

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Infektiologie
Geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Alexander Schmidt

**Entwicklung verdauungsresistenter Peptidantigene
für orale Impfstoffe**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Albers, Jan Eike
aus Bobingen

2007

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-
Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Volker Arolt

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. M. Alexander Schmidt

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Andreas Frey

Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.2007

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Infektiologie

- Geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Alexander Schmidt -

Referent: Univ.-Prof. Dr. M. Alexander Schmidt

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. Andreas Frey

ZUSAMMENFASSUNG

Entwicklung verdauungsresistenter Peptidantigene für orale Impfstoffe

Albers, Jan Eike

Die Entwicklung synthetischer oraler Impfstoffe ist auch wegen der oft fehlenden Verdauungsstabilität der Antigene sehr komplex. Mit Hilfe von Peptid-Antigenen, die durch eine Überführung in die retro-inverse (RI) Form verdauungsresistent gestaltet werden, kann dieses Problem gelöst werden. Zur Induktion einer starken Immunantwort müssen RI-Peptide mit möglichst starker Antigenität gefunden werden. Am Beispiel eines Modellantigens wurden Verfahren entwickelt, um hochantigene RI-Peptide zu identifizieren und diese weiter zu optimieren.

Es wurden beispielhaft zwei Epitope aus dem Modellantigen Hühner-Ovalbumin (OVA) untersucht. Dazu wurde ein hochsensitiver Peptid-ELISA etabliert. Festphasen-synthetisierte Peptid-Homotetramere wurden an Mikrotiterplatten gebunden und ihre Reaktivität gegen polyklonale Antikörperproben von mit OVA immunisierten Mäusen getestet. Das Peptid OVA103-118 wurde via Alanin-Scan einer Feinkartierung unterzogen. Mit Hilfe eines neu entwickelten Algorithmus, der die Antikörperzugänglichkeit der Aminosäuren anhand der OVA-Kristallstruktur berechnet, wurden die Resultate der Feinkartierung analysiert. Auf Basis dieser Ergebnisse wurde ein *in silico* Evolutionsalgorithmus entwickelt, der unter Verwendung einer Molecular-Modelling Software RI-Peptidmutanten vorhersagte, deren Struktur auf die des Originalepitops im Protein hin optimiert war. Die Antikörperbindung der so optimierten RI-Peptide wurde anschließend *in vitro* getestet.

Mit dem hochsensitiven Peptid-ELISA konnte eine Menge von 10^{-18} Mol Antikörper nachgewiesen und eine Antikörperbindung für die RI-Form des Peptids OVA103-118 gezeigt werden. In der Feinkartierung wurden die zur Antikörperbindung essentiellen Aminosäuren dieses Peptids identifiziert, wobei sich eine hohe Korrelation zur berechneten Antikörperzugänglichkeit der Aminosäuren ergab ($p < 0,001$). Mit Hilfe des Evolutionsalgorithmus wurden RI-Peptidmutanten erzeugt, deren Antikörperbindung *in vitro* bis zu 30mal höher war als die des natürlichen Peptids.

Mit den hier beschriebenen Verfahren lassen sich RI-Peptidantigene für Impfstoffe entwickeln, die eine erheblich höhere Antikörperbindung aufweisen als bisherige Peptidimpfstoffe. RI-Peptide könnten sich so als attraktive Option für die Entwicklung neuer oraler Impfstoffe erweisen.

Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.2007

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	III
INHALTSVERZEICHNIS	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Mukosale Impfstoffe	1
1.2 Strategien zur mukosalen Immunisierung	2
1.3 Retro-Inverse Peptide als Impfstoffe	4
1.4 Bedeutung der B-Zell-Epitope	7
1.5 Testen von Impfstoffkandidaten mittels Epitopkartierung	8
1.6 Anforderungen an einen Immunoassay	10
1.7 Bisherige Impfstoffkandidaten	14
1.8 Möglichkeiten der Feinkartierung	16
1.9 Zielsetzung	18
2 MATERIALIEN UND METHODEN	19
2.1 Materialien und Geräte	19
2.1.1 Proteine und Antikörper	19
2.1.2 Chemikalien und Nachweissysteme	20
2.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterial	22
2.1.4 Software	23
2.2 Verwendete Serum- und Stuhlproben	23
2.3 Häufig verwendete Puffer	24

2.4	Peptidsynthese	25
2.4.1	Grundlagen	25
2.4.2	Vorbereitung der Reagenzien	27
2.4.3	Häufig verwendete Lösungen	28
2.4.4	Derivatisierung der Zellulosemembranen	28
2.4.5	Bestimmung des Derivatisierungsgrades der Membranen	30
2.4.6	Definition der Spots	31
2.4.7	Herstellung der Aminosäurelösungen	32
2.4.8	Verlängerung der Peptidketten	33
2.4.9	Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen	35
2.4.10	Abspalten der Peptide von der Zellulosemembran	35
2.5	Messung der Kopplungseffizienz	36
2.6	Immunoassays	37
2.6.1	Grundlagen	37
2.6.2	Häufig verwendete Lösungen	38
2.6.3	Optimierung des Peptid-ELISAs	39
2.6.4	Bestimmung der Nachweisgrenze	41
2.6.5	Messung der Antikörperbindung aus polyklonalen Proben	43
2.7	Berechnung der Oberflächenlage der Aminosäuren	45
2.8	Computerunterstützte Peptidoptimierung	46
2.8.1	Prinzip	46
2.8.2	Berechnung und Analyse der Peptide	48
3	ERGEBNISSE	52
3.1	Bestimmung der Kopplungseffizienz von Biocytin und PEG	52
3.2	Optimieren des Peptid-ELISAs	54
3.2.1	Maximierung der Beschichtungs-Konzentration	54
3.2.2	Bestimmung der erforderlichen Peptidmenge	56
3.3	Nachweisgrenze des ELISAs	57
3.4	Antikörperbindung der Immunisierungskandidaten	60
3.5	Alanin-Replacement des Peptids OVA 103-118	62
3.6	Oberflächenlage der Aminosäuren im Protein	66

3.7	Computerunterstützte Peptidoptimierung	69
4	DISKUSSION	74
4.1	Peptid-ELISA und Homotetramer-Peptide	74
4.2	Testen der Modellpeptide	77
4.3	Feinkartierung des Peptids OVA103-118	80
4.4	Möglichkeiten zur Peptidoptimierung	83
4.5	Ausblick	86
5	LITERATURVERZEICHNIS	88
	DANKSAGUNG	93
	LEBENS LAUF	94
	ANHANG	XI

Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren (1- und 3-Buchstabenkodierung)

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Aminosäureschutzgruppen

Acm	Acetamidomethyl
Boc	tertiär-Butoxycarbonyl
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
OPfp	Pentafluorphenylester
OtBu	tertiär-Butylester
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl

tBu	O-tertiär-Butyl
Trt	Trityl

andere Reagenzien

A. bidest	zweifach destilliertes Wasser
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
BPB	Bromphenolblau
BSA	bovines Serumalbumin
DICD	Diisopropylcarbodiimid
DMF	N,N-Dimethylformamid
D-PBS	phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (Dulbecco's phosphate buffered saline)
D-PBST	D-PBS mit Tween 20
HOBt	N-Hydroxybenzotriazol
L-PBS	phosphatgepufferte niedermolare Kochsalzlösung (Lite phosphate buffered saline)
L-PBST	L-PBS mit Tween 20
MDP	Muramyldipeptid
MeIm	1-Methylimidazol
NMP	1-Methyl-2-pyrrolidon
OVA	Ovalbumin
PEG	Polyethylenglykol
TBS	trisgepufferte Kochsalzlösung (Tris buffered saline)
TBST	TBS mit Tween 20
TEAA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
TIBS	Triisobutylsilan
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

allgemeine Abkürzungen

#	Nummer
% (v/v)	Volumenprozent

% (w/v)	Massenprozent pro Volumen
Å	Ångström (0,1 Nanometer)
Abb	Abbildung
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
Ala-Scan	Untersuchung mittels Alanin-Replacement (konsekutiver Alani- naustausch)
amol	Attomol (10^{-18} mol)
AS	Aminosäure
CT	Choleratoxin
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
fmol	Femtomol (10^{-15} mol)
HG	Hintergrund
HIV	human immunodeficiency virus
IPV	inaktivierte Polio-Vakzine
K_a	Assoziationskonstante ($=1/K_d$)
Kat-Nr	Katalog-Nummer
K_d	Dissoziationskonstante ($=1/K_a$)
KI	Konfidenzintervall
LT	hitzelabiles Enterotoxin aus Escherichia coli
M	molar
MALT	Schleimhautassoziiertes lymphatisches Gewebe (engl.: mucosa associated lymphoid tissue)
ng	Nanogramm (10^{-9} Gramm)
nmol	Nanomol (10^{-9} mol)
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
OPV	orale Polio-Vakzine
OVA	Hühner-Ovalbumin
p	Wahrscheinlichkeit
p.a.	zur Analyse (Reinheitsgrad für Reagenzien)

PDB	Proteindatenbank (Dateiformat für u.a. Kristallstrukturen von Proteinen)
pg	Pikogramm (10^{-12} Gramm)
pmol	Pikomol (10^{-12} Mol)
PSL	willkürliche Helligkeitseinheit des Lumi-Imagers
RI	retro-invers
RKI	Robert-Koch-Institut
S	Standardabweichung
STIKO	ständige Impfkommision (des Robert-Koch-Instituts)
Tab	Tabelle
VAPP	Vakzine-assoziierte paralytische Poliomyelitis
WHO	World-Health-Organisation

1 Einleitung

1.1 Mukosale Impfstoffe

Die Impfstoffentwicklung ist eine der größten Erfolgsgeschichten der modernen Medizin. Dies wird am besten deutlich durch die Tatsache, dass seit der Einführung von Impfstoffen und deren systematischer Anwendung die Morbidität und Mortalität vieler Kinderkrankheiten um 90-100% gesenkt werden konnte. Die WHO hat geschätzt, dass durch Impfungen jährlich etwa 3 Millionen Todesfälle verhindert werden (WHO, 1998). Schutzimpfungen weisen dabei eine außergewöhnlich günstige Kosten-Nutzen-Relation auf. Ein Vergleich der Kosteneffektivität von lebensrettenden Maßnahmen in den USA hat ergeben, dass die empfohlenen Impfungen im Kindesalter weniger als 1 US-Dollar pro gerettetem Leben kosten (Tengs et al., 1995). Für viele Infektionskrankheiten, wie z.B. AIDS, Hepatitis C oder Tuberkulose, existieren allerdings bis heute keine wirksamen Impfstoffe. Für diese Erreger hat sich die Impfstoffentwicklung mit den traditionellen Methoden als unerwartet schwierig erwiesen. Es wird deshalb nach neuen Ansätzen für die Immunisierung gesucht.

Eine große Bedeutung kommt möglicherweise dem Applikationsweg des Impfstoffs zu. Die Mehrzahl der heutzutage verfügbaren Impfstoffe bzw. Vakzine werden parenteral (meist intramuskulär) appliziert. Die meisten Infektionserreger dringen hingegen über die Schleimhäute in den menschlichen Körper ein. Aus Sicht eines Erregers ist das nicht verwunderlich, weil die gesamte Schleimhautoberfläche mit ca. 400 m² deutlich größer ist als die Haut (etwa 2 m²) (Neutra et al., 1992). Darüber hinaus ist das Schleimhautepithel im Gegensatz zur Haut nicht durch eine Hornschicht geschützt und damit für den Erreger direkt zugänglich.

Folglich ist der größte Teil der Immunabwehrkapazität des Menschen an den Schleimhäuten konzentriert. Schätzungen zufolge sollen sich etwa 70-80% aller Antikörper produzierenden Zellen am Darm befinden. So enthält Dünndarmgewebe pro Meter etwa 10¹⁰ Antikörper produzierende Zellen während sich in Knochenmark, Milz und Lymphknoten zusammengenommen nur $2,5 \times 10^{10}$ dieser Zellen befinden (Brandtzaeg, 1989). Die mukosalen Antikörper-produzierenden Zellen an den Mukosen sowie weitere dort befindliche immunkompetente Zellen fasst man unter dem Begriff Schleimhaut-

assoziiertes lymphatisches Gewebe (engl.: mucosa associated lymphoid tissue, MALT) zusammen.

Obwohl das MALT nur ein Arm des gesamten Immunsystems ist und auch mit dem systemischen Immunsystem intensiv kommuniziert, ist es durch parenterale Immunisierung bisher nicht gelungen, eine effiziente Antikörperproduktion des MALT zu induzieren, insbesondere dann nicht, wenn das Individuum vorher keinen Kontakt zu dem betreffenden Mikroorganismus oder Antigen hatte (Mestecky, 1987). Die mukosale Immunisierung kann dagegen sowohl eine lokale, als auch eine systemische Immunantwort hervorrufen. Während der Schutz einer parenteralen Immunisierung also erst beginnt, wenn der Erreger schon in den Körper eingedrungen ist, stellen mukosale Impfstoffe im Moment die einzige Möglichkeit dar, bereits die Infektion *per se* zu verhindern. Aus diesem Grund sind mukosale Impfstoffe eine attraktive Strategie zur Bekämpfung vieler Infektionskrankheiten.

1.2 Strategien zur mukosalen Immunisierung

Angesichts des deutlichen Vorteils der mukosalen Immunisierung überrascht es, dass die meisten Impfstoffe, die sich derzeit auf dem Markt befinden, parenteral appliziert werden. Der einzige in Deutschland eingesetzte mukosale Impfstoff, das orale Polio-Vakzin (OPV), wird seit Frühjahr 1998 nicht mehr für Standardimmunisierungen empfohlen. Statt dessen empfiehlt die ständige Impfkommission des Robert-Koch-Instituts (STIKO) einen zu injizierenden Impfstoff, die inaktivierte Polio-Vakzine (IPV). Der Grund für diese Maßnahme liegt in einem, wenn auch sehr geringen, Risiko einer Vakzine-assoziierten paralytischen Poliomyelitis (VAPP). Die Gabe von OPV wird heute nur noch als Riegelungsimpfung, d.h. nach einem Krankheitsausbruch, empfohlen (RKI, 2005; RKI, 1999).

An diesem Beispiel wird das Dilemma mukosaler Impfstoffe deutlich. Einerseits bewirkt die mukosale Applikation des Impfstoffs einen effektiveren Schutz (Swennen et al., 2001), andererseits gestaltet sich die Entwicklung mukosaler Impfstoffe deutlich komplizierter als die parenteraler. Bei den bisherigen Versuchen mukosaler Immunisierung wurden meistens attenuierte Lebendimpfstoffe verwendet (Holmgren et al., 2003), was im Fall von Polio das Problem der VAPP erst erzeugt. Es liegt auf der Hand, dass der Einsatz attenuierter Erreger zur Prävention anderer Krankheiten wie z.B. AIDS, zum

Teil noch deutlich problematischer ist. Trotzdem ist seit den frühen 1980er Jahren das Interesse an der Entwicklung mukosaler Impfstoffe kontinuierlich gestiegen, was unter anderem auf den großen technischen Fortschritt im Bereich der Biotechnologie sowie auf ein besseres Verständnis des mukosalen Immunsystems zurückzuführen ist (Cripps et al., 2001).

Die Entwicklung parenteraler Impfstoffe ist deshalb leichter, weil der Körper ein parenteral verabreichtes Antigen in jedem Fall als Fremdkörper und potentiellen Erreger auffassen kann. Sehr stark vereinfacht wäre es also ausreichend, ein bakterielles oder virales Antigen in den Muskel zu spritzen, um eine Immunantwort zu erzeugen.

Bei der mukosalen Immunisierung bildet dagegen gleich die Applikation das erste Problem, da sichergestellt werden muss, dass das applizierte Antigen (z.B. ein virales Protein) die mukosale Oberfläche überhaupt erreicht. Insbesondere bei der oralen Applikation ist ein Vakzin besonders gefährdet, da es die Magen-Darm-Passage möglichst unverändert überstehen muss. Wenn isolierte Untereinheiten von Bakterien oder Viren als Impfstoff eingesetzt werden, führt dies aber häufig zu Problemen, weil sie schnell von den Verdauungsenzymen im Darm abgebaut werden. Deshalb ist die Wahl eines geeigneten Transportsystems für das Antigen von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung mukosaler Impfstoffe.

Darüber hinaus muss das verabreichte Antigen vom Körper als potentieller Erreger eingestuft werden. Das ist nicht selbstverständlich, weil viele Antigene wie z.B. Nahrungsmittelproteine oder Bakterien der Normalflora vom MALT geduldet werden. Das bedeutet, dass nicht jedes Antigen eine Immunantwort erzeugt. Es ist sogar möglich durch mukosale Applikation eines Antigens eine systemische Toleranz zu erzeugen. Dieses Phänomen wird häufig auch als „orale Toleranz“ bezeichnet (Faria et al., 2005). Dies eröffnet zwar eine völlig neue Perspektive für die Behandlung von Autoimmunerkrankheiten und Hypersensibilitätsreaktionen, auf der anderen Seite muss das Tolerisierungsrisiko berücksichtigt und eine Toleranzreaktion bei der Entwicklung von Impfstoffen auf jeden Fall ausgeschlossen werden.

Schließlich muss eine geeignete Route für die Applikation des Impfstoffs ausgewählt werden. Zwar ist der induzierte mukosale Immunschutz in der Regel in der Umgebung seines Induktionsortes am stärksten, eine Schutzwirkung wird aber auch an entfernten Schleimhautoberflächen beobachtet, die nicht mit dem Vakzin in Kontakt gekommen

sein können. Der Grund für dieses „Ausstrahlen“ in andere Effektorregionen ist darin begründet, dass die Lymphozyten, nachdem sie im entsprechenden MALT aktiviert wurden, zunächst in die Blutbahn und erst von dort in verschiedene teilweise vom Induktionsort weit entfernte Effektorregionen auswandern. Dieser Prozess wird auch als „homing“ bezeichnet. Obwohl es hierdurch zu einer starken Vernetzung des mukosalen Immunsystems kommt, gibt es deutliche Unterschiede in der Stärke der Immunantwort an verschiedenen Effektororganen. So konnte z.B. durch eine nasale Immunisierung eine Immunantwort im Respirationstrakt sowie im Genitaltrakt ausgelöst werden. Andererseits ist die orale Immunisierung bei der Induktion einer Antwort im Darm deutlich überlegen (Holmgren et al., 2005). Die Auswahl der geeigneten Applikationsroute für den Impfstoff ist also vom Infektionsweg des entsprechenden Krankheitserregers abhängig.

Es gibt unterschiedliche Ansätze für die Entwicklung mukosaler Impfstoffe, die unterschiedliche Vorzüge und Probleme aufweisen. So stellen Lebendvektorsysteme eine interessante Möglichkeit zur Antigenapplikation dar. Dabei handelt es sich um vermehrungsfähige Bakterien oder Viren, die durch gentechnische Verfahren so verändert werden, dass sie das Antigen, gegen das eine Immunantwort erwünscht ist, exprimieren. Als Träger kommen z.B. attenuierte Salmonellen, Polioviren oder Yersinien in Frage. Der Vorteil dieses Systems besteht darin, dass der Vektor, weil er von Natur aus die Schleimhaut kolonisiert bzw. infiltriert, eine effektive Immunantwort auslöst (Curtiss, 1990). Grundsätzliches Problem von Lebendvektorsystemen ist allerdings bisher noch das Auftreten von Rückmutationen bzw. der unkontrollierter Vermehrung.

Demgegenüber bieten synthetische Impfstoffe z.B. auf Protein- oder Peptidbasis zwar den Vorteil einer kontrollierten und damit sicheren Antigenpräsentation. Andererseits werden gerade Proteine und Peptide sehr schnell von Verdauungsenzymen abgebaut und erreichen deshalb, besonders nach oraler Gabe, nicht in ausreichender Konzentration den Induktionsort für die Immunantwort. Eine viel versprechende Alternative liegt deshalb in der Antigenpräsentation in Form von so genannten retro-inversen Peptiden.

1.3 Retro-Inverse Peptide als Impfstoffe

Ein retro-inverses (RI) Peptid ist ein Peptid, das im Gegensatz zu natürlichen Peptiden aus α -D-Aminosäuren besteht, dabei aber trotzdem die Struktur eines natürlichen Pep-

tids oder den entsprechenden Abschnitt eines Proteins möglichst gut nachahmen soll. Unter Umständen kann so auch ein B-Zell-Epitop, d.h. eine Antikörperbindungsstelle, eines Proteins durch ein RI-Peptid imitiert werden. Zu einem natürlichen Peptid wird ein retro-inverses Analogon gebildet, indem erstens die Aminosäurereihenfolge des Peptids umgekehrt wird, und zweitens die α -L-Aminosäuren des natürlichen Peptids durch ihre jeweiligen α -D-Enantiomere ersetzt werden (daher die Bezeichnung „retro-invers“). Die Grundidee besteht darin, dass Peptide aus α -D-Aminosäuren von den meisten Proteasen bzw. Peptidasen nicht oder kaum abgebaut werden (Guichard et al., 1994). RI-Peptide sind deshalb im Körper und insbesondere im Verdauungstrakt deutlich länger stabil.

Die strukturelle Ähnlichkeit von natürlichem und retro-inversem Peptid wird in Abbildung 1.1 deutlich, indem ein Dipeptid mit den beiden Seitenketten R_1 und R_2 in der natürlichen, der „retro“, der inversen sowie in der retro-inversen Form dargestellt ist. Die Richtung der Peptidbindung und die Positionen der Endgruppen beim RI-Analogon sind im Vergleich zur natürlichen Form umgedreht, die Ausrichtung der Seitenketten entspricht dagegen annähernd der natürlichen Form (Chorev et al., 1979). Gerade die Positionen der Seitenkettenatome sollten aber für die Spezifität eines Antigens eine größere Rolle spielen als die Atome des Rückgrats. Die Frage, wie gut sich ein Epitop auf einem Protein durch ein RI-Peptid imitieren lässt, ist dabei von verschiedenen Faktoren abhängig und keineswegs trivial.

Erstens spielt die Sekundär- bzw. Tertiärstruktur des entsprechenden Proteins eine gewisse Rolle. Abgesehen davon, dass ein Epitop vermutlich eher oberflächlich gelegen sein muss, ist das Rückgrat des Proteins manchmal mehr und manchmal weniger durch die Seitenkettenatome verdeckt. Die Atome des Rückgrats sind deshalb, abhängig von der Proteinstruktur, für die Spezifität eines Epitops mehr oder weniger wichtig. Zweitens wird die Aminosäuresequenz des Peptids selbst von gewisser Bedeutung sein. So bewirken manche Aminosäuren eine Änderung der Sekundärstruktur. Tritt z.B. Prolin in einer Sequenz auf, kann sich die räumliche Anordnung der nachfolgenden Aminosäuren ändern. Die Umkehrung der Aminosäuresequenz kann daher unter Umständen die Struktur des Peptids stark beeinflussen. Drittens ist es möglich, dass sich bestimmte Aminosäuresequenzen in Peptidform grundsätzlich anders falten, als sie es tun würden,

wenn sie innerhalb eines Proteins vorkommen. Solche Peptide wären dann für die Nachahmung eines Epitops unbrauchbar.

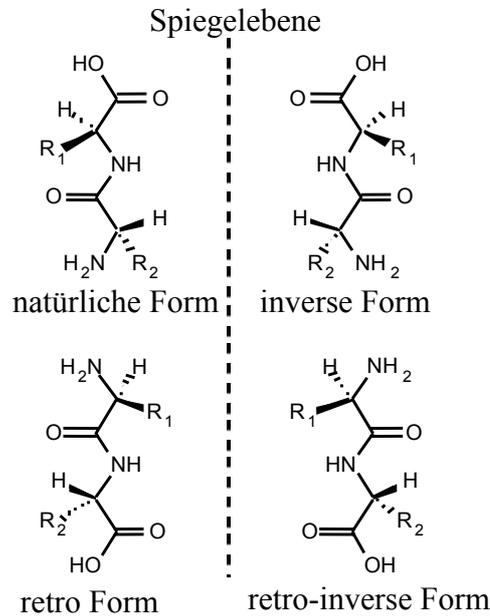


Abb. 1.1: Darstellung eines Dipeptids in normaler und inverser Form wie in normaler und umgekehrter Reihenfolge

Es wurde gezeigt, dass bestimmte RI-Peptide die immunologischen Eigenschaften ihrer natürlichen Analoga imitieren und eine lang anhaltende Immunantwort erzeugen können (Guichard et al., 1994). Darüber hinaus ist es bei Mäusen gelungen, durch die nasale Applikation eines RI-Peptids zusammen mit Choleratoxin eine protektive Immunantwort gegen Influenza zu erzeugen (Ben-Yedidia et al., 2002). Auch wenn bei der intranasalen Route die Immunantwort nach Gabe des natürlichen Peptids ähnlich stark war, wie nach Gabe des RI-Analogons, zeigt dies doch, dass Impfungen mit RI-Peptiden prinzipiell möglich sind und einen viel versprechenden Ansatz für die Entwicklung oraler Impfstoffe darstellen.

Trotzdem ist die Frage, unter welchen Bedingungen sich ein RI-Peptid als mukosales Vakzin eignet, nicht befriedigend beantwortet. Da es sowohl ethisch problematisch als auch sehr aufwendig wäre, eine große Anzahl von Peptiden in Immunisierungsstudien parallel zu testen, wäre ein Verfahren wünschenswert, mit dem zu einem gegebenen Antigen eines beliebigen Erregers ein oder zumindest wenige Impfstoffkandidaten vorgeschlagen werden könnten. Solch ein Verfahren sollte im Optimalfall bei möglichst

geringem Aufwand eine möglichst hohe Anzahl von schlechten Peptiden ausschließen, ohne dabei gute Impfstoffkandidaten zu eliminieren. Weil für die Auswahl geeigneter Kandidaten zum Teil teure Laborversuche notwendig sind, wäre es zudem wünschenswert, wenn bereits durch theoretische Vorüberlegungen die Menge der möglichen Peptide eingegrenzt werden könnte.

1.4 Bedeutung der B-Zell-Epitope

Grundsätzliches Ziel jedes Impfstoffs ist es, eine protektive Immunantwort gegen einen Krankheitserreger auszulösen, d.h., es soll eine spezifische Immunantwort gegen Oberflächenmoleküle des Erregers erzeugt werden.

Das spezifische mukosale Immunsystem besteht, wie die gesamte Abwehr aus einer humoralen, d.h., antikörpervermittelten und einer zellvermittelten Komponente. Der humoralen Abwehr kommt an den Schleimhäuten eine große Bedeutung zu. Die Antikörper (meist sekretorische IgA-Antikörper) werden von den Schleimhäuten sezerniert und sind dadurch in der Lage bereits im Lumen der Schleimhautorgane pathogene Keime zu binden. Dies ist der einzige Weg wie Krankheitserreger vor dem Eindringen in den Organismus spezifisch angegriffen werden können. Ein guter mukosaler Impfstoff sollte also in der Lage sein, eine effektive Antikörperbildung zu erzeugen.

Die Teile bzw. Moleküle eines Erregers, gegen die eine spezifische Antwort gerichtet ist, nennt man Antigene. Die Stellen auf dem Antigen, an denen die Immunantwort auf molekularer Ebene ansetzt, heißen Epitope. Bei Antigenen handelt es sich häufig um Proteine des Erregers. Die Epitope sind dann z.B. relativ kleine Abschnitte dieser Proteine. Da die Antikörper im menschlichen Körper von B-Lymphozyten gebildet werden, heißen die Ansatzpunkte für Antikörper an Antigenen entsprechend „B-Zell-Epitope“. Da die zelluläre Komponente des Immunsystems in der Regel von T-Lymphozyten vermittelt wird, heißen die entsprechenden Epitope „T-Zell-Epitope“. Auch den T-Zellen kommt bei der Antikörperproduktion eine Bedeutung zu, weil die Immunantwort durch so genannte T-Helferzellen ausgelöst, bzw. verstärkt wird. Für die Generierung einer effektiven Antikörperantwort sollte ein Impfstoff also sowohl mindestens ein B-Zell-Epitop als auch ein T-Zell-Epitop tragen. Es ist natürlich zwingend erforderlich, dass das B-Zell-Epitop des Impfstoffs eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zur Zielstruktur auf dem Originalerreger aufweist, da andernfalls die Antikörper nicht oder nur unzu-

reichend an den Erreger binden würden. Andererseits ist es nicht unbedingt notwendig, dass das T-Zell-Epitop Ähnlichkeit mit einem Teil des Erregers besitzt, da die T-Zellen nur die Antikörperproduktion aktivieren aber beim Neutralisieren eines Erregers durch einen Antikörper nicht direkt beteiligt sind.

Darüber hinaus enthalten Impfstoffe oft sog. Adjuvantien. Es handelt sich dabei um Substanzen, die in der Lage sind, den biologisch ältesten Teil unserer Immunabwehr, das angeborene Immunsystem zu stimulieren. Vielfach spielen dabei sog. Mustererkennungsrezeptoren eine Rolle, die durch gemeinsame Eigenschaften ganzer Erregerklassen stimuliert werden und so dem Körper mitteilen, dass es sich bei einem Antigen nicht nur um einen Fremdkörper, sondern um einen gefährlichen Fremdkörper handelt, gegen den es sich lohnt eine Immunantwort zu bilden. Als Adjuvantien für mukosale Immunisierungen werden häufig bakterielle Toxine, z.B. Cholera-toxin, Enterotoxin oder Pertussis-Toxin verwendet (Holmgren et al., 2003). Es ist ein großer Vorteil von Peptidimpfstoffen, dass sie sich verhältnismäßig leicht an Adjuvantien koppeln lassen. Auf diese Weise ist es möglich, beim Design eines Impfstoffes die Wahl eines geeigneten Adjuvans von der eigentlichen Präsentation eines Antigens zu trennen.

1.5 Testen von Impfstoffkandidaten mittels Epitopkartierung

Antigene sind, wie schon beschrieben häufig Proteine. Hierbei handelt es sich um Aminosäureketten mit einer Länge von einigen Hundert Aminosäuren. Die Proteine sind in der Regel immer so gefaltet, dass die Aminosäurekette eine Art Knäuel bildet. Aufgrund der spezifischen Faltung des Proteins liegen also bestimmte Aminosäuren eher an der Oberfläche, während andere Aminosäuren im Innern des „Knäuels“ verborgen bleiben.

Aufgrund seiner Größe verfügt ein Protein in der Regel über eine Vielzahl von Antikörperbindungsstellen. Die Idee eines Peptidimpfstoffes besteht nun darin, dass auch eine kurze Aminosäuresequenz ausreichen sollte, um ein Epitop zu imitieren. Hierzu müssen zwei Voraussetzungen erfüllt sein: erstens muss die Aminosäuresequenz im Protein im Bereich einer potentiellen Antikörperbindungsstelle liegen und zweitens muss das Peptid, dass die Aminosäuresequenz enthält, in etwa die gleiche 3D-Struktur haben wie die entsprechende Aminosäuresequenz innerhalb des Proteins.

Peptide, die in der Lage sind ein Epitop zu imitieren, haben in der Regel eine Länge von etwa 4 bis 20, häufig aber unter 12 Aminosäuren (Jin et al., 1992). Um die Peptide zu finden, die sich zur Imitierung eines Epitops eignen, wird eine Epitopkartierung durchgeführt. Dazu werden zunächst Versuchstiere mit dem Originalprotein immunisiert, anschließend werden den Versuchstieren Blut-, Stuhl oder Speichelproben entnommen, die nun Antikörper gegen das Protein enthalten. Weil diese Proben Antikörpergemische gegen verschiedene Epitope des Proteins enthalten, d.h., die Antikörper auch von verschiedenen B-Zell-Klonen abstammen, spricht man von polyklonalen Antikörperproben.

Im nächsten Schritt werden viele Peptide synthetisiert, die jeweils einen kurzen Abschnitt des Originalproteins enthalten. Für jedes Peptid wird dann getestet, ob es in der Lage ist, Antikörper aus der polyklonalen Probe zu binden. Ist dies der Fall, muss die entsprechende Aminosäuresequenz einem Epitop oder einem Teil eines Epitops des betreffenden Proteins entsprechen. Der Aufbau einer Epitopkartierung ist am Beispiel von Ovalbumin in Tabelle 1.1 dargestellt.

Tab. 1.1: Darstellung der ersten 10 Peptide für die Epitopkartierung von Ovalbumin

Ovalbumin-Sequenz	G	S	I	G	A	A	S	M	E	F	C	F	D	V	F	K	E	L	K	V	H	H	A	N	E	N	I	F	Y	C	P	I	A	I	...				
Peptid #1	G	S	I	G	A	A	S	M	E	F	C	F	D	V	F	K																							
Peptid #2			I	G	A	A	S	M	E	F	C	F	D	V	F	K	E	L																					
Peptid #3					A	A	S	M	E	F	C	F	D	V	F	K	E	L	K	V																			
Peptid #4							S	M	E	F	C	F	D	V	F	K	E	L	K	V	H	H																	
Peptid #5									E	F	C	F	D	V	F	K	E	L	K	V	H	H	A	N															
Peptid #6											C	F	D	V	F	K	E	L	K	V	H	H	A	N	E	N													
Peptid #7													D	V	F	K	E	L	K	V	H	H	A	N	E	N	I	F											
Peptid #8																F	K	E	L	K	V	H	H	A	N	E	N	I	F	Y	C								
Peptid #9																		E	L	K	V	H	H	A	N	E	N	I	F	Y	C	P	I						
Peptid #10																				K	V	H	H	A	N	E	N	I	F	Y	C	P	I	A	I				
u.s.w.																																							

Die Aminosäuren wurden im Einbuchstaben-Code notiert. In der ersten Zeile ist der Anfang der Sequenz des kompletten Proteins aufgetragen (die Gesamtlänge beträgt 385 Aminosäuren). In den weiteren Zeilen sind die ersten 10 Peptidfragmente dargestellt, wobei jedes Peptid 16 Aminosäuren lang ist, und das jeweils nächste Peptid immer zwei Aminosäuren später als das vorherige beginnt. Aus der Gesamtlänge von 385 Aminosäuren ergibt sich, dass insgesamt 186 Peptide im Zweivorschub synthetisiert werden müssen, um die ganze Sequenz von Ovalbumin abzudecken.

Ist ein Peptid in der Lage Antikörper aus der Probe zu binden, imitiert es offenbar die Struktur eines Epitops. Theoretisch sollte ein solches Peptid auch umgekehrt in der Lage sein, als Impfstoff eine Immunantwort gegen das Originalprotein auszulösen. Ziel der Epitopkartierung ist es, diejenigen Peptide herauszufiltern, die bei besonders vielen Mäusen eine möglichst starke Immunantwort erzeugen.

1.6 Anforderungen an einen Immunoassay

Um Peptide auf die Fähigkeit zur Antikörperbindung zu testen, ist das Design eines leistungsfähigen Peptid-Immunoassays erforderlich. Ein solcher Assay sollte im Optimalfall mehrere Eigenschaften vereinen.

1. Der Assay sollte eine hohe Sensitivität besitzen, d.h., er sollte in der Lage sein, möglichst jede Antikörperreaktion gegen ein Peptid nachzuweisen.
2. Der Assay sollte eine möglichst hohe Spezifität besitzen. Er sollte also möglichst keine falsch positiven Resultate erbringen. Hierzu ist insbesondere ein möglichst konstant niedriges Fehlersignal wichtig.
3. Der Assay sollte in der Lage sein, zwischen Peptiden mit geringer und hoher Affinität der Peptid-Antikörperbindung zu differenzieren, weil sich eine hohe strukturelle Ähnlichkeit des Peptids mit dem Originalepitop auch in einer hohen Antikörperaffinität niederschlägt. Zudem ist es von Interesse zu wissen, in welchem Maße sich die Affinität durch den Einsatz retro-inverser Peptide ändert.
4. Der Assay sollte nicht zu aufwendig sein, damit möglichst viele Peptide getestet werden können.

Es versteht sich beinahe von selbst, dass ein Assay nicht alle Eigenschaften in sich vereinen kann. Das liegt zum einen daran, dass ein Assay um so mehr an Sensitivität einbüßt, je spezifischer er wird. Zum anderen müssen, wenn zwischen Peptiden mit geringer und hoher Affinität differenziert werden soll, Peptide mit geringer Affinität ein kleines bzw. gar kein Signal mehr liefern. Dies wirkt sich wiederum negativ auf die Sensitivität des Assays aus.

Somit stellt sich die Frage, wie hoch die Affinität eines Peptids sein muss, damit man es zumindest theoretisch als positiv definieren würde. Auf der einen Seite würde man gerne alle Peptide messen können, die überhaupt in der Lage sind, Antikörper binden zu können. Auf der anderen Seite ist die Antikörperbindung bei sehr niedriger Affinität so

schwach, dass man nur noch bedingt von spezifischer Bindung sprechen kann. Weiterhin kann ein Assay, der auch eine Antikörperbindung mit niedriger Affinität nachweisen kann, in der Regel nicht mehr zwischen Peptiden mit mittlerer und sehr hoher Affinität unterscheiden.

