

Facharbeit

Aus dem Fach

Chemie

Thema: Reinigung therapeutischer Antikörper

Verfasser: Fabian Winter

Leistungskurs: 3C1

Kursleiter: Lass K. Gallenberger

Abgabetermin:

Erzielte Note: In Worten:

Erzielte Punkte: In Worten:

Abgabe beim Kollegstufenbetreuer am

.....

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG	S.5-12
1. Definition und Struktur von Antikörpern	S.5-6
2. Verschiedene Antikörperklassen	S.6-9
3. Herstellung Therapeutischer Proteine	S.9-10
4. Verschiedene Reinigungsmethoden für Antikörper	S.10-12
II. MATERIAL	S.12-13
1. Materialien	S. 12
2. Geräte	S. 12-13
III. METHODEN	S.13-20
1. Aufreinigungsmethoden	S.13-15
1.1 Affinitätschromatographie	S. 13-14
1.2 Size Exclusion Chromatographie	S. 14-15
2. Analytische Methoden	S.16-20
2.1 High Pressure Liquid Chromatographie	S.16-17
2.2 SDS- Page	S.18-19
2.3 Photometrie	S.19-20
IV. DURCHFÜHRUNG	S.20-25
1. Aufreinigung	S.20-25
1.1 Protein A Affinitätschromatographie	S.20-22
1.2 Size Exclusion Chromatographie	S. 22-23
2. Analytische Methoden	S. 23-25

V. ERGEBNISSE	S.25-31
1. Reinigung und Analytik	S.25-30
2. Zusammenfassung der Ergebnisse	S.30-31
VI. QUELLENVERZEICHNIS	S.31-32
1. Bilderverzeichnis	S.31
2. Literaturverzeichnis	S.31-32
VII. DANKSAGUNG	S.33

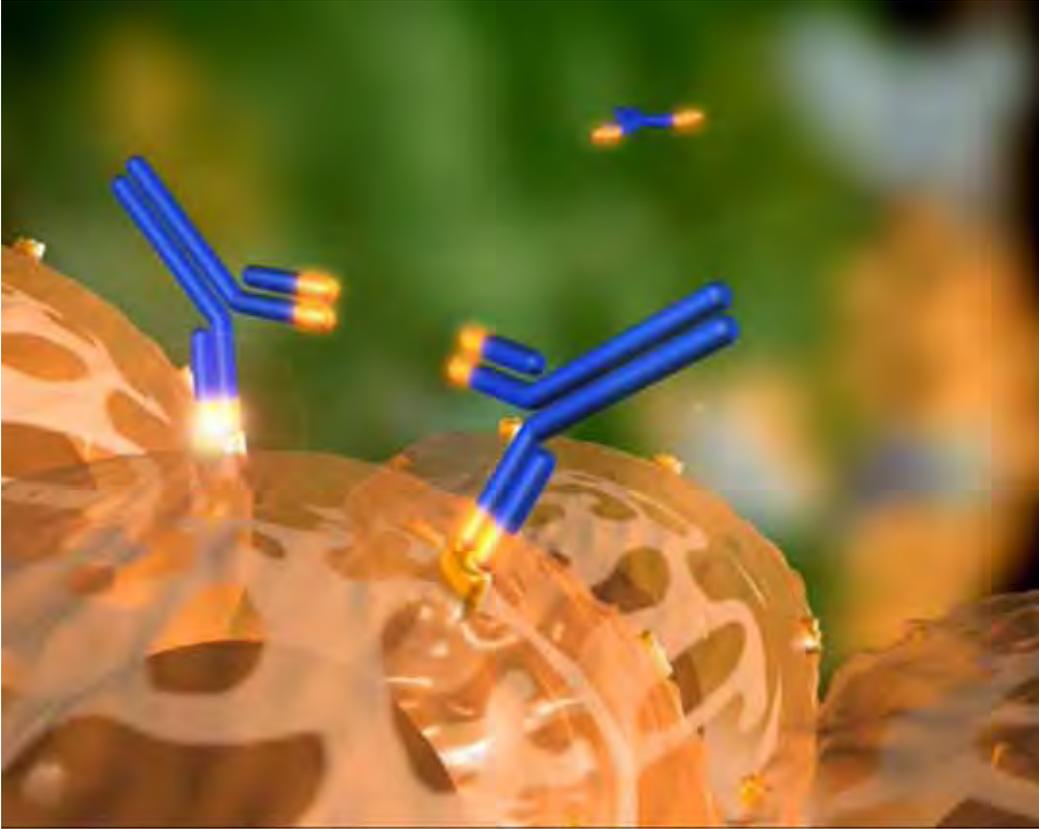


Abb. 1 Ein Antikörper bindet an ein Bakterium (Schemabild)

http://www.handzeichen-gegen-krebs.de/download/Andocken_Antikoerper.jpg

Vorwort

In der modernen Gesellschaft sind Medikamente nicht mehr wegzudenken. Das Spektrum der Arzneimittel reicht dabei von der einfachen Kopfschmerztablette, z.B. dem mehr als 100 Jahre alten Aspirin bis hin zu den neuen biotechnologischen Arzneistoffen, auch therapeutische Proteine genannt. Mit diesen modernen Arzneimitteln ist es heute zum Teil möglich bisher als unheilbar angesehene Krankheiten, wie z.B. Krebs, zu therapieren. So ist bei einer bestimmten Form des Brustkrebses der Therapieerfolg nach Gabe des therapeutischen Antikörpers Herceptin sehr groß.

Therapeutische Antikörper stellen die derzeit größte und wichtigste Gruppe der biotechnologisch gewonnenen Arzneistoffe dar. Es gibt bereits mehr als 30 Antikörper im Markt und weit mehr als 100 weitere sind in der Entwicklung.¹ Von der Idee bis zum fertigen Medikament ist es allerdings ein sehr langer Weg. In Laufe meines 2-wöchigen Praktikums bei der Firma Roche Diagnostics GmbH in Penzberg habe ich beispielhaft einen Schritt daraus, die Reinigung eines wichtigen therapeutischen Antikörpers, genauer beobachtet und selbst durchgeführt. Darauf werde ich im experimentellen Teil der Arbeit näher eingehen.

I. Einleitung

1. Definition und Struktur von Antikörpern

Antikörper sind Proteine, welche der Klasse der Glykoproteine angehören, d.h. sie bestehen aus einem Proteingrundgerüst und daran angehefteten Zuckerketten. Sie werden den Immunglobulinen (Ig) zugeordnet. Antikörper werden bei den Wirbeltieren als Reaktion auf Fremdstoffe, die Antigene, gebildet.² Sie sind damit Teil der Immunabwehr des Körpers. Antikörper binden das in den Körper eingedrungene Antigen und machen es zum Teil dadurch bereits unschädlich. Die Bindung eines Antikörpers an ein Antigen erfolgt mittels Ionenbindung, Wasserstoffbrückenbindung und Van der Waals Kräften. Weiterhin wird nun das vom Antikörper gebundenen Antigen leicht von Makrophagen (Fresszellen) und anderen Zellen des Immunsystems erkannt und vernichtet. Dazu kommt, dass nach dem Kontakt mit dem Antigen sehr viele neue Antikörper dagegen produziert werden und zwar von einer bestimmten Klasse von weißen Blutzellen, den sogenannten B- Lymphozyten oder B-Plasmazellen.³ Diese Blutzellen tragen auf ihrer Oberfläche ein bestimmtes membran-gebundenes Antikörpermolekül, das als Rezeptor zum Erkennen eines bestimmten Antigens dient. Diese Blutzellen sind meist nicht in der Lage die genaue Struktur des Antigens zu erkennen, sondern nur einen bestimmten Teil. Dieser Teil ist die antigene Determinante. Jeder Antikörper besitzt also eine Binderegion für ein Antigen. Diese Binderegion wird

¹ Vgl Kayser/Müller (2000). 87-91

² Vgl Schug Facharbeit (2008)

³ <http://www.meine-molekuele.de/antigene-antikoerper>

als variabler Teil der Antikörper bezeichnet, der Rest der großen Antikörpermoleküle in einem Lebewesen ist praktisch immer gleich aufgebaut.

Die Grundstruktur jedes Antikörpers ist ein Y-förmiges Molekül (Abb. 2).⁴ Es besteht aus zwei identischen großen Proteinketten, sog. „heavy chains“ und zwei weiteren, ebenfalls zueinander identischen, kleinen „light chains“, die alle durch Disulfidbrücken zu der oben genannten Y-förmigen Struktur miteinander verbunden sind. Die „light chains“ haben jeweils eine konstante, sowie eine variable Domäne, die „heavy chains“ bestehen aus drei konstanten und nur einer variablen Domäne. Wie bereits oben erwähnt, bilden die variablen Domänen jeweils die Antigenbindungsstellen.⁵

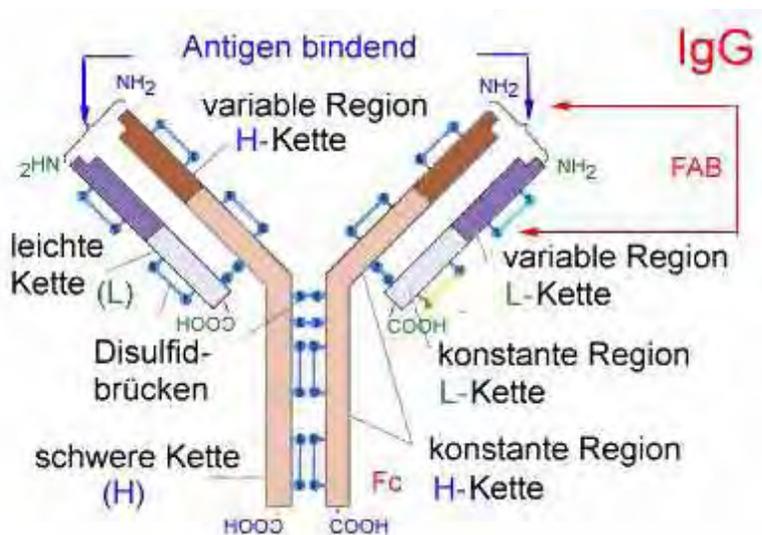


Abb. 2 : Struktur eines Antikörpers⁶

2. Verschiedene Antikörperklassen

Die Gruppe der Antikörper wird bei den Wirbeltieren in verschiedene Klassen (Isotypen) und Subklassen unterteilt. Die jeweiligen Antikörperklassen unterscheiden sich dabei in ihrer Struktur, der Effektorfunktion und ihren Aufgaben. Es gibt fünf Isotypen für die „heavy chains“, welche als γ , α , μ , δ , und ϵ bezeichnet werden und zwei Isotypen der leichten Ketten, genannt Kappa κ und Lambda λ . Die Immunglobulin-

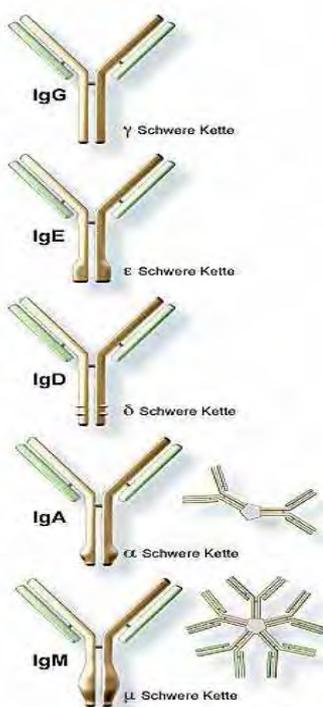
⁴ <http://www.nhl-info.de/exec/start?site=/infopool/281.htm&check=0>

⁵ Vgl. Rassow (2006), 702-703, Horn (2005) 593ff.

