

*Spezifische monoklonale Antikörper gegen humanes
Cystatin B*

*für die Aufklärung seiner physiologischen und
pathophysiologischen Bedeutung*

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Gerit Theil

geb. am: 05.11.1975 in Querfurt

Gutachter /in

1. Prof. Dr. R. Ulbrich-Hofmann

2. Prof. Dr. T. Hollemann

3. Prof. Dr. B. Wiederanders

Verteidigungsdatum: 04.02.2011

Halle/Saale, Oktober 2010

INHALTSVERZEICHNIS

I	Inhaltsverzeichnis	I
II	Abkürzungsverzeichnis	IV
1	Einleitung	1
1.1	Cysteinproteinasen der Papainfamilie	1
1.1.1	Cathepsine	2
1.1.1.1	Physiologische Funktionen der Cystein-Cathepsine	2
1.1.1.2	Regulation der Aktivität der Cathepsine	4
1.2	Cysteinprotease-Inhibitoren	5
1.3	Cystatin B (CSTB)	7
1.3.1	CSTB-Tertiärstruktur	8
1.3.2	Mutationen im CSTB-Gen	9
1.3.3	CSTB als Modellprotein für amyloide Fibrillenbildung	10
1.3.4	CSTB - Rolle bei der malignen Transformation	12
1.3.5	Rolle von CSTB im Immunsystem	14
1.4	Hybridisierung - Theoretische Grundlagen der Herstellung von monoklonalen Antikörpern	14
1.5	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	15
2	Aufgabenstellung	17
3	Material und Methoden	18
3.1	Material	18
3.1.1	Chemikalien	18
3.1.2	Zelllinien	21
3.1.3	Hefestämme	21
3.1.4	Antikörper	22
3.2	Immunologische Methoden	22
3.2.1	Generierung muriner monoklonaler Antikörper gegen humanes Cystatin B	22
3.2.1.1	Antigen	22
3.2.1.2	Immunisierung	23
3.2.1.3	Vorbereitung der Fusion	23
3.2.1.4	Isolierung der B-Lymphoblasten aus der Milz	24
3.2.1.5	Fusion von Maus-B-Lymphoblasten mit Maus-Myelomzellen (P3X63 Ag8/653)	24
3.2.1.6	Kultivierung der Fusionsprodukte in Selektionsmedium und Klonierung positiver Hybridome	25
3.2.1.7	Präparation von Maus-Peritoneal-Makrophagen als Feederzellen	26
3.2.2	Charakterisierung der anti-CSTB-Antikörper	26
3.2.2.1	Isotypbestimmung	26

3.2.2.2	Kreuzreaktionen _____	27
3.2.2.3	Epitope Mapping _____	27
3.2.2.4	Bestimmung der Bindungskonstanten für die monoklonalen anti- CSTB- Antikörper mit Hilfe der QCM-Technik _____	28
3.2.2.5	Immunzytochemische Färbung _____	29
3.2.3	Massenproduktion monoklonaler Antikörper _____	29
3.2.3.1	Reinigung der Antikörper mit Hilfe der Affinitätschromatographie _____	30
3.2.3.2	Biotinylierung der monoklonalen anti-CSTB-Antikörper _____	31
3.2.4	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) _____	32
3.2.4.1	Indirekter ELISA _____	32
3.2.4.2	Quantitativer Immunoassay - Sandwich ELISA _____	33
3.2.4.2.1	Selektion von geeigneten Antikörperpaaren _____	34
3.2.4.2.2	Ausschluss von unspezifischen Reaktionen im Sandwich-ELISA _____	35
3.2.4.2.3	Erstellung der CSTB-Standardkurve _____	35
3.2.4.2.4	CSTB-Bestimmung im Plasma gesunder Probanden und im Plasma von hepatozellulären Karzinom (HCC)- Patienten _____	36
3.2.5	Auswertung der ELISA _____	36
3.3	Proteinchemische Methoden _____	36
3.3.1	SDS-PAGE und Immunoblot-Analyse _____	36
3.3.2	Proteinfärbung _____	38
3.3.3	Konzentrierung von Proteinen _____	39
3.3.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinen _____	39
3.3.5	Zellaufschluss-Methoden _____	40
3.3.6	Immunpräzipitation (IP) _____	40
3.3.7	Massenspektrometrie _____	41
3.3.8	Größenausschlusschromatographie _____	41
3.3.9	Isoelektrische Fokussierung in Agarose-gelen _____	42
3.4	Zellkultur _____	43
3.4.1	Kultivierung von Karzinomzelllinien _____	43
3.5	Yeast two-Hybrid System 3 _____	43
4	Ergebnisse _____	46
4.1	Generierung monoklonaler Anti-CSTB-Antikörper _____	46
4.1.1	Reinheitskontrolle des Antigens _____	46
4.1.2	Immunantwort – Titerbestimmung _____	46
4.1.3	Selektion von anti-CSTB-mAK produzierenden Hybridomen _____	47
4.1.4	Isotypbestimmung _____	48
4.1.5	Bestimmung der Kreuzreaktivität gegen Cystatin A _____	48
4.1.6	Sensitivitätsvergleich der anti-CSTB-mAK im Immunoblot und im ELISA _____	50
4.1.7	Epitope-Mapping _____	50

4.1.8	Reinheitskontrolle der anti-CSTB-Antikörper in der SDS-PAGE _____	55
4.1.9	Biotinylierung der monoklonalen anti-CSTB-Antikörper _____	56
4.1.10	Immunpräzipitation–Isolierung von Cystatin B aus biologischen Materialien mit Hilfe der generierten Antikörper _____	56
4.1.11	Bestimmung der Bindungskonstanten für die monoklonalen anti-CSTB-Antikörper mit Hilfe der QCM-Technik _____	59
4.2	Sandwich-ELISA _____	61
4.2.1	Selektion von Antikörperpaaren für einen CSTB-Sandwich- ELISA _____	61
4.2.2	Ausschluss von unspezifischen Bindungen (Störeffekten) im Sandwich-ELISA _____	64
4.2.3	Erstellung der Cystatin B-Standardkurve _____	66
4.2.4	Vergleich der Cystatin B–Bestimmungen zwischen Serum und Plasma _____	67
4.2.5	CSTB-Bestimmung im Plasma gesunder Probanden und im Plasma von Patienten mit einem Hepatozellulärem Karzinom _____	68
4.3	CSTB-Polymere und CSTB-Interaktionspartner _____	70
4.3.1	Identifikation möglicher CSTB-Bindungspartner mit Hilfe der <i>Pre-transformed Human Brain Matchmaker cDNA Library</i> _____	70
4.3.2	Nachweis potentieller CSTB-Komplexparker bzw. CSTB-Strukturen höherer Ordnung _____	71
4.4	Nachweis von CSTB in etablierten Karzinom-Zelllinien _____	76
5	Diskussion _____	81
5.1	Charakterisierung der monoklonalen anti-CSTB-mAK _____	82
5.2	Charakteristika des CSTB-Sandwich-ELISA _____	84
5.2.1	Bestimmung der CSTB-Konzentrationen im Plasma von HCC-Patienten-orientierende Studie _____	86
5.3	CSTB-Polymere und CSTB-Interaktionspartner _____	90
5.3.1	Interaktion mit Cystein-Cathepsinen _____	93
5.4	Zytochemischer Nachweis von CSTB _____	95
6	Zusammenfassung _____	96
7	Literaturverzeichnis _____	99
	Danksagung _____	110
	Eidesstattliche Erklärung _____	111
	Lebenslauf _____	112
	Publikationsliste _____	114

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AMP	Adenosinmonophosphat
AS	Aminosäure
Da, kDa	Dalton, Kilodalton
°C	Grad Celsius
CDR	<i>Complementarity Determining Region</i>
DTT	Dithiothreitol
E°	Redoxpotential (pH 7,0)
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
EDC	N ³ -(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
et al.	et altera
ESI-MS	<i>Electrospray-Ionization Mass Spectrometry Flight</i>
FKS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GMP	Guanosinmonophosphat
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxidiert
HAT	Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin (Zusätze für die Selektion von Hybridomklonen)
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HT	Hypoxanthin, Thymidin (Zusätze nach der Selektion von Hybridomklonen)
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin G
IEP	isoelektrischer Punkt

IP	Immunpräzitation
IK	Immunkomplex
k_{Ass}	Assoziationsgeschwindigkeitskonstante
K_D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
k_{Dis}	Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante
L	Liter
M	Molarität
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser-Desorption-Ionization Time-of-Flight</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
mAK	monoklonaler Antikörper
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
NMWL	<i>Nominal Molecular Weight Limit</i>
OD	optische Dichte
pAK	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEG	Polyethylenglycol
PIC	<i>Protease Inhibitor Cocktail</i>
%	Prozent
QCM	<i>Quartz Crystal Microbalance</i>
RT	Raumtemperatur
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i>
Tab.	Tabelle
TBST	<i>Tris-Buffered Saline-Tween[®]20</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	<i>volume/volume</i>
w/v	<i>weight/volume</i>

Δf	Frequenzänderung
Tween® 20	Polyoxyethylen Sorbitan Monolaurat
V_e	Elutions-Volumen
V_0	Ausschluss-Volumen

Englische Fachbegriffe werden in *kursiver Schreibweise* dargestellt. Die Bezeichnung der Aminosäuren folgt dem Einbuchstabencode auf der Grundlage der IUPAC-IUB-Nomenklatur.

1 EINLEITUNG

Mit der vollständigen Entschlüsselung des humanen Genoms stellte sich heraus, dass die Gene der Proteasen einen Anteil von über 2% an den für Proteine codierenden Genen haben. Damit bilden die proteolytischen Enzyme eine der größten Proteingruppen. Sie sind essentiell an den meisten Lebensprozessen der Organismen beteiligt (Barrett *et al.*, 2001). Die Bedeutung der Proteasen und ihrer Inhibitoren wird durch die Tatsache unterstrichen, dass 18% der Sequenzen der SwissProt-Datenbank Sequenzen proteolytischer Enzyme oder ihrer Inhibitoren darstellen (Rawlings *et al.*, 2006). Das zunehmende Interesse an den Proteasen reflektiert ihre Funktionen bzw. ihre Beteiligung an zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen. Daraus resultiert auch ihre wachsende Bedeutung für die Medizin und die Biotechnologie.

Die Arbeiten, die dieser Dissertation zu Grunde liegen, konzentrieren sich auf den endogenen Cysteinprotease-Inhibitor Cystatin B (CSTB). Zur Veranschaulichung der Bedeutung der endogenen Inhibitoren sollen zunächst die Cystein-Proteinasen näher betrachtet werden.

Die Proteasen (auch als Peptidasen, Peptidhydrolasen oder Proteinase bezeichnet) spalten Peptidbindungen durch Hydrolyse. Sie werden nach wesentlichen Merkmalen der Struktur ihrer katalytischen Zentren in vier Klassen: 1. Serin-, 2. Cystein-, 3. Aspartat-, 4. Metalloproteasen eingeteilt.

Barrett führte 1979 eine formale Unterteilung der Proteasen nach ihrem evolutionären Ursprung ein. Proteasenfamilien wurden in Klans eingruppiert, welche einen gemeinsamen Vorfahren haben (Barrett *et al.*, 2001). Die aus den Klans entstehenden Familien haben gemeinsame strukturelle Eigenschaften und eine relativ hohe Homologie der Aminosäuresequenzen (Rawling and Barret 1990).

1.1 CYSTEINPROTEINASEN DER PAPAINFAMILIE

Proteasen, bei denen bei der Katalyse die Thiolgruppe eines Cysteins als Nukleophil dient, bezeichnet man als Cysteinproteasen. Der katalytische Mechanismus der Cysteinproteinasen basiert auf der Interaktion einer Aminosäure-Triade, die aus Cystein, Histidin und Asparagin/Asparaginsäure oder Glutamin/Glutaminsäure besteht mit dem

zu hydrolysierenden Protein. Der Klan CA ist die größte Untergruppe der Cysteinproteasen und umfasst alle Proteine, die eine strukturelle Homologie zu Papain aufweisen. Die papainähnlichen Cysteinproteinasen sind weiter in die Familien C01 (Cathepsine) und C02 (Calpaine) unterteilt (Rawlings *et al.*, 2006), <http://www.merops.ac.uk>).

1.1.1 CATHEPSINE

Der Begriff Cathepsine leitet sich vom Griechischem $\kappa\alpha\tau\eta\epsilon\pi\sigma\omicron$ (verdauen) ab. Bisher wurden folgende Cathepsine identifiziert: B, C, D, E, F, H, L, K, N, O, S, T, V, W und X. Strukturell bestehen alle Cystein-Cathepsine unter ihnen aus einem 10-20 Aminosäuren umfassenden Signalpeptid, einem Propeptid und einer katalytischen Domäne. Sie besitzen eine Molmasse von 22-28 kDa. Cathepsine sind hauptsächlich in den endosomalen bzw. lysosomalen Kompartimenten der Zelle lokalisiert. Sie werden als Präproenzym an den membrangebundenen Ribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums synthetisiert. Die N-terminale Glykosylierung, die im endoplasmatischen Retikulum beginnt, wird im Golgi-Apparat fortgesetzt. Die Enzyme enthalten Mannose-6-phosphat-Gruppen, die für die Aufnahme in die Endosomen über einen Mannose-6-phosphat-Rezeptor benötigt werden. Die Bindung an den Rezeptor ist Voraussetzung für die Aufnahme in die Endosomen, die sich zu Lysosomen differenzieren. Während dieses Prozesses werden die Cathepsine vom Rezeptor getrennt. Dieser wird dann zum Golgi-Apparat zurück transportiert (Kornfeld, 1992). In einigen Geweben können die Cathepsine durch einen Mannose-6-phosphat-Rezeptor-unabhängigen Transportweg in die Lysosomen gelangen (Glickman and Kornfeld, 1993).

1.1.1.1 PHYSIOLOGISCHE FUNKTIONEN DER CYSTEIN-CATHEPSINE

Sieben dieser Proteasen, die Cathepsine B, C, F, H, L, O und Z werden ubiquitär exprimiert, die Cathepsine W und S in Zellen des lymphatischen Systems, Cathepsin K in Osteoklasten und Cathepsin V in Thymus, Testes und Cornealepithel (Rawlings and Barrett, 2000; Turk *et al.*, 2000). Die klassischen Funktionen der lysosomalen Cysteinproteasen sind: Die terminale Degradation von Proteinen ("Bulk"-Proteolyse) im Lysosom, die Prozessierung und die Aktivierung von Proteinen (Barrett *et al.*, 1992). In den vergangenen Jahren sind weitere Funktionen der Cathepsine in physiologischen und

pathophysiologischen Prozessen bekannt geworden. Cathepsin S wird zum Beispiel nur von Zellen exprimiert, welche mononukleären Ursprungs sind. Es ist beteiligt an der Antigenprozessierung für die MHC II-Präsentation (Shi *et al.*, 1999). Cathepsin K ist ein weiteres Beispiel für eine gewebespezifisch exprimierte Cysteinpeptidase. Es wird hauptsächlich in Osteoklasten exprimiert und ist essentiell für den Knochenumbau (Troen *et al.*, 2006). Cathepsine spielen außerdem eine Rolle bei der Apoptose - spezifische Funktionen bzw. Substrate konnten bisher aber noch nicht nachgewiesen werden. Die postulierte Beteiligung der Cathepsine an Caspase-abhängigen und Caspase-unabhängigen apoptotischen *Pathways* (Abb. 1.1.1.1-1) erfordert ihre Freisetzung in das Zytosol (Leist und Jäättelä 2001, Stoka *et al.*, 2005).

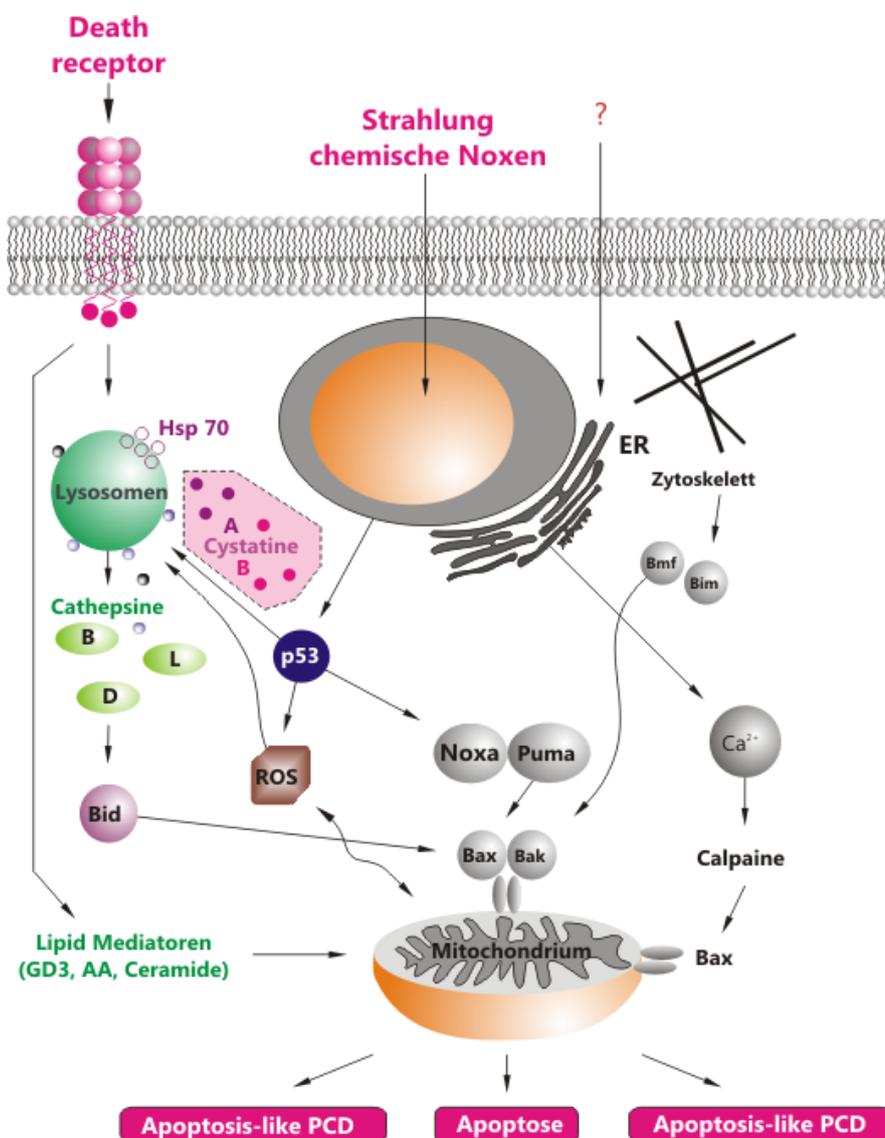


Abb. 1.1.1.1-1: Caspase-unabhängige Signalwege der Apoptose

Im Zytosol wird die Aktivität der Cathepsine unter anderem durch ihre endogenen Inhibitoren reguliert, die so mit in die Apoptose eingreifen. Die Arbeitsgruppe um Felbor *et al.* 2002 generierte und charakterisierte Cathepsin B/L Doppel-*knockout* Mäuse, welche zwischen dem 10. und 14. Tagen nach der Geburt starben. Diese Mäuse wiesen ein massives Neuron-Sterben im zentralen Nervensystem auf. Es war gekennzeichnet durch einen frühen Beginn mit rapider Progression der neuro-degenerativen Prozesse und massiver Akkumulationen lysosomaler Strukturen, mit anschließender Apoptose und reaktiver Astrozytose. Diese Degeneration führte zu einer ausgeprägten Atrophie von Gross- und Kleinhirn. Zusätzlich spielen verschiedene Cathepsine bei entzündlichen Prozessen eine Rolle, wie der rheumatoiden Arthritis, den degenerativen Gefäßerkrankungen, der Pankreatitis und der Gastritis (Skoumal *et al.*, 2005).

Einige Cathepsine sind in der Lage, Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM) abzubauen (Andreasen *et al.*, 2000; Kos *et al.*, 1998). Diese Eigenschaft der Cathepsine erklärt unter anderem ihre Bedeutung für die Entwicklung, Ausbreitung und Metastasierung maligner Tumoren (Joyce and Hanahan, 2004; Sloane *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 1994). Eine Verschiebung des physiologischen Gleichgewichtes zwischen Cathepsinen und ihren endogenen Inhibitoren soll zur Tumorprogression beitragen (Kos *et al.*, 1995; Lah *et al.*, 1997).

Wegen dieser Vielzahl unterschiedlicher, biologisch relevanter Funktionen wird den Cystein-Cathepsinen unter anderem auch ein diagnostisches und therapeutisches Potenzial bei Krebserkrankungen zugesprochen (Turk *et al.*, 2000).

Es wird deutlich, dass die in diesem Abschnitt beispielhaft genannten Funktionen der Cathepsine zeigen, welche Bedeutung die Modulation ihrer Aktivität durch ihre natürlichen Inhibitoren haben kann.

1.1.1.2 REGULATION DER AKTIVITÄT DER CATHEPSINE

Abgesehen von den Determinanten der Genexpression wird die Aktivität der lysosomalen Proteasen von weiteren Faktoren bestimmt, die im Folgenden zusammengefasst werden:

1. **pH-Wert.** Ihre optimale Aktivität haben die Cathepsine im pH-Bereich von pH 3,8-5,0 -wie er in den Lysosomen vorherrscht. Ein großer Teil der Cathepsine, z.B.

L, H, K, V und F, zeigt bei neutralem pH-Wert deshalb nur eine reduzierte Aktivität.

2. **Redoxpotential:** Unter reduzierenden Bedingungen wird das Cystein des aktiven Zentrums reduziert und die Cathepsine zeigen ihre höchste enzymatische Aktivität. Endosomen können spezifisch Cystein akkumulieren, um solche Umgebungsbedingungen zu schaffen (Pisoni *et al.*, 1990)
3. **Synthese als inaktive Pro-Form:** Die Cathepsine benötigen eine proteolytische Aktivierung durch die Abspaltung des Pro-Peptids. Voraussetzung für diesen Schritt ist unter anderem ein saures Milieu oder eine Interaktion mit der extrazellulären Matrix.
4. **Inhibitoren der lysosomalen Cathepsine:** Die Aktivitätsmodulation der lysosomalen Cysteinproteinasen im Zytoplasma und im extrazellulären Raum erfolgt auch durch die endogenen Inhibitoren - die Cystatine und die Thyropsine. Sie scheinen außerdem die Funktion zu haben, als Chaperone für die Cathepsine zu dienen, um in neutralem Milieu die Denaturierung dieser Enzyme zu verhindern.

1.2 CYSTEINPROTEASE-INHIBITOREN

Die ersten Befunde zu spezifischen Inhibitoren von zellulären Proteinasen stammen von Finkelstaedt (1957), der einen hitzestabilen Inhibitor des Cathepsin B aus Rattenleber isolieren konnte. 1981 wurde von Barrett ein Protein aus Hühnereiweiß isoliert, welches ebenfalls Cathepsin B hemmt. Dieses Protein wurde Cystatin genannt, da es spezifisch Cysteinproteinasen hemmt (Barrett 1981). Aus verschiedenen Geweben wurden weitere Inhibitoren isoliert, die in ihren physiko-chemischen Eigenschaften und ihren Molmassen von ca. 12 kDa dem Cystatin ähneln. Diese Inhibitoren wurden aufgrund ihrer strukturellen Homologie in der Cystatin-Superfamilie zusammengefasst (Barrett *et al.*, 1986). Alle Mitglieder der Cystatin-Superfamilie blockieren Cysteinproteinasen der Papainfamilie durch eine reversible und feste Bindung.

Bei höheren Eukaryoten wird die Cystatin-Superfamilie in drei unterschiedliche Subfamilien unterteilt: Familie 1: Stefine, Familie 2: Cystatine und Familie 3: Kininogene

(Barrett *et al.*, 1986) - für die seit 1990 auch die Klassifizierung in Typ 1, 2 und 3 verwendet wurde.

Später wurde das Klassifizierungssystem der Proteinase-Inhibitoren neu geordnet. Grundlage für diese Neuordnung waren die Aminosäure-Homologien und ihre 3D-Struktur.

Auf dieser Basis entstanden 31 Familien, die aus 26 Klans hervorgingen. Die Klans umfassen eine oder mehrere Familien mit einer ähnliche Proteinfaltung (Rawlings *et al.*, 2004; <http://merops.sanger.ac.uk>). In dieser Arbeit erfolgt die Klassifizierung der Cystatine nach Typen, wie sie auch in den meisten Publikationen verwendet wird.

Typ 1-Cystatine (Stefine)

Die Stefine bestehen aus einer ca. 100 Aminosäuren langen Polypeptidkette ohne Glykosylierungen und intramolekulare Disulfidbindungen. Es sind intrazelluläre Proteine, die aber auch in extrazellulären Flüssigkeiten vorkommen können (Abrahamson *et al.*, 1986). Von diesem Typ werden nur die Cystatine A und B im humanen System exprimiert. Ihre Funktion im Organismus ist die Blockade von verschiedenen lysosomalen Cysteinproteinasen durch nicht-kovalente, reversible und feste Bindung. Darüberhinaus gibt es immer mehr Hinweise für eine Beteiligung von Cystatin A und B am „*Lysosomal Death Pathway*“ (Jones *et al.*, 1998; Houseweart *et al.*, 2003). Charakteristisch für die Stefine ist eine extreme Stabilität gegenüber alkalischen pH-Werten und hohen Temperaturen.

Das humane Cystatin A kommt in hohen Konzentrationen in verschiedenen epithelialen Zellen und in Leukozyten vor. Die Gruppe um Jones hat in einer Genexpressionsstudie mit Hilfe der Microarray-Technik ermittelt, dass Cystatin A unter den 50 Proteinen ist, welche als Marker für myoepitheliale Zellen identifiziert wurden (Jones *et al.*, 2004).

Das humane CSTB hat dagegen ein breiteres Expressionsmuster. Weitere Funktionen und Eigenschaften von CSTB werden in den nächsten Abschnitten behandelt, da dieses Protein im Mittelpunkt dieser Arbeit steht. Typ 1-Cystatine gehören zur Subfamilie I25A (Rawlings *et al.*, 2004).

Typ 2-Cystatine (Cystatine)

Diese Cystatine bestehen aus 115-120 Aminosäuren und sind somit größer als die Stefine. In ihrer Tertärstruktur kommen zwei Disulfidbrücken nahe dem C-Terminus vor.

Einige Cystatine weisen am N-Terminus Glykosylierungen auf und im Unterschied zu den Stefinen haben die Typ 2-Cystatine eine Signalsequenz für den Transport durch die Zellmembran in den extrazellulären Raum.

In hohen Konzentrationen sind diese Cystatine in verschiedenen Körperflüssigkeiten zu finden (Abrahamson *et al.*, 1986; Kopitar-Jerala, 2006). Der bekannteste Vertreter dieser Unterfamilie ist das humane Cystatin C (CSTC), das in vielen Organen und Geweben vorkommt - in besonders hohen Konzentrationen in der Samenflüssigkeit, im Liquor cerebrospinalis und in der Muttermilch. Die Funktion von Cystatin C in diesen Flüssigkeiten ist nicht geklärt. Im Gegensatz dazu wird das Vorkommen von CSTC in Tränenflüssigkeit, Speichel und Plasma mit der Regulation und der Hemmung von Cysteinproteinasen erklärt.

Die humanen Typ 2-Cystatine gehören zur Subfamilie I25B der Cystatin-Superfamilie (Rawlings *et al.*, 2004).

Typ 3-Cystatine (Kininogene)

Kininogene sind große, multifunktionale Glykoproteine des Blutplasmas. Sie werden in der Leber synthetisiert und ins Blut abgegeben. Man unterscheidet verschiedene Formen: die hochmolekularen (88-120 kDa) und die niedermolekularen (50-68 kDa) Form.

Hohe Konzentrationen finden sich außerdem in der Gelenkflüssigkeit. Die Domänen der Kininogene werden der Subfamilie I25B der Cystatin-Superfamilie zugeordnet (Rawlings *et al.*, 2004).

1.3 CYSTATIN B (CSTB)

Erstmalig wurde CSTB aus lymphatischem Gewebe isoliert und als Inhibitor der Cysteinproteinasen charakterisiert (Rinne *et al.*, 1981; Järvinen and Rinne, 1982). Später gelang die Isolierung aus weiteren Geweben, wie z.B. der Leber (Ritonja *et al.*, 1985).

CSTB ist auch unter den Synonymen NCPI (Neutral Cysteine Protease Inhibitor) und Stefin B bekannt. Es besteht aus einer 98 AS umfassenden Polypeptidkette ohne intramolekulare Disulfidbindungen. Das ubiquitär vorkommende Protein hat zu dem

Familienmitglied Cystatin A eine 54 %-ige AS-Sequenzen-Identität und eine 80%-ige AS-Sequenzen-Homologie (Abb. 1.3-1).

	10	20	30	40	50
Cystatin A	MIPGGLSEAK	PATPEIQEIV	DKVKPQLEEK	TNETYGKLEA	VQYKTQVVAG
Cystatin B	MMCGAPSATQ	PATAETQHIA	DQVRSQLEEK	ENKKFPVFKA	VSFKSQVVAG
	60	70	80	90	
Cystatin A	TNYYIKVRAG	DNKYMHLKVF	KSLPGQNEEL	VLTYQVDKN	KDELTGF
Cystatin B	TNYFIKVVHG	DEDFVHLRVF	QSLPHENKPL	TLSNYQTNKA	KHDELTYY

Abb. 1.3-1: AS-Sequenzen von Cystatin A und B. Identisch besetzte Positionen in den Sequenzen beider Proteine sind rot markiert.

In vitro hemmt CSTB verschiedene Cysteinproteinasen der Papainfamilie durch nicht-kovalente, reversible Bindung. Mit hoher Affinität bindet es an die Cathepsine H, L und S, weniger affin an Cathepsin B (Green *et al.*, 1984; Abrahamson *et al.*, 1986; Brömme *et al.*, 1991; Machleidt *et al.*, 1991; Lenaric *et al.*, 1996).

1.3.1 CSTB-TERTIÄRSTRUKTUR

Durch die Aufklärung der 3D-Struktur des Komplexes aus humanem rekombinanten CSTB mit Papain, konnte gezeigt werden, dass CSTB ein α/β -Protein ist (Abb. 1.3.1-1). Die CSTB-Tertärstruktur bildet sich aus einem β -Faltblatt bestehend aus 4 antiparallelen Strängen, welche eine aus 5 Windungen bestehende α -Helix umgeben („hot dog“-Faltung). Der C-Terminus befindet sich an der konvexen Seite der Faltblätter.

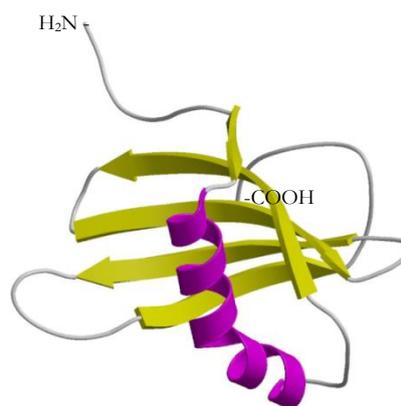


Abb. 1.3.1-1: CSTB-Tertärstruktur (*hot dog*-Faltung)

Die Interaktion mit Papain erfolgt über drei Bereiche und beruht hauptsächlich auf hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den beiden Proteinen. Die Interaktionsbereiche im CSTB sind der N-terminale „trunk“, die QVVAG-Schleife und die zweite Haarnadelschleife. Der außerhalb liegende C-Terminus soll, im Vergleich zum Hühner-Cystatin, eine zusätzliche Bindungsmöglichkeit schaffen (Stubbs *et al.*, 1990). Im N-terminalen Bereich von CSTB, welcher einen Teil der Proteinasebindungsstelle darstellt, wurde die Bedeutung der Aminosäure Cystein für die Inhibitoraffinität in einer Mutationsstudie untersucht. Cystein wurde gegen Serin ausgetauscht und die Bindungsaffinität des Wildtyps von CSTB im Vergleich zu Cys/3/Ser-CSTB, zu den Proteinase Cathepsin B, H, L und Papain bestimmt. Cys/3/Ser-CSTB zeigt aufgrund seiner Mutation eine Verringerung der Affinität zu den genannten Proteasen (Pol *et al.*, 2001). Dieser Austausch der SH-Gruppe des Cysteins, führt ebenfalls zu einer deutlichen Verringerung der Affinität von CSTB zu den Proteinase (Pol *et al.*, 2001). CSTB kann unter oxidativen Bedingungen extrazellulär Dimere durch Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken zwischen zwei CSTB-Monomeren bilden. Diese CSTB-Dimere werden zusätzlich durch nicht-kovalente Wechselwirkungen stabilisiert.

1.3.2 MUTATIONEN IM CSTB-GEN

ine Mutation im CSTB-Gen auf Chromosom 21q22.3 wurde als molekularer Hintergrund für die progressive myoklonische Epilepsie 1991 von Lehesjoki *et al.* identifiziert. In diesem Zusammenhang wurde CSTB erstmals mit einer Erkrankung in Verbindung gebracht. Es sind inzwischen 10 Mutationen im CSTB B-Gen (Abb.1.3.2-1) bekannt (Joensuu *et al.* 2008; Pennacchio *et al.*, 1996; Lafreniere *et al.*, 1997; Lalioti *et al.*, 1997a, b; Virtaneva *et al.*, 1997; Kagitani-Shimno *et al.*, 2002). Die häufigste Mutation (ca. 90%) ist die Expansion ($n > 30$) eines Dodecamers (12 bp) in der Promotorregion des Gens (Lafreniere *et al.*, 1997; Lalioti *et al.*, 1997a; Virtaneva *et al.*, 1997). Normale Allele enthalten in diesem Genbereich maximal 2-3 Repeats. Diese Expansion ist die Ursache für eine signifikante Abnahme der CSTB-mRNA-Synthese, welche zu einer verringerten Proteinexpression von CSTB führt (Pennacchio *et al.*, 1996; Allakurtti *et al.*, 2000; Joensuu *et al.*, 2007). Verkürzende Mutationen innerhalb der translatierten Genregion führen entweder zu instabilen Genprodukten oder ebenso wie bei den zwei bekannten Missense-

Mutationen zu diffus im Zytoplasma verteilten Produkten, die nicht mit lysosomalen Markern co-lokalisieren. Bei den Missense-Mutationen wurde gezeigt, dass die Bindung an Zielproteasen eingeschränkt ist (Alakurtti *et al.*, 2005; Lehesjoki, 2003).

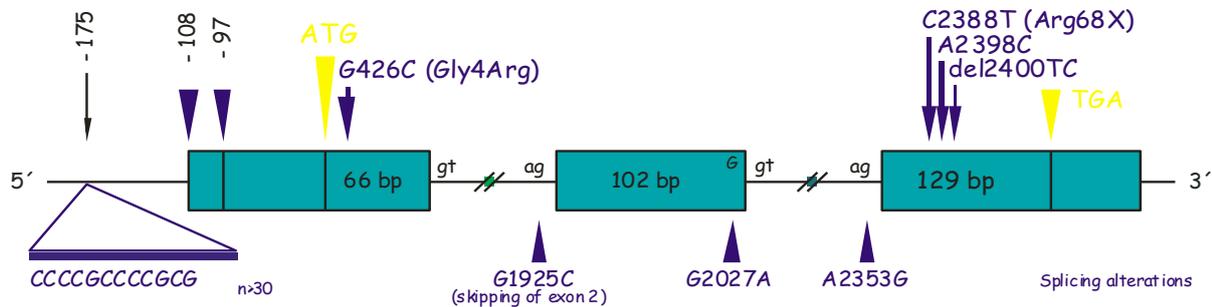


Abb. 1.3.2-1: Genstruktur von CSTB mit den für die EPM1 verantwortlichen Mutationen.

Die progressive myoklonische Epilepsie wurde vor mehr als 100 Jahren erstmals von Unverricht in Estland und von Lundborg in Schweden beschrieben. Merkmale dieser Erkrankung sind unter anderem: der autosomal-rezessive Erbgang, die Manifestation im Alter von 6-15 Jahren, ein progressiver Verlauf mit tonisch-klonischen Krampfanfällen, stimulus-sensitivem Myoklonus, abnormem EEG, Ataxie und Dysarthrie und progredientem Verlust intellektueller Leistungsfähigkeit (10 IQ-Punkte/Dekade). Zusätzlich zeigen sich histopathologische Veränderungen, welche sich durch einen signifikanten Verlust an Purkinje-Zellen oder durch degenerative Veränderungen im Cerebellum manifestieren.

Bei CSTB-Knockout-Mäusen treten die charakteristischen Symptome der EPM1 auf. Der Phänotyp der Mäuse zeigt einen progredienten Verlust an cerebellaren Granula-Neuronen. In diesen Zellen finden sich typische Veränderungen, wie Chromatinkondensation und apoptotische Zellkörper (Pennachio *et al.*, 1998). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die neuronale Degeneration bei den EPM1-Symptomen eine kritische Rolle spielt. Es wird ein protektiver Mechanismus von CSTB diskutiert, welcher die Apoptose der Neurone limitieren soll, da im chronisch epileptischen Tier (Ratte) während eines Anfalls eine erhöhte Expression der CSTB-mRNA und des CSTB-Proteins in den Neuronen des Vorderhirns induziert wird (D'Amato *et al.*, 2000).

In lymphoblastoiden Zellen von EPM1-Patienten, in denen eine verringerte CSTB-Aktivität nachweisbar ist, wurde eine erhöhte Aktivität der Cathepsine B, L und S gemessen. In diesem Zusammenhang wurde die Regulation dieser Cathepsine durch CSTB *in vivo* diskutiert. Trotz des bisherigen Kenntnisstandes sind funktionale Zusammenhänge zwischen CSTB-Mangel und der Symptomatik der EPM1 bis heute nicht geklärt.

1.3.3 CSTB ALS MODELLPROTEIN FÜR AMYLOIDE FIBRILLENBILDUNG

Einige Proteine können unter bestimmten Bedingungen amyloide Fibrillen bilden. Der Begriff „amyloid“ (=stärkeähnlich) wurde erstmals von Virchow 1854 zur Beschreibung von Ablagerungen in Geweben oder Organen verwendet.

Eine amyloide Fibrille ist ein geordnetes Polypeptidaggregat mit einer Cross- β -Struktur. Die Grundstruktur aller Fibrillen besteht aus β -Faltblättern, welche sich um ihre senkrechte Fibrillenachse lagern (Blake *et al.*, 1996). Die Ursache für die Bildung von Fibrillen ist noch weitgehend unbekannt. Diese Strukturveränderung führt zu einem Funktionsverlust der Proteine. Die Fibrillen werden wahrscheinlich nicht abgebaut und es kommt in und außerhalb der Zellen zu amyloiden Ablagerungen, welche charakteristisch für degenerative Erkrankungen des ZNS sind, wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Chorea Huntington. Zerovnik *et al.*, 2002 konnten zeigen, dass rekombinantes CSTB *in vitro* spontan amyloide Fibrillen bilden kann. Voraussetzung für die amyloide Strukturveränderung von CSTB ist seine Sekundärstruktur (β_1 , α , β_2 , β_3 , β_4 , β_5). Es ist damit ein geeignetes Modellprotein für Untersuchungen amyloider Strukturen. Die *in vitro* Bedingungen (pH 4,8), unter denen CSTB amyloide Fibrillen bildet, sind bekannt (Zerovnik *et al.* 2002). Die Reaktion beginnt mit einer extensiven Keimbildung (*lag phase*), bei der sich granuläre Aggregate (micellenartig) zu Oligomeren zusammenlagern. Dieser präfibrilläre Status wird durch pH-Werte zwischen 3,3 und 4,8 induziert. CSTB nimmt dabei eine dem nativen Zustand ähnliche oder eine *molten globule*-Konformation an.

Die notwendige Grundeinheit dazu können *domain-swapping*-Dimere oder Endlos-Ketten (*run away domain swapping*) sein (Guo *et al.*, 2006). Das *domain-swapping* findet in der Schleife zwischen den zweiten und den dritten β -Strängen statt.

