

Facharbeit  
Aus dem Fach  
Biologie

Thema: Identifizierung therapeutisch interessanter Antikörper

Verfasser: Christina Schug  
Leistungskurs: 3B1  
Kursleiter: OStR M. Schefcsik  
Abgabetermin: 25.01.2008

Erzielte Note: .....

In Worten: .....

Erzielte Punkte: .....

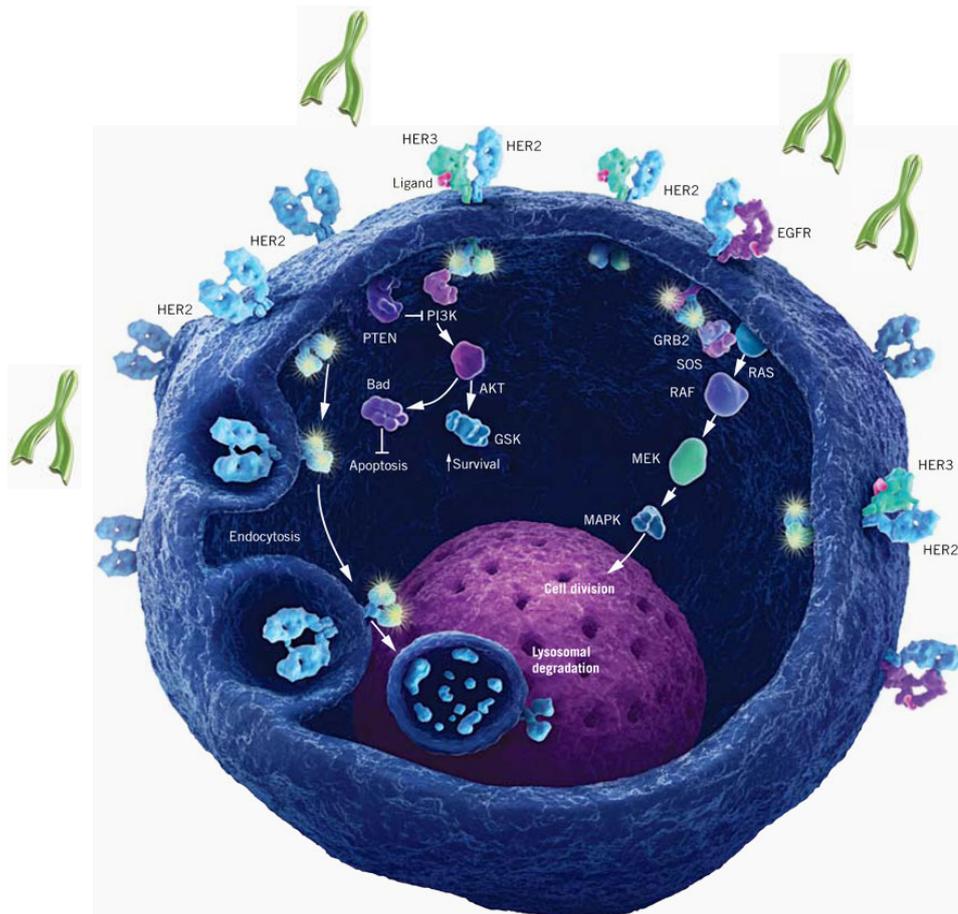
In Worten: .....

Abgabe beim Kollegstufenbetreuer am .....

.....

(Unterschrift des Kursleiters)

# Identifizierung therapeutisch interessanter Antikörper



Facharbeit von Christina Schug

## Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	-4-
2. KREBS.....	-4-
2.1. Krebsstatistik von Deutschland.....	-4-
2.2. Krebsentstehung und Eigenschaften einer Tumorzelle.....	-5-
3. SIGNALTRANSDUKTION.....	-7-
3.1. HER-Familie.....	-7-
3.2. HER-Rezeptoren und Krebstherapie.....	-9-
4. ANTIKÖRPER.....	-10-
4.1. Definition und Struktur.....	-10-
4.2. Antikörperklassen und Subklassen.....	-11-
4.2. Herstellung monoklonaler Antikörper.....	-13-
5. MATERIAL UND METHODEN.....	-16-
5.1. Material.....	-16-
5.2. Versuchsdurchführung.....	-17-
5.2.1. HERX1-ELISA.....	-17-
5.2.2. Primärscreening der Hybridomaüberstände.....	-18-
5.2.3. Sekundärscreening.....	-21-
5.2.4. Subklassenbestimmung.....	-22-
6. AUSWERTUNGEN UND ERGEBNISSE.....	-23-
6.1. Auswertung der Primärscreening Ergebnisse.....	-23-
6.2. Auswertung der Sekundärscreening Ergebnisse.....	-26-
6.3. Auswertung der Subklassenbestimmung.....	-29-
7. DISKUSSION.....	-30-
8. LITERATURVERZEICHNIS.....	-31-
9. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	-33-
10. DANKSAGUNG.....	-34-
11. ANHANG.....	-35-
11.1. ELISA-Ergebnisse.....	-35-
11.2. Bilder.....	-37-
11.3. CD mit Internetseiten.....	-38-

## **1. Einleitung**

Durch den gezielten Einsatz moderner molekularbiologischen Methoden werden die biochemischen Mechanismen der Tumorentstehung und –ausbreitung zunehmend besser erforscht. Dadurch erhöhen sich die Chancen, die bei Krebs außer Kontrolle geratenen Prozesse mit Arzneimittel therapeutisch zu beeinflussen.

Ein zweiwöchiges Praktikum bei dem Pharma Unternehmen Roche Diagnostics GmbH in der Pharmaforschung Abteilung TR-BAS gab mir die Möglichkeit einen Einblick in die Entwicklung therapeutischer Krebsmedikamente zu bekommen. Die Experimente meiner Facharbeit stellen die ersten Schritte zur Entwicklung monoklonaler Antikörper dar. Angriffspunkt ist dabei der HERX1 Zelloberflächenrezeptor. Ziel meiner Facharbeit war es Antikörper zu finden, die an den Rezeptor binden, die Signaltransduktion in der Zelle hemmen und somit das Wachstum des Tumors blockieren. Mit Hilfe des immunologischen Nachweisverfahren ELISA wurden die von Hybridomazellen sezernierten Antikörpermengen im Primär- und Sekundärscreening quantifiziert und die spezifische Bindung an den HERX1-Rezeptor bestimmt. Danach wurden die Subklassen und Isotypen der Antikörper identifiziert.

Die bei den Versuchen verwendeten Substanzen und Vorgänge sind unter Material und Methoden aufgeführt. Im theoretischen Teil wird die Erkrankung Krebs, die Signaltransduktion der HER-Rezeptoren, sowie die Antikörperstruktur und die Herstellung monoklonaler Antikörper vorgestellt.

## **2. Krebs**

### **2.1. Krebsstatistik von Deutschland**

Krebs ist nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Jährlich erkranken mehr als 400.000 Menschen neu daran. Davon sind jährlich 218.250 Männer und 206.000 Frauen betroffen.

Von allen Krebsarten ist bei Frauen mit 26,8 % das Mammakarzinom die häufigste Neuerkrankung. Bei Männern hingegen erkrankt ein prozentualer Anteil von 22,3 % an Prostatakrebs. Die zweithäufigste Neuerkrankung bei Männern, als auch bei Frauen, ist

der Darmkrebs. Die Weiteren Zahlen der Krebsneuerkrankungen und der jeweiligen Krebsart bei Mann und Frau sind der Abbildung 1 zu entnehmen.

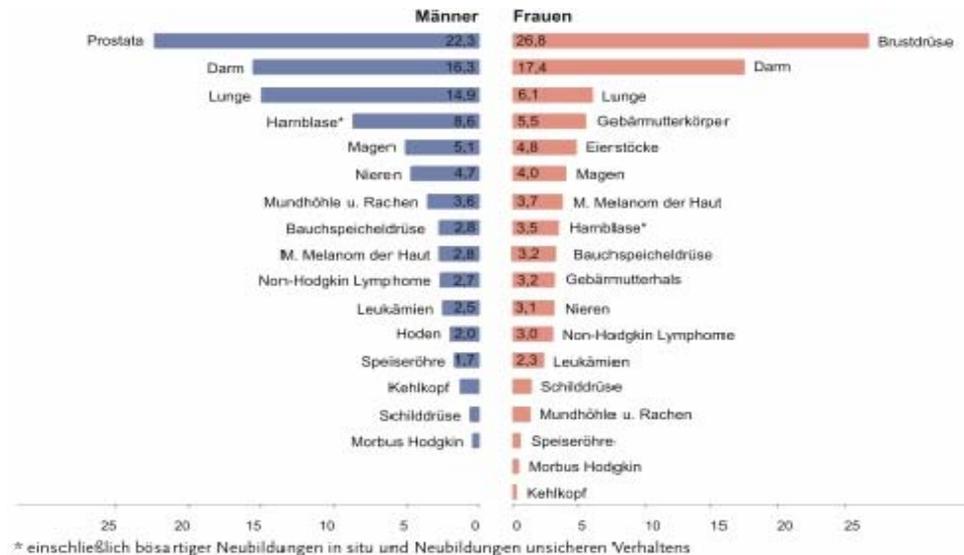


Abb. 1: Prozentualer Anteil ausgewählter Krebserkrankungen in Deutschland<sup>1</sup>

Obwohl es für die Krebstherapie inzwischen bessere Behandlungsmethoden gibt, wird die Zahl der Krebskranken dennoch weiter ansteigen.

Aufgrund der hohen Sterberate bei Krebs ist es immer noch eine Herausforderung für die Forschung neue Medikamente gegen Krebs zu entwickeln.

## 2.2. Krebsentstehung und Eigenschaften einer Tumorzelle

Die Krebsentstehung beruht auf DNA-Veränderungen, welche durch ionisierende Strahlen, chemische Carcinogene, somatische Mutationen, unter anderem aber auch durch Zigarettenkonsum, Adipositas, erhöhtem Alkoholkonsum oder falscher Ernährung ausgelöst werden kann. Ebenso hängt es von der genetischen Disposition eines Menschen ab. In unseren Körperzellen treten ständig Genmutationen auf. Diese werden in der Regel von der Zelle selbst repariert, die veränderten Zellen werden vom Körper entfernt oder bleiben stumm.<sup>2</sup> Zwei besonders häufig veränderte Gene sind Proto-Onkogene und Tumorsuppressor-Gene. In allen gesunden Zellen wird das

<sup>1</sup> vgl. <http://www.biotechnologie.de/>

<sup>2</sup> vgl. B. Alberts, D. Bray [...], Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie, S. 775

Zellwachstum (Proliferation) und die Zellreifung (Differenzierung) von Proto-Onkogenen geregelt und die Wirkung von Tumorsuppressor-Genen kontrolliert. Während Proto-Onkogene die Proliferation generell fördern, wird sie von Tumorsuppressor-Genen unterdrückt. Durch Mutation wird die Struktur und Funktion der Proto-Onkogene verändert und werden zu Onkogenen. Dies führt zu unkontrollierten Wachstums- und Differenzierungsprozesse. Es entsteht ein Tumor. Ebenso zur Tumorentstehung kommt es, wenn die Kontrolle der Tumorsuppressor-Gene durch Mutation ausfällt.<sup>3</sup> Durch das unglückliche Zusammentreffen verschiedener Kombinationen solcher Veränderungen besteht die seltene Möglichkeit, dass aus einer Normalzelle ein Klon von veränderten Zellen entsteht. Dessen Einzelzellen haben Wachstumsvorteile, entgehen dem programmierten Zelltod (Apoptose), entziehen sich der Immunabwehr, wachsen zu einem bösartigen (malignen) Tumor aus, wuchern in benachbartes fremdes Gewebe (Invasion), siedeln sich dort an und bilden Tochtergeschwülste (Metastasierung). Ein Tumor kann sowohl gutartig (benigne) als auch maligne sein. Ein maligner Tumor wird als Krebs bezeichnet.<sup>4</sup>

Die Abneigung der Tumorzellen gegen Apoptose ist bei 50% der Krebserkrankungen auf zusätzliche Mutationen im p53-Gen oder dem Verlust des Gens zurückzuführen. Das Gen p53 ist ein Tumorsuppressor-Gen und gehört zu dem Kontrollmechanismus, welcher dafür sorgt, dass Zellen entweder ihre Teilung beenden oder bei einer beschädigten DNA Selbstmord betreiben. Durch einen Defekt dieses Gens können sie sich unbegrenzt teilen und überleben.

