



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg  
*Hamburg University of Applied Sciences*

## Bachelorarbeit

# **Expression, Reinigung und funktioneller Test von rekombinantem TNFR2-spezifischen TNF**

1. Gutachter: Prof. Dr. Gesine Cornelissen (HAW Hamburg)
2. Gutachter: Prof. Dr. Daniela Männel (Universität Regensburg)

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg  
Fakultät Life Sciences  
Department Biotechnologie

Abgabetermin: 11.06.2014

Eingereicht von  
**Christine Hirl**  
aus Regensburg

# Inhaltsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| 1. Einleitung.....   | 1  |
| 1.1 Das Immunsystem .....  | 1  |
| 1.2 Cytokine und deren Rezeptoren.....   | 1  |
| 1.2.1 Allgemeines .....  | 1  |
| 1.2.2 Das TNF/TNFR-System.....   | 1  |
| 1.2.3 Die Rolle des TNF/TNFR-Systems im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen ..... | 4  |
| 1.3 TNC-scTNF80 .....  | 5  |
| 1.4 Ziel der Arbeit .....  | 6  |
| 2. Material .....  | 6  |
| 2.1 Verbrauchsmaterial und Geräte.....   | 6  |
| 2.2 Chemikalien, Reagenzien und Medien .....   | 8  |
| 2.3 Puffer und Lösungen .....  | 9  |
| 2.5 Kits .....   | 10 |
| 2.6 Software .....   | 10 |
| 2.7 Zelllinien .....   | 10 |
| 2.8 Antikörper.....  | 10 |
| 2.9 Vektoren .....   | 11 |
| 3. Methoden.....   | 11 |
| 3.1 Zellkultur-Methoden .....  | 11 |
| 3.1.1 Bedingungen für das Arbeiten mit eukaryotischen Zelllinien .....               | 11 |
| 3.1.2 Zellkulturmedium .....   | 11 |
| 3.1.3 Kultur adhärent wachsender Zellen .....  | 11 |
| 3.1.4 Kultur von Suspensionszellen.....  | 12 |
| 3.1.5 Bestimmung der Lebendzellzahl .....  | 12 |
| 3.1.6 Gewinnen von Überstand aus der Zellkultur.....                                 | 12 |
| 3.2 Proteinbiochemische Methoden.....  | 13 |
| 3.2.1 Dialyse .....  | 13 |
| 3.2.2 PEG-Konzentrierung .....   | 14 |
| 3.2.3 Ammoniumsulfatfällung.....   | 14 |
| 3.2.4 Herstellen von Zelllysaten .....   | 14 |
| 3.2.5 BCA-Assay .....  | 15 |
| 3.2.6 SDS-PAGE.....  | 16 |
| 3.2.7 Coomassie-Färbung .....  | 18 |
| 3.2.8 Sypro Red Proteinfärbung .....   | 18 |
| 3.2.9 FLAG-Tag Affinitätschromatografie .....  | 18 |

|   |    |
|---|----|
| 3.3 Immunologische Methoden .....   | 21 |
| 3.3.1 Western Blot.....   | 21 |
| 3.3.2 ELISA .....   | 22 |
| 3.4 Molekularbiologische Methoden - Transfektion.....                                   | 26 |
| 4. Ergebnisse.....  | 29 |
| 4.1 Reinigung von TNC-scTNF80 aus HEK-scTNF80 Zellkulturüberstand .....                 | 29 |
| 4.1.1 R1: Batch Adsorption – Desorption im gravity flow .....                           | 29 |
| 4.1.2 R1 – Quantifizierung .....  | 30 |
| 4.1.3 R2 – Batch-Elution .....  | 33 |
| 4.1.4 R3 – Batch-Elution .....  | 33 |
| 4.1.5 R4 – Arginin-Elution.....   | 35 |
| 4.1.6 R4 – Quantifizierung.....   | 36 |
| 4.1.6 R5 – Arginin-Elution.....   | 37 |
| 4.1.7 Sypro Red Protein gel stain – Typhoon Scan .....                                  | 38 |
| 4.1.8 R6 – Batch-Elution .....  | 40 |
| 4.1.9 R7 – Batch-Elution .....  | 41 |
| 4.2 Konzentrierung des HEK-scTNF80 Zellkulturüberstandes.....                           | 43 |
| 4.2.1 Ammoniumsulfatfällung.....  | 43 |
| 4.2.2 PEG-Konzentrierung .....  | 43 |
| 4.3 Bestimmung der biologischen Aktivität des gereinigten TNC-scTNF80 – IL-8 ELISA..... | 43 |
| 4.3.1 IL-8 ELISA: R1, Ammoniumsulfatfällung und PEG-Konzentrierung .....                | 44 |
| 4.3.2 IL-8 ELISA der R3, R4 und R5.....   | 48 |
| 4.4 Anti-FLAG ELISA .....   | 53 |
| 4.5 Gewinnung von TNC-scTNF80 aus Ag8-Zellen.....                                       | 59 |
| 4.6 Transfektion von BFS-1 Zellen .....   | 62 |
| 5. Zusammenfassung der Ergebnisse, Diskussion und Ausblick.....                         | 63 |
| 5.1 Reinigung des TNC-scTNF80 .....   | 63 |
| 5.2 Konzentrierung der HEK-scTNF80 Zellkulturüberstände.....                            | 64 |
| 5.3 Quantifizieren des TNC-scTNF80 im Zellkulturüberstand und den Eluatn.....           | 65 |
| 5.4 Aktivitätsbestimmung des TNC-scTNF80 durch den IL-8 ELISA.....                      | 67 |
| 5.4 Gewinnung von scTNF80 aus Ag8-Zellen .....  | 68 |
| 5.5 Transfektion von BFS-1 Zellen .....   | 68 |
| Literaturverzeichnis.....   | 69 |
| Abbildungsverzeichnis.....  | 70 |
| Tabellenverzeichnis .....   | 72 |
| Abkürzungsverzeichnis .....   | 72 |

|                                |    |
|--------------------------------|----|
| Danksagung .....               | 74 |
| Eidesstattliche Erklärung..... | 75 |

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Mit einer Masse von 2-3 kg gehört das Immunsystem zu den großen Organen. Dies fällt allerdings nicht auf den ersten Blick auf, weil Immunzellen und lymphatische Gewebe im gesamten Organismus verteilt sind. Neben seiner Komplexität, weshalb das Immunsystem auch mit dem zentralen Nervensystem verglichen wird, ist eine beeindruckende Dynamik charakteristisch für dieses System: Zellteilung und Zelltod, Umbau der Organe durch Ein- und Auswanderung von Zellen, Veränderungen durch Differenzierung sind hier nicht die Ausnahme, sondern die Regel (Schütt, Bröker 2011).

Die physiologische Funktion des Immunsystems ist die Abwehr von Krankheitserregern. Aber auch nichtinfektiöse fremde Substanzen können eine Immunantwort auslösen. Dies geschieht in einer ersten Reaktion zunächst über das angeborene Immunsystem und als spätere Antwort über das adaptive Immunsystem (Abbas 2000).

Eine entscheidende Rolle für die Regulierung der Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems spielen Cytokine (Abbas 2000).

## 1.2 Cytokine und deren Rezeptoren

### 1.2.1 Allgemeines

Cytokine sind lösliche Polypeptide mit lokaler Wirkung und einer kurzen Halbwertszeit von einigen Minuten. Das gleichzeitig an einem Ort wirkende Cytokinspektrum beeinflusst die dort vorhandenen Zellen und deren Funktion (Fischer 2011).

Die Cytokinomenklatur ist nicht einheitlich, auch wenn viele als Interleukine mit einer eigenen Nummer bezeichnet werden. Sehr oft hängt die biologische Wirkung eines Cytokins davon ab, welche Rezeptorstruktur gebunden wird (Schütt, Bröker 2000).

Cytokine werden von Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems sezerniert und übernehmen eine Vielzahl von Funktionen in diesen Zellen. Cytokine werden als Antwort auf Krankheitserreger und andere Antigene produziert. Verschiedene Cytokine stimulieren dabei verschieden Antworten auf Zellen, die in der Immunabwehr und bei Entzündungsreaktionen involviert sind. In der Aktivierungsphase der adaptiven Immunantwort stimulieren Cytokine das Wachstum und die Differenzierung von Lymphocyten. In einer späteren Phase der angeborenen und adaptiven Abwehr aktivieren sie verschiedene Effektorzellen, um die Antigene zu eliminieren. In der Medizin spielen Cytokine deshalb eine wichtige Rolle in der Therapie, sowohl als Agonisten als auch als Antagonisten, in einer Vielzahl von Erkrankungen des Immunsystems und Erkrankungen, die mit einer Entzündung einhergehen (Abbas 2000).

### 1.2.2 Das TNF/TNFR-System

Bisher wurden 40 Mitglieder der TNF-Cytokinfamilie identifiziert. Die Mitglieder des Tumornekrosefaktor (TNF)- und des TNF-Rezeptor (TNFR)-Systems spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung und Funktion des Immunsystems sowie der lymphoiden Organogenese. Die Signalwege, welche durch die TNF- und TNFR-Familie reguliert werden, sind sehr unterschiedlich und beeinflussen

unter anderem Zellproliferation, Zellüberleben, Differenzierung und Apoptose (Hehlgans, Pfeffer 2005). Die Liganden der TNF-Familie interagieren mit einem oder mehreren Rezeptortypen der TNFR-Familie und können verschiedene Zellantworten induzieren (Rauert 2012).

Eine wichtige Komponente der frühen angeborenen Immunantwort auf Viren und Bakterien ist die Sekretion von Cytokinen. Der Tumornekrosefaktor ist ein wichtiger Mediator akuter Entzündungen als Antwort auf gram-negative Bakterien und andere mikrobielle Antigene. TNF ist verantwortlich für zahlreiche systemische Komplikationen bei Infektionen. Seinen Namen hat der Tumornekrosefaktor seiner ursprünglichen Identifizierung als Serumfaktor, welcher Nekrose von Tumoren verursacht, zu verdanken. TNF wird auch als TNF- $\alpha$  bezeichnet, um es vom eng verwandten Lymphotoxin (TNF- $\beta$ ) zu unterscheiden (Abbas 2000).

Die größte zelluläre Quelle des TNF sind aktivierte mononukleare Phagozyten. Aber auch antigen-stimulierte T-Zellen, NK-Zellen und Mastzellen können dieses Protein sezernieren. Der potenteste Stimulus, um die TNF-Produktion durch Makrophagen zu erhöhen, ist TLR zusammen mit LPS und anderen bakteriellen Produkten. Große Mengen an TNF werden während einer Infektion mit gram-negativen Bakterien aufgrund von LPS in der bakteriellen Zellwand ausgeschüttet. IFN- $\gamma$ , das von T-Zellen und NK-Zellen produziert wird, stimuliert die TNF-Synthese durch LPS-stimulierte Makrophagen zusätzlich (Abbas 2000).

In mononuklearen Phagozyten wird TNF als nichtglykosyliertes Typ II Membranprotein mit einem intrazellulären N-Terminus und einem großen extrazellulären Carboxylterminus synthetisiert. Membran-TNF wird als Homotrimer exprimiert, welches in der Lage ist, an Typ II TNF-Rezeptoren zu binden. Der trimere Aufbau wird durch die TNF-Homologie-Domäne (THD) vermittelt, deren Aminosäuresequenz zwischen den Liganden der TNF-Familie zu etwa 25-30 % homolog ist. Die THD ist auch für die Bindung an die TNF-Rezeptoren verantwortlich (Rauert, 2012). Die etwa 150 Aminosäuren umfassende THD liegt carboxyterminal, also extrazellulär, und formt zwei  $\beta$ -Faltblätter, welche eine jelly roll-Topologie bilden. Zwischen der THD und der Transmembrandomäne liegt eine stalk-Region. Diese Region trägt eine Erkennungssequenz für Proteasen, welche die membranständigen Proteine prozessieren und somit lösliche Liganden freisetzen (Bodmer et al., 2002). Die Membranform des TNF wird durch membranassoziierte Metalloproteasen gespalten unter Freisetzung eines 17 kD Polypeptids. Drei dieser Polypeptidketten polymerisieren und formen das 51 kD, zirkulierende TNF Protein. Sezerniertes TNF bildet die Form einer dreiseitigen Pyramide aus, wobei jede Seite der Pyramide von einer Untereinheit geformt wird. Die Rezeptorbindestellen sind die Basis der Pyramide, was das Binden von parallel drei Rezeptormolekülen ermöglicht (Rauert 2012).

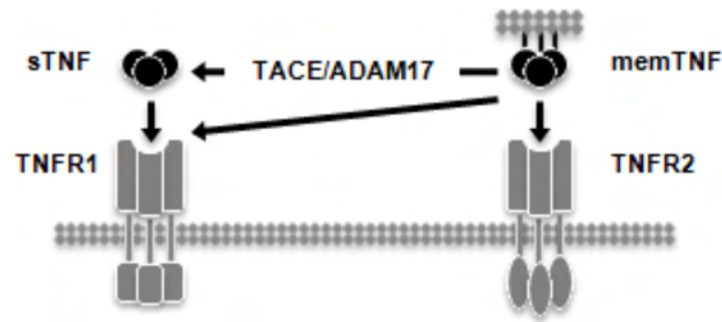


Abbildung 1: TNF und die TNF-Rezeptoren. TNF wird als trimeres Transmembranprotein synthetisiert (memTNF). Proteolytische Spaltung durch TACE/ADAM17 führt zu einer Freisetzung von löslichen TNF (sTNF) Trimeren. Beide TNF-Formen können TNFR1 aktivieren, wohingegen TNFR2 nur durch memTNF optimal aktiviert werden kann (Fischer 2011).

Es gibt zwei verschiedene TNF-Rezeptoren mit einem Molekulargewicht von 55 kD (TNF-RI) und 75 kD (TNF-RII). Die Affinität des TNFs zu seinen Rezeptoren ist für ein Cytokin ungewöhnlich niedrig. Die  $K_d$  für das Binden an TNF-RI beträgt nur ca.  $1 \times 10^{-9}$  und für TNF-RII  $5 \times 10^{-9}$ . Die extrazelluläre Domäne der TNF-Rezeptoren ist durch sich wiederholende cysteinreiche Domänen (CRDs) charakterisiert, welche durch Disulfidbrücken stabilisiert werden. Die Bindung der Liganden an den Rezeptor findet im Bereich der CRDs statt (Locksley et al., 2001). Beide TNF-Rezeptoren sind in den meisten Zelltypen vorhanden. Diese Rezeptoren liegen als Trimere gebunden auf der Plasmamembran vor. Cytokine, die an Mitglieder der TNF-Rezeptor Familie (z. B. TNF-RI, TNF-RII, CD40) binden, führen zu einer Rekrutierung von Proteinen, sog. TNF-Rezeptor assoziierte Faktoren (TRAFs), zur cytoplasmatischen Domäne des Rezeptors. Die TRAFs wiederum aktivieren Transkriptionsfaktoren, insbesondere nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) und activation protein-1 (AP-1). Cytokine, die an andere Mitglieder der TNF-Rezeptor Familie binden, z. B. an TNF-RI, führen zur Rekrutierung von Adapterproteinen, die Caspase aktivieren und die Apoptose triggern. Dies zeigt, dass verschiedene Mitglieder der TNF-Rezeptor Familie sowohl Genexpression, als auch Zelltod oder sogar beides induzieren können (Abbas 2000).

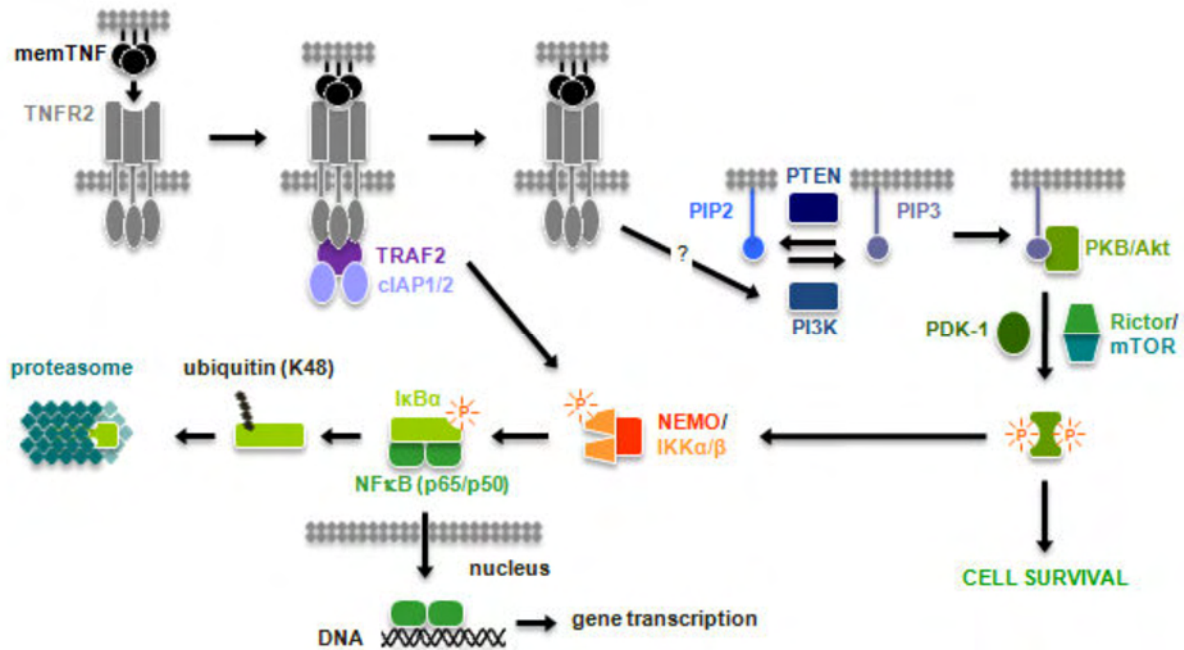


Abbildung 2: Signalwege des TNFR2. Bindet TNF an TNFR2, induziert dies die Rekrutierung von TRAF2 und cIAP1/2. Die Aktivierung des IκK-Komplexes resultiert in der Induktion des NFκB-Signalweges. Zusätzlich wird PI3K über noch nicht bekannte molekulare Mechanismen aktiviert, welche auf TNFR2 zurückzuführen sind. Die aktivierte PI3K wandelt PIP2 in den second messenger PIP3 um, welcher PKB/AKT zur Plasmamembran rekrutiert, wodurch Phosphorylierung aktiviert wird. PKB/Akt aktiviert schließlich die NFκB Signalkaskade und induziert verschiedene zelluläre Überlebensmechanismen (Fischer 2011).

### 1.2.3 Die Rolle des TNF/TNFR-Systems im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen

Eine wichtige Rolle des TNF/TNFR-Systems in Autoimmunerkrankungen, die häufig mit Entzündungsreaktionen einhergehen, konnte auf Anomalitäten im TNFR2 zurückgeführt werden. Beispiele hierfür sind Polymorphismen im TNFR2-Gen, eine erhöhte Expression von TNFR2 und eine gesteigerte Abspaltung von TNFR2 in verschiedenen Autoimmunerkrankungen. Besonders Patienten mit beispielsweise familiärer rheumatoider Arthritis, die Polymorphismen im TNFR2 aufweisen, zeigen ein höheres Level an löslichem TNFR2, nicht aber an löslichem TNFR1. Dies ist vermutlich auf eine verstärkte Abspaltung der Ektodomäne des TNFR2 in den Extrazellulärraum zurückzuführen (Fischer 2011).

T-Zellen proliferieren und reifen im Thymus. Die meisten dieser unreifen Zellen sterben durch Apoptose während der T-Zell-Reifung. Dieser Prozess ist essentiell, um fehlerhafte Vorläuferzellen zu entfernen. Fehler in der T-Zell-Reifung können zu naiven autoreaktiven T-Zellen führen, die die Apoptose umgehen, in den Blutkreislauf einwandern und dort differenzieren durch den Kontakt mit spezifischen Eigen-Antigenen. Fehlerhafte T-Zell-Reifung kann zu einer Vielzahl von Autoimmunerkrankungen führen, beispielsweise Multiple Sklerose, Diabetes Typ I und Morbus Crohn (Fischer 2011).

Bei Diabetes Typ I beispielsweise handelt es sich um eine Form des Diabetes Mellitus, der auf einer Zerstörung der insulinproduzierenden β-Zellen der Langerhansschen Inseln der Bauchspeicheldrüse aufgrund einer Autoimmunreaktion beruht. Das Fehlen von Insulin führt zu einer Hyperglykämie. Manifestiert sich diese über einen längeren Zeitraum, hat dies Gefäßschädigungen einhergehend mit



Nierenschäden, Herzerkrankungen, Retinopathie und Neuropathie zur Folge. Obwohl eine Insulinsubstitution Symptome und lebensbedrohliche Komplikationen reduziert, können Spätfolgen, die auf den Diabetes Typ I zurückzuführen sind, in vielen Fällen nicht verhindert werden. Typ I Diabetes kann durch fehlerhafte Prozessierung von Proteinen verursacht werden, die einen Fehler beim Zerstören autoreaktiver CD8+ T-Zellen während der physiologischen Reifung dieser Zellen zur Folge haben. Diese autoreaktiven T-Zellen können in den Blutkreislauf einwandern und zerstören bei Erreichen der Pankreas die insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen. Eine Verabreichung von TNF in niedrigen Dosen führt zu einer gezielten Apoptose der pathogenen CD8+ T-Zellen, aber nicht zur Apoptose nicht-pathogener T-Zellen. Dieser Effekt auf die pathogenen CD8+ T-Zellen ist auf verschiedene Defekte in der Aktivierung des NF-kBs zurückzuführen. Anti-apoptotische Effekte werden nicht länger vermittelt, stattdessen wird die Apoptose eingeleitet (Fischer 2011).

### 1.3 TNC-scTNF80

Das single chained (sc) TNF80 besteht aus 3 TNF-Monomeren, welche durch kurze Linker-Aminosäuren verbunden sind. Membrangebundenes TNF (memTNF) aktiviert, wie bereits erwähnt, sowohl TNFR1 als auch TNFR2. Um eine TNF-Variante als Therapeutikum verwenden zu können, muss diese sowohl das memTNF nachahmen, als auch selektiv den TNFR2 aktivieren.

Die Selektivitätsbedingung wird durch die Mutation von zwei Aminosäuren (D143N/A145R) des scTNF80-Proteins gewährleistet. Diese Mutation führt zum Verlust der Affinität für TNFR1.

Die Nachahmung des memTNF wurde dadurch gewährleistet, dass TNFR2-selektives scTNF mit der Trimerisierungsdomäne des Tenascin C (TNC) verbunden wurde. Dadurch kommt es zur Bildung eines stabilen TNC-scTNF80-Trimers (Wajant et al. 2012).

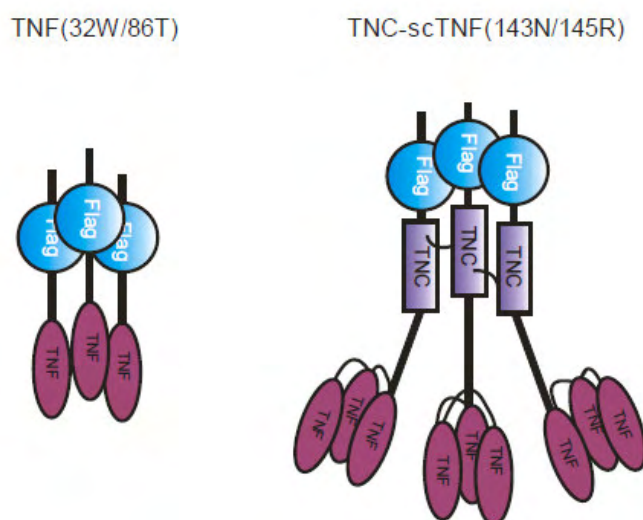


Abbildung 3: Struktur der TNF-Varianten TNF (32W/86T) und TNC-scTNF (143N/145R). FLAG-Aminosäuresequenz: D-Y-K-D-D-D-K, TNC: Trimerisierungsdomäne des Tenascin-C (Aminosäuren: 110-139). Die Nummerierung der Aminosäuren der TNF-Mutationen bezieht sich auf die lösliche, reife, aus 157 Aminosäuren bestehende Form des Proteins (Rauert 2012).

Zusätzlich besitzt das TNC-scTNF80, wie in der Abbildung dargestellt, einen FLAG-Tag. Das FLAG-Peptid ist ein 1013 Da Oktapeptid, welches folgende Aminosäure-Sequenz aufweist:

N-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-C

Dieser FLAG-Tag für Proteine wird von einem spezifischen Antikörper, dem für die Reinigung eingesetzten anti-FLAG M2 Antikörper, erkannt. Mit dem FLAG-Tag markierte Proteine können mit dem anti-FLAG-Antikörper, kovalent gebunden an eine Matrix, durch eine Immunoaffinitätschromatographie isoliert werden. Durch Hinzufügen von freiem FLAG-Peptid wird das FLAG-markierte Protein schließlich wieder von dem Antikörper getrennt. Das kurze Peptid ist im Überschuss vorhanden und konkurriert mit dem markierten Protein um den Antikörper und führt so zur Elution des gebundenen Proteins (Wajant et al. 2012).

## 1.4 Ziel der Arbeit

Das rekombinante Protein TNC-scTNF80 wurde benötigt, um an chronischer Colitis ulcerosa erkrankte Mäuse zu behandeln. Ziel war es, TNC-scTNF80 in reiner Form, biologisch aktiv und in ausreichender Menge herzustellen.

Transfizierte HEK-scTNF80 Zellen für die Produktion von TNC-scTNF80-haltigem Zellkulturüberstand lagen bereits vor. Die Reinigung des Proteins erfolgte über eine FLAG-Tag Immunoaffinitätschromatographie. Hierfür sollte das Reinigungsprotokoll optimiert werden. Außerdem war es notwendig, das TNC-scTNF80 zu quantifizieren und die biologische Aktivität mithilfe eines IL-8 ELISAs zu prüfen.

Außerdem sollte die Möglichkeit eines alternativen Weges der TNC-scTNF80 Produktion durch die Suspensionszelllinie Ag8 geprüft werden. Die mit dem TNC-scTNF80 Gen transfizierten Ag8-Zellen lagen ebenfalls bereits vor.

Zu guter Letzt mussten BFS-1 Zellen, eine Fibrosarkomzelllinie, für einen späteren Versuch mit dem Gen für TNC-scTNF80 transfiziert werden.

## 2. Material

### 2.1 Verbrauchsmaterial und Geräte

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| Beckmann J2-21 M/E Zentrifuge   | Beckmann, München                      |
| Begasungsbrutschrank Cell Safe  | Integra Biosciences, Baar, Schweiz     |
| Dialysemembran (MWCO 6-8000 Da) | Spectra/Por®                           |
| Eppendorfcups (1,5ml/2ml)       | Eppendorf, Hamburg                     |
| ELISA Platte maxisorp           | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| ELISA Reader                    | MWG Biotech, Ebersberg                 |
| Gelelektrophoreseapparaturen    | BioRad, München                        |

|  |  |
|--|--|
| Heizblock Thermostat, Bio TDB-100      | Hartenstein, Würzburg                  |
| Image Quant, LAS 4000 mini             | GE Healthcare, Solingen                |
| Laminair Flow HB 2448 – Sterilbank     | Heraeus, Hanau                         |
| Magnetrührer Heidolph MR 3001          | Heidolph, Schwabach                    |
| Microplate Reader                      | Molecular Devices, Kalifornien, USA    |
| Mikroskop                              | Olympus, Hamburg                       |
| Mikroskop Diaplan (Fotomikroskop)      | Leica, Solms                           |
| Mikrospin S – 200HR Säulen             | Amersham, Braunschweig                 |
| Mikrotiterplatten                      | Falcon, Heidelberg                     |
| Mithras, Multicolor Plate Reader LB940 | Berthold technologies, Bad Wildbad     |
| Multikanalpipette 100 µl/300 µl        | Eppendorf, Hamburg                     |
| Neubauer Zählkammer                    | Brand, Giessen                         |
| Nitrocellulosemembran                  | Osmonics, Minnetonka, USA              |
| pH-Meter                               | Inolab, Weilheim                       |
| Pipette 0,5-10 µl                      | Eppendorf, Hamburg                     |
| Pipette 2-20 µl                        | Eppendorf, Hamburg                     |
| Pipette 10-100 µl                      | Eppendorf, Hamburg                     |
| Pipette 100-1000 µl                    | Eppendorf, Hamburg                     |
| Pipettenspitzen                        | Eppendorf, Hamburg                     |
| Pipettenspitzen 5, 10, 25 ml           | Sarstedt, Nümbrecht                    |
| Pipettierhilfe Accu-jet pro            | B. Braun, Melsungen                    |
| Polypropylenröhrchen                   | Falcon, Heidelberg                     |
| PVDF-Membran 0,45 µm                   | Merck, Darmstadt                       |
| Reaktionsgefäße                        | Eppendorf, Hamburg                     |
| Satorius R 160P Waage                  | Satorius, Göttingen                    |
| Satorius L2200S Waage                  | Satorius, Göttingen                    |
| Shandon Cytospin 4                     | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Soniprep 150                           | MSE, London, Großbritannien            |
| Spannungsquelle Biorad 200/2,0         | BioRad, München                        |
| Tischzentrifuge                        | Beckmann, München                      |
| Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell   | BioRad, München                        |
| Typhoon 9200                           | GE Healthcare, Solingen                |
| Vortexer, MS2 Minishaker               | IKA Works, Staufen                     |
| Wasserbad, Thermomix                   | B. Braun, Melsungen                    |
| Whatman Filterpapier                   | Laborcenter, Nürnberg                  |
| Zeiss Mikroskop                        | Leitz, Wetzlar                         |
| Zellkulturflaschen                     | Falcon, Heidelberg                     |

Zellkulturschalen  
Zentrifuge 5417 R

BD Bioscience, New Jersey, USA  
Eppendorf, Hamburg

## 2.2 Chemikalien, Reagenzien und Medien

|   |   |
|---|---|
| APS   | Sigma Aldrich, Steinheim                                    |
| Acrylamid-Bisacrylamid Lösung                     | Roth, Karlsruhe   |
| BSA   | Sigma Aldrich, Steinheim                                    |
| Coomassie Brilliant Blue R 250                    | Fluka, Buchs, Schweiz                                       |
| DMEM GlutaMAX Medium                              | Gibco <sup>®</sup> , Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| ECS Prime Western Blotting Detection Reagent      | GE Healthcare, Solingen                                     |
| Ethanol   | Sigma Aldrich, Steinheim                                    |
| Fetales Kälberserum (FCS)                         | PAN Biotech, Aidenbach                                      |
| G 418 (Geneticin)                                 | PAN Biotech, Aidenbach                                      |
| Glycerin  | Merck, Darmstadt  |
| Glycin  | USB, Cleveland, USA   |
| H <sub>2</sub> O (deionisiert)                    | Milli Q UF Plus System                                      |
| L-Arginin Monochlorid                             | Sigma Aldrich, Steinheim                                    |
| Magermilchpulver                                  | Real  |
| M-PER Zellysis-Reagenz                            | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA                      |
| Penicillin/Streptomycin                           | PAN Biotech, Aidenbach                                      |
| Polyethylenglykol 35000                           | Fluka, Buchs, Schweiz                                       |
| Ponceau S Concentrate                             | Sigma Aldrich, Steinheim                                    |
| Proteinmarker VI                                  | Applichem, Darmstadt  |
| Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets | Roche, Basel, Schweiz                                       |
| RIPA-Puffer                                       | Sigma Aldrich, Steinheim                                    |
| RPMI 1640 Medium                                  | PAN Biotech, Aidenbach                                      |
| Sypro Red protein gel stain                       | Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA          |
| TEMED   | Sigma Aldrich, Steinheim                                    |
| Tris base   | Applichem, Darmstadt  |
| Tris-HCl  | Merck, Darmstadt  |
| Trypanblau  | Sigma Aldrich, Steinheim                                    |
| Trypsin-EDTA-Lösung                               | PAN Biotech, Aidenbach                                      |
| Tween 20  | Fluka, Buchs, Schweiz                                       |

## 2.3 Puffer und Lösungen

|  |   |
|--|---|
| Blockierlösung Western Blot/Dot Blot   | 10 % Magermilchpulver in 1xTBS  |
| Blockierlösung für IL8-ELISA           | 10% FCS in PBS  |
| Coatingpuffer für IL8-ELISA            | 0,1 M Natriumcarbonat<br>pH 9,5 (7,13 g NaHCO <sub>3</sub> ; 1,59 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; H <sub>2</sub> O millipore<br>ad 1 L) |
| Calciumchlorid-Lösung                  | 2,5 M CaCl <sub>2</sub> , gelöst in Milli-Q-H <sub>2</sub> O  |
| Coomassie-Blau-Lösung                  | 0,25% Coomassie blue R250<br>45% Methanol<br>10% Essigsäure<br>50% H <sub>2</sub> O   |
| Coomassie-Entfärbelösung               | 40% Ethanol<br>10% Essigsäure<br>50% H <sub>2</sub> O   |
| HBS-Puffer (2x), pH 7,1                | 280 mM NaCl<br>50 mM HEPES<br>1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>   |
| Laemmli-Laufpuffer (5x)                | 40 mM Tris Base<br>0,95 M Glycin  |
| PBS (1x), pH 7,3                       | 150 mM NaCl<br>8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>   |
| PBST                                   | 0,05 % Tween 20 in PBS  |
| Sammegel-Trispuffer                    | 0,5M Tris-HCl<br>pH 6,8   |
| SDS-Probenpuffer (4x)                  | 312,5 mM Tris-HCl pH 6,8<br>10 % SDS (w/v)<br>250 mM DTT<br>50 % Glycerol<br>0,05 % Bromphenolblau  |
| TBS Puffer (1x), pH 7,4                | 25 mM Tris Base<br>2,7 mM KCl<br>150 mM NaCl  |
| Towbin/SDS Transferpuffer (1x), pH 8,8 | 25 mM Tris-HCl<br>0,02 % SDS  |

192 mM Glycin

20 % Methanol

## 2.5 Kits

|  |                                       |
|--|---------------------------------------|
| BCA-Protein-Assay-Kit Pierce                 | Thermo Scientific, Waltham, USA       |
| BD OptEIA TMB Substrat Reagent               | BD Biosciences, New Jersey, USA       |
| BD OptEIA Human IL-8-ELISA                   | BD Biosciences, New Jersey, USA       |
| DiffQuik Stain                               | Medion Diagnostics, Düringen, Schweiz |
| DOTAP Liposomal Transfection Reagent         | Roche Diagnostics, Basel, Schweiz     |
| ECL Prime Western Blotting Detection Reagenz | GE Healthcare, Solingen               |
| jetPRIME Transfection Reagent                | Axil Scientific, Singapur             |

## 2.6 Software

|  |                         |
|--|-------------------------|
| Image Quant TL 7.0 Image Analysis Software | GE Healthcare, Solingen |
| Microsoft Office 2008                      | Microsoft Office        |
| MicroWin 2000                              | Berthold                |

## 2.7 Zelllinien

|         |                                |
|---------|--------------------------------|
| Ag8     | Maus-Myelom-Zelllinie          |
| BFS-1   | Fibrosarkomzelllinie           |
| HEK 293 | Humane embryonale Nierenzellen |
| HT1080  | humane Fibrosarkomzelllinie    |

## 2.8 Antikörper

|                              |                                 |
|------------------------------|---------------------------------|
| Anti FLAG M2                 | BD Biosciences, New Jersey, USA |
| anti FLAG M2 HRP conj.       | eigene Herstellung              |
| Anti Human IL-8              | BD Biosciences, New Jersey, USA |
| Anti Human IL-8 biotinyliert | BD Biosciences, New Jersey, USA |
| goat anti-mTNF               | BD Biosciences, New Jersey, USA |
| rabbit anti-mTNF             | BD Biosciences, New Jersey, USA |
| rabbit anti-mTNF poAb Serum  | eigene Herstellung              |

## 2. 9 Vektoren

TNF80(mu)sc-Flag-TNC-pT2/SV-Neo

Universität Würzburg

pT2/SVNeo

Universität Würzburg

pCMV(CAT)T7-SB100

Universität Würzburg

## 3. Methoden

### 3.1 Zellkultur-Methoden

#### 3.1.1 Bedingungen für das Arbeiten mit eukaryotischen Zelllinien

Um eine Kontamination der Zellen zu verhindern, fanden alle zellbiologischen Arbeiten in einer Sterilbank statt. Die Kultivierung der verschiedenen Zelllinien fand in Zellkulturflaschen und Dishes (Zellkulturschalen) mit dem jeweils angegebenen Medium in einem Begasungsbrutschrank statt. Folgende Bedingungen waren notwendig (Gstraunthaler, Lindl 2013):

Temperatur: 37°C

CO<sub>2</sub>-Gehalt: 5 %

Luftfeuchtigkeit: 95%

#### 3.1.2 Zellkulturmedium

Die Kultivierung sämtlicher Zelllinien fand unter Verwendung des Kulturmediums RPMI 1640, dem 10% FCS und 1% P/S zugesetzt wurden, statt. Um das Komplementsystem des FCS zu inaktivieren, war es notwendig, das FCS 30 Minuten auf 56 °C zu erhitzen. Bevor das Medium verwendet werden konnte, musste es auf 37°C erwärmt werden.