⁶Vgl. <http://www.zum.de/Faecher/Materialien/beck/bilder/IGG1.gif>

klassen sind durch die nicht variablen Teile der schweren Ketten gekennzeichnet und somit unterscheidet man 5 Immunglobuline: IgG, IgM, IgA, IgD und IgE.⁷

IgD Antikörper enthalten schwere δ -Ketten und kommen auf der Oberfläche von B-Zellen vor. IgD ist nur in sehr geringen Mengen in sezernierter Form in Blut und Lymphe vorhanden. Die genaue Funktion von IgD ist bisher immer noch nicht im Detail verstanden.⁸



Klasse	Strukturschema	Hauptaufgaben
IgG		häufigste Antikörper (70-75 %) der Immunglobuline, vorwiegend in Lymphe und Zwischenzellflüssigkeit
IgM		ca. 10 % der Immunglobuline, führen ersten Angriff gegen Mikroorganismen in der Blutbahn durch
IgA		ca. 15 % der Immunglobuline, vorwiegend in Schleimhäuten und Darmwand, außerdem in der Muttermilch (s. 2.1.1), schützen Schleimhäute
IgD		unter 1 % der Immunglobuline, beeinflussen Lymphozyten
IgE		unter 1 % der Immunglobuline, verantwortlich für viele Allergie-Reaktionen (s. 2.5.1), binden an Mastzellen, aktivieren das Immunsystem

Abb. 3. Darstellung der Struktur Ig- Klassen⁹ Abb. 4 Vorkommen der Antikörperklassen¹⁰

IgA Antikörper enthalten schwere α -Ketten. IgA sind vor allem in den Schleimhäuten zu finden. Die wichtigste Funktion der IgA Antikörper ist die Neutralisation von Mikroorganismen, sie hindern diese damit am Eindringen in den Organismus. Sezerniertes IgA kommt in Form von Homodimeren vor.

IgM Antikörper enthalten schwere μ -Ketten Bei IgM kommen sowohl Monomere, d.h. einzelne Antikörpermoleküle, als auch Pentamere vor, was bedeutet, dass fünf IgM-

⁷Vgl. Schug Facharbeit (2008)

⁸ Vgl. <http://www.nhl-info.de/exec/start?site=/infopool/281.htm&check=0>

⁹ Vgl. http://www.nhl-info.de/infopool/images/AntikoerperSorten_2.jpg

¹⁰ Vgl. <http://www.zum.de/Faecher/Materialien/hupfeld/Referate/immunsystem/antikoerper-klassen-2.gif>

Moleküle durch sogenannte „Joining Peptide“ (J-Ketten) zu einem Kreis verbunden sind. In Abb. 3 ist das u.a. graphisch dargestellt.¹¹

Jedes IgM-Molekül hat dadurch zehn identische Bindungsstellen für ein Antigen und kann Strukturen mit gleichartigen Epitopen binden. Das Fünffachmolekül wird sehr früh im Infektionsverlauf gebildet, vor allem dann, wenn der Erreger ein bis dahin unbekannter Erreger war.

IgE enthalten schwere ϵ -Ketten und werden in größeren Mengen beim Vorliegen einer Allergie gebildet (Heuschnupfen, Lebensmittelallergien, Stauballergie). Auch spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Abwehr multizellulärer Parasiten, wie zum Beispiel Würmern.¹²

IgG ist das kleinste der Immunglobuline, aber der typischste und bekannteste Antikörpertyp. Er stellt ca. 75% des Gesamtglobulins im Serum dar, wobei die Gesamtmenge wiederum in vier Subklassen aufgeteilt werden kann (IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4). Das wichtigste davon ist das IgG1 Immunglobulin, welches ca. 70% ausmacht. Im IgG1 sind die meisten protektiven antibakteriellen und antiviralen Antikörper enthalten. Niedrige Konzentrationen an IgG in Blut und Lymphe führen deshalb zur allgemeinen Immundefizienz. Die verschiedenen Subklassen der IgGs besitzen auch unterschiedliche Eigenschaften. Bei IgG1 sind die schweren Ketten über zwei Disulfide verbrückt, bei IgG3 sind es fünfzehn Disulfidbrücken. Dadurch gibt es große Unterschiede in der Geschwindigkeit und Vollständigkeit der Oxidation/Reduktion dieser Bindungen und damit der Stabilität der Moleküle.¹³

IgG ist das am häufigsten pharmazeutisch und diagnostisch verwendete Immunglobulin. Im Rahmen meiner Facharbeit habe ich selbst einen IgG1-Antikörper gereinigt und analysiert.¹⁴

¹¹ Vgl. http://www2.biologie.uni-halle.de/genet/plant/staff/koebnik/teaching/biotech/plantibody/plantibody_11a.pdf

¹² Vgl. <http://www.nhl-info.de/exec/start?site=/infopool/281.htm&check=0>

¹³ Vgl. <http://www.medizinfo.de/immunsystem/abwehr/immunglobuline.html>, Rassow (2006), 704-710, Horn (2005), 593ff.

¹⁴ Vgl. <http://www.netdokter.de/Diagnostik+Behandlungen/Laborwerte/Immunglobuline-Ig-1286.html>

3. Herstellung therapeutischer Proteine

Für die Herstellung von therapeutischen Antikörpern bzw. aller Pharmaproteine ist die Gentechnik von grundsätzlicher Bedeutung. Das erste gentechnisch hergestellte pharmazeutische Produkt war Humaninsulin, das bis dahin nur aus der Bauchspeicheldrüse von Schweinen oder Rindern gewonnen werden konnte und deshalb stets Risiken bzgl. Allergien, sowie der Übertragung von Maul und Klauenseuche (MKS) und Boviner spongiformer Enzephalopathie (BSE) aufwies. Diese Risiken sind heute vollständig beseitigt worden. Danach wurden zunächst die wichtigsten körpereigenen Hormone und Wachstumsfaktoren wie Erythropoetin (Epo), Wachstumshormone, Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) und die Interferone gentechnisch hergestellt. Bald kamen auch die Antikörper dazu. Im Jahre 2000 wurden 43 gentechnisch produzierte Fertigpräparate mit 29 verschiedenen Wirkstoffen angeboten. Heute sind es ca. 100 und viele weitere stehen vor der Zulassung. Der Herstellungsprozess für rekombinante Proteine beinhaltet immer sowohl gentechnische als auch biotechnologische Elemente. Im Wesentlichen umfasst die biotechnologische Herstellung von Pharmaproteinen folgende Schritte.¹⁵

Zuerst muss das Gen identifiziert werden, das für das zu produzierende Protein die genaue Information (genetischer Code) enthält. Dies ist der erste, bei Antikörpern sehr komplexe Teil der gentechnologischen Seite. Sobald die genetische Information klar ist, muss sie in Form eines Plasmids auf eine Zelle übertragen werden, die später dieses Protein produzieren soll. Prinzipiell können das verschiedene Zellen sein, allerdings können Bakterien keine glykosilierten Proteine herstellen und kommen deshalb für die Produktion von Antikörpern nicht in Frage. Hier nimmt man Säugetierzellen (z.B. CHO-Zellen = Chinese Hamster Ovary-Zellen), die allerdings schwieriger zu vermehren sind. Das Plasmid muss also in die Zelle eingebracht werden, man nennt dies Transfektion. Da Plasmide (DNA) negativ geladen sind, treten sie nicht ohne weiteres durch die Zellmembran. Deshalb muss man mit Transfektionsmethoden wie z.B. kationischen Liposomen, Viren oder Elektroporation nachhelfen. So transfizierte Zellen werden nun mit Hilfe der Biotechnologie massiv vermehrt. Man füttert sie in Fermentern mit Nährstoffen wie Salzen, Zuckern und Aminosäuren und hält sie bei einem bestimmten pH-Wert und Sauerstoffgehalt. Dabei produzieren die Zellen das gewünschte Protein, d.h. die Expression des Proteins hat funktioniert. Damit dies gut

¹⁵ Vgl. Kayser/Müller (2000). 87-91

gelingt, muss auf dem Plasmid neben dem eigentlichen Code für das Protein noch mehr Informationen eingeschleust werden, sogenannte Promotorsequenzen sind dazu wichtig. Wenn das alles korrekt funktioniert, vermehren sich die Zellen so stark, dass man sie auch in sehr großen Fermentern bis zu 10000 Liter züchten kann.¹⁶ Um nun an das gewünschte Pharmaprotein zu gelangen, muss man das von den Zellen in die Fermenterbrühe sezernierte Protein isolieren. Diesen letzten Schritt der gentechnischen Produktion nennt man die „Aufreinigung“ oder auch „Downstreaming“. Dazu wird der sog. „Zellkulturüberstand“ zunächst einfach durch Zentrifugation oder Filtration von den Zellen abgetrennt. Der Zellkulturüberstand enthält neben dem gewünschten Protein aber noch eine Vielzahl von Begleitstoffen, angefangen von den Bestandteilen der Nährlösung über andere Proteine, Kohlenhydrate, DNA, Zellbruchstücke bis hin zu Viren.¹⁷ Relativ einfach ist es dabei noch, die in Wasser unlöslichen Bestandteile abzutrennen und das lösliche Protein durchzulassen, doch es gibt noch jede Menge löslicher Begleitstoffe. Dabei sind vor allem die strukturell dem Arzneiprotein grundsätzlich ähnlichen Zellproteine zu nennen.¹⁸

4. Verschiedene Reinigungsmethoden für Antikörper

Es gibt in der heutigen Zeit viele verschiedene Möglichkeiten einen therapeutischen Antikörper zu reinigen. Ich möchte nun die wichtigsten Möglichkeiten ganz allgemein erklären, auf einige werde ich später in Kapitel III noch genauer eingehen.