Hinzu kommt noch, dass Wachstum, Überleben und Teilung einer Tumorzelle fast unabhängig von den Signalen anderer Zellen ist. Ihre Zellkommunikation ist gestört. Krebszellen können sich teilen und wachsen ohne ein extrazelluläres Signal (z.B. Wachstumsfaktoren, Hormone). Normale Zellen sind abhängig von extrazellulären Signalen. Mit verschiedenen Rezeptoren ist es ihnen möglich auf die Signalmoleküle anderer Zellen zu reagieren. Durch Kombinationen verschiedener Signale wird das Verhalten der Zellen reguliert. Sie benötigen bestimmte Signale, um zu überleben, zusätzliche, um sich zu teilen und andere, um zu differenzieren. Ohne Signal kommt es zum Zelltod.<sup>5</sup>

---

<sup>3</sup> vgl. <http://www.krebsgesellschaft.de/>

<sup>4</sup> vgl. Alberts, B. (et al), Molekularbiologie der Zelle, S. 1534

<sup>5</sup> vgl. Alberts, B. (et al), Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie, S.777, S. 571

### 3. Signaltransduktion

#### 3.1. HER-Familie

Die Familie der **humanen epidermalen** (an der Zelloberfläche befindlichen) Wachstumsfaktor-**Rezeptoren**, kurz HER, besteht aus vier strukturell sehr ähnlichen Mitgliedern, die man als HER1, HER2, HER3 und HER4 bezeichnet (Abb.2). Die Rezeptoren sind aus einem extrazellulären, transmembranen und einem intrazellulären Bereich aufgebaut (Abb.3). Der extrazelluläre Bereich, welcher sich auf der Zelloberfläche befindet, dient als Bindungsstelle für verschiedene Wachstumsfaktoren sowie anderen Liganden und wird deswegen als Ligandenbindungsregion bezeichnet. Der intrazelluläre Bereich trägt eine Enzymgruppe, die Tyrosinkinase. Durch die hydrophobe transmembrane Domäne wird der innere und äußere Bereich verbunden.

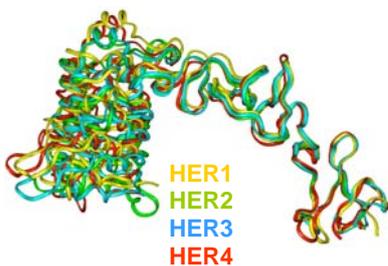


Abb.2: Überlagerung der vier HER-Rezeptoren<sup>6</sup>

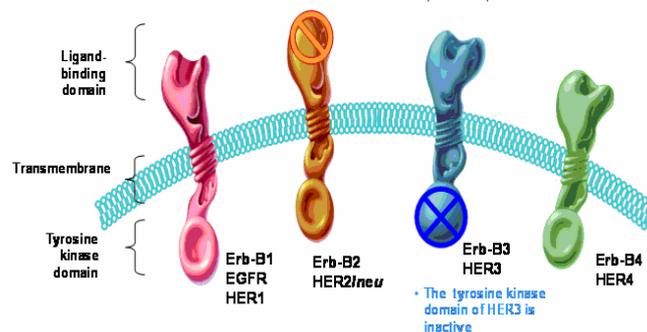


Abb.3: Die HER-Rezeptoren

In der Regel werden zwei gleichartige oder unterschiedliche HER-Rezeptoren von einem Ligand gleichzeitig gebunden und somit an der Zelloberfläche aneinander gekoppelt. Dies wird als Rezeptordimerisierung bezeichnet, bei der die dreidimensionale Molekülstruktur der vorher monomeren Rezeptoren verändert wird. Trotz der strukturellen Ähnlichkeit wird HER2 bei der Heterodimerisation mit anderen HER-Rezeptoren bevorzugt. Bei der Rezeptordimerisierung wird Tyrosinkinase aktiviert, welche die Phosphorylierung von Tyrosinresten ermöglicht und somit

<sup>6</sup> vgl. Bossmailer, Dr. B. , Präsentation Roche ( Abb.2 und Abb.3)

intrazelluläre Signalwege in Richtung Zellkern in Gang gesetzt werden. Die ankommenden Signale regen zur Proliferation, Migration, Zellanlagerung (Adhäsion), Gefäßneubildung (Angiogenese) an oder hemmen den Zelltod. „Welcher signalgebende Prozess dabei aktiviert wird, hängt u.a. vom Liganden, vom Dimerisierungspartner und der Aktivierung anderer Rezeptoren ab.“<sup>7</sup> Für HER2 existiert kein natürlicher Ligand, der ausschließlich an HER2 bindet. Bei HER3 ist der intrazelluläre Bereich inaktiv, was zur Folge hat, dass keine Tyrosinaktivität vorhanden ist und daher auch keine Signalübertragung in der homodimeren Form von HER3 in Gang gesetzt wird.<sup>8</sup> Bindet an HER3 jedoch der Ligand Heregulin sucht er sich ein HER2-Molekül als Dimerisierungspartner. Diese Kombination setzt sowohl eine Wachstumssignal- als auch eine Überlebenssignalkaskade in Gang, welche der Abbildung 4 entnommen werden können. Das Signal zur Proliferation wird von HER2 über die MAP-Kinase gegeben. HER3 dient dabei als Aktivator und Effektor der PI3-Kinase, welche über *Akt* die Hemmung der Apoptose antreibt.

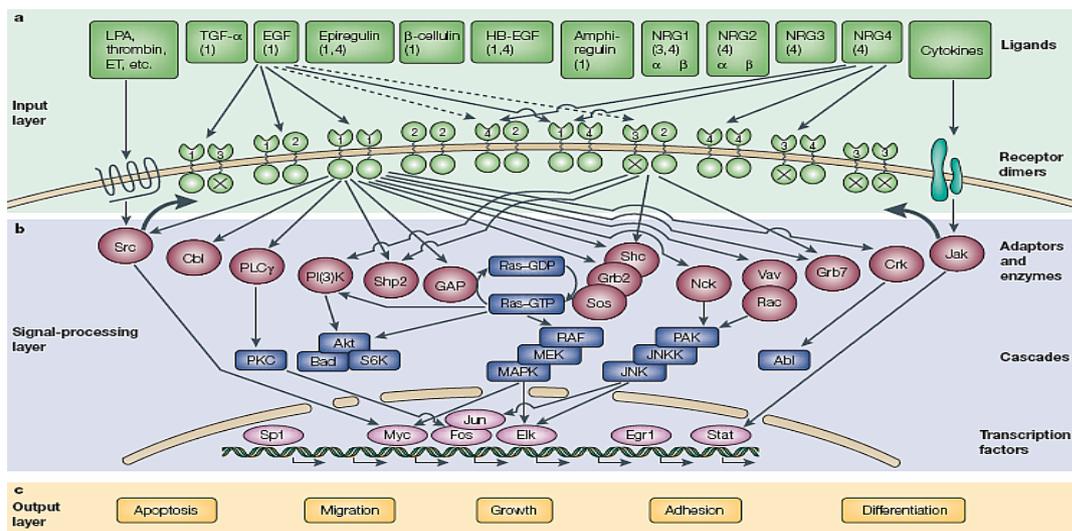


Abb.4: HER-Signaltransduktion<sup>9</sup>

Auch HER1 geht nach der Bindung von EGF oder TGF-alpha eine Dimerisation mit HER2 ein. In der wachstumsaktivierenden Wirkung sind die Heterodimere den jeweiligen Homodimeren überlegen.<sup>10</sup>

<sup>7</sup> Zitiert von <http://www.roche.com/>, S.43

<sup>8</sup> vgl. <http://www.roche.com/>, S. 38-40 und S.43

<sup>9</sup> vgl. Dissertation, Edward Htun van der Horst

## 4.2. HER-Rezeptoren und Krebstherapie

In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass die Fehlregulierung der HER-Familie eine Rolle bei der Entwicklung und dem Fortschreiten vieler Krebsarten spielt. Da viele Tumoren eine Überexpression von HER-Rezeptoren aufweisen, sind sie interessante Zielmoleküle in der Krebsforschung. Bei Brustkrebspatientinnen ist meist HER2 überexprimiert. Ziel ist es, die Rezeptoren zu blockieren und somit den Signalweg zu unterbrechen. Hierfür gibt es unterschiedliche Entwicklungsansätze für Antikrebsmittel. Dazu zählt die Entwicklung von so genannten monoklonalen Antikörpern, welche die extrazelluläre Ligandenbindungsregion des Rezeptors besetzen sollen. Herceptin® (Trastuzumab) von Roche ist ein Beispiel für ein Brustkrebsmedikament, das bereits etabliert ist und an den HER2-Rezeptor bindet. Der humanisierte monoklonale Antikörper unterbindet bei 25% der auf der Brustzelle vorkommenden HER2-Rezeptoren die Tyrosinkinaseaktivität und verhindert somit Wachstum und Ausbreitung des Tumors.<sup>11</sup> Omnitarg™ (Pertuzumab) bindet ebenso an den HER2-Rezeptor und verhindert die Signaltransduktion, welche unter anderem bei der Dimerisierung von HER2 mit HER3 in Gang gesetzt werden (Abb.5).<sup>12</sup>

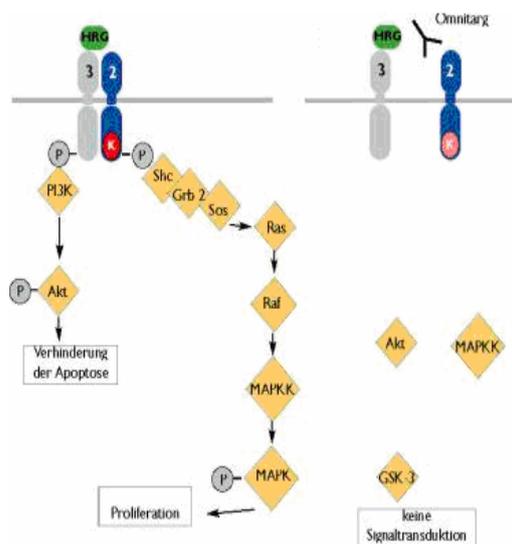


Abb.5: Hemmung der Signalübertragung durch Omnitarg™

<sup>10</sup>vgl. <http://www.journalonko.de/>

<sup>11</sup>vgl. <http://www.roche.com/>, S. 42-44

<sup>12</sup>vgl. <http://www.journalonko.de/>

Auch niedermolekulare Substanzen werden entwickelt, welche auf intrazellulärer Ebene wirken sollen. Sie verhindern die Phosphorylierung der Tyrosinkinase, indem sie an der „HER-Achse“ ansetzen. Ein Beispiel hierfür ist Tarceva™, das spezifisch die HER1-gesteuerten Kinasen hemmt.<sup>13</sup> Des Weiteren gibt es Entwicklungsansätze für Antikörper, die Liganden binden und für Antikörper bzw. Liganden die zusätzlich an zelluläre Toxine gekoppelt sind. Für die Krebstherapie ist es notwendig neue und wirksamere Medikamente zu finden, die möglichst wenige Nebenwirkungen aufweisen.

## **4. Antikörper**

### **4.1. Definition und Struktur<sup>14</sup>**

Antikörper sind Glykoproteine und werden den Immunglobulinen (Ig) zugeordnet. Sie entstehen in unserem Immunsystem als Antwort auf ein fremdes Molekül. Bestimmte weiße Blutkörperchen, die B-Lymphozyten oder B-Plasmazellen, stellen Antikörper her und tragen auf ihrer Oberfläche ein bestimmtes membrangebundenes Antikörpermolekül, welches als Rezeptor für die Erkennung eines bestimmten Antigens dient. Durch die Bindung von Antikörpern an ein Antigen wird die Vernichtung des Fremdeiweiß von Makrophagen und anderen Zellen des Immunsystems induziert. Dieses Schlüssel-Schloss-Prinzip bedeutet, dass eine falsche Aminosäure das Protein als Wirkstoff inaktiv machen kann. Antikörper besitzen eine Binderegion für ein Antigen. Diese Bindungsstelle wird als variable Region bezeichnet, da sie von der Aminosäuresequenz sehr unterschiedlich sein kann. Innerhalb dieser Region sitzen bestimmte Abschnitte (hypervariable Regionen), welche das so genannte Paratop enthalten. Diese eigentliche Antigenbindungsstelle bindet reversibel das so genannte Epitop des Antigens.

Die Bindung erfolgt über Ionenbindungen, Wasserstoffbrückenbindungen oder Van-der-Waals-Kräfte (Abb.6). Alle Antikörper bilden ein Y-förmiges Molekül mit zwei identischen Bindungsstellen für das Epitop eines Antigens (Abb.7).