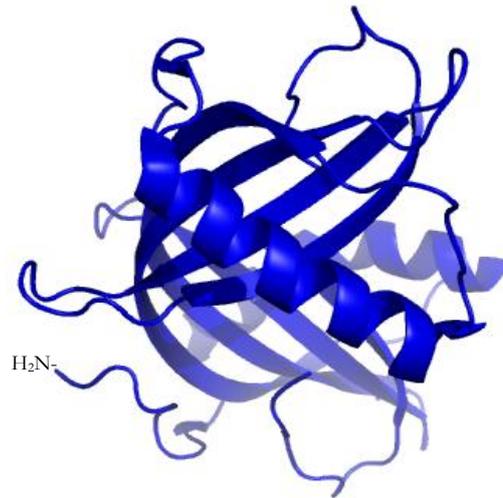


Abb. 1.3.3-1: CSTB-Dimer. 3D-Struktur

Diese Dimere (Abb. 1.3.3.-1) sind Voraussetzung für das Entstehen von CSTB-Tetrameren. Die Tetramer-Bildung findet statt, wenn Prolin-74 von trans zu cis isomerisiert. Anschließend bilden sich höhere CSTB-Oligomere in einer exponentiellen Wachstumsphase durch die Zusammenlagerung von Dimeren und Tetrameren (Kokalj *et al.*, 2007). In weiteren Untersuchungen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die präfibrilläre Form von CSTB zytotoxisch ist und mit sauren Phospholipiden interagieren kann (Anderluh *et al.*, 2005).

Es kann gesagt werden, dass CSTB-Fibrillen charakteristische Gemeinsamkeiten mit anderen Proteinfibrillen zeigen. Dazu gehören die Bindung von Chromogenen, eine ähnliche 3-dimensionale Struktur und die Kinetik des Fibrillenwachstums. Außerdem haben CSTB-Fibrillen keine Inhibitoraktivität mehr (Ekiel *et al.*, 1996). In amyloiden Plaques von Alzheimer- und Parkinson-Patienten wurde neben CSTB auch CSTA nachgewiesen was aufgrund seiner ähnlichen Struktur erklärt werden kann (Ii *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 2000). Ein Großteil dieser Untersuchungen erfolgte in *in vitro*-Modellsystemen mit rekombinantem CSTB bzw. mit CSTB-Mutanten, die im Rahmen von Untersuchungen die zur EPM1-Pathologie gemacht wurden. Polymere Strukturen von CSTB wurden bisher *in vivo* nur von der Gruppe um Cipollini *et al.*, 2008 nachgewiesen.

1.3.4 CSTB - ROLLE BEI DER MALIGNEN TRANSFORMATION

Cystein-Cathepsine und ihre endogenen Inhibitoren - die Cystatine - sind an den unterschiedlichsten Phasen der Entwicklung maligner Tumoren beteiligt. So wird die Konzentration von CSTB z.B. in Probenmaterial für die Diagnostik, die Beurteilung des Verlaufs einer Therapie oder als Anhaltspunkt für das Auftreten eines Rezidivs bestimmt. Cystatine und Cystein-Cathepsine spielen sowohl bei der Tumorprogression als auch bei der Suppression von Tumoren eine Rolle. Für CSTB gibt es unterschiedliche Hinweise für seine Bedeutung in der Tumorbilogie (Keppler *et al.*, 2006). Tumordinvasion und -metastasierung sind unter anderem abhängig von dem proteolytischen Abbau der extrazellulären Matrix. Daran beteiligt sind unter anderem die Cathepsine B und L und Inhibitoren der Cystatin-Superfamilie. So soll eine hohe Konzentration von CSTB bzw. Cystatin A (CSTA) im Tumorgewebe auf eine günstigere Prognose für den Patienten hindeuten (Werle *et al.*, 2006). Beim Bronchialkarzinom korreliert eine erhöhte Expression von CSTB im Tumorgewebe mit einer günstigen Prognose für den Patienten. Hier wird diskutiert, dass die erhöhte Expression der Cystatine A und B die Aktivität der Cathepsine unterdrückt und sie so als Tumorsuppressoren die Überlebenschancen der Patienten verbessern (Werle *et al.*, 2006).

Im Gegensatz dazu gibt es auch Hinweise dafür, dass eine hohe Konzentration von CSTA bzw. CSTB (Kos *et al.*, 2000) in Körperflüssigkeiten für einen ungünstigen Verlauf einer Krebserkrankung spricht.

Auf mRNA-Ebene wurde gezeigt, dass beim Oesophaguskarzinom im Vergleich zum gesunden Gewebe die CSTB-mRNA-Expression deutlich niedriger ist. Mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers konnte dieser Befund auf immunhistochemischer Ebene bestätigt werden. Die niedrige CSTB-Expression wird bei diesem Karzinom als Marker für das aggressive Verhalten des Tumors verwendet (Shiraisshi *et al.*, 1998).

Ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der CSTB-Expression wurden beim Adenokarzinom der Prostata erhalten. Hier beschränkt sich die verringerte Expression auf den zytoplasmatischen Raum von Karzinomzellen (Mirtti *et al.*, 2003). In unterschiedlichen Melanomzelllinien wurde die CSTB-Expression untersucht und gezeigt, dass die Zelllinie mit dem invasivsten Verhalten die niedrigste CSTB-Expression aufweist. In einer hoch-

invasiven Zelllinie wurde eine erhöhte Konzentration von Cathepsin B intra- und extrazellulär nachgewiesen, gleichzeitig aber eine verringert CSTB-Konzentration, was zum invasivem Verhalten dieser Zellen beitragen soll (Klose *et al.*, 2006). Die Gruppe von Piazza *et al.*, 2007 untersuchte in humanen Gliomzellen die Induktion des Zelltodes durch das Parvovirus H-1 (H-PV-1). Von Gliomen ist bekannt, dass sie resistent gegenüber der Zelltod-Induktion durch TRAIL oder Cisplatin sind, wenn das Oncogen Bcl-2 überexprimiert wird. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Infektion der Glioblastomzellen mit dem Parvovirus ein nicht-apoptotischer Zelltod ausgelöst wird. Dabei kommt es im Zytoplasma der infizierten Zelle zur Akkumulation der Cathepsine L und B und zu einer Reduzierung des CSTB-Gehaltes. Zellen welche CSTB überexprimieren sind weniger sensitiv gegenüber dem H-PV-1 induzierten Zelltod als normale Kontrollzellen. In Untersuchungen zu potentiellen Markern für das benigne Meningeom wurde gezeigt, dass die mRNA-Expression von CSTB in atypischen Meningeomen deutlich erhöht ist im Vergleich zum benignen Meningeom (Trinkhaus *et al.*, 2005).

Bei der Suche nach Biomarkern für maligne Tumoren wurde CSTB für das Leberzellkarzinom (HCC) und für das Blasenkarzinom als potentieller Marker identifiziert (Lee *et al.*, 2008; Feldman *et al.*, 2009).

Die meisten Untersuchungen zu CSTB und seiner Rolle als diagnostisch verwendbarer Marker erfolgten auf Gen-Expressionsebene mit einer limitierten Anzahl von Krebsarten, so dass weitere Untersuchungen an unterschiedlichen Krebsarten für eine umfassendere Aussage zur Rolle von CSTB in der Tumorbilogie erforderlich erscheinen.

1.3.5 ROLLE VON CSTB IM IMMUNSYSTEM

Eine Störung der Homöostase zwischen Cathepsinen und Cystatinen kann zu pathologischen Veränderungen führen, wie sie in den vorangestellten Abschnitten beschrieben wurden. Den Protease-Inhibitoren kommt aber nicht nur eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Aktivität endogener Proteasen zu, sondern ebenfalls in der Kontrolle der durch Pathogene, wie z.B. Viren, Bakterien oder Parasiten, freigesetzten Proteasen, welche die Verteidigungsmechanismen des Zielorganismus angreifen sollen. Die genannten Pathogene sezernieren Cysteinproteaseinhibitoren, die sowohl ihre eigenen

Proteasen als auch die Proteasen des Wirtes kontrollieren. Die Inhibitoren können so die Immunantwort des Wirtes modifizieren.

Hashimoto *et al.*, 1999, zeigten, dass die CSTB-Expression auf Genebene nach der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen signifikant erhöht ist. In den Makrophagen konnte keine Co-Lokalisation von CSTB mit den Cathepsinen L, S und B gezeigt werden (Kopitar-Jerala 2006). Untersuchungen von Monozyten, welche mit Lipopolysacchariden (Bestandteile der äußeren Membran gramnegativer Bakterien) behandelt wurden, zeigten eine erhöhte CSTB-Expression. Die Expressionsrate von Cystatin C zeigte im Vergleich zu CSTB keine Veränderungen. Diese Befunde, weisen auf eine mögliche Rolle von CSTB bei der angeborenen Immunabwehr nach einer bakteriellen Infektion hin (Suzuki *et al.*, 2000)

Durch Proteom-Analyse wurde gezeigt, dass CSTB eine Rolle bei der eingeschränkten HIV-1-Replikation in Plazenta-Makrophagen spielt. Untersuchungen mit synthetischen Cysteinproteinase-Inhibitoren zeigten, dass diese in Kombination mit einer anti-retroviralen Behandlung eine deutliche Repression der HIV-Replikation bewirken. In den Makrophagen wird so die primäre HIV-Infektion blockiert und die Virus- Ausbreitung limitiert (C. Luciano-Montavo *et al.*, 2008). In weiteren Versuchen wurde durch Co-Immunpräzipitation gezeigt, dass CSTB mit STAT-1 (Signal Transducers and Activator of Transcription) in aus Monozyten differenzierten Plazenta-Makrophagen interagiert (C. Luciano-Montavo *et al.*, 2009).

1.4 HYBRIDISIERUNG - THEORETISCHE GRUNDLAGEN DER HERSTELLUNG VON MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN

Die von einem Hybridomklon synthetisierten Antikörper besitzen eine identische Struktur mit einer definierter Selektivität und Affinität zu einem Antigen. Köhler und Milstein entwickelten 1975 eine Methode zur Herstellung von monoklonalen Antikörper. Sie zeigten, dass sich mittels somatischer Zellhybridisierung Antikörper-produzierende Zellen durch die Fusion von aktivierten B-Lymphozyten der Milz immunisierter Mäuse mit Maus-Myelomzellen generieren lassen. Die B-Zellen liefern die Fähigkeit zur Synthese der Antikörper, die Myelomzellen die Eigenschaft immortalisierter Zellen zur unbegrenzten Proliferation. Die entstehenden Hybridome gewinnen damit u.a. die Eigenschaft der

kontinuierlichen Antikörperproduktions. Die Zellen fusionieren in Gegenwart von Polyethylenglykol (PEG 1500). Die Selektion der Antikörper-produzierenden Zellklone erfolgt durch mehrfache Vereinzeln der Hybridomzellen nach dem Prinzip der *Limiting Dilution*-Klonierung. Als Fusionspartner wurde die HAT-sensitive Myelomzelllinie P3X63Ag8/653 („Ag8“) gewählt. Diese Zelllinie weist einen Defekt im *Salvage-Pathway* der Nucleinsäuresynthese auf. Es fehlt das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT). HGPRT katalysiert die Synthese Vorstufe von IMP und GMP aus Hypoxanthin. Für die Selektion der Hybridomzellen wird der Hauptstoffwechselweg der Purin- und Pyrimidin-Synthese durch Verwendung von Aminopterin in HAT-Medium (HAT: Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin) blockiert. Eine Zelle, die Nucleotide aus Hypoxanthin über den *Salvage-Pathway* synthetisiert, kann die HAT-Behandlung überleben. Fusionierte Hybridomzellen können diese Fähigkeit durch die B-Lymphozyten erwerben. Myelomzellen sterben dagegen ab, da beide Stoffwechselwege blockiert sind.

1.5 ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

Immunochemische Methoden nutzen die spezifische Wechselwirkung eines Antikörpers mit einem Analyten. Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) wurde zum ersten Mal 1971 von Engvall und Perlmann als Methode zur Bestimmung von Antigenen beschrieben. Es ist ein Testverfahren, das Immunkomplexe aus einem Antigen und einem Antikörper mittels eines zweiten, Enzym-markierten Antikörpers (Konjugat) und eine durch das gekoppelte Enzym katalysierte Farbreaktion nachweist.

Grundlage für den ELISA ist die Festphasenkopplung eines der primär beteiligten Reaktionspartner – Antigen oder Antikörper, was die Trennung von gebundenen und nicht gebundenen Reagenzien erheblich erleichtert. In dieser Arbeit wurden verschiedene ELISA-Formate (indirekter und Sandwich ELISA) angewandt.

Bei dem indirekten ELISA wird das Antigen an die feste Phase adsorbiert (Immuno-sorbens). Nach dem Blockierungsschritt bindet der in der Probe enthaltene Antikörper in einem Zeitraum von einer Stunde an das Antigen. Ungebundene Proteine werden durch Waschen entfernt. Der Nachweis des Antigen-Antikörper-Komplexes erfolgt mit einem enzymgekoppelten Sekundärantikörper. Durch die Reaktion des Enzyms mit einem löslichen Chromogen zu einem löslichen Farbstoff lässt sich die Bildung des Komplexes quantifizieren

Den Sandwich-ELISA zeichnet im Vergleich mit dem indirekten indirekten ELISA eine höhere Sensitivität aus. Es sind für diesen ELISA zwei Antikörper notwendig, welche spezifisch an das Antigen binden. Voraussetzung ist, dass beide Antikörper verschiedene Epitope im Antigen erkennen und sich bei der Bindung nicht behindern. Das Antigen bindet an einen immobilisierten Antikörper (Capture-AK) und wird dann durch einen zweiten, markierten Detektionsantikörper nachgewiesen.

In dieser Arbeit wurde das Streptavidin-Biotin-System eingesetzt. Mit ihm ist es möglich, einen Sandwich-ELISA mit zwei Maus-Antikörpern aufzubauen. Das Biotin des markierten Detektions-Antikörpers ist Voraussetzung für die Bindung von HRP-Streptavidin an diesen Antikörper und den anschließenden enzymologischen Nachweis des gebildeten Sandwiches.

2 AUFGABENSTELLUNG

Wie in den vorangegangenen Kapiteln dargestellt wurde, gibt es viele Hinweise und Befunde, die belegen, dass CSTB an sehr unterschiedlichen Prozessen intra- und extrazellulär beteiligt zu sein scheint. Aber obwohl CSTB als Protein gut charakterisiert ist, sind seine physiologischen Funktionen innerhalb dieser Prozesse weitestgehend unbekannt (Joensuu *et al.*, 2008).

Ein Problem bei der Aufklärung seiner Funktionen war auf Proteinebene in der Vergangenheit das Fehlen hochspezifischer Antikörper gegen das humane CSTB. Viele der publizierten Befunde wurden mit polyklonalen Antikörpern erhoben, deren Spezifität nicht gezeigt werden konnte. Auf Grund der hohen Sequenz-Identität, bzw. -Homologie zwischen Cystatin A und B, sind polyklonale Antikörper aber für solche Untersuchungen ungeeignet, da es mit Ihnen nicht möglich ist, zwischen beiden Inhibitoren sicher zu differenzieren.

Um dieses generelle Problem zu lösen, sollten als primäres Ziel dieser Arbeit monoklonale Antikörper gegen CSTB entwickelt werden. Diese Antikörper sollten spezifisch, kreuzreaktivitätsfrei und gut charakterisiert sein, um sie dann für weiterführende Versuche zur Aufklärung seiner physiologischen und pathophysiologischen Funktionen einsetzen zu können. Die Bindungskonstanten für diese Antikörper waren mit der Quarzmikrowaage zu bestimmen und ihre Epitope im CSTB sollten identifiziert werden.

Mit den so charakterisierten Antikörpern sollte ein ELISA zur quantitativen Bestimmung von CSTB im Serum entwickelt werden. Als Grundvoraussetzung dafür sollten Paare von Antikörpern determiniert werden, die einen sensitiven Sandwich-ELISA ermöglichen. Mit ihm sollte an einem Kollektiv von 77 Probanden in einer Pilotstudie geprüft werden, ob die CSTB-Bestimmung im Serum geeignet sein könnte, das Leberzellkarzinom in einem frühen, noch therapierbaren Stadium sicher zu diagnostizieren - Befunde aus anderen Arbeitsgruppen hatten nachgewiesen, dass CSTB-Gen zu den 20 Genen zählt, die beim Hepatozelluläres Karzinom (HCC) am stärksten überexprimiert werden.

Auch die Fähigkeit dieser Antikörper war zu prüfen, CSTB-Strukturen höherer Ordnung in Zellen nachzuweisen. Diese Untersuchungen sollten mit Hilfe der Zytochemie und der Gelpermeationschromatographie erfolgen, um Interaktionspartner des CSTB aus biologischem Material zu isolieren und zu identifizieren.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIAL

3.1.1 CHEMIKALIEN

Amidoschwarz (0,8%) Lösung	Merck, Darmstadt
ABTS	Roche Diagnostics, Mannheim
Acrylamid-Bisacryamidlösung 37, 5:1	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	SERVA GmbH, Heidelberg
2,2'-Azino-bis[3-ethylbenzthiazolinsulfonsäure (6)] -diammonium-Salz	Roche Diagnostics, Mannheim
Blockierungreagenz für ELISA	Roche Diagnostics, Mannheim
Bromphenolblau	Feinchemie Sebnitz
Citronensäure Monohydrat	Chemapol, Prag
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim
Coomassie®Stain Solution R-250	Bio-Rad Laboratories, München
Digitonin	Roth, Karlsruhe
Essigsäure 100%	Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Ethanol 99,8%	Merck, Darmstadt
Folin-Ciocalteu Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formalinlösung 35%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glutaraldehyd 25% Lösung	SERVA GmbH, Heidelberg
Glutathion, oxidiert (GSSG)	Applichem, Darmstadt
Glutathion, reduziert (GSH)	Applichem, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogentartrat	Merck, Darmstadt
Lumi-Light Western Blotting Substrate	Roche Diagnostics, Mannheim
Methanol	Roth, Karlsruhe

MOPS	Invitrogen, Karlsruhe
NADH ₂	Roche Diagnostics, Mannheim
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumperborat-Tetrahydrat	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Fluka, Schwalbach
4-Nitrobluetetrazoliumchloride (NBT)	Roche Diagnostic, Mannheim
N-[N-(L-3-trans-carboxyoxirane-2-carbonyl)-L-leucyl]-agmatine (E-64)	Roche Diagnostics, Mannheim
Phenol	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Protease Inhibitor Cocktail</i> -Tabletten	Roche Diagnostics, Mannheim
Polyethylenglykol	Roche Diagnostics, Mannheim
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure, konzentriert 37%	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure 5 N	Merck, Darmstadt
Silbernitrat	Fluka, Schwalbach
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	SERVA, Heidelberg
SuperSignal®West Dura Extended Duration Substrate	Pierce, Rockford, USA
Streptavidin-HRP	Amersham, Freiburg
TEMED	Roth, Karlsruhe
1-Step™Ultra TMB-ELISA	Pierce, Rockford, USA
Thimerosal	Fluka, Schwalbach
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt
Triton X-100	SERVA, Heidelberg
Tris-Glycine-Running Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
Tween® 20	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt
Western Blocking Reagent	Roche Diagnostics, Penzberg
EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin	Pierce, Rockford, USA
Nutridoma-CS (50 x)	Roche Diagnostics, Mannheim
Streptavidin-HRP	Amersham, Heidelberg

Kits

Maus-Hybridoma-Subtyping Screening Kit	Roche, Mannheim
Protein Assay	Bio-Rad, München
SilverQuest Staining Kit	Invitrogen, Karlsruhe

Chromatographiematerialien

HiTRap Protein G HP, 1mL	Amersham, Heidelberg
Superdex 75, prep grade	Amersham, Heidelberg
Dextranblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cytochrom c	Sigma-Aldrich, Steinheim

Sonstige Materialien

rec. CSTB	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
rec. CSTA	R&D Systems Wiesbaden-Nordenstadt
Ultrafiltration Membrane Regenerated Cellulose YM10	Millipore, Bedford, England
Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices	Millipore, Bedford, England
Mikrotiterplatte Costar high binding, flat bottom	Bioscience, San Diego, USA
Nitrocellulose Membrane Hybond™-c extra	Amersham, Heidelberg
Tracker Taps RPN 2050 (10 x 15 cm)	Amersham, Heidelberg
Hyperfilm™ ECL	Amersham, Heidelberg
NuPAGE® Novex® Bis-Tris Gel	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® LDS Sample Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
Novex® Tris-Glycine	Invitrogen, Karlsruhe
Native Tris-Glycine Sample Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
PageRuler™	Fermentas, St. Leon-Rot
LysoTracker, green	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.2 ZELLINIEN

P3X63Ag8/653 - HAT-sensitive, murine Myelomzelllinie (Kurzname „Ag8“). Die Zelllinie weist einen Defekt im *Salvage pathway* der Nukleinsäuresynthese auf. Es fehlt das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) (Kearny *et al.*, 1979)

HeLa – humane, epitheliale Cervix-Karzinom-Zelllinie (Gey, *et al.*, 1952)

UTC 8505C – humane Zelllinie aus einem undifferenzierten Schilddrüsenkarzinom mit papillären Strukturen (Ito, *et al.*, 1994).

FTC 133 – humane Zelllinie aus einem metastasierten follikulären Schilddrüsenkarzinom, Zellen bilden noch Thyreoglobulin und besitzen intakte EGF- und TSH-Rezeptoren (Goretzki *et al.*, 1990).

B-CPAP – humane Zelllinie aus einem papillären Schilddrüsenkarzinom (Fabien *et al.*, 1994)

BHK-Zellen *Baby Hamster Kidney*-Zellen, immortalisierte Fibroblastenzelllinie (MacPherson, I. and Stoker, M. 1962)

Zellkulturmaterial und -zusätze wurden von den Firmen Roche, Invitrogen und Sigma-Aldrich bezogen. Für die Immunisierung der Mäuse wurde Freund´s-Adjuvans (komplett und nicht-komplett) von der Firma Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, verwendet.

3.1.3 HEFESTÄMME

Für das Yeast two-Hybrid System wurden folgende Hefestämme verwendet.

Stamm	Genotyp
PJ69-4A	Mata, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2: GAL1 _{UAS} -GAL1 _{TATA} -HIS3, MEL1 GAL2 _{UAS} -GAL2 _{TATA} -ADE2, URA3: MEL1 _{UAS} -MEL1 _{TATA} -lacZ
Y187	Mata α , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4- Δ , met ⁻ gal80 Δ , URA3::GAL1 _{UAS} -GAL1 _{TATA} -lacZ, MEL1

Die Anzucht von *S. cerevisiae* vor der Transformation erfolgte in YPD-Medium:

YPD: 2% BactoPepton (w/v); 1% Hefeextrakt (w/v); 2% Glucose (w/v); pH 6.5

Die Anzucht von *S. cerevisiae* erfolgte in SD-Medium:

SD: 0,67% Hefe-Stickstoff-Base ohne Aminosäuren (w/v); 2% Glucose (w/v)

1x synthetisches Aminosäure Drop-Out-Supplement; pH 5,8

Für YPD- bzw. SD-Agar wurde 1,5% Agar(w/v) hinzugegeben.

3.1.4 ANTIKÖRPER

Antikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Anti-human Cathepsin L mAK 33/1	Maus	AG-Dr.Weber	1:800
Anti-human Cathepsin L pAK	Kaninchen	AG-Dr.Weber	1:200 - 1:600
Anti-human CSTA mAK WR 23/3/3	Maus	AG-Dr.Weber	1: 500
Anti-human Cathepsin B mAK 4B11	Maus	AG-Dr.Weber	1:200 - 1:1000
Sekundärantikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Anti-Maus IgG+M, HRP-markiert, pAK	Kaninchen	Dianova	1:5000 - 1:10000
Anti-Maus IgG, Fc _γ , HRP-markiert, pAK	Kaninchen	Dianova	1:5000 – 1:10000
Anti-Maus-IgG (H+L)-Cy3, pAK	Ziege	Invitrogen	1:400 - 1:600
Anti-Kan. IgG + IgM Alexa Fluor 568, pAK	Ziege	Invitrogen	1:400 - 1:600
Anti-Kan. IgG + IgM Alexa Fluor 488, pAK	Ziege	Invitrogen	1:400 - 1:600

3.2 IMMUNOLOGISCHE METHODEN

3.2.1 GENERIERUNG MURINER MONOKLONALER ANTIKÖRPER GEGEN HUMANES CYSTATIN B

3.2.1.1 ANTIGEN

Natives Cystatin B, welches für die Immunisierung der Mäuse verwendet wurde, wurde aus humanen Milzzellen isoliert und im Rahmen einer Kooperation freundlicherweise von Herrn Prof. A. Rinne (Tromsø, Norwegen) zur Verfügung gestellt (Rinne *et al.*, 1981). Das rekombinante CSTB wurde von der Firma R&D Systems erworben.

3.2.1.2 IMMUNISIERUNG

Für die Immunisierung (Abb. 3.2.1.2-1) wurden drei 3 Monate alte Balb/c-Mäuse eingesetzt und 25 µg natives CSTB pro Maus für die Erstimmunisierung verwendet. Das Protein wurde mit 300 µL komplettem Freundschens-Adjuvans (CFA) und 200 µL isotonischer NaCl-Lösung versetzt und so lange gemischt, bis eine Emulsion entstand, welche in den Peritonealraum der Maus injiziert wurde. Nach einem Zeitraum von 6 Wochen erfolgte die erste Auffrischung der Immunantwort. Pro Maus wurden 25 µg natives CSTB, 300 µL inkomplettes Freundschens-Adjuvans (IFA) und 200 µL NaCl (0,154 M) appliziert. Die zweite Auffrischung der Immunantwort erfolgte nach weiteren 14 Tagen. Pro Maus wurden 20 µg CSTB intraperitoneal injiziert. Dieser Schritt wurde nach 3 Tagen wiederholt und am 4. Tag erfolgte die Isolierung der Milzzellen. Die für die Immunisierung eingesetzten Mäuse wurden identisch behandelt.

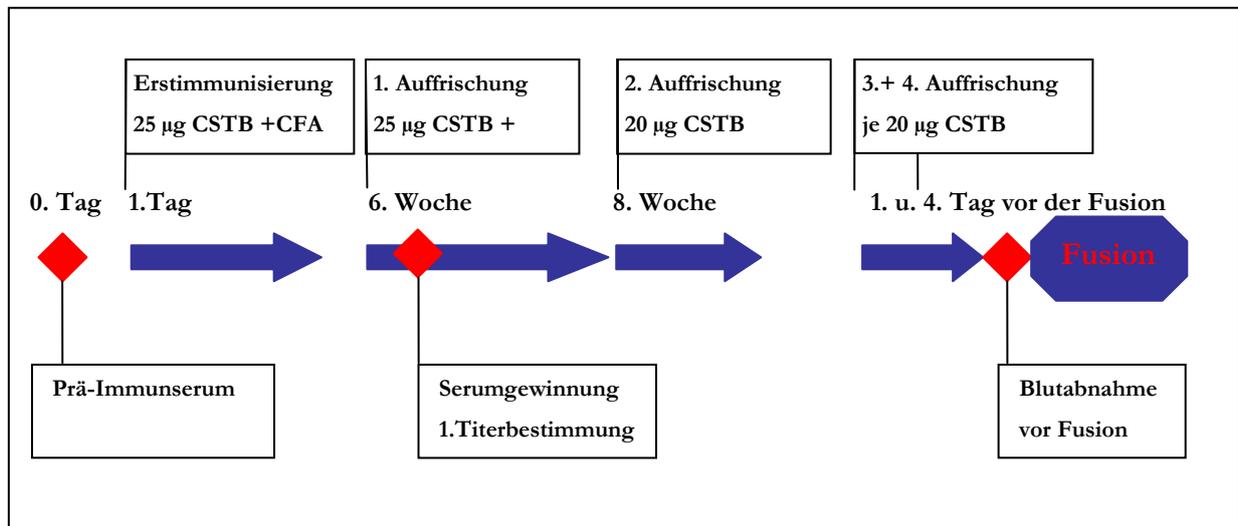


Abb. 3.2.1.2-1: Immunisierung. Schema

3.2.1.3 VORBEREITUNG DER FUSION

Um die Anzahl der Erythrozyten in der zu isolierenden Milz zu reduzieren, wurde der Maus aus der Schwanzvene Blut entnommen. Die Milzentnahme erfolgte ca. 30 Minuten nach der Blutentnahme (ca. 0,5 mL).

Die Myelomzellen befanden sich zum Zeitpunkt der Fusion in der exponentiellen Wachstumsphase. Als Vorbereitung für die Fusion wurden sie 4-mal mit FKS-freiem Medium gewaschen.

3.2.1.4 ISOLIERUNG DER B-LYMPHOBLASTEN AUS DER MILZ

Die Milz wurde präpariert und in eine 6 cm-Petrischale überführt. Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Für die Isolierung der Lymphoblasten wurde die Milzkapsel zweimal mit 10 mL Serum-freiem Medium ausgespült, die Zellen wurden isoliert und die Zellzahl bestimmt. Im Anschluss erfolgte die Fusion.

3.2.1.5 FUSION VON MAUS-B-LYMPHOBLASTEN MIT MAUS-MYELOMZELLEN (P3X63 AG8/653)

Serumfreies Medium und Polyethylenglykol (PEG 1500) wurden im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die Zellen der Myelomzelllinie Ag8 und die Milzzellen wurden im Verhältnis von 1 zu 1 gemischt, in ein Glaszentrifugenröhrchen überführt, mit 25 mL serumfreiem Medium versetzt und bei 300 x g für 10 min zentrifugiert (Abb. 3.2.1.5-1). Anschließend wurde der Überstand vollständig entfernt. Das Zellsediment wurde im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Alle folgenden Schritte wurden unter Drehen des Zentrifugenröhrchens bei 37°C durchgeführt. Die Zugabe von 1,5 mL vorgewärmtem PEG 1500 zum Zellsediment erfolgte in einem Zeitraum von 1 min. Für eine vollständige Durchmischung der Zellen mit PEG 1500 wurde das Zentrifugenröhrchen für eine weitere Minute bei 37°C gedreht. Anschließend wurde vorgewärmtes, serumfreies Medium in folgenden Schritten zugegeben:

1. 1 mL in 60 s,
2. 3 mL in 60 s,
3. 18 mL in 60 s.

Die Zellen wurden vorsichtig resuspendiert und 10 min bei 200 x g zentrifugiert. Ehe der Überstand abgesaugt und die Zellen (Sediment) in 8 mL HAT-Medium (Endkonzentration im Ansatz: Hypoxanthin 100 µM, Aminopterin 0,4 µM, Thymidin 16 µM) resuspendiert wurden, erfolgte eine 5 minütige Inkubation bei 37°C im Wasserbad. 1 mL dieser Zellsuspension wurde in 40 mL HAT-Medium gegeben und in 4 Zellkultur-platten (96-Flachboden) ausplattiert. Die Zellkulturplatten waren mit Makrophagen und HAT-Medium vorbeschichtet. Die nicht in die Kultur überführten Zellen wurden kryokonserviert.

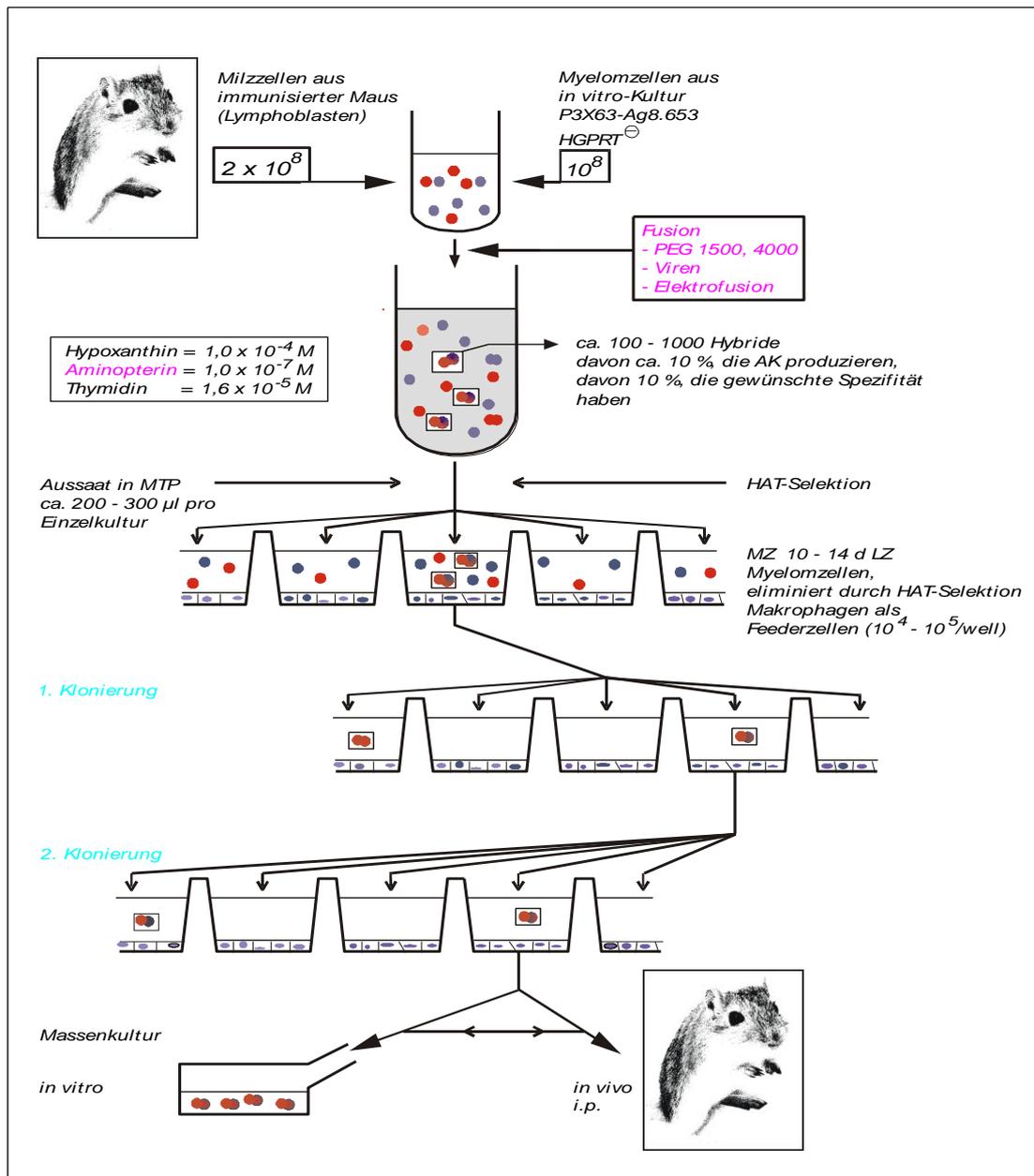


Abb. 3.2.1.5-1: Generierung monoklonale Antikörper-produzierender Hybridome. Schema

3.2.1.6 KULTIVIERUNG DER FUSIONSPRODUKTE IN SELEKTIONSMEDIUM UND KOLONIERUNG POSITIVER HYBRIDOME

Das Verfahren der Zellfusion erfasst nicht alle Zellen. Nach der Fusion verbleiben zunächst nicht-fusionierte Zellen in der Kultur. Auf Grund der HAT-Selektion kann nur ein Teil der fusionierten Zellen (Klone) überleben, die nach einem Zeitraum von 2-3 Wochen HAT-Kultivierung identifiziert wurden. Der Zellkulturüberstand der einzelnen Kavitäten wurde in einem indirekten ELISA auf das Vorhandensein von spezifischen anti-CSTBAntikörpern untersucht. Positive Klone wurden selektiert und kloniert. Für die

Isolierung dieser Klone wurde aus der entsprechenden Kavität der Mutterplatte das Zellgemisch so verdünnt, dass pro Kavität statistisch nur eine einzige Antikörperproduzierende Zelle kultiviert wurde. Dazu wurden die Zellen aus den positiven Kavitäten mit einer sterilen Pipette entnommen und in ein Röhrchen überführt. Nach der Zellzahlbestimmung wurde die Zellsuspension auf 10^4 Zellen/mL eingestellt. Von dieser Verdünnung wurden 200 μ L in die erste Kavität gegeben, welche Medium mit Nutridoma-CS enthielt. Aus dieser Kavität wurden 100 μ L entnommen und in die nächste Kavität überpipettiert. Dieser Schritt wurde bis zur Kavität 12 wiederholt. Während der Klonierungen wurden die Zellen in HAT- bzw. HT-Medium kultiviert, nach 10 Tagen wurden die Klone im indirekten ELISA erneut bezüglich ihrer spezifischen Antikörperproduktion überprüft. Positive Klone wurden rekloniert, anschließend propagiert und kryokonserviert.

3.2.1.7 PRÄPARATION VON MAUS-PERITONEAL-MAKROPHAGEN ALS FEEDERZELLEN

Peritoneal-Makrophagen sollen in der Co-Kultur mit den Hybridomzellen tote Zellen durch Phagozytose beseitigen und Wachstumsfaktoren freisetzen. Die Feederzellen wurden vor der Fusion aus der immunisierten Maus gewonnen. Die Präparation fand unter sterilen Bedingungen statt. Für eine effektive Makrophagengewinnung wurde der Bauchraum der Maus massiert. Der Peritonealraum wurde eröffnet und 4-mal mit 1 mL HAT-Medium gespült. Das wiedergewonnene Medium enthielt die Makrophagen und wurde in einem eisgekühlten Zentrifugenröhrchen gesammelt. Es folgte die Zellzahlbestimmung. Die Zellzahl wurde auf 1×10^6 Zellen/5 mL RPMI 1640 eingestellt und 100 μ L der Feederzellsuspension wurden in jede Kavität der 96-Well-Zellkulturplatten gegeben.

3.2.2 CHARAKTERISIERUNG DER ANTI-CSTB-ANTIKÖRPER

3.2.2.1 ISOTYPBESTIMMUNG

Die Ermittlung der Immunglobulin-Isotypen dient unter anderem der Kontrolle der Monoklonalität der Klone und ist für einige Verfahren, wie zum Beispiel die Reinigung der Antikörper, unerlässlich. So sind zum Beispiel die Bindungsaffinitäten an Protein G bzw. Protein A je nach Immunglobulin-Isotyp unterschiedlich. Eingesetzt wurde der Maus-Hybridoma-Subtyping Kit, ein ELISA der Firma Roche, welcher nach Anleitung

des Herstellers nach dem Antigen-unabhängigen Testprinzip angewandt wurde. Auf Grund der Eigenschaften des eingesetzten „Wandantikörpers“ (Anti-Maus-Ig) stören Fremd-Ig, wie z. B. Rinder-Ig aus dem Zellkulturmedium, durch unspezifische Bindung nicht. Der Wandantikörper erkennt alle Ig-Klassen und Subklassen der Maus unabhängig vom Typ der leichten Ketten.

3.2.2.2 KREUZREAKTIONEN

Die generierten monoklonalen anti-CSTB-AK wurden bezüglich ihrer Kreuzreaktion mit Cystatin A im Immunoblot und im indirekten ELISA untersucht. Die einzelnen Methoden werden unter 3.2.4.1/3.4.1 beschrieben.

3.2.2.3 EPITOPE MAPPING

Alle folgenden Arbeitsschritte der Epitopkartierung wurden auf einem Rotationsschüttler bei Raumtemperatur durchgeführt. Die genutzten Puffer und ihre Zusammensetzung sind in Tabelle 3.2.2.3-1 genannt. Begonnen wurde mit einer Inkubation der Cellulosemembran mit Methanol für 10 min, dass durch Waschen mit TBST (3 x 8 min) vollständig wieder entfernt wurde. Unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Cellulosemembran konnten durch Blockierung (Roche Western Blocking solution) beseitigt werden. Die Membran wurde nach dem Waschen mit TBST (10 min) mit dem Antikörper (1-10 µg/mL), dessen Bindungsepitop bestimmt werden soll, in Blockpuffer für 90 min inkubiert. Der Primärantikörper kann aber auch gleichzeitig mit dem Sekundärantikörper auf der Membran inkubiert werden (Co-Inkubation). Erfolgte keine Co-Inkubation, wurde durch Waschen mit TBST für fünf Minuten nicht gebundener Antikörper von der Cellulosemembran entfernt und im nächsten Schritt mit dem Konjugat Anti-Maus-IgG Fc, HRP (1:10000) für 90 min inkubiert. Nach einem Waschschrift (3 x 10 min) erfolgte die Detektion des Antikörperkomplexes unter Verwendung des ECL Lumi-Light Immunoblotting Substrate entsprechend den Herstellerangaben. Das entstandene Chemilumineszenz-Licht wurde auf einem ECL-Film dokumentiert.

