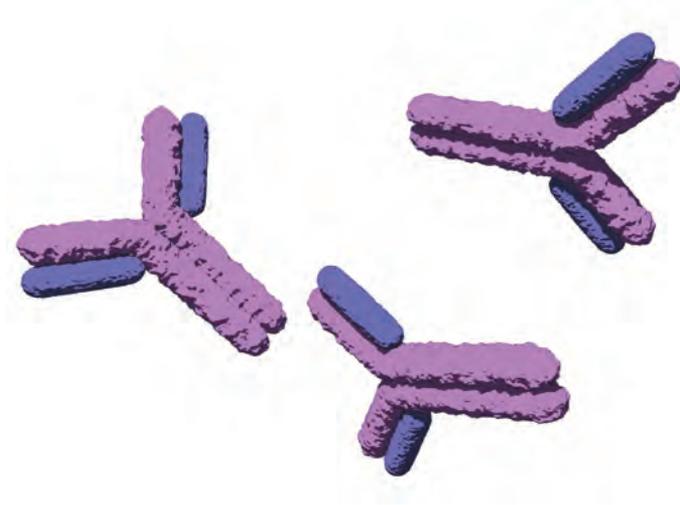


# Charakterisierung von Antikörpern gegen P-12-LOX und Aufbau von Nachweisverfahren (ELISA und Durchflusszytometrie)

**Christine Wollmann**



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*edition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Biochemie und Endokrinologie des Fachbereiches Veterinärmedizin der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. H.-C. Siebert

**und**

Firma American Diagnostica GmbH (Labor in Heidelberg)

Betreuer: Prof. Dr. M. Kramer

## **Charakterisierung von Antikörpern gegen P-12-LOX**

### **und Aufbau von Nachweisverfahren**

### **(ELISA und Durchflusszytometrie)**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Christine Wollmann**  
Tierärztin aus Heppenheim

Gießen 2010

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. Dr. habil. H.-C. Siebert

Prof. Dr. M. Kramer

Tag der Disputation: 11.01.2011

**Meinen Eltern**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Verwendete Abkürzungen</b>	<b>6</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1. Lipoxygenasen und Lipoxygenase-12	7
1.1.1. Funktion	7
1.1.2. Molekulare Struktur	7
1.1.3. Vorkommen	8
1.2. Biomarker	9
1.3. Antikörper und deren Nutzung im Rahmen immunologischer Nachweisverfahren	10
1.4. Entwicklung von Testverfahren zum Nachweis von P-12-LOX mit Hilfe von Antikörpern	13
1.5. Zielsetzung	13
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>14</b>
2.1. Material	14
2.1.1. Antigene	14
2.1.2. Antikörper	14
2.1.3. Für den ELISA verwendetes Material	15
2.1.3.1. Für den ELISA verwendete Geräte	15
2.1.3.2. Für den ELISA verwendete Reagenzien	15
2.1.4. Für den Western Blot verwendetes Material	16
2.1.4.1. Für den Western Blot verwendete Geräte	16
2.1.4.2. Für den Western Blot verwendete Reagenzien	17
2.1.5. Für die Immunpräzipitation verwendetes Material	18
2.1.5.1. Für die Immunpräzipitation verwendete Geräte	18
2.1.5.2. Für die Immunpräzipitation verwendete Reagenzien	18
2.1.6. Für die Durchflusszytometrie verwendetes Material	18
2.1.6.1. Für die Durchflusszytometrie verwendete Geräte	18
2.1.6.2. Für die Durchflusszytometrie verwendete Reagenzien	19
2.2. Methoden	20
2.2.1. Enzyme-linked Immunosorbent Assay	20
2.2.1.1. Prinzip	20
2.2.1.2. Durchführung	21
2.2.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese	22
2.2.2.1. Prinzip	22
2.2.2.2. Durchführung	22
2.2.3. Western Blot	23
2.2.3.1. Prinzip	23

2.2.3.2. Durchführung	23
2.2.4. Immunpräzipitation	25
2.2.4.1. Prinzip	25
2.2.4.2. Durchführung	26
2.2.5. Durchflusszytometrie	27
2.2.5.1. Prinzip	27
2.2.5.2. Durchführung	28
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>29</b>
3.1. Charakterisierung der Antikörper	29
3.2. Entwicklung des ELISA Testsystems	30
3.2.1. Antikörperkombinationen	30
3.2.2. Messbereich, Sensitivität und Präzision	32
3.2.3. Reproduzierbarkeit des ELISAs: Intra- und Inter-Assay Variabilität	34
3.2.4. Spezifität des ELISAs	36
3.2.5. Stabilität der Platten und der LOX-Vorverdünnungen	37
3.2.6. Stabilität des P-12-LOX Standard	38
3.2.7. Wiederfindung der P-12-LOX	39
3.2.8. Messung von plättchenfreiem Plasma und plättchenreichem Plasma	40
3.2.9. Messung von P-12-LOX in xenotransplantierten Brustkrebszellen	45
3.3. Nachweis von P-12-LOX mit Hilfe der Durchflusszytometrie	46
<b>4 Diskussion</b>	<b>50</b>
4.1. Entwicklung des P-12-LOX Enzym Immuntests und Charakterisierung der hierfür verwendeten Antikörper	50
4.2. Nachweis von P-12-LOX mit Hilfe von Durchflusszytometrie	55
4.3. P-12-LOX und Krebs	56
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>59</b>
<b>Summary</b>	<b>61</b>
<b>6 Literatur</b>	<b>62</b>
<b>7 Danksagung</b>	<b>65</b>

## Verwendete Abkürzungen

Alb	Albumin
AK	Antikörper
BSA	bovines Serum Albumin
DAB	Diaminobenzidin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym Immuntest
Fab	antigenbindendes Fragment
FACS	fluorescence activated cell sorting
Fc	„crystallizable-fragment“ eines Immunglobulinmoleküls
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HPETE	Hydroperoxyeicosatetraensäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
HRP	Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
mAb	monoklonaler Antikörper
P-12-LOX	Plättchen-Lipoxygenase-12
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PFP	plättchenfreies Plasma
POX	Peroxidase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRP	plättchenreiches Plasma
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
TMB	Tetramethylbenzidin

# 1. Einleitung

## 1.1. Lipoxygenasen und Lipoxygenase-12

### 1.1.1. Funktion

Lipoxygenasen (LOX) oxidieren mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit jeweils zwei Sauerstoffatomen. Sie gehören somit zur Gruppe der Dioxygenasen. Die bisher bekannten Lipoxygenasen spielen eine Rolle im Arachidonsäurestoffwechsel der Säugetiere und im pflanzlichen Linolsäure-Metabolismus.

Arachidonsäure wird durch Phospholipase A<sub>2</sub> aus Plasmamembranen freigesetzt. Anschließend wird sie durch Cyclooxygenasen und Lipoxygenasen metabolisiert. Die wichtigsten Metaboliten dieses Stoffwechsels sind Eicosanoide. Produkte von Cyclooxygenasen sind Prostaglandine und Thromboxane A<sub>2</sub>. Zu den Produkten des LOX-katalysierten Arachidonsäuremetabolismus gehören Leukotriene, Hydroperoxy-eicosatetraensäure (HPETE) und Hydroxyeicosatetraensäure (HETE).

LOX katalysieren das Einfügen von molekularem Sauerstoff in die 5-, 8-, 12-, und 15-Position von mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie Arachidonsäure, wodurch die entsprechenden Hydroperoxide 5-, 8-, 12-, 12R- oder 15-HPETE entstehen. Entsprechend ihrer Eigenschaft, Arachidonsäure an unterschiedlichen Positionen zu oxygenieren, unterscheidet man bei Säugetieren 5-, 8-, 12- und 15-LOX (Brash AR, 1999; Shureiqi I et al, 2001).

### 1.1.2. Molekulare Struktur

Lipoxygenasen sind Metalloenzyme, die ein Eisenatom im Reaktionszentrum enthalten. Dieses ist pro Molekül direkt über 5 Aminosäureseitenketten gebunden. Alle Lipoxygenasen bestehen aus einer einzelnen Polypeptidkette mit einer Molekularmasse von 75-80 kDa und einer Länge von 662-711 Aminosäuren (Brash AR, 1999).

Die Aktivierung des Enzyms beginnt mit der Oxidation seines Eisenatoms. Fe(II) wird dabei in seine aktive Fe(III)-Form oxidiert (De Groot *et al.*, 1975).

### 1.1.3. Vorkommen

12-LOX existiert in drei Isoformen. Sie werden nach dem Zelltyp, in dem sie überwiegend exprimiert werden, benannt. Es gibt ein Plättchentyp (P-12-LOX), ein Leukozytentyp (L-12-LOX) und ein Epitheltyp (E-12-LOX) 12-LOX. Diese Isoformen von 12-LOX unterscheiden sich in Substratspezifität, Immunogenität und Aminosäuresequenz. So ist P-12-LOX weniger aktiv mit C18-Fettsäuren wie Linolsäure, sondern reagiert besonders stark mit Arachidonsäure. E-12-LOX ist hingegen mit C18-, C22-Fettsäuren und mit Arachidonsäure aktiv (Yamamoto *et al.*, 1992).

P-12-LOX kommt in humanen Thrombozyten, ihren Vorläufern den Megakaryozyten und in humanen Epidermiszellen vor (Funk CD *et al.*, 1990; Izumi T *et al.*, 1990).

P-12-LOX ist gehäuft in Tumorzellen nachweisbar, wobei deren Lokalisation in der Zelle variiert. In nicht metastasierenden Zellen ist P-12-LOX in der Plasmamembran, in zytoplasmatischen Organellen und im Zellkern lokalisiert (Hagmann *et al.*, 1996). In metastasierenden Zellen ist das Enzym auch in zytoplasmatischen Vesikeln und Filamenten des Zytoskeletts vorzufinden (Timar *et al.*, 2000). Die Lokalisation von P-12-LOX in der Plasmamembran wird mit deren Signalfunktion in Zusammenhang gebracht (Liu *et al.*, 1994), wohingegen die Präsenz im Zellkern mit der Rolle bei Zellüberleben und Apoptose in Verbindung gebracht wird (Tang *et al.*, 1996; Hagmann, 1997). In Vesikeln und Filamenten hat das P-12-LOX-Produkt 12-HETE regulatorische Effekte auf Anordnung von Organellen und Neuordnung des Zytoskeletts (Timar *et al.*, 1993).

## 1.2. Biomarker

Biomarker sind messbare biochemische oder molekulare Größen, die einen normalen oder pathologischen Prozess oder die Antwort auf eine therapeutische Intervention beschreiben (Biomarkers Definitions Working Group 2001).

Man unterscheidet zwischen verschiedenen Typen von Biomarkern: DNA-Biomarker wie beispielsweise Mutationen von Onkogenen, Tumorsuppressorgenen oder Reparaturgenen; RNA-Biomarker und Proteinmarker. Zu letzterer Gruppe zählen unter anderem Zelloberflächenrezeptoren, Tumorantigene und Peptide, welche von Tumoren produziert werden.

Bei Krebserkrankungen finden Biomarker Anwendung vor der eigentlichen Krebsdiagnose im Rahmen der Risikoabschätzung und der Diagnostik von Krebs. In der Diagnose werden sie u.a. zur Klassifizierung des Tumors anhand des Ursprungsgewebes und dem Grad der Differenzierung eingesetzt. Darüber hinaus können Biomarker zur Stadieneinteilung beitragen. Nach der Diagnosestellung werden Biomarker zur Kontrolle des Therapieerfolges eingesetzt, um gegebenenfalls zusätzlich nötige Therapien auszuwählen und das Wiederauftreten des Tumors frühzeitig zu erkennen (Ludwig et al, 2005).

Viele Proteinbiomarker werden mittels quantitativer ELISA-Verfahren nachgewiesen.

Die in der vorliegenden Arbeit angestrebte Entwicklung eines Nachweisverfahrens für P-12-LOX dient auch dazu, der Wissenschaft ein routinefähiges Testsystem zur Verfügung zu stellen. Damit kann u.a. geprüft werden, in wie weit P-12-LOX als Biomarker für Krebserkrankungen herangezogen werden kann.

### **1.3. Antikörper und deren Nutzung im Rahmen immunologischer Nachweisverfahren z.B. ELISA**

Antikörper bzw. Immunglobuline sind Proteine, die in Wirbeltieren als Reaktion auf Antigene gebildet werden. Sie sind Teil der sog. humoralen Immunantwort. Ein bestimmtes Antigen induziert die Bildung passender Antikörper, die über spezifische nicht-kovalente Bindung dieses Antigen spezifisch erkennen.

Antikörper werden von zu Plasmazellen differenzierten B-Lymphozyten gebildet. B-Lymphozyten sind klonal, das heißt, dass jeder B-Lymphozyt nur einen spezifischen Antikörper produziert. Sie kommen im Blut und in der extrazellulären Flüssigkeit der Lymphknoten vor und gelangen von hier in die Gewebe und Schleimhäute.

Antikörper können eine Kreuzreaktivität zeigen, bei der ein Antikörper zusätzlich ein anderes Epitop erkennt als das, gegen das er ursprünglich generiert wurde.

Alle Antikörper sind aus 4 Polypeptidketten aufgebaut. Dies sind zwei identische schwere Ketten (heavy chains, H) und zwei identische leichte Ketten (light chains, L), die ein Tetramer bilden, in dem die Ketten kovalent über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die leichten Ketten bestehen jeweils aus einer variablen und einer konstanten Domäne. Die schweren Ketten haben jeweils eine variable und 3 (IgG, IgA) bzw. 4 konstante Domänen (Abb. 1).

Die am Aminoende der Ketten lokalisierten variablen Domänen bilden die Antigenbindungsstelle. Sie bilden zusammen mit dem oberhalb der so genannten hinge Region liegendem Anteil der schweren Ketten das Fab-Fragment, welches mit Hilfe von Papain vom Fc-Fragment abgespalten werden kann.

Papain spaltet oberhalb der Disulfidbrücken beider schwerer Ketten zueinander, so dass man zwei Fab-Fragmente und ein vollständiges Fc-Fragment erhält. Pepsin hingegen spaltet unterhalb der Disulfidbrücken, so dass die hinge Region erhalten bleibt (Abb. 2).

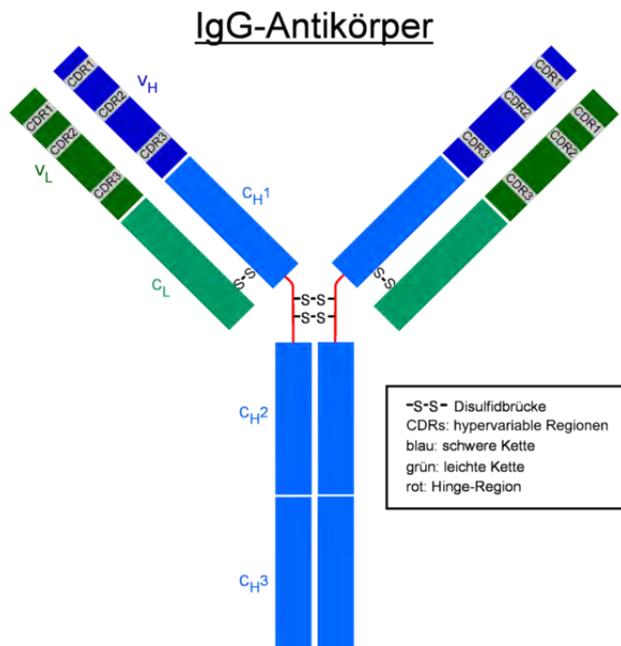


Abb. 1 (Wikipedia): Aufbau eines AK aus zwei schweren und zwei leichten Ketten, verbunden durch Disulfidbrücken.

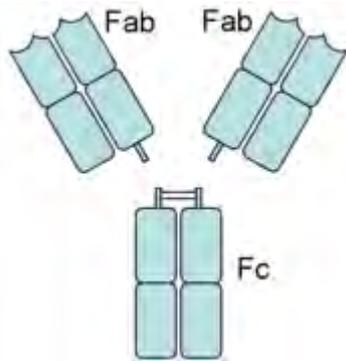


Abb. 2 (Wikipedia): AK bestehend aus 2 Fab- und einem Fc-Fragment

Es gibt 5 verschiedene Isotypen von Immunglobulinen, die anhand von Unterschieden im konstanten Teil der schweren Kette eingeteilt werden. Es wird unterschieden zwischen IgA, IgD, IgE, IgM und IgG. Sie sind auf die Aktivierung unterschiedlicher Immunwirkungsmechanismen spezialisiert.

Man kennt poly- und monoklonale Antikörper. Polyklonale Antikörper werden aus dem Serum gewonnen und aufgereinigt. Verschiedene B-Zellen produzieren diese Antikörper, welche alle gegen dasselbe Protein gerichtet sind, jedoch gegen unterschiedliche Bereiche dieses Proteins. Für experimentelle Zwecke werden polyklonale Antikörper z.B. in Kaninchen hergestellt. Man injiziert dem Tier das Antigen, woraufhin es in einer Immunreaktion Antikörper bildet. Die Immunisierung wird mehrmals wiederholt. Nach

ein paar Wochen kann das polyklonale Antiserum entnommen werden. Es entsteht ein Gemisch mehrerer verschiedener Antikörper, die mit unterschiedlicher Spezifität an das Antigen binden und unterschiedliche Epitope des Antigens erkennen.

Monoklonale Antikörper werden von einem einzigen B-Zellklon produziert und richten sich gegen ein Epitop. Daher sind alle produzierten Antikörper identisch. Bei der Herstellung wird zunächst einer Maus das Antigen injiziert. Es bilden sich B-Lymphozyten, die Antikörper bilden und die sich in der Milz anreichern. Die Milz wird entnommen und die B-Lymphozyten werden isoliert. Diese Zellen werden mit Plasmazellen einer aus einem Plasmozytom gewonnenen Zelllinie fusioniert, wodurch sog. „Hybridomzelllinien“ entstehen. Diese Zellen haben die Eigenschaft, einen bestimmten Antikörper zu produzieren und als Tumorzellen die Fähigkeit zu unbegrenztem Wachstum. Durch mehrfaches Vereinzeln (Klonieren) wird ein Stamm von Zellen gewonnen, der auf eine einzelne Hybridoma-Zelle und somit auf eine einzelne Plasmazelle zurückgeht. Die so erhaltenen Zelllinien können in Kultur unbegrenzt expandiert werden. Der Zellüberstand enthält die identischen Antikörper und kann regelmäßig geerntet werden.

Antikörper finden Anwendung in immunologischen Nachweisverfahren. Eine inzwischen weit verbreitete Methode, die auf Immunreaktion zwischen Antikörper und Antigen beruht, ist der sog. Sandwich- ELISA-Test. Grundlage dieser Technik ist die spezifische Reaktion eines Antigens mit einem festplattengebundenen Antikörper. Nachdem der erste Antikörper an eine feste Phase gebunden wurde, wird die Probe mit dem nachzuweisenden Antigen zugegeben. Der an die Platte gebundene Antikörper bindet daraufhin das Antigen und es entsteht somit ein Immunkomplex.

Zum Nachweis des gebildeten Immunkomplexes werden markierte Antikörper gegen das Antigen eingesetzt. Üblicherweise werden zur Markierung Enzyme (z.B. Meerrettichperoxidase oder alkalische Phosphatase) eingesetzt, die Reaktionen zu chromogenen Reaktionsprodukten katalysieren. Liegt der Antikörper in enzymgekoppelter Form vor, kann ein direkter Nachweis durchgeführt werden. Ist dies nicht der Fall, verwendet man einen sekundären Antikörper, der an die konstante Region der schweren Ketten des zu identifizierenden Antikörpers bindet. Der sekundäre Antikörper ist dann an ein Enzym gekoppelt.

#### **1.4. Entwicklung von Testverfahren zum Nachweis von P-12-LOX mit Hilfe von Antikörpern**

Der Nachweis von P-12-LOX erfolgte bislang immunhistochemisch (Immunfluoreszenz zur Lokalisation in Gewebeschnitten) oder über RT-PCR. Darüber hinaus gibt es die Möglichkeit des chemischen Metabolitennachweises über HPLC, was schwierig und zeitaufwendig ist. Die vorhandenen Nachweismethoden werden bisher nur im Forschungsbereich eingesetzt und ermöglichen keinen routinemäßigen Betrieb. Ein Test zur Routinediagnostik ist zurzeit noch nicht auf dem Markt.

Bisher gibt es noch keine Ansätze für die Entwicklung eines immunologischen Testsystems (ELISA, Durchflusszytometrie) zum Nachweis von P-12-LOX.

#### **1.5. Zielsetzung**

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines ELISAs zum Nachweis von P-12-LOX. Hierzu musste ein spezifisches Antikörperpaar für Bindung und Nachweis von P-12-LOX entwickelt werden. Als Antigen für die Untersuchungen sollte rekombinantes bzw. isoliertes natürliches P-12-LOX eingesetzt werden.

Das Antikörperpaar sollte zum Aufbau eines ELISA für den quantitativen Nachweis von P-12-LOX in Körperflüssigkeiten und Gewebeextrakten herangezogen werden.

Darüber hinaus sollte getestet werden, ob P-12-LOX mittels Durchflusszytometrie in Blutzellen nachgewiesen werden kann.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Antigene

- 12-LOX (4 mg/ml), 5-LOX, 15-LOX-1 (2 mg/ml), 15-LOX-2 (2 mg/ml), r15-LOX (1 mg/ml), 12R-LOX (2,5 mg/ml), eLOX3 (2 mg/ml) (freundlicherweise bereitgestellt von Frau Dr. Ewa-Skrzypczak-Jankun, Associate Professor, University of Toledo)
- Plättchenreiches Plasma gewonnen durch Zentrifugation von Vollblut mit niedriger Drehzahl (10 min, 150 x g)
- Thrombozytenkonzentrat aus der Blutbank in Heidelberg ( $2,0 - 4,5 \times 10^9$  Thrombozyten pro 311 ml)
- Na-Citrat-Plasma, Heparin-Plasma, EDTA-Plasma und Serum von freiwilligen Spendern
- lyophilisiertes Zytosol von Tumorgewebeextrakten (Foundation for Endocrine R & D, University of Nijmegen, Niederlande)

#### 2.1.2. Antikörper

- Kaninchen anti-human P-12-LOX IgG (Artikelnr. 7212, 7,5 mg/ml, American Diagnostica GmbH, Pfungstadt)
- Maus anti-human P-12-LOX mAk (Artikelnr. 7213, 0,47 mg/ml, American Diagnostica GmbH, Pfungstadt)
- Maus anti-human P-12-LOX mAk (Artikelnr. 7225, 0,34 mg/ml, American Diagnostica GmbH, Pfungstadt)
- Maus anti-human P-12-LOX mAk (Artikelnr. 7228, 0,54 mg/ml, American Diagnostica GmbH, Pfungstadt)
- Maus anti-human P-12-LOX mAk, POX-markiert (Artikelnr. 7213-POX, 7228-POX, American Diagnostica GmbH, Pfungstadt)



- Waschpuffer: PBS-Puffer + 0,5 % Tween  
PBS-Puffer
- Blockierungspuffer Liquid Plate Sealer pH 6,5 (Katalognr. 160500, Candor Bioscience GmbH, Weißensberg)
- BSA-Blockierungspuffer (bovine serum albumine): PBS + 0,1 % BSA
- ELISA-Verdünnungspuffer (American Diagnostica GmbH, Pfungstadt)
- HRP-Stabilisierungspuffer (Katalognr. 220500, Candor Bioscience GmbH, Weißensberg)
- TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) (American Diagnostica GmbH, Pfungstadt)
- Citrat-Stopplösung (American Diagnostica GmbH, Pfungstadt)
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Stopplösung (American Diagnostica GmbH, Pfungstadt)

#### 2.1.4. Für den Western Blot verwendetes Material

##### 2.1.4.1. Für den Western Blot verwendete Geräte

- XCell Sure Lock Elektrophorese Zelle, Novex Mini-Zelle (Invitrogen, Carlsbad, USA)
- Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- Horizontale Schwenkplattform (neoLab, Heidelberg)
- Laborwaage (Sartorius, Göttingen)
- Netzgerät (Consort, Turnhout, Belgien)
- Gelladepipettenspitzen (Invitrogen, Carlsbad, USA)
- Pipetboy acu (Integra Biosciences, Fernwald)
- Novex 4-12 % Tris-Glycine Gel 1,5 mm 15 well (Katalognr. EC60385BOX, Invitrogen, Carlsbad, USA)
- Nitrocellulose Blotting Membran (Katalognr. LC2001, Invitrogen, Carlsbad, USA)

#### 2.1.4.2. Für den Western Blot verwendete Reagenzien

- DTT (Katalognr. 197777, Roche, Mannheim)
- Tris Glycine Native Running Buffer (Katalognr. LC2672, Invitrogen, Carlsbad, USA)
- Tris Glycine Native Sample Buffer (Katalognr. LC2673, Invitrogen, Carlsbad, USA)
- SDS-Laufpuffer für SDS-PAGE: 10 x
  - 0,25 M Tris (7,57g)
  - 1,9 M Glycin (35,65 g)
  - 1 % SDS
- SDS-Probenpuffer: 60 µl DTT
  - 390 µl dest. Wasser
  - 150 µl 4 x Sample Buffer
- Tris-Glycine Transferpuffer: Deionisiertes Wasser 760 ml
  - Transferpuffer (Katalognr. LC3675, Invitrogen, Carlsbad, USA) 40 ml
  - Methanol 200 ml
- Molekulargewichtsmarker Kaleidoscope Prestained Standard (Bio-Rad)
- PBS-Waschpuffer: 1x PBS
  - 0,2 % Tween 20
- Ponceau S (Katalognr. 114275, Merck, Darmstadt)
- Blockierungspuffer: 5 % Milchpulver in PBS
- Coomassie-Färbelösung: 100 ml Methanol
  - 100 ml Wasser
  - 250 mg Coomassie R-250
  - 25 ml Essigsäure 100 %
  - Wasser auf 250 ml auffüllen
- Coomassie-Entfärbelösung: 400 ml Methanol
  - 100 ml Essigsäure 100 %
  - Wasser auf 1000 ml auffüllen
- DAB-Puffer: 20 ml 10 mM Tris, pH 7,5
  - 10 mg DAB
  - 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

## 2.1.5. Für die Immunpräzipitation verwendetes Material

### 2.1.5.1. Für die Immunpräzipitation verwendete Geräte

- Rotator (neoLab, Heidelberg)
- Tisch-Zentrifuge (Thermo electron corporation, Waltham, USA)
- Schnellzentrifuge (neoLab, Heidelberg)
- Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg)

### 2.1.5.2. Für die Immunpräzipitation verwendete Reagenzien

- Protein G mit Sepharose 4 fast flow (Katalognr. 17-0618-01, Amersham Biosciences, Uppsala Schweden)
- PBS-Waschpuffer
- Zellysepuffer: 50 mM Tris-HCl pH 8.0  
150 mM NaCl  
1% Triton-x-100
- Protease Inhibitor Cocktail (100 X): PMSF, 5mg (50 µg/ml)  
Aprotinin, 100 µg (1 µg/ml)  
Leupeptin, 100 µg (1 µg/ml)  
Pepstatin, 100 µg (1 µg/ml)  
100 % Ethanol auf 1 ml aufgefüllt

## 2.1.6. Für die Durchflusszytometrie verwendetes Material

### 2.1.6.1. Für die Durchflusszytometrie verwendete Geräte

- Durchflusszytometer Facs Calibur (Becton Dickinson, New York, USA)

### 2.1.6.2. Für die Durchflusszytometrie verwendete Reagenzien

- Albumin Fraktion V  $\geq$  98 % pulv. Bovine Albumin;  $M \approx 69000$  (Katalognr. 8076.3, Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- Saponin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- Formaldehyd (Baker)
- FACS-Puffer:            PBS + 0,1 % BSA
- Fixierlösung:           54  $\mu$ l 37 %iges Formaldehyd  
                              946  $\mu$ l PBS

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Enzyme-linked Immunosorbent Assay

#### 2.2.1.1. Prinzip

ELISA bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren (Assay), das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Mit Hilfe des ELISA können Proteine, Viren, niedermolekulare Verbindungen wie Hormone, Toxine und Pestizide in einer Probe (Blutserum, Milch, Urin etc.) nachgewiesen werden.

Spezifische Antikörper binden an den nachzuweisenden Stoff (Antigen). Antigen oder Antikörper werden zuvor mit einem Enzym markiert. Als Enzym wird in der Regel Meerrettichperoxidase (horseradish Peroxidase (POX)), welche als Substrat ortho-Phenylendiamin oder Tetramethylbenzidin umsetzt, oder Alkaline Phosphatase, welche para-Nitrophenylphosphat umsetzt, verwendet. Das Substrat wird vom Enzym in ein Reaktionsprodukt umgesetzt. Die durch das Enzym katalysierte Reaktion dient als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens. Die Signalstärke ist eine Funktion der Antigenkonzentration, so dass ELISA für quantitative Nachweise verwendet werden kann.

Prinzipiell gibt es drei Hauptvarianten von ELISA. Antibody capture assay (Nachweis von Antikörpern mit bekanntem Antigen), antigen capture assay (Nachweis eines Antigens mit einem bekannten Antikörper) und sandwich assay (Nachweis eines Antigens mit zwei bekannten Antikörpern). Der Vorteil eines sandwich assay gegenüber einem antigen capture assay ist die erhöhte Sensitivität des Tests und durch die Beteiligung zweier Antikörper, welche an das nachzuweisende Antigen binden, eine hohe Spezifität.

Bei dieser Arbeit wurde ein Sandwich-ELISA entwickelt, zum Nachweis von P-12-LOX. Bei dieser Technik verwendet man zwei Antikörper, die beide spezifisch an das nachzuweisende Antigen (P-12-LOX) binden. Hierbei ist es wichtig, dass beide

Antikörper an unterschiedlichen Stellen an das nachzuweisende Enzym binden, da sie sich sonst gegenseitig sterisch behindern würden.

#### 2.2.1.2. Durchführung

100 µl des Fänger- bzw. Primär-Antikörpers wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml in Carbonatbeschichtungspuffer in die Vertiefung einer Flachbodenmikrotiterplatte aufgebracht. Die Platten wurden eine Stunde inkubiert und anschließend viermal mit PBS im Falle von Liquid Plate Sealer Blockierungspuffer oder mit PBS mit 0,5 % Tween bei Verwendung von BSA-Blockierungspuffer gewaschen. Dann wurden 100 µl eines Blockierungspuffers pro Vertiefung zugegeben, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Nach einer Stunde auf dem Schüttler, wurde der Blockierungspuffer ausgeschlagen. 100 µl der Probe mit dem nachzuweisenden Antigen wurden in die Vertiefungen pipettiert und eine Stunde lang auf dem Schüttler inkubiert. Während dieser Zeit kam es zur Bindung des an die Platte gebundenen Antikörpers an das in der Probe vorhandene Antigen. Es folgte viermaliges Waschen zum Entfernen ungebundener Bestandteile der Probe. Im nächsten Schritt wurden 100 µl POX-markierter Detektions-Antikörper in der Konzentration 0,25 µg/ml pro Vertiefung zugegeben. Wiederum wurde die Platte eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert, um die Bindung des Antikörpers an das Antigen zu erlauben. Durch erneutes viermaliges Waschen der Platte wurde der überschüssige zweite Antikörper entfernt und 100 µl TMB Substrat pro Vertiefung zugegeben. Dieses wurde daraufhin vom Enzym zu einem Reaktionsprodukt umgesetzt, dessen Nachweis durch Farbumschlag von blau nach gelb erfolgte. Nach maximal zwanzigminütiger Inkubation im Dunkeln wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl/Vertiefung Citrat- bzw. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - Stopplösung abgestoppt. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm im ELISA-Reader bestimmt.

## 2.2.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

### 2.2.2.1. Prinzip

Bei der Polyacrylamidgelelektrophorese wird ein Proteingemisch mit Hilfe einer Gel-Elektrophoresetechnik in einer Trägermatrix entsprechend ihrer Molekularmasse in Proteinbanden aufgetrennt. Das Polyacrylamidgel wirkt als Molekularsieb, indem es die Wanderung von Proteinen annähernd proportional zu ihrer Molekülmasse verlangsamt. Das bedeutet, dass kleinere Proteine schneller wandern als große.

Bei dieser Arbeit wurde sowohl eine Nativ-Gelelektrophorese als auch eine SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophorese) durchgeführt.

Bei der Nativ-Gelelektrophorese geht es darum, die physiologischen Eigenschaften der aufzutrennenden Proteine zu erhalten. Es werden native, also gefaltete Proteine im elektrischen Feld aufgetrennt.

Bei SDS-PAGE kommt SDS (Natriumdodecylsulfat) zum Einsatz. Dies führt dazu, dass die Proteine denaturieren. Außerdem entstehen durch die negative Ladung des SDS negativ geladene SDS-Protein-Komplexe mit einem konstanten Verhältnis von Ladung zu Masse, da die Eigenladung der Proteine überdeckt ist.

### 2.2.2.2. Durchführung

Die Kammern der Gelelektrophoresezelle wurden zuerst mit Laufpuffer befüllt. Als Laufgel wurde ein Novex-Fertigel mit 15 Probenvertiefungen verwendet. Die Verdünnung der verwendeten Proben erfolgte mit Probenpuffer, der 10 mM DTT (Dithiothreitol) enthielt. Der Kunststoffkamm wurde aus dem Laufgel entfernt. Die hierdurch entstandenen Taschen dienten der Aufnahme der verdünnten Proben. Jeweils 12 µl der Proben wurden in die einzelnen Kammern gegeben und 3 µl des Markers. Anschließend wurde eine 125 Volt starke Spannung für 90 – 120 Minuten angelegt, bis die Proteine in das Gel eingewandert waren.

### 2.2.3. Western Blot

#### 2.2.3.1. Prinzip

Der Western Blot ist eine Methode, bei der elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Trenngel auf einen geeigneten Träger, z.B. Nitrocellulose, übertragen werden. Dadurch, dass ein senkrecht zum Polyacrylamidgel gerichtetes elektrisches Feld angelegt wird, wandern die Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran. Sie haften aufgrund hydrophober Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken an der Membranoberfläche. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten.

Die Proteine können anschließend über unterschiedliche Reaktionen, wie beispielsweise durch die Bindung spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Ein spezifischer Antikörper bindet an sein spezifisches Epitop der aufgetrennten Proteinmischung. An die Fc-Region des primären Antikörpers bindet ein enzymmarkierter Antikörper, über den der Nachweis erfolgt.

#### 2.2.3.2. Durchführung

Nach beendeter Gelelektrophorese wurde das Gel für 30 Minuten in Transferpuffer gelegt, ebenso zwei Minifilterpapiere sowie die Nitrocellulosemembran. Der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran erfolgte in einer Elektrophoresetransferzelle. Dabei wurde die Nitrocellulosemembran zwischen zwei Lagen von Filtermembranen auf der Anodenplatte gelagert. Das Gel wurde vorsichtig luftblasenfrei auf die Membran gelegt. Nachdem die Kathodenplatte aufgesteckt wurde, erfolgte der Transfer bei 15 Volt für 30 Minuten.

Der Erfolg des Transfers wurde durch Anfärben der auf die Nitrocellulose transferierten Proteine mit Ponceau S Lösung kontrolliert. Dafür wurde die Nitrocellulose ein bis drei Minuten in Ponceau S gelegt und anschließend mit destilliertem Wasser teilweise entfärbt, bis einzelne rote Proteinbanden sichtbar wurden.

Zur Durchführung der Immunfärbung wurden unspezifische Bindungsstellen auf der

Nitrocellulose zunächst durch 30 minütige Inkubation in Blockierungspuffer blockiert. Als Blockierungspuffer diente 5 % - ige PBS-Milchpulver-Lösung.

Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt. Dies ist ein blauer Proteinfarbstoff, welcher die Proteinbanden sichtbar machte. Über Nacht wurde das Gel durch Einlegen in Coomassie-Entfärbelösung wieder teilweise entfärbt.

Die Proteinbanden konnten nun auf der Membran mit Hilfe spezifischer Antikörper identifiziert werden. Dazu wurde der Antikörper auf eine Konzentration von 1 µg/ml verdünnt. Diese Antikörper-Verdünnung wurde hinzu gegeben und dies über Nacht bei 4 °C inkubiert. Zur Entfernung von ungebundenem Antikörper wurde die Membran dreimal mit PBS + 0,2 % Tween und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der POX-markierte Sekundär-Antikörper (Ziege-anti-Maus IgG bzw. Ziege-anti-Kaninchen IgG) 1:10000 verdünnt und auf die Membran gegeben. Nach zweistündiger Inkubation erfolgte erneutes dreimaliges Waschen mit PBS + 0,2 % Tween und einmaliges Waschen mit PBS. Zur Sichtbarmachung der Proteinregionen, an denen Antikörper gebunden haben, wurde das Substrat Diaminobenzidin zugegeben. Nach wenigen Minuten konnte die Reaktion mit Wasser abgestoppt werden.

## 2.2.4. Immunpräzipitation

### 2.2.4.1. Prinzip

Die Immunpräzipitation ist eine immunologische Methode, bei der mittels eines Antikörpers ein Antigen aus einer Lösung ausgefällt („präzipitiert“) wird. Hierzu kann Protein G-Sepharose verwendet werden. Protein G (ein Bestandteil der Zellwand von bestimmten Streptokokken-Stämmen) bindet mit hoher Spezifität an die Fc-Region der Immunglobuline. Dadurch, dass Protein G an Sepharose gekoppelt wird, können die gebundenen Komplexe sedimentiert/präzipitiert werden (Abb.4).

Das präzipitierte Protein und seine Interaktionspartner können im Anschluss mit unterschiedlichen Methoden nachgewiesen werden, beispielsweise mit einem Western Blot.

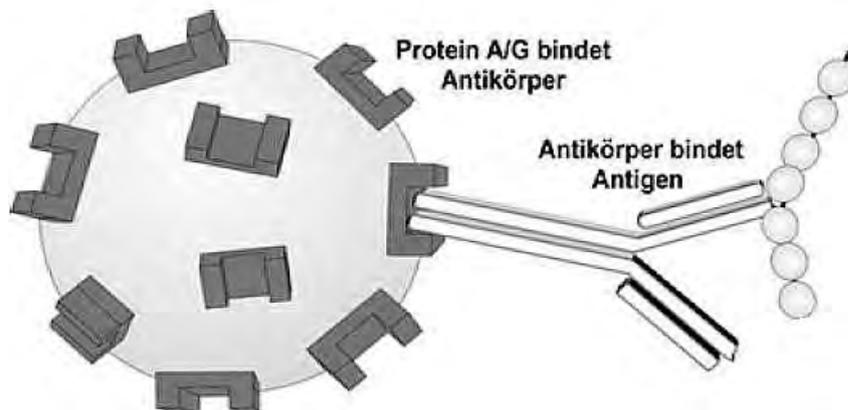


Abb.4 (Wikipedia). Schema einer Immunpräzipitation. Das Lysat wird mit einem spezifischen AK inkubiert. Dieser AK bindet an das Protein und wird über Protein G-Beads präzipitiert.

#### 2.2.4.2. Durchführung

Zu Beginn wurde ein Zelllysate hergestellt. Dafür wurde plättchenreiches Plasma verwendet, welches durch Zentrifugation von Vollblut mit niedriger Drehzahl gewonnen wurde.

Die Thrombozyten wurden aus 1 ml Plasma bei 13000 g für 10 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Plättchen wurden zweimal mit jeweils 2 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml Zellysepuffer mit 1 X Protease Inhibitor Cocktail hinzugegeben. Nach dreimaligem Einfrieren mit anschließendem Wiederauftauen wurde das Zelllysate 10 min bei 13000 g abzentrifugiert und der Überstand wieder verworfen.

Es folgte die eigentliche Immunpräzipitation. Die lysierten Thrombozyten wurden mit den spezifischen Antikörpern und anschließend mit Protein G-Sepharose inkubiert.

Dafür wurden 10 µg Antikörper mit dem Zelllysate für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Währenddessen wurden 500 µl Protein G mit Sepharose zweimalig mit Zellysepuffer gewaschen. Dafür wurde das Gemisch jeweils bei 13000 g 2 min zentrifugiert. 100 µl des gewaschenen Protein G wurde zu dem zuvor mit Antikörper eine Stunde inkubierten Zelllysate gegeben. Dieses Gemisch verblieb für eine Stunde bei 4 °C auf einem Schüttler. Die Isolierung der nun entstandenen Komplexe erfolgte über Abzentrifugation bei 13000 g für 2 min sowie dreimaliges Waschen mit jeweils 500 µl Zellysepuffer, um unspezifische Proteine zu entfernen. Nachdem der Überstand entfernt wurde, kamen 12,5 µl 1 x Laemmli Proben Puffer (Ladepuffer) zum Sediment. Dies wurde für fünf Minuten bei 90 °C erhitzt und bei 13000 g für 2 min abzentrifugiert. Die Proteine wurden dadurch denaturiert und von den Beads gelöst. Der Nachweis von P-12-LOX erfolgte über eine SDS-PAGE und Western Blot.

## 2.2.5. Durchflusszytometrie

### 2.2.5.1. Prinzip

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht darauf, dass verschiedene mikroskopisch kleine Partikel (Zellen, deren Fragmente) anhand ihrer Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaften und intrazellulärer Zusammensetzung unterschieden werden können. Zellen können auch mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markiert werden. Dies kann durch direkt am Farbstoff gebundene spezifische Antikörper erfolgen oder indirekt, indem markierte Anti-Immunglobuline verwendet werden, die an zellgebundene Antikörper binden.

Im Durchflusszytometer wird die Fluoreszenzintensität der einzelnen Zellen bestimmt, welche mit der Dichte der jeweils mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbten Oberflächenstruktur korreliert. Das Prinzip der Untersuchung beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert. Die Zellen werden einzeln durch hydrodynamische Fokussierung durch einen gebündelten Laserstrahl in einer Durchflusszelle geführt. Die emittierten Photonen sind proportional zur Menge der gebundenen Antikörper.

Die Zellen streuen einen Teil des Lichts, welches mittels Detektoren (Photomultiplier) nachgewiesen wird. Die Menge des gestreuten Lichts korreliert mit der Größe der Zelle und mit ihrer Komplexität. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = *Forward Scatter*) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und korreliert mit der Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = *Sidewards Scatter*) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, die von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und der Menge der Vesikel in einer Zelle beeinflusst wird. Mit diesen beiden Parametern können die Zellen des Blutes grob unterschieden werden.

#### 2.2.5.2. Durchführung

Für die Färbung wurde Thrombozytenkonzentrat ( $10^6$  Thrombozyten/ $\mu\text{l}$ ) verwendet. Pro Färbeansatz wurden  $5 \times 10^6$  Thrombozyten eingesetzt. Zunächst wurden die Thrombozyten mit 1 % Formaldehyd fixiert. Dazu wird der Färbeansatz in 100  $\mu\text{l}$  PBS aufgenommen und mit 100  $\mu\text{l}$  2 %iger frisch angesetzter Formaldehydlösung gründlich durchmischt. Die Fixierung wurde nach 10 min durch Zugabe von 800  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer beendet. Die Zellen wurden 5 Minuten bei 2500 g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Thrombozyten mit den verschiedenen Antikörpern inkubiert. Um intrazelluläre Proteine färben zu können, muss in dem Färbeansatz ein Detergenz (z.B. Saponin) enthalten sein, das die Zellmembran permeabilisiert und das Zellinnere für die Antikörper zugänglich macht. Für diesen Zweck wurden die Antikörper mit 0,25 % iger Saponin-PBS-Lösung auf eine Konzentration von 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  verdünnt. Es wurde immer ein Ansatz ohne Antikörper, eine Isotypkontrolle sowie eine Positivkontrolle (CD41a, Thrombozyten-spezifischer Marker) mitgeführt. Nach dreißigminütiger Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von PE-markiertem anti-Maus-Antikörper bzw. FITC-markiertem anti-Kaninchen-Antikörper in einer Konzentration von 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Nach einer erneuten dreißigminütigen Inkubationszeit im Dunkeln konnten die Proben im Durchflusszytometer (FacsCalibur, Becton Dickinson) gemessen werden.

Die Instrumenteneinstellung wurde so gewählt, dass die Thrombozyten im Dot-Plot („Forward-Scatter“ versus „Side-Scatter“) als klare Zellpopulation erkennbar waren. Diese Zellpopulation wurde mit einem Analysefenster eingegrenzt. Alle Proben wurden mit den identischen Messeinstellungen für den „Forward-Scatter“ und „Side-Scatter“ gemessen. Von den im Analysefenster eingegrenzten Thrombozyten wird ein Fluoreszenz 1 (FITC) bzw. Fluoreszenz 2 (PE) Histogramm erstellt, bei dem die Stärke des Fluoreszenzsignals gegen die Anzahl der Ereignisse aufgetragen wird.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Charakterisierung der Antikörper

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten poly- und monoklonalen Antikörper gegen P-12-LOX wurden zunächst hinsichtlich ihrer Spezifität charakterisiert.

Hierzu wurden die Antikörper auf ihre Reaktivität mit unterschiedlichen LOX-Typen getestet.

Es wurde eine Nativ-Gelelektrophorese und anschließend ein Western Blot mit verschiedenen LOX-Typen durchgeführt. Zum Einsatz kamen P-12-LOX, 5-LOX, 15-LOX-1, 15-LOX-2, r15-LOX, eLOX und 12R-LOX. 500 ng der verschiedenen LOX-Proteine wurden auf jede Spur eines Polyacrylamidgels aufgetragen. Die Trennung erfolgte unter reduzierenden und nicht-denaturierenden Bedingungen. Die aufgetrennten Proteine wurden auf die Nitrocellulosemembran transferiert und jeweils mit dem polyklonalen anti-P-12-LOX IgG (7212) und den monoklonalen Antikörpern 7213, 7225 und 7228 zur Reaktion gebracht. Als sekundärer Markierungsantikörper diente POX-markiertes Ziege-anti-Maus IgG bzw. POX-markiertes Ziege-anti-Kaninchen IgG.

Wie in Abb. 5 ersichtlich, fand sich eine positive Reaktion nur bei P-12-LOX. 7212 IgG zeigte die deutlichste Reaktion, gefolgt von dem monoklonalen Antikörper 7225. Die Bindung der Antikörper an die P-12-LOX erfolgte im Größenbereich von 132 kDa. Es fand sich keine Kreuzreaktivität mit den übrigen LOX-Formen.

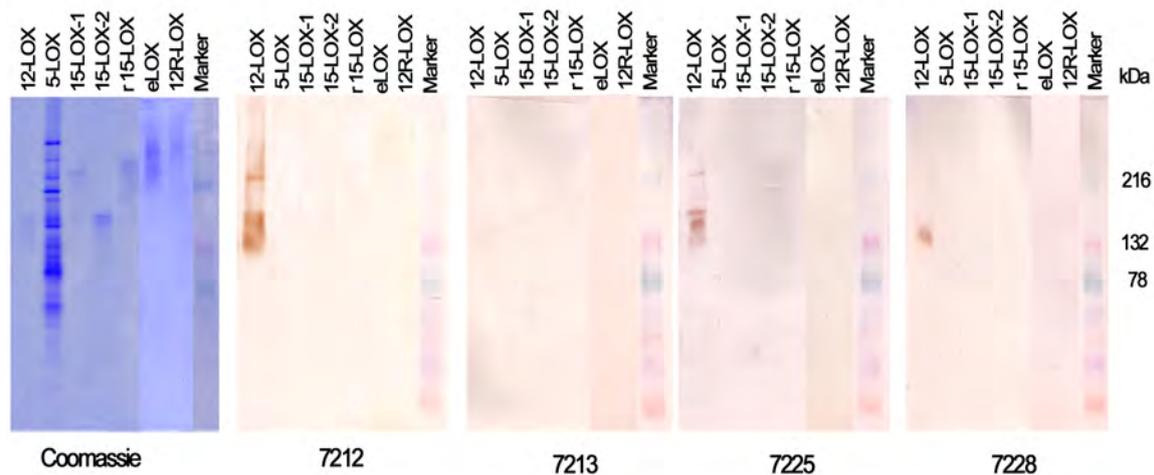


Abb. 5. Nativ-Gelelektrophorese und anschließender Western Blot mit verschiedenen LOX-Typen zur Testung der AK. Der Nachweis erfolgte mit 7212 IgG, 7213 mAb, 7225 mAb und 7228 mAb. Als Sekundär-AK diente POX-markiertes Ziege-anti-Maus IgG bzw. Ziege-anti-Kaninchen IgG. P-12-LOX wurde durch 7212 IgG, 7225 mAb und 7228 mAb im Größenbereich von 132 kDa nachgewiesen. 7213 mAb zeigte keine positive Reaktion.

### 3.2. Entwicklung des ELISA-Testsystems

#### 3.2.1. Antikörperkombinationen

Um zu ermitteln, welche der Antikörper sich für einen ELISA eignen, wurden verschiedene Antikörperkombinationen getestet. Beschichtet wurde mit dem polyklonalen Antikörper 7212 und den monoklonalen Antikörpern 7213, 7225 bzw. 7228. Als nachzuweisendes Antigen wurde rekombinante P-12-LOX eingesetzt. Detektiert wurde mit den peroxidase-markierten monoklonalen Antikörpern 7213 bzw. 7228.

Abb. 6 zeigt, dass die Kombination aus Beschichtung mit dem polyklonalen Antikörper 7212 und Detektion mit dem monoklonalen Antikörper 7213 das stärkste Signal lieferte. Das zweitstärkste Signal wurde bei der Kombination der monoklonalen Antikörper 7213 und 7228 als Detektor erzielt.

Alle folgenden Untersuchungen wurden mit der Antikörperkombination 7212 IgG mit 7213 mAb durchgeführt.

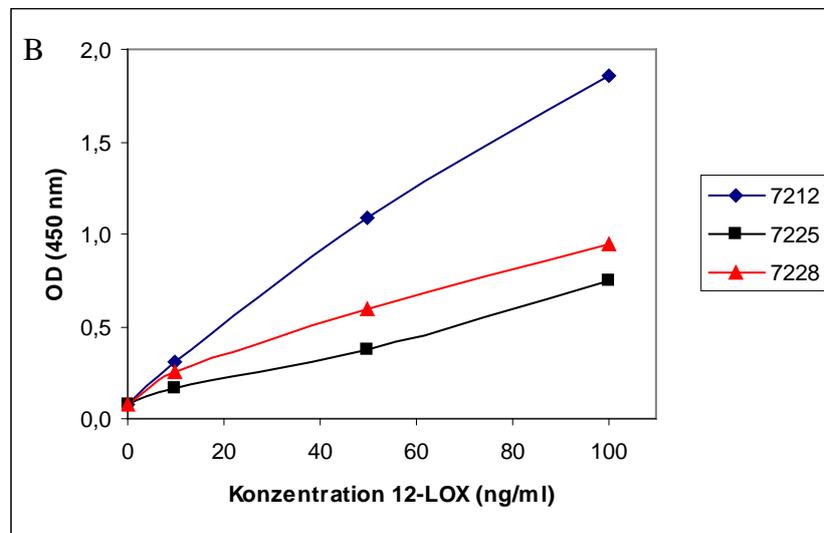
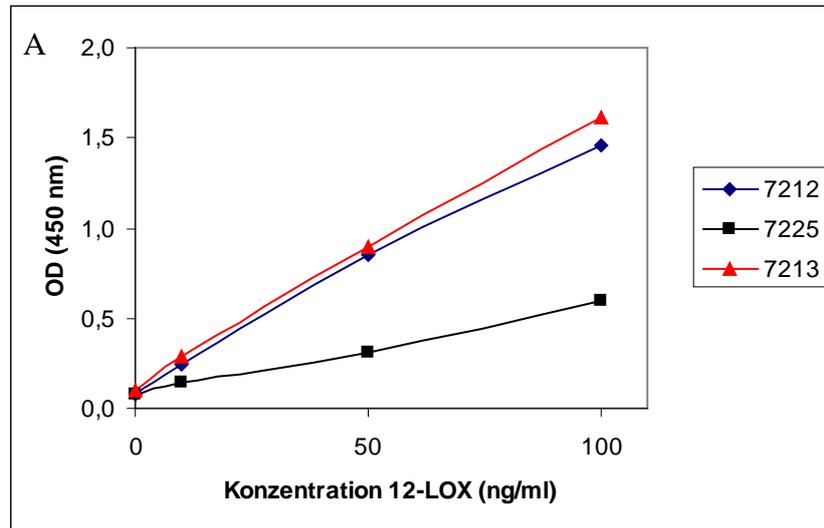


Abb. 6. Testung verschiedener AK-Kombinationen: Beschichtung der Platte mit drei verschiedenen Primär-AK und Nachweis mit 7228-POX mAb (Abb. A) bzw. 7213-POX mAb (Abb. B). Als nachzuweisendes Antigen wurde P-12-LOX eingesetzt. Die höchste OD wurde bei Kombination von 7213 mAb mit 7228-POX mAb bzw. 7212 IgG mit 7213-POX mAb erreicht.

### 3.2.2. Messbereich, Sensitivität und Präzision

In einem Konzentrationsbereich zwischen 3,125 ng/ml und 100 ng/ml bestand eine lineare Beziehung zwischen Antigennachweis und –konzentration, so dass in diesem Bereich die Standardkurve erstellt werden konnte.

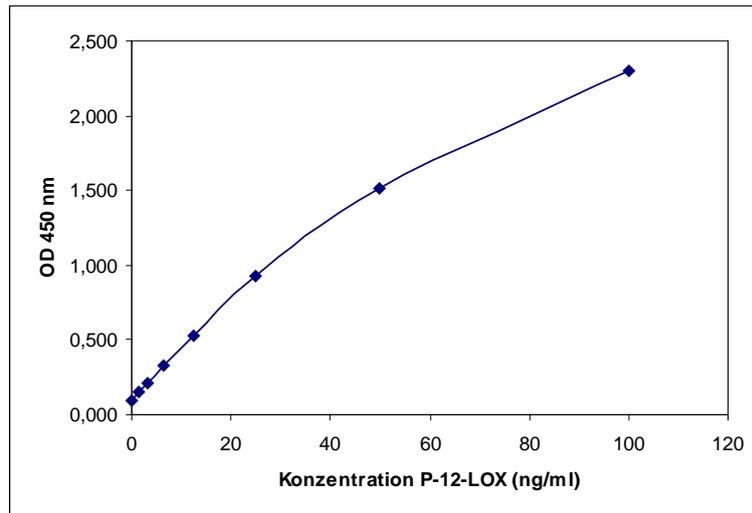


Abb. 7. Standardkurve, welche im Bereich einer P-12-LOX-Konzentration von 3,125 ng/ml bis 100 ng/mg gemessen wurde. Beschichtet wurde die Platte mit 7212 IgG und detektiert wurde mit 7213-POX mAb.

Als Maß für die Sensitivität des Enzym-Immuntests wurde die sog. „untere Nachweisgrenze“ ermittelt. Diese wird definitionsgemäß als dreifache Standardabweichung über dem Mittelwert des Leerwertes (Testansatz ohne Antigen) angegeben. Für die Untersuchung wurde der Mittelwert aus 8 Leerwerten herangezogen. Im Falle rekombinanter P-12-LOX ergab sich eine untere Nachweisgrenze von 0,6 ng P-12-LOX/ml. Niedrigere Konzentrationen konnten nicht mehr eindeutig vom „Grundrauschen“ der Negativkontrolle abgegrenzt werden.

Anschließend wurden verschiedene Behandlungsverfahren der Mikrotiterplatte verglichen. Dafür wurden frisch beschichtete und durch Zentrifugation getrocknete Mikrotiterplatten sowie zwei unterschiedliche Blockierungspuffer (Liquid Plate Sealer und BSA-Blockierungspuffer) verwendet. In Abb. 8 ist zu sehen, dass das gemessene Signal bei Verwendung getrockneter Platten geringgradig niedriger war als bei frisch beschichteten Platten, während die Blockierungspuffer keinen Einfluss erkennen ließen. Alle weiteren Versuche wurden mit Liquid Plate Sealer als Blockierungspuffer durchgeführt.

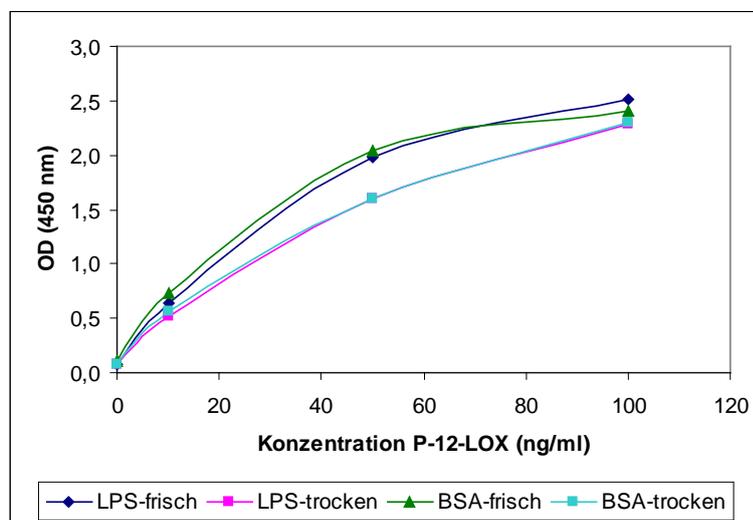


Abb. 8. Vergleich verschiedene Plattenbeschichtungen: Mit 7212 IgG beschichtete Platte, anschließend mit 7213 mAb detektiert. Mikrotiterplatten getrocknet und frisch im Vergleich; LPS und BSA-Blockierungspuffer im Vergleich; getrocknete Platten führen zu einer niedrigeren OD. Zwischen der OD bei verschiedenen Blockierungspuffern war kein Unterschied messbar.

Es wurde ein ELISA mit zwei unterschiedlichen Substraten bzw. Stopplösungen durchgeführt. Es kamen zwei TMB-Lösungen (Tetramethylbenzidin) von zwei unterschiedlichen Herstellern (American Diagnostica und Virotech) zum Einsatz, wobei einmal mit Citrat-Stopplösung abgestoppt wurde und einmal mit  $H_2SO_4$ . Bei der Kombination aus TMB von der Firma American Diagnostica mit  $H_2SO_4$  Stopplösung bildete sich bei hoher OD ein Präzipitat.

### 3.2.3. Reproduzierbarkeit des ELISAs: Intra- und Inter-Assay Variabilität

Um die sog. „Intra-Assay Variabilität“ zu untersuchen, wurde eine Methode zur direkten Abschätzung der Testpräzision benutzt. Hierfür wurden drei verschiedene P-12-LOX-Konzentrationen (100 ng/ml, 25 ng/ml und 6,25 ng/ml) jeweils 8 mal gemessen und der sich daraus ergebende Variationskoeffizient errechnet. Ein Test besitzt per Definition eine ausreichende Genauigkeit in Konzentrationsbereichen, bei denen der Variationskoeffizient unter 10% liegt. Dies wurde bei allen verwendeten Konzentrationen erreicht (Tab.1.).

Mit der Bestimmung der Reproduzierbarkeit oder „Inter-Assay Variabilität“ des Testsystems werden Schwankungen der Messergebnisse bei wiederholten Testungen konstanter Antigenkonzentrationen an unterschiedlichen Tagen wiedergegeben. Hierfür wurde eine in Bezug auf den Messbereich der Standardkurve niedrige (6,25 ng/ml), mittlere (25 ng /ml) und hohe (100 ng/ml) Antigenkonzentration an 5 verschiedenen Tagen gemessen. Die so erhaltenen Messdaten wurden zur Ermittlung des Variationskoeffizienten herangezogen. Eine hinreichende Genauigkeit liegt bei Antigenkonzentrationen vor, deren Variationskoeffizient bei Mehrfachbestimmungen unter 10 % liegt. Dies wurde, wie aus Tab. 1 ersichtlich, bei allen Ansätzen erreicht.

Konzentration P-12-LOX 100 ng/ml Beschichtung <b>IgG 7212</b> , Detektor 7213-POX mAb					
Tag	1	2	3	4	5
Mittelwert [n=8]	1,599	1,588	1,796	1,532	1,540
Standardabweichung	0,081	0,048	0,035	0,052	0,070
Variationskoeffizient [%]	5,0	3,0	2,0	3,4	4,5

Konzentration P-12-LOX 25 ng/ml Beschichtung <b>IgG 7212</b> , Detektor 7213-POX mAb					
Tag	1	2	3	4	5
Mittelwert [n=8]	0,644	0,623	0,767	0,688	0,639
Standardabweichung	0,020	0,030	0,030	0,025	0,035
Variationskoeffizient [%]	3,1	4,7	3,9	3,7	5,4

Konzentration P-12-LOX 6,25 ng/ml Beschichtung <b>IgG 7212</b> , Detektor 7213-POX mAb					
Tag	1	2	3	4	5
Mittelwert [n=8]	0,219	0,221	0,292	0,249	0,240
Standardabweichung	0,010	0,010	0,011	0,007	0,013
Variationskoeffizient [%]	4,6	4,7	3,7	2,9	5,6

Tab.1. Intra- und Interassayvariabilität wurde an fünf aufeinander folgenden Tagen mit drei verschiedenen Konzentrationen bestimmt. Hinreichende Genauigkeit der Bestimmung von P-12-LOX wird bei einem Variationskoeffizient unter 10 % erreicht. Dies ist in allen Messungen der Fall.

### 3.2.4. Spezifität des ELISAs

Zur Überprüfung der Spezifität wurde ein ELISA mit verschiedenen LOX-Typen durchgeführt. Dafür wurden mit dem polyklonalen Antikörper 7212 beschichtete Platten verwendet und mit dem monoklonalen Antikörper 7213 nachgewiesen. Die verschiedenen LOX-Typen wurden in den Konzentrationen 100 ng/ml, 50 ng/ml, 10 ng/ml und 2 ng/ml auf die Platten aufgetragen. Abb.9 zeigt, dass die verwendeten Antikörper nur mit P-12-LOX reagierten, und dass die OD bei anderen LOX-Typen im Bereich des Leerwertes lag.

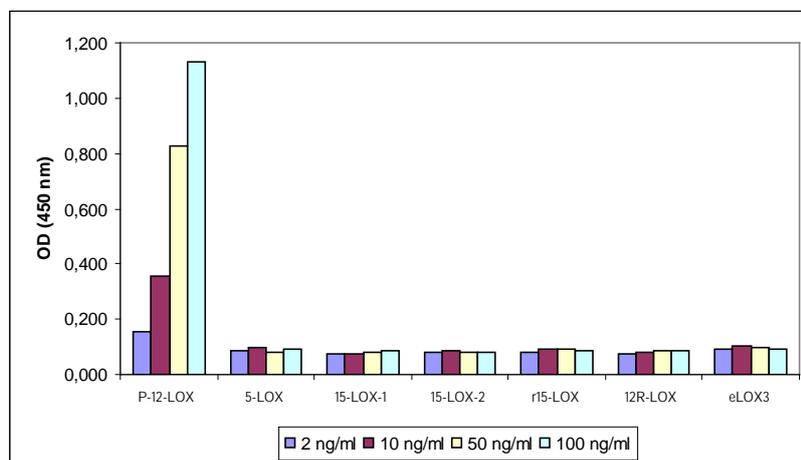


Abb. 9. Testung der Spezifität des ELISAs: Es wurde ein ELISA mit verschiedenen LOX-Typen in vier unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. Die Mikrotiterplatte wurde mit 7212 IgG beschichtet. Nachgewiesen wurde mit 7213-POX mAb. Deutlich positive Reaktion bei P-12-LOX, keine Kreuzreaktivität der Antikörper mit anderen LOX-Typen.

### 3.2.5. Stabilität der Platten und der LOX-Vorverdünnungen

Es wurde getestet, wie stabil mit Antikörpern beschichtete Flachbodenmikrotiterplatten bei der Lagerung sind. Dafür wurden Platten mit dem polyklonalen Antikörper 7212 beschichtet und eine Woche bei 4°C und 37°C gelagert. Anschließend wurde eine Platte mit dem Antikörper frisch beschichtet. Daraufhin wurde sowohl mit den gelagerten Platten als auch mit der frisch beschichteten Platte ein ELISA durchgeführt. Wie in Abb.10 ersichtlich, war kein deutlicher Unterschied der Signale zwischen den unterschiedlich gelagerten Platten feststellbar.

Mit Antikörpern beschichtete Flachbodenmikrotiterplatten können demnach im Kühlschrank und auch bei höheren Temperaturen bis mindestens 37°C stabil gelagert werden.

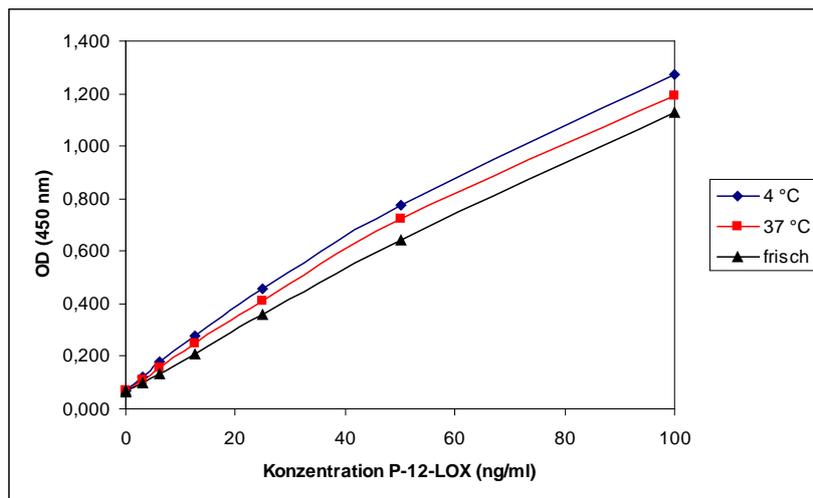


Abb.10. Im Stabilitätstest wurden mit 7212 IgG beschichtete Platten eine Woche bei 4 °C und 37 °C gelagert und anschließend P-12-LOX in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Platten aufgebracht. Der Nachweis wurde mit 7213-POX mAb geführt. Es zeigten sich keine erniedrigten Werte der gelagerten Platten gegenüber den frisch beschichteten Platten.

### 3.2.6. Stabilität des P-12-LOX Standard

Um die Stabilität von LOX-Vorverdünnungen bei Lagerung in verschiedenen Puffern zu testen, wurden vier verschiedene Vorverdünnungen (100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml und 0,1 µg/ml) von P-12-LOX in normalem Assaypuffer und in HRP-Stabilisierungspuffer angefertigt. Diese wurden eine Woche im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Zusätzlich wurde zum Vergleich noch eine Verdünnung von P-12-LOX frisch angesetzt. Alle Vorverdünnungen wurden anschließend auf 100 ng/ml verdünnt.

Es zeigte sich kein Unterschied in den Signalen zwischen den verschiedenen Lagerungsmethoden und auch kein Unterschied zwischen gelagerten Vorverdünnungen und einer frisch angesetzten Verdünnung. Daraus lässt sich schließen, dass angefertigte Vorverdünnungen von LOX bei der Lagerung in ELISA-Verdünnungspuffer und HRP-Stabilisierungspuffer für mindestens eine Woche stabil sind.

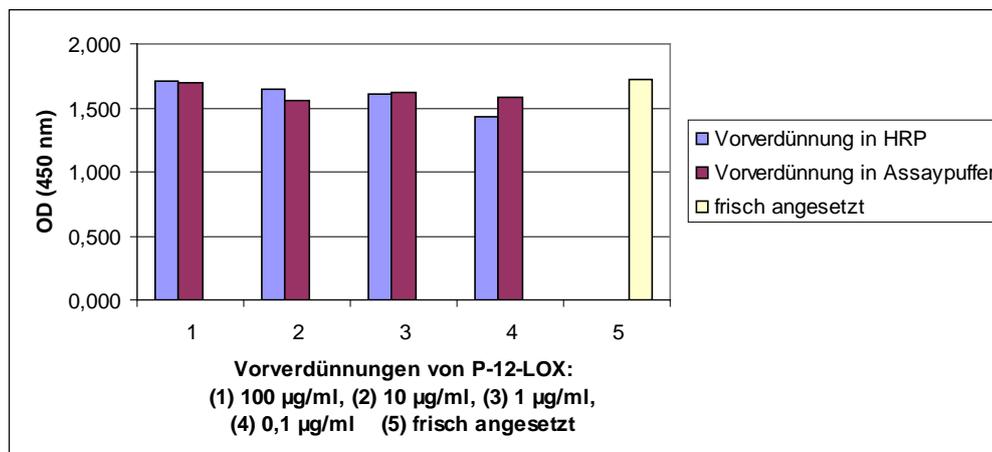


Abb.11. Anfertigung von vier verschiedenen Vorverdünnungen von P-12-LOX in HRP und Assaypuffer. Nach einer Woche Lagerung bei 4 °C wurden alle Vorverdünnungen auf 100 ng/ml verdünnt und zusätzlich eine frische Verdünnung angesetzt. Im ELISA wurden diese Verdünnungen mit 7212 IgG beschichteten Platten gemessen. Detektiert wurde mit 7213 mAb. Es wurde keine Erniedrigung in der Signalstärke festgestellt.

### 3.2.7. Wiederfindung der P-12-LOX

Um zu klären, welchen Einfluss die Probenmatrix Plasma auf den Antigennachweis nimmt, wurden Plasmaproben, in denen mit Hilfe des ELISAs keine P-12-LOX nachweisbar war, verwendet. Dies geschah in der Absicht fortlaufende Verdünnungen von P-12-LOX in Plasmalösung herzustellen, anstatt wie sonst in Verdünnungspuffer der Assays. Aus Abb. 12 geht hervor, dass nur eine geringe Abnahme von 0,2 OD in der Signalstärke vorliegt. Die Extinktion nahm bei diesem Versuch dementsprechend um 13 % ab. Die Probenmatrix hatte darüber hinaus keinen Einfluss auf die Linearität der Standardkurve. Das nicht beeinflusste Linearitätsverhalten der Standardkurve erlaubt gegebenenfalls eine Korrektur der veränderten Extinktionswerte durch einen entsprechenden Korrekturfaktor. Mit dessen Hilfe könnten dann die durch die Probenmatrix Plasma beeinflussten Messdaten an die tatsächliche P-12-LOX-Konzentration angepasst werden.

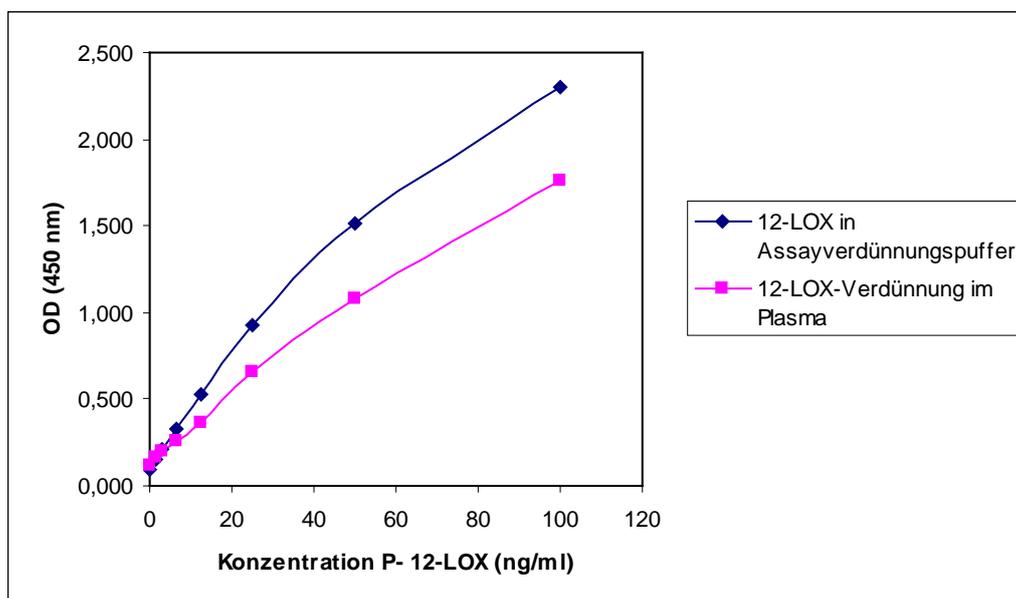


Abb. 12. Einfluss der Probenmatrix Plasma auf den Nachweis von P-12-LOX: P-12-LOX-Verdünnung in Assaypuffer verglichen mit P-12-LOX-Verdünnung in Plasma. Es zeigte sich eine Abnahme der Extinktion um 13 % bei der Verdünnung in Plasma. Die Linearität der Standardkurven wurde gewahrt.

### 3.2.8. Messung von plättchenfreiem Plasma (PFP) und plättchenreichem Plasma (PRP)

Es wurde ein ELISA mit plättchenfreien Plasmaproben (PFP) von Normalpersonen in der Verdünnung 1:100 durchgeführt. In diesen Proben konnte P-12-LOX nicht eindeutig nachgewiesen werden (Abb.13).

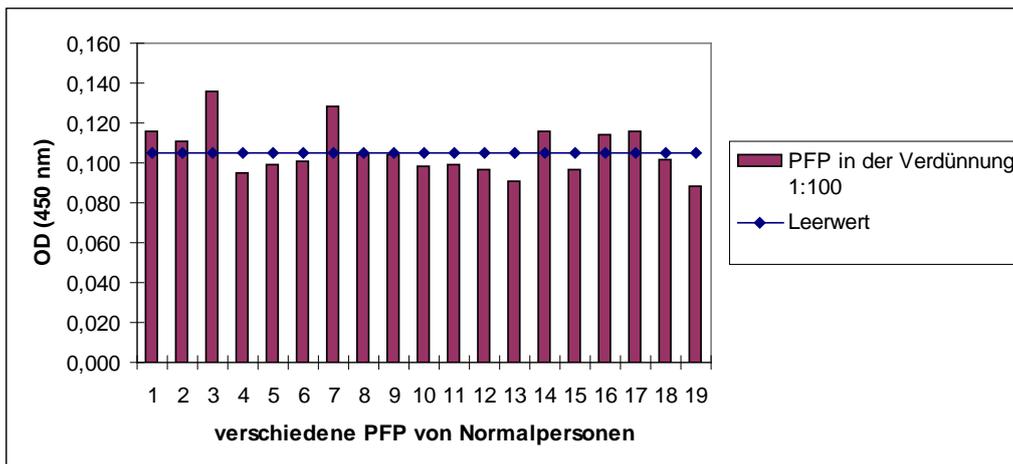


Abb. 13. PFP von Normalpersonen wurde in der Verdünnung 1:100 im ELISA getestet. Es konnte kein deutliches Signal gemessen werden.

Abb.14 zeigt einen ELISA mit plättchenreichem Plasma (PRP), welches in den Verdünnungsstufen 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000 untersucht wurde. Insbesondere in der Verdünnungsstufe 1:10 konnte ein deutliches Signal gemessen werden und somit P-12-LOX nachgewiesen werden.

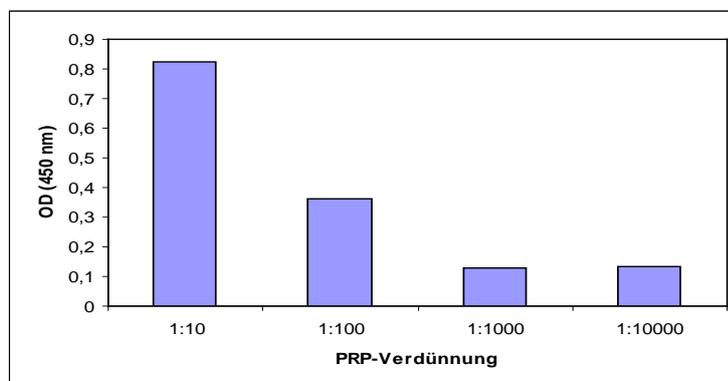


Abb. 14. PRP wurde in 4 verschiedenen Verdünnungsstufen auf 7212 IgG beschichtete Platte gegeben. Anschließend wurde mit 7213-POX mAb detektiert. Insbesondere bei der Verdünnung 1:10 konnte ein deutliches Signal gemessen werden.

Um zu untersuchen, ob ein Unterschied bei Verwendung verschiedener Gerinnungshemmer im Blutröhrchen feststellbar ist, wurde von zwei Personen Natrium-Citrat-, EDTA- und Heparin-Blut sowie Serum gewonnen. Anschließend wurde jedes Röhrchen unterschiedlich hoch zentrifugiert (10 min bei 150 g, 15 min bei 2000 g und 5 min bei 15000 g). Das Serum wurde 10 min bei 2000 g zentrifugiert. Die Plasmen bzw. das Serum wurde jeweils 1:100 verdünnt im ELISA getestet.

Aus Abb.15 geht hervor, dass P-12-LOX nur im Plasma nachweisbar war, wenn es niedrig zentrifugiert wurde, d.h. nur wenn Plättchen vorhanden waren. Der Nachweis von P-12-LOX in Natrium-Citrat-Plasma war am besten, gefolgt von EDTA-Plasma. Im Serum von Normalpersonen war kein P-12-LOX nachweisbar. Die im niedrig zentrifugierten Natrium-Citrat-Plasma nachgewiesene Menge an P-12-LOX entsprach 8,2 ng/ml.

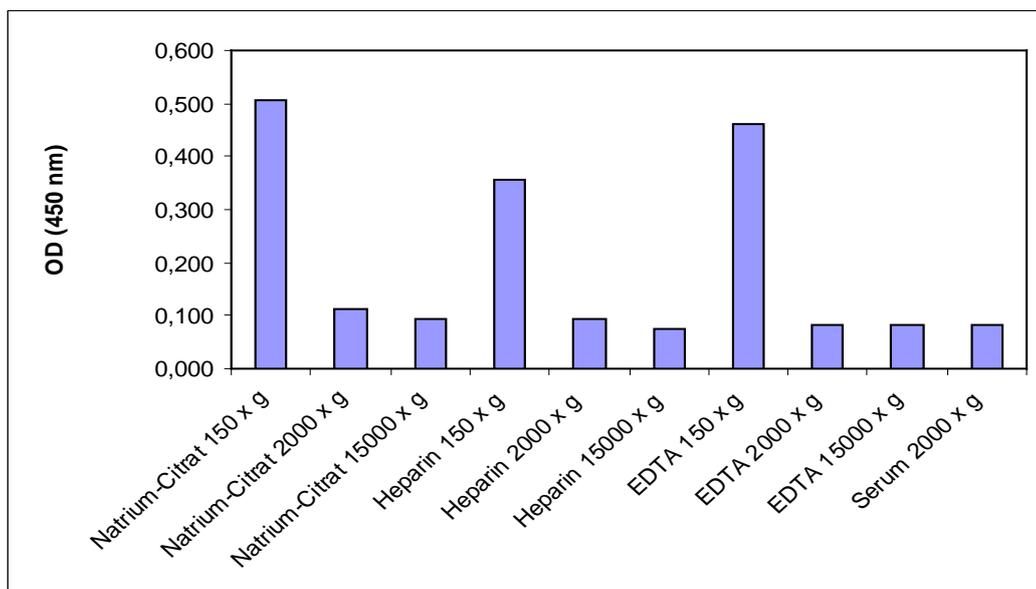


Abb. 15. ELISA mit Natrium-Citrat-, Heparin- und EDTA-Plasma, welches jeweils auf drei unterschiedlichen Stufen zentrifugiert wurde. P-12-LOX war am besten nachweisbar in niedrig zentrifugiertem Natrium-Citrat-Plasma.

Da Lipoxygenasen v.a. im Zellinneren lokalisiert sind, wurden Plättchenlysate aus PRP untersucht, indem die Thrombozyten in PRP mit verschiedenen Detergenzien (PBS, Tween-20 und Triton-X-100) lysiert wurden. Das mit Detergenzien behandelte PRP wurde in den Verdünnungen 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000 untersucht. Aus der Abb.16 ist ersichtlich, dass am meisten P-12-LOX in mit Triton-x-100 lysierten Plättchen nachgewiesen werden konnte.

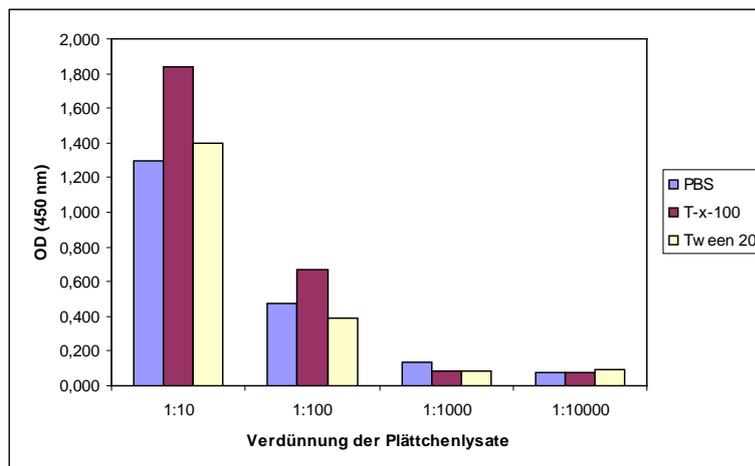


Abb. 16. PRP in 4 unterschiedlichen Verdünnungen wurden mit PBS, Triton-X-100 und Tween 20 lysiert und auf mit 7212 IgG beschichtete Platten gegeben. Detektiert wurde mit 7213-POX mAb. Am meisten P-12-LOX war in mit Triton-x-100 lysierten Plättchen nachweisbar.

Plättchenlysate wurden darüber hinaus auch durch Zellaufschluss mittels eines Ultraschallhomogenisators hergestellt. Hierfür wurden gleiche Mengen PRP mit Tris-EDTA-Puffer vermischt. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe des Ultraschallhomogenisators lysiert. Nach Zentrifugation wurden fortlaufende 1:2er Verdünnungen des Überstandes hergestellt und im ELISA gemessen. Wie in Abb.17 dargestellt, konnte P-12-LOX in den aufgeschlossenen Zellen mittels ELISA nachgewiesen werden und hierbei eine annähernd lineare Abnahme der P-12-LOX ermittelt werden.

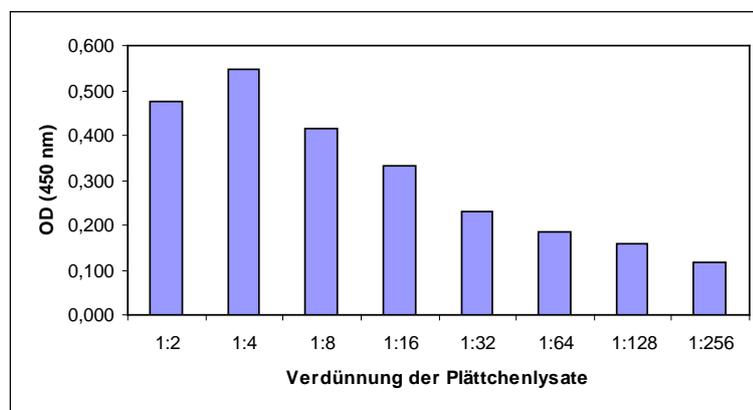


Abb. 17. Thrombozytenaufschluss aus Plasma mit Hilfe eines Ultraschallhomogenisators: Die gewonnenen Plättchenlysate wurden in einer seriellen 1:2 Verdünnung auf mit 7212 IgG beschichtete Platten gegeben. Detektion erfolgte mit 7213-POX mAb. Annähernd lineare Abnahme der Reaktion.

Zur weiteren Charakterisierung des in Thrombozyten enthaltenen Antigens wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. P-12-LOX wurde mit Hilfe von Antikörpern und Protein G Sepharose aus dem Gemisch heraus präzipitiert und anschließend in einer SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen nachgewiesen. Zusätzlich zu der immunpräzipitierten P-12-LOX, wurden Thrombozyten lysiert (Ultraschallhomogenisator) und auf das Gel aufgetragen.

P-12-LOX wurde mit Hilfe der Immunpräzipitation im Größenbereich von 78 kDa nachgewiesen (Abb.18). Die Farbreaktion war dabei bei dem monoklonalen Primär-Antikörper 7225 und POX-markiertem Sekundär-Antikörper Ziege-anti-Maus IgG stärker als bei der Kombination aus dem polyklonalen 7212 und POX-markiertem Ziege-anti-Kaninchen IgG. Geringer war das Signal bei Thrombozyten aus PRP ohne Immunpräzipitation.

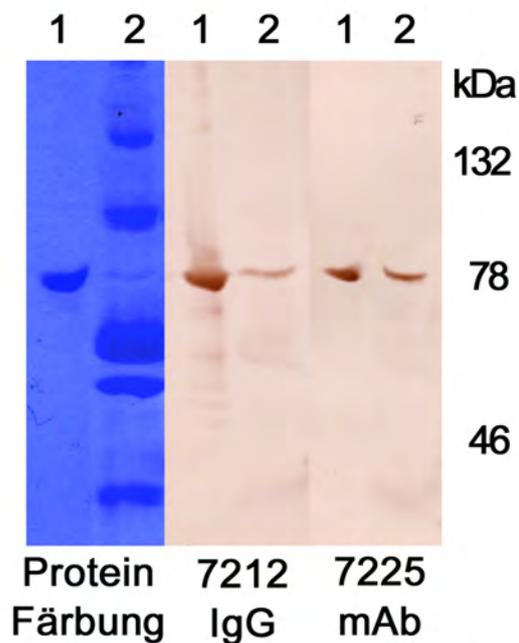


Abb. 18. SDS-Page mit immunpräzipitierter P-12-LOX (1) und mit Plättchenlysaten (2). Als Fänger-AK dienten 7225 mAb und 7212 IgG. Der Nachweis erfolgte mit Ziege-anti-Kaninchen und Ziege-anti-Maus IgG. Ein deutliches Signal fand sich im Bereich von 78 kDa.

### 3.2.9. Messung von P-12-LOX in xenotransplantierten Brustkrebszellen

Um zu untersuchen, ob P-12-LOX auch in Gewebeproben nachweisbar ist, wurden Extrakte von humanen xenotransplantierten Tumoren untersucht. Das Gewebe stammte von Mäusen, denen menschliche Brustkrebszellen (MDA-MB231) transplantiert worden waren (Referenzmaterial American Diagnostica GmbH Lot No. 281107). 50 µl Zelllysate wurde 1:5 in PBS mit 0,05 % Tween verdünnt. Im ELISA konnte ein deutliches Signal festgestellt werden. Die gemessene Menge P-12-LOX im Zelllysate entsprach einer Konzentration von 8,6 ng/ml.

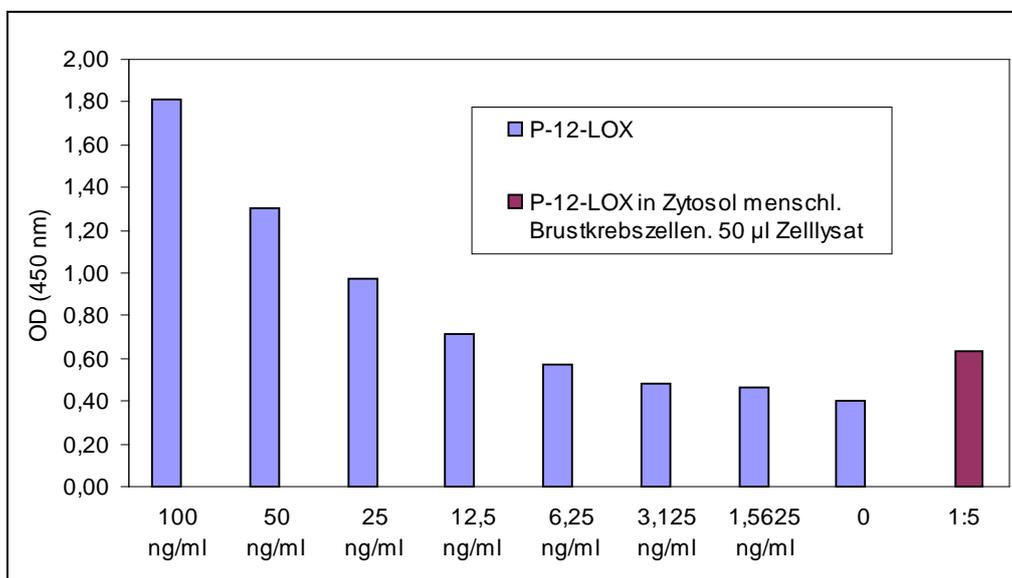


Abb. 19. Untersuchung humaner xenotransplantierte Brustkrebszellen im ELISA. P-12-LOX wurde in unterschiedlichen Konzentrationen auf eine mit 7212 IgG beschichtete Platte gegeben. Das lyophilisierte Zelllysate wurde 1:5 in PBS mit 0,05 % Tween verdünnt und ebenfalls auf die Platte aufgetragen. Der Nachweis erfolgte mit 7213-POX mAb. P-12-LOX konnte eindeutig im Zelllysate nachgewiesen werden.

### **3.3. Nachweis von P-12-LOX mit Hilfe der Durchflusszytometrie**

Um P-12-LOX durchflusszytometrisch nachweisen zu können, wurde zunächst die optimale Probenvorbereitung ermittelt.

Wurden die Thrombozyten direkt, ohne Fixieren und ohne Vorbehandlung mit den Antikörpern inkubiert, war keine Anfärbung von P-12-LOX möglich. Da Lipoxygenasen im Zellinneren lokalisiert sind, mussten die Zellen zunächst permeabilisiert werden. Dies geschieht durch die Zugabe von Detergenzien wie beispielsweise Saponin.

Erst nach Zugabe von Saponin konnten die Antikörper an das intrazelluläre Protein binden. Mit 0,25 % Saponin wurden die besten Ergebnisse erzielt.

Außerdem mussten die Zellen vor der Saponin-Behandlung fixiert werden. Ohne Fixierung wurden die Zellen lysiert und waren nicht mehr als distinkte Population vom Zelldebris abgrenzbar.

Abb.20 zeigt die indirekte Färbung mit dem polyklonalen anti-P-12-LOX IgG 7212. Detektiert wurde mit einem FITC-markierten anti-Kaninchen-Antikörper. Als Isotypkontrolle diente unspezifisches Kaninchen-IgG. Es konnte eine positive Reaktion erkennbar als Verschiebung der Stärke des Fluoreszenzsignals nach rechts im Histogramm festgestellt werden.