---

<sup>13</sup> vgl. <http://www.roche.com/>, S.45

<sup>14</sup> vgl. Raem, Arnold M., Rauch, P., Immunoassays, S. 5-7

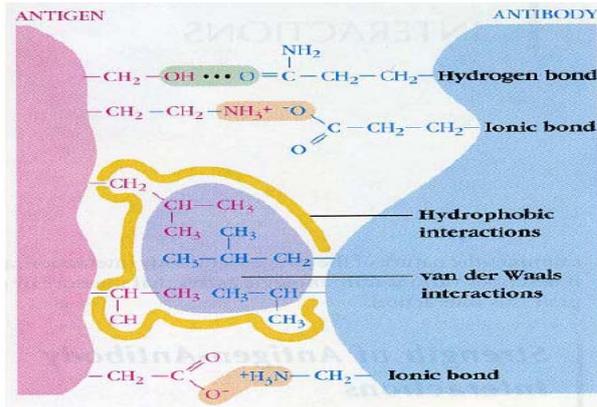


Abb.6:Antikörper-Antigen-Bindungs-kräfte<sup>15</sup>

Die Grundstruktur besteht aus vier Polypeptidketten, zwei identisch schweren Ketten oder H-Ketten (heavy chain) und zwei identisch leichten Ketten oder L-Ketten (light chain).

Durch Disulfidbrücken, welche sich zwischen zwei Cystein-Resten ausbilden, werden die vier

Polypeptidketten zusammengehalten.

Neben der variablen Region besitzt das Antikörpermolekül eine konstante Region, welche für die Wirkungs- und Effektormechanismen zuständig ist.

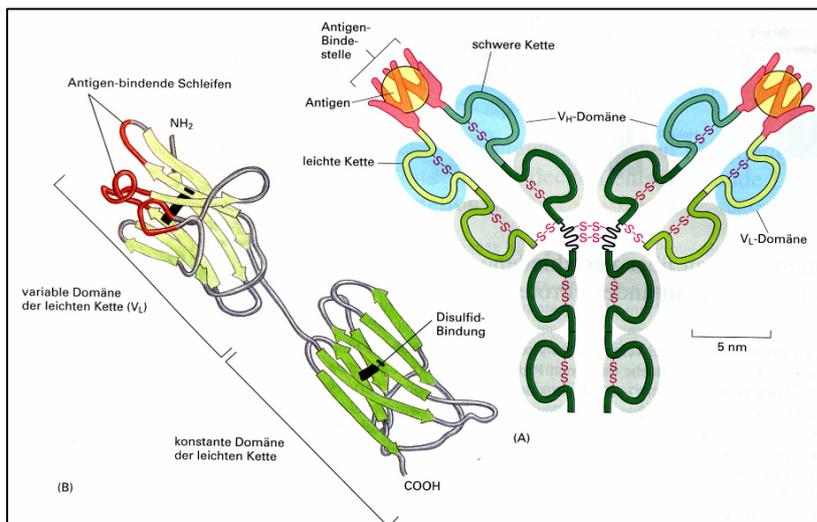


Abb. 7: Struktur eines Antikörpermoleküls<sup>16</sup>

## 4.2. Antikörperklassen und Subklassen

Antikörper werden in verschiedene Klassen (Isotypen) und Subklassen unterteilt, welche sich in ihrer Struktur, ihrer Verteilung im Organismus und in ihren Effektorfunktionen unterscheiden. Dabei gibt es zwei Isotypen, *kappa* ( $\kappa$ ) und *lamda*

<sup>15</sup> vgl. Raem, Arnold M., Rauch, P., Immunoassays, S. 30

<sup>16</sup> vgl. Alberts, B. (et al), Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie, S.154

( $\lambda$ ), für die leichten Ketten und fünf Isotypen für die schweren Ketten, welche als  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  bezeichnet werden.

Die Immunglobulinklassen sind durch die konstanten Abschnitte der schweren Ketten charakterisiert und man unterscheidet deshalb ebenfalls fünf Immunglobuline: IgG, IgD, IgE, IgA und IgM (Abb.8). Einige Immunglobulin-Isotypen bilden weitere komplexe Strukturen und Untergruppen. So kommen bei IgA sowohl Monomere (klassische Antikörperstruktur) als auch Dimäre, das bedeutet zwei IgA-Moleküle, die über eine so genannte *Joining* (J-) Kette verbunden sind, vor.

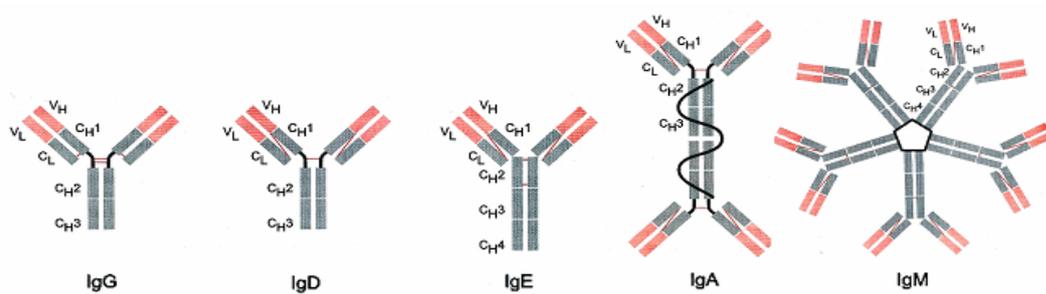


Abb 8: Struktureller Aufbau der Immunglobulinklassen

IgA ist auf den äußeren Oberflächen des Organismus lokalisiert. Die wichtigste Funktion des IgA ist die Neutralisation, d.h. die Verhinderung der Invasion von Mikroorganismen in den Organismus.

IgM tritt löslich als Pentamer auf, dabei sind jeweils fünf IgM-Moleküle über eine J-Kette miteinander verbunden. Jedes IgM-Molekül hat zehn identische Bindungsstellen für ein Antigen und kann Strukturen mit gleichartigen Epitopen, wie zum Beispiel Polysaccharide, mit hoher Avidität (Bindungsstärke bei multivalenten Molekülinteraktionen) binden.

IgD kommt auf der Oberfläche von B-Zellen vor. Seine Funktion ist unbekannt.

IgE spielt eine wichtige Rolle bei der Abwehr multizellulärer Parasiten, z.B. Würmer. Außerdem ist IgE für allergische Reaktionen verantwortlich (Heuschnupfen, allergisches Asthma, Lebensmittelallergien).

IgG stellt etwa 75% des Gesamt-Immunglobulins im Serum dar, wovon wiederum IgG<sub>1</sub> 60-70 % und IgG<sub>2</sub> 15-20% ausmachen, IgG<sub>3</sub> und IgG<sub>4</sub> hingegen nur etwa 5%.<sup>17</sup>

<sup>17</sup> vgl. Schütt, C., Bröker, B., Grundwissen Immunologie, S. 10-12

Die Subklassenunterschiede beim menschlichen IgG sind in Abbildung 9 dargestellt. Die Unterschiede sind besonders in der Hinge-Region ausgeprägt, wo die antikörperspaltenden Proteasen bevorzugt angreifen.

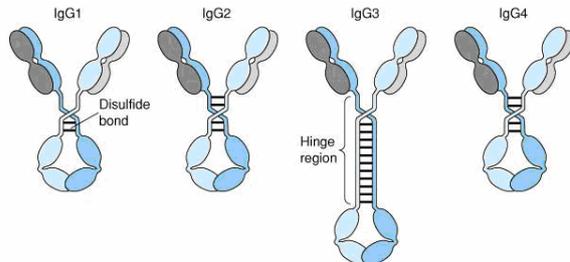


Abb.9: Spezies- und Subklassenunterschiede von IgG

Bei IgG<sub>1</sub> sind die H-Ketten über zwei Disulfide und bei IgG<sub>3</sub> über fünfzehn Disulfide verbrückt. Daraus ergeben sich deutliche Unterschiede im Fragmentierungsverhalten, besonders hinsichtlich Geschwindigkeit und Vollständigkeit der Spaltung.

Die meisten monoklonalen Antikörper sind vom IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> oder IgG<sub>2b</sub> Typ (Maus).

IgG ist der am häufigsten verwendete und unproblematischste Antikörper für *In vitro* Testsysteme.<sup>18</sup>

### 4.3. Herstellung monoklonaler Antikörper

Ein monoklonaler Antikörper ist gegen ein einziges Epitop gerichtet und besitzt damit eine einmalige Spezifität und eine für das Epitop hohe Selektivität. Die Spezifität eines Antikörpers bezeichnet die Fähigkeit desselben, zwischen ähnlichen aber unterschiedlichen Antigenen zu unterscheiden und selektiv nur an ein bestimmtes Epitop eines Antigens zu binden. Monoklonale Antikörper wurden erstmals 1975 von Georges Köhler und Cesar Milstein hergestellt. Sie fanden heraus, dass antikörperproduzierende Zellen (Plasmazellen) immortalisiert werden können, wenn man sie mit Myelomzellen (B-Lymphozyten, die zu Krebszellen entartet sind) fusioniert. Das Ergebnis sind Hybridomazellen. Bei der Herstellung monoklonaler Antikörper (Abb.10) gegen ein bestimmtes Antigen wird eine Maus zunächst mit diesem Antigen immunisiert.

<sup>18</sup> vgl. Kürzinger, Dr. Konrad, Antikörper und Immunoassay, Präsentation Roche

Auf diese Weise erhält man eine große Menge an Milzzellen, die spezifische Antikörper sezernieren, aber normalerweise

nach wenigen Tagen in der Kultur absterben. Damit man eine kontinuierliche Quelle von Antikörpern erhält, fusioniert man die Zellen in Anwesenheit von Polyethylenglycol (PEG) mit unsterblichen Myelomzellen. Myelomzellen sind neoplastische, antikörperproduzierende Zellen, die unbegrenzt wachsen können. Diese hat man so selektiert, dass sie selbst keine Antikörper produzieren und gegenüber einem Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin-Medium

(HAT-Medium) (Abb.11)

empfindlich sind. Nur aus

Myelomzellen bestehende Produkte der Fusion können in diesem Fall nicht wachsen, da ihnen das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) fehlt.

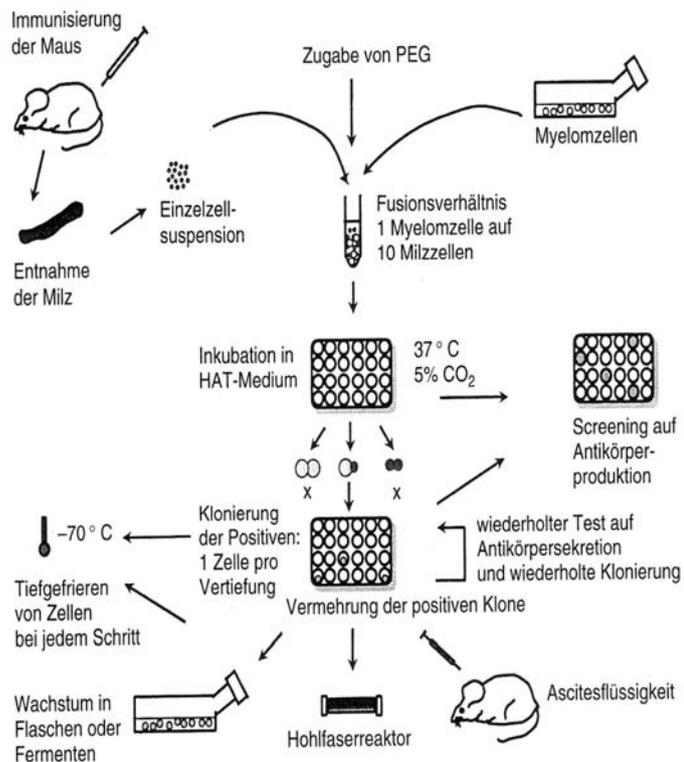


Abb.10: Herstellung monoklonaler Antikörper<sup>19</sup>

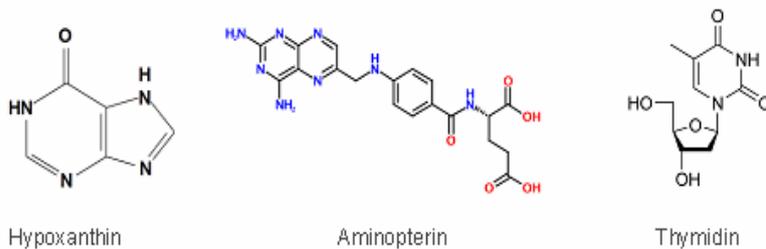


Abb.11: Struktur von Hypoxanthin<sup>20</sup>, Aminopterin<sup>21</sup> und Thymidin<sup>22</sup>