Die Techniken der Chromatographie ermöglichen es, bestimmte chemische Verbindungen, wie auch Proteine, voneinander zu trennen und damit zu reinigen. Chromatographische Techniken basieren auf einem 2 Phasensystem.¹⁹ Es gibt eine sogenannten stationäre (feste) Phase und eine mobile (bewegliche) Phase. Die mobile Phase kann entweder flüssig oder gasförmig sein und bewegt sich an der stationären Phase, welche flüssig oder fest ist, vorbei. Auf Grund der verwendeten mobilen Phase unterteilt man die Chromatographie in Flüssig- und Gaschromatographie, entsprechend

¹⁶ Vgl. Crommelin/Sindelar (2002), 54-55.

¹⁷ Vgl. Wink (2004), 131.

¹⁸ Vgl. Kayser/Müller (2000), 73-75.

¹⁹ Vgl. <http://de.wikipedia.org/wiki/Chromatographie>

den bei der stationären Phase verwendeten Trägern lassen sich dann weitere Untergruppen einteilen.

An der stationären Phase kommt es zur Wechselwirkung mit den Molekülen der Probe. Sie verteilen sich in die stationäre Phase hinein und werden ggf. nach einer bestimmten Zeit wieder in die mobile Phase zurückverteilt. Diese Grundvorgänge wiederholen sich über die Chromatographiestrecke hinweg immer wieder. Die Trennung beruht letztlich auf den verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeiten der verschiedenen Teilchen durch die Trennsäule aufgrund der unterschiedlich starken Wechselwirkungen.²⁰ Dabei unterscheiden sich die Moleküle, die zu trennen sind, in Größe, Ladung, Lipophilie. Die Art der Wechselwirkung unterscheidet sich bei den einzelnen chromatographischen Trennmethoden.²¹

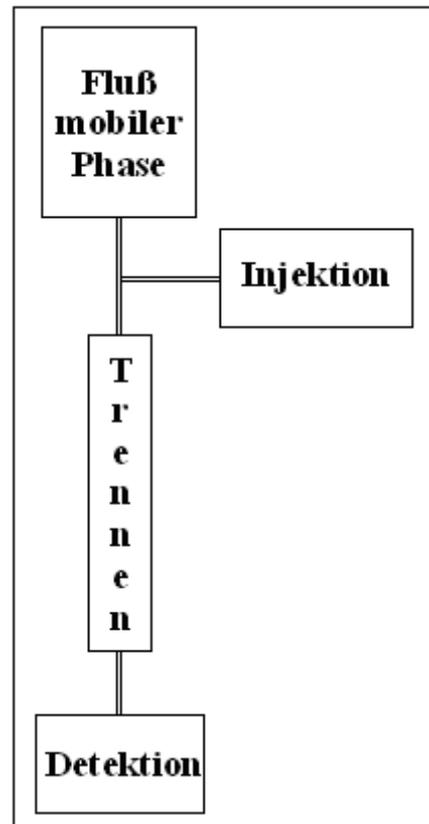


Abb. 5 Chromatographie²²

Eine der bei Schülern bekanntesten Methoden ist die Papierchromatographie. Dabei besteht die stationäre Phase aus einem Filterpapier, die mobile Phase, das Fließmittel, ist eine Flüssigkeit.

Die für die Proteinaufreinigung wichtigsten Methoden sind die Gelfiltration, die aufgrund der Größe von Molekülen trennt, die Affinitätschromatographie, die nach der biospezifischen Wechselwirkung trennt, sowie die hydrophobe Interaktionschromatographie und die Ionenaustauschchromatographie, welche aufgrund von hydrophoben und ionischen Wechselwirkungen die Proben auftrennen. Alle genannten Methoden sind Beispiele für die Flüssigkeits-Säulenchromatographie. Diese ist die am häufigsten in Laboren verwendete Arbeitstechnik. Das mit Abstand wichtigste System ist heute die sogenannte „High Pressure Liquid Chromatographie“, kurz HPLC genannt. Sie zeichnet sich gegenüber anderen Chromatographien durch Automation, hohe Auflösung, gute

²⁰ Vgl. Crommelin/Sindelar (2002), 46-48.

²¹ Vgl. Häder/Häder (1998), 189.

²² <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/de/9/91/ChromatographieSchematisch.png>

Reproduzierbarkeit und Schnelligkeit aus. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Maschinen mit hohem Druck arbeiten können, wodurch Säulenfüllungen mit sehr kleiner Teilchengröße benutzt werden können. Die Hochdruckpumpe bewirkt, dass die flüssige Phase den Widerstand der festen Phase durchbrechen und somit mit höherer Geschwindigkeit gearbeitet werden kann.²³

Bei der Gaschromatographie bewegt das Trägergas, welches als mobile Phase dient, die Probenkomponenten durch das System. Durch den Detektor wird erkennbar, wann die Probe aus dem System austritt. Die Gaschromatographie zeichnet sich durch eine schnelle Trennungsgeschwindigkeit aus und basiert auf dem adsorptionschromatographischen Trennprinzip.²⁴

II. Material

1. Materialien

Liste befindet sich im Anhang

2. Geräte

Geräte	Hersteller
pH- Messer, Calimatic	Knick
Pump-50,Control Unit UV-1, Optical Unit UV-1,Schreiber Rec 102	Pharmacia Biotech Pump-50 Baujahr 1994
Photometer Uvikon 930	Kontron
P 680 HPCL Pump	Dionex
ASI-100 Automated Sample Injector	Dionex
Äkta Explorer (Pump-900, UV-900, PH-900)	GE
Elektrophoresis Power Supply-EPS 600	Pharmacia Biotech
Bio Rad Power Pac 300	

²³ Vgl. Kaltenböck (2008)

²⁴ Vgl. Crommelin/Sindelar (2002), 46.

Centrifuge 4K15	Sigma
Thermomixer Comfort	Eppendorf

III. Methoden

In dem folgenden Kapitel möchte ich nun genauer auf die Reinigungs- und Analysenmethoden eingehen, mit denen ich im Laufe meines Praktikums bei der Firma Roche Diagnostics gearbeitet habe.

1. Aufreinigungsmethoden

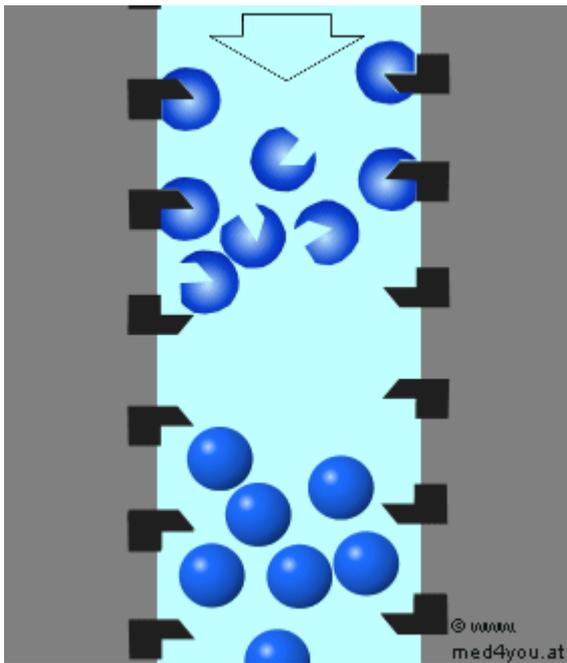
1.1 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie besitzt ein extrem spezifisches Trennungsvermögen, da die Trennung nicht auf physikalisch-chemische Unterschiede zwischen Makromolekülen beschränkt ist, sondern auf der Basis ihrer biospezifischen Wirkung (bei meinem Praktikum Ligand-Antikörper) trennt. Das Trägermaterial der Säule besteht aus einer festen Substanz, an die sogenannte Liganden kovalent gekoppelt sind. Ein dafür geeigneter Ligand muss eine hohe Affinität zu der Probe, die man binden will, aufweisen, sie darf aber auch nicht zu stark sein, da sonst die gebundenen Proteine nur durch denaturierende Bedingungen wieder abgelöst werden können.²⁵ Weiterhin muss der Ligand über funktionelle Gruppen verfügen. Bei der Auftrennung bindet nur genau eine Sorte von Makromolekülen, die die richtige Affinität zu dem Liganden aufweist.²⁶ Eine geeignete Reaktion dafür ist die Bindung von Antikörper und Antigen, eines von beiden kann als Ligand, das andere als isolierende Komponente fungieren. Die Moleküle, die nicht gebunden werden, können die Säule ungehindert passieren. Danach werden die gebundenen Moleküle durch geeignete Lösungsmittel eluiert und man hat sie als Proteine im Eluat. Eine auf der Affinitätschromatographie aufbauende Reinigungsmethode ist die Protein A Chromatographie. Diese ist eine der am weitest verbreiteten Reinigungsmethoden zur Antikörperreinigung. Protein A ist ein bakterielles Zellwandprotein von *Staphylococcus aureus* mit einer spezifischen Affinität zur Fc-Region von Immoglobulinen der G-Klasse (IgG). Protein A hat eine Größe von 40-60 kDa und weist eine hohe pH-Stabilität im Bereich von pH 2-10 auf.²⁷ Die

²⁵ Vgl. Häder/Häder (1993), 203-205.

²⁶ Vgl. Crommelin/Sindelar (2002), 48.

²⁷ http://de.wikipedia.org/wiki/Protein_A



Bindungsaffinität zum Fc-Teil der Antikörper ist pH-abhängig und nach der Bindung von Antikörpern in neutraler oder leicht alkalischer Lösung, lassen sich die Immunglobuline bei niedrigerem pH-Wert gut eluieren.²⁸ Da IgG, wie oben beschrieben, der am häufigsten therapeutisch eingesetzte Antikörpertyp ist, ist die Protein A Methode im industriellen Maßstab heute das wichtigste Verfahren bei der selektiven Antikörperaufreinigung.

Abb. 6 Affinätschromatographie²⁹

1.2 Size Exclusion Chromatographie (SEC)

Diese Art der Chromatographie ist nur dazu da, die Teilchen verschiedenerer Größe zu unterscheiden und dann zu trennen. Bei der „Size Exclusion Chromatographie“ oder auch Gel-Permeations-Chromatographie, handelt es sich um eine Form der Flüssigkeits-Chromatographie, die sowohl präparativ, wie in diesem Fall oder auch analytisch in Form der „High Pressure Liquid Chromatographie“ angewandt werden kann.³⁰ Die Trennsäulen einer SEC bestehen aus Polymer-Gelperlen mit Poren von genau definiertem Durchmesser. Dieser Durchmesser liegt im Bereich von ca. 5-15 nm.³¹ Die wichtigsten Bestandteile einer SEC sind Pumpe, Injektionssystem, Trennsäule und verschiedene Detektoren. Durch die Pumpe wird ein gleichmäßiger Fluss im gesamten System gewährleistet, sowie der notwendige Druck erzeugt, um den durch das dicht

²⁸ <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/antibodies/antibody-products.html?TablePage=9679188>

²⁹ <http://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/chromatographie/affinity.gif>

³⁰ Vgl. Wink (2004), 137-140.