Eine Ausnahme bezüglich der FCS-Konzentration bildete die Produktion von TNC-scTNF80 durch die HEK-Zellen. Diese erfolgte unter Zusatz von lediglich 2% FCS zum Kulturmedium.

Für die Transfektion von BFS-1 Zellen mittels DOTAP kam DMEM-Medium zum Einsatz.

#### 3.1.3 Kultur adhärent wachsender Zellen

Bei HEK, HT1080-BI2 und HT1080-BI2-TNFR2 sowie BFS-1 handelt es sich um adhärent wachsende Zellen, die einen Monolayer bilden. Abhängig von der Proliferationsrate wurden die Zellen ein bis zweimal pro Woche enzymatisch abgelöst und passagiert. Hierzu wurde das verbrauchte Medium abgesaugt, der Zellrasen mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung so lange inkubiert, bis sich die Zellen von der Oberfläche ablösten und eine Suspension bildeten. Dies wurde unter dem Mikroskop überprüft. Nun wurde eine 1:5 Verdünnung der Zellsuspension in frischem Medium hergestellt. Die Zugabe des Mediums war direkt im Anschluss an das Ablösen der Zellen notwendig, um die Wirkung des Trypsins durch den Verdünnungsschritt abzustoppen. Zudem musste das Kulturmedium im Wasserbad auf 37°C angewärmt werden.

### 3.1.4 Kultur von Suspensionszellen

Bei den Ag8-Zellen handelt es sich um Suspensionszellen. Auch hier musste das Medium alle 3-4 Tage gewechselt und eine Subkultur der Zellen gebildet werden. Hierfür wurde die Zellsuspension in ein Falcon-Tube überführt und bei 300 g 8 Minuten zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes und dem Resuspendieren in frischem Medium wurden die Zellen 1:5 verdünnt.

### 3.1.5 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Lebendzellzahl wurde mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Hierbei handelt es sich um ein optisches Präzisionsgerät. In einer dicken Grundplatte aus Spezialglas von der Größe eines Objektträgers sind drei Stege durch Längsrillen herausgefräst. Die plangeschliffenen Seitenstege sind 0,1 mm höher als der Mittelsteg, in welchen zwei Zählnetze eingezätzt sind (Gstraunthaler, Lindl 2013).

Zur Vitalfärbung wurden die Zellen in Trypanblau verdünnt.

Dabei handelt es sich um einen sauren Farbstoff, der als Anion sehr leicht an Proteine binden kann. Die Farbstoffaufnahme der Zellen ist stark pH-abhängig. Die maximale Aufnahme findet bei pH 7,5 statt. Deshalb sollte bei der Durchführung der pH-Bereich relativ eng eingehalten werden. Bei diesem Test ist außerdem zu berücksichtigen, dass möglichst ohne Serumzusatz im Medium gearbeitet werden sollte, da sich die Anzahl der gefärbten Zellen bei zunehmender Serumkonzentration drastisch vermindert und deshalb eine vorhandene Lebensfähigkeit vorgetäuscht werden kann (Gstraunthaler, Lindl 2013). Das Trypanblau lagert sich ausschließlich in tote Zellen ein, welche dadurch unter dem Mikroskop blau erscheinen und sich daher deutlich von den noch lebenden Zellen unterscheiden.

Ausgezählt wurden vier große Quadrate mit je 16 Kleinquadraten. Es wurde ein Mittelwert errechnet, welcher mit dem Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor  $10^4$  multipliziert wurde, um so die Anzahl der Zellen pro Milliliter zu erhalten:

$$\text{Durchschnittswert der 4 Großquadrate} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

### 3.1.6 Gewinnen von Überstand aus der Zellkultur

Zunächst wurden die Zellen in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 175 cm<sup>2</sup> ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurde der Zellkulturüberstand abgesaugt und der Zellrasen mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 3ml Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst. Dieser Vorgang wurde wiederum im Mikroskop kontrolliert. Durch Zugabe von 10 ml RPMI-Medium (10 % FCS, 1 % P/S) wurde die Reaktion abgestoppt. An dieser Stelle war das Resuspendieren der Zellen wichtig, sodass die Zellen einzeln vorlagen. Anschließend wurde 20 ml Medium, ebenfalls mit 10 % FCS, in einem Falcon-Tube vorgelegt und mit 10 ml der Zellsuspension vermischt. Nachdem in drei Dishes mit einer Wachstumsfläche von 145x20 mm jeweils 10 ml Medium vorgelegt wurden, wurde jeweils 10 ml der Zellsuspension hinzupipettiert, sodass das Endvolumen pro Dish 20 ml betrug.

Nach drei Tagen wurde das verbrauchte Medium der Dishes gewechselt. Das 10 % FCS-haltige Medium wurde abgesaugt und durch 2 % FCS-haltiges Medium ersetzt. Ab diesem Zeitpunkt startete die Produktion des TNC-scTNF80.

Die Produktion erfolgte über einen Zeitraum von 5 Tagen. Um den Überstand der HEK-Zellen zu gewinnen, wurde das Zellkulturmedium in Falcon-Tubes pipettiert und anschließend bei 3000 g und 4°C 15 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte das Filtrieren des Überstandes durch einen Sterilfilter (0,2 µm) in eine sterile Flasche. Der Überstand wurde bei 4°C gelagert.



Auf die gleiche Art und Weise wie bei den HEK-scTNF80 Zellen wurde der Überstand der HEK-pCR3 Zellen, welche lediglich den Leervektor enthalten, gewonnen.

## 3.2 Proteinbiochemische Methoden

### 3.2.1 Dialyse

Im Verlauf einer Proteinreinigung erhält man oft Lösungen, die in ihrer Ionenstärke für den nächsten Reinigungs- oder Analyseschritt ungeeignet sind. Die am längsten bekannte Entsalzungsmethode ist dabei die Dialyse. Der wichtigste Bestandteil der Dialyse ist die Dialysemembran, die kleine Moleküle frei diffundieren lässt, während größere Moleküle zurückgehalten werden. Es sind verschiedene Membranen im Handel, die sich vor allem in der Porengröße, dem sogenannten cutoff-Wert, unterscheiden. Dieser gibt das Molekulargewicht der Proteine an, die zu 90% von der Membran ausgeschlossen werden. Da aber neben dem Molekulargewicht des Proteins auch die Form, der Hydratationszustand und die Ladung eine wesentliche Rolle für einen Durchtritt durch die Membran spielen, gibt der cutoff-Wert keine scharfe Molekulargewichtsgrenze an, sondern nur einen Anhaltspunkt, welche Molekülgrößen die Membran noch relativ ungehindert passieren können (Rehm, Letzel 2010).

Zur Durchführung der Dialyse wird die Proteinlösung in einen Schlauch gefüllt, der aus einer Dialysemembran besteht. Diese sollte vor Gebrauch in destilliertem Wasser einige Minuten ausgekocht werden, da sie aus regenerierter Cellulose hergestellt wird und deshalb erhebliche Mengen an Schwermetallen enthält. Im Anschluss an das Auskochen sollte der Schlauch noch einmal ausgiebig mit destilliertem Wasser gespült werden. Da das Volumen der Probelösung durch Wassereinwanderung während der Dialyse erheblich zunehmen kann – abhängig von der Proteinkonzentration in der Lösung – darf der Dialyseschlauch nur zu maximal zwei Dritteln befüllt werden. Der so gefüllte, weitgehend luftfreie und durch Knoten oder Dialyseklammern an beiden Enden verschlossene Dialyseschlauch wird in ein Becherglas mit dem gewünschten Puffer gehängt. Die Diffusionsrate durch die Membran wird durch den Konzentrationsgradienten der diffundierbaren Teilchen, die Diffusionskonstanten dieser Teilchen, die Membranoberfläche und die Temperatur bestimmt. Für eine effektive Entsalzung soll der Puffer gerührt und einige Male gewechselt werden, um einen möglichst großen Konzentrationsgradienten an der Membranoberfläche aufrecht zu erhalten. Zur Stabilisierung von Proteinen wird die Dialyse normalerweise im Kühlraum durchgeführt. Bei sehr kleinen Probenmengen (Mikrogramm) und –volumina stößt diese Technik aufgrund von Adsorptionsverlusten jedoch an ihre Grenzen. Deshalb werden für diesen Zweck keine Dialyseschläuche mehr verwendet, sondern verschiedene spezielle Konstruktionen, z. B. der Deckel eines Eppendorfgefäßes, der auf einer Seite gegen den Puffer mit der Dialysemembran abgedichtet wird (Lottspeich, Engels 2009).

Im Zuge der TNC-scTNF80-Reinigung war es notwendig, kleinere Volumina gegen PBS zu dialysieren, um den TBS-Puffer gegen PBS auszutauschen und das FLAG-Peptid bzw. das Arginin, welches zur Elution eingesetzt wurde, aus den Eluatfraktionen zu entfernen.

Hierfür wurde die Dialysemembran, welche einen cutoff-Wert von 6-8 kD besaß, 15 Minuten auf 80°C unter Zusatz von 2 % Natriumhydrogencarbonat und 1 mM EDTA erhitzt. Nachdem die Membran mit VE-Wasser gespült wurde, wurde sie erneut 10 Minuten in VE-Wasser aufgeköcht. Um die Adsorption des TNC-scTNF80 an die Membran zu minimieren, wurde diese mit 0,0025% Tween 20 für 4 Minuten blockiert. Wichtig war es hierbei darauf zu achten, dass die Tween 20-Konzentration unterhalb der kritischen micellaren Konzentration bleibt. Für die Durchführung der Dialyse wurden in 2 ml

Eppendorfcups mit einem Skalpell kreisrunde Löcher in die Deckel geschnitten. Nachdem die Eluate in die Cups überführt wurden, wurde die Dialysemembran mithilfe des Deckels im Cup eingespannt. Die Cups wurden anschließend kopfüber in ein Becherglas mit 2 Liter PBS, welchem 0,02% NaN<sub>3</sub> zugesetzt wurde, gehängt und bei 4°C unter Rühren dialysiert. Nach einer Stunde wurde der erste Pufferwechsel und nach weiteren 4 Stunden ein zweiter Pufferwechsel durchgeführt und final über Nacht dialysiert.

### 3.2.2 PEG-Konzentrierung

Für die Konzentrierung des HEK-scTNF80 Zellkulturüberstandes wurde ein Dialyseschlauch mit der Lösung befüllt und auf das hygroskopische PEG 35000 gelegt. Dadurch wurden durch die Membranwand Flüssigkeit und kleine Moleküle gesaugt, das TNC-scTNF80 blieb innerhalb der Membran. Nachdem das PEG gelöst war, wurde dieses erneuert. Die Konzentrierung wurde solange durchgeführt, bis 1/5 des Ausgangsvolumens erreicht war.

### 3.2.3 Ammoniumsulfatfällung

Bei der Aussalzung von Proteinen macht man sich die Eigenschaften des Salzes, die hydrophoben Effekte in der Lösung zu vergrößern und die Proteinaggregation über hydrophobe Wechselwirkungen zu fördern, zunutze. Die sogenannte Hofmeister-Serie gibt Auskunft darüber, ob ein Salz diese hydrophoben Effekte aufweist oder ob es als chaotropes Salz hydrophobe Effekte vermindert und Proteine in Lösung hält. Die in der Reihe weiter links stehenden Salze weisen dabei antichaotrope (z. B. NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), die rechts stehenden Salze chaotrope Eigenschaften auf.

Die am häufigsten angewendete Methode der Proteinfällung ist das Aussalzen mit Ammoniumsulfat. Die Proteine müssen hierfür in einer Konzentration von etwa 0,01-2 % vorliegen. Der Schutz der biologischen Aktivität – auch empfindlicher Proteine – oberhalb einer Konzentration von 0,5 M macht Ammoniumsulfat besonders gut geeignet. Auch lässt es sich durch eine anschließende Dialyse leicht aus der Proteidlösung entfernen. Ammoniumsulfat muss portionsweise und unter kontrollierten Bedingungen zur Proteinlösung gegeben werden. Dies kann bis zur vollständigen Fällung einige Stunden dauern (Lottspeich, Engels 2009).

Die Ammoniumsulfatfällung des HEK-scTNF80 Zellkulturüberstandes wurde mit einer Sättigung von 50 % durchgeführt. Dies entspricht einer Menge von 377 g Ammoniumsulfat/Liter. Das Ammoniumsulfat wurde portionsweise unter Rühren über einen Zeitraum von einer Stunde zugegeben. Nach der vollständigen Zugabe des Salzes wurde eine weitere Stunde gerührt. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation der Suspension bei 15000 g für 15 Minuten. Das Pellet wurde schließlich in 1/40 des Ausgangsvolumens resuspendiert. Dies entsprach einer 20-fachen Konzentrierung des Zellkulturüberstandes.

### 3.2.4 Herstellen von Zelllysaten

#### 3.2.4.1 Zellyse mithilfe von Detergenzien

Um TNC-scTNF80 in Ag8 bzw. BFS-1 Zellen mittels Western Blot nachweisen zu können, wurden die Zellen mit detergenzienhaltigen Puffern (RIPA und M-PER) lysiert, sodass das Protein frei in der Suspension vorlag.

Zunächst wurden die Ag8-Zellen in einem Falcon Tube bei 300 g und 4°C für 8 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 10 ml PBS resuspendiert, erneut zentrifugiert, der Überstand erneut abgesaugt und das Pellet schließlich in 1 ml PBS aufgenommen.

Um ein Zelllysat der adhärent wachsenden BFS-1 und HEK-Zellen herstellen zu können, wurde zunächst das Medium abgesaugt, der Zellrasen mit 10 ml PBS gewaschen und die Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA abgelöst. Anschließend wurde diese Reaktion mit 10 ml Medium abgestoppt. Nun erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 300 g, 4°C für eine Dauer von 8 Minuten. Das Zellpellet wurde schließlich, nach dem Absaugen des Mediums, in 1 ml PBS resuspendiert.

Nun wurden die Zellen in der Neubauer Zählkammer wie beschrieben ausgezählt. Für die Lyse der Ag8- und HEK-Zellen kam RIPA Puffer unter Zusatz eines Proteaseinhibitors zum Einsatz. Nachdem die Zellen 10 Minuten bei 2500 g und 4°C zentrifugiert wurden, wurde der Überstand abgenommen und der Lysepuffer im Verhältnis  $1 \times 10^6$  Zellen/10µl Lysepuffer zugesetzt. Außerdem wurde Proteaseinhibitor zugesetzt und das Eppendorfcup für 10 Minuten auf Eis inkubiert.

Für die Lyse der BFS-1 Zellen kam M-PER + Proteaseinhibitor zum Einsatz. Das Verhältnis Zellzahl/Lysepuffer entsprach dem der Ag8-Zellen. Anstatt des 10-minütigen Inkubationsschrittes auf Eis erfolgte hier eine 15-minütige, rotierende Inkubation bei 4°C.

#### 3.2.4.2 Ultraschallaufschluss

Der Ultraschallzellaufschluss wird den mechanischen Zellaufschlussmethoden zugeordnet. Hierbei macht man es sich zunutze, dass durch schnelle Druckänderungen Zellen und Organellen sehr effizient aufgebrochen werden können. So werden mit Ultraschallwellen im Frequenzbereich von 10-40 kHz über einen Metallstab starke Druckänderungen in der Suspension eines Zellmaterials erzeugt. Da bei dieser Methode viel Wärme freigesetzt wird, sollten nur relativ kleine Volumina und kurze – maximal zehn Sekunden lange – Beschallungsimpulse eingesetzt werden. DNA wird unter diesen Bedingungen fragmentiert (Lottspeich, Engels 2009).

Für den Ultraschallzellaufschluss der Ag8-Zellen wurde die Zellsuspension in ein Falcon-Tube überführt und bei 300 g 8 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in einem definierten Volumen PBS resuspendiert und anschließend die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurde die Suspension in ein Eppendorfcup überführt und auf Eis aufgeschlossen. Die Amplitude wurde auf 8 % eingestellt und die Impulszahl lag bei 30. Nach dem Ultraschallaufschluss wurde der Erfolg des Aufschlusses unter dem Mikroskop überprüft.

Im Anschluss wurde ein BCA-Assay durchgeführt, um die Gesamtproteinkonzentration im Lysat zu bestimmen. Der Zellaufschlussüberstand wurde schließlich mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

#### 3.2.5 BCA-Assay

Beim Bicinchoninsäure-Assay handelt es sich um eine kolorimetrische Detektion zur Quantifizierung des Gesamtproteins in einer Probe. Der Assay beruht auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen durch deren Reaktion mit Protein zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen in alkalischem Medium. BCA bildet dann mit den  $\text{Cu}^+$ -Ionen einen violetten Farbkomplex, welcher photometrisch bestimmt werden kann. Dabei hängt die Intensität der Farbstoffbildung, also das Redoxverhalten der beteiligten Gruppen, unter anderem von der

Temperatur ab. Der BCA-Assay kann somit für eine gewünschte Sensitivität über die Temperatur variiert werden (Lottspeich, Engels 2009).

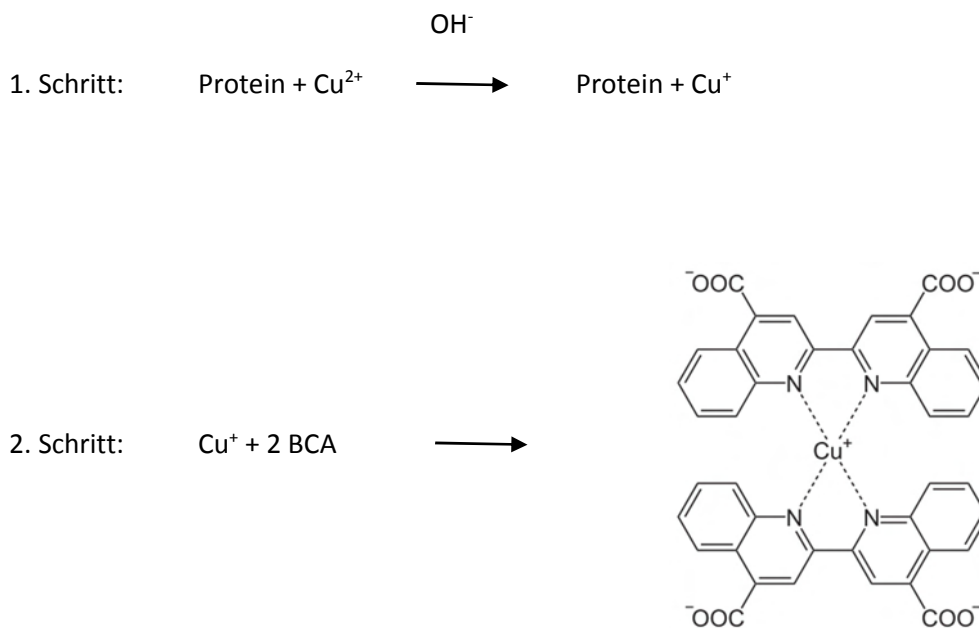


Abbildung 4: Der Bicinchoninsäure-Assay: Kombination der Biuret-Reaktion mit der selektiven Bicinchoninsäurekomplexierung von  $\text{Cu}^+$  (Lottspeich, Engels 2009).

Vorteile gegenüber anderen Assays sind beispielsweise die einfachere Durchführung, die beeinflussbare Sensitivität und die gute zeitliche Stabilität des gebildeten Farbkomplexes. Allerdings muss darauf geachtet werden, störende Substanzen in der Lösung, wie beispielsweise DTT, zu vermeiden (Lottspeich, Engels 2009).

Um die Konzentration des TNC-sctNF80 in den Eluaten und den Gesamtproteingehalt in den Ag8-Zelllysaten zu bestimmen, wurde eine Proteinbestimmung mithilfe des BCA-Assays durchgeführt. Die Messung der OD erfolgte bei 540 nm im Microplate Reader. Als Standard diente BCA in bekannter Konzentration: 1,75; 1,5; 1,0; 0,75; 0,5; 0,25 mg/ml. Die Proben wurden so eingesetzt, dass die zu erwartende Proteinkonzentration im Kalibrierbereich lag. In eine 96 Well-Platte wurden 10  $\mu\text{l}$  Standard bzw. Probe in Duplikaten pipettiert. Von der Mischung der Reagenzien A und B des BCA-Kits im Verhältnis 50:1 wurden je 200  $\mu\text{l}$ /Well pipettiert. Die Platte wurde bei 37°C für 30 Minuten inkubiert und anschließend bei 540 nm am Microplate Reader gemessen.

### 3.2.6 SDS-PAGE

Hierbei werden die in der Probe enthaltenen Proteine ausschließlich entsprechend des Molekulargewichts aufgetrennt.

Um dies zu erreichen, wird die zu untersuchende Probe mit einem Ladepuffer vermischt. Dieser enthält denaturierende und reduzierende Agenzien, einen Farbstoff sowie Glycerol als Beschwerungsmittel.

Nachdem der Ladepuffer und die Probe vermischt sind, wird die Gelprobe 5-10 Minuten auf 95°C erhitzt, kurz zentrifugiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Es wird erreicht, dass die Disulfidbrücken aufgebrochen werden. Das SDS, welches sowohl im Lauf- als auch im Ladepuffer enthalten ist, wird von den Proteinen in der Probe gebunden, sodass sich negativ geladene SDS-Protein-Komplexe mit konstantem Ladungs- zu Masse-Verhältnis bilden. SDS denaturiert die Proteine und unterbindet Protein-Protein-Wechselwirkungen (Quartärstrukturen). Die SDS-Protein-Komplexe verschiedener Proteine unterscheiden sich damit nur in ihrer Größe und haben vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften. Der SDS-Protein-Komplex wandert im elektrischen Feld zur Anode. Dabei trennt der Molekularsiebeffekt der porösen Polyacrylamidmatrix die SDS-Protein-Komplexe nach ihrem Stokes-Radius und damit nach ihrem Molekulargewicht auf (Rehm, Letzel 2010).

Benötigt werden ein Stromversorger, eine Elektrophoresekammer, Lauf- und Ladepuffer sowie Polyacrylamidgele.

Beim eingesetzten SDS-Gelelektrophoresesystem handelte es sich um das diskontinuierliche Lämmli-System mit Tris-Glycin-Puffer. Ein Sammelgel überschichtet dabei ein Trenngel. Polyacrylamidgele sind chemisch inert und besonders stabil. Durch chemische Copolymerisation von Acrylamidmonomeren mit einem Vernetzer erhält man ein klares, durchsichtiges Gel mit sehr geringer Elektroendosmose. Die Porengröße wird durch die Totalacrylamidkonzentration bestimmt. Für die SDS-PAGE wurden ausschließlich Trenngele mit 12 % Acrylamid sowie Sammelgele mit 4 % Acrylamid eingesetzt. Die Polymerisation erfolgte unter Luftabschluss, da Sauerstoff zum Kettenabbruch führt (Lottspeich, Engels 2009). Die Gele wurden zur Minimierung der Sauerstoffaufnahme in vertikalen Gießständen polymerisiert und mit n-Butanol überschichtet.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels (SDS-PAGE) für einen Ansatz von je 50 ml

|                            | Trenngel (12 %) | Sammelgel (4 %) |
|----------------------------|-----------------|-----------------|
| Polyacrylamid 30 %         | 20 ml           | 6,5 ml          |
| 1 M Tris pH 8,8            | 18,8 ml         | -----           |
| 1 M Tris pH 6,8            | -----           | 6,25 ml         |
| H <sub>2</sub> O millipore | 7,5 ml          | 36,5 ml         |
| Glycerol 86 %              | 2,87 ml         | -----           |
| SDS 10 %                   | 0,5 ml          | 0,5 ml          |
| TEMED                      | 50 µl           | 50 µl           |
| APS 10%                    | 250 µl          | 250 µl          |

Für die Gelproben wurden 5 µl des 4x Ladepuffers und 10 µl der zu untersuchenden Probe in einem Eppendorfcup gemischt und 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Eingesetzt wurde eine vertikale Elektrophoresekammer. Die Gele wurden dabei vollständig von Glasplatten und den Puffern eingeschlossen. Die Proben wurden oben auf das Gel in die Geltaschen aufgetragen, indem sie mit einer Pipette unter den Kathodenpuffer unterschichtet wurden. Es wurde eine konstante Stromstärke von 30 mA im Sammelgel und 35 mA im Trenngel angelegt. Die Laufzeit betrug unter diesen Bedingungen in der Regel 80-90 Minuten.

### 3.2.7 Coomassie-Färbung

Bei Coomassie handelt es sich um blaue Säurefarbstoffe, die als Coomassie-Brillantblau bezeichnet werden. In Gegenwart von Proteinen und in saurem Milieu wird der Farbstoff in seiner unprotonierten, anionischen Sulfonatform durch Komplexbildung zwischen Farbstoff und Protein stabilisiert. Der Farbstoff bindet dabei recht unspezifisch an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten der Proteine. Am Wichtigsten sind die Wechselwirkungen mit Arginin, weniger die mit Lysin, Histidin, Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin. Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 100 ng Protein (Lottspeich, Engels 2009).

Die mit der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden über die Färbung mit Coomassie sichtbar gemacht, falls das Augenmerk auf dem Gesamtprotein der Proben lag. Das Gel wurde im Anschluss an die SDS-PAGE für eine Stunde in Coomassie gefärbt und anschließend entfärbt, bis die gewünschte Farbtintensität vorlag. Auch wurden geblottete Gele gefärbt, um den Erfolg und die Vollständigkeit des Blot-Vorgangs zu überprüfen.

### 3.2.8 Sypro Red Proteinfärbung

Bei Sypro Red handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff für die 1-D SDS-PAGE. Der Vorteil dieser Färbung im Vergleich zur Coomassie-Färbung liegt darin, dass die Färbung in einem Schritt abläuft und kein Entfärben notwendig ist. Außerdem wird eine höhere Sensitivität als bei Färbung mit Coomassie erreicht, was allerdings auch einen höheren Hintergrund zur Folge haben kann (Lottspeich, Engels 2009). Die Extinktion des Sypro Reds liegt bei 532 nm und die Emission bei 631 nm.

Für die Durchführung der SDS-PAGE und der Färbung war es wichtig, Handschuhe zu tragen, da auch kleinste Proteinmengen zu Verunreinigungen auf dem Gel führen konnten. Die SDS-PAGE für beide Proteingele wurde mit einem großen Gel, das 24 Taschen hatte, durchgeführt. Die Proben wurden mit 4x Probenpuffer 5 Minuten aufgekocht. Auf das Gel wurden 15 µl aufgetragen. Nach der Auftrennung der Proteine wurde das Gel in 7,5 % Essigsäure gelegt und 15 Minuten gewaschen. Anschließend wurde Sypro Red 1:10000 in 7,5 % Essigsäure zugegeben und 45 Minuten im Dunkeln auf einer Wippe inkubiert. Um überschüssige Farbe zu entfernen, wurde im Anschluss an die Inkubationszeit erneut mit 7,5 % Essigsäure 10 Minuten gewaschen. Nun wurde das Gel luftblasenfrei in den Typhoon 9200 eingelegt und eingescannt. Anschließend erfolgte die Quantifizierung mit Image Quant.

### 3.2.9 FLAG-Tag Affinitätschromatografie

Die Affinitätschromatographie beruht auf der spezifischen und reversiblen Adsorption eines Moleküls (Adsorbent) an einen individuellen, matrixgebundenen Bindungspartner. Ein verfügbarer, affiner Bindungspartner wird kovalent an eine Matrix gebunden und dient als immobilisierter Ligand. Die biospezifische Wechselwirkung mit dem Zielmolekül wird genutzt, um diesen Adsorbenten selektiv aus einer komplexen Mischung heraus zu adsorbieren. Die Elution des Adsorbenten wird dann entweder durch kompetitive Verdrängung aus der Bindung erreicht oder durch einen Konformationswechsel aufgrund einer Änderung des pH-Werts oder der Ionenstärke. Die Affinitätschromatographie ist die Trennmethode mit der größten Spezifität und Selektivität für die Isolierung und Reinigung von Biomolekülen (Lottspeich, Engels 2009).