<sup>19</sup> vgl. Liddell, E., Weeks, I., Antikörper-Techniken, S. 41

<sup>20</sup> vgl. <http://de.wikipedia.org/wiki/Hypoxanthin>

<sup>21</sup> vgl. <http://de.wikipedia.org/wiki/Aminopterin>

<sup>22</sup> vgl. <http://de.wikipedia.org/wiki/Thymidin>

Nukleinsäuren werden auf zwei verschiedene Wege synthetisiert. Zum einem über den *de novo*-Weg, welchen alle normalen Zellen benutzen, und zum anderen über den *salvage pathway*, welchen die Zellen nehmen, falls der andere Weg blockiert ist. Sind beide Wege blockiert sterben die Zellen ab. Der *salvage pathway*-Mechanismus verwendet für die Purinbiosynthese die Substrate Hypoxanthin und Guanin, aus denen Inosinat und Guanylat mit Hilfe von HGPRT entstehen. Des Weiteren benötigt dieser Mechanismus, um bei der Pyrimidinsynthese mit Hilfe der Thymidinkinase (TK) Thymidylat zu gewinnen, das Substrat Thymidin. Das im HAT-Medium enthaltene Aminopterin blockiert den *de novo*-Weg und zwingt somit die Zellen den *salvage pathway* zu benutzen. Das HGPRT-Gen wird jedoch von den Milzzellen beigesteuert und ermöglicht es den gewünschten Hybridzellen im HAT-Medium zu überleben. Reine Myelomzellen und nichtfusionierte Milzzellen sterben ab. Diese Methode ist unter HAT-Selektion bekannt.<sup>23</sup> Anschließend wird getestet, ob die Hybridomazellen Antikörper produzieren. Durch Vereinzlung kloniert man die Zellen mit der gewünschten Spezifität. Die klonierten Hybridomazellen lässt man wachsen und erhält so große Mengen an Antikörper. Da jedes Hybridom von einer einzigen Zelle abstammt, erzeugen alle Zellen einer Linie dieselben Antikörpermoleküle (so genannte monoklonale Antikörper).

In der Krebsforschung spielen therapeutische monoklonale Antikörper eine immer größere Rolle. Jedoch sind die Antikörper, die wie oben beschrieben hergestellt wurden, im menschlichen Organismus selbst ein Antigen und können somit eine Immunantwort auslösen. Dies liegt an den Mausbestandteilen der monoklonalen Antikörper, die mit Hilfe von molekularbiologischen Verfahren entfernt und durch baugleiche konstante Teile menschlicher Antikörper ersetzt werden können.

Da die konstanten Teile keine Rolle für die Wirkung des Antikörpers spielen, können sie problemlos ausgetauscht werden. Der monoklonale Antikörper wird nun als „humanisierter monoklonaler Antikörper“ bezeichnet und ruft keine Immunantwort mehr hervor. Je nach Ähnlichkeit zu dem menschlichen Antikörper unterscheidet man chimäre, humanisierte oder humane Antikörper.<sup>24</sup>

---

<sup>23</sup> vgl. Liddell, E., Weeks, I., Antikörper- Techniken, S.39-47

<sup>24</sup> vgl. <http://www.medizininfo.de/>

## 5. Material und Methoden

### 5.1. Material

- ABTS-Tabletten: Substrat für den Farbstoffumsatz (Roche Diagnostics GmbH)  
(ABTS= 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure))
- Kontrollantikörper: Anti-c-ErbB2/c IgG (Mouse Monoclonal IgG), Konz.: 0,1mg/ml  
(Calbiochem);  
Anti-erbB-3/HER-3 (Mouse monoclonal IgG1); bei -20°C  
gelagert; Konz.: 1 mg/ml (Upstate);  
EGFR-Rezeptor IgG, Konz.: 200 µg/ml; (Invitrogen);  
IGF-1R-IgG, Konz.: 5,71 mg/ml; (Roche Diagnostics GmbH)
- Blocking-Reagenz für ELISA: 1:10 in H<sub>2</sub>O verdünnt (Roche Diagnostics GmbH)
- ABTS-Puffer: 125ml (Roche Diagnostics GmbH)
- Dulbecco's PBS: ohne Ca; Mg; 0,01 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,01 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,137 M  
NaCl; 0,0027 M KCL; pH = 7.0 (PAA Laboratories GmbH)
- Messgerät: TECAN Spectra ELISA Reader; Messfilter: 405 nm;  
Referenzfilter: 492 nm
- Mikrotiterplatten (MTP): 384 Well Polypropylenmikrotiterplatten;  
384 Well Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatten (Roche  
Diagnostics GmbH)
- Mikrotiterplattenschüttler: IKA-VIBRAX-VXR
- Mikrotiterplattenwascher: EMBLA; Waschgang mit 90 µl/Well PBS-T
- Pipetierroboter: CyBi-Well Pipettor; 384 Well Format;  
Multi-Dispenser (Matrix)
- Pipetten: Ein- und Mehrkanalpipetten (Eppendorf) (Matrix);  
Pipetboy (IBS Integra Biosciences)
- Pipettenspitzen: (Eppendorf)
- Quantifizierungssoftware: *Activity Base*
- Rezeptoren: HERX1-ECD (HER3 extrazelluläre Domäne),  
Assayverdünnung: 1:36;  
HERX2-ECD, Assayverdünnung: 1:6;

HERX3-ECD, Assayverdünnung: 1:10,  
 IgF-1R-ECD, Assayverdünnung: 1:6 (Roche Diagnostics  
 GmbH )

Sekundärer Antikörper: Anti-Maus POD Konjugat (Bio-Rad)

Subklassen Nachweis-System: IsoStrip™ (Roche Diagnostics GmbH)

Verdünnungspuffer: OSE-Puffer (PBS + 0,5% BSA (Bovine Serum Albumin  
 Fraktion V )+ 0,05% Tween 20) (Roche Diagnostics GmbH )

Waschpuffer: PBS-T mit 0,2% Tween 20 (PAA Laboratories GmbH)

Zellkulturüberstände: Hybridomaüberstände der Maus 02

Zellkulturmedium: RPMI 1640 mit 10% FCS (Fetales Kälberserum) (Invitrogen)

## 5.2. Versuchsdurchführung

Aus patentrechtlichen Gründen muss auf eine Darstellung der Strukturen der targetspezifischen Rezeptoren und Antikörper im Rahmen dieser Arbeit verzichtet werden. Der untersuchte HER-Rezeptor wird als HERX1-Rezeptor bezeichnet und die anderen als HERX2 sowie HERX3.

### 5.2.1. HERX1-ELISA<sup>25</sup>

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren (Assay), das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Im HERX1-ELISA System (Abb.12) wird die HERX1-ECD (Extrazelluläre Domäne) an der mit der Streptavidin beschichteten Platte gekoppelt.

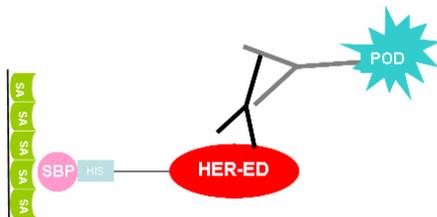


Abb.12: HERX1-ELISA System

<sup>25</sup> vgl. [http://de.wikipedia.org/wiki/Enzyme-linked\\_Immunesorbent\\_Assay](http://de.wikipedia.org/wiki/Enzyme-linked_Immunesorbent_Assay)

Daran bindet der Antikörper (Analyt) aus der Probe. Der selektive Antikörper sollte sich durch hohe Spezifität und Affinität auszeichnen und keine Kreuzreaktionen mit ähnlichen Epitopen zeigen. Wird die Konformation geändert, kann die Bindungsfähigkeit des Antikörpers verloren gehen. Der enzymmarkierte Anti-Antikörper (sekundärer Antikörper) bindet an den Analyten. Das Enzym als Marker sollte eine hohe Enzymaktivität aufweisen und möglichst einfach an den Antikörper binden. Dafür wird die Meerrettichperoxidase (POD) verwendet. Der Farbumsatz des dazugegebenen Substrates (ABTS) korreliert mit den aus den Hybridomaüberständen gewonnenen Antikörpermengen. Die Farbentwicklung, optische Dichte (Extinktion), wird mittels Photometer gemessen. Die Quantifizierung der Antikörperkonzentrationen in den Überständen wird mit der *Activity Base* Software durchgeführt.

### 5.2.2. Primärscreening der Hybridomaüberstände

Hybridzellen werden aus der Fusion der B-Zellen (aus der Milz isoliert) mit den Myelomzellen gewonnen. Die Zellmischung wird auf den 96 Well Mikrotiterplatten verteilt und bei 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach fünf Tagen Wachstum im HAT-Medium sind die einzig überlebenden Zellen Hybride aus Milz- und Myelomzellen. Ungefähr zwei Wochen nach der Fusion wird getestet, welche der vielen hundert Minikulturen die gewünschten Antikörper produzieren. Für den Nachweis werden biochemische oder zelluläre ELISA entwickelt. Wird beispielsweise ein Antikörper gegen einen Zellrezeptor gesucht, kann im Assay der isolierte lösliche Rezeptor verwendet werden.

Die spezifische Antikörperkonzentration der Hybridomaüberstände in HERX1-ELISA wurde gemäß dem nachfolgend beschriebenen Primärscreening bestimmt.

Erster Schritt der HERX1-ELISA Durchführung ist die Assayplattenbeschichtung mit löslichen HERX1-Rezeptoren. Dazu wurde die bei -20°C gelagerte extrazelluläre Rezeptordomäne von HERX1 (Abb.13) im Wasserbad (37 °C) aufgetaut und 1:36 in OSE-Puffer verdünnt.



Abb.13: HERX1 Extrazelluläre Domäne mit SBP-Tag

Danach wurden 25 µl/Well des verdünnten HERX1-ECD zu zwei 384 Well mit Streptavidin beschichteten Assayplatten mit Hilfe einer elektronischen 16-Kanal-Pipette dazugegeben. Durch das Streptavidinbindungsprotein wurde die extrazelluläre Domäne des HERX1-Rezeptors an das Streptavidin gekoppelt. Beschichtet wurde über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank. Anschließend erfolgte die Probenverdünnung. Die Fusion der aus Maus 02 gewonnenen B-Zellen mit Myelomzellen und die Ausplattierung der Zellmischung wurden in einer anderen Arbeitsgruppe durchgeführt. Die frisch geernteten Hybridomaüberstände wurden in 8 96 Well-Platte geliefert und mittels CyBi-Well Pipettierroboter gemäß vorgegebener Probenlogistik auf zwei 384 Well Polypropylenverdünnungsplatten übertragen und dabei mit Verdünnungspuffer 1:10 verdünnt (72 µl OSE-Puffer und 8 µl Probe). Um die Antikörperkonzentration der Hybridomaüberstände zu bestimmen, ist die Herstellung der Verdünnungsreihe mit bekannten Analytkonzentrationen (Standard) erforderlich. Da die äußeren Bedingungen bei der Durchführung eines ELISAs nie vollkommen identisch sind, wird auf jeder Platte eine Standardverdünnungsreihe mitgeführt. Bei dieser wurden in Micronicröhrchen zwölf Verdünnungen vorbereitet. Da die Stammlösungskonzentration 1mg/ml beträgt und der Kontrollantikörper 1:1000 verdünnt werden soll, wurden in 400 µl OSE-Puffer 0,4 µl Antikörper verdünnt. Darauf folgte eine 1:2 Verdünnungsreihe nach dem folgenden Pipettierschema (Abb.14).