³¹ Vgl. Mori/Barth (1998)

gepackte Säulenbett hervorgerufenen Widerstand zu überwinden.³² Injiziert man eine Probe in das System, diffundieren die kleineren Moleküle in die Poren des Gels. Bei den größeren Molekülen findet diese Diffusion weniger statt und sie verlassen dadurch die Trennsäulen deutlich schneller als die kleineren, die erst im weiteren Verlauf wieder aus den Poren heraus diffundieren.³³ Wie bei allen Chromatographieanlagen ist auch hier ein Detektor angeschlossen, mit dessen Hilfe man die Konzentration des Proteins im Eluat messen kann. Durch den Detektor sind verschiedene Proteinpeaks genau sichtbar zu machen, sie können mittels des angeschlossenen Computers graphisch dargestellt und dadurch analysiert werden.³⁴ Jeder Peak steht für eine Konzentrationsänderung, hervorgerufen durch das Eluieren der verschiedenen Moleküle in der Probe.

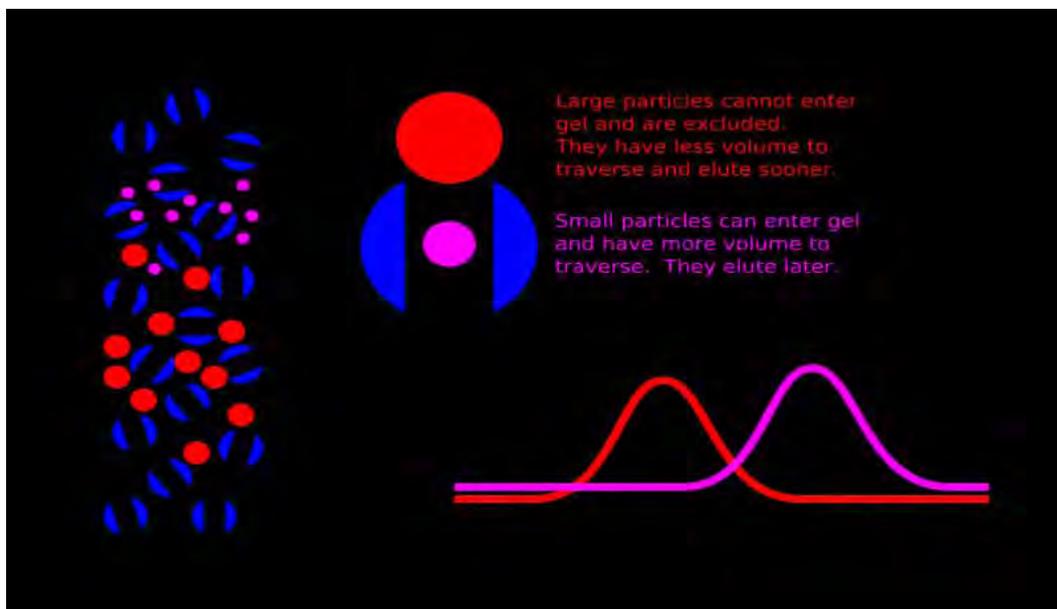


Abb. 7 Erklärung einer Size Exclusion Chromatographie³⁵

2. Analytische Methoden

2.1. High Pressure Liquid Chromatographie

Die HPLC, „high pressure liquid chromatography“, ist ein Verfahren der Säulen-Flüssigkeits-Chromatographie. Sie stellt ein Trennverfahren dar, bei dem die

³² Vgl. Crommelin/Sindelar (2002), 46.

³³ <http://de.wikipedia.org/wiki/Gelfiltration>

³⁴ http://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/chromatographie/lbef_chromatographie.htm

³⁵ <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/2/2a/SizeExChrom.png>

Probenflüssigkeit mit Hilfe einer flüssigen Phase (Eluent) unter hohem Druck über die stationäre Phase (Trennsäule) transportiert wird. Bei der HPLC finden hauptsächlich die Verfahren der Adsorptions- und Verteilungschromatographie Anwendung. Bei der Adsorptionsschromatographie werden die in der Probe enthaltenen Moleküle durch Dipol-Wechselwirkungen reversibel an die stationäre Phase gebunden. Aufgrund der verschiedenen starken Wechselwirkungen mit der Oberfläche ist die Verweildauer der Substanzen unterschiedlich lang. So werden die unterschiedlichen Proben voneinander getrennt. Bei der Verteilungschromatographie wird die unterschiedliche Löslichkeit der zu trennenden Substanzen in den beiden Phasen genutzt. Normalerweise ist die stationäre Phase polarer als die mobile Phase, nur bei un- oder wenig polaren Substanzen funktioniert das Verfahren entgegengesetzt. Die Trennsäulen der HPLC können unterschiedlich lang sein und verschiedene Durchmesser besitzen. Die längsten sind 30 cm lang, aber es gibt auch Säulen, die nur eine Länge von 1,8 cm besitzen. Der Durchmesser liegt im Bereich von 2-4,6 Millimeter. Die Säulen bestehen aus Glas oder Metall mit einer Trägermatrix, die eine ausreichende Druckstabilität aufweisen muss. Als Trägermatrix dienen sehr poröse Substanzen wie Aluminiumoxid oder Kieselgel.³⁶ Diese Säulen können kommerziell gefüllt, gekauft werden, oder selbst befüllt werden. Die verwendeten Lösungsmittel, müssen vor der Benutzung entgast werden, damit keine Gasblasen in das System eindringen. Die Probe kann auf zwei verschiedene Arten auf das System aufgetragen werden, einmal mit einer Mikrospritze, die hohen Gegendruck verträgt, wobei allerdings der Fluss der mobilen Phase kurz unterbrochen werden muss. Die andere Möglichkeit ist es, die Probe in eine Probenschleife zu geben und den Fluss der mobilen Phase umzuschalten. Die HPLC ist in der heutigen Zeit ein sehr wichtiges Analysegerät, da es eine extrem hohe Trennleistung hat. Man verwendet Trennpartikel mit Korngrößen von 3 bis 10 µm, damit werden hohe Trennstufenzahlen erreicht, aber es erfordert gleichzeitig die Überwindung eines sehr hohen Gegendrucks beim Transport der mobilen Phase durch die Trennsäule.³⁷ Der Vorteil ist, dass mit der HPLC dieser hohe Gegendruck überwunden werden kann und die Trennleistung in die Höhe geschraubt wird.

³⁶ Vgl. Häder/Häder (1993), 207ff

³⁷ Vgl. Kaltenböck 2008

Insgesamt besteht ein HPLC-Gerät aus 4 Hauptteilen: Pumpe, Einspritzsystem, Trennsäule und einem Detektor mit Auswertungssystem.

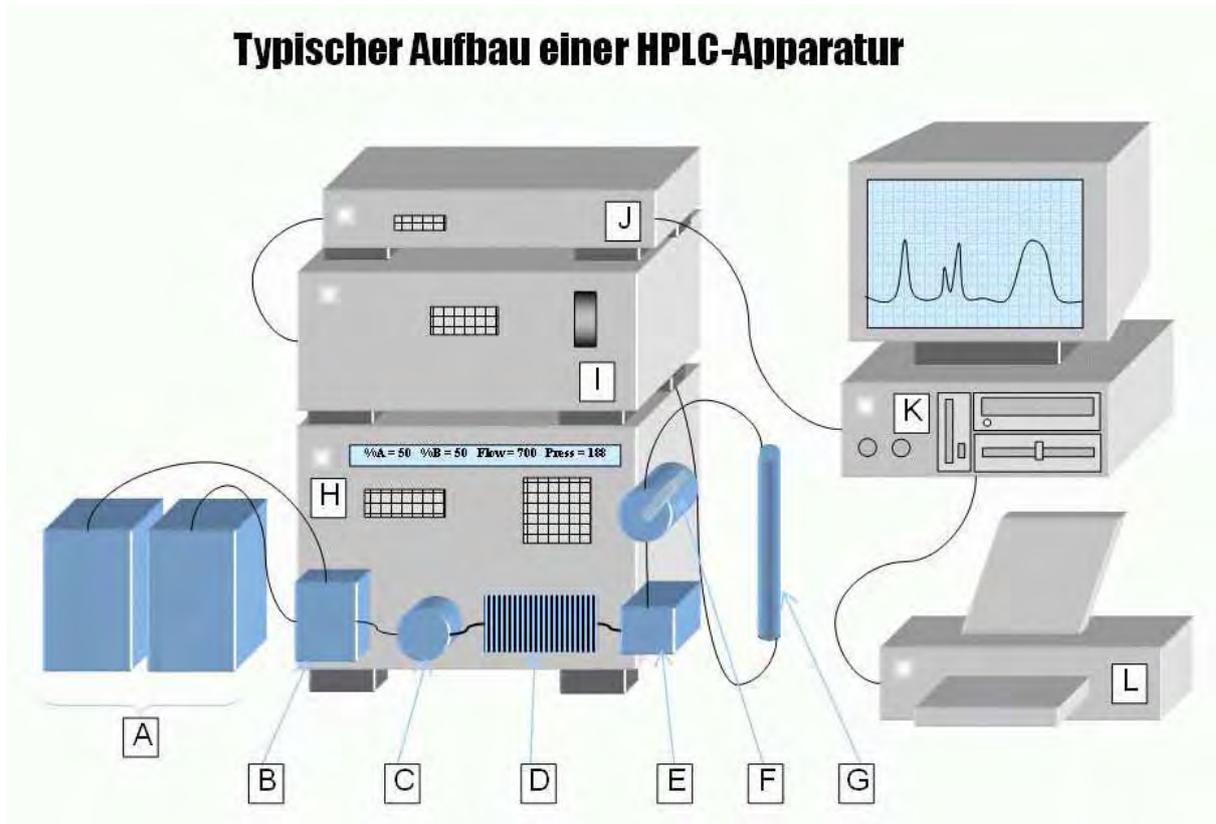


Abb. 8 Aufbau einer HPLC Apparatur³⁸

A: Eluierenreservoirs B: Elektromagnetische Mischventile mit Doppelhubkolbenpumpe
 C: Überdruckventil D: Druckkompensationsschleife E: Mischkammer
 F: RHEODYNE-Einspritzventil G: Trennsäule H: HPLC-Einheit
 I: Detektor-Einheit J: Computer-Interface K: Pc
 L: Drucker zur Ausgabe der Ergebnisse

2.2. SDS- PAGE

SDS-PAGE steht für "Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamid Gel Electrophoresis". In der Regel wird die SDS-PAGE in Gelen auf Polyacrylamidbasis durchgeführt. Je nachdem in welchem Größenbereich die aufzutrennenden Proteine liegen, können Gele mit unterschiedlichen Konzentrationen an Acrylamid verwendet werden. In der Regel