Für die Frage, welchen Einfluss Affinität und Antikörpermenge auf das Messergebnis haben, ist die Menge an eingesetztem Peptid entscheidend. Das liegt daran, dass sich die Peptid-Antikörper-Reaktion (oder allgemein jede Antigen-Antikörperreaktion) mit dem Massenwirkungsgesetz beschreiben lässt (Steward, 1986):

$$K_d = \frac{[Ag] \times [Ak]}{[AgAk]}$$

wobei K_d die Dissoziationskonstante (gleich dem Kehrwert der Affinitätskonstante K_a), $[Ag]$ die Konzentration an freiem Antigen, $[Ak]$ die Konzentration ungebundener Antikörper und $[AgAk]$ die Konzentration von Antigen-Antikörperkomplexen ist. Wenn die Antigenkonzentration die Antikörperkonzentration deutlich übersteigt, lässt die Menge der gebundenen Antikörper (bzw. der Antigen-Antikörperkomplexe) herleiten:

$$[AgAk] \approx [Ak_{Ges}] \times \frac{[Ag]/K_d}{1 + [Ag]/K_d}$$

wobei $[Ak_{Ges}]$ die Menge aller Antikörper (gebundenen und ungebundenen) ist. Wahlweise kann man auch nach dem Anteil der gebundenen Antikörper herleiten:

$$\alpha = \frac{[AgAk]}{[Ak_{Ges}]} \approx \frac{[Ag]/K_d}{1 + [Ag]/K_d}$$

Es zeigt sich, dass die Menge gebundener Antikörper einerseits von der Antikörperkonzentration abhängt. Andererseits wird der Anteil der gebundenen Antikörper von dem Verhältnis von Peptidkonzentration und der Dissoziationskonstante beeinflusst. Der Zusammenhang zwischen der Peptidmenge relativ zur Dissoziationskonstante und dem Anteil gebundener Antikörper ist in Abbildung 1.2. dargestellt.

Von schlecht bindenden Antikörpern mit hoher Dissoziationskonstante (d.h., wenn die Dissoziationskonstante mehr als 100mal so groß wie die Peptidkonzentration ist) wird nur ein verschwinden geringer Anteil der Antikörper gebunden. Solche Antikörper lassen sich im Immunoassay nur schwer nachweisen.

Ist die Peptidkonzentration dagegen deutlich höher als die Dissoziationskonstante, werden nahezu alle Antikörper gebunden. Das Ergebnis hängt fast ausschließlich von der

Antikörperkonzentration ab. Die Antikörperaffinitäten spielen nur noch eine untergeordnete Rolle.

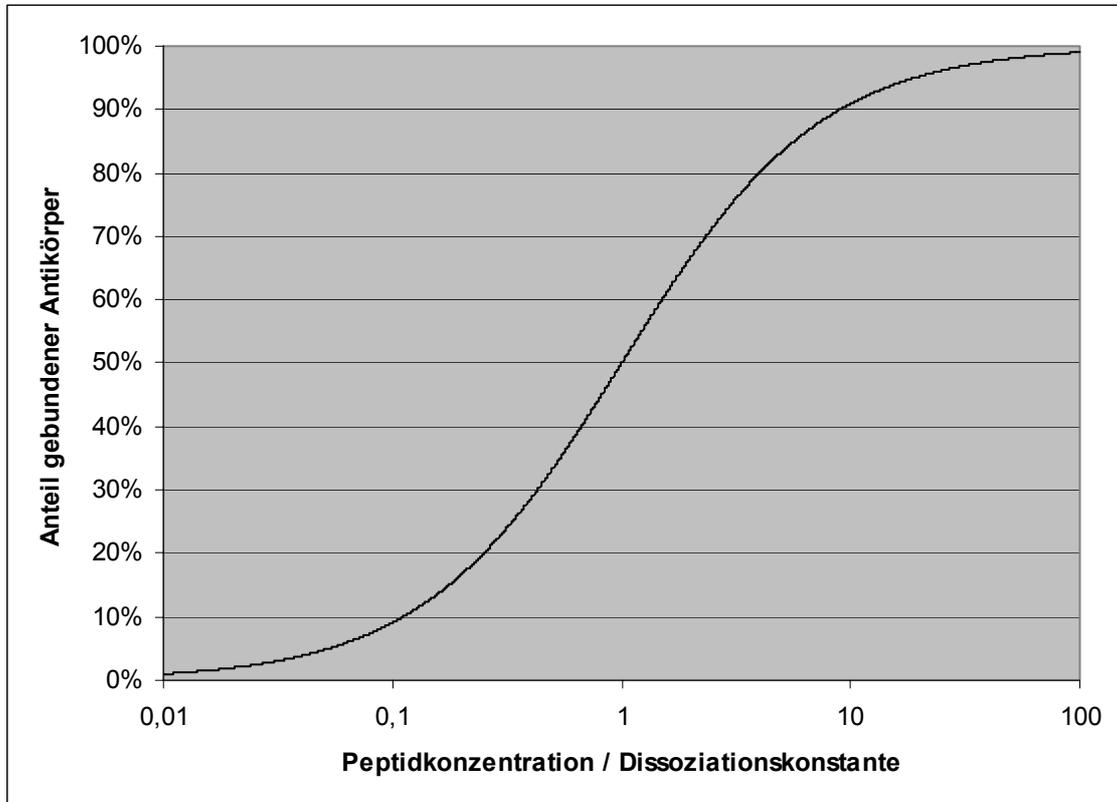


Abb. 1.2: Zusammenhang zwischen Peptidkonzentration und Anteil gebundener Antikörper

Wenn man die Dissoziationskonstante K_d messen möchte, ist es notwendig, sich den mathematischen Zusammenhang zwischen K_d und dem gemessenen Signal im Immunoassay klarzumachen. Es stellt sich also die Frage, um welchen Faktor das Signal steigt, wenn K_d um den Faktor x sinkt. Da sich das Signal in einem Immunoassay in der Regel proportional zur Menge der gebundenen Antikörper verhält, kann man auch fragen, um welchen Faktor der Anteil der gebundenen Antikörper steigt, wenn K_d um den Faktor x sinkt.

Da dieser Faktor von dem Quotienten aus Peptidkonzentration und Dissoziationskonstante abhängt, lässt sich der Einfluss von K_d bei unterschiedlichen Peptidkonzentrationen berechnen, indem man die obige Formel für α nach $[Ag]/K_d$ ableitet:

$$\alpha' = \frac{1}{1 + [Ag]/K_d} \cdot \frac{[Ag]/K_d}{(1 + [Ag]/K_d)}$$

Mathematisch ausgedrückt wird sich, wenn K_d um den Faktor ε sinkt, der Anteil der gebundenen Antikörper um den Faktor $\alpha' * \varepsilon$ zunehmen. Der Zusammenhang ist in Abbildung 1.3 graphisch dargestellt.

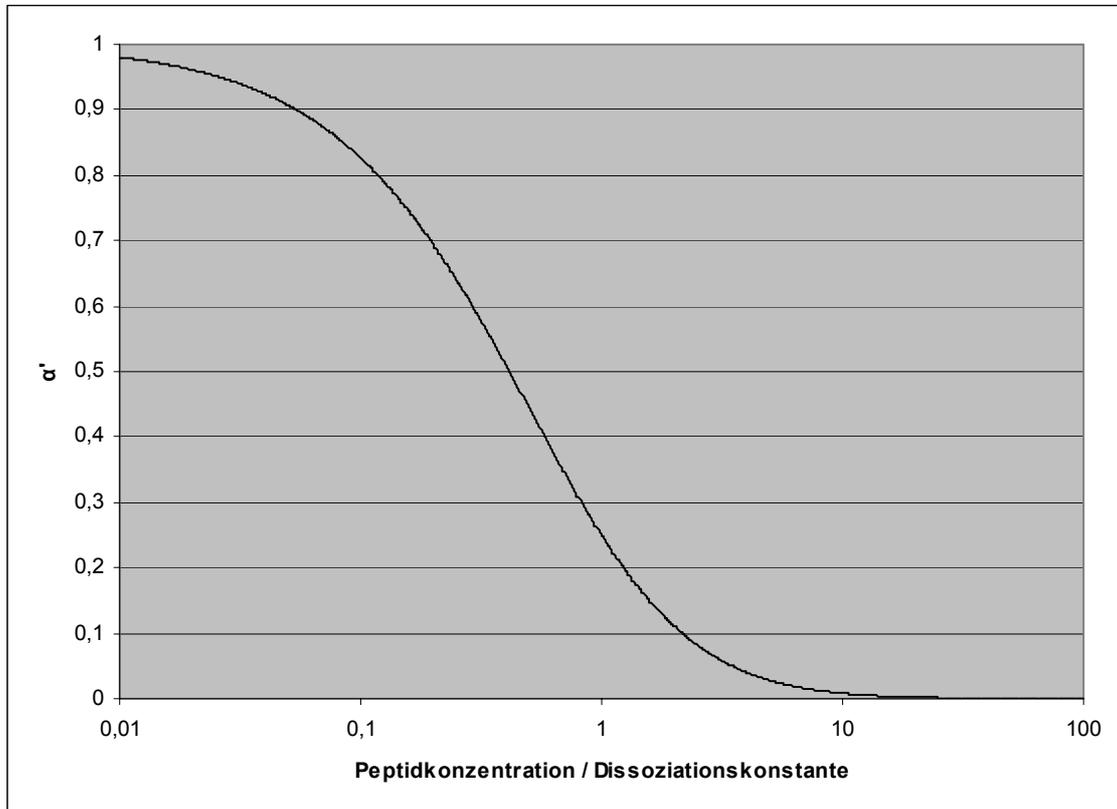


Abb. 1.3: Änderung der Signalintensität / Änderung der Affinitätskonstante bei unterschiedlicher Peptidmenge

Beträgt die Peptidkonzentration nur ein Bruchteil der Dissoziationskonstante, wird die Menge der gebundenen Antikörper noch etwa im selben Maß zunehmen, wie K_d abnimmt. Vereinfacht kann man sagen, dass die Menge gebundener Antikörper bei schlechter Antikörperbindung bzw. relativ niedriger Peptidmenge in etwa umgekehrt proportional zu K_d ist. (Also ungefähr proportional zur Affinitätskonstante K_a ist.)

Ist die Peptidkonzentration dagegen deutlich höher als die Dissoziationskonstante, wird sich eine Änderung von K_d kaum in der Menge der gebundenen Antikörper und damit auch nicht im gemessenen Signal im Immunoassay niederschlagen. In diesem Bereich kann ein Immunoassay also nicht mehr zwischen gut und sehr gut bindenden Antikörpern, bzw. gut und sehr gut bindenden Peptiden differenzieren.

Liegen Dissoziationskonstante und Peptidkonzentration in einer ähnlichen Größenordnung, haben sowohl Antikörperkonzentration als auch Affinitätskonstante Einfluss auf das Messergebnis. Allerdings gehen beide Faktoren nicht linear in das Messergebnis ein. Man kann allerdings sagen, dass bei konstanter Peptidmenge eine Änderung des Signals um den Faktor x entweder durch eine Änderung der Affinität um mindestens den Faktor x oder um einen Anstieg der Antikörpermenge um den Faktor x zu erklären ist.

Es ist also wichtig, von vornherein festzulegen, welche Antikörper im Immunoassay überhaupt nachgewiesen werden sollen, bzw. welche Peptide in der Epitopkartierung als Träger von Epitopen gewertet werden sollen, da sich hieraus auch die Wahl des Immunoassays ergibt.

1.7 Bisherige Impfstoffkandidaten

Ein gängiges Verfahren zur Epitopkartierung ist die Spotsynthesetechnik (Frank, 1992). Hierbei können mit relativ geringem Aufwand große Peptidbibliotheken auf einer Zellulosemembran synthetisiert werden. Die Peptide verbleiben nach der Synthese auf der Zellulosemembran, die Antikörperprobe wird anschließend dazugegeben, und die gebundenen Antikörper können anschließend z.B. über radioaktiv markierte Zweitantikörper nachgewiesen werden. Die synthetisierte Peptidmenge beträgt (abhängig von den Syntheseparametern) in etwa 10 nmol pro Peptid, das Flüssigkeitsvolumen im Immunoassay beträgt ungefähr 10 ml. Es ergibt sich eine Peptidkonzentration in der Größenordnung von 10^{-5} M. Vorteile dieses Nachweissystems sind einerseits die relativ einfache und schnelle Durchführbarkeit, insbesondere durch die parallele Testung einer sehr großen Zahl von Peptiden und die hohe Sensitivität durch eine hohe Peptidkonzentration. Nachteil ist, dass durch die hohe Peptidmenge nicht Antikörper mit mittlerer und hoher Affinität differenziert werden können (Antikörper haben eine Dissoziationskonstante von etwa 10^{-5} bis 10^{-10} (Eisen et al., 1964; Batista et al., 1998)). Durch den gemeinsamen Ansatz ist es außerdem möglich, dass ähnliche Peptide um dieselben Antikörper konkurrieren. Dies spielt z.B. eine Rolle, wenn kleine Epitope auf mehreren, sich in der Aminosäuresequenz überlappenden, Peptiden vorhanden sind. Daher lassen sich ähnliche Peptide nur schwer miteinander vergleichen. Zudem ist die Zelluloseoberfläche anfällig für unspezifische Bindungen, d.h., das Grundrauschen ist bei diesem Messauf-

bau ziemlich hoch. Vereinfacht kann man sagen, dass die Sensitivität dieses Verfahrens sehr hoch, die Spezifität jedoch relativ gering ist. Außerdem kann es nicht zwischen Antikörpern mittlerer und hoher Qualität unterscheiden.

Ziel im Rahmen eines übergeordneten Projektes ist es, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem Peptidimpfstoffe zu einem beliebigen Antigen bzw. Protein entwickelt werden können. In Rahmen der hier vorliegenden Arbeit soll das am Beispiel des Modellantigens Hühner-Ovalbumin durchgeführt werden.

Dazu waren in zwei vorangegangenen Studien Epitopkartierungen mit Seren und Sekretproben durchgeführt worden, die nach mukosaler und systemischer Immunisierung von Versuchstieren mit Ovalbumin gewonnen worden waren. Die Epitopkartierungen erfolgten unter Verwendung der vorangehend beschriebenen Spotsynthesetechnik an natürlichen Peptiden (Externest, 2000) und retro-inversen Peptiden (Gorris, 2001). Die Ergebnisse wurden miteinander verglichen, anschließend wurden Epitopkandidaten nach 3 Kriterien ausgewählt: erstens sollte das Peptid von vielen Mäusen erkannt worden sein, zweitens sollte die Signalintensität für RI-Peptide mindestens halb so groß sein wie das Signal mit dem natürlichen Peptid, drittens sollte das natürliche Peptid nicht verdauungsstabil sein, um den Vorteil der RI-Peptide untersuchen zu können. Es ergaben sich zwei Epitopkandidaten:

OVA 103-118: SRLY AEER YPIL PEYL

OVA 349-364: VDAA SVSE EFRA DHPF

Die Nummern beziehen sich auf die Aminosäurenummern innerhalb der Ovalbuminsequenz, die Aminosäuren wurden im Einbuchstaben-Code notiert.

Aufgrund der beschriebenen Nachteile der Spotsynthesetechnik sollte die Eignung dieser Kandidaten vor einer Immunisierungsstudie in einem alternativen Testverfahren bestätigt werden. Im Unterschied zur bisherigen Epitopkartierung sollte der Ansatz für die verschiedenen Peptide nun getrennt sein. Außerdem sollte das neue Testverfahren ein geringeres unspezifisches Signal haben als der alte. Hierzu bot sich ein Ansatz auf Mikrotiterplatten und als Nachweissystem ein ELISA an. Ebenfalls Ziel dieser Arbeit war deshalb die Entwicklung eines sensitiven Peptid-ELISAs.

Damit sollte wegen der eingeschränkten Vergleichbarkeit der Signalintensitäten beim Spotverfahren der Unterschied in der Antikörperbindung von natürlichem und RI-Peptid

verglichen werden. Darüber hinaus sollte überprüft werden, ob die Fähigkeit zur Antikörperbindung durch die Kopplung an ein anderes Molekül verloren gehen könnte. Weil die Kopplung in einer Immunisierung über Cystein erfolgen würde, galt es herauszufinden, ob ein Cystein am C- bzw. N-terminalen Ende des Peptids die Bindungsfähigkeit beeinflussen könnte. Schließlich sollte auch die Bedeutung einzelner Aminosäuren des Epitops für die Antikörperbindung bestimmt werden. Dazu führt man eine so genannte Feinkartierung durch.

1.8 Möglichkeiten der Feinkartierung

Mit Hilfe der Epitopkartierung ist es möglich, ein Epitop eines Proteins im Bereich eines kurzen Peptids (im hier vorliegenden Fall 16 Aminosäuren) zu lokalisieren. Welche dieser 16 Aminosäuren tatsächlich an der Antikörperbindung beteiligt sind, lässt sich mit einer Feinkartierung mittels Alanin-Replacement-Scan (kurz: Ala-Scan) ermitteln (Magdolen et al., 1996; Clark et al., 1994).

Beim Alanin-Replacement werden zu einem bekannten Peptid verschiedene Mutanten synthetisiert, deren Eigenschaften mit dem Originalpeptid verglichen werden können. Bei den Peptidmutanten wird jeweils eine Aminosäure durch Alanin ersetzt. Der Grundgedanke ist, dass wenn ein Peptid seine Fähigkeit zur Antikörperbindung verliert, sobald eine einzelne Aminosäure durch eine andere Aminosäure ersetzt wird, man schlussfolgern kann, dass diese Aminosäure essentiell an der Antikörperbindung beteiligt sein muss. Alanin wird deshalb als Austauschaminosäure gewählt, weil ihm am ehesten neutrale Eigenschaften zugesprochen werden und nicht beabsichtigt ist, generelle Eigenschaften der Peptidmutanten wesentlich zu verändern. Tabelle 1.2 zeigt die Peptidmutanten für einen Ala-Scan am Beispiel des Peptids Ova 103-118. In diesem Beispiel wurde die 5. Aminosäure (da es sich bereits im Originalpeptid um Alanin handelt) durch Glycin ersetzt.

Tab. 1.2: Ala-Scan am Beispiel von Ova103-118

Ova 103-118	S	R	L	Y	A	E	E	R	Y	P	I	L	P	E	Y	L
Ala-Scan #1	A	R	L	Y	A	E	E	R	Y	P	I	L	P	E	Y	L
Ala-Scan #2	S	A	L	Y	A	E	E	R	Y	P	I	L	P	E	Y	L
Ala-Scan #3	S	R	A	Y	A	E	E	R	Y	P	I	L	P	E	Y	L
Ala-Scan #4	S	R	L	A	A	E	E	R	Y	P	I	L	P	E	Y	L
Ala-Scan #5	S	R	L	Y	G	E	E	R	Y	P	I	L	P	E	Y	L
Ala-Scan #6	S	R	L	Y	A	A	E	R	Y	P	I	L	P	E	Y	L
Ala-Scan #7	S	R	L	Y	A	E	A	R	Y	P	I	L	P	E	Y	L
Ala-Scan #8	S	R	L	Y	A	E	E	A	Y	P	I	L	P	E	Y	L
Ala-Scan #9	S	R	L	Y	A	E	E	R	A	P	I	L	P	E	Y	L
Ala-Scan #10	S	R	L	Y	A	E	E	R	Y	A	I	L	P	E	Y	L
Ala-Scan #11	S	R	L	Y	A	E	E	R	Y	P	A	L	P	E	Y	L
Ala-Scan #12	S	R	L	Y	A	E	E	R	Y	P	I	A	P	E	Y	L
Ala-Scan #13	S	R	L	Y	A	E	E	R	Y	P	I	L	A	E	Y	L
Ala-Scan #14	S	R	L	Y	A	E	E	R	Y	P	I	L	P	A	Y	L
Ala-Scan #15	S	R	L	Y	A	E	E	R	Y	P	I	L	P	E	A	L
Ala-Scan #16	S	R	L	Y	A	E	E	R	Y	P	I	L	P	E	Y	A

Der Ala-Scan sollte sowohl für das natürliche als auch das retro-inverse Peptid durchgeführt werden. Es sollte untersucht werden, ob die gleichen Aminosäuren in der retro-inversen und in der natürlichen Form essentiell für die Antikörperbindung sind, oder ob sich die Mutanten in den beiden Enantiomer-Formen unterschiedlich auswirken, z.B. durch unterschiedlichen Einfluss auf die Sekundärstruktur des Peptids. Im letzteren Fall wäre es zusätzlich interessant zu betrachten, ob sich einige Aminosäuren als eher schädlich für die Antikörperbindung erweisen, d.h., die entsprechenden Mutanten möglicherweise sogar eine bessere Antikörperbindung aufweisen als das Originalpeptid.

Darüber hinaus sollten die Ergebnisse des Ala-Scans anhand der Kristallstruktur von Ovalbumin interpretiert werden. Zusätzlich sollte versucht werden, die Struktur der synthetisierten Peptide und Peptidmutanten mit Hilfe von Computersoftware zu modellieren. Ziel sollte dabei sein eventuelle Gesetzmäßigkeiten zu finden, die Auskunft darüber geben, warum bestimmte Aminosäuren besonders wichtig für die Antikörperbindung sind und sich daher besonders als Epitopmimetika eignen. Würde sich eine solche Gesetzmäßigkeit finden lassen, könnte man bei der Entwicklung zukünftiger Impfstoffe auf Peptidbasis, die Auswahl der zu testenden Peptide bereits im vornherein deutlich einschränken.

1.9 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollten folgende Ziele erreicht werden:

1. Entwicklung eines möglichst sensitiven und spezifischen Peptid-ELISAs für die Testung von Peptiden auf Antikörperbindung aus polyklonalen Proben.
2. Testung bzw. Bestätigung der Kandidaten aus den vorherigen Studien und nochmaliger Vergleich der Antikörperbindung bei retro-inverser bzw. natürlicher Form mit Hilfe des neuen Peptid-ELISA.
3. Testen des Einflusses von Cystein am C- bzw. N-Terminus für eine künftige Kopplung des Peptids an ein Adjuvans im Rahmen einer Immunisierungsstudie mit Hilfe des neuen Peptid-ELISA.
4. Durchführung der Feinkartierung der Epitopkandidaten via Ala-Scan unter Verwendung des neuen Peptid-ELISA.
5. Analyse bzw. Interpretation der Ergebnisse des Ala-Scans mit Hilfe der Kristallstruktur des Ovalbumins sowie Computerunterstützter Modellierung der Struktur der synthetisierten Peptide.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

2.1.1 Proteine und Antikörper

Proteine:

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

Antikörper:

Maus IgG anti-OVA, monoklonaler Maus IgG anti-Ovalbumin Antikörper, Klon OVA-14, Kat.-Nr. A6075, (Sigma / Sigma-Aldrich Chemie)

Ziege anti-Maus IgG, Meerrettich-Peroxidase-Konjugat (spezifisch gegen die γ -schwere Kette), Kat.-Nr. 1030-05 (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA über Biozol, Eiching)

Ziege anti-Maus IgA, Meerrettich-Peroxidase-Konjugat (spezifisch gegen die α -schwere Kette), Kat.-Nr.1040-05 (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA über Biozol)

Ziege anti-Maus IgG, Alkalische Phosphatase gekoppelt, Kat.-Nr. 1030-04 (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA über Biozol)

Maus anti-Hühner-Ovalbumin, Aszitesflüssigkeit Sigma / Sigma-Aldrich Chemie

2.1.2 Chemikalien und Nachweissysteme

Allgemeine Laborchemikalien Sigma-Aldrich Chemie
in p.a. Qualität Roth, Karlsruhe

Chemikalien für die Peptidsynthese:

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

Bausteine für die Peptidsynthese:

Alanin	Fmoc-Ala-OH	Novabiochem / Merck Biosci- ences, Schwalbach/Ts.
	Fmoc-D-Ala-OH	Bachem, Weil am Rhein
β-Alanin	Fmoc-β-Ala-OH	Novabiochem
	Fmoc-β-Ala-OPfp	Bachem
Aminobuttersäure	Fmoc-GABA-OH	Fluka / Sigma-Aldrich Chemie
Aminocaprinsäure	Fmoc-6-Ahx-OH	Fluka / Sigma-Aldrich Chemie

Aminodecansäure	Fmoc-10-Adc-OH	Advanced Chemtech Louisville, KY, USA
Aminododecansäure	Fmoc-12-Ado-OH	Advanced Chemtech
Aminoheptansäure	Fmoc-7-Ahp-OH	Peptech, Burlington, MA, USA
Aminononansäure	Fmoc-9-Anc-OH	Advanced Chemtech
Aminooctansäure	Fmoc-8-Aoc-OH	Advanced Chemtech
Aminoundecansäure	Fmoc-11-Aun-OH	Peptides International, Louisville, KY, USA
Aminovaleriansäure	Fmoc-5-Ava-OH	Advanced Chemtech
Arginin	Fmoc-Arg (Pbf)-OH	Novabiochem
	Fmoc-D-Arg (Pbf)-OH	Advanced Chemtech,
Asparagin	Fmoc-Asn (Trt)-OH	Novabiochem
	Fmoc-D-Asn (Trt)-OH	Advanced Chemtech
Asparaginsäure	Fmoc-Asp (OtBu)-OH	Novabiochem
	Fmoc-D-Asp (OtBu)-OH	Advanced Chemtech
Biocytin	Fmoc-Lys (Biotin)-OH	Advanced Chemtech
Carboxyglutaminsäure	Fmoc-Gla (OtBu) ₂ -OH	Iris Biotech, Marktredwitz
Cystein	Fmoc-Cys (Acm)-OH	Novabiochem
Glutamin	Fmoc-Gln (Trt)-OH	Novabiochem
Glutaminsäure	Fmoc-Glu (OtBu)-OH	Novabiochem
	Fmoc-D-Glu (OtBu)-OH	Advanced Chemtech
Glutaminsäure-Biotin	Fmoc-Glu(biot-PEG)-OH	Novabiochem
Glycin	Fmoc-Gly-OH	Novabiochem
Histidin	Fmoc-His (Trt)-OH	Novabiochem
	Fmoc-His (Boc)-OH	Bachem
Isoleucin	Fmoc-Ile-OH	Novabiochem
Leucin	Fmoc-Leu-OH	Novabiochem
	Fmoc-D-Leu-OH	Advanced Chemtech
Lysin	Boc-Lys (Fmoc)-OH	Novabiochem
	Fmoc-Lys (Boc)-OH	Novabiochem
	Fmoc-D-Lys (Boc)-OH	Advanced Chemtech
Methionin	Fmoc-Met-OH	Novabiochem

Phenylalanin	Fmoc-Phe-OH	Novabiochem
	Fmoc-D-Phe-OH	Advanced Chemtech
Polyethylenglycol	Fmoc-amino PEG diglycolic acid	
	(n = 2, MW 530,6)	Polypure, Oslo, Norwegen
	(n = 9, MW 839)	Polypure
Prolin	Fmoc-Pro-OH	Novabiochem
Serin	Fmoc-Ser (tBu)-OH	Novabiochem
Threonin	Fmoc-Thr (tBu)-OH	Novabiochem
Tryptophan	Fmoc-Trp (Boc)-OH	Novabiochem
	Fmoc-D-Trp (Boc)-OH	Advanced Chemtech
Tyrosin	Fmoc-Tyr (tBu)-OH	Novabiochem
	Fmoc-D-Tyr (tBu)-OH	Advanced Chemtech
Valin	Fmoc-Val-OH	Novabiochem

Sonstige Chemikalien und Nachweissysteme:

TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)	Aldrich / Sigma-Aldrich Chemie
AmpliQ	DAKO Diagnostika, Hamburg

2.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterial

Apex II ESI-FT-Massenspektrometer	Bruker Daltonik, Bremen
AutoSpot Pipettierroboter ASP 222	Intavis, Köln
ChemDoc System	Bio-Rad Laboratories
Versa Max Mikrotiterplatten-Lesegerät	Molecular Devices, Ismaning
ELISA-Washer Columbus	Tecan, Crailsheim
96-Loch Mikrotiterplatten hochbindend, Polystyrol, Flachboden	Corning, Wiesbaden
Lumi-Imager F1	Roche Diagnostics, Mannheim
SpeedVac-Konzentrator SPD121P	ThermoElectron, Frankfurt
Zellulosemembran 540 Whatman	Whatman, Madistone, England (über Merck, Darmstadt)
Zellulosemembran 3MM	Whatman über Merck

2.1.4 Software

Adobe Photoshop 7	Adobe Systems, San Jose, CA, USA
AutoSpot Operation Software 3.12	Intavis
Borland Delphi 5	Borland, Cupertino, CA, USA
CS ChemDraw 9	CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA
GraphPad Prism 4	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Microsoft Office 2004	Microsoft, Red Wood City, OR, USA
SoftMax Pro 4.7	Molecular Devices
TINKER 3.9	Jay William Ponder, Washington University School of Medicine, Saint Louis, MO, USA

2.2 Verwendete Serum- und Stuhlproben

Es wurden Serum- und Stuhlproben verwendet, die im Rahmen einer vorangegangenen Immunisierungsstudie (Externest, 2000) gewonnen worden waren, und zwar eine Serumprobe einer subkutan mit OVA immunisierten Maus, sowie drei Fäcesproben von intragastral mit OVA immunisierten Mäusen. Die Proben sind im Folgenden aufgelistet:

Serumprobe einer subkutan immunisierten Maus

Maus #51, Probe B4 (Benennung in Externest, 2000)

weibliche Balb/c Maus

Immunisierung subkutan mit jeweils 100 µg OVA + 50 µg Muramyldipeptid (MDP)

an den Tagen 0, 21, 35 und 49 (gerechnet ab der 1. Immunisierung)

Probenentnahme an Tag 60 (gerechnet ab der 1. Immunisierung)

Fäcesprobe einer intragastral immunisierten Maus

Maus #8, Probe F4 (Benennung in Externest, 2000)

weibliche Balb/c Maus

Immunisierung intragastral mit jeweils 200 µg OVA + 10 µg Cholera toxin (CT)

an den Tagen 0, 21, 35 und 49 (gerechnet ab der 1. Immunisierung)

Probenentnahme an Tag 59 (gerechnet ab der 1. Immunisierung)

Fäcesprobe einer intragastral immunisierten Maus

Maus #9, Probe F4 (Benennung in Externest, 2000)

weibliche Balb/c Maus

Immunisierung intragastral mit jeweils 200 µg OVA + 10 µg Cholera toxin (CT)

an den Tagen 0, 21, 35 und 49 (gerechnet ab der 1. Immunisierung)

Probenentnahme an Tag 59 (gerechnet ab der 1. Immunisierung)

Fäcesprobe einer intragastral immunisierten Maus

Maus #25, Probe F4 (Benennung in Externest, 2000)

weibliche Balb/c Maus

Immunisierung intragastral mit jeweils 2 mg OVA + 10 µg Cholera toxin (CT)

an den Tagen 0, 21, 35 und 49 (gerechnet ab der 1. Immunisierung)

Probenentnahme an Tag 59 (gerechnet ab der 1. Immunisierung)

2.3 Häufig verwendete Puffer

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

80 g NaCl
11,5 g Na₂HPO₄
2 g KCl
2 g KH₂PO₄
ad 1000 ml A. bidest.

D-PBS (1×) Dulbecco's Phosphate-buffered saline (2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄,
136 mM NaCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, pH 7,3)

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

D-PBST D-PBS × 0,05 % (v/v) Tween 20

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

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

0,584 g	NaCl
1,38 g	NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O

ad 1000 ml A. bidest.
mit 1 N NaOH auf pH 7,0 eingestellt

TBS-Puffer (10×) 10-fach konzentriertes Tris-buffered saline

NaCl	87,6	g/l
Tris-Base	6,1	g/l

der pH wurde mit HCl auf 7,0 eingestellt. Die Lösung wurde hitzesterilisiert und bei 4°C gelagert.

TBS-Puffer (1×) Tris-buffered saline (10 mM Tris-Cl, 149 mM NaCl, pH 7,0)

TBS-Puffer (10×)	100	ml
A. bidest.	900	ml

Die Lösung wurde hitzesterilisiert und bei 4°C gelagert.

TBST TPBS × 0,05 % (v/v) Tween 20

1 l	TBS (1×)
5 ml	10 % (v/v) Tween 20

10% (v/v) Tween 20 D-PBS × 10 % (v/v) Tween 20

45 ml	D-PBS (1×)
5 ml	Tween 20

2.4 Peptidsynthese

2.4.1 Grundlagen

Die so genannte Spot-Synthese oder ortsgerichtete Festphasensynthese diente der Synthese der Peptide für die nachfolgenden Bindungsstudien. Sie ermöglicht die parallele Synthese einer Vielzahl von Peptidketten auf einer Zellulosemembran (Frank, 1992). Mit dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Aufbau konnten parallel bis zu 1700

verschiedene Peptide auf vier Zellulosemembranen mit einer maximale Länge von ca. 25 Aminosäuren in einer Menge von jeweils etwa 20 nmol synthetisiert werden.

Die Synthese der Peptide verläuft in einem zyklischen Prozess, und zwar im Gegensatz zur Proteinbiosynthese von carboxyterminaler in aminoterminaler Richtung. Dabei ist die carboxyterminale Aminosäure über einen Anker mit der Zellulosemembran verknüpft. In der Synthese wird die Peptidkette in jedem Zyklus um eine Aminosäure verlängert, wobei die jeweils neue Aminosäure unter Bildung einer Säureamidbindung auf das carboxyterminale Ende der wachsenden Peptidkette aufgebracht wird. Um unerwünschte Nebenreaktionen zu vermeiden, werden die funktionellen Gruppen der zu koppelnden Aminosäuren mit Ausnahme des Carboxylatrestes durch Schutzgruppen blockiert. Als Schutzgruppe für die α -Aminofunktion wird die Fluorenylmethyloxycarbonyl- (Fmoc) Gruppe verwendet, die selektiv durch basische Reagenzien, wie Piperidin, entschützt werden kann. Die Seitenkettenschutzgruppen verbleiben bis zum Ende der Synthese an der Peptidkette. In jedem Zyklus wird zunächst die freie Carboxylatgruppe einer geschützten Aminosäure in eine reaktive Form („HOBt-Aktivester“) überführt, bevor sie mit dem Aminoterminus der wachsenden Peptidkette verknüpft wird. Da evtl. nicht alle Peptidketten verlängert werden können, werden nicht reagierte Aminogruppen anschließend durch Acetylierung mit Essigsäureanhydrid abgesättigt („Capping“), um Deletionen in der Peptidsequenz zu vermeiden. Danach wird die α -Aminofunktion der neu aufgebrachten Aminosäure selektiv entschützt. Anschließend beginnt der Zyklus wieder von vorne. Am Ende der Synthese werden die Seitenkettenschutzgruppen entfernt und die Peptide von der Zellulosemembran abgespalten. Sie können in einem geeigneten Puffer gelöst und in den folgenden Versuchen eingesetzt werden.

Alle Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Ein AutoSpot-Pipettierroboter ASP 222 wurde mit den gewünschten Peptidsequenzmotiven programmiert. Durch den Roboter wurden Aminosäurelösungen mit einer Stahlnadel positionsgenau auf die Spots aufgetragen. Alle anderen Arbeitsschritte wurden manuell durchgeführt. Die Waschschritte zwischen den einzelnen Synthesezyklen erfolgten in einer Polypropylenschale auf einem Wippschüttler, wobei immer 2 Membranen zusammen in einer Schale behandelt wurden. Das Volumen wurde mit 15 ml je Membran so gewählt, dass alle Membranen vollständig von der Lösung bedeckt waren. Wenn nicht anders angemerkt, wurden

der erste Waschschrift 30 Sekunden und die folgenden Waschschriftte jeweils 2 Minuten durchgeföhrt. Während der Inkubation in den entsprechenden Lösungen wurden die Membranen regelmäßig mit einer Pinzette gewendet.

2.4.2 Vorbereitung der Reagenzien

Der bei der Peptidsynthese verwendete Kopplungsansatz ist empfindlich gegen Wasser, Alkohole und Amine. Deshalb wurden alle in der Synthese verwendeten Geräte und GefäÙe sorgfältig gereinigt und getrocknet. Die Chemikalien wurden in Gegenwart von Trockenmittel in luftdichten GefäÙen gelagert. Bis auf Essigsäureanhydrid (Ac_2O), Bromphenolblau (BPB), N,N'-Dimethylformamid (DMF), Ethanol p.a., Dichlormethan, Piperidin, Triisobutylsilan (TIBS) und Trifluoressigsäure (TFA) wurden alle Chemikalien in Gegenwart von Silica Gel Blau (Blaugel) gelagert. N-Hydroxybenzotriazol (HOBt) wurde in Gegenwart von Blaugel und Phosphorpentoxid aufbewahrt.