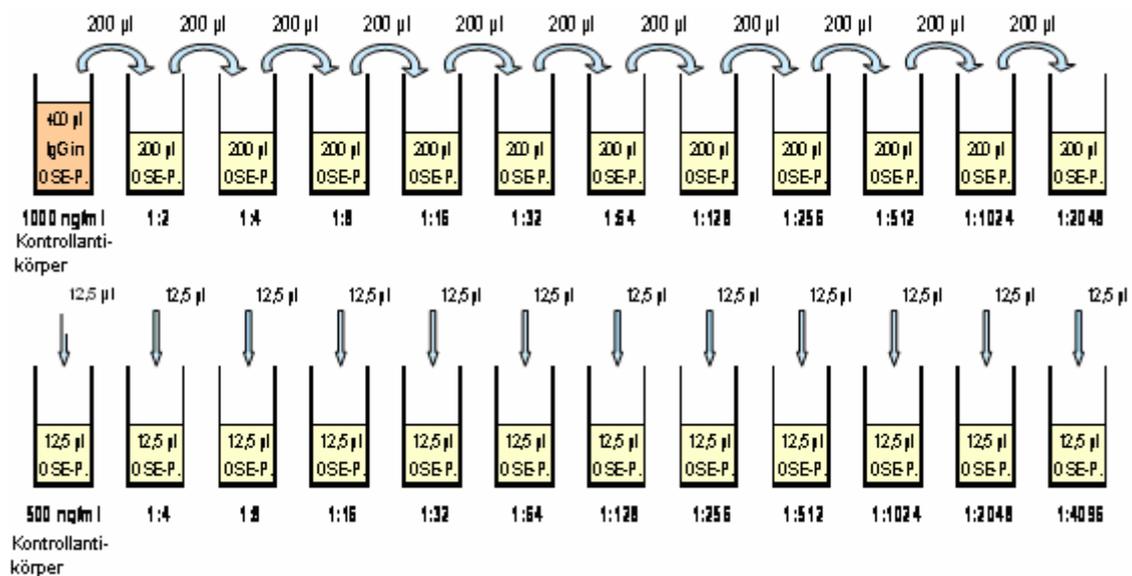


Abb.14: Prinzip der Standardverdünnung und Übertragung auf den Assay

Nach der Standardverdünnung wurden die zwei über Nacht bei 4 °C beschichteten Platten mittels EMBLA Mikrotiterplattenwascher dreimal mit 90 µl/Well Waschpuffer (PBS-T) gewaschen. Anschließend wurden mittels Multi-Dispenser in je Well 12,5 µl OSE-Puffer dosiert. Danach wurden die verdünnten Hybridomaüberstände mit Hilfe des CyBi-Well Pipettierroboter auf die ELISA-Platte übertragen. Gleichzeitig wurde in die 1. und 2. Spalte der Mikrotiterplatte 12,5 µl/Well Kontrollantikörper (Standard) in 12 Verdünnungen dazugegeben. Um später Messwerte für die Negativkontrolle zu erhalten, wurden in den leeren Wells der Mikrotiterplatten (Positionen M1 bis P2) Puffer ohne Antikörper pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 1,5 h bei Raumtemperatur (RT) auf dem Mikrotiterplattenschüttler wurden die Platten dreimal mit PBS-T gewaschen und anschließend 25 µl/Well des Sekundär-Antikörpers, der an Anti-HERX1 Antikörper bindet, mit Multi-Dispenser dazugegeben. Dieses Anti-Maus POD Konjugat (1:1500 in ELISA-Blocking Puffer verdünnt), besitzt das gekoppelte Enzym Meerrettichperoxidase (POD). Die durch das Enzym katalysierte Reaktion dient später zum Nachweis der Anti-HERX1 Antikörper. Die optimale Inkubationszeit beträgt eine Stunde bei RT.

Zum Schluss folgte ein viermaliges Waschen mit 90 µl/Well PBS-T und die Zugabe von 40 µl/Well Substrat (ABTS-Lösung). Nach 20 Minuten Inkubationszeit bei RT wurde das vorher farblose ABTS durch freiwerdenden Protonen oxidiert und unter Wasserabspaltung zu dem farbigen Endprodukt (Abb.15).

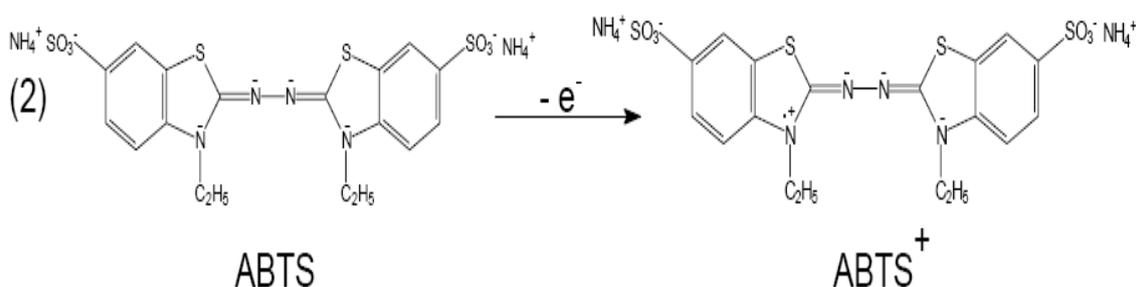


Abb.15: Reaktion von ABTS zu ABTS<sup>+</sup> <sup>26</sup>

<sup>26</sup> vgl. <http://www.uni-saarland.de/>

Nach 20 min wurde die optische Dichte (OD) bei 405/492 nm Wellenlänge im TECAN Spectra ELISA Reader gemessen. Die Messergebnisse wurden in der Datenbank gespeichert.

### 5.2.3. Sekundärscreening

Um mehr Anti-HERX1 Antikörper für die Sekundärassays zu gewinnen werden die positiven Hybridomazellen in das frische Zellkulturmedium aufgenommen und im Brutschrank bei 37 °C und 7% CO<sub>2</sub> Gehalt kultiviert. Diese Hybridzellen können bei optimalen Bedingungen in der Kultur unendlich stark expandiert werden und damit theoretisch auch unendlich große Mengen Antikörper produzieren.

Nach dem Primärscreening wurden von den 12 am meisten antikörperproduzierenden Hybridomazellen 8 ausgewählt, auf eine 24 Well Mikrotiterplatte übertragen und eine Woche im Zellkulturmedium inkubiert. Danach wurde jeweils 1 ml Zellkulturüberstand für das Sekundärscreening entnommen.

Die Proben wurden in vier biochemischen Assays, d.h. in HERX3-, HERX2-, HERX1- und IgF-1R (Insulin-like growth factor 1 receptor)- ELISA parallel getestet, um den spezifischen Antikörper zu bestimmen. Die Beschichtung der Assayplatten erfolgte analog zum Primärscreening. Die extrazelluläre Domäne von HERX3-, HERX2-, HERX1- und IGF-1R- Rezeptoren wurden in OSE-Puffer verdünnt, mittels 16-Kanal-Pipette jeweils eine Streptavidin-Assayplatte mit 25 µl/Well beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Probenverdünnung erfolgte bei diesem Experiment etwas anders als beim Primärscreening. Zuerst wurde in die Verdünnungsplatte 60 µl/Well OSE-Puffer pipettiert. Dabei wurde die dritte Spalte für die unverdünnten Proben leer gelassen. Die 8 Proben, die in je einem Micronicröhrchen gelagert sind, wurden jeweils mit 90 µl/Well in die dritte Spalte in je zwei Wells - zwecks Doppelbestimmung-unverdünnt übertragen. Anschließend erfolgte mit einer 16-Kanal-Pipette eine 1:3 Verdünnungsreihe (60 µl OSE-Puffer + 30 µl Probe) mit 10 Verdünnungen.

Die vier über Nacht bei 4 °C beschichteten Platten wurden mittels Mikrotiterplattenwascher dreimal mit 90 µl/Well Waschpuffer gewaschen.

Für die Standardverdünnung wurde eine Verdünnungsreihe der jeweiligen Kontrollantikörper vorbereitet. Die mit den extrazellulären Domänen beschichteten

Platten wurden dreimal gewaschen und danach mit 12,5 µl/Well OSE-Puffer versehen. Mit dem CyBi-Well Pipettierroboter wurden 12,5 µl/Well der Proben von den Polypropylenverdünnungsplatten auf je eine Assayplatte von dem HERX3, HERX2, HERX1 und IGF-1R System nach angegebener Logistik der Probenverteilung pipettiert, d.h. die identische Probenmenge wurde auf vier verschiedenen ELISA-Platten verteilt. Auf jeder Platte wurden jeweils die Standardverdünnungen mitgeführt. In die Wells für die Negativkontrolle wurden 12,5 µl/Well OSE-Puffer pipettiert. Nach 1,5 h Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Mikrotiterplattenschüttler wurden die Assayplatten wiederum mit PBS-T gewaschen und 25 µl/Well des sekundären Antikörpers (Anti-Maus POD Konjugat) dazugegeben. Nach der einstündigen Inkubationszeit wurden die Platten viermal mit PBS-T gewaschen und anschließend 40 µl/Well ABTS dazugegeben. Der Substratumsatz wurde nach 20 Minuten bei 405/492 nm Wellenlänge gemessen.

#### 5.2.4. Subklassenbestimmung<sup>27</sup>

Um die Subklassen der monoklonalen Antikörper bestimmen zu können verwendet man das Nachweis-System IsoStrip™, mit dessen Hilfe IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>2c</sub>, IgA und IgM identifiziert werden können. Die Entwicklungsröhrchen im Kit enthalten Latex-Beads, die anti-Maus-*kappa* und anti-Maus-*lamda* Antikörper tragen. Diese reagieren mit jedem Antikörper aus der Maus, unabhängig von seinem Isotyp. Die Isotypisierungstreifen tragen immobilisierte Banden von anti-Maus-Antikörpern von der Ziege, welche mit jeweils einem der bekannten Isotypen der Maus-Antikörper (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>2c</sub>, IgA und IgM) bzw. mit den leichten Ketten *kappa* und *lamda* reagieren. Beide Seiten des Streifens tragen eine Bande für die Positivkontrolle, die anzeigt, dass die Antikörper-beschichteten Beads den Streifen hinaufgewandert sind. Unter Verwendung dieser zwei Komponenten kann ein monoklonaler Antikörper aus der Maus leicht auf seinen Isotyp getestet werden. Bei 8 Test-Proben des HER-Sekundärscreeningsystems wurden diese 1:20 verdünnt. Dabei wurden 142,5 µl von PBS mit 1% BSA und 7,5 µl Probe in das Entwicklungsröhrchen pipettiert und nach 10 Sekunden der Streifen eingeführt (Abb.16). Während der Inkubationszeit von 10

---

<sup>27</sup> vgl. <https://www.roche-applied-science.com/>

Minuten bilden die Antikörper und die Antikörper-beschichteten Latex-Beads einen Komplex (Abb.17).

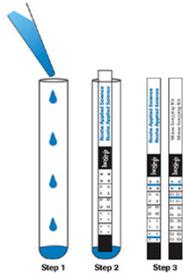


Abb.16: Testprinzip

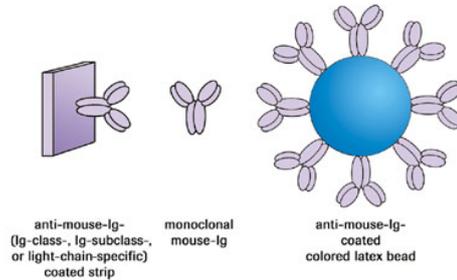


Abb.17: Antikörper und Latex-Beads Komplex

Dieser Komplex wandert durch Kapillarkräfte den Streifen hinauf, bis er von dem immobilisierten Anti-Maus-Antikörper aus der Ziege gebunden wird, der für seinen Isotyp und für seine leichte Kette spezifisch ist.

## 6. Auswertungen und Ergebnisse

### 6.1. Auswertung der Primärscreening-Ergebnisse

Mit einem quantitativen Assay wird die Konzentration eines Analyten in einer unbekannt Probe bestimmt. Dazu wird eine Standardkurve erstellt, anhand deren dann die Konzentration der zu untersuchenden Proben ermittelt werden kann.

Die Messergebnisse des Primärscreenings wurden in die Datenbank übertragen. 704 Hybridomaüberstände (352 Proben/Mikrotiterplatte) wurden dabei ausgewertet, um zu sehen, welche Zellen Antikörper gegen HERX1 produzieren. Abbildung 18 zeigt den Farbumsatz des ABTS Substrates beim Standard und den Hybridomaüberständen. Die positiven Proben (Hits) sind stark grün gefärbt.

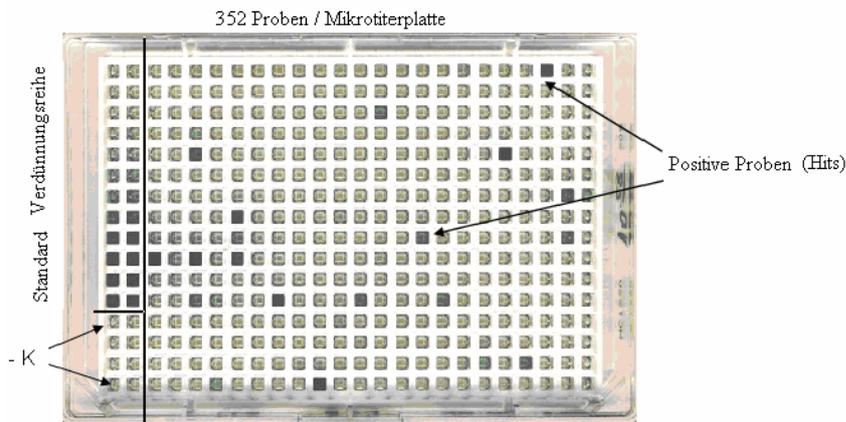


Abb.18: Die Verteilung der Hits nach der Farbentwicklung in der 384 Well Mikrotiterplatte

Zur Quantifizierung der Antikörperkonzentration der Proben wurde auf jeder Platte jeweils eine Standardkurve mitgeführt. Die Messergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt.