Als stationäre Phase wurde das anti-FLAG M2 Affinitätsgel der Firma Sigma Aldrich eingesetzt, wobei hier der monoklonale Antikörper IgG<sub>1</sub> kovalent an Agarose gebunden ist. Dieser Antikörper bindet spezifisch an das FLAG-Oktapeptid des TNC-scTNF80.

Die Reinigung 1 (R1) wurde im gravity flow durchgeführt, wobei der Adsorptionsschritt im Batch-Verfahren erfolgte.

Entsprechend des übernommenen Protokolls der Universität Würzburg wurde zunächst versucht, die Reinigung des TNC-scTNF80 aus den HEK-Zellkulturüberständen mittels gravity flow durchzuführen. Für 400 ml Zellkulturüberstand bei einer erwarteten TNC-scTNF80-Konzentration von 3 µg/ml wurden 2,5 ml FLAG M2-Agarose eingesetzt, da die Bindekapazität der FLAG M2-Agarose 0,4 mg/ml beträgt und somit eine maximale Sättigung der Säule erreicht werden sollte. Die in TBS/50 % Glycerol gelagerte Agarose wurde mit 20 column volumes (CV) TBS equilibriert. Dem Zellkulturüberstand wurden 150 mM NaCl zugesetzt, was der physiologischen Kochsalzkonzentration von 0,9 % entspricht. Der Überstand wurde in Falcon-Tubes überführt, die equilibrierte Agarose zugegeben und über Nacht bei 4°C und einer über-Kopf-Rotation inkubiert. Nach der Adsorption wurde am nächsten Tag die Matrix durch Zentrifugation bei 1000 g, 5 Minuten und 4°C separiert und im Anschluss mit einer Pasteurpipette entnommen und in eine leere Säule gepackt. Nun wurde zweimal mit 2,5 CV TBS gewaschen. Die Elution erfolgte mit 100 µg/ml FLAG-Peptid, gelöst in TBS. Insgesamt wurde mit 5 CV Elutionspuffer bei einem Flow von 1 Tropfen/40 Sekunden eluiert. Es wurden 13 Eluatfraktionen à 1 ml gesammelt. Die Waschschritte mit TBS im Anschluss an die Elution, die dem Regenerieren der Säule dienen sollten, wurden ebenfalls gesammelt und später analysiert, um die Vollständigkeit der Elution zu überprüfen.

Für die Reinigungen 2, 3, 6 und 7 kam das Batch-Verfahren und die Desorption mit 150 µg/ml FLAG-Peptid zum Einsatz. Hierfür wurde der Zellkulturüberstand, dem wiederum 150 mM NaCl zugesetzt wurden, wie oben beschrieben über Nacht mit der Agarose inkubiert. Nach dem Separieren der Matrix am nächsten Tag durch Zentrifugation bei 5000 g für 30 Sekunden und bei 4°C, wurde diese in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 30 CV TBS gewaschen. Für das Abtrennen der Überstände während der Waschschritte und der anschließenden Elution wurde ebenfalls eine Zentrifugation bei 5000 g, 4°C für eine Dauer von 30 Sekunden durchgeführt. Im Anschluss an das Waschen der Agarose erfolgte die Desorption des Proteins durch Zugabe von 5 CV Elutionspuffer. Dieser wurde mit der Agarose für eine Stunde auf der Wippe bei 4°C inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation wurde der Überstand (= Eluat 1) entnommen. Nun wurden 2 CV Elutionspuffer zugegeben und die Agarose resuspendiert. Bei R2 und R3 fand nach diesem Schritt keine Inkubation der Agarose mit dem Elutionspuffer statt, in R6 und R7 wurde vor Abzentrifugieren der Eluate 15 Minuten inkubiert. Nach dem Sammeln des Eluats 2 wurde in R2 und R3 nicht mehr mit Elutionspuffer, sondern mit TBS eluiert, wobei nicht inkubiert und direkt nach dem Resuspendieren der Matrix abzentrifugiert wurde. In R6 und R7 wurden E3-E5 mit Elutionspuffer und einer Desorptionszeit von 15 Minuten durchgeführt. Im Anschluss an die Reinigung wurde die Agarose mit TBS gewaschen und in 50 % Glycerol/TBS gelagert.

Für R4 und R5 galten dieselben Bedingungen wie in den eben beschriebenen Reinigungen im Batch-Verfahren. Jedoch wurde im Unterschied dazu Arginin-HCl zur Elution eingesetzt. Dass dies eine mögliche Elutionsmethode für Proteine mit FLAG-Tag ist, wurde von Futatsumori-Sugai et al., 2009, beschrieben. In dieser Arbeit wurden 0,5-1 M Arginin-HCl bei einem pH von 3,5-4,4 zur Elution eingesetzt.

Für die verschiedenen Ansätze kamen jeweils 50 ml Zellkulturüberstand und 50 µl anti-FLAG M2 Agarose zum Einsatz, wobei zusätzlich zu den Elutionen mit Arginin-Puffern immer als Vergleich eine Elution mit FLAG-Peptid durchgeführt wurde. Folgende Arginkonzentrationen und pH-Werte wurden gewählt:

|              |                                       |        |
|--------------|---------------------------------------|--------|
| Reinigung 4: | 0,5M Arginin-HCl in H <sub>2</sub> O, | pH 3,5 |
|              | 1M Arginin-HCl in H <sub>2</sub> O,   | pH 3,5 |
|              | 1M Arginin-HCl in H <sub>2</sub> O,   | pH 4,4 |
|              | 1M Arginin-HCl in H <sub>2</sub> O,   | pH 7,0 |
|              | 150µg/ml Flag-Peptid in TBS,          | pH 7,3 |
| Reinigung 5: | 1M Arginin-HCl in TBS,                | pH 4,4 |
|              | 1M Arginin-HCl in TBS,                | pH 5,0 |
|              | 1M Arginin-HCl in TBS,                | pH 5,5 |
|              | 1M Arginin-HCl in TBS,                | pH 6,0 |
|              | 1,5M Arginin-HCl in TBS,              | pH 6,0 |
|              | 2M Arginin-HCl in TBS,                | pH 6,0 |

Direkt im Anschluss an die Desorption wurden die Eluate mit Tris-BASE neutralisiert.

Tabelle 2: Zusammenfassung der durchgeführten TNC-scTNF80 Reinigungen

|   | R1   | R2  | R3  | R4  | R5  | R6  | R7  |
|---|--|---|---|---|---|---|---|
| <b>V<sub>Zellkulturüberstand</sub> [ml]</b> | 350  | 14  | 500                                       | 50/Ansatz   | 50/Ansatz   | 1000                                      | 1000<br>(aus R7)                          |
| <b>CV [ml]</b>                              | 2,5  | 0,1                                       | 0,5                                       | 0,05/Ansatz   | 0,05/Ansatz   | 1   | 1   |
| <b>Adsorptionsbedingungen</b>               | üN 4°C<br>üK                               | üN 4°C<br>üK                              | 1h<br>4°C<br>Wippe                        | 1h<br>4°C<br>Wippe  | 1h<br>4°C<br>Wippe  | 1h<br>4°C<br>Wippe                        | 1h<br>4°C<br>Wippe                        |
| <b>Elutionspuffer</b>                       | 100µg/ml<br>FLAG-Peptid in<br>TBS          | 150µg/<br>ml<br>FLAG-<br>Peptid<br>in TBS | 150µg/<br>ml<br>FLAG-<br>Peptid<br>in TBS | 0,5M Arg,pH<br>3,5<br>1M Arg, pH 3,5<br>1M Arg, pH 4,4<br>1M Arg, pH 7,0<br>150µg/ml<br>FLAG-Peptid in<br>TBS | 1M Arg, pH 4,4<br>1M Arg, pH 5,0<br>1M Arg, pH 5,5<br>1M Arg, pH 6,0<br>1,5M Arg,pH 6,0<br>2M Arg, pH 6,0;<br>alle gelöst in<br>TBS | 150µg<br>/ml<br>FLAG-<br>Peptid<br>in TBS | 150µg<br>/ml<br>FLAG-<br>Peptid<br>in TBS |
| <b>Desorptionsbedingungen</b>               | Gravity flow (1<br>Tropfen/40<br>Sekunden) | 1h<br>4°C<br>Wippe                        | 1h<br>4°C<br>Wippe                        | 1h<br>4°C<br>Wippe  | 1h<br>4°C<br>Wippe  | 1h<br>4°C<br>Wippe                        | 1h<br>4°C<br>Wippe                        |



Zwei Eluate aus früheren Reinigungen wurden im Verlauf der Arbeit immer wieder als Vergleich zu den durchgeführten Elutionen eingesetzt. Dabei handelte es sich um den Pool aus der Glycin-Elution (Elution mit 0,1 M Glycin, pH 3,5) und einen Pool aus der FLAG-Elution im gravity flow, wobei 37 µg/ml FLAG-Peptid zur Desorption eingesetzt wurde. Diese Konzentration stellte sich allerdings schon vor Beginn dieser Arbeit als zu niedrig heraus.

### 3.3 Immunologische Methoden

#### 3.3.1 Western Blot

Beim Western Blot werden die nach der Größe aufgetrennten Proteine eines SDS-Gels elektrophoretisch auf eine adsorbierende Membran übertragen und hier durch eine Immunreaktion detektiert.

Die Durchführung des Blottings erfolgte im Semidry-Verfahren. Hierbei besteht die Apparatur aus Plattenelektroden, zwischen denen das Blot-Sandwich aus Filterpapieren, Gel und Membran horizontal eingebaut wird, sodass ein elektrisches Feld senkrecht zum Gel anliegt. Die geringe Puffermenge, die für dieses Verfahren notwendig ist, hat den Vorteil, dass Proteine während des Transfers weniger mit reaktiven Verunreinigungen der Puffersysteme konfrontiert werden als beim Tankblotting. Zudem sind Proteinfärbung und Immunnachweise auf Semidry-Blots empfindlicher (Lottspeich, Engels 2009).

Bei der eingesetzten Membran handelte es sich um eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran mit 0,45 µm, welche eine positive Ladung aufweist, was den negativ geladenen Proteinen eine Bindung an der Membranoberfläche ermöglicht. Diese Membran ist hydrophob und zeichnet sich durch eine hohe chemische und mechanische Stabilität aus (Rehm, Letzel 2010).

Die Membran wurde durch Benetzung mit Methanol aktiviert und anschließend, genauso wie die Whatmanpapiere und das Gel in Transferpuffer für 3 Minuten equilibriert. Nun wurde das Sandwich aus 3 Filterpapieren, Membran, Gel und weiteren 3 Filterpapieren zusammengesetzt, wobei darauf zu achten war, dass sich zwischen den einzelnen Lagen keine Luftblasen befanden, und für 60 Minuten bei einer konstanten Spannung von 25 Volt geblottet.

Nach dem Blotten wurde die Membran für eine Stunde in TBS/10 % Magermilchpulver gelegt, um freie Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen, was spätere unspezifische Bindungen des Antikörpers verhinderte. Im Anschluss wurden 15 ml des Detektionsantikörpers, 1:30000 gelöst in TBS/1 % Magermilchpulver, zugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die hohe Verdünnung des Antikörpers war notwendig, um bei der hoch sensitiven ECL-Reaktion den Hintergrund niedrig zu halten (Rehm, Letzel 2010). Der HRP-konjugierte anti-FLAG Antikörper bindet spezifisch an den FLAG-Tag des TNC-scTNF80. Nun erfolgten drei Waschschrte à 10 Minuten mit TBS/0,05 % Tween 20, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Nach Zugabe von 1,2 ml der Substratlösung, bestehend aus 600 µl der Lösung A des Western Blotting Kits (Luminol Enhancer

Lösung) und 600 µl der Lösung B (Peroxidlösung) wurde die Membran im Image Quant LAS 4000 mittels Chemilumineszenz ausgewertet.

Unter Chemilumineszenz versteht man einen Prozess, bei dem in einer mehrstufigen chemischen Reaktion elektromagnetische Strahlung entsteht. Hierbei katalysiert eine Peroxidase die Oxidation von Luminol. Luminol zeigt in folgender Abbildung in alkalischer Wasserstoffperoxidlösung Chemilumineszenz. Im ersten Schritt findet dabei die Oxidation von Luminol (**1**) zur energiereichen Verbindung **2** statt. Diese setzt in einer Retro-Diels-Alder-Reaktion das stabile N<sub>2</sub> frei, wobei das Dinatriumsalz der 3-Aminophthalsäure (**3**) zunächst in energetisch angeregtem Zustand gebildet wird. Beim Übergang von **3** in einen energetisch tieferliegenden und damit günstigeren Zustand wird Energie in Form von sichtbarem Licht frei.

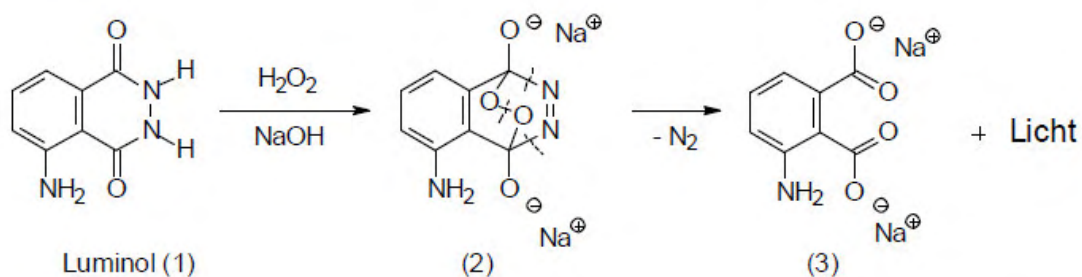


Abbildung 5: Chemilumineszenz. Mehrstufige chemische Reaktion von Luminol mit daraus resultierender Entstehung von elektromagnetischer Strahlung (Roesky, Möckel 1996).

Die Intensität kann durch Katalysatoren wie rotes Blutlaugensalz verstärkt werden, jedoch wird dadurch die Abklingzeit vermindert.

Das Maximum der Lichtemission, die durch die ECL-Reaktion entsteht, wird nach 5-20 Minuten erreicht und kann bei einer Wellenlänge von 425 nm mit einer CCD Kamera detektiert werden. Die Lichtemission verhält sich proportional zur Quantität des zu detektierenden Proteins (Lottspeich, Engels 2009).

### 3.3.2 ELISA

#### 3.3.2.1 IL-8 ELISA

Mit diesem ELISA ist es möglich, humanes Interleukin-8 (IL-8) in den Zellüberständen nachzuweisen.

Die Basis aller Enzym-Immunoassays (ELISA) bilden Antigen/Antikörperreaktionen (Schütt, Bröker 2011). Alle Reaktionen des ELISAs finden mit einem immobilisierten Partner statt, was die Trennung von gebundenen und nicht gebundenen Reagenzien erheblich erleichtert (Lottspeich, Engels 2009).

Als Marker wird ein Enzym eingesetzt, wodurch die Antigenkonzentration anhand des Substratumsatzes bestimmt werden kann (Luttmann et al. 2009). Ein lösliches und farbloses Chromogen wird zu einem löslichen, gefärbten und quantifizierbaren Farbstoff umgesetzt (Lottspeich, Engels 2009). Ein geeignetes Enzym bringt sowohl eine hohe Enzymaktivität als auch die Verfügbarkeit leicht zu detektierender Substrate mit. Darüber hinaus muss gewährleistet sein, dass das Enzym bei

typischen Assaytemperaturen im Bereich von 4°C bis 37°C über einen längeren Zeitraum stabil ist und sich möglichst einfach und reproduzierbar an Antikörper bzw. Antigen koppeln lässt. Aufgrund dieser Merkmale haben sich die Enzyme Meerrettich-Peroxidase (HRP), Alkalische Phosphatase (AP) aus dem Kälberdarm,  $\beta$ -Glaktosidase aus *Escherichia coli* und Glucoseoxidase aus *Aspergillus niger* als Enzyme der Wahl für den ELISA herauskristallisiert (Luttmann et al. 2009).

Man unterscheidet grundsätzlich drei ELISA-Systeme.

Zunächst gibt es ein EIA-System, das mithilfe eines enzymmarkierten Antigens kompetitiv nicht markiertes Antigen in komplexen Proteinmischungen messen kann. Die Verdrängung des markierten Antigens kann hierbei mit Standardlösungen nicht markierten Antigens kalibriert werden. Über eine Standardkurve kann der Verdrängungsgrad durch ein unbekanntes Antigen exakt quantifiziert werden.

Eine zweite Variante, der nichtkompetitive ELISA, arbeitet mit sukzessiv applizierten Reagenzien. Das System entspricht der Anordnung typischer Bindungstest, wobei das an eine Mikrotiterplatte adsorbierte Antigen einen Antikörper bindet, der über typische Amplifikationen nachgewiesen werden kann. Das Erkennungs- und Amplifikationssystem für den Nachweis dieser Bindung ist meist das indirekte, kann aber auch ein anderes System sein. Diese ELISA-Variante dient vor allem der Untersuchung von Antikörpern, deren Titer-Bestimmung oder der Aufdeckung der Antigen- und Epitopspezifität sowie der Epitopkartierung monoklonaler Antikörper. Dieses System eignet sich aber auch, um andere Bindungsfunktionen zu untersuchen, die nicht auf einer Antigen-Antikörper-Bindung beruhen (Lottspeich, Engels 2009).

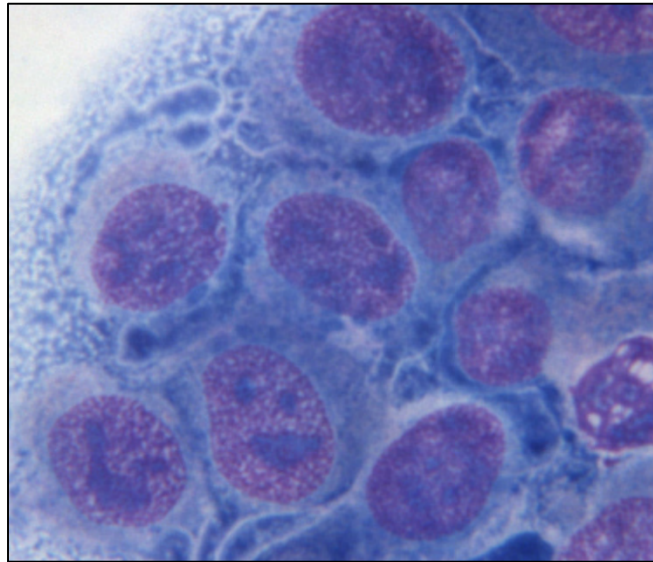
Ein weiteres System, der Sandwich-ELISA, dient vor allem der Quantifizierung von Antigenen, die in niedriger Konzentration in komplexen Mischungen vorliegen. Dieser ELISA beginnt mit der Immobilisierung eines spezifischen Antikörpers in einer Mikrotiterplatte, welcher als Fang-Antikörper (capture antibody) bezeichnet wird und das relevante gelöste Antigen bindet, sodass alle anderen nicht gebundenen Konstituenten der Mischung gewaschen werden können. Dieses Einfangen durch Binden des Antigens entspricht dem Bindungsschritt in der Affinitätschromatographie. Das durch den Fang-Antikörper gebundene Antigen kann nun in derselben Weise nachgewiesen werden wie beim einfachen nichtkompetitiven ELISA. Da das Epitop des Fangantikörpers bereits besetzt ist, ist es notwendig, für die Detektion des gebundenen Antigens einen zweiten markierten Antikörper mit einer anderen Epitopspezifität zu nutzen. Dies gilt vor allem bei Einsatz monoklonaler Antikörper (Lottspeich, Engels 2009).

Am häufigsten kommen der Sandwich- und der kompetitive ELISA zum Einsatz, wobei den Sandwich-ELISA in den meisten Fällen eine höhere Sensitivität auszeichnet (Luttmann et al. 2009).

Das Prinzip des IL-8 ELISAs, der mit dem OptEIA human IL8-ELISA Set durchgeführt wird, besteht darin, dass HT1080-Bcl2-TNFR2 Zellen mit TNC-scTNF80-haltigen Eluaten bzw. Zellkulturüberständen stimuliert werden und dadurch IL-8 produzieren. Dieses produzierte IL-8 wird dann mittels eines Sandwich-ELISAs nachgewiesen und quantifiziert. So lässt sich eine Aussage über die biologische Aktivität des zur Stimulierung eingesetzten TNC-scTNF80, das nach verschiedenen Verfahren gereinigt wurde, treffen. Die Durchführung der Stimulierung erfolgte auf HT1080-Bcl2-Zellen und auf HT1080-Bcl2-TNFR2-Zellen, sodass als Kontrolle die IL-8 Produktion der Zellen ohne TNFR2 gemessen wurde.

Zunächst mussten die Zellkulturüberstände der adhärent wachsenden HT1080-Bcl2- und HT1080-Bcl2-TNFR2-Zellen aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und der Zellrasen mit 10 ml PBS gewaschen werden. Im Anschluss wurden die Zellen mit 3 ml Trypsin/EDTA abgelöst. Der Erfolg dieses Vorgangs, der 1-3 Minuten dauert, wurde im Lichtmikroskop überprüft. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte mit

7 ml RPMI 1640-Medium, dem 10 % FCS zugesetzt wurde. Die Zellen wurden in 50 ml Falcon-Tubes überführt und 8 Minuten bei 4 °C und 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Pellets aufgeklopft. Anschließend wurde 5 ml frisches RPMI-Medium zugegeben und die Zellen resuspendiert.



*Abbildung 6: HT1080-Bcl2-TNFR2 Zellen. 1000-fache Vergrößerung, Färbung mit Diff-Quik, Medion Diagnostics.*

Im Anschluss musste die Zellzahl in beiden Suspensionen bestimmt werden, um diese für den weiteren Verlauf normieren zu können. Hierzu wurden die Zellen 1:5 mit Trypanblau verdünnt und in der Neubauer Zählkammer ausgezählt. Final sollte eine Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml erreicht und pro Well 100  $\mu$ l Zellsuspension aufgetragen werden. Die HT1080-Bcl2 Zellen und die HT1080-Bcl2-TNFR2 Zellen wurden in zwei 96-Well-Flachbodenplatten ausgesät ( $2 \times 10^4$  Zellen/Well). Jede Platte wurde zur Hälfte mit den TNFR2-positiven und den TNFR2-negativen Zellen bestückt und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten unter dem Lichtmikroskop auf Konfluenz und die Abwesenheit von Kontaminationen überprüft. Anschließend wurden die Überstände abgesaugt und die Wells mit den verschiedenen TNC-scTNF80-haltigen Proben für 8 Stunden bzw. über Nacht bei 37°C stimuliert.

Tabelle 3: IL-8 ELISA. Aufgetragene Proben und der Konzentrationen bzw. Verdünnungen

|   | Probe   | TNC-scTNF80 Konzentration | Aufgetragene Konzentrationen                                 |
|---|---|---------------------------|--|
| ELISA 1<br>(Stimulierung der HT1080-Zellen für 8 Stunden) | Glycin-Elution  | 265 µg/ml                 | 250 ng/ml, 50 ng/ml, 10 ng/ml, 2 ng/ml, 0,4 ng/ml, Ø (Blank) |
|   | Pool FLAG-Reinigung (Elution mit 37µg/ml FLAG-Peptid) | 333 µg/ml                 |  |
|   | Pool Reinigung 1                                      | 19,2 µg/ml                |  |
|   | HEK-scTNF80 SN nativ                                  | unbekannt                 | 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64                                   |
|   | SN AS-Fällung   | unbekannt                 |  |
|   | SN PEG-Dialyse  | unbekannt                 |  |
|   | HEK-pCR3 Leervektorüberstand                          | unbekannt                 |  |
| ELISA 2<br>(Stimulierung der HT1080-Zellen über Nacht)    | TNC-scTNF80 Würzburg                                  | 20 µg/ml                  | 250 ng/ml, 50 ng/ml, 10 ng/ml, 2 ng/ml, 0,4 ng/ml, Ø (Blank) |
|   | Pool R3   | 2,76 µg/ml                |  |
|   | HEK-scTNF80 nativ                                     | 1 µg/ml                   |  |
|   | Pool R4 (1M Arg, pH 3,5)                              | 4,38 µg/ml                | 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256                               |
|   | Pool R4 (1M Arg, pH 4,4)                              | 4 µg/ml                   |  |
|   | Pool R5 (1M Arg, pH 4,4)                              | unbekannt                 |  |
|   | Pool R5 (2M Arg, pH 6,0)                              | unbekannt                 |  |
| HEK-pCR3 Leervektorüberstand                              | unbekannt   |                           |  |

Nun wurden zwei ELISA-Platten mit dem Capture Antikörper gecoatet. Als Capture Antikörper diente der monoklonale Anti-huIL-8 (Anti-human IL-8). Dieser wurde 1:250 in Coating-Puffer verdünnt. Pro Well wurden 50 µl der Lösung aufgetragen. Die Platten wurden mit Parafilm abgedeckt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Platten dreimal mit 300 µl/Well Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden 200 µl PBS + 10% FCS/Well zum Blockieren hinzugegeben und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde weitere dreimal mit 300 µl Waschpuffer gewaschen. Anschließend konnten die Überstände der HT1080-Zellen und die IL-8 Standardreihe aufgetragen werden. Von allen Proben wurden Duplikate angefertigt.

Für die IL-8 Standardreihe wurden folgende Konzentrationen angesetzt: 2 ng/ml; 1 ng/ml; 0,5 ng/ml; 0,25 ng/ml; 0,125 ng/ml. Hiervon wurden, genauso wie von den Überständen, 50 µl/Well aufgetragen und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurde fünfmal mit 300 µl Waschpuffer/Well gewaschen. Nun wurden 50 µl/well des Detektionsantikörpers/Streptavidin-HRPs zugegeben. Für diese Mischung wurde der Detektionsantikörper, bei dem es sich um biotinyliertes Anti-human IL-8 handelte, 1:250 in PBS/ 10 % FCS verdünnt. Dieser Lösung wurde das Streptavidin-HRP 1:250 beigemischt, sodass das Streptavidin des Enzyms an das Biotin des Antikörpers binden konnte. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur wurde siebenmal mit 300 µl Waschpuffer gewaschen und anschließend 50 µl Substratlösung/Well zugegeben. Nach einer Entwicklungszeit von 5 Minuten im Dunkeln wurde die Reaktion mit 25 µl/Well 1 M Schwefelsäure abgestoppt. An dieser Stelle konnte ein Farbumschlag von blau/violett nach gelb beobachtet werden. Die Platten wurden im ELISA-Reader bei 450 nm ausgewertet.

### 3.3.2.2 anti-FLAG ELISA

Um eine alternative Quantifizierungsmethode für das TNC-scTNF80 zu entwickeln, wurde ein anti-FLAG ELISA durchgeführt. Es wurde die Methode des Sandwich-ELISAs gewählt. Hierfür musste die Frage geklärt werden, welcher Antikörper als coating-Antikörper die Bestbesetzung ist. Bei Einsatz eines anti-FLAG Antikörpers als coating-Antikörper bestand die Gefahr, dass für den späteren anti-FLAG M2 HRP conj. Detektionsantikörper nicht mehr ausreichend FLAG-Tag Bindeplätze vorhanden sind.

Folgende coating-Antikörper wurden auf ihre Tauglichkeit hin überprüft:

- goat-anti-mTNF (0,8µg/ml)
- anti-FLAG M2 (5µg/ml)
- rabbit anti-mTNF (V1q) 5µg/ml
- rabbit anti-mTNF PoAB Serum 1:200

Detektiert wurde mit anti-FLAG M2 HRP-konjugiert (1µg/ml). Die aufgetragenen Proben waren verschiedene Eluate der bisher durchgeführten Reinigungen, native Zellkulturüberstände sowie gereinigtes TNC-scTNF80 aus Würzburg.

Um den ELISA durchzuführen, wurde die ELISA-Platte mit 50 µl/Well coating-Antikörper gelöst in PBS gecoatet. Die Wells wurden mit Parafilm verschlossen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde 3 mal mit 300 µl PBS/T gewaschen und anschließend mit 250 µl für eine Stunde mit 1 % BSA in PBS bei Raumtemperatur blockiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden 50 µl/Well anti-FLAG M2 HRP conj. (1 µg/ml in 1 % BSA/PBS) zugegeben und wiederum eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend dreimal mit PBS/T gewaschen und das Substrat (OPTeIA) zugegeben. Nach einer Entwicklungszeit von 10 Minuten wurde die Reaktion mit 1 M Schwefelsäure abgestoppt und die OD<sub>450</sub> im ELISA-Reader gemessen.

## 3.4 Molekularbiologische Methoden - Transfektion

Der Begriff Transfektion bezeichnet das Einschleusen von Fremd-DNA in Säugerzellen. Um die Transfektion durchzuführen, kamen drei verschiedene Methoden zum Einsatz: Transfektion mit den zwei kommerziellen Kits DOTAP<sup>®</sup> und jetPRIME<sup>®</sup> sowie die Transfektion durch die Calciumphosphatmethode.

Nach einer Transfektion gelangt, je nach angewendeter Technik, nur ein Teil der eingesetzten DNA-Moleküle in den Zellkern und die Testgene werden dort für einige Tage exprimiert (transiente Transfektion). Durchschnittlich integriert eine von 10<sup>4</sup> Zellen das eingeschleuste Expressionsplasmid nach Transfektion in die chromosomale DNA (stabile Transfektion). Zur Selektion stabil transfizierter Zellen muss der eingesetzte Expressionsvektor einen Resistenzgenmarker besitzen, der in der transfizierten Zelle exprimiert wird. Bei Verwendung eines spezifischen Selektionsmediums über mehrere Zellteilungszyklen hinweg können nur Zellen überleben, die das Resistenzgenprodukt permanent exprimieren, während Zellen ohne Resistenzgenprodukt abgetötet werden (Lottspeich, Engels 2009). Ein weit verbreitetes und auch in dieser Arbeit eingesetztes Selektionssystem ist die Neomycin/Geneticinresistenz, die durch die vom neo-Resistenzgen kodierte Aminoglycosid-Phosphotransferase vermittelt wird. Im Anschluss an die Transfektion können stabil transformierte Zellen nach einer Selektion von 2-3 Wochen isoliert werden (Jansohn 2011).

Um dies zu erreichen, kann auf einen Pool von Transfektionstechniken zurückgegriffen werden.

Die ursprünglich bekannteste Technik zur Transfektion ist die Calciumphosphat-Transfektion. Ursprünglich wurde sie für die Steigerung der Infektiosität viraler Nukleinsäuren entwickelt und gehört bis heute zu den am häufigsten angewandten Transfektionsmethoden. Hierbei wird die Fähigkeit von Säugerzellen, Calciumphosphatkristalle zu phagozytieren, ausgenutzt. Hierfür wird die DNA in einer  $\text{CaCl}_2$ -Lösung vorgelegt und langsam unter ständigem Rühren mit Phosphatpuffer gemischt. Die gebildeten DNA/Calciumphosphat-Kopräzipitate werden in das Kulturmedium gegeben, adsorbieren auf der Zelloberfläche und werden durch Phagozytose in die Zelle aufgenommen. Der Weg der DNA aus dem Endosom in den Zellkern ist weitgehend ungeklärt (Jansohn 2011).

Bei der Herstellung dieser Kopräzipitate ist es extrem wichtig, die 2xHBS-Lösung langsam und unter ständigem Mischen zur DNA-Lösung zu geben. Zusätzlich muss unbedingt ein pH-Wert von 7,1 eingehalten werden. Nur Präzipitate der Größe, die in einem pH-Bereich von 6,9-7,5 gebildet werden, können von den Zellen aufgenommen werden (Jansohn 2011).

Die Lipofektion wurde erstmals 1987 beschrieben und erzielt, im Vergleich zur Calciumphosphatmethode, eine Steigerung der Transfektionseffizienz um den Faktor 5-100 (Jansohn 2011).

Bei der Lipofektion werden kleine unilamellare Vesikel aus dem kationischen 1,2-Dioleoyloxypropyl-3-trimethylammonium (DOTMA) und dem natürlichen Helferlipid Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) verwendet. Die Vesikel werden durch Ultraschallbehandlung der Liposomensuspension hergestellt. Die DNA wird hierbei ionisch an die Oberfläche der Liposomen gebunden. Die DNA-Lösung wird gewöhnlich in einem solchen Verhältnis mit den Liposomen gemischt, dass eine positive Nettoladung verbleibt und die Plasmid-DNA zu 100% von den Liposomen komplexiert wird. Die DNA/Liposomen-Komplexe binden an negativ geladene Sialinsäurereste auf der Zelloberfläche und gelangen durch Membranfusion ins Cytoplasma der Zelle. Mit seinen zwei Esterbrücken besitzt DOTAP den Vorteil, dass es in der Zelle durch unspezifische Esterasen abgebaut werden kann, wodurch die Toxizität deutlich verringert ist (Jansohn 2011).