³⁸ <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/7e/HPLC.gif>

erreicht man eine gute Auftrennung über einen weiten Größenbereich bei der Verwendung von 12-14%igen Gelen. Es sind aber auch so genannte Gradientengele erhältlich, die unterschiedliche Konzentrationen von Acrylamid (z.B. 4-15%) über den gesamten Trennungsbereich aufweisen und so ein sehr breites Größenspektrum von Proteinen abdecken können.³⁹ In der Regel bestehen SDS-PAGE Gele aus zwei Gelen: einem Trenn- und einem Sammelgel. Das Sammelgel ist ein schwächer konzentriertes Gel und dient, wie der Name schon sagt, zum "Sammeln" der gesamten aufgetragenen Probe, um allen Probemolekülen den selben "Startpunkt" für die Trennung zu ermöglichen. Das ist wichtig, damit Proteine mit gleichem Migrationsverhalten nach der Trennung im Trenngel als einzelne klare Bande erscheinen. Die Rolle des Trenngels ist die Trennung der verschiedenen Proteine aufgrund ihrer Größe und der damit unterschiedlichen Laufstrecke. Fast alle Proteine sind und bleiben in Gegenwart von SDS löslich. Dadurch werden die Proteine insgesamt stark negativ geladen, ihre eigene Ladung wird also effektiv überlagert. Die Komplexe, die sich aus dem SDS und den Proteinen bilden, laufen zur Anode. Die SDS- Elektrophorese dient zur Molekulargewichtsbestimmung, da die Beweglichkeit der Moleküle nur durch ihre Größe und nicht durch die Eigenladung bestimmt wird. Als Referenz benutzt man ein Markerprotein mit bekanntem Molekulargewicht.⁴⁰

³⁹ Vgl. Häder/Häder (1993), 222ff

⁴⁰ Vgl. Lottspeich/Zorbas 1998

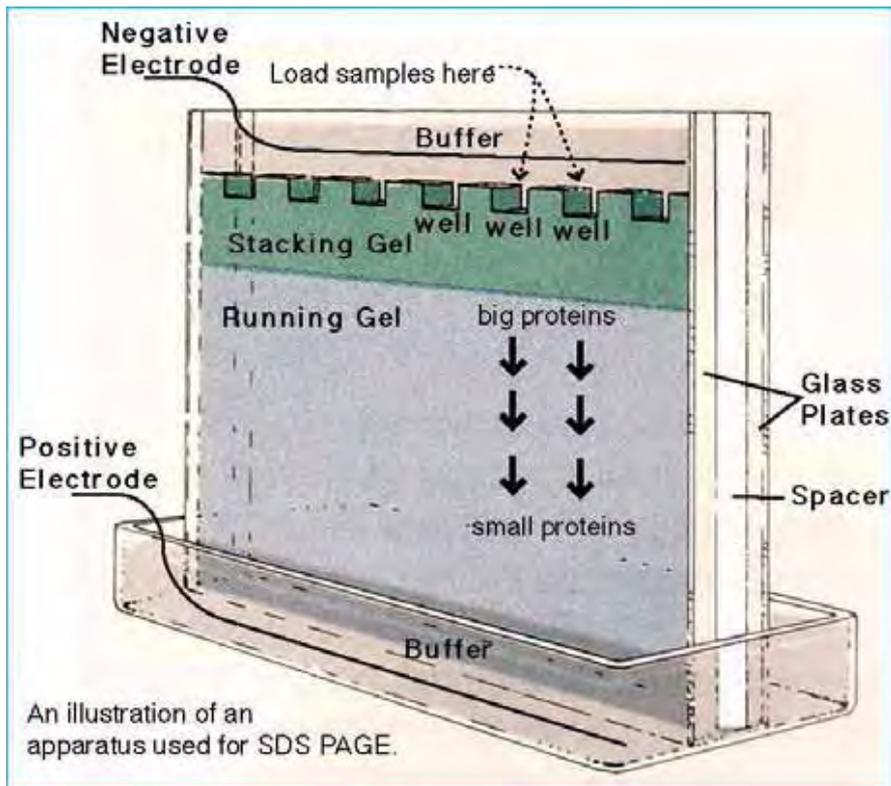


Abb. 9 Schematischer Aufbau einer SDS- PAGE⁴¹

2.3. Photometrie

Zur Messung der Absorption im UV/Vis- Bereich bis zum nahen IR werden in den heutigen biochemischen Laboren überwiegend Spektralphotometer eingesetzt, die meist einen Teil des Spektralbereichs von ca. 190 nm bis ca. 1000 nm abdecken, viele decken sogar schon den gesamten Spektralbereich ab. Bei den Photometern wird der Messlichtstrahl, der meist von einer UV-Lampe oder in den neueren Geräten von einem Xenon Blitzlicht stammt und dessen Wellenlänge durch einen sogenannten Monochromator bestimmt wird, durch einen Strahlteiler in einen Probe- und einen Referenzstrahl aufgeteilt.⁴² Diese Strahlen durchsetzen dann die Proben- und Referenzküvetten und werden mit einem Detektor, der in dem Photometer enthalten ist, registriert. Mit Hilfe eines Photometers kann man die Absorption der zu testenden Probe messen, durch die sich eine Aussage über die Konzentration der Moleküle, die in der Probe enthalten sind, machen lässt. Ein Vorteil der modernen Photometer ist, dass

⁴¹ http://web.chemistry.gatech.edu/~williams/bCourse_Information/4581/techniques/gel_elect/gel.jpg

⁴² Vgl. Dr. Herb

man die direkte Differenz von der Absorption der Probe und Referenz erhalten kann und somit den Unterschied nach dem ersten Reinigungsschritt sehen kann.⁴³

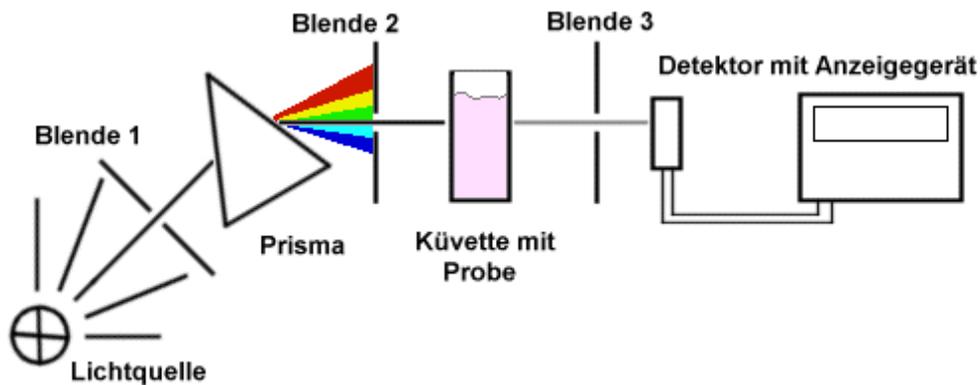


Abb. 10 Darstellung eines Photometers⁴⁴

IV. Durchführung

In dem folgendem Teil möchte ich genauer auf die Durchführung meines Praktikums bei Roche Diagnostics GmbH, Penzberg eingehen.

1. Aufreinigung

1.1 Protein A- Affinitätschromatographie

Die Protein A Chromatographie wurde mit einem einfach bedienbaren Gerät durchgeführt. Das System bestand aus einer Pumpe, Pharmacia Pump-50, aus einem Detektor „UV-1“ der aus einer Control und Optical Unit bestand und zur Aufzeichnung der Ergebnisse war ein Schreiber, „Rec 102“, angeschlossen. Der erste Schritt der Aufreinigung des Antikörpers aus dem Zellkulturüberstand bestand aus einer Affinitätschromatographie. Dazu mussten verschiedenste Vorbereitungen getroffen werden. Am ersten Tag wurden für die Chromatographie drei Puffer hergestellt, einer

⁴³ Vgl. <http://www.chemlin.de/chemie/photometrie.htm>

⁴⁴ http://www.elhardt.de/matthias/chemie/photometer/Photometer_Prinzip.gif

mit neutralem pH-Wert (Puffer 1), einer mit saurem (Puffer 2) und der dritte mit leicht basischen pH-Wert (Puffer 3).

Puffer 1, mit einem pH-Wert von 7,5, bestand aus 50 mM Tris (6,057 g) und 150 mM NaCl (8,766 g) in einem Liter Wasser. Dieser Puffer war dazu da, vor Versuchsbeginn die Säule (Protein A Superdex) zu neutralisieren und vorzuspülen.

Puffer 2 bestand aus 100 mM Zitronensäure (10,507 g) und hatte den pH von 3. Dieser Puffer sollte zum Eluieren der an die Liganden gebundenen Antikörper benutzt werden, da diese nur durch eine saure Lösung von dem Protein A der Säule gelöst werden können.

Puffer 3 bestand aus 1000 mM Tris (6,057 g/ pro 50ml) und hatte einen pH-Wert von 9. Dieser Puffer wird für die Neutralisierung des Eluats benötigt. Da das Eluat aus dem sauren Puffer 2 besteht muss es mit Puffer 3 neutralisiert werden, damit der Antikörper länger stabil bestehen bleibt.

War der pH-Wert bei der Herstellung der Puffer nicht ganz korrekt, benutzte man zum Einstellen entweder 1N HCl oder 1N NaOH in der jeweils nötigen Menge. Unter ständiger pH-Messung wurde tropfenweise zugegeben bis der exakte pH-Wert erreicht war.

Nun spielt noch eine Rolle wie viel Zellkulturüberstand über die Protein A Säule geleitet werden darf, damit der Antikörper quantitativ gebunden werden kann. Pro 1 ml Säulenmaterial hat das darauf befindliche Protein A eine Bindungskapazität von 20 mg Antikörper. Das bedeutet, pro ml Säulenmaterial, können 20 mg Antikörper gebunden werden. Die von uns zur Aufreinigung verwendete Säule besitzt ein Volumen von 5ml, daher besitzt sie eine Bindungskapazität von 100 mg. In dem von mir benutzten Zellkulturüberstand waren ca. 2 mg Antikörper pro ml enthalten, was einer sehr hohen Konzentration entspricht. Deshalb können 50 ml des Zellkulturüberstandes bei einem Reinigungsgang über die Säule geschickt werden.