Die Behältnisse mit Ac_2O , DMF, Ethanol, Methylchlorid, Piperidin, TIBS, und TFA wurden lediglich mit Parafilm abgedichtet. Bei einigen Chemikalien wurden, weil sie sich leicht zersetzen, noch andere Vorsichtsmaßnahmen getroffen. Ac_2O ist hydrolyseempfindlich und wurde auf mehrere 250 ml Duranglasflaschen aufgeteilt, im Stickstoffstrom verschlossen und bei Raumtemperatur gelagert. N-Methylimidazol (MeIm) ist stark hygroskopisch und wurde daher zu 200 μl in 500 μl MikroreaktionsgefäÙe portioniert und bei -80°C gelagert. TFA ist hygroskopisch, licht- und oxidationsempfindlich und wurde nach dem Öffnen des OriginalgefäÙes direkt in 50 ml Duranflaschen portioniert und im Stickstoffstrom verschlossen.

Die beiden Lösungsmittel für den Kopplungsansatz, N-Methylpyrrolidon (NMP) und DMF, wurden deionisiert und entwässert. NMP wurde mit Ionenaustauscherharz (Mischbett-Ionenaustauscher AG 501-X8 (D)) versetzt und mit einem Hantelrührstab langsam geröhrt. Nach 2 Stunden wurde eine kleine Menge des Harzes aus der Flasche entnommen und mit Wasser versetzt. Wenn die Ionenbindekazität des Harzes bereits erschöpft war, erfolgte bei Wasserkontakt ein Farbumschlag von blau nach goldgelb. In diesem Fall wurde erneut Harz hinzugefügt. Wenn die Farbe des Ionenaustauscherharzes bei Wasserzugabe nicht mehr nach gelb umschlug, wurde über Nacht weitergeröhrt. Anschließend wurde das NMP über eine doppelte Lage Faltenfilter in eine frische Flasche überführt, deren Boden ca. 1 cm hoch mit aktiviertem Molekularsieb, Porengröße

4 Å, bedeckt war. Die ersten 20 – 50 ml NMP wurden verworfen. Zum Durchmischen wurde die Flasche gelegentlich aufgeschüttelt. Nach einer weiteren Filtration am nächsten Tag wurde das NMP zu je 50 ml in 100 ml Duranflaschen portioniert. Das NMP wurde in einer Glasflasche im Stickstoffstrom verschlossen und in einem Exsikkator bei -80°C gelagert. Zum Einfrieren sollten die Flaschen nicht direkt mit Blaugel in Kontakt kommen und wurden schräg gestellt, da ansonsten die Gefahr bestand, dass die Glasflaschen beim Einfrieren oder Auftauen platzten. Außerdem wurden mehrere 2 ml-Mikroreaktionsgefäße mit 2 ml NMP gefüllt und bei -80°C in einem Exsikkator über Blaugel gelagert. Bei der Derivatisierung der Zellulosemembranen verwendetes DMF wurde analog deionisiert und dehydratisiert.

Wurden Chemikalien gefroren oder gekühlt gelagert, wurden die entsprechenden Gefäße vor dem Öffnen ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur angewärmt. Größere Gefäße wurden über Nacht aufgetaut.

2.4.3 Häufig verwendete Lösungen

Cappinglösung 2 % (v/v) Ac_2O in DMF

Piperidinlösung 20 % (v/v) Piperidin in DMF

BPB-Stammlösung 1 % (w/v) BPB in DMF

Färbelösung 0,01 % (w/v) BPB in DMF

2.4.4 Derivatisierung der Zellulosemembranen

Die Zellulosemembranen wurden zunächst mit Fmoc-Prolin verestert. Die Aminofunktion des Prolin dient als „Anker“ für die nachfolgende Peptidsynthese. Dazu muss es zunächst in eine Form überführt werden, in der es reaktiv genug ist, um mit den Hydroxyl-Gruppen der Zellulose zu einem Ester zu reagieren. Fmoc-Prolin wurde dazu zunächst durch Kondensation in Gegenwart von Methylimidazol zu dem entsprechenden Anhydrid umgesetzt.

Die zu derivatisierenden Membranen der Größe 9×13 cm sowie mehrere exakt 1 cm^2 große Membranschnipsel, die zur Analyse des Derivatisierungsgrades benötigt werden,

wurden aus Whatman 540 Papier ausgeschnitten. Zusätzlich wurde die gleiche Anzahl 9x13 cm große Membranunterlagen für den ersten Pipettierzyklus aus Whatman 3MM Papier vorbereitet. Alle Membranen und Membranunterlagen wurden über Nacht in einem Exsikkator unter Vakuum getrocknet.

Zur Derivatisierung wurden 4 Membranen aus dem Whatman 540 Bogen sowie mehrere Membranschnipsel in einer Polypropylenschale (PP-Schale) übereinander gelegt und gleichmäßig mit einer frisch angesetzten Fmoc-Prolin-OH-Anker-Lösung befeuchtet. Die PP-Schale wurde sorgfältig verschlossen und für 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Stapel einmal gewendet und die Schale für weitere 5-8 Stunden inkubiert. Bei diesem Inkubationsschritt wurden Lösung und Membranen nicht bewegt. Alle weiteren Wasch- und Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur auf einem Wippschüttler durchgeführt.

Fmoc-Prolin-OH-Anker (für 4 Membranen)

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

684 mg	Fmoc-Pro-OH
8800 µl	DMF (deionisiert, dehydratisiert)
420 µl	DICD
10 min.	Inkubation
345 µl	MeIm

Die 1 cm² großen Membranschnipsel wurden anschließend zur Messung des Derivatisierungsgrades aus den Schalen entnommen und auf Schnappdeckelgläser verteilt (Bestimmung des Derivatisierungsgrades siehe Abschnitt 2.3.5). Die 9x13 cm großen Zellulosemembranen wurden während dieser Bestimmung in der Fmoc-Prolin-OH-Anker-Lösung belassen.

Nachdem der Derivatisierungsgrad bestimmt war, wurden die noch freien Hydroxylgruppen der Zellulosemembranen acetyliert und damit abgeblockt. Die vier Membranen wurden dazu zunächst auf zwei PP-Schalen verteilt und 3mal in DMF (15 ml pro Membran) sowie 4mal in Cappinglösung (2% Ac₂O in DMF) gewaschen. Danach wurden die Membranen in frischer Cappinglösung weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit wurde die Cappinglösung mehrfach gewechselt.

Die Membranen wurden zum Schluss 4mal in DMF und 3mal in Ethanol gewaschen und im Warmluftstrom eines Föns getrocknet. Danach wurden die Membranen in Folie eingeschweißt und in Anwesenheit von Trockenmittel bei -20°C gelagert.

2.4.5 Bestimmung des Derivatisierungsgrades der Membranen

Es wurde bestimmt, wie viele Fmoc-Prolin-OH Moleküle pro cm^2 an die Zellulosemembran gebunden haben.

Zur Messung wurden die 1 cm^2 großen parallel derivatisierten Membranschnipsel benutzt. Die Schnipsel wurden hierzu einzeln auf Schnappdeckelgläser verteilt und zunächst 3mal mit je 2 ml DMF gewaschen und 5min in 1 ml Piperidinlösung inkubiert, um die Fmoc-Schutzgruppen der Aminosäuren abzuspalten. Danach wurden die Schnipsel 4mal mit jeweils 2 ml DMF und 3mal mit je 2 ml Färbelösung gewaschen. Das in der Färbelösung enthaltene Bromphenolblau band dabei an die freien Aminogruppen der aufgebrachtten Anker, die Schnipsel wurden durch den Färbeschritt also tiefblau gefärbt. Die Schnipsel wurden anschließend 3mal mit Ethanol gewaschen um die ungebundenen Bromphenolblaumoleküle zu entfernen. Anschließend wurden sie im Warmluftstrom getrocknet und in frische Schnappdeckelgläser überführt. Der Derivatisierungsgrad, d.h. die Menge der Aminogruppen pro cm^2 , wurde über die Menge des gebundenen Bromphenolblaus bestimmt. Um den gebundenen Farbstoff von den Schnipseln zu entfernen, wurden diese mit exakt 2 ml Piperidinlösung inkubiert und solange geschüttelt bis die Schnipsel vollständig entfärbt waren. $50\ \mu\text{l}$ der gefärbten Lösung wurden nun mit weiteren 2 ml frischer Piperidinlösung verdünnt. Im Photometer wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 605nm sowohl von dieser verdünnten Lösung, als auch von einer reinen Piperidinlösung gemessen.

Die Konzentration des Bromphenolblaus konnte mit Hilfe des Lambert-Beer-Gesetzes ($E=\varepsilon \times c \times d$) ausgerechnet werden, mit

- | | |
|---------------|--|
| E | Extinktion der Lösung (abzüglich der Extinktion der Piperidinlösung) |
| ε | $9500\text{m}^2\cdot\text{mol}^{-1}$ (molarer Extinktionskoeffizient von Bromphenolblau bei 605nm) |
| c | Konzentration von Bromphenolblau in der verdünnten Lösung |
| d | 1 cm (Länge des Strahlengangs durch die Lösung) |

daraus ergibt sich die Formel für den Derivatisierungsgrad

$$\text{Derivatisierungsgrad} = \frac{\text{OD}_{605} \times 41 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \times 2 \text{ ml (Volumen der Lösung)}}{9500 \text{ m} \times 1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm (Länge des Strahlengangs)}}$$
$$\approx \text{OD}_{605} \times 0,8632 \text{ } \mu\text{mol/cm}$$

mit OD_{605} als optischer Dichte bei 605 nm und 1 cm Schichtdicke der Lösung.

Alle Zellulosemembranen erreichten einen Derivatisierungsgrad von mindestens 70 nmol Amin pro cm^2 .

2.4.6 Definition der Spots

An bestimmte Ortskoordinaten auf den Zellulosemembranen wurde eine kleine Menge Boc-Lys(Fmoc)-OH pipettiert. An diesen Stellen bildeten sich kleine Spots von Dipeptiden, die als Ausgangspunkt oder „Zweitanker“ für die Synthese der eigentlichen Peptide dienten.

Die Membranen wurden zunächst 5 min in Piperidinlösung inkubiert, um die noch vorhandenen Fmoc-Schutzgruppen des Prolins aus der Derivatisierungsreaktion zu entfernen. Danach wurden die Membranen 5mal in DMF und 5mal in Ethanol gewaschen und im Warmluftstrom eines Föns getrocknet. Anschließend wurden sie auf die Teflonplatte des Pipettierroboters gelegt. Als Unterlage dienten die vorher ausgeschnittenen gleich großen Whatman 3MM Papiere. Membranen und Unterlagen wurden dabei durch drei Nadeln auf der Teflonplatte des Roboters aufgespießt, um sicherzustellen, dass der Roboter in weiteren Syntheseschritten die gleichen Koordinaten auf der Membran ansteuern konnte.

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

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

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

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

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

Es wurde nun auf jeder Membran an 425 (25 x 17) Positionen jeweils 0,1 μl der frisch angesetzten Boc-Lys(Fmoc)-Obt-Anker-Lösung pipettiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt 4mal wiederholt, wobei die Spots nach jedem Pipettiervorgang mindestens 30 Minuten abreagieren durften. Während dieser Zeit schlug das in der Ankerlösung enthaltene Bromphenolblau von blau nach gelb um, da die zunächst freien Aminogruppen mit Boc-Lys(Fmoc) belegt wurden und Bromphenolblau in nicht-basischer Umgebung gelb ist. Dieser Farbumschlag diente als Kontrolle für die Kopplungsreaktion.

Danach wurden die Membranen vom Pipettierroboter genommen und in einer PP-Schale zunächst 5mal in Cappinglösung (15 ml pro Membran) gewaschen. Hierbei wurden die ersten Waschschrte möglichst kurz gehalten, um ein Binden noch nicht abreagierter Aminosäuren an Positionen außerhalb der Spots zu verhindern. Anschließend wurden die Membranen 24 Stunden in Cappinglösung bei Raumtemperatur inkubiert. Die Cappinglösung wurde dabei mehrfach gewechselt. Nach der Inkubationszeit wurden die Membranen 4mal in DMF und 3mal in Ethanol gewaschen und im Warmluftstrom getrocknet. Die Membranen wurde danach bei -20°C trocken gelagert.

2.4.7 Herstellung der Aminosäurelösungen

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

2.4.8 Verlängerung der Peptidketten

Nach der Spotdefinition wurden die einzelnen Peptide zyklusweise um je eine weitere Aminosäure verlängert. Als Ausgangspunkt für die weitere Synthese diente jeweils die Aminogruppe des zuvor pipettierten Lysins.

Säureamid- bzw. Peptidbindungen werden aus Carbonsäuren und primären oder sekundären Aminen unter Freisetzung einer äquimolaren Menge Wasser gebildet. Da das Gleichgewicht auf der Seite der Edukte liegt, muss ein Kondensationsmittel zugesetzt werden, welches das Wasser aus der Reaktion entfernt. Um die Reaktionsgeschwindigkeit zu erhöhen und die Racemisierungsrate zu senken, führt man die Kondensation jedoch nicht direkt durch, sondern bedient sich eines Aktivesterintermediates, welches unter Freisetzung der alkoholischen Komponente freiwillig mit Aminen abreagiert. Der Aktivester wird unmittelbar vor der Kettenverlängerungsreaktion aus der geschützten Aminosäure und HOBt durch Zugabe von DICD gebildet.

Vor jedem Syntheseschritt wurden die vorbereiteten Aminosäurekopplungslösungen mindestens 30 Minuten im Dunkeln auf Raumtemperatur angewärmt und kurz bei $16100 \times g$ zentrifugiert. Anschließend wurden $4 \mu\text{l}$ DICD pro $100 \mu\text{l}$ (Endkonzentration: $0,25 \text{ M}$) Aminosäurelösung zur Aktivierung der Aminosäuren hinzugefügt. Nach kurzem Mischen wurden die Gefäße im Dunkeln bis zum Beginn der Synthese stehen gelassen, so dass die Aktivierungszeit ca. 30 Minuten betrug. Vor dem Synthesestart wurden die Aminosäurelösungen 1 min bei $16100 \times g$ zentrifugiert, anschließend wurden die Deckel der Mikroreaktionsgefäße abgeschnitten und die Gefäße in die Halterung des Pipettierroboters einsortiert.

Währenddessen wurden die Fmoc-Schutzgruppen der zuvor gekoppelten Aminosäuren auf den Zellulosemembranen entfernt. Dazu wurden die Membranen zunächst 3mal in DMF gewaschen und dann für 5 min in Piperidinlösung inkubiert. Die Membranen wurden anschließend 5mal mit DMF gewaschen, um sämtliches Piperidin wieder zu entfernen.

Danach wurden die Membranen in Färbelösung inkubiert. Die Spots mit den nun ungeschützten Aminogruppen färbten sich dabei blau. Die Färbelösung wurde solange gewechselt, bis sie im Überstand gelb blieb. Dadurch wurde kontrolliert, dass die Membranen tatsächlich vom Piperidin gereinigt waren. Danach wurden die Membranen 3mal

in Ethanol gewaschen, im Warmluftstrom getrocknet und mit Hilfe der Nadeln an ihren alten Positionen auf der Teflonplatte des Pipettierroboters fixiert.

Der Roboter pipettierte dann an jede Spotposition jeweils 0,2 µl der entsprechenden mit DICD aktivierten Fmoc-Aminosäure-Obt-Lösung. Dieser Vorgang wurde je 3mal wiederholt, wobei die Spots nach jedem Pipettiervorgang mindestens 30 Minuten abreagieren durften. Die zuvor blauen Spots schlugen während der Reaktion nach gelb um. (Es sei denn die pipettierte Aminosäure zeigte aufgrund ihrer Seitenkette trotz Schutzgruppe eine basische Reaktion, wie z.B. Histidin).

Um diejenigen Peptidketten zu terminieren, an die keine neue Aminosäure gebunden hatte, wurden die Membranen anschließend mehrfach in Cappinglösung gewaschen und 20 Minuten in selbiger inkubiert. Die ersten Waschschrte wurden dabei möglichst kurz gehalten, um ein Binden von noch nicht abreagierten Aminosäuren an falsche Spots zu verhindern.

Nach dem Capping konnten die Membranen entweder bei -20°C gelagert werden oder es wurde wie oben beschrieben mit dem nächsten Synthesezyklus begonnen. Zur Lagerung wurden die Membranen 3mal mit DMF und 3mal mit Ethanol gewaschen, im Warmluftstrom getrocknet, in Plastikfolie eingeschweißt und in Anwesenheit von Kieselgel eingefroren.

Nach dem Pipettieren der letzten Aminosäure wurden die Membranen nicht in Cappinglösung inkubiert. Stattdessen wurden sie zunächst 5mal in DMF gewaschen, wobei die ersten Waschschrte wieder möglichst kurz gehalten wurden. Danach wurden die Membranen wie oben beschrieben 5 Minuten in Piperidinlösung inkubiert, 5mal in DMF gewaschen und anschließend in Färbelösung inkubiert, so dass sich alle Spots blau färbten.

Die Spots wurden nun solange mit Cappinglösung gewaschen, bis die Spots vollständig entfärbt waren. Auf diese Weise wurden alle Peptidketten am N-terminalen Ende acetyliert (Endcapping).

Danach wurden die Membranen 3mal in DMF und 5mal in Ethanol gewaschen und im Warmluftstrom getrocknet. Die Membranen wurden danach in Folie eingeschweißt und in Anwesenheit von Kieselgel bei -20°C gelagert.

2.4.9 Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen

Die Entschützungsreaktion erfordert stark saure Bedingungen und die Anwesenheit von Triisobutylsilan (TIBS), das zum Abfangen von Carbeniumionen dient. Die Membranen wurden dazu 2mal für jeweils eine Stunde in Abspalllösung inkubiert und dabei nicht gewendet. Danach wurden sie 4mal in Methylenchlorid, 4mal in methanolischer Salzsäure und 4mal in 1M Essigsäure gewaschen. Anschließend wurden sie zwischen zwei Whatman 3MM Papiere gelegt und über Nacht unter Vakuum in Anwesenheit von Alkalihydroxid getrocknet.

Abspalllösung für die Seitenkettenschutzgruppen (für 1 Membran)

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

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

2.4.10 Abspalten der Peptide von der Zellulosemembran

Beim Entschützen der Aminosäureseitenketten wird gleichzeitig die Boc-Schutzgruppe des Lysyl-Prolin-Ankers abgespalten. Bei erneutem Anheben des pH-Wertes durch das Entfernen der Essigsäure im Vakuum auf $>7,0$, bricht der Lysyl-Prolin-Anker auf und das carboxyterminale ϵ -Lysin lagert sich zu einem Diketopiperazinderivat um, das am Carboxyterminus der Peptide verbleibt (Bray et al., 1990).

Die einzelnen durch die Rhodaminfärbung gut sichtbaren Spots wurden nun mit einem Loch Eisen mit 3mm Durchmesser (dem gleichen Durchmesser wie die Spots) ausgestanzt und in 2 ml Eppendorfgefäße überführt. Zusätzlich wurden aus derselben Membran mehrere Testschnipsel der gleichen Größe ausgestanzt. Diese Testschnipsel dienen beim nächsten Schritt zur Kontrolle des pH-Wertes. Die Eppendorfgefäße wurden mit jeweils 500 µl Triethylamin-Puffer (TEAA-Puffer) befüllt. Solange der Überstand der Testschnipsel einen pH-Wert $< 7,0$ aufwies, wurde der Puffer in frische Eppendorfgefäße überführt und gesammelt, danach wurden die Eppendorfgefäße mit den Spots erneut mit 500 µl TEAA-Puffer befüllt.

Die Eppendorfggefäße mit den ausgestanzten Spots im TEAA-Puffer wurden über Nacht bei 30°C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde der Überstand in frische Eppendorfggefäße überführt, bzw. mit den ersten Eluaten, falls vorhanden, vereinigt. Die Eppendorfggefäße mit den Spots wurden dann nochmals mit 500 µl TEAA-Puffer befüllt und für 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Der Überstand wurde erneut entnommen und mit den vorherigen Eluaten vereinigt. Auf diese Weise wurden die Peptide von der Membran abgelöst und lagen nun gelöst in dem flüchtigen TEAA-Puffer vor.

Zum Schluß wurden die Peptide in den Eluaten im Vakuumkonzentrator (ohne Heizung) lyophilisiert und bei -70°C gelagert.

TEAA-Puffer (für 250 ml)

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

3485 µl Triethylamin

50 ml Ethanol

ad 250 ml A. bidest.

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

2.5 Messung der Kopplungseffizienz

Die Spots auf den Zellulosemembranen färben sich in jedem Zyklus blau, wenn das Bromphenolblau an die entschützten Aminotermini der Peptidketten bindet. Da das überschüssige Bromphenolblau abgewaschen wird, ist die Intensität der Blaufärbung auch ein Maß für die Anzahl der freien Aminotermini. Über die Messung der Blaufärbung konnte so die Kopplungseffizienz ausgewählter Aminosäuren, insbesondere von PEG und Biocytin bestimmt werden. Die Kopplungseffizienz dieser Aminosäuren wurde bestimmt, weil es sich um Aminosäuren handelt, die in dieser Form der Peptidsynthese bisher nicht zum Einsatz kamen.

Auf einer einzelnen Membran wurden mehrere Dipeptide synthetisiert, hierzu wurden verschiedene Kombinationen von ausgewählten Aminosäuren benutzt. Nach dem Pipetieren der zweiten Aminosäure wurden die Membranen 3mal in DMF gewaschen, 5 min in Piperidinlösung inkubiert, 5mal in DMF gewaschen, in Färbelösung inkubiert, 3mal in Ethanol gewaschen und im Warmluftstrom getrocknet. Durch die Inkubation in Färbelösung wurden die Spots mit den Dipeptiden blau gefärbt.

Die Membranen wurden anschließend mit dem Lumi-Imager im Auflichtverfahren eingescannt und die Blaufärbung der Spots ausgewertet. Hierzu wurden Bereiche von konstanter Größe im Zentrum jedes Spots markiert. Analog dazu werden 10 Bereiche der gleichen Größe außerhalb der Spots als Referenz markiert. Aus den Helligkeitswerten (ein blauer Spot erschien dunkel) in PSL (willkürliche Einheit der Software des Lumi-Imagers) konnte ein Maß für die Kopplungseffizienz berechnet werden, indem die Helligkeitswerte der Spots von den Helligkeitswerten der Negativreferenz abgezogen wurden. Das Ergebnis ist ein Maß für die Blaufärbung und damit ein Maß für die Kopplungseffizienz. Es sollte allerdings betont werden, dass der gemessene Wert in keiner Weise linear mit der Anzahl der freien Aminotermini einer Peptidkette korrelieren muss, sondern eher der groben Kontrolle dient.

2.6 Immunoassays

2.6.1 Grundlagen

Die synthetisierten Peptide lagen zunächst in lyophilisierter Form vor. Um sie im ELISA an die Mikrotiterplatten binden zu können, wurden alle Peptide am C-terminalen Ende mit einer Biocytin-Markierung, sowie einem PEG-Abstandhalter zwischen Biocytin und dem zu untersuchenden Sequenzmotiv ausgestattet (d.h., die Synthesesequenz begann für jedes Peptid mit den Aminosäuren Biocytin und Amino-PEG-Carbonsäure). Auf diese Weise konnten die Peptide an mit Streptavidin beschichtete Platten binden. Aufgrund der sehr stabilen Bindung zwischen Streptavidin und Biocytin war die Peptidkonzentration auf der Mikrotiterplatte nicht von den speziellen Eigenschaften der Peptide abhängig, d.h., das Bindungsverhalten verschiedener Peptide konnte besser verglichen werden.

Aufgrund des beschriebenen Aufbaus war die maximale Peptidmenge durch die Menge an freien Biotin-Bindungsstellen des Streptavidins begrenzt. Um die Peptidmenge trotzdem weiter zu erhöhen, wurden bei einigen Peptiden zwischen Biocytin und Amino-PEG-Carbonsäure zwei dendritische Vergabelungen aus Lysin eingefügt, sodass auf jedem Biocytin vier identische Peptide parallel synthetisiert werden konnten. Auf diese Weise konnte im Peptid-ELISA die vierfache Peptidmenge an die Streptavidinschicht gebunden werden.

Der ELISA umfasste grundsätzlich vier Arbeitsschritte. Zunächst wurde die Mikroterplatte mit Streptavidin beschichtet, anschließend wurde das Peptid aufgebracht. Danach wurde die Antikörperprobe zugegeben. Zum Schluss wurden die gebundenen Antikörper mit einem Enzym-markierten Zweitantikörper nachgewiesen.

2.6.2 Häufig verwendete Lösungen

Blocking-Puffer D-PBS × 1 % (w/v) Casein

1 g	Casein
ad 100 ml	D-PBS (1×)

Casein-Tween-Puffer D-PBS × 1 % (w/v) Casein × 0,05 % (w/v) Tween 20

1 g	Casein
ad 100 ml	D-PBS (1×)
500 µl	10% (w/v) Tween 20

Peptidlösung

Abgespaltenes Syntheseprodukt eines lyophilisierten Spots in 1,5 ml L-PBST.

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

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

250 mM Kaliumcitratpuffer, pH 4,0

52,5 g Zitronensäure × H₂O

ad 1000 ml A.bidest.

mit 5 N KOH auf pH 4,0 eingestellt

Die Lösung wurde sterilfiltriert.

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

172,2 ml Kaliumcitratpuffer

ad 210 ml A. bidest.

66 µl 30 % (w/v) H₂O₂

Lösung A wurde bei 4 °C gelagert.

Lösung B 41 mM TMB × 8,2 mM TBABH in Dimethylacetamid

52,2 mg TMB

4,38 ml Dimethylacetamid

868 µl 50 mM TBABH (12,9 mg Tetrabutylammoniumborhydrid in 987 µl Dimethylacetamid)

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

Substratlösung (für 1 Mikrotiterplatte)

8 ml Lösung A

200 µl Lösung B

Die beiden Lösungen wurden auf Raumtemperatur angewärmt und 8 – 30 Minuten vor der Verwendung gemischt.

2.6.3 Optimierung des Peptid-ELISAs

Bestimmung der zur vollständigen Beschichtung der Kavitäten erforderlichen Streptavidinkonzentration:

Zur Beschichtung wurden hochbindende Mikrotiterplatten mit je 75 µl pro Kavität von 1,2 bis 2,4 µg/ml Streptavidin in L-PBS für 15 Stunden bei 4°C behandelt. Anschließend wurde 3mal mit 300 µl TBST pro Kavität gewaschen und die unspezifischen Bindestellen wurden mit 250 µl einer Lösung von 0,1% (w/v) BSA in TBS pro Kavität abgesättigt. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 3 Stunden wurde erneut 3mal mit

300 µl TBST pro Kavität gewaschen. In jede Kavität wurden 75 µl der Lösung eines Testpeptids aus der Ovalbuminsequenz (Aminosäuren Nr. 1-16; Sequenz: GSIG AASM EFCF DVFK) in 0,1% (w/v) BSA × 0,05% Tween 20 in TBS gegeben. Die Konzentration der Peptidlösung wurde so eingestellt, dass die applizierte Menge pro Kavität 1/2000 der Syntheseausbeute eines Spots entsprach.. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 3 Stunden wurde 6mal mit 300 µl TBST pro Kavität gewaschen. Anschließend wurde in jede Kavität 75 µl einer Lösung von 50 ng/ml eines monoklonalen Maus anti-Ovalbumin-Antikörpers in 0,1% (w/v) BSA × 0,05% Tween 20 in TBS gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 18 Stunden wurde 9mal mit 300 µl TBST pro Kavität gewaschen. Danach wurde in jede Kavität 75 µl einer Lösung eines Alkalische Phosphatase-markierten Ziege anti-Maus-Antikörpers gegeben. Die Antikörperlösung war 1:2000 in 0,1% (w/v) BSA × 0,05% Tween 20 in TBS verdünnt. Nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten wurde 9mal mit 300 µl TBST pro Kavität gewaschen. Alle Kavitäten wurden mit dem AMPLIQ-System entwickelt. Dabei wurde in jede Kavität 100 µl der Lösung A und 100 µl der Lösung B gegeben. Nach einer Entwicklungszeit von 30 Minuten im Dunkeln wurden 50 µl Stopp-Lösung zugegeben. Anschließend wurde die Extinktion der Lösung in jeder Kavität bei einer Wellenlänge von 492nm gemessen.

Bestimmung der zur vollständigen Beschichtung der Kavitäten erforderlichen Peptidkonzentration:

Zur Beschichtung wurden hochbindende Mikrotiterplatten mit 75 µl pro Kavität einer Lösung von 1,6 µg/ml Streptavidin in L-PBS für 15 Stunden bei 4°C behandelt. Anschließend wurde 3mal mit 300 µl D-PBST pro Kavität gewaschen und die unspezifischen Bindestellen wurden mit 250 µl Blocking-Puffer abgesättigt. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 3 Stunden wurde erneut 3mal mit 300 µl D-PBST pro Kavität gewaschen. In jede Kavität wurden dann 75 µl der Lösung eines Testpeptids aus der Ovalbuminsequenz (Aminosäuren Nr. 1-16; Sequenz: GSIG AASM EFCF DVFK) in Casein-Tween-Puffer gegeben. Die Konzentrationen der Peptidlösung wurden so eingestellt, dass die applizierten Mengen pro Kavität zwischen 1/250 und 1/128000 der Syntheseausbeute eines Spots entsprachen. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 3 Stunden wurde 6mal mit 300 µl D-PBST pro Kavität gewaschen. Anschließend wurden

in jede Kavität 75 µl einer Lösung von 400 pg/ml eines monoklonalen Maus anti-Ovalbumin-Antikörpers in Casein-Tween-Puffer gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 18 Stunden wurde 9mal mit 300 µl D-PBST pro Kavität gewaschen. Danach wurden in jede Kavität 75 µl einer Lösung eines Peroxidase-markierten Ziege anti-Maus-Antikörpers gegeben. Die Antikörperlösung wurde dabei 1:500 in Casein-Tween-Puffer verdünnt. Nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten wurde 9mal mit 300 µl TBST pro Kavität gewaschen. Alle Kavitäten wurden dann mit 75 µl der Substratlösung behandelt und exakt 60 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Entwicklung wurde durch Zugabe von 125 µl 1 M H₂SO₄ pro Kavität gestoppt. Die Extinktion der Lösung in jeder Kavität wurde bei einer Wellenlänge von 450nm gemessen.

2.6.4 Bestimmung der Nachweisgrenze

Für die verschiedenen Nachweissysteme wurde das untere Detektionslimit einer Antikörper-Peptidbindung mit Hilfe eines monoklonalen Maus anti-OVA-Antikörpers ermittelt. Es wurden jeweils Endpunkttitrationen durchgeführt, um die niedrigste Antikörperkonzentration zu bestimmen, die noch ein positives Signal aufwies. Ein Messwert wurde als positiv gewertet, wenn er sich signifikant von den Negativkontrollen unterschied. Hierfür wurde bei jeder Messreihe aus den Negativkontrollen ohne Antikörper ein Endpunkt oder „Cut-off“ bestimmt. Dieser war definiert, als diejenige Extinktion, bei der sich ein einzelner Messwert im einseitigen t-Test ($p < 0,05$) von den Negativkontrollen signifikant positiv unterschied (Frey et al., 1998). Für das TMB-Substrat wurde das Detektionslimit sowohl für unverzweigte als auch für dendritische Peptidkonstrukte bestimmt. Für das AMPLIQ-System wurde die Nachweisgrenze nur für die Detektion unverzweigter Peptidkonstrukte ermittelt.

Für den Vergleich der Endpunkttitrationen mit unverzweigten und dendritischen Peptidkonstrukten wurde außerdem der Faktor bestimmt, um den sich das Signal durch den Einsatz der Homotetramere verstärkte. Hierzu wurde jeweils aus der Extinktion der Negativkontrollen zunächst ein Mittelwert gebildet und als unspezifischer Anteil von der Extinktion der Lösungen der übrigen Kavitäten abgezogen. Das Ergebnis wurde als spezifischer Anteil gewertet. Um den Verstärkungsfaktor zu bestimmen, wurde das Verhältnis der spezifischen Anteile des Signals berechnet.

TMB-Entwicklung:

Zur Beschichtung wurden hochbindende Mikrotiterplatten mit 75 µl pro Kavität einer Lösung von 1,6 µg/ml Streptavidin in L-PBS für 15 Stunden bei 4°C behandelt. Anschließend wurde 3mal mit 300 µl D-PBST pro Kavität gewaschen und die unspezifische Bindestellen wurden mit 250 µl Blocking-Puffer abgesättigt. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 3 Stunden wurde erneut 3mal mit 300 µl D-PBST pro Kavität gewaschen. In jede Kavität wurden dann 75 µl der Lösung eines Testpeptids aus der Ovalbuminsequenz (Aminosäuren Nr. 1-16; Sequenz: GSIG AASM EFCF DVFK) in Casein-Tween-Puffer gegeben. Die Konzentration der dendritischen oder unverzweigten Peptidkonstrukte wurde so eingestellt, dass die applizierte Menge pro Kavität 1/1000 der Syntheseausbeute eines Spots entsprach. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 3 Stunden wurde 6mal mit 300 µl D-PBST pro Kavität gewaschen. Anschließend wurde in jede Kavität 75 µl einer Lösung eines monoklonalen Maus anti-Ovalbumin-Antikörpers in verschiedenen Konzentrationen in Casein-Tween-Puffer gegeben. Der Antikörper wurde dabei in zwei Verdünnungsreihen schrittweise jeweils 1:2 verdünnt, von 1,6 ng/ml bis auf 3,125 pg/ml, und von 50 ng/ml auf 0,0977 pg/ml. Zusätzlich wurden mehrere Kavitäten ohne Antikörper belassen und nur mit Casein-Tween-Puffer behandelt. Diese Kavitäten dienten später als Negativkontrollen zur Berechnung des Cutoffs für die Nachweisgrenzenbestimmung. Nach einer Inkubationszeit von 18 Stunden wurde 9mal mit 300 µl D-PBST pro Kavität gewaschen. Danach wurde in jede Kavität 75 µl einer Lösung eines in Casein-Tween-Puffer 1:500 verdünnten Peroxidase-markierten Ziege anti-Maus-Antikörpers gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten wurde 9mal mit 300 µl TBST pro Kavität gewaschen. Alle Kavitäten wurden dann mit 75 µl der Substratlösung behandelt und exakt 60 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Entwicklung wurde durch Zugabe von 125 µl 1 M H₂SO₄ pro Kavität gestoppt. Die Extinktion der Lösung jeder Kavität wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Jede Kavität wurde anschließend einzeln mit den Negativkontrollen verglichen. Eine Kavität wurde als positiv gewertet, wenn sie sich im t-Test signifikant ($p < 0,05$) von den Negativkontrollen unterschied.

AMPLIQ-Entwicklung:

Zur Beschichtung wurden hochbindende Mikrotiterplatten mit 75 µl pro Kavität von 1,0 bis 2,4 µg/ml Streptavidin in L-PBS für 15 Stunden bei 4°C behandelt. Anschließend wurde 3mal mit 300 µl TBST pro Kavität gewaschen und unspezifische Bindestellen wurden mit 250 µl einer Lösung von 0,1% (w/v) BSA in TBS pro Kavität abgesättigt. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 3 Stunden wurde erneut 3mal mit 300 µl TBST pro Kavität gewaschen. In jede Kavität wurden 75 µl der Lösung eines Testpeptids aus der Ovalbuminsequenz (Aminosäuren Nr. 1-16; Sequenz: GSIG AASM EFCF DVFK) in 0,1% (w/v) BSA × 0,05% Tween 20 in TBS gegeben. Die Konzentration der Peptidlösung wurde so eingestellt, dass die applizierte Menge pro Kavität 1/1000 der Syntheseausbeute eines Spots entsprach. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 3 Stunden wurde 6mal mit 300 µl TBST pro Kavität gewaschen. Anschließend wurde in jede Kavität 75 µl einer Lösung eines monoklonalen Maus anti-Ovalbumin-Antikörpers in verschiedenen Konzentrationen in 0,1% (w/v) BSA × 0,05% Tween 20 in TBS gegeben. Dazu wurden wie vorangehend beschrieben zwei Verdünnungsreihen von 1,6 µg/ml bis 3,125 ng/ml und von 50 ng/ml bis 0,0977 ng/ml sowie mehrere Negativkontrollen ohne Antikörper angelegt. Nach einer Inkubationszeit von 18 Stunden wurde 9mal mit 300 µl TBST pro Kavität gewaschen. Danach wurde in jede Kavität 75 µl einer Lösung eines Alkalische Phosphatase-markierten Ziege anti-Maus-Antikörpers gegeben. Die Antikörperlösung wurde dabei 1:2000 in 0,1% (w/v) BSA × 0,05% Tween 20 in TBS verdünnt. Nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten wurde 9mal mit 300 µl TBST pro Kavität gewaschen. Alle Kavitäten wurden mit dem AMPLIQ-System entwickelt. Dabei wurde in jede Kavität 100 µl der Lösung A und 100 µl der Lösung B gegeben. Nach einer Entwicklungszeit von 30 Minuten im Dunkeln wurden 50 µl Stopp-Lösung zugegeben. Anschließend wurde die Extinktion der Lösung jeder Kavität bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen. Jede Kavität wurde anschließend einzeln mit den Negativkontrollen verglichen. Eine Kavität wurde als positiv gewertet, wenn sie sich im t-Test signifikant ($p < 0,05$) von den Negativkontrollen unterschied.