Tab. 3.2.2.3-1: Epitope Mapping. Puffer

Puffer	Zusammensetzung
TBST	TBS, 0,05% (v/v) Tween® 20
Blocklösung	WB-Reagent, TBST, 146 mM Saccharose

3.2.2.4 BESTIMMUNG DER BINDUNGSKONSTANTEN FÜR DIE MONOKLONALEN ANTI- CSTB-ANTIKÖRPER MIT HILFE DER QCM-TECHNIK

Für die Charakterisierung der Antikörper wurden unter anderem die Bindungskonstanten zwischen den Antikörpern und Cystatin B mit der Quarzmikrowaage bestimmt. Piezoimmunosensoren werden u.a. zur Konzentrationsbestimmung von Antigenen und Antikörpern genutzt. Dabei erfasst die Quarzmikrowaage kleinste Masseanlagerungen an der Goldelektrode einer dünnen Quarzscheibe. Das Prinzip beruht auf der Eigenschaft von Schwingquarzen (Sensoren), bei Massenbeladung linear mit einer Frequenzänderung zu reagieren (Sauerbrey 1959). In den Versuchen wurden 10 MHz-Quarze verwendet, welche eine Frequenzabnahme von einem Hz bei einer Massenbeladung von 1,2 ng/cm² zeigen. Zunächst musste die Goldelektrode des Quarzsensors in einem self-assembly-Prozess über Nacht bei RT aktiviert werden. Dies erfolgte mit einer 1 mM 16-Mercaptohexadecansäure/Ethanol-Lösung in einem geschlossenen Gefäß. Anschließend mussten die Quarze mit Ethanol (96%) gespült und im Stickstoffstrom getrocknet werden. Die auf der Oberfläche entstandenen Carboxylgruppen wurden für 10 min mit einer EDC-Lösung (1 mg/mL, pH 3,5) aktiviert. Im Stickstoffstrom erfolgte die erneute Trocknung der Goldelektrode. Anschließend konnte die Kopplung des Antigens an den Sensor erfolgen. Dazu wurden die Antigenlösungen über Nacht bei 4°C mit der aktivierten Goldelektrode inkubiert. Das Antigen Cystatin B wurde in der nativen Form (0,06 mg/mL PBS) und in der rekombinanten Form (0,1 mg/mL PBS) verwendet. Pro Sensoroberfläche wurde ein Volumen von 100 µL der oben definierten Antigenlösungen benötigt. Nach Beschichtung über Nacht bei 4°C wurden die Sensoren mit Wasser gespült und in die Quarzmikrowaage eingebaut. Anschließend erfolgte die Spülung mit PBS bis eine konstante Ausgangsfrequenz des Schwingquarzes erreicht wurde. Die Antikörperlösung wurde dann in einem konstanten Pufferstrom über den Sensor gespült. Es kommt zur Bindung des Antikörpers und damit zur Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes, welche über eine Frequenzabnahme (Massenzunahme an der Oberfläche des Sensors) detektiert wurde. Danach wurde mit PBS-Puffer gespült, was zu einer teilweisen Dissoziation des Antikörpers vom Antigen führte, welche durch eine leichte Frequenzzunahme (Massenabnahme an der Oberfläche des Sensors) erkennbar war.

3.2.2.5 IMMUNZYTOCHEMISCHE FÄRBUNG

Immunfluoreszenzuntersuchungen wurden an drei etablierten Zelllinien durchgeführt, welche aus Schilddrüsenkarzinomen unterschiedlicher Malignität entwickelt wurden. Die Zellen wurden auf Poly-L-Lysin Hydrobromid (0,5 mg/mL) beschichteten 12 mm-Deckgläsern ausgesät und wuchsen dort bis zur 60-80%-igen Konfluenz. Anschließend wurden die Deckgläser 3-mal mit PBS gewaschen, um die Eigenfluoreszenz des Mediums zu minimieren. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 4% Paraformaldehyd für 10 min bei Raumtemperatur. Um die Reaktion zu stoppen, wurde einmal mit 50 mM Glycinlösung gespült. Für die Permeabilisierung der zellulären Membranen wurden die Zellen mit 0,5% Triton X-100 in PBS für 20 min inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen durch 1% (v/v) Magermilch in PBS für 30 min. Nach dem Blocken wurden die Präparate mit 20 µL Primärantikörper-Lösung für 1 h in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch Waschen mit 1% Magermilch in PBS entfernt und die Präparate wurden mit den entsprechenden Sekundärantikörpern, an welche Fluorochrome (Alexa Fluor 568, Cy3) gekoppelt und die in 1% Milchpulver verdünnt worden waren, für 1 h unter Lichtausschluss inkubiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33258 angefärbt, ehe die Zellen in 96%-igem Ethanol entwässert und die Präparate auf dem Objektträger durch die hydrophile Einbettung mit Mowiol (5% Mowiol [w/v] 30% Glycerol [v/v] 0,25% DABCO [w/v]) fixiert wurden. Aushärtung und Lagerung erfolgten im Dunkeln bei 4°C. Die Fluoreszenzbilder wurden an einem Nikon Eclipse E600 Mikroskop mit Hilfe einer Vosskühler CCD-1300-QLN-Kamera dokumentiert. Verwendet wurde ein Apo TIRF-Objektiv (60 x/1,49 in Öl). Die Auswertung und Bearbeitung der Bilder erfolgte mittels der Software NIS-Elements AR 2.30 MuTech MV1500, Lucia G/F Version 4.71.

3.2.3 MASSENPRODUKTION MONOKLONALER ANTIKÖRPER

Zur Herstellung größerer Mengen der anti-CSTB-AK wurden die Antikörper produzierenden Hybridomzellen (1×10^8 Zellen pro Klon) in einem *TECNOMOUSE Hollow Fiber Fermenter* (Integra Bioscience, Fernwald, Germany) kultiviert. Dieser Fermenter gliedert sich in ein Produktionsmodul, in dem die Zellen in 10% FCS in RPMI 1640 kultiviert werden und in ein Versorgungsmodul, aus dem die Hybridomzellen über eine semipermeable Membran (Ausschlussgröße von 10 kDa) mit RPMI 1640 versorgt

werden. Die Membran hält Zellen und hochmolekulare Produkte im Produktionsmodul zurück, während Nährstoffe, physikalisch gelöste Gase und kleinere Metabolite passieren können. Das Produktionsmodul wird außerdem noch über eine gasdurchlässige Membran mit 5% CO₂ versorgt. Diese Anordnung ermöglicht eine starke Anreicherung von Zellen und Zellprodukten. Zu Beginn werden 10 mL Zellsuspension (10% FKS in RPMI 1640) in das Produktionsmodul überführt. Das angeschlossene Versorgungsmodul garantiert die permanente Mediumzufuhr. 20 mL der Kultur wurden pro Woche geerntet und durch frisches RPMI 1640 mit FKS ersetzt. Die Zellsuspension wurde bei 550 x g zentrifugiert und der Überstand bis zur späteren Reinigung der Antikörper bei -20°C aufbewahrt.

3.2.3.1 REINIGUNG DER ANTIKÖRPER MIT HILFE DER AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

Die von den Hybridomzellen produzierten monoklonalen Antikörper werden in das Kulturmedium abgegeben. Zur Konzentrierung der Antikörper wurde eine Aufreinigung mit Hilfe der Affinitätschromatographie an Protein G-Sepharose durchgeführt. Protein G ist ein Zelloberflächenprotein der Streptokokken der Gruppe G und bindet über einen Typ III Fc-Rezeptor an die Fc-Region der Maus-IgG. Die Matrix besteht aus Protein G, das an Sepharose-Beads gekoppelt ist (Nilson *et al.*, 1986). Die Bindungskapazität der eingesetzten Protein G-Sepharose beträgt ca. 7 mg murine IgG/mL Matrix. Die Affinitätsreinigung der murinen AK wurde mit einem *Low Pressure Liquid Chromatography-System* durchgeführt. Die Matrix wurde durch Spülen mit 10 Säulenvolumen (= 10 mL) Bindungspuffer (Tab. 3.2.3.1-1) äquilibriert. Die Zellkulturüberstände wurden bei 3500 x g (10 min) zentrifugiert und 1:5 mit Bindungspuffer verdünnt. Nach der Applikation der Probe wurde die Säule mit dem 20-fachen Säulenvolumen (= 20 mL) Bindungspuffer gewaschen. Das Elutionsprofil wurde bei 278 nm aufgezeichnet. Das Eluat wurde fraktioniert gesammelt. Proteinhaltige Fraktionen wurden durch Zugabe von 50 µL 1 M Tris-Puffer, pH 9,0 (Tab. 3.2.3.1-1) neutralisiert. Die Säulenmatrix wurde sofort nach Beendigung der Elution mit 10 Säulenvolumina Bindungspuffer (Tab. 3.2.3.1-1) äquilibriert. Die Reinheitskontrolle der eluierten Proben erfolgte mit der SDS-PAGE und der Coomassie G250-Färbung. Die Umpufferung des Eluates erfolgte mittels Dialyse gegen PBS. Zur Standardisierung der Antikörperlösungen wurden die Proben mit Hilfe von Amicon®Ultra-15 50000 NMWL-Zentrifugenröhrchen auf 1 mg/mL konzentriert. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford.

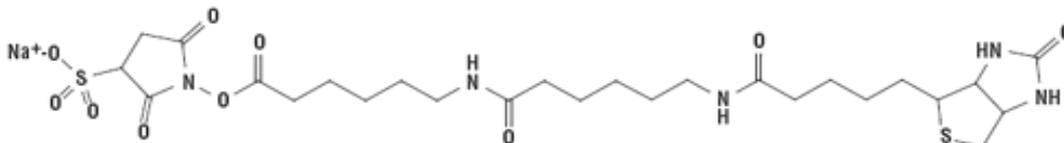
Tab. 3.2.3.1-1: Affinitätsreinigung. Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Bindungspuffer	20 mM Na ₂ HPO ₄ / 20 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 7,0)
Elutionspuffer	0,1 M Glycin-HCl (pH 2,7)
Neutralisationspuffer	1 M Tris-HCl, 0,01% Thimerosal (pH 9,0)

3.2.3.2 BIOTINYLIERUNG DER MONOKLONALEN ANTI-CSTB-ANTIKÖRPER

Biotin (Vitamin H) ist eine gut wasserlösliche Verbindung, die mit hoher Affinität ($K_D = 10^{-15}$ M) nicht-kovalent an Avidin, ein Glykoprotein aus dem Hühnereiweiß, und an Streptavidin, ein nicht-glykosyliertes Protein aus Streptokokken, bindet (Updyke et al., 1986). Nach der kovalenten Bindung von Biotin an den Antikörper kann HRP-markiertes Streptavidin zur Detektion des Antikörpers verwendet werden.

Für die Biotin-Kopplung wurden affinitätsgereinigte Antikörper mit einer Konzentration von 1 mg/mL eingesetzt. Die Kopplungsreaktion findet zwischen den primären Aminogruppen (-NH₂) des Lysins (K), dem N-Terminus des Antikörpers und dem NHS-aktivierten-Biotin-Molekül unter der Ausbildung einer kovalenten Amidbindung statt. Der Biotinester wurde nach Herstellervorschrift eingesetzt 2 mg/mL EZ-Link® Sulfo-succinimidyl-6-(biotin-amido)hexanoat (Abb. 3.2.3.2-1) wurden in aqua bidest. gelöst und im 20-fachen molaren Überschuss zur Antikörperlösung gegeben. Die entsprechenden Ansätze wurden unter langsamem Rühren 1 h inkubiert. Um die Kopplungsreaktion zu beenden und um überschüssiges Biotin zu entfernen, wurde dann 3 mal gegen 1 L PBS (270 mM NaCl, 16 mM Na₂HPO₄, 2,9 mM KH₂PO₄, 5,4 mM KCl pH 7,4) dialysiert. Die Proteinkonzentration der biotinmarkierten Antikörper wurde nach Bradford bestimmt. Die Antikörper wurden mit 0,01% Thimerosal konserviert. Zur Funktionskontrolle der markierten Antikörper wurde im indirekten ELISA (Kap. 3.2.4.1) ihre Reaktivität mit der der entsprechenden nicht-markierten Antikörper verglichen. Ergaben sich bei diesem Vergleich Hinweise darauf, dass bei der Biotin-Kopplung Aktivität und Löslichkeit der Antikörper negativ beeinflusst worden waren, wurden weitere Kopplungen mit veränderten Konzentrationen des Biotin-NHS-LC-LC-Esters durchgeführt.

**Abb. 3.2.3.2-1:** EZ-Link® Sulfosuccinimidyl-6-(biotin-amido)hexanoat.

3.2.4 ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

In dieser Arbeit wurden verschiedene ELISA-Formate angewandt.

3.2.4.1 INDIREKTER ELISA

Der indirekte ELISA diente in dieser Arbeit zum Nachweis spezifischer Antikörper in Mausseren oder in Hybridoma-Zellkulturüberständen. Die verwendeten Puffer und Ihre Zusammensetzung sind in Tabelle 3.2.4.1-1 genannt. Nachfolgend sind die einzelnen Arbeitsschritte für den indirekten ELISA genannt:

- Adsorption: 50 μ L Cystatin B-Lösung/Kavität (3 μ g/mL natives Cystatin B in TBS oder 5 μ g/mL rec. Cystatin B in TBS) über Nacht bei 4°C
- Waschen: 3 x NaCl-Tween® 20
- Blockierung: 200 μ L Blocklösung/Kavität, 30 min, RT
- Waschen: 3 x NaCl-Tween® 20
- 1. Immunreaktion: 20 μ L ELISA-Puffer/Kavität vorlegen + 30 μ L Hybridoma-Kulturüberstand/Kavität, 90 min, RT
- Waschen: 3 x NaCl-Tween® 20
- 2. Immunreaktion: 50 μ L/Kavität anti-Maus-IgG-Fc γ -HRP (1:5000), 60 min, RT
- Waschen: 3 x NaCl-Tween® 20
- Nachweis des IK: 50 μ L/Kavität ABTS-Chromogenlösung, 45 min, RT,
- Quantifizierung. Wellenlänge: 405 nm, Referenzwellenlänge: 492 nm

Die am Immunkomplex (IK) beteiligte Peroxidase katalysiert in dieser Reaktion die Oxidation von ABTS (2,2'-Azino-bis-[3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure]) in Gegenwart von H₂O₂ (Abb. 3.2.4.1-1). Es entsteht zunächst ein metastabiles Radikalkation, das sehr langsam in ABTS und ein Azodikation disproportioniert. Das Absorptionsmaximum des Radikalkations liegt bei 414 nm. Die OD-Werte positiver Proben sollten im Bereich zwischen 0,5 – 2,0 und die des Kontroll-ELISA sollten \leq 0,1 sein.

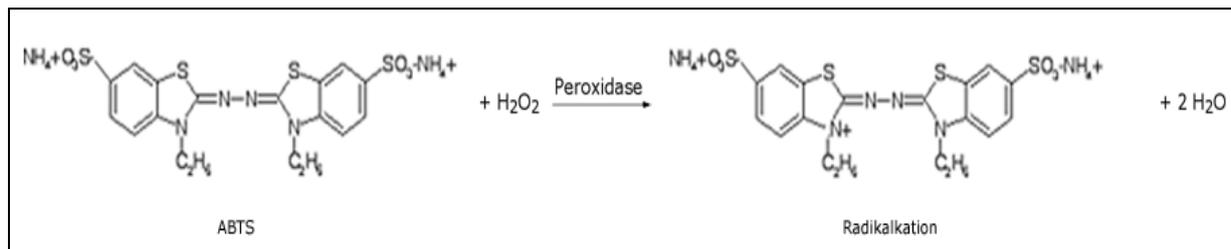


Abb. 3.2.4.1-1: Oxidation von ABTS durch HRP

Tab. 3.2.4.1-1: Indirekter ELISA. Puffer

Puffer	Zusammensetzung
TBS (Bindungspuffer)	20 mM Tris-HCl; 155 mM NaCl (pH 7,5)
NaCl-Tween (Waschpuffer)	155 mM NaCl; 2% (v/v) Tween [®] 20
ELISA-Puffer	TBS; 0,05% (v/v) Tween [®] 20 (pH 7,5)
Substratpuffer	3,25 mM Natriumperborat 39,8 mM 2-Hydroxypropan-1,2,3-tricarbonsäure 60 mM Na ₂ HPO ₄ (pH 4,4)

3.2.4.2 QUANTITATIVER IMMUNOASSAY - SANDWICH ELISA

In dieser Arbeit wurde das Streptavidin-Biotin-System eingesetzt. Mit ihm ist es möglich, einen Sandwich-ELISA mit zwei Maus-Antikörpern aufzubauen (Abb. 3.2.4.2-2) Das Biotin des markierten Detektions-Antikörpers ist Voraussetzung für die Bindung von HRP-Streptavidin an diesen Antikörper und den anschließenden enzymologischen Nachweis des gebildeten Sandwiches.

- Adsorption: Capture-Antikörper über Nacht bei 4°C
- Waschen: 3 x NaCl-Tween[®] 20
- Blockierung: 200 µL Blocklösung/Kavität, 30 min, RT
- Waschen: 3 x NaCl-Tween[®] 20
- Immunreaktion: 50 µL/Kavität Cystatin B-haltige Probe, 90 min, RT
- Waschen: 3 x NaCl-Tween[®] 20
- Immunreaktion: 50 µL/Kavität biotinmarkierter Detektionsantikörper, 60 min, RT
- Waschen: 3 x NaCl-Tween[®] 20
- Nachweis des Immunkomplexes: 50 µL/Kavität TMB-Chromogenlösung, maximal 5 min, RT (Abb. 3.2.4.2-1)
- Stoppen: 50 µL 1N H₂SO₄/Kavität
- Quantifizierung: Wellenlänge: 450 nm,
Referenzwellenlänge: 620 nm (Abb. 3.2.4.2-1)

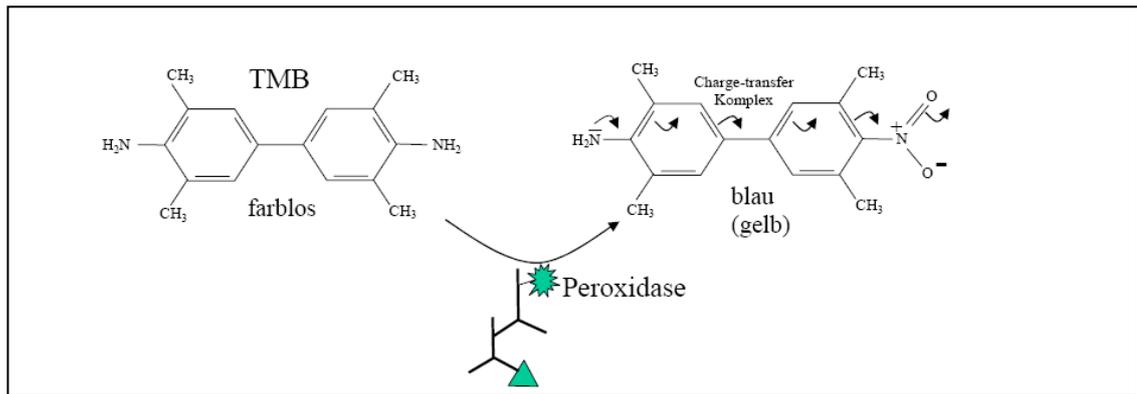


Abb. 3.2.4.2-1: Oxidation von TMB durch HRP

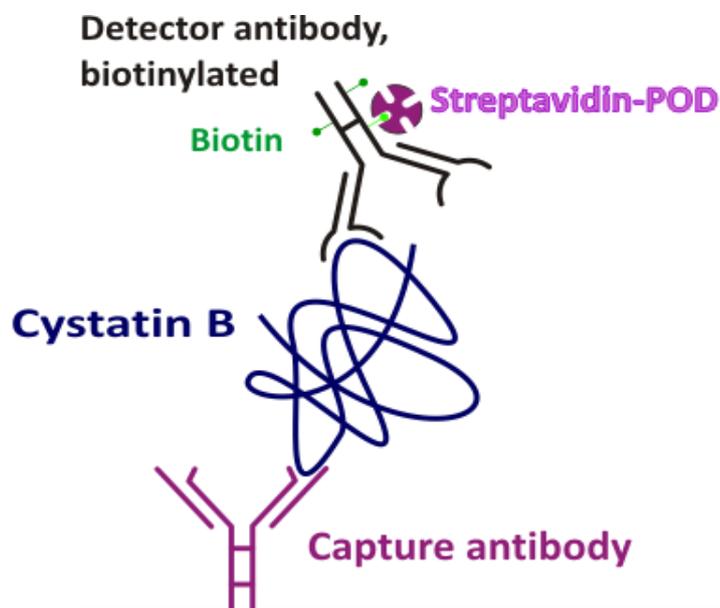


Abb. 3.2.4.2-2: CSTB-Sandwich-ELISA. Prinzip

Die Etablierung eines CSTB-Sandwich-ELISA für die quantitative CSTB-Bestimmung im unter standardisierten Bedingungen setzt sich aus folgenden Schritten zusammen:

- Selektion von geeigneten Antikörperpaaren
- Ausschluss von unspezifischen Reaktionen im ELISA
- Erstellung einer CSTB-Standardkurve

3.2.4.2.1 Selektion von geeigneten Antikörperpaaren

In den Versuchen sollten ein *Capture*-AK und ein Detektions-AK ermittelt werden, welche in Kombination im Sandwich-ELISA die höchste Sensitivität zur Bestimmung von CSTB zeigen. Alle 6 generierten anti-CSTB-mAK wurden als Capture-Antikörper

eingesetzt. Als Detektor-Antikörper standen nur die Antikörper zur Verfügung, welche erfolgreich biotinyliert werden konnten. Voraussetzung für den Einsatz von zwei Antikörpern als Antikörperpaar ist eine affine Bindung an CSTB, ohne dass sie sich dabei sterisch behindern. Die Konzentrationen der eingesetzten Antikörper lagen zwischen 5 µg/mL für den Capture-Antikörper und 10 µg/mL für den Detektor-Antikörper. Da Antigen-Antikörper-Reaktionen Gleichgewichtsreaktionen sind, unterliegen sie dem Massenwirkungsgesetz. Für die sensitive Bestimmung von CSTB müssen beide anti-CSTB-mAK im Überschuss vorliegen, bzw. eingesetzt werden. Alle potenziellen Antikörperpaare wurden bezüglich ihrer Verwendbarkeit für die Bestimmung von Cystatin B (1 ng/mL) im Sandwich-ELISA untersucht.

3.2.4.2.2 Ausschluss von unspezifischen Reaktionen im Sandwich-ELISA

Um eine unspezifische Bindung von Proteinen an die ELISA-Platten auszuschließen, wurden die Antikörper und die Probe in Einzelschritten durch Blocklösung ersetzt (Tab. 3.2.4.2.2-1). Eine mögliche unspezifische Bedingung wurde durch die Zugabe des Substrats nachgewiesen.

Tab. 3.2.4.2.2-1: Kontrollen im Sandwich-ELISA

	1. Kontrolle (TBS-Kontrolle)	2. Kontrolle (Leerwert)	3. Kontrolle	4. Kontrolle
Capture-mAK	██████████	Capture-mAK	██████████	██████████
CSTB	CSTB	██████████	██████████	██████████
Detektions-mAK	Detektions-mAK	Detektions-mAK	Detektions-mAK	██████████
Streptavidin-HRP	Streptavidin-HRP	Streptavidin-HRP	Streptavidin-HRP	Streptavidin-HRP
Substrat (TMB)	Substrat	Substrat	Substrat	Substrat

3.2.4.2.3 Erstellung der CSTB-Standardkurve

Für die quantitative CSTB-Bestimmung im Serum war es notwendig, eine CSTB-Standardkurve zu erstellen. Im Sandwich-ELISA wurden dazu unterschiedliche Konzentrationen von Capture- und Detektions-Antikörpern, sowie verschiedene CSTB-Konzentrationen getestet. Die Ausgangskonzentrationen von CSTB in der ersten Kavität waren 1 µg/mL oder 50 ng/mL. Sie wurden jeweils 1:2 in seriellen Schritten bis zur 12.

Kavität verdünnt. Alle Standardkurven wurden als Mehrfach-Bestimmungen mit der entsprechenden TBS-Kontrolle aufgenommen.

3.2.4.2.4 CSTB-Bestimmung im Plasma gesunder Probanden und im Plasma von Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom (HCC)

Die Untersuchung der Probandenplasmen erfolgte mit dem unter 3.2.4.2 beschriebenen Sandwich-ELISA. Der Capture-Antikörper (1 mg/mL) wurde 1:1000 verdünnt eingesetzt, der Detektions-Antikörper (1 mg/mL) ebenfalls 1:1000 verdünnt. Die Plasmen wurden in Blockpuffer seriell in sechs Schritten verdünnt, beginnend mit der Verdünnung von 1:2 bei der Kontrollgruppe und mit einer 1:10 Verdünnung bei der HCC-Patientengruppe. Die Plasmen der HCC-Patienten wurden im Rahmen einer Zusammenarbeit mit der FSU-Jena und der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg zur Verfügung gestellt. Die Plasmen der Kontrollgruppe stammten von freiwilligen Spendern.

3.2.5 AUSWERTUNG DER ELISA

Zur Erstellung der Standardkurven wurden die Konzentrationen logarithmiert und auf der Abszisse aufgetragen. Die Ordinate umfasste die Absorptionswerte der verschiedenen konzentrierten Proben. Das Ergebnis war immer eine Kurve mit einem sigmoidalen Verlauf. Die erstellten Kurven enthielten absolute Messwerte. Die statistische Signifikanz wurde mit den allgemein akzeptierten Signifikanzniveaus von 5% bzw. 0,3% (hochsignifikant) berücksichtigt. Dazu eignete sich ein im Statistikprogramm Origin enthaltener t-Test.

3.3 PROTEINCHEMISCHE METHODEN

3.3.1 SDS-PAGE UND IMMUNOBLOT-ANALYSE

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970). Auf Grund der Bindung von SDS an die Proteine entstehen negativ geladene SDS-Protein-Komplexe mit einem annähernd konstanten Ladungs-Masse-Verhältnis. Diese Komplexe wandern im elektrischen Feld zur Anode und werden durch den Molekularsiebeffekt der Polyacrylamidmatrix nach der Molmasse getrennt. Die Gele hatten eine Abmessung von 83 x 73 mm und waren 15 mm dick. Die Trenngele hatten Acrylamidkonzentrationen von 15% oder 7,5% und die Sammelgele eine Acrylamidkonzentration von 5% (Tabelle 3.4.1-1). Die eingesetzten Proben hatten Proteinkonzentrationen in einem Bereich von 10 ng Protein/Slot bis zu 100 µg Protein über die gesamte Gelbreite. Die Proteinproben wurden im Verhältnis von

1:2 mit SDS-Probenpuffer (10 % Glycerol [v/v]; 2,3% SDS [w/v]; 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8) versetzt und anschließend für 5 min auf 95°C erhitzt. Für die Trennung der Proteingemische unter reduzierenden Bedingungen wurde Mercaptoethanol (10% [v/v]) in den Probenpuffer gegeben. Nach dem 5-minütigen Erhitzen der Proben auf 95°C wurden 50 µL der so vorbereiteten Probe in die Sammelgeltaschen oder maximal 700 µL über die gesamte Gelbreite aufgetragen. Die Trennung des Gemisches denaturierter Proteine erfolgte in 25 mM Tris/200 mM Glycin-Puffer (pH 6,8) über 90 min, bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA pro Gel.

Tab. 3.3.1-1: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Zusammensetzung der Gele.

	7,5%-iges Trenngel	15,0%-iges Trenngel	Sammelgel
30% Acrylamid	7,5 mL	15,5 mL	1,5 mL
0,8% Bisacrylamid			
Trenngelpuffer 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	7,5 mL	7,5 mL	
Sammelgelpuffer 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)			2,5 mL
Aqua dest.	10 mL	5,0 mL	6,0 mL
TEMED	20 µL	20 µL	10 µL
10% APS	100 µL	100 µL	60 µL

NuPAGE-Gel

Für Trennungen in einem breiten Molmassenbereich wurden NuPAGE Gradientengele der Firma Invitrogen verwendet. Die Bis/Tris-Gele waren 4-12%ig bezüglich der Acrylamidkonzentration. Als Puffersystem wurde das MOPS-Puffersystem genutzt und die Elektrophorese wurde unter konstanten 200 V durchgeführt. Die Vorbereitung der Proteinproben erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Novex Tris-Glycin-Gele

Für native Elektrophoresen wurde das Tris/Glycin-System der Firma Invitrogen benutzt. Es wurden Tris-Glycin-Gradienten-Gele (4-20%) eingesetzt. Die Durchführung der Elektrophorese und die Probenvorbereitung erfolgten nach Herstellerangaben.

Immunblotting

Die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine der Probe wurden durch Blotten elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dazu wurde die von Towbin beschriebene Methode angewandt (Towbin *et al.*, 1979). Als Blotsystem wurde

das Tank-Blot-System der Firma Bio-Rad genutzt. Der Transfer der Proteine erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 350 mA über einen Zeitraum von 90 min und wurde im Anschluss mit einer 2% Ponceau-Lösung überprüft (Li *et al.*, 1989). Anschließend wurden freie Proteinbindungsstellen durch einstündiges Blocken mit 3% (w/v) Magermilchpulver in TBST mit 0,5% Triton-X-100 abgesättigt. Dann wurde die Nitrocellulose dreimal 10 min mit TBST gewaschen. Primärantikörper wurden mit TBST verdünnt und für 2 h - oder über Nacht - bei Raumtemperatur mit der Membran unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal 10 min mit TBST gewaschen und mit HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper, der in TBST verdünnt wurde, 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen der Membran mit TBST erfolgte der Nachweis des Antikörper-Proteinkomplexes durch das Lumi-Light Immunoblotting Substrate, welches entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt wurde. Das entstandene Chemilumineszenz-Signal wurde auf einem Film (HyperFilm) dokumentiert. Für die Entwicklung mit Nitrobluetetrazolium wurden die Membranen gespült. Als HRP-Substratlösung wurden 6 mg NBT in 10 mL TBST und 20 mg NADH₂ in 10 mL TBST gelöst und gemischt. Nach der Zugabe von 10 µL Phenol (80%) und 10 µL H₂O₂ (30 %) wurde die Substratlösung sofort unter Lichtabschluss für 7 min mit der Membran inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch die Inkubation der Membran in Leitungswasser beendet.

3.3.2 PROTEINFÄRBUNG

Silberfärbung der SDS-PAGE

Die Silberfärbung wurde nach Merril *et al.*, 1984 durchgeführt. Alle Lösungen wurden mit aqua tridest. hergestellt.

- Fixierung:
 1. Vorfixierlösung (50 % [v/v] Methanol, 10% [v/v] Essigsäure), 30 min,
 2. Spüllösung (5% Methanol, 7% [v/v] Essigsäure), 30 min
 3. Fixierlösung (2,5% [v/v] Glutaraldehydlösung), 30 min, RT
- Waschschrift: Aqua tridest, 1 h, RT

Für die Reduzierung der Hintergrund-Färbung im Gel wurde 1 h mit Wasser gespült. Anschließend erfolgte die Vorbehandlung des Gels für die Färbung mit 0,8 mM Natriumthiosulfatlösung. Mit diesem Reduktionsschritt wird die Nachweisgrenze für Proteine erhöht - Heukeshoven & Dernick (1988). Im anschließenden Waschzyklus wurde 3 x für 20 s mit Wasser gespült und zur Imprägnierung des Gels mit Ag⁺-Ionen wurde es 20 min

in 12 mM Silbernitratlösung inkubiert. Unspezifisch gebundene Silberionen wurden durch Waschen mit Wasser entfernt. Nun konnten die Proteinbanden mit der Entwicklerlösung (566 mM Na₂CO₃; 150 µL Formaldehyd; 0,016 mM Na₂S₂O₃) sichtbar gemacht werden. Dies erfolgte durch Formaldehyd, welches die gebundenen Silberionen zu metallischem Silber reduziert. Die Entwicklung erfolgte in einem Zeitraum von 3-6 min und wurde durch die Zugabe der Stopperlösung (50% [v/v] Methanol, 12% [v/v] Essigsäure) beendet.

Außerdem wurde der Silberfärbungskit SilverQuest™ von Invitrogen verwendet. Der Vorteil dieses Kits besteht darin, dass die gefärbten Proteinbanden für die Identifizierung in der Massenspektrometrie eingesetzt werden können.

Coomassie-Färbung

Die irreversible Fixierung und die Färbung von Proteinen im Polyacrylamidgel erfolgten durch Roti-Blue. Dabei handelt es sich um eine 5-fach konzentrierte, kolloidale Coomassie Brilliant Blau G-250- Lösung. Die Gele wurden nach der Elektrophorese über Nacht gefärbt. Zur Entfernung unspezifischer Färbungen mit Coomassie-Blau wurden die Gele für mehrere Stunden in Coomassie-Blau-Entfärbelösung inkubiert.

3.3.3 KONZENTRIERUNG VON PROTEINEN

Proteinlösungen wurden nach Volumen in Amicon® Ultra-15 Zentrifugenröhrchen oder in Amicon-Zellen unter Verwendung von YM-10-Membranen eingeengt.

3.3.4 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON PROTEINEN

Eine sensitive Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe ist der Test nach Bradford (Bradford, M. 1976). Basis des Testes ist ein Shift des Absorptionsmaximums des Coomassie Brilliant Blau G-250 in Abhängigkeit von seiner Bindung an Protein - variierend von 465 nm ohne Bindung an Protein bis zu 595 nm nach erfolgter Proteinbindung. Die Farbstoffbindung verläuft unspezifisch an hydrophobe, kationische Seitenketten des Proteins. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist dabei ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Für die zu untersuchenden Proben wurde der Bio-Rad Protein Assay nach Bradford verwendet. Dazu wurden 10 µL einer Proteinlösung mit 490 µL 1:5 verdünntem Dye-Reagenz gemischt. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min konnte die Absorption bei

595 nm bestimmt werden. Eine Standardkurve aus Rindergammaglobulin im Bereich von 0,04 mg/mL bis 1,34 mg/mL diente der Bestimmung der Proteinkonzentration.

3.3.5 ZELLAUFSCHLUSS-METHODEN

Verschiedene Zellaufschlussmethoden wurden eingesetzt, um Cystatin B und seine potentiellen Komplexpartner zu identifizieren.

Zellaufschluss mit Lysis-Puffer

Die Zusammensetzung des Lysis-Puffers (1 % Triton X 100 [v/v] 0,4 % SDS [v/w], PIC, 10 mM Tris/HCl pH 8,0) ermöglicht einen nicht-mechanischen Zellaufschluss. Das in ihm enthaltene nicht-ionische Tensid Triton X-100 lysiert die Zellmembran. Das gewaschene Pellet von z.B. $3,6 \times 10^6$ Zellen wurde in 4 mL Puffer resuspendiert und bei $4000 \times g$ zentrifugiert, mit dem Überstand wurde die Immunpräzipitation durchgeführt.

Extraktionspuffer

Eine Behandlung von Zellen mit Digitonin resultiert in einer Permeabilisierung ihrer Membranen. Bei Verwendung von $200 \mu\text{g/mL}$ Digitonin kommt es zur Lyse aller Membranen und damit zur Freisetzung aller intrazellulären Proteine. Für einen Aufschluss wurden $3,6 \times 10^6$ gewaschene Zellen in 5 mL Extraktionspuffer (Tab. 3.4.5-1) aufgenommen und bei 0°C für 15 min inkubiert. Anschließend wurden die restlichen Fragmente von Kernen und Mitochondrien für 25 min bei $10000 \times g$ pelletiert und der Überstand für eine Immunoblotanalyse vorbereitet oder für die Immunpräzipitation verwendet. Der pH-Wert des Puffers und die Verwendung des Reduktionsmittels wurden versuchsabhängig variiert.

Tab. 3.3.5.-1: Extraktions-Puffer. Zusammensetzung

Extraktionspuffer	Zusammensetzung
	250 mM Saccharose
	20 mM HEPES, 10 mM KCl
	1,5 mM MgCl_2 , 1mM EGTA
	1mM EDTA
	$200 \mu\text{g/mL}$ Digitonin

3.3.6 IMMUNPRÄZIPITATION (IP)

Diese Methode wurde angewandt, um CSTB aus Zelllysaten und Urin zu isolieren. Durch eine anschließende Gelelektrophorese mit Coomassie bzw. MS-kompatibler Silberfärbung wurden Proben für die MALDI-TOF-Massenspektrometrie gewonnen.

In weiteren Versuchen wurde mit Hilfe der Co-Immunpräzipitation in Gegenwart der Redoxmittel GSH und DTT versucht, Cystatin B und mögliche Interaktionspartner zu isolieren und nachzuweisen. Zur Vorbereitung der Immunpräzipitation wurde Protein G-Sepharose zweimal mit dem eingesetzten Zellaufschlusspuffer gewaschen. Um unspezifisch bindende Proteine aus der Probe zu entfernen, wurden 100 μL der Protein G-Sepharose-Suspension zu den Proteinextrakten hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte im Überkopfschüttler (1 h, 4°C). Nach der Zentrifugation (2 min bei 600 x g) wurde der vorgereinigte Zellysatsüberstand mit dem spezifischen Antikörper versetzt und weitere 4 h im Überkopfschüttler (4°C) inkubiert.

Zur Isolierung der spezifischen Antikörper-Protein-Komplexe (1 h, 4°C, im Überkopfschüttler) wurden 200 μL Protein G-Sepharose verwendet. Die an die Protein G-Sepharose gebundenen Immunkomplexe wurden durch Zentrifugation gewonnen. Das erhaltene Pellet wurde zweimal mit PBS gewaschen. Um den Immunkomplex zu denaturieren und auf diese Weise von der Protein G-Sepharose zu trennen, wurde 1 Teil NuPAGE-Puffer (2 fach konzentriert) mit 10% Mercaptoethanol versetzt, auf 95 °C (5 min) erhitzt und abzentrifugiert (3000 x g, 10 min, RT). Der Überstand wurde als Immunpräzipitat bezeichnet und im Immunoblot analysiert.

3.3.7 MASSENSPEKTROMETRIE

Die Molekulargewichtsbestimmungen mittels Massenspektrometrie wurden freundlicherweise von Frau Dr. A. Schierhorn (Forschungsgruppe „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft, Halle) durchgeführt. Hierfür wurden Spektren von den IP-Ansätzen durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie an einem Esquire-LC-Ionenfallen-Massenspektrometer aufgenommen.

3.3.8 GRÖBENAUSSCHLUSSCHROMATOGRAPHIE

Der Nachweis von möglichen CSTB-Komplexen mit Hilfe der „Size Exclusion Chromatography“ (SEC), wurde unter Milieu-Bedingungen durchgeführt, die dem intrazellulären Redoxpotenzial entsprachen, bei dem die Cystein-Cathepsine funktional sind. Superdex 75-prep, das einen Trennbereich von 3–80 kDa hat, wurde über Nacht in dem Laufpuffer eingequollen. Alle Trennungen wurden bei 4°C an einem BIO-RAD Econo System durchgeführt. Die Trennung erfolgte per hydrostatischem Druck. Zwei Molmassenstandards (Dextranblau, Cytochrom c) dienten der Kalibrierung der Säule (50 x 2,5 cm). Mit ihnen wurden das Ausschlussvolumen V_0 (Dextranblau) und das

Elutionsvolumen V_E (Cytochrom c) bestimmt, um die Molmasse möglicher CSTB-Komplexe zu bestimmen.