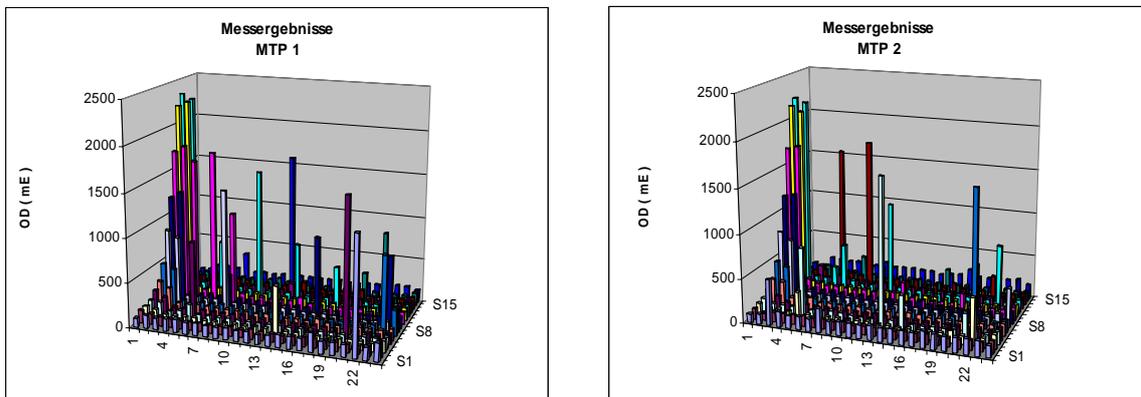


Abb.19: Primärscreening Messergebnisse

Für die Interpolation der Messwerte wird eine Kalibrationskurve je Mikrotiterplatte erstellt. Die Auswertung bzw. die Quantifizierung der Antikörpermenge in den Überständen erfolgt mit Hilfe der *Activity Base* Software. Dabei ist die Kalibrationskurve in einem halb-logarithmischen Diagramm dargestellt. Auf der X-Achse wird der natürliche Logarithmus der Konzentration aufgetragen und auf der Y-

Achse die Extinktion (OD=Absorption). Um eine lineare Regression berechnen zu können, muss man die Kurve vorher linearisieren (Abb.20).<sup>28</sup>

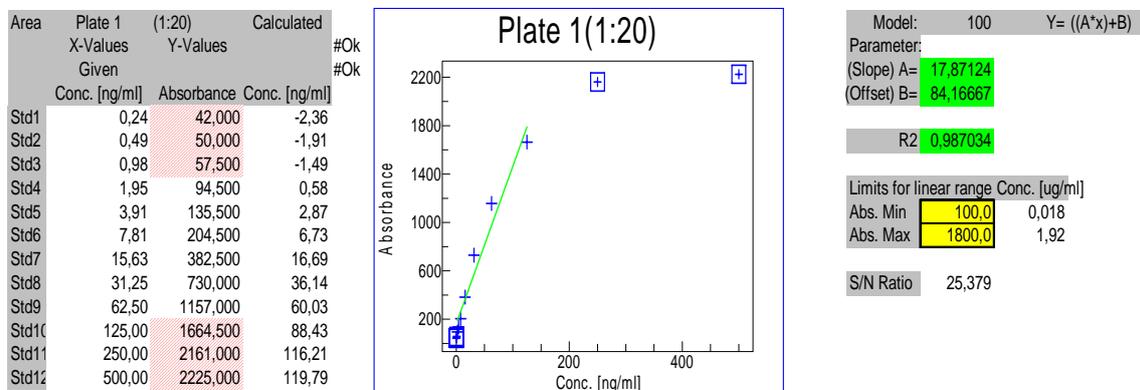


Abb.20: Kalkulation der Kalibrationskurve in *Activity Base*

Die Interpolation von Messwerten der Proben erfolgt mit einer speziell vorgefertigten Excel-Vorlage. Die Antikörperkonzentrationen der 704 Hybridomaüberstände werden in einer Excel-Tabelle zusammengefasst und nach Antikörpergehalt sortiert. In 627 Zellkulturüberständen (89 %) waren keine Antikörper nachweisbar. In Tabelle 1 sind die 12 Hybridomazellen (Hits) aufgelistet, die am meisten Anti-HERX1 IgG produziert haben.

Hybridoma Überstand	Anti- HERX1 AK in HERX1-ECD-ELISA c ( µg/ml )
HER_M02.8G4:1	1,83
HER_M02.7B7:1	1,78
HER_M02.3E3:1	1,75
HER_M02.7G3:1	1,68
HER_M02.5D11:1	1,64
HER_M02.3E2:1	1,62
HER_M02.3H6:1	1,58
HER_M02.2C10:1	1,57
HER_M02.2A11:1	1,30
HER_M02.3E4:1	0,99
HER_M02.1D12:1	0,81
HER_M02.8F11:1	0,70

Tab.1: Die 12 im Primärscreening ausgewählten Hybridomazellen

<sup>28</sup> vgl. [http://de.wikipedia.org/wiki/Enzyme-linked\\_Immunesorbent\\_Assay](http://de.wikipedia.org/wiki/Enzyme-linked_Immunesorbent_Assay)

Jene 8 Hybridomazellen, die mehr als 1 µg/ml Anti-HERX1 Antikörper produzierten, wurden im Sekundärscreening analysiert.

## 6.2. Auswertung der Sekundärscreening-Ergebnisse

Der spezifische Anti-HERX1 Antikörper erkennt den HERX1-Rezeptor auf der Oberfläche von Krebszellen, sollte aber weder an die anderen HER-Rezeptoren noch an die nicht verwandten Rezeptoren, wie beispielsweise an IgF-1R binden.

Die im Primärscreening ausgewählten 8 Hybridomazellen wurden im Sekundärscreening in vier verschiedenen biochemischen Assays (in HERX3-, HERX2-, HERX1- und IgF-1R-ELISA) parallel getestet, um den Antikörper zu finden, der spezifisch an den HERX1-Rezeptor bindet. Die ausgewählten 8 Proben wurden jeweils mit Doppelbestimmung in 10 Konzentrationen getestet. Der Farbstoffumsatz der Proben im ELISA ist in Abbildung 24 (Anhang) dargestellt. Die Messergebnisse sind plattenweise in einer Excel-Tabelle zusammengefasst (Tab.4 Anhang) und daraus die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet (Tab.2). Die Berechnung der Messergebnisse erfolgt nach den folgenden mathematischen Formeln:

Der Mittelwert (MW) ist die Summe aller Messwerte ( $x_i$ ) geteilt deren Anzahl  $n$ :<sup>29</sup>

$$\bar{x}_{\text{arithm}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

Die Standardabweichung (STABW) gibt die Streuung der Werte einer Zufallsvariable um ihren Mittelwert an.<sup>30</sup>

$$s_X := \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

$s_x$  Standardabweichung der Grundgesamtheit

$N$  der Stichprobenumfang (Anzahl der Werte bzw. Anzahl der Freiheitsgrade)

<sup>29</sup> vgl. <http://de.wikipedia.org/wiki/Mittelwert>

<sup>30</sup> vgl. <http://de.wikipedia.org/wiki/Standardabweichung>

$x_i$  die Merkmalsausprägungen am i-ten Element der Stichprobe  
 $\bar{x}$  der Mittelwert der Stichprobe

Nr.	Hybridoma- überstand	OD (mE)															
		1:10		1:30		1:90		1:270		1:810		1:2430		1:7290		1:21870	
		Mittelw	STABW														
1	HER_M02.8G4	2493	74,2	2560	2,8	2712	41,0	2425	46,0	1830	100,4	1022	40,3	499	24,0	316	58,7
2	HER_M02.3E3	1812	45,3	2133	96,9	2193	68,6	1696	80,6	882	96,9	414	67,2	226	14,8	165	3,5
3	HER_M02.7B7	1551	21,9	2011	214,3	2097	131,5	1864	21,2	990	74,2	469	14,8	250	0,7	184	13,4
4	HER_M02.7G3	2696	25,5	2511	80,6	2356	157,0	862	39,6	327	7,1	189	0,7	149	7,1	132	4,2
5	HER_M02.3E2	1608	20,5	2037	15,6	2038	34,6	1482	17,7	806	41,7	366	9,2	216	1,4	161	3,5
6	HER_M02.5D11	1229	154,9	1132	120,9	702	79,2	370	6,4	222	14,8	163	6,4	143	4,9	143	0,0
7	HER_M02.3H6	1829	96,2	1998	144,2	2172	45,3	1551	108,2	793	91,2	377	9,2	233	1,4	167	4,9
8	HER_M02.2C10	1660	11,3	2138	188,8	2079	81,3	1219	48,8	624	18,4	339	37,5	216	29,7	193	39,6

Tab.2: Kalkulation der HERX1-ELISA Messergebnisse

Die Abbildung 21 stellt die Sekundärscreening-Ergebnisse dar. Die Y-Achse zeigt die OD-Werte in Milliextinktion an und die X-Achse die Probenverdünnung. Beim Vergleich der verschiedenen Assays (Abb.22) kann man feststellen, dass alle Antikörper der 8 Überstände an den HERX1-Rezeptor binden. Die sezernierten Antikörper der Zelllinie HER\_M02.7G3 sind kreuzreaktiv, d.h. sie binden an alle vier Rezeptoren.

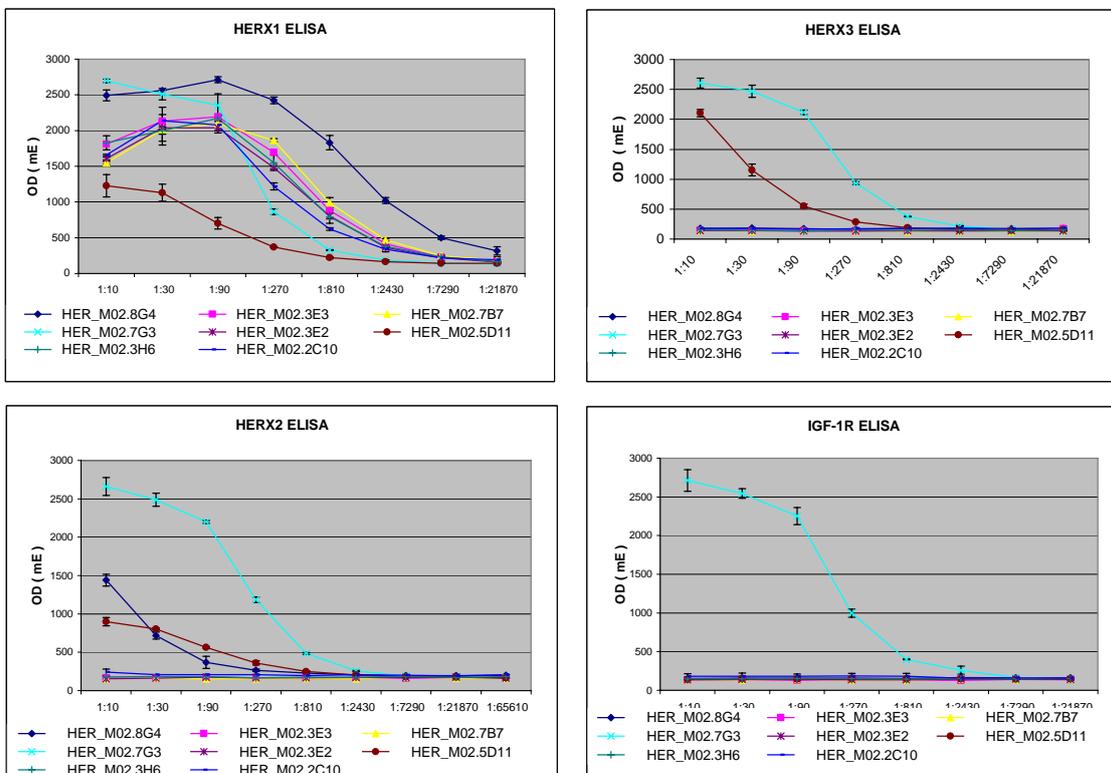


Abb.21: HER-ELISA Ergebnisse

Die Quantifizierung der Antikörpermenge in den Überständen erfolgt mit Hilfe der *Activity Base* Software. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

Nr.	Hybridomaüberstand	Antikörper Konzentration (µg/ml)			
		HERX1 ELISA	HERX2 ELISA	HERX3 ELISA	IGF-1R ELISA
1	HER_M02.8G4	22,99	0,38	<0.04	<0.007
2	HER_M02.3E3	12,78	<0.02	<0.04	<0.007
3	HER_M02.7B7	14,91	<0.02	<0.04	<0.007
4	HER_M02.7G3	4,36	4,78	6,01	3,58
5	HER_M02.3E2	11,41	<0.02	<0.04	<0.007
6	HER_M02.5D11	1,20	0,50	1,17	<0.007
7	HER_M02.3H6	10,97	<0.02	<0.04	<0.007
8	HER_M02.2C10	9,90	<0.02	<0.04	<0.007

Tab.3.: Kalkulierte Antikörperkonzentration im Sekundärscreening

Die Balken zeigen die Antikörperkonzentrationen der Überstände. Die produzierten Antikörper der Hybridzellen HER\_M02.5D11 erkennen drei HER-Rezeptoren, sie sind kreuzreaktiv oder Mischklone. Sechs Hybridomazellen produzieren spezifische Antikörper. Die Zelllinien HER\_M02.7B7 und HER\_M02.3E3 sezernieren die höchste spezifische Antikörpermenge (Abb.22).