2.6.5 Messung der Antikörperbindung aus polyklonalen Proben

Die Messung der Antikörperbindung aus polyklonalen Proben diente einerseits zum Nachweis einer signifikanten Antikörperbindung, andererseits dem Vergleich der Anti-

körperbindung mehrerer ähnlicher Peptide, d.h. dem Vergleich der Antikörperaffinitäten.

Zur Beschichtung wurden hochbindende Mikrotiterplatten mit 75 µl pro Kavität einer Lösung von 1,6 µg/ml Streptavidin in L-PBS für 15 Stunden bei 4°C behandelt. Anschließend wurde 3mal mit 300 µl D-PBST pro Kavität gewaschen und unspezifische Bindestellen wurden mit 250 µl Blocking-Puffer abgesättigt. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 3 Stunden wurde erneut 3mal mit 300 µl D-PBST pro Kavität gewaschen. In jede Kavität wurden dann 75 µl der Lösung der zu testenden Peptide in Casein-Tween-Puffer gegeben. Alle Peptide wurden grundsätzlich in der Homotetramerform eingesetzt, und die Konzentration der Peptidlösungen wurde so eingestellt, dass die applizierte Menge pro Kavität 1/1000 der Syntheseausbeute eines Spots entsprach. Zusätzlich wurden mehrere Proben angelegt, die kein Peptid, sondern nur Casein-Tween-Puffer enthielten, und in Kavitäten gegeben, die als Negativkontrollen dienen sollten. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 3 Stunden wurde 6mal mit 300 µl D-PBST pro Kavität gewaschen. Anschließend wurde in jede Kavität, einschließlich der Negativkontrollen, 75 µl einer bestimmten Verdünnung der polyklonalen Probe in Casein-Tween-Puffer gegeben. Die Verdünnung war innerhalb eines Experimentes für alle Kavitäten einschließlich der Negativkontrollen gleich. Für die verschiedenen Anwendungen wurden unterschiedliche Probenverdünnungen gewählt: Für die Validierung der Immunisierungskandidaten und die Feinkartierung des natürlichen Peptids wurden alle Serumproben 1:75 verdünnt; für die Feinkartierung mit dem retro-inversen Peptid wurden alle Serumproben 1:150 verdünnt; für den Test der optimierten Peptide wurden alle Serumproben 1:600 verdünnt. Nach einer Inkubationszeit von 18 Stunden wurde 9mal mit 300 µl D-PBST pro Kavität gewaschen. Danach wurde in jede Kavität 75 µl einer Lösung eines Peroxidase-markierten Ziege anti-Maus-Antikörpers gegeben. Die Antikörperlösung wurde dabei 1:500 in Casein-Tween-Puffer verdünnt. Nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten wurde 9mal mit 300 µl TBST pro Kavität gewaschen. Alle Kavitäten wurden dann mit 75 µl der Substratlösung behandelt und exakt 60 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Entwicklung wurde durch die Zugabe von 125 µl 1 M H₂SO₄ pro Kavität gestoppt. Die Extinktion der Lösung jeder Kavität wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Jede Kavität wurde anschließend einzeln mit den Negativkontrollen verglichen. Eine Kavität wurde als positiv gewertet, wenn sie sich im t-Test

signifikant ($p < 0,05$) von den Negativkontrollen unterschied. Beim Vergleich verschiedener Peptide wurde aus der Extinktion der Negativkontrollen zunächst ein Mittelwert gebildet und als unspezifischer Anteil von der Extinktion der Lösungen der übrigen Kavitäten abgezogen. Das Ergebnis wurde als spezifischer Anteil gewertet. Um zwei Peptide zu vergleichen, wurde das Verhältnis der spezifischen Signalanteile berechnet.

2.7 Berechnung der Oberflächenlage der Aminosäuren

Für die Analyse der Feinkartierung war ein Maß für die Zugänglichkeit der Aminosäuren bzw. deren Seitenketten im Protein notwendig. Die Kristall-Struktur von Ovalbumin ist bereits veröffentlicht (Stein et al., 1991) und lag als PDB-Datei vor. In diesem Format ist die Position für die Atome des Proteins in einem 3D-Vektorraum angegeben, wobei die Länge des Einheitsvektors ein Angström (0,1 nm) ist.

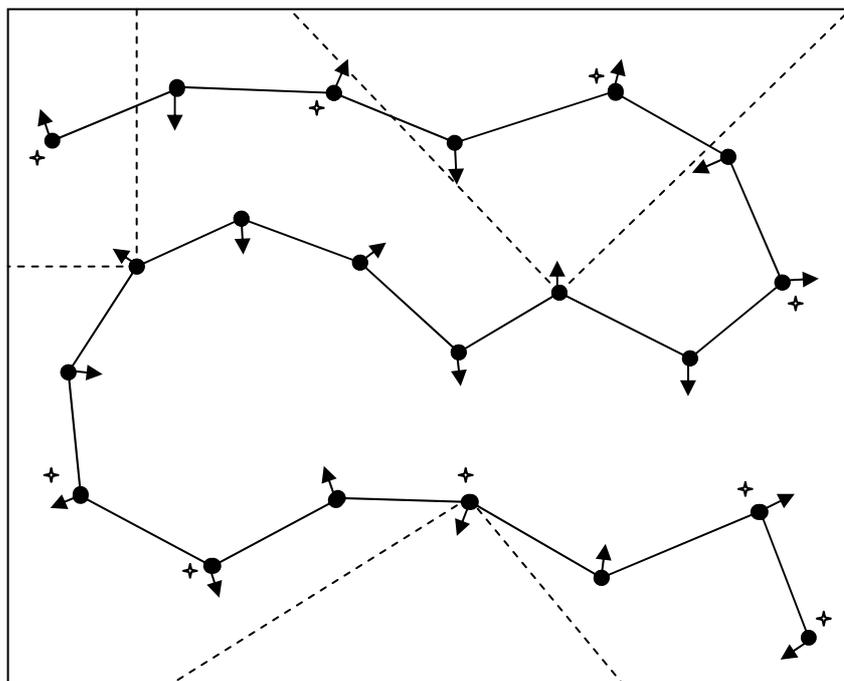


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Modells für die Zugänglichkeit von Seitenketten. α -C-Atome sind als Punkte dargestellt, Vektoren für die Seitenketten durch Pfeile. Exemplarisch für drei Aminosäuren ist der Kegel eingezeichnet, in dem kein α -C-Atom liegen darf, damit eine Aminosäure als frei gewertet wird. Als frei gewertete Aminosäuren sind durch Sterne markiert.

Um die Zugänglichkeit der Seitenketten zu bestimmen, wurde das Protein vereinfacht als eine Kette der α -C-Atome der Aminosäuren modelliert. Für jede Aminosäure wurde weiterhin ein Vektor für die Richtung der Seitenketten bestimmt. Dieser wurde jeweils

als der Vektor vom α -C-Atom zum β -C-Atom definiert. Um den Seitenkettenvektor herum wurde nun ein Kegel konstruiert, der seine Spitze im α -C-Atom hatte, und der in Richtung der Seitenkette unendlich weit in den Raum ging. Eine Aminosäure wurde als zugänglich gewertet, wenn sich in einem 90° -Kegel um die Seitenkette kein weiteres α -C-Atom befand (Abb. 2.1). Durch die Reduzierung der Aminosäuren auf ihre α -C-Atome sollte sichergestellt werden, dass das Maß für deren Zugänglichkeit nicht durch die Art der Seitenkette oder die der Nachbaraminosäure beeinflusst wird. Glycin besitzt keine Seitenkette, und wurde grundsätzlich als nicht zugänglich gewertet.

2.8 Computerunterstützte Peptidoptimierung

2.8.1 Prinzip

Ziel der Peptidoptimierung war es, ein Peptid mit Hilfe von computerunterstützter molekularer Modellierung zu entwickeln, das nicht die Originalsequenz des bekannten Epitops enthält, aber in der Lage ist, Antikörper aus einer polyklonalen Probe besser zu binden als das originale Peptid. Es sollte betont werden, dass es bei dem Versuch grundsätzlich nicht darum ging, tatsächlich das bestmögliche Epitopmimetikum zu finden, sondern zu untersuchen, ob eine computergestützte Peptidoptimierung prinzipiell erfolgsversprechend ist.

Das modellierte Peptid sollte ebenfalls aus 16 Aminosäuren bestehen und in der retro-inversen Form synthetisiert werden. Das Peptid sollte außerdem auf jeden Fall diejenigen Aminosäuren enthalten, die sich im Alanin-Replacement als essentiell erwiesen haben. Es wurden also nur solche Aminosäuren ersetzt, bei deren Austausch im Alanin-Scan des natürlichen Peptids nicht mehr als 20% der Bindung verloren gegangen war. Damit waren bereits 9 der 16 Aminosäuren festgelegt. Es blieben allerdings bei 20 proteinogenen Aminosäuren noch immer 20^7 mögliche Kombinationen, d.h. etwa 1,2 Milliarden Peptide als potenzielle Epitopmimetika übrig. Aufgrund dieser großen Menge an Kandidaten wurde ein Evolutionsalgorithmus benutzt, um potenzielle Kandidaten vorzuschlagen.

Ausgangspunkt für die Evolution waren die besten retro-inversen Peptide aus dem Alanin-Replacement, die dem obigen Kriterium entsprachen, in den essentiellen Aminosäuren nicht von der Originalsequenz abzuweichen. Es wurde nun ein Punktwert entwi-

ckelt, mit dem die mutmaßliche Antikörperbindung geschätzt werden sollte. Für die Punktwertberechnung wurde die 3D-Struktur des Peptids mit der Hilfe des Computerprogramms TINKER berechnet. Die Struktur wurde anschließend mit dem in Abschnitt 2.8.2 beschriebenen Algorithmus analysiert, mit der Struktur des Epitops im Protein verglichen und bewertet.

Der Evolutionsalgorithmus lief dabei in mehreren Zyklen ab. In jedem Zyklus waren die 5 Peptide mit den bisher besten Punktwerten Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer Peptide. Aus den 5 Peptiden wurden dann durch zufällige Mutation bzw. Kreuzung 40 neue Peptide erstellt:

- 20 Peptide wurden erstellt, indem jeweils bei einem der 5 bisher besten Kandidaten eine Aminosäure an einer Position zufällig verändert wurde (Punktmutation).
- 10 Peptide wurden erstellt, indem zufällig zwei der 5 bisher besten Kandidaten ausgewählt wurden und für das neue Peptid für jede Aminosäureposition zufällig bestimmt wurde, ob das neue Peptid die Aminosäure des ersten oder zweiten Eltern-Peptids übernehmen sollte (Kreuzung).
- 10 Peptide wurden erstellt, indem wie vorangehend beschrieben zunächst zwei der bisher 5 besten Peptide miteinander gekreuzt wurden, aber zusätzlich eine Aminosäureposition zufällig verändert wurde (Kreuzung + Punktmutation).

Für die neuen Peptide wurde nun mit dem Programm TINKER eine 3D-Struktur berechnet. Anschließend wurde nach einer Strukturanalyse für alle neuen Peptide der Punktwert bestimmt. Aus den 5 bisher besten Peptiden und den 40 neuen Kandidaten wurden die nun besten 5 Peptide ausgewählt und der Zyklus begann von neuem (Abb. 2.2). Insgesamt wurden 50 Zyklen durchgeführt.

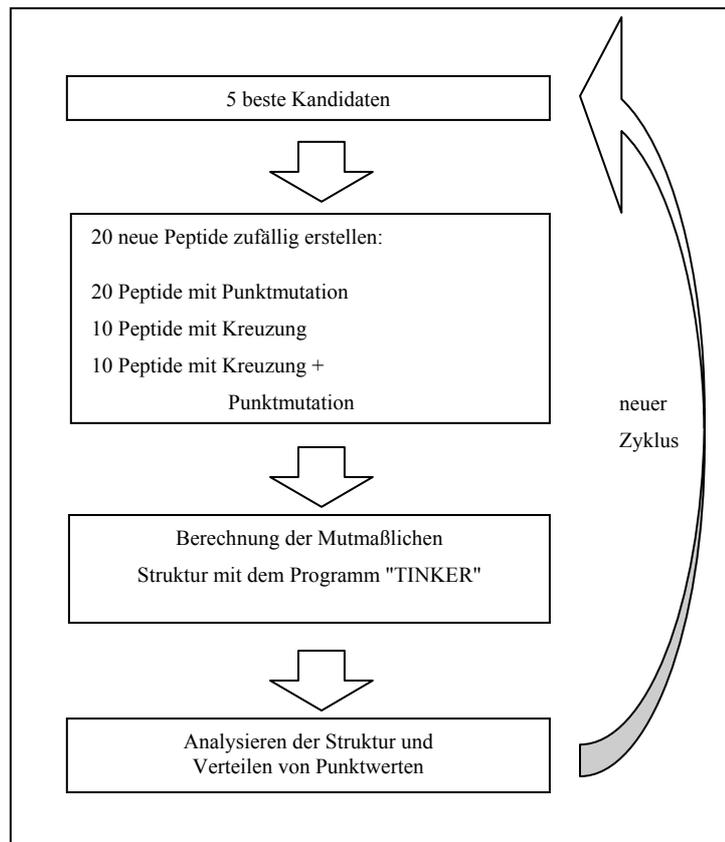


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Peptidevolution

2.8.2 Berechnung und Analyse der Peptide

3D-Struktur berechnen

Die Berechnung der 3D-Struktur der Peptide erfolgte mit dem Programm TINKER (Ponder et al., 1987) in der Version 3.9.

Die Peptidstruktur wurde mit Hilfe des Programms PROTEIN erstellt. Dabei wurde grundsätzlich die reine Peptidsequenz mit acetyliertem N-Terminus eingegeben. Die Berechnung erfolgte mit dem Programm MINIMIZE. Als Parameterdatei wurde die mitgelieferte Datei AMBER.PRM verwendet, für andere Parameter wurde mit den Standardeinstellungen gearbeitet. Die berechnete Struktur konnte mit dem Programm XYZPDB in das PDB-Format transformiert werden.

Zum Vergleich mit der 3D-Struktur des Epitops im Protein wurde ein Ausschnitt einer berechneten Kristallstruktur verwendet, die ebenfalls im PDB-Format vorlag (Stein et al., 1991).

Peptid normieren

Um die Struktur der Peptide mit der Struktur des Epitops im Protein vergleichen zu können, musste zunächst das Koordinatensystem normiert werden. Dazu wurde das Koordinatensystem der PDB-Datei so gedreht, bzw. der Nullpunkt so verschoben, so dass die Peptid einerseits und das Epitop des Proteins andererseits in einem gemeinsamen Koordinatensystem quasi übereinander zu liegen kamen. Auf diese Weise wurden die Positionskordinaten der Peptide und des Epitops vergleichbar.

Als Ursprung des Koordinatensystems wurde das α -C-Atom der 7. Aminosäure gewählt. Der X-Vektor des neuen Koordinatensystems wurde genau in die Richtung der 13. Aminosäure positioniert¹. Weiterhin wurde die Seitenkette der 7. Aminosäure in der Ebene aus X- und Z-Vektor positioniert. Da das neue System ebenfalls ein Rechtssystem sein musste (ein Linkssystem wäre spiegelverkehrt) und die Länge der Vektoren nicht verändert wurde, war hierdurch ein neues Koordinatensystem definiert. Die Koordinaten konnten durch eine lineare Abbildung in das neue Koordinatensystem umgerechnet werden.

Bewertung der Peptide

Da das Koordinatensystem vorher normiert worden war, sollten bei optimaler Imitierung der Proteinstruktur die Aminosäuren im Peptid theoretisch die gleichen Positionskordinaten haben wie im Protein. Darüber hinaus sollten die Seitenketten der Aminosäuren in die gleiche Richtung weisen.

Aufgrund der Ergebnisse des Alanin-Replacements hatten offensichtlich bestimmte Aminosäuren eine besonders hohe Bedeutung für die Antikörperbindung. Es handelte sich um die Positionen, bei deren Austausch im Ala-Scan mehr als 80% des Signals der Originalsequenz verloren gingen (Aminosäurepositionen 7,8,10,13,14,15 und 16). Die anderen Aminosäuren schienen zum einen bei der Antikörperbindung nicht direkt beteiligt zu sein, da sie sich im Protein mit anderen tiefer liegenden Proteinabschnitten zusammenlagern. Zum anderen konnten diese Aminosäuren die Antikörperbindung sogar negativ beeinflussen, vermutlich weil sie sich im Peptid mit den anderen Aminosäuren

¹ 7. und 13. Aminosäure wurden gewählt, weil das Originalepitop an diesen Stellen „Knicke“ hatte und sie deshalb als Bezugspunkt sinnvoll erschienen.

zusammenlagern und so die Struktur des Peptids verfälschen konnten. Für die Imitierung des Epitops wurde deshalb die Position und die Ausrichtung ausschließlich der für die Antikörperbindung essentiellen Aminosäuren optimiert.

Für jedes Peptid und jede der angegebenen Aminosäuren wurde die Positionsabweichung des α -C-Atoms und die Abweichung des Winkels der Seitenkette im Vergleich zum Epitop im Protein berechnet, sowie die Summe aller berechneten Positions- und Winkelabweichungen gebildet.

Außerdem wurde für diese Positionen ein Maß für die Zugänglichkeit der entsprechenden Seitenketten ermittelt. Aufgrund der kleineren Größe der Peptide im Vergleich zum Protein wurde für diesen Parameter ein anderer Algorithmus gewählt als für die Berechnung der Zugänglichkeit der Seitenketten innerhalb eines Proteins. Wie beim Algorithmus für die Zugänglichkeit der Aminosäureseitenketten im Protein wurden dabei die Aminosäuren auf ihre α -C-Atome und die Richtungen ihrer Seitenketten reduziert.

Vom α -C-Atom einer Aminosäure wurde auf dem Strahl in Richtung des Vektors der Seitenkette ein Punkt P im Abstand r definiert. Um diesen Punkt P wurde ein Kreis mit Radius r gezogen und überprüft, ob sich innerhalb des Kreises ein weiteres α -C-Atom befand. Als Maß für die Zugänglichkeit war der maximale Wert für r definiert, bei dem der Kreis gerade noch leer war (Abbildung 2.3). Der Wert wurde in Angström angegeben, r konnte keine Werte >1000 annehmen.

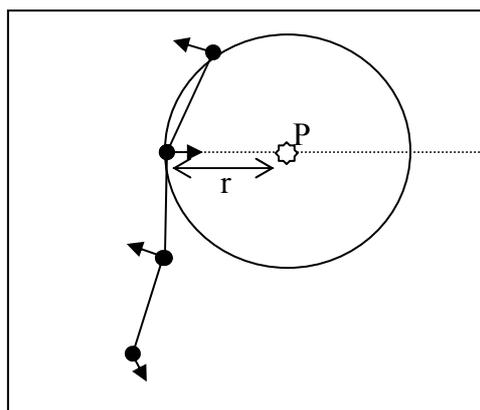


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Berechnung der Zugänglichkeit einer Aminosäure eines Peptids. α -C-Atome sind durch Punkte markiert und durch Linien verbunden, Vektoren für die Seitenketten wurden als Pfeile dargestellt. Für die 2. Aminosäure wurde der maximale Abstand r eingezeichnet für den der Kreis um den Punkt P gerade noch kein weiteres α -C-Atom enthält.

Aus allen Parametern wurde schließlich ein Punktwert (PW), das heißt eine einzelne Zahl, berechnet. In diesen Punktwert sollten aber nur die Parameter eingehen, die tatsächlich eine bessere Antikörperbindung eines Peptids beschrieben. Es wurde deshalb jeweils getestet, ob der entsprechende Parameter signifikant mit den Ergebnissen des Ala-Scans korrelierte. In den Test wurden ausschließlich die Ergebnisse der retroinversen Peptide mit einbezogen, wobei die Peptide, in denen eine der Aminosäuren 7,8,10,13,14,15 oder 16 ersetzt wurden, ausgelassen wurden. Diese Aminosäuren galten als potenziell essentiell für die Antikörperbindung, d.h., die entsprechenden Peptide hätten evtl. aufgrund der fehlenden Seitenkette niedrige Signale produziert, obwohl die Struktur des Peptids dem Originalepitop nah kommen könnte.

In die Punktwertberechnung sollten alle Parameter eingehen, die signifikant ($p < 0,05$) mit der Antikörperbindung korrelierten. Allerdings sollte eine Positions- oder Winkelabweichung nicht gleichzeitig als Einzelwert und als Summe in die Punktwertberechnung eingehen. Im Zweifelsfall wurde die Summe als Parameter bevorzugt. Es ergab sich schließlich folgende Formel für die Punktwertberechnung:

$$PW = \frac{\text{Zugänglichkeit von Aminosäure \#14}}{(\text{Summe der Winkelabweichungen in Bogenmaß}) * (\text{Positionsabweichung von Aminosäure \#8})}$$

3 Ergebnisse

3.1 Bestimmung der Kopplungseffizienz von Biocytin und PEG

Bei der Spot-Synthese werden die Peptidketten in jedem Zyklus um eine Aminosäure verlängert. Die Aminosäuren reagieren dabei als Aktivester mit den freien Aminogruppen der wachsenden Peptidketten eines Spots. Der Einsatz aller proteinogenen Aminosäuren, sowohl in der natürlichen als auch der retro-inversen Form, war für das Verfahren bereits etabliert. Die Effizienz der Kopplung von Biocytin- und PEG-Carbonsäureaktivestern in der Spot-Synthese war jedoch noch nicht bekannt. Da Biocytin sich relativ schlecht in dem bei der Spot-Synthese verwendeten Lösungsmittel N-Methylpyrrolidinon (NMP) löst, sollte insbesondere die Kopplungseffizienz von Biocytin an verschiedenen Aminosäuren untersucht werden.

Da eine Bestimmung der absoluten Kopplungseffizienz auf Spot-Bibliotheken technisch sehr aufwändig gewesen wäre, wurde die Kopplungseffizienz von Biocytin an ausgewählte Aminosäuren relativ zur der von Alanin bestimmt. Die Messung der Kopplungseffizienz erfolgte über die Messung der Blaufärbung mit Bromphenolblau der entschützten verlängerten Peptidkette.

Die Blaufärbung der Spots wurde mit Hilfe des Lumi-Imagers gemessen und in der willkürlichen Einheit des Lumi-Imagers (PSL/mm²) quantifiziert. Es sollte betont werden, dass es sich um ein semiquantitatives Verfahren handelt, das sowohl vom Bindungsverhalten des Bromphenolblaus an die terminalen Aminofunktionen als auch von Wechselwirkungen des Bromphenolblau mit geschützten Seitenketten bestimmter Aminosäuren beeinflusst werden kann. Das Verfahren diente also nicht dem genauen Messen der Kopplungseffizienz, sondern vielmehr der groben Abschätzung der Bindungseigenschaften von Biocytin.

Die Ergebnisse des Tests für die Bindung von Biocytin an verschiedene Aminosäuren sind in Abbildung 3.1 dargestellt.

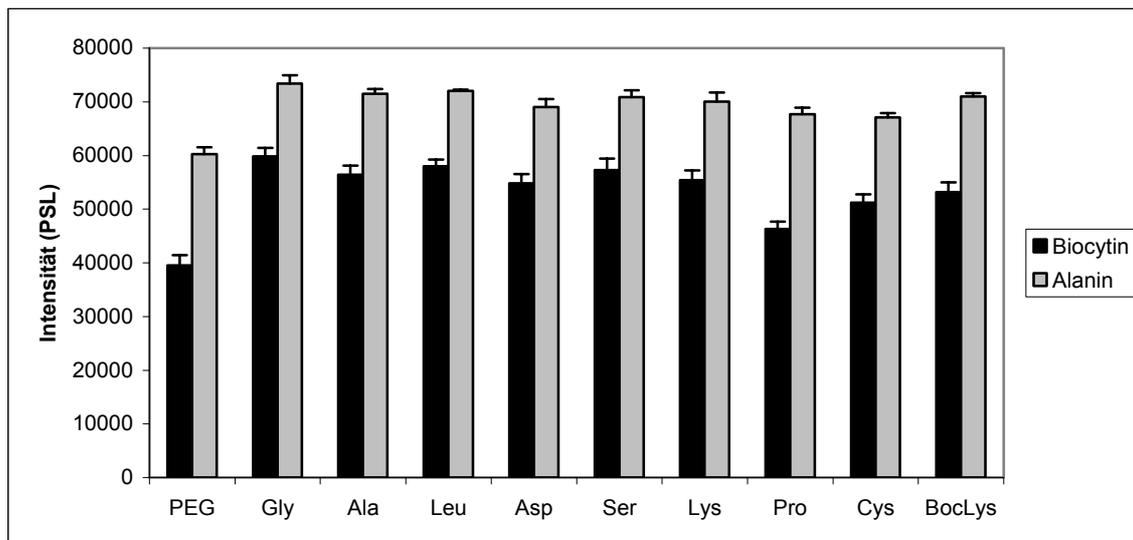


Abb. 3.1: Kopplung von Biocytin im Vergleich zu Alanin an ausgewählte Aminosäuren.

Die Aminosäuren wurden im Dreibuchstaben-Code notiert. PEG ist Polyethylenglycol-Carbonsäure, Lys entspricht Fmoc-Lys(Boc), Boc-Lys entspricht Boc-Lys(Fmoc). Experimentelle Schwankungen sind als Standardabweichung dargestellt.

Es zeigte sich, dass Biocytin grundsätzlich eine signifikant schlechtere Bindung aufwies als Alanin (t-Test, $p < 0,001$). Die Farbintensität nach Kopplung von Biocytin betrug im Schnitt nur ca. 75% im Vergleich zu der, die bei Kopplung von Alanin erhalten wurde. Die Bindung von Biocytin an PEG lieferte das schlechteste Ergebnis, was für Peptidkonstrukte, die über ihren N-Terminus an Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten gekoppelt werden sollen, besonders nachteilig ist, da diese Kombination für diese Immobilisierungsstrategie erforderlich wäre. Diese Immobilisierungsstrategie wurde daher im Rahmen dieser Arbeit nicht verfolgt. Die Bindung von Alanin an die verschiedenen Aminosäuren zeigte nicht solche ausgeprägten Unterschiede. Lediglich die Kopplung von Alanin an Amino-PEG-Carbonsäure war etwas schlechter als an andere Aminosäuren.

Da die Immobilisierung der Peptidkonstrukte über den N-Terminus nicht praktikabel war, konnte das Biocytin nur am C-Terminus – also am Beginn der Peptidkette – eingebaut werden. Dazu musste überprüft werden, wie verschiedene Aminosäuren an den N-Terminus von Biocytin koppeln. In diesem Fall wurde zuerst Biocytin, bzw. Alanin an die Membran gekoppelt, und dann die Peptidkette um ausgewählte Aminosäuren verlängert. Die Ergebnisse dieses zweiten Tests sind in Abbildung 3.2 dargestellt.

Im zweiten Test zeigte sich, dass die Bindung der Aminosäuren an Biocytin grundsätzlich schlechter war als die Bindung an Alanin (t-Test, $p < 0,01$ für alle Aminosäuren

außer Asp und Cys, $p < 0,05$ für Asp, nicht signifikant für Cys). Die Farbintensität nach Kopplung einer Aminosäure an Biocytin betrug im Schnitt 87% der Intensität nach Kopplung der entsprechenden Aminosäure an Alanin. Die Ergebnisse nach Kopplung verschiedener Aminosäuren schwankten jedoch zum Teil erheblich, was möglicherweise auf die unterschiedlich gute Bindung von Bromphenolblau an die verschiedenen Aminosäuren zurückzuführen ist. Die Kopplung von Amino-PEG-Carbonsäure an Biocytin war von mittlerer Effizienz, besser als die Kopplung von Asparaginsäure und Cystein aber schlechter als die Kopplung von Alanin und Glycin an Biocytin.

Da sich beim Aufbau einer Peptidkette auf der Amino-PEG-Carbonsäure kein starker Einfluss der ersten gekoppelten Aminosäure und der Sequenz der jeweiligen Peptide bemerkbar machte, wurden alle Peptidkonstrukte mit einer C-terminalen Biocytin-Amino-PEG-Carbonsäure-Verankerungseinheit ausgerüstet.

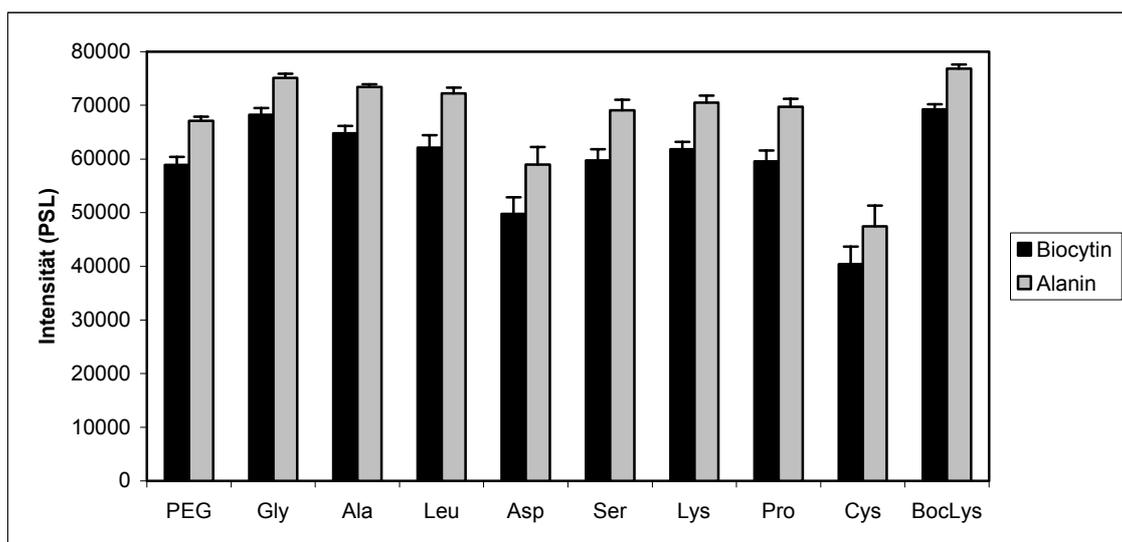


Abb. 3.2: Kopplung von ausgewählten Aminosäuren an Biocytin bzw. Alanin. Die Aminosäuren wurden im Dreibuchstaben-Code notiert. PEG ist Amino-Polyethylenglycol-Carbonsäure, Lys entspricht Fmoc-Lys(Boc), Boc-Lys entspricht Boc-Lys(Fmoc). Experimentelle Schwankungen sind als Standardabweichung dargestellt.

3.2 Optimieren des Peptid-ELISAs

3.2.1 Maximierung der Beschichtungs-Konzentration

Wie in der Einleitung erläutert, hängt die Sensitivität eines ELISAs entscheidend von der Peptidkonzentration in einer ELISA-Kavität ab. Um eine möglichst hohe Sensitivi-

tät auch für relativ schlecht bindende Antikörper zu ermöglichen, sollte die immobilisierte Peptidmenge möglichst hoch sein. Weil die Peptide über eine Biocytin-Markierung an mit Streptavidin beschichtete Platten binden sollten, war es zunächst notwendig die Platten mit einer möglichst hohen Menge Streptavidin zu beladen.

Für die Beschichtung wurden mehrere ELISA-Kavitäten mit Streptavidin in Konzentrationen zwischen 1,2 und 2,4 $\mu\text{g/ml}$ (1,5-3,0 pmol/Kavität) beladen. Das Streptavidin wurde anschließend mit einem biotinylierten Testpeptid aus der Ovalbuminsequenz (Aminosäuren Nr. 1-16; Sequenz: GSIG AASM EFCF DVFK) beladen. Anschließend wurde das Signal eines monoklonalen Maus anti-Ovalbumin-Antikörpers nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.3 dargestellt.

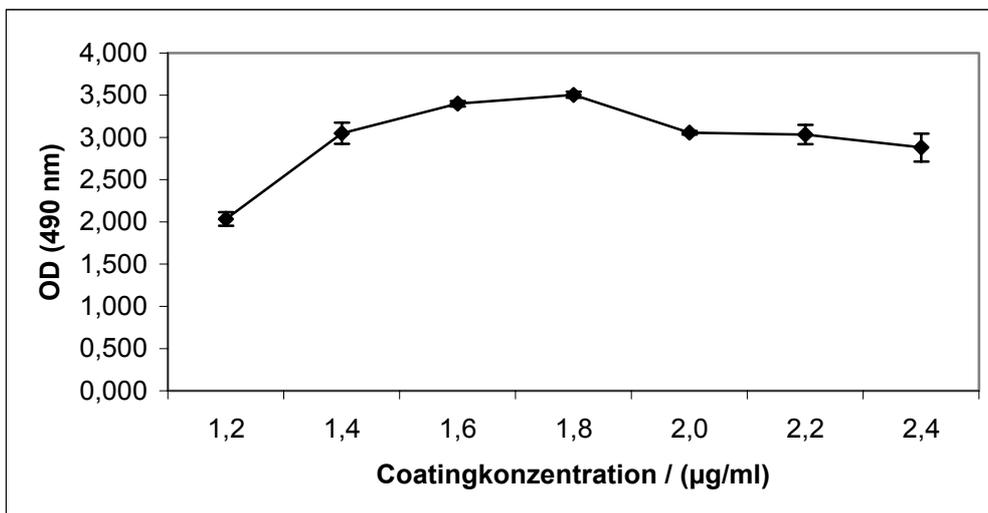


Abb. 3.3: Nachweis eines monoklonalen anti-OVA-Antikörpers bei unterschiedlichen Streptavidin-Beschichtungskonzentrationen.

Normalerweise wird die höchste Intensität erreicht, wenn die Wand der ELISA-Kavität in einer einfachen Schicht mit dem entsprechenden Protein beschichtet ist (Monolayer). Wird eine bestimmte Konzentration überschritten, kann es sein, dass sich das Protein in mehreren Schichten an die Platte anlagert. In diesem Fall können zwar mehr Analyten eingefangen werden, die lose adhärenen äußeren Proteinschichten mit den daran gebundenen Reagenzien können aber in nachfolgenden Waschschrinen leicht wieder von der Platte abgelöst werden. Im Falle des Streptavidins kann es auch sein, dass durch eine zu enge Beschichtung die Biocytin-Bindungsstellen des Streptavidins verdeckt werden.

Es zeigte sich, dass zwischen 1,6 und 1,8 $\mu\text{g/ml}$ das höchste Signal erreicht wird und ab einer Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ Streptavidin das Signal des ELISAs bereits wieder

leicht abfällt. Der Abfall des Signals könnte, wie oben angedeutet, durch Verdecken von Biocytin-Bindungsstellen oder durch beginnendes Anlagern in zwei Schichten erklärt werden. Da diese Effekte in jedem Fall verhindert werden sollten, wurde die Streptavidin-Beschichtungskonzentration für den Peptid-ELISA auf 1,6 µg/ml (2 pmol/Kavität) festgelegt.

3.2.2 Bestimmung der erforderlichen Peptidmenge

Der Peptid-ELISA sollte unabhängig von eventuellen Schwankungen der Syntheseausbeute der Peptidsynthese sein. Aus diesem Grund muss das Peptid im Überschuss eingesetzt werden, d.h., es müssten alle verfügbaren Biocytin-Bindungsstellen abgesättigt werden. Andererseits sollten mit den synthetisierten Peptiden möglichst viele ELISAs durchgeführt werden können. Es war also von hohem Interesse, die erforderliche Peptidmenge für den ELISA zu bestimmen.

Die Platten wurden zunächst mit 1,6 µg/ml (2 pmol / Kavität) Streptavidin beschichtet. Anschließend wurden die Peptide in unterschiedlichen Mengen aufgetragen. Es handelte sich um ein biotinyliertes Testpeptid aus der Ovalbuminsequenz (Aminosäuren Nr. 1-16; Sequenz: GSIG AASM EFCF DVFK) in der Homotetramerform. Der Nachweis erfolgte über einen monoklonalen Maus anti-Ovalbumin-Antikörper. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.4 dargestellt.