Am nächsten Tag begann die Affinitätschromatographie. Dazu wurde Puffer 1 solange durch das Chromatographiesystem laufen gelassen, bis der Durchlauf einen pH-Wert von ca. 7,5 aufwies. Dieser Prozess wird auch als Äquilibrierung bezeichnet. Die Fließgeschwindigkeit musste am Anfang 1 ml/min betragen und wurde später auf 2 ml/min erhöht, da das System am Anfang keinen so hohen Druck verträgt. Aufgrund

von Luftblasen im System schaffte es der Schreiber nicht eine einheitliche Basislinie zu schaffen, daher mussten noch alle Lösungen entgast werden. Nun konnte der Aufzug beginnen und der Zellkulturüberstand wurde 25 Minuten durch das System gepumpt. Der Detektor zeigte schon nach kurzer Zeit einen deutlichen Anstieg der Absorption, wodurch die Proteine im Zellkulturüberstand klar zu erkennen sind. Das Ziel dieses Aufzuges war es, dass die Antikörper an dem Liganden (Protein A) haften bleiben und somit von den Verunreinigungen und „Host Cell Proteinen“ abgetrennt werden sollten, da diese ungebunden ablaufen. Waren nun alle Antikörper gebunden, wurden sie dann mit Hilfe des zweiten, sauren Puffers wieder von den Liganden gelöst und speziell aufgefangen. Diese Lösung bezeichnet man als Eluat. Das saure Eluat wurde mit Puffer 3 (pH 9) verdünnt, und so neutralisiert, dass in etwa ein pH-Wert von 6-7 resultierte.

1.2 Size Exclusion Chromatographie

Nachdem die Konzentration des Eluats in einem Photometer gemessen wurde und die verschiedenen Lösungen mittels analytischer HP-SEC überprüft wurden, worauf ich in Punkt 2 genauer eingehen werde, begann der nächste Reinigungsschritt, eine präparative SEC. Dafür wurde ein neuer Puffer A hergestellt. Puffer A beinhaltet 10 mM Histidin und 150 mM NaCl und hat einen pH-Wert von 6,0. Es wurden 2 l benötigt.

Die Chromatographie wird auf einer Äkta Explorer Anlage ausgeführt, einer modernen präparativen Chromatographieanlage, die kompakt alle wesentlichen Komponenten, d.h. Pumpe, Detektor, Steuerung, Säulenhälter etc. in einem Gehäuse enthält und besonders gut zur Methodenentwicklung geeignet ist.

Damit keine Verfälschungen der Ergebnisse entstehen, lässt man zuerst entgastes Wasser durch das System des Äkta Explorers laufen, um alle Luftblasen zu entfernen.



Abb. 11 Äkta Explorer⁴⁵

Danach werden alle Proben und Puffer entgast, um auch diese von Luftblasen zu befreien. Nun wird die Säule in das System eingespannt und der erste Probelauf mit Puffer A gemacht. Dieser Probelauf dauert 5-6 Stunden, da die Säule ein Volumen von 320 ml hat und die Fließgeschwindigkeit aufgrund des sich entwickelnden Drucks nicht mehr als 1 ml/min betragen darf. Nachdem der Puffer A durch das System gelaufen ist, kann der Aufzug mit dem Eluat von der Protein A Chromatographie beginnen. Dafür werden 8,5 ml des Eluats auf die Säule injiziert, das Eluat läuft nun zusammen mit dem Puffer durch das System und dieser Lauf dauert 120 Minuten. Nach 30 Minuten wird der Fraktionssammler gestartet, der alle 2 Minuten eine Fraktion abteilt, die ein Volumen von 2 ml hat. Der therapeutische Antikörper wurde in insgesamt 11 dieser Fraktionen, d.h. in insgesamt ca. 22 ml, gefunden. Um eine quantitative Ausbeute des Antikörpers zu bekommen, werden die einzelnen Fraktionen zunächst zentrifugiert. Danach werden alle 11 Fraktionen in einen großen Pool vereinigt. Nach Beendigung des zweiten Reinigungsschrittes wurden zwei verschiedene analytische Methoden benutzt, um zu testen, ob der Antikörper sauber abgetrennt wurde. Die Absorption dieses Eluats wird wieder mit Hilfe eines Photometers gemessen und die Konzentration bestimmt.

2. Analytische Methoden

⁴⁵ <http://www.gmi-inc.com/BioTechLab/AKTA%20explorer.jpg>

Nach dem ersten Reinigungsschritt des Antikörpers, der Affinitätschromatographie, wurden zwei verschiedene analytische Methoden benutzt, der Photometer und die High Pressure – SEC, um die Qualität des gereinigten Antikörpers zu überprüfen.

Um die Konzentration des Eluats mit Hilfe eines Photometers zu messen, muss es zunächst in einem Verhältnis von 1/20 verdünnt werden, da es sonst zu einer Extinktion (>1) kommen würde und daraus Messabweichungen resultieren würden. Das Photometer wurde für die Pufferlösungen 2 und 3 (beide sind anteilig im Zwischenprodukt enthalten) auf Null abgeglichen, um nachfolgend korrekt die Extinktion und damit die Konzentration messen zu können. Um nun auf die gesuchte Konzentration zu kommen, benutzt man das Lambert-Beer'sche Gesetz.

$$E = e \times c \times d.$$

E= Extinktion =Absorption, e= molarer, dekadischer Extinktionskoeffizient d= Pfadlänge in cm c= Konzentration der absorbierenden Substanz

Das Photometer berechnet bei dem verdünnten Eluat eine Extinktion E von 0,5577.

Nun muss man das Lambert-Beersche Gesetz nach c auflösen und es ergab sich eine Konzentration von $c = 7,97 \text{ mg/ml}$.

Nachdem man die Konzentration berechnet hatte, wurden die nachfolgend aufgeführten Lösungen durch eine analytische High Pressure-SEC geleitet, um die Qualität des gereinigten Eluats zu bestimmen:

1. Puffer 30 μl Kaliumphosphat, 300 μl NaCl pH 7
2. Größenstandard 100 μl
3. Eluat 6,2766 μl (enthält ca.50 μg Antikörper)
4. Puffer nach Durchlauf von Protein A 200 μl
5. Zellkulturüberstand Durchlauf durch Säule Protein A 100 μl
6. Zellkulturüberstand 100 μl

Der zweite Reinigungsschritt bestand, wie oben bereits erwähnt, in einer präparativen SEC. Um die Konzentration des dort entstandenen Eluats zu berechnen, wurde die Absorption der Probe, wie auch nach dem ersten Reinigungsschritt, im Photometer gemessen. Die Konzentration wurde, wie bereits erklärt, berechnet, und es ergab sich eine Konzentration $c = 2,742 \text{ mg/ml}$. Auch diesmal wurde noch eine HP–SEC durchgeführt, um die Homogenität der Probe zu prüfen.

Am letzten Tag des praktischen Teils wurde eine SDS-PAGE d.h. eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden die verschiedenen Lösungen Zellkulturüberstand, Zellkulturüberstand Durchlauf Protein A, Puffer Wasch, zwei Eluate (1. nach Affinitätschromatographie, 2. nach SEC) mit dem Puffer „Simply Blue Coomassie“ im Verhältnis 3:4 gemischt. Die gleiche Probenvorbereitung erfolgte noch einmal mit einem zweiten, reduzierenden Puffer, der die 4 S-S Bindungen im Antikörper reduziert und dadurch den Antikörper in seine leichte und schwere Aminosäurenketten aufgespaltet. Somit wurden am Ende Auftrennungen unter „nicht reduzierenden“ und „reduzierenden“ Bedingungen ausgeführt. Die Konzentration des Antikörpers spielt eine große Rolle, um zu definieren wie viel µg/Spur des Eluats verwendet werden sollen, damit ein optimales Ergebnis erzielt werden kann. Für die Gelelektrophorese wurden diese verschiedenen Lösungen in kleine Taschen auf dem Gel aufgetragen, ebenso wie ein Größenstandard (Precision Plus Protein). Als nächstes wurde ein Puffer (MOPS SDS Running Buffer) in die Kammern des SDS-PAGE gegeben und an eine Spannung von 200 V angeschlossen. Die Laufzeit der Elektrophorese wurde auf 50 Minuten eingestellt. Nach der SDS-PAGE wurde das Gel aufgeköcht und dann mit einer blauen Farblösung eingefärbt, damit es in der Auswertung leichter ist, die Proteinbanden genau zu erkennen.

Folgende Versuchsbedingungen wurden angewandt:

Gel: NuPAGE Gel, 4-12% Bis-Tris

Laufpuffer: 800ml MOPS SDS Puffer (Invitrogen)

Standard: Kaleidoscope (Precision Plus Protein)

Probenvorbereitung: 5 Min mit 4x Sample Buffer (Invitrogen) aufgeköcht bei 70°C

4x LDS Sample Buffer von

Reduktionsreagenz: Nu Page Sample Reducing Agent (10x)

30µl Probe + 10µl LDS Sample Buffer

30µl Probe + 10µl LDS Sample Buffer + Reducing Agent

Laufbedingungen: 50 Min bei 200 V und 110 mA (Stromstärke nicht konstant).

Färbung: Simply Blue (Invitrogen)

V. Ergebnisse

1. Reinigung und Analytik

Das Ziel des praktischen Teils bei Roche Diagnostics war, aus einem Zellkulturüberstand mit einem Antikörper und vielen anderen Begleitstoffen, nur den Antikörper herauszufiltern und diesen dann von möglichst allen Verunreinigungen zu befreien, damit er am Ende in einer für den therapeutischer Einsatz grundsätzlich geeigneten Qualität vorliegt. Nachfolgend sind dazu die mit HPLC und SDS- PAGE enthaltenen Analysenergebnisse dargestellt.

Protein A Aufreinigung

Bei der Affinitätschromatographie war das Ziel, dass die Antikörper sich an die Liganden heften und die Verunreinigungen und „Host Cell Proteine“ aus dem Zellkulturüberstand durchlaufen, damit danach ein Eluat mit dem reinen Antikörper erhalten wird. Um zu sehen, was aus dem Zellkulturüberstand heraus gereinigt wurde und nun im Eluat vorhanden ist, werden die Proben mittels HP-SEC analysiert und die Chromatogramme verglichen.

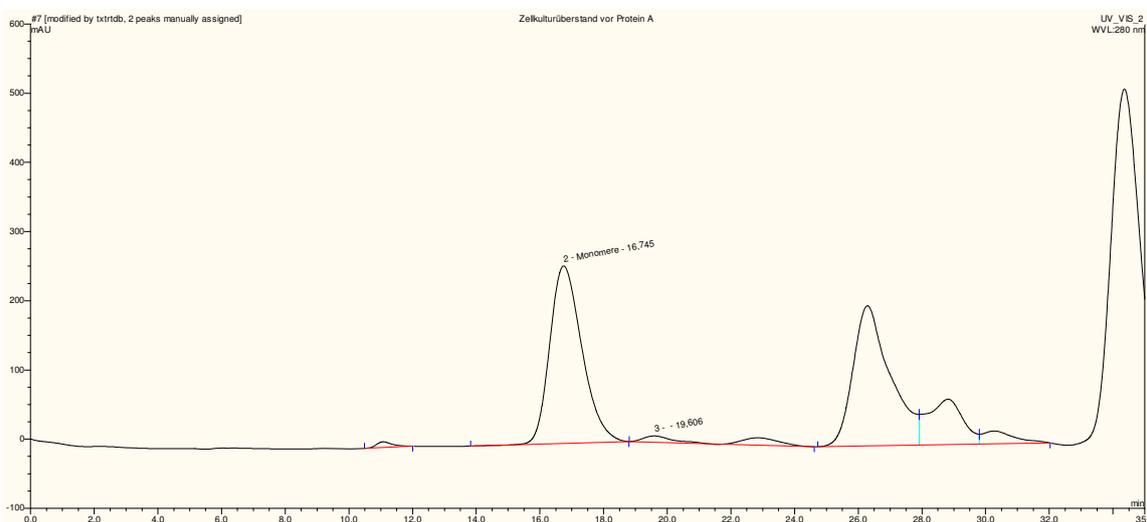


Abb. 12. Zellkulturüberstand vor Protein A

Auf dem oberen Diagramm (Abb. 12) ist der Zellkulturüberstand zu erkennen, der am Anfang gegeben war. Man kann drei große Hauptpeaks erkennen. Der erste, große Peak

nach ca. 16.7 min. stellt den therapeutischen monoklonalen Antikörper (MAK) dar, die nachfolgenden Peaks die Verunreinigungen.