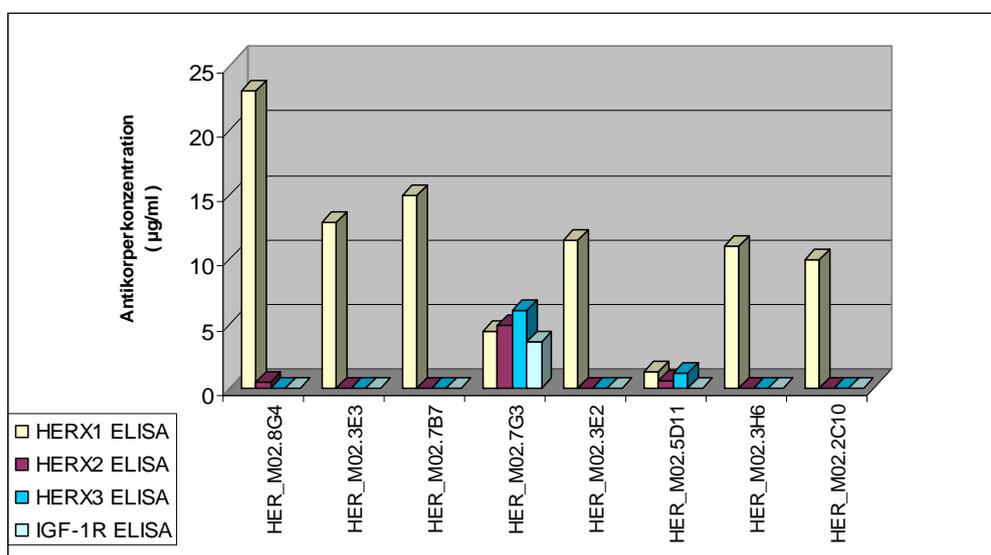


Abb.22: Antikörperkonzentrationen der Hybridomaüberstände

Die Messergebnisse des jeweiligen Assays, sowie die Auswertung von *Activity Base* und Bilder befinden sich im Anhang.

### 6.3. Auswertung der Subklassenbestimmung

Mit dem Nachweis-System Iso-Strip™ werden die Subklassen und Isotypen der Antikörper von den 8 Proben aus dem Sekundärscreening bestimmt (Abb.23). Dabei ergab sich, dass die Proben 1-3, sowie die Proben 5,6 und 8 vom IgG<sub>1</sub> Typ sind. Die Probe 7 wurde als IgG<sub>2b</sub>, Probe 4 als IgM identifiziert. Alle Proben besitzen die leichte Kette *kappa* als Isotyp. Es lässt sich erkennen, dass die am häufigsten produzierten Antikörper der Hybridomazellen vom IgG<sub>1</sub> Typ sind. Es kam weder IgA noch die leichte Kette *lamda* vor.

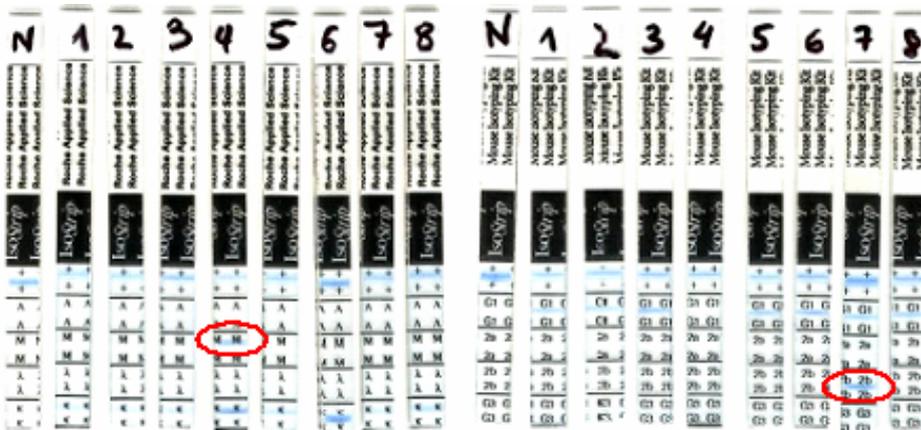


Abb.23: Ergebnis der Subklassenbestimmung

Die Probe 4 als IgM Typ ist für die Krebsforschung uninteressant, da die Stabilität und die Reproduzierbarkeit der IgM Testsysteme problematisch sind. Die anderen hingegen sind unproblematisch für *In vitro* Testsysteme.

Mit den durchgeführten Testverfahren ist es gelungen mehrere spezifische antikörperproduzierende Hybridomazellen zu isolieren. Die Testergebnisse beweisen, dass die Hybridomazelllinie mit der Bezeichnung HER\_M02.7B7 am meisten (14.91 µg/ml) spezifische Anti-HERX1 IgG<sub>1</sub> Antikörper produziert hat. Deshalb wurde diese Zelllinie für die weitere Entwicklung therapeutischer Krebsmedikamente ausgewählt.

## 7. Diskussion

Zielgerichtete, hochspezifische monoklonale Antikörper werden häufig zur Krebstherapie, Unterdrückung unerwünschter Immunreaktionen und Verhinderung von Ausstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen eingesetzt. Bedeutung haben sie auch im diagnostischen Bereich, da sie sehr genau bestimmte Antigene sowohl im menschlichen Körper, als auch in Laborproben erkennen können.

Mit dem Einsatz monoklonaler Antikörper besteht die Möglichkeit die Signaltransduktion der HERX1-Rezeptoren in der Tumorzelle zu hemmen.

Bevor ein Antikörper jedoch als monoklonal bezeichnet wird, muss er bei der Herstellung mit verschiedenen Testverfahren isoliert und identifiziert werden. Die durch Fusion von Immunzellen der Maus mit Myelomzellen gewonnenen Hybridomazellen sezernieren unterschiedliche Antikörperstrukturen. Im Primärscreening der Hybridomaüberstände wurden die acht produktivsten Proben von 704 Maus-Zelllinien mit Hilfe eines quantitativen HERX1-ELISAs ausgewählt. Im Sekundärscreening wurde die sezernierte Antikörpermenge der Hybridomaüberstände und die Selektivität der Bindung an HER-Rezeptoren bestimmt. Dabei zeigte sich, dass zwar alle Antikörper an die extrazelluläre Domäne von HERX1 binden, jedoch zwei Proben auch an die anderen getesteten Rezeptoren. Diese Antikörper sind kreuzreaktiv und nicht HERX1 spezifisch. Die Subklassen- und Isotypbestimmung der Antikörper aus den ausgewählten acht Proben bestätigte die Aussage, dass die meisten von Hybridomazellen produzierten Antikörper der Subklassen des IgG Typs angehören. Besonders häufig kam IgG<sub>1</sub> vor und alle wiesen die leichte Kette *kappa* vor. Die Resultate der Experimente zeigen, dass eine Maus-Hybridomazelllinie für die weitere Entwicklung monoklonaler Antikörper besonders gut geeignet ist. Diese Zelllinie mit der Bezeichnung HER\_M02.7B7 hat 14.91 µg/ml spezifische Anti-HERX1 IgG<sub>1</sub> produziert. Das in dieser Facharbeit vorliegende Praktikum zeigt lediglich einen kleinen Ausschnitt auf der Suche nach einem Antikrebsmittel. Bevor der ausgewählte Antikörper ein wirksames Arzneimittel wird, muss er noch mit unzähligen biotechnologischen Verfahren wie u.a. Klonierung, Aufreinigung, Strukturoptimierung und Chimerisierung weiterentwickelt werden. Mit geringen Nebenwirkungen ist jedoch die Antikörpertherapie ein viel versprechender Ansatz bei der Krebsbekämpfung.

## 8. Literaturverzeichnis

### Bücher

Alberts, B. (et al), Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie, Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, 2005<sup>3</sup>

Alberts, B. (et al), Molekularbiologie der Zelle, Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, 2004

Liddell, E., Weeks, I., Antikörper-Techniken, Heidelberg, Berlin, Oxford, Spektrum Akademischer Verlag, 1996

Raem, Arnold M, Rauch, P., Immunoassays, o.O., Spektrum Akademischer Verlag, 2007

Schütt, C., Bröker, B., Grundwissen Immunologie, o.O., Spektrum Akademischer Verlag, 2006

### Sonstige

Dissertation: Edward Htun van der Horst, The role of ErbB3/HER3 in gliomas and breast cancer: Molecular mechanism and potential role as therapeutic target, Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München, 2002

Vortrag: Bossenmaier, Dr. B., Präsentation Roche, o.J.

Kürzinger, Dr.Konrad, Antikörper und Immunoassay, Präsentation Roche, 2007

### Internet

<http://www.biotechnologie.de/bio/generator/Navigation/Deutsch/Service/schuelerservice,did=64896,render=renderPrint,sprache=de.html>, 18.01.08

<http://www.journalonko.de/aktuellview.php?id=513>, 17.01.08

<http://www.krebsgesellschaft.de/krebsentstehung,11266.html>, 17.01.08

[http://www.medizininfo.de/hautundhaar/psoriasis/monoklonale\\_antikoerper.shtml](http://www.medizininfo.de/hautundhaar/psoriasis/monoklonale_antikoerper.shtml), 17.01.08

[http://www.roche.com/pages/downloads/company/pdf/rddpenzberg02\\_03d.pdf](http://www.roche.com/pages/downloads/company/pdf/rddpenzberg02_03d.pdf), 10.01.08

<https://www.roche-applied-science.com/servlet/RCCConfigureUser?URL=StoreFramesetView&storeId=10201&catalogId=10201&langId=-3&countryId=de> , 16.01.08

[http://www.uni-saarland.de/fak8/heinzle/de/teaching/GrundPraktikum\\_Bioinf/V5\\_Giffhorn\\_Kinetik\\_2007.pdf](http://www.uni-saarland.de/fak8/heinzle/de/teaching/GrundPraktikum_Bioinf/V5_Giffhorn_Kinetik_2007.pdf), 18.01.08

<http://de.wikipedia.org/wiki/Aminopterin>, 19.01.08

[http://de.wikipedia.org/wiki/Enzyme-linked\\_Immunosorbent\\_Assay](http://de.wikipedia.org/wiki/Enzyme-linked_Immunosorbent_Assay), 15.01.08

<http://de.wikipedia.org/wiki/Hypoxanthin>, 19.01.08

<http://de.wikipedia.org/wiki/Mittelwert>, 15.01.08

<http://de.wikipedia.org/wiki/Standardabweichung>, 15.01.08

<http://de.wikipedia.org/wiki/Thymidin>, 19.01.08

## 9. Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die Facharbeit ohne fremde Hilfe angefertigt und nur die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

.....,den.....

Ort

Datum

.....

Unterschrift des Schülers

## **10. Danksagung**

Ich möchte der Firma Roche Diagnostics GmbH herzlich danken, die mir ermöglicht hat ein zweiwöchiges Praktikum in Penzberg zu machen.

Besonderer Dank geht an meine Betreuerin Ildiko Wünsche für ihre Hilfe und Geduld während des Praktikums.

Weiterer Dank geht an Herrn Dr. Hans-Willi Krell für die Organisation und die Unterstützung des Praktikums.