Bei der Transfektion mit aktivierten Dendrimeren schließlich wird die Plasmid-DNA von den polykationischen Dendrimeren (verzweigte Polyamidoaminopolymere) gebunden und stark kondensiert. Die resultierenden Komplexe werden von den Zellen phagozytiert und in Endosomen aufgenommen. Dort vermindern die Dendrimere durch ihre Pufferwirkung den hydrolytischen Abbau der Plasmid-DNA (Jansohn 2011).

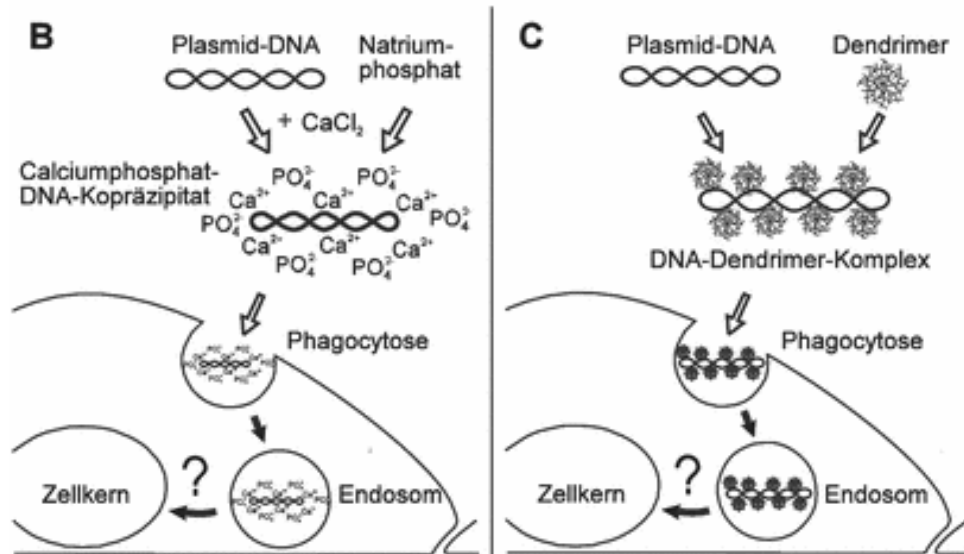


Abbildung 7: Chemische Transfektionsmethoden. B) Calciumphosphatmethode, C) Polymervermittelte Transfektion (Jansohn 2011).

Für die Durchführung der Transfektion wurde als Vertreter der polymervermittelten Transfektion das kommerzielle Kit jetPRIME (Axil Scientific) eingesetzt. Für die Transfektion mithilfe der liposomalen Technik kam DOTAP (Roche Diagnostics) zum Einsatz. Diesen beiden Methoden gegenübergestellt wurde die Transfektion mit Calciumphosphat.

Transfiziert wurden BFS-1 Zellen, eine Fibrosarkomzelllinie, die adhären wächst.

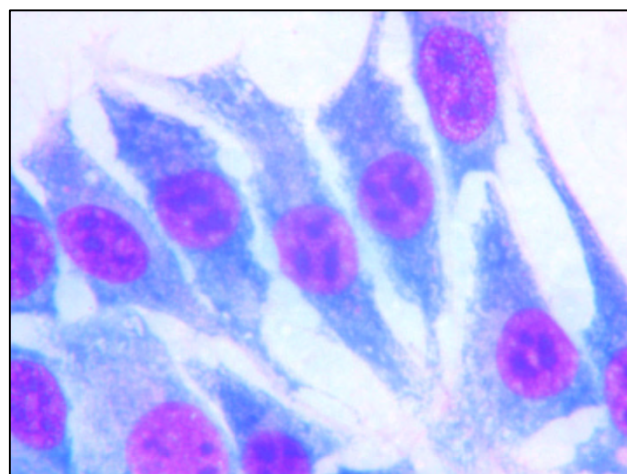


Abbildung 8: BFS-1 Zellen. 1000-fache Vergrößerung und Färbung mit Diff-Quik, Medion Diagnostics.



Die kultivierten BFS-1 Zellen wurden in einer 6-Well-Platte ausgesät. Hierbei wurde eine Zellzahl von  $1 \times 10^5$  Zellen/Well eingestellt. Die Inkubation erfolgte über Nacht. Am folgenden Tag sollte eine Konfluenz zwischen 60 und 80 % vorliegen, was einen optimalen Wert für eine anschließende Transfektion darstellt.

Der Einsatz von DOTAP und jetPRIME erfolge nach Herstellerangaben.

Für die Calciumphosphat-Transfektion wurden 2 µg Plasmid-DNA und 2 µg Transposon-DNA in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit 2,5 µl 2,5 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung gemischt, mit Milli-Q- $\text{H}_2\text{O}$  auf 25 µl aufgefüllt und anschließend 25 µl 2xHBS, pH 7,1, langsam unter ständigem Mischen dazugegeben. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation des Transfektionsmixes.

Für die Transfektion wurde ein Medienwechsel der Zellen, die auf der 6-Well Platte ausgesät wurden, durchgeführt. Der Transfektionsmix wurde langsam zu den Zellen pipettiert und 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurde ein Medienwechsel durchgeführt und für weitere 44 Stunden inkubiert.

Eine Woche nach der Transfektion wurde dem Medium G418 als Selektionsmarker zugesetzt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Reinigung von TNC-scTNF80 aus HEK-scTNF80 Zellkulturüberstand

#### 4.1.1 R1: Batch-Adsorption – Desorption im gravity flow

Der Adsorptions- und Desorptionsvorgang wurden wie beschrieben durchgeführt und die gesammelten Fraktionen mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

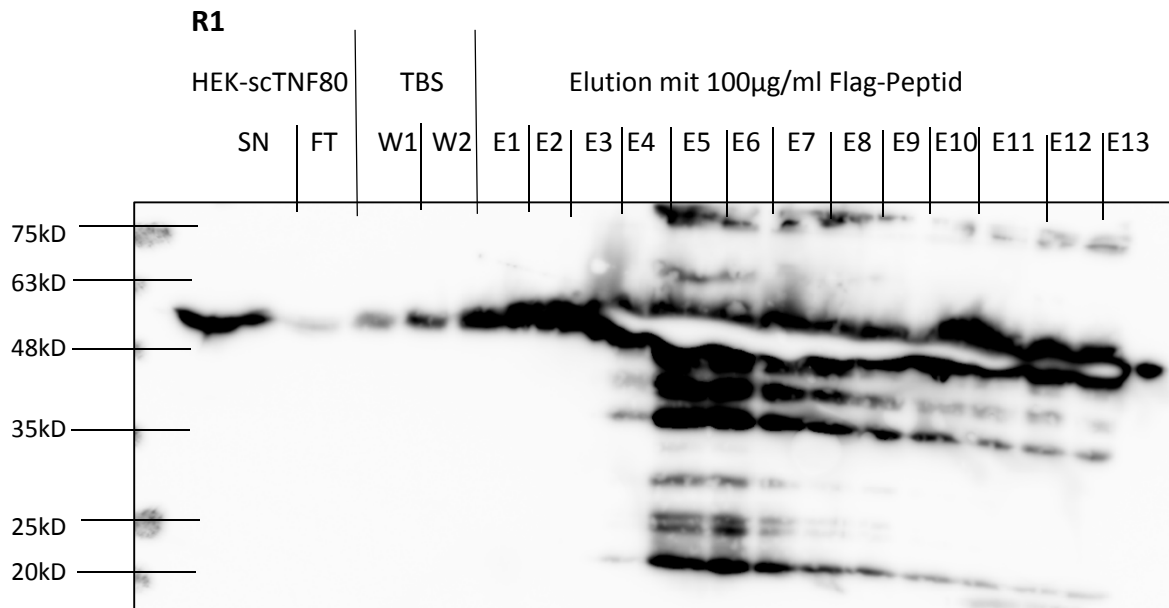


Abbildung 9: Western-Blot der R1: Reinigung von 350 ml HEK-scTNF80 Zellkulturüberstand mit 2,5 ml anti-FLAG M2 Agarose. Adsorption über Nacht bei 4°C, Desorption im gravity flow-1 Tropfen/40 Sekunden. Färben und Detektion erfolgten mit ECL Prime Western Blotting Detection Reagenz und Image Quant LAS 4000, die Auswertung mit Image Quant.

Im Durchlauf (FT) zeigte sich nur eine sehr schwache Bande im Molekulargewichtsbereich des TNC-scTNF80 (~57 kD). Dies weist auf eine noch nicht maximale Sättigung der anti-Flag M2-Agarose hin. Die TNC-scTNF80 Banden der Waschfraktionen W1 und W2 waren etwas kräftiger als die des FTs, jedoch lag diese Menge in einem tolerierbaren Bereich, sodass der Waschschritt mit TBS in dieser Form beibehalten werden konnte. In allen Eluatfraktionen wurde TNC-scTNF80 gefunden. In E4-E13 lag so viel TNC-scTNF80 vor, dass bereits nach 10-sekündiger Belichtungszeit im Image Quant LAS 4000 eine Sättigung eintrat, was keine quantitative Aussage bezüglich der Proteinmengen mehr zuließ.

Insgesamt zeigte sich, dass über die gesamte Dauer der Elution TNC-scTNF80 eluiert wurde, was dem erwarteten Elutionsprofil – im Idealfall ein schneller Anstieg bei einem etwas langsameren Abfall – widersprach. In dieser Elution handelte es sich nicht um einen Peak, sondern eher um ein Plateau, das über die gesamte Elution relativ konstant blieb.

Darüber hinaus sind auf der Membran viele unspezifische Banden erkennbar. Möglicherweise handelte es sich um Abbauprodukte des TNC-scTNF80, welche einen Flag-Tag enthielten und deshalb mit dem anti-Flag Antikörper detektiert werden konnten.

#### 4.1.2 R1 – Quantifizierung

Im nächsten Schritt wurde der TNC-scTNF80-Gehalt der gepoolten Eluate aus R1 quantifiziert, um eine Aussage bezüglich der Gesamtproteinmenge zu erhalten.

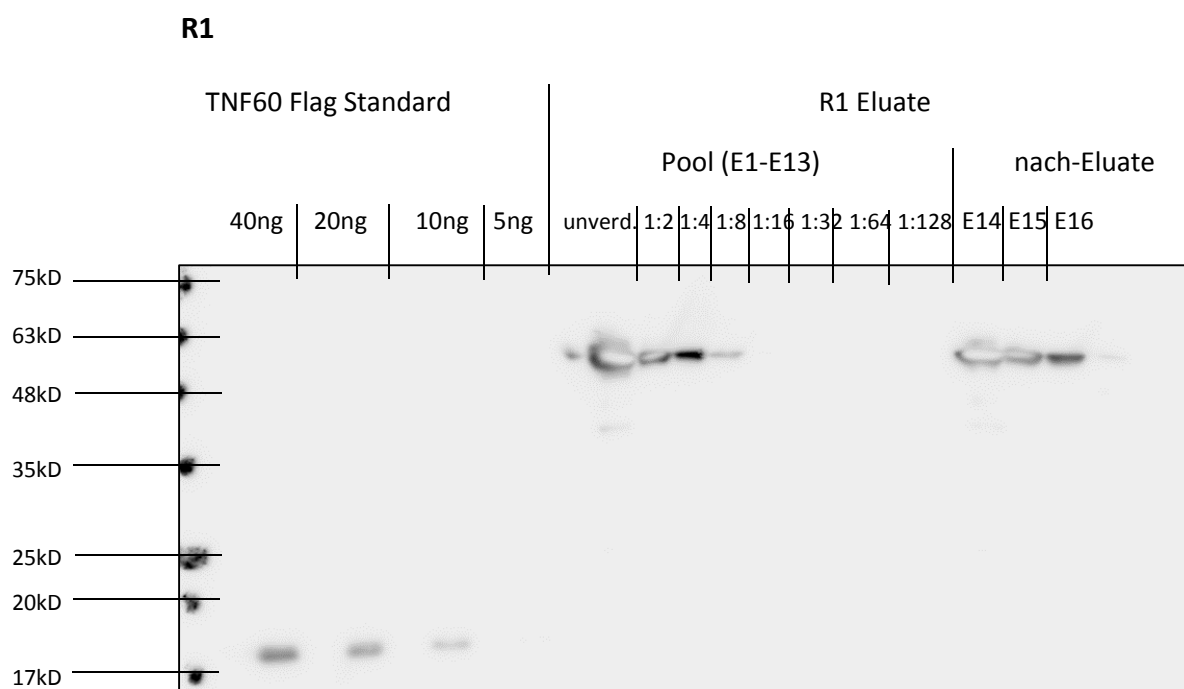


Abbildung 10: Western Blot: Quantifizierung des Pools der Eluate aus R1 mittels eines TNF60-Flag Standards. Färben und Detektion erfolgten mit ECL Prime Western Blotting Detection Reagenz und Image Quant LAS 4000, die Auswertung mit Image Quant.

Für die Quantifizierung wurden sowohl verschiedene Mengen TNF60-FLAG-Standard, als auch die angefertigten Verdünnungen des TNC-scTNF80-Pools auf ein Gel aufgetragen und mittels Western Blot analysiert.

Bei E14-E16 handelte es sich um „nach-Eluate“, d. h. diese Eluate entstanden bei der Reinigung der Säule mit TBS im Anschluss an R1. Somit zeigte sich, dass sich in diesen 3 Fraktionen nach wie vor TNC-scTNF80 befand. Die Säule wurde in R1 nicht vollständig eluiert. Es war deutlich erkennbar, dass die Desorption des TNC-scTNF80 auch nach 13 Elutionsschritten mit einem Gesamtelutionsvolumen von 4,8 CV noch nicht vollständig war. Eine mögliche Ursache für dieses Ergebnis könnte eine zu geringe Menge an FLAG-Peptid im Elutionspuffer sein (100 µg/ml). Die „Nach-Eluate“ konnten nicht quantifiziert werden, da sich die Banden bereits in der Sättigung befanden.

Die unverdünnte sowie die 1:2 und 1:4 verdünnten Proben waren für die Quantifizierung ebenfalls unbrauchbar, da sich hier bereits eine Sättigung eingestellt hatte und die von Image Quant errechnete Konzentration somit unter dem eigentlichen Wert lag. Um die Konzentration an TNC-scTNF80 zu ermitteln, konnte die 1:8 verdünnte Probe herangezogen werden. Alle weiteren Verdünnungsschritte wiesen keine nachweisbare Menge an TNC-scTNF80 mehr auf.

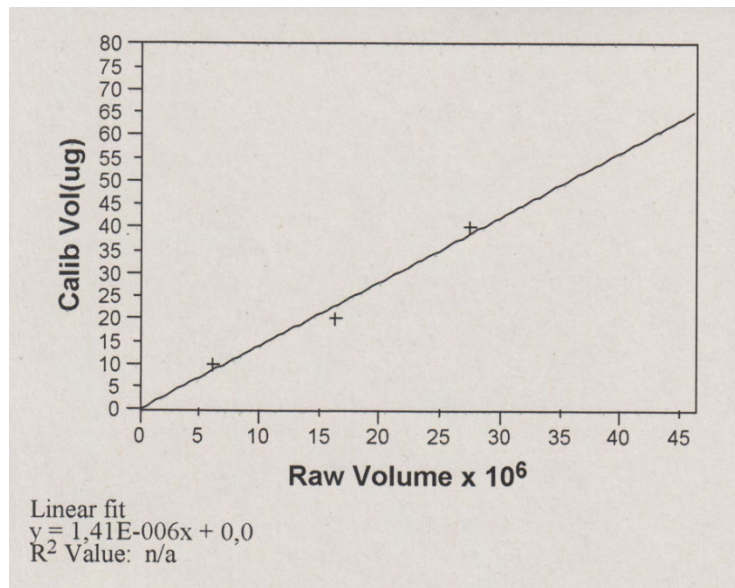


Abbildung 11: von Image Quant erzeugte Standardgerade für den Western Blot aus Abbildung 10. Quantifizierung der Eluate aus R1 erfolgte durch Image Quant mittels dieser FLAG-TNF60 Standardgerade (40ng, 20ng, 10ng)

Die errechnete Menge TNC-scTNF80 für die 1:8 verdünnte Probe lag bei 9,8 ng, wobei dieser Wert noch mit dem Faktor 3 multipliziert werden musste, da es sich bei dem FLAG-TNF60-Standard lediglich um ein Monomer handelt, das TNC-scTNF80 aber als Trimer vorliegt. Diese Methode zur Quantifizierung wurde von der Universität Würzburg übernommen. Auf das Gel aufgetragen wurde ein Volumen von 12 µl Probe, d. h. in der 1:8 Verdünnung befanden sich 1,5 µl der Probe. In diesen 1,5 µl befanden sich also 29,4 µg TNC-scTNF80. Bei einem Probenvolumen von 12 ml ergab sich somit eine Gesamtproteinmenge von 235,2µg, was einer Konzentration von 19,6 µg/ml entspricht.

Ausgehend von der Annahme, dass sich im HEK-scTNF80-Zellkulturüberstand 3µg/ml TNC-scTNF80 befanden, lag der erwartete Wert für die Gesamtmenge an Protein in 350ml Überstand bei 1,05 mg TNC-scTNF80. Dieser Wert impliziert, dass das gesamte TNC-scTNF80 aus dem Überstand an die Säule bindet und sich im Anschluss vollständig in den Eluatfraktionen wiederfindet. Geht man davon aus, dass die experimentell erhaltene Menge etwas geringer ist, handelt es sich trotzdem um einen Wert, der vermuten lässt, dass die Bindekapazität der Säule theoretisch voll ausgeschöpft ist.

Bei der Berechnung der Proteinmenge über den FLAG-TNF60-Standard wurde für die gepoolten Fraktionen (12 ml) eine Proteinmenge von 235,2 µg ermittelt, was lediglich einem Viertel der zu erwartenden Proteinmenge entsprach.

Bei der Konzentrationsbestimmung mit dem TNC-scTNF80 Standard der Universität Würzburg lag die Proteinkonzentration mit 4,92 µg/ml sogar noch einmal deutlich unter dem vorher bestimmten Wert. Dieser Wert unterschied sich kaum von dem angenommenen Wert von 3 µg/ml im Zellkulturüberstand, was bedeuten würde, dass mit der Reinigung keine Konzentrierung des Proteins erreicht wurde.

#### 4.1.3 R2 – Batch-Elution

Mit dem Ziel, das Elutionsprofil aus R1 zu verbessern und möglichst eine vollständige Elution des TNC-scTNF80 zu erreichen, wurde eine Desorption des TNC-scTNF80 im Batch Verfahren durchgeführt. Die Konzentration des FLAG-Peptids im Elutionspuffer lag bei 150µg/ml. Als Kontrolle wurde der HEK-pCR3 Leervektorüberstand in gleicher Art und Weise gereinigt.

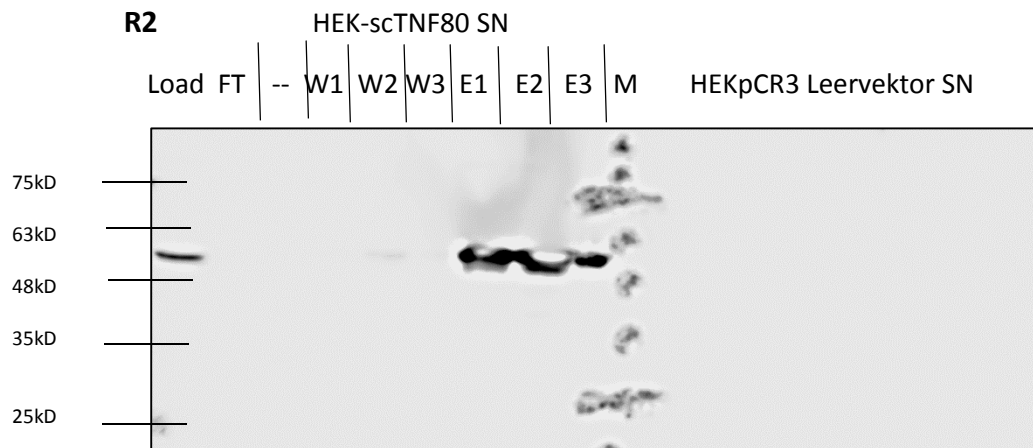


Abbildung 12: Western Blot der R2: Reinigung von 14 ml HEK-scTNF80 Zellkulturüberstand mit 100 µl anti-FLAG M2 Agarose. Adsorption über Nacht, 4°C; Desorption mit 150µg/ml Flag Peptid im Batch Verfahren. Färben und Detektion erfolgten mit ECL Prime Western Blotting Detection Reagenz und Image Quant LAS 4000, die Auswertung mit Image Quant.

Es zeigte sich, dass das verwendete Volumen an Zellkulturüberstand (14 ml) nicht ausreichte, um eine maximale Sättigung der 100 µl anti-FLAG M2 Agarose zu erreichen. In den Waschfraktionen war, wie schon in R1, kaum Protein zu detektieren. Man sah zudem, dass in den ersten beiden Elutionsschritten, welche mit FLAG-Peptid durchgeführt wurden, große Mengen an TNC-scTNF80 eluiert wurden. Außerdem befand sich auch in E3 noch Protein, obwohl hier nur TBS zur Elution bzw. zum Waschen der Agarose im Anschluss an die Reinigung eingesetzt wurde. Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die Elution unter diesen Bedingungen vollständiger ablief als in R1 wäre es nötig gewesen, noch weitere Elutionsschritte durchzuführen und diese mittels Western Blot zu analysieren. Außerdem sollte für den nächsten Schritt berücksichtigt werden, ein anderes Zellkulturüberstand-Säulenvolumen-Verhältnis zu wählen, da keine Sättigung der Säule vorlag.

#### 4.1.4 R3 – Batch-Elution

Für R3 wurden 500 ml Zellkulturüberstand und 0,5 ml Säulenvolumen eingesetzt. Ziel war es, eine etwas größere Menge an TNC-scTNF80 zu erhalten, damit diese in parallel laufenden Versuchen eingesetzt werden konnte.

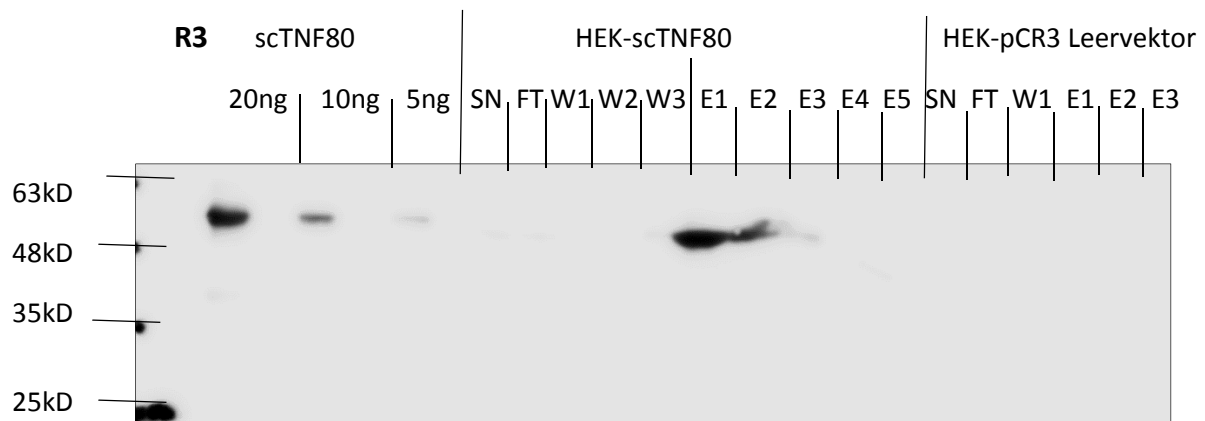


Abbildung 13: Western Blot der R3: Reinigung von 500 ml HEK-scTNF80 Zellkulturüberstand mit 0,5 ml anti-FLAG M2 Agarose. Adsorption 1 Stunde, 4°C; Desorption mit 150µg/ml Flag Peptid im Batch Verfahren. Färben und Detektion erfolgten mit ECL Prime Western Blotting Detection Reagenz und Image Quant LAS 4000, die Auswertung mit Image Quant.

Auch bei dieser Reinigung zeigte sich, dass noch immer keine maximale Sättigung der Agarose erreicht wurde.

In den Waschfraktionen war auch bei R3 kaum Zielprotein erkennbar. Die größte Menge an TNC-scTNF80 konnte in E1 detektiert werden. Auch in E2 befand sich noch Protein, in E3 nur noch eine sehr geringe Menge. E4 und E5 wiesen keine nachweisbare Menge an TNC-scTNF80 mehr auf. Dies spricht dafür, dass die Elution vollständig war und kein Protein mehr an die Agarose gebunden war.

Im Überstand des Leervektors konnte, wie erwartet, kein Protein nachgewiesen werden.

Da auf dem Gel auch eine Standardreihe aufgetragen wurde, konnte eine Quantifizierung mittels Image Quant erfolgen. Es ergaben sich folgende Werte:

|                  |                        |                  |
|------------------|------------------------|------------------|
| E1: 27,62ng/10µl | $V_{E1}=3\text{ml}$    | → 8,29µg scTNF80 |
| E2: 16,88ng/10µl | $V_{E2}=0,75\text{ml}$ | → 1,27µg scTNF80 |
| E3: 6,39ng/10µl  | $V_{E3}=2\text{ml}$    | → 1,28µg scTNF80 |

Die Eluatfraktionen 1 und 2 wurden gepoolt, da beide die höchste Proteinkonzentration aufwiesen. Im Anschluss an die Dialyse gegen PBS lag das Gesamtvolumen des Pools bei 3 ml. Dies führte zu einer TNC-scTNF80-Konzentration von 3,18µg/ml.

Die Ausbeute der Reinigung 3 betrug damit 9,6 µg TNC-scTNF80. Da der gereinigte Überstand auf dem Western Blot nicht als Bande erkennbar und damit nicht zu quantifizieren war, konnte die Wiederfindungsrate nicht berechnet werden.

#### 4.1.5 R4 – Arginin-Elution

Im Zuge von Reinigung 4 wurde untersucht, ob FLAG-Peptid im Elutionspuffer durch das wesentlich preisgünstigere Arginin-HCl ersetzt werden kann. Dazu wurden mehrere parallele Ansätze mit verschiedenen Elutionspuffern im Batch Verfahren durchgeführt:

|                                       |        |
|---------------------------------------|--------|
| 0,5M Arginin-HCl in H <sub>2</sub> O, | pH 3,5 |
| 1M Arginin-HCl in H <sub>2</sub> O,   | pH 3,5 |
| 1M Arginin-HCl in H <sub>2</sub> O,   | pH 4,4 |
| 1M Arginin-HCl in H <sub>2</sub> O,   | pH 7,0 |
| 150µg/ml Flag-Peptid in TBS,          | pH 7,3 |

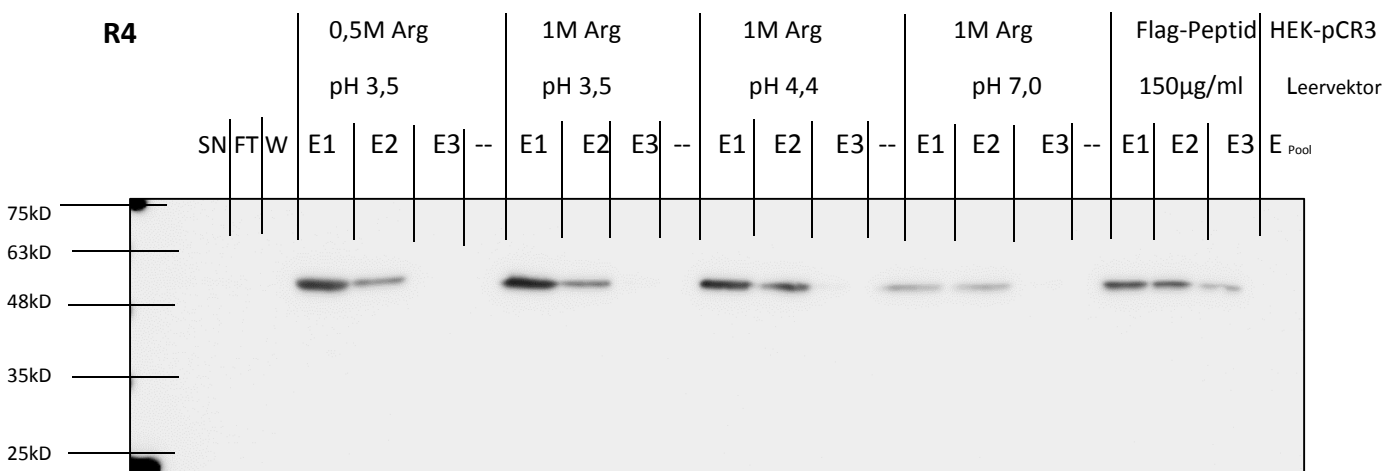


Abbildung 14: Western Blot der R4: Adsorption 1 Stunde, 4°C; Desorption mit verschiedenen Arginin Puffern im Batch Verfahren; je Ansatz Reinigung von 50 ml HEK-sctNF80 Zellkulturüberstand mit 50 µl anti-FLAG M2 Agarose. Färben und Detektion erfolgten mit ECL Prime Western Blotting Detection Reagenz und Image Quant LAS 4000, die Auswertung mit Image Quant.

Zunächst ist anzumerken, dass bei der gewählten Belichtungszeit keine Bande im SN, also im Zellkulturüberstand, erkennbar war. Dies deutete darauf hin, dass der zur Detektion verwendete HRP-konjugierte anti-FLAG Antikörper, der bereits zum 4. Mal eingesetzt wurde, erneuert werden sollte.

Im FT war ebenfalls keine Bande erkennbar. Somit lag noch immer keine maximale Sättigung der Agarose vor oder die Menge an TNC-sctNF80 im FT war so gering, dass sie mit dem mehrfach verwendeten Antikörper nicht detektiert werden konnte.

Verglich man die verschiedenen Elutionsbedingungen, so waren die stärksten Banden im ersten Elutionsschritt bei der Elution mit 1 M Arginin bei einem pH von 3,5 sowie bei 1 M Arginin bei einem pH von 4,4 erkennbar. Mit Ausnahme der Arginin-Elution bei pH 7 zeigten alle ersten Elutionsfraktionen stärkere Banden als die zweiten Elutionsfraktionen. Bei der parallel dazu

durchgeführten Elution mit FLAG-Peptid war dies nicht erkennbar. Hier waren die Banden in E1 und E2 annähernd gleich stark. Zudem zeigte die Elution mit FLAG-Peptid deutlich schwächere Banden als bei der Elution mit Arginin. Lediglich die Arginin-Elution unter neutralen Bedingungen lieferte noch schlechtere Ergebnisse.

In den 3. Eluatensätzen aller mit Arginin durchgeführten Elutionen war kein TNC-scTNF80 mehr nachweisbar, was im Gegensatz zu der Elution mit FLAG-Peptid steht. Dieser dritte Elutionsschritt wurde in allen Ansätzen mit TBS durchgeführt. Es könnte also sein, dass bei der Elution mit Arginin bereits nach 7 CV eine vollständige Desorption des TNC-scTNF80 erreicht wurde. Möglich wäre aber auch, dass bei einer nochmaligen Elution mit Arginin weiteres TNC-scTNF80 eluiert werden würde.

Es schloss sich zudem die Frage an, ob die biologische Aktivität des TNC-scTNF80 nach Elution unter sauren Bedingungen erhalten bleibt. Auch musste geklärt werden, ob eine Erhöhung der Arginkonzentration im Elutionspuffer möglicherweise auch unter annähernd neutralen Bedingungen zu einer ausreichenden Elution des TNC-scTNF80 führt. Abschließend stellte sich darüber hinaus die Frage, ob die Desorption auch funktioniert, wenn das Arginin nicht in H<sub>2</sub>O, sondern in TBS gelöst werden würde, da unter diesen physiologischen Bedingungen das Protein vermutlich stabiler ist.

#### 4.1.6 R4 – Quantifizierung

Nun wurden die Eluate aus R4 gepoolt und mittels Western Blot und Image Quant quantifiziert. Zusätzlich zu den Eluatensätzen aus R4 wurden noch die „Nach-Eluate“ aus R1 sowie native Zellkulturüberstände und eine Zellysatsprobe der Ag8-Zellen untersucht.