Das maximale Signal wurde bei einer Peptidmenge von 1/2000 Spot pro Kavität erreicht. Interessanterweise fiel das Signal, wenn diese Peptidmenge überschritten wurde, wieder ab. Dieser Effekt war möglicherweise dadurch bedingt, dass die Peptide untereinander Komplexe bildeten, und sich so bei der Bindung ans Streptavidin behinderten. Aufgrund der hohen Affinität des Streptavidins zum Biocytin ließ sich durch dieses Experiment auch die Größenordnung der Ausbeute der Peptidsynthese messen. Da Streptavidin vier Biocytin-Bindungsstellen besitzt, von denen wahrscheinlich zwei verfügbar sind, das heißt nicht zum Boden zeigen, waren etwa 4 pmol Bindungsstellen für die Peptide vorhanden. Bei einem maximalen Signal bei 1/2000 Spot ergab das eine Peptid- ausbeute im Bereich von 8 nmol/Spot (oder in der Größenordnung von 10 nmol/Spot).

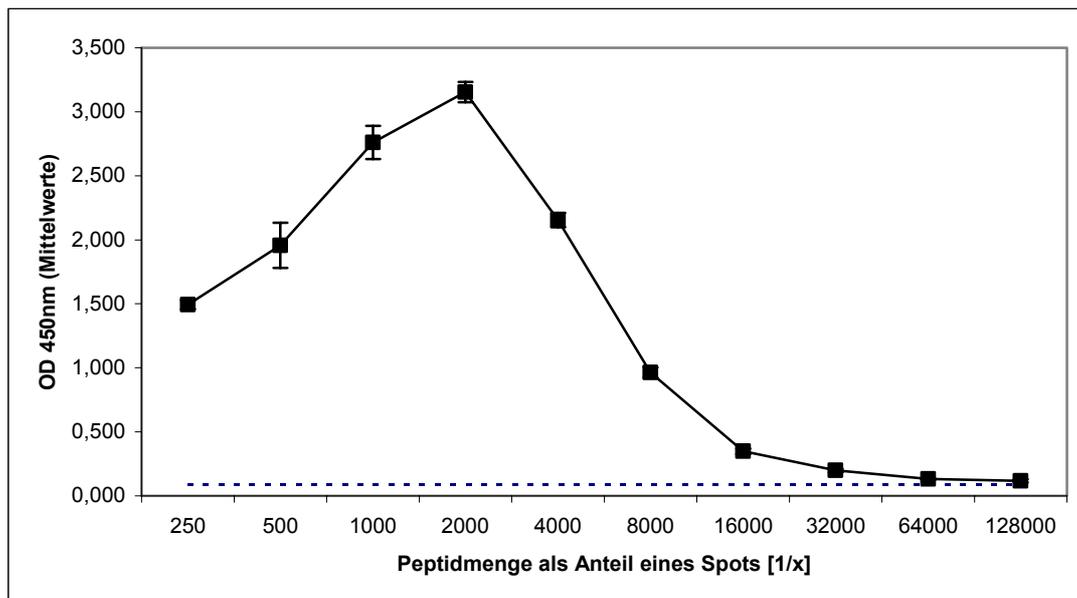


Abb. 3.4: Nachweis eines monoklonalen anti-OVA-Antikörpers bei unterschiedlichen Peptidkonzentrationen. Die Platten wurden mit 2 pmol/Kavität mit Streptavidin beschichtet. Abgebildet sind die Mittelwerte aus drei Experimenten mit den Messfehlern in Form der Standardabweichungen. Der unspezifische Signal, d.h., das durchschnittliche Signal ohne Peptid, ist durch eine gestrichelte Linie dargestellt.

Um unabhängig von den Schwankungen der Peptidsynthese zu sein, wurde für die folgenden ELISAs eine Konzentration von 1/1000 Spot pro Kavität gewählt. Das bedeutet dass in einer Peptidsynthese mit dem beschriebenen Verfahren parallel 1700 Peptidkonstrukte synthetisiert und mit jedem Konstrukt jeweils 1000 ELISAs durchgeführt werden können.

3.3 Nachweisgrenze des ELISAs

Die Sensitivität des Peptid-ELISAs war aus zwei Gründen von besonderem Interesse. Zum einen stehen meist nur relativ geringe Mengen von Serum- oder anderen Proben für die Versuche zur Verfügung. Zum anderen könnte der ELISA auch zur Epitopkartierung zum Nachweis von Antikörpern in niedrigen Konzentrationen (z.B. IgE in Stuhlproben) verwendet werden. Die Sensitivität kann mit der Nachweisgrenze des Assays beschrieben werden, d.h., der Antikörperkonzentration (bzw. Antikörpermenge), die sich gerade noch nachweisen lässt, also ein signifikant positives Signal liefert.

Wie eingangs bereits erwähnt, kann das Signal, welches ein Antikörper im ELISA liefert, unter anderem auch von der Dissoziationskonstante zum Peptid abhängen. Der Einfluss der Dissoziationskonstante wiederum wird wesentlich von der Peptidkonzentration

beeinflusst. Es ist also prinzipiell nicht möglich, die Nachweisgrenze allgemein für alle Antikörper oder Peptide anzugeben. Ebenso ist ein ELISA, der aufgrund einer besonders hohen Peptidkonzentration besonders empfindlich im Nachweis niedrig affiner Antikörper ist, nicht empfindlicher beim Nachweis stark bindender Antikörper, da bei hoch bindenden Antikörpern ohnehin fast 100% der Antikörper an ihr Ziel binden. Folglich ist die Sensitivität durch die Angabe einer Nachweisgrenze unzureichend beschrieben. Gleichwohl lassen sich verschiedene Verfahren durch die Angabe der Nachweisgrenze vergleichen.

Ermittelt wurde die Nachweisgrenze jeweils für die Bindung eines biotinylierten monoklonalen Maus anti-OVA-Antikörpers an ein Peptid aus der Ovalbuminsequenz (Aminosäuren Nr. 1-16; Sequenz: GSIG AASM EFCF DVFK). Die Entwicklung erfolgte über einen Peroxidase-markierten Zweitantikörper und mit Hilfe von TMB-Substrat.

Das Peptid wurde zunächst in der normalen, und danach in der Homotetramerform eingesetzt, wodurch gleichzeitig der signalverstärkende Effekt der Homotetramer-Peptide demonstriert werden sollte.

Dargestellt ist die Endpunkttitration, bei der die Entwicklung über einen mit Alkalischer Phosphatase markierten Zweitantikörper und über das kommerzielle Entwicklungssystem AMPLIQ erfolgte. Das AMPLIQ-Verstärkersystem basiert auf einer Umsetzung von NADPH zu NADH durch die Alkalische Phosphatase, und dann auf einer zyklischen Umsetzung von NADH mit Diaphorase und Alkoholdehydrogenase, wobei beim zyklischen Umsetzungsprozess Formazan entsteht, das sich optisch nachweisen lässt.

Der monoklonale Antikörper wurde in zwei überlappenden Verdünnungsreihen aufgetragen. Für alle Versuche wurden mehrere Negativkontrollen (ohne Antikörper) angelegt und daraus jeweils ein Cut-off berechnet. Der Cut-off war definiert als diejenige Signalintensität, bei der sich ein einzelner Messwert gerade noch signifikant positiv von den Negativkontrollen unterschied (t-Test, $p < 0,05$).

Alle Experimente wurden vierfach durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.5 dargestellt. Die Endpunkte sind gesondert in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Tab. 3.1: Endpunkte eines monoklonalen Maus anti-OVA-Antikörpers bei unterschiedlichen Entwicklungssystemen

	<i>pg/ml</i>	<i>amol/Kavität</i>	<i>Moleküle/Kavität</i>
<i>ohne Dendrimere TMB-Substrat</i>	25	12,5	ca. 7.500.000
<i>mit Dendrimeren TMB-Substrat</i>	6,25	3,13	ca. 1.900.000
<i>ohne Dendrimere AMPLIQ</i>	1,56	0,78	ca. 470.000

Es zeigte sich, dass bereits ohne Verwendung von Homotetramer-Peptiden mit TMB-Substrat der Antikörper noch in einer Konzentration 25 pg/ml nachgewiesen werden konnte. Durch die Homotetramer-Peptide lag die Nachweisgrenze um den Faktor 4 niedriger. Damit lag die Nachweisgrenze unter 2 Millionen Molekülen. Durch die Verwendung des zyklischen Diaphorase-Dehydrogenase-Systems würde die Nachweisgrenze zwar noch mal um den Faktor 4 verschoben. Leider produzierte dieses System beim messen von Serum- und Stuhlproben sehr hohe unspezifische Signale (Daten im Anhang) und wurde deshalb nicht weiter eingesetzt. Vergleich man die Signalintensitäten der Farbentwicklungen durch TMB-Substrat bei unverzweigten und verzweigten Peptiden abzüglich des unspezifischen Signals, d.h., abzüglich des mittleren Signals der Negativkontrollen, so ergab sich im Schnitt ein 8,8mal höheres Signal (Konfidenzintervall 3,1-14,5 ($p < 0,05$)).

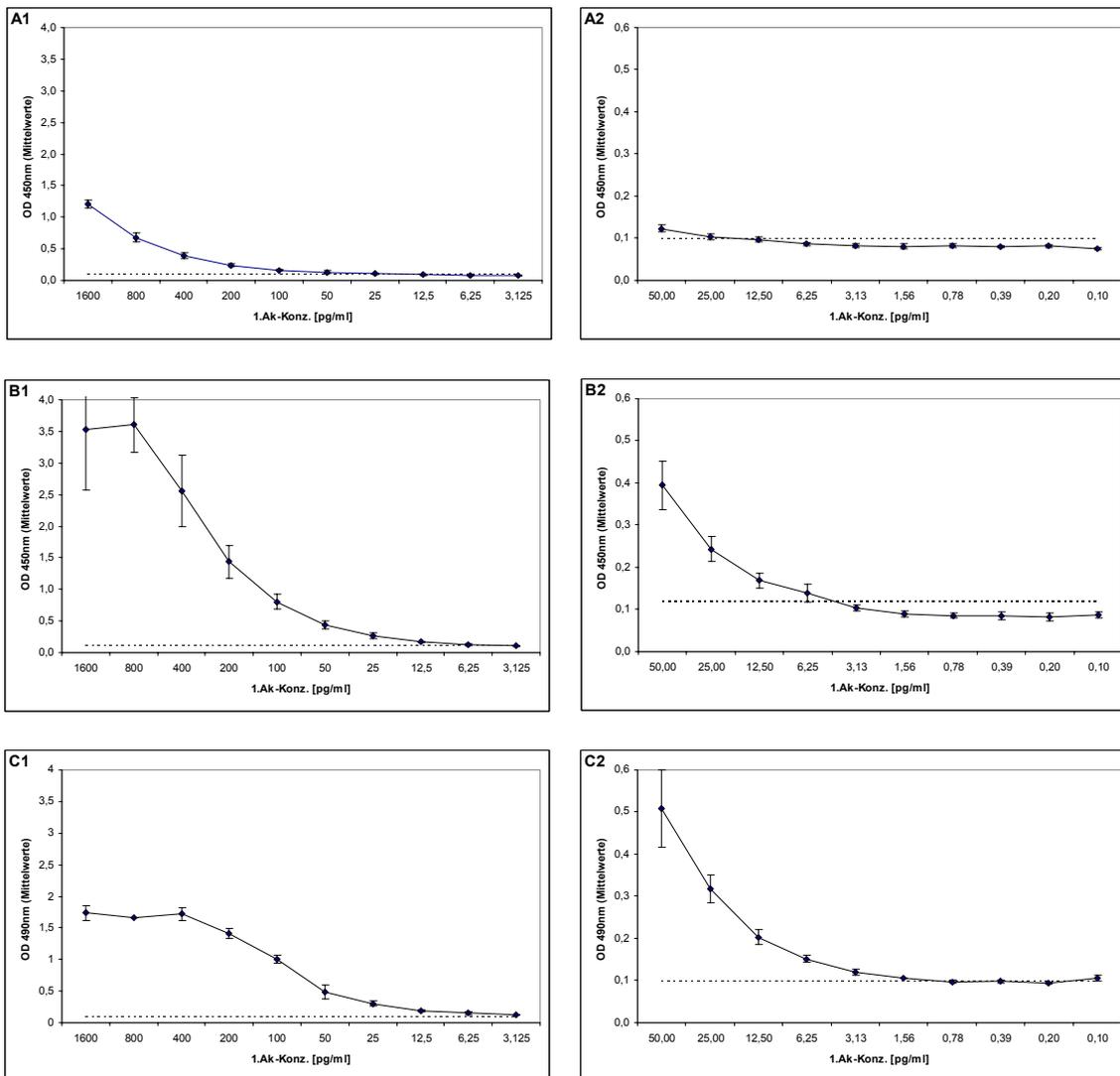


Abb. 3.5: Messungen der Nachweisgrenze eines monoklonalen Maus anti-OVA-Antikörpers mit unterschiedlichen Entwicklungssystem in jeweils zwei Verdünnungsreihen. A1 und A2: ohne Verwendung von Homotetramer-Peptiden, Entwicklung mit TMB-Substrat; B1 und B2: mit Verwendung von Homotetramer-Peptiden, Entwicklung mit TMB-Substrat; C1 und C2: ohne Verwendung von Homotetramer-Peptiden, Entwicklung mit AMPLIQ. Ergebnisse aus 4 Experimenten, Experimentelle Schwankungen sind als Standardabweichungen dargestellt. Cut-offs wurden für jedes Experiment einzeln berechnet und sind als gestrichelte Linie abgebildet.

3.4 Antikörperbindung der Immunisierungskandidaten

Um die Antikörperbindung der beiden Ovalbuminpeptide aus den vorherigen Studien zu validieren, wurden sie im Peptid-ELISA mit den Serum- bzw. Stuhlproben getestet, mit deren Hilfe die Peptide identifiziert worden waren und, die in den bisherigen Arbeiten die höchsten Signale geliefert hatten.

Die Antikörperbindung des Peptids OVA 103-118 (in der Ovalbuminsequenz Aminosäuren Nr. 103-118; Einbuchstaben-Code: SRLY AEER YPIL PEYL; bei Externest,

2000 und Gorris, 2001: „Peptid #52“) wurde mithilfe einer Serumprobe einer Maus, die zuvor subkutan mit Ovalbumin immunisiert worden war², validiert (Verdünnung 1:75). Das Peptid hatte bei Gorris (2001) in der natürlichen Form ein etwa 1,7mal höheres Signal als in der retro-inversen Form gezeigt.

Da die Peptide für nachfolgende Immunisierungsstudien mit einer Cystein-Markierung ausgestattet werden sollten, wurde außerdem die Antikörperbindung von Peptiden mit einem zusätzlichen Cystein am C- bzw. N-Terminus untersucht. Alle Peptide wurden in der Homotetramerform eingesetzt. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.6 dargestellt.

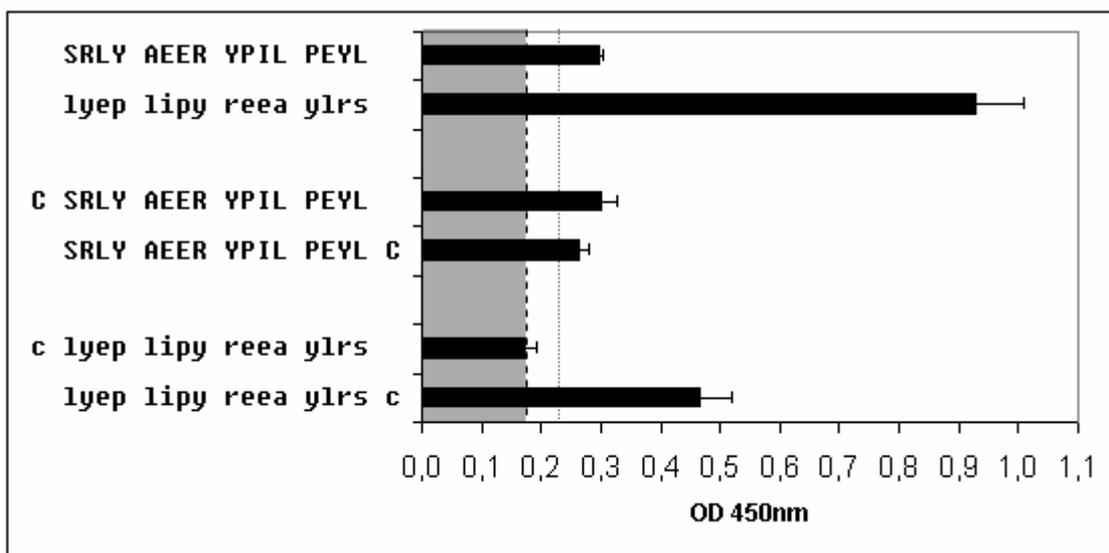


Abb. 3.6: Ergebnisse des Peptid-ELISAs mit dem Peptid OVA103-118 in verschiedenen Variationen mit einer polyklonale Serumprobe einer systemisch mit Ovalbumin immunisierten Maus. Peptidsequenzen wurden im Einbuchstaben-Code notiert, retro-inverse Aminosäuren wurden mit Kleinbuchstaben notiert. Der Mittelwert der Negativkontrollen (ohne Peptid) wurde durch eine gestrichelte Linie markiert, der Bereich unterhalb der mittleren Negativkontrollen wurde grau unterlegt, der Cut-off, d.h., der Wert, ab dem sich ein einzelner Messwert signifikant positiv von den Negativkontrollen unterscheidet, wurde durch eine gepunktete Linie dargestellt.

Das Peptid ohne zusätzliches Cystein erbrachte sowohl in der natürlichen als auch in der retro-inversen Form ein signifikant positives Signal ($p < 0,01$). Im Gegensatz zu der von Gorris (2001) beobachteten Signalintensität fiel das Signal des retro-inversen Peptids jedoch deutlich höher aus als das des natürlichen Peptids. Abzüglich des unspezifischen Signals ergab sich ein Faktor 6,20 (KI: 3,61 - 8,78; $p = 0,05$).

² In den Arbeiten von Externest (2000) und Gorris (2001) hatte diese Maus die #51.

Die Auswirkungen eines Cysteins am N- bzw. C-Terminus auf die Antikörperbindung hingen maßgeblich von der Art des Peptides ab.

Bei den natürlichen Peptiden ergab sich keine signifikante Signaländerung. Ein Cystein am N-Terminus bewirkte einen leichten Signalanstieg (Faktor 1,05; KI: 0,37 - 1,73; $p = 0,05$). Ein Cystein am C-Terminus bewirkte einen leichten Signalabfall (Faktor 0,72; KI: 0,33 - 1,11). Beide Formen lieferten ein signifikant positives Signal ($p < 0,01$).

Bei den retro-inversen Peptiden hatte das Cystein deutliche Effekte. Das Peptid mit einem Cystein am C-Terminus erbrachte ein signifikant kleineres Signal, als die retro-inverse Variante ohne Cystein (Faktor 0,38; KI: 0,17 - 0,60; $p = 0,05$). Das Signal war allerdings immer noch signifikant positiv ($p < 0,01$) und signifikant höher als das Signal des Peptids in der Normalform ($p < 0,05$). Das Cystein am N-Terminus lieferte kein signifikantes Signal mehr (mittlere OD: 0,171; mittlere OD ohne Peptid: 0,174) und war damit signifikant niedriger als das von beiden Peptiden ohne Cystein ($p < 0,01$).

Die Antikörperbindung für den anderen Immunisierungskandidaten OVA 349-364 (in der Ovalbuminsequenz Aminosäuren Nr. 349-364; Einbuchstaben-Code: VDAA SVSE EFRA DHPF; bei Externest, 2000 und Gorris, 2001: „Peptid #175“) konnte nicht gezeigt werden. Dieses Peptid hatte bei Externest, 2000 und Gorris, 2001 positive Signale bei Bindungstests mit Stuhlproben geliefert. Eine Überprüfung mit den Stuhlproben der Mäuse #8, #9 und #25 (intra-gastral immunisierte Mäuse) lieferte relativ hohe unspezifische Signale (OD bis zu 0,176), sodass eine potentielle Antikörperbindung möglicherweise im hohen Grundrauschen untergegangen sein könnte (Daten im Anhang). Andererseits ist es aufgrund des hohen unspezifischen Signals auch möglich, dass es sich um einen falsch positiven Kandidaten handelte.

3.5 Alanin-Replacement des Peptids OVA 103-118

Mithilfe des Alanin-Replacements sollten die Aminosäuren identifiziert werden, die für die Antikörperbindung essentiell notwendig sind. Das Alanin-Replacement wurde sowohl für das natürliche als auch für das retro-inverse Peptid durchgeführt. Die Peptide wurden grundsätzlich in der Homotetramerform eingesetzt. Als Antikörperprobe wurde die bereits getestete Serumprobe einer subkutan mit Ovalbumin immunisierten Maus³ verwendet. Für den Ala-Scan mit den natürlichen Peptiden wurde die Probe in einer

³ Es handelte sich ebenfalls um die Maus mit der #51 (Externest, 2000; Gorris, 2001).

Verdünnung von 1:75, für die retro-inversen Peptide von 1:150 eingesetzt. Alle Experimente wurden zweifach durchgeführt.

Die Ergebnisse des Alanin-Replacements mit natürlichen Peptiden sind in Abbildung 3.7 dargestellt.

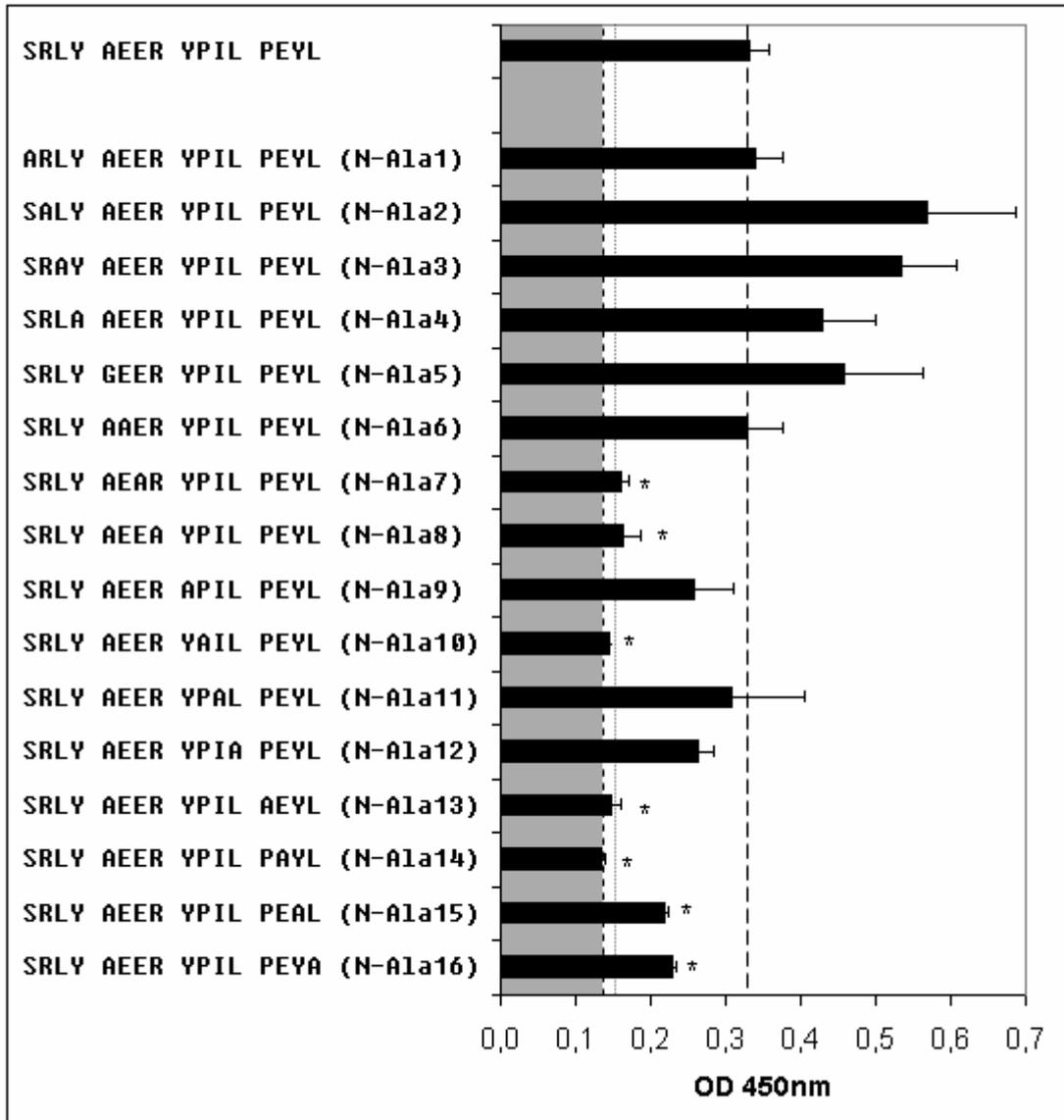


Abb. 3.7: Ergebnisse des Ala-Scans des Peptids OVA103-118 in der natürlichen Form. Peptidsequenzen wurden im Einbuchstaben-Code notiert. Der Mittelwert der Negativkontrollen (ohne Peptid) wurde durch eine kurz gestrichelte Linie markiert, der Bereich unterhalb der mittleren Negativkontrollen wurde grau unterlegt, der Cut-off, d.h., der Wert, ab dem sich ein einzelner Messwert signifikant positiv von den Negativkontrollen unterscheidet, wurde durch eine gepunktete Linie dargestellt. Das Signal des nicht-mutierten Peptids wurde durch eine lang gestrichelte Linie angegeben. Peptide, die sich im Signal signifikant vom nicht-mutierten Peptid unterschieden, wurden mit Sternen markiert (Zweiseitiger t-Test, $p < 0,05$).

Es fällt auf, dass das Ersetzen verschiedener Aminosäuren sehr unterschiedliche Auswirkungen auf die Antikörperbindung hatte. Bei den Peptiden N-Ala1 bis N-Ala6 hatte die Mutation eine leichte Signalsteigerung zur Folge, die jedoch nicht signifikant war (bei N-Ala3 wurde die Signifikanz mit $p = 0,066$ knapp verfehlt; bei N-Ala2 war $p = 0,112$). Auch bei den Peptiden N-Ala9, N-Ala11 und N-Ala12 hatte die Mutation keine signifikanten Auswirkungen auf die Antikörperbindung. Bei den Peptiden N-Ala7, N-Ala8, N-Ala10 und den Peptiden N-Ala13 bis N-Ala16 hatte die Mutation signifikante Reduktion der Signale ($p < 0,05$) zur Folge. Bei den Peptiden N-Ala10, N-Ala13 und N-Ala14 unterschied sich das Signal nicht mehr signifikant von den Negativkontrollen ($p < 0,05$). Aber auch bei den anderen Peptiden war der Signalverlust sehr deutlich. Das spezifische Signal⁴ reduzierte sich auf ca. 15% bei N-Ala7 und N-Ala8, bzw. auf 43% und 49% bei N-Ala15 und N-Ala16.

Aus den Daten ergab sich demnach, dass für die Antikörperbindung des Peptids die Aminosäuren #7, #8, #10, #13 und #14 von sehr hoher, und die Aminosäuren #15 und #16 von hoher Bedeutung sind.

Die Ergebnisse des Alanin-Replacements mit retro-inversen Peptiden sind in Abbildung 3.8 dargestellt.

Es fiel zunächst auf, dass im Vergleich zu den natürlichen Peptiden die Signale trotz der doppelt so hohen Serumverdünnung wesentlich stärker waren. Die Daten der beiden Ala-Scans wurden deshalb nicht mit dem gleichen Maßstab dargestellt.

Im Unterschied zu den natürlichen Peptiden lieferten alle Peptide ein signifikant positives Signal ($p < 0,05$). Dies war vermutlich auch dadurch bedingt, dass das mittlere Signal der Negativkontrollen aufgrund der höheren Serumverdünnung etwas niedriger war. Die Signalintensität der Peptide RI-Ala7, RI-Ala10, RI-Ala13, RI-Ala15 und RI-Ala16 hatten ein signifikant niedrigeres Signal als das nicht-mutierte retro-inverse Peptid. Sie zeigten einen Signalabfall auf unter 10% des Signals des nicht-mutierten Peptides. Den Aminosäuren #15 und #16 kam also bei der retro-inversen Form offenbar eine größere Bedeutung zu, als bei der natürlichen Form. Andererseits zeigten die an den Aminosäuren #8, #10 und #14 mutierten Peptide keinen signifikanten Signalrückgang.

⁴ Das spezifische Signal ist als das Signal abzüglich des durchschnittlichen Signals der Negativkontrollen NK zu verstehen. Das relative spezifische Signal errechnet sich also nach der Formel $(\text{Signal Peptid} - \emptyset \text{NK}) / (\text{Signal unmod. Peptid} - \emptyset \text{NK})$

Ein weiterer bedeutender Unterschied war, dass die Peptide RI-Ala2 und RI-Ala11 mit einem Anstieg des spezifischen Signals auf 183% bzw. 315% ein signifikant höheres Signal als die nicht-mutierte Form zeigten. Dieses Ergebnis lieferte die Basis für weitere Überlegungen durch gezielte Veränderungen der Aminosäuresequenz die Antikörperbindung zu erhöhen.

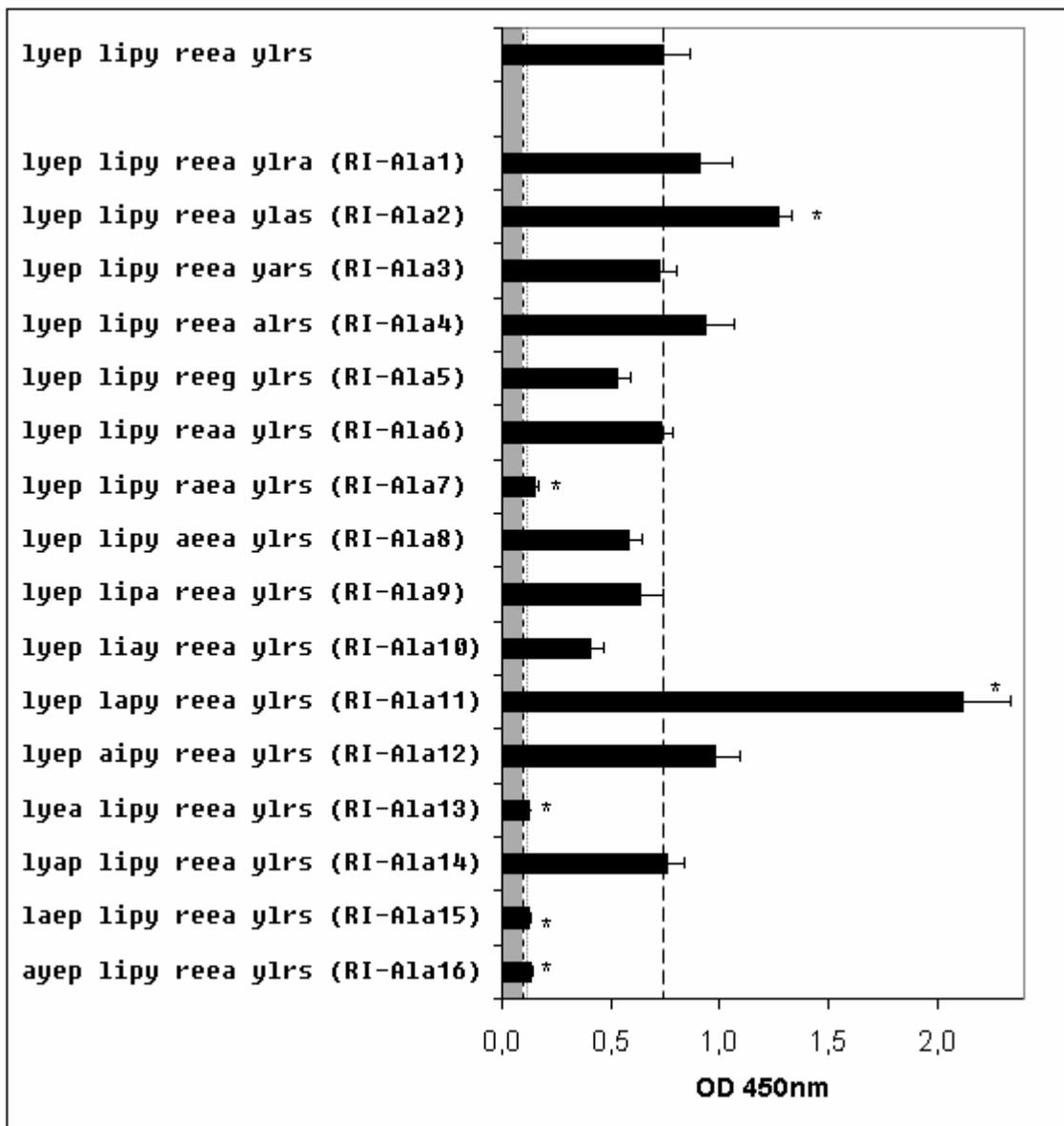


Abb. 3.8: Ergebnisse des Ala-Scans des Peptids OVA103-118 in der retro-inversen Form. Peptidsequenzen wurden im Einbuchstaben-Code notiert, die retro-inversen Aminosäuren wurden klein geschrieben. Der Mittelwert der Negativkontrollen (ohne Peptid) wurde durch eine kurz gestrichelte Linie markiert, der Bereich unterhalb der mittleren Negativkontrollen wurde grau unterlegt, der Cut-off, d.h., der Wert, ab dem sich ein einzelner Messwert signifikant positiv von den Negativkontrollen unterscheidet wurde durch eine gepunktete Linie markiert. Das Signal des nicht-mutierte Peptids wurde durch eine lang gestrichelte Linie markiert. Peptide, die sich im Signal signifikant vom nicht-mutierte Peptid unterschieden, wurden mit Sternen markiert (Zweiseitiger t-Test, $p < 0,05$).

3.6 Oberflächenlage der Aminosäuren im Protein

Die verschiedenen Aminosäuren des Peptids OVA103-118 zeigten im Ala-Scan sehr unterschiedliche Einflüsse auf die Antikörperbindung. Es sollte ermittelt werden, ob dieser Einfluss vor allem durch die Lage der Aminosäuren im Ovalbuminmolekül zu erklären ist. Da das Immunsystem des Versuchstiers die Antikörperbindung zur Bindung des Proteins optimiert, sollten theoretisch nur die Aminosäuren im Peptid einen direkten Einfluss auf die Bindung haben, deren Seitenketten im Protein tatsächlich zugänglich sind. Andererseits wäre es auch möglich, dass sich die Anwesenheit bestimmter Aminosäuren so wesentlich auf die Konformation der Peptidkette auswirkt, dass durch Austausch dieser Aminosäuren auch auf diesem Weg die Antikörperbindung abnehmen könnte.

Um die Zugänglichkeit der Seitenketten eines Proteins zu berechnen, wurde daher in dieser Arbeit ein Algorithmus entwickelt. Als Grundlage diente die Kristallstruktur des Ovalbumins (Stein et al., 1991; Swiss-Prot: P01012). Für die Berechnung der Oberflächenlage wurden nur die Daten der Untereinheit A des Ovalbuminmoleküls verwendet. Ein zu diesem Zweck entwickeltes Computerprogramm errechnete aus den Atomkoordinaten der Kristallstruktur die Zugänglichkeit der Seitenketten. Als Maß für die Zugänglichkeit wurde der maximale Winkel des Kegels um eine Seitenkette definiert, in dem sich keine weitere Aminosäure befand (siehe Abschnitt 2.6). Als binäres Maß wurde festgelegt, dass eine Seitenkette dann als zugänglich gilt, wenn dieser Winkel mindestens 90° beträgt.

Die Ergebnisse für die Zugänglichkeit aller Aminosäuren sind im Anhang angegeben. Die Zugänglichkeiten für die Aminosäuren des Peptides OVA103-118 sind in Tabelle 3.2 dargestellt. Zum Vergleich wurde außerdem die Veränderung des spezifischen Signals bei Austausch der entsprechenden Aminosäuren im Verhältnis zum nicht-mutierten Peptid dargestellt.

Es zeigte sich, dass von den 7 Aminosäuren, bei deren Austausch im Ala-Scan ein signifikanter Signalmrückgang beobachtet wurde, 6 Aminosäuren vom Algorithmus als frei zugänglich gewertet wurden. Lediglich Aminosäure 117 (relatives spezifisches Signal im Ala-Scan 43%) wurde als nicht zugänglich gewertet. Umgekehrt wurden alle Aminosäuren, bei deren Austausch kein signifikanter Signalmrückgang auftrat, als nicht zugänglich gewertet.

Es bestand also eine hochgradige Abhängigkeit zwischen der Zugänglichkeit einer Aminosäure und dem signifikanten Signalrückgang im Ala-Scan der natürlichen Peptide ($\text{Chi}^2 = 12,3$; $p < 0,001$).