Vor jeder Trennung wurde die Säule mit ca. 3 L Laufpuffer äquilibriert. Anschließend wurden 3 mL Probe aufgetragen und das Eluat in 6 mL-Fractionen gesammelt. Die Fractionen wurden durch Lyophilisation konzentriert und anschließend im Immunoblot bezüglich des Vorkommens von CSTB kontrolliert.

3.3.9 ISOELEKTRISCHE FOKUSSIERUNG IN AGAROSEGELEN

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) dient der Trennung von Proteinen auf der Grundlage ihrer differentiellen isoelektrischen Punkte (IEP). Amphoterische Puffersubstanzen (Trägerampholyte) erzeugen im elektrischen Feld einen pH-Gradienten - mit dem niedrigsten pH-Wert an der Anode und dem höchsten an der Kathode. Für die Identifizierung möglicher CSTB-Komplexe wurden annähernd native Bedingungen gewählt. Die von Altenhofer *et al.*, 2006, beschriebene Methode wurde dafür in einer leicht modifizierten Form eingesetzt - die Proben wurden auf das Gel aufgetragen und nicht in das Gel eingossen. Für die Herstellung der IEF-Gel wurden 1%ige (w/v) Agarose, 10% (w/v) Sorbitol, 4% (w/v) Zwittergent SB 3-14 in 100°C heißem Wasser gelöst. Die Zugabe der Servalyte (pH 3-10; 2,5% [v/v]) erfolgte anschließend bei 60°C. Das flüssige Agarosegel wurde auf Gelfixfolien (12,5 cm x 25,5 cm x 0,1 cm) gegossen. Im folgenden Schritt wurde das Agarosegel so auf einer wassergekühlten Plattform fixiert, dass die Fokussierungstrecke 12,5 cm betrug. Für den Aufbau des elektrischen Feldes wurden als Kathodenpuffer 0,5 M NaOH und als Anodenpuffer 0,5 M Essigsäure verwendet. Die Fokussierung beginnt mit einer Präelektrophorese für 10 min bei konstanten 4 W - vor der Probenauftragung. Zunächst erfolgte an Kathode und Anode des Agarosegels die Auftragung der Proteinmarker, welche für die Visualisierung der Iso-pH-Linien zur Bestimmung der IEP notwendig waren. Von den in der *Size Exclusion Chromatography* getrennten und im Immunoblot untersuchten CSTB-Fractionen wurden je 20 µL auf das Agarosegel aufgetragen und unter folgenden Bedingungen fokussiert: 7 W konstant, 1500 Vh (Voltstunden). Anschließend wurde das Gel senkrecht zu den Iso-pH-Linien in Streifen geschnitten. Der Teil, welcher die Markerproteine enthielt, wurde mit Coomassie G250 gefärbt. Die anderen Streifen wurden zum Entfernen der Ampholyte 3 mal 20 min in 30% Methanol/10% Essigsäure gespült. In den nächsten zwei Schritten erfolgte die Äquilibrierung der Streifen für die

Trennung in der zweiten Dimension. Dazu wurde 10 min in Äquilibriumspuffer mit 1% DTT und anschließend 10 min mit 260 mM Jodacetamid gewaschen. Die so behandelten Proben in den Agarosestreifen wurden in der zweiten Dimension in NuPAGE-Bis-Tris Gelen (4-12%) nach ihrer Molmasse getrennt und per Immunoblot weiter analysiert.

3.4 ZELLKULTUR

3.4.1 KULTIVIERUNG VON KARZINOMZELLINIEN

Die kryokonservierten Zellen wurden schnell aufgetaut, um die toxische Wirkung des Einfriermediums zu minimieren. Die Zellen wurden aus der Ampulle entnommen und in eine mit Zellkulturmedium gefüllte Zellkulturflasche gegeben. Die Kultivierung von BHK, UTC 8505C, FTC 133, B-CPAP und HeLa-Zellen erfolgte in RPMI 1640-Medium mit 10% (v/v) FKS bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit. Die Zellen wurden in 250 mL Zellkulturflaschen kultiviert. In Abhängigkeit von der Konfluenz wurden die Zellen nach 2 oder 3 Tagen passagiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit Hilfe von Accutase vom Substrat gelöst und anschließend in Kulturmedium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die gewünschte Zellzahl in eine Zellkulturflasche ausgesät.

Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer

Die Neubauer Zählkammer besteht aus 9 Quadraten mit einer Fläche von je 1 mm² und einem Volumen von 0,1 µL bei einer Tiefe von 0,1 mm. Für die Bestimmung der Zellzahl wurden 20 µL einer Zellsuspension in die Zählkammer gegeben, 4 der Quadrate wurden ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Die Berechnung der Zellkonzentration pro mL erfolgte aus den Mittelwerten der vier Quadrate.

3.5 YEAST TWO-HYBRID SYSTEM 3

Für die Identifizierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen wurde das Matchmaker *Two-Hybrid System 3* (BD Biosciences) verwendet. Grundlage des Systems ist die selektive Aktivierung bestimmter Reporter-Gene, die unter der Kontrolle des GAL4-Transkriptionsfaktors stehen. Dieser Transkriptionsfaktor ist aufgebaut aus einer DNA-Bindungsdomäne (GAL4 DNA-BD) und einer Transkriptions-Aktivierungsdomäne (GAL4-AD). GAL4 kann die Transkription nur aktivieren, wenn beide Domänen wechselwirken. Im *Yeast Two-Hybrid System* werden die beiden Domänen getrennt

voneinander, zur Synthese von zwei verschiedenen Hybridproteinen („Köder-“ und „Beuteprotein“) eingesetzt. Die zwei Hybridproteine wurden von zwei kompatiblen Plasmiden kodiert. Das erste Plasmid pAS2-1, besteht aus seiner GAL-4 DNA-Bindedomäne und der cDNA-Sequenz für das Köderprotein CSTB. Das zweite Plasmid pACT2, besteht aus GAL-4-AD und dem cDNA-Fragment einer cDNA-Genbank - hier der *Pre-transformed human brain MATCHMAKER cDNA library*. Für die Ermittlung von Protein-Protein-Wechselwirkungen wurden das Fusionsplasmid pAS2-1-CSTB in den Hefestamm MAT α PJ69-4A und das pACT2-Plasmid in den Hefestamm MAT α Y187 transformiert. Verschmolzene, diploide Hefen wurden anschließend auf Histidin- und Adenin-Auxotrophie selektiert. Transformation und Selektion der Hefen wurden nach dem *Yeast Protocols Handbook* von Clontech durchgeführt.

4 ERGEBNISSE

4.1 GENERIERUNG MONOKLONALER ANTI-CSTB-ANTIKÖRPER

4.1.1 REINHEITSKONTROLLE DES ANTIGENS

CSTB wurde in der nativen und in der rekombinanten Form in dieser Arbeit genutzt.

Das für die Immunisierung der Mäuse eingesetzte native Antigen wurde unter reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung auf Verunreinigungen hin untersucht (Abb. 4.1-1-A). Die CSTB-Präparationen (Milz, Muskel) zeigten keine sichtbaren Verunreinigungen durch Fremdproteine. Es wurde eine Proteinbande im Molmassenbereich von ca. 13 kDa angefärbt.

Das rekombinante CSTB wurde in dieser Arbeit für die Charakterisierung der monoklonalen Antikörper im ELISA und im Immunoblot benötigt. Im Unterschied zu dem nativem CSTB ist das rekombinante CSTB am N-Terminus mit einem His-Tag kovalent verbunden. Die Abbildung 4.1-1-B stellt das rekombinante CSTB unter reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE dar. Die anschließende Silberfärbung zeigt nur eine Proteinbande im Molmassenbereich von ca. 13 kDa.

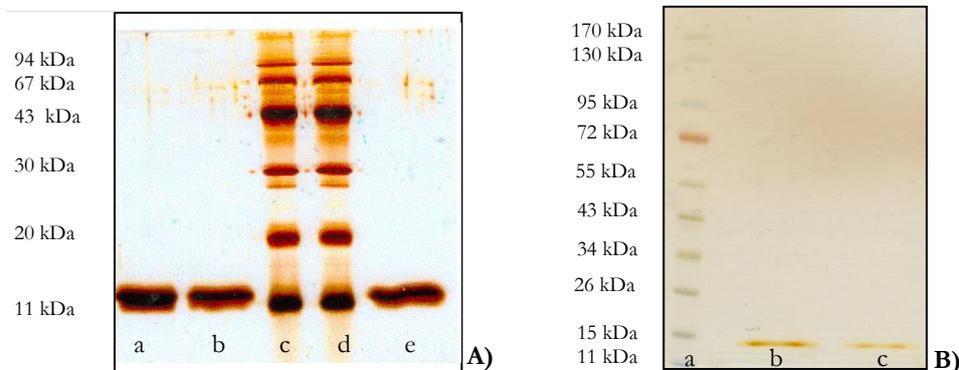


Abb. 4.1-1: A) Natives CSTB. SDS-PAGE: Reinheitskontrolle unter reduzierenden Bedingungen. Spur a, b, e: 50 ng CSTB; Spur c, d: Größenstandards. Silberfärbung **B)** Rekombinantes CSTB. SDS-PAGE (NuPAGE): Reinheitskontrolle unter reduzierenden Bedingungen. Spur b: 10 ng CSTB, Spur c: 5 ng CSTB, Spur a: Größenstandard

4.1.2 IMMUNANTWORT – TITERBESTIMMUNG

Die Titerbestimmung zur Kontrolle der Immunantwort gegen CSTB erfolgte mit dem aus der Schwanzvene der immunisierten Mäuse gewonnenen Blut und wurde im Immunoblot durchgeführt. Die Mäuseseren zeigten bis zu einer Verdünnung von 1:10000 ein deutliches Signal mit der ca. 13 kDa Cystatin B-Bande im Immunoblot (Abb. 4.1.2-1)

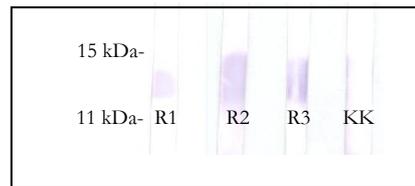


Abb. 4.1.2-1: CSTB-Immunoblot zur Titerbestimmung der Mausseren R1, R2, R3. Verdünnung der Seren: 1:10000; Konjugatkontrolle (KK): anti-IgG und M, HRP-markiert.

4.1.3 SELEKTION VON ANTI-CSTB-MAK PRODUZIERENDEN HYBRIDOMEN

Die Identifizierung von Hybridomen, welche anti-CSTB-Antikörper sezernieren, erfolgte mit Hilfe eines indirekten CSTB-ELISA. Für diese Untersuchung wurden Kulturüberstände aus den so genannten Mutterplatten verwendet, die sich zwischen dem 10. und dem 14. Tag der Kultivierung nach der Fusion befanden. Zum Ausschluss unspezifischer Reaktionen der Antikörper mit der Oberfläche der Kavitäten wurden mit TBS-Puffer beschichtete Platten mitgeführt. Die Durchführung des indirekten ELISA ist in Kapitel 3.2.4.1 beschrieben. Die Identifizierung von Klonen, die anti-CSTB-AK produzieren, erfolgte 45 min nach Substratzugabe (ABTS-Substrat). Positive Hybridome wurden kloniert und ihre Antikörper charakterisiert. Mit diesem Screening-Verfahren wurden insgesamt ca. 4000 Hybridome auf die Produktion spezifischer anti-CSTB-mAK getestet. 6 anti-CSTB-mAK produzierende Klone wurden selektiert (Tab.: 4.1.3-1), deren Antikörper im Folgenden ausführlich charakterisiert werden.

Tab. 4.1.3-1: Selektierte Klone, die anti-Cystatin B-monoklonale Antikörper produzieren

Anti-CSTB-mAK-Klone
I-2B
I-4H
I-4G
II-5A
II-12D
II-1H

4.1.4 ISOTYPBESTIMMUNG

Die Bestimmung der Immunglobulin-Subklasse und des Leichtkettentyps der anti-CSTB-AK erfolgte mit Hilfe des Sandwich-ELISA (Maus-Hybridoma-Subtyping Screening Kit). Die Kenntnis des Antikörper-Isotyps ist notwendig für eine effektive Reinigung der Antikörper, die Verwendung der Antikörper bei Immunpräzipitationen, im ELISA und in der Zytochemie. Der ELISA wurde wie unter Abschnitt 3.2.2.1 beschrieben, durchgeführt. Die Subklassen werden in Tabelle 4.1.4-1 genannt.

Tab. 4.1.4-1: Ig-Subklassen und Leichtkettentyp der anti-CSTB-mAK

Anti-CSTB-mAK	I-2B	I-4H	I-4G	II-5A	II-12D	II-1H
Ig-Subtyp	IgG _{1,κ}	IgG _{2a,κ}	IgG _{1,λ}	IgA _κ	IgG _{1,κ}	IgG _{1,κ}

4.1.5 BESTIMMUNG DER KREUZREAKTIVITÄT GEGEN CYSTATIN A

Die Kreuzreaktivität der anti-CSTB-Antikörper gegenüber Cystatin A wurde im Immunoblot und im indirekten ELISA untersucht. Auf Grund der 55%igen Identität bzw. 80%igen Homologie der Sequenzen von Cystatin B und Cystatin A ist die Wahrscheinlichkeit, dass Antikörper identische Cystatin B- und A-Epitope erkennen, und damit kreuzreagieren, hoch. Das in Kapitel 3.2.4.1 beschriebene ELISA-Format diente als Grundlage für den angewandten Assay. Die Beschichtung der Mikrotiterplatte mit rec. Cystatin A erfolgte in den Kavitäten A1-B12 mit 5 µg/mL und mit rec. Cystatin B in den Kavitäten C1-D12. Kulturüberstände, die Antikörper enthielten, wurden in 1:5 Verdünnungen, gereinigte mAK in 1:50 und der Cystatin A-Kontrollantikörper, WR23/2/3/3, 1:500 verdünnt eingesetzt. Die nachfolgenden Schritte wurden entsprechend den unter 3.2.4.1 genannten Bedingungen durchgeführt. In der Abbildung 4.1.5-1 sind die nach 30 min erreichten Absorptionswerte für jeden einzelnen Antikörper dargestellt.

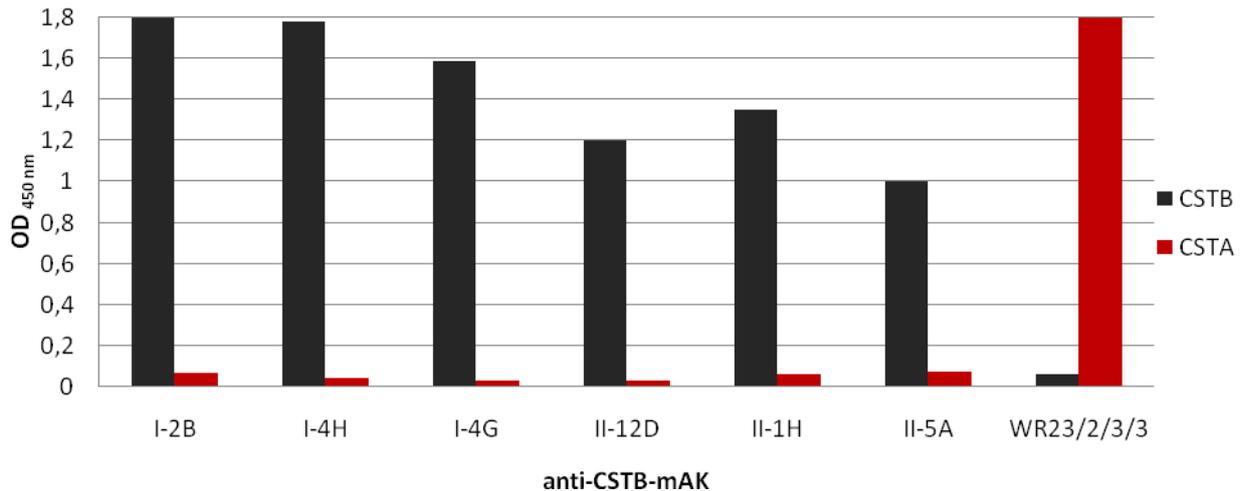


Abb. 4.1.5-1: Indirekter ELISA zur Ermittlung möglicher Kreuzreaktivitäten der anti-CSTB-AK gegenüber Cystatin A. Absorptionswerte nach 30 min Substratumsatz (ABTS-Substrat)

In einem Vorscreening wurde die Reaktion der Hybridom-Kulturüberstände mit CSTA untersucht, da dieser Schritt für die weitere Antikörperselektion notwendig war. Alle sechs anti-CSTB-mAK zeigten im ELISA keine signifikante Reaktion mit rekombinantem Cystatin A. Die für Cystatin A-gemessenen Absorptionswerte in den Assays waren $\leq 0,05$ und lagen im Grundrauschen des Assays. Eine Reaktion der Antikörper mit Cystatin A ist damit unter Immunoassay-Bedingungen auszuschließen. Für den Nachweis möglicher Kreuzreaktionen im Immunoblot wurden, wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben, je 500 ng Cystatin A und B elektrophoretisch getrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Blotmembran wurde zunächst mit den zu untersuchenden Antikörpern in 1:20 Verdünnungen inkubiert und anschließend mit einem HRP-markierten Sekundärantikörper. Die Bildung von Antigen-Antikörperkomplexen wurde mit Hilfe der NBT-Farb-Entwicklung detektiert. Alle 6 anti-Cystatin B-Antikörper zeigen im Immunoblot keine Reaktion mit Cystatin A. Der Kontrollantikörper anti-CSTA WR23/2/3/3 konnte Cystatin A nachweisen.

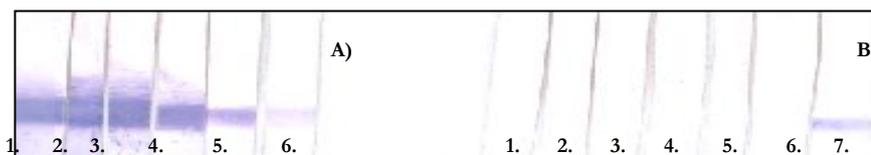


Abb. 4.1.5-2: Immunoblot von CSTB und CSTA für die Ermittlung möglicher Kreuzreaktionen. **A)** rec. Cystatin B entwickelt mit anti-CSTB 1. I-4G, 2. I-4H 3.) I-2B, 4. II-12D, 5. II-1H, 6. II-5A **B)** rec. Cystatin A entwickelt mit anti-CSTB 1. I-4G, 2. I-4H 3. I-2B, 4. II-12D, 5. II-1H, 6. II-5A und 7. mit anti-CSTA WR23/2/3/3.

4.1.6 SENSITIVITÄTSVERGLEICH DER ANTI-CSTB-MAK IM IMMUNOBLOT UND IM ELISA

Mit Hilfe des Immunoblots sollte ermittelt werden, bis zu welcher Antikörper-Verdünnung die anti-Cystatin-mAK Cystatin B nachweisen können. Dazu wurden 500 ng rec. CSTB über die gesamte Gelbreite aufgetragen und unter reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE getrennt und elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Antikörper wurden in verschiedenen Konzentrationen mit der Blotmembran inkubiert. Der gebildet Antigen-Antikörper-Komplex wurde mit Hilfe der NBT- oder der ECL-Reaktion sichtbar gemacht.

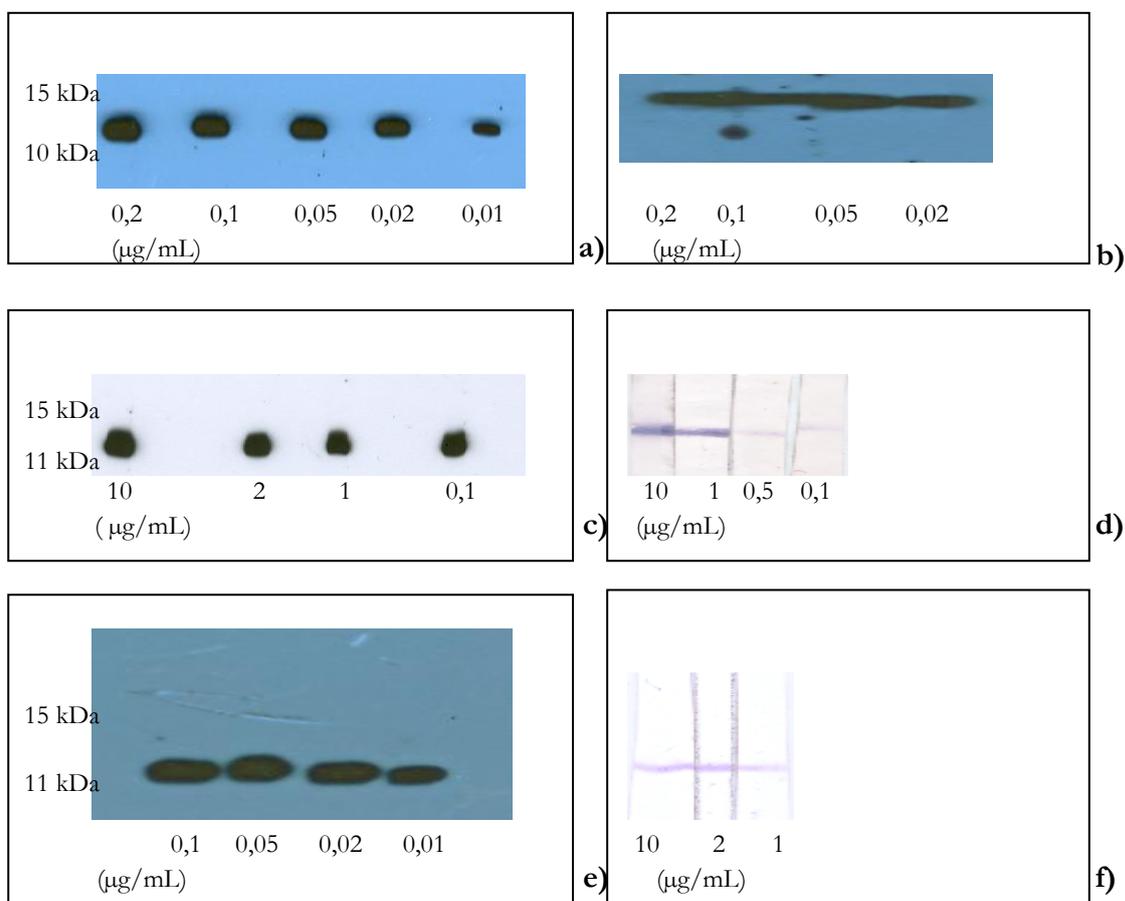


Abb. 4.1.6-1: CSTB-Immunoblot. Bestimmung der Sensitivität der anti-CSTB-mAK im Immunoblot. Konzentrationen der anti-CSTB-mAK a) I-2B: 0,2-0,01 µg/mL, b) I-4G: 0,2-0,02 µg/mL c) II-1H: 10-0,1 µg/mL d) II-5A: 10-0,1 µg/mL e) I-4H: 0,1-0,01 µg/mL f) II-12D: 10-1 µg/mL

Alle Antikörper reagierten im Immunoblot in einer Konzentration von 1 µg/mL, die Antikörper anti-CSTB I-2B und anti-CSTB I-4H konnten CSTB noch in einer Konzentration von 10 pg/mL nachweisen.

Ein Sensitivitätsvergleich der Antikörper erfolgte ebenfalls im indirekten ELISA. Eine detaillierte Beschreibung des indirekten ELISA findet sich in Kap. 3.2.4.1 Pro Antikörper wurden 12 Kavitäten der ELISA-Platte für den Vergleich genutzt und mit einer Antikörper-Verdünnung von 10000 ng/mL begonnen, die in zwölf 1:2 seriellen Verdünnungsschritten bis zur Verdünnung von 0,05 ng/mL fortgeführt wurde. Als positives Signal wurden alle OD-Werte über 0,3 gewertet.

Tab. 4.1.6-1: Indirekter ELISA. CSTB-Detektion (5 µg/mL) in Abhängigkeit von der mAK-Konzentration

Anti-CSTB mAK	I-2B	I-4H	II-4G	II-12D	II-1H	II-5A
mAK-Konzentration (ng/mL)	10	10	400	20	20	1000

Der Vergleich der Antikörper im indirekten ELISA zeigt (Tab. 4.1.6-1), dass die Antikörper eine unterschiedliche Sensitivität im Nachweis von CSTB aufweisen. Die Antikörper anti-CSTB I-2B und I-4H erkennen CSTB im indirekten ELISA noch in einer Konzentration von 10 ng/mL. II-12D und II-1H erkennen CSTB bis zu einer Konzentration von 20 ng/mL. Die Antikörper anti-CSTB II-4G und II-5A haben eine geringere Sensitivität. Die Ergebnisse des Sensitivitätsvergleichs der Antikörper im Immunoblot und im indirekten ELISA stimmen überein. Antikörper, welche im Immunoblot die größte Sensitivität haben, zeigen diese auch im indirekten ELISA.

Eine Ausnahme ist der mAK anti-CSTB II-12D. Er zeigt im Immunoblot (Signal bis 1:1000) eine deutlich niedrigere Affinität zu CSTB als im indirekten ELISA (Signal bis $1:1 \times 10^5$).

4.1.7 EPITOPE-MAPPING

Die umfassende Charakterisierung monoklonaler Antikörper sollte die Epitopkartierung einschließen. Diese Forderung gehört zu den von den internationalen Gesellschaften für Immunologie inzwischen genannten Voraussetzungen für die Zertifizierung von monoklonalen Antikörpern.

Mit Hilfe der Epitopkartierung wurde der Sequenz-Bereich ermittelt, in dem die monoklonalen anti-CSTB-Antikörper die Primärstruktur von Cystatin B erkennen (Abb. 4.1.7-1). Dazu wurde von der Firma Jerini AG, Berlin, die Cystatin B-AS-Sequenz in Form von einzelnen Peptid-Spots auf einer Zellulosemembran immobilisiert. Die gesamte

Proteinsequenz wurde in Form von einzelnen 13mer-Peptiden synthetisiert, die sich in benachbarten Spots mit einem Frameshift von je 3 AS C- und N-terminal unterscheiden. Diese Peptide wurden kovalent über den C-Terminus an die Membran gekoppelt und sind N-terminal mit einem Acetylrest als Schutzgruppe versehen. Für jeden einzelnen Antikörper wurde durch Variationen der Inkubationszeiten die optimale Konzentration ermittelt, mit welcher das Epitope Mapping durchgeführt werden konnte.

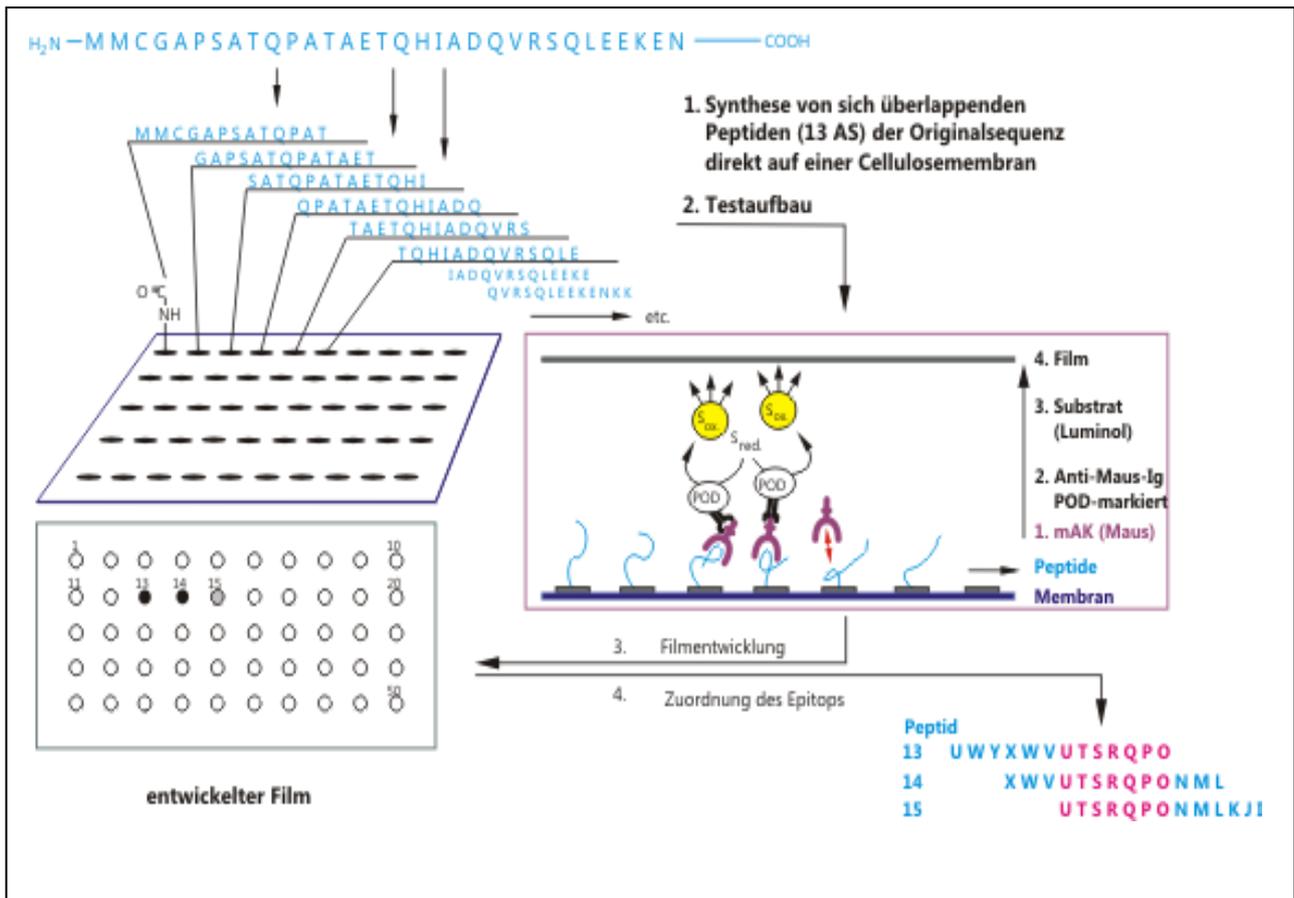


Abb. 4.1.7-1: Epitope Mapping. Prinzip

Die CSTB-Mapping-Membran wurde zunächst mit dem mAK anti-CSTB I-2B über Nacht inkubiert und anschließend mit dem Sekundärantikörper anti-Maus IgGFc_γ für 2 h. Auf dem ECL-Film wurde nach einer Belichtungszeit von 2,5 min die 11. Teilsequenz von CSTB als Epitop identifiziert (Abb. 4.1.7-2). Der Antikörper anti-CSTB I-4H und der Sekundärantikörper wurden auf der CSTB-Mapping-Membran co-inkubiert und nach einer Belichtungszeit von 1 min wurde ebenfalls die 11. (Abb. 4.1.7-3). Teilsequenz als Epitop detektiert. Antikörper anti-CSTB-II-12D erkannte bei der Epitopkartierung nach 5 min Inkubation die Spots mit den CSTB-Teilsequenzen 16, 17, 27, 28 und 29 (Abb. 4.1.7-3).



Abb. 4.1.7-2: Anti-CSTB-mAK I-2B. Epitopkartierung. Die Membran wurde mit dem Antikörper (10 µg/mL) inkubiert. Der Nachweis der Antikörperinteraktion mit dem Peptid-Spot Nr. 11 erfolgte mit einem Sekundärantikörper

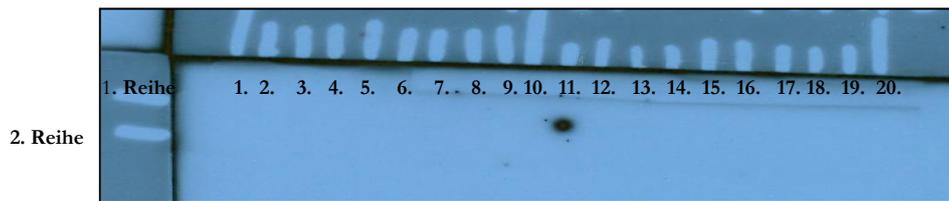


Abb. 4.1.7-3: Anti-CSTB-mAK I-4H. Epitopkartierung. Die Membran wurde mit dem Antikörper (5 µg/mL) inkubiert. Der Nachweis der Antikörper-Interaktion mit dem Peptid-Spot Nr. 11 erfolgte durch eine Co-Inkubation mit einem Sekundärantikörper.

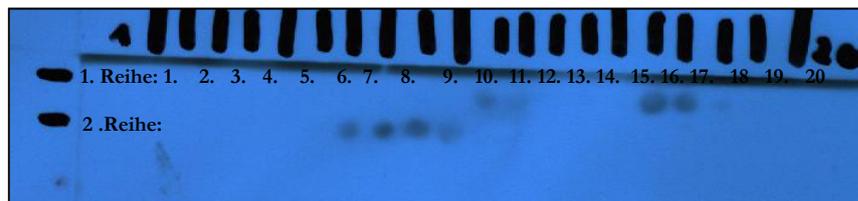


Abb. 4.1.7-4: Anti-CSTB-mAK II-12D. Epitopkartierung. Die Membran wurde mit dem Antikörper (10 µg/mL) inkubiert. Der Nachweis der Antikörperinteraktion mit den Peptid-Spots Nr. 16, 17, 27, 28 und 29 erfolgte mit einem Sekundärantikörper.

Die Epitopkartierung für die mAK I-4G, II-1H und II-5A gelang trotz verschiedener Variationen der Versuchsbedingungen nicht.

CSTB-Mapping-Membran: Pepscan 13/10; 30 Peptide

1.	MMCGAPSATQPAT	
2.	GAPSATQPATAET	
3.	SATQPATAETQHI	
4.	QPATAETQHIADQ	
5.	TAETQHIADQVRS	
6.	TQHIADQVRSQLE	
7.	IADQVRSQLEEKE	
8.	QVRSQLEEKENKK	
9.	SQLEEKENKKFPV	
10.	EEKENKKFPVEKA	
11.	ENKKFPVFKAVSF	anti-CSTB I-2B , anti-CSTB I-4H
12.	KFPVFKAVSFKSQ	
13.	VFKAVSFKSQVVA	
14.	AVSFKSQVVAGTN	
15.	FKSQVVAGTNYFI	
16.	QVVAGTNYFIKVH	anti-CSTB II-12D
17.	AGTNYFIKVHVG	
18.	NYFIKVHVGDEDF	
19.	IKVHVGDEDFVHL	
20.	HVGDEDFVHLRVF	
21.	DEDFVHLRVFQSL	
22.	FVHLRVFQSLPHE	
23.	LRVFQSLPHENKP	
24.	FQSLPHENKPLTL	
25.	LPHENKPLTLSNY	
26.	ENKPLTLSNYQTN	anti-CSTB-II-12D
27.	PLTLSNYQTNKAK	
28.	LSNYQTNKAKHDE	
29.	YQTNKAKHDELTY	
30.	QTNKAKHDELYF	

Peptid-Spot-Auswertung für die anti-CSTB-mAK I-2B und I-4H:

Spot 11: **ENKKFPVFKAVSF** → Epitop: **E₃₁NKKFPVFKAVSF₄₃**

Peptid-Spot-Auswertung für anti-CSTB-mAK II-12D:

Spot 16: QVV-AGTNYFIKVH	}	→	Epitop: A₄₉GTNYFIKVH₅₈
Spot 17: AGTNYFIKVH-VGD			
Spot 26: ENKPLT-LSNYQTN	}	→	Epitop: L₈₂SNYQTN₈₈
Spot 27: PLT-LSNYQTN-KAK			
Spot 28: -LSNYQTN-KAKHDE			

Abb. 4.1.7-5: Aminosäure-Sequenzen der einzelnen Peptid-Spots der Cystatin B-Mapping-Membran mit den durch die anti-CSTB-mAK I-2B, I-4H, II-12D erkannten Teilsequenzen

Die Peptid-Spot-Auswertung für die Antikörper I-2B und I-4H ergab als detektiertes Epitop die Aminosäuresequenz E₃₁NKKFPVFKAVSF₄₃ (Abb. 4.1.7-6).

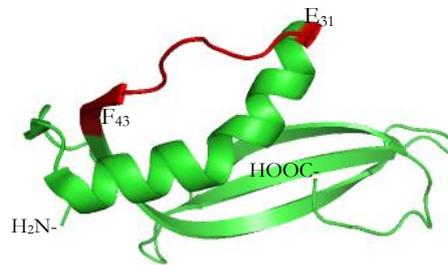


Abb. 4.1.7-6: Cystatin B. 3-D-Struktur. Das von den Antikörpern anti-CSTB I-2B und I-4H detektierte Epitop E₃₁NKKFPVFKAVSF₄₃ ist rot markiert.

Für den Antikörper anti-CSTB II-2D wurden nach der Peptid-Spot-Analyse die Epitope A₄₉GTNYFIKVVH₅₈ und L₈₂SNYQTN₈₈ ermittelt. In der 3D-Struktur von Cystatin B (Abbildung 4.1.7-7) wird erkennbar, dass beide Epitope in unterschiedlichen Bereichen des Proteins liegen

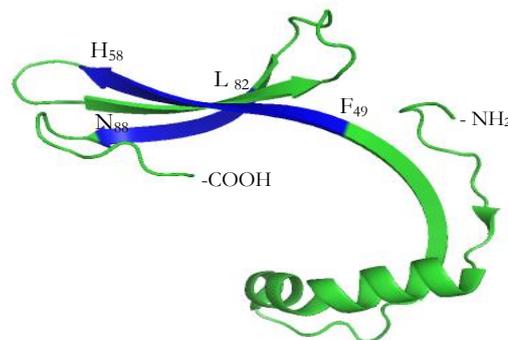


Abb. 4.1.7-7: Cystatin B. 3D-Struktur. Die durch den Antikörper anti-CSTB II-12D detektierten Sequenzen A₄₉GTNYFIKVVH₅₈ und L₈₂SNYQTN₈₈ sind blau markiert

4.1.8 REINHEITSKONTROLLE DER ANTI-CSTB-ANTIKÖRPER IN DER SDS-PAGE

Für die Gewinnung größerer Mengen an gereinigten Antikörpern wurden die einzelnen Klone in der Tecnomouse kultiviert und die produzierten Kulturüberstände gesammelt. Die in den Kulturüberständen enthaltenen Antikörper wurden mit Hilfe von Protein-G-Sepharose affinitätsgereinigt (siehe 3.2.3.1) und die eluierten AK-Fraktionen mit Hilfe der SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen und anschließender Coomassie-Färbung beurteilt. Es konnte gezeigt werden, dass die anti-CSTB-mAK in hoher Reinheit vorlagen (siehe Abb. 4.1.8-1). In den 7,5%-igen SDS-PAGE-Gelen war im wesentlichen nur eine Hauptbande bei ca. 150 kDa zu sehen. Diese entspricht der Molmasse eines kompletten Antikörpers. Banden unmittelbar unterhalb der 150 kDa-Bande enthalten

vermutlich verschiedene Glykosylierungsformen der einzelnen Antikörper. Im Immunoblot waren sie als Antikörper zu identifizieren (Daten nicht gezeigt).

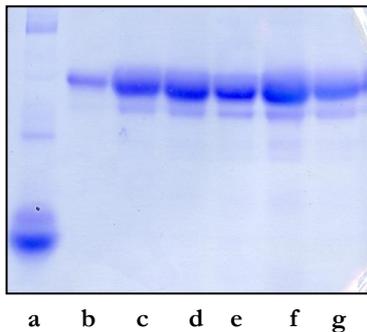


Abb. 4.1.8-1: SDS-PAGE und Coomassie G250-Färbung des gereinigten Antikörpers anti-CSTB I-4H. Spur a) Durchlauf der Protein-G-Säule. Spuren b-g) eluierte Fraktionen

4.1.9 BIOTINYLIERUNG DER MONOKLONALEN ANTI-CSTB-ANTIKÖRPER

Die Markierung der Antikörper mit Biotin war ein notwendiger Schritt für den beabsichtigten Einsatz der mAK in einem Sandwich-Assay. Dazu wurde mit allen 6 Antikörpern eine Biotinylierung durchgeführt. Eine abschließende Funktionskontrolle im indirekten ELISA zeigte, dass eine erfolgreiche Biotinmarkierung ohne Funktionsverlust nur bei den mAK anti-CSTB I-2B, anti-CSTB I-4G und anti-CSTB II-12D erfolgte.

