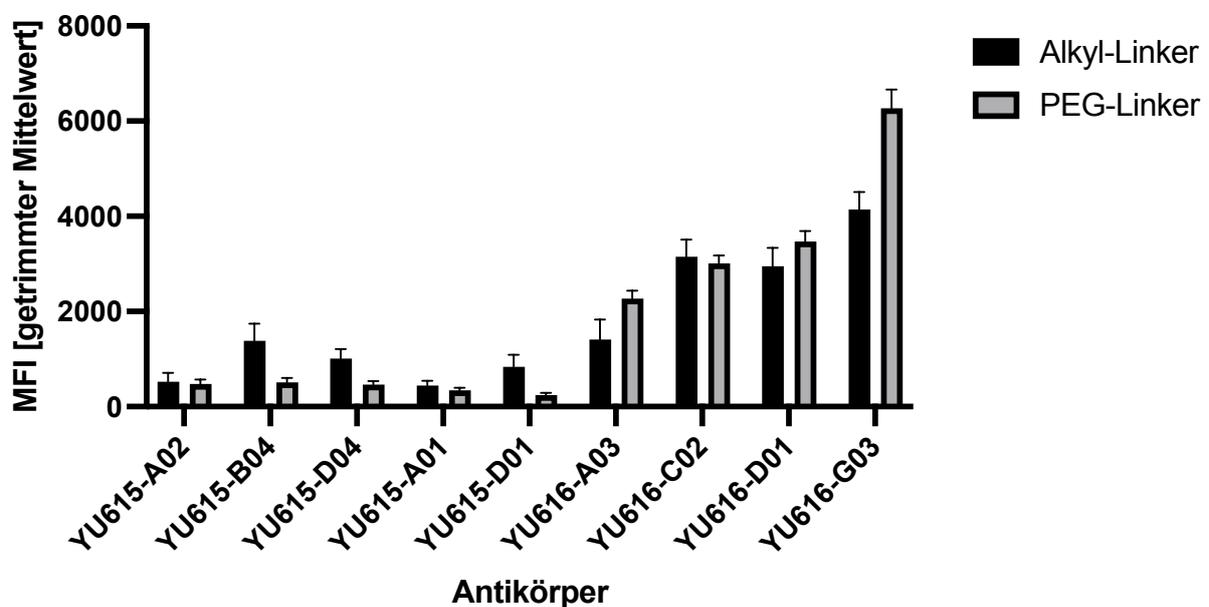


Abbildung 18 Spezifische Antikörperbindung mit Vergleich der Linker

Die Biotin-Konjugate mit Alkyl- (schwarz), bzw. PEG-Linker (grau) wurden im Singleplex Ansatz vermessen. Es wurden jeweils die spezifischen Antikörper (YU615-THC; YU616-CBD) mit den entsprechenden Konjugaten inkubiert. Es wurde 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ primärer Antikörper eingesetzt und anschließend mit 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-mouse RPE Antikörper inkubiert. Es wurden jeweils 100 Beads vermessen. Aufgetragen wurde der getrimmte Mittelwert der mittleren Fluoreszenz Intensitäten mit Standardabweichung.

Man sieht in Abbildung 18, dass der Nachweis der Kopplung erfolgt ist. Es sind für die gekoppelten Konjugate Signale messbar, die für THC im Bereich von 500-1000 MFI liegen, für CBD sogar im Bereich von 3000-7000 MFI. Da diese Signalintensitäten zum Teil sehr

gering sind, und mit dem Wissen, dass, wie in 4.2.1.1 zu sehen, noch sehr viele Avidin-Bindungsstellen ungebunden vorliegen, wurden für die Folgeversuche die Menge an zu koppelndem Konjugat verdoppelt.

Vergleicht man die Signalintensitäten von den jeweiligen Alkyl- beziehungsweise PEG-Linkern bei den CBD-spezifischen Antikörpern, so ergibt sich nur ein minimaler Unterschied. Einzig bei den geringeren Signalen der THC-spezifischen Antikörper sieht man, dass die Alkyl-Signale höher sind und eine bessere Abstufung zwischen den Antikörpern zulassen. Es wurde im Folgenden mit den Biotin-Alkyl-Konjugaten weitergearbeitet.

4.2.1.3. Antikörperscreening

Ziel der folgenden Versuche war die Untersuchung der Spezifität der Antikörper. Es wurde für die Kopplung 2 μg Biotin-Alkyl-Konjugat pro 100.000 Beads verwendet. Für die Messung wurden jeweils 5000 Beads pro Region zusammen in einem Well vermessen. Es wurde pro Well mit 100 μL der jeweiligen 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Antikörperverdünnung inkubiert. Anschließend wurde mit einem RPE-konjugierten anti-mouse Antikörper inkubiert.

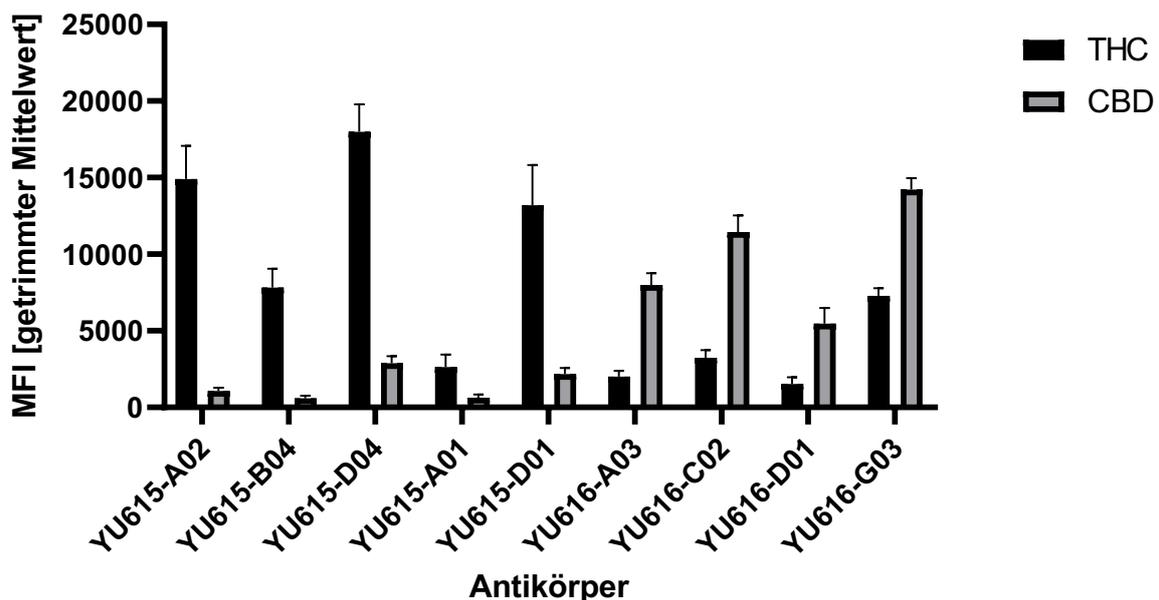


Abbildung 19 Antikörperscreening

Die Biotin-Alkyl-Konjugat-gekoppelten Beads wurden im Multiplex vermessen. Es wurde jeweils 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ des zu testenden spezifischen Antikörpers (YU615-THC; YU616-CBD), gefolgt von 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ goat anti-mouse RPE Antikörper verwendet. Es wurden mindestens 100 Beads pro Region vermessen. Aufgetragen wurde der getrimmte Mittelwert der mittleren Fluoreszenz Intensitäten (MFI) mit Standardabweichung. Signale des THC-Konjugats sind in schwarz, Signale des CBD-Konjugats sind in grau dargestellt.

In Abbildung 19 sieht man, dass die allgemeinen Signalintensitäten durch die erhöhte Menge an gekoppeltem Konjugat ebenfalls angestiegen sind. Für die THC-Antikörper können Signale zwischen 8000 und 15.000 MFI gemessen werden. Dabei ist das Signal des Antikörpers YU615-A01 um 2500 MFI wesentlich kleiner als die anderen THC-spezifischen Signale. Die CBD-Antikörper zeigten Signale im Bereich zwischen 8000 und 14.000 MFI, und waren damit in ihrer Intensität vergleichbar mit den THC-Antikörpern

Wichtig für die Verwendung der Antikörper ist ihre Spezifität. Da es sich bei THC und CBD um annähernd identische Moleküle handelt, ist es durch Antikörperbindung nur möglich beide zu unterscheiden, wenn sich das Epitop an der variablen Stelle, also dem C₈, befindet. Daher wurde neben den spezifischen Bindern auch mit dem komplementären inkubiert. Dabei zeigte sich, dass das Signal für CBD bei den THC-spezifischen Antikörpern vorhanden, aber sehr viel geringer ist. Andersherum ist dies ebenfalls der Fall.

4.2.1.4. Ratio Berechnung

Um die Spezifität der Antikörper besser vergleichen und bewerten zu können, wurden die Signalwerte für die Analyten jeweils auf den spezifischen Binder normalisiert. So ergeben sich folgende Ratios für die Bindungen.

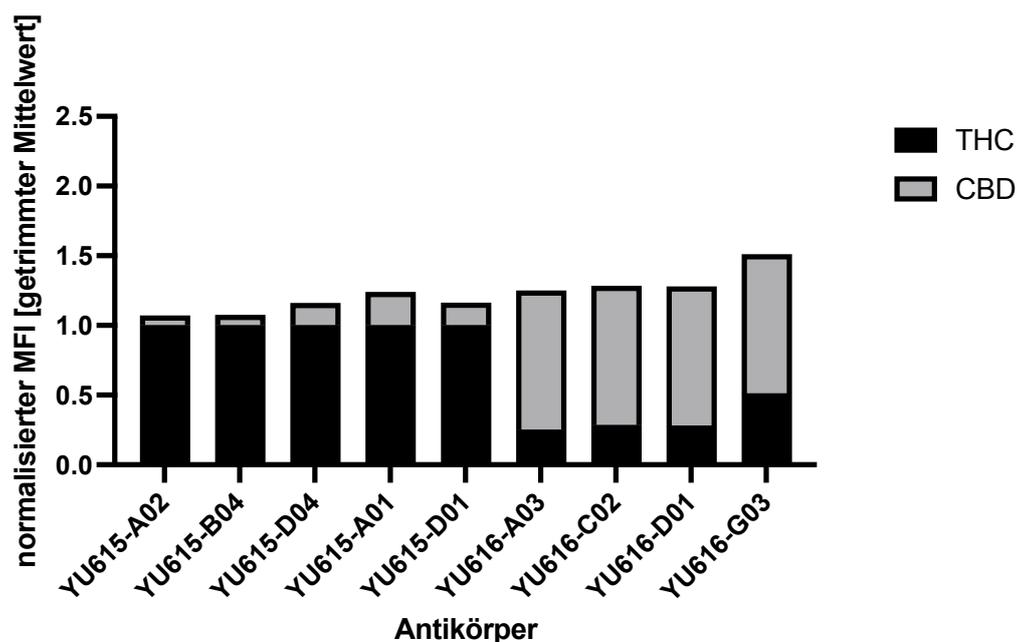


Abbildung 20 Ratios für spezifische Antikörper mit unspezifischer Bindung

Berechnetes Verhältnis zwischen dem Signal des spezifischen Analyten (YU615-THC; YU616-CBD) im Vergleich zu unspezifischer Bindung mit normalisierter Mittlerer Fluoreszenz Intensität (MFI). Jeweils mit einer Antikörperkonzentration von 1 µg/mL.

Tabelle 30 Berechnete Ratios

	YU615-A02	YU615-B04	YU615-D04	YU615-A01	YU615-D01	YU616-A03	YU616-C02	YU616-D01	YU616-G03
THC	1	1	1	1	1	0,25	0,28	0,27	0,51
CBD	0,07	0,07	0,16	0,23	0,16	1	1	1	1

Dabei sieht man in Abbildung 20 und Tabelle 30, dass die Antikörper bei einer eingesetzten Konzentration von 1 µg/mL alle ihr Target spezifisch binden. Das unspezifische Signal für den jeweiligen komplementären Partner ist dabei bei allen um mindestens 50 % kleiner. Im Falle von YU615-A02 und YU615-B04 waren es sogar um die 90 %. Um die spezifischsten Antikörper weiterer Testungen zu unterziehen, wurden die jeweils drei besten ausgewählt. Dabei wurde primär an Hand der berechneten Ratios entschieden. Hatten zwei Antikörper das gleiche Verhältnis, so wie YU615-D04 und YU615-D01, so wurde der mit der höchsten Signalintensität gewählt. Demnach wurde im Folgenden mit YU615-A02, YU615-B04 und YU615-D01 für die THC-spezifischen und mit YU616-A03, YU616-C02 und YU616-D01 für die CBD spezifischen Antikörper weitergearbeitet.

4.2.1.5. Verdünnungsreihen für Top 3 THC/CBD Antikörper

Für die sechs ausgewählten Antikörper wurden Verdünnungsreihen erstellt, um zu sehen, wie sich die Antikörperspezifität bei unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen verhält. Dafür wurden 5000 Beads beider Regionen in einem Well mit jeweils 100 µL der jeweiligen Antikörperverdünnung inkubiert. Im Anschluss wurde mit einem RPE-konjugierten anti-mouse Antikörper inkubiert. Es wurden 100 µg/mL, 50 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL und 1 µg/mL Verdünnungen jedes Antikörpers verwendet.

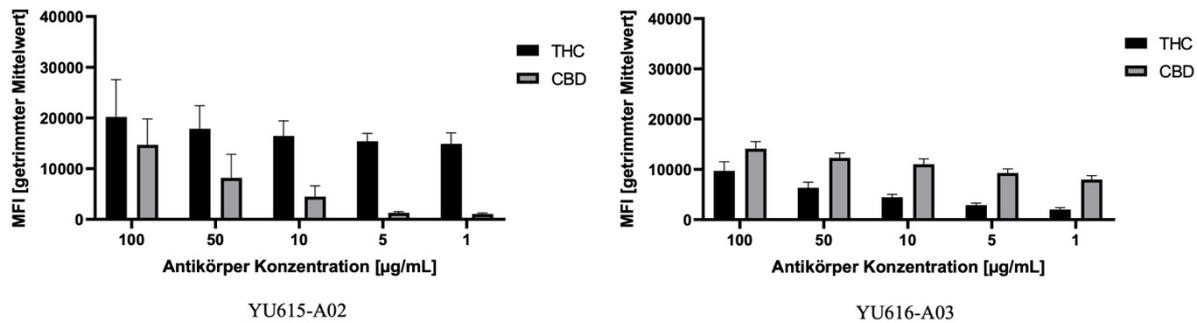


Abbildung 21 Verdünnungsreihen Top 3

Die Biotin-Alkyl-Konjugat-gekoppelten Beads wurden im Multiplex vermessen. Es wurde eine Verdünnungsreihe des spezifischen Antikörpers von 100 µg/mL, 50 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL und 1 µg/mL, gefolgt von 1 µg/mL goat anti-mouse RPE Antikörper verwendet. Es wurden mindestens 100 Beads pro Region vermessen. Aufgetragen wurde der getrimmte Mittelwert der mittleren Fluoreszenz Intensitäten (MFI) mit Standardabweichung. Signale des THC-Konjugats sind in schwarz, Signale des CBD-Konjugats sind in grau dargestellt. Rechts ist beispielhaft die Verdünnungsreihe für YU615-A02 als THC spezifischer Antikörper dargestellt, links YU616-A03 als CBD spezifischer.

In Abbildung 21 wurden repräsentativ YU615-A02 für die THC-spezifischen und YU616-A03 für die CBD-spezifischen Antikörper dargestellt. Die Verdünnungsreihen für die anderen Antikörper sind dem Anhang 4 zu entnehmen. Für YU615-A02 war für THC durchgängig über alle Antikörperkonzentrationen hinweg ein Signal von 18000 bis 20000 MFI zu sehen. Dies ist auch für YU615-B04 zu sehen. Nur YU615-D01 zeigte hierbei Abweichungen, sodass das Signal für 1 µg/mL und 5 µg/mL um etwa 50 % kleiner als bei höheren Verdünnungen war. Vergleichbar mit in 4.2.1.4 erzielten Ergebnissen ist bei einer Antikörperkonzentration von 1 µg/mL und auch bei 5 µg/mL kaum unspezifische Bindung an CBD zu sehen. Ab einer Konzentration von 10 µg/mL sah man ein ansteigendes CBD-Signal, was bei einer Antikörperkonzentration von 100 µg/mL dann etwa 75 % des Signals von THC erreicht hatte. Beim CBD-spezifischen Antikörper YU616-A03 sah man hingegen, dass mit steigender Antikörperkonzentration das Signal für CBD linear von 8000 MFI bis etwa 15.000 MFI angestiegen ist. Wie in Abbildung 20 schon ersichtlich wurde, sind die unspezifischen Bindungen an THC höher und liegen bei etwa 25 %. In Abbildung 21 wird ersichtlich, dass diese Bindung mit steigender Antikörperkonzentration ebenfalls ansteigt, sodass bei 100 µg/mL das THC-Signal etwa 65 % des CBD-Signals entspricht. Für YU616-C02 und YU616-D01 waren gleiche Effekte zu beobachten. Es lässt sich jedoch sagen, dass die Antikörper auch mit sehr hohem Konzentrationsüberschuss, im Gegensatz zu den Antigen-

gekoppelten Beads, weiterhin Präferenzen und damit höhere Signale zu ihrem spezifischen Binder zeigen.

4.2.1.6. Testung kompetitiver Ansatz

Um zu testen, ob die Antikörper in einem kompetitiven Ansatz sowohl das gebundene Konjugat als auch den freien Analyten bindet, wurden verschiedene molekulare Verhältnisse von Antikörper und Kompetitor eingesetzt. Bezogen auf die gleiche theoretisch gebundene Konjugat-Menge an die Beads, wurden die Anzahl an Molekülen von Antikörper, Biotin-Alkyl-Konjugat beziehungsweise Reinstoff des Analyten als Kompetitor, verwendet.

Es wurden pro Ansatz 5000 Beads mit dem jeweiligen gekoppelten Konjugat in einem Well Inkubiert. Als Verhältnisse wurde dazu gegeben (Antikörper: (Biotin-Alkyl-)THC/CBD) 1:1, 1:10, 1:100, 10:1 und 100:1. Dabei wurde zuerst der Kompetitor zu den Beads gegeben, dann der Antikörper. Anschließend wurde mit einem RPE-konjugierten anti-mouse Antikörper inkubiert.

Der Versuch wurde zunächst in PBST, wie auch sämtliche Vorversuche, durchgeführt.

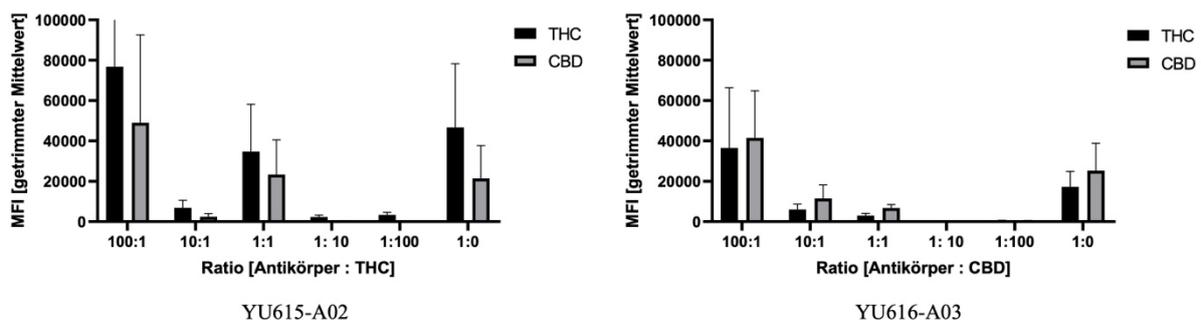


Abbildung 22 Konkurrenz in PBST

Die Biotin-Alkyl-Konjugat-gekoppelten Beads wurden im Multiplex vermessen. Es wurde im molekularen Verhältnis Antikörper und freier Kompetitor (in Abhängigkeit der Spezifität des Antikörpers) in den Verhältnissen 100:1, 10:1, 1:1, 1:10, 1:100 und ohne Kompetitor (1:0) verdünnt in PBST hinzugegeben, gefolgt von einer Inkubation mit 1 µg/mL goat anti-mouse RPE Antikörper. Es wurden mindestens 100 Beads pro Region vermessen. Aufgetragen wurde der getrimmte Mittelwert der mittleren Fluoreszenz Intensitäten (MFI) mit Standardabweichung. Signale des THC-Konjugats sind in schwarz, Signale des CBD-Konjugats sind in grau dargestellt. Rechts ist beispielhaft die Konkurrenz für YU615-A02 als THC spezifischer Antikörper dargestellt, links YU616-A03 als CBD spezifischer.

In Abbildung 22 wurden YU615-A02 für die THC-spezifischen und YU616-A03 für die CBD-spezifischen Antikörper dargestellt. Die kompetitiven Ansätze für die weiteren Antikörper in PBST sind dem Anhang 5 zu entnehmen.

Ausgehend von der 1:0 Verdünnung (jeweils links), bei der kein freier Kompetitor hinzugegeben wurde, zeigte sich bei YU615-A02, dass die Menge an Antikörper ausreicht, sodass sich die an den Beads gekoppelten Biotin-Alkyl-THC-Konjugate in Sättigung befinden und, dass dabei noch eine unspezifische Bindung an die Biotin-Alkyl-CBD-Konjugate der anderen Bead Region erfolgt. Es erfolgt kaum eine Signalabnahme durch die gleichmäßige Zugabe von freiem THC im 1:1 Gemisch. Es scheint also noch ungebundener Antikörper vorhanden zu sein, der den Kompetitor bindet. Erst bei einem 10-fachen Überschuss an THC im Vergleich zu Beads und Antikörper lässt sich das Signal für das gebundene Konjugat erkennen. Das Signal liegt nur noch bei etwa 1000 MFI, ist dann jedoch auch gleichbleibend für eine weitere 10-fache Erhöhung des Kompetitors. Interessanterweise ist das Messsignal für das Verhältnis von 10-fachem Überschuss an Antikörper im Verhältnis zu Beads, also 10:1, kleiner als das Signal von 1:0 und 1:1. Dies ist jedoch nicht für YU615-B04 und YU615-D01 zu beobachten, bei denen das Signal in etwa dem gesättigten Signal entspricht. Für den 100-fachen Überschuss an Antikörper steigen die Signale sowohl spezifisch für THC als auch unspezifisch für CBD weiter an. Man kann auf Grund der Standardabweichung, welche in etwa die gleiche Intensität hat wie das Messsignal, jedoch sehen, dass diese Messwerte fehlerbelastet und wenig valide sind.

Für den CBD-spezifischen Antikörper YU616-A03 erhält man bei keiner Zugabe von Kompetitor für das Verhältnis 1:0 ein Signal von etwa 20000 MFI für CBD, jedoch war auch hier das unspezifische Signal für THC mit etwa 75 % sehr hoch. Durch Zugabe von freiem CBD sank neben der spezifischen Bindung an die Biotin-Alkyl-CBD-Beads auch das unspezifische Signal. Bei einer Erhöhung des Kompetitors um das 10- beziehungsweise um das 100-fache war keine Bindung von Antikörper an die Beads mehr detektierbar. Wurde die Antikörperkonzentration im Gegensatz dazu um das 10-fache erhöht, so ist ein Signal von etwa 10.000 MFI, also nur die Hälfte im Vergleich zum Ausgangssignal, messbar. Das Signal für die unspezifische Antikörperbindung stieg dabei wieder auf 2000 MFI. Gleiche Effekte waren für YU616-C02 und YU616-D01 zu beobachten. Wie auch beim THC-spezifischen Antikörper war bei 100-fachen Überschuss an Antikörper die Messwerte und auch die Standardabweichungen am höchsten. Dies galt sowohl für die spezifischen als auch für die unspezifischen Bindungen, die hier in etwa die gleiche Intensität zeigen.

Anschließend wurde die Versuchsreihe in humanem Leer-Serum wiederholt, um etwaige Matrix-Effekte zu berücksichtigen.

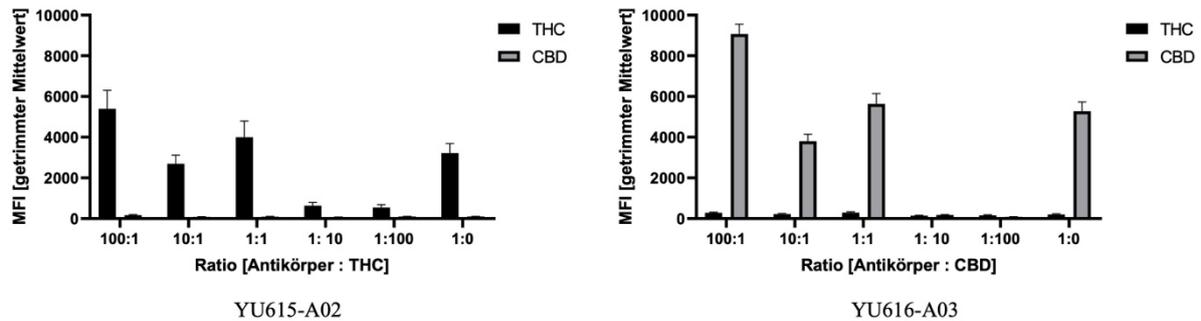


Abbildung 23 Konkurrenz in Serum

Die Biotin-Alkyl-Konjugat-gekoppelten Beads wurden im Multiplex vermessen. Es wurde im molekularen Verhältnis Antikörper und freier Kompetitor (in Abhängigkeit der Spezifität des Antikörpers) in den Verhältnissen 100:1, 10:1, 1:1, 1:10, 1:100 und ohne Kompetitor (1:0) verdünnt in humanem Leer-Serum hinzugegeben, gefolgt von einer Inkubation mit 1 µg/mL goat anti-mouse RPE Antikörper. Es wurden mindestens 100 Beads pro Region vermessen. Aufgetragen wurde der getrimmte Mittelwert der mittleren Fluoreszenz Intensitäten (MFI) mit Standardabweichung. Signale des THC-Konjugats sind in schwarz, Signale des CBD-Konjugats sind in grau dargestellt. Rechts ist beispielhaft die Konkurrenz für YU615-A02 als THC spezifischer Antikörper dargestellt, links YU616-A03 als CBD spezifischer.

Zum Vergleich wurden in Abbildung 23 YU615-A02 für die THC-spezifischen und YU616-A03 für die CBD-spezifischen Antikörper in den gleichen Verhältnissen dargestellt wie in Abbildung 22. Die kompetitiven Ansätze für die weiteren Antikörper in Serum sind dem Anhang 6 zu entnehmen. Für beide Antikörper wurde ersichtlich, dass die Maximal-Signalintensität im Vergleich zum Versuch in PBST gesunken ist. So betrug das spezifische Ausgangssignal für YU615-A02 für 1:0 nur noch etwa 3000 MFI. Gleichzeitig ist jedoch kein unspezifisches Signal detektierbar. Mit gleicher Zugabe des THC sank das Signal auch hier, analog zum PBST, zunächst nicht ab, was den Überschuss an Antikörper andeutet. Erst mit 10- bzw 100-fachem Überschuss an THC als Kompetitor im Ansatz sank das gemessene Signal der Beads auf etwa 300 MFI ab. Wird die Antikörperkonzentration im Gegensatz dazu im Verhältnis 10:1 erhöht, so stieg das gemessene Signal in etwa auf den Wert des Ausgangssignals an. Mit einem 100-fachen Überschuss an Antikörper erreicht man nochmals eine Signalsteigerung auf 6000 MFI. Interessanterweise stiegen bei den Versuchen bei keinem Verhältnis die unspezifischen Signale für das Biotin-Alkyl-CBD an. Die weiteren THC-spezifischen Antikörper YU615-B04 und YU615-D01 verhielten sich analog zu YU615-A02. Für YU616-A03 waren gleiche Effekte zu beobachten. Für das Ausgangssignal ohne Kompetitor bei 1:0 waren Signale bei 5000 MFI zu beobachten. Diese sanken erst bei 10-fachen Überschuss an CBD und waren nicht mehr detektierbar. Bei 10-fachem Überschuss an Antikörper hingegen lagen die Messwerte wieder bei 4000 MFI und damit auf Niveau des

Ausgangsmesswertes. Bei 100-fachem Antikörperanteil lagen die Messwerte bei etwa 9000 MFI. Auch hier ist bei keinem Verhältnis eine unspezifische Antikörperbindung, wie sie noch in PBST zu messen war, detektierbar. Auch zeigten die Messwerte geringere Standardabweichungen als noch die Versuche in Puffer. Die Messsignale verhielten sich für YU616-C02 und YU616-D01 gleich.

Wie zu sehen, lassen sich sowohl in PBST als auch in Serum kompetitive Effekte durch Zugabe von reinem THC beziehungsweise CBD erzielen. Dabei waren die maximalen Messwerte in PBST um das etwa 10-fache größer als in Serum. Durch das Quenchen zeigte sich jedoch ebenfalls der Vorteil, dass unspezifische Antikörperbindungen unterbunden werden und die Homogenität der Bindungssignale viel höher ist, was sich in den geringeren Abweichungen zwischen den Messwerten zeigt.

Wie man für alle Antikörper in Anhang 6 sieht, zeigte sich kein Unterschied, ob man als Kompetitor THC beziehungsweise CBD, oder das Biotin-Alkyl-Konjugat verwendet. Durch die sehr geringen unspezifischen Hintergrundsignale lässt sich jedoch sagen, dass sich die Antikörper für die Funktionalisierung in einem Immunoassay zu eignen scheinen.

4.2.1.7. Serum Spike-In

Laut Straßenverkehrsgesetz (StVG § 24a Abs. 2) ist das Führen eines Kraftfahrzeuges nach Konsum von THC strafbar. Dabei wird ab einer Blutkonzentration von 1 ng/mL von einem positiven Ergebnis gesprochen. Um den Nachweis in diesem Konzentrationsbereich zu simulieren, wurde die Konzentration an freiem Reinstoff variiert. Es wurden 10.000 ng/mL, 5000 ng/mL, 1000 ng/mL, 500 ng/mL, 100 ng/mL, 50 ng/mL, 10 ng/mL, 5 ng/mL, 1 ng/mL, 0,5 ng/mL und 0,1 ng/mL reines THC beziehungsweise CBD in humanem Leer-Serum verdünnt. Je 5000 Beads der spezifischen Region wurden in einem Well mit 100 µL der Kompetitor-Verdünnung in Serum zusammen pipettiert. Anschließend wurden 10 µL einer Antikörperverdünnung hinzugegeben, sodass dieser im Well in einer Konzentration von 1 µg/mL vorlag. Im Anschluss wurde mit 1 µg/mL eines RPE-konjugierten anti-mouse Antikörpers inkubiert. Es soll gezeigt werden, dass die Konkurrenz der freien Droge um die Bindung durch den Antikörper zu einer Abnahme des Messsignals durch weniger Bindung des Antikörpers an die konjugierten Drogen-Konjugate an den Beads führt.

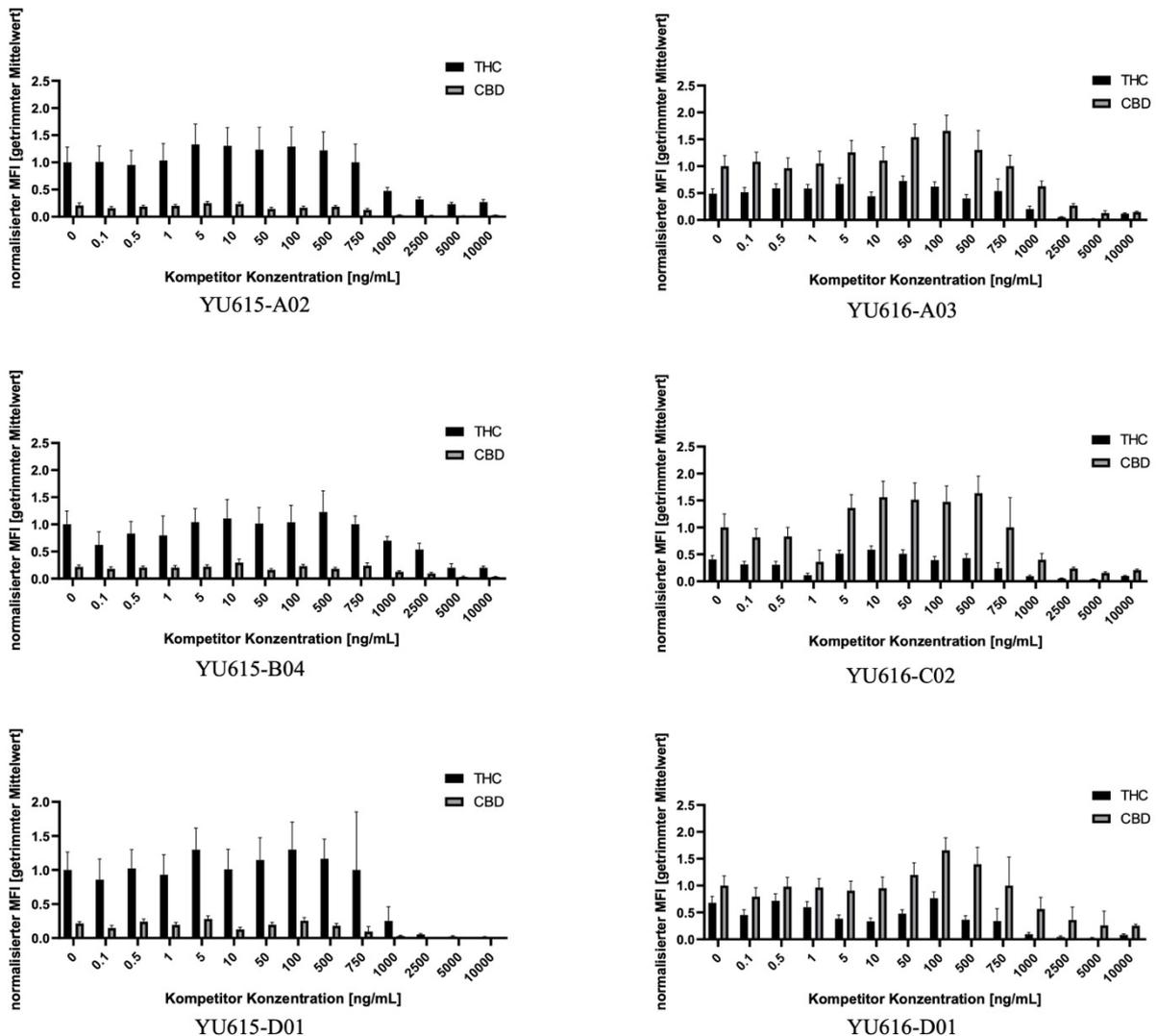


Abbildung 24 Serum Spike-In normalisiert

Die Biotin-Alkyl-Konjugat-gekoppelten Beads wurden im Multiplex vermessen. Es wurde eine Verdünnungsreihe von THC bzw. CBD von 10.000 ng/mL, 5000 ng/mL, 1000 ng/mL, 500 ng/mL, 100 ng/mL, 50 ng/mL, 10 ng/mL, 5 ng/mL, 1 ng/mL, 0,5 ng/mL und 0,1 ng/mL als Kompetitor hinzugegeben. Es wurde anschließend mit 1 µg/mL des spezifischen Antikörpers inkubiert gefolgt von 1 µg/mL goat anti-mouse RPE Antikörper. Es wurden mindestens 100 Beads pro Region vermessen. Aufgetragen wurde der auf das Ausgangssignal ohne Zugabe von Kompetitor normalisierte getrimmte Mittelwert der mittleren Fluoreszenz Intensitäten (MFI) mit Standardabweichung. Signale des THC-Konjugats sind in schwarz, Signale des CBD-Konjugats sind in grau dargestellt.

In Abbildung 24 sind die Signale für die aus 4.2.1.4 bestimmten besten Antikörper dargestellt. Um die Signale innerhalb einer Verdünnungsreihe besser vergleichen zu können, wurden diese auf das Signal von 0 ng/mL zugegebenen Kompetitor normalisiert. Für die THC-spezifischen Antikörper ließ sich zeigen, dass die Signale mit steigender Konzentration an freiem THC zunächst leicht anstiegen, bzw. gleichblieben, und dabei eine hohe Standardabweichung

zeigten. Bei YU615-A02 zeigte sich ab einer Konzentration von 5000 ng/mL Kompetitor eine Abnahme des Signals. Mit steigender Konzentration sank dieses Signal weiter bis auf etwa 30 % des Vergleichsignals. Bei YU615-B04 war diese Signalabnahme erst bei einer Konzentration von 10.000 ng/mL zu sehen, fiel jedoch ebenfalls auf etwa 30 %. Nur bei YU615-D01 war keine signifikante Reduktion des Signals zu sehen. Das Signal für die unspezifischen Antikörperbindung war dabei durchweg gering, bei etwa 10 % des gemessenen Signals.

Vergleicht man die Signale mit denen aus Abbildung 23, so sieht man, dass die Konzentration des hier eingesetzten Kompetitors für 10.000 ng/mL und 50.000 ng/mL in etwa den Verhältnissen 10:1 und 100:1 entsprachen. Auch in diesen Versuchen konnte unter diesen Konzentrationen keine Kompetition gemessen werden.

Ähnliches Verhalten zeigten die CBD-spezifischen Antikörper. Auch hier zeigten die Signale bis einschließlich einer Konzentration an Kompetitor bis 5000 ng/mL keine Signalreduktion, sondern minimale Signalerhöhungen. Erst ab einer Konzentration von 10.000 ng/mL ließen sich bei YU616-A03, YU616-C02 und YU616-D01 Signalreduktionen auf 40% des Ausgangssignals messen, bei einer Konzentration von 50.000 ng/mL sogar auf 25 %. YU616-C02 zeigte auch bei einer Konzentration von 1 ng/mL Kompetitor ein um etwa 60% geringeres Signal, allerdings fiel dies in der Messreihe raus, auch wegen des sich minimierenden unspezifischen Signals. Im Allgemeinen ließen sich bei den CBD-spezifischen Antikörpern sehr hohe unspezifische Bindungen von zum Teil mehr als 50 % des Messsignals detektieren.

4.2.1.8. Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze, oder auch *Limit of Detection* (LoD) ist die kleinste Konzentration, bei der ein Analyt qualitativ nachgewiesen werden kann [80]. Im kompetitiven Ansatz entspricht die Konzentration des Kompetitors dem nachzuweisenden Analyten. Wie in Abbildung 24 zu sehen, konnte der jeweilige Kompetitor erst bei höheren Konzentrationen detektiert werden. Zur besseren Auflösung wurden weitere Verdünnungen vermessen. Es wurden jeweils 10.000 ng/mL, 5000 ng/mL, 2500 ng/mL, 1000 ng/mL, 750 ng/mL, 500 ng/mL und 100 ng/mL reines THC beziehungsweise CBD in humanem Leer-Serum verdünnt. Je 5000 Beads der spezifischen Region wurden in einem Well mit 100 µL der Kompetitor-Verdünnung in Serum zusammen pipettiert. Anschließend wurden 10 µL einer Antikörperverdünnung hinzugegeben, sodass dieser im Well in einer Konzentration von 1 µg/mL vorlag. Final wurde mit 1 µg/mL eines RPE-konjugierten anti-mouse Antikörpers inkubiert

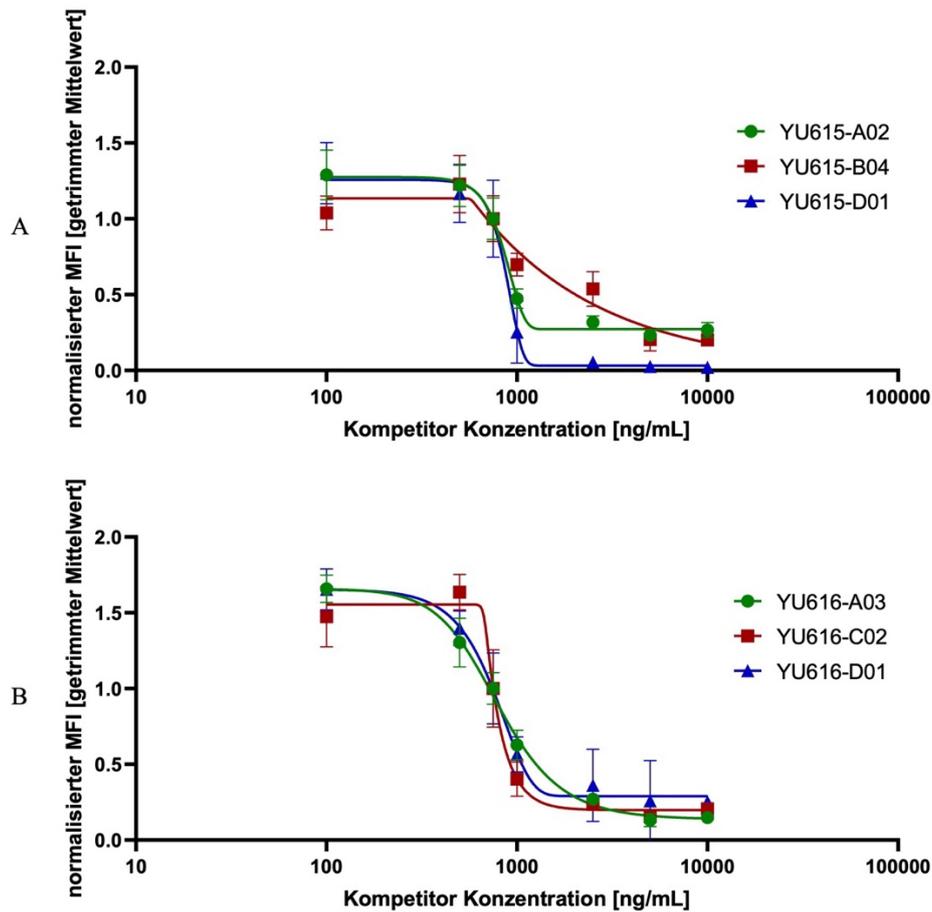


Abbildung 25 Serum Spike-In normalisiert (halblogarithmisch)

Die Biotin-Alkyl-Konjugat-gekoppelten Beads wurden im Multiplex vermessen. Es wurde eine Verdünnungsreihe von THC bzw. CBD von jeweils 10.000 ng/mL, 5000 ng/mL, 2500 ng/mL, 1000 ng/mL, 750 ng/mL, 500 ng/mL und 100 ng/mL als Kompetitor hinzugegeben. Es wurde anschließend mit 1 µg/mL des spezifischen Antikörpers inkubiert, gefolgt von 1 µg/mL goat anti-mouse RPE Antikörper. Es wurden mindestens 100 Beads pro Region vermessen. Halblogarithmisch aufgetragen wurde der auf das Ausgangssignal ohne Zugabe von Kompetitor (nicht dargestellt) normalisierte getrimmte Mittelwert der mittleren Fluoreszenz Intensitäten mit Standardabweichung. In **A** sieht man die THC-spezifischen Antikörper, in **B** die CBD-spezifischen Antikörper.

Es ergeben sich in Abbildung 25 sigmoidale Kurvenverläufe, welche die Konkurrenz durch die freien Drogen im Gemisch zeigen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus 4.2.1.7 war die Bindung des Antikörpers an die ungebundenen Moleküle für die THC-spezifischen Antikörper (A) schon ab einer Konzentration von 500 ng/mL – 750 ng/mL zu sehen. Im Verlauf der Kurven sah man jedoch Unterschiede zwischen den Antikörpern. So kommt es mit steigender Kompetitorkonzentration bei YU615-A02 und YU615-D01 zu stark abfallenden Kurven, sodass sich diese bei einer Konzentration kurz über 1000 ng/mL schon auf dem Minimum befanden. Dabei sank YU615-D01 auf einen Minimalwert von 5 % im Vergleich zum

Ausgangssignal, YU615-A02 hingegen nur auf 35 %. YU615-B04 sank langsamer und zeigte auch noch bei einer Konzentration von 10.000 ng/mL eine Linearität bei etwa 25 % im Verhältnis zum Ausgangssignal.

Für die CBD-spezifischen Antikörper (B) sah man für YU616-A03 sowie YU616-D01 einen Abfall bei einer Kompetitor-Konzentration zwischen 100 ng/mL und 500 ng/mL, was einer etwa 10-fach geringeren Konzentration als im Vorversuch entsprach. Die Kurven zeigten einen linearen, mäßig steilen Abfall, wobei YU616-A03 bei einer Konzentration von 5000 ng/mL und YU616-D01 bei knapp über 1000 ng/mL sein Minimum bei etwa 10 % beziehungsweise 25 % im Vergleich zum Ausgangssignal erreicht hatte. YU616-C02 zeigte erst bei einer Konzentration zwischen 500 ng/mL und 750 ng/mL einen starken Signalabfall, der knapp über 1000 ng/mL sein Minimum bei etwa 15% des Ausgangssignals erreicht.

Zur Berechnung des LoD wurde folgende Formel genutzt [81]:

$$\text{LoD} = X - (3,3 * \text{SD})$$

Dabei stellt X die höchste vermessene Konzentration an Kompetitor dar, die sich noch im Plateau befand. Von diesem Punkt aus wurde der lineare Bereich der Negativsteigung betrachtet. SD gab die Standardabweichung an diesem Punkt an. Es ergaben sich für die Antikörper folgende Nachweisgrenzen:

Tabelle 31 Berechnete Nachweisgrenzen

	YU615-A02	YU615-B04	YU615-D01	YU616-A03	YU616-C02	YU616-D01
LoD	530,84 ng/mL	584,29 ng/mL	559,75 ng/mL	311,42 ng/mL	771,85 ng/mL	173,46 ng/mL

Es ist dabei zu sehen, dass die THC-spezifischen Antikörper (YU615) alle eine ähnliche Nachweisgrenze im Bereich von 550 ng/mL Kompetitor besitzen. Bei den CBD-spezifischen Antikörpern (YU616) sind jedoch Unterschiede zu finden. So wurde der LoD für YU616-D01 schon bei 173 ng/mL berechnet, für YU616-C02 bei 771 ng/mL. Dies zeigt einen deutlichen Unterschied in der Sensitivität der CBD-spezifischen Antikörper.

Es konnte gezeigt werden, dass die getesteten Antikörper spezifisch entweder THC oder CBD gebunden haben. Erst bei höherer Antikörperkonzentration wurde jeweils der andere Analyt ebenfalls gebunden. Gleichzeitig war eine Konkurrenz durch die Zugabe des ungebundenen

Reinstoffes möglich, wobei hier Unterschiede in der verwendeten Matrix bestanden. In humanem Serum wurden die Messsignale teilweise gequenchet. Es zeigte sich, dass sich für THC eine Kompetition in humanem Serum ab einer Konzentration von 550 ng/mL von allen drei Antikörpern detektieren lässt, bei CBD schon ab einer Konzentration von 170 ng/mL von einem Antikörper. Die CBD-spezifischen Antikörper zeigten jedoch Unterschiede in ihren Nachweisgrenzen, sodass die anderen beiden getesteten Antikörper eine höhere Konzentration an Kompetitor benötigten, um den Bindungsunterschied zu detektieren. Dies liegt weit unter den Vorgaben der StVG, bei der ab einer Blutkonzentration von 1 ng/mL von einem positiven Ergebnis gesprochen wird.

4.2.2. Identifizierung von IgE in Pferdeserum

Eine weitere Anwendung von Antikörpern kann im Nachweis von endogen im Organismus vorkommenden Immunglobulinen, welche gegen exogene Antigene gebildet wurden, bestehen. Dabei werden spezifische Antikörper gegen körpereigene Proteine hergestellt, um diese diagnostisch zu untersuchen. IgE gehört zu den Allergie-assoziierten Immunglobulinen. Es liegt nach Exposition mit einem Allergen sowohl in freier als auch in Mastzell-gebundener Form im Organismus vor. Da IgE, wie sämtliche Antikörper, Antigen-spezifisch ist, bindet es bei Kontakt an das Allergen. Im Fall vom Sommereczem beim Pferd handelt es sich dabei um Proteine, welche im Speichel von bestimmten Mückenarten zu finden sind. Es sollte ein Testsystem entwickelt werden, mit dem es möglich ist, das freie IgE aus Serumproben von Pferden auf die spezifische Bindung hin zu verschiedenen Proteinen zu testen.

Dafür sollten die allergenen Proteine untersucht werden. Es wurden 12 verschiedene Proteine ausgewählt, die ihren Ursprung im Speichel drei verschiedener Mückenarten (*Culicoides obsoletus*, *Culicoides nubeculosus* und *Simulium vittatum*) haben. Diese hatten eine Größe von 18 – 55 kDa, sollten rekombinant hergestellt und über einen V5-Tag an Antikörper-gekoppelte Beads gebunden werden. Abbildung 26 zeigt den schematischen Aufbau des Testsystems. Im ersten Schritt der Testetablierung sollte die Kopplung der anti-V5 Antikörper optimiert werden, sodass die Proteine im zweiten Schritt synthetisiert werden und an diesen binden können. Durch Inkubation mit 97 Pferdeseren sollte im Multiplex die Bindung von spezifischen IgE an die Proteine durch weitere Antikörperinkubation detektierbar gemacht werden. Zusammenfassend setzt sich das Testsystem aus Kompartimenten eines Sandwich-Ansatzes, gekoppelt mit einem indirekten Nachweissystem, zusammen.

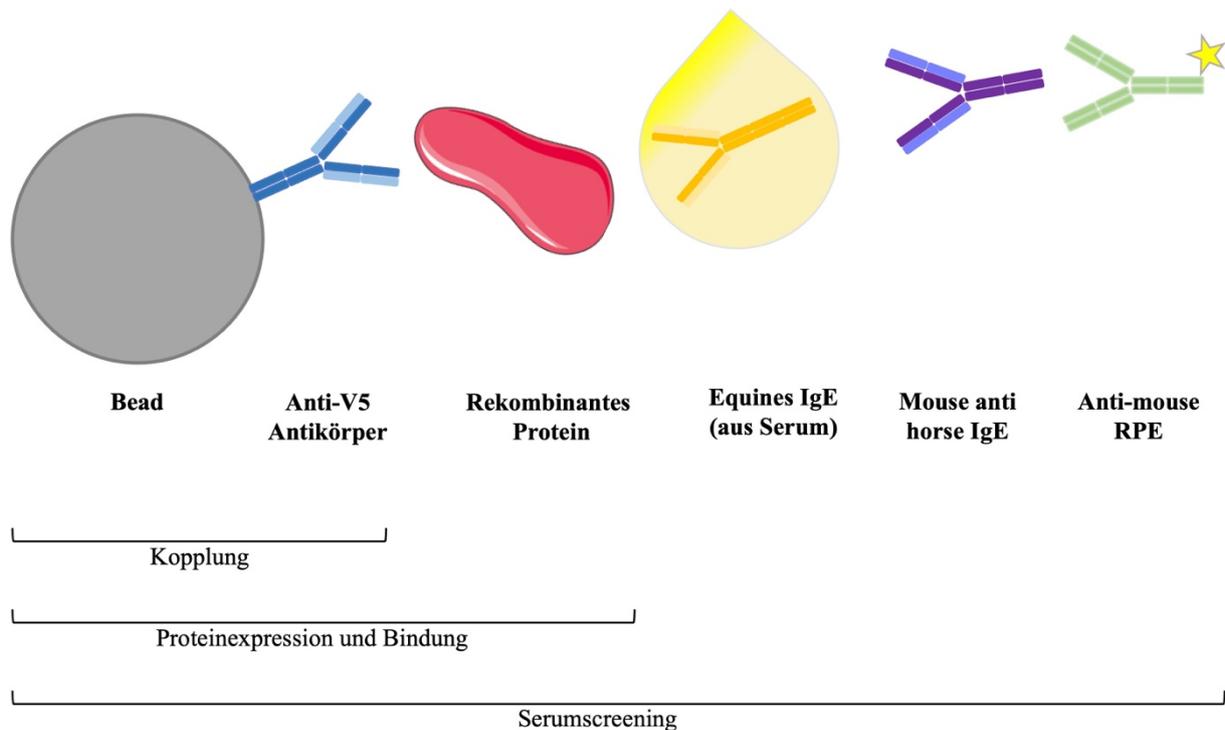


Abbildung 26 Schematischer Versuchsaufbau des Serumscreenings

Die Untersuchung des IgE-Gehaltes der Pferdeseren konnte in die folgenden Einzelschritte aufgeteilt werden: An magnetische Epoxy-Beads (grau) wurde ein anti-V5 Antikörper (blau) gekoppelt. Dieser band rekombinant hergestelltes Protein (rot) über seinen V5-Tag. IgE aus den Pferdeseren (gelb) sollte an das Protein als Antigen binden, und durch Inkubation mit mouse anti-horse IgE Antikörper (lila) und einem anti-mouse RPE Antikörper (grün) durch das Luminex messbar gemacht werden.

4.2.2.1. Kopplung

Es wurde zunächst ein anti-V5 Antikörper an Beads gekoppelt. Es sollte austitriert werden, bei welcher Konzentration an gekoppeltem Antikörper eine Sättigung der funktionellen Gruppen an den Beads erreicht wurde und damit eine maximale Beladung für spätere Versuche garantiert werden konnte. Dafür wurden 1 μg , 2,5 μg , 5 μg , 10 μg und 25 μg Antikörper an jeweils 1.000.000 Beads nach Luminex Cookbook [79] gekoppelt. Für die Messung wurden jeweils 5000 Beads in einem Well mit einem RPE-gelabelten anti-rabbit Antikörper inkubiert und vermessen. Zusätzlich dazu wurde ein Ansatz ohne gekoppelten Antikörper gemessen.

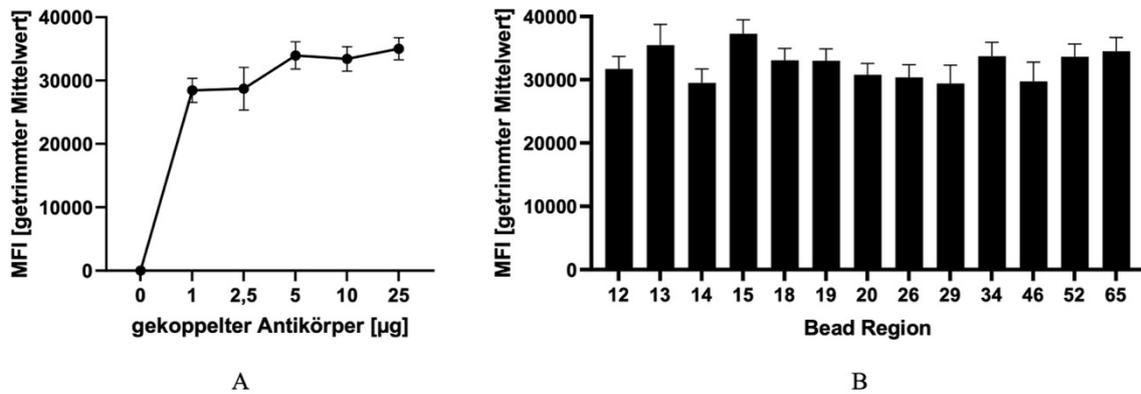


Abbildung 27 Titrationskurve und Kopplungskontrolle (Serumscreening)

Es wurde in **A** getestet welche Menge an gekoppelten anti-V5 Antikörper das höchste Signal erzeugt. Es wurden 1 µg, 2,5 µg, 5 µg, 10 µg und 25 µg Antikörper pro 1.000.000 Beads eingesetzt. Da sich für 5 µg das Maximalsignal bei geringstem Antikörperverbrauch zeigte, wurde in **B** jeweils 5 µg Antikörper an 13 verschiedene Bead Regionen gekoppelt. Es wurde im Multiplex mit 1 µg goat anti-rabbit RPE Antikörper inkubiert. Es wurden pro Region mindestens 100 Beads vermessen. Aufgetragen wurde der getrimmte Mittelwert der mittleren Fluoreszenz Intensitäten (MFI) mit Standardabweichung.

In Abbildung 27 A ist die Titrationskurve der Antikörperkonzentrationen, welche an die Beads gekoppelt wurden, zu sehen. Es ist ein Signalanstieg der Kontrolle ohne gekoppelten Antikörper zu 1 µg gekoppelter Antikörper von etwa 30.000 MFI zu sehen. Bei einer Erhöhung der Antikörpermenge auf 5 µg waren Signale um 35.000 MFI zu sehen, welche sich auch mit weiter ansteigender Antikörperkonzentration nicht weiter steigern ließen. In nachfolgenden Versuchen wurden 1.000.000 Beads mit jeweils 5 µg Antikörper gekoppelt.

Es wurden im Anschluss 13 verschiedene Bead-Regionen mit anti-V5 Antikörper gekoppelt. Dazu wurde zu 1.000.000 Beads jeweils 5 µg Antikörper gegeben. Um die Kopplung nachzuweisen, wurden 5000 Beads jeder Region zusammen in ein Well gegeben und mit einem RPE-markierten anti-rabbit Antikörper inkubiert.

Abbildung 27 B zeigt die Signale der Kopplungskontrolle des Antikörpers an die verschiedenen Bead-Regionen. Für sämtliche Beads konnten Signale zwischen 30.000 MFI und 35.000 MFI erhalten werden. Eine gleichmäßige Kopplung der Antikörper an die Beads war somit gegeben.

4.2.2.2. Proteinbindung

Um zu zeigen, dass es möglich ist, Proteine über Antikörper-konjugierte Beads zu binden, wurden Beads verwendet, an die ein anti-His-Tag Antikörper konjugiert wurde. An diese Beads wurden mittels eines His-Tags ein Grün-fluoreszierendes Protein (GFP) gebunden. GFP hat mit

26,9 kDa eine ähnliche Größe wie die zu synthetisierenden Proteine. Es wurde unter einem Konfokal-Mikroskop vermessen.

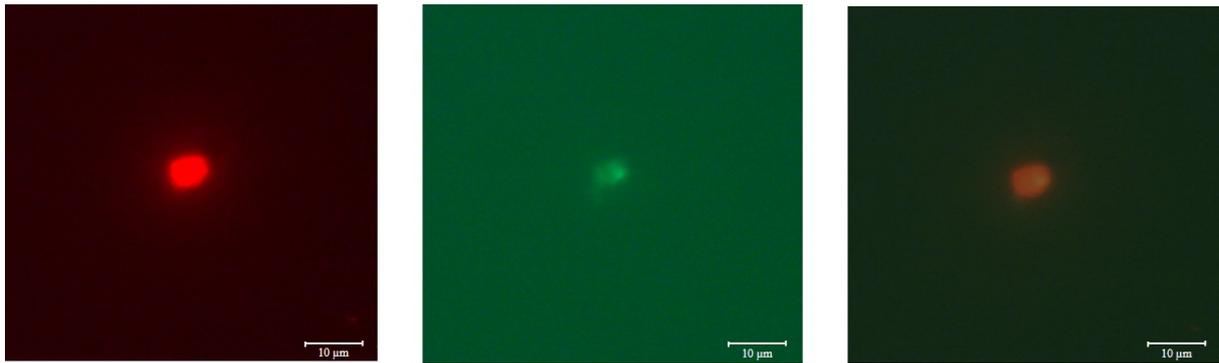


Abbildung 28 Fluoreszenzaufnahmen der Bindung von GFP an Bead

Aufnahme bei 60-facher Vergrößerung der Bindung von GFP (mitte, grüner Filter) an einem Bead (links, roter Filter) mittels Konfokal-Mikroskop. Overlay beider Aufnahmen mit 50 % Transparenz (rechts)

Es wurden von einem Bildausschnitt Aufnahmen sowohl mit rotem als auch mit grünem Filter gemacht. Durch den roten Filter waren die Beads, welche durch ihr intrinsisches Gemisch an Farbstoff fluoreszieren, aufgenommen. Mittels grünem Filter konnte das GFP gemessen werden. Auf Abbildung 28 sieht man beide Bilder übereinandergelegt mit 50 % Transparenz bei der Aufnahme mit grünem Filter. Man sieht, dass neben dem roten Leuchten durch die Beads ein grün leuchtender Schleier auf diesen zu sehen ist. Dabei handelt es sich um das GFP. Die Bindung des Proteins über den gekoppelten Antikörper war damit erfolgreich.

4.2.2.3. Proteinexpression

Es wurden 12 verschiedene Proteine (siehe Tabelle 20 und Tabelle 21) ausgewählt, die auf ihre IgE-Bindung hin getestet werden sollten. Als Template für die Proteinsynthese wurden Plasmide mit den kodierenden Bereichen der Proteine designed und extern synthetisiert. Es wurden mehrere Strategien zur Proteinsynthese getestet, um diese rekombinant herzustellen, darunter die Expression in Bakterien und zellfreie Proteinsynthese. Eine spezifische Extraktion der Proteine aus dem Speichel der zu untersuchenden Mücken war, aufgrund der Verfügbarkeit und auch der geringen Proteinkonzentration durch die Mückengröße, nicht möglich.

4.2.2.3.1. Template-Generierung

Es wurden Plasmide entworfen, die neben dem Zielprotein für einen FLAG-Tag (C-terminal), einen V5-Tag (N-terminal) kodierten und zusätzlich eine T7-Promotor-Sequenz enthielten, um sie in zellfreien Systemen herstellen zu können.

Die Sequenzen wurden in einem Expressionsvektor (pEX-A128 in Anhang 2 beziehungsweise pEX-A258 in Anhang 3) synthetisiert und lagen, nach dem Lösen in 1 M TRIS, in einer Konzentration von 100 ng/ μ L vor. Für die zellbasierte Proteinsynthese enthielten die Expressionsvektoren ein lac-Promotor.

4.2.2.3.1.1. Plasmidisolierung

Zur Vervielfältigung des jeweiligen Plasmids wurde dieses gemäß 3.1.7.2 in *E.coli* XL1-blue transformiert und über Nacht bei 37 °C auf LB-Agar-Platten bebrütet. Die Platten waren sowohl mit Tetracyclin (Resistenz des Stamms) als auch mit Ampicilin (Resistenz auf Plasmid) versetzt. Gepickte Einzelkolonien wurden in einer flüssigen Übernachtskultur wachsen gelassen und am Folgetag nach 3.1.7.3 behandelt, sodass das gewünschte Plasmid isoliert werden konnte. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über eine Messung mittels Nanodrop.

Tabelle 32 Plasmid Konzentrationen bestimmt mittels Nanodrop

Cul o 3	Cul o 5	Cul o 6	Cul o 7	A5SP	Cul n 3	Cul n 2 V1	Cul n 2 V2	Cul n 5	Cul n 7	Sim v 3	Sim v 4
61,09 ng / μ L	79,07 ng / μ L	87,7 ng / μ L	68,74 ng / μ L	88,33 ng/ μ L	65,31 ng / μ L	68,98 ng / μ L	79,57 ng / μ L	68,67 ng / μ L	48,82 ng / μ L	74,09 ng / μ L	61,74 ng / μ L

Die Plasmide wurden jeweils nach dem zu synthetisierenden Protein benannt. Es ist zu erkennen, dass durch die Präparation alle Plasmide vervielfältigt und isoliert werden konnten. Um die erhaltenen Plasmide auf die Größe des Inserts, und damit auf die Richtigkeit hin zu überprüfen, wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Je nach Expressionsvektor wurden mittels Vektorkarte nahe am Insert liegende Restriktionsschnittstellen gewählt, wobei die verwendeten Enzyme dafür gleiche Temperaturoptima besitzen sollten. Für die Sequenzen im pEX-A128-Vektor (Cul o 3, Cul o 5, Cul o 6, Cul o 7, A5SP, Sim v 4) wurden *BamHI* sowie *NotI* gewählt. Für die im pEX-258-Vektor (Cul n 3, Cul n 2 V1, Cul n 2 V2, Cul n 5, Cul n 7, Sim v 3) *XhoI* und *EcoRI*. Der Restriktionsverdau wurde gemäß 3.1.7.4 für die gewählten Enzyme bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben nach 3.1.3 durch eine 2 % Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Gele wurden im Fluoreszenzscanner eingescannt und sind im Anhang 7 zu finden.

Das jeweilige Plasmid wurde sowohl unverdaut als auch einfach- beziehungsweise doppelverdaut aufgetragen. Die Lauflänge der jeweiligen Fragmente entspricht den vorher

rechnerisch bestimmten. Daraus ließ sich ableiten, dass es sich bei den präparierten Plasmiden um Kopien der Ausgangsplasmide handelte.

4.2.2.3.1.2. PCR-Produkt

Da in den kommerziell erhältlichen *in vitro* Proteinsynthese-Kits auch mit PCR-Produkt als Template gearbeitet werden konnte, wurden die Inserts per PCR amplifiziert. Dafür wurden Primer entworfen (pEX-for, pEX-rev), die die proteinkodierende Sequenz flankierten. Die PCR wurde nach 3.1.7.5 durchgeführt, und das Produkt aufgereinigt. Die Konzentration an DNA wurde mittels Nanodrop bestimmt.

Tabelle 33 PCR-Produkt Konzentrationen bestimmt mittels Nanodrop

Cul o 3	Cul o 5	Cul o 6	Cul o 7	A5SP	Cul n 3	Cul n 2 V1	Cul n 2 V2	Cul n 5	Cul n 7	Sim v 3	Sim v 4
358.6 ng / μ L	352.2 ng / μ L	350.5 ng / μ L	361.0 ng / μ L	357.2 ng / μ L	352.5 ng / μ L	349.3 ng / μ L	356.6 ng / μ L	357.5 ng / μ L	325.1 ng / μ L	368.4 ng / μ L	361.1 ng / μ L

Die Konzentration des PCR-Produkts war, im Gegensatz zum präparierten Plasmid, etwa dreimal so hoch. Es wurde durch Auftragung der DNA nach 3.1.3 durch eine 2 % Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und überprüft, ob die Größe der Produkte der der Inserts entsprach. Das Bild des Gels wurde mittels Fluoreszenzscanner aufgenommen.

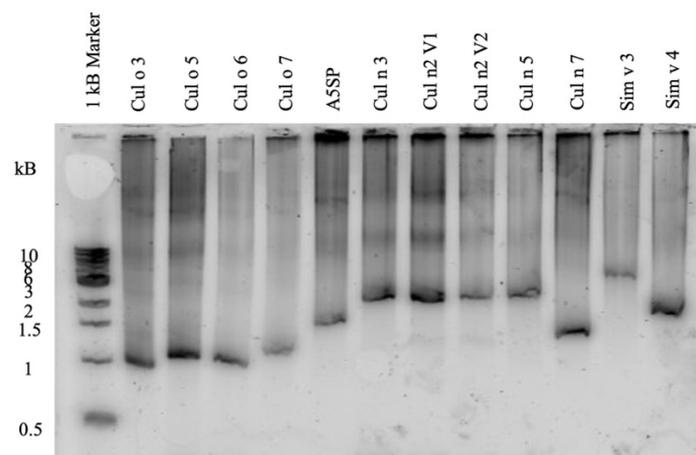


Abbildung 29 Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Es wurden 500 ng PCR-Produkt pro Spur mit 2 μ L SYBR Green (1:1000) auf 10 μ L aufgefüllt und in die Tasche eines 2 % Agarose-Gelelektrophorese gegeben. Die Laufzeit betrug 60 min bei 60 V. Spur 1 enthält 8 μ L Marker + 2 μ L SYBR Green. Eingesannt mittels Fluoreszenzscanner.

In Abbildung 29 sieht man die unterschiedlichen Laufhöhen der jeweiligen PCR-Produkte deutlich, welche den errechneten Größen von etwa 900 – 1600 bp entsprechen. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei den Proben um das gewünschte Produkt handelte.

4.2.2.3.2. *In vivo* Proteinexpression

Die 12 ausgewählten Proteine sollten rekombinant hergestellt werden. Dafür wurden die Plasmide aus 4.2.2.3.1.1 gemäß 3.1.7.2 in *E.coli* BL21-D3 Zellen transformiert und über Nacht bei 37 °C auf LB-Agar Platten bebrütet. Die Agarplatten enthielten Tetracyclin (Resistenz des Stamms) und Ampicillin (Resistenz des Plasmids). Es wurden Einzelkolonien gepickt und in einer Übernachtkultur anwachsen gelassen. Aus dieser wurden Hauptkulturen durch Animpfen im Verhältnis 1:100 erstellt. Analog zu 3.1.7.6 wurde die Kultur auf eine OD von 0,5 – 0,6 anwachsen gelassen und dann mit IPTG versetzt, um die Proteine mittels lac-Operon im Expressionsvektor zu exprimieren. Die Zellen wurden anschließend mittels BPer aufgeschlossen, Ultraschall ausgesetzt und abzentrifugiert. Die löslichen Proteine sollten sich im flüssigen Überstand befinden.

Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA nach dem in 3.1.5 beschriebenen Protokoll bestimmt. Es wurde eine Standardkurve mit BSA in den Konzentrationen 2000, 1000, 750, 500, 250, 125 und 25 µg/mL erstellt.

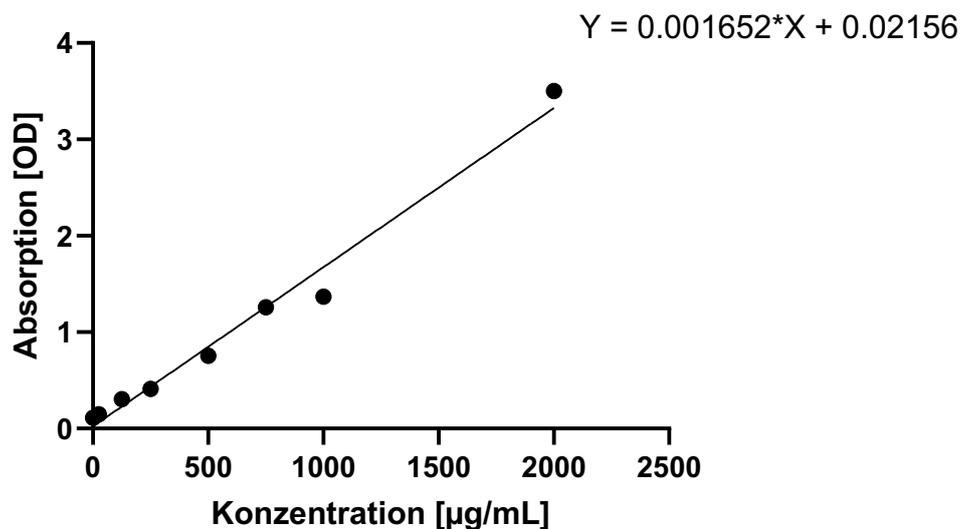


Abbildung 30 Standardkurve für BCA

Durch lineare Regression der OD von BSA im Bereich von 25– 2000 µg/mL ergibt sich die Funktion $y=0,001652x + 0,02156$ mit einem Korrelationskoeffizienten von $R^2=0,98$.

Durch lineare Regression ergab sich, wie in Abbildung 30 ersichtlich, die Funktion $y=0,001652x + 0,02156$, wodurch die Proteinkonzentrationen durch Einsetzen der gemessenen OD berechnet werden konnten. Es wurde jeweils als Doppelbestimmung gearbeitet.

Tabelle 34 Proteinkonzentrationen bestimmt über BCA-Assay

Cul o 3	Cul o 5	Cul o 6	Cul o 7	A5SP	Cul n 3	Cul n 2 V1	Cul n 2 V2	Cul n 5	Cul n 7	Sim v 3	Sim v 4
24,5 µg /µL	26,8 µg /µL	24,8 µg /µL	19,9 µg /µL	14,9 µg/µL	17,2 µg /µL	22,5 µg /µL	18,7 µg /µL	23,7 µg /µL	28,7 µg /µL	28,7 µg /µL	22,5 µg /µL

Es ergaben sich für die Proteine die Konzentrationen wie sie in Tabelle 28 angegeben wurden, und lagen damit in einem Bereich von etwa 15 – 29 µg/µL.

Der Nachweis der Proteine sowohl über eine SDS-PAGE als auch über einen Western Blot war nicht erfolgreich. Es wurde daher direkt versucht, die Proteine durch die V5-Beads zu binden und dort nachzuweisen.

Die Proteine, welche alle N-Terminal einen V5-Tag trugen, sollten über den an die Beads gekoppelten anti-V5-Tag Antikörper aus 4.2.2.1 gebunden werden. Dafür wurden pro Protein 5 mg mit 100.000 V5-gekoppelter Beads über Nacht bei 4 °C inkubiert. Diese Konzentration an Protein wurde verwendet, damit sich die gekoppelten Antikörper in einem gesättigten Zustand befanden. Sollten sich in der Proteinlösung Verunreinigungen befinden, konnten diese zwar das Ergebnis des BCA-Assays beeinflussen durch fehlenden V5-Tag aber nicht an die Antikörper binden. Die Bindung wurde über den C-Terminal sitzenden FLAG-Tag adressiert. Dazu wurden pro Protein 5000 Beads in ein Well gegeben und mit 1µg/mL anti-FLAG Antikörper inkubiert. Im Anschluss wurde mit einem RPE-konjugierten anti-rabbit Antikörper inkubiert.

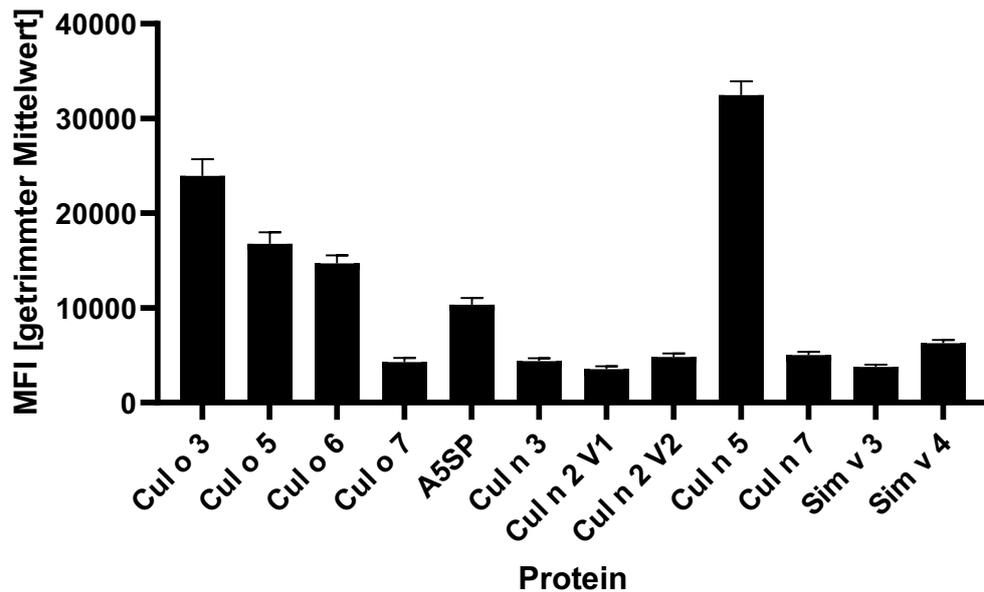


Abbildung 31 Immunpräzipitation der *in vivo* Proteinexpression

Es wurden 5 mg Protein aus *in vivo* Expression mit 100.000 anti-V5 Antikörper gekoppelten Beads inkubiert. Der Nachweis der Bindung erfolgte durch Adressierung des C-terminalen FLAG-Tags durch Inkubation mit 1 µg/mL mouse anti-FLAG Antikörper, gefolgt von 1 µg/mL goat anti-mouse RPE Antikörper. Es wurden pro Region mindestens 100 Beads im Multiplex vermessen. Aufgetragen wurde der getrimmte Mittelwert der mittleren Fluoreszenz Intensitäten (MFI) mit Standardabweichung.

Man sieht in Abbildung 31, dass für sämtliche Proteine ein Signal erhalten werden konnte. Dies spricht dafür, dass die Proteine komplett synthetisiert worden sind, da der C-Terminale FLAG-Tag den Abschluss während der Proteinsynthese bildete und die Bindung über den V5-Tag am N-Terminus erfolgte. Es sollten demnach an den Beads nur Vollängen-Proteine immobilisiert sein.

Obwohl die Proteinextrakte konzentrationsnormiert eingesetzt wurden, sind große Unterschiede zwischen den einzelnen Signalen zu sehen. Für Cul o 7, Cul n 3, Cul n 2 V1, Cul n 2 V 2, Cul n 7, Sim v 3 und Sim v 4 wurden Signale um die 5000 MFI erhalten. Für Cul o 3, Cul o 5 und Cul o 6 liegen diese zwischen 10.000 und 15.000 MFI, für A5SP bei 10.000 MFI und für Cul n 5 bei sogar mehr als 30.000 MFI.

Die Unterschiede basieren dabei nicht auf einer variierenden Antikörperdichte auf den Beads. Dies lässt sich durch die Kopplungskontrolle in Abbildung 27 ausschließen. Durch Wiederholung der Immunpräzipitation mit Beads zeigte sich, dass zwar auch sämtliche Proteine ein Signal zeigten, die Intensitäten jedoch voneinander abwichen. Die Menge an gebundenem Protein war damit scheinbar abhängig von der Durchmischung der Probe und der Faltung der

Proteine. Die Dichte an gebundenem Antikörper wird größer sein, als dass die größeren Proteine diese sättigen könnten, sich also gegenseitig sterisch hindern könnten, und je nach Faltung der Proteine, die Beladung so verkleinern könnten.

4.2.2.3.3. *In vitro* Proteinexpression

Neben der Proteinexpression in *E. coli* wurde ebenfalls versucht, die rekombinanten Proteine durch zellfreie Proteinexpression herzustellen. Dafür wurden drei Kits mit jeweils dem gleichen Protein (A5SP) ausgetestet. Als Templat wurde dafür das PCR-Produkt verwendet.

4.2.2.3.3.1. Vergleich der Kits

Es wurden insgesamt drei verschiedene Kits verwendet, die als Templat entweder Plasmid oder PCR-Produkt benötigen, sowie einen im Konstrukt vorhandenen T7-Promotor. Zwei dieser drei Kits bedienen sich Lysaten, welche aus Insekten-Zellen gewonnen wurden. Ein weiteres Lysat bestand aus *E.coli*-Extrakt. Zum Vergleich der Kits wurde das PCR-Produkt, welches für das A5SP Protein kodiert, verwendet. Zusätzlich dazu wurde eine Kontrolle verwendet, zu der keine DNA hinzugegeben wurde.

Das jeweilige Lysat wurden gemäß der Hersteller-Angaben nach 3.1.7.7.1, 3.1.7.7.2 und 3.1.7.7.2.1 verwendet.

Im Anschluss an die Synthese sollten die Proteine durch ihren V5-Tag an die anti-V5 gekoppelten Beads gebunden werden. Da das Gesamtvolumen des jeweiligen Synthese-Ansatzes nur 50 µL betrug, wurden 250.000 mit anti-V5 Antikörper Beads für die Inkubation bei 4 °C über Nacht benutzt.

Es wurden jeweils 5000 Beads pro Probe und korrespondierender Negativkontrolle in ein Well gegeben und mit 1µg/mL anti-FLAG Antikörper inkubiert. Im Anschluss wurde mit einem RPE-konjugierten anti-rabbit Antikörper inkubiert.

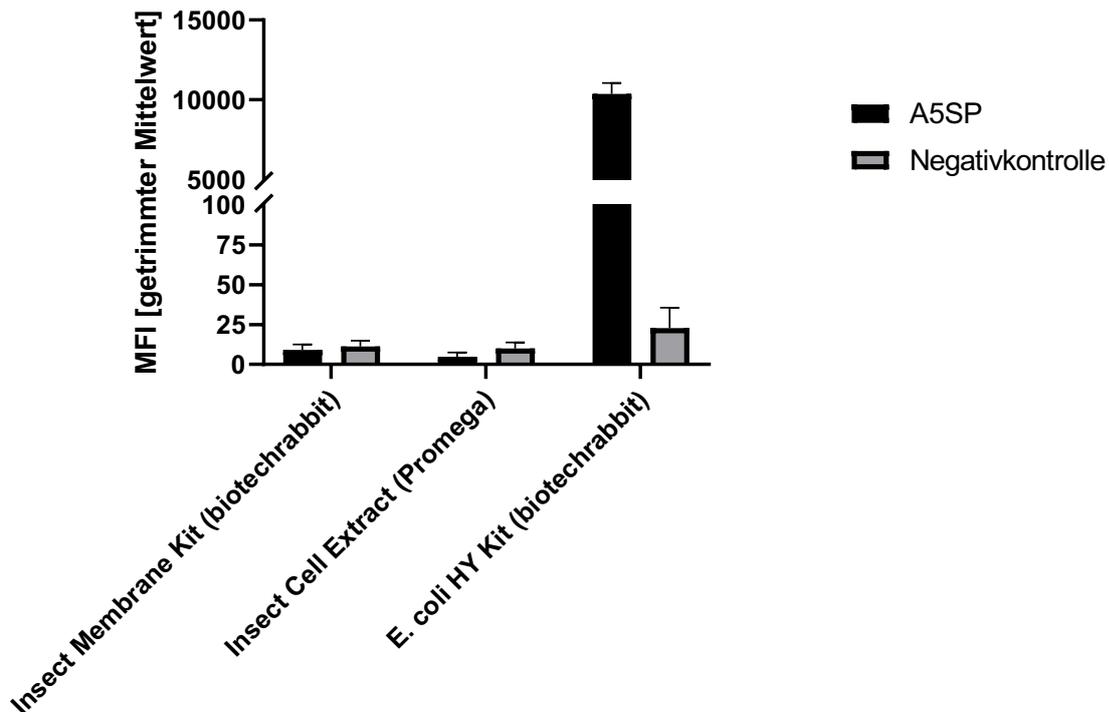


Abbildung 32 Vergleich der *in vitro* Expressionssysteme

Es wurden 50 μ L Proteinlösung aus *in vitro* Expression mit 25.000 anti-V5 Antikörper gekoppelte Beads inkubiert. Der Nachweis der Bindung erfolgte durch Adressierung des C-terminalen FLAG-Tags durch Inkubation mit 1 μ g/mL mouse anti-FLAG Antikörper gefolgt von 1 μ g/mL goat anti-mouse RPE Antikörper. Es wurden pro Region mindestens 100 Beads vermessen, wobei Probe und Negativkontrolle dabei im Multiplex behandelt wurden. Aufgetragen wurde der getrimmte Mittelwert der mittleren Fluoreszenz Intensitäten (MFI) mit Standardabweichung.

Für beide Insekten-Lysat-basierten Kits ist in Abbildung 32 zu sehen, dass kein Protein detektiert werden konnte. Dies spricht dafür, dass das Protein entweder gar nicht oder aber nicht vollständig synthetisiert wurde und ein Nachweis über den FLAG-Tag somit nicht möglich war. Dahingegen zeigten sich für das Protein, welches durch das *E.coli*-Lysat-basierte Kit hergestellt wurde, Signalwerte bei 10.000 MFI. So konnte die vollständige Synthese mit Hilfe des anti-FLAG-Tag Antikörpers und auch die Bindung über den gekoppelten anti-V5 Antikörper nachgewiesen werden. Im Folgenden wurde die *in vitro* Proteinsynthese mit dem *E.coli* HY Kit der Firma biotechrabbit durchgeführt.

4.2.2.3.3.2. *E.coli* HY Kit

Die Proteine sollten mit Hilfe des *E.coli* HY Kits hergestellt werden. Dafür wurde für jedes Protein ein doppelter Reaktionsansatz von 3.1.7.7.1 angefertigt. Als DNA-Template diente jeweils das PCR Produkt. Zusätzlich dazu wurde eine Probe ohne Template verwendet.

Die Proteine wurden gemäß 3.1.1 auf eine SDS-PAGE aufgetragen und per Gelelektrophorese getrennt. Durch Western Blotting wurden die Proben, wie in 3.1.2 beschrieben, auf eine Nitrocellulosemembran gebracht. Die Membran wurde entweder mit anti-V5 Antikörper oder mit anti-FLAG-Tag Antikörper behandelt und im Anschluss mit einem AP-konjugierten anti-rabbit Antikörper inkubiert. Der enzymkatalysierte Farbumschlag erfolgte durch Zugabe von Western Blue. Die Reaktion wurde durch dH₂O abgestoppt.

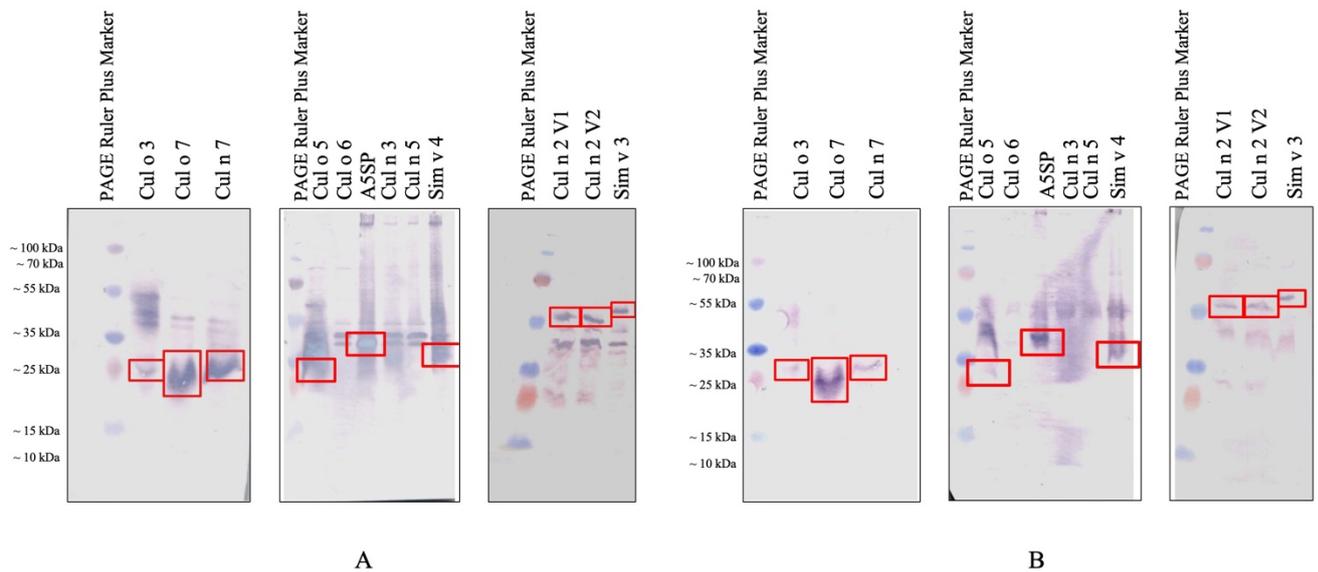


Abbildung 33 Western Blots der *in vitro* Proteinexpression

10 μ L der *in vitro* Proteinexpressionen wurden mit jeweils 2 μ L 5 x CCE Puffer bei 95 °C aufgeköcht und mittels 12 % SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden bei 48 mA für 90 min auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. **A:** Die Membranen wurden mit 1 μ g/mL rabbit anti-V5 Antikörper und im Anschluss mit 1 μ g/mL goat anti-rabbit AP Antikörper inkubiert. **B:** Die Membranen wurden mit 1 μ g/mL mouse anti-FLAG Antikörper und im Anschluss mit 1 μ g/mL goat anti-mouse AP Antikörper inkubiert. Der Farbumschlag erfolgte durch enzymatische Katalyse nach Zugabe von Western Blue.

Abbildung 33 zeigt Western Blots der exprimierten Proteine. Dabei erfolgte in A der Nachweis durch die Bindung des V5-Tags der Proteine durch einen anti-V5 Antikörper. Die Banden, welche auf Höhe der Proteingrößen laufen wurden mit einem roten Kasten markiert (Cul o 3 (18,5 kDa), Cul o 7 (19,5 kDa), Cul n 7 (22,3 kDa), Cul o 5 (21,5 kDa), A5SP (31,6 kDa), Sim v 4 (27 kDa), Cul n 2 V1 (21,5 kDa), Cul n 2 V2 (18,5 kDa), Sim v 3 (31,6 kDa)).

Gleiches wurde in B mittels eines anti-FLAG-Tag Antikörpers gegen den C-Terminalen FLAG-Tag der Proteine getan. Auch hier sieht man im roten Kasten die jeweiligen Laufhöhen der Proteine. Es konnten die gleichen Banden detektiert werden, wie auch mit anti-V5 Antikörper. Damit war es möglich, 9 von 12 Proteinen mittels Western Blot nachzuweisen.

Gleichzeitig sollten die Proteinexpressionen im Bead-basierten Ansatz untersucht werden. Dafür wurden die Proteine über ihren V5-Tag an anti-V5 Antikörper gekoppelte Beads gebunden. Dafür wurde für jedes Protein und die Negativkontrolle eine eigene Beadregion gewählt, um im Folgeschritt im Multiplex-Verfahren messen zu können.

100 μ L der Proteinsynthese-Ansätze wurden mit jeweils 500.000 Beads bei 4°C über Nacht inkubiert. Zur Überprüfung der Bindung wurden jeweils 5000 Beads pro Protein in einem Well mit 1 μ g/mL anti-FLAG Antikörper inkubiert. Im Anschluss wurde mit einem RPE-konjugierten anti-rabbit Antikörper inkubiert.

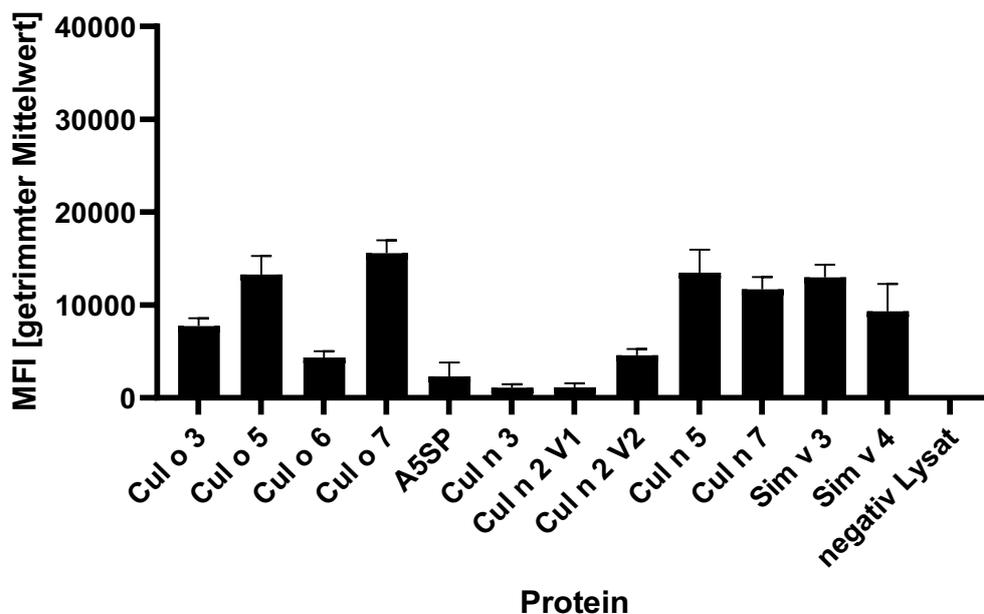


Abbildung 34 Immunpräzipitation der *in vitro* Proteinexpression

Es wurden 100 μ L Proteinlösung aus *in vitro* Expression mit 50000 anti-V5 Antikörper gekoppelte Beads inkubiert. Der Nachweis der Bindung erfolgte durch Adressierung des C-terminalen FLAG-Tags durch Inkubation mit 1 μ g/mL mouse anti-FLAG Antikörper gefolgt von 1 μ g/mL goat anti-mouse RPE Antikörper. Es wurden pro Region mindestens 100 Beads im Multiplex-Ansatz vermessen. Aufgetragen wurde der getrimmte Mittelwert der mittleren Fluoreszenz Intensitäten (MFI) mit Standardabweichung.

In Abbildung 34 ist zu sehen, dass für sämtliche Proteine Signale erhalten werden konnten. Für den Ansatz ohne DNA-Template sieht man, dass nur ein geringeres Hintergrundsignal detektiert werden konnte. Bestandteile aus dem Lysat haben also nicht unspezifisch an die Beads gebunden. Die geringsten Signale konnten auch hier für Cul n 3 und Cul n 2 V1 mit etwa 1000 MFI erhalten werden, gefolgt von A5SP mit 2500 MFI. Dies war verwunderlich, da dieses

Protein in 4.2.2.3.3.1 bereits höhere Signalwerte aufgewiesen hat. Für Cul o 6 und Cul n 2 V2 konnten Signale um 5000 MFI gemessen werden. Cul o 3, Cul o 5 Cul o 7, Cul n 5, Cul n 7, Sim v 3 und Sim v 4 zeigten Signale zwischen 10.000 – 15.000 MFI. Damit sind die Signale im Durchschnitt geringer als in der *in vivo* Proteinexpression. Gleichzeitig lässt sich jedoch auch zeigen, dass die Sensitivität des Bead-basierten Nachweises höher als im Western Blot ist, und sich so die erfolgreiche Synthese aller Proteine nachweisen ließ.

4.2.2.4. Unspezifische IgE-Kontrolle

Mit Hilfe des Testsystems sollte auf das Vorhandensein von IgE aus equinen Serumproben in Bezug auf Allergene des Sommererkzems getestet werden. Dazu wurden durch Partner 97 Proben von gesunden und erkrankten Pferden gesammelt. Um IgE in den Serumproben nachzuweisen, wurde zunächst eine unspezifisch Positivkontrolle entwickelt. Dafür wurden zwei anti-horse IgE Antikörper ausgewählt, die jeweils aus verschiedenen Host-Organismen stammen und an verschiedene Epitope des IgEs binden. Aus diesen wurde ein Sandwich-Ansatz aufgebaut. Der biotinylierte rabbit anti-horse IgE Antikörper wurde gemäß 3.2.1.2 an Avidin-Beads gekoppelt. Es wurden 5000 Beads pro Well vorgelegt und, über Nacht bei 4°C mit jeweils 100 µL unverdünnter Serumprobe, inkubiert. Es wurden alle 97 Probeseren sowie ein humanes Leerserum verwendet. Am Folgetag wurde mit einer 1 µg/mL Verdünnung eines mouse anti-horse IgE Antikörpers inkubiert. Anschließend wurde mit einem RPE-markierten anti-mouse Antikörper inkubiert.

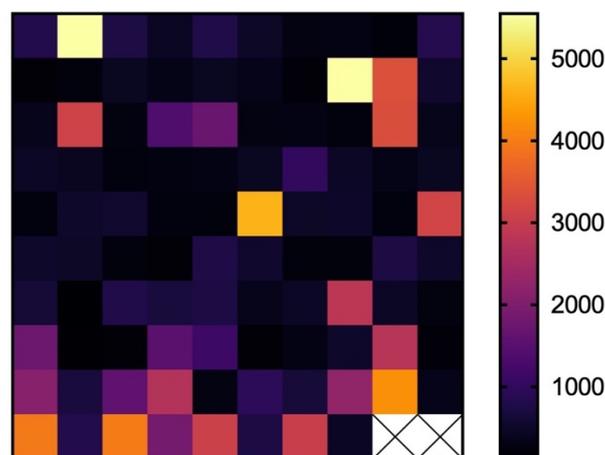


Abbildung 35 Heat-Map der unspezifischen IgE-Bindung

Die über Biotin/Avidin an die Beads gekoppelten rabbit anti-horse IgE Antikörper wurden im Singleplex mit den 97 Pferdeseren + Negativkontrolle inkubiert. Anschließend wurde mit 1 µg/mL mouse anti-horse IgE Antikörper und 1 µg/mL goat anti-mouse RPE Antikörper inkubiert. Die getrimmten Mittelwerte der Mittleren Fluoreszenzsignale (MFI) wurden gemäß ihrer Ausprägung eingefärbt. Die Seren sind fortlaufend von oben links horizontal aufgetragen.

Wie in Abbildung 35 zu sehen, war nur in einigen Seren ein IgE-Signal detektierbar. Dabei lag der Bereich der erhaltenen Signale zwischen 0 und 5500 MFI. Signale über 1000 MFI wurden als IgE-positiv eingestuft. Daraus ergibt sich für 52 von 97 Testseren ein positives Ergebnis. Dazu gehörten Serum 1, 2, 3, 5, 10, 18, 19, 22, 24, 25, 29, 37, 38, 42, 43, 46, 47, 48, 50, 51, 52, 55, 56, 59, 60, 61, 63, 64, 65, 67, 68, 69, 71, 74, 75, 78, 79, 81, 82, 83, 84, 86, 87, 88, 89, 91, 92, 93, 94, 95, 96 und 97.

4.2.2.5. Serumscreening

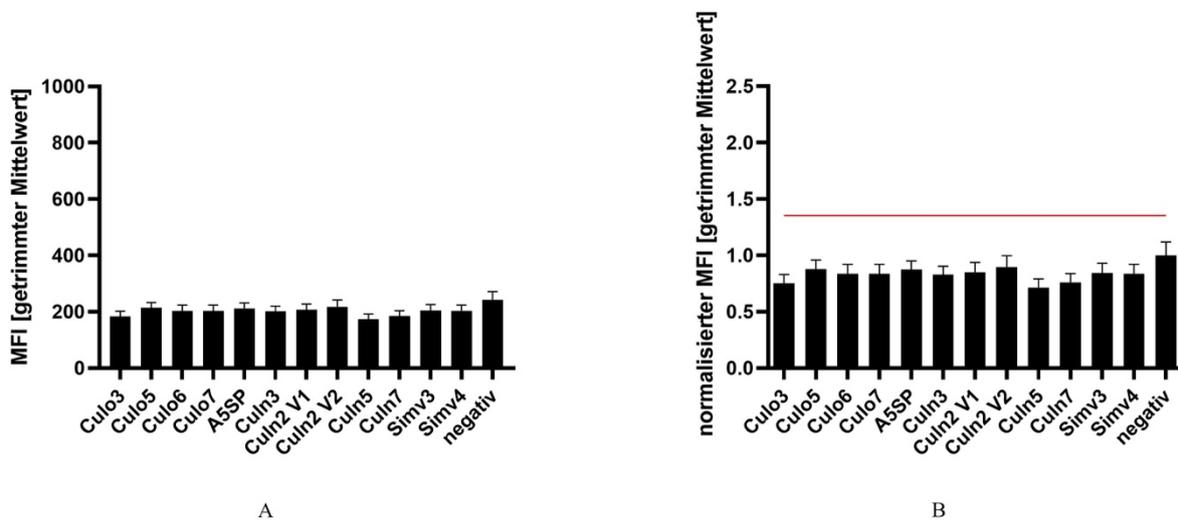
Die Seren wurden mit den 12 synthetisierten Proteinen, welche an die verschiedenen Bead-Regionen gebunden wurden, inkubiert. Dabei wurden alle 97 gesammelten Seren vermessen, unabhängig davon, ob sie in 4.2.2.4 ein positives Ergebnis zeigten. Dies sollte zur Überprüfung der Qualität der Validierung der Ergebnisse dienen, da diese Proben durch bereits bestimmtes nicht Vorhandensein von IgE kein Signal für die Proteine zeigen sollten.

Das Screening wurde insgesamt 6 mal wiederholt, dabei wurden drei Messungen mit den in *E. coli* synthetisierten Proteinen (4.2.2.3.2) erhaltenen Proteinen und drei Messungen mit den *in vitro* Synthesen mittels *E. coli* HY Kit (4.2.2.3.3.2) erhaltenen Proteinen getätigt.

4.2.2.5.1. Messungen

Es wurden pro Protein 5000 Beads pro Well pipettiert. Die Seren wurden jeweils unverdünnt mit 100 μ L pro Well hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es wurde mit einer 1 μ g/mL Verdünnung eines mouse anti-horse IgE Antikörpers inkubiert. Anschließend wurde mit einem RPE-markiertem anti-mouse Antikörper inkubiert.

Die gemessenen Signale wurden auf das Signal der Negativkontrolle normalisiert und ein Cut-Off Wert berechnet. Dieser setzte sich zusammen aus dem Mittelwert der normalisierten Negativkontrolle (also 1) + dreimal deren Standardabweichung. Lag ein Probensignal über diesem Wert, so wurde er als positiv angesehen.

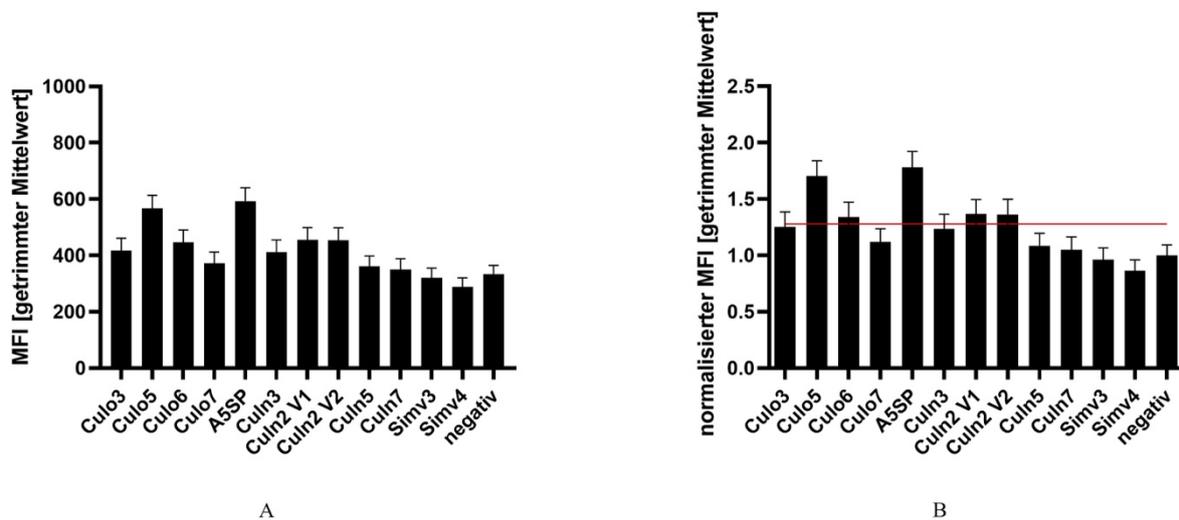
4.2.2.5.1.1. Verwendung von Proteinen aus *in vivo* Proteinexpression**Abbildung 36 Serum 10 (*in vivo* Expression)**

Die Beads mit gebundenem Protein aus der *in vivo* Expression wurden im Multiplex mit jeweils 100 μ L an zu testendem Pferdeserum inkubiert (hier beispielhaft an Serum 10 dargestellt). Anschließend wurde mit 1 μ g/mL mouse anti-horse IgE Antikörper und 1 μ g/mL goat anti-mouse RPE Antikörper inkubiert. In **A** ist der getrimmte Mittelwert der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) mit Standardabweichung aufgetragen. In **B** sind die auf die Negativkontrolle normalisierten, getrimmten Mittelwerte der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) mit Standardabweichung aufgetragen. Zusätzlich wurde ein Cut-Off Wert (rot) aus der normalisierten Negativkontrolle plus dreimal ihrer Standardabweichung berechnet.

Exemplarisch wurden in Abbildung 36 die Messwerte für Serum 10 dargestellt. Zusätzlich zu den Proteinen wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, bei der es sich um anti-V5 gekoppelte Beads handelte, die im BPer-Puffer, also dem Lyse- und Lagerpuffer der Proteine anstelle dieser inkubiert wurde. Man sieht anhand der Grafik beispielhaft, dass das Signal für die Negativkontrolle bei etwa 200 MFI lag. Die erhaltenen Probensignale zeigten ebenfalls Signale um 200 MFI oder lagen minimal darunter. Normalisiert man die Messwerte, und setzt sie in Bezug zu dem berechneten Cut-Off Wert, so sieht man, dass keins der Signale diesen überschreitet. Die Bindung der Proteine an IgE war damit als negativ bewertet worden.

Der Cut-Off Wert wurde für jedes Serum einzeln berechnet. Für alle Seren konnte durch *in vivo* Proteinsynthese kein Signal den Cut-Off Wert überschreiten, somit wurden sämtliche Proteine für sämtliche Seren als negativ bewertet.

Durch die vorangegangenen Validierungen der Einzelkompartimente des Tests lässt sich die Bindung des IgEs an das Protein als kritischen, nicht-funktionellen Punkt ausmachen.

4.2.2.5.1.2. Verwendung von Proteinen aus *in vitro* Proteinexpression**Abbildung 37 Serum 10 (*in vitro* Expression)**

Die Beads mit gebundenem Protein aus der *in vitro* Expression wurden im Multiplex mit jeweils 100 μ L an zu testendem Pferdeserum inkubiert (hier beispielhaft an Serum 10 dargestellt). Anschließend wurde mit 1 μ g/mL mouse anti-horse IgE Antikörper und 1 μ g/mL goat anti-mouse RPE Antikörper inkubiert. In **A** ist der getrimmte Mittelwert der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) mit Standardabweichung aufgetragen. In **B** sind die auf die Negativkontrolle normalisierten, getrimmten Mittelwerte der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) mit Standardabweichung aufgetragen. Zusätzlich wurde ein Cut-Off Wert (rot) aus der normalisierten Negativkontrolle plus dreimal ihrer Standardabweichung berechnet.

In Abbildung 37 wurden beispielhaft die Messwerte für Serum 10 dargestellt. Zusätzlich zu den Proteinen wurde eine Negativkontrolle vermessen, bei der es sich um einen *in vitro* Transkriptions/Translations Ansatz ohne DNA-Template handelte, welcher mit anti-V5 konjugierten Beads inkubiert wurde. Man sieht anhand der Grafik, dass die Negativkontrolle ein Signal bei 400 MFI zeigt. Die Signale der Proteine befinden sich in einem Bereich von 400 – 600 MFI. Auch hier wurden die Signale der Proben auf das Signal der Negativkontrolle normiert und ein Cut-Off Wert berechnet. Proteine, die ein Signal über diesem Wert haben, wurden als positiv gewertet. In diesem Fall waren dies Cul o 5, Cul o 6, A5SP, Cul n 2 V1 und Cul n 2 V2.

Es wurden drei biologische Replikate des Screenings gemessen. In Tabelle 35 wurden die aus 4.2.2.4 als positiv eingestufteten Seren aufgelistet. Für jedes Replikat wurde in grün markiert, ob für das jeweilige Protein ein Wert über dem errechneten Cut-Off Wert berechnet werden konnte.

Tabelle 35 Serumscreening der IgE-positiven Seren (durch *in vitro* Proteinexpression)

Serum	Cul o 3	Cul o 5	Cul o 6	Cul o 7	A5SP	Cul n 3	Cul n 2 V1	Cul n 2 V2	Cul n 5	Cul n 7	Sim v 3	Sim v 4
1												
2												
3												
5												
10												
18												
19												
22												
24												
25												
29												
37												
38												
42												
43												
46												
47												
48												
50												
51												
52												
55												
56												
60												
63												
64												
65												
67												
68												
69												
71												
74												
75												
78												
79												
81												
82												
83												
84												
86												
87												
88												
89												
91												
92												
94												
95												
96												
97												

In Tabelle 35 sind die Signale dargestellt, die pro Serum über dem berechneten Cut-Off Wert lagen. Jedoch zeigten nur 38 der 52 positiv bewerteten Seren Bindung an die Proteine. Dabei auffällig ist, dass nur in wenigen Fällen bei einer biologischen Wiederholung zweimal das gleiche Protein gebunden wurde. Prädominant ist dabei die Bindung an IgE durch das A5SP, was bei 24 Seren mindestens einmal ein positives Signal zeigte, gefolgt von Cul o 5, wo in 14 Fällen der Cut-Off Wert überschritten wurde. Jedes Protein wurde mindestens einmal als positiv detektiert. Es ist ebenfalls zu sehen, dass nur in einem Fall (Serum 82) nur ein Protein als positiv gewertet wurde. In den meistens Fällen wurden zwei oder mehr Proteine in einem Serum als positive Binder detektiert.

Man sieht jedoch ebenfalls, dass die Verteilung der Proteinbindung wenig reproduzierbar ist. In keiner der Messungen konnte eine dreifache Übereinstimmung detektiert werden. Da für die Bindung der Proteine bei jeder Messung zuvor eine Kontrolle der Proteinsynthese über den V5-Tag und den FLAG-Tag stattgefunden hat, kann ausgeschlossen werden, dass kein Protein gebunden wurde.

Zusätzlich dazu wurden die Seren vermessen, welche in 4.2.2.4 als negativ eingestuft wurden. Auch diese zeigten, entgegen den vorherigen Versuchen, teilweise Signale oberhalb des Cut-Off Wertes für die Bindung von IgE an die Proteine (Daten nicht gezeigt). Auch hier zeigten die Messungen große Unsicherheiten und Schwankungen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mittels der vorangegangenen Versuche gezeigt werden konnte, dass die vollständige Synthese der Proteine durch *in vitro* Expression erzielt werden konnte. Auch die Bindung dieser, durch die an den Beads gekoppelten V5-Antikörper, hat funktioniert. Gleichzeitig konnte IgE unspezifisch in den Serumproben, durch Bindung zweier Epitop-verschiedener anti-horse-IgE Antikörper, nachgewiesen werden. Die Verbindung beider Teile, also die spezifische Bindung des IgEs an die rekombinanten Proteine konnte zwar gezeigt, aber nicht reproduzierbar gemessen werden.

5. Diskussion

Antikörper nehmen in der Immunologie eine bedeutende Rolle ein. So werden sie neben ihrer eigentlichen Funktion, der spezifischen Fremdkörper-Elimination, zu diesem Zwecke auch in therapeutischen Ansätzen verwendet, allerdings auch in der Forschung und Diagnostik zum gezielten Nachweis von anderen Molekülen. Für die Anwendung der Antikörper, unabhängig von ihrem Einsatzzweck, ist das Wissen über ihre Eigenschaften unabdinglich. Im Zuge dieser Arbeit wurde das Bindungsverhalten ausgesuchter Antikörper mittels Bead-basierter Assays im Multiplex-Ansatz untersucht. Ziel dabei war es, die Vorteile dieser Messmethoden zu verwenden, um vergleichbare Ergebnisse für die Charakterisierung von Antikörpern zu erzielen, und diese mit bereits etablierten Methoden in Relation setzen zu können. Die Antikörpercharakterisierung lässt sich in die molekulare Charakterisierung, bei der der Aufbau und die Struktur des Antikörpers inklusive seiner Sequenz und posttranslationale Modifikationen (PTM) im Fokus steht, und der funktionellen Charakterisierung unterscheiden, welche neben dem Bindungsepitop auch die Selektivität und die Spezifität durch Bindungskonstanten beschreibt [82][83][84].

Im Gegensatz dazu steht die Antikörpervalidierung. Diese beschreibt die Utilisierung des Antikörpers in einem Biosensor und die damit verbundene Funktionalität für das angewandte Testsystem und den Testaufbau. Dabei sind die einzelnen Validierungen der Einzelkompartimente des Tests für eine Etablierung von großer Priorität [85][86][87].

Zu diesem Zweck sollten Bead-basierte multiplexe Analyseverfahren zu zwei biologischen Fragestellungen validiert und etabliert werden, bei denen die verwendeten Antikörper eine Schlüsselrolle einnehmen. Zur Vereinfachung werden im Folgenden die Abschnitte nach verwendeten Antikörpern getrennt.

5.1. Phospho-PKA-Substrat Antikörper

Proteinkinasen spielen eine wichtige Rolle in vielen verschiedenen Aspekten der Zelle. Dazu gehören neben zellulärem Metabolismus auch dessen Proliferation, Transkription und weitere zum Überleben der Zelle wichtige Funktionen [88]. Sie erreichen dies durch Phosphorylierung von Zielstrukturen. Zusammen mit Proteinphosphatasen, welche phosphorylierte Proteine dephosphorylieren, binden sie eine regulatorisch funktionelle Einheit [89][90]. So können diese beispielsweise Ionenkanäle beeinflussen und so zu ihrer Öffnung beitragen [91] oder aber auch Rezeptoren durch Phosphorylierung so modulieren, dass ihre Sensibilität gegenüber Liganden steigt [92]. Die Identifikation von Targetmotiven und Bindungsstellen für Proteinkinasen ist

daher von großem Interesse, da sie für mögliche therapeutische Ansätze durch Anregung oder auch durch Inhibition eingesetzt werden könnten [93]. Potenzielle Targets können beispielweise durch softwarebasierte Tools vorausgesagt werden [94][95]. Die Überprüfung auf die tatsächliche Phosphorylierbarkeit lässt sich beispielsweise mittels Antikörper realisieren.

Zur Antikörpercharakterisierung wurde ein Antikörper verwendet, welcher spezifisch Targets der PKA, der bisher am besten charakterisierten Proteinkinase, mit der Sequenz RRxpS/T nach deren Phosphorylierung erkennen und binden soll. Dieser Antikörper ist in der PKA-assoziierten Forschung weit verbreitet und hat mehr als 220 Zitierungen. Der Antikörper wurde oftmals zur Identifikation neuer PKA-Targets verwendet. Es wurde bereits gezeigt, dass dieser neben der Konsensussequenz RRxpS auch weitere Motive der PKA erkennt und bindet [96]. Um die möglichen Variationen zu zeigen, wurden Peptide entworfen, welche abgeleitet von bekannten PKA-Target-Sites von ARMS und CREB verschiedene Punktmutationen und Phosphorylierungsstatus aufwiesen. Diese wurden mittels Bead-basierter Multiplexanalyse auf die Antikörperbindung hin untersucht. Dabei wurden nur Serin-basierte Bindemotive, nicht aber welche, die ein Threonin enthalten, ausgetestet und betrachtet.

Es konnte in 4.1.1 gezeigt werden, dass der Antikörper die Peptide unterschiedlich gut bindet. Von den 23 getesteten Peptiden zeigten 7 eine Bindung zum Antikörper in unterschiedlichen Intensitäten. Ausgehend davon lassen sich verschiedene Aussagen über die Bindungseigenschaften des Antikörpers an das Serin-Motiv treffen.

- Der Antikörper hat nur Peptide gebunden, bei der sich eine Phosphorylierung am Serin befand. Unphosphorylierte Peptide wurden nicht gebunden.
- Die Position der Phosphorylierung scheint essenziell für die Bindung des Antikörpers. So sieht man bei den Peptiden ARRS*S und ARRSS*, dass eine Bindung nur zu Stande kommt, wenn sich die Phosphorylierung am zweiten Serin befindet.
- Eine zweite Phosphorylierung in P-1 Position beeinflusst die Bindung nicht wesentlich.
- Wichtig für die Bindung des Antikörpers ist das Arginin in P-3 Position. Wird dieses durch beispielsweise Lysin ausgetauscht, so ist kein Signal mehr detektierbar.
- Die P-2 Position hingegen muss nicht zwingend ein Arginin sein. Es wurden ebenfalls Bindungen detektiert, wenn dort ein Alanin oder ein Lysin saß.

Es zeigt sich dabei, dass der Antikörper die Targetmotive spezifisch bindet. Bei der Identifikation von neuen PKA-Targets ergibt sich dabei das Problem, dass er jedoch nicht alle Motive, sondern nur solche, die die Kriterien, wie eben beschrieben, erfüllen, erkennt. Es kann

dabei zu Fehlinterpretationen von negativen Signalen kommen, sodass PKA-Targets mit abweichenden Motiven dabei als falsch-negativ bewertet werden. Genau Bestimmungen der Spezifitäten und Epitope von Antikörpern erlauben dabei eine fundiertere Auswertung von Bindungssignalen, und verkleinern dabei den Bias bei der Dateninterpretation. Die Aussage der Messwerte, die dabei erhalten werden, sind in ihrem Kontext nur so gut, wie das Wissen über die Bindungseigenschaften des Antikörpers.

Der Screeningcharakter der Bead-basierten Multiplexanalyse erlaubte einen hohen Probendurchsatz innerhalb einer Messung mit mindestens 100 Replikaten pro Analyt. Vergleicht man die normalisierten Signalintensitäten und die sich daraus ergebenden Signalverhältnisse der Proben mit denen anderer etablierter Methoden, so findet man eine Übereinstimmung innerhalb der Ergebnisse. Es konnten gleiche Ergebnisse wie mittels Peptid-Mikroarray und auch SPR erhalten werden.

Während beim Mikroarray üblicherweise Endpunkte gemessen werden, ist beim SPR eine kontinuierliche Detektion der Bindung und die daraus resultierende Auswertung kinetischer Parameter möglich. Es wurde in einem weiteren Schritt getestet, ob durch einen geeigneten Versuchsaufbau die Messung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D des phospho-PKA-Substrat Antikörpers auch durch einen Bead-basierten Assay möglich ist.

Dafür wurden Peptide verwendet, welche ihren Ursprung in Transmembranrezeptoren aus dem Schmerzkontext haben. Diese wurden bereits als Targets der PKA identifiziert und beschrieben [78]. Nach Kopplung an Beads wurden diese durch einen *in vitro* Kinase-Assay phosphoryliert. Der Antikörper wurde in verschiedenen Konzentrationen mit den Beads inkubiert und die erhaltenen Signale halblogarithmisch aufgetragen. Die sich daraus ergebene sigmoidale Kurve wurde analysiert und der jeweilige EC_{50} als K_D berechnet. Gleichzeitig wurde überprüft, ob die Verwendung eines sekundären gelabelten Antikörpers, wie im Fall des Bead-basierten Assay, nicht aber beim SPR, Einfluss auf die Detektion der Bindeeigenschaften des primären Antikörpers hat. Dies konnte ausgeschlossen werden.

Es wurde in dieser Arbeit zusätzlich ein Standardpeptid verwendet, welches bereits durch SPR und das BScreen auf seinen K_D Wert hin überprüft wurde. So konnten die erhaltenen Ergebnisse durch die Bead-basierte Methode mit den etablierten Methoden verglichen werden. In der Literatur gibt es bisher keine Studien zu den kinetischen Parametern dieses Antikörpers. Es zeigte sich, dass die erhaltenen K_D Werte für das Standardpeptid mit denen der Goldstandards übereinstimmten. Es kann also davon ausgegangen werden, dass auch die gemessenen Werte und die errechneten K_D Werte für die weiteren Peptide vergleichbaren Werten entsprechen. Die

Peptide hatten demnach Gleichgewichtsdissoziationskonstanten im nanomolaren Bereich von 10^{-8} bis 10^{-10} nM.

Der phospho-PKA-Substrat Antikörper liegt damit im Bereich der hochaffinen Antikörper [97][98][99]. Es bindet verschiedene Targetmotive mit unterschiedlicher Affinität, allerdings alle immer noch sehr sensitiv.

Es war somit möglich, durch die Verwendung eines geeigneten Testaufbaus den phospho-PKA Antikörper an einigen ausgewählten Targets zu charakterisieren. Auftretende Bindungsunterschiede zwischen dem Antikörper und dem Peptid, durch sich minimal verändernde Epitope, konnten dabei gemessen werden. Dies zeigt, dass nur einzelne Änderungen im Epitop einen Einfluss auf die Bindung des Antikörpers haben können, und somit die Betrachtung des Targetaufbaus im Zusammenhang mit der Datenauswertung wichtig ist, um falsche Ergebnisinterpretationen zu vermeiden. Gleichzeitig konnte eine Methode etabliert werden, in der Bindungsunterschiede Bead-basiert nicht nur als Endpunktsignal, sondern als Gleichgewichtsdissoziationskonstante ausgegeben werden konnten. Der Informationsgehalt, den man durch die Messung mittels SPR erhält, ist detaillierter und genauer, auch durch die Erfahrung im Umgang mit dem Gerät und der Datenauswertung. Allerdings ermöglicht die Bead-basierte Technologie, durch die gleichzeitige Verwendung von bis zu 500 verschiedenen Analyten in gegebenem Testaufbau, eine sehr gute Möglichkeit des Screenings zur Auswahl und Kategorisierung von zu testenden Antikörpern in Bezug auf ihre Bindungsstärke und Affinität, was sich als Vorteil bei der Beurteilung großer Mengen zu testender Proben und Analyte erweist. Gleichzeitig kann das Testsystem auch so modifiziert werden, dass nicht ein Antikörper an verschiedenen Targets, sondern mehrere Antikörper an einem Target getestet werden können.

5.2. THC & CBD Antikörper

Im zweiten Teil der Arbeit wurden verschiedene Antikörper zur Unterscheidung zwischen THC und CBD ausgetestet und validiert. Laut Betäubungsmittelgesetz und Straßenverkehrsgesetz ist der Besitz und der Konsum von psychoaktivem THC im Zusammenhang mit der Führung eines Kraftfahrzeuges verboten. Durch die vermehrte Popularität von nicht berauschendem CBD, einem THC-Isomer, in freiverkäuflichen Produkten, ist eine spezifische Unterscheidung der beiden Moleküle von großem Interesse [100]. Zu diesem Zweck wurden Antikörper mittels Phage-Display durch YUMAB hergestellt, die THC und CBD jeweils spezifisch binden sollen, ohne mit der jeweils anderen Substanz unspezifische Bindungen einzugehen. Es wurden dabei Biotin-Alkyl-Konjugate und Biotin-PEG-Konjugate der Substanzen zur Auswahl genutzt.

Neun der hergestellten Antikörper, fünf THC- und vier CBD-spezifische Antikörper, wurden im Bead-basierten Multiplex-Verfahren mit gekoppeltem Biotin-Alkyl-Konjugat der Analyten untersucht. Dabei wurden die Antikörper auf die jeweilige Spezifität hin getestet. Es zeigte sich, dass die anti-THC Antikörper die Konjugate sehr spezifisch banden, mit nur einer sehr geringen Kreuzreaktivität zum CBD. Auch die anti-CBD Antikörper zeigten größtenteils spezifische Bindungen, wobei die unspezifische Bindung zum THC größer war. Es wurden die jeweils drei spezifischsten Antikörper für weitere Testungen ausgewählt. Dabei wurde untersucht, ob die Antikörper nur das Konjugat binden, durch welches sie im Phage-Display ausgewählt wurden, oder auch den Reinstoff. Dies wurde im kompetitiven Ansatz mit ungebundenem THC beziehungsweise CBD zunächst in PBST, später auch in humanem Serum getestet. Bei beiden Versuchen zeigte sich, dass die Antikörper sowohl das Konjugat als auch die reine Droge binden. Der Bereich, in dem der Kompetitor detektiert werden konnte, wurde im humanen Serum bestimmt und die jeweiligen Nachweisgrenzen der Antikörper berechnet. Es zeigten sich für die THC-spezifischen Antikörper gleiche, für die CBD-spezifischen Antikörper sehr unterschiedliche Sensitivitäten für die Antikörper. Um einen möglichst breiten Bereich an Kompetitor Konzentrationen messen zu können, war hierbei eine langsame Negativsteigung des linearen Bereiches der sigmoidalen Kurve von Vorteil. Nachfolgend wurde zusammenfassend dargestellt, für welche Antikörper die jeweiligen Kriterien erfüllt wurden.

Tabelle 36 Zusammenfassung der Antikörper

	YU615-A02	YU615-B04	YU615-D04	YU615-A01	YU615-D01	YU616-A03	YU616-C02	YU616-D01	YU616-G03
Spezifität									
Sensitivität									
Quantifizierbarer Konzentrationsbereich									

Daraus ergibt sich für die THC-spezifischen Antikörper YU615-B04 mit einer Nachweisgrenze von 584,29 ng/mL und einem quantifizierbaren Bereich bis 10.000 ng/mL an Kompetitor als geeignetster Antikörper. Für die CBD-spezifischen Antikörper ist YU616-D01 wegen seiner Nachweisgrenze von 173,46 ng/mL und seinem quantifizierbaren Bereich bis 1000 ng/mL YU616-A03 sensitiver.

In bereits etablierten Tests werden anstatt der Nachweisgrenzen Cut-Off Werte berechnet. Also die Konzentrationen, bei denen die Konzentration nicht nur bestimmt werden kann, sondern bei der das vorhandene THC im Probenmaterial eine Grenzwelle überschreitet, ab welcher das Führen eines Fahrzeuges nicht mehr erlaubt ist. Vergleicht man die hier errechneten Nachweisgrenzen für die Antikörper mit den Cut-Off Werten vergleichbarer Tests, die für immunologische Assays bei Verkehrskontrollen genutzt werden, so sieht man, dass die Konzentration an THC im Serum für die hier getesteten Antikörper weit darüber liegen müsste, um ein positives Ergebnis zu detektieren. Bei urinbasierten Drogenscreening Schnelltests werden Cut-Off Werte um 20 ng/mL [101] in Abhängigkeit vom Hersteller angegeben. Positive Ergebnisse bei Schnelltests dienen zur Veranlassung von Blutuntersuchungen, die gerichtlich Bestand haben, und per Flüssigkeits- oder Gaschromatographie, gekoppelt mit dem Massenspektrometer, untersucht werden. Dabei ergibt sich eine Nachweisgrenze von 0,5 ng/mL [102][103]. Daher eignen sich die untersuchten Antikörper in diesem Testsystem zwar für den allgemeinen Nachweis von THC beziehungsweise CBD in einer Matrix, nicht jedoch zum Einsatz für Drogenscreenings in der Straßenverkehrskontrolle. Neben Blut- und Urin-basierten Tests treten vor allem Speichel-basierte Testungen immer weiter in den Vordergrund [104][105][106]. Dabei wird dem Probanden mit einem Wattepad Flüssigkeit aus dem Mund entnommen. Mithilfe eines Lateral-Flow Assays werden die Stoffe darin untersucht. Dabei handelt es sich oft um Multi-Drogen Screenings mit gängigen Betäubungsmitteln. Auch hier konnte gezeigt werden, dass CBD für das THC-Testfeld keine falsch-positiven Ergebnisse zeigte. Der Test besaß dabei eine Nachweisgrenze von 20 ng/mL [107].

Im Vergleich zu den getesteten Antikörpern werden bei gängigen Untersuchungen außerdem die Metabolite des THC betrachtet. Da THC schnell zu THC-Carbonsäure (THC-COOH) umgewandelt wird, ist der Nachweis in Ausscheidungsprodukten wie Urin von Vorteil, da sie dort in prozentual höherer Konzentration auftritt. Gleichzeitig konnte dabei gesehen werden, dass die Antikörper, welche den Carbonsäuremetaboliten binden, keinerlei Kreuzreaktionen mit den Abbauprodukten des CBD zeigten, es wurden lediglich Bindungen zum Cannabinol (CBN) beobachtet [108].

Betrachtet man jedoch die Spezifität der einzelnen getesteten Antikörper, so fällt vor allem bei den CBD-spezifischen Antikörpern auf, dass sie neben dem eigentlichen Analyten auch sekundär THC und THC-Konjugate binden. Das Epitop der einzelnen Antikörper ist nicht weiter bekannt. Es lässt sich jedoch vermuten, dass die Antikörper zumindest teilweise an Strukturen binden, die beide Moleküle teilen (siehe Abbildung 4). So wird das Epitop der

Antikörper das C₈ der Moleküle miteinschließen, neben diesem jedoch auch noch andere Strukturen der Isomere, wodurch es zu ungewollten Kreuzreaktionen kommt. Präferiert werden dabei jedoch immer die spezifischen Moleküle. Zur Verbesserung der Spezifität der Antikörper wäre zunächst ein genaues Wissen über das gebundene Epitop erforderlich. Durch Verknüpfung des Wissens über die gebundenen Strukturen und dem Zusammenhang dieser mit dem unspezifischen Signal, könnten weitere Antikörper, basierend auf den Relationen, synthetisiert werden, die spezifischer ihr Ziel, und unter anderem auch Metabolite der Drogen binden.

Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Austestung der THC- und CBD-spezifischen Antikörper mittels Bead-basierter Multiplexanalyse auf ihre Spezifität und Sensitivität hin gelungen ist. Mit Hilfe der Versuche sowie des Aufbaus eines kompetitiven Assays konnte gezeigt werden, dass sich die verwendeten Antikörper für einen Immunoassay in verschiedenen Matrices eignen, jedoch nur in einem Konzentrationsbereich, der weit über dem des Einsatzes für die gerichtliche Verwendbarkeit in Hinblick auf Drogentestung liegt.

5.3. Equines IgE

Beim sogenannten Sommerekzem handelt es sich um eine Typ-I Hypersensibilitäts-Reaktion, welche bei Pferden auftritt. Als Auslöser dieser Reaktion wurden Proteine aus dem Speichel einzelner Mückenarten identifiziert. Ein Biss der weiblichen Mücke hat für das Pferd eine Reaktion zur Folge, die sich in empfindlicher und juckender Haut und daraus resultierenden blutigen Wunden und Entzündungen manifestiert [71].

Durch anfängliche Testung von zunächst Ganzkörperproben [109] und später Speichalextrakten [110][111] konnten Proteine als potenzielle Antigene identifiziert und untersucht werden [112]. Diese Allergene lösen in betroffenen Pferden nach Sensitivierung eine Immunantwort aus, die zur Produktion von Gedächtniszellen und IgE führen. Durch rekombinante Herstellung der Allergene in *E. coli* konnte bereits eine Spezifität des IgE gezeigt werden [113].

Zur Untersuchung von betroffenen Pferden sollte die Bindung von in Serum enthaltenen IgE zum spezifischen Allergen untersucht werden. Dazu wurde in dieser Arbeit ein Bead-basiertes Multiplex-Testsystem etabliert, mit dem der gleichzeitige Nachweis von IgE an 12 verschiedene Allergene spezifisch möglich ist.

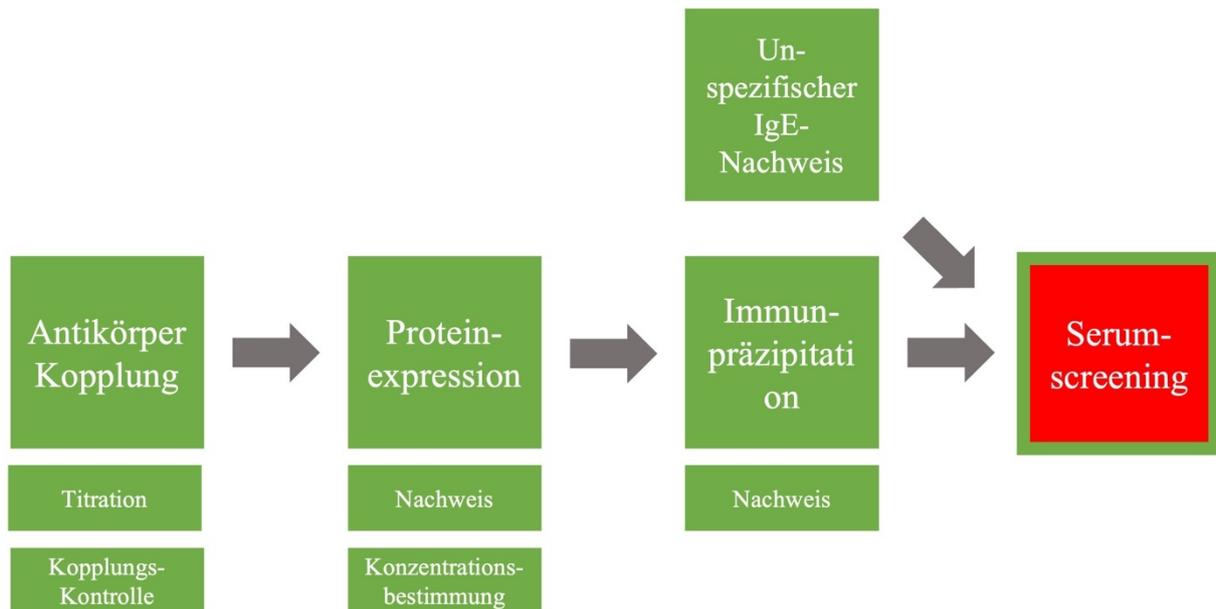


Abbildung 38 Arbeitsschritte des Serumscreenings (Sommerekzem)

Dargestellt wurden die Arbeitsschritte, welche für das Serumscreening validiert wurden. Grün markierte gelten als erfolgreich validierte Kompartimente, rot markierte als nicht erfolgreich.

Das Testsystem setzte sich aus einzeln zu validierenden Kompartimenten zusammen (Abbildung 38). Es wurde im ersten Schritt verschiedene Antikörperkonzentrationen zur Kopplung an die Beads getestet, mit dem Ziel, eine gleichmäßige Verteilung durch eine Sättigung der Bindungsstellen bei minimal verwendeter Antikörperkonzentration zu erreichen. Es ergab sich eine Antikörperkonzentration von 5 μg pro 1.000.000 Beads. Anschließend wurden weitere Bead-Regionen mit der gleichen Menge an Antikörper gekoppelt, sowie auf den Erfolg kontrolliert.

In den weiteren Schritten wurden verschiedene Proteinsynthese-Systeme ausgetestet. Die gewünschten Proteine konnten dabei nur durch *E. coli* basierte Synthese, sowohl zellbasiert als auch zellfrei hergestellt werden. Die zellfreie Proteinsynthese durch *Sf21*-basierte Kits war nicht möglich. Die Proteine wurden durch Western Blots qualitativ nachgewiesen, und anschließend durch den Nanodrop oder BCA-Assay quantifiziert.

Die hergestellten Proteine konnten über ihren N-Terminalen V5-Tag an die, an die Beads gekoppelten, anti-V5 Antikörper gebunden, und über ihren C-Terminalen FLAG-Tag nachgewiesen werden. Die vollständige Proteinexpression konnte so bestätigt werden.

Die 97 zu testenden Pferdeseren wurden durch den Aufbau eines Testsystems zum unspezifischen Nachweis von equinem IgE analysiert. Es wurden in 52 von 97 Proben IgE nachgewiesen. Das Screening konnte dreimalig erfolgreich reproduziert werden.

Für die Überprüfung der spezifischen IgE-Bindungen wurden die Testseren im Multiplex mit den 12 rekombinant hergestellten und an Beads gebundenen Proteinen inkubiert. Es wurde für jedes Serum ein Cut-Off Wert berechnet, der sich durch das Signal der Negativkontrolle + 3-mal Ihrer Standardabweichung ergab. Testsignale über diesem Wert galten als positiv. Für die durch zellbasierte Proteinsynthese hergestellten Proteine, ergab sich, trotz Expressionskontrolle, für kein Serum eine spezifische IgE-Bindung. Bei der zellfreien Proteinsynthese hingegen konnten die hergestellten Proteine detektiert werden.

Die Messungen wurden als Screening dreimalig wiederholt, wobei die Anzahl an positiv gemessenen Proteinen für die vorher als IgE-positiv detektierten Seren in Abbildung 39 A dargestellt wurden.

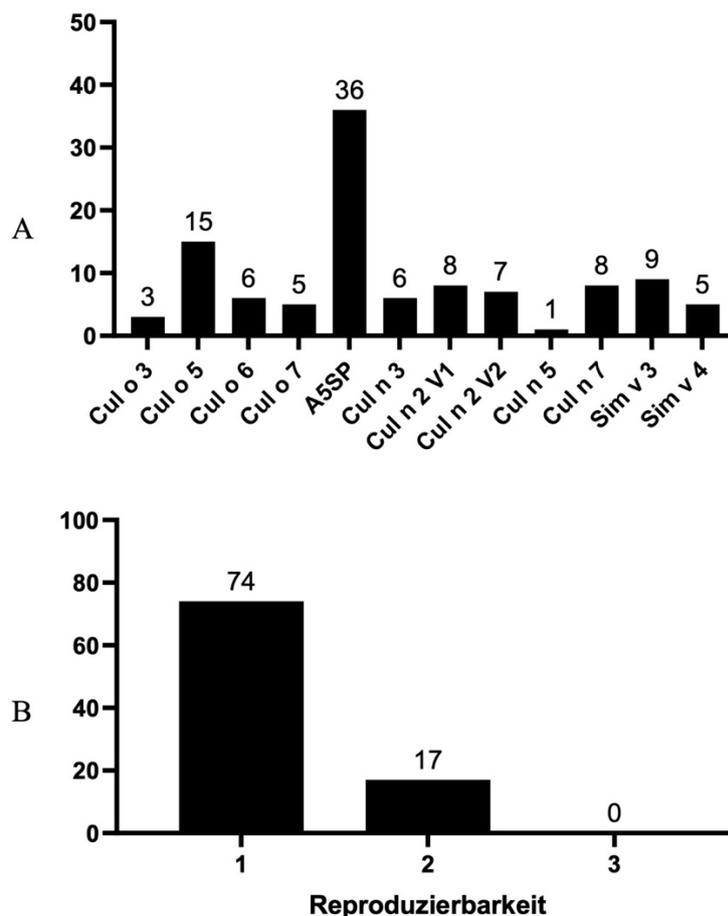


Abbildung 39 Anzahl positiver Detektionen und Reproduzierbarkeit (Sommerekzem)

In **A** wurden die Anzahl der Detektionen, der als positiv deklarierten Seren von allen drei Messungen pro Protein aufaddiert, dargestellt. In **B** ist die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse, der detektierten Antigen-IgE Messungen im Serum über die Triplet-Messungen aufgezeigt.

Auffällig hierbei ist, dass nur für Cul o 5 und für A5SP mehr als zehnmal eine Bindung zu detektieren war. Für sämtlich anderen Proteine lag die Anzahl unter zehn, bei Cul n 5 als Minimum bei einer Detektion. Betrachtet man Abbildung 39 B, so sieht man, wie reproduzierbar die Ergebnisse waren. Es wurden pro Serum für jedes Protein drei Messungen durchgeführt. Sollte spezifisches IgE im Serum enthalten sein, so sollte das IgE in allen drei Proben mit dem entsprechenden Protein eine Bindung eingehen. Es konnte jedoch für keine Messung dreimalig ein positives Signal für das gleiche Protein erhalten werden. Nur in 17 Fällen konnte die positive Detektion überhaupt reproduziert werden. In sämtlichen anderen Messungen wurden 74-mal nur jeweils ein- von dreimal ein Protein für ein Serum als positiv detektiert.

Neben den als IgE-positiv klassifizierten Seren, wurden auch die negativen auf ihre Bindung zu den Proteinen untersucht. Auch hier konnten Signale oberhalb des Cut-Off Wertes gemessen werden, allerdings waren auch bei diesen Screenings keine reproduzierbaren Daten zu erhalten. Auf Grund der mangelnden Reproduzierbarkeit und damit zusammenhängender Validierung der Ergebnisse war es nicht möglich, Aussagen über Verteilungsmuster nach Geschlecht oder Rasse der Pferde zu treffen.

Es kann zusammengefasst werden, dass der Aufbau des Testsystems in seinen Einzelteilen validierbar ist. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Proteine vollständig synthetisiert und durch den anti-V5 Tag Antikörper an die Beads gebunden werden konnten. Gleichzeitig wurde unspezifisch das teilweise Vorhandensein von IgE in den Seren bestätigt. Auch die Detektionsantikörper wurden im gesamten Prozess des Öfteren validiert und auf Funktionalität hin überprüft. Einzig die Bindung des rekombinant hergestellten Proteins zu dem equinem IgE konnte im Testsystem nicht einzeln validiert werden. Es konnte in der Literatur bereits gezeigt werden, dass es sich bei den getesteten Proteinen um Allergene, welche das Sommerekzem auslösen, handelt [109]. Die Proteine konnten bereits rekombinant *in vivo* in *E. coli* BL21-D3-Zellen hergestellt, über einen His-Tag aufgereinigt und mittels ELISA als IgE-Binder detektiert werden [112][113]. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen, die in dieser Arbeit gezeigt wurden, so sieht man, dass die, durch bakterielle Synthese hergestellten, Proteine trotz ähnlichen angewandten Protokolls in diesem Fall zwar nachweisbar waren, jedoch kein Signal durch Bindung von IgE an die Proteine messbar war. Die Unterschiede zwischen den Protokollen beruhen dabei lediglich im Puffer beim Zellaufschluss.

Neben den in *E. coli* Zellen hergestellten Proteinen wurden in dieser Arbeit auch mittels *E. coli* Lysat zellfrei hergestellte Proteine getestet. Diese konnten ebenfalls vollständig synthetisiert und durch den anti-V5 Tag Antikörper an die Beads gebunden werden. Sie zeigten auch nach Seruminkubation Signale, die, wie bereits beschrieben, jedoch nicht reproduzierbar waren. Des Weiteren waren auch für die IgE-negativ getestete Seren Bindungen zu den Proteinen zu detektieren. Die Bindung des IgE an die Proteine scheint hierbei das Problem zu sein. Es ist bekannt, dass diese Proteine posttranslationale Modifikationen (PTM) ausbilden [114]. Dabei handelt es sich um enzymatische Modifizierungen eines Proteins nach dessen Synthese, wie zum Beispiel einer Phosphorylierung, Glykosylierung oder auch Methylierung [115][116]. Diese haben eine Änderung der dreidimensionalen Struktur des Proteins zu Folge. Die Struktur des Proteins steht im direkten Zusammenhang mit seiner Funktionalität und seiner Bindeeigenschaften [117][118]. So ist es zwar möglich Proteine in Vollängen, wie bei den hier verwendeten Proteinen, zu exprimieren und durch Adressierung von C-Terminalen und N-Terminalen Tags dies nachzuweisen, jedoch dabei ein ungefaltetes Protein zu erhalten, welches funktionell inaktiv ist. Gleichzeitig gibt es neben linearen Antikörper-Bindungsepitopen auch strukturelle Epitope [119]. Diese sind erst bei Ausbildung der dreidimensionalen Struktur des Proteins für Antikörper so zugänglich, dass sie diese spezifisch binden können. Um PTMs in zellfrei hergestellten Proteinen abbilden zu können, muss in Abhängigkeit der Art der Modifikation der geeignete Organismus des Lysats gewählt werden [120]. *E. coli* Lysat ist zwar am besten für eine hohe Proteinausbeute geeignet, besitzt jedoch nur eine geringe Fähigkeit, die Proteine nach Translation zu modifizieren. Dafür bedarf es zusätzlicher Supplementationen und ist auch dann nur im geringen Maße möglich [121][122]. Da einige der untersuchten Allergene Glykosylierungen aufwiesen, ist es möglich, dass durch das Wegbleiben dieser das Epitop durch das spezifische IgE nicht länger oder nur teilweise erkannt wurde oder sich sogar Kreuzreaktivitäten zeigten. Um posttranslationale Glykosylierungen in *E. coli* Systemen sicherzustellen, bedarf es der Zugabe von Mikrosomen.

Es bedarf einer Optimierung der Proteinsynthese, durch beispielsweise der Herstellung in einem eukaryotischen Organismus, mit dem die Ausbildung von PTMs wahrscheinlicher wäre, und struktureller Analyse der Expressionsprodukte. Anhand der Vorversuche, bei denen die eukaryotischen *Sf21* Insektenkits ausgetestet wurden, sieht man die Notwendigkeit von Optimierungsschritten. Dies umfasst neben der Template-Generierung auch die Anpassung von Reaktionsbedingungen durch Zugabe von geeigneten Reagenzien zur begünstigten Ausbildung von PMTs [123][124].

Prinzipiell ist die Hochdurchsatz-Analyse im Multiplex durch die Beads nicht nur auf das Sommererkzem beim Pferd, sondern auch auf weitere Krankheiten und Organismen ausweitbar. Das Screening von Körperflüssigkeiten auf verschiedene Analyten lässt sich wie gezeigt in Einzelschritten validieren und optimiert etablieren.

5.4. Multiplex

Die Versuche in dieser Arbeit wurden vorrangig im Multiplex-Format vermessen, das heißt, pro Messung wurden mehrere Analyte gleichzeitig bestimmt. Dafür wurden Vergleiche durchgeführt, um zu überprüfen, ob es durch die gleichzeitige Prozessierung Unterschiede im Detektionsverhalten gibt. Es konnte gezeigt werden, dass für Versuche, welche im Multiplex durchgeführt werden, vergleichbare Ergebnisse wie im Singleplex erhalten wurden.

Die gleichzeitige Messung mehrerer Analyten in einer Probe ist kein neues Prinzip. In Tabelle 37 wurden die drei hier verwendeten multiplexen Testsysteme gegenübergestellt. So gelten als etablierte Methoden in der Multiplex-Anwendung Mikroarrays. DNA-Mikroarrays wurden erstmals in den 1980er Jahren noch als Dot-Blots auf Membranen etabliert [125][126]. Seither ist die Entwicklung, sowohl von Substraten wie der Verwendung von funktionalisierten Glasslides, als auch die Vielfältigkeit der aufzubringenden Proben wie DNA und RNA, Proteine, Peptide, Oligosaccharide, Lipide oder ganze Zellen, weit fortgeschritten [127][128]. Nicht zuletzt wegen der hohen Anzahl an zu immobilisierenden Proben werden Mikroarrays in vielen Bereichen der Diagnostik, Forschung und Entwicklung eingesetzt [129]. Die Anzahl der messbaren Analyte hängt hierbei stark von der verwendeten Prozessierung (vergleiche Abbildung 6) und den zu messenden Replikaten und Probenanzahlen ab. So ist beispielweise das Aufbringen von 8 x 8 Spots im 8x2 FAST-Slide Format möglich. Zwar können in diesem Format 16 Proben gleichzeitig analysiert werden, allerdings ist so im Vergleich zu anderen Formaten die Anzahl an individuellen Analyten, die in einem Feld vorkommenden, geringer. Nutzt man dann noch Replikate der Analyten, so verringert sich die Anzahl noch weiter.

Als Probenmatrix dienen hier Flüssigkeiten. Meist muss vor der Inkubation der Slide teilweise sehr stark blockiert werden, um Hintergrundsignale durch unspezifische Bindung von Probenbestandteilen zu verhindern. Dabei sollte die immobilisierte Probe, als ungewollter Nebeneffekt, so wenig wie möglich angegriffen oder denaturiert werden. Durch Probeninkubation mit nachfolgender Antikörperinkubation lassen sich Endpunkte der Bindungsreaktion messen. Weitaus aufwändiger lassen sich ebenfalls Zeitreihen mit variierenden Inkubationszeiträumen aufnehmen, was jedoch von der Handhabung schwieriger ist. Die Detektion der Bindung kann entweder über Fluoreszenz-markierte Antikörper oder im

Fall des BScreen über die Detektion von Änderung des Brechungsindex durch Bindung von Probenbestandteilen an die immobilisierten Analyten erfolgen.

Eine weitere etablierte Methode der multiplexen Bindungsanalysen wird mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) erzielt. Diese Technik setzte sich in den 1990ern in der Untersuchung von Bindungspartnern durch [130]. Die dabei untersuchten Bindungen können hierbei zum Beispiel Protein-Protein- [131], Protein-DNA- [132], Enzym-Substrat- [133] oder aber auch Antigen-Antikörper-Bindungen [134] sein. Die Anzahl der immobilisierten Analyten ist bei der herkömmlichen SPR limitiert. So können zwar mehrere Proben nacheinander durch Regenerationsschritte, also Trennung der Bindung zwischen Analyten und Probenbestandteil, vermessen werden, allerdings ist die Immobilisierung von einer großen Anzahl verschiedener Analyten nicht möglich. Durch das Detektionssystem der SPR, also der Messung der Änderung des Brechungsindex, resultierend durch die Analyt-Proben-Bindung, können hochauflösende Kurven erhalten werden, mit denen die kinetische Beschreibung der Bindung möglich ist. So lassen sich neben Parametern, wie der Assoziationskonstante und der Dissoziationskonstante, Spezifitäten und Affinitäten der Bindungspartner genauestens berechnen. Bedingt durch die direkte Detektion der Bindung, bedarf es bei der Messung keiner Inkubation mit markierten Antikörpern oder anderen Farbstoffen. Es wird labelfrei-gemessen. Dadurch kann gleichzeitig der Einfluss von anderen Parametern auf die Detektion, wie zum Beispiel die Kreuzreaktivität von verwendeten Detektionsantikörpern, ausgeschlossen werden. Das SPR gilt als Goldstandard in der kinetischen Untersuchung von Bindungen.

In dieser Arbeit wurde vorrangig mit Bead-basierten Multiplex-Systemen gearbeitet. Bei dieser Methode werden die Analyten durch Kopplung an funktionelle Gruppen auf der Oberfläche der magnetischen Beads immobilisiert. Die magnetischen Beads lassen sich in Regionen einteilen, abhängig vom Verhältnis an intrinsischem, fluoreszentelem Farbstoff. Durch verschiedene Konzentrationsvariationen dieser lassen sich 500 verschiedene Regionen unterscheiden. Im Well-Format werden die gekoppelten Beads mit der zu untersuchenden Probe inkubiert und durch Bindung des Reporter-Fluorophors R-Phycoerythrin, beispielsweise durch Bindung eines gekoppelten Antikörpers, messbar gemacht. Die Beads werden ähnlich eines Durchflusszytometers vermessen. Dabei werden sie durch zwei Laser bei verschiedenen Wellenlängen angeregt (siehe Abbildung 3). Die Zuordnung der Beads zu einer Region erfolgt über den DD Detektor, die Detektion des gebundenen Phycoerythrins über den Assay-Detektor [135].

Über die funktionellen Epoxy-Gruppen an den Beads lassen sich Proteine, Peptide, Antikörper oder andere Moleküle, die eine Aminogruppe besitzen, durch EDC/NHS Kopplung an den Beads immobilisieren [136]. Durch Verwendung von Beads, dessen Oberfläche mit Avidin beschichtet sind, ist ebenfalls die Möglichkeit der Kopplung von Biotin-Konjugaten möglich. Die Anzahl der zu verwendenden Analyte steigt damit immens, da die Biotinylierung von Biomolekülen zur Immobilisierung, zum Beispiel beim ELISA schon oftmals eingesetzt und erfolgreich genutzt wurde [137][138][139]. Es sind ebenfalls Beads erhältlich, die mit spezifischen Oligonukleotid-Tags beschichtet sind. Durch Hinzufügen der Komplementärsequenz können so zu untersuchende Nukleotid-Proben hybridisiert werden [140]. Die Anzahl an pro Messung verwendeter Beads ist abhängig von der Sorgfalt und der Präzision des Bearbeiters. So gehen mit jedem Waschschrift und Flüssigkeitswechsel eine mehr oder weniger hohe Zahl an magnetischen Beads verloren. Im Endvolumen der zu messenden Flüssigkeit, muss die eingestellte Mindestanzahl an Beads enthalten sein. Die Grundeinstellung beträgt 100 Beads pro vermessener Region, also pro Analyt. Dies entspricht einer Anzahl von 100 Replikaten pro Analyt pro Well.

Die Inkubation der Beads geschieht zumeist im Well-Format in Flüssigproben unter Schütteln, sodass eine gute Durchmischung der Beads, gerade im Multiplex, gegeben ist. Daraus ergibt sich der Vorteil gegenüber automatisierten Fluss-basierten Systemen, das massentransportunabhängig gearbeitet wird [141]. Durch die verschiedenen Verwendungen von Bead-basierten Assays wurde die Vielfältigkeit von zu untersuchenden Proben bereits gezeigt [142][143].

Tabelle 37 Vergleich der Multiplex-Systeme

	Mikroarray	Bead-basierter Assay	SPR
Anzahl Analyten	+++ (in Abhängigkeit von Replikaten)	+++	+
Anzahl Replikate	++ (in Abhängigkeit von Analyten)	+++	
Diversität Analyten	+++	++	++
Diversität Proben(matrix)	++	++	+
Handhabung	++	++	+

	Mikroarray	Bead-basierter Assay	SPR
Zeitaufwand	++	++	+++
Schwierigkeit	++	++	+
Informationsgehalt	++	++(+)	+++

+++ : gut ++ : mittel gut + : weniger gut

Gerade durch die Diversität der zu koppelnden Analyten oder der zu inkubierenden Proben, gibt es bereits eine Vielzahl an kommerziell erhältlichen Kits, welche entweder standardisierte Analyten oder aber individuell zusammenstellbare gekoppelte Beads enthalten [144][145]. Durch die sich daraus ergebende hohe Anzahl an verschiedenen Analyten eignen sich besagte Kits besonders zur Untersuchung mehrerer Parameter gleichzeitig, um eventuelle Verteilungsmuster an Probenbestandteilen identifizieren und miteinander verknüpfen zu können. Ebenso können Screenings von Probenbestandteilen in großer Anzahl parallel durchgeführt werden, so wie in dieser Arbeit beim Serumscreening nach spezifischen IgEs. Im Zusammenhang mit dem Bead-basierten Testsystem konnten auch die Vorteile der Methode in Bezug auf die Schritt-für-Schritt Validierung gesehen werden. Durch Austestung der Einzelfragmente des Tests konnte schnell der nicht funktionierende Arbeitsschritt gefunden werden, da sämtliche anderen Einzelschritte bereits als erfolgreich validiert angesehen werden konnten.

Neben Endpunktmessungen ist es möglich, das Testsystem abzuändern, um weitergehende Informationen über die Bindung zu erhalten. Es war in dieser Arbeit möglich, durch Aufbau und Etablierung des Tests, kinetische Parameter der Analyt-Proben-Bindung zu erhalten. So ist es mit der Verwendung von Bead-basierten Methoden möglich versatile Testsysteme zu validieren, die gezielt auf Fragestellungen und Forschungsziele abgestimmt werden können.

Durch Ausnutzung der Vorteile von Bead-basierten Systemen, war es möglich, die Bindung zwischen dem verwendeten Antikörper und seinem Epitop zu charakterisieren und Unterschiede durch Mutationen der Bindungsstelle zu zeigen. Gleichzeitig konnte ein Ansatz etabliert werden, der die kinetische Betrachtung der Bindung erlaubt.

Weiterhin war es möglich einen kompetitiven Assay zu etablieren und zu validieren, um antikörperbasiert zwischen gebundenen und freien Analyten unterscheiden zu können. Die Nachweisgrenzen des Tests konnten dabei mitbestimmt werden.

Zuletzt sollte eine Screeningmethode zum Nachweis von spezifischen Antikörpern in Serumproben etabliert werden. Während die Einzelschritte erfolgreich validiert werden konnten, war es nicht möglich, den Test als Ganzes erfolgreich und reproduzierbar durchzuführen. Nichtsdestotrotz erwies sich der Bead-basierte Ansatz zur Antikörpercharakterisierung und Antikörpervalidierung als erfolgreich und kann in Zukunft die Auswahl und Kategorisierung zu untersuchender Antikörper erleichtern.

6. Literatur

- [1] E. Behring and S. Kitasato, “Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thiereneber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren,” *Deutsche Medicinische Wochenschrift*, vol. 16, pp. 1113–1114, 1890.
- [2] P. Ehrlich, “Experimentelle Untersuchungen über Immunität,” *Deutsche Medicinische Wochenschrift*, vol. 17, p. 1218, 1891.
- [3] D. Voet, J. Voet, and C. Pratt, “Lehrbuch der Biochemie,” 2010.
- [4] M. L. Chiu, D. R. Goulet, A. Teplyakov, and G. L. Gilliland, “Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics,” *Antibodies*, vol. 8, no. 4, p. 55, Dec. 2019, doi: 10.3390/antib8040055.
- [5] D. Davies and H. Metzger, “Structural basis of antibody function,” *Annual review of immunology*, vol. 1, pp. 87–117, 1983, doi: 10.1146/ANNUREV.IY.01.040183.000511.
- [6] C. Menti, J. Henriques, F. Missell, and M. Roesch-Ely, “Antibody-based magneto-elastic biosensors: potential devices for detection of pathogens and associated toxins,” *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 100, no. 14, pp. 6149–6163, Jul. 2016, doi: 10.1007/S00253-016-7624-3.
- [7] T. W. Mak, M. E. Saunders, and B. D. Jett, “Primer to The Immune Response: Second Edition,” *Primer to The Immune Response: Second Edition*, pp. 1–674, Jan. 2014, doi: 10.1016/C2009-0-62217-0.
- [8] H. Lodish *et al.*, “Molecular Cell Biology (Lodish, Molecular Cell Biology),” p. 973, 2007.
- [9] K. Chen and A. Cerutti, “The Function and Regulation of Immunoglobulin D,” *Current opinion in immunology*, vol. 23, no. 3, p. 345, Jun. 2011, doi: 10.1016/J.COI.2011.01.006.
- [10] J. S. Marshall, R. Warrington, W. Watson, and H. L. Kim, “An introduction to immunology and immunopathology,” *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*, vol. 14. BioMed Central Ltd., Sep. 12, 2018. doi: 10.1186/s13223-018-0278-1.
- [11] G. P. Amarante-Mendes, S. Adjemian, L. M. Branco, L. C. Zanetti, R. Weinlich, and K. R. Bortoluci, “Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery,” *Frontiers in Immunology*, vol. 0, no. OCT, p. 2379, Oct. 2018, doi: 10.3389/FIMMU.2018.02379.
- [12] G. A. Holländer, *Immunologie : Grundlagen für Klinik und Praxis*. Elsevier, Urban & Fischer, 2006.
- [13] L. B. Nicholson, “The immune system,” *Essays in Biochemistry*, vol. 60, no. 3, pp. 275–301, Oct. 2016, doi: 10.1042/EBC20160017.
- [14] H. F. Stills, “Polyclonal Antibody Production,” in *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*, Elsevier Inc., 2012, pp. 259–274. doi: 10.1016/B978-0-12-380920-9.00011-0.
- [15] K. M. Murphy, C. Weaver, L. Seidler, and Springer-Verlag GmbH, “Janeway Immunologie,” 2018.
- [16] C. Newcombe and A. R. Newcombe, “Antibody production: Polyclonal-derived biotherapeutics,” *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, vol. 848, no. 1. pp. 2–7, Mar. 15, 2007. doi: 10.1016/j.jchromb.2006.07.004.

- [17] S. Pandey, “Hybridoma Technology for Production of monoclonal Antibodies,” *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, vol. 1, no. 2, 2010.
- [18] T. Schirrmann, T. Meyer, M. Schütte, A. Frenzel, and M. Hust, “Phage display for the generation of antibodies for proteome research, diagnostics and therapy,” *Molecules*, vol. 16, no. 1, pp. 412–426, Jan. 2011, doi: 10.3390/molecules16010412.
- [19] L. Ledsgaard, M. Kilstrup, A. Karatt-Vellatt, J. McCafferty, and A. Laustsen, “Basics of Antibody Phage Display Technology,” *Toxins*, vol. 10, no. 6, p. 236, Jun. 2018, doi: 10.3390/toxins10060236.
- [20] R. M. Lu *et al.*, “Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases,” *Journal of Biomedical Science*, vol. 27, no. 1. BioMed Central Ltd., Jan. 02, 2020. doi: 10.1186/s12929-019-0592-z.
- [21] P. Chames, M. van Regenmortel, E. Weiss, and D. Baty, “Therapeutic antibodies: Successes, limitations and hopes for the future,” *British Journal of Pharmacology*, vol. 157, no. 2. pp. 220–233, May 2009. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00190.x.
- [22] M. Suzuki, C. Kato, and A. Kato, “Therapeutic antibodies: Their mechanisms of action and the pathological findings they induce in toxicity studies,” *Journal of Toxicologic Pathology*, vol. 28, no. 3. Japanese Society of Toxicologic Pathology, pp. 133–139, Aug. 03, 2015. doi: 10.1293/tox.2015-0031.
- [23] P. J. Conroy, S. Hearty, P. Leonard, and R. J. O’Kennedy, “Antibody production, design and use for biosensor-based applications,” *Seminars in Cell and Developmental Biology*, vol. 20, no. 1. Elsevier Ltd, pp. 10–26, 2009. doi: 10.1016/j.semcdb.2009.01.010.
- [24] K. Kramer and B. Hock, “Antibodies for Biosensors,” 2004.
- [25] S. Sharma, H. Byrne, and R. J. O’Kennedy, “Antibodies and antibody-derived analytical biosensors,” *Essays in Biochemistry*, vol. 60, no. 1, pp. 9–18, Jun. 2016, doi: 10.1042/EBC20150002.
- [26] D. Jani *et al.*, “Recommendations for Use and Fit-for-Purpose Validation of Biomarker Multiplex Ligand Binding Assays in Drug Development,” *AAPS Journal*, vol. 18, no. 1, pp. 1–14, Jan. 2016, doi: 10.1208/s12248-015-9820-y.
- [27] W. Jordan, “Antigen Measurement Using ELISA,” *The Protein Protocols Handbook*, pp. 1083–1088, 2002.
- [28] J. L. Powers, K. D. Rippe, K. Imarhia, A. Swift, M. Scholten, and N. Islam, “A direct, competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as a quantitative technique for small molecules,” *Journal of Chemical Education*, vol. 89, no. 12, pp. 1587–1590, Nov. 2012, doi: 10.1021/ed2005505.
- [29] P. Hornbeck, “Enzyme-Linked Immunosorbent Assays,” *Current Protocols in Immunology*, vol. 1, no. 1, pp. 2.1.1-2.1.22, Mar. 1992, doi: 10.1002/0471142735.im0201s01.
- [30] L. J. Kricka and S. R. Master, “Validation and Quality Control of Protein Microarray-Based Analytical Methods.”
- [31] R. Govindarajan, J. Duraiyan, K. Kaliyappan, and M. Palanisamy, “Microarray and its applications,” *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, vol. 4, no. Suppl 2, p. S310, 2012, doi: 10.4103/0975-7406.100283.
- [32] D. A. Hall, J. Ptacek, and M. Snyder, “Protein microarray technology,” *Mechanisms of ageing and development*, vol. 128, no. 1, pp. 161–167, Jan. 2007, doi: 10.1016/J.MAD.2006.11.021.
- [33] K. N. Chitrala and S. Yeguvapalli, “Computational screening and molecular dynamic simulation of breast cancer associated deleterious non-synonymous single nucleotide

- polymorphisms in TP53 gene,” *PloS one*, vol. 9, no. 8, Aug. 2014, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0104242.
- [34] G. Gimenez, S. Benedé, and J. Lin, “IgE epitope mapping using peptide microarray immunoassay,” in *Methods in Molecular Biology*, vol. 1352, Humana Press Inc., 2016, pp. 251–261. doi: 10.1007/978-1-4939-3037-1_19.
- [35] H. H. Nguyen, J. Park, S. Kang, and M. Kim, “Surface plasmon resonance: A versatile technique for biosensor applications,” *Sensors (Switzerland)*, vol. 15, no. 5. MDPI AG, pp. 10481–10510, May 05, 2015. doi: 10.3390/s150510481.
- [36] A. Henseleit, S. Schmieder, T. Bley, R. Klapsing, F. Sonntag, and E. Boschke, “Oberflächenfunktionalisierung von Goldschichten zur gerichteten Immobilisierung von Biomolekülen -.”
- [37] Y. Tang, X. Zeng, and J. Liang, “Surface Plasmon Resonance: An Introduction to a Surface Spectroscopy Technique,” *Journal of chemical education*, vol. 87, no. 7, p. 742, 2010, doi: 10.1021/ED100186Y.
- [38] H. Meyer, “Surface Plasmon Resonance - Biosensoren in der Proteomanalyse und der pharmazeutischen Wirkstoffentwicklung,” *BIOspektrum Special-Heft: Proteomics & Drug Development*, pp. 532–535, 2002.
- [39] M. Le, “Just Bead It!,” 2019. <https://www.luminexcorp.com/blog/just-bead-it/> (accessed Jan. 16, 2022).
- [40] W. Stöcker and W. Schlumberger, “Luminex-Assay,” 2019, pp. 1538–1538. doi: 10.1007/978-3-662-48986-4_1980.
- [41] T. P. Taylor, M. G. Janech, E. H. Slate, C. Lewis, J. M. Arthur, and J. C. Oates, “Overcoming the effects of Matrix Interference in the Measurement of Urine protein Analytes,” *Biomarker Insights*, pp. 7–8, 2012, doi: 10.4137/BMI.S8703.
- [42] J. K. Møller, “Detection of Neisseria meningitidis in Cerebrospinal Fluid Using a Multiplex PCR and the Luminex Detection Technology,” 2012, pp. 37–53. doi: 10.1007/978-1-61779-346-2_3.
- [43] M. J. Taussig, C. Fonseca, and J. S. Trimmer, “Antibody validation: a view from the mountains,” *New Biotechnology*, vol. 45. Elsevier B.V., pp. 1–8, Oct. 25, 2018. doi: 10.1016/j.nbt.2018.08.002.
- [44] H. Sun, G. Y. J. Chen, and S. Q. Yao, “Recent Advances in Microarray Technologies for Proteomics,” *Chemistry & Biology*, vol. 20, no. 5, pp. 685–699, May 2013, doi: 10.1016/J.CHEMBIOL.2013.04.009.
- [45] S. H. Jung *et al.*, “Systematic investigation of protein kinase A substrate proteins using on-chip protein kinase kinetic profiling,” *Analyst*, vol. 142, no. 12, pp. 2239–2246, Jun. 2017, doi: 10.1039/C6AN02682F.
- [46] S. S. Taylor, J. Yang, J. Wu, N. M. Haste, E. Radzio-Andzelm, and G. Anand, “PKA: a portrait of protein kinase dynamics,” *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1697, no. 1–2, pp. 259–269, Mar. 2004, doi: 10.1016/J.BBAPAP.2003.11.029.
- [47] L. R. Pearce, D. Komander, and D. R. Alessi, “The nuts and bolts of AGC protein kinases,” *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 11, no. 1, pp. 9–22, Jan. 2010, doi: 10.1038/NRM2822.
- [48] F. Gesellchen, O. Bertinetti, and F. W. Herberg, “Analysis of posttranslational modifications exemplified using protein kinase A,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, vol. 1764, no. 12, pp. 1788–1800, Dec. 2006, doi: 10.1016/J.BBAPAP.2006.10.001.
- [49] J. F. Riemann, “Gastroenterologie : das Referenzwerk für Klinik und Praxis,” 2008.
- [50] P. I. Nedvetsky *et al.*, “cAMP-dependent protein kinase A (PKA) regulates angiogenesis by modulating tip cell behavior in a Notch-independent manner,” *Development*, vol. 143, no. 19, pp. 3582–3590, Oct. 2016, doi: 10.1242/dev.134767.

- [51] D. Moujalled *et al.*, “Cyclic-AMP-dependent protein kinase A regulates apoptosis by stabilizing the BH3-only protein Bim,” *EMBO reports*, vol. 12, no. 1, pp. 77–83, Jan. 2011, doi: 10.1038/embor.2010.190.
- [52] L. S. Kirschner, Z. Yin, G. N. Jones, and E. Mahoney, “Mouse models of altered protein kinase A signaling,” *Endocrine-related cancer*, vol. 16, no. 3, pp. 773–793, Sep. 2009, doi: 10.1677/ERC-09-0068.
- [53] A. C. Horsfall, F. C. Hay, A. J. Soltys, and M. G. Jones, “Epitope mapping,” 1991.
- [54] M. Z. Atassi, “Antigenic structures of proteins,” *European Journal of Biochemistry*, vol. 145, no. 1, pp. 1–20, Nov. 1984, doi: 10.1111/J.1432-1033.1984.TB08516.X.
- [55] U. Reineke, “Antibody Epitope Mapping Using Arrays of Synthetic Peptides.”
- [56] J. Nilvebrant and J. Rockberg, “An introduction to epitope mapping,” in *Methods in Molecular Biology*, vol. 1785, Humana Press Inc., 2018, pp. 1–10. doi: 10.1007/978-1-4939-7841-0_1.
- [57] M. H. V. van Regenmortel, “Mapping Epitope Structure and Activity: From One-Dimensional Prediction to Four-Dimensional Description of Antigenic Specificity,” *Methods*, vol. 9, no. 3, pp. 465–472, Jun. 1996, doi: 10.1006/METH.1996.0054.
- [58] B. M. Mumey, B. W. Bailey, B. Kirkpatrick, A. J. Jesaitis, T. Angel, and E. A. Dratz, “A New Method for Mapping Discontinuous Antibody Epitopes to Reveal Structural Features of Proteins,” <https://home.liebertpub.com/cmb>, vol. 10, no. 3–4, pp. 555–567, Jul. 2004, doi: 10.1089/10665270360688183.
- [59] I. Jarmoskaite, I. Alsadhan, P. P. Vaidyanathan, and D. Herschlag, “How to measure and evaluate binding affinities,” *eLife*, vol. 9, pp. 1–34, Aug. 2020, doi: 10.7554/ELIFE.57264.
- [60] Y. S. Sun *et al.*, “Effect of fluorescently labeling protein probes on kinetics of protein-ligand reactions,” *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, vol. 24, no. 23, pp. 13399–13405, Dec. 2008, doi: 10.1021/LA802097Z.
- [61] S. A. Hunter and J. R. Cochran, “Cell-Binding Assays for Determining the Affinity of Protein–Protein Interactions: Technologies and Considerations,” *Methods in enzymology*, vol. 580, p. 21, 2016, doi: 10.1016/BS.MIE.2016.05.002.
- [62] F. Orosz and J. Ovádi, “A simple method for the determination of dissociation constants by displacement ELISA,” *Journal of Immunological Methods*, vol. 270, no. 2, pp. 155–162, Dec. 2002, doi: 10.1016/S0022-1759(02)00295-8.
- [63] M. Uhlen *et al.*, “A proposal for validation of antibodies,” *Nature Methods*, vol. 13, no. 10. Nature Publishing Group, pp. 823–827, Oct. 01, 2016. doi: 10.1038/nmeth.3995.
- [64] L. Pillai-Kastoori, S. Heaton, S. D. Shiflett, A. C. Roberts, A. Solache, and A. R. Schutz-Geschwender, “Antibody validation for Western blot: By the user, for the user,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 295, no. 4, pp. 926–939, Jan. 2020, doi: 10.1074/jbc.RA119.010472.
- [65] F. Grotenhermen, “Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids,” *Clinical pharmacokinetics*, vol. 42, no. 4, pp. 327–360, 2003, doi: 10.2165/00003088-200342040-00003.
- [66] I. Ujváry and L. Hanuš, “Human Metabolites of Cannabidiol: A Review on Their Formation, Biological Activity, and Relevance in Therapy,” *Cannabis and cannabinoid research*, vol. 1, no. 1, pp. 90–101, Jan. 2016, doi: 10.1089/CAN.2015.0012.
- [67] C. J. Lucas, P. Galettis, and J. Schneider, “The pharmacokinetics and the pharmacodynamics of cannabinoids,” *British journal of clinical pharmacology*, vol. 84, no. 11, pp. 2477–2482, Nov. 2018, doi: 10.1111/BCP.13710.
- [68] M. Greenwood, “GC-FID Analysis of CBD and THC,” 2021.
- [69] S. Schumacher, “Etablierung eines parallelen immunologischen Nachweises von Drogen in Serum,” 2017.

- [70] J. Hallbach, *Klinische Chemie und Hämatologie : biomedizinische Analytik für MTLA und Studium*, 4th ed. 2019.
- [71] A. Schaffartzik, E. Hamza, J. Janda, R. Cramer, E. Marti, and C. Rhyner, “Equine insect bite hypersensitivity: What do we know?,” *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 147, no. 3–4, pp. 113–126, Jun. 2012, doi: 10.1016/J.VETIMM.2012.03.017.
- [72] E. M. Larson, S. Babasyan, and B. Wagner, “Phenotype and function of IgE-binding monocytes in equine Culicoides hypersensitivity,” *PLoS ONE*, vol. 15, no. 5, May 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0233537.
- [73] M. Pedrosa *et al.*, “Management of angioedema without urticaria in the emergency department,” *Annals of Medicine*, vol. 46, no. 8, pp. 607–618, Dec. 2014, doi: 10.3109/07853890.2014.949300.
- [74] S. Björnsdóttir, J. Sigvaldadóttir, H. Broström, B. Langvad, and Á. Sigurðsson, “Summer eczema in exported Icelandic horses: influence of environmental and genetic factors,” *Acta veterinaria Scandinavica*, vol. 48, no. 1, p. 3, Dec. 2006, doi: 10.1186/1751-0147-48-3.
- [75] B. Wagner, “IgE in horses: Occurrence in health and disease,” *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 132, no. 1, pp. 21–30, Nov. 15, 2009. doi: 10.1016/j.vetimm.2009.09.011.
- [76] H. Gehlen and M. Brunner, “In vitro-Allergietests beim Sommerekzems des Pferdes-Zusammenhang zur klinischen Ausprägung, Zuverlässigkeit in der insektenfreien Zeit und möglicher Einfluss einer parasitären Belastung,” *Pferdeheilkunde*, vol. 32, no. 4, pp. 296–305, Jul. 2016, doi: 10.21836/PEM20160401.
- [77] N. M. A. van der Meide, H. F. J. Savelkoul, C. Meulenbroeks, B. J. Ducro, and E. Tijhaar, “Evaluation of a diagnostic ELISA for insect bite hypersensitivity in horses using recombinant Obsoletus complex allergens,” *Veterinary Journal*, vol. 200, no. 1, pp. 31–37, 2014, doi: 10.1016/j.tvjl.2013.12.004.
- [78] S. Mükusch, “Identifizierung post-translatiöner Modifikationen mittels Peptid Mikroarrays,” Potsdam-Golm, 2017.
- [79] S. Angeloni, S. Das, W. de Jager, and S. Dunbar, *xMAP® Cookbook A collection of methods and protocols for developing multiplex assays with xMAP® Technology*, 5th ed. 2022.
- [80] D. A. Armbruster and T. Pry, “Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation,” *Clin Biochem Rev*, vol. 29, 2008.
- [81] European Medicines Agency, “ICH Q2 (R1) Validation of analytical procedures: text and methodology | European Medicines Agency,” 1994. <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology> (accessed Jan. 31, 2022).
- [82] M. Domina *et al.*, “Functional characterization of a monoclonal antibody epitope using a lambda phage display-deep sequencing platform,” *Scientific Reports*, vol. 6, no. 1, p. 31458, Aug. 2016, doi: 10.1038/srep31458.
- [83] R. S. Depetris *et al.*, “Functional antibody characterization via direct structural analysis and information-driven protein–protein docking,” *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, Nov. 2021, doi: 10.1002/prot.26280.
- [84] X. Wang, Z. An, W. Luo, N. Xia, and Q. Zhao, “Molecular and functional analysis of monoclonal antibodies in support of biologics development,” *Protein & Cell*, vol. 9, no. 1, pp. 74–85, Jan. 2018, doi: 10.1007/s13238-017-0447-x.
- [85] S. M. Hewitt, D. G. Baskin, C. W. Frevert, W. L. Stahl, and E. Rosa-Molinar, “Controls for Immunohistochemistry,” *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, vol. 62, no. 10, pp. 693–697, Oct. 2014, doi: 10.1369/0022155414545224.

- [86] Z. Prgomet, T. Andersson, and P. Lindberg, "Optimization, validation, and identification of two reliable antibodies for immunodetection of WNT5A," *Biotechnic & Histochemistry*, vol. 92, no. 1, pp. 46–58, Jan. 2017, doi: 10.1080/10520295.2016.1255995.
- [87] G. O'Hurley *et al.*, "Garbage in, garbage out: A critical evaluation of strategies used for validation of immunohistochemical biomarkers," *Molecular Oncology*, vol. 8, no. 4, pp. 783–798, Jun. 2014, doi: 10.1016/j.molonc.2014.03.008.
- [88] G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, and S. Sudarsanam, "The Protein Kinase Complement of the Human Genome," *Science*, vol. 298, no. 5600, pp. 1912–1934, Dec. 2002, doi: 10.1126/science.1075762.
- [89] A. Alonso *et al.*, "Protein Tyrosine Phosphatases in the Human Genome," *Cell*, vol. 117, no. 6, pp. 699–711, Jun. 2004, doi: 10.1016/j.cell.2004.05.018.
- [90] R. Roskoski, "A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors," *Pharmacological Research*, vol. 100, pp. 1–23, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.phrs.2015.07.010.
- [91] I. I. Ismailov and D. J. Benos, "Effects of phosphorylation on ion channel function," *Kidney International*, vol. 48, no. 4, pp. 1167–1179, Oct. 1995, doi: 10.1038/ki.1995.400.
- [92] M. Dorey *et al.*, "Effects of phosphorylation on the structure of the G-protein receptor rhodopsin," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1416, no. 1–2, pp. 217–224, Jan. 1999, doi: 10.1016/S0005-2736(98)00224-7.
- [93] R. Lorenz, J. Wu, F. W. Herberg, S. S. Taylor, and R. A. Engh, "Drugging the Undruggable: How Isoquinolines and PKA Initiated the Era of Designed Protein Kinase Inhibitor Therapeutics," *Biochemistry*, vol. 60, no. 46, pp. 3470–3484, Nov. 2021, doi: 10.1021/acs.biochem.1c00359.
- [94] G. Neuberger, G. Schneider, and F. Eisenhaber, "pkPS: prediction of protein kinase A phosphorylation sites with the simplified kinase-substrate binding model," *Biology Direct*, vol. 2, no. 1, p. 1, Dec. 2007, doi: 10.1186/1745-6150-2-1.
- [95] N. Amiri Dash Atan, R. Farrokhi Yekta, and M. Koushki, "Study of PKA binding sites in cAMP-signaling pathway using structural protein-protein interaction networks," *Research in Molecular Medicine*, vol. 3, no. 1, pp. 6–11, 2015, doi: 10.7508/RMM.2015.01.002.
- [96] F. D. Smith, B. K. Samelson, and J. D. Scott, "Discovery of cellular substrates for protein kinase A using a peptide array screening protocol," *Biochemical Journal*, vol. 438, no. 1, pp. 103–110, Aug. 2011, doi: 10.1042/BJ20110720.
- [97] K. Stubenrauch, U. Wessels, U. Essig, F. Kowalewsky, R. Vogel, and J. Heinrich, "Characterization of murine anti-human Fab antibodies for use in an immunoassay for generic quantification of human Fab fragments in non-human serum samples including cynomolgus monkey samples," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 72, pp. 208–215, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.jpba.2012.08.023.
- [98] J. P. Landry, Y. Fei, and X. Zhu, "Simultaneous Measurement of 10,000 Protein-Ligand Affinity Constants Using Microarray-Based Kinetic Constant Assays," *ASSAY and Drug Development Technologies*, vol. 10, no. 3, pp. 250–259, Jun. 2012, doi: 10.1089/adt.2011.0406.
- [99] J. P. Landry, Y. Ke, G.-L. Yu, and X. D. Zhu, "Measuring affinity constants of 1450 monoclonal antibodies to peptide targets with a microarray-based label-free assay platform," *Journal of Immunological Methods*, vol. 417, pp. 86–96, Feb. 2015, doi: 10.1016/j.jim.2014.12.011.

- [100] C. M. White, “A Review of Human Studies Assessing Cannabidiol’s (CBD) Therapeutic Actions and Potential,” *The Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 59, no. 7, pp. 923–934, Jul. 2019, doi: 10.1002/jcph.1387.
- [101] A. D. Hutchings and B. Widdop, “Drugs of Abuse,” in *The Immunoassay Handbook*, Elsevier, 2013, pp. 963–987. doi: 10.1016/B978-0-08-097037-0.00077-4.
- [102] M. Laloup, M. del Mar Ramirez Fernandez, M. Wood, G. de Boeck, V. Maes, and N. Samyn, “Correlation of Δ^9 -tetrahydrocannabinol concentrations determined by LC–MS–MS in oral fluid and plasma from impaired drivers and evaluation of the on-site Dräger DrugTest®,” *Forensic Science International*, vol. 161, no. 2–3, pp. 175–179, Sep. 2006, doi: 10.1016/j.forsciint.2006.03.033.
- [103] M. Pourseyed Lazarjani, S. Torres, T. Hooker, C. Fowlie, O. Young, and A. Seyfoddin, “Methods for quantification of cannabinoids: a narrative review,” *Journal of Cannabis Research*, vol. 2, no. 1, p. 35, Dec. 2020, doi: 10.1186/s42238-020-00040-2.
- [104] F. Musshoff, E. G. Hokamp, U. Bott, and B. Madea, “Performance evaluation of on-site oral fluid drug screening devices in normal police procedure in Germany,” *Forensic Science International*, vol. 238, pp. 120–124, May 2014, doi: 10.1016/j.forsciint.2014.02.005.
- [105] S. M. R. Wille, N. Samyn, M. del M. Ramírez-Fernández, and G. de Boeck, “Evaluation of on-site oral fluid screening using Drugwipe-5+®, RapidSTAT® and Drug Test 5000® for the detection of drugs of abuse in drivers,” *Forensic Science International*, vol. 198, no. 1–3, pp. 2–6, May 2010, doi: 10.1016/j.forsciint.2009.10.012.
- [106] M. H. Y. Tang *et al.*, “Evaluation of three rapid oral fluid test devices on the screening of multiple drugs of abuse including ketamine,” *Forensic Science International*, vol. 286, pp. 113–120, May 2018, doi: 10.1016/j.forsciint.2018.03.004.
- [107] D. McCartney *et al.*, “Orally administered cannabidiol does not produce false-positive tests for Δ^9 -tetrahydrocannabinol on the Securetec DrugWipe® 5S or Dräger DrugTest® 5000,” *Drug Testing and Analysis*, vol. 14, no. 1, pp. 137–143, Jan. 2022, doi: 10.1002/dta.3153.
- [108] G. M. Kroner, K. L. Johnson-Davis, K. Doyle, and G. A. McMillin, “Cannabinol (CBN) Cross-React with Two Urine Immunoassays Designed to Detect Tetrahydrocannabinol (THC) Metabolite,” *The Journal of Applied Laboratory Medicine*, vol. 5, no. 3, pp. 569–574, May 2020, doi: 10.1093/jalm/jfaa020.
- [109] A. D. Wilson, K. J. Heesom, W. J. Mawby, P. S. Mellor, and C. L. Russell, “Identification of abundant proteins and potential allergens in *Culicoides nubeculosus* salivary glands,” *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 122, no. 1–2, pp. 94–103, Mar. 2008, doi: 10.1016/j.vetimm.2007.10.011.
- [110] W. Hellberg *et al.*, “Equine insect bite hypersensitivity: Immunoblot analysis of IgE and IgG subclass responses to *Culicoides nubeculosus* salivary gland extract,” *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 113, no. 1–2, pp. 99–112, Sep. 2006, doi: 10.1016/j.vetimm.2006.04.009.
- [111] W. Hellberg, P. S. Mellor, S. Torsteinsdóttir, and E. Marti, “Insect bite hypersensitivity in the horse: Comparison of IgE-binding proteins in salivary gland extracts from *Simulium vittatum* and *Culicoides nubeculosus*,” *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 132, no. 1, pp. 62–67, Nov. 2009, doi: 10.1016/j.vetimm.2009.09.016.
- [112] A. Schaffartzik, E. Marti, R. Cramer, and C. Rhyner, “Cloning, production and characterization of antigen 5 like proteins from *Simulium vittatum* and *Culicoides nubeculosus*, the first cross-reactive allergen associated with equine insect bite

- hypersensitivity,” *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 137, no. 1–2, pp. 76–83, Sep. 2010, doi: 10.1016/j.vetimm.2010.04.012.
- [113] A. Schaffartzik, E. Marti, S. Torsteinsdottir, P. S. Mellor, R. Cramer, and C. Rhyner, “Selective cloning, characterization, and production of the *Culicoides nubeculosus* salivary gland allergen repertoire associated with equine insect bite hypersensitivity,” *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 139, no. 2–4, pp. 200–209, Feb. 2011, doi: 10.1016/j.vetimm.2010.10.015.
- [114] M. Mann and O. N. Jensen, “Proteomic analysis of post-translational modifications,” *Nature Biotechnology*, vol. 21, no. 3, pp. 255–261, Mar. 2003, doi: 10.1038/nbt0303-255.
- [115] N. Blom, T. Sicheritz-Pontén, R. Gupta, S. Gammeltoft, and S. Brunak, “Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence,” *PROTEOMICS*, vol. 4, no. 6, pp. 1633–1649, Jun. 2004, doi: 10.1002/pmic.200300771.
- [116] D. G. Knorre, N. v Kudryashova, and T. S. Godovikova, “Chemical and functional aspects of posttranslational modification of proteins,” *Acta naturae*, vol. 1, no. 3, pp. 29–51, Oct. 2009.
- [117] R. J. Najmanovich, J. W. Torrance, and J. M. Thornton, “Prediction of Protein Function from Structure: Insights from Methods for the Detection of Local Structural Similarities,” *BioTechniques*, vol. 38, no. 6, pp. 847–851, Jun. 2005, doi: 10.2144/05386TE01.
- [118] S. Ramazi and J. Zahiri, “Post-translational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods,” *Database*, vol. 2021, Apr. 2021, doi: 10.1093/database/baab012.
- [119] D.-G. Kim, Y. Choi, and H.-S. Kim, “Epitopes of Protein Binders Are Related to the Structural Flexibility of a Target Protein Surface,” *Journal of Chemical Information and Modeling*, vol. 61, no. 4, pp. 2099–2107, Apr. 2021, doi: 10.1021/acs.jcim.0c01397.
- [120] N. E. Gregorio, M. Z. Levine, and J. P. Oza, “A User’s Guide to Cell-Free Protein Synthesis,” *Methods and Protocols*, vol. 2, no. 1, p. 24, Mar. 2019, doi: 10.3390/mps2010024.
- [121] P. Braun and J. LaBaer, “High throughput protein production for functional proteomics,” *Trends in Biotechnology*, vol. 21, no. 9, pp. 383–388, Sep. 2003, doi: 10.1016/S0167-7799(03)00189-6.
- [122] A. Zemella, L. Thoring, C. Hoffmeister, and S. Kubick, “Cell-Free Protein Synthesis: Pros and Cons of Prokaryotic and Eukaryotic Systems,” *ChemBioChem*, vol. 16, no. 17, pp. 2420–2431, Nov. 2015, doi: 10.1002/cbic.201500340.
- [123] M. Stech, M. Hust, C. Schulze, S. Dübel, and S. Kubick, “Cell-free eukaryotic systems for the production, engineering, and modification of scFv antibody fragments,” *Engineering in Life Sciences*, vol. 14, no. 4, pp. 387–398, Jul. 2014, doi: 10.1002/elsc.201400036.
- [124] L. Thoring, S. K. Dondapati, M. Stech, D. A. Wüstenhagen, and S. Kubick, “High-yield production of ‘difficult-to-express’ proteins in a continuous exchange cell-free system based on CHO cell lysates,” *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, p. 11710, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-12188-8.
- [125] B. R. Jordan, “DNA Arrays for Expression Measurement: An Historical Perspective,” 2001, pp. 1–12. doi: 10.1007/978-3-642-56517-5_1.
- [126] E. M. Southern, “DNA Microarrays: History and Overview,” in *DNA Arrays*, New Jersey: Humana Press, 2001, pp. 1–15. doi: 10.1385/1-59259-234-1:1.

- [127] J. D. Hoheisel, "Microarray technology: beyond transcript profiling and genotype analysis," *Nature Reviews Genetics*, vol. 7, no. 3, pp. 200–210, Mar. 2006, doi: 10.1038/nrg1809.
- [128] S.-H. Shiu and J. O. Borevitz, "The next generation of microarray research: applications in evolutionary and ecological genomics," *Heredity*, vol. 100, no. 2, pp. 141–149, Feb. 2008, doi: 10.1038/sj.hdy.6800916.
- [129] P. Jaluria, K. Konstantopoulos, M. Betenbaugh, and J. Shiloach, "A perspective on microarrays: current applications, pitfalls, and potential uses," *Microbial Cell Factories*, vol. 6, no. 1, p. 4, Dec. 2007, doi: 10.1186/1475-2859-6-4.
- [130] H. Nguyen, J. Park, S. Kang, and M. Kim, "Surface Plasmon Resonance: A Versatile Technique for Biosensor Applications," *Sensors*, vol. 15, no. 5, pp. 10481–10510, May 2015, doi: 10.3390/s150510481.
- [131] A. Madeira, E. Vikeved, A. Nilsson, B. Sjögren, P. E. Andrén, and P. Svenningsson, "Identification of Protein-Protein Interactions by Surface Plasmon Resonance followed by Mass Spectrometry," in *Current Protocols in Protein Science*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011, pp. 19.21.1-19.21.9. doi: 10.1002/0471140864.ps1921s65.
- [132] J. Majka and C. Speck, "Analysis of protein-DNA interactions using surface plasmon resonance.," *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, vol. 104, pp. 13–36, 2007.
- [133] C.-C. Fong, W.-P. Lai, Y.-C. Leung, S. C.-L. Lo, M.-S. Wong, and M. Yang, "Study of substrate–enzyme interaction between immobilized pyridoxamine and recombinant porcine pyridoxal kinase using surface plasmon resonance biosensor," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, vol. 1596, no. 1, pp. 95–107, Apr. 2002, doi: 10.1016/S0167-4838(02)00208-X.
- [134] M. Malmqvist, "Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics," *Current Opinion in Immunology*, vol. 5, no. 2, pp. 282–286, Jan. 1993, doi: 10.1016/0952-7915(93)90019-O.
- [135] N. Reslova, V. Michna, M. Kasny, P. Mikel, and P. Kralik, "xMAP Technology: Applications in Detection of Pathogens," *Frontiers in Microbiology*, vol. 8, Jan. 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.00055.
- [136] M. J. E. Fischer, "Amine Coupling Through EDC/NHS: A Practical Approach," 2010, pp. 55–73. doi: 10.1007/978-1-60761-670-2_3.
- [137] C. Kendall, I. Ionescu-Matiu, and G. R. Dreesman, "Utilization of the biotin/avidin system to amplify the sensitivity of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)," *Journal of Immunological Methods*, vol. 56, no. 3, pp. 329–339, Jan. 1983, doi: 10.1016/S0022-1759(83)80022-2.
- [138] M. KEMP, S. HUSBY, J. C. JENSENIUS, G. G. RASMUSSEN, and S.-E. SVEHAG, "ANALYSIS OF RHEUMATOID FACTORS BY A BIOTIN-AVIDIN BASED ISOTYPE-SPECIFIC ELISA," *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Series C: Immunology*, vol. 93C, no. 1–6, pp. 217–223, Aug. 2009, doi: 10.1111/j.1699-0463.1985.tb02948.x.
- [139] A. Jain and K. Cheng, "The principles and applications of avidin-based nanoparticles in drug delivery and diagnosis," *Journal of Controlled Release*, vol. 245, pp. 27–40, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.jconrel.2016.11.016.
- [140] S. A. Dunbar, "Applications of Luminex® xMAP™ technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection," *Clinica Chimica Acta*, vol. 363, no. 1–2, pp. 71–82, Jan. 2006, doi: 10.1016/j.cccn.2005.06.023.
- [141] P. Schuck and H. Zhao, "The role of mass transport limitation and surface heterogeneity in the biophysical characterization of macromolecular binding processes

- by SPR biosensing,” *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 627, pp. 15–54, 2010, doi: 10.1007/978-1-60761-670-2_2.
- [142] E. J. Breen, W. Tan, and A. Khan, “The Statistical Value of Raw Fluorescence Signal in Luminex xMAP Based Multiplex Immunoassays,” *Scientific Reports*, vol. 6, no. 1, p. 26996, Jul. 2016, doi: 10.1038/srep26996.
- [143] K. Minta *et al.*, “Dynamics of cerebrospinal fluid levels of matrix metalloproteinases in human traumatic brain injury,” *Scientific Reports*, vol. 10, no. 1, p. 18075, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-75233-z.
- [144] J. F. Djoba Siawaya *et al.*, “An Evaluation of Commercial Fluorescent Bead-Based Luminex Cytokine Assays,” *PLoS ONE*, vol. 3, no. 7, p. e2535, Jul. 2008, doi: 10.1371/journal.pone.0002535.
- [145] S. Purohit, A. Sharma, and J.-X. She, “Luminex and Other Multiplex High Throughput Technologies for the Identification of, and Host Response to, Environmental Triggers of Type 1 Diabetes,” *BioMed Research International*, vol. 2015, pp. 1–7, 2015, doi: 10.1155/2015/326918.

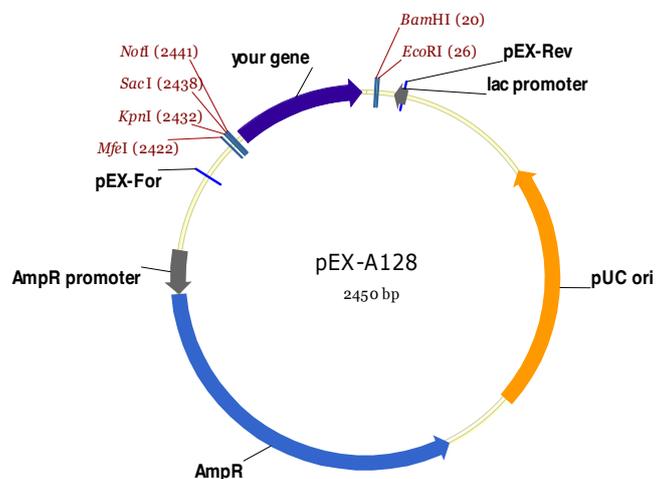
7. Anhang

Anhang 1 Pferdeseren

Nr.	Geschlecht	Rasse
SE01	weiblich	Isländer
SE02	weiblich	Isländer
SE03	weiblich	Isländer
SE04	weiblich	Isländer
SE05	männlich	Isländer
SE06	männlich	WB
SE07	weiblich	Dt. Reitpony
SE08	weiblich	Dt. Reitpony
SE09	weiblich	SWB
SE10	weiblich	Shetlandpony
SE11	weiblich	Welsh-Pony
SE12	männlich	WB
SE13	weiblich	WB
SE14	weiblich	Araber
SE15	weiblich	Araber
SE16	männlich	Araber
SE17	weiblich	Haflinger
SE18	weiblich	Isländer
SE19	weiblich	Isländer
SE20	weiblich	Shetlandpony
SE21	männlich	Dt. Reitpony
SE22	weiblich	SWB
SE23	weiblich	WB
SE24	männlich	Dt. Reitpony
SE25	weiblich	Shetlandpony
SE26	männlich	Andalusier
SE27	weiblich	WB
SE28	männlich	WB
SE29	weiblich	SWB
SE30	männlich	WB
SE31	weiblich	Welsh-Pony
SE32	weiblich	Dt. Reitpony
SE33	weiblich	SWB
SE34	weiblich	SWB
SE35	weiblich	Isländer
SE36	männlich	Isländer
SE37	weiblich	SWB
SE38	weiblich	WB
SE39	weiblich	Pony-Mix
SE40	männlich	Shetlandpony
SE41	männlich	Shetlandpony
SE42	männlich	SWB
SE43	weiblich	SWB
SE44	weiblich	Schwarzwälder Kaltblut

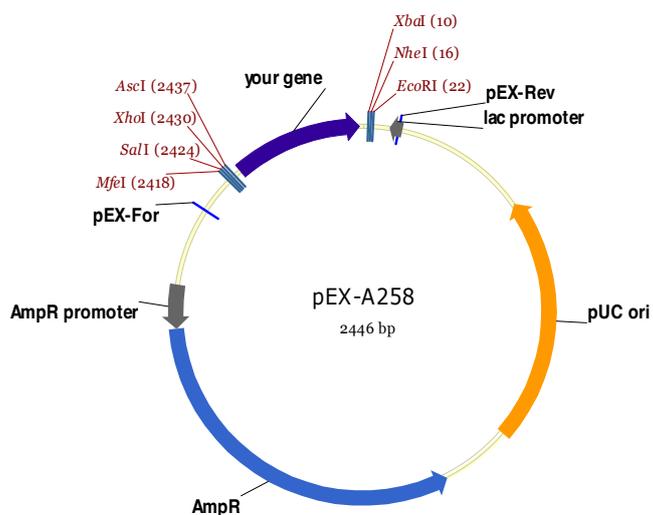
Nr.	Geschlecht	Rasse
SE45	männlich	Isländer
SE46	männlich	Isländer
SE47	weiblich	Friesenmix
SE48	weiblich	Dt. Reitpony
SE49	weiblich	Shetlandpony
SE50	männlich	Shetlandpony
SE51	männlich	Belg. Kaltblut
SE52	männlich	SWB
SE53	männlich	Tennessee Walker
SE54	männlich	SWB
SE55	weiblich	Haflinger
SE56	weiblich	Haflinger
SE57	weiblich	Haflinger
SE58	weiblich	Haflinger
SE59	weiblich	Haflinger
SE60	weiblich	Haflinger
SE61	weiblich	Welsh Partbred
SE62	weiblich	Welsh Mix
SE63	männlich	Isländer
SE64	weiblich	Isländer
SE65	weiblich	Isländer
SE66	männlich	Isländer
SE67	weiblich	Isländer
SE68	weiblich	Isländer
SE69	weiblich	Isländer
SE70	weiblich	Isländer
SE71	weiblich	Isländer
SE72	weiblich	Isländer
SE73	weiblich	Isländer
SE74	weiblich	Isländer
SE75	männlich	Isländer
SE76	männlich	Isländer
SE77	weiblich	Isländer
SE78	weiblich	Isländer
SE79	weiblich	Isländer
SE80	weiblich	Isländer
SE81	männlich	Isländer
SE82	weiblich	Isländer
SE83	weiblich	Isländer
SE84	weiblich	Isländer
SE85	männlich	Isländer
SE86	männlich	Isländer
SE87	männlich	Isländer
SE88	männlich	Isländer
SE89	weiblich	Isländer
SE90	weiblich	Isländer
SE91	männlich	Isländer

Nr.	Geschlecht	Rasse
SE92	weiblich	Isländer
SE93	weiblich	Isländer
SE94	weiblich	Isländer
SE95	männlich	Isländer
SE96	männlich	Isländer
SE97	männlich	Isländer



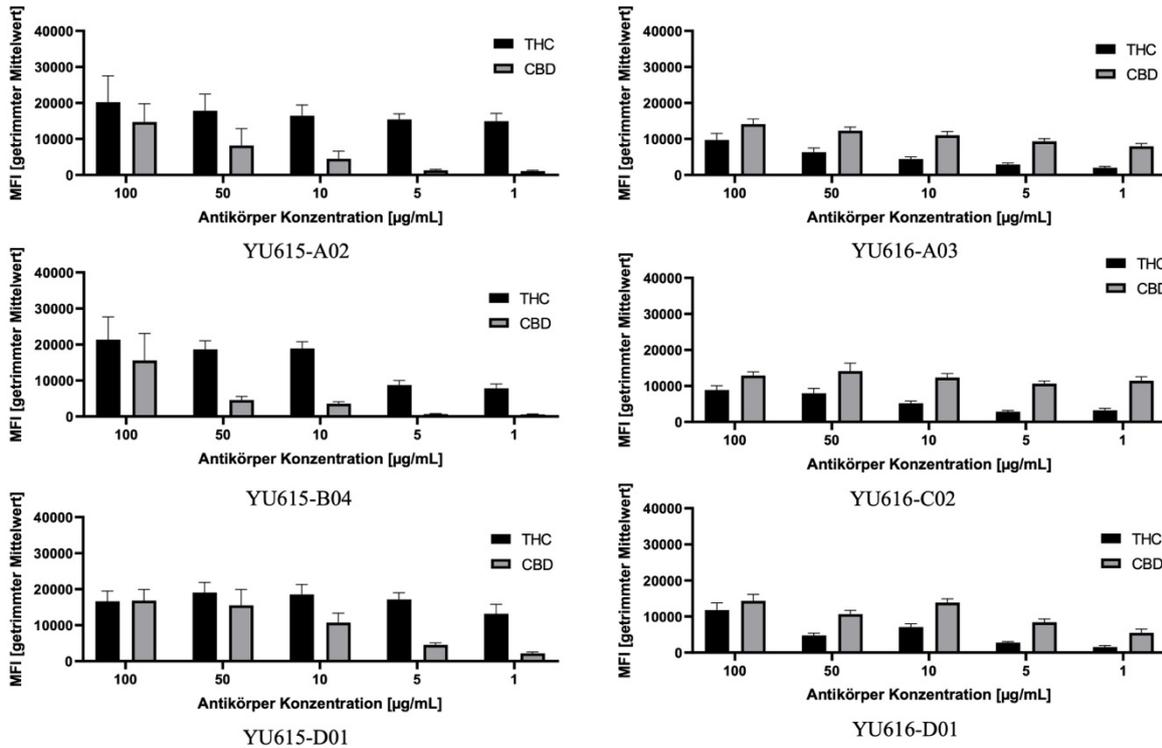
Anhang 2 Plasmidkarte (pEX-A128)

Quelle: Eurofins



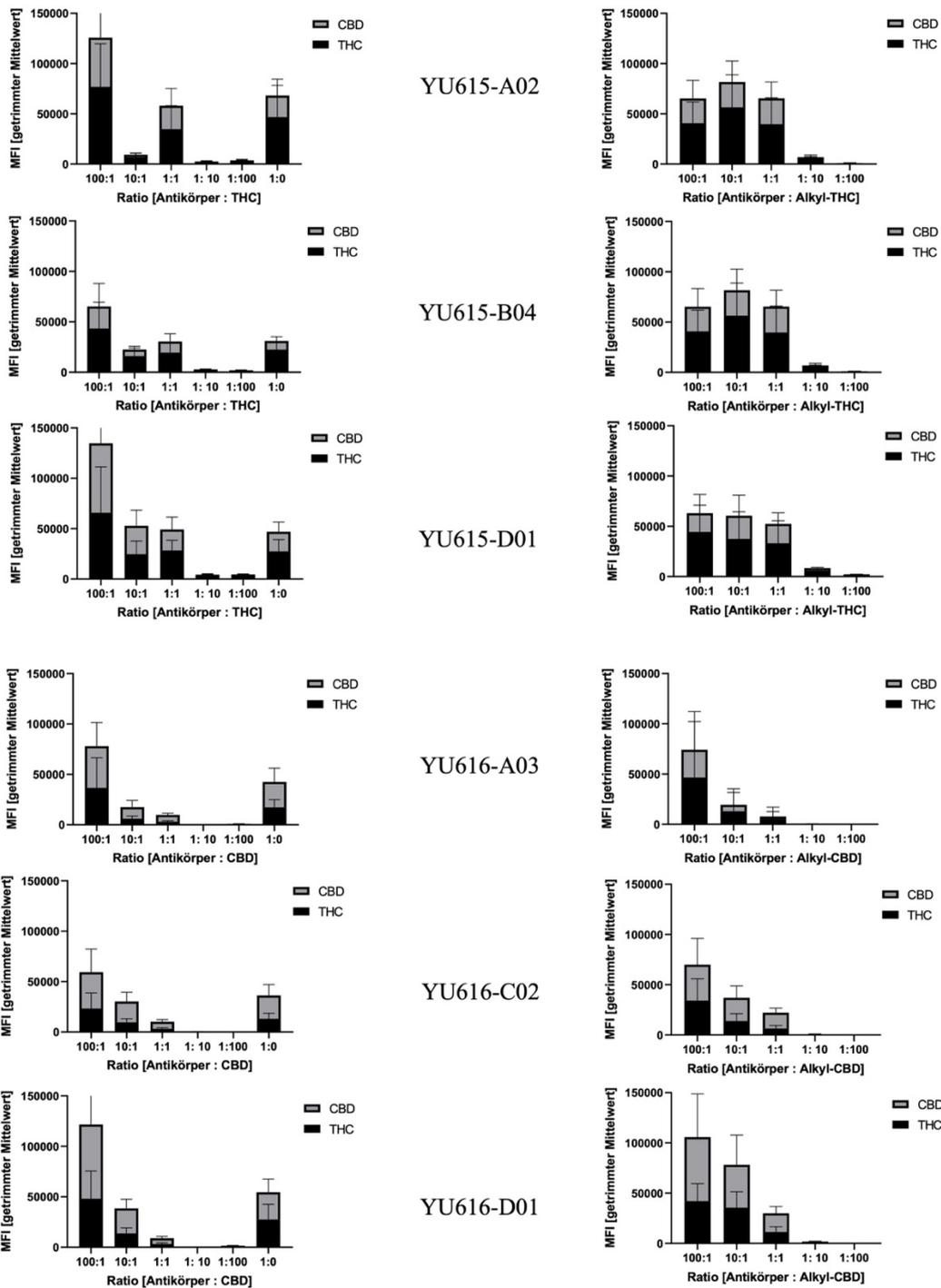
Anhang 3 Plasmidkarte (pEX-A258)

Quelle: Eurofins



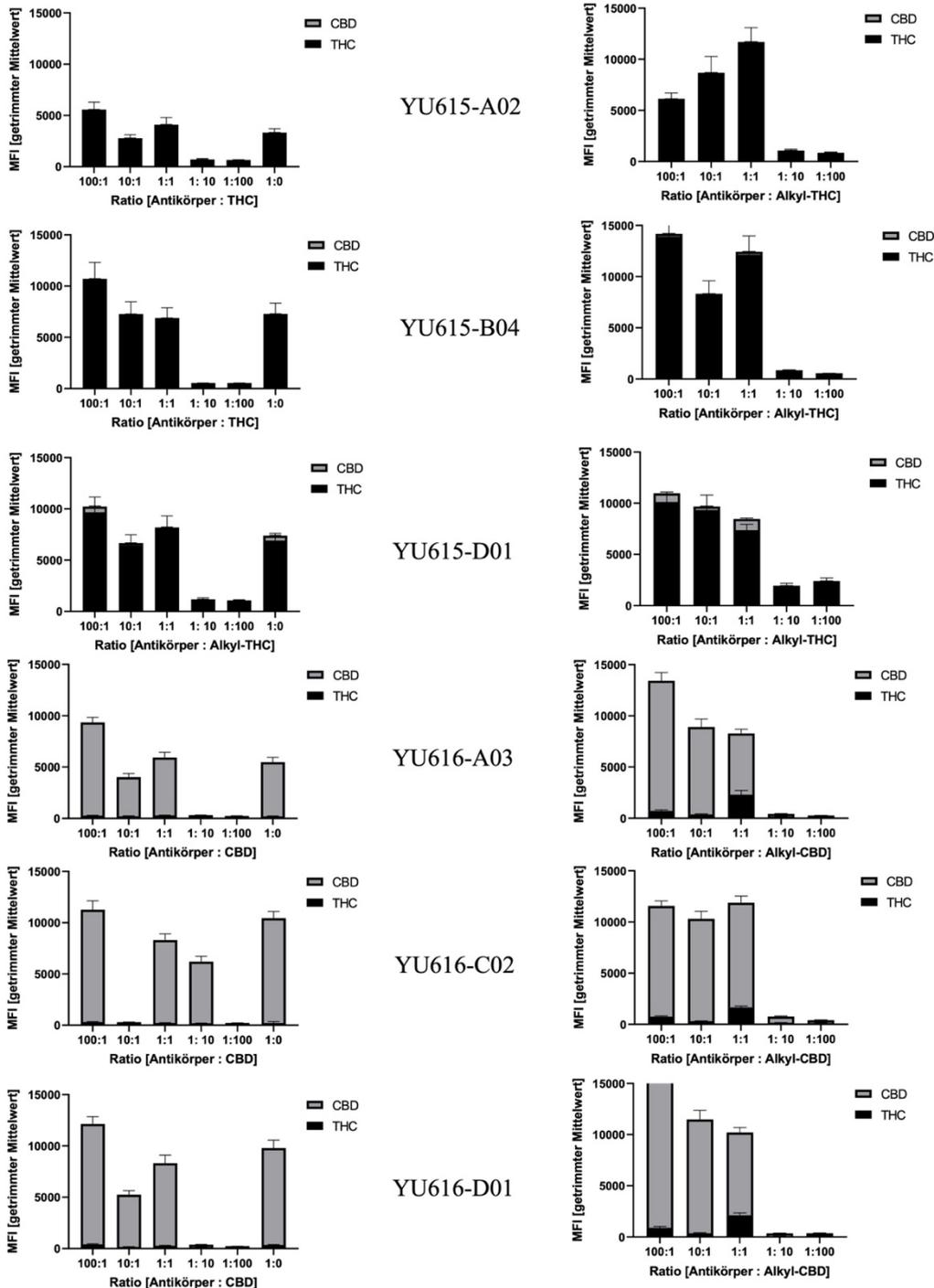
Anhang 4 Top 3 Antikörper CBDabs alle

Die Biotin-Alkyl-Konjugat-gekoppelten Beads wurden im Multiplex vermessen. Es wurde eine Verdünnungsreihe des spezifischen Antikörpers von 100 µg/mL, 50 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL und 1 µg/mL, gefolgt von 1 µg/mL goat anti-mouse RPE Antikörper verwendet. Es wurden mindestens 100 Beads pro Region vermessen. Aufgetragen wurde der getrimmte Mittelwert der mittleren Fluoreszenz Intensitäten mit Standardabweichung. Signale des THC-Konjugats sind in schwarz, Signale des CBD-Konjugats sind in grau dargestellt.



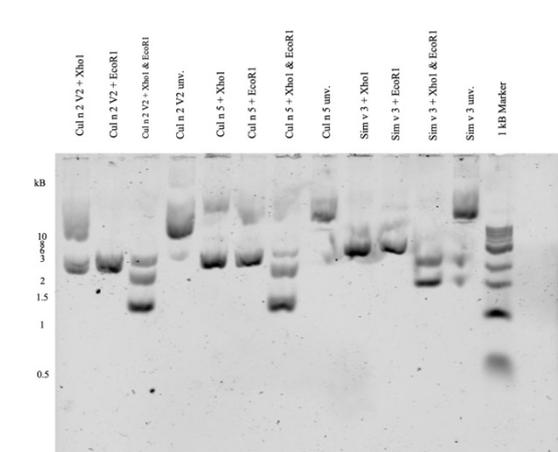
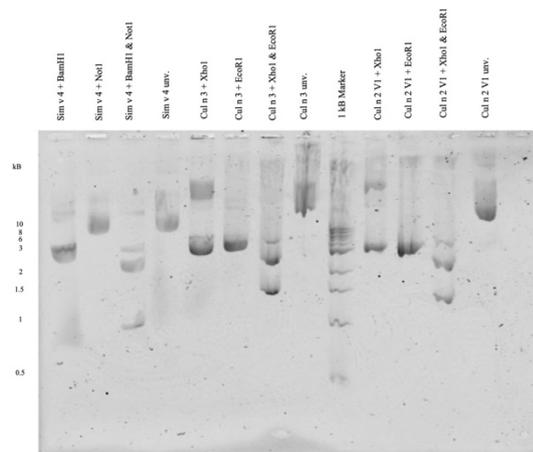
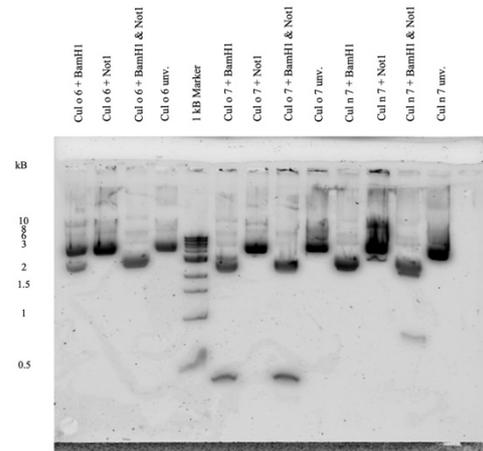
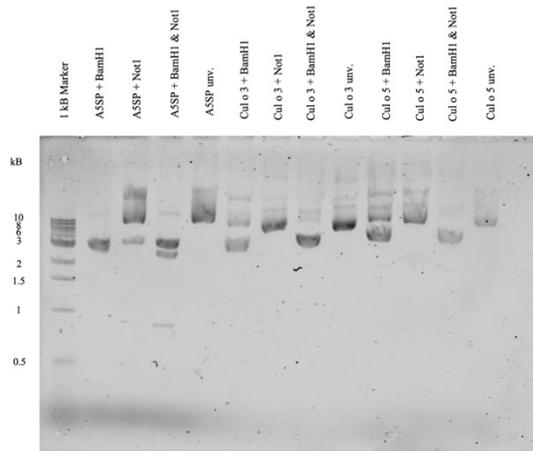
Anhang 5 Kompetitiver Ansatz alle PBST

Die Biotin-Alkyl-Konjugat-gekoppelten Beads wurden im Multiplex vermessen. Es wurde im molekularen Verhältnis Antikörper und freier Kompetitor (in Abhängigkeit der Spezifität des Antikörpers) in den Verhältnissen 100:1, 10:1, 1:1, 1:10, 1:100 und ohne Kompetitor (1:0) verdünnt in PBST hinzugegeben, gefolgt von einer Inkubation mit 1 µg/mL goat anti-mouse RPE Antikörper. Es wurden mindestens 100 Beads pro Region vermessen. Aufgetragen wurde der getrimmte Mittelwert der mittleren Fluoreszenz Intensitäten mit Standardabweichung. Signale des THC-Konjugats sind in schwarz, Signale des CBD-Konjugats sind in grau dargestellt.



Anhang 6 Kompetitiver Ansatz alle Serum

Die Biotin-Alkyl-Konjugat-gekoppelten Beads wurden im Multiplex vermessen. Es wurde im molekularen Verhältnis Antikörper und freier Kompetitor (in Abhängigkeit der Spezifität des Antikörpers) in den Verhältnissen 100:1, 10:1, 1:1, 1:10, 1:100 und ohne Kompetitor (1:0) verdünnt in humanem Leer-Serum hinzugegeben, gefolgt von einer Inkubation mit 1 µg/mL goat anti-mouse RPE Antikörper. Es wurden mindestens 100 Beads pro Region vermessen. Aufgetragen wurde der getrimmte Mittelwert der mittleren Fluoreszenz Intensitäten mit Standardabweichung. Signale des THC-Konjugats sind in schwarz, Signale des CBD-Konjugats sind in grau dargestellt.



Anhang 7 Restriktionsverdau Plasmide

Es wurde 500 ng DNA mit den angegebenen Enzymen für 90 min bei 37 °C inkubiert. Es wurden 100 ng DNA pro Spur mit 2 µL SYBR Green (1:1000) auf 10 µL aufgefüllt und in die Tasche eines 2 % Agarose-Gelelektrophorese gegeben. Die Laufzeit betrug 60 min bei 60 V. Eingesannt mittels Fluoreszenzscanner.