Tab. 3.2: Ergebnisse der Berechnung der Winkel für die Zugänglichkeit der Aminosäuren des Peptids OVA103-118 aus den Atomkoordinaten der Kristallstruktur von Ovalbumin

Aminosäure	Winkel für die Zugänglichkeit	spezifisches Signal im Ala-Scan relativ zur unmodifizierten Form	
		natürliche Aminosäuren	retro-inverse Aminosäuren
103 (Ser)	5°	104%	126%
104 (Arg)	42°	220%	183%
105 (Leu)	10°	204%	97%
106 (Tyr)	13°	151%	131%
107 (Ala)	16°	165%	67%
108 (Glu)	68°	99%	99%
109 (Glu)	124° *	14% **	8% **
110 (Arg)	103° *	15% **	75%
111 (Tyr)	0°	63%	83%
112 (Pro)	129° *	5% **	48%
113 (Ile)	20°	88%	315%
114 (Leu)	48°	66%	137%
115 (Pro)	199° *	7% **	3% **
116 (Glu)	98° *	0% **	103%
117 (Tyr)	11°	43% **	3% **
118 (Leu)	99° *	49% **	5% **

Zum Vergleich wurde das Ergebnis des im Ala-Scan entsprechend mutierten Peptids als spezifisches Signal relativ zum nicht-mutierten Peptid mit aufgeführt.

* Aminosäure wird als frei zugänglich gewertet (Winkel $\geq 90^\circ$)

** signifikanter Signalunterschied im Ala-Scan ($p < 0,05$)

Die Abhängigkeit zwischen Aminosäurezugänglichkeit und Signalintensität war bei den retro-inversen Peptiden deutlich niedriger. Von den 4 Aminosäuren, deren Austausch einen signifikanten Signalabfall verursachte, wurden 3 als zugänglich gewertet. Von den 12 Aminosäuren, deren Austausch keinen signifikanten Signalrückgang verursachte, wurden 3 als zugänglich gewertet. Insgesamt ergab sich keine signifikante Abhängigkeit zwischen Aminosäurezugänglichkeit und Signalintensität ($\text{Chi}^2 = 3,2$; $p = 0,073$).

Aufgrund der hohen Korrelation der Aminosäurezugänglichkeit mit den Ergebnissen des Ala-Scans stellte sich die Frage, ob ein Peptid generell eine gewisse Anzahl an zugänglichen Aminosäuren besitzen muss, um als Epitop für einen Antikörper in Frage zu kommen. Wäre dies der Fall, würde sich bereits durch theoretische Überlegungen ein großer Teil an potentiellen Impfstoffkandidaten von vornherein ausschließen lassen.

Für die Peptide aus der Ovalbuminsequenz, die in einer bereits durchgeführten Epitopkartierung auf Antikörperbindung getestet wurden (Externest, 2000), wurde jeweils ermittelt, wie viele frei zugängliche Aminosäuren das entsprechende Peptid nach dem dargestellten Algorithmus besitzt. Im Anhang ist die vollständige Tabelle abgedruckt, in der für jedes Peptid die Anzahl der zugänglichen Seitenketten, die aus der Ovalbumin-Kristallstruktur berechnet wurden, sowie die Anzahl der Mäuseseren, bei denen das entsprechende Peptid in der Epitopkartierung IgG-Antikörper binden konnte (nach Externest, 2000).

Es zeigte sich, dass eine deutliche Korrelation zwischen der Anzahl freier Aminosäuren und der Antikörperbindung in der Epitopkartierung bestand. In Tabelle 3.3 wurde dieser Zusammenhang zwischen positiver Antikörperbindung und Anzahl zugänglicher Aminosäuren zusammengefasst. Zur Durchführung eines Chi²-Tests wurden 3 Klassen für die Anzahl positiv gemessener Mäuseseren und 4 Klassen für die Anzahl zugänglicher Aminosäuren gebildet.

Tab. 3.3: Zusammenfassung des Zusammenhangs zwischen Anzahl zugänglicher Aminosäuren und Anzahl positiv reagierender Mäuseseren in der Epitopkartierung für die Peptide der Ovalbuminsequenz.

		Anzahl Mäuseseren mit IgG-Bindung		
		0	1-2	≥3
Anzahl zugänglicher Seitenketten in OVA-Kristallstruktur	0	9	0	0
	1-2	21	14	0
	3-4	50	23	1
	≥ 5	29	32	7

Es besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen beiden Größen ($\chi^2 = 21,63$; $p < 0,01$). Bemerkenswerterweise reagierte kein Peptid mit mehr als drei Mäuseseren positiv, dass nicht mindestens 5 zugängliche Aminosäuren besaß. Es reagierte außerdem kein Peptid mit mehr als zwei Mäuseseren positiv, dass nicht mindestens 3 Aminosäuren besaß. (Die Tabelle ohne Klassenbildung ist im Anhang aufgeführt.)

Ein Peptid sollte also mindestens 5 an der Oberfläche liegende Aminosäuren enthalten, um Aussicht auf eine positive Erkennung in der Epitopkartierung, und damit Aussicht

auf Eignung als Peptidimpfstoff zu haben. Im Falle von Ovalbumin würde durch diese Erkenntnis die Menge der zu testenden Peptide auf etwa ein Drittel begrenzt.

3.7 Computerunterstützte Peptidoptimierung

Aus den Daten des Peptid-ELISAs ergab sich überraschenderweise, dass das retro-inverse Peptid offenbar eine höhere Antikörperbindung aufwies, als das natürliche Peptid (Steigerung des spezifischen Signals um den Faktor 6,2). Weiterhin zeigten zwei mutierte retro-inverse Peptide aus dem Ala-Scan eine Steigerung des spezifischen Signals um den Faktor 3,2 und damit eine signifikant höhere Antikörperbindung, als die nicht-mutierte Form. Es lag daher die Vermutung nahe, dass sich durch Veränderung eines Peptids die Antikörperbindung deutlich erhöhen lassen kann.

Die Steigerung des Signals kann man theoretisch dadurch erklären, dass die Konformation des Epitops innerhalb eines Peptids nicht exakt der Konformation innerhalb des Proteins entspricht. Beim Alanin-Replacement fiel auf, dass gerade diejenigen Aminosäuren, deren Seitenketten in der Kristallstruktur nicht nach außen zeigten, beim Ersetzen durch Alanin tendenziell eher eine Signalerhöhung lieferten. Es lag also die Hypothese nahe, dass ein Peptid ein Epitop eventuell besser imitieren würde, wenn nur die in der Kristallstruktur zugänglichen Aminosäuren genau wie in der Originalsequenz besetzt würden. Die anderen Aminosäurepositionen dagegen sollten möglichst so gewählt werden, dass die essentiellen Aminosäuren in eine Position kommen, die der Struktur des Epitops im Protein entspricht.

Solch eine Hypothese ist natürlich schon allein deswegen schwer zu belegen, weil die 3D-Struktur eines Peptids, bzw. seiner Mutanten, nicht ohne erheblichen Aufwand gemessen werden kann. Um dieses Problem zu umgehen, wurde mit einer Molecular-Modelling-Software versucht, die 3D-Struktur der Peptide vorherzusagen. Mithilfe des Programms sollten Peptidmutanten des Peptids OVA103-118 entwickelt werden, bei denen die für die Antikörperbindung essentiellen Aminosäuren mutmaßlich an optimierten Positionen liegen würden. Zur Kontrolle sollte in einem Peptid-ELISA gemessen werden, ob sich die Bindung der so entwickelten Mutanten tatsächlich verbessert hatte.

Zunächst wurde die 3D-Struktur der mutierten Peptide aus dem Ala-Scan mit Hilfe des Computerprogramms TINKER modelliert. Um ein quantitatives Maß für die Qualität der Ähnlichkeit mit dem Protein zu finden, wurde die Peptidstruktur mit der Kristall-

struktur des Ovalbumins verglichen. Es wurden die Positionsabweichungen der essentiellen Aminosäuren im Vergleich zur Position im Protein bestimmt, wobei als essentiell die Aminosäuren #7, #8, #10, #13 und #14 definiert wurden. Weiterhin wurden die Abweichungen der Winkel der Seitenketten sowie die Zugänglichkeit der Seitenketten bestimmt (siehe Abschnitt 2.8.2). Für diese Parameter sollte ermittelt werden, inwieweit sie als Indikator für eine optimale Imitierung der Struktur des Originalepitops in Frage kommen. Es wurde deshalb jeweils getestet, ob der entsprechende Parameter signifikant mit den Ergebnissen des Ala-Scans korrelierte. In den Test wurden ausschließlich die Ergebnisse der retro-inversen Peptide mit einbezogen, wobei die Peptide, in denen eine der Aminosäuren 7,8,10,13,14,15 oder 16 ersetzt wurden, aus den bereits beschriebenen Gründen (siehe Abschnitt 2.8.2) nicht berücksichtigt wurden. In Tabelle 3.4 sind die Korrelationskoeffizienten für alle Indikatoren sowie für den sich daraus ergebenden Punktwert (PW) aufgeführt.

Die optimierten Peptide sollten retro-inverse Peptide sein, da sie für mukosale Impfungen besser geeignet sein sollten als natürliche Peptide. Bei der Optimierung wurde deshalb ausschließlich auf die Daten des Ala-Scans mit den retro-inversen Peptiden zurückgegriffen. Weiterhin sollte auf jeden Fall sichergestellt sein, dass die Peptide alle für die Antikörperbindung essentiellen Aminosäuren enthielten. Die Peptide sollten deshalb in allen Positionen, die im Ala-Scan einen Signlrückgang um mindestens 20% gezeigt hatten, mit der Originalsequenz identisch sein. Damit konnten ausschließlich die Positionen #1-#6 sowie #11 variiert werden.

Bemerkenswert ist, dass die Positions- und Winkelabweichung von Aminosäure #14 eine negative Korrelation („in die falsche Richtung“) aufweist, d.h., je größer die Abweichung, desto höher das Signal. Dieser Effekt ist vermutlich dadurch bedingt, dass die für die Bindung essentielle Aminosäure bei einer großen Positionsabweichung besonders gut zugänglich war.

Im Idealfall müssten zwar alle Indikatoren in den Punktwert mit einbezogen werden, die eine signifikante positive Korrelation („in die richtige Richtung“) aufwiesen. Da die Winkelabweichungen jedoch nur einmal (d.h. nicht einzeln und als Summe) eingehen sollten, wurde schließlich nur die Gesamtwinkelabweichung in den Punktwert mit einbezogen. Es ergab sich folgender Punktwert:

$$PW = \frac{\text{Zugänglichkeit von Aminosäure \#14}}{(\text{Summe der Winkelabweichungen in Bogenmaß}) * (\text{Positionsabweichung von Aminosäure \#8})}$$

Tab. 3.4: Korrelationskoeffizienten für mögliche Indikatoren einer hohen Ähnlichkeit der Struktur eines Peptids mit der Struktur des Proteins

Indikator	Korrelationskoeffizient
Positionsabweichung Aminosäure #7	-
Positionsabweichung Aminosäure #8	-0,57 *
Positionsabweichung Aminosäure #10	-0,35
Positionsabweichung Aminosäure #13	-0,32
Positionsabweichung Aminosäure #14	0,73
Summe Positionsabweichungen	-0,15
Winkelabweichung Aminosäure #7	-0,07
Winkelabweichung Aminosäure #8	-0,46
Winkelabweichung Aminosäure #10	-0,63 *
Winkelabweichung Aminosäure #13	-0,56 *
Winkelabweichung Aminosäure #14	0,61
Summe Winkelabweichungen	-0,54 *
Zugänglichkeit Aminosäure #7	-0,13
Zugänglichkeit Aminosäure #8	-0,34
Zugänglichkeit Aminosäure #10	0,21
Zugänglichkeit Aminosäure #13	-0,12
Zugänglichkeit Aminosäure #14	0,85 *
Punktwert	0,93 *

* signifikante Korrelation ($p < 0,05$; einseitiger t-Test)

In Abbildung 3.9 zeigt das Punktdiagramm, in dem für alle einbezogenen Peptide auf der X-Achse der berechnete Punktwert und auf der Y-Achse das mittlere Signal im Ala-Scan aufgeführt sind, den Zusammenhang dieser beiden Parameter. Der Punktwert korrelierte deutlich mit den gemessenen Signalen ($KI = 93\%$; $p < 0,01$) und schien ein viel versprechender Marker für die Peptidoptimierung zu sein.

Zur Peptidoptimierung wurde in dieser Arbeit ein Evolutionsalgorithmus entwickelt, der in mehreren Zyklen ablief (siehe Abschnitt 2.7). In jedem Zyklus wurden dabei aus den bisher 5 besten Kandidaten zufällig 40 Mutanten erstellt, für die jeweils eine 3D-Struktur berechnet und bewertet wurde. Da einige der neu vorgeschlagenen Sequenzen bereits berechnet waren, wurden effektiv weniger als 40 neue Mutanten pro Zyklus berechnet. Der Anteil neuer Sequenzen bewegte sich zwischen 30 und 100%. Insgesamt wurden 1205 verschiedene Peptide in 50 Zyklen berechnet. Die Verbesserung des Punktwertes ging während des Optimierungsprozesses eher sprunghaft als kontinuierlich voran. Abbildung 3.10 zeigt die Entwicklung des maximalen Punktwertes über die 50 Zyklen. Der maximale Punktwert von 212 wurde nach 31 Zyklen erreicht und in den nachfolgenden Zyklen nicht mehr übertroffen.

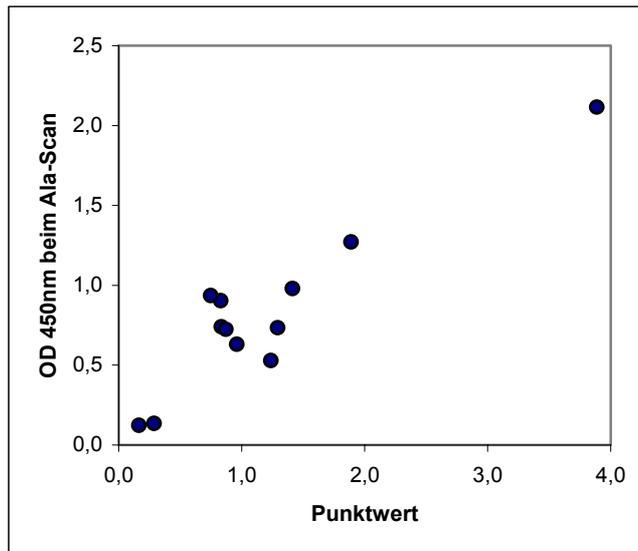


Abb. 3.9: Zusammenhang zwischen berechnetem Punktwert und gemessenen Signalen im Ala-Scan für ausgewählte RI-Peptide.

Schließlich wurden 6 Peptide ausgewählt, deren Bindung im Peptid-ELISA getestet werden sollte. Es handelte sich um die besten Kandidaten nach 1, 5, 10, 20, 30 und 40 bzw. 50 Zyklen Peptidevolution. Zum Vergleich wurde das Peptid aus dem Ala-Scan mit der höchsten Bindung mitgetestet.

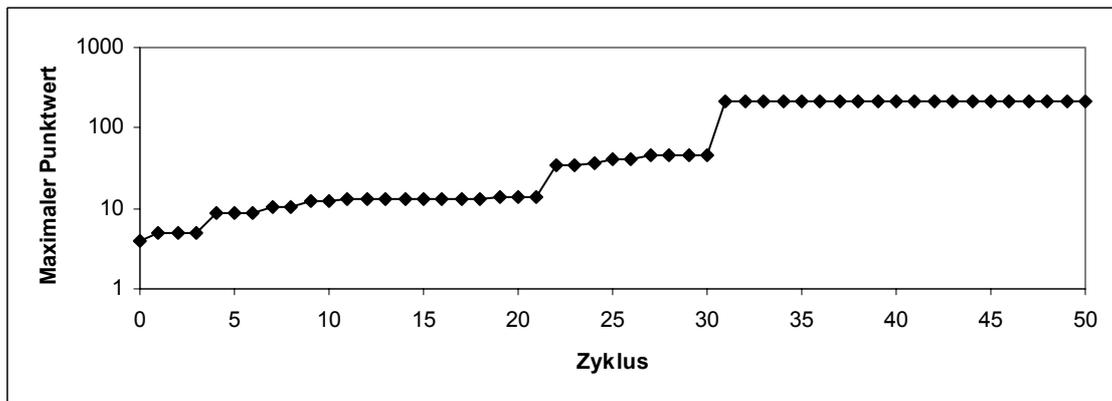


Abb. 3.10: Entwicklung des maximalen Punktwertes während der Peptidevolution.

Es wurde das bereits getestete Serum einer subkutan immunisierten Maus⁵ verwendet. Die Probe wurde für den ELISA 1:600 verdünnt. Die Ergebnisse des Peptid-ELISAs mit den entsprechenden Peptid-Sequenzen sind in Abbildung 3.11 dargestellt.

⁵ Es handelte sich ebenfalls um die Maus #51 (Externest, 2000; Gorris, 2001).

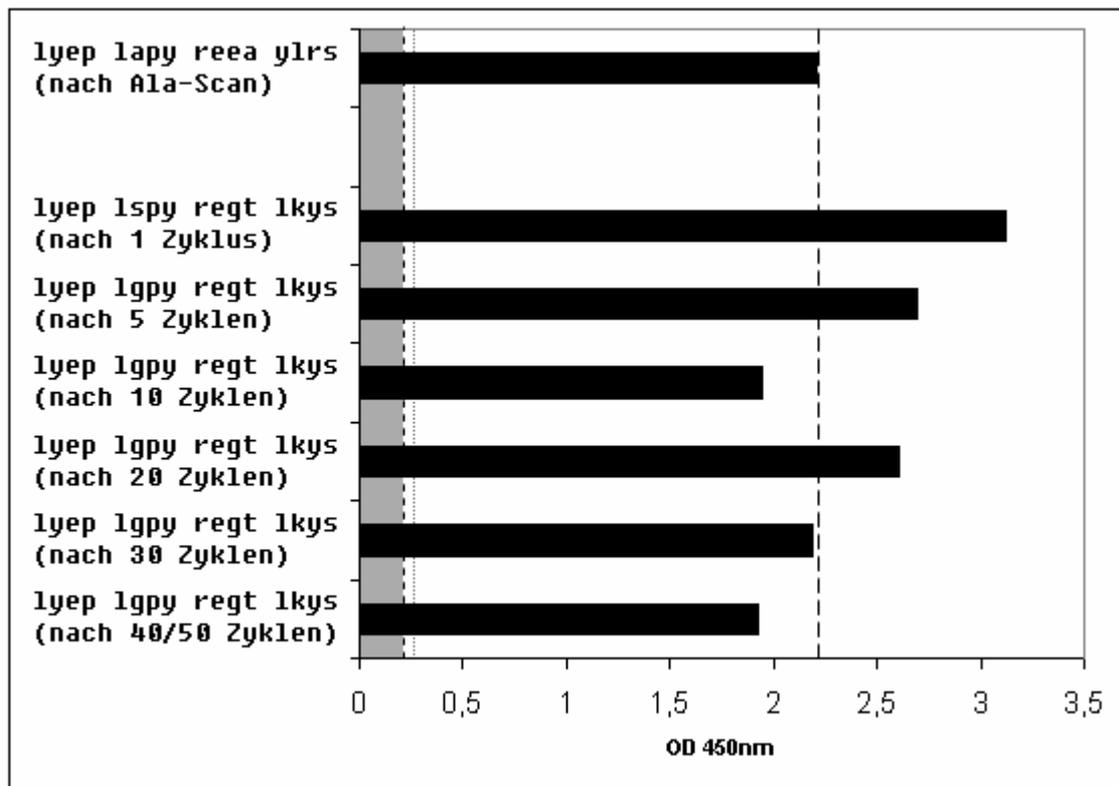


Abb. 3.11: Ergebnisse des ELISAs mit RI-Peptiden aus der *in silico* Evolution. Sequenzen wurden im Einbuchstaben-Code notiert. Der Mittelwert der Negativkontrollen wurde durch eine kurz gestrichelte Linie, der Cut-off ($p < 0,05$) durch eine gepunktete Linie und das Signal des besten Peptids aus dem Ala-Scan durch eine lang gestrichelte Linie markiert. Der Bereich unterhalb der mittleren Negativkontrollen wurde grau unterlegt.

Es ist zunächst bemerkenswert, dass keines der Peptide ein wesentlich schwächeres Signal zeigte, als das bisher beste Peptid aus dem Ala-Scan erbrachte. Alle vorgeschlagenen Kandidaten wiesen eine deutlich höhere Bindung als die des Peptids mit der Originalsequenz auf. Drei der getesteten Peptide zeigten sogar ein stärkeres Signal. Hierzu ist anzumerken, dass bei den drei besten Peptide das Signal im ELISA an der oberen Nachweisgrenze lag (in der Farbreaktion Präzipitation des Produktes aufgrund von besonders hohem Substratumsatzes), wodurch das gemessene Signal wahrscheinlich falsch zu niedrig sein könnte.

Es scheint also eher ein nachteilig, wenn die Originalsequenz an den nicht-essentiellen Aminosäuren unverändert belassen wird. Umgekehrt scheint es auf jeden Fall möglich zu sein, die Antikörperbindung eines bereits bekannten Epitops durch gezielte Mutationen an diesen Positionen zu verbessern.

4 Diskussion

4.1 Peptid-ELISA und Homotetramer-Peptide

Kombinatorische Peptidbibliotheken haben sich seit ihrer Einführung (Geysen et al., 1984) schnell zu einem wichtigen Werkzeug zur Erforschung biologischer Systeme entwickelt. Es gibt eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten für Peptidbibliotheken. So können mit ihrer Hilfe neue Liganden und Inhibitoren für unterschiedlichste Proteine gefunden werden, und z.B. neue Pharmaka entwickelt werden, sodass viele pharmazeutische Unternehmen eigene Programme für kombinatorische Peptidbibliotheken betreiben (Liu et al., 2003; Marx, 2005). Eine besonders wichtige Anwendung von Peptidbibliotheken ist die Epitopkartierung, d.h. der Test einer Vielzahl unterschiedlicher Peptide auf Bindung zu einem oder mehreren Antikörpern, insbesondere im Hinblick auf die Erforschung von Allergenen und die Entwicklung von Impfstoffen auf Peptidbasis.

Es existieren eine Reihe unterschiedlicher Techniken zur Herstellung von Peptidbibliotheken und eine Reihe von Assays zum Testen von Peptid-Bindungspartner-Interaktionen (Liu et al., 2003). So gibt es mehrere Möglichkeiten zur Generierung biologischer Bibliotheken (Hoess, 2001) und unterschiedliche Verfahren zur Herstellung synthetischer Peptidbibliotheken. Während biologische Bibliotheken den Vorteil haben, längere Peptidketten sowie parallel eine extrem große Zahl unterschiedlicher Peptide (bis zu einer Milliarde) liefern zu können, bieten synthetische Peptidbibliotheken den Vorteil, dass die Synthese der Peptidketten zielgerichteter und einfacher zu steuern ist. Insbesondere muss die synthetisierte Sequenz nicht im Nachhinein kontrolliert werden. Darüber hinaus sind synthetische Peptidbibliotheken nicht auf die 20 proteinogenen Aminosäuren beschränkt. Es besteht auch die Möglichkeit zur Einbindung von α -D-Aminosäuren oder gänzlich artifiziellen Aminosäuren.

Es existieren mehrere Techniken zur Herstellung von synthetischen Peptidbibliotheken, wie z.B. die Multi-Pin-Technik (Geysen et al., 1984), die Spot-Synthese (Frank, 1992) oder die Nanocan-Technik („Teebeutel-Methode“) (Houghten, 1985). Darüber hinaus wurden in den letzten Jahren auch bereits Anstrengungen zur Herstellung von Peptid-Microarrays unternommen (Falsey et al., 2001; Pellois et al., 2002; Bertone et al., 2005;

Kumaresan et al., 2006). Jede dieser Techniken besitzt Vor- und Nachteile, deren Bedeutung von der jeweiligen Fragestellung abhängt.

Während Multi-Pin- und Nanocan-Technik den Vorteil haben, dass die Peptidbindung in einem getrennten Assay getestet werden, konkurrieren mit der klassischen Variante der Spot-Peptidbibliothek, bei der die Peptide auf der Zellulose- oder Polypropylenmembran verbleiben, auf der sie synthetisiert werden, verschiedene Peptide um die angebotenen Bindepartner. Bei der Nanocan-Technik und der Spot-Synthese auf Zellulosemembranen werden im Vergleich zur Multi-Pin-Technik und zu Peptid-Microarrays relativ hohe Syntheseausbeuten erhalten. Bei der Spot-Synthese wiederum können erheblich mehr verschiedene Peptide parallel synthetisiert werden, als bei den anderen Verfahren. Eine Kombination dieser Techniken, die nur die jeweiligen Vorteile in sich vereinigt und so z.B. die rasche Synthese vieler Peptide und die individuelle Analyse ihrer Bindung an niedrigaffine Bindepartner erlauben würde, existiert bislang nicht.

Durch das hier beschriebene Verfahren, in dem mit Hilfe der Spot-Synthese abspaltbare Homotetramer-Peptide synthetisiert werden, die in einem getrennten Peptid-ELISA nachgewiesen werden können, kommt man diesem Ziel näher.

Durch die Verwendung der Spot-Synthese konnten mit relativ geringem Aufwand parallel bis zu 1700 verschiedene Peptide synthetisiert werden und die Menge jedes Peptides reicht für bis zu 1000 Immunoassays in dem gewählten Messaufbau.

Der Messaufbau, bei dem das in biotinylierte Peptid mittels einer Biotin-Streptavidin-Brücke an einer Mikrotiterplattenoberfläche immobilisiert wird, bietet darüber hinaus die Vorteile, dass sich die Peptide nicht durch Adsorption an der Mikrotiterplattenoberfläche umfalten und dass die angebotene Menge an Peptid nicht über die Syntheseausbeute sondern durch die Zahl der Biotinbindestellen auf der Platte kontrolliert wird, und so auch bei unterschiedlichen Syntheseausbeuten letztlich immer die gleiche Menge Peptid vorgelegt wird. Da der Immunoassay auf einer Mikrotiterplatte und nicht auf einer Zellulosemembran durchgeführt wurde, war zudem das unspezifische Signal relativ niedrig und war vor allem keinen hohen Schwankungen für unterschiedliche Peptidsequenzen unterworfen. Die Wahrscheinlichkeit für falsch positive Resultate konnte dadurch erheblich reduziert werden. Ein Nachteil des Messaufbaus auf der Mikrotiterplatte war die im Vergleich zur Zellulosemembran doch erheblich geringere Peptiddichte. Wie bereits dargelegt (siehe Abschnitt 1.6) wird hierdurch die Sensi-

tivität für Antikörper mit niedriger Affinität reduziert. Dieser Nachteil konnte jedoch durch den Einsatz von Homotetrameren deutlich kompensiert werden. Durch die Verwendung von Peptidtetrameren konnte die Nachweisgrenze eines Testantikörpers von etwa 12 amol auf 3 amol (von 25 pg/ml auf 6,25 pg/ml) reduziert werden. Es muss jedoch betont werden, dass sich die Sensitivität eines ELISAs nicht allein in der Nachweisgrenze ausdrücken lässt, weil das Signal deutlich von den Bindungseigenschaften beeinflusst wird und sich der verwendete Messaufbau gerade dadurch auszeichnet, dass auch eher schlecht bindende Antikörper nachweisbar sind. Ein hoch-bindender Antikörper hätte eine noch niedrigere Nachweisgrenze, würde aber mit und ohne Einsatz von Homotetrameren ähnlich gut erkannt werden (siehe Abschnitt 1.6).

Der zeitliche Aufwand bei dem hier verwendeten Messaufbau war im Vergleich zur klassischen Spot-Synthese, bei der die Antikörperbindung direkt auf der Zellulosemembran nachgewiesen wird, nur geringfügig erhöht. Die Peptide mussten nur in einem zusätzlichen Syntheseschritt von der Zellulosemembran abgespalten werden. Während aber die Peptidbibliotheken auf Zellulosemembranen nur für eine sehr begrenzte Anzahl an Immunoassays zur Verfügung stehen und zudem bei Mehrfachverwendung aufwändigen Waschschritten unterzogen werden müssen, sollte bei Verwendung des Peptid-ELISAs in Verbindung mit der Spot-Synthese die Ausbeute eines Spots auch für größere Immunisierungsstudien ausreichend sein.

Ein Nachteil des Peptid-ELISAs besteht in der eingeschränkten Sensitivität für schwache Antikörperbindungen. Eine Peptiddichte, die derjenigen auf den Zellulosemembranen vergleichbar wäre, ist auch bei Verwendung von Peptidtetrameren in einem ELISA praktisch nicht zu erreichen. Es muss allerdings hinterfragt werden, in wieweit der Nachweis schlecht bindender Antikörper überhaupt erwünscht ist. Insbesondere sollte bedacht werden, dass der klassische Assay auf der Zellulosemembran aufgrund der sehr hohen Peptidkonzentration nicht in der Lage ist, zwischen gut und sehr gut bindenden Antikörpern, bzw. Peptiden, zu unterscheiden. Welches Verfahren für das Testen einer Peptidbibliothek erwünscht ist, sollte daher anhand der konkreten Problemstellung entschieden werden.

Insgesamt ist der Peptid-ELISA im Vergleich zum Immunoassay auf der Zellulosemembran weniger sensitiv aber spezifischer. Aufgrund des relativ niedrigen unspezifischen Signals und der Trennung der Assays für die einzelnen Peptide, sind die Ergeb-

nisse zudem quantitativ besser zu interpretieren als bei dem bisherigen Verfahren. Der Peptid-ELISA ist dadurch bei der Durchführung einer Feinkartierung dem Immunoassay mit zellulosegebundenen Peptiden klar überlegen. In wieweit er auch bei der Durchführung einer Epitopkartierung das bisherige Verfahren ersetzen sollte, wird von der Problemstellung und ihren Randbedingungen abhängen.

4.2 Testen der Modellpeptide

In vorangegangenen Epitopkartierungen (Externest, 2000; Gorris, 2001) konnten zwei Peptide aus der Ovalbuminsequenz identifiziert werden, die sich als Modellantigene für eine orale Immunisierung von Mäusen gegen Ovalbumin eignen würden. Beide Peptide hatten in bereits durchgeführten Epitopkartierungen bereits Antikörper aus polyklonalen Proben von mit Ovalbumin immunisierten Mäusen binden können (Externest, 2000). Beide Peptide hatten außerdem auch in der retro-inversen Form eine hohe antikörperbindende Aktivität, d.h. zwischen 50% und 100% der Bindungsaktivität der jeweiligen natürlichen Peptides, gezeigt (Gorris, 2001). Es handelte sich um die bereits in Abschnitt 1.7 genannten Peptide

OVA 103-118: SRLY AEER YPIL PEYL

OVA 349-364: VDAA SVSE EFRA DHPF⁶

Das Peptid OVA103-118 hatte in seiner natürlichen Form mit einer Serumprobe und 6 Stuhlproben positiv reagiert, das Peptid OVA349-364 hatte mit insgesamt 5 Stuhlproben positiv reagiert. Alle Epitopkartierungen waren mit Hilfe der Spot-Synthesetechnik und einem Immunoassay direkt auf der Zellulosemembran durchgeführt worden.

In einer experimentellen Immunisierungsstudie mit diesen Peptiden und ihren retro-inversen Isoformen würden Mäuse mit Peptiden, die über eine Cystein-Brücke mit dem Adjuvans und T-Zellepitopträger Cholera toxin verbunden sind, immunisiert werden. Hierdurch könnte gezeigt werden, dass sich mit dem Verfahren der Epitopkartierung Peptidimpfstoffe gegen das Modellantigen Ovalbumin, bzw. in einem weiteren Schritt gegen beliebige Proteine, finden lassen. Wegen des relativ hohen unspezifischen Sig-

⁶ Benennung in Gorris 2001: Peptid #52 und Peptid #175

nals bei den Immunoassays auf Zellulosemembranen, sowie der nur eingeschränkten Vergleichbarkeit der Antikörperbindung verschiedener Peptide, wurde der bereits beschriebene Messaufbau entwickelt, in dem die Peptide einzeln auf einer Mikrotiterplatte getestet werden können. Ziel war es, die Antikörperbindung der beiden Peptide nach Möglichkeit zu bestätigen, sowie den Einfluss von einer Cystein-Markierung auf die Antikörperbindung zu untersuchen.

Mit Hilfe des Peptid-ELISAs konnte die Antikörperbindung des Peptids OVA103-118 bestätigt werden. Im Unterschied zu den vorangegangenen Studien (Externest, 2000; Gorris, 2001) wies das retro-inverse Peptid allerdings eine deutlich höhere Antikörperbindung als das natürliche Peptid auf. Das spezifische Signal, d.h. das Signal abzüglich des Durchschnittswertes der Negativkontrollen, war etwa um den Faktor 6 größer. Dies lässt sich nach dem Massenwirkungsgesetz als eine Zunahme der effektiven Affinitätskonstante K_a mindestens um den Faktor 6 erklären (Abschnitt 1.6). Dabei sollte betont werden, dass die effektive Affinitätskonstante eines festphasengebundenen Peptids nicht genau der Affinitätskonstante eines löslichen Peptids entsprechen muss.

Da in den vorangegangenen Studien das retro-inverse Peptid tendenziell eine eher niedrigere Antikörperbindung aufwies als das natürliche stellt sich die Frage nach dem überlegenen Verfahren. Die Ergebnisse der bisherigen Epitopkartierungen sollten jedoch gerade bezüglich des direkten Vergleichs der Bindung zweier Peptide aus mehreren Gründen kritisch hinterfragt werden. Zum einen kompetetieren bei den bisherigen Kartierungen auf der Zellulosemembran die Peptide um die gleichen Antikörper. Zum anderen reagiert Messergebnis viel sensibler auf Schwankungen der Peptidausbeute, als das hier verwendete Verfahren. Trotzdem konnten die Ergebnisse in soweit bestätigt werden, als das das Peptid OVA103-118 als guter Kandidat für eine Immunisierungsstudie mit retro-inversen Peptiden anzusehen ist.

Überraschenderweise hatte die Cystein-Markierung am C- bzw. N-Terminus des Peptids zum Teil erheblichen Einfluss auf die Antikörperbindung. Beim natürlichen Peptid änderte sich das spezifische Signal zwar nicht signifikant, beim retro-inversen Peptid verschwand die nachweisbare Antikörperbindung jedoch entweder ganz (Cystein am N-Terminus), oder wurde auf weniger als die Hälfte reduziert (Cystein am C-Terminus). Offensichtlich kann durch eine einzelne Aminosäure die Struktur eines Peptids erheblich geändert werden. Es ist außerdem auffällig, dass die Bindung des retro-inversen

Peptids offenbar sensibler auf diese Änderungen reagiert. Bei einer Immunisierungsstudie sollte daher erwogen werden, beispielsweise einen PEG-Abstandhalter in der Sequenz zwischen Peptid und Cystein-Markierung einzubauen, um einem möglicherweise nachteiligen Effekt des Cysteins auf die Konformation vorzubeugen.

Die Antikörperbindung des Peptids OVA349-364 konnte nicht bestätigt werden. Da das Peptid in den bisherigen Kartierungen ausschließlich Antikörper aus Stuhlproben binden konnte und die Stuhlproben naturgemäß ein höheres unspezifisches Signal erzeugen, müssen zwei Möglichkeiten zur Interpretation in Betracht gezogen werden. Zum einen ist es gut möglich, dass der hier vorgestellte Peptid-ELISA nicht sensitiv genug ist, um die in den vorherigen Arbeiten gemessene Antikörperbindung nachzuweisen. Aufgrund der deutlich höheren Peptiddichte auf der Zellulosemembran hat der klassische Immunoassay eine deutlich höhere Sensitivität beim Nachweis schlecht bindender Antikörper als der hier eingesetzte Peptid-ELISA. Da das nachgewiesene Signal des Peptids OVA103-118 mit der Serumprobe ein spezifisches Signal lieferte, das um den Faktor 2,3 über dem Cut-off lag, wäre es gut möglich, dass die Aktivität von anderen, schlechter bindenden Peptiden im Grundrauschen untergehen kann.

Andererseits ist es auch möglich, dass das Peptid OVA349-364 falsch positiv gemessen wurde. Als Negativkontrolle für die bisherige Epitopkartierung dienten 6 nicht immunisierte Mäuse. Die Stuhlproben dieser Mäuse wurden ebenfalls mit allen Peptiden getestet und produzierten zum Teil stark schwankende Signale⁷. Aus diesem Grund wurden für die verschiedenen Peptide die Cut-offs getrennt berechnet. Die Negativkontrollen lieferten bei Peptid OVA349-364 relativ niedrige Signale⁸, sodass die Mäuse mit relativ niedrigen Signalen als signifikant positiv gewertet wurden⁹. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Stuhlproben mit dem Peptid getestet, wobei die Stuhlproben in relativ hohen Konzentrationen eingesetzt werden mussten, sodass auf eine systematische Testung aller Proben verzichtet wurde. Allerdings lag das Signal der Stuhlprobe mit dem höchsten absoluten Signal fast genau im Bereich der parallel durchgeführten Negativkontrollen mit der gleichen Stuhlprobe ohne Peptid.