4.1.10 IMMUNPRÄZIPITATION–ISOLIERUNG VON CYSTATIN B AUS BIOLOGISCHEN MATERIALIEN MIT HILFE DER GENERIERTEN ANTIKÖRPER

Die Immunpräzipitation wurde durchgeführt um die spezifische Reaktion der generierten Antikörper nachzuweisen. Mit Hilfe der unter 3.3.6. beschriebenen Technik sollten die Antikörper eingesetzt werden, um natives CSTB aus Zelllysaten (Aufschluss mit Lysispuffer 3.3.5.) oder Urin zu binden und anzureichern. Das isolierte Cystatin B sollte nach der Immunoblot-Analyse durch Sequenzierung mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert werden, um so die Spezifität der Antikörper zu bestätigen. Aus der Literatur war bekannt, dass CSTB im Urin in einer Konzentration von $< 0,1$ mg/L vorkommt (Abrahamson *et al.*, 1986). Die Isolierung des Antikörper-CSTB-Komplexes erfolgte über Protein-G-Sepharose-Beads. Der Immunkomplex aus nativem Cystatin B und Antikörper wurde von den Sepharose-Beads durch Inkubation bei 95°C in SDS-PAGE-Probenpuffer gelöst. Die Trennung des Komplexes erfolgte unter reduzierenden Bedingungen in der

SDS-PAGE. Die Analyse der Proben erfolgte im Immunoblot mit Hilfe der anti-CSTB-AK, die nicht für die Präzipitation eingesetzt worden waren. Die anti-CSTB Antikörper detektierten eine Bande im Molmassenbereich von ca.13 kDa. Das Protein aus dieser Bande wurde aus dem Gel isoliert und sequenziert (Abb. 4.1.10-1).

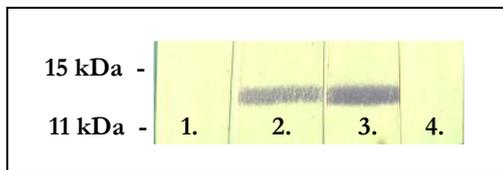


Abb. 4.1.10-1: Immunoblot des Immunpräzipitats aus Urin. Cystatin B wurde mit dem Antikörper anti-CSTB I-2B präzipitiert. Der Nachweis CSTB, erfolgte mit den Antikörpern anti-CSTB I-2B (2.), anti-CSTB I-4H (3.) und dem anti-Cystatin A-mAK WR23/2/3/3 (4.). Die Kontrolle ohne primären Antikörper wurde mit einem anti-Maus-IgG, Fc γ -spezifisch, HRP-markiert, durchgeführt (1.).

Die Sequenzierung dieser Bande bestätigte, dass der Antikörper I-2B in der Lage ist, Cystatin B zu binden und der anti-CSTB I-4H-AK ebenfalls CSTB detektiert (Abb. 4.1.10-2 und Tab. 4.1.10-1).

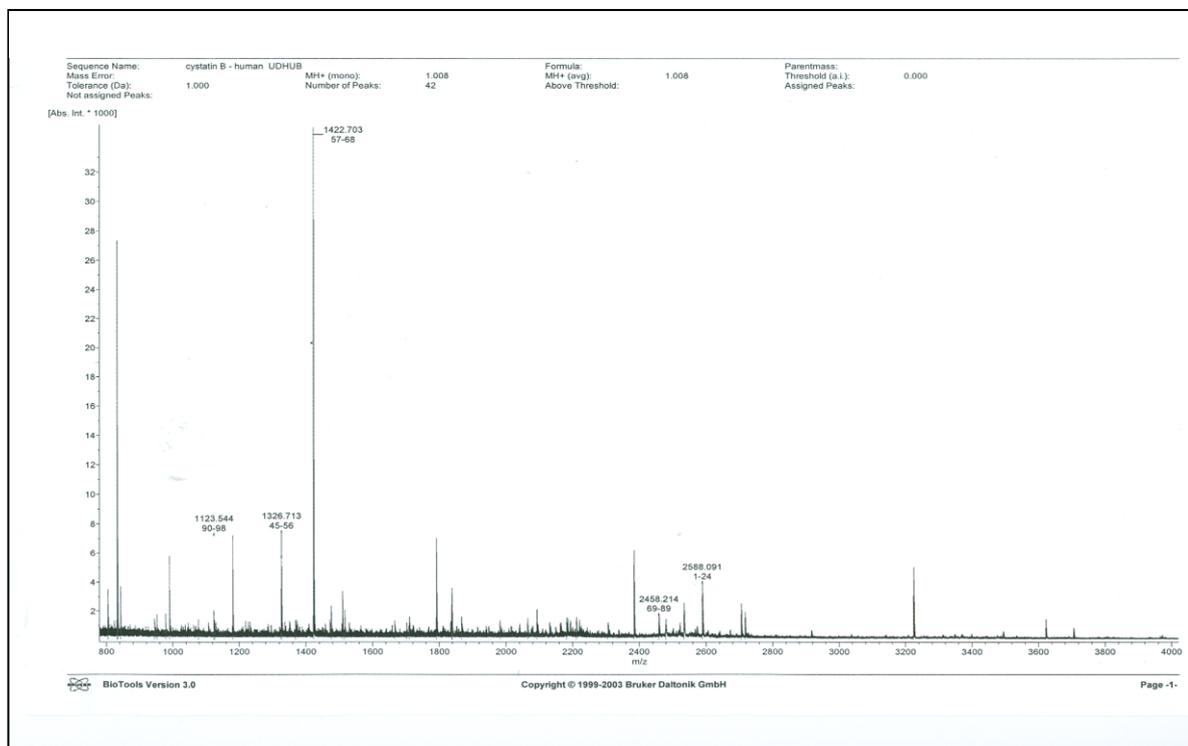


Abb. 4.1.10-2: MALDI-TOFF-Übersichtsmassenspektrum des Urinpräzipitats mit Antikörper anti-CSTB I-2B

Tab. 4.1.10-1: Massenspektrometrie-Analyse. Identifizierte CSTB-Peptidsequenzen

gemessene MM [Da]	Peptid	kalkulierte MM [Da]
1123,544	A ₉₀ KHDELTYF ₉₈	1123,542
1326,713	S ₄₅ QVVAGTNYFIK ₅₆	1326,705
1422,703	V ₅₇ HVGDEDFVHLR ₆₈	1422,712
2448,214	V ₆₉ FQSLPHENKPLTLSNYQTNK ₈₉	2458,272
2588,091	M ₁ MCGAPSATQPATAETQHIADQVR ₂₄	2588,154

Immunpräzipitation mit HeLa-Zellysaten

Aus HeLa-Zellysaten wurde durch Immunpräzipitation ebenfalls Cystatin B isoliert. HeLa-Zellen sind Zellen einer Zervixkarzinomzelllinie. Von Cystatin B ist bekannt, dass es hauptsächlich in Zellen epithelialen Ursprungs vorkommt. Die Immunpräzipitation erfolgte mit anti-CSTB I-2B - der Nachweis des Proteins im Immunoblot mit anti-CSTB I-4H.



Abb. 4.1.10-3: Immunpräzipitat aus HeLa-Zellen mit anti-CSTB I-2B. Immunoblot. Der Cystatin B-Nachweis erfolgte mit dem Antikörper anti-CSTB I-4H.

Das Protein der in Abbildung 4.1.10-3 gekennzeichneten ca. 13 kDa-Bande konnte durch Sequenzierung als Cystatin B bestätigt werden. In weiteren Versuchen (Abb. 4.1.10-4) konnte gezeigt werden, dass die anti-CSTB-Antikörper anti-CSTB I-4H und anti-CSTB II-12D ebenfalls CSTB präzipitieren. Die Antikörper anti-CSTB I-2B, I-4H und II-12D erkennen somit Cystatin B unter nativen Bedingungen und konnten deshalb für die Entwicklung eines Immunoassays genutzt werden.

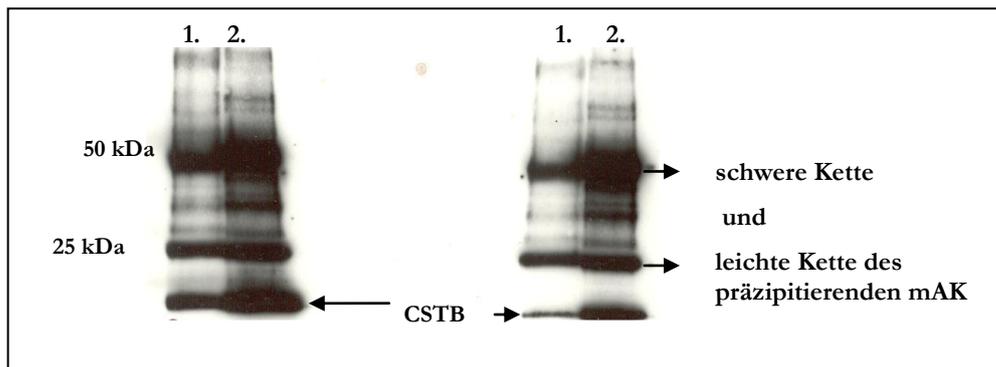


Abb. 4.1.10-4: Immunoblot des Immunpräzipitats aus HeLa-Zellysaten mit den anti-CSTB-AK II-12D und I-4H. Der Nachweis von Cystatin B erfolgte mit mAK anti-CSTB I-2B.

4.1.11 BESTIMMUNG DER BINDUNGSKONSTANTEN FÜR DIE MONOKLONALEN ANTI-CSTB-ANTIKÖRPER MIT HILFE DER QCM-TECHNIK

Die Quarzmikrowaage kann u.a. zur Bestimmung der Bindungsparameter einer Liganden-Rezeptor-Wechselwirkung eingesetzt werden. In den Versuchen wurde die QCM-Apparatur der Arbeitsgruppe Dr. Rothe genutzt (Höpfner M, MLU, Dissertation 2005), um die Antigen-Antikörperbindung zu charakterisieren, die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D , die Geschwindigkeitskonstanten k_{ASS} für die Assoziation und k_{DISS} für die Dissoziation zu ermitteln. Die Bindung des anti-Cystatin B-mAK an Cystatin B wurde über die Frequenzabnahme durch die Massenzunahme an der Oberfläche des Sensors detektiert. Anschließend wurde mit PBS gespült, was zu einer teilweisen Dissoziation des Antikörpers vom Antigen führte. Diese Dissoziation konnte über die Frequenzzunahme (Massenabnahme an der Oberfläche des Sensors) verfolgt werden. Den Verlauf typischer Sensogramme wird in Abb. 4.1.11-1 dargestellt.

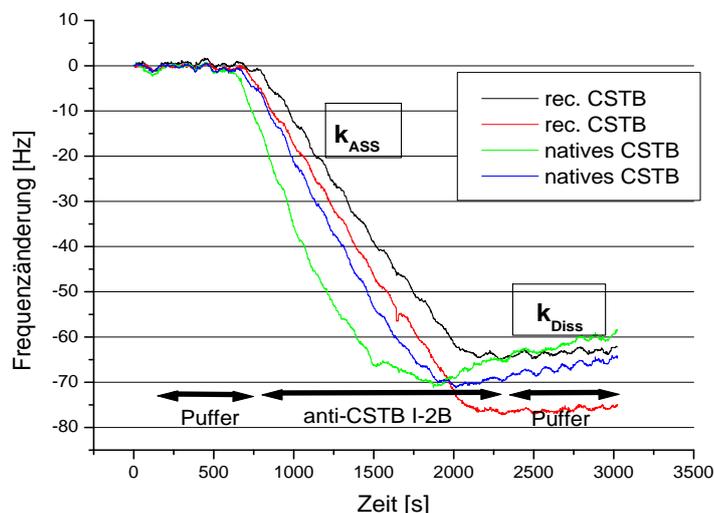


Abb. 4.1.11-1: QCM-Sensogramme. Frequenzänderung bei der Bindung von mAK anti-CSTB I-2B an immobilisiertes natives Cystatin B und an rekombinantes CSTB

Mit den erhaltenen Kurvenverläufen konnten die Geschwindigkeitskonstanten k_{Ass} für die Assoziation und k_{Diss} für die Dissoziation bestimmt werden. Dafür wurde mit Hilfe der nichtlinearen Regression (Origin 6.0) die folgende Formel an den Kurvenanteil für die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante angepasst.

$$\Delta F = \Delta F_0 \times e^{-k_{Diss}(t-t_0)}$$

Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{Ass} wurde mit folgender Formel durch nichtlineare Regression bestimmt.

$$\Delta F = \frac{k_{Ass} \times [A] + F_{max}}{k_{Ass} \times [A] + k_{Diss}} \times (1 - e^{-[k_{Ass} \times [A] + k_{Diss} \times (t-t_0)])}$$

Die Auswertung wurde nach Hengerer *et al.*, 1999 und Skladal 2003 durchgeführt.

Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D ergibt sich aus

$$K_D = \frac{k_{Diss}}{k_{Ass}}$$

Die folgenden Tabellen (Tab. 4.1.11-1) geben die berechneten K_D -Werte für die einzelnen Antikörper wieder.

Tab. 4.1.11-1: Geschwindigkeitskonstanten der anti-CSTB-mAK mit nativem und rec. Cystatin B

	k_{Diss} (10^{-5} s^{-1})	k_{Ass} ($10^4 \text{ L x mol}^{-1} \text{ x s}^{-1}$)	K_D ($10^{-10} \text{ mol x L}^{-1}$)
I-2B + rec. CSTB	4,0 ± 0,1	4,4 ± 0,6	9,2 ± 1,4
I-2B + natives CSTB	20,5 ± 10,3	15,1 ± 6,7	14,3 ± 6,3
II-12D + rec. CSTB	3,5 ± 2,0	5,4 ± 2,2	7,90 ± 7,12
II-12D + natives CSTB	14,5 ± 5,0	35,2 ± 6,3	4,3 ± 2,2
II-5A + rec. CSTB	9,0 ± 1,4	0,58 ± 0,1	162 ± 63,8

Die Daten (Tab. 4.1.11-1) zeigen, dass der mAK CSTB II-5A weniger affin bindet als CSTB II-12D und CSTB I-2B, da seine Bindungskonstante mit 10^{-8} [mol/L] um zwei Zehnerpotenzen höher liegt. Bezüglich ihrer Bindung an rekombinantes und natives Cystatin B unterscheiden sich die Antikörper auf der Grundlage der hier ermittelten

Daten nicht. Die Bindungskonstanten der anti-CSTB-AK I-2B und II-12D zeigen, dass beide Antikörper mit hoher Festigkeit an ihre Epitope im Protein binden.

4.2 SANDWICH-ELISA

Der Sandwich-ELISA ist das sensitivste Testsystem unter den quantitativen Immunoassays. Für die Etablierung des Sandwich-ELISA stand eine ausreichende Anzahl von charakterisierten Antikörpern zur Verfügung. Diese wurden für die Ermittlung von Antikörperpaaren genutzt. Eine weitere Voraussetzung für die Etablierung des Sandwich-ELISA war Struktur von CSTB. Um in einem Sandwich-ELISA quantitativ erfassbar zu sein, muss ein Analyt zwei Epitope besitzen, die strukturell so weit voneinander entfernt sind, dass zwei Antikörper sich bei der Bindung nicht behindern.

4.2.1 SELEKTION VON ANTIKÖRPERPAAREN FÜR EINEN CSTB-SANDWICH-ELISA

Für den Aufbau eines Sandwich-Assays ist es notwendig, Antikörper einzusetzen, welche in Kombination – als *Capture*-Antikörper und als Detektor-Antikörper - einen effektiven Nachweis des Analyten garantieren. Für die Ermittlung geeigneter Antikörperpaare wurden in Tabelle 4.2.1-1 genannten Antikörper-Kombinationen untersucht.

Tab. 4.2.1-1: Potentielle Antikörperpaare für den Sandwich-ELISA

Capture-mAK:	Detektor-mAK:		
	CSTB I-2B-Biotin	CSTB I-4G-Biotin	CSTB II-12D-Biotin
CSTB I-2B	■	CSTB I-4G-Biotin	CSTB II-12D-Biotin
CSTB I-4H	CSTB I-2B-Biotin	■	CSTB II-12D-Biotin
CSTB I-4G	CSTB I-2B-Biotin	CSTB I-4G-Biotin	CSTB II-12D-Biotin
CSTB I-12D	CSTB I-2B-Biotin	CSTB I-4G-Biotin	■
CSTB II-1H	CSTB I-2B-Biotin	CSTB I-4G-Biotin	CSTB II-12D-Biotin
CSTB II-5A	CSTB I-2B-Biotin	CSTB I-4G-Biotin	CSTB II-12D-Biotin

Die Antikörper anti-CSTB II-12D als *Capture*-Antikörper und anti-CSTB I-2B als Detektor-Antikörper erwiesen sich als das effektivste Antikörper-Paar für die Bindung von Cystatin B (Abb. 4.2.1-1).

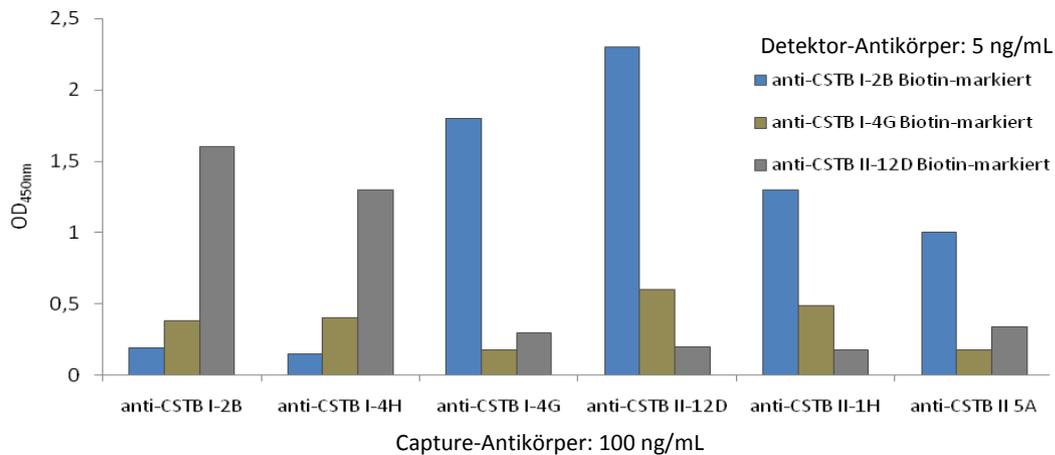


Abb. 4.2.1-1: Selektion geeigneter Antikörperpaare für den Sandwich-ELISA. Erreichte Absorptionswerte bei der Bestimmung von 1 ng/mL Cystatin B. *Capture*-Antikörper 100 ng/mL (Beschichtungskonzentration), Detektor-Antikörper 5 ng/mL.

Die Lokalisation der Epitope (Abb. 4.2.1-2) dieser beiden Antikörper im CSTB 3D-Modell zeigt, dass sie nicht unmittelbar benachbart sind. Dadurch wird eine effektive Bindung von CSTB ermöglicht.

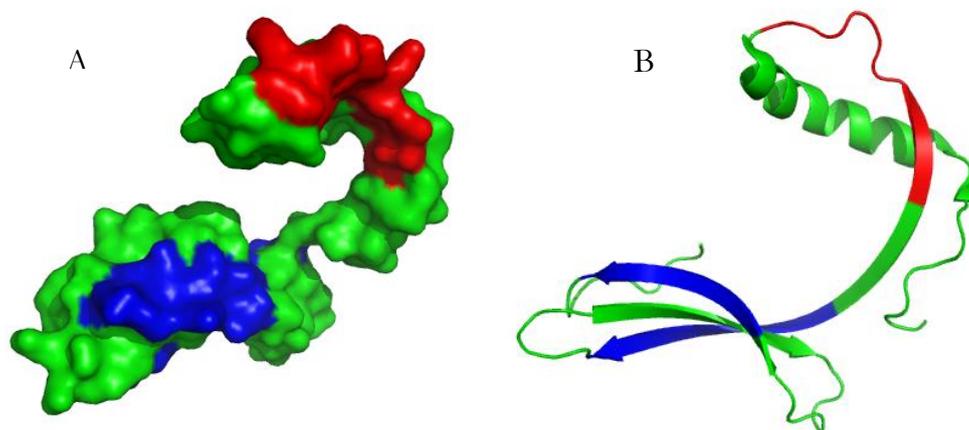


Abb. 4.2.1-2: 3D-Darstellung von Cystatin B im Kalottenmodell (A) und im Topologiediagramm (B). Die Epitope von anti-CSTB II-12D sind blau und das von anti-CSTB I-2B rot dargestellt.

Nach der Selektion des Antikörperpaares wurden die optimalen Antikörperkonzentrationen für die Cystatin B-Bestimmung ermittelt (Abb. 4.2.1-3 bis 4.2.1-6). Im Sandwich-ELISA wurden dazu unterschiedliche CSTB-Konzentrationen mit verschiedenen Konzentrationen von *Capture*-Antikörper und Detektor-Antikörper untersucht.

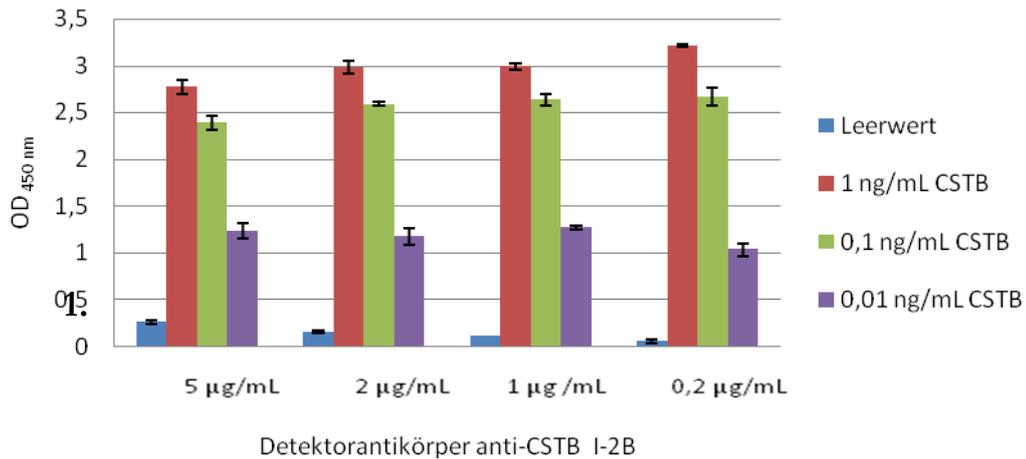


Abb. 4.2.1-3: Abhängigkeit der CSTB-Bestimmung (1; 0,1; 0,01 ng/mL) von den Konzentrationen des **Detektor-Antikörpers anti-CSTB, I-2B**, Biotin-markiert (Ausgangskonzentration 1 mg/mL), und des **Capture-Antikörpers anti-CSTB II-12D (5 µg/mL)** in der Beschichtungslösung.

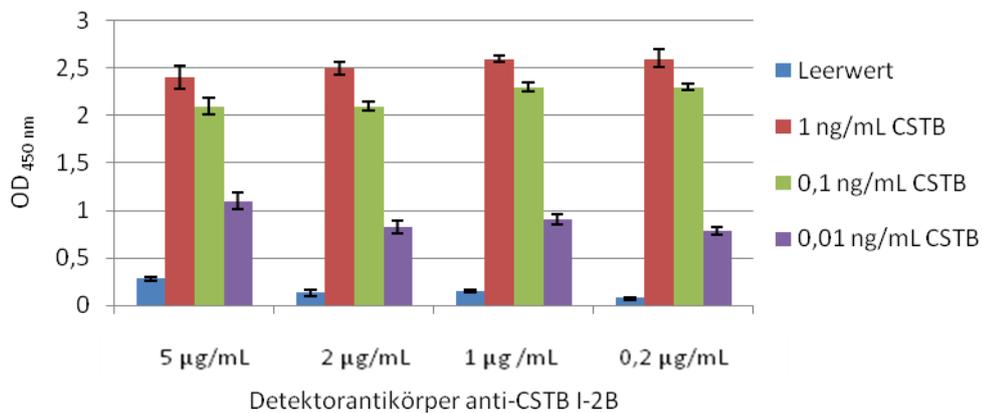


Abb. 4.2.1-4: Abhängigkeit der CSTB-Bestimmung (1; 0,1; 0,01 ng/mL) von den Konzentrationen des **Detektor-Antikörpers anti-CSTB I-2B**, Biotin-markiert (Ausgangskonzentration 1 mg/mL), und des **Capture-Antikörpers anti-CSTB II-12D (2 µg/mL)** in der Beschichtungslösung.

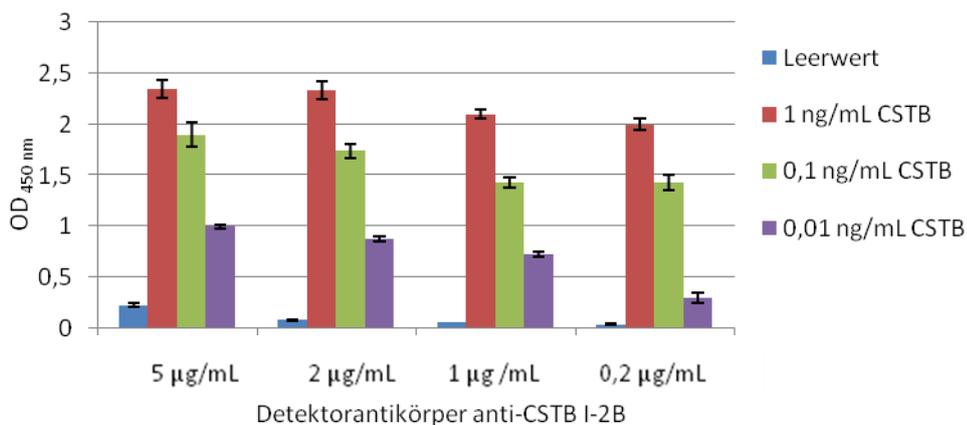


Abb. 4.2.1-5: Abhängigkeit der CSTB-Bestimmung (1; 0,1; 0,01 ng/mL) von den Konzentrationen des **Detektor-Antikörpers anti-CSTB I-2B**, Biotin-markiert (Ausgangskonzentration 1 mg/mL), und des **Capture-Antikörpers anti-CSTB II-12D (1 µg/mL)** in der Beschichtungslösung.

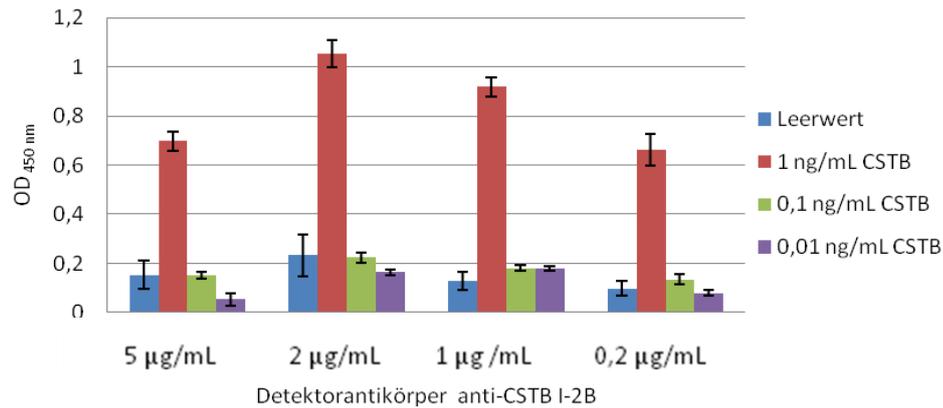


Abb. 4.2.1-6: Abhängigkeit der CSTB-Bestimmung (1; 0,1; 0,01 ng/mL) von den Konzentrationen des **Detektor-Antikörpers anti-CSTB I-2B**, Biotin-markiert (Ausgangskonzentration 1 mg/mL), und des **Capture-Antikörpers anti-CSTB II-12D (0,1 µg/mL)**

Es konnte gezeigt werden, dass die *Capture*-Antikörper-Konzentration von 1 µg/mL Beschichtungslösung und die Detektor-Antikörper-Konzentrationen von 1 bis 2 µg/mL optimal für die Cystatin B-Bestimmung im Bereich von 1 – 0,01 ng/mL sind (Abb.4.2.1-4 und Abb. 4.2.1-5). Mit diesen Antikörper-Konzentrationen erhält man im Sandwich-Assay für die eingesetzten Cystatin B-Konzentrationen signifikante Unterschiede in den Absorptionswerten. Bei einer CSTB-Konzentration von 1 ng/mL wurden im Assay OD-Werte von $2,1 \pm 0,004$ erhalten, gegenüber OD-Werten von $0,7 \pm 0,004$ bei einer CSTB-Konzentration von 0,01 ng/mL.

4.2.2 AUSSCHLUSS VON UNSPEZIFISCHEN BINDUNGEN (STÖREFFEKTEN) IM SANDWICH-ELISA

Spezifität und Sensitivität des Sandwich-Assays können durch Störfaktoren, wie zum Beispiel Matrixeffekte, unspezifische Bindungen und die Kreuzreaktion mit anderen Proteinen, negativ beeinflusst werden. Mit dem unter 3.2.4.2.2 beschriebenen Aufbau wurden unspezifische Bindungen der beteiligten Komponenten an die Mikrotiterplatte bzw. an die beteiligten Komponenten schrittweise untersucht. Zunächst wurde eine effiziente Blockierung ermittelt, welche die unspezifische Bindung reduziert. Als optimales Blockreagenz erwies sich die Roche-Blocklösung mit 0,5% Tween®20 (Daten nicht gezeigt). Alle für die folgenden Schritte notwendigen Verdünnungen wurden deshalb mit dieser Blocklösung vorgenommen. Probenverdünnungen erfolgten ebenfalls mit Blocklösung und dem Detergens Tween®20. Eine Zusammenfassung der Kontroll-Sandwich-ELISA ist in der Abbildung 4.2.2-1 dargestellt.

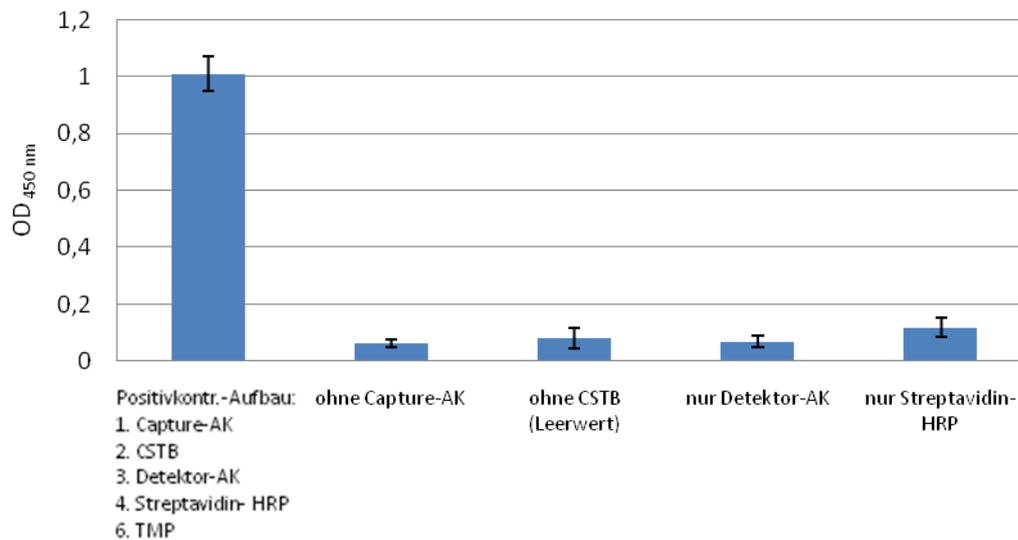


Abb. 4.2.2-1: Zusammenfassung der Kontroll-Sandwich-Assays mit den Absorptionswerten und den Standardabweichungen

Alle Absorptionswerte wurden durch Mehrfachbestimmung (40-fach oder 90-fach) erhalten und lagen in einem Bereich von $\leq 0,126$. Falsch positive Signale durch die im Assay beteiligten Komponenten wurden so ausgeschlossen. Für den Ausschluss von Interaktionen der Antikörper mit Proteinen aus dem Plasma von Probanden wurden Proben definierte Cystatin B-Mengen zugefügt und ihre Wiederfindungsrate bestimmt. Die Probandenproben wurden 1:5 verdünnt und Cystatin B bis zu den folgenden Endkonzentrationen zugefügt: 1,6; 0,8; 0,4; 0,2 ng/mL. Die CSTB-Konzentrationen der Proben wurden über eine Standardkurve bestimmt und die ermittelten Wiederfindungsraten im Assay betragen im Rahmen des Fehler 100%. Die Wiederfindungsraten sind der Tabelle 4.2.2-1 aufgelistet. Unspezifische Reaktionen mit endogenen Bestandteilen des Plasmas konnten damit ausgeschlossen werden.

Tab. 4.2.2-1: Wiederfindungsraten für CSTB im Plasma

CSTB-Konz.: [ng/mL]	Bestimmte CSTB-Konz. [ng/mL]	Wiederfindungsrate [%]
200	195 ± 21,2	97,5 ± 10,6
400	425 ± 7,1	106,3 ± 1,8
800	807 ± 7,1	101,0 ± 0,9
1600	1600 ± 141,0	105,0 ± 1,9

4.2.3 ERSTELLUNG DER CYSTATIN B-STANDARDKURVE

Die Quantifizierung der CSTB-Konzentrationen im Blutplasma erfolgte über eine Standardkurve. Für die Beschichtung wurde der *Capture*-Antikörper anti-Cystatin B II-12D in einer Konzentration von 1 µg/mL und für die Detektion der Antikörper anti-CSTB I-2B, Biotin-markiert, in einer Konzentration von 0,5 µg/mL eingesetzt. Die Ausgangskonzentration von Cystatin B war 50 ng/mL. Sie wurde in 12 seriellen Schritten verdünnt bis 25 pg/mL. Die Absorptionswerte wurden gegen die logarithmischen CSTB-Konzentrationen aufgetragen. Das Ergebnis war immer eine Kurve mit einem sigmoidalen Verlauf.

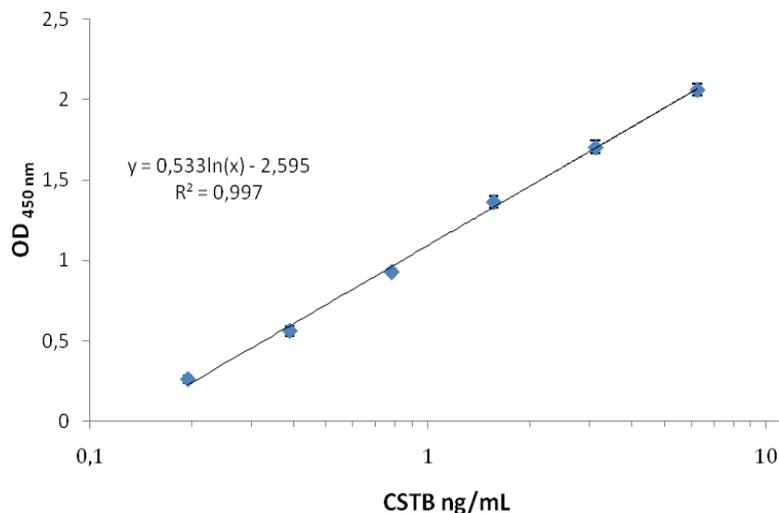


Abb. 4.2.3-1.: CSTB-Sandwich-ELISA. Cystatin B-Standardkurve. Halblogarithmische Auftragung des linearen Teils der Standardkurve.

Im Bereich der CSTB-Konzentrationen von 0,11 ng/mL bis 8 ng/mL sind die Konzentrationen und die Absorptionswerte linear korreliert (Abb. 4.2.3-1). Das Bestimmtheitsmaß mit einem Wert von $R^2=0,997$ beweist den linearen Zusammenhang zwischen optischer Dichte und CSTB-Konzentration. CSTB-Konzentrationen im Plasma wurden mit der Punkt-zu-Punkt-Auswertung im linearen Teil der Standardkurve bestimmt.

Nachweisgrenze des CSTB-Assays und Intra- und Interassayvarianz

Die Nachweisgrenze stellt die kleinste erfassbare Antigen-Konzentration dar, welche signifikant vom Signal des Leerwertes abweicht. Der ermittelte Leerwert entspricht einer Absorption von $0,13 \pm 0,038$. Durch die Addition der doppelten Standardabweichung

wurde eine Absorption von 0,2 ermittelt, welche einer CSTB-Nachweisgrenze von 200 pg/mL entspricht. Für die Ermittlung der Testpräzision der CSTB-Konzentrationsbestimmung wurden die Intra-Assay-Varianz und die Inter-Assay-Varianz bestimmt. Die CSTB-Konzentrationsbestimmung erfolgte im Plasma von gesunden Probanden. Pro Probandenplasma erfolgte eine achtfache CSTB-Konzentrationsbestimmung in einer Serie für die Bestimmung der Intra-Assay-Varianz (Tab. 4.3.2-1) und für die Bestimmung der Inter-Assay-Varianz (Tab. 4.3.2-2) wurde eine sechsfache CSTB-Bestimmung im Probandenplasma an 3 verschiedenen Tagen innerhalb eines Monats durchgeführt.

Tab. 4.3.2-1: CSTB-Sandwich-ELISA. Intra-Assay-Varianz [%]

Plasma	CSTB [ng/mL]	Standardabw. [ng/mL]	CV [%]
NS 1	5,8	0,19	3,1
NS 5	2,9	0,07	2,3
NS 15	1,4	0,03	2,3

Tab. 4.3.2-2: CSTB-Sandwich-ELISA. Inter-Assay-Varianz [%]

Plasma	CSTB [ng/mL]	Standardabw. [ng/mL]	CV [%]
NS 1	5,8	0,15	2,5
NS 5	2,9	0,23	7,9
NS 15	1,3	0,1	7,7

4.2.4 VERGLEICH DER CYSTATIN B-BESTIMMUNGEN ZWISCHEN SERUM UND PLASMA

1:2 verdünnte Plasma- oder Serumproben (n=12) zeigen keinen signifikanten Unterschied bei der Bestimmung der CSTB-Konzentrationen (Abb. 4.2.4-1). Für die Untersuchungen innerhalb einer im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Pilotstudie wurden ausschließlich Plasmaproben verwendet. Das Plasma wurde spätestens 4 h nach Abnahme der Blutprobe gewonnen und bis zur CSTB-Bestimmung bei -20°C gelagert.

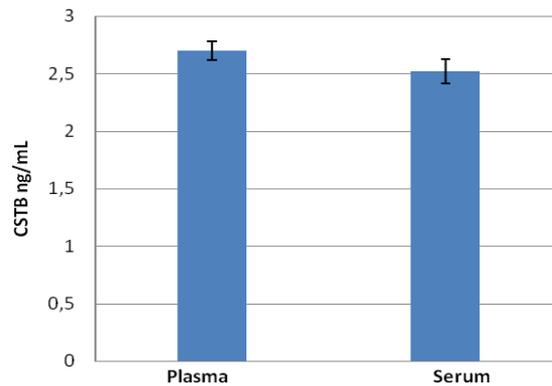


Abb. 4.2.4-1: CSTB-Sandwich-ELISA. Vergleich der CSTB-Konzentrationen zwischen Plasma und Serum eines gesunden Probanden.