# 11. Anhang

## 11.1. ELISA-Ergebnisse

1 MTP Primärscreening		OD (mE)																							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	104	149	134	143	152	135	142	131	132	140	125	132	112	126	150	146	141	215	143	150	140	1327	147	212	
B	147	122	107	97	101	95	97	96	97	105	92	110	99	92	88	97	100	109	105	105	98	101	117	168	
C	151	133	94	91	94	99	83	89	85	91	88	93	91	579	91	91	91	90	90	92	101	101	93	141	
D	182	176	87	108	195	91	91	89	98	92	90	89	95	99	90	94	93	93	95	94	88	99	102	127	
E	253	187	88	88	867	97	89	94	93	106	86	89	94	86	87	95	97	93	88	1569	96	96	87	118	
F	323	255	101	96	112	100	101	95	97	100	95	106	95	92	99	91	129	98	87	94	102	98	100	130	
G	492	442	87	87	90	87	96	89	87	91	84	85	88	85	93	82	95	93	87	91	100	891	297		
H	851	778	101	101	99	103	1380	90	92	93	95	165	108	104	93	94	101	93	94	96	92	101	105	132	
I	1209	1274	101	91	102	91	362	90	92	92	88	94	89	96	92	919	88	94	94	95	99	103	801	134	
J	1712	1786	1618	107	1732	107	1049	119	96	100	88	98	108	157	101	93	92	109	101	114	93	100	104	141	
K	2220	2271	91	92	96	104	95	92	93	98	88	93	93	99	93	97	91	100	91	90	92	99	91	149	
L	2339	2280	105	102	615	271	105	96	1496	93	95	105	688	99	111	102	478	105	93	113	101	103	98	140	
M	90	90	89	89	117	90	87	90	88	94	85	175	91	90	95	90	91	90	86	89	96	99	98	136	
N	83	96	103	107	108	103	104	98	92	95	97	164	91	101	92	103	94	152	90	95	103	109	139		
O	75	102	103	96	116	92	92	91	99	131	96	100	94	93	99	96	91	159	317	104	820	107	110	153	
P	90	102	155	153	147	343	123	130	125	138	1579	144	139	142	139	149	129	135	155	153	152	176	174	147	
-K																									

2 MTP Primärscreening		OD (mE)																							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	100	119	520	173	142	152	144	273	151	157	161	159	167	160	165	161	154	190	174	166	171	177	175	138	
B	118	76	109	110	110	113	106	111	99	110	91	97	103	102	94	104	102	109	104	103	105	113	109	139	
C	138	85	100	94	327	88	84	94	97	93	99	107	87	92	86	94	93	95	94	136	99	527	107	159	
D	153	110	108	106	790	94	95	117	107	99	93	94	1670	108	403	92	87	99	93	107	295	116	100	150	
E	212	153	96	97	100	88	85	94	90	95	86	98	87	88	86	89	86	96	94	94	91	100	91	143	
F	295	279	109	101	132	94	104	94	106	105	94	100	110	118	110	97	104	96	93	94	109	110	145		
G	465	413	92	100	89	93	89	87	88	89	92	90	94	98	89	88	88	96	94	91	1548	97	87	135	
H	777	691	138	112	91	99	100	100	103	101	105	99	93	98	92	94	97	92	93	92	91	103	153	447	
I	1169	1193	106	105	99	101	93	92	98	102	95	93	101	90	122	93	93	95	91	97	100	98	93	140	
J	1693	1725	168	133	118	120	111	106	121	112	87	139	271	105	93	91	109	108	229	100	94	100	102	149	
K	2159	2100	106	101	93	89	96	92	94	101	95	93	88	91	99	101	89	90	90	534	91	97	88	134	
L	2229	2183	119	121	261	533	125	100	104	105	1063	114	100	105	98	99	106	106	104	114	107	738	104	148	
M	108	105	214	86	117	95	83	87	88	91	89	91	86	92	87	89	85	92	87	93	92	99	92	132	
N	94	103	119	125	1689	123	108	1714	110	114	114	101	136	91	96	94	151	98	102	109	298	99	111	137	
O	80	96	133	104	97	102	297	91	194	95	100	93	101	94	88	262	90	98	100	105	97	112	105	120	
P	108	85	192	186	181	184	173	167	218	169	175	186	174	173	156	174	178	256	179	177	181	185	211	158	
-K																									

	x < 320
	320 < x < 800
	800 < x < 1300
	x > 1300

Tab.3: Primärscreening-Messergebnisse

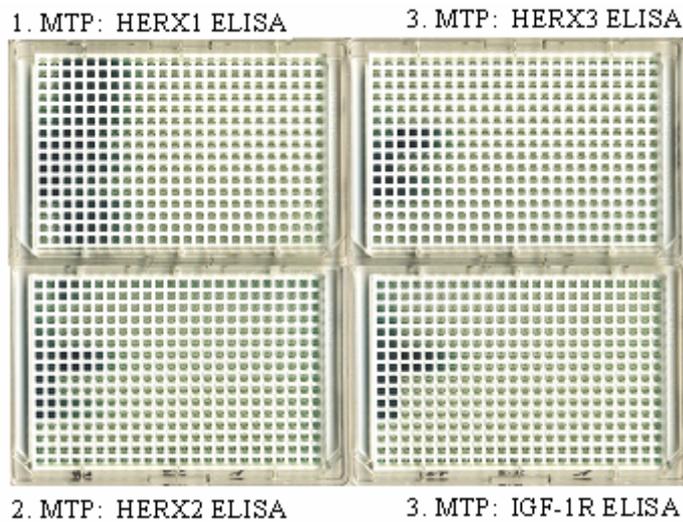


Abb.24: Farbentwicklung in der 384 Well Mikrotiterplatte des Sekundärscreening

1.MTP: HERX1 ELISA

OD (mE)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
A	212	166	2440	2558	2683	2457	1901	1050	408	307	223	223	194	219	203	190	207	186	210	212	213	225	229	200	
B	176	136	2545	2562	2741	2392	1759	993	359	220	152	129	139	129	123	120	119	129	125	142	158	144	141	217	
C	212	170	1780	2201	2241	1753	950	461	236	167	136	137	137	137	134	126	126	131	137	132	144	145	150	222	
D	247	232	1844	2064	2144	1639	813	366	215	162	132	125	126	122	127	139	127	141	137	139	144	136	126	202	
E	375	333	1566	2162	2004	1879	1042	479	249	174	144	130	132	142	136	131	140	133	138	140	137	137	126	214	
F	531	520	1535	1859	2190	1849	937	458	250	193	143	134	132	134	128	126	137	130	125	126	148	128	136	204	
G	919	876	2678	2454	2245	890	322	189	144	129	126	132	128	144	131	130	142	140	142	151	142	151	127	188	
H	1267	1299	2714	2568	2467	834	332	188	154	135	126	131	129	131	129	130	136	148	133	142	144	146	124	181	
I	1650	1810	1622	2048	2013	1494	835	372	215	158	142	142	132	128	130	129	142	136	144	142	148	147	123	201	
J	2132	2215	1593	2026	2062	1469	776	359	217	163	145	143	131	141	133	142	134	148	141	139	142	154	138	184	
K	2410	2540	1338	1217	758	374	232	158	139	143	128	132	136	132	133	145	136	139	143	150	143	145	137	208	
L	2330	2460	1119	1046	646	365	211	167	146	143	143	142	149	140	134	133	143	144	141	153	145	154	150	184	
M	130	102	1897	2100	2204	1627	857	383	234	163	156	152	139	149	142	146	143	142	140	147	136	171	133	218	
N	135	105	1761	1896	2140	1474	728	370	232	170	149	144	150	147	133	138	142	147	144	142	147	149	125	226	
O	162	108	1652	2271	2136	1253	637	312	195	165	161	151	134	150	141	149	147	149	143	153	158	153	160	223	
P	189	137	1668	2004	2021	1184	611	365	237	221	216	203	201	197	201	207	208	192	221	225	193	230	190	180	
-K																									

2.MTP: HERX2 ELISA

OD (mE)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
A	205	208	1496	751	425	276	248	215	208	210	205	191	193	185	180	168	193	179	175	185	200	185	201	216	
B	292	257	1387	686	313	255	205	195	178	177	193	187	188	196	197	204	195	200	219	225	222	227	241	220	
C	349	300	168	164	162	169	159	160	164	169	168	166	179	157	186	180	170	191	185	205	186	195	215	225	
D	407	370	157	156	157	147	153	157	160	157	152	165	167	176	167	174	170	174	188	194	186	201	206	220	
E	561	508	148	149	150	152	153	153	181	154	162	156	160	176	179	176	160	164	201	202	183	209	211	217	
F	760	745	158	176	156	155	162	151	163	166	151	170	159	164	165	173	174	165	173	169	180	188	206	217	
G	1195	1032	2743	2548	2213	1159	476	248	186	167	172	162	154	161	169	174	159	177	189	182	189	211	209	208	
H	1245	1085	2579	2427	2186	1209	493	262	183	193	160	184	167	161	159	172	168	187	180	185	204	210	218	229	
I	1404	1378	160	165	168	171	159	163	179	167	160	154	159	166	162	159	165	178	174	171	194	208	229	218	
J	1536	1626	145	162	177	160	174	175	164	178	166	173	181	175	151	176	199	187	176	191	232	191	220	223	
K	2321	2400	938	812	570	342	252	195	172	177	169	157	165	166	191	163	183	184	189	181	188	217	218	209	
L	2589	2472	861	798	556	380	244	210	184	175	163	179	176	187	180	168	208	183	194	189	196	231	236	215	
M	204	186	184	173	171	164	160	173	184	166	185	180	168	193	179	175	185	177	170	198	194	208	223	208	
N	175	216	170	188	191	168	190	171	177	173	177	174	176	183	175	199	168	177	200	185	201	216	235	210	
O	184	132	212	203	201	209	198	210	194	199	209	215	208	210	205	191	193	220	225	220	217	245	237	181	
P	170	162	269	208	210	205	191	201	202	183	209	195	200	219	225	222	227	189	182	189	211	209	220	217	
-K																									

3.MTP: HERX3 ELISA

OD (mE)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
A	200	160	210	215	194	189	198	197	202	198	197	212	199	210	219	195	213	202	229	219	238	223	217	213	
B	206	170	151	157	152	140	165	145	146	148	140	136	155	142	153	152	147	160	151	176	180	168	170	219	
C	217	187	143	133	142	133	127	151	132	214	132	137	154	148	150	137	131	139	138	150	162	161	163	226	
D	230	214	141	130	131	136	137	125	140	138	118	133	143	142	132	151	154	134	150	163	144	161	154	221	
E	311	270	136	132	139	140	125	140	128	130	142	132	134	139	137	143	152	148	174	164	158	161	152	226	
F	381	370	149	136	149	136	132	133	129	151	125	143	137	146	143	131	146	146	144	171	170	166	156	206	
G	649	612	2664	2542	2091	952	375	213	153	134	139	133	138	151	129	152	146	147	156	160	161	173	150	198	
H	951	1090	2548	2397	2145	920	381	221	181	139	144	149	154	150	158	143	162	150	154	141	157	160	162	208	
I	1660	1661	152	140	145	134	140	140	135	132	136	143	141	160	143	144	140	136	149	152	166	164	144	210	
J	2136	2097	139	142	135	144	131	141	145	141	140	140	166	139	142	150	145	146	147	159	145	178	151	217	
K	2245	2321	2150	1224	577	281	196	146	140	142	143	148	147	137	141	142	139	155	171	159	163	170	163	237	
L	2366	2438	2063	1085	531	290	182	164	156	172	141	148	159	150	149	146	155	152	163	167	169	181	161	206	
M	172	147	150	139	136	156	148	150	143	151	165	142	150	162	156	144	147	155	154	152	162	202	156	223	
N	170	145	157	158	144	147	148	161	148	154	148	155	147	149	149	153	156	163	162	187	160	167	168	215	
O	193	156	179	165	159	166	160	156	167	161	148	162	157	154	160	166	163	163	162	160	170	171	186	229	
P	117	179	184	186	174	189	205	215	185	207	198	215	199	203	216	221	227	209	233	221	230	256	236	252	
-K																									

4.MTP: IGF-1R ELISA

OD (mE)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	210	120	161	157	158	175	173	180	174	183	168	180	182	167	169	177	160	153	158	167	153	202	200	182
B	190	214	143	154	153	136	131	151	144	136	135	135	162	142	138	134	139	143	154	155	167	169	177	203
C	440	380	127	125	130	127	124	134	142	142	130	137	137	146	153	137	136	132	149	134	159	165	156	206
D	738	694	135	131	128	139	129	123	138	130	128	134	147	137	136	140	151	148	152	155	151	154	166	234
E	1002	955	133	130	130																			

## 11.2. Bilder



Abb.25: Mikrotiterplattenwascher (EMBLA)



Abb.26: Mehrkanal-Pipetten (Matrix)



Abb.27: Multi-Dispenser (Matrix)



Abb.28: Micronics (Matrix)



Abb.29: CyBi-Well Pipettor



Abb.30: ELISA-Reader (TECAN)

### **11.3. CD mit Internetseiten**