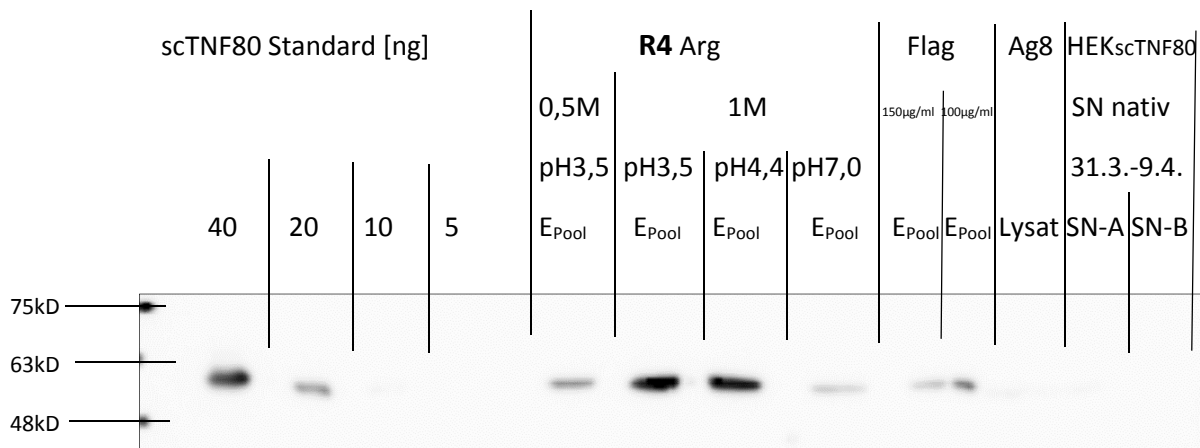


Abbildung 15: Western Blot zur Quantifizierung der Pools der Eluate aus R4. Auftrag von 10µl Probe/Lane. Färben und Detektion erfolgten mit ECL Prime Western Blotting Detection Reagenz und Image Quant LAS 4000, die Auswertung mit Image Quant.

Folgende Werte konnten ermittelt werden:



|                                      |               |                              |  |         |
|--------------------------------------|---------------|------------------------------|--|---------|
| 0,5M Arginin, pH 3,5                 | 19,27ng/10µl  |                              |  |         |
| 1M Arginin, pH 3,5                   | 43,83ng/10µl, | V <sub>gesamt</sub> =100 µl, | TNC-scTNF80 <sub>gesamt</sub> =0,44µg, | Wf=0,9% |
| 1M Arginin, pH 4,4                   | 39,95ng/10µl, | V <sub>gesamt</sub> =140 µl, | TNC-scTNF80 <sub>gesamt</sub> =0,56µg, | Wf=1,1% |
| 1M Arginin, pH 7,0                   | 14,29ng/10µl, | V <sub>gesamt</sub> =400 µl, | TNC-scTNF80 <sub>gesamt</sub> =0,56µg, | Wf=1,1% |
| 150µg/ml Flag-Peptid                 | 14,17ng/10µl, | V <sub>gesamt</sub> =100 µl, | TNC-scTNF80 <sub>gesamt</sub> =0,14µg, | Wf=0,3% |
| Pool E14-E16 (R1)                    | 18,49ng/10µl  |                              |  |         |
| Ag8 Lysat (1x10 <sup>6</sup> Zellen) | 10,44ng/10µl  |                              |  |         |
| HEK-scTNF80 SN nativ                 |               |                              |  |         |
| (A, 31.3.-9.4.14)                    | 10,0ng/10µl   |                              |  |         |
| HEK-scTNF80 SN nativ                 |               |                              |  |         |
| (B, 31.3.-9.4.14)                    | 10,0ng/10µl   |                              |  |         |

Es bestätigte sich die Annahme, dass bei der Elution mit 1 M Arginin bei pH 3,5 und 4,4 die größten Mengen an TNC-scTNF80 eluiert wurden. Für die nativen Überstände wurde eine Konzentration von 1µg/ml errechnet. Legt man diese Annahme für R4 zu Grunde, so müssten in 50 ml Überstand, was einem einzelnen Ansatz entspricht, 50 µg TNC-scTNF80 enthalten sein.

Die geringe Wiederfindung des TNC-scTNF80 in allen Eluaten konnte zum einen einem Quantifizierungsfehler zu Grunde liegen. Möglicherweise lag der TNC-scTNF80-Gehalt im Zellkulturüberstand unter dem ermittelten Wert von 1 µg/ml. Die höchste Wiederfindung mit 1,1% lieferte die Elution mit 1 M Arginin-HCl bei einem pH-Wert von 4,4. Allerdings ergab auch die Elution mit 1 M Arginin-HCl bei pH 7,0, die eine deutlich schwächere Bande lieferte, diesen Wert. Dies könnte mit der im Anschluss an die Elution durchgeführten Dialyse zusammenhängen. Aufgrund des geringeren Volumens des Eluates bei pH 4,4 kann sich die Adsorption des Proteins an die Dialysemembran und das Dialysegefäß stärker ausgewirkt haben als bei dem Eluat mit größerem Volumen und geringerer Proteinkonzentration.

#### 4.1.6 R5 – Arginin-Elution

Im Folgenden wurde untersucht, ob eine Erhöhung der Argininkonzentration im Elutionspuffer zu einer Verbesserung der Desorption unter annähernd neutralen Bedingungen führt. Außerdem wurde das Arginin in TBS gelöst.

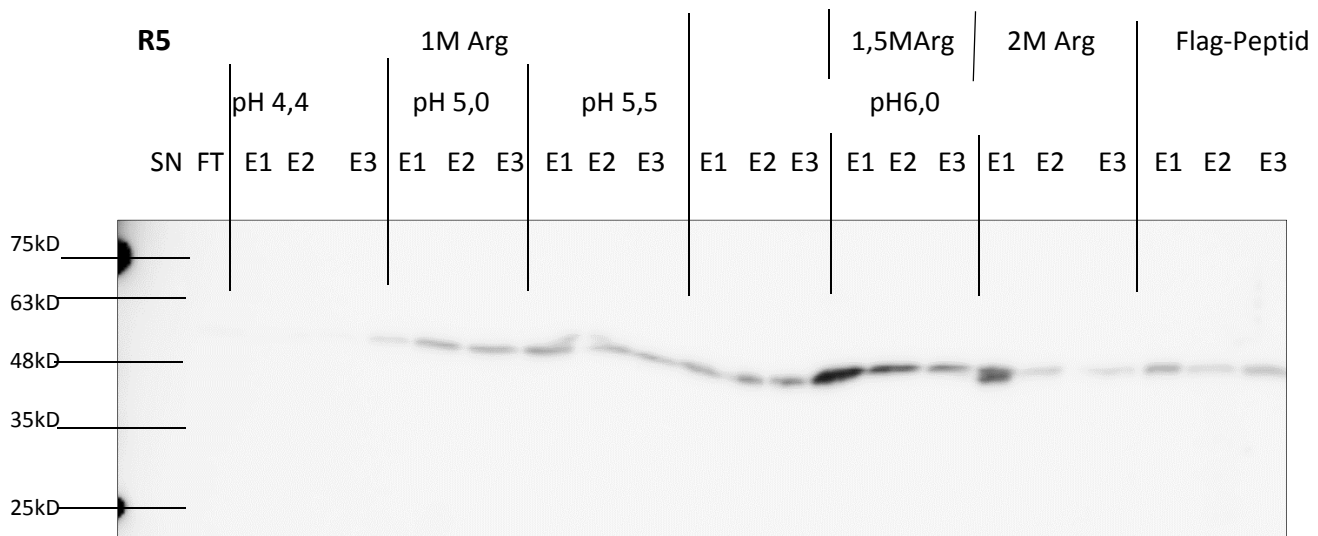


Abbildung 16: Western Blot der R5: Adsorption 1 Stunde, 4°C; Desorption mit verschiedenen Arginin Puffern im Batch Verfahren; je Ansatz Reinigung von 50 ml HEK-scTNF80 Zellkulturüberstand mit 50 µl anti-FLAG M2 Agarose. Färben und Detektion erfolgten mit ECL Prime Western Blotting Detection Reagenz und Image Quant LAS 4000, die Auswertung mit Image Quant.

Zunächst war erkennbar, dass das Blotting vom Gel auf die PVDF-Membran etwas ungleichmäßig verlaufen ist, sodass über die Elution bei pH 4,4 keine Aussage getroffen werden konnte. Auch im SN zeichnete sich keine Bande ab, obwohl dies bei frischem Detektionsantikörper zu erwarten gewesen wäre.

Bei der Elution mit 1,5 M Arginin bei pH 6,0 waren dagegen die stärksten Banden zu erkennen. Vor allem im Vergleich zu den Banden, die durch die Desorption mit FLAG-Peptid erhalten wurden, waren diese Banden deutlich stärker.

Betrachtete man die Elution mit 2 M Arginin bei pH 6,0, so fällt auf, dass hier im ersten Eluat bereits der überwiegende Teil des TNC-scTNF80 eluiert wurde.

#### 4.1.7 Sypro Red Protein gel stain – Typhoon Scan

Nachdem die Eluate aus R5 gepoolt und dialysiert wurden, wurde eine SDS-PAGE mit anschließendem Färben mit Sypro Red durchgeführt, um eine Aussage über die Reinheit der Eluate treffen zu können und eine Quantifizierung durchzuführen.

Neben den Eluaten aus R5 wurden Proben früherer Reinigungen mit bekannter Konzentration aufgetragen. Bei diesen Proben handelte es sich um eine Reinigung im gravity flow, wobei die Desorption mit einem Glycinpuffer bei saurem pH durchgeführt wurde und um eine Elution im gravity flow, bei der 37 µg/ml FLAG-Peptid zur Elution zum Einsatz kam. Auch der Pool aus R3 wurde aufgetragen.

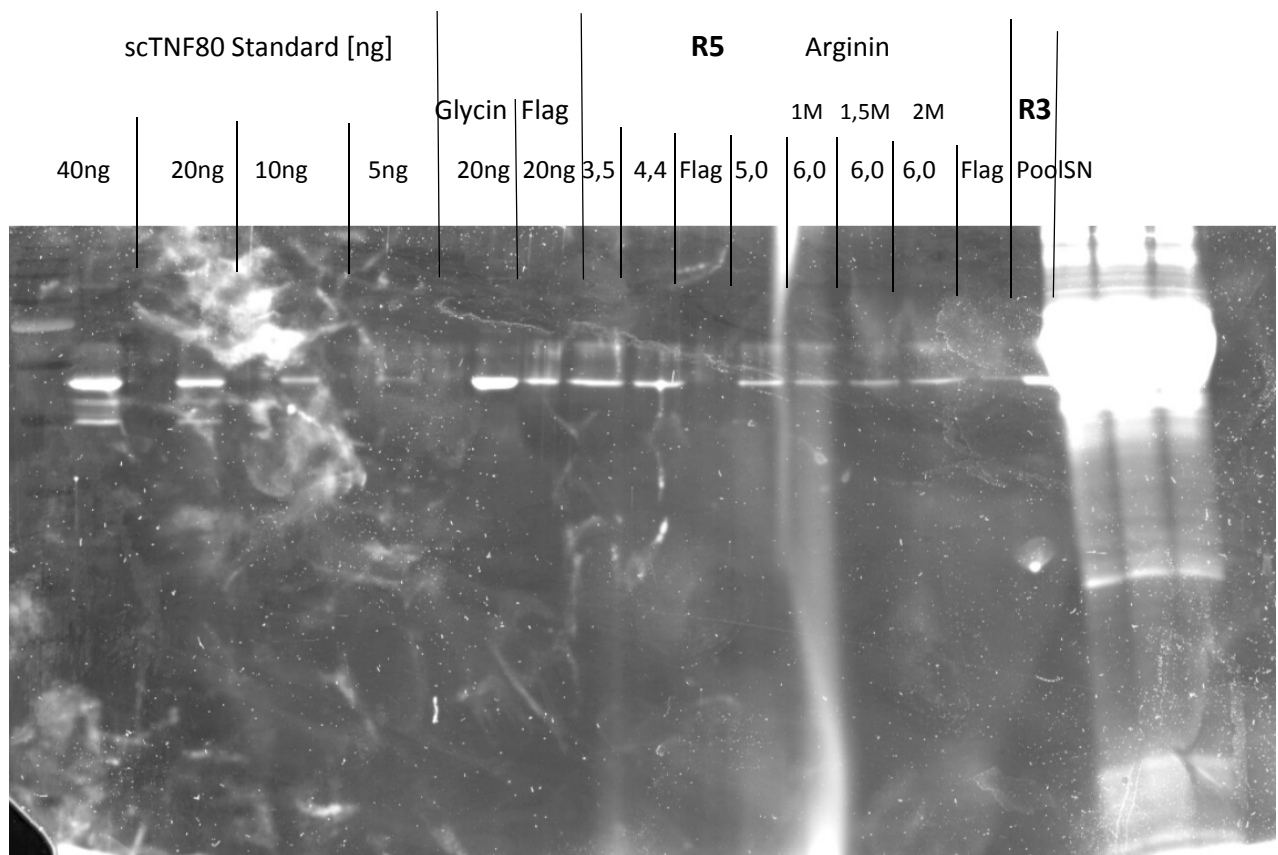


Abbildung 17: SDS-PAGE verschiedener Eluate mit anschließender Färbung mit Sypro Red Proteinstain Gel und Auswertung im Typhoon 9200 Scanner mittels Fluoreszenz. Extinktion 532nm, Emission bei 631nm.

Die Banden, die auf dem Gel sehr hell erschienen, konnten nicht zur Quantifizierung eingesetzt werden, da hier bereits eine Sättigung vorlag. Dies waren die Standards mit 40 ng und 20 ng sowie die Proben aus der Glycin- und FLAG-Elution (37  $\mu\text{g/ml}$ ), die Arginin-Eluate bei pH 3,5 und 4,4 und der Pool aus R3.

Auch der TNC-scTNF80-Gehalt der Zellkulturüberstände konnte nicht bestimmt werden, da die Bande des Albumins mit einem Molekulargewicht von  $\sim 66$  kDa sehr stark war. Der Grund für den hohen Albumingehalt ist der Zusatz von FCS zum Kulturmedium. Die ausgeprägte Bande des Albumins lag nur unwesentlich über der Bande des TNC-scTNF80 und überstrahlte diese komplett.

Dennoch ließ sich festhalten, dass die Eluate überwiegend eine große Reinheit aufwiesen. Lediglich eine leichte Verunreinigung mit Albumin war zu erkennen.

Auch wurde hier noch einmal bestätigt, dass der Sprung der Argininkonzentration von 1 M auf 1,5 M und 2 M keine Verbesserung der Desorption mehr zur Folge hatte.

Von den Proben der Glycin-Elution und der Elution mit 37  $\mu\text{g/ml}$  FLAG-Peptid wurden jeweils 20 ng aufgetragen. Die Bande der Glycin-Elution war aber wesentlich stärker. Dies ließ vermuten, dass die

Konzentrationsbestimmung beider Proben, die durch die Universität Würzburg durchgeführt wurde, etwas ungenau war.

#### 4.1.8 R6 – Batch-Elution

Da bisher die Reinigung im Batch Verfahren mit 150 µg/ml FLAG-Peptid im Elutionspuffer die besten Resultate lieferte, wurde dieses Verfahren für die Reinigung von 1 Liter Zellkulturüberstand eingesetzt. Ziel war es, eine möglichst große Menge an TNC-scTNF80 in möglichst reiner Form und hoher biologischer Aktivität zu erhalten, um damit Versuche in Mäusen durchführen zu können. Es wurde ein CV von 4,5 ml eingesetzt.

Um die Vollständigkeit der Desorption des TNC-scTNF80 zu überprüfen, wurden zudem 10 µl Resin auf das Gel geladen und untersucht.

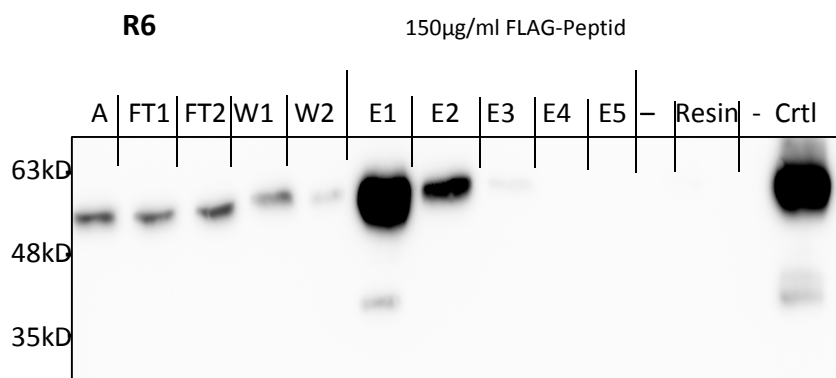


Abbildung 18: Western Blot der R6: Reinigung von 1L HEK-scTNF80 Zellkulturüberstand mit 1 ml anti-FLAG M2 Agarose; Kulturüberstand in 2% FCS haltigem RPMI-Medium gesammelt. Färben und Detektion erfolgten mit ECL Prime Western Blotting Detection Reagenz und Image Quant LAS 4000, die Auswertung mit Image Quant.

Zunächst fiel auf, dass das Gel etwas schräg gelaufen ist. In FT1 und FT2 sind deutliche Banden zu erkennen, was für eine maximale Sättigung der Säule spricht. Dies spricht außerdem dafür, dass die neu aufgetauten HEK-scTNF80 Zellen mehr TNC-scTNF80 produzieren als die vorher genutzten Zellen, die schon eine Passage von 40 erreicht hatten. Beim gleichen SN zu Agarose-Verhältnis war in vorherigen Reinigungen im FT keine Bande zu erkennen und somit keine Sättigung erreicht.

Auch in den Waschfraktionen waren leichte Banden erkennbar. Auch dies sprach für eine maximale Sättigung der Säule.

In E1 und E2 waren sehr starke Banden erkennbar. In E3 fand sich nur noch eine sehr dünne Bande und in den übrigen Eluatfraktionen konnte kein TNC-scTNF80 mehr detektiert werden. Auch in dem zur Kontrolle aufgetragenen Resin befand sich keine nachweisbare Menge TNC-scTNF80 mehr. Die Säule wurde also vollständig eluiert.

#### 4.1.9 R7 – Batch-Elution

Im Anschluss wurden die FT-Fractionen aus R6 aufgrund des immer noch vorhandenen TNC-scTNF80 ein weiteres Mal gereinigt.

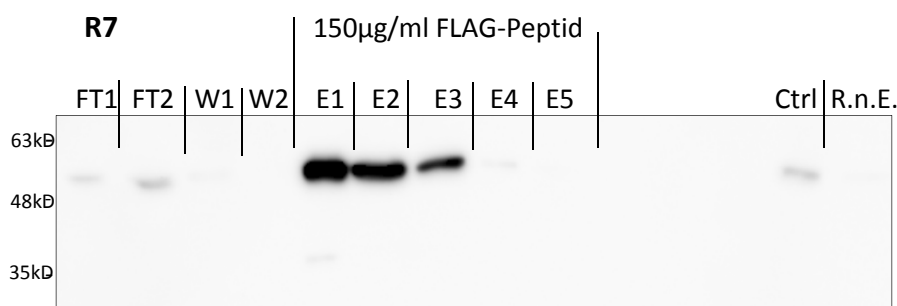


Abbildung 19: Western Blot der R7: Reinigung von 1L FT aus R6 in Batch-Verfahren mit 1ml anti-FLAG M2 Agarose. Färben und Detektion erfolgten mit ECL Prime Western Blotting Detection Reagenz und Image Quant LAS 4000, die Auswertung mit Image Quant

In FT1 und FT2 waren Banden zu sehen, was auch hier für eine maximale Sättigung der Säule spricht. In den Eluatfraktionen E1, E2 und E3 zeigten sich schöne Banden. In E4 und E5 sowie im aufgetragenen Resin waren keine Banden mehr zu sehen, was für eine vollständige Desorption des TNC-scTNF80 spricht.

Mit dem Ziel, die Reinheit und Menge des TNC-scTNF80 in den Eluaten aus R6 und R7 zu überprüfen, wurde im Anschluss eine SDS-PAGE mit anschließender Färbung mit Sypro Red und der Detektion im Typhoon 9200 durchgeführt.

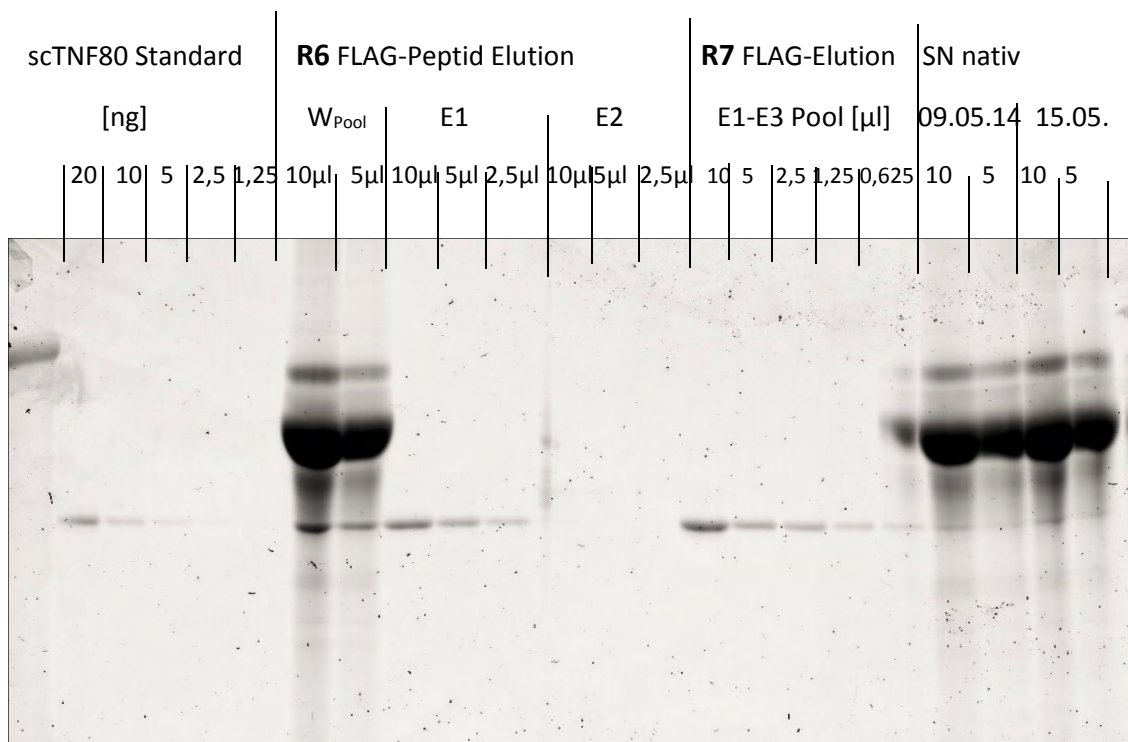


Abbildung 20: SDS-PAGE verschiedener Eluate mit anschließender Färbung mit Sypro Red Proteinstain Gel und Auswertung im Typhoon 9200 Scanner mittels Fluoreszenz. Extinktion 532nm, Emission bei 631nm.

Zunächst konnte festgestellt werden, dass die Eluatfraktionen in sehr großer Reinheit vorlagen. Neben der TNC-scTNF80-Bande waren keine weiteren Banden zu erkennen. Im Typhoon Scan in Abbildung 17 dagegen waren in den Eluaten leichte Albuminbanden zu erkennen. Eine mögliche Erklärung dafür ist das frische Säulenmaterial, das in R6 und R7 eingesetzt wurde. Im Gegensatz dazu war bei den aufgetragenen Zellkulturüberständen die Albuminbande bei ~66 kD sehr dominant.

Die Quantifizierung wurde mit Image Quant durchgeführt. Es ergaben sich folgende Werte:

Tabelle 4: errechnete Ausbeute der Reinigungen 6 und 7

|                                 | <b>Ermittelte Werte in Image Quant</b>  | <b>Gesamtvolumen der Proben:</b>       | <b>Gesamtmenge TNC-scTNF80</b> |
|---------------------------------|---|--|--------------------------------|
| Reinigung 6                     | 17,71 ng in 5 μl E1<br>9,88 ng in 2,5 μl E1<br>23,67 ng in 5 μl W <sub>Pool</sub>   | E1: 2,5 ml<br>W <sub>Pool</sub> : 15ml | 71,75 μg                       |
| Reinigung 7                     | 18,18 ng in 5 μl E <sub>Pool</sub><br>14,94 ng in 2,5 μl E <sub>Pool</sub><br>8,05 ng in 1,35 μl E <sub>Pool</sub><br>5,82 ng in 0,625 μl E <sub>Pool</sub> | E <sub>Pool</sub> : 4,5 ml             | 22,32 μg                       |
| HEK-scTNF80 Zellkulturüberstand | 316 ng/ml   | 1000 ml                                | 316 μg                         |

Das bedeutete, dass insgesamt 94,1 µg TNC-scTNF80 gereinigt werden konnten. Wenn man davon ausging, dass 316 µg TNC-scTNF80 im gereinigten Zellkulturüberstand vorlagen, ergab sich eine Wiederfindung von 29,8 %. Dieser Wert lag deutlich über den Werten, die in R4 ermittelt wurden. Jedoch sind auch knapp 30 % noch sehr wenig. Ein Grund hierfür könnte sein, dass im FT von R7 und den Waschfraktionen von R6 noch TNC-scTNF80 zu finden war, welches somit verlorenging.

## 4.2 Konzentrierung des HEK-scTNF80 Zellkulturüberstandes

Da auch die Überlegung im Raum stand, die Mäuse nicht mit gereinigtem TNC-scTNF80 zu behandeln, sondern mit Zellkulturüberstand der HEK-scTNF80 Zellen, wurde versucht, den Überstand zu konzentrieren. Ausgangspunkt dieser Überlegung war, dass im nativen Überstand eine zu geringe Menge an TNC-scTNF80 vorhanden war, um mit dem maximal injizierbaren Volumen einen therapeutischen Effekt zu erzielen.

### 4.2.1 Ammoniumsulfatfällung

Hierfür wurden 100 ml HEK-scTNF80 Zellkulturüberstand mit 50% der Sättigungskonzentration des Ammoniumsulfats ausgefällt und das erhaltene Pellet in 1/40 des Ausgangsvolumens in PBS resuspendiert. Insgesamt wurde eine Konzentrierung der Proteine im Zellkulturüberstand um das 20-fache erreicht.

### 4.2.2 PEG-Konzentrierung

Mit Polyethylenglykol wurde das Volumen des in einen Dialyseschlauch gefüllten Zellkulturüberstands eingengt und anschließend gegen PBS dialysiert. Das Endvolumen betrug 1/5 des Ausgangsvolumens, sodass eine Konzentrierung um das 5-fache erreicht wurde.

Die biologische Aktivität beider Konzentrate wurde mit dem IL-8 ELISA überprüft.

## 4.3 Bestimmung der biologischen Aktivität des gereinigten TNC-scTNF80 – IL-8 ELISA

Mit diesem ELISA wurde die von HT1080-Bcl2-TNFR2 und HT1080-Bcl2 Zellen produzierte Menge an Interleukin-8 (IL-8) untersucht, welche durch TNC-scTNF80 stimuliert wurde.

Hierfür wurden die Eluate der durchgeführten Reinigungen, native und konzentrierte Zellkulturüberstände sowie gereinigtes TNC-scTNF80 der Universität Würzburg eingesetzt. Erwartet wurde eine Dose Response, d. h. je größer die eingesetzte TNC-scTNF80-Menge, desto größer sollte die IL-8 Produktion der HT1080-Bcl2-TNFR2 Zellen ausfallen. Zudem wurde erwartet, dass dieser Effekt auf den HT1080-Bcl2 Zellen aufgrund des fehlenden TNFR2 bei paralleler Stimulation nicht beobachtbar sein sollte.

#### 4.3.1 IL-8 ELISA: R1, Ammoniumsulfatfällung und PEG-Konzentrierung

Neben dem Pool der Eluate aus Reinigung 1 wurden auch zwei Pools aus früheren Reinigungen mittels des IL-8 ELISAs untersucht. Dies war zum einen der Pool aus einer Glycin-Elution, d. h. hier wurde TNC-scTNF80 mit Glycin und bei saurem pH eluiert. Zum anderen wurde ein Pool einer Reinigung, bei der mit FLAG-Peptid (37µg/ml in TBS) im gravity flow eluiert wurde, eingesetzt.

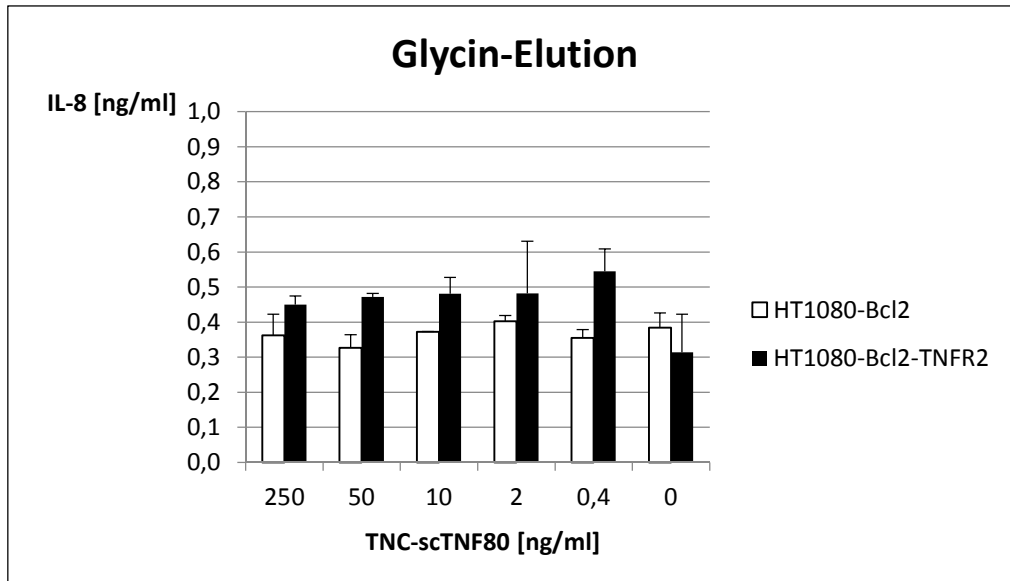


Abbildung 21: IL-8 Produktion bei Aktivierung von HT1080-Zellen mit TNC-scTNF80 aus der Glycin-Elution



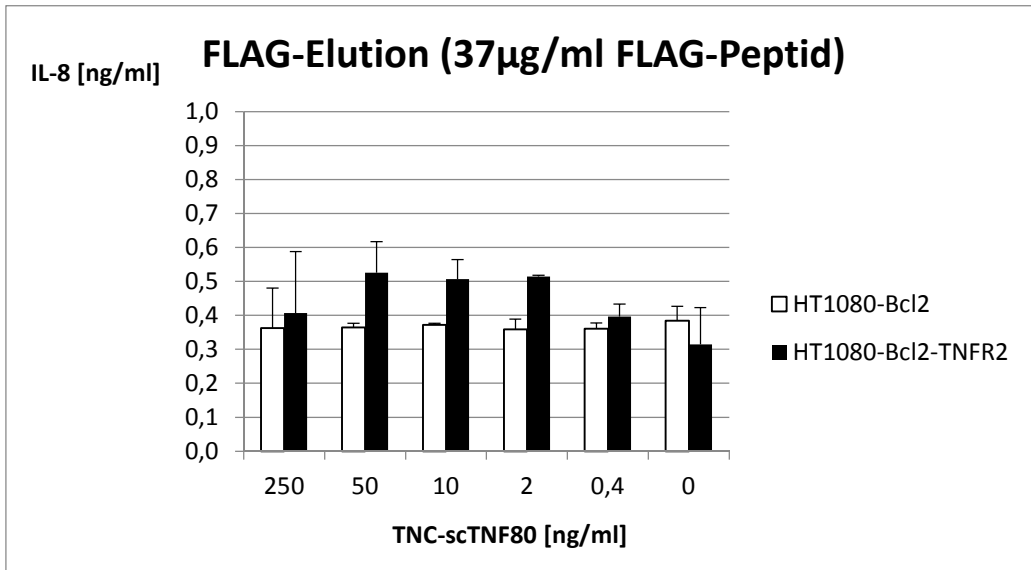


Abbildung 22: IL-8 Produktion bei Aktivierung von HT1080-Zellen mit TNC-scTNF80 aus der FLAG-Elution mit 37µg/ml FLAG-Peptid im Elutiospuffer

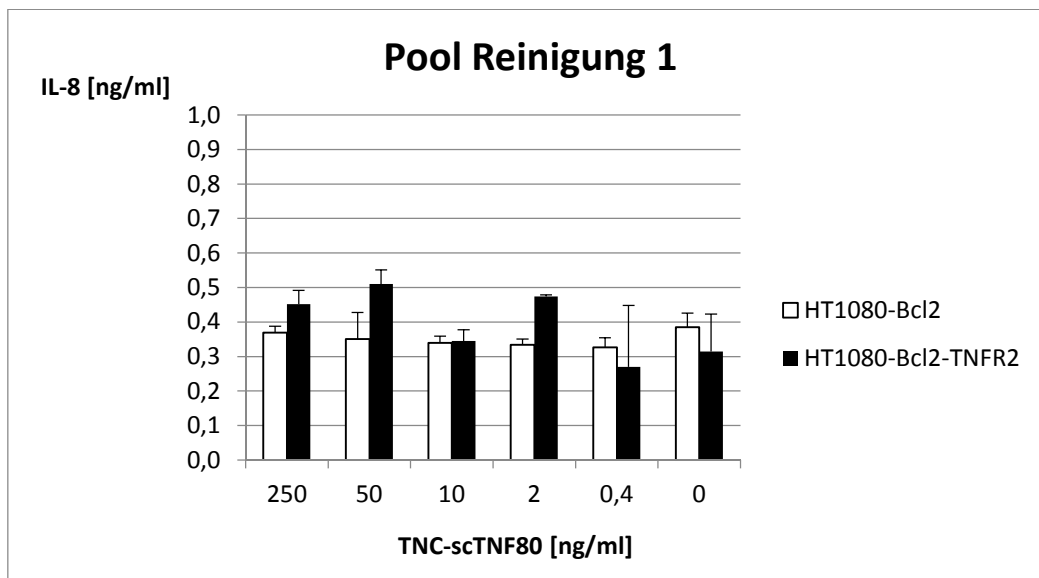


Abbildung 23: IL-8 Produktion bei Aktivierung von HT1080-Zellen mit TNC-scTNF80 aus R1

In allen drei Proben, die gereinigtes TNC-scTNF80 zur Stimulierung der HT1080-Zellen enthielten, konnte keine Dose Response beobachtet werden. Die IL-8 Produktion zeigte sich unabhängig von der eingesetzten Menge TNC-scTNF80, sodass es schwierig war, aus diesen drei Diagrammen aussagekräftige Resultate abzuleiten.