4.2.5 CSTB-BESTIMMUNG IM PLASMA GESUNDER PROBANDEN UND IM PLASMA VON PATIENTEN MIT EINEM HEPATOZELLULÄREN KARZINOM

Im Rahmen einer Pilotstudie wurde die Cystatin B-Konzentration im Plasma von Probanden mit Hilfe des etablierten Sandwich-Assays bestimmt. Die 77 Probanden waren in zwei Gruppen eingeteilt - 45 freiwillige gesunde Spender in der ersten Gruppe und 32 HCC-Patienten in der zweiten Gruppe. Alle Bestimmungsansätze wurden 3 min nach Substratzugabe abgestoppt und unmittelbar im Anschluss am Tecan-Platten-Reader gemessen. Alle in den Tabellen 4.2.5-1 und 4.2.5-2 aufgeführten Cystatin B-Plasmawerte sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung. Bei mehrfacher Bestimmung (bis 8-fach) variierten die Messwerte derselben Probe innerhalb einer Mikrotiterplatte um weniger als 3,1% (Intra-Assay-Varianz). Bei der Bestimmung der CSTB-Konzentration in den Plasmen gesunder Probanden (Tab. 4.2.5-1) lagen die CSTB-Werte zwischen 0 und 6,4 ng/mL - bei einem Median von 0,49 ng/mL Der arithmetische Mittelwert der CSTB-Konzentrationen der Plasmen gesunder Probanden- war 0,9 ng/mL.

Tab. 4.2.5-1: CSTB. Plasma-Konzentrationen [ng/mL] mit Standardabweichungen von 45 gesunden Probanden

0,8 ± 0	0,65 ± 0,03	1,8 ± 0,25	0,2 ± 0	2 ± 0,15	0,43 ± 0,18	0,4 ± 0,2
0,0	3,4 ± 0,14	0,13 ± 0,02	0,79 ± 0,03	1,28 ± 0,1	0	0
0,15 ± 0,06	1,2 ± 0,09	0,12 ± 0,05	1 ± 0,28	0	1,95 ± 0,07	1,96 ± 0,06
0	0,48 ± 0,03	3,0 ± 0,5	0,43 ± 0,04	2,05 ± 0,49	0,94 ± 0,25	0
0,54 ± 0,08	0,25 ± 0	2,34 ± 0,3	6,4 ± 0,8	0	0,27 ± 0,04	3,7 ± 0,4
0,51 ± 0	1,1 ± 0,2	0	0	0,7 ± 0,2	0	0,33 ± 0,04
4,7 ± 0,14	0,35 ± 0,06	0				

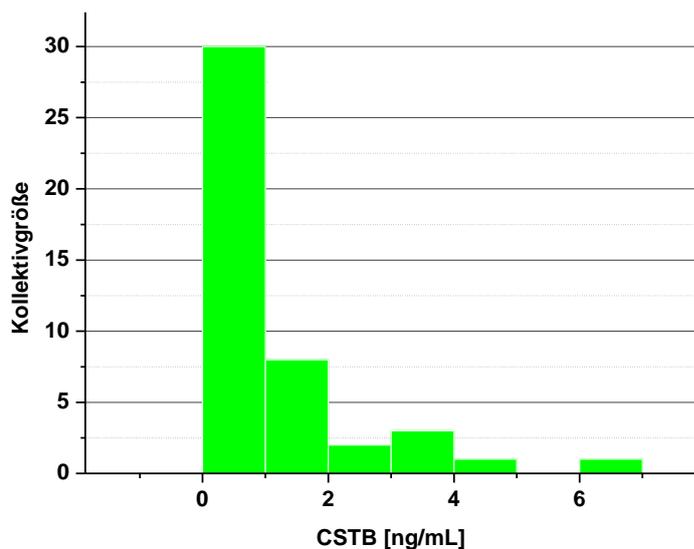


Abb. 4.2.5-1: Häufigkeitsverteilung der CSTB-Konzentrationen in den Plasmen gesunder Probanden.

Im Histogramm der Abbildung 4.2.5-1 ist die Häufigkeit der einzelnen CSTB-Plasmakonzentrationen (Tab. 4.2.5-1) dargestellt. 67% der 45 Probanden haben eine CSTB-Konzentration im Plasma von 0 - 1 ng/mL.

Tab. 4.2.5-2: CSTB. Plasma-Konzentrationen [ng/mL] mit Standardabweichungen von 32 HCC-Patienten

0,68 ± 0,1	0,2	2,5 ± 0,014	6,7 ± 0,4	3 ± 0,084	26,5 ± 0,64
1,2 ± 0,07	25 ± 0,08	3,1 ± 0,15	2,7 ± 0,1	23,8 ± 0,29	4,5 ± 0,63
23,4 ± 0,84	6 ± 0,07	5,2 ± 0,23	4 ± 0,06	3,9 ± 0,08	2,7 ± 0,28
0	3,8 ± 0,08	3,6 ± 0,01	3,1 ± 0,2	28 ± 0,01	5,16 ± 0,3
0	0	6,8 ± 0,3	15,6 ± 0,3	4,2 ± 0,01	3,49 ± 0,16
3,2 ± 0,06	24,7 ± 0,36				

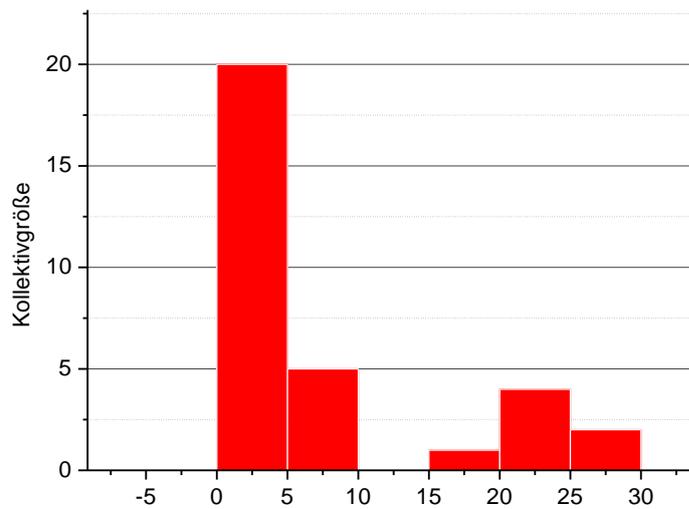


Abb. 4.2.5-2: Häufigkeitsverteilung der CSTB-Konzentrationen in den Plasmen von HCC-Patienten

Der Median für die CSTB-Plasmakonzentrationen der HCC-Patienten (Tab. 4.2.5-2) liegt bei 3,9 ng/mL in einem Gesamtbereich von 0-26,5 ng/mL. Der arithmetische Mittelwert der CSTB-Konzentrationen beträgt 7,5 ng/mL. Die einzelnen CSTB-Plasmakonzentrationen sind in Tab. 4.2.5-2 genannt. Das Histogramm in der Abb. 4.2.5-2 gibt einen Überblick über die Häufigkeitsverteilung der CSTB-Plasmakonzentrationen der HCC-Patienten.

4.3 CSTB-POLYMERE UND CSTB-INTERAKTIONSPARTNER

4.3.1 IDENTIFIKATION MÖGLICHER CSTB-BINDUNGSPARTNER MIT HILFE DER *PRE-TRANSFORMED HUMAN BRAIN MATCHMAKER cDNA LIBRARY*

Für die Identifizierung von CSTB-Interaktionspartnern wurden Versuche mit dem Yeast two-Hybrid System durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten mit Hilfe einer *Pre-transformed human brain Matchmaker cDNA library*.

Konstruktion des GAL4-DNA-BD/CSTB-Plasmids

Die CSTB-cDNA wurde in die MCS des pAS2-1-Vektors an die Seite der GAL4-DNA-BD kloniert. Die erfolgreiche Einschleusung der CSTB-DNA in das pAS2-1-Plasmid mit der GAL4-DNA-BD wurde durch Kontrollrestriktion mit anschließender Sequenzierung bestätigt. Der Vektor pAS2-1 wird in den PJ69-2a-Stamm, der die Reportergene *HIS3*, *ADE2*, *MEL1* enthält, transformiert. Das gemeinsame Vorkommen beider Plasmide in einzelnen Kolonien (doppelt transformierte Hefen) konnte nachgewiesen werden.

Interaktionen zwischen Köder und Beute-Proteine fanden aber nicht statt, da positiven Kolonien im entsprechenden synthetische Minimalmedium nicht proliferierten.

4.3.2 NACHWEIS POTENTIELLER CSTB-KOMPLEXPARTNER BZW. CSTB-STRUKTUREN HÖHERER ORDNUNG

Für die Identifizierung potentieller Komplexpartner wurde die Zelllinie UTC 8505c eingesetzt, die aus einem hoch-aggressiven, anaplastischen Schilddrüsenkarzinom entwickelt wurde. Der Aufschluss der Zellen erfolgte unter Milieubedingungen, welche dem intrazellulären Redoxpotenzial entsprachen. Er wurde wie unter 3.3.5 beschrieben, durchgeführt. Der gesamte Überstand des Zellhomogenates wurde für die Immunpräzipitation verwendet (Kap. 3.3.6). Bei pH 5,0 konnten in Gegenwart von GSH (5 mM) beide Antikörper, anti-CSTB I-2B und anti-CSTB I-4H, kein CSTB präzipitieren (Abb. 4.3.2-1). Die Präzipitation von Cystatin B gelang aber bei einer Konzentration von 5 mM GSH und pH 7,5 (Abb. 4.3.2-1). Analoge Befunde wurden mit der zytosolischen Fraktion erhalten.

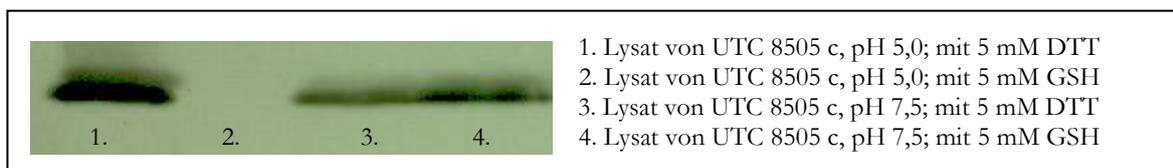


Abb. 4.3.2-1: Immunoblot des Immunpräzipitats mit dem mAK anti-CSTB I-2B aus dem Lysat von UTC 8505c - entwickelt mit dem mAK anti-CSTB I-4H.

In einem Kontrollansatz mit Extraktionspuffer ohne Zellen wurde unter gleichen Bedingungen (pH 5,0; 5 mM GSH) rekombinantes CSTB präzipitiert (Abb.4.3.2-2).

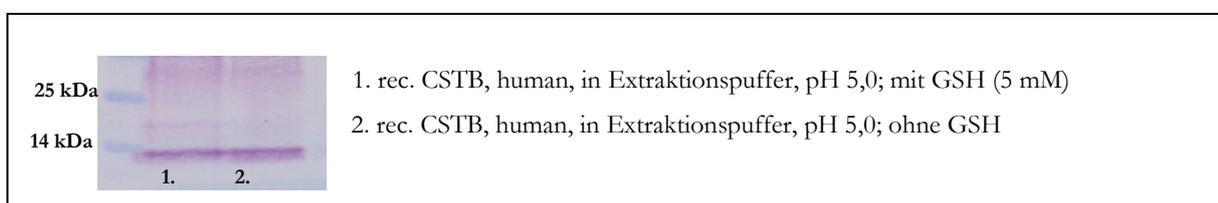


Abb. 4.3.2-2: Immunoblot des Immunpräzipitats von rec. CSTB mit dem mAK anti-CSTB I-2B, entwickelt mit dem anti-CSTB I-4H.

Damit konnte ausgeschlossen werden, dass GSH die Bindungs- bzw. Struktureigenschaften der Antikörper verändert. Es wurde außerdem überprüft, ob eine Abhängigkeit der CSTB-Präzipitation vom pH-Wert oder von der GSH-Konzentration

des Extraktionspuffers besteht. Für die Bestimmung der pH-Abhängigkeit (Abb. 4.3.2-3) wurden Extraktionspuffer mit 5 mM GSH und pH-Werten von 5,0; 6,0; 7,0 und 8,0 eingesetzt. Die Zellen wurden mit Extraktionspuffer mit den genannten pH-Werten aufgeschlossen und die Immunpräzipitation mit dem AK anti-CSTB I-2B durchgeführt und das Präzipitat im Immunoblot analysiert.

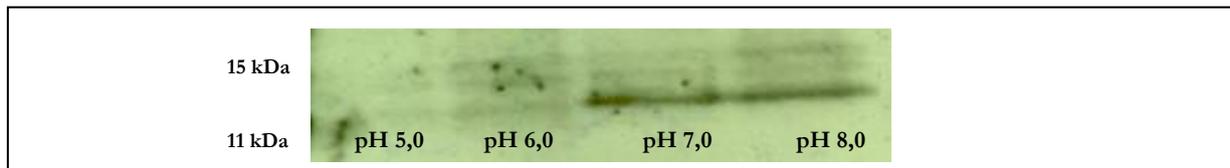


Abb. 4.3.2-3: pH-Abhängigkeit der CSTB-Immunpräzipitation (mit mAK anti-CSTB I-2B) in Gegenwart von 5 mM GSH. Immunoblot entwickelt mit mAK anti-CSTB I-4H.

Es konnte gezeigt werden, dass freies CSTB in Gegenwart von 5 mM GSH erst bei einem pH-Wert über 6,0 präzipitiert werden konnte. Die Untersuchung zur GSH-Abhängigkeit der CSTB-Immunpräzipitation erfolgte mit Extraktionspuffer bei einem pH-Wert von 5,0 und den folgenden GSH-Konzentrationen: 0 mM; 0,1 mM; 0,5 mM; 1 mM; 3 mM und 5 mM (Abb. 4.3.2-4). Die CSTB-IP erfolgte mit anti-CSTB-I-2B. Die Zellen wurden mit Extraktionspuffer der genannten GSH-Konzentrationen aufgeschlossen.

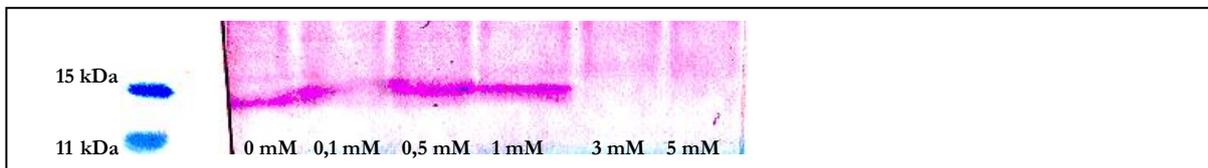


Abb. 4.3.2-4: GSH-Abhängigkeit der CSTB-IP (mit mAK anti-CSTB I-2B) bei pH 5,0. Immunoblot entwickelt mit mAK anti-CSTB I-4H

Die Präzipitation von freiem CSTB gelingt bei einem pH-Wert von 5 nur bis zu einer GSH-Konzentration von 1 mM GSH. Bei beiden Bestimmungen konnte freies CSTB in den Post-IP-Überständen nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigte Befunde).

Durch die Gelpermeations-Chromatographie (SEC), beschrieben unter 3.4.8, wurde versucht, mögliche CSTB-Komplexe mit anderen Proteinen aus dem Zellextrakt zu isolieren und zu identifizieren. Die Kalibrierung der Säule erfolgte mit den Molmassenstandards Dextranblau und Cytochrom c. Das ermittelte Ausschlussvolumen V_0 (Dextranblau) war 90 mL, das Elutionsvolumen V_E für Cytochrom c war 222 mL. 3 mL des lysierten UTC 8505c-Zellüberstandes wurden auf die Superdex 75-prep grade-Säule

aufgetragen und chromatographiert. Anhand des Säulenprofils (Abb. 4.3.2-5) wurden für 9 Bereiche die Einzelfraktionen vereint. Die lyophilisierten Pool-Fraktionen wurden im Immunoblot auf das Vorkommen von CSTB untersucht (Abb. 4.3.2-6)

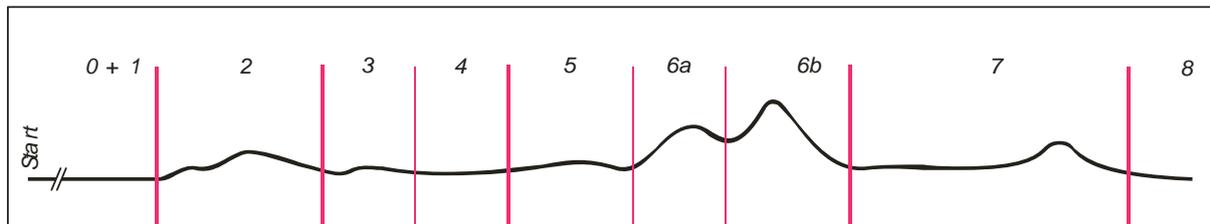


Abb. 4.3.2-5: SEC-Elutionsprofil bei 280 nm (Superdex 75, prep grade) von UTC 8505c-Lysat bei pH 5,0 in Gegenwart von 5 mM GSH

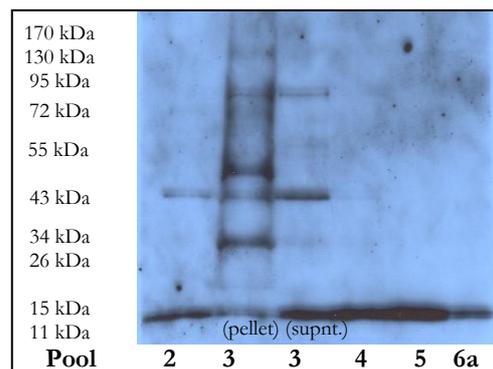


Abb. 4.3.2-6: Immunoblot der Pool-Fraktionen 2 - 6a der SEC (Abb. 4.3-5), entwickelt mit mAK anti-CSTB I-4H

CSTB wurde in den Poolfraktionen 2 - 6a nachgewiesen, nicht aber in den Poolfraktionen 1, 6b, 7 und 8. Um eine eindeutigere Eingrenzung des CSTB-Vorkommens auf die einzelnen Fraktionen eines Pools vornehmen zu können, wurden nach einer erneuten SEC die lyophilisierten Fraktionen 23 - 67, die den o.g. genannten Pools entsprachen, einzeln im Immunoblot auf das Vorhandensein von CSTB hin untersucht (Abb. 4.3.2-7). In den Einzelfraktionen 26-28 mit Elutionsvolumina von 156, 162 und 168 mL wurde Cystatin B nachgewiesen. Die Fraktionen 29 und 30 waren frei von Cystatin B. Aber in den Fraktionen 31 bis 43 konnte Cystatin B im Immunoblot erneut detektiert werden. In der Fraktion 43, mit einem V_E von 258 mL, war CSTB nur noch schwach und in den Fraktionen bis 67 nicht mehr nachweisbar.

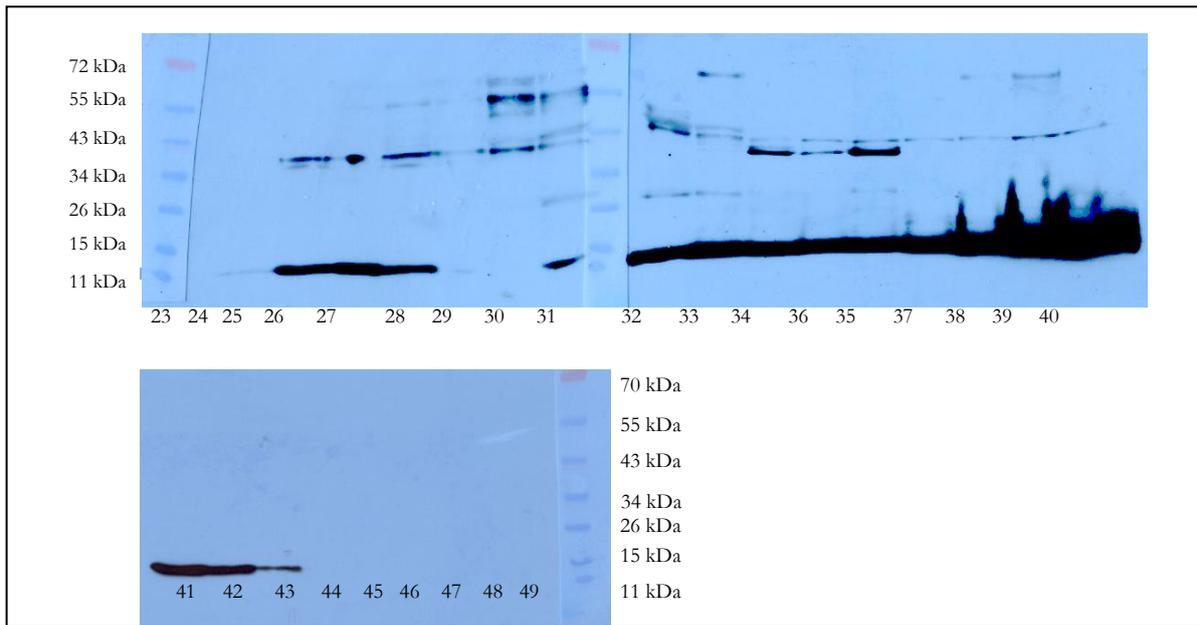


Abb. 4.3.2-7: Immunoblots der Fraktionen 23-49 der SEC entwickelt mit mAK anti-CSTB I-4H

Für den Nachweis möglicher Cystatin B-Komplexe in den Fraktionen 26, 27, 31 und 34 wurden diese Proben mit der nativen PAGE per Silberfärbung und Immunoblot untersucht. Die SDS-PAGE (silbergefärbt) zeigte ein diffuses Bandenmuster (Abb. 4.3.2-8). Im Immunoblot, welcher mit dem mAK anti-CSTB I-4H entwickelt wurde, erschien ein CSTB-Signal in Form einer Doppelbande in den Fraktionen 26 und 27, während die Fraktionen 31 und 34 starke, diffuse CSTB-Signale zeigten. Auf Grund dieser diffusen Immunoblots konnten CSTB, bzw. CSTB-Komplexen keine eindeutigen Banden im Silbergel zugeordnet werden, Banden, die eine MS-Analyse ermöglicht hätten.

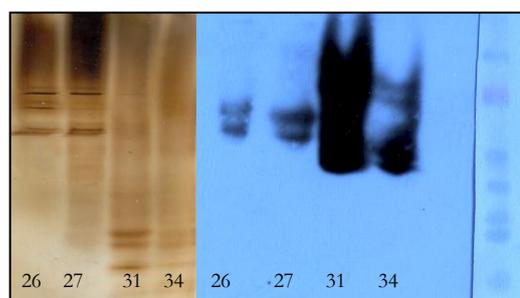


Abb. 4.3.2-8: Native PAGE. Silberfärbung und Immunoblot der Fraktionen 26, 27, 31 und 34 der SEC - entwickelt mit dem mAK anti-CSTB I-4H

Die Identifizierung von CSTB-Komplexen war mit Hilfe der nativen PAGE nicht möglich und wurde deshalb nicht weiter verfolgt. Für den Nachweis einer Interaktion von CSTB mit den Cathepsinen L oder B wurden die Fraktionen 23 - 40 auf das Vorkommen von Cathepsin L und B im Immunoblot untersucht (Abb. 4.3.2-9). Die Fraktionen 32 - 35 enthielten Cathepsin L als Proform, als Zweiketten- und als Einketten-Enzym. Gleichzeitig kommt in diesen Fraktionen CSTB vor (Abb. 4.3.2-9).

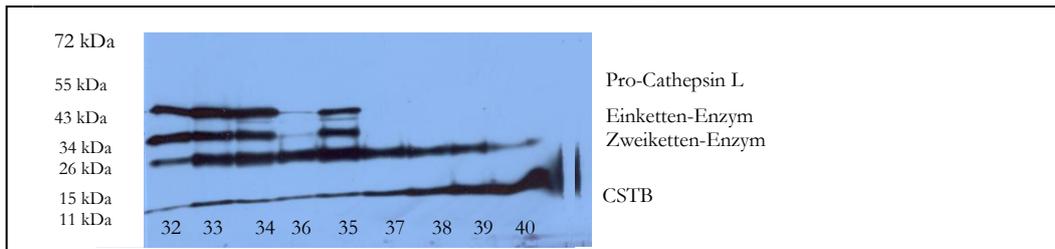


Abb. 4.3.2-9: Immunoblot der Fraktionen 32 - 40 der SEC - entwickelt mit den mAK anti-CSTB I-4H und anti-human Cathepsin L 33/1.

Die Molmassen der Proteine Cystatin B und des Cathepsin L-Zweiketten-Enzyms entsprechen nicht dem für sie zu erwartenden Elutionsvolumen und sind ein Hinweis auf eine native Interaktion zwischen Cathepsin L und CSTB. Die Analyse der Fraktionen 23-40 im Immunoblot bezüglich des Vorkommens von Cathepsin B zeigte, dass Cathepsin B in den Fraktionen 25-40 nachweisbar ist (Abb. 4.3.2-10). Cystatin B kommt ebenfalls in den Fraktionen 26-40 vor. Das Vorkommen von Cystatin B und Cathepsin B in den Fraktionen 26 - 28 ist ein Hinweis auf eine native Interaktion der beiden Proteine.

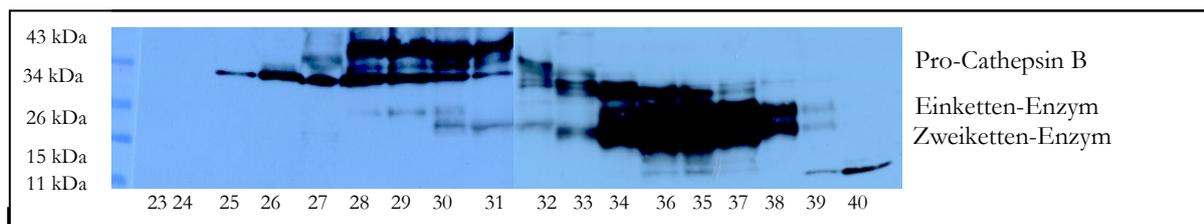


Abb. 4.3.2-10: Immunoblot der Fraktionen 23 - 40 der SEC - entwickelt mit dem anti-human Cathepsin B-mAK CB-59-4B11

Für den Nachweis der Interaktion von Cystatin B mit den Cathepsinen L und B wurde die native Fokussierung der gelchromatographisch nach Molmasse getrennten Proben durchgeführt. Anschließend wurden die fokussierten Proben in der zweiten Dimension in der SDS-PAGE getrennt und mit Hilfe des Immunoblots untersucht (Abb.4.3.2-11). Die Auswertung dieses Immunoblots zeigte, dass die Cathepsine B und L und Cystatin B bei

einem identischen IEP fokussiert wurden und deshalb unter nativen Bedingungen sehr wahrscheinlich als Komplex vorlagen.

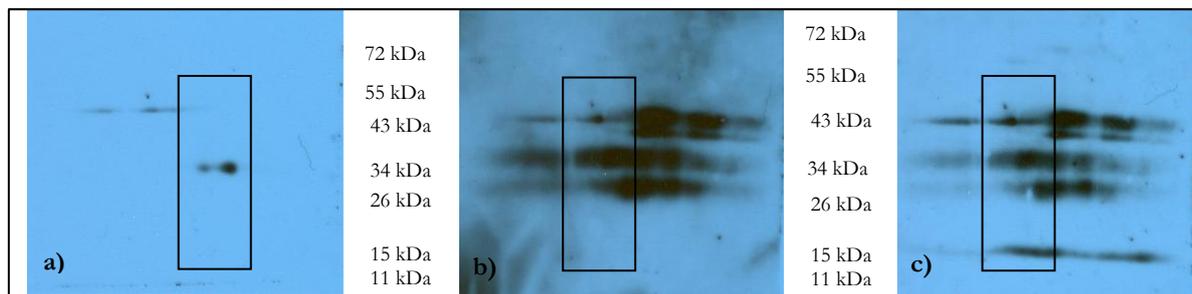


Abb. 4.3.2-11: Immunoblot der Pool-Fraktion 3 nach 2D-SDS-PAGE. a) Cathepsin B-Nachweis mit anti-human-Cathepsin B-mAK CB 59-4B11 b) Cathepsin L-Nachweis mit dem anti-Cathepsin L-mAK CPLH 33/1 c) Cathepsin L- und Cystatin B-Nachweise mit anti-Cathepsin L-mAK CPLH 33/1 und anti-CSTB I-4H

Aus dem Kulturüberstand von UTC 8505c-Zellen konnte durch Immunpräzipitation ein Komplex aus Procathepsin L und CSTB isoliert werden (Abb. 4.3.2-12).

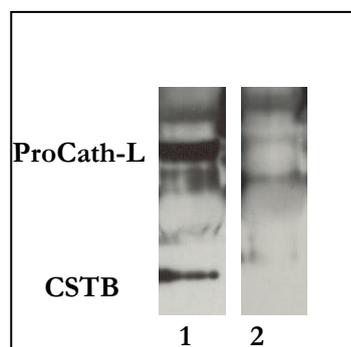


Abb. 4.3.2-12: Immunoblot. Nachweis von Procathepsin L und Cystatin B nach Immunpräzipitation aus Zellkulturüberstand von UTC 8505C-Zellen mit einem polyklonalen anti-human Cathepsin L-AK. 1. Procathepsin L-Nachweis mit dem mAK CPLH 33/1 und Cystatin B-Nachweis mit dem mAK I-4H. 2. Konjugat-Kontrolle: Anti-Maus-IgG, Fcγ-spezifisch, HRP-markiert

4.4 NACHWEIS VON CSTB IN ETABLIERTEN KARZINOM-ZELLINIEN

Die Immunzytochemischen Untersuchungen dienten zunächst der weiteren Charakterisierung der Antikörper. Die zytochemischen Färbungen der Zellen UTC 8505c wurden, wie in Kapitel 3.2.2.5 beschrieben, durchgeführt. Die Zellen wurden mit 4% Paraformaldehyd fixiert und mit 0,5% Triton X-100 permeabilisiert. Die Zelllinie stammt von einem undifferenzierten Schilddrüsenkarzinom und hat ein hohes malignes Potential.

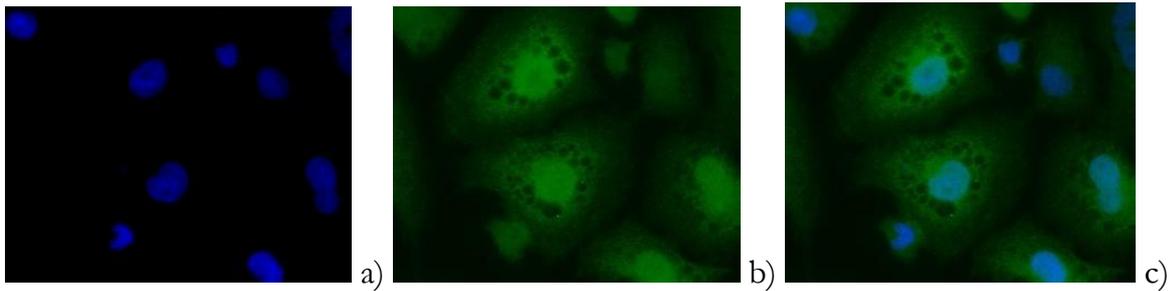


Abb. 4.4-1: PFA-fixierte UTC 8505C-Zellen, a) Kernlokalisierung durch Hoechst 33258, b) immunzytochemischer Nachweis von CSTB durch den mAK I-2B und anti-Maus-IgG (H+L)-Alexa-488-AK, c) Overlay von a) und b)

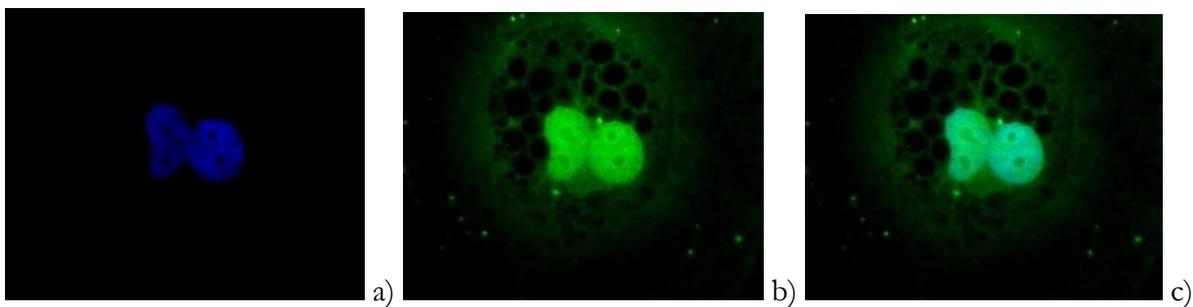


Abb. 4.4-2: PFA-fixierte UTC 8505C-Zellen, a) Kernlokalisierung durch Hoechst 33258 b) immunzytochemischer Nachweis von CSTB durch mAK I-4H und anti-Maus-IgG (H+L)-Alexa-488 AK, c) Overlay von a) und b)

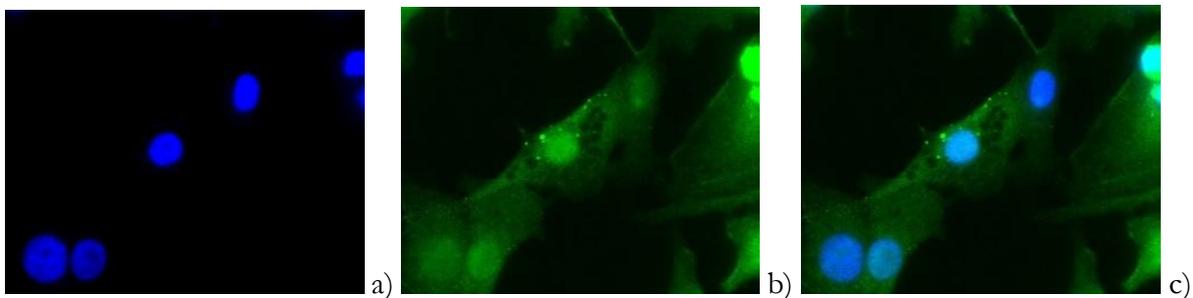


Abb. 4.4-3: PFA-fixierte UTC 8505C-Zellen, a) Kernlokalisierung durch Hoechst 33258 b) immunzytochemischer Nachweis von CSTB mit mAK I-4G und anti-Maus-IgG (H+L)-Alexa-488 c) Overlay von a) und b)

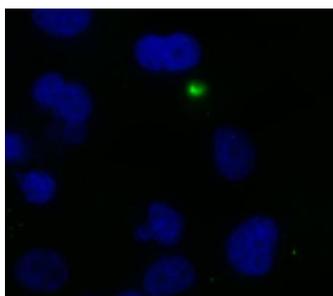


Abb. 4.4-4: PFA-fixierte UTC 8505C-Zellen, Konjugatkontrolle, Overlay der Kernlokalisierung durch Hoechst 33258 und der Negativkontrolle (pAK anti-Maus-IgG-Alexa-488).

Von den eingesetzten anti-CSTB-Antikörpern, die unterschiedliche Epitope detektieren, färben alle vergleichbare Strukturen an (Abb. 4.4-1 bis Abb. 4.4-3). Die Kontrolle mit dem sekundären Antikörper zeigt keine Signale in den untersuchten Zellen (Abb. 4.4-4). Die Antikörper weisen CSTB im Kern und im zytoplasmatischen Raum nach. Es sind zytoskelettartige (Telefonscheiben) Strukturen in den Zellen zu erkennen. Für den Nachweis, dass diese Strukturen mit dem Malignitätsgrad der Zelllinien korrelieren, wurden mit dem mAK anti-CSTB I-4H weitere Untersuchungen an den Zelllinien FTC-133 (Abb. 4.4-5) und B-CPAP (Abb. 4.4-6) durchgeführt. Es konnten ähnliche Strukturen auch in diesen weniger malignen Zelllinien nachgewiesen werden.

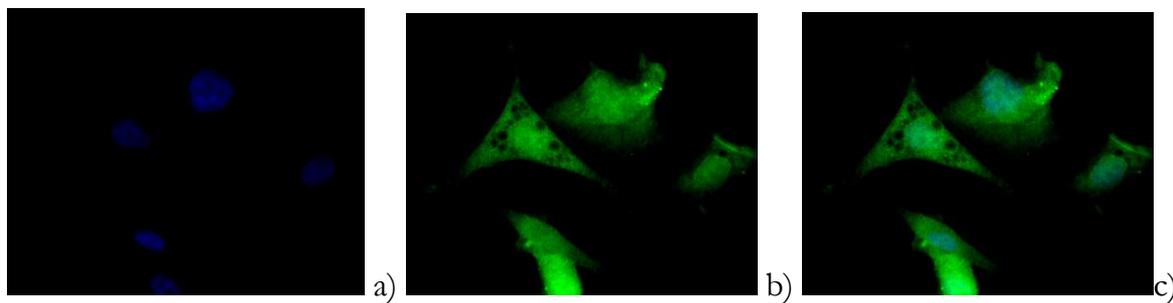


Abb. 4.4-5: PFA-fixierte FTC-133-Zellen, Kernlokalisierung durch Hoechst 33258 und immunzytochemischer Nachweis von CSTB mit mAK anti-CSTB I-4H und anti-Maus-IgG (H+L)-Alexa-488 AK, c) Overlay von a) und b).

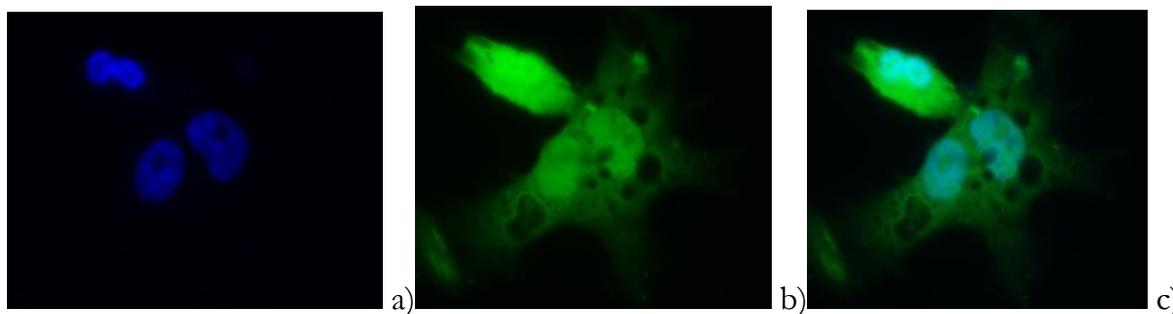


Abb. 4.4-6: PFA-fixierte B-CPAP-Zellen, a) Kernlokalisierung durch Hoechst 33258 b) immunzytochemischer Nachweis von CSTB mit mAK anti-CSTB I-4H und anti-Maus-IgG (H+L)-Alexa-488 AK, c) Overlay von a) und b).

Co-Lokalisation von Cystatin B und Cathepsin L

In Untersuchungen zur Co-Lokalisation von Cystatin B und Cathepsin L wurden UTC 8505c-Zellen mit den mAK anti-CSTB I-4H und pAK-anti-Cathepsin L gefärbt (Abb. 4.4-7 und (Abb. 4.4-8)). Beide Proteine wurden im Kern der Zellen nachgewiesen und zeigten eine deutliche Überlagerung der Fluoreszenz-Signale, was eine identische Lokalisation der beiden Proteine beweist.