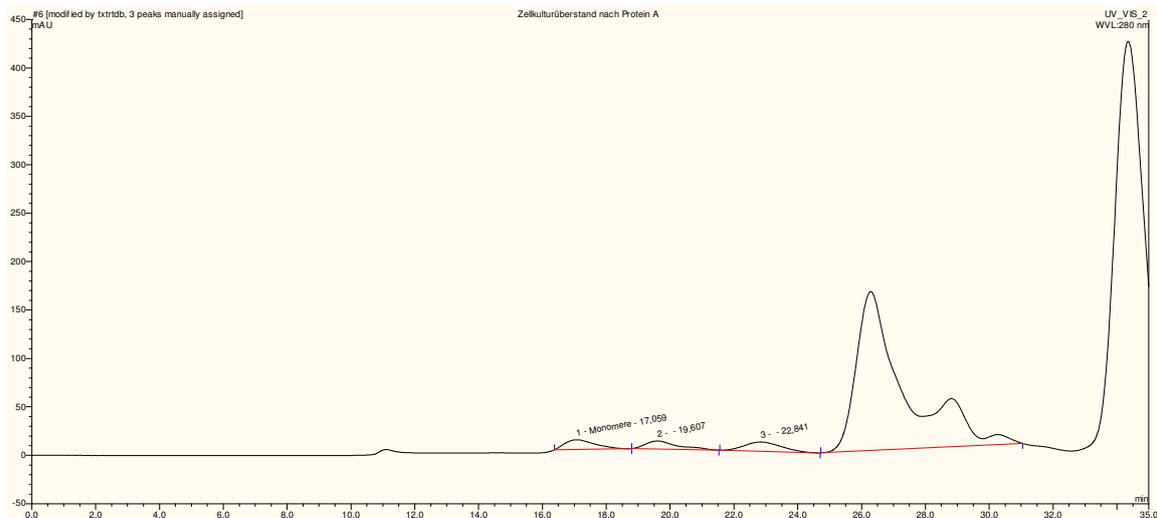


Abb. 13 Zellkulturüberstand nach Protein A

Auf dem zweiten Diagramm (Abbildung 13) ist der Zellkulturüberstand nach der Protein A Reinigung d.h. den Durchlauf durch die Säule zu erkennen. Der Hauptunterschied der zwei Diagramme ist klar festzustellen. Auf Abb. 13 fehlt der erste große Peak (MAK) welcher auf der Protein A Säule festgehalten wurde. Auf dem nächsten Bild ist ein Overlay der beiden Diagramme zu erkennen, in dem klar ersichtlich ist, welcher Peak gereinigt wurde.

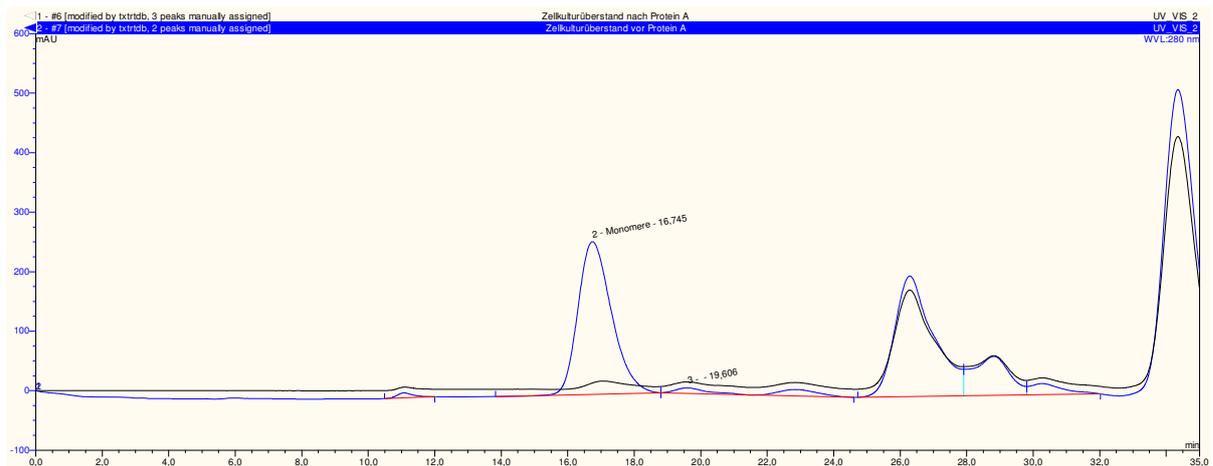


Abb. 14 Overlay der UV Detektorsignale für beide Zellkulturüberstände

Die blaue Linie repräsentiert den Zellkulturüberstand vor der Protein A Reinigung und die schwarze Linie den Durchlauf nach der Säule. Der erste Peak müsste nun dem Eluat

der Affinitätschromatographie mit niedrigem pH-Wert entsprechen, also dem Antikörper der an den Liganden gebunden hatte.

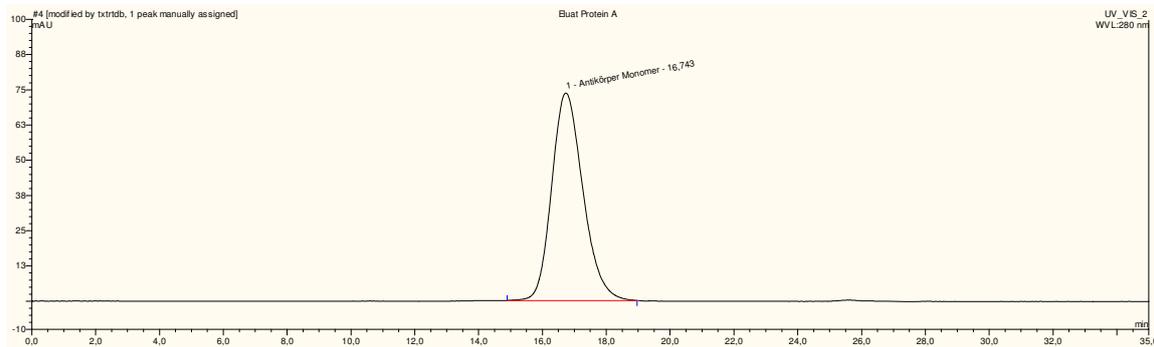


Abb. 15 Eluat (neutralisiert auf pH 7) nach Protein A

In Abbildung 15 ist erwartungsgemäß nur noch ein großer Peak zu erkennen. Dies ist der Antikörper, der aus dem Zellkulturüberstand gereinigt wurde. Wenn man sich den Peak genauer ansieht (Vergrößerung, hier nicht dargestellt), erkennt man klar, dass der Antikörper schon nach dieser einen Reinigungsmethode sehr sauber ist. Auch ist klar ersichtlich, dass es genau der Peak ist, der auf Abbildung 13 (Zellkulturüberstand nach Protein A) nicht mehr vorhanden ist, denn er hat genau die gleiche Retentionszeit auf der analytischen Trennsäule der HPLC.

Präparative SEC

Nach der Protein A Chromatographie war der Antikörper schon sehr rein und die präparative SEC war nur nötig, um auch noch kleine Spuren von Verunreinigungen abzutrennen, die möglicherweise in Tierstudien Nebenwirkungen hervorrufen könnten. Die SEC dient dabei vor allem der Abreinigung von Protein- bzw. Antikörperaggregaten. Auf dem folgenden Diagramm (Abb. 16) sieht man, dass sich im Vergleich zu der Situation nach der Protein A Reinigung nicht mehr viel geändert hat und der Antikörper sehr sauber ist.

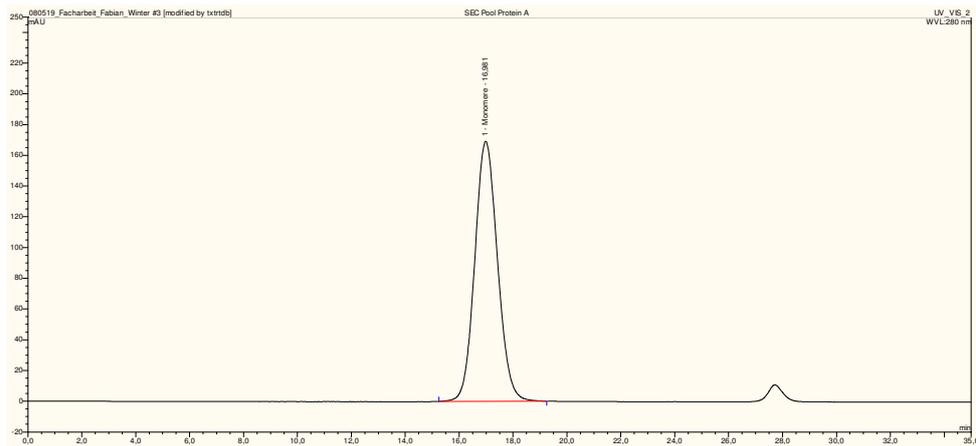


Abb. 16 Eluat nach SEC

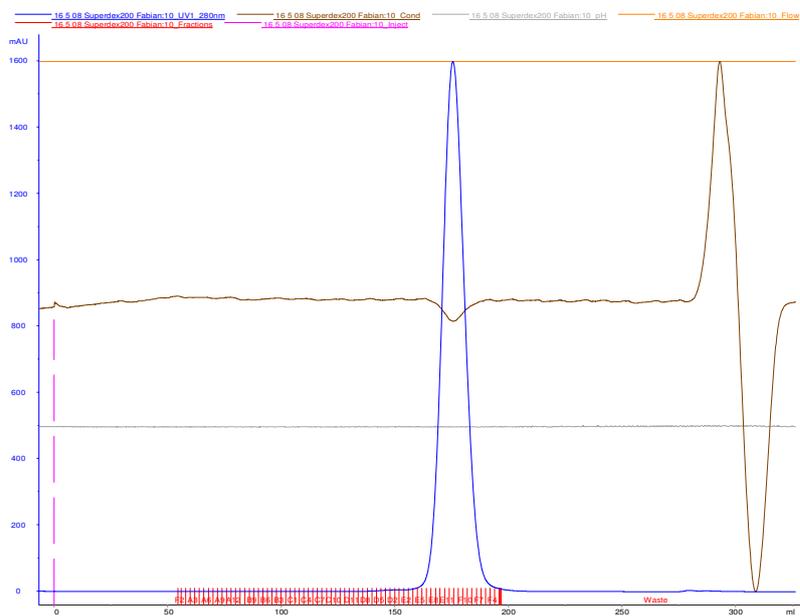


Abb.17 Eluat nach SEC in Farbe

Der Peak ist sehr scharf und symmetrisch, was auf hohe Reinheit hinweist. Auch wenn man näher an den Hauptpeak heranzoomt sind keine Schultern oder kleine Nebenpeaks zu erkennen, dass selbste trifft auf Abb. 17 zu. Der kleine Peak bei ca. 27 min ist ein Puffersignal, dass nichts mit dem MAK zu tun hat. Damit ist bestätigt, dass die Umpufferung der Probe zur SEC keinen negativen Effekt hatte und die erwünschte Produktsicherheit und Reinheit erreicht werden konnte.