⁷ Mittelwerte der Negativkontrollen für alle Peptide lagen im Durchschnitt im Bereich von 9 PSL/mm², die Standardabweichung lag bei etwa 15 PSL/mm²

⁸ Der Cut-off für Peptid OVA349-364 lag bei ca. 4,1 PSL/mm²

⁹ Signale lagen bei den positiven Peptiden bei 15,0; 9,8; 7,4; 8,4 und 4,6 PSL/mm²

Aus diesem Grund kann die Frage, ob es sich bei dem Peptid OVA349-364 um einen falsch positiven Kandidaten in den früheren Studien oder einen falsch negativen Kandidaten in dieser Arbeit handelt, nicht abschließend geklärt werden. Die Eignung als Impfstoffkandidat sollte allerdings aufgrund dieser Ergebnisse hinterfragt werden.

4.3 Feinkartierung des Peptids OVA103-118

Mit Hilfe des Alanin-Replacements konnten diejenigen Aminosäuren des Peptids identifiziert werden, die für die Antikörperbindung essentiell waren. 6 der 16 Aminosäuren hatten nach Analyse der Kristallstruktur nach außen gerichtete Seitenketten. Alle 6 Aminosäuren waren essentiell für die Antikörperbindung, d.h., beim Ersetzen der entsprechenden Aminosäuren reduzierte sich die Antikörperbindung signifikant. Lediglich eine Aminosäure mit nach innen gerichteter Seitenkette war ebenfalls essentiell für die Antikörperbindung.

Dieses Ergebnis war überraschend. Es ist zwar grundsätzlich zu erwarten, dass nach außen gerichtete Seitenketten direkt mit dem Antikörper wechselwirken und deshalb die Bindefähigkeit des Peptides sensibel auf Modifikationen an diesen Aminosäuren reagiert. Es wäre allerdings zu erwarten gewesen, dass auch andere Aminosäuren ohne direkt an der Wechselwirkung mit dem Antikörper beteiligt zu sein, einen Einfluss auf die Konformation des Peptids haben können, und so die Bindefähigkeit des Peptides auch auf Modifikationen an anderen Stellen sensibel reagieren könnte. Im Falle des Peptides OVA103-118 scheint es so zu sein, dass entweder die 3D-Struktur des Peptids relativ wenig von der Aminosäuresequenz beeinflusst wird, oder aber dass, die Konformation des Epitops durch andere Faktoren, etwa durch Wechselwirkungen mit tiefer liegenden Proteinabschnitten beeinflusst wird. Da die tiefer liegenden Abschnitte nicht im Peptid enthalten sind, würde die Konformation des Peptids in der natürlichen Form nicht der Konformation des Epitops im Gesamtprotein entsprechen.

Bezüglich dieser Fragestellung ist es hilfreich, sich zwei verschiedene Modelle der Antigen-Antikörperreaktion vor Augen zu führen. Die klassische Ansicht modelliert die Reaktion als „Schlüssel-Schloss-Reaktion“. Allein aus der Metapher wird bereits die Vorstellung deutlich, dass sowohl Antikörper als auch Epitop eine fest vorgegebene Struktur haben, und beide Moleküle an bestimmten Stellen chemisch in Wechselwirkung treten. Ein anderes Modell betrachtet die Bindungsreaktion als einen so genannten

„induced fit“ (engl.: induzierte Passform). In diesem Modell ist die 3D-Struktur eines oder beider Bindungspartner relativ labil. Die beiden Partner hängen bei Erstkontakt zunächst nur an einer Stelle relativ locker zusammen. Ab diesem Zeitpunkt ändert sich die Struktur der Bindungspartner laufend und wird erst zu dem Zeitpunkt fest, in dem die anderen Abschnitte des Antigens bzw. Antikörpers in der richtigen Stellung zueinander stehen. Es ist natürlich davon auszugehen, dass kleine Moleküle, wie z.B. Peptide grundsätzlich eine labilere Struktur haben als größere Moleküle, wie z.B. Proteine. Das ist in sofern problematisch, weil es bedeuten würde, dass Peptide weniger spezifisch für bestimmte Antikörper sind. D.h., die Peptide sind sehr wohl in der Lage, Antikörper zu binden, die gegen das Gesamtprotein gerichtet sind. Als Vakzine würden sie allerdings eine Immunantwort auslösen, die weniger spezifisch gegen das entsprechende Protein gerichtet wäre.

Die Frage ist also, ob die Peptid-Antikörper-Bindung eher einer „Schlüssel-Schloss-Reaktion“ oder eher einem „induced fit“ entspricht. In beiden Fällen würden die Aminosäuren, deren Seitenketten direkt mit dem Antikörper in Berührung kommen, großen Einfluss auf die Stärke der Bindung haben. Es handelt sich hier um die Aminosäuren, deren Seitenketten im Protein nach außen gerichtet sind. Bei dem Modell der „Schlüssel-Schloss-Reaktion“ kommt außerdem der 3D-Struktur des Peptids eine entscheidende Rolle zu. Diese Struktur sollte sich dann durch die Aminosäuresequenz ergeben. D.h., das auch den nicht oberflächlich gelegenen Aminosäuren eine wichtige Rolle bei der Bindung zukommen würde. Das Ergebnis des Ala-Scans mit natürlichen Aminosäuren war aber, dass fast ausschließlich die Aminosäuren für die Bindung essentiell sind, die im Protein nach außen gerichtete Seitenketten besitzen. Dies Ergebnis spricht also eher für das Modell des „induced fit“ und weniger für die „Schlüssel-Schloss-Reaktion“.

Anders verhält es sich allerdings mit den Ergebnissen des Alanin-Replacements des retro-inversen Peptids. Zunächst ist es absolut überraschend, dass das retro-inverse Peptid eine höhere Antikörperbindung aufweist als die natürliche Form. Zudem wurde die Antikörperbindung des Peptids durch das Ersetzen einiger Aminosäuren sogar nochmals signifikant verbessert. Rechnet man die beiden Erhöhungen des spezifischen Signals zusammen, ergibt dies eine mutmaßliche Erhöhung der Affinität im Vergleich zum Peptid in der natürlichen Form um etwa den Faktor 20. Diese Verbesserung der Bindung wurde durch diejenigen Aminosäuren erreicht die im Protein keine oberflächlichen Sei-

tenketten besitzen. Die also nicht direkt mit dem Antikörper in Berührung kommen. Die Verbesserung der Bindung kann deshalb nur durch die günstigere 3D-Struktur des Peptids erklärt werden. Es ist also davon auszugehen, dass das retro-inverse Peptid, insbesondere in der mutierten Form, offenbar die Struktur des Originalepitops besser imitieren konnte als das natürliche Peptid. Im Gegensatz zu dem Ala-Scan mit natürlichen Peptiden haben hier offensichtlich auch die Aminosäuren, die nicht direkt mit dem Antikörper in Berührung kommen, bedeutenden Einfluss auf die Stärke der Bindung. Erstaunlicherweise kann sich also die Modifikation der Aminosäuresequenz und die Modifikation des Rückgrades günstig auf die 3D-Struktur des Peptids auswirken. Dieser Einfluss ist allerdings nicht mit dem Modell des „induced fit“ sondern nur mit einer „Schlüssel-Schloss-Reaktion“ zu erklären.

Weiterhin ist in diesem Zusammenhang bemerkenswert, dass das retro-inverse Peptid viel weniger sensibel auf Modifikationen der Aminosäuren mit oberflächlich gelegenen Seitenketten reagierte. Von den 6 Aminosäuren mit nach außen gerichteten Seitenketten erwiesen sich nämlich nur 3 als essentiell.

Möglicherweise ist für eine Bindung, die einem „induced fit“ entspricht, bei der also die 3D-Struktur des Peptids noch nicht genau zum Antikörper passt, die Bindung viel stärker davon abhängig, dass die oberflächlich gelegenen Aminosäuren dieselben sind wie im Protein. Wenn dagegen die Struktur des Peptids von vorn herein schon zum Antikörper passt, wie dies bei einer „Schlüssel-Schloss-Reaktion“ der Fall ist, bleibt die Bindung zum Antikörper selbst dann erhalten, wenn oberflächlich gelegene Aminosäuren mutiert werden.

Die Ergebnisse könnten also so interpretiert werden, dass die eher schwache Bindung (wie bei dem natürlichen Peptid), bei der die Richtige Konformation des Peptids erst zustande kommen muss, eher einem „induced fit“ entspricht, während für eine stabilere Bindung (wie bei dem mutierten retro-inversen Peptid), die „richtige“ Struktur des Peptids notwendig ist, was eher dem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ entspricht.

Dies hätte die Konsequenz, dass Peptide mit hoher Affinität viel besser ein Epitop imitieren können und viel effektiver die Bildung spezifischer Antikörper induzieren könnten. Peptide mit hoher Antikörperbindung würden sich also erheblich besser als Impfstoffkandidaten eignen. Im Optimalfall sollte also bereits bei der Epitopkartierung, in denen mögliche Peptid-Impfstoff-Kandidaten gefunden werden sollen, Peptide mit ho-

her Antikörperbindung ausgewählt werden. Der entsprechende Immunoassay muss dann natürlich so aufgebaut sein, das man gut zwischen Peptiden mit hoher und weniger hoher Antikörperbindung differenzieren kann, was bei den hier entwickelten Peptid-ELISA gegeben ist.

4.4 Möglichkeiten zur Peptidoptimierung

Ein gegen Peptid-Impfstoffe oft vorgebrachtes Argument ist, dass Peptide die Form der Epitope nur eingeschränkt imitieren können, insbesondere wegen der fehlenden diskontinuierlichen Proteinabschnitte, die sonst in Juxtaposition stehen würden (Murphy et al., 1996).

Es lässt sich jedoch nicht generell sagen, wie hoch die Ähnlichkeit zwischen Peptid und Protein sein muss, um einen effektiven Schutz gegen einen Erreger zu gewährleisten. Da die Antikörperproduktion einem Evolutionsprozess unterliegt, bedeutet eine Stimulation des Immunsystems durch einen ähnlichen Impfstoff in jedem Fall einen zeitlichen Vorteil für die Bekämpfung des Erregers. Ob dieser Vorsprung ausreichend ist, um einen adäquaten Schutz zu gewährleisten, hängt, abgesehen vom Immunstatus des infizierten Subjektes, vor allem von der Pathogenese des jeweiligen Erregers ab.

Die Epitopkartierung bietet natürlich die Möglichkeit, diejenigen Peptide auszuwählen, die eine besonders hohe Affinität aufweisen und damit die Form des Epitops besonders gut imitieren sollten. Offen bleibt, ob es darüber hinaus möglich ist, durch gezielte Modifikation des Peptids die strukturelle Ähnlichkeit zum Epitop weiter zu erhöhen, und damit einen effektiveren Schutz gegen mikrobielle Pathogene zu ermöglichen.

Durch die Feinkartierung konnte gezeigt werden, dass nicht alle Aminosäuren eines Peptids essentiell für die Antikörperbindung sind. Vielmehr scheinen nur einige Aminosäuren für die Bindung von Bedeutung zu sein, und zwar in aller Regel die Aminosäuren, deren Seitenketten auch in der Proteinstruktur von außen zugänglich sind. Die anderen Aminosäuren sind für die Antikörperbindung nicht unbedingt erforderlich. Ja sie können unter Umständen die Antikörperbindung sogar verschlechtern, was bedeutet, dass ein an diesen Stellen mutiertes Peptid eine höhere Bindung aufweisen könnte, als ein Peptid mit der Originalsequenz.

Folglich sollte sich tatsächlich die Antikörperbindung eines Peptids durch gezielte Modifikation optimieren lassen. Ein optimierter Kandidat würde die direkt an der Antikörper-

perbindung beteiligten Seitenketten, also die essentiellen Aminosäuren, von der Originalsequenz übernehmen. Die anderen Aminosäuren können prinzipiell frei gewählt werden, und zwar möglichst so, dass die essentiellen Aminosäuren in einer ähnlichen 3D-Struktur zueinander stehen wie im Protein.

Für eine Optimierung müssen also zwei Dinge festgelegt werden. Erstens muss bestimmt werden, welche Aminosäuren als essentiell gelten sollen und demnach nicht zu mutieren sein sollen. Diese Aminosäuren konnten mit Hilfe der Ergebnisse des Ala-Scans identifiziert werden. Ein alternativer Weg bestünde in der Auswertung der Kristallstruktur des Proteins und der Auswahl der Aminosäuren mit zugänglichen Seitenketten. Letztere Vorgehensweise hätte im Vergleich zur Auswertung des Ala-Scans nur eine weitere Aminosäure (sechs statt fünf) als essentiell definiert.

Zweitens muss ein effektiver Algorithmus gefunden werden, um eine Peptidsequenz zu erstellen, bei der das Peptid eine möglichst hohe Antikörperbindung erreicht. Da die Menge möglicher zu testender Peptide extrem hoch ist (das getestete Peptid war an 7 Positionen zu mutieren, es ergeben sich also $20^7 \approx 12,7$ Milliarden mögliche Peptidkandidaten), ist es nicht möglich, jeden potentiellen Kandidaten einzeln zu testen. Es sind verschiedene Ansätze denkbar, aus dieser Peptidmenge geeignete Kandidaten auszuwählen. So gibt es z.B. unterschiedliche Möglichkeiten für Immunoassays mit gemischten Peptidbibliotheken. Das Prinzip dieses Ansatzes besteht darin, dass zunächst ein Gemisch aus vielen unterschiedlichen Peptiden in einem Assay getestet werden. Diejenigen Gemische mit hoher Antikörperbindung werden ausgewählt. In mehreren Schritten werden dann die Peptidgemische immer weiter verkleinert, sodass man (im Optimalfall) schließlich zu einer einzigen Peptidsequenz mit hoher Bindung gelangt (Liu et al., 2003). Ein Problem dieses Verfahrens besteht allerdings darin, dass der zu testende Antikörper in einer großen Menge verfügbar sein muss. Für die Durchführung einer solchen Optimierungsstrategie sollte der Antikörper daher in monoklonaler Form vorliegen. Eine weitere Möglichkeit für die Peptidoptimierung besteht in einem Evolutionsalgorithmus (Voigt et al., 2001). Bei diesem Verfahren wird in mehreren Schritten die Peptidsequenz immer wieder leicht modifiziert, um eine schrittweise Verbesserung der Antikörperbindung zu erreichen. Die Evolution läuft dabei in mehreren Zyklen ab, wobei nach jedem Zyklus die bisher besten Peptide als Grundlage für die Generierung potentieller Kandidaten im nächsten Zyklus gewählt werden. Idealerweise werden bei

einem solchen Algorithmus die neuen Peptide nach jedem Zyklus in einem Immunoassay getestet, um die Antikörperbindung zu bewerten. Da eine Peptidsynthese mit dem hier beschriebenen Verfahren etwa 3 Wochen dauert, ist die Durchführung einer solchen Peptidevolution ein zuverlässiges jedoch sehr zeitaufwendiges Verfahren.

Rascher kommt man zum Ziel, wenn die Peptide nach jedem Zyklus mit Hilfe eines Computerprogramms bewertet werden. Dazu wurde ein Algorithmus entwickelt, mit dem sich -- ausschließlich aufgrund einer mit einem Computerprogramm berechneten 3D-Struktur des Peptids -- ein Maß für die Ähnlichkeit der Struktur mit dem Originalpeptid ermitteln ließ. Die Zeitersparnis bei diesem Verfahren bestand darin, dass die Peptide nicht nach jedem Evolutionszyklus synthetisiert werden mussten. Ausschließlich nach der Evolution wurde die Antikörperbindung der Peptide in einem Immunoassay kontrolliert. Ein potentieller Nachteil dieser Vorgehensweise ist jedoch die komplette Abhängigkeit des Prozesses von der Qualität des Algorithmus, der die 3D-Struktur der *in silico* generierten Peptide beschreibt.

Keines der *in silico* entwickelten Peptide lieferte ein wesentlich schlechteres Signal als die bis dahin besten Peptidkandidaten aus dem Ala-Scan. Das ist insofern bemerkenswert, weil die *in silico* entworfenen Peptide an 6 Positionen von der Originalsequenz abwichen, und bis dahin nicht gesichert war, ob durch den Algorithmus die Struktur der realen Peptide tatsächlich optimiert wird. Dieses Ergebnis bestätigt zum einen, dass eine Modifikation der Aminosäuresequenz an den nicht essentiellen Positionen in der Tat einen positiven Einfluss auf die Antikörperbindung haben kann. Zum anderen konnte die Antikörperbindung des besten Peptids aus dem Ala-Scan weiter gesteigert werden (auf bis zu 150%). Wird die bereits erhebliche Signalsteigerung des besten Peptids aus dem Ala-Scan verglichen mit dem natürlichen Peptid mit einbezogen, und rechnet man die Ergebnisse zusammen, so ergibt sich eine etwa 30fache Erhöhung der Antikörperbindung im Vergleich zum natürlichen Peptid., was auch aufgrund des relativ experimentellen Charakters der Berechnung und Bewertung der Struktur der Peptide bemerkenswert ist.

Es konnte also gezeigt werden, dass sich die Antikörperbindung, und damit die Strukturähnlichkeit eines Peptids zum Protein, durch Veränderung der Aminosäuresequenz mit Hilfe von Optimierungsalgorithmen prinzipiell verbessern lässt. Es bleibt offen, ob sich durch derart optimierte Peptide auch *in vivo* eine stärkere Immunantwort erzeugen

lässt. Dies ist auch deswegen von großer Bedeutung, weil häufig als Argument gegen Peptidimpfstoffe vorgebracht wird, dass die Peptide eine zu geringe Strukturähnlichkeit mit dem Zielprotein besitzen und darum keinen adäquaten Impfschutz erzeugen könnten. Optimierungsalgorithmen könnten Impfstoffe auf Peptidbasis generell aufwerten. Da die Benutzung retro-inverser Peptide darüber hinaus auch die Herstellung verdauungsresistenter Impfstoffe ermöglicht, könnte sich die Peptidoptimierung als sehr nützliches Werkzeug für die Entwicklung mukosaler Impfstoffe erweisen.

4.5 Ausblick

Mit dem in dieser Arbeit beschriebenen Verfahren lassen sich RI-Peptidmutanten für potenzielle Impfstoffe entwickeln, die eine erheblich höhere Antikörperbindung aufweisen als bisherige Impfstoffe. Für den Nachweis einer erhöhten Immunogenität *in vivo* steht der Beweis allerdings noch aus.

Hierzu muss eine Immunisierungsstudie durchgeführt werden, in der Versuchstiere mit den Peptiden tatsächlich geimpft werden. In einer solchen Studie könnten Tieren z.B. das Peptid OVA103-118 in der natürlichen sowie in der retro-inversen Form über unterschiedliche Routen (d.h. oral und parenteral) appliziert werden. Ein Immunisierungserfolg könnte dann über den Antikörpertiter gegen das Protein (hier: Hühner-Ovalbumin) gemessen werden. Auf diese Weise könnte erstens die Immunogenität des Peptids gezeigt werden. Zweitens wäre es Ziel einer solchen Studie, die Überlegenheit retro-inverser Peptide für orale Immunisierungen zu zeigen.

Von großem Interesse ist weiterhin, inwieweit sich die Immunogenität der Peptide durch Modifikationen der Aminosäuresequenz steigern lässt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mutierte Peptide eine im Vergleich zum natürlichen Peptid bis zu 30mal höhere Antikörperbindung aufweisen. Es ist daher zu untersuchen, ob diese Peptidmutanten *in vivo* einen höheren Antikörpertiter gegen das Protein und damit einen besseren Impfschutz auslösen können als die unmodifizierten Peptide. In dieser Arbeit wurden mehrere solcher Peptidmutanten vorgeschlagen, die eine potenziell höhere Immunogenität besitzen.

Andererseits könnten evtl. durch aufwendigere Verfahren Peptide mit noch höherer Immunogenität entwickelt werden. Denkbar wäre z.B. ein Evolutionsalgorithmus, ähnlich dem in dieser Arbeit vorgestellten, in dem die Peptide allerdings nicht durch einen

Computeralgorithmus bewertet, sondern nach jedem Zyklus *in vitro* mit polyklonalen Proben immunisierter Tiere getestet würden. Mit dem in dieser Arbeit entwickelten Immunoassay wäre die Durchführung einer solchen *in vitro* Evolution problemlos denkbar, da der Bedarf an Probenmaterial (also Serum- oder Stuhlproben) aufgrund der hohen Sensitivität sehr niedrig ist.

Schließlich sollten auf die gleiche Weise auch Peptidimpfstoffe gegen tatsächliche Pathogene entwickelt werden. Der Erfolg von Immunisierungen könnte so nicht nur in Form eines Antikörpertiters gegen ein Protein sondern auch durch den tatsächlichen Schutz vor Infektionskrankheiten belegt werden. Letztlich lässt sich erst auf diese Weise der Vorteil des hier beschriebenen Verfahrens zur Entwicklung neuer oraler Impfstoffe beweisen.

5 Literaturverzeichnis

Batista FD, Neuberger MS (1998)

Affinity dependence of the B cell response to antigen: a threshold, a ceiling, and the importance of off-rate.

Immunity 8(6): 751-9

Ben-Yedidia T, Beignon AS, Partidos CD, Muller S, Arnon R (2002)

A retro-inverso peptide analogue of influenza virus hemagglutinin B-cell epitope 91-108 induces a strong mucosal and systemic immune response and confers protection in mice after intranasal immunization.

Mol Immunol 39(5-6): 323-31

Bertone P, Snyder M (2005)

Advances in functional protein microarray technology.

FEBS J 272(21): 5400-11

Brandtzaeg P (1989)

Overview of the mucosal immune system.

Curr Top Microbiol Immunol 146: 13-25

Bray, A. M., Maeji, N. J. and Geysen, H. M. (1990)

The simultaneous multiple production of solution phase peptides: assessment of the Geysen method of simultaneous peptide synthesis.

Tetrahedron Lett 31: 5811-5814

Chorev M, Shavitz R, Goodman M, Minick S, Guillemin R (1979)

Partially modified retro-inverso-enkephalinamides: topochemical long-acting analogs in vitro and in vivo.

Science 204(4398): 1210-2

Clark CD, Palzkill T, Botstein D (1994)

Systematic mutagenesis of the yeast mating pheromone receptor third intracellular loop.

J Biol Chem 269(12): 8831-41

Cripps AW, Kyd JM, Foxwell AR (2001)

Vaccines and mucosal immunisation.

Vaccine 19(17-19): 2513-5

Curtiss R 3rd (1990)

Antigen delivery systems for analysing host immune responses and for vaccine development.

Trends Biotechnol 8(9): 237-40

Eisen HN, Siskind GW (1964)

Variations in Affinities of Antibodies during the Immune Response.

Biochemistry 3: 996-1008

Externest D (2000)

Analyse der Immunantworten und Erkennung linearer B-Zell Epitope nach mukosaler und systemischer Immunisierung: Neue Erkenntnisse für die Entwicklung von mukosalen Peptidvakzinen.

Dissertation, vorgelegt dem Fachbereich Biologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Falsey JR, Renil M, Park S, Li S, Lam KS (2001)

Peptide and small molecule microarray for high throughput cell adhesion and functional assays.

Bioconjug Chem 12(3): 346-53

Faria AM, Weiner HL (2005)

Oral tolerance.

Immunol Rev 206: 232-59

Frank R (1992)

Spot-synthesis – An easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support.

Tetrahedron. 48: 9217-9232

Frey A, Di Canzio J, Zurakowski D (1998)

A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays

J Immunol Methods 221(1-2):35-41

Frey A, Meckelein B, Externest D, Schmidt MA (2000)

A stable and highly sensitive 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays.

J Immunol Methods 233(1-2): 47-56

Geysen HM, Meloen RH, Barteling SJ (1984)

Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid.

Proc Natl Acad Sci U S A 81(13): 3998-4002

Gorris H (2001)

Analyse der Erkennung antigener Epitope und Epitopmimetika nach Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvantien.

Diplomarbeit, vorgelegt dem Fachbereich Biologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Guichard G, Benkirane N, Zeder-Lutz G, van Regenmortel MH, Briand JP, Muller S (1994)

Antigenic mimicry of natural L-peptides with retro-inverso-peptidomimetics.

Proc Natl Acad Sci U S A 91(21): 9765-9

Hoess RH (2001)

Protein design and phage display.
Chem Rev 101(10): 3205-18

Holmgren J, Czerkinsky C, Eriksson K, Mharandi A (2003)

Mucosal immunisation and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges.
Vaccine 21 Suppl 2: S89-95

Holmgren J, Czerkinsky C (2005)

Mucosal immunity and vaccines.
Nat Med 11(4 Suppl): S45-53

Houghten RA (1985)

General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids.
Proc Natl Acad Sci U S A 82(15): 5131-5

Jin L, Fendly BM, Wells JA (1992)

High resolution functional analysis of antibody-antigen interactions.
J Mol Biol 226(3):851-65

Kumaresan PR, Lam KS (2006)

Screening chemical microarrays: methods and applications.
Mol Biosyst 2(5): 259-70

Liu R, Enstrom AM, Lam KS (2003)

Combinatorial peptide library methods for immunobiology research.
Exp Hematol 31(1): 11-30

Magdolen V, Rettenberger P, Koppitz M, Goretzki L, Kessler H, Weidle UH, Konig B, Graeff H, Schmitt M, Wilhelm O (1996)

Systematic mutational analysis of the receptor-binding region of the human urokinase-type plasminogen activator.
Eur J Biochem 237(3): 743-51

Marx V (2005)

Watching peptide drugs grow up.
C&EN 83(11): 17-24

Mestecky J (1987)

The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions.
J Clin Immunol 7(4): 265-76

Murphy BR, Channock RM (1996)

Immunization Against Virus Disease

In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM et al. (Hrsg), Fields Virology, Lippincott-Raven, Philadelphia, Vol. I, 3rd ed., S. 467

Neutra MR, Kraehenbuhl JP (1992)

Transepithelial transport and mucosal defence I: the role of M cells.

Trends Cell Biol 2(5): 134-8

Pellois JP, Zhou X, Srivannavit O, Zhou T, Gulari E, Gao X (2002)

Individually addressable parallel peptide synthesis on microchips.

Nat Biotechnol 20(9): 922-6

Ponder JW, Richards FM (1987)

An efficient newton-like method for molecular mechanics energy minimization of large molecules

J Comput Chem 8: 1016-1024

RKI (1999)

Letzte Vakzine-assoziierte Poliomyelitis in Deutschland.

Epid Bull 1999; 12: 75–76

RKI (2005)

Empfehlungen der ständigen Impfkommision (STIKO) am Robert-Koch-Institut/ Stand Juli 2005.

Epid Bull 2005; 30: 257–72

Stein PE, Leslie AG, Finch JT, Carrell RW (1991)

Crystal structure of uncleaved ovalbumin at 1.95 Å resolution.

J Mol Biol 221(3): 941-59

Steward MW (1986)

Overview: Introduction to methods used to study the affinity and kinetics of antibody-antigen reactions.

In: Weir M (Hrsg) Handbook of Experimental Immunology, Blackwell scientific Publications, London, Vol I, 4th ed., S. 25

Swennen B, Levy J (2001)

Oral poliomyelitis vaccine: time to change?

Vaccine 19(17-19): 2262-7

Tengs TO, Adams ME, Pliskin JS, Safran DG, Siegel JE, Weinstein MC, Graham JD (1995)

Five-hundred life-saving interventions and their cost-effectiveness.

Risk Anal 15(3): 369-90

Voigt CA, Mayo SL, Arnold FH, Wang ZG (2001)

Computationally focusing the directed evolution of proteins.

J Cell Biochem Suppl 37: 58-63

WHO (1998)

The World Health Report 1998. Life in the 21st century – A vision for all, Genf, S. 64

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich bei dieser Arbeit direkt oder indirekt unterstützt haben:

... bei Prof. Dr. M. Alexander Schmidt für die Aufnahme in den Arbeitskreis, seine Unterstützung und seine konstruktive Kritik an dieser Arbeit.

... bei PD Dr. Andreas Frey für die sehr angenehme und intensive Betreuung dieser Arbeit und die vielen spannenden (nicht nur fachlichen) Diskussionen.

... bei Prof. Dr. Andreas Dress für die Beratung bei der mathematischen Modellierung der Peptidstrukturen.

... bei (jetzt Dr.) Hans-Heiner Gorris für die Unterstützung besonders während der ersten Zeit im Labor und die schöne Zeit in Münster und Borstel.

... bei (jetzt auch Dr.) Christian Buddenborg für die fachlichen Diskussionen, die schönen Angelabende und ganz besonders für die bunte Weihnachtsmischung.

... bei der gesamten IFI-Arbeitsgruppe in Münster und Laborgruppe Mukosaimmunologie in Borstel für die Unterstützung während der Arbeit.

... bei Melanie für die Geduld und die Unterstützung während des Zusammenschreibens und natürlich für das Korrekturlesen und die konstruktive Kritik.

... bei meinen Eltern, die mich all die Jahre unterstützt und motiviert haben.

Anhang

Tab. 6.1: Lineare Aminosäuresequenz des Ovalbumins aus Hühnereiern im Einbuchstabencode

1	6	11	16	21	26	31	36	41	46
GSIGA	ASMEF	CFDVF	KELKV	HHANE	NIFYC	PIAIM	SALAM	VYLGA	KDSTR
51	56	61	66	71	76	81	86	91	96
TQINK	VVRFD	KLPGF	GDSIE	AQCGT	SVNVH	SSLRD	ILNQI	TKPND	VYSFS
101	106	111	116	121	126	131	136	141	146
LASRL	YAEER	YPILP	EYLCQ	VKELY	RGGLE	PINFQ	TAADQ	ARELI	NSWVE
151	156	161	166	171	176	181	186	191	196
SQTNG	IIRNV	LQPSS	VDSQT	AMVLV	NAIVF	KGLWE	KAFKD	EDTQA	MPFRV
201	206	211	216	221	226	231	236	241	246
TEQES	KPVQM	MYQIG	LFRVA	SMASE	KMKIL	ELPFA	SGTMS	MLVLL	PDEVS
251	256	261	266	271	276	281	286	291	296
GLEQL	ESIIN	FEKLT	EWTSS	NVMEE	RKIKV	YLPRM	KMEEK	YNLTS	VLMAM
301	306	311	316	321	326	331	336	341	346
GITDV	FSSSA	NLSGI	SSAES	LKISQ	AVHAA	HAEIN	EAGRE	VVGSA	EAGVD
351	356	361	366	371	376	381			
AASVS	EEFRA	DHPFL	FCIKH	IATNA	VLFFG	RCVSP			

(Quelle: Stein et al., 1991; Swiss-Prot: P01012)

Tab. 6.2: Densitometrische Quantifizierung der Kopplung von Biocytin im Vergleich zu Alanin an ausgewählte Aminosäuren

	Biocytin		Alanin	
	Ø (PSL)	S (PSL)	Ø (PSL)	S (PSL)
PEG	58940	1454	67106	754
Gly	68260	1202	75132	798
Ala	64799	1385	73412	527
Leu	62147	2270	72226	1042
Asp	49747	3090	58958	3277
Ser	59722	2114	69056	1959
Lys	61841	1371	70500	1327
Pro	59589	2025	69748	1433
Cys	40365	3265	47476	3844
(Boc)Lys	69277	945	76840	762

PSL: willkürliche Einheit des Lumi-Imagers

S: Standardabweichung

Die Daten beziehen sich auf Abschnitt 3.1 (S. 52)

Methodenbeschreibung in Abschnitt 2.5 (S. 36)

Tab. 6.3: Densitometrische Quantifizierung der Kopplung von ausgewählten Aminosäuren an Biotin bzw. Alanin

	Biotin		Alanin	
	Ø (PSL)	S (PSL)	Ø (PSL)	S (PSL)
PEG	39545	1875	60273	1233
Gly	59848	1574	73401	1569
Ala	56433	1669	71494	866
Leu	57973	1297	72037	218
Asp	54795	1766	69004	1505
Ser	57246	2167	70864	1276
Lys	55397	1829	70053	1643
Pro	46285	1411	67707	1184
Cys	51228	1566	67102	778
(Boc)Lys	53194	1796	71006	572

PSL: willkürliche Einheit des Lumi-Imagers

S: Standardabweichung aus 4 Experimenten

Die Daten beziehen sich auf Abschnitt 3.1 (S. 52)

Methodenbeschreibung in Abschnitt 2.5 (S. 36)

Tab. 6.4: Nachweis eines monoklonalen Maus-anti-OVA-Antikörpers bei unterschiedlichen Beschichtungskonzentrationen von Ovalbumin auf hochbindende Polystyrolmikrotiterplatten

Beschichtungskonzentration (µg/ml)	Ø OD (490nm)	S (OD)
1,2	2,035	0,081
1,4	3,051	0,127
1,6	3,400	0,032
1,8	3,505	0,036
2,0	3,056	0,022
2,2	3,034	0,115
2,4	2,880	0,167

S: Standardabweichung aus 2 Experimenten

Die Daten beziehen sich auf Abschnitt 3.2.1 (S. 54)

Methodenbeschreibung in Abschnitt 2.6.3 (S. 39)

Tab. 6.5: Nachweis eines monoklonalen Maus-anti-OVA-Antikörpers bei unterschiedlichen Mengen applizierten Peptids auf Streptavidin-beschichteten hochbindende Polystyrolmikrotiterplatten

Anteil vom Spot [1/x]	Ø OD (450nm)	S
250	1,494	0,035
500	1,957	0,177
1000	2,760	0,129
2000	3,155	0,080
4000	2,155	0,056
8000	0,962	0,040
16000	0,348	0,021
32000	0,198	0,014
64000	0,131	0,004
128000	0,117	0,011
Ø Negativkontrollen	0,091	0,004
Cutoff (95%)	0,099	

S: Standardabweichung aus 2 Experimenten

Die Daten beziehen sich auf Abschnitt 3.2.2 (S. 56)

Methodenbeschreibung in Abschnitt 2.6.3 (S. 39)

Tab. 6.6: Messungen der Nachweisgrenze eines monoklonalen Maus-anti-OVA-Antikörpers mit unterschiedlichen Entwicklungssystem (zu Abb. 3.5, Diagramm A1, B1 und C1)

Antikörper-Konzentration (pg/ml)	Peptidmonomer Entwicklung mit TMB		Peptidtetramer Entwicklung mit TMB		Peptidmonomer Entwicklung mit AMPLIQ	
	Ø OD (450nm)	S	Ø OD (450nm)	S	Ø OD (490nm)	S
1600	1,203	0,062	3,526	0,948	1,735	0,117
800	0,680	0,074	3,601	0,433	1,659	0,004
400	0,392	0,053	2,557	0,570	1,721	0,102
200	0,241	0,022	1,437	0,257	1,405	0,079
100	0,162	0,012	0,803	0,119	1,007	0,064
50	0,132	0,018	0,436	0,064	0,488	0,107
25	0,106	0,011	0,270	0,044	0,305	0,040
12,5	0,089	0,003	0,167	0,012	0,189	0,022
6,25	0,084	0,005	0,124	0,011	0,150	0,023
3,125	0,080	0,002	0,107	0,008	0,125	0,004
Ø Neg.-Kontr. Cutoff (p=0,05)	0,081 0,098	0,010	0,088 0,117	0,017	0,092 0,099	0,004

S: Standardabweichung aus 4 Experimenten

Die Daten beziehen sich auf Abschnitt 3.3 (S. 57)

Methodenbeschreibung in Abschnitt 2.6.4 (S. 41)

Tab. 6.7: Messungen der Nachweisgrenze eines monoklonalen Maus-anti-OVA-Antikörpers mit unterschiedlichen Entwicklungssystem (zu Abb. 3.5, Diagramm A2, B2 und C2)

Antikörper-Konzentration (pg/ml)	Peptidmonomer Entwicklung mit TMB		Peptidtetramer Entwicklung mit TMB		Peptidmonomer Entwicklung mit AMPLIQ	
	Ø OD (450nm)	S	Ø OD (450nm)	S	Ø OD (490nm)	S
50	0,123	0,008	0,394	0,058	0,508	0,092
25	0,104	0,007	0,243	0,030	0,318	0,034
12,5	0,097	0,006	0,168	0,018	0,203	0,017
6,25	0,087	0,004	0,138	0,021	0,152	0,008
3,125	0,081	0,005	0,103	0,007	0,119	0,007
1,563	0,081	0,005	0,089	0,007	0,105	0,001
0,781	0,083	0,005	0,085	0,006	0,097	0,004
0,391	0,081	0,002	0,085	0,009	0,098	0,003
0,195	0,082	0,004	0,083	0,009	0,094	0,003
0,098	0,076	0,003	0,087	0,008	0,105	0,007
Ø Neg.-Kontr. Cutoff (p=0,05)	0,081 0,098	0,010	0,088 0,117	0,017	0,092 0,099	0,004

S: Standardabweichung aus 4 Experimenten

Die Daten beziehen sich auf Abschnitt 3.3 (S. 57)

Methodenbeschreibung in Abschnitt 2.6.4 (S. 41)

Tab. 6.8: Unspezifisches Signal des AMPLIQ-Entwicklungssystem mit Blutproben

	Ø OD (490 nm)	S
Beschichtung mit Streptavidin, Blocken mit BSA, Peptid OVA 1-16, Serumprobe von Maus #51, Phosphate-markierter Zweitantikörper	0,850	0,010
Beschichtung mit Streptavidin, Blocken mit BSA, ohne Peptid , Serumprobe von Maus #51, Phosphate-markierter Zweitantikörper	0,734	0,003
Keine Beschichtung mit Streptavidin , Blocken mit BSA, ohne Peptid , Serumprobe von Maus #51, Phosphate-markierter Zweitantikörper	0,727	0,011
Beschichtung mit Streptavidin, Blocken mit Tween , ohne Peptid , Serumprobe von Maus #51, Phosphate-markierter Zweitantikörper	1,316	0,010
Beschichtung mit Streptavidin, Blocken mit BSA, Peptid OVA 1-16, Serumprobe von Maus #56 , Phosphate-markierter Zweitantikörper	1,207	0,093
Beschichtung mit Streptavidin, Blocken mit BSA, ohne Peptid , Serumprobe von Maus #51, kein Phosphate-markierter Zweitantikörper	0,098	0,002
Negativkontrolle: Beschichtung mit Streptavidin, Blocken mit BSA, ohne Peptid, monoklonaler Maus anti-OVA-Ak , Phosphate-markierter Zweitantikörper	0,099	0,002
Positivkontrolle: Beschichtung mit Streptavidin, Blocken mit BSA, Peptid OVA 1-16, monoklonaler Maus anti-OVA-Ak , Phosphate-markierter Zweitantikörper	1,492	0,015

S: Standardabweichung aus 2 Messungen

Das Entwicklungssystem AMPLIQ produzierte hohe unspezifische Signale mit Serum- und Stuhlproben, es wurden verschiedene Experimente zur Ursachensuche durchgeführt. Alle Schritte des Peptid-ELISAs wurden testweise abgeändert (mit Ausnahme der Entwicklung). Die Ursache konnte letztendlich nicht gefunden werden. Jedoch zeigen die Ergebnisse, dass für die unspezifischen Signale eine Serumprobe (Maus #51 oder Maus #56) und der Phosphate-markierte Zweitantikörper notwendig sind. Offensichtlich enthielten die Serumproben einen Stoff, die den Phosphate-markierten Zweitantikörper unspezifisch an die Mikrotiterplatte binden konnten. Dies ist in sofern überraschend, weil der Peroxidase-markierte Zweitantikörper (für die Entwicklung mit TMB-Substrat) auch in Verbindung mit Serum- oder Stuhlproben nicht unspezifisch binden konnte.