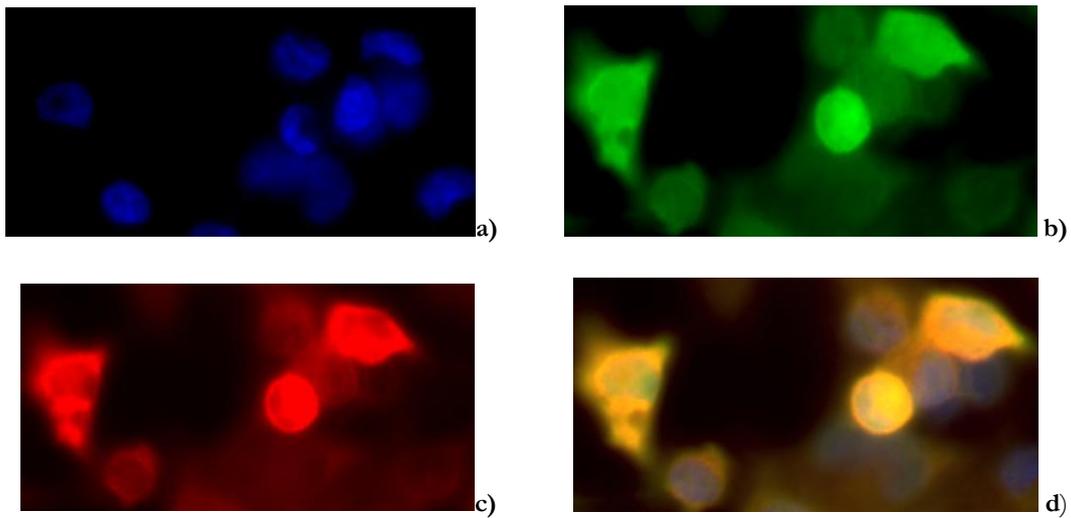


Abb. 4.4.-7: PFA-fixierte UTC 8505C-Zellen, a) Kernlokalisierung durch Hoechst 33258, b) immunzytochemischer Nachweis von CSTB durch mAK I-4G und pAK anti-Maus-IgG (H+L)-Alexa-488, c) immunzytochemischer Nachweis von Cathepsin L durch die AK anti-Cathepsin L (BioAss) und anti-rabbit-IgG (H+L)-Cy3, d) Overlay von a), b), c)

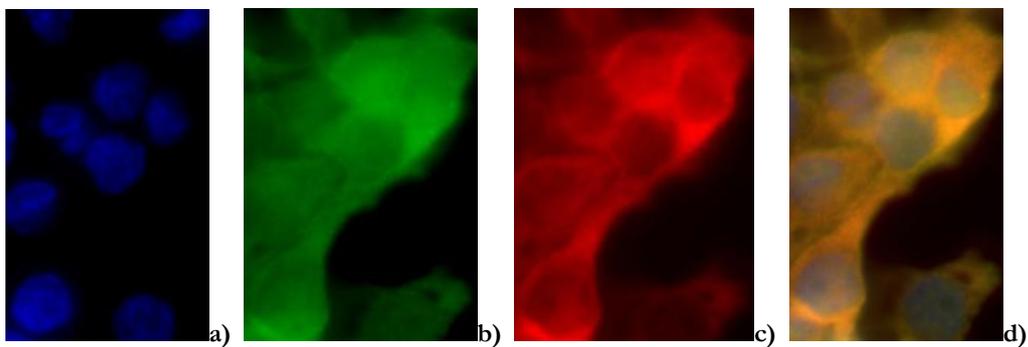


Abb. 4.4.-8: PFA-fixierte UTC 8505C-Zellen, a) Kernlokalisierung durch Hoechst 33258, b) immunzytochemischer Nachweis von CSTB durch mAK I-4G und pAK anti-Maus-IgG (H+L)-Alexa-488, c) immunzytochemischer Nachweis von Cathepsin L durch die AK anti-Cathepsin L (BioAss) und anti-rabbit-IgG (H+L)-Cy3, d) Overlay von a), b), c)

Subzelluläre Lokalisation von CSTB

Mit Hilfe des Organellenmarkers Lysotracker[®] wurde die Lokalisation von Cystatin B in Zellen untersucht. Die BHK-Zellen wurden für eine Stunde mit Lysotracker[®] green 5 μ M inkubiert.

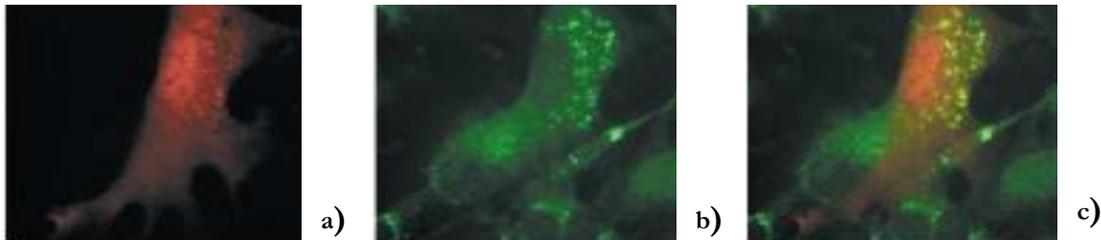


Abb. 4.4.-9: PFA-fixierte BHK-Zellen, a) immunzytochemischer Nachweis von CSTB mit mAK I-2B und anti-Maus-IgG Cy3, b) immunzytochemischer Nachweis der Lysosomen mit Hilfe des Lysotracker[®] green, c) Overlay von a) und b)

Es konnten eindeutig Lysosomen mit Hilfe des Lysotracker[®] in den BHK-Zellen identifiziert

werden. CSTB wurde ebenfalls an den Lysosomen vom mAK I-2B nachgewiesen, was durch Co-Lokalisation von beiden Strukturen bestätigt werden konnte (Abb. 4.4.-9).

5 DISKUSSION

CSTB ist ein ubiquitär im humanen Organismus vorkommendes Protein, welches zur Gruppe der Cysteinprotease-Inhibitoren der Typ 1-Cystatine gehört. Es hemmt *in vitro* verschiedene lysosomale Proteasen, zum Beispiel die Cathepsine L, B, S und H, die durch eine feste, aber reversible Bindung blockiert werden (Barret, 1986; Rawlings & Barret, 1990). Im CSTB-Gen sind 10 Mutationen bekannt, die die Ursache für die progressive Myoklonus-Epilepsie vom Typ Unverricht-Lundborg (EPM1) sind. Die häufigste Mutation ist die Vervielfältigung ($n > 30$) eines Dodecamers in der Promotorregion des CSTB-Gens. Diese Krankheit zählt auf Grund ihrer Symptome und des Verlustes der intellektuellen Leistungsfähigkeit zu den neurodegenerativen Erkrankungen (Pennacchio *et al.*, 1998).

CSTB ist *in vitro* gut charakterisiert. Seine physiologischen Funktionen in der Zelle sind aber nach wie vor nicht geklärt. *In vitro* hemmt die Bindung von CSTB an die Cystein-Cathepsine B, H, L und S die Aktivität dieser Cathepsine. Dies war die Grundlage für vermutete Funktion von CSTB als endogener Proteaseinhibitor. Die von CSTB gehemmten lysosomalen Proteasen spielen eine wichtige Rolle beim intrazellulären Protein *turnover* in den Lysosomen, bei der Prozessierung und Aktivierung von Proteasen, beim Antigen-Prozessing für die Antigen-Präsentation, bei der Apoptose (Turk *et al.*, 2000) und bei der Ausprägung typischer Merkmale maligner Tumoren – wie Invasion und Metastasierung. Eine Störung des physiologischen Gleichgewichtes in der Regulation der proteolytischen Aktivität der Proteasen führt zu einer Reihe von Erkrankungen (Joyce *et al.*, 2004). Die gestörte Homeostase zwischen den endogenen Inhibitoren und den Cystein-Cathepsinen hat u.a. auch eine Bedeutung für die Manifestation der Malignität und damit für die Prognose einer Krebserkrankung. Diese Proteine werden deshalb auch als Biomarker für die Tumorprogression und als prognostische Faktoren für die Beurteilung des Verlaufs von Tumorerkrankungen diskutiert, Lah *et al.*, 2008.

Im Rahmen eines EU-Projektes („Cystatin B in Epilepsy“ QLRT-31450), das zur Klärung der molekularen Ursachen der EPM1 beitragen sollte, mussten zunächst hoch-spezifische Antikörper gegen CSTB generiert werden. Generierung und Charakterisierung dieser Antikörper und ihr Einsatz für weiterführende Fragestellungen sind Inhalt dieser Arbeit.

5.1 CHARAKTERISIERUNG DER MONOKLONALEN ANTI-CSTB-MAK

Die spezifischen monoklonalen anti-CSTB-Antikörper wurden nach dem klassischen Hybridomverfahren (Köhler & Milstein) gewonnen, das in Teilaspekten modifiziert worden war. Das für die Immunisierung benötigte native humane Antigen wurde in hochreiner Form von Herrn Prof. Dr. A. Rinne (Tromsø, Norwegen) zur Verfügung gestellt. Die Reinheitskontrolle des Proteins erfolgte mit Hilfe der SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung. Das CSTB-Präparat zeigte keine sichtbaren Verunreinigungen und konnte für die Immunisierung von 3 Balb/c-Mäusen genutzt werden. Beim Screening von ca. 4000 Hybridom-Kulturüberständen wurden 6 Klone identifiziert, welche den für diese Arbeit gestellten Anforderungen entsprachen. Selektion und Charakterisierung der spezifischen Antikörper erfolgten unter verschiedenen Kriterien und waren ein wesentlicher Teil dieser Arbeit. Es wurden solche Klone ausgewählt, deren Antikörper bei der Detektion von rekombinantem und nativem CSTB sehr sensitiv waren. Zunächst erfolgte die Kontrolle der Kreuzreaktion der Antikörper gegenüber dem in der Primärstruktur zu 54% identischen Cystatin A. Die Hybridome von kreuzreaktionsfreien mAK (Abb. 4.1.5-1, Abb. 4.1.5-2) wurden im Bioreaktor (Tecnomouse) kultiviert, um sie in größeren Mengen für die Aufreinigung zur Verfügung zu haben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Epitopkartierung mit Hilfe einer 13-mer CSTB-Peptid-Membran durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Antikörper unterschiedliche Sequenzbereiche im CSTB erkennen. Die Antikörper anti-CSTB I-2B und anti-CSTB I-4H reagierten mit der Aminosäuresequenz E₃₁-F₄₃ und der Antikörper II-12D mit A₄₉-H₅₈ und L₈₂-N₈₈. Keine Reaktion mit der Mapping-Membran zeigten die Antikörper anti-CSTB-mAK I-4G, II-1H und II-5, was darauf hinweist, dass sie wahrscheinlich Konformations-Epitope erkennen. Konformations-Epitope entstehen durch die dreidimensionale Faltung des Proteins. Es kommen Aminosäuresequenzen in räumliche Nachbarschaft, welche in der Primärstruktur deutlich entfernt von einander liegen. Bei der Immunisierung der Mäuse wird das Antigen (CSTB) nicht vollständig denaturiert. Die konservierten Proteinstrukturen ermöglichen damit u.a. die Aktivierung von B-Lymphozyten, die Antikörper gegen Konformations-Epitope bilden.

Ein weiterer Grund dafür, dass die Antikörper anti-CSTB-mAK I-4G, II-1H und II-5 nicht mit der Mapping-Membran reagieren ist, dass im Gegensatz zum Immunoblot, bei dem das gesamte Protein für die Binding mit den Antikörpern zur Verfügung steht, die Ausbildung der nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen Paratop und Epitop bei der Peptid-Membran mit den 13mer-Peptiden limitiert ist.

In Abbildung 5.1-1 wird deutlich, wie begrenzt die Anzahl möglicher kreuzreaktionsfreier Epitope im CSTB gegenüber CSTA ist. Der Antikörper II-12D erkannte auf der Mapping-Membran zwei CSTB-Epitope, welche in der Primärstruktur nicht benachbart sind. Abbildung 4.1.7-7 zeigt, dass durch die Faltung des CSTB-Proteins diese beiden Epitope räumlich getrennt vorliegen. Die CSTB-Sequenz A₄₉GTNYFIKVVH₅₈ zeigt eine 80%-ige Identität zur CSTA-Sequenz A₄₉GTNYIYIKVVR₅₈ und könnte eine Kreuzreaktion ermöglichen. Dieser Antikörper reagiert aber weder im Immunoblot noch im ELISA mit Cystatin A (Abb. 4.1.5-1, Abb. 4.1.5-2).

		10	20	30	40	50
Cystatin A	H ₂ N-	MIPGGLSEAK	PATPEIQEIV	DKVKPQLEEK	TNETYGKLEA	VQYKTQVVAG
Cystatin B	H ₂ N-	MMCGAPSATQ	PATAETQHIA	DQVRSQLEEK	ENKKFPVFKA	VSFKSQVVHG
					anti-CSTB I-2B, anti-CSTB I-4H	
		60	70	80	90	
Cystatin A		TNYIYIKVRAG	DNKYMHLKVF	KSLPGQNEDE	VLTYGQVDKN	KDELDTGF-OOH
Cystatin B		TNYFIKVVHVG	DEDFVHLRVF	QSLPHENKPL	TLSNYQTNKA	KHDELTYF-OOH
		anti-CSTB II-12D				

Abb. 5.1-1: CSTB-Epitope der anti-CSTB mAK I-2B, I-4H und II-12D. Vergleich mit den korrespondierenden Sequenzen im CSTA. Identisch besetzte Positionen in den Sequenzen beider Proteine sind rot markiert. Modifiziert nach Swiss-prot. Nr. P04080 und P01040-1

Der Einsatz der Antikörper bei der Immunpräzipitation zeigte, dass die Antikörper I-2B, I-4H und II-12D natives CSTB binden und anreichern können. Die Sequenzierung der präzipitierten ca. 12 kDa Proteinbande (Abb. 4.1.10-1, Abb. 4.1.10-3) bestätigte, dass die Antikörper spezifisch mit CSTB reagieren. In der Abbildung 5.1.-3 sind CSTB-Peptide in der CSTB-Sequenz farbig markiert, welche durch Sequenzierung bestätigt wurden - 86% der gesamten Aminosäuresequenz.

H₂N-MMCGAPSATO PATAETOHIA DVRSOLEEK ENKKFPVFKA VSFKSQVVAG TNYFIKVHVG
DEDFVHLRVE QSLPHENKPL TLSNYQTNKA KHDELTYF-COOH

Abb. 5.1-3: Massenspektrometrie. Aminosäuresequenz von CSTB, das mit dem Antikörper anti-CSTB I-2B aus HeLa-Zellen präzipitiert wurde. Farbige unterstrichen sind die CSTB-Sequenzen, welche durch Sequenzierung bestätigt wurden.

Mit Hilfe der *Quarz crystal microbalance*-Technik (QCM), die eine Online-Detektion des Bindungsablaufs zwischen zwei Partnern ermöglicht, wurde an Piezoimmunosensoren die Charakterisierung der Antigen-Antikörper-Bindung vorgenommen. CSTB wurde an die aktivierte Goldelektrode gebunden und mit dem zu untersuchenden Antikörper umspült. Die erhaltenen Bindungskonstanten in der Größenordnung von 1×10^{-8} bis $1 \times 10^{-10} \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$ bestätigen die affine Bindung der Antikörper an CSTB. Es konnte kein Unterschied in ihrem Bindungsverhalten zwischen nativem und rekombinantem CSTB festgestellt werden. Deutlich wird, dass der Antikörper anti-CSTB II-5A ($K_D 1,6 \times 10^{-8} \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$) weniger affin als die Antikörper anti-CSTB I-2B und II-12D an CSTB bindet. Eine mögliche Ursache dafür ist, dass das Epitop für den Antikörper anti-CSTB II-5A im Protein schlecht zugänglich ist. Seine Dissoziationskonstante - und damit die Festigkeit der Bindungen - gleicht der der anderen Antikörper. Diese Ergebnisse zeigen, dass mit der QCM-Technik die kinetische Bestimmung von Bindungskonstanten möglich ist und sie Aussagen über das Erkennen von Bindungsstrukturen und die Festigkeit der Bindung – hier zwischen Antigen und Antikörper- gemacht werden können. Die piezoelektrischen Immunosensoren sind eine Alternative zu der ELISA-Methode, da der zeitliche Aufwand deutlich geringer ist und kinetische Daten für die Berechnung herangezogen werden können.

5.2 CHARAKTERISTIKA DES CSTB-SANDWICH-ELISA

Zunächst wurden alle 6 Antikörper mit EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin markiert. Der Vorteil dieses Biotinesters ist, dass er durch seinen Spacerarm mit einer Länge von 30,5 Å eine mögliche sterische Behinderung bei der Bindung von Streptavidin-HRP-Molekülen reduziert (*Pierce*). Die Biotinmarkierung war bei den anti-CSTB-mAK I-2B, I-

4G und II-12D erfolgreich. Sie resultierte bei den Antikörpern I-4H, II-4A und II-1H in einem Verlust der Affinität zu CSTB. Sie zeigten keine Reaktion mit CSTB im direkten ELISA. Eine mögliche Ursache für diesen Verlust ist die Bindung des Biotinesters an Aminogruppen im Bereich der CDR-Regionen der Antikörper. Diese Antikörper konnten deshalb nicht als Detektor-Antikörper genutzt werden. Bei der Ermittlung des optimalen Antikörperpaares wurden als Capture-Antikörper anti-CSTB II-12D und als Detektor-Antikörper anti-CSTB I-2B bestimmt, da beide in Kombination den sensitivsten Nachweis von CSTB ermöglichten (Abbildung 4.2.1-1).

Die Epitopkartierung für diese beiden Antikörper bestätigte die Grundlage für die beobachtete effektive Reaktion der Antikörper mit dem Protein, welche für den sensitiven Nachweis von CSTB erforderlich ist. Mit Hilfe des Computerprogramms PyMOL wurden die CSTB-Epitope, mit denen die Antikörper reagieren, im 3D-Komplex von CSTB und Papain gekennzeichnet (Abb. 5.2-1).

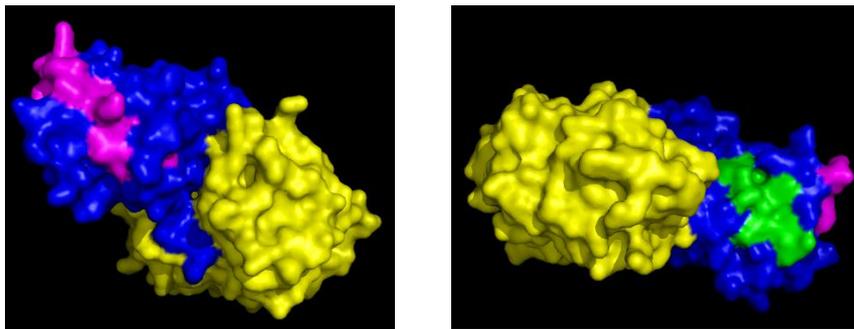


Abb. 5.2-1: 3D-Modell des Komplexes aus CSTB (blau) und Papain (gelb) (Stubbs *et al.*, 1990). Epitope der Antikörper anti-CSTB I-2B (magenta) und anti-CSTB II-12D (grün) im CSTB. Diese Antikörper werden im Sandwich-ELISA als Catcher- bzw. Detektor-Antikörper eingesetzt.

Liegt CSTB gebunden an einen Komplexpartner nach dem von Stubbs *et al.*, 1990 beschriebenen Modell vor, können beide Antikörper nicht nur freies, sondern auch gebundenes CSTB, z.B. im Plasma, erkennen und binden (Abb. 5.2-1).

Die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten für die im Sandwich-ELISA verwendeten Antikörper liegen im Bereich von $1,43 \times 10^{-9}$ mol/L und $4,3 \times 10^{-10}$ mol/L und bestätigen die feste Bindung an CSTB. Der entwickelte Sandwich-ELISA erreicht mit Hilfe der etablierten CSTB-Standardkurven ein *Detection Limit* von 200 pg/mL. Er ist damit um den Faktor drei sensitiver bei der Konzentrationsbestimmung von CSTB als

der bisher zu Verfügung stehende ELISA (Strojan *et al.*, 2000). Die Literaturangaben für das *Detection Limit* dieses ELISA differieren zwischen 0,6 ng/mL und 1 ng/mL (Werle *et al.*, 2006; Strojan *et al.*, 2000). Mit dem in dieser Arbeit erstellten ELISA kann die CSTB-Konzentration sowohl in Plasma als auch in Serum erfolgen. Es konnte kein Unterschied bei den CSTB-Bestimmungen zwischen diesen beiden Probenmaterialien festgestellt werden (Abb. 5.2.4-1). Mit einer Wiederfindungsrate von 97-106% und einer Intra-Assay-Varianz von maximal 3,1% und einer Inter-Assay-Varianz von maximal 7,9% ist dieser Assay auch wesentlich besser charakterisiert.

Die Etablierung des Sandwich-ELISA und die Charakterisierung seiner Leistungsparameter waren Grundlage für die Bestimmung der CSTB-Konzentrationen im Plasma von HCC-Patienten im Rahmen einer Pilotstudie.

5.2.1 BESTIMMUNG DER CSTB-KONZENTRATIONEN IM PLASMA VON HCC-PATIENTEN - ORIENTIERENDE STUDIE

Das hepatozelluläre Karzinom ist weltweit das fünft-häufigste Karzinom mit ca. 1 Millionen Todesfällen pro Jahr (Okuda *et al.*, 2000). Es entwickelt sich meist auf der Grundlage einer Leberzirrhose oder einer chronischen Hepatitis C. Erfolgt die Diagnose des Karzinoms bei einer Größe von weniger als 3 cm, können Patienten vollständig geheilt werden. Lee *et al.*, 2008 zeigten in einer cDNA-Microarray-Analyse bei einem Vergleich der Genexpression zwischen HCC-Tumorgewebe und gesundem Lebergewebe, dass von 248 untersuchten Genen 149 hauptsächlich im Tumorgewebe exprimiert werden. Zu den 20 Genen, deren Expression im Tumorgewebe am stärksten erhöht war, gehört CSTB. Der histologische Vergleich von gesundem Gewebe und Tumorgewebe zeigte eine deutlich erhöhte CSTB-Expression im Tumorgewebe. Mit einem CSTB-ELISA wurden die CSTB-Serumkonzentrationen von gesunden Probanden und Patienten mit einem HCC in unterschiedlichen Stadien verglichen (Lee *et al.*, 2008). Die CSTB-Konzentrationen waren bei den HCC-Patienten signifikant erhöht.

Mit dem in dieser Arbeit etablierten HCC-Assay sollte eine primäre Abschätzung bezüglich der Verwendbarkeit des Testes für die HCC-Diagnostik bzw. Leberdiagnostik erfolgen.

Mit Hilfe des Sandwich-ELISA wurde die Bestimmung der CSTB-Konzentration im Plasma von 45 gesunden Probanden und 32 HCC-Patienten durchgeführt. Die ermittelten Daten zu den CSTB-Konzentrationen (Tab. 4.2.5.-1 und Tab. 4.2.5.-2) im Plasma bestätigen die von Lee und Mitarbeitern (2008) erhobenen Befunde. Es wurde ein signifikanter ($p= 0,000003$) Unterschied zwischen den CSTB-Plasma-Konzentrationen der gesunden Kontrollgruppe und der HCC-Patienten nachgewiesen. In Abbildung 5.2.1.-1 sind die ermittelten CSTB-Konzentrationen in einem Boxplot zusammengefasst dargestellt. Für die gesunden Probanden liegt der Median der CSTB-Plasma-Konzentrationen bei 0,49 ng/mL und ist damit niedriger als der von Lee *et al.*, 2008 publizierte Median von 3,3 ng/mL. Der Median, welcher von der Gruppe um Lee ermittelt wurde, setzt sich aus den CSTB-Plasma-Konzentrationen von zwei Gruppen (gesunde Probanden und Patienten mit nicht zirrhotischer, chronischer Hepatitis) zusammen. Diese Gruppen zeigten bezüglich der CSTB-Konzentrationen keinen signifikanten Unterschied ($p= 0,8325$) und lagen in einem Bereich von 0,8 - 23,4 ng/mL. Die Gruppe um Kos *et al.*, 2000 publizierte einen Median von 1,7 ng/mL bei 95 gesunden Probanden mit CSTB-Konzentrationen in einem Bereich von 0,6 - 58 ng/mL. Auf Grund der niedrigeren Nachweisgrenze des hier etablierten Sandwich-ELISA fließen niedrigere CSTB-Konzentrationen mit in die Berechnung ein. Alter und Geschlecht der Probanden korrelieren nicht mit der CSTB-Konzentration im Blut (Kos *et al.*, 2000).

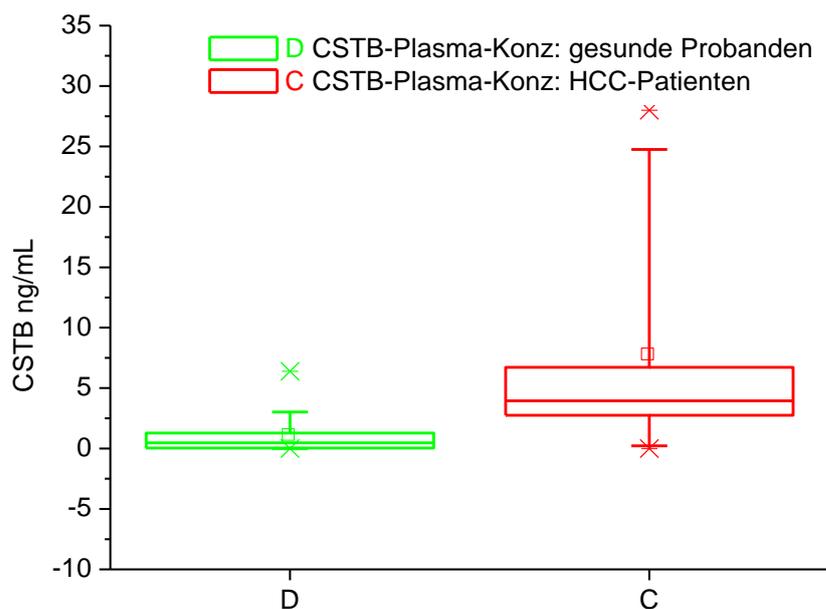


Abb. 5.2.1-1: Boxplot der CSTB-Plasmakonzentrationen von gesunden Probanden (D) und HCC-Patienten (C). Die CSTB-Konzentrationen wurden mit dem Sandwich-ELISA ermittelt. Die Boxen umfassen die mittleren 50% aller bestimmten CSTB-Konzentrationen. Der waagerechte Strich innerhalb einer Box entspricht dem Median - die kleineren Rechtecke zeigen die Mittelwerte für D = 0,9 ng/mL und C = 7,7 ng/mL. Die Whiskers geben die Bereiche der übrigen CSTB-Konzentrationen an.

Der Median der CSTB-Plasma-Konzentrationen der hier untersuchten 32 HCC-Patienten lag bei 3,9 ng/mL, im Bereich von 0-28 ng/mL. 10,8 ng/mL (1,6 - 142,5) CSTB im Serum ist der von Lee *et al.*, 2008 angegebene Median. Neben der bereits erwähnten niedrigeren Nachweisgrenze des Sandwich-ELISA könnten bei den einzelnen Patienten auch verschiedene Tumorstadien (z.B. Tumorgröße, Metastasierung) und Tumoreigenschaften zu einer unterschiedlich hohen CSTB-Konzentration im Blut führen. Lee fand, dass bei HCC-Patienten mit einer großen inoperablen Tumormasse oder bei metastasierten Tumoren mit vaskulärer Invasion eine erhöhte CSTB-Expression im Tumorgewebe und eine signifikant höhere CSTB-Konzentration im Serum nachzuweisen waren.

Im Vergleich mit gesundem Lungengewebe zeigten Untersuchungen zur CSTB-Konzentration im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom ebenfalls eine erhöhte CSTB-Expression im Tumorgewebe. Untersuchungen zur prognostischen Relevanz von

Cystatin A und B deuten daraufhin, dass hohe Konzentrationen von CSTB und CSTA im Tumorgewebe die proteolytische Aktivität der Cystein-Cathepsine unterdrücken und zu einer verbesserten Prognose für den Patienten führen. Die Typ 1-Cystatine werden deshalb beim Bronchialkarzinom als mögliche *Tumorsuppressoren* betrachtet (Werle *et al.*, 2006).

Andererseits wird diskutiert, dass die Cystatine durch ihre verstärkte Expression die an der Apoptose beteiligten Cathepsine in der Zelle blockieren, die Apoptose der maligne transformierten Zellen damit verhindern und so zu einer erhöhten Aggressivität des Tumors beitragen (Kuopio *et al.*, 1998). Diese Befunde spiegeln die unterschiedlichen Funktionen der Cystatine als potentielle Tumorsuppressoren und Tumorpromotoren in der Tumorbilogie wieder. Die Gruppe um Yang *et al.*, 2010, zeigte, dass CSTB eine Rolle bei der Rezeptor-vermittelten Apoptose spielt. CSTB soll als endogener Inhibitor der TRAIL-induzierten Apoptose in Melanomzellen agieren. Es schützt diese Zellen vor der Apoptose durch die Stabilisierung von FLIP_L (FLICE-inhibierendes Protein) und verhindert so dessen Abbau durch die E3-Ligase Itch.

Nach Untersuchungen von Kos und Mitarbeitern an 345 Seren von Darmkrebs-Patienten korreliert die CSTB-Konzentration mit den Dukes-Stadien. Im Stadium A wurde ein Median der CSTB-Konzentrationen von 0,8 ng/mL ermittelt, im Stadium D ein Median von 1,7 ng/mL (Kos *et al.*, 2000).

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Plasmen stammten ausschließlich von Patienten, deren Tumorstadium sich außerhalb der MILAN-Kriterien befanden (Mazzaferro *et al.*, 1996). Sie hatten alle ein hepatozelluläres Karzinom, welches größer als 3 cm und deshalb mit einer schlechten Prognose verbunden war. Der Median der CSTB-Konzentrationen dieser Gruppe lag um den Faktor sieben höher als der Median der gesunden Probanden. Dies entspricht den von Kos *et al.*, 2000 erhobenen Befunden, bei denen ein hoher Gehalt an CSTA, CSTB und CSTC in Körperflüssigkeiten mit einer schlechten Prognose für Krebspatienten (kolorektalen Karzinomen) korreliert war.

Unsere Befunde bezüglich der Plasmakonzentrationen von CSTB bestätigen die potenzielle Rolle von CSTB als Serummarker für das hepatozelluläre Karzinom und sind damit ein weiterer Hinweis darauf, dass CSTB als Biomarker für verschiedene Karzinome eine Rolle spielen könnte. Bei der Suche nach neuen Biomarkern für Blasenkrebs wurde

CSTB jetzt als potenzieller Urin- und Gewebe-Marker ermittelt. Die CSTB-Konzentration im Urin, welche mit Hilfe des semiquantitativen Western Blots ermittelt wurde, entspricht dem TCC-Grad (*Transitional cell carcinoma*). Im Vergleich zu anderen klinischen Markern zeigt CSTB eine höhere Signifikanz für das Auftreten eines Rezidivs und für den Progress der Erkrankung. Zusammenfassend kann beim Blasenkrebs gesagt werden, dass die CSTB-Expression im Blasenepithel und die CSTB-Konzentration im Urin positiv mit dem Tumorgrad korrelieren (Feldman *et al.*, 2009). Der in dieser Arbeit etablierte Sandwich-ELISA kann ebenfalls für die Bestimmung der CSTB-Konzentration im Urin eingesetzt werden. Die Isolierung von CSTB aus Urin konnte erfolgreich mit den generierten Antikörper durchgeführt werden (Abb. 4.1.10-1) und das isolierte Protein wurde durch Sequenzierung als CSTB bestätigt.

Dieser Sandwich-ELISA eignet sich auf der Basis der mit ihm bisher erzielten Ergebnisse für die Entwicklung eines *In vitro*-Diagnostikums, für dessen Etablierung allerdings noch weitere Charakterisierungen erforderlich sind. So sollte seine Robustheit der Methode, z.B. gegenüber Temperaturschwankungen, pH-Wert-Änderungen, etc. validiert werden. Die Bestimmung der diagnostischen Sensitivität, welche die Wahrscheinlichkeit eines richtig positiven Tests bei einer tatsächlich vorliegenden Erkrankung angibt, muss ebenfalls nocherfolgen. Desweiteren müssen die gesetzlichen Anforderungen für die Entwicklung eines *In vitro*-Diagnostikums erfüllt werden (Raem und Rauch 2007).

5.3 CSTB-POLYMERE UND CSTB-INTERAKTIONSPARTNER

Für die Identifizierung potenzieller CSTB-Interaktionspartner wurden Versuche mit dem *Yeast two-Hybrid* System durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten mit einer *Pre-transformed human brain MATCHMAKER cDNA library*. Es konnten mit diesem System keine Interaktionen nachgewiesen werden. Di Giaimo *et al.*, 2002 hat mit Hilfe einer *Adult rat cerebellum cDNA library* im *Yeast two-Hybrid* System als Interaktionspartner das Neurofilament *light*-Polypeptid, den Proteinkinase C-Rezeptor (RACK-1) und β -Spectrin identifiziert. Diese Befunde konnten nicht bestätigt werden, ebenso wie sie von der Gruppe von Kopitar-Jerala bezüglich der Interaktion von CSTB mit RACK-1 nicht bestätigt werden konnten (Kopitar-Jerala *et al.*, 2005).

Interessanterweise wurden in den Versuchen von Di Giaimo *et al.*, 2002, aber auch keine Interaktionen mit den Cathepsinen nachgewiesen, obwohl die cDNA der Cathepsine in der Bibliothek vorhanden war.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, durch ein schonendes Zellaufschlussverfahren, CSTB-Interaktionspartner durch Immunpräzipitation und SEC zu identifizieren. Für den Zellaufschluss wurde ein Extraktionspuffer gewählt, welcher die Aktivität der Cathepsine erhält (Foghsgraad *et al.*, 2001, Johansson *et al.*, 2003). Er enthielt DTT (Dithiothreitol), das aber bei verschiedenen Versuchsansätzen gegen das physiologische Reduktionsmittel GSH (reduziertes Glutathion) ausgetauscht wurde. Es sollte überprüft werden, ob die Verwendung dieser beiden Redoxmitteln bei der Zellyse und der anschließenden Immunpräzipitation zu unterschiedlichen Ergebnissen führt. Im Gegensatz zu DTT kommt GSH *in vivo* in Konzentrationen bis zu 12 mM in Säugerzellen vor (Dringen *et al.*, 2000). Die Funktionen von GSH in Zellen sind vielfältig. Hauptsächlich fungiert es als Redoxpartner und Antioxidans und sorgt u.a. dafür, dass die Sulfhydrylgruppen von Proteinen, z.B. die der Cystein-Cathepsine und von CSTB, im reduzierten Zustand vorliegen. GSH ist an der Aufrechterhaltung der nativen Konformation von Proteinen in der Zelle beteiligt. Im Wesentlichen ist es für die Aufrechterhaltung des intrazellulären Redoxstatus verantwortlich. Ein Vergleich der Redoxpotenziale beider Verbindungen zeigt, dass DTT ($E^\circ = -0,33$ V) im Vergleich zu GSH ($E^\circ = -0,1$ V) ein niedrigeres Potenzial besitzt.

In einer Konzentration von 5 mM hat DTT keinen Einfluss auf das Interaktions-/Polymerisationsverhalten von CSTB (Abb. 4.3.2-1). Dagegen wurde in Gegenwart von 5 mM GSH bei der Immunpräzipitation bei pH 5,0 kein CSTB vom Antikörper gebunden und konnte im Immunoblot CSTB nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.3.2-1).

Da in den Post-IP-Überständen ebenfalls kein CSTB gefunden wurde und der Kontrollansatz (Abb. 4.3.3-2) ohne Zellen zeigte, dass unter gleichen Bedingungen (5 mM GSH; pH 5,0) freies CSTB präzipitiert werden kann, ist anzunehmen, dass CSTB mit zellulären Proteinen in Gegenwart von GSH interagiert. Wichtig ist, dass durch den Kontrollansatz eine Konformationsänderung von CSTB, welche der Antikörper nicht

erkennt, ausgeschlossen wurde und eine Veränderung der Bindungs- bzw. Struktureigenschaften des Antikörpers in Gegenwart von 5 mM GSH offensichtlich nicht erfolgt. Die Unterschiede bei den CSTB-Präzipitation sind damit auf die Verwendung der unterschiedlichen Redoxmittel DTT und GSH beim Zellaufschluss zurückzuführen. Die zellulären Proteine bleiben vermutlich unter GSH während der Zellyse in der nativen Konformation. Eine mögliche Interaktion von CSTB mit zellulären Proteinen bleibt so erhalten.

In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die CSTB-Immunpräzipitation eine pH- und eine GSH-Konzentrations-Abhängigkeit zeigt. (Abb. 4.3.3-3, 4.3.3-4). Höhere GSH-Konzentrationen als 1 mM und pH-Werte von kleiner als 6,0 schaffen Bedingungen, unter denen kein freies CSTB nachweisbar ist und begünstigen offensichtlich die Bindung von CSTB an mögliche Komplexpartner oder eine Polymerisierung von CSTB.

Die Gegenwart von Glutathion bedeutet für CSTB, dass seine Thiolgruppe im reduzierten Zustand vorliegt und so die *aktive* Form des Proteins auch während der Zellyse erhalten bleibt. Aus diesem Grund wurde in Gegenwart von 5 mM GSH eine Größenausschlusschromatographie (SCE) durchgeführt, um mögliche CSTB-Komplexe und CSTB-Polymere im nativem Zustand unter schonenden und strukturerhaltenden Bedingungen nach den Molmassen zu trennen. Bei der Immunoblot-Analyse der einzelnen durch SEC getrennten Fraktionen (Abb. 4.3.2-7) wurden ca. 13 kDa große CSTB-Banden in Elutionsbereichen detektiert, welche nicht den V_e der einfachen Molmasse von ca. 13 kDa des Proteins entsprachen. Außerdem wurden Proteinbanden im Bereich von ca. 26 kDa, 38 kDa und 52 kDa vom anti-CSTB mAK I-2B detektiert. Diese Proteinbanden könnten CSTB-Polymeren entsprechen, welche in Gegenwart von 5 mM GSH zwischen pH 3 und pH 6,0 *in vivo* vorkommen.

Der in dieser Arbeit verwendete Begriff CSTB-Polymere umfasst sowohl CSTB-Homopolymere als auch die CSTB-Heteropolymere mit anderen Proteinen.

Das CSTB *in vitro* amyloide Fibrillen durch *Domain swapping* bilden kann, ist bekannt (Zerovnik et al., 2002). Ausgangsstrukturen für diese Fibrillen sind durch *Domain swapping* gebildete CSTB-Dimere, welche sich zu CSTB-Tetrameren zusammenlagern (Morgan et al., 2008). *In vivo* soll das Wachstum von CSTB-Polymeren durch eine Addition von

CSTB-Monomeren erfolgen und sich so von der *in vitro*-Polymerisierung unterscheiden. Die in der vorliegenden Arbeit im Immunoblot detektierten Banden, die vermutlich Polymeren entsprechen (Abb. 4.3.2.-7 und 4.3.2.-8) und in Gegenwart von 5 mM GSH auftraten, können sich nur durch Monomer-Addition gebildet haben, da die CSTB-Banden in einer Höhe von ca. 13 kDa und 38 kDa durch den mAK anti-CSTB I-2B nachgewiesen wurden. Diese detektierten CSTB-Polymere sind resistent gegen SDS-Denaturierung und gegen eine 5 mM GSH-Behandlung. Die Stabilität der *in vivo* auftretenden CSTB-Polymere gegen die SDS-Denaturierung wurde ebenfalls von Coppillini beobachtet. Sie stellten weiterhin fest, dass durch eine 8 M Harnstoffbehandlung keine Denaturierung der Polymere erfolgt. Sensitiv zeigten sich die Polymere gegenüber einer DTT-Behandlung und die Polymerstabilität wies ebenfalls eine Abhängigkeit von hohen GSH-Konzentrationen (20 mM) auf (Coppillini *et al.*, 2008).

In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen zur CSTB-Aggregation wurde in Gegenwart von 5 mM DTT keine CSTB-Polymerbildung beobachtet

5.3.1 INTERAKTION MIT CYSTEIN-CATHEPSINEN

Die in der SEC nach Molmasse getrennten Fraktionen, welche atypisch CSTB enthielten, wurden auch im Immunoblot auf das Vorhandensein der Cathepsine L und B überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass die Cathepsine B und L in den Fraktionen vorkamen, in denen auch CSTB nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.3-10 und Abb. 4.3-11). Dies ist ein Hinweis auf eine Interaktion von CSTB mit den beiden Proteasen in komplexen Zellhomogenaten, eine Interaktion, die bisher nur *in vitro* nachgewiesen werden konnte.

Die Identifizierung der nativen Komplexe aus CSTB und den Cathepsinen L oder B wurde mit Hilfe der nativen Fokussierung der gelchromatographisch nach Molmasse getrennten Proben durchgeführt. Es konnten Komplexe aus CSTB und Cathepsin L und Cathepsin B (Abb. 4.3-8) nachgewiesen werden, die offensichtlich *in vivo* existieren CSTB übernimmt außerhalb der Lysosomen eine Chaperon-Funktion und verhindert so den Verlust der Aktivität der Cathepsine und macht sie innerhalb der Zelle für andere Funktionen verfügbar.

Untersuchungen von Lehtinen zeigten, dass oxidativer Stress in Neuronen zu einer höheren Expression von CSTB führt. Es wird eine Schutzfunktion von CSTB vor

oxidativem Stress in cerebellaren Granula-Neuronen diskutiert. CSTB knock-out-Mäuse wiesen apoptotisch werdende cerebellare Granula-Neuronen auf, wenn sie oxidativem Stress ausgesetzt wurden (Lehtinen *et al.*, 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig die Interaktion von CSTB mit Procathepsin L im Kulturüberstand von UTC 8505C-Zellen durch Co-Immünpräzipitation nachgewiesen. In der Literatur wird die Interaktion zwischen CSTB und den reifen Cathepsinen diskutiert, eine Interaktion mit einem Pro-Cathepsin wurde bisher nicht beschrieben. Im extrazellulären Raum beschränkt sich damit die Funktion wahrscheinlich nicht nur auf die Funktion als Inhibitor. CSTB wirkt auch hier u.U. als funktionserhaltendes Chaperon.

5.4 ZYTOCHEMISCHER NACHWEIS VON CSTB

Durch zytochemischen Untersuchungen konnte an der anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzelllinie UTC 8505C gezeigt werden, dass alle CSTB-Antikörper zytoskelettartige Strukturen anfärbten. Diese Strukturen zeigen eine geordnete Verteilung von CSTB im Zytosol dieser Zelllinie.

Die CSTB-Expression wurde an weiteren Schilddrüsenkarzinomzelllinien geprüft und es zeigte sich, dass diese Zytoskelettstrukturen nicht mit der Herkunft der Zelllinie und damit vom Malignitätsgrad der den Zelllinien zu Grunde liegenden Karzinome in Verbindung gebracht werden kann.

Zytoskelettstrukturen könnten sowohl auf die Bildung von CSTB-Homopolymeren als auch auf die Bildung von Heteropolymeren mit Zytoskelettproteinen zurückzuführen sein (Di Giaimo *et al.*, 2002; Cipollini *et al.*, 2008).

Die Interaktion von CSTB mit Cathepsin L im zytoplasmatischen Raum konnte durch die Co-Lokalisation von CSTB und Cathepsin L nachgewiesen werden (Abb. 4.4.-6, Abb. 4.4.-7). Sie bestätigte so die mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung gezeigten Interaktionen mit Cathepsin L.

Eine Co-Lokalisation von Cathepsin L und CSTB konnte auch im Zellkern nachgewiesen werden. Dieser Befund weist auf bisher nicht bekannte Funktionen von CSTB in der Zelle hin und könnte die Grundlage für weitere Untersuchungen zur direkten oder indirekten Beteiligung von CSTB an der Apoptose sein. Die Gruppe um Ceru konnte

2010 diese Co-Lokalisation bestätigen. Sie fand, dass CSTB mit Histonen und Cathepsin L im Zellkern interagiert und so zur Regulation des Zellzyklus während der S-Phase beiträgt. CSTB übernimmt dabei die Regulation der Aktivität von Cathepsin L und ist damit Protektor für verschiedene Transkriptionsfaktoren, die vor ihrem proteolytischen Abbau geschützt werden (Ceru *et al.*, 2010).

6 ZUSAMMENFASSUNG

Cystatin B ist ein endogener Proteinaseinhibitor der Typ 1-Cystatine. Bekannt ist, dass CSTB verschiedene Cysteinproteinasen der Papainfamilie durch eine nicht-kovalente, reversible Bindung *in vitro* hemmt. Mutationen im CSTB-Gen sind verantwortlich für die progressive myoklonische Epilepsie (EPM1) und führen zu einer verringerten Expression von Cystatin B. Die Merkmale dieser Erkrankung ordnen die EPM1 den neurodegenerativen Erkrankungen zu. Das Protein CSTB ist gut charakterisiert, seine direkte oder indirekte Beteiligung an physiologischen Prozessen ist aber weitgehend unbekannt (Joensuu *et al.*, 2008) In der Literatur werden z.B. unterschiedliche Funktionen in der Tumorbilogie diskutiert, Funktionen die wesentlich für die Ausprägung der Charakteristika maligner Tumoren sind, die sich aber nicht nur auf seine Rolle als Inhibitor zu beschränken scheinen.

Für weiterführende Untersuchungen zur Funktionsaufklärung von CSTB auf Proteinebene wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit 6 hochspezifische monoklonale Antikörper gegen CSTB generiert. Diese wurde nach einer modifizierten Variante der Methode von Milstein und Köhler entwickelt.

Im ersten Teil wurden die monoklonalen Antikörper gegen CSTB charakterisiert. Wesentlich dabei war, dass die Antikörper kreuzreaktionsfrei gegenüber Cystatin A sein mussten. Cystatin B hat zu Cystatin A eine 54%-ige AS-Identität und eine 80%-ige AS-Homologie. Aus diesem Grund war das Screening von ca. 4000 Klonen notwendig. Die spezifische Reaktion der Antikörper mit CSTB wurde u.a. durch die Identifizierung ihrer Epitope im CSTB bestätigt. Es konnten für 3 anti-CSTB-mAK I-2B, I-4H und II-12D die Epitope gefunden werden. Für die Antikörper anti-CSTB-mAK I-4G, II-1H und II-5 konnten mit dem 13mer Peptid-Spot-Blot keine Epitope bestimmt werden. Möglicherweise erkennen sie Konformationsepitope.

Die Bestimmung der Bindungskonstanten von ausgewählten Antikörpern mit Hilfe der Quarzmikrowaage bestätigte die affine Bindung der Antikörper an CSTB. Dabei zeigte sich, dass die QCM-Technik eine Methode darstellt, die sich gut zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Antigenen und Antikörpern eignet.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde mit Hilfe der gereinigten Antikörper ein quantitativer Sandwich-ELISA entwickelt, welcher für die Bestimmung von CSTB im Plasma von Karzinom-Patienten genutzt werden soll. Dafür war es notwendig, Antikörperpaare zu ermitteln, die eine sensitive Bestimmung von CSTB ermöglichen. Die Antikörper II-12D als *Capture*-Antikörper und der I-2B als Detektor-Antikörper erwiesen sich als das effektivste Antikörper-Paar für die Bindung von CSTB. Die Standardkurve ermöglichte im linearen Teil einen Nachweis von CSTB im Plasma von 0,11 ng/mL bis 8 ng/mL CSTB.

Als Nachweis für die Eignung des entwickelten Sandwich-ELISA zur CSTB-Bestimmung im Plasma wurde eine Pilotstudie mit 45 Plasmaproben von gesunden Probanden und 32 Proben von HCC-Patienten durchgeführt. Es wurde ein signifikanter ($p = 0,000003$) Unterschied zwischen den CSTB-Plasmakonzentrationen von gesunden und HCC-Probanden gefunden. Der Median der CSTB-Konzentrationen der gesunden Probanden liegt bei 0,49 ng/mL und der der HCC-Patienten bei 3,9 ng/mL.

Der in dieser Arbeit etablierte Sandwich-ELISA ist sensitiver im Nachweis von CSTB als der in der Literatur beschriebene ELISA. Die niedrigere CSTB-Nachweisgrenze ermöglicht die Ermittlung von bisher nicht bestimmbareren CSTB-Konzentrationen.

Der etablierte Sandwich-ELISA ist für die Bestimmung der CSTB-Konzentrationen bei HCC-Patienten geeignet. Für die Zulassung des Sandwich-ELISA als In vitro-Diagnostikum müssen aber weitere Studien durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurden nur Plasmen von Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom außerhalb der Milan-Kriterien eingesetzt.

Im dritten Teil der Arbeit wurde versucht mit den anti-CSTB-mAK CSTB-Strukturen höherer Ordnung nachzuweisen. Auf zytochemischer Ebene konnte gezeigt werden, dass die CSTB-mAK in drei – in sich ihrem malignen Potential unterscheidenden – Schilddrüsenkarzinomzelllinien vergleichbare Strukturen anfärben, die auf eine Interaktion von CSTB mit Zytoskelettproteinen hinweisen.

Die Interaktion von CSTB mit Cathepsin L konnte durch Co-Lokalisation und Co-Präzipitation nachgewiesen werden. Erstmals konnte durch eine Co-Immunpräzipitation auch die Interaktion zwischen Pro-Cathepsin L und CSTB im Kulturüberstand der Karzinomzelllinie UTC 8505C demonstriert werden. Für die Suche nach weiteren

Interaktionspartnern von CSTB wurde ein schonendes Zellaufschlussverfahren in Gegenwart von 5 mM GSH entwickelt. Unter diesen Bedingungen mit - 5 mM GSH - wurde auch eine SEC durchgeführt. In der anschließenden nativen Fokussierung konnte die Interaktion von Cathepsin B und Cathepsin L mit CSTB nachgewiesen werden. Die Verwendung von GSH als natürliches Redoxmittel während des Zellaufschlusses und der SEC deutet daraufhin, dass die Aufrechterhaltung des zellulären Milieus in Bezug auf die Struktur des Redoxmittels eine wesentliche Bedingung bei der Identifizierung von Komplexpartnern von SH-sensitiven Proteinen ist.

Die generierten und charakterisierten anti-CSTB-mAK haben sich in ersten Versuchen als spezifische und sensitive Tools bewährt und stehen für weitere Aufgaben für die Aufklärung der biologischen Bedeutung von CSTB und der Cystein-Cathepsine zur Verfügung. Sie könnten außerdem in der Krebsdiagnostik für die Bestimmung von CSTB als Marker genutzt werden - wie zum Beispiel beim Blasenkarzinom.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abrahamson, M., Barret, A. J., Salvesen, G. and Grubb, A 1986. Isolation of six cysteine proteinase inhibitors from human urine. Their physicochemical and enzyme kinetic properties and concentration in biological fluids. *JBC* **261**: 11282-11289.
- Anderluh, G., Gutierrez-Aguirre, I., Rabzelj, S., Ceru, S., Kopitar-Jerala, N., Macek, P., Turk, V. and Zervonik, E., 2005. Interaction of human stefin B in the prefibrillar oligomeric form membranes. Correlation with cellular toxicity. *FEBS J***272**: 3042-3051.
- Alakurtti, K., Virtaneva, K., Joensuu, T., Palvimo, J. J., Lehesjoki, A. E., 2000. Characterization of the cystatin B gene promoter harboring the dodecamer repeat expanded in progressive myoclonus epilepsy, EPM1. *Gene* **242**: 65–73.
- Alakurtti, K., Weber, E., Rinne, R., Theil, G., Haan, G. J., Lindhout, D., Salmikangas, P., Saukko, P., Lahtinen, U., Lehesjoki, A. E. 2005. Loss of lysosomal association of cystatin B proteins representing progressive myoclonus epilepsy, EPM1, mutations. *Eur J Hum Genet* **13**: 208-215.
- Andreasen, P. A., Egelund, R., Petersen, H. H., 2000. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion and metastasis. *Cell Mol Life Sci* **57**: 25-40.
- Blake, C. C., Serpell, L. C., Sunde, M., Sandgren, O., Lundgren, E., 1996. A molecular model of the amyloid fibril. *Ciba Found Symp* **199**: 40-46.
- Altenhofer, P., Schierhorn, A., Fricke, B., 2006. Agarose isoelectric focusing can improve resolution of membrane proteins in the two-dimensional electrophoresis of bacterial proteins. *Electrophoresis* **20**: 3919–4123.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Barret, A. J. and Kirschke, H. 1981. Cathepsin B, cathepsin H and cathepsin L. *Methods Enzymol* **80**: 535-561.
- Barret, A. J., Fritz, H., Grubb, A., Isemura, S., Järvinen, M., Katunuma, N., Machleidt, W., Muller-Esterl, W., Sasaki, M. and Turk, V. 1986. Nomenclature and classification of proteins homologous with the cysteine-proteinase inhibitor chicken cystatin. *BJ* **236**: 312.

- Barrett, A. J. 1986. The cystatins, a diverse superfamily of cysteine peptidase inhibitors *BBA*, **45**: 1363-1373.
- Barret, A. J., 1992. Cellular proteolysis. *Ann. NY Acad. Sci.* **674**: 1-15.
- Barret, A. J., Rawlings, N. D. & O'Brien, E. A. 2001. The MEROPS database as a protease information system. *J Struct Biol* **134**: 95-102.
- Brömme, D., Rinne, R., and Kirschke, H., 1991. Tight-binding inhibition of Cathepsin S by cystatins. *BBA*, **50**: 631-635.
- Ceru, S., Konjar, S., Maher, K., Repnik, U., Krizaj, I., Bencina, M., Renko, M., Nepveu, A., Zerovnik, E., Turk, B., Kopitar –Jerala, N., 2010. Stefin B interact with histones and cathepsin L in the nucleus. *JBC* **285**: 10078-10086.
- Cipollina, E., Ricco, M., Di Giaimo, R., Piazz, D., F., Pulice, G., Catania, S., Caldarelli, M., Santi, S., Melli, M., 2008. Cystatin B and its EPM1 mutants are polymeric and aggregate prone *in vivo*. *BBA* **1783**: 312-322.
- Di Giamo, R., Ricco, M., Santi, S., Galeotti, C., Ambrosetti, D. C. and Melli, M. 2002. New insights into the molecular basis of progressive myoclonus epilepsy (EPM1): a multiprotein complex with Cystatin B. *Hum Mol Genet* **11**: 2941-2950.
- D'Amanto, E., Kokaia, Z., Nanobasihivil, A., et al., 2000. Seizure induced widespread up regulation of cystatin B, the gene mutated in progressive myoclonus epilepsy, in rat forebrain neurons. *Eur J Neurosci* **12**: 1687-1695.
- Dringen, R., 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol.* **62**: 649–671.
- Ekiel, I., & Abrahamson, M., 1996. Folding-related dimerization of human cystatin C. *JBC* **271**: 1314-1321.
- Fabien, N., Fusco, A., Santoro, M., Barbier, Y., Dubois, P. M, Paulin, C., 1994. Description of a human papillary thyroid carcinoma cell line. Morphologic study and expression of tumor markers. *Cancer* **73 (8)**: 2206-12.
- Felbor, U., Kessler, B., Mothes, W., Goebel, H. H., Ploegh H. L., Bronson, R. T., and Olsen, B. R., 2002. Neuronal loss and brain atrophy in mice lacking cathepsins B and L. *PNAS* **99 (12)**: 7883-7888.
- Feldman, A. S., Banyard, J., Wu, C.-L., McDougal, S., Zetter, B. R. 2009. Cystatin B as a

- tissue and urinary biomarker of bladder cancer recurrence and disease progression *Clin Cancer Res* **15** (3): 1024-1031.
- Foghsgraad, L., Wissing D., Mauch, D., Lademann, U., Bastholm, L., Boes, M., Elling F., Leist, M., Jäättellä, M., 2001. Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor *J Cell Biol* **153** (5): 999–10010.
- Gey, G. O., Coffman, W. D., Kubicek, M. T. 1952. Tissue culture studies of the proliferation capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research* **12**: 264-265.
- Glickman, J. N., and Kornfeld, S. 1993. Mannose 6-phosphate-independent targeting of lysosomal enzymes in I-cell disease B lymphoblasts. *J Cell Biol.* **123**: 199-108
- Green, G. D., Kembhavi, A. A., Davies, M. E. and Barret, A. J. 1984. Cystatin-like cysteine proteinase inhibitors from human liver. *BJ* **218**: 939-946.
- Goretzki, P. E., Frilling, A., Simon, D., Roehrer, H. D. 1990. Growth regulation of normal thyroids and thyroid tumors in man. *Recent Results Cancer Res* **118**: 48-63.
- Guo, Z., Eisenberg, D. 2006. Runaway domain swapping in amyloid-like fibrils of T7 endonuclease I. *PNAS* **103**: 8042-8047.
- Hengerer, A., Decker, J., Prohaska, E., Hauck, S., Köblinger, C., Wolf, H. 1999. Quartz crystal microbalance (QCM) as a device for the screening of phage libraries. *Biosens Bioelectron* **14**: 139-144.
- Hengerer, A., Kösslinger, C., Decker, J., Hauck, S., Queitsch, I., Wolf, H., Dübel, S. 1999. Determination of phage antibody affinities to antigen by a microbalance sensor system. *Bio Techniques* **26**: 956-964.
- Houseweart, M. K., Pennacchio, L. A., Vilaythong A., Peters, C., Noebels J. L., Myers R. M. 2003. Cathepsin B but not cathepsin L or S contributes to the pathogenesis of Unverricht-Lundborg progressive myoclonus epilepsy (EPM1). *J Neurobiol* **56**: 315-327.
- Heukeshoven, J. and Dernick, R. 1988. Improved silver staining procedure for fast staining in phast system development unit. I. staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* **9**: 28-32.
- Hashimoto, S., Suzuki, T., Dong, H. Y., Yamazaki, N., Matsushima, K. 1999. Serial

- analysis of gene expression in human monocytes and macrophages. *Blood* 94(3): 837-44.
- Höpfner, M. 2005. Untersuchung zur Anwendbarkeit der Quarzmikrowaage für pharmazeutisch analytische Fragestellungen. *Dissertation, MLU-Halle, Pharmazie*
- Järvinen, M., and Rinne, A. 1982. Human spleen cysteine protease inhibitor. Purification, fractionation into isoelectric variants and some properties of variants. *BBA* 708: 210-217.
- Ii, K., Ito, H., Kominami, A., Hirano, A. 1993. Abnormal distribution of cathepsin proteinases and endogenous inhibitors (cystatins) in the hippocampus of patients with Alzheimer's disease, parkinsonism-dementia complex on Guam, and senile dementia and in the aged. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 423: 185-194.
- Ito, T., Seyama, T., Hayashi, Y., Hayashi, T., Dohi, K., Mizuno, T., Iwamoto, K. S., Tsuyama, N., Nakamura, N., Akiyama, M. 1994. Establishment of two human thyroid carcinoma cell lines (8305C, 8505C) bearing p53 gene mutations. *Int J Oncol* 4: 583-586.
- Jenko, S., Skarabot, M., Kenig, M., Guncar, G., Musevic, I., Turk, D., Zerovnik, E. 2004. Different propensity to form amyloid fibrils by two homologous proteins- human stefin A and B: searching for an explanation. *Proteins* 55: 417-425.
- Johansson, A.-C., Steen, H., Öllinger, K. and Roberg, K. 2003. Cathepsin D mediates cytochrome c release and caspase activation in human fibroblast apoptosis induced by staurosporine. *Cell Death and Differentiation* 10: 1253-1259.
- Joyce, J. A. and Hanahan, D. 2004. Multiple roles for cysteine cathepsins in cancer. *Cell cycle* 5: 1516-1519
- Jones, B., Roberts, P. J., Faubion, W. A., Kominami, E., and Gores, G. J.** 1998. Cystatin A expression reduces bile salt-induced apoptosis in a rat hepatoma cell line. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 275: G723-G730.
- Jones, C., Mackay, A., Grigoriadis, A., Cossu, A., Reis-Filho, J. S., Fulford, L., Dexter, T., Davies S., Blumer, K., Ford, E., Parry, S., Budroni, M., Palmieri, G., Neville, A., M., O'Hare M. J., and Lakhani, S. R. 2004. Expression profiling of purified normal human luminal and myoepithelial breast cells: identification of novel prognostic markers for breast cancer. *Cancer Research* 64: 3037-3045.
- Joensuu, T., Kuronen, M., Alakurtti, K., Tegelberg, S., Hakala, P., Aalto, A., Huopaniemi,

- L., Aula. N., Michellucci, R., Eriksson, K., Lehesjoki, A. E. 2007. Cystatin B: mutation detection, alternative splicing and expression in progressive myoclonus epilepsy of Unverricht-Lundborg type (EPM1) patients. *Eur J Hum Genet* **15**: 185–193.
- Joensuu, T., Lehesjoki, A. L., Kopra, O. 2008. Molecular background of EPM1-Unverricht-Lundborg disease. *Epilepsia* **49(4)**: 557-563.
- Kagitani-Shimono, K., Imai, K., Okamoto, N., Ono, J., and Okada, S. 2002. Unverricht-Lundborg disease with cystatin B gene abnormalities. *Pediatr Neurol* **26**: 55–60.
- Kearney J. F., Radbruch A., Liesegang, B., Rajewsky K. 1979. New mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody secreting hybrid cell-lines. *Jl* **123 (4)**: 1548-1550
- Keppler, D. 2006. Towards novel anti-cancer strategies based on cystatin function. *Cancer Letters* **235**: 159-176.
- Klose, A., Wilbrand-Hennes, A., Zigrino, P., Weber, E., Krieg, T., Mauch, C., Hunzelmann, N. 2006. Contact of high-invasive, but not low-invasive melanoma cells to native collagen I induces the release of mature cathepsin B. *Int J Cancer* **118**: 2735-2743.
- Kokalj, S. J., Guncar, G., Stern, I., Morgan, G., Rabzelj, S., Kenig, M., Staniforth, R. A., Waltho, J. P., Žerovnik, E., Turk, D. 2007. Essential role of proline isomerization in stefin B tetramer formation. *J Mol Biol* **366**: 1569-1579.
- Kolwijck, E., Kos J., Obermajer, N., Span P. N., Thomas, C. M. G., Massuger, L. F. A. G., Sweep, F. C. G. J. 2010. The balance between extracellular cathepsins and cystatin C is of importance for ovarian cancer. *ESCI* **40**: 591-599.
- Kopitar-Jerala, N., Schweiger, A., Myers R. M., Turk, V., Turk, B. 2005. Sensitization of stefin B-deficient thymocytes towards staurosporin-induced apoptosis is independent of cysteine cathepsins. *FEBS Letters* **579**: 2149-2155.
- Kopitar-Jerala, N. 2006 The role of cystatins in cells of immune systems. *FEBS Lett* **580**: 6295-6301.
- Kornfeld, S. 1992. Structure and Function of the Mannose 6-Phosphate/Insulin-like Growth Factor II Receptors. *Ann Review of Biochemistry* **61**: 307-330
- Köhler, G., Milstein, C. 1975. Continuous culture of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature* **56**: 495-497.

- Kos, J., Lah, T. T. 1998. Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in cancer (review). *Oncol Rep* **5**: 1349-1361.
- Kos, J., Smid, A., Krasovec, M., Svetic, B., Lenarcic, B., Vrhovec, I., Skrk, J., Turk, V. 1995. Lysosomal proteases cathepsins D, B, H, L and their inhibitors stefins A and B in head and neck cancer. *Biol Chem Hoppe Seyler* **376**: 401-405.
- Kos, J., Werle, B., Lah, T. T., Brunner, N. 2000. Cysteine proteinases and their inhibitors in extracellular fluids: Markers for diagnosis and prognosis in cancer. *Int J Biol Markers* **15**: 84-89.
- Kuopio, T., Kankaanranta, A., Jalava, P., Kronqvist, P., Kotkansalo, T., Weber, E., Collan, Y. 1998. Cysteine proteinase inhibitor cystatin A in breast cancer. *Cancer Res* **58**: 58432-436.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophages T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lafreniere, R. G., Rochefort, D. L., Chrétien, N., Rommens, J. M., Cochius, I., Kälviäinen, R., Nousiainen, U., Patry, G., Farrell, K., Söderfeldt, B. Federico, A. Bradford, R., et al. 1997. Unstable insertion in the 5' flanking region of the cystatin B gene is the most common mutation in progressive myoclonus epilepsy type 1, EPM1. *Nat Genet* **15**: 298-302.
- Lah, T. T., Kos, J., Blejec, A., Frkovic-Georgio, S., Golouh, R., Vrhovec, I. I., Turk, V., 1997. The expression of lysosomal proteases and their inhibitors in breast cancer: possible relationship to prognosis of the disease. *Pathol Oncol Res* **3**: 89-99.
- Lah, T. T., Obermajer, N., Dúran, A., M. B., Kos, J. 2008. Cysteine cathepsins and cystatins as cancer biomarkers, in Edwards D, Hoyer-Hansen G, Blasi F, et al (eds) *The cancer degradome: Protease and Cancer Biology*. New York Springer Verlag, 578-626.
- Lalioti, M. D., Mirotsoy, M., Buresi, C., Peitsch, M. C., Rossier, C., Ouazzani, R., Baldy-Moulinier, M., Bottani, A., Malafosse, A., Antonarakis S. E. 1997a. Identification of mutations in the cystatin B, the gene responsible for the Unverricht-Lundborg type of progressive myoclonus epilepsy (EPM1). *Am J Hum Genet* **60**: 342-351.
- Lalioti, M. D., Scott, H. S., Buresi, C., Rossier, C., Bottani, A., Morris, M. A., Malafosse, A., Antonarakis, S. E. 1997b. Dodecamer repeat expansion in cystatin B gene in progressive myoclonus epilepsy. *Nature* **386**: 847-851.

- Lee, M.-J., Yu, G.-R., Park, S.-H., Cho, B.-H., Ahn, J.-S., Park, H.-J., Song, E.-Y., Kim, D.-G. 2008. Identification of cystatin B as a potential serum marker in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* **14** (4): 1080-1089.
- Lenarcic, B., Krizaj, I., Zunec, P. and Turk, V. 1996. Differences in specificity for interaction of stefin A, B and D with cysteine proteinases. *FEBS Lett* **395**: 113-118.
- Leist, M. und Jäättelä, M. 2001. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**: 589-598.
- Lehesjoki, A. E., Koskiniemi, M., Sistonen, P., Miao, J., Hastbacka, J., Norio, R., de la Chapelle, A. 1991. Localization of a gene for progressive myoclonus epilepsy to chromosome 21q22. *PNAS* **88**: 3696–3699.
- Lehesjoki, A. E., 2003. Molecular background of progressive myoclonus epilepsy. *EMBO J*. **22**: 3473-3478.
- Lehtinen, M. K., Tegelberg, S., Schipper, H., Su, H., Zukor, H., Manninen, O., Kopra, O., Joensuu, T., Hakala, P., Bonni, A., Lehesjoki, A. E. 2009. Cystatin B deficiency sensitizes neurons to oxidative stress in progressive myoclonus epilepsy, EPM1. *J Neurosci* **29**: 5910-5.
- Luciano-Montalvo, C., Ciborowski, P., Duan, F., Gendelman, H. E., Meléndez, L. M., 2008. Proteomic analyses associate cystatin B with restricted HIV-1 replication in placental macrophages. *Placenta* **29**: 1016-1023.
- Luciano-Montalvo, C., and Meléndez, L. M. 2009. Cystatin B associates with signal transducer and activator of transcription 1 in monocyte-derived and placental macrophages. *Placenta*. **30(5)**: 464–467.
- Machleidt, W., Thiele, U., Assfalg-Machleidt, I., Froger, D. and Auerswald, E. A. 1991. Molecular mechanism of inhibition of cysteine proteinases by their protein inhibitors: kinetic studies with natural and recombinant variants of cystatins and stefins. *BBA*, **50**: 613-620.
- Mazzaferro, V., Regalia, E., Doci, R., Andreola, S., Pulvirenti, A., Bozzetti, F., Montalto, F., Ammatuna, M., Morabito, A., Gennari, L. 1996. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med*. **14**:334(11): 693-9.
- Mirtti, T., Alanen, K., Kallajoki, M., Rinne, A., Soderstrom, K. O. 2003. Expression of cystatins, high molecular weight cytokeratin, and proliferation markers in prostatic adenocarcinoma and hyperplasia. *Prostate* **54**: 290-8.

- Morgan, G. J., Giannini, S., Hounslow, A. M., Craven, C. J., Zerovnik, E., Turk, V., Waltho, J. P., Staniforth, R. A. 2008. Exclusion of the native α -helix from the amyloid fibrile of a mixed α/β protein. *J. Mol. Biol.* **375**: 487-498.
- Nilsson, K. and Mosbach, K. 1987. Affinity purification of natural ligands. *Biochemistry* **102**: 449-457.
- Okuda, K., 2000. Hepatocellular carcinoma *J Hepatol*, **32**: 225-237.
- Pennacchio, L. A. Lehesjoki, A. E., Stone, N. E., Willour, V. L., Virtaneva, K., Miao, J., Amato, E. D. *et al.* 1996. Mutations in the gene encoding cystatin B in progressive myoclonus epilepsy (EPM1). *Science* **271**: 1731-1734.
- Pennacchio, L. A, Bouley, D. M., Higgins, K. M., Scott, M. P., Noebels, J. L. and Myers, R. M. 1998. Progressive ataxia, myoclonic epilepsy and cerebellar apoptosis in cystatin B-deficient mice. *Nat Genet* **20**: 251-258.
- Di Piazza, M., Mader, C., Geletneky, K., Herrero Calle, M., Weber, E., Schlehofer, J. R., Deleu, L., Rommelaere, J. 2007. Cytosolic activation of cathepsins mediates parvovirus H-1-induced killing of cisplatin and TRAIL-resistant glioma cells. *J Virol* **81**: 4186–4198.
- Pisoni, R. L., Acker, T. L., Lisowski, K. M., Lemons, R. M., Thoene, J. G. 1990. A cysteine-specific lysosomal transport system provides a major route for the delivery of thiol to human fibroblast lysosomes: possible role in supporting lysosomal proteolysis. *JCB* **110**: 327-35.
- Pol, E., Björk, I. 2001. Role of the single cysteine residue, Cys 3, of human and bovine cystatin B (stefin B) in the inhibition of cysteine proteinases. *Protein Sci* **10**: 1729-1738.
- Raem, A. M., Rauch, P. 2007. Immunoassays. Spektrum Akademischer Verlag.
- Rawlings, N. D., Morton, F. R., Barret, A. J. 2006. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* **34**: D270-2.
- Rawlings, N. D. and Barret, A. J. 1990. Evolution of proteins of the cystatin superfamily. *J Mol Evol.* **30**: 60-71.
- Rawlings, N. D., Tolle, D. P, and Barrett A. J. 2004. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *JBC* **378**: 705–716.
- Ricco, M., Di Giaimo, R., Pianetti, S., Palmieri, P. P., Melli, M. and Santi, S. 2001. Nuclear

- localization of cystatin B, the cathepsin inhibitor implicated in myoclonus epilepsy (EPM1). *Exp Cell Res* **262**: 84-94.
- Rinne, A., Järvinen, M., Martikainen, J., Alavaikko, M., and Räsänen, O. 1981. Über das Vorkommen des epidermalen SH-Protease-Inhibitors im lymphatischen Gewebe. *Verb Anat Ges* **75**: 573-574.
- Rinne, R., Saukko, P., Järvinen, M., Lehesjoki, A. E. 2002. Reduced cystatin B activity correlates with enhanced cathepsin activity in progressive myoclonus epilepsy. *Ann Med* **34**: 380-385.
- Shi, G. P., Villadangos, J. A., Dranoff, G., Small, C., Gu, L., Haley, K. J., Riese, R., Ploegh H. L., and Chapmann, H. A. 1999. Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity* **10(2)**: 197-206.
- Shiraishi, T., Mori, M., Tanaka, S., Sugimachi, K., Akiyoshi, T. 1998. Identification of cystatin B in human esophageal carcinoma, using differential displays in which the gene expression is related to lymph-node metastasis. *Int J Cancer* **79**: 175-178.
- Strojan, P., Budihna, M., Smid, L., Svetic, B., Vrhovec, I., Kos, J., and Skrk, J. 2000. Prognostic significance of cysteine proteinases cathepsins B and L and their endogenous inhibitors stefins A and B in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical Cancer Research* **1052**: 1052–1062.
- Stoka, V., Turk, B., Turk, V. 2005. Lysosomal cysteine proteases: structural features and their role in apoptosis. *IUBMB Life* **57 (4-5)**: 347-353.
- Stoker, M., O'Neill, C., Berryman, S., Waxman, V. 1968. Anchorage and growth regulation in normal and virus-transformed cells. *IJC* **3**: 683–693,
- Stubbs, M. T., Laber, B., Huber, R., Jerala, R., Lenarcic, B., Turk, V. 1990. The refined 2.4 Å X-ray crystal structure of recombinant human stefin B in complex with cysteine proteinase papain: a novel type of proteinase interaction. *EMBO J* **9**: 1939-1947.
- Sloane, B. F., Yan, S., Podgorski, I., Linebaugh, B. E., Cher, M. L., Mai, J., Cavallo-Medved, D., Sameni, M., Dosescu, J., Moin, K. 2005. Cathepsin B and tumor proteolysis: contribution of the tumor microenvironment *Seminars in Cancer Biology* **15**: 149-157.
- Skoumal, M., Kolarz, G., Haberhauer, G., Woloszczuk, W., Hawa, G., Klingler, A. 2005. Osteoprotegerin and the receptor activator of NF-kappa B ligand in the serum and synovial fluid. A comparison of patients with longstanding rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Rheumatol Int*, **26**: 63-69.

- Skladal, P. 2003. Piezoelectric Quartz crystal sensors applied for bioanalytical assays and characterization of affinity interactions. *J. Brazil. Chem. Soc.* **14**: 491-502.
- Suzuki, T., Hashimoto, S., Toyoda, N., Nagai, S., Yamazaki, N., Dong, H.Y., Sakai, J., Yamashita, T., Nukiwa, T., Matsushima, K., 2000. Comprehensive gene expression profile of LPS-stimulated human monocytes by SAGE. *Blood* **96**: 2584-2591.
- Towbin, H. *et al.* 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS* **76**: 4350-4354.
- Trinkaš, M., Vranic, A., Dolenc, V. V., Lah, T. T. 2005. Cathepsins B and L and their inhibitors stefin B and cystatin C as markers for malignant progression of benign meningiomas. *Int J Biol Markers.* 20(1): 50-9.
- Troen, B. R. 2006. The regulation of cathepsin gene expression. *PNAS* **1068**: 165-172.
- Turk, V., Turk, B., Gunar, G., Turk, D., Kos, J. 2002. Lysosomal cathepsins: structure, role in antigen processing and presentation, and cancer. *Adv Enzyme Regul* **42**: 285-303.
- Turk, B., Turk, D., Turk, V. 2000 Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *BBA* **1477**: 98-111.
- Updyke, T. V. and Nicolson, G. L. 1984. Immunoaffinity isolation of membrane antigens with biotinylated monoclonal antibodies and immobilized streptavidin matrices. *J Immunol Meth* **73**: 83-95.
- Virtaneva, K. *et al.* 1997. Unstable minisatellite expansion causing recessively inherited myoclonus epilepsy, EPM1. *Nat Genet* **15**: 1247-1253.
- Weber, E., Günther, D., Laube, F., Wiederanders, B., Kirschke, H. 1994. Hybridoma cells producing antibodies to cathepsin L have greatly reduced potential for tumor growth. *J Cancer Res Clin Oncol* **120**: 564-567.
- Werle, B., Schanzenbächer, U., Turenssek, B., Lah, T. T., Ebert, E., Jülke, B., Ebert, W., Fiehn, W., Kayser, K., Spiess, E., Abrahamson, M., and Kos, J. 2006. Cystatins in non-small cell lung cancer: Tissue levels, localization and relation to prognosis. *Onocology Reports* **16**: 647-655.
- Zajc, I., Sever, N., Bervar, A., Lah, T. T. 2002. Expression of cysteine peptidase cathepsin L and its inhibitors stefins A and B in relation to tumorigenicity of breast cancer cell lines. *Cancer Letters* **187**: 185-190.

Zerovnik, E., Pompe-Novak, M., Skarabot, M., Ravnikar, M., Musevic, I., Turk, V. 2002.
Human stefin B readily forms amyloid fibrils in vitro. *BBA* **1594**: 1-5

Yang, F., Tay, K. H., Dong, L., Thorne, R. F., Jiang, C. C., Yang, E., Tseng, H. Y., Liu, H., Christopherson, R., Hersey, P., Zhang, X. D. 2010. Cystatin B inhibition of TRAIL-induced apoptosis is associated with the protection of FLIP (L) from degradation by the E3 ligase itch in human melanoma cells. *Cell Death Differ* 8: 1354-67.

8 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Dr. Ekkehard Weber bedanken, für das Ermöglichen dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe, für das ständige Interesse am Voranschreiten der Arbeit, die stetige Diskussionsbereitschaft, für das entgegen gebrachte Vertrauen und für die kollegiale Zusammenarbeit.

Prof. Ari Rinne danke ich für die Bereitstellung des humanen nativen Cystatin B.

Prof. Dr. Renate Ulbrich Hofmann für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit.

Frau Rita Medek möchte ich für die Unterstützung bei der Erlernung der Techniken zur Generierung monoklonaler Antikörper danken, sowie für das angenehme Arbeitsklima.

Frau Pia Altenhofer für die Unterstützung bei der Durchführung der nativen Fokussierung.

Besonderer Dank gilt meiner Familie, durch deren ständige Unterstützung das Anfertigen dieser Arbeit erst ermöglicht wurde.

9 ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt, die den angewandten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht und die Arbeit an keiner weiteren Universität eingereicht habe. Ich selbst habe mich noch nicht um einen Doktorgrad beworben.

Halle (Saale), den 1.10.2010

LEBENS LAUF**PERSÖNLICHE DATEN**

Name: Gerit Theil, geb. Bauerfeld
Geburtsdatum: 05.11.1975
Geburtsort: Querfurt
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder
Adresse: Merseburger Str. 89c
06268 Querfurt
(034771) 25190
E-Mail: Gerit-Bauerfeld@gmx.de

WERDEGANG

1989 -1994 Gymnasium Querfurt, Abitur

10.1994 - 06.1999 Diplomstudiengang für Biochemie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Diplomarbeit: Thema: „¹⁵N-Tracerstudien zum Einfluss von Ozon auf den
pflanzlichen Stickstoffstoffwechsel“
Umweltforschungszentrum (UFZ) Leipzig-Halle

Abschluss: Diplom-Biochemikerin (UNI)

09.1999 - 11.1999 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Umweltforschungs-
zentrum Leipzig-Halle, Sektion Chemische Ökotoxikologie,
Leipzig

12.1999 - 02.2001 Mutterschutz und Erziehungsjahr

03.2001 - 10.2004 wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe von
Dr. Weber, EU-Projekt: „Cystatin B in epilepsy“
Institut für Physiologische Chemie
Medizinische Fakultät
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

- 11.2004 - 02.2008 Beginn der Promotionsarbeit - in der Arbeitsgruppe von
Dr. Weber
Institut für Physiologische Chemie
Medizinische Fakultät
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Unterbrechung:
- 11.2005 - 11.2006 Mutterschutz und Erziehungsjahr
- seit 03.2008 wissenschaftliche Mitarbeiterin bei der GiLuPi-GmbH,
Potsdam;
Schwerpunkte: Isolierung von CTC durch einen Antikörper-
beschichteten Nanodetektor; CTC-Diagnostik

PUBLIKATIONEN

Weber, E., Kotzur, S., Medek, R., **Theil, G.** (2006): „Verfahren zur Konzentrierung von gelösten Stoffen“, Patentanmeldung 10 2006 032 176.6 (12. Juli 2006), Europäisches Patentamt München

Alakurtti K, Weber E, Rinne R, **Theil G**, Salmikangas P, Saukko P, Lahtinen U, & Lehesjoki A-E (2005). Cellular compartmentalisation of cystatin B and loss of lysosomal association of EPM1 mutant CSTB proteins. *Eur J Hum Gen* 2005; 13: 208 – 215.

Alakurtti K, Lahtinen U, Weber E, **Theil G**, Guo, D, Joensuu TH, Rinne R , Saukko P, Salmikangas P, Carpén O, Saarma M, Lehesjoki A-E (2002). Cellular Localization of the Cystatin B (CSTB) Protein Defective in Progressive Myoclonus Epilepsy, EPM1. American Soc. For Cell Biology Meeting, San Francisco, CA

Theil G, Medek R, Rinne A, & Weber E

Identification of binding partners of CSTB under physiological GSH concentrations in thyroid carcinoma cell lines. In preparation (for Biol, Chemistry)