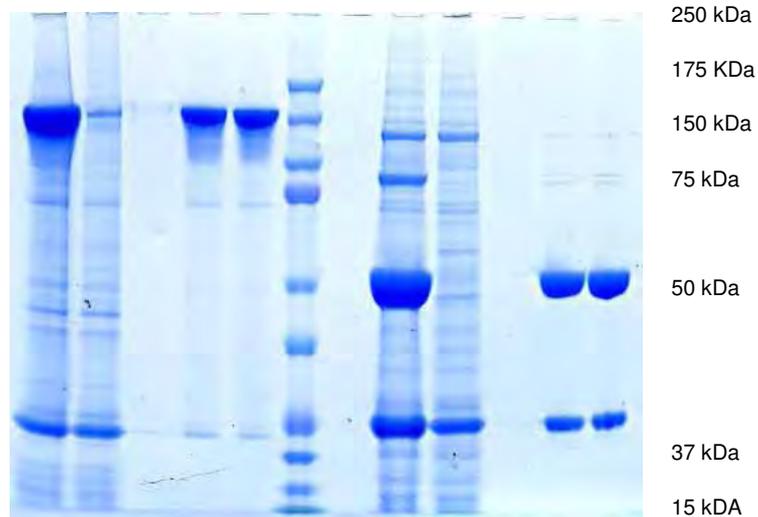
Nach der zweiten Reinigungsstufe wurde abschließend auch noch eine Elektrophorese unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt.

Auf der nachfolgenden Seite sind die Ergebnisse in Form eines Gel-Scans dargestellt.

Auf der Abbildung 17 ist der Reinigungsverlauf des MAK zu erkennen. Auf Bahn 4 und 5 sowie 11 und 12 wurden die Eluate der beiden Trennsäulen (Protein A, dann SEC) aufgetragen sowie auf Bahn 2 und 9 der Durchlauf der Protein A Säule. Im Vergleich dazu sieht man den Zellkulturüberstand auf Bahnen 1 und 8 vor der ersten Säule (Protein A).

Reduziert / Marker / nicht reduziert

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



Bahnbelegung

1: Zellkulturüberstand vor Protein A, nicht reduziert	15µl
2: Zellkulturüberstand nach Protein A, nicht reduziert	15µl
3: Puffer Wasch, nicht reduziert	15µl
4: Eluat 1, nicht reduziert, nach Prot. A	5µg
5: Eluat 2, nicht reduziert, nach SEC	5µg
6: Standard (Kaleidoscope)	10µl
7. Leer	
8: Zellkulturüberstand vor Protein A, reduziert	15µl
9. Zellkulturüberstand nach Protein A, reduziert	15µl
10. Puffer Wasch, reduziert	15µl

11. Eluat 1, reduziert, nach Prot. A	5µg
12. Eluat 2, reduziert, nach SEC	5µg

Eindeutig zu erkennen ist im Überstand vor der ersten Säule der Antikörper neben den vielen Verunreinigungen. Im Durchlauf (Bahnen 2 und 9) fehlt er praktisch völlig und im finalen Eluat nach den beiden Säule erscheint er rein. Die vielen Verunreinigungsbanden sind (Bahnen 4, 5 und 11, 12) bis auf wenige Reste verschwunden. Während unter nicht reduzierenden Bedingungen der ganze Antikörper auftaucht, liegt er unter reduzierenden Bedingungen in schwere und leichte Ketten aufgespalten vor (Dunkle Hauptbanden in Bahnen 11 und 12).

2. Zusammenfassung

Wenn man sich die verschiedenen Ergebnisse im Überblick anschaut und diese zusammenfassen möchte, ist zu sagen, dass der therapeutische Antikörper sehr gut aus dem Zellkulturüberstand, der zahlreiche Proteine und andere Begleitstoffe enthält, selektiv angereichert werden konnte. Schon nach der ersten Protein A Aufreinigung sind eigentlich kaum mehr Verunreinigung in der analytischen HP-SEC zu finden und der MAK erscheint rein. Die zweite Reinigung über eine präparative SEC bringt mit den von mir angewandten analytischen Methoden kaum einen nachweisbaren Zugewinn an Reinheit. Dennoch ist dieser Reinigungsschritt aus Sicherheitsgründen nötig und wird in der Industrie deshalb standardmäßig angewandt. Eventuell könnte man mit weiteren Methoden, die mir nicht zur Verfügung standen, noch weitere Qualitätsunterschiede zwischen den Reinigungsstufen erkennen. Immer noch sind auch nach 2 Aufreinigungsschritten kleine und ganz feine Nebenbanden zu erkennen bei denen es schwierig sein dürfte, die genaue Natur dieser Begleitstoffe eindeutig herauszufinden. Faszinierend finde ich, dass mit dem Einsatz von Protein A ein für praktisch alle Antikörper funktionierendes, sehr effektives Bindeprotein vorhanden ist und damit die Reinigung aus den Tausenden von Proteinen aus den Zellen doch relativ einfach möglich ist.

VI. Quellenverzeichnis

1. Bilderverzeichnis

- Abb. 1 http://www.handzeichen-gegen-krebs.de/download/Andocken_Antikoerper.jpg
- Abb. 2 <http://www.zum.de/Faecher/Materialien/beck/bilder/IGG1.gif>
- Abb. 3 http://www.nhl-info.de/infopool/images/AntikoerperSorten_2.jpg
- Abb.4 <http://www.zum.de/Faecher/Materialien/hupfeld/Referate/immun-system/antikoerper-klassen-2.gif>
- Abb. 5 <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/de/9/91/ChromatographieSchematisch>
- Abb. 6 <http://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/chromatographie/affinity.gif>
- Abb. 7 <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/2/2a/SizeExChrom.png#>
- Abb. 8 <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/7e/HPLC.gif>
- Abb. 9 http://web.chemistry.gatech.edu/~williams/bCourse_In-formation/4581/techniques/gel_elect/gel.jpg
- Abb. 10 http://www.elhardt.de/matthias/chemie/photometer/Photometer_Prinzip.gif
- Abb. 11 <http://www.gmi-inc.com/BioTechLab/AKTA%20explorer.jpg>

2. Literaturverzeichnis

Crommelin, Daan J. A. u. Robert D. Sindelar: Pharmaceutical Biotechnology. 2. Aufl. London 2002

Häder, Donat-Peter u. Maria Häder: Moderne Labortechnik. 1. Aufl. Stuttgart 1993

Herb, Dr. Rolf: Persönliche Mitteilung Roche Diagnostics

Horn, Florian et al.: Biochemie des Menschen 3. Aufl. Stuttgart 2005

Kayser, Oliver u. Rainer H. Müller: Pharamazeutische Biotechnologie. Stuttgart 2000

Lottspeich, Friedrich u. Harabos Zorbas: Bioanalytik. 1. Aufl. Heidelberg 1998

Kaltenböck, Karl: Chromatographie für Einsteiger. 1.Aufl. Weinheim 2008

Mori, Sadao u. Howard G. Barth: Size Exclusion Chromatography. Berlin 1999

Rassow, Joachim et al.: Biochemie. Stuttgart 2006

Wink, Michael: Molekulare Biotechnologie. Weinheim 2004

Quellen aus dem Internet:

<http://www.newsletter.nunc.de/Okt2005/affinitaet.pdf>

http://www.mh-hannover.de/fileadmin/institute/-physiologische_chemie/lehre/biochemie/bcf1/bcf1muehlenhoff04.pdf

http://de.wikipedia.org/wiki/Protein_A

http://www.optek.com/de/Lambert_Beer_Law.asp

<http://www.medizinfo.de/immunsystem/abwehr/immunglobuline.htm>

<http://www.nhl-info.de/exec/start?site=/infopool/281.htm&check=0>

<http://www.meine-molekuele.de/antigene-antikoerper>

http://www.handzeichen-gegen-krebs.de/download/Andocken_Antikoerper.jpg

http://www.med4you.at/laborbefunde/lbef_immunglobuline.htm

<https://www5.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/Products?OpenDocument&parentid=5179&moduleid=6638&zone=Labsep>

<http://www.unki.de/schulcd/physik/photom.htm>

http://www.photometer.org/html/grundlagen_spektrum.html

http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/proteinanalytik/chromatographie.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/proteinanalytik/methoden_protein/affin1.vscml.html

<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/E/ExclusionChrom.html>

VII. Danksagung

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

Besonderer Dank geht an meine Betreuer Dr. Monika Bähler und Anton Jochner für Ihre Hilfe während meines Praktikums. Weiterer Dank geht an Herrn Dr. Hans Willi Krell für die Organisation des Praktikums.

Anhang:

Materialliste:

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KgaA, Darmstadt
Zitronensäure C ₆ H ₈ O ₇	Merck KgaA, Darmstadt
Protein A 5 ml Säule	Superdex
Histidin	Fluka
HiLoad 320 ml SEC Säule	Superdex
Größenstandard SDS-Page	Kaleidoscope (Precision Plus Protein, Invitrogen)
MOPS	SDS-Running Buffer 20x NuPage (Invitrogen)
LDS Puffer	LDS Sample Buffer NuPAGE (Invitrogen)
Reducing Agent	Sample Reducing Agent DTT (10fach) (Invitrogen)
Ethanol	Merck KgaA, Darmstadt
Färbungsmittel	Simply Blue Fräbemittel
Simply Blue Coomassie	Invitrogen
H ₂ O	PCR Grade (Roche), Bestnr. 03315932
Pipetten	Cellstar Pipetten (Greiner bio-one)

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