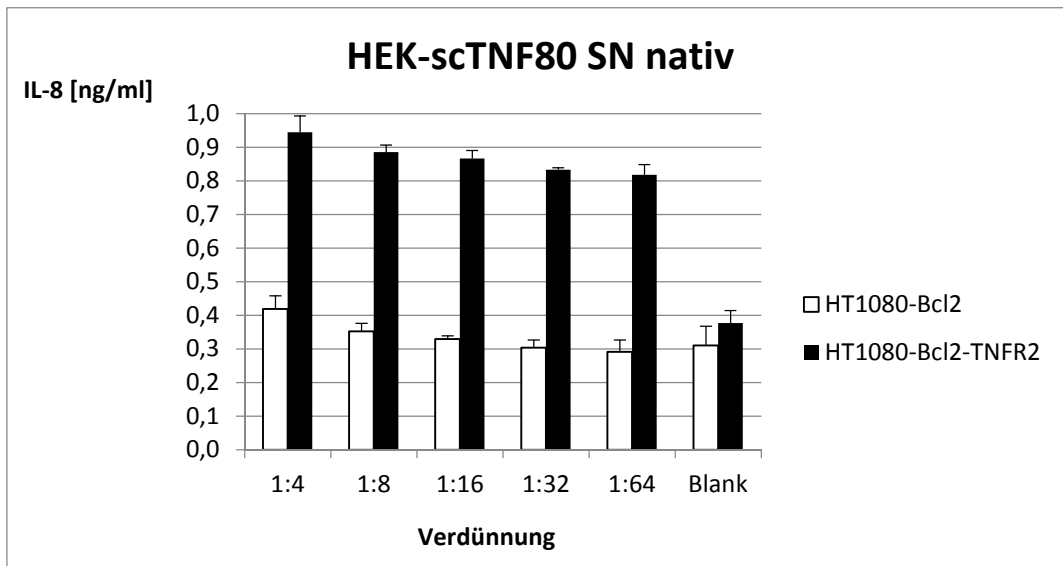


Abbildung 24: IL-8 Produktion bei Aktivierung von HT1080-Zellen mit HEK-scTNF80 SN nativ

Anders als beim gereinigten TNC-scTNF80 ist beim nativen HEK-scTNF80 Zellkulturüberstand eine leichte Dose Response erkennbar. Gleichzeitig blieb die IL-8 Produktion der HT1080-Zellen ohne TNF Rezeptor 2 in einem konstant niedrigen Bereich, sodass bei Abzug dieses Hintergrundes eine hohe Aktivität des TNC-scTNF80 beobachtbar war.

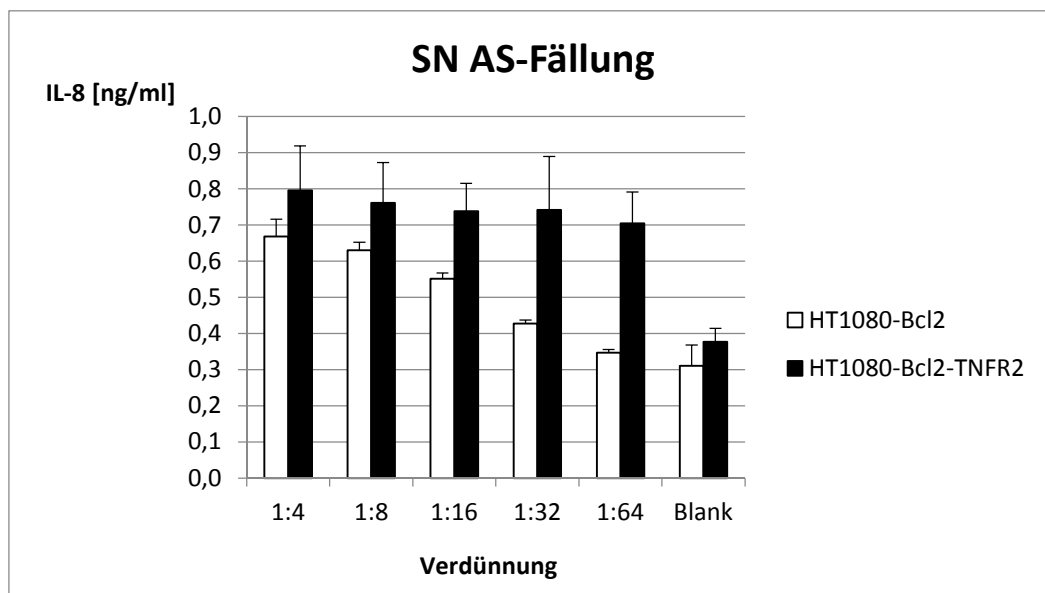


Abbildung 25: IL-8 Produktion bei Aktivierung von HT1080-Zellen mit HEK-scTNF80 SN, welcher durch Ammoniumsulfatfällung um das 20-fache konzentriert wurde

Beim HEK-scTNF80 Zellkulturüberstand, welcher mit Ammoniumsulfat konzentriert wurde, zeigte sich ebenfalls kaum eine Dose Response. Die IL-8 Produktion blieb, unabhängig von der Verdünnung, auf

einem annähernd konstanten Niveau. Allerdings fiel hier auf, dass die Aktivierung und damit die IL-8 Produktion der HT1080-Bcl2-Zellen sehr stark ausfiel und eine deutliche Dose Response aufwies. Da diese Zellen aber keinen TNFR2 enthalten, musste die IL-8 Produktion auf anderem Wege zustande gekommen sein. Es schienen eine oder mehrere Substanzen zusätzlich zum TNC-scTNF80 konzentriert worden zu sein, die die Zellen über einen nicht TNFR2-spezifischen Weg zur Produktion von IL-8 veranlassten. Eine Rolle hierbei könnte das Zellkulturüberstand enthaltene FCS spielen, welches vor der Konzentrierung 2%-ig vorlag.

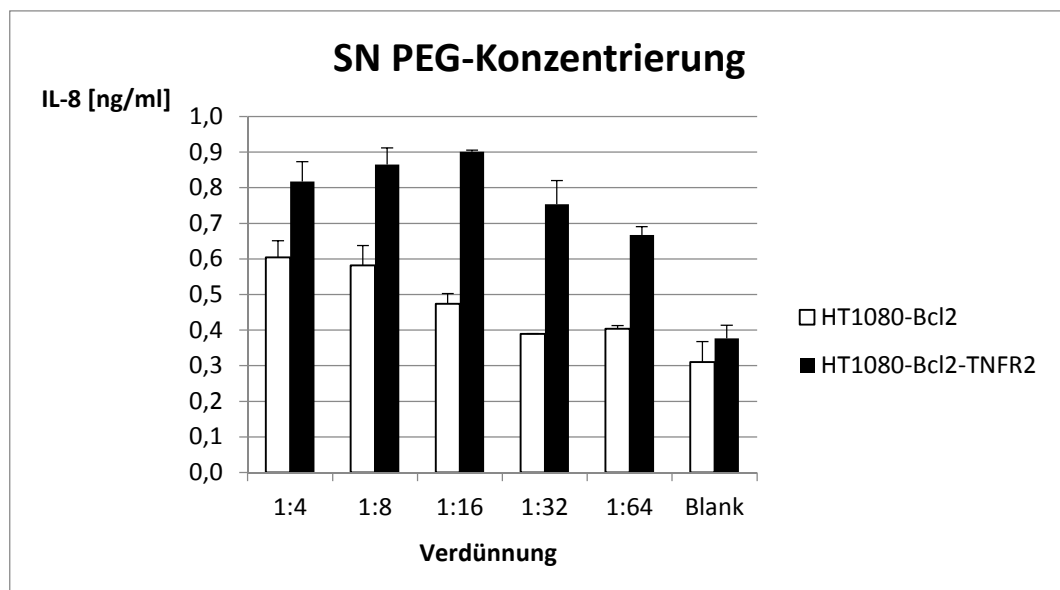


Abbildung 26: IL-8 Produktion bei Aktivierung von HT1080-Zellen mit HEK-scTNF80 SN, der durch Polyethylenkonzentrierung um das 5-fache konzentriert wurde

Bei den HEK-scTNF80 Zellkulturüberständen, welche durch PEG konzentriert wurden, zeigte sich ab der 1:16 Verdünnung eine leichte Dose Response. Die Aktivierung der HT1080-Bcl2-TNFR2-Zellen war deutlich höher als die Aktivierung der TNFR2-negativen Zellen. Auffallend war allerdings auch hier, analog zur Ammoniumsulfatfällung, die Dose Response der HT1080-Bcl2 Zellen, also eine nicht TNFR2-spezifische IL-8-Sekretion. Allerdings fiel diese etwas geringer als bei der Ammoniumsulfatfällung aus. Dies war darauf zurückzuführen, dass es sich hier lediglich um eine 5-fache Konzentrierung handelte, wohingegen bei der Ammoniumsulfatfällung eine 20-fache Konzentrierung vorlag.

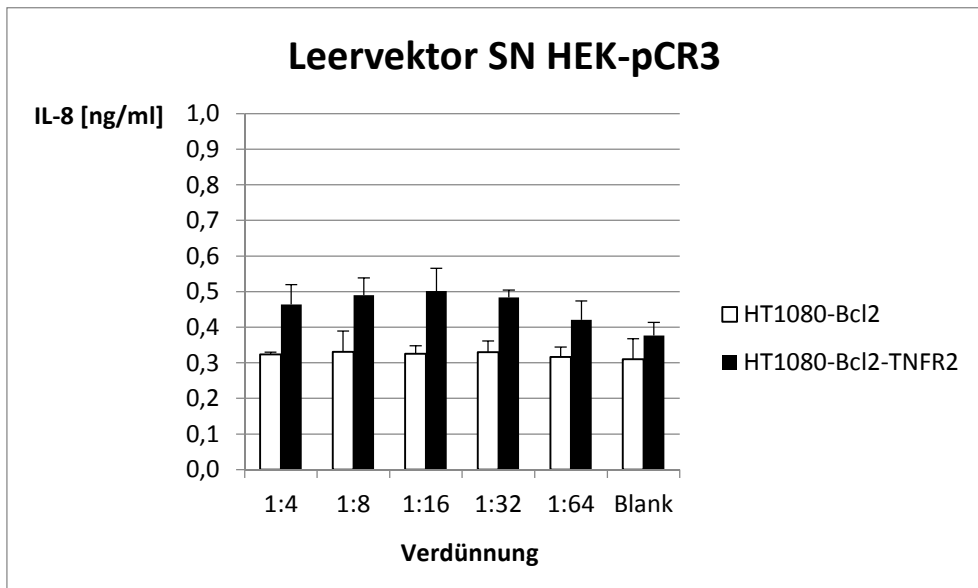


Abbildung 27: IL-8 Produktion bei Aktivierung von HT1080-Zellen mit HEK-pCR3 Leervektorüberstand

Im Zellkulturüberstand der HEK-pCR3 Zellen lag kein TNC-scTNF80 vor. Entsprechend wurde erwartet, dass dieser Überstand zu keiner Aktivierung der HT1080-Bcl2-TNFR2 Zellen führt. Dennoch war eine leichte IL-8 Produktion erkennbar. Ab der 1:16 Verdünnung konnte man sogar eine leichte Dose Response erkennen. Aufgrund dieses Ergebnisses musste auch Abbildung 26 neu bewertet werden. Die Aktivierung der TNFR2-positiven Zellen, die dort beobachtet werden konnte, scheint in einer störenden Substanz, die durch die Transfektion entstanden ist, begründet zu sein.

#### 4.3.2 IL-8 ELISA der R3, R4 und R5

Die TNC-scTNF80-Konzentrationen wurden im Folgenden gegen die gemessene OD<sub>450</sub> aufgetragen. Der erste Verdünnungsschritt der Proben mit unbekannter Konzentration war 1:16, da im ersten ELISA festgestellt wurde, dass eine geringere Verdünnung zu Werten führt, die bereits in der Sättigung liegen und deshalb nicht ausgewertet werden können.

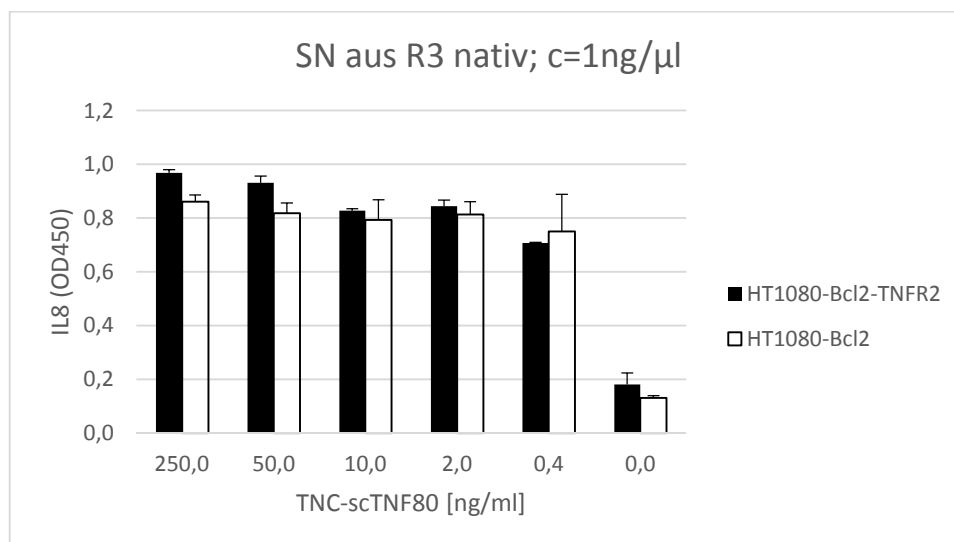


Abbildung 28: IL-8 Produktion bei Aktivierung von HT1080-Zellen mit HEK-scTNF80 SN nativ

Es fiel auf, dass die IL-8 Produktion nach Aktivierung durch den nativen HEK-scTNF80 Zellkulturüberstand kaum höher ausfiel als die IL-8 Produktion der TNFR2-negativen Zellen. Das TNC-scTNF80 zeigte also keine biologische Aktivität, welche durch eine Aktivierung des TNFR2 ausgelöst wird. Die IL-8-Produktion ist also nicht TNFR2-spezifisch.

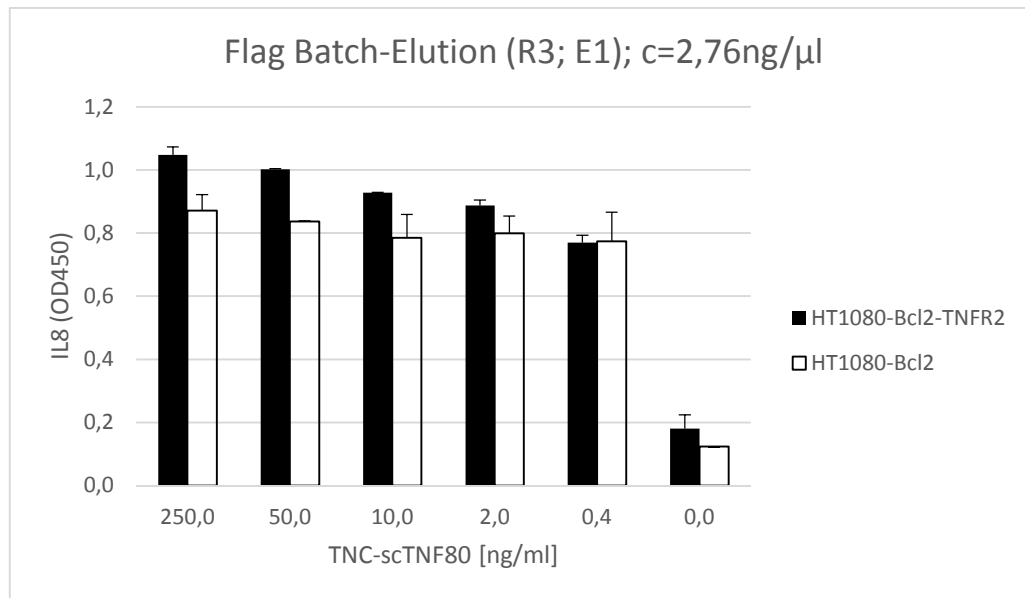


Abbildung 29: IL-8 Produktion bei Aktivierung von HT1080-Zellen mit E1 aus R3

Es konnte zwar im Ansatz von einer Dose Response gesprochen werden, da die IL-8 Produktion mit abnehmender TNC-scTNF80-Konzentration abnahm. Jedoch zeigte auch das Eluat aus Reinigung 3 keine durch den TNFR2 erhöhte IL-8 Produktion. Der Hintergrund durch die HT1080-Bcl2 Zellen war auch hier annähernd so groß wie die IL-8 Produktion der HT1080-Bcl2-TNFR2 Zellen.

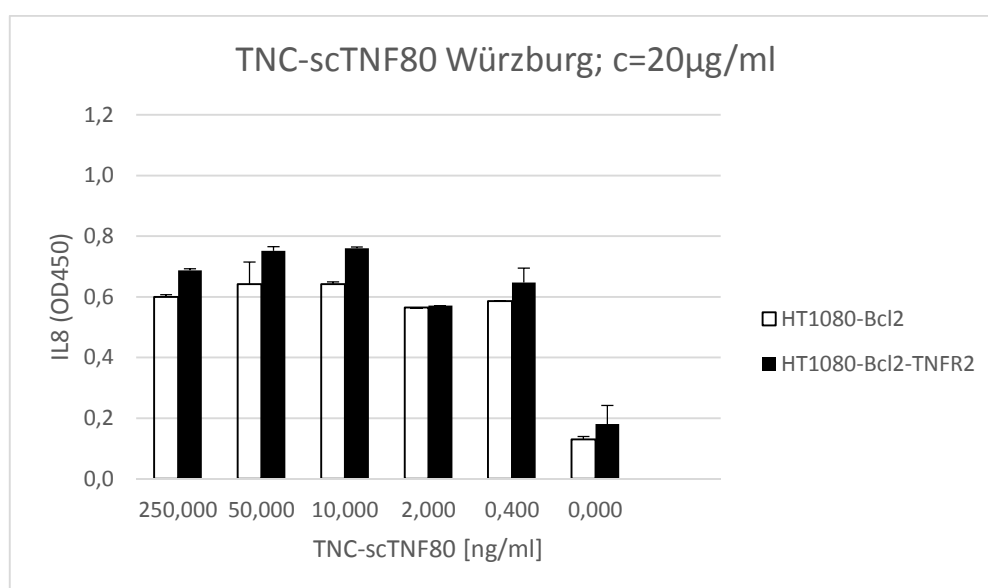


Abbildung 30: IL-8 Produktion bei Aktivierung von HT1080-Zellen mit TNC-scTNF80 (Würzburg)

Bei Aktivierung der HT1080-Bcl2-TNFR2 Zellen durch das gereinigte TNC-scTNF80 der Universität Würzburg wurde eine deutliche Dose Response erwartet. Dies war jedoch ebenfalls nicht der Fall. Die IL-8 Produktion fiel relativ willkürlich aus und zeigte keine Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinkonzentration.

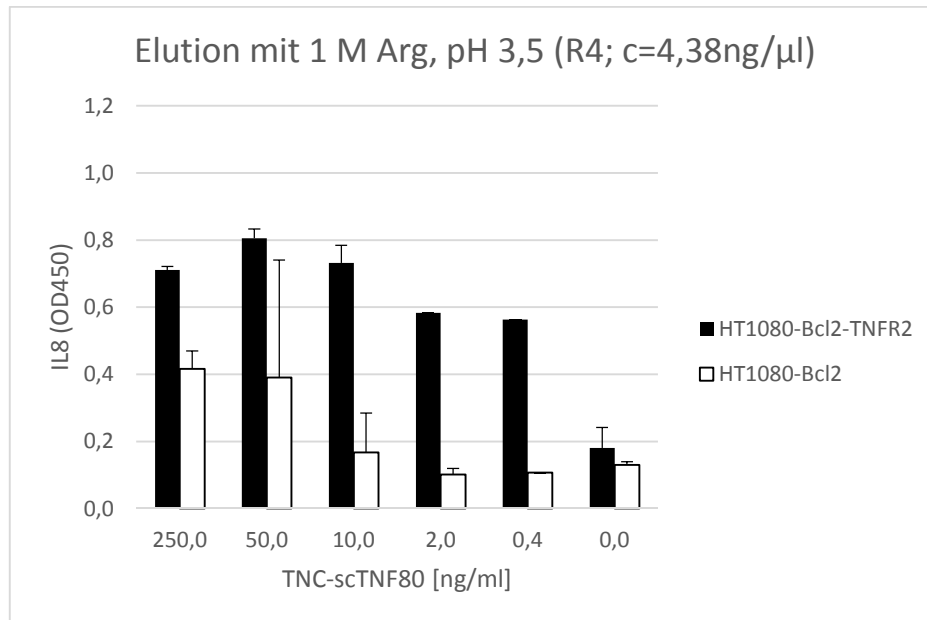


Abbildung 31: IL-8 Produktion bei Aktivierung von HT1080-Zellen mit  $E_{pool}$  (1M Arg, pH 3,5) aus R4

Ab einer Konzentration von 50 ng/ml TNC-scTNF80 konnte eine Dose Response beobachtet werden. Die Konzentration von 250 ng/ml war möglicherweise zu hoch gewählt, sodass sich hier bereits eine Sättigung einstellte und der IL-8 Wert niedriger erschien als er tatsächlich war. Zusätzlich fiel auf, dass der Pool der Elution mit 1 M Arginin-HCl bei einem pH-Wert von 3,5 die HT1080-Bcl2-Zellen weniger dazu veranlasste, IL-8 zu produzieren, als dies bei den FLAG-Eluaten der Fall war. Das könnte auf den sauren pH während der Desorption zurückzuführen sein, wodurch Substanzen inaktiviert werden könnten, welche auf den TNFR2-negativen Zellen die IL-8 Produktion stimulieren. Dafür spräche auch die bei den HT1080-Bcl2-TNFR2 niedrigere IL-8 Produktion aufgrund der Reduktion unspezifischer, TNFR2 unabhängiger, IL-8 Bildung.

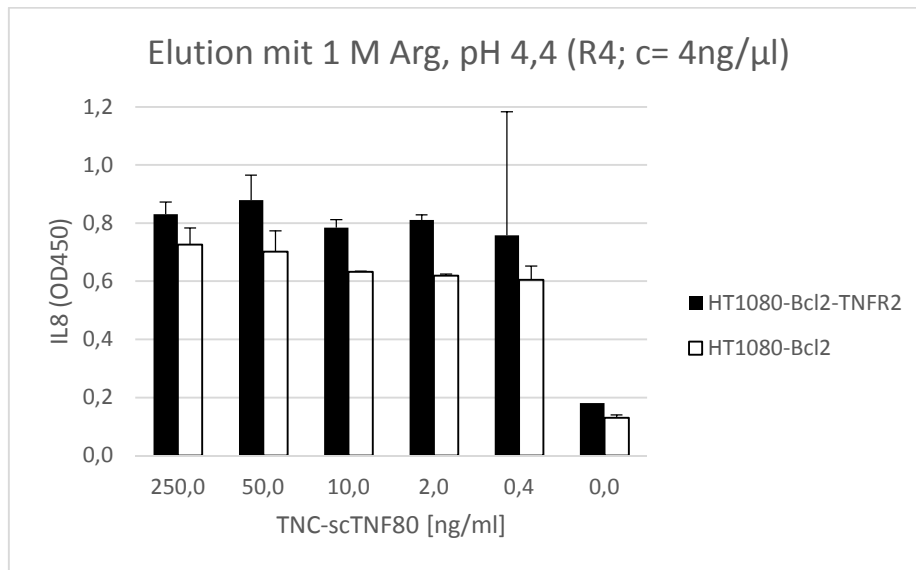


Abbildung 32: IL-8 Produktion bei Aktivierung von HT1080-Zellen mit  $E_{Pool}$  (1M Arg, pH 4,4) aus R4

Anders als bei der Elution bei pH 3,5 war bei pH 4,4 keine Dose Response erkennbar. Auch der Hintergrund war deutlich höher als dies beim Pool mit pH 3,5 der Fall war, sodass die IL-8 Produktion der TNFR2-negativen Zellen fast wieder das Level der TNFR2-positiven Zellen erreichte.

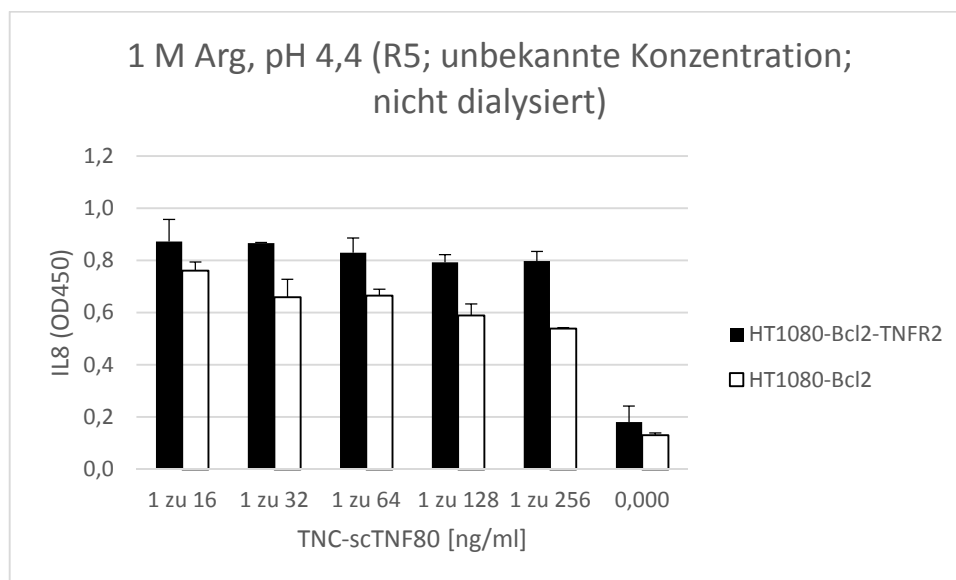


Abbildung 33: IL-8 Produktion bei Aktivierung von HT1080-Zellen mit  $E_{Pool}$  (1M Arg, pH 4,4, gelöst in TBS) aus R5

Auch bei der Elution, die mit Arginin-HCl, gelöst in TBS, durchgeführt wurde, war keine Dose Response erkennbar. Die IL-8 Produktion der HT1080-Bcl2-TNFR2 Zellen war insgesamt ein klein wenig höher als bei Stimulierung mit dem Pool, bei dem die Elution mit Arginin-HCl gelöst in  $H_2O$  stattfand. Dies wies

darauf hin, dass Arginin-HCl in TBS gelöst werden sollte, was aufgrund der dadurch herrschenden physiologischen Bedingungen nachvollziehbar erscheint.

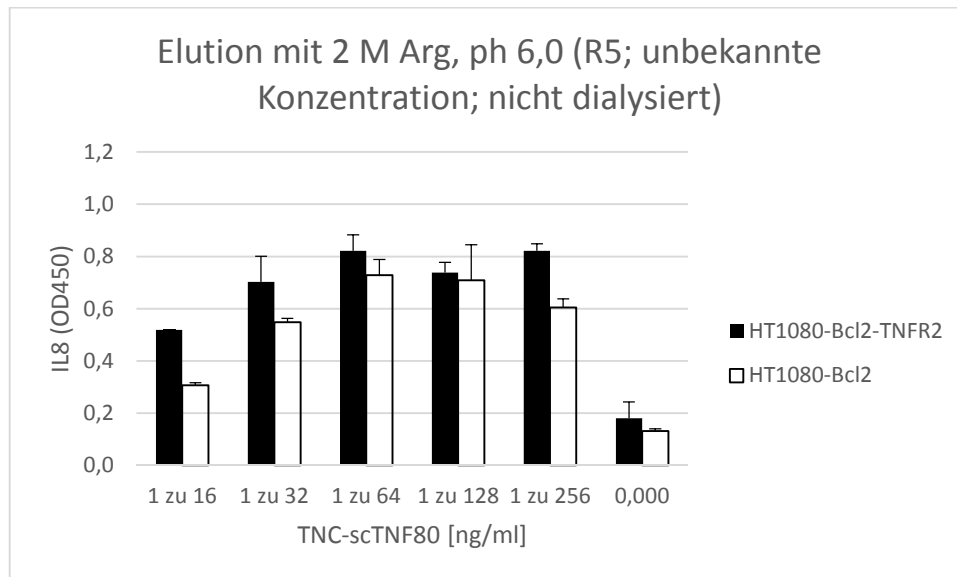


Abbildung 34: IL-8 Produktion bei Aktivierung von HT1080-Zellen mit  $E_{Pool}$  (2M Arg, pH 6,0, gelöst in TBS) aus R5

Bei Stimulierung der HT1080-Bcl2-TNFR2 Zellen durch den Pool, der mit 2 M Arginin-HCl und bei pH 6,0 wies ebenfalls keine Dose Response auf. Allenfalls konnte eine umgekehrte Dose Response beobachtet werden, d. h. die IL-8 Produktion fiel bei der Probe mit der höchsten TNC-scTNF80 Konzentration am niedrigsten aus und steigerte sich mit fallender Proteinkonzentration.

Möglicherweise wurde der ELISA durch das Arginin, das sich noch in hoher Konzentration im Pool befand, da der ELISA vor Dialyse der Pools aus Reinigung 5 durchgeführt wurde, gestört.



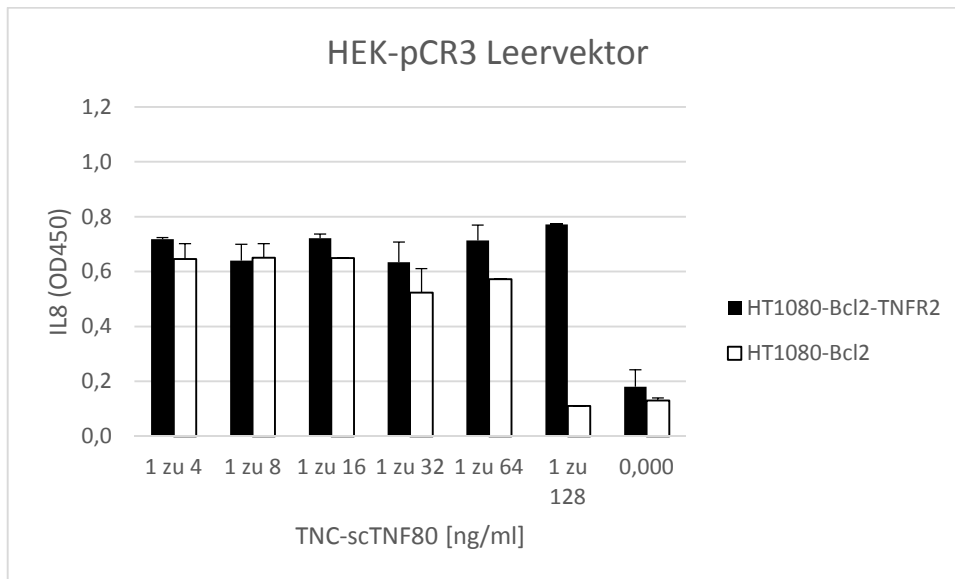


Abbildung 35: IL-8 Produktion bei Aktivierung von HT1080-Zellen mit HEK-pCR3 Leervektorüberstand

Ähnlich wie bei Durchführung des ersten ELISAs konnte man auch hier eine Aktivierung der TNFR2-positiven HT1080-Zellen beobachten, obwohl kein TNC-scTNF80 in der Probe war. Betrachtete man die 1:128-Verdünnung im Vergleich zum Blank-Wert, der lediglich Medium enthielt, fiel eine deutliche IL-8 Produktion durch den HEK-pCR3 Zellkulturüberstand auf. Aufgrund des fehlenden TNC-scTNF80 konnte die Stimulierung aber nicht an einer TNFR2-Aktivierung liegen. Dieses Ergebnis zeigt, dass der IL-8 ELISA nicht geeignet ist, um die biologische Aktivität von TNC-scTNF80 zu prüfen.

#### 4.4 Anti-FLAG ELISA

Mit dem Ziel, eine andere Quantifizierungsmethode als die Quantifizierung mittels Western Blot und Image Quant zu finden, wurde versucht, einen anti-FLAG ELISA zu entwickeln.

Für den folgenden Versuch standen vier verschiedene coating-Antikörper zur Verfügung: goat-anti-mTNF (0,8µg/ml), anti-FLAG M2 (5µg/ml), anti-mTNF (V1q) 5µg/ml und rabbit anti-mTNF PoAb Serum 1:200. Detektiert wurde mit anti-FLAG M2 HRP-konjugiert (1µg/ml).

Als Proben wurden Pools aus den bisherigen Reinigungen aufgetragen.

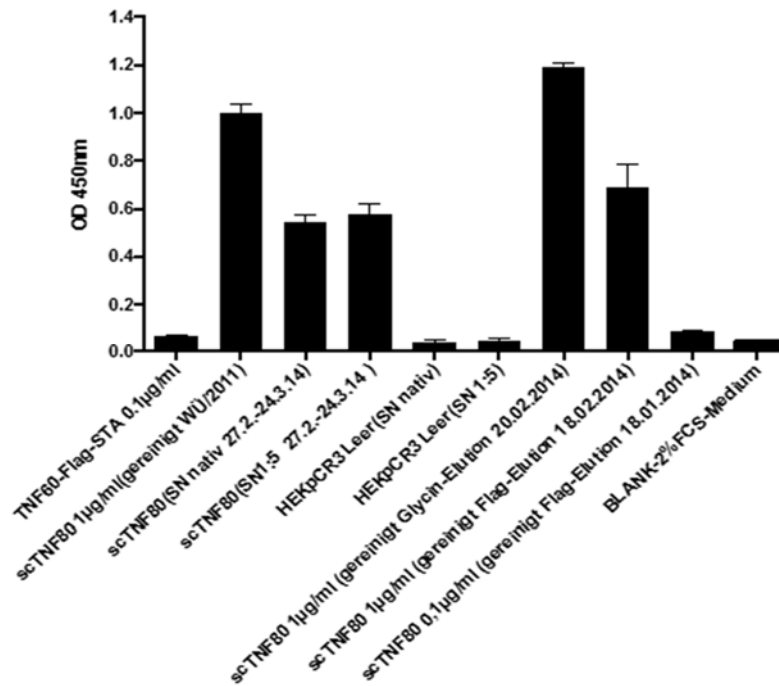


Abbildung 36: anti-FLAG ELISA: **coating mit goat anti-mTNF (0,8µg/ml)**; detection mit anti-FLAG M2 HRP-conj. (1µg/ml); Substrat: OPTEIA; Messen bei 450nm.

Die Auswertung zeigte, dass das Coaten mit goat anti-mTNF sehr gut geeignet war, um TNC-scTNF80 nachzuweisen. Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob dies schon der ideale Antikörper für den geplanten ELISA war, musste ein Vergleich mit den weiteren Ergebnissen erfolgen.

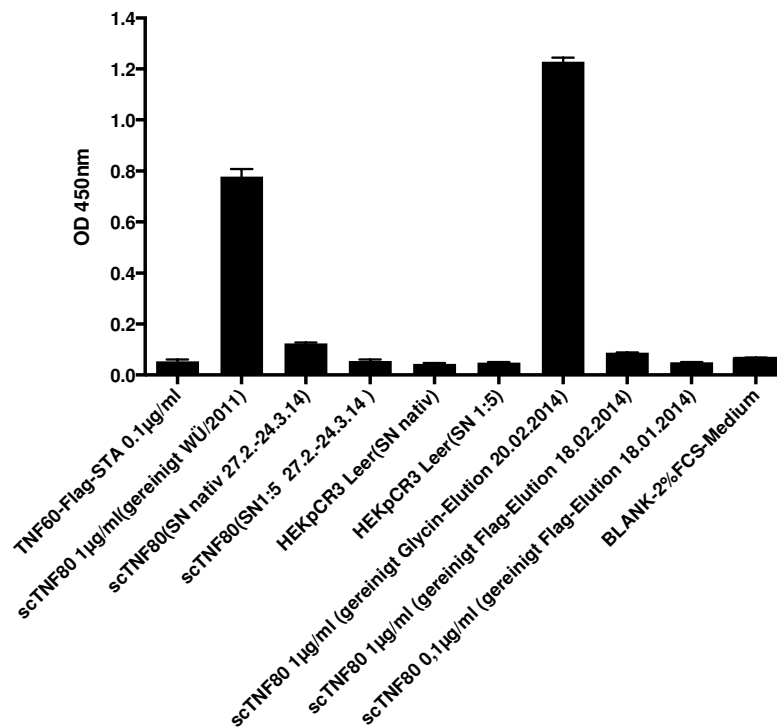


Abbildung 37: Anti-FLAG ELISA: **coating mit anti-FLAG M2 (5µg/ml)**; detection mit anti-FLAG M2 HRP-conj. (1µg/ml); Substrat: OPTEIA; Messen bei 450nm.

Das Ergebnis zeigte, dass das Coating mit anti-FLAG M2 weniger gut funktionierte als mit goat anti-mTNF. Lediglich in dem gereinigten TNC-scTNF80 der Universität Würzburg und im Pool der Glycin-Elution konnte TNC-scTNF80 nachgewiesen werden, wobei die OD hier auch etwas geringer als bei Coating mit goat anti-mTNF war. In allen anderen Proben konnte mit dieser Methode kein Protein nachgewiesen werden. Daraus konnte geschlossen werden, dass in jedem Fall ein coating-Antikörper gegen mTNF und nicht gegen FLAG eingesetzt werden musste.

Nun wurden die zur Wahl stehenden anti-mTNF Antikörper dahingehend getestet, dass TNC-scTNF80 in bekannter Konzentration, beginnend bei 1 µg/ml und in Verdünnungsschritten von 1:2, aufgetragen wurde. Erwartet wurde eine Standardkurve, die es zulässt, Proben unbekannter Konzentration zu quantifizieren.

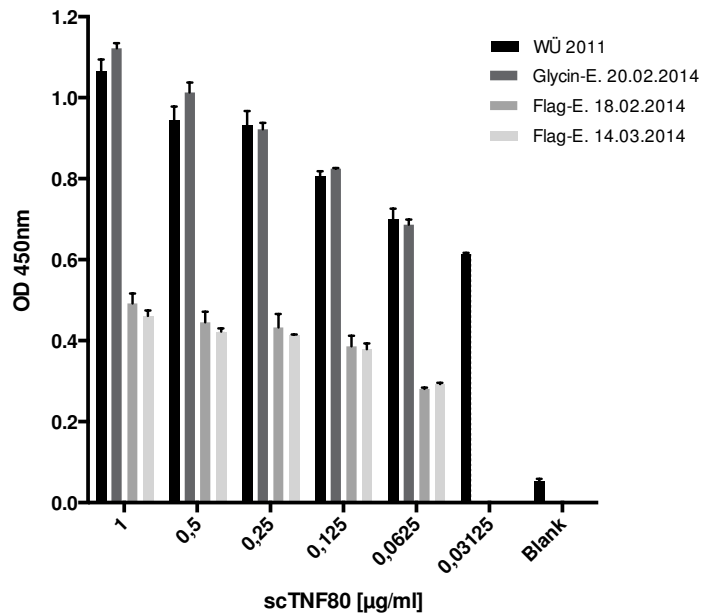


Abbildung 38: Anti-FLAG ELISA: **coating mit goat anti-mTNF (0,8µg/ml)**; detection mit anti-FLAG M2 HRP-conj. (1µg/ml); Substrat: OPTEIA; Messen bei 450nm. Aufgetragene Proben: scTNF80 1µg/ml in 1:2 Verdünnungsschritten

Das Diagramm zeigte, dass goat anti-mTNF grundsätzlich geeignet war, um eine Quantifizierung des TNC-scTNF80 durchzuführen. Das gereinigte TNC-scTNF80 bekannter Konzentration aus Würzburg eignete sich zudem als Standard. Allerdings wurde auch deutlich, dass die Verdünnung des TNC-scTNF80 noch höher gewählt werden musste, da die niedrigste Konzentration immer noch eine OD von ca. 0,6 lieferte. Die OD der Pools der aufgetragenen Eluate lag dagegen bei maximal 0,5, also außerhalb des Kalibrierbereichs.

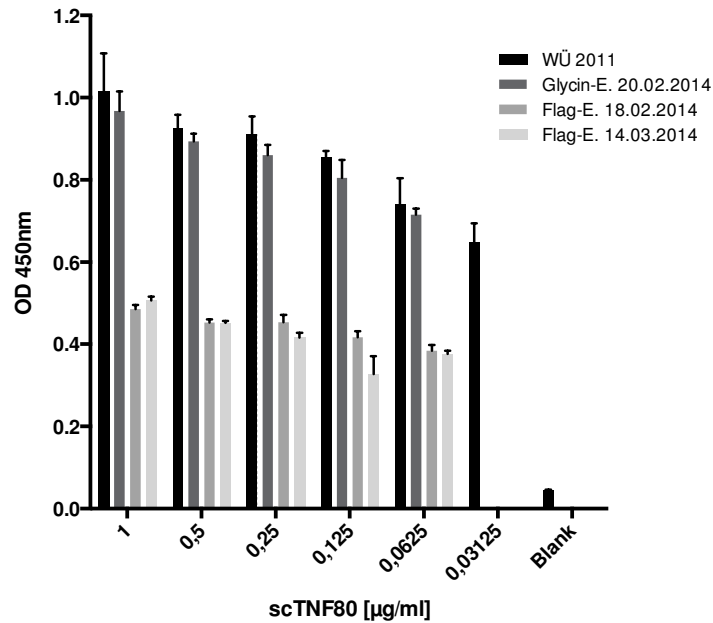


Abbildung 39: Anti-FLAG ELISA: **coating mit rabbit anti-mTNF** (0,8µg/ml); detection mit anti-FLAG M2 HRP-conj. (1µg/ml); Substrat: OPTEIA; Messen bei 450nm. Aufgetragene Proben: scTNF80 1µg/ml in 1:2 Verdünnungsschritten.

Im Gegensatz zu der vorherigen Abbildung wurde bei diesem ELISA der rabbit anti-mTNF für das Coating eingesetzt. Die Ergebnisse waren beinahe identisch mit den Ergebnissen in der Abbildung vorher. Das heißt, auch dieser Antikörper war geeignet, um den ELISA durchzuführen.

Nun wurden noch ein ELISA mit einem polyklonalen rabbit anti-mTNF Serum und erneut mit dem goat anti-mTNF durchgeführt. Diesmal wurde anstatt einer Probe bekannter Konzentration nativer HEK-scTNF80 Zellkulturüberstand aufgetragen, beginnend bei einer Verdünnung von 1:5.

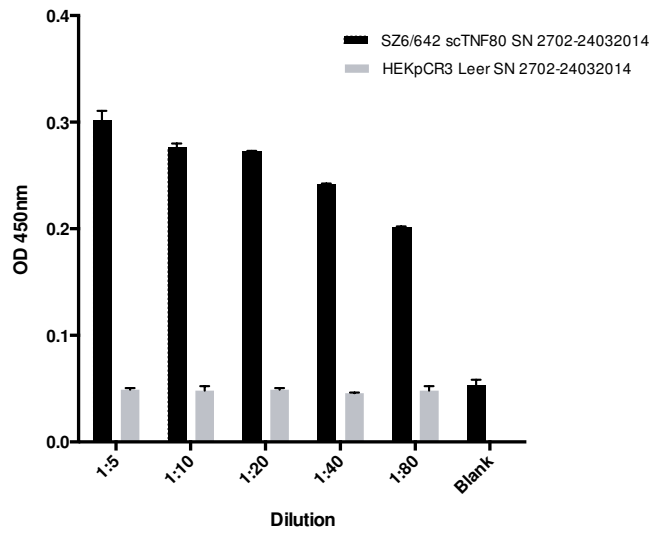


Abbildung 40: anti-FLAG ELISA: **coating mit goat anti-mTNF (0,8µg/ml)**; detection mit anti-FLAG M2 HRP-conj. (1µg/ml); Substrat: OPTEIA; Messen bei 450nm. Aufgetragene Proben: HEK-scTNF80 SN in 1:5 Verdünnungsschritten

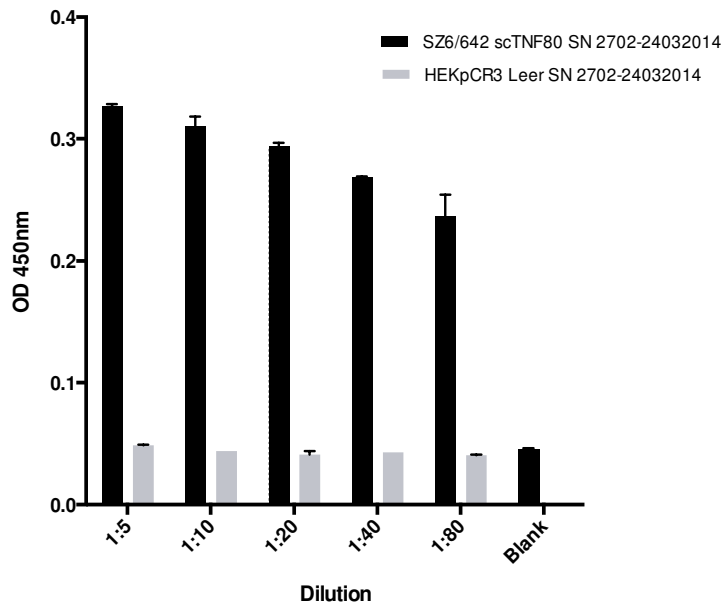


Abbildung 41: anti-FLAG ELISA: **coating mit rabbit anti-mTNF PoAb Serum (1:200)**; detection mit anti-FLAG M2 HRP-conj. (1µg/ml); Substrat: OPTEIA; Messen bei 450nm. Aufgetragene Proben: HEK-scTNF80 SN in 1:5 Verdünnungsschritten

Beide ELISA ergaben ähnliche Resultate. Da das rabbit anti-mTNF PoAb Serum sehr gute Ergebnisse lieferte und vor allem selbst hergestellt wurde und im Institut bereits vorlag, wurde dieses ausgewählt, um spätere Quantifizierungen mittels eines anti-FLAG ELISAs durchzuführen.

Bei den letzten beiden ELISA muss ergänzend gesagt werden, dass auch hier die Verdünnung des Zellkulturüberstandes deutlich höher gewählt werden könnte, da bei einer 1:80 Verdünnung immer noch eine OD<sub>450</sub> von ca. 0,25 vorlag.

#### 4.5 Gewinnung von TNC-scTNF80 aus Ag8-Zellen

Da die Produktion von TNC-scTNF80 Zellkulturüberstand aus den adhärent wachsenden HEK-scTNF80 Zellen mit großem Arbeitsaufwand verbunden ist, wurden Ag8-Zellen mit TNC-scTNF80 transfiziert. Bei den Ag8-Zellen handelt es sich um Suspensionszellen, wodurch der Arbeitsschritt des Abtrypsinierens wegfallen würde. Außerdem wäre es möglich, die Zellen in einem Reaktor zu kultivieren, was eine weitere große Arbeitserleichterung bedeuten würde.

Aufgrund dessen wurde untersucht, ob die transfizierten Ag8-Zellen TNC-scTNF80 exprimieren und wenn ja, ob es in den Zellkulturüberstand sezerniert wird oder ob das Protein in den Zellen verbleibt.

Für die SDS-PAGE und den anschließenden Western Blot wurden Zelllysate von Ag8- und HEK-Zellen hergestellt, welche zum einen mit TNC-scTNF80 und zum anderen mit einem Leervektor transfiziert wurden. Außerdem wurden parallel jeweils die Zellkulturüberstände untersucht.

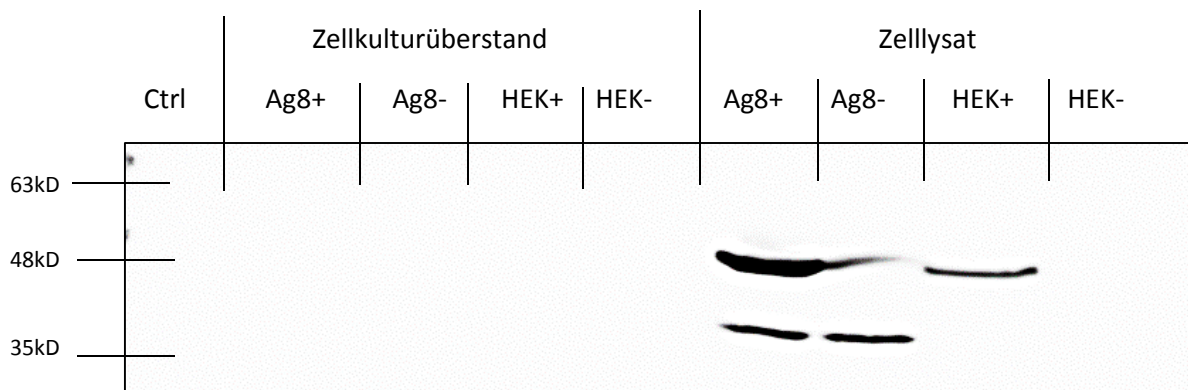


Abbildung 42: Western Blot von Ag8-Zellen und HEK-Zellen: Zelllysate und Zellkulturüberstände von scTNF80 transfizierten und leervektortransfizierten Zellen (+ = scTNF80; - = Leervektor). Färben und Detektion erfolgten mit ECL Prime Western Blotting Detection Reagenz und Image Quant LAS 4000, die Auswertung mit Image Quant.

Die Proben der Zellkulturüberstände wiesen keine Banden auf, obwohl dies zumindest beim HEK-scTNF80 SN zu erwarten gewesen wäre. Auch die Positivkontrolle zeigte keine Bande. Dies ließ vermuten, dass der Detektionsantikörper nicht mehr die notwendige Sensitivität zeigte und erneuert werden musste, da er bereits dreimal eingesetzt worden war. Somit kann nicht eindeutig bestimmt

werden, ob Ag8-Zellen TNC-scTNF80 in das Medium sezernieren oder ob das Protein nahezu vollständig in der Zelle verbleibt.

Die Zelllysate der TNC-scTNF80-positiven Ag8-Zellen und der HEK-Zellen weisen eine Bande im Molekulargewichtsbereich des TNC-scTNF80 auf. Die Bande der Ag8-Zellen war dabei erwartungsgemäß deutlich stärker, da die HEK-Zellen das TNC-scTNF80 in das Medium sezernieren. Dennoch wurde deutlich, dass dies nicht vollständig geschieht, sondern ein Teil des Proteins in der Zelle zurückbleibt.

Des Weiteren war bei den Ag8-Leervektorzellen eine Bande im Bereich des TNC-scTNF80 zu erkennen. Jedoch handelte es sich dabei lediglich um einen kleinen Teil der Ag8-scTNF80 Probe, der beim Auftrag in die benachbarte Tasche übergelaufen ist.

In den Zelllysaten der Ag8-Zellen konnte eine weitere Bande im Molekulargewichtsbereich von ~38kDa detektiert werden. Es könnte sich dabei um  $\beta$ -Aktin handeln, welches im Cytoskelett von eukaryontischen Zellen zu finden und durch Protein-Protein-Wechselwirkungen detektiert wurde. Allerdings steht dem entgegen, dass es im Lysat der HEK-Zellen nicht nachgewiesen werden konnte.

Um herauszufinden, ob verschiedenen FCS-Konzentrationen im Kulturmedium der Ag8-Zellen einen Einfluss auf die Produktionsmenge von TNC-scTNF80 haben und auch die Frage beeinflussen, ob das Protein in das Medium sezerniert wird oder in der Zelle verbleibt, wurden die Ag8-Zellen jeweils für 5 Tage im entsprechenden Medium kultiviert und anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht.

Die Kultivierung erfolgte auf 6-Well Platten. Es wurden  $1 \times 10^6$  Zellen/Well ausgesät und fünf Tage in 6 ml Medium mit der entsprechenden FCS-Konzentration (10%, 5%, 2%, 1%, 0,5%, 0,25%) kultiviert.

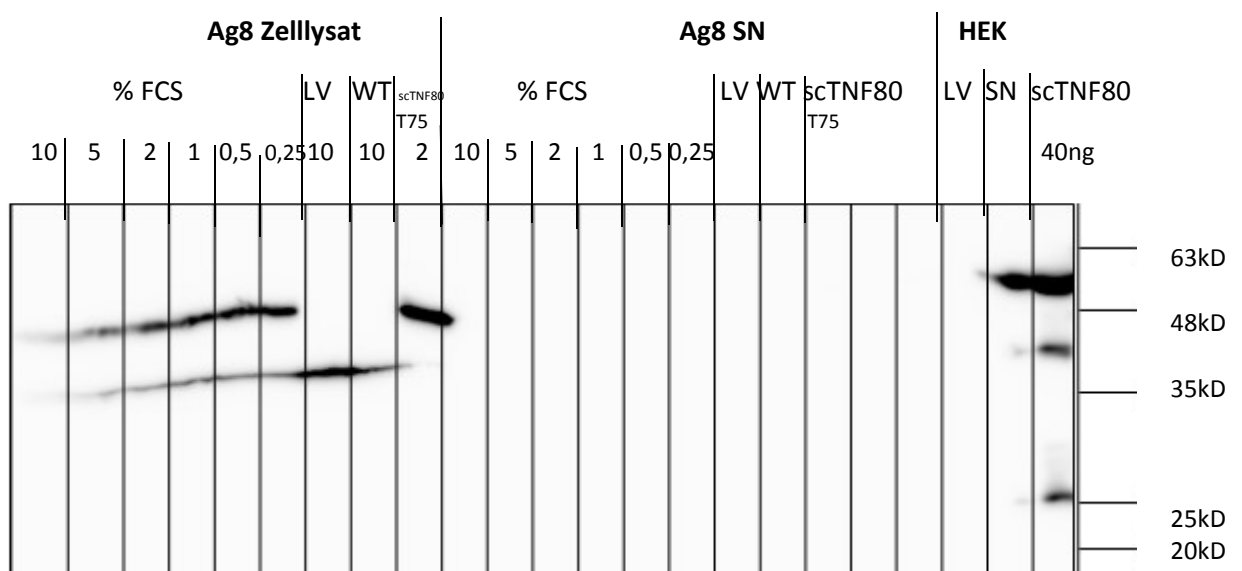


Abbildung 43: Western Blot von Ag8 Zelllysaten und Ag8 Zellkulturüberständen; Kultivierung erfolgte mit verschiedenen FCS-Konzentrationen im Medium (10%, 5%, 2%, 1%, 0,5%, 0,25%). Färben und Detektion erfolgten mit ECL Prime Western Blotting Detection Reagenz und Image Quant LAS 4000, die Auswertung mit Image Quant.



In den Zellkulturüberständen der Ag8-Zellen waren keine Banden zu sehen. Auch in den Überständen der Leervektorzellen und der nicht transfizierten Ag8-Zellen konnte wie erwartet kein TNC-scTNF80 nachgewiesen werden.

In den Zelllysaten der Ag8-Zellen waren Banden im Molekulargewichtsbereich des TNC-scTNF80 zu sehen. Allerdings tauchte auch in diesem Blot die zweite Bande im Bereich von ~38 kD auf. Diese Banden waren auch in den Lysaten des Leervektors und des Wildtyps zu sehen.

Die stärkste TNC-scTNF80-Bande fand sich im Lysat der Ag8-Zellen, die nicht in einer 6-Well Platte, sondern in einer T75-Zellkulturflasche bei 2% FCS kultiviert wurden. Hier war die zweite Bande bei 38 kD nicht zu sehen.

Insgesamt konnte festgestellt werden, dass die TNC-scTNF80-Produktion in den Zellen mit sinkender FCS-Konzentration stieg. Allerdings wurde parallel festgestellt, dass mit sinkender FCS-Konzentration auch vermehrt tote Zellen in der Kultur waren.

Nun wurde untersucht, ob das TNC-scTNF80 mittels eines Ultraschallzellaufschlusses freigesetzt und anschließend durch SDS-PAGE und Western Blot detektiert werden konnte. Es wurden jeweils 10µl der Überstände der Lysate auf das Gel aufgetragen.

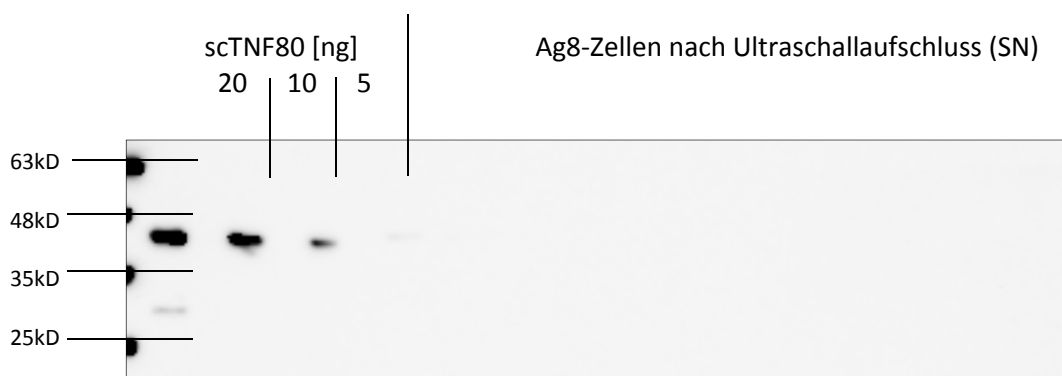


Abbildung 44: Western Blot von Ag-8 Zelllysaten (Ultraschallaufschluss). Färben und Detektion erfolgten mit ECL Prime Western Blotting Detection Reagenz und Image Quant LAS 4000, die Auswertung mit Image Quant.

Es waren lediglich die Banden des TNC-scTNF80-Standards zu sehen, der zur Quantifizierung des TNC-scTNF80 in den Proben eingesetzt werden sollte. Allerdings zeigte sich, dass kein Protein in nach dem Ultraschallaufschluss nachgewiesen werden konnte.

Mit diesem Ergebnis wurde der Versuch, TNC-scTNF80 auf diesem Wege aus Ag8-Zellen zu gewinnen, zunächst auf Eis gelegt.

## 4.6 Transfektion von BFS-1 Zellen

Für einen späteren Versuch sollten BFS-1 Zellen mit TNC-scTNF80 transfiziert werden.

Für diesen Zweck wurden 3 verschiedenen Transfektionsmethoden ausgewählt.

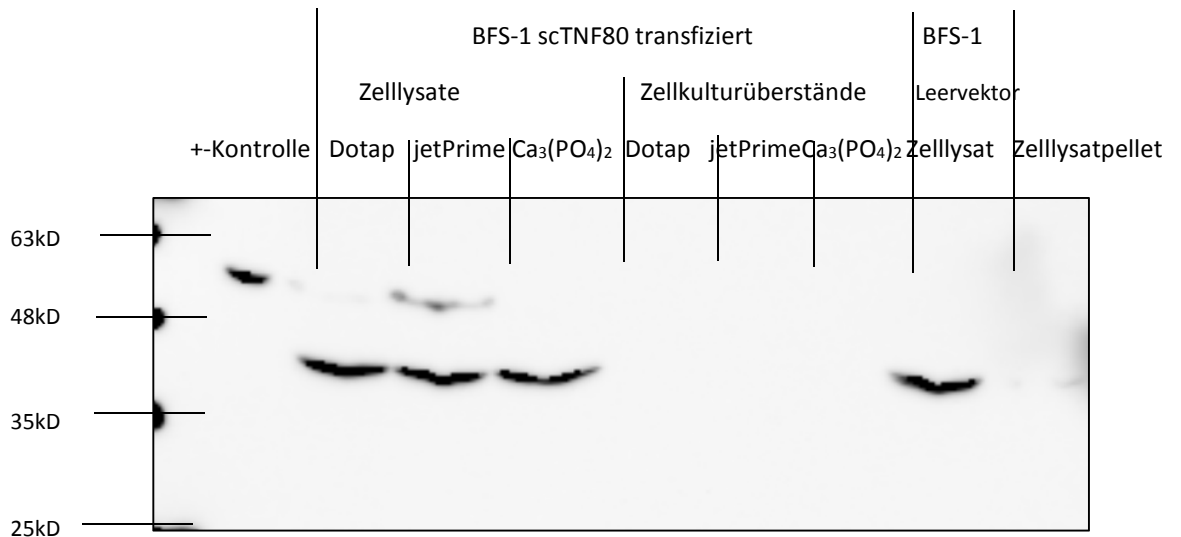


Abbildung 45: Western Blot von Zelllysaten und Zellkulturüberständen der BFS-1 Zellen nach Transfektion mit der Dotap-, jetPrime- und Calciumphosphat-Methode. Färben und Detektion erfolgten mit ECL Prime Western Blotting Detection Reagenz und Image Quant LAS 4000, die Auswertung mit Image Quant.

Es zeigte sich, dass in den Zelllysaten der Zellen, die mit DOTAP und Calciumphosphat transfiziert wurden, wenig bzw. kein TNC-scTNF80 nachgewiesen werden konnte. Die Transfektion mit jetPRIME lieferte das beste Ergebnis.

Im Folgenden wurden nur noch die mit jetPRIME transfizierten Zellen kultiviert. Es sollte untersucht werden, ob verschiedene FCS-Konzentrationen im Medium sowie die Kultivierungsdauer einen Einfluss auf die Expression des TNC-scTNF80 haben. Es wurden wiederum sowohl die Zelllysate als auch die Kulturüberstände mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

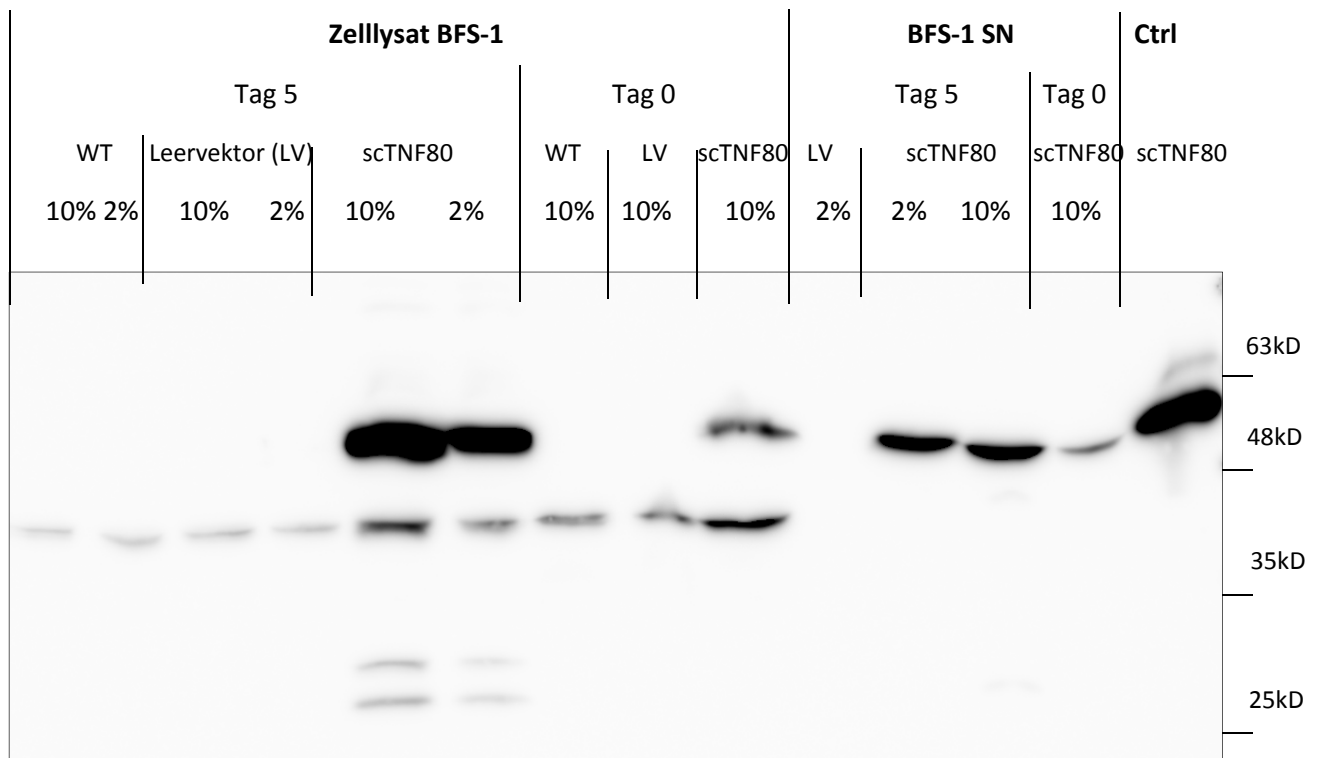


Abbildung 46: Western Blot von BFS-1 Zelllysaten und Zellkulturüberständen nach Kultivierung in 10% bzw. 2% FCS haltigem Medium nach einer Kultivierungsdauer von 5 bzw. 0 Tagen. Färben und Detektion erfolgten mit ECL Prime Western Blotting Detection Reagenz und Image Quant LAS 4000, die Auswertung mit Image Quant.

Sowohl in den leervektortransfizierten Zellen als auch in der Wildtypzelllinie konnte erwartungsgemäß kein TNC-scTNF80 nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis bezog sich auf die Zelllysate gleichermaßen wie auf die Zellkulturüberstände. Jedoch zeigte sich hier, wie später auch in den weiteren Zelllysateproben, eine Bande bei etwa 40 kD. Möglicherweise handelte es sich auch hierbei um eine Kreuzreaktion mit  $\beta$ -Aktin. Die größte Menge an TNC-scTNF80, sprich die stärkste Bande, wurde in den Zelllysaten der BFS1-Zellen gefunden, die 5 Tage mit 10 % FCS im Medium kultiviert wurden.

Allerdings konnte TNC-scTNF80 nicht nur in den Zelllysaten nachgewiesen werden, sondern auch in den Zellkulturüberständen. Hier zeigte sich kein Unterschied zwischen den Zellen, die bei 2% FCS und bei 10% FCS kultiviert wurden. Beide Banden hatten in etwa die gleiche Stärke.

## 5. Zusammenfassung der Ergebnisse, Diskussion und Ausblick

### 5.1 Reinigung des TNC-scTNF80

Die Reinigung im gravity flow führte zu keiner vollständigen Desorption des TNC-scTNF80 von der anti-FLAG M2-Agarose. Das Elutionsprofil stellte keinen Peak, sondern ein langgezogenes Plateau dar, sodass die Reinigung in dieser Form unbrauchbar für die Produktion größerer Mengen TNC-scTNF80 war. Zudem erwies sich der von der Universität Würzburg vorgeschlagene Flow von 1 Tropfen/40 Sekunden als umständlich in der Einstellung und deshalb für die Praxis wenig brauchbar. Außerdem brachte die lange Elutionsdauer die Gefahr von Kontaminationen mit sich.

Die Desorption im Batch-Verfahren zeigte dagegen ein deutlich besseres Elutionsprofil. Nach einem Säulenvolumen von 9 CV bzw. drei Elutionsschritten wurde eine vollständige Elution des TNC-scTNF80 erreicht. Zudem zeigte die Färbung mit Sypro Red, dass die Eluate in sehr reiner Form vorlagen.

Die Quantifizierung von Reinigung 6 und 7, welche beide im Batch-Verfahren durchgeführt wurden, ergab eine Ausbeute von knapp 30 %. Die Vollständigkeit der Desorption wurde durch Auftragen von Säulenmaterial auf die SDS-PAGE überprüft, weshalb dies als Ursache für den noch nicht idealen Wert ausgeschlossen werden konnte. Eine mögliche Erklärung für die geringe Ausbeute war allerdings, dass bei R7 im flow through noch TNC-scTNF80 nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus lagen im Western Blot auch in E2 von Reinigung 6 sowie in W1 und E4 von Reinigung 7 noch Banden vor. Diese Fraktionen wurden aber vernachlässigt und nicht zur Berechnung herangezogen. Vor allem die noch vorhandene Menge TNC-scTNF80 im flow through deutete darauf hin, dass zukünftig ein größeres Säulenvolumen eingesetzt werden sollte, um die Ausbeute zu erhöhen.

Der Nachteil der Desorption mit FLAG-Peptid ist jedoch der hohe Preis des FLAG-Peptids. Deshalb wurde in Anlehnung an Futatsumori-Sugai et al., 2009, versucht, die Elution mit Arginin-HCl anstatt des FLAG-Peptids durchzuführen. Diese Methode zeigte vor allem bei einem pH-Bereich von 3,5 und 4,4 sehr gute Ergebnisse. Die Eluate wiesen eine höhere TNC-scTNF80 Konzentration auf als parallel durchgeführte Ansätze mit FLAG-Peptid. Jedoch konnte noch keine Aussage bezüglich der biologischen Aktivität des auf diese Weise eluierten TNC-scTNF80 getroffen werden, da der IL-8 ELISA als nicht TNFR2-spezifisch herausgestellt hat und somit keine eindeutigen Ergebnisse lieferte. Dies muss im Anschluss mit Proliferationstests überprüft werden.

Insgesamt scheint die Bindung zwischen FLAG-Tag und anti-FLAG M2 Antikörper sehr stark zu sein, was die Desorption des TNC-scTNF80 in der Reinigung erschwert. Möglicherweise hätte ein HIS-Tag anstatt eines FLAG-Tags am Protein die Reinigung wesentlich einfacher gemacht.

Da im Laufe der Reinigung 1-5 die Banden der Zellkulturüberstände der HEK-scTNF80 Zellen, die inzwischen eine Passage von 40 erreicht hatten, auf dem Western Blot immer schwächer wurden, wurden ab Reinigung 6 neu aufgetaute Zellen eingesetzt. Das Verhältnis von Auftragsvolumen zu Säulenvolumen wurde beibehalten. Und tatsächlich war die TNC-scTNF80 Produktion ab diesem Zeitpunkt deutlich höher, was an den Banden im FT in R6 und R7 beobachtet werden konnte. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die HEK-scTNF80-Zellen das transfizierte Gen im Laufe der Zeit wieder zu verlieren scheinen.

Es muss geprüft werden, wie viele Passagen ohne große Einbußen der TNC-scTNF80 Produktion möglich sind und ob die Notwendigkeit einer erneuten Transfektion besteht.

## 5.2 Konzentrierung der HEK-scTNF80 Zellkulturüberstände

Da auch die Überlegung im Raum stand, die Mäuse nicht mit gereinigtem TNC-scTNF80 zu behandeln, sondern mit Zellkulturüberstand der HEK-scTNF80 Zellen, wurde versucht, den Überstand zu konzentrieren. Ausgangspunkt dieser Überlegung war, dass im nativen Überstand eine zu geringe Menge an TNC-scTNF80 vorhanden war, um mit dem maximal injizierbaren Volumen einen therapeutischen Effekt zu erzielen.

### 5.3 Quantifizieren des TNC-scTNF80 im Zellkulturüberstand und den Eluaten

Nachdem die R1 durchgeführt wurde, wurde der Gesamtproteingehalt mit einem BCA-Assay gemessen. Jedoch war die TNC-scTNF80-Konzentration in den Eluaten zu gering, um mit dieser Methode bestimmt werden zu können.

Nun wurde versucht, das TNC-scTNF80 mittels SDS-PAGE, Western Blot und Auswertung im Image Quant zu quantifizieren, wobei ein FLAG-TNF60 Standard zum Einsatz kam. Diese Methode der Quantifizierung wurde von der Universität Würzburg übernommen. Hierbei mussten die für das TNC-scTNF80 erhaltenen Werte mit drei multipliziert werden, da es sich beim Standardprotein um ein Monomer, beim TNC-scTNF80 jedoch um ein Trimer handelt. Das Monomer legt aufgrund des geringeren Molekulargewichts auf dem Gel eine wesentlich längere Strecke zurück als das Trimer, weshalb ein Vergleich beider Banden, welcher zur Quantifizierung nötig ist, schwierig ist. Beide Banden befinden sich nicht auf einer Höhe.

Um dem entgegenzusteuern wurde das FLAG-TNF60 Protein durch ein gereinigtes TNC-scTNF80 bekannter Konzentration ausgetauscht. Die Quantifizierung erfolgte wieder mittels SDS-PAGE, Western Blot und Image Quant. Die mit dieser Methode erhaltenen Werte stimmten nicht mit den Ergebnissen der FLAG-TNF60 Quantifizierung überein. Die mit dem TNC-scTNF80 Standard ermittelte Konzentration war geringer. Da dieser Wert aber mehr der Realität zu entsprechen schien, wurde diese Methode in der Folge zur Quantifizierung beibehalten.

Dennoch lagen die Mängel einer Quantifizierung durch Western Blotting auf der Hand. Zum einen wurde nicht das Protein im Gel, sondern das Protein, welches auf die Membran geblottet wurde, untersucht. Hierbei konnte schon der erste Fehler entstehen. Es bestand die Möglichkeit, dass das Protein nicht vollständig auf die Membran transferiert wurde. Dies konnte anhand von Gelen, die nach dem Blotten in Coomassie gefärbt wurden, beobachtet werden. Auch wurde festgestellt, dass ein Teil des Proteins durch die PVDF-Membran hindurch geblottet wurde und sich auf dem Whatman Papier darunter befand. Darüber hinaus konnte aufgrund ungleichmäßiger Bedingungen (Feuchtigkeit, Druck) in der Blottingapparatur und der daraus resultierenden ungleichmäßigen Strom- und Spannungsverhältnisse ein über die Membran ungleichmäßiger Proteintransfer entstehen, was wiederum Fehler bei der Quantifizierung zur Folge hätte.

Aufgrund der vermuteten Fehlerhaftigkeit der Quantifizierung wurden Proben der Eluate und Zellkulturüberstände an die Universität Würzburg geschickt, um sie vor Ort nach deren Methoden quantifizieren zu lassen. Es bestätigte sich der Verdacht, dass die eingesetzte Quantifizierungsmethode noch nicht der Weisheit letzter Schluss war. Folgende Abweichungen zu den Ergebnissen aus Würzburg lagen vor:

Tabelle 5: Vergleich der ermittelten TNC-scTNF80-Konzentrationen mit den Ergebnissen der Konzentrationsbestimmung der Universität Würzburg

| Probe  | Konzentration TNC-scTNF80 Regensburg | Konzentration TNC-scTNF80 Würzburg | Faktor der Abweichung |
|--|--------------------------------------|------------------------------------|-----------------------|
| Pool der Reinigung vom 09.01.14                                    | 3 µg/ml                              | 0 µg/ml                            | ---                   |
| Pool der Reinigung vom 18.02.14 (Elution mit 37 µg/ml FLAG-Peptid) | 333 µg/ml                            | 74 µg/ml                           | 4,5                   |
| Pool der Glycin-Elution  | 265 µg/ml                            | 151 µg/ml                          | 1,8                   |
| HEK-scTNF80 Zellkulturüberstand                                    | 3 µg/ml                              | 0,5 µg/ml                          | 6                     |

Es wurde deutlich, dass die Konzentration im Vergleich zu den Ergebnissen aus Würzburg durchweg zu hoch gemessen wurde. Das heißt, es wurde für alle durchgeführten Versuche, die den Einsatz einer definierten Menge TNC-scTNF80 erforderten, zu wenig Protein eingesetzt.

Allerdings sei an dieser Stelle auch erwähnt, dass bei der Durchführung des Sypro Red Protein Stains die Konzentrationsangaben aus Würzburg für die Berechnung herangezogen wurden und trotzdem die Banden, die beide 20 ng TNC-scTNF80 enthalten sollten, unterschiedlich stark waren. Möglicherweise muss deshalb auch die Quantifizierungsmethode der Universität Würzburg noch einmal genauer betrachtet werden.

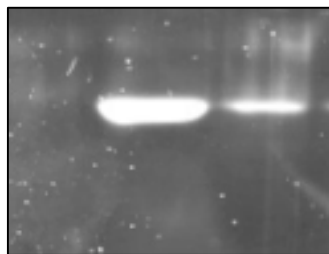


Abbildung 47: SyproRed Protein stain und Auswertung im Typhoon Scanner. Linke Bande: 20 ng TNC-scTNF80 aus dem Pool der Glycin-Elution; rechte Bande: 20 ng TNC-scTNF80 aus dem Pool der FLAG-Elution mit 37 µg/ml FLAG-Peptid im Elutionspuffer. Beide Mengen wurden nach den Konzentrationsangaben der Universität Würzburg berechnet.

Aufgrund der Schwierigkeiten bei Quantifizierung des TNC-scTNF80 mittels Western Blot wurde versucht, eine alternative Quantifizierungsmethode zu etablieren. Dabei wurden zwei verschiedene Wege eingeschlagen: zum einen die Quantifizierung mittels SDS-PAGE mit anschließendem Sypro Red Protein Stain und Scan im Typhoon 9200 und zum anderen eine Quantifizierung mittels eines anti-FLAG ELISAs.

Die Quantifizierung durch die Sypro Red Färbung erfolgte nach dem Typhoon Scan durch Auswerten mit Image Quant. Diese Methode erwies sich als sehr vielversprechend. Zwar ist der Bereich, in dem ausgewertet werden kann, sehr gering (ca. 2,5ng-20ng Protein/Bande), jedoch können die Proben entsprechend verdünnt werden. Allerdings ist die Fehleranfälligkeit aufgrund des engen zur Verfügung stehenden Intervalls etwas größer. Der große Vorteil dieser Methode ist aber, dass das Protein direkt im Gel detektiert wird und somit alle möglichen Fehlerquellen, die der Transfer auf eine Membran mit sich bringt, ausgeschlossen werden. Die mit dieser Methode errechneten Ergebnisse müssen nun noch von der Universität Würzburg verifiziert werden.

Die Quantifizierung mittels eines anti-FLAG ELISAs erwies sich ebenfalls als vielversprechend. Jedoch ist die Durchführung etwas zeitintensiver als die Sypro Red Färbung. Für den anti-FLAG ELISA wurde der polyklonale Antikörper rabbit anti-mTNF als idealer Coating-Antikörper identifiziert. Der Standard, welcher zukünftig eingesetzt werden soll, ist das gereinigte TNC-scTNF80 der Universität Würzburg mit einer Konzentration von 20 µg/ml. Im nächsten Schritt müssen die idealen Konzentrationen für die Standardgerade sowie die idealen Verdünnungen der Proben herausgefunden werden.

#### 5.4 Aktivitätsbestimmung des TNC-scTNF80 durch den IL-8 ELISA

Zunächst muss festgestellt werden, dass die Durchführung des IL-8 ELISAs mit hohem finanziellen Aufwand verbunden ist und die Durchführung drei Tage in Anspruch nimmt. Aufgrund dieser Punkte wurde erwartet, dass der Test aussagekräftige Ergebnisse lieferte, die das Projekt insgesamt voran bringen sollten.

Diese Hoffnungen wurden aber nur teilweise erfüllt. Größtenteils lieferte der ELISA kaum auswertbare Ergebnisse. Von einer Dose Response konnte in den seltensten Fällen gesprochen werden.

Außerdem war der Hintergrund, also die IL-8 Produktion, die nicht durch TNC-scTNF80 stimuliert wurde, sehr hoch. Dies machte es schwierig, zu reproduzierbaren und aussagekräftigen Ergebnissen zu gelangen.

Ein weiteres Problem, das identifiziert wurde, ist die unzureichende Konzentrationsbestimmung des TNC-scTNF80 in den Eluaten und Zellkulturüberständen. Aufgrund dessen könnte statt der 250 ng/ml, 50 ng/ml usw., die zur Stimulation der HT1080-Bcl2-TNFR2 Zellen eingesetzt wurden, wesentlich weniger Protein in den Proben enthalten gewesen sein, was eine mögliche Erklärung für das größtenteils schwache Signal, das kaum höher als der Hintergrund war, darstellen könnte.

Ein möglicher Punkt, der zudem variiert werden könnte, ist das im Protokoll des ELISA-Kits angegebene Abstoppen der Reaktion mit dem Substrat durch Schwefelsäure. Das Problem bei der Durchführung des ELISAs war, dass der Substratumsatz sehr rasch – nach wenigen Minuten – erfolgte und die Reaktion deshalb zum einen auf Eis stattfinden und zum anderen sehr schnell abgestoppt werden musste. Generell gilt bei einem ELISA aber die Regel, dass das Signal sich möglichst über einen Zeitraum von 30-60 Minuten aufbauen sollte, um ein aussagekräftiges Ergebnis zu liefern. Die Universität Würzburg schlägt deshalb in ihrem Protokoll vor, die nicht abgestoppten ELISA-Platten bei einer Wellenlänge von 405 nm direkt im Anschluss an die Substratzugabe zu messen und diese Messung in kurzen Abständen zu wiederholen, bis die OD<sub>405</sub>-Werte weitestgehend stagnieren. Für die Zukunft gilt es herauszufinden, ob dieses Vorgehen bessere Ergebnisse liefert.

## 5.4 Gewinnung von scTNF80 aus Ag8-Zellen

Um die Produktion effektiver und weniger zeitintensiv mithilfe eines Fermenters zu gestalten, wurde versucht, TNC-scTNF80 aus der Suspensionszellkultur Ag8 zu gewinnen. Der Idealfall hierfür wäre gewesen, dass die Zellen das Protein in den Zellkulturüberstand sezernieren. Dies war jedoch nicht der Fall. Auch nach unterschiedlichen Kultivierungszeiten und verschiedenen FCS-Konzentrationen im Medium änderten die Zellen dieses Verhalten nicht und TNC-scTNF80 war lediglich in den Zelllysaten nach Zellyse mit RIPA-Puffer zu finden. Dieser Puffer beeinträchtigt aber in jedem Fall die biologische Aktivität des Proteins.

Daraufhin wurde versucht, die Ag8-Zellen mit Ultraschall aufzuschließen und das TNC-scTNF80 anschließend nachzuweisen. Hätte diese Methode reibungslos funktioniert, wäre sie trotz des zusätzlichen Arbeitsschrittes, den der Ultraschallzellaufschluss bedeutete, eine Alternative zur Produktion des TNC-scTNF80 in HEK-Zellen gewesen. Jedoch konnte im Zelllysat der Ag8-Zellen nach Ultraschallaufschluss kein TNC-scTNF80 nachgewiesen werden. Möglicherweise war das Protein den Aufschlussbedingungen nicht gewachsen. Auch kann es sein, dass der Zellaufschluss unter den gewählten Bedingungen nicht vollständig war und sich das Protein noch immer in den Zellen befand. Jedoch wäre eine noch längere Impulszeit in jedem Fall bedenklich hinsichtlich der biologischen Aktivität des Proteins gewesen.

Aufgrund dieser Schwierigkeiten wurde der Versuch, TNC-scTNF80 durch Ag8-Zellen zu gewinnen, an dieser Stelle abgebrochen.

## 5.5 Transfektion von BFS-1 Zellen

Um in einem späteren Versuch Mäuse mit TNC-scTNF80 transfizierten BFS-1 Tumorzellen infizieren zu können, mussten die BFS-1 Zellen transfiziert werden.

Dafür wurden drei verschiedene Transfektionsmethoden eingesetzt: zum einen zwei kommerzielle Kits (DOTAP<sup>®</sup> und jetPRIME<sup>®</sup>) und zum anderen die Calciumphosphatmethode. Die eingesetzten Plasmide stammten von der Universität Würzburg. Mit jeder Methode wurde parallel ein Leervektor transfiziert. Alle sechs Transfektionen waren erfolgreich, da in jedem Well Klone die Selektion mit G418 überlebten. Jedoch produzierten nur die mit jetPRIME transfizierten Zellen TNC-scTNF80. Dies konnte erst nach mehreren Generationszeiten nachgewiesen werden, da erst hier eine für den Nachweis ausreichende Menge TNC-scTNF80 produziert wurde. Zunächst konnte TNCscTNF80 nur im Zelllysat nachgewiesen werden, später auch im Zellkulturüberstand.

An dieser Stelle sei angemerkt, dass ein Fluoreszenz-Tag am Protein die Identifizierung jener Klone, die TNC-scTNF80 produzieren, sehr erleichtert hätte.



## Literaturverzeichnis

- Abbas A. K., Lichtman A. H., Poabler J. S.. 2000. Cellular and molecular immunology. W. B. Saunder company.
- Bodmer, J.L., Schneider, P., Tschopp, J.. 2002. The molecular architecture of the TNF superfamily. Trends in Biochemical Sciences; 27: 19-26.
- Davidson Ann E., Gratsch Theresa E., Morell Maria H., O'Shea K. Sue, Krull Catherine E.. 2009. Use of the Sleeping Beauty Transposon System for Stable Gene Expression in Mouse Embryonic Stem Cells. Cold Spring Harbor Protocols; Vol. 4: 1018-1023
- Fischer, R.. 2011. A Soluble TNF Receptor 2 Agonist as a New Therapeutic Approach to Treat Autoimmune and Demyelinating Diseases, unv. Diss., Universität Stuttgart.
- Futatsumori-Sugai Mutsumi, Abe Ryota, Watanabe Masato, Kudou Motonori, Yamamoto Tadashi, Ejima Daisuke, Arakawa Trutomu, Tsumoto Kouhei. 2009. Utilization of Arg-elution method for FLAG-tag based chromatography. Protein Expression and Purification; 67: 148-155.
- Grewal, Iqbal S.. 2009. Therapeutic Targets of the TNF Superfamily. Springer Series: Advances in Experimental Medicine and Biology ; Vol. 647
- Gstraunthaler Gerhard, Lindl Toni: Zell- und Gewebekultur. 7. Auflage. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin 2013.
- Hehlgans Thomas, Pfeffer Klaus. 2005. The intriguing biology oft the tumor necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. Immunology; 115: 1-20.
- Jansohn Monika, Rothhämel Sophie (Hrsg.). 2012. Gentechnische Methoden. 5. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Locksley R., Killeen N., Lenardo M.. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. Cell; Vol. 104(4): 487-501.
- Lottspeich, Friedrich/Engels, Joachim W. (Hrsg.). 2009. Bioanalytik. 2. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Mülhardt Cornel. 2009. Der Experimentator. Molekularbiologie/Genomics. 6. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Rauert, H.. 2012. Apoptoseregulation durch TNF im Multiplen Myelom. unv. Diss., Universität Würzburg.
- Rehm, Hubert/Letzel, Thomas. 2010. Der Experimentator. Proteinbiochemie/Proteomics. 6. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Roesky H. W., Möckel K.. 1996. Chemische Kabinettstücke. Weinheim: VCH.

Wajant H., Wyzgol A., Fick A.. 2012. Production, Purification, and Characterization of scFv TNF Ligand Fusion Proteins. Patrick Chames (ed.), Antibody Engineering: Methods and Protocols, Second Edition, Methods in Molecular Biology; vol. 907

Schmitz, Sabine. 2011. Der Experimentator. Zellkultur. 3. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Schütt Christine, Bröker Barbara. 2011. Grundwissen Immunologie. 3. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

## Abbildungsverzeichnis

|   | Seite |
|---|-------|
| Abbildung 1: TNF und die TNF-Rezeptoren.....  | 3     |
| Abbildung 2: Signalwege des TNFR2.....  | 4     |
| Abbildung 3: Struktur der TNF-Varianten TNF (32W/86T) und TNC-scTNF (143N/145R).....                      | 5     |
| Abbildung 4: Der Bicinchoninsäure-Assay.....  | 16    |
| Abbildung 5: Chemilumineszenz. Mehrstufige chemische Reaktion von Luminol.....                            | 22    |
| Abbildung 6: HT1080-Bcl2-TNFR2 Zellen.....  | 24    |
| Abbildung 7: Chemische Transfektionsmethoden.....   | 28    |
| Abbildung 8: BFS-1 Zellen.....  | 28    |
| Abbildung 9: Western-Blot der R1.....   | 30    |
| Abbildung 10: Western Blot: Quantifizierung des Pools der Eluate E1-E13 aus R1.....                       | 31    |
| Abbildung 11: Standardgerade für die Quantifizierung.....   | 32    |
| Abbildung 12: Western Blot der R2.....  | 33    |
| Abbildung 13: Western Blot der R3.....  | 34    |
| Abbildung 14: : Western Blot der R4.....  | 35    |
| Abbildung 15: Western Blot zur Quantifizierung der Pools der Eluate aus R4.....                           | 36    |
| Abbildung 16: Western Blot der R5.....  | 38    |
| Abbildung 17: SDS-PAGE verschiedener Eluate mit anschließender Färbung mit Sypro Red<br>Proteinstain..... | 39    |
| Abbildung 18: Western Blot der R6.....  | 40    |
| Abbildung 19: Western Blot der R7.....  | 41    |
| Abbildung 20: SDS-PAGE verschiedener Eluate mit anschließender Färbung mit Sypro Red<br>Proteinstain..... | 42    |

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 21: IL-8 Produktion bei Aktivierung von HT1080-Zellen mit scTNF80 aus der Glycin-Elution.....  | 44 |
| Abbildung 22: IL-8 Produktion bei Aktivierung von HT1080-Zellen mit scTNF80 aus der FLAG-Elution.....  | 44 |
| Abbildung 23: IL-8 Produktion bei Aktivierung von HT1080-Zellen mit scTNF80 aus R1.....  | 45 |
| Abbildung 24: IL-8 Produktion bei Aktivierung von HT1080-Zellen mit HEK-scTNF80 SN nativ....   | 45 |
| Abbildung 25: IL-8 Produktion bei Aktivierung von HT1080-Zellen mit HEK-scTNF80 SN, welcher durch Ammoniumsulfatfällung um das 20fache konzentriert wurde..... | 46 |
| Abbildung 26: IL-8 Produktion bei Aktivierung von HT1080-Zellen mit HEK-scTNF80 SN, der durch Polyethylenkonzentrierung um das 5fache konzentriert wurde.....  | 47 |
| Abbildung 27: IL-8 Produktion bei Aktivierung von HT1080-Zellen mit HEK-pCR3.....  | 47 |
| Abbildung 28: IL-8 Produktion bei Aktivierung von HT1080-Zellen mit HEK-scTNF80 SN nativ....   | 48 |
| Abbildung 29: IL-8 Produktion bei Aktivierung von HT1080-Zellen mit E1 aus R3.....   | 49 |
| Abbildung 30: IL-8 Produktion bei Aktivierung von HT1080-Zellen mit scTNF80 (Würzburg).....  | 49 |
| Abbildung 31: IL-8 Produktion bei Aktivierung von HT1080-Zellen mit E <sub>pool</sub> (1M Arg, pH 3,5).....  | 50 |
| Abbildung 32: IL-8 Produktion bei Aktivierung von HT1080-Zellen mit E <sub>pool</sub> (1M Arg, pH 4,4).....  | 51 |
| Abbildung 33: IL-8 Produktion bei Aktivierung von HT1080-Zellen mit E <sub>pool</sub> (1M Arg, pH 4,4, gelöst in TBS) .....                                    | 51 |
| Abbildung 34: IL-8 Produktion bei Aktivierung von HT1080-Zellen mit E <sub>pool</sub> (2M Arg, pH 6,0, gelöst in TBS) .....                                    | 52 |
| Abbildung 35: IL-8 Produktion bei Aktivierung von HT1080-Zellen mit HEK-pCR3.....  | 53 |
| Abbildung 36: anti-FLAG ELISA: coating mit goat anti-mTNF (0,8µg/ml).....  | 54 |
| Abbildung 37: Anti-FLAG ELISA: coating mit anti-FLAG M2 (5µg/ml).....  | 55 |
| Abbildung 38: Anti-FLAG ELISA: coating mit goat anti-mTNF (0,8µg/ml).....  | 56 |
| Abbildung 39: Anti-FLAG ELISA: coating mit rabbit anti-mTNF (0,8µg/ml).....  | 57 |
| Abbildung 40: anti-FLAG ELISA: coating mit goat anti-mTNF (0,8µg/ml).....  | 58 |
| Abbildung 41: anti-FLAG ELISA: coating mit rabbit anti-mTNF PoAb Serum (1:200).....  | 58 |
| Abbildung 42: Western Blot von Ag8-Zellen.....   | 59 |
| Abbildung 43: Western Blot von Ag8 Zelllysaten und Ag8 Zellkulturüberständen.....  | 60 |
| Abbildung 44: Western Blot von Ag-8 Zelllysaten (Ultraschallaufschluss).....   | 61 |
| Abbildung 45: Western Blot von Zelllysaten und Zellkulturüberständen der BFS-1 Zellen.....   | 62 |
| Abbildung 46: Western Blot von BFS-1 Zelllysaten und Zellkulturüberständen.....  | 63 |
| Abbildung 47: SyproRed Protein stain und Auswertung im Typhoon Scanner.....  | 66 |

## Tabellenverzeichnis

|   | Seite |
|---|-------|
| Tabelle 1: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels (SDS-PAGE) für einen Ansatz von je 50 ml...17  |       |
| Tabelle 2: Zusammenfassung der durchgeführten TNC-scTNF80 Reinigungen.....20  |       |
| Tabelle 3: IL-8 ELISA. Aufgetragene Proben und der Konzentrationen bzw. Verdünnungen.....25   |       |
| Tabelle 4: Errechnete Ausbeute der Reinigungen 6 und 7.....42   |       |
| Tabelle 5: Vergleich der ermittelten TNC-scTNF80-Konzentrationen mit den Ergebnissen der Konzentrationsbestimmung der Universität Würzburg.....66 |       |

## Abkürzungsverzeichnis

|       |                                   |
|-------|-----------------------------------|
| AK    | Antikörper                        |
| APS   | Ammoniumpersulfat                 |
| Arg   | Arginin-HCl                       |
| BCA   | Bicinchoninsäure                  |
| BSA   | Bovine serum albumin              |
| Ctrl  | Control                           |
| DTT   | Dithiothreitol                    |
| E     | Eluat                             |
| EDTA  | Ethylendiamintetraacetat          |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent-assay |
| FCS   | Fetal calf serum                  |
| FT    | Flow Through                      |
| g     | Gramm bzw. Erdbeschleunigung      |
| HEK   | Human embryonic kidney            |
| HRP   | Horseradish peroxidase            |
| kD    | Kilodalton                        |
| LV    | Leervektor                        |
| mA    | Milliamper                        |
| M     | Molar (mol/l) oder Marker         |
| MMP   | Magermilchpulver                  |
| MW    | Molekulargewicht                  |
| PAGE  | Polyacrylamid-Gelelektrophorese   |
| PBS   | Phosphat-buffered Saline          |
| P/S   | Penicillin/Streptomycin           |

|       |                        |
|-------|------------------------|
| PVDF  | Polyvinylidenfluorid   |
| R     | Reinigung              |
| Rpm   | Rounds per minute      |
| RT    | Raumtemperatur         |
| SDS   | Sodiumdodecylsulfat    |
| SN    | supernatent            |
| TBS   | Tris-buffered Saline   |
| TEMED | Tetramethylethyldiamin |
| TMB   | Tetramethylbenzidin    |
| TNF   | Tumornekrosefaktor     |
| W     | Wash                   |
| WB    | Western Blot           |
| WT    | Wildtyp                |

## Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Besonders möchte mich bei Prof. Dr. Daniela Männel bedanken, die mir ermöglicht hat, meine Bachelorarbeit an Ihrem Institut anzufertigen. Auch für die Korrektur dieser Arbeit bin ich sehr dankbar.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dorothea Weber-Steffens für die Betreuung im Labor. Danke Doro, dass du mir den Beginn meiner Zeit am Institut durch deine herzliche und positive Art und Weise sehr leicht gemacht und mich durch deine fachliche Kompetenz, deine wertvollen Anregungen und Tipps sowie deine Begeisterung für das Thema zu jeder Zeit unterstützt hast.

Bedanken möchte ich mich auch sehr herzlich bei Prof. Dr. Gesine Cornelissen, die mich aus der Ferne unterstützt und alle noch vorhandenen bürokratischen Hürden aus dem Weg geräumt hat.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei allen Mitarbeitern am Institut für die freundliche Aufnahme bedanken.

## **Eidesstattlich Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und dabei nur die genannten Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Regensburg, den 11.06.14

---

Christine Hirl