Die Daten beziehen sich auf Abschnitt 3.3 (S. 57)

Methodenbeschreibung in Abschnitt 2.6.5 (S. 43)

Tab. 6.9: Ergebnisse des Peptid-ELISAs mit verschiedenen Variationen der Monomerform? des Peptides OVA103-118 und einer polyklonalen Serumprobe einer systemisch mit Ovalbumin immunisierten Maus

	Ø OD (450 nm)	S
SRLY AEER YPIL PEYL	0,297	0,008
lyep lipy reea ylrs	0,928	0,079
C SRLY AEER YPIL PEYL	0,300	0,027
SRLY AEER YPIL PEYL C	0,262	0,018
c lyep lipy reea ylrs	0,171	0,020
lyep lipy reea ylrs c	0,467	0,054
Hintergrund	0,174	0,008
Cutoff (95%)	0,201	

S: Standardabweichung aus 3 Experimenten

Die Daten beziehen sich auf Abschnitt 3.4 (S. 60)

Methodenbeschreibung in Abschnitt 2.6.5 (S. 43)

Tab. 6.10: Ergebnisse zum Test der Antikörperbindung der Monomerform? des Peptides OVA349-364 mit verschiedenen Stuhlproben

Stuhlverdünnung	OD (450nm)		
	Faeces von Maus #8	Faeces von Maus #9	Faeces von Maus #25
1:50	0,231	0,221	0,319
1:100	0,114	0,166	0,211
1:200	0,123	0,146	0,178
1:400	0,112	0,148	0,155
1:800	0,101	0,127	0,133
1:1600	0,084	0,102	0,111
1:3200	0,073	0,087	0,089
1:6400	0,084	0,073	0,076
1:12800	0,062	0,066	0,066
1:25600	0,060	0,062	0,064

Da bei diesem Test relativ viel Material verbraucht wurde, wurden die Tests zunächst nur einfach und ohne Negativkontrolle durchgeführt.

Die Daten beziehen sich auf Abschnitt 3.4 (S. 60)

Methodenbeschreibung in Abschnitt 2.6.5 (S. 43)

Tab. 6.11: Erkennung von OVA349-364 im Peptid-ELISA durch feacale IgA der Stuhlprobe, die das höchste Signal in der Titration lieferte

	OD (450nm)
OVA349-364 (natürliche Form, Monomer)	0,171
OVA349-364 (retro-inverse Form, Monomer)	0,176
Ø Negativkontrollen (ohne Peptid)	0,165
Standardabweichung der Negativkontrollen	0,011
Cutoff (95%)	0,201

Verwendet wurde die Stuhlprobe von Maus #25 (siehe. Tab 6.11)

Die Daten beziehen sich auf Abschnitt 3.4 (S. 60)

Methodenbeschreibung in Abschnitt 2.6.5 (S. 43)

Tab. 6.12: Ergebnisse des Ala-Scans des Peptids OVA103-118 in der natürlichen Form

	Ø OD (450nm)	STABW
SRLY AEER YPIL PEYL	0,330	0,026
ARLY AEER YPIL PEYL (N-Ala1)	0,339	0,037
SALY AEER YPIL PEYL (N-Ala2)	0,568	0,120
SRAY AEER YPIL PEYL (N-Ala3)	0,535	0,073
SRLA AEER YPIL PEYL (N-Ala4)	0,430	0,071
SRLY GEER YPIL PEYL (N-Ala5)	0,458	0,105
SRLY AAER YPIL PEYL (N-Ala6)	0,329	0,048
SRLY AEER YPIL PEYL (N-Ala7)	0,161	0,011
SRLY AEEA YPIL PEYL (N-Ala8)	0,163	0,025
SRLY AEER APIL PEYL (N-Ala9)	0,257	0,053
SRLY AEER YAIL PEYL (N-Ala10)	0,144	0,001
SRLY AEER YPAL PEYL (N-Ala11)	0,307	0,099
SRLY AEER YPIA PEYL (N-Ala12)	0,264	0,019
SRLY AEER YPIL AEYL (N-Ala13)	0,148	0,013
SRLY AEER YPIL PAYL (N-Ala14)	0,134	0,005
SRLY AEER YPIL PEAL (N-Ala15)	0,218	0,006
SRLY AEER YPIL PEYA (N-Ala16)	0,229	0,004
Hintergrund	0,133	0,008
Cutoff (95%)	0,152	

S: Standardabweichung aus 2 Experimenten

Die Daten beziehen sich auf Abschnitt 3.5 (S. 62)

Methodenbeschreibung in Abschnitt 2.6.5 (S. 43)

Tab. 6.13: Ergebnisse des Ala-Scans des Peptids OVA103-118 in der retro-inversen Form

	Ø OD (450nm)	S
lyep lipy reea ylrs	0,740	0,125
lyep lipy reea ylra (RI-Ala1)	0,905	0,150
lyep lipy reea ylas (RI-Ala2)	1,271	0,063
lyep lipy reea yars (RI-Ala3)	0,724	0,081
lyep lipy reea alrs (RI-Ala4)	0,935	0,136
lyep lipy reeg ylrs (RI-Ala5)	0,529	0,061
lyep lipy reaa ylrs (RI-Ala6)	0,734	0,051
lyep lipy raea ylrs (RI-Ala7)	0,153	0,011
lyep lipy aeea ylrs (RI-Ala8)	0,583	0,059
lyep lipa reea ylrs (RI-Ala9)	0,631	0,111
lyep liay reea ylrs (RI-Ala10)	0,406	0,066
lyep lapy reea ylrs (RI-Ala11)	2,115	0,225
lyep aipy reea ylrs (RI-Ala12)	0,979	0,117
lyea lipy reea ylrs (RI-Ala13)	0,122	0,003
lyap lipy reea ylrs (RI-Ala14)	0,757	0,078
laep lipy reea ylrs (RI-Ala15)	0,123	0,007
ayep lipy reea ylrs (RI-Ala16)	0,136	0,002
Hintergrund	0,102	0,005
Cutoff (95%)	0,113	

S: Standardabweichung aus 2 Experimenten

Die Daten beziehen sich auf Abschnitt 3.5 (S. 62)

Methodenbeschreibung in Abschnitt 2.6.5 (S. 43)

Tab. 6.14: Zugänglichkeit aller Aminosäuren von Ovalbumin, Untereinheit A (zu Kapitel 3.6)

Aminosäure			Aminosäure			Aminosäure			Aminosäure		
#	Code	freier Winkel									
#1	Gly	0°	#51	Thr	131°	#101	Leu	9°	#151	Ser	88°
#2	Ser	50°	#52	Gln	22°	#102	Ala	14°	#152	Gln	3°
#3	Ile	12°	#53	Ile	9°	#103	Ser	5°	#153	Thr	9°
#4	Gly	0°	#54	Asn	75°	#104	Arg	42°	#154	Asn	28°
#5	Ala	72°	#55	Lys	125°	#105	Leu	10°	#155	Gly	0°
#6	Ala	5°	#56	Val	30°	#106	Tyr	13°	#156	Ile	2°
#7	Ser	6°	#57	Val	3°	#107	Ala	16°	#157	Ile	8°
#8	Met	40°	#58	Arg	6°	#108	Glu	68°	#158	Arg	119°
#9	Glu	73°	#59	Phe	7°	#109	Glu	124°	#159	Asn	127°
#10	Phe	8°	#60	Asp	110°	#110	Arg	103°	#160	Val	11°
#11	Cys	25°	#61	Lys	137°	#111	Tyr	0°	#161	Leu	6°
#12	Phe	21°	#62	Leu	2°	#112	Pro	129°	#162	Gln	61°
#13	Asp	5°	#63	Pro	67°	#113	Ile	20°	#163	Pro	171°
#14	Val	9°	#64	Gly	0°	#114	Leu	48°	#164	Ser	186°
#15	Phe	9°	#65	Phe	8°	#115	Pro	199°	#165	Ser	4°
#16	Lys	97°	#66	Gly	0°	#116	Glu	98°	#166	Val	42°
#17	Glu	8°	#67	Asp	71°	#117	Tyr	11°	#167	Asp	132°
#18	Leu	7°	#68	Ser	160°	#118	Leu	99°	#168	Ser	155°
#19	Lys	14°	#69	Ile	27°	#119	Gln	118°	#169	Gln	124°
#20	Val	35°	#70	Glu	12°	#120	Cys	28°	#170	Thr	15°
#21	His	1°	#71	Ala	111°	#121	Val	17°	#171	Ala	21°
#22	His	5°	#72	Gln	103°	#122	Lys	124°	#172	Met	15°
#23	Ala	150°	#73	Cys	11°	#123	Glu	19°	#173	Val	12°
#24	Asn	102°	#74	Gly	0°	#124	Leu	32°	#174	Leu	16°
#25	Glu	20°	#75	Thr	149°	#125	Tyr	14°	#175	Val	21°
#26	Asn	33°	#76	Ser	34°	#126	Arg	14°	#176	Asn	7°
#27	Ile	25°	#77	Val	117°	#127	Gly	0°	#177	Ala	28°
#28	Phe	9°	#78	Asn	108°	#128	Gly	0°	#178	Ile	6°
#29	Tyr	6°	#79	Val	6°	#129	Leu	13°	#179	Val	25°
#30	Cys	17°	#80	His	4°	#130	Glu	8°	#180	Phe	8°
#31	Pro	17°	#81	Ser	113°	#131	Pro	88°	#181	Lys	104°
#32	Ile	24°	#82	Ser	26°	#132	Ile	4°	#182	Gly	0°
#33	Ala	25°	#83	Leu	3°	#133	Asn	111°	#183	Leu	77°
#34	Ile	19°	#84	Arg	13°	#134	Phe	4°	#184	Trp	8°
#35	Met	13°	#85	Asp	108°	#135	Gln	64°	#185	Glu	41°
#36	Ser	6°	#86	Ile	8°	#136	Thr	157°	#186	Lys	13°
#37	Ala	20°	#87	Leu	5°	#137	Ala	132°	#187	Ala	116°
#38	Leu	31°	#88	Asn	33°	#138	Ala	38°	#188	Phe	11°
#39	Ala	13°	#89	Gln	33°	#139	Asp	140°	#189	Lys	46°
#40	Met	7°	#90	Ile	8°	#140	Gln	115°	#190	Asp	119°
#41	Val	8°	#91	Thr	4°	#141	Ala	14°	#191	Glu	86°
#42	Tyr	8°	#92	Lys	107°	#142	Arg	26°	#192	Asp	17°
#43	Leu	20°	#93	Pro	164°	#143	Glu	120°	#193	Thr	24°
#44	Gly	0°	#94	Asn	20°	#144	Leu	39°	#194	Gln	69°
#45	Ala	5°	#95	Asp	144°	#145	Ile	20°	#195	Ala	156°
#46	Lys	83°	#96	Val	28°	#146	Asn	73°	#196	Met	12°
#47	Asp	77°	#97	Tyr	9°	#147	Ser	110°	#197	Pro	95°
#48	Ser	102°	#98	Ser	91°	#148	Trp	10°	#198	Phe	7°
#49	Thr	16°	#99	Phe	7°	#149	Val	32°	#199	Arg	88°
#50	Arg	62°	#100	Ser	18°	#150	Glu	109°	#200	Val	72°

Aminosäure		freier									
#	Code	Winkel									
#201	Thr	134°	#251	Gly	0°	#301	Gly	0°	#351	Ala	100°
#202	Glu	80°	#252	Leu	15°	#302	Ile	9°	#352	Ala	102°
#203	Gln	80°	#253	Glu	122°	#303	Thr	150°	#353	Ser	97°
#204	Glu	52°	#254	Gln	78°	#304	Asp	30°	#354	Val	2°
#205	Ser	81°	#255	Leu	6°	#305	Val	5°	#355	Ser	159°
#206	Lys	4°	#256	Glu	16°	#306	Phe	19°	#356	Glu	28°
#207	Pro	146°	#257	Ser	109°	#307	Ser	116°	#357	Glu	58°
#208	Val	12°	#258	Ile	32°	#308	Ser	185°	#358	Phe	19°
#209	Gln	67°	#259	Ile	7°	#309	Ser	96°	#359	Arg	129°
#210	Met	71°	#260	Asn	127°	#310	Ala	7°	#360	Ala	7°
#211	Met	12°	#261	Phe	12°	#311	Asn	49°	#361	Asp	94°
#212	Tyr	106°	#262	Glu	159°	#312	Leu	13°	#362	His	32°
#213	Gln	17°	#263	Lys	19°	#313	Ser	112°	#363	Pro	42°
#214	Ile	23°	#264	Leu	5°	#314	Gly	0°	#364	Phe	9°
#215	Gly	0°	#265	Thr	55°	#315	Ile	15°	#365	Leu	15°
#216	Leu	142°	#266	Glu	100°	#316	Ser	9°	#366	Phe	11°
#217	Phe	5°	#267	Trp	9°	#317	Ser	156°	#367	Cys	9°
#218	Arg	49°	#268	Thr	4°	#318	Ala	12°	#368	Ile	17°
#219	Val	8°	#269	Ser	101°	#319	Glu	172°	#369	Lys	20°
#220	Ala	12°	#270	Ser	113°	#320	Ser	93°	#370	His	8°
#221	Ser	78°	#271	Asn	88°	#321	Leu	10°	#371	Ile	52°
#222	Met	7°	#272	Val	14°	#322	Lys	30°	#372	Ala	71°
#223	Ala	133°	#273	Met	11°	#323	Ile	6°	#373	Thr	8°
#224	Ser	99°	#274	Glu	135°	#324	Ser	14°	#374	Asn	62°
#225	Glu	4°	#275	Glu	115°	#325	Gln	23°	#375	Ala	19°
#226	Lys	90°	#276	Arg	53°	#326	Ala	6°	#376	Val	16°
#227	Met	9°	#277	Lys	60°	#327	Val	20°	#377	Leu	14°
#228	Lys	12°	#278	Ile	7°	#328	His	10°	#378	Phe	10°
#229	Ile	7°	#279	Lys	109°	#329	Ala	21°	#379	Phe	16°
#230	Leu	5°	#280	Val	8°	#330	Ala	6°	#380	Gly	0°
#231	Glu	55°	#281	Tyr	65°	#331	His	14°	#381	Arg	44°
#232	Leu	14°	#282	Leu	6°	#332	Ala	12°	#382	Cys	7°
#233	Pro	109°	#283	Pro	17°	#333	Glu	106°	#383	Val	8°
#234	Phe	2°	#284	Arg	105°	#334	Ile	13°	#384	Ser	85°
#235	Ala	74°	#285	Met	6°	#335	Asn	86°	#385	Pro	13°
#236	Ser	46°	#286	Lys	133°	#336	Glu	26°			
#237	Gly	0°	#287	Met	7°	#337	Ala	27°			
#238	Thr	34°	#288	Glu	74°	#338	Gly	0°			
#239	Met	7°	#289	Glu	8°	#339	Arg	42°			
#240	Ser	26°	#290	Lys	36°	#340	Glu	77°			
#241	Met	15°	#291	Tyr	14°	#341	Val	62°			
#242	Leu	16°	#292	Asn	122°	#342	Val	16°			
#243	Val	13°	#293	Leu	5°	#343	Gly	0°			
#244	Leu	18°	#294	Thr	49°	#344	Ser	148°			
#245	Leu	10°	#295	Ser	84°	#345	Ala	192°			
#246	Pro	43°	#296	Val	4°	#346	Glu	27°			
#247	Asp	77°	#297	Leu	6°	#347	Ala	9°			
#248	Glu	132°	#298	Met	76°	#348	Gly	0°			
#249	Val	50°	#299	Ala	16°	#349	Val	122°			
#250	Ser	91°	#300	Met	5°	#350	Asp	1°			

Die Daten beziehen sich auf Abschnitt 3.6 (S. 66)
Methodenbeschreibung in Abschnitt 2.7 (S. 45)

Tab. 6.15: Erkennung von Ovalbuminpeptiden durch systemisch und oral induzierte anti-Ovalbumin Serum-IgG (nach Gorris, 2001, S.67) sowie die Aminosäureseitenkettengänglichkeit

Peptid	# freie AS	# erkannt	Peptid	# freie AS	# erkannt	Peptid	# freie AS	# erkannt	Peptid	# freie AS	# erkannt
OVA 1-16 (#1)	1	0	OVA 101-116 (#51)	5	2	OVA 201-216 (#101)	4	1	OVA 301-316 (#151)	5	1
OVA 3-18 (#2)	1	2	OVA 103-118 (#52)	6	4	OVA 203-218 (#102)	3	0	OVA 303-318 (#152)	6	0
OVA 5-20 (#3)	1	1	OVA 105-120 (#53)	7	2	OVA 205-220 (#103)	3	1	OVA 305-320 (#153)	7	0
OVA 7-22 (#4)	1	1	OVA 107-122 (#54)	8	5	OVA 207-222 (#104)	3	0	OVA 307-322 (#154)	7	0
OVA 9-24 (#5)	3	2	OVA 109-124 (#55)	8	2	OVA 209-224 (#105)	4	0	OVA 309-324 (#155)	5	0
OVA 11-26 (#6)	3	2	OVA 111-126 (#56)	6	1	OVA 211-226 (#106)	4	0	OVA 311-326 (#156)	4	0
OVA 13-28 (#7)	3	0	OVA 113-128 (#57)	5	0	OVA 213-228 (#107)	3	1	OVA 313-328 (#157)	4	0
OVA 15-30 (#8)	3	0	OVA 115-130 (#58)	5	0	OVA 215-230 (#108)	3	0	OVA 315-330 (#158)	3	0
OVA 17-32 (#9)	2	0	OVA 117-132 (#59)	3	1	OVA 217-232 (#109)	2	1	OVA 317-332 (#159)	3	0
OVA 19-34 (#10)	2	1	OVA 119-134 (#60)	3	0	OVA 219-234 (#110)	3	0	OVA 319-334 (#160)	3	1
OVA 21-36 (#11)	2	0	OVA 121-136 (#61)	3	0	OVA 221-236 (#111)	3	0	OVA 321-336 (#161)	1	2
OVA 23-38 (#12)	2	0	OVA 123-138 (#62)	3	1	OVA 223-238 (#112)	3	1	OVA 323-338 (#162)	1	1
OVA 25-40 (#13)	0	0	OVA 125-140 (#63)	5	0	OVA 225-240 (#113)	1	0	OVA 325-340 (#163)	1	1
OVA 27-42 (#14)	0	0	OVA 127-142 (#64)	5	0	OVA 227-242 (#114)	1	0	OVA 327-342 (#164)	1	2
OVA 29-44 (#15)	0	0	OVA 129-144 (#65)	6	1	OVA 229-244 (#115)	1	0	OVA 329-344 (#165)	2	2
OVA 31-46 (#16)	0	0	OVA 131-146 (#66)	6	1	OVA 231-246 (#116)	1	0	OVA 331-346 (#166)	3	2
OVA 33-48 (#17)	1	1	OVA 133-148 (#67)	7	0	OVA 233-248 (#117)	2	1	OVA 333-348 (#167)	3	1
OVA 35-50 (#18)	1	0	OVA 135-150 (#68)	7	0	OVA 235-250 (#118)	2	0	OVA 335-350 (#168)	3	1
OVA 37-52 (#19)	2	0	OVA 137-152 (#69)	6	1	OVA 237-252 (#119)	2	1	OVA 337-352 (#169)	5	4
OVA 39-54 (#20)	2	0	OVA 139-154 (#70)	5	1	OVA 239-254 (#120)	3	0	OVA 339-354 (#170)	6	4
OVA 41-56 (#21)	3	0	OVA 141-156 (#71)	3	0	OVA 241-256 (#121)	3	0	OVA 341-356 (#171)	7	1
OVA 43-58 (#22)	3	1	OVA 143-158 (#72)	4	0	OVA 243-258 (#122)	4	0	OVA 343-358 (#172)	7	2
OVA 45-60 (#23)	4	0	OVA 145-160 (#73)	4	0	OVA 245-260 (#123)	5	1	OVA 345-360 (#173)	7	2
OVA 47-62 (#24)	5	0	OVA 147-162 (#74)	4	1	OVA 247-262 (#124)	6	1	OVA 347-362 (#174)	7	1
OVA 49-64 (#25)	4	0	OVA 149-164 (#75)	5	1	OVA 249-264 (#125)	5	0	OVA 349-364 (#175)	7	0
OVA 51-66 (#26)	4	1	OVA 151-166 (#76)	4	0	OVA 251-266 (#126)	5	1	OVA 351-366 (#176)	6	0
OVA 53-68 (#27)	4	0	OVA 153-168 (#77)	6	1	OVA 253-268 (#127)	5	1	OVA 353-368 (#177)	4	0
OVA 55-70 (#28)	4	0	OVA 155-170 (#78)	7	2	OVA 255-270 (#128)	6	1	OVA 355-370 (#178)	3	0
OVA 57-72 (#29)	5	0	OVA 157-172 (#79)	7	1	OVA 257-272 (#129)	6	1	OVA 357-372 (#179)	2	0
OVA 59-74 (#30)	5	0	OVA 159-174 (#80)	6	0	OVA 259-274 (#130)	6	0	OVA 359-374 (#180)	2	0
OVA 61-76 (#31)	5	0	OVA 161-176 (#81)	5	0	OVA 261-276 (#131)	6	1	OVA 361-376 (#181)	1	0
OVA 63-78 (#32)	6	1	OVA 163-178 (#82)	5	0	OVA 263-278 (#132)	5	0	OVA 363-378 (#182)	0	0
OVA 65-80 (#33)	6	0	OVA 165-180 (#83)	3	0	OVA 265-280 (#133)	6	1	OVA 365-380 (#183)	0	0
OVA 67-82 (#34)	7	1	OVA 167-182 (#84)	4	0	OVA 267-282 (#134)	5	0	OVA 367-382 (#184)	0	0
OVA 69-84 (#35)	6	0	OVA 169-184 (#85)	2	0	OVA 269-284 (#135)	6	0	OVA 369-384 (#185)	0	0
OVA 71-86 (#36)	7	1	OVA 171-186 (#86)	1	0	OVA 271-286 (#136)	5	1	OVA 371-386 (#186)	0	0
OVA 73-88 (#37)	5	1	OVA 173-188 (#87)	2	0	OVA 273-288 (#137)	5	0			
OVA 75-90 (#38)	5	1	OVA 175-190 (#88)	3	0	OVA 275-290 (#138)	4	1			
OVA 77-92 (#39)	5	0	OVA 177-192 (#89)	3	0	OVA 277-292 (#139)	4	0			
OVA 79-94 (#40)	4	1	OVA 179-194 (#90)	3	0	OVA 279-294 (#140)	4	0			
OVA 81-96 (#41)	5	8	OVA 181-196 (#91)	4	0	OVA 281-296 (#141)	3	0			
OVA 83-98 (#42)	5	7	OVA 183-198 (#92)	4	2	OVA 283-298 (#142)	3	2			
OVA 85-100 (#43)	5	4	OVA 185-200 (#93)	4	2	OVA 285-300 (#143)	2	0			
OVA 87-102 (#44)	4	2	OVA 187-202 (#94)	5	1	OVA 287-302 (#144)	1	0			
OVA 89-104 (#45)	4	0	OVA 189-204 (#95)	4	1	OVA 289-304 (#145)	2	0			
OVA 91-106 (#46)	4	0	OVA 191-206 (#96)	3	2	OVA 291-306 (#146)	2	1			
OVA 93-108 (#47)	3	0	OVA 193-208 (#97)	4	0	OVA 293-308 (#147)	3	0			
OVA 95-110 (#48)	4	0	OVA 195-210 (#98)	4	0	OVA 295-310 (#148)	4	0			
OVA 97-112 (#49)	4	0	OVA 197-212 (#99)	4	0	OVA 297-312 (#149)	4	0			
OVA 99-114 (#50)	3	0	OVA 199-214 (#100)	3	3	OVA 299-314 (#150)	5	0			

Zu Tab. 6.15:

Eine Aminosäureseitekette wurde als zugänglich gewertet, wenn der frei Winkel (Tab 6.14) min. 90° betrug. Die Peptidnamen beziehen sich auf die Aminosäurenummern der linearen OVA-Sequenz. In Klammern jeweils ist der Name des Peptids in (Externest, 2000) angegeben.

Die Daten für die Häufigkeit der Peptiderkennung durch Serum-IgG stammen aus den Tabellen 7.19-21 der Studie (Externest, 2000). Es wurden jeweils die Daten von 24 Mäusen (12 mukosal und 12 systemisch immunisiert) ausgewertet. Als erkannt wurde ein Peptid jeweils dann bewertet, wenn ein Mäuseserum einer immunisierten Maus mit einem bestimmten Peptid ein signifikant (t-Test, $p < 0,025$) höheres Signal produzierte, als die nicht immunisierten Mäuse mit dem gleichen Peptid.

Die Daten beziehen sich auf Abschnitt 3.6 (S. 66)

Methodenbeschreibung in Abschnitt 2.7(S. 45)

Tab. 6.16: Zusammenhang zwischen der Erkennung von Ovalbuminpeptiden durch systemisch und oral induzierte anti-Ovalbumin Serum-IgG (nach Gorris, 2001, S.67) sowie die Aminosäureseitenkettenzugänglichkeit

		Anzahl Mäuseseren mit IgG-Bindung								
		0	1	2	3	4	5	6	7	8
Anzahl zugänglicher Seitenketten in	0	9
	1	9	5	3
	2	12	5	1
	3	24	9	5	1
	4	26	6	3
	5	17	10	1	.	2	.	.	1	1
	6	7	11	.	.	2
	7	5	5	4
	8	.	.	1	.	.	1	.	.	.

Zusammenfassung der Ergebnisse aus Tab. 6.15. Dargestellt ist jeweils, wie viele der 186 Peptide in einer vorangegangenen Studie (Externest, 2000) mit X Mäuseseren reagierte, und nach dem beschriebenen Algorithmus Y zugängliche Aminosäureseitenketten besaßen. Um den Grad der Korrelation beider Merkmale zu bestimmen, wurde ein Chi²-Test durchgeführt. Die jeweiligen Klassen für den Chi²-Test sind durch durchgezogene Linien umrahmt (Chi² = 21,64; $p = 0,0014$).

Die Daten beziehen sich auf Abschnitt 3.6 (S. 66)

Methodenbeschreibung in Abschnitt 2.7(S. 45)

Tab. 6.17: Analyse für mögliche Indikatoren einer hohe Ähnlichkeit der Struktur eines Peptids mit der Struktur des Proteins

Indikator	Peptid												korrel.	
	n-mutiert	RI- Ala1	RI- Ala2	RI- Ala3	RI- Ala4	RI- Ala5	RI- Ala6	RI- Ala9	RI- Ala11	RI- Ala12	RI- Ala15	RI- Ala16		
Positionsabw. As #7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Positionsabw. As #8	3,22	3,21	3,31	3,01	4,46	2,80	3,55	2,88	2,09	3,53	3,91	3,97	-0,57 *	
Positionsabw. As #10	4,93	4,96	3,62	4,89	6,23	3,65	1,95	4,63	3,06	4,95	4,96	5,11	-0,35	
Positionsabw. As #13	1,03	1,03	2,85	0,94	0,74	1,19	3,09	0,82	0,88	2,45	2,78	2,83	-0,32	
Positionsabw. As #14	5,24	5,25	6,04	5,18	4,77	4,91	5,79	5,24	5,90	6,20	2,50	2,87	0,73	
Summe Positionsabw.	14,4	14,4	15,8	14,0	16,2	12,5	14,4	13,6	11,9	17,1	14,2	14,8	-0,15	
Winkelabw. As #7	0,55	0,55	0,50	0,30	0,27	0,27	0,97	0,01	0,23	0,47	0,40	0,39	-0,07	
Winkelabw. As #8	1,36	1,36	0,78	1,29	0,97	1,37	2,46	1,30	0,88	0,51	1,47	1,46	-0,46	
Winkelabw. As #10	1,14	1,16	0,67	1,21	0,69	0,49	0,87	1,09	0,66	0,29	1,81	1,83	-0,63 *	
Winkelabw. As #13	2,10	2,11	1,76	2,07	1,67	1,58	0,94	1,99	2,08	1,91	0,75	0,78	-0,56 *	
Winkelabw. As #14	0,65	0,66	0,81	0,58	0,77	0,60	1,33	0,51	0,66	0,35	2,24	1,87	0,61	
Summe Winkelabw.	5,81	5,85	4,53	5,45	4,37	4,31	6,58	4,91	4,51	3,54	6,67	6,33	-0,54 *	
Zugänglichkeit As #7	1000	1000	27	1000	22	1000	10	100	27	26	7	8	-0,13	
Zugänglichkeit As #8	4,93	4,90	7,68	8,30	21,31	4,38	3,98	5,96	6,66	4,45	16,32	18,40	-0,34	
Zugänglichkeit As #10	7,99	7,97	17,30	7,93	7,57	8,32	4,76	8,20	22,33	7,05	19,56	18,74	0,21	
Zugänglichkeit As #13	5,09	5,07	15,99	4,94	4,98	5,10	9,51	4,86	10,23	4,97	14,00	17,36	-0,12	
Zugänglichkeit As #14	15,6	15,6	28,3	14,3	14,6	15,0	30,2	13,6	36,6	17,6	4,3	7,2	0,85 *	
Punktwert	0,83	0,83	1,89	0,87	0,75	1,24	1,29	0,96	3,89	1,41	0,16	0,29	0,93 *	
OD (450nm), Ala-Scan	0,74	0,90	1,27	0,72	0,94	0,53	0,73	0,63	2,11	0,98	0,12	0,14		

Dargestellt sind 17 Indikatoren, die potentiell in die Punktwertberechnung für die Peptidoptimierung mit einbezogen werden konnten. Ob der entsprechende Indikator in die Punktwertberechnung eingehen sollte, hing davon ab, ob über die Peptide des Ala-Scans (Spalten) signifikant mit den ODs aus dem Ala-Scan (letzte Zeile) korrelierte. Dargestellt ist jeweils der Korrelationskoeffizient (letzte Spalte). Dargestellt sind außerdem die Werte für den Punktwert, dessen Formel sich aus den anderen Indikatoren ergab:

$$\text{Punktwert} = (\text{Zugänglichkeit As \#8}) / (\text{Summe Winkelabw.}) / (\text{Positionsabw. As \#8})$$

korrel.: Korrelationskoeffizient des Entsprechenden Indikatoren mit den ODs des Ala-Scans

* signifikante Korrelation ($p < 0,05$; einseitiger t-Test)

Die Daten beziehen sich auf Abschnitt 3.7 (S. 69)

Methodenbeschreibung in Abschnitt 2.8.2 (S. 48)

Tab. 6.18: Entwicklung verschiedener Parameter während der Peptidevolution (zu Kapitel 3.7)

Zyklus-Nr	Ø Punktwert	Max. Punktwert	Max. über alle Zyklen	Verbesserung	Anteil neuer Peptide
1	1,6	4,9	4,9	1,0	0,7
2	2,2	4,9	4,9	0,0	0,6
3	2,9	4,9	4,9	0,0	0,7
4	2,5	8,9	8,9	4,0	0,8
5	3,7	8,9	8,9	0,0	0,6
6	3,9	8,9	8,9	0,0	0,7
7	4,2	10,4	10,4	1,5	0,7
8	3,9	10,4	10,4	0,0	0,7
9	4,7	12,0	12,0	1,6	0,7
10	4,6	12,3	12,3	0,3	0,7
11	5,3	12,9	12,9	0,6	0,6
12	4,6	12,9	12,9	0,0	0,7
13	5,5	12,9	12,9	0,0	0,7
14	6,3	12,9	12,9	0,1	0,7
15	5,6	12,9	12,9	0,0	0,7
16	4,5	12,9	12,9	0,0	0,7
17	5,1	12,9	12,9	0,0	0,5
18	5,0	12,9	12,9	0,0	0,7
19	5,6	13,7	13,7	0,7	0,6
20	5,2	13,7	13,7	0,0	0,6
21	5,9	13,7	13,7	0,0	0,6
22	6,6	33,7	33,7	20,0	0,6
23	7,6	33,7	33,7	0,0	0,6
24	8,5	36,1	36,1	2,4	0,5
25	12,0	41,2	41,2	5,1	0,6
26	16,8	36,4	41,2	0,0	0,6
27	10,4	45,5	45,5	4,3	0,8
28	11,6	43,9	45,5	0,0	0,7
29	13,9	45,5	45,5	0,0	0,7
30	10,6	45,5	45,5	0,0	0,6
31	17,3	211,8	211,8	166,3	0,6
32	8,1	45,5	211,8	0,0	0,6
33	18,6	211,8	211,8	0,0	0,6
34	14,2	211,8	211,8	0,0	0,7
35	9,2	45,8	211,8	0,0	0,5
36	24,5	211,8	211,8	0,0	0,5
37	16,9	211,8	211,8	0,0	0,4
38	19,3	211,8	211,8	0,0	0,4
39	13,3	211,8	211,8	0,0	0,5
40	9,2	45,8	211,8	0,0	0,5
41	14,0	211,8	211,8	0,0	0,4
42	8,8	45,5	211,8	0,0	0,5
43	29,4	211,8	211,8	0,0	0,4
44	21,2	211,8	211,8	0,0	0,4
45	20,1	211,8	211,8	0,0	0,5
46	19,1	211,8	211,8	0,0	0,4
47	12,9	211,8	211,8	0,0	0,4
48	15,6	211,8	211,8	0,0	0,4
49	24,3	211,8	211,8	0,0	0,3
50	22,7	211,8	211,8	0,0	0,5

Dargestellt ist der Verlauf der Peptidoptimierung während der *in silico*-Evolution. Für jeden Evolutionszyklus ist aufgeführt, wie hoch der berechnete Punktwert der in diesem Zyklus neu vorgeschlagenen Peptide, sowie wie hoch der Punktwert des insgesamt besten Peptids bis zu diesem Zyklus war. Außerdem wurde aufgeführt wie hoch die Steigerung des insgesamt höchsten Punktwertes in dem jeweiligen Zyklus war. Für jeden Zyklus ist außerdem aufgeführt, welcher Anteil der 40 vorgeschlagenen Peptide tatsächlich neu berechnet werden musste, dass heißt nicht schon in vorherigen Zyklen vorgeschlagen wurde.

Die Daten beziehen sich auf Abschnitt 3.7 (S. 69)

Methodenbeschreibung in Abschnitt 2.8 (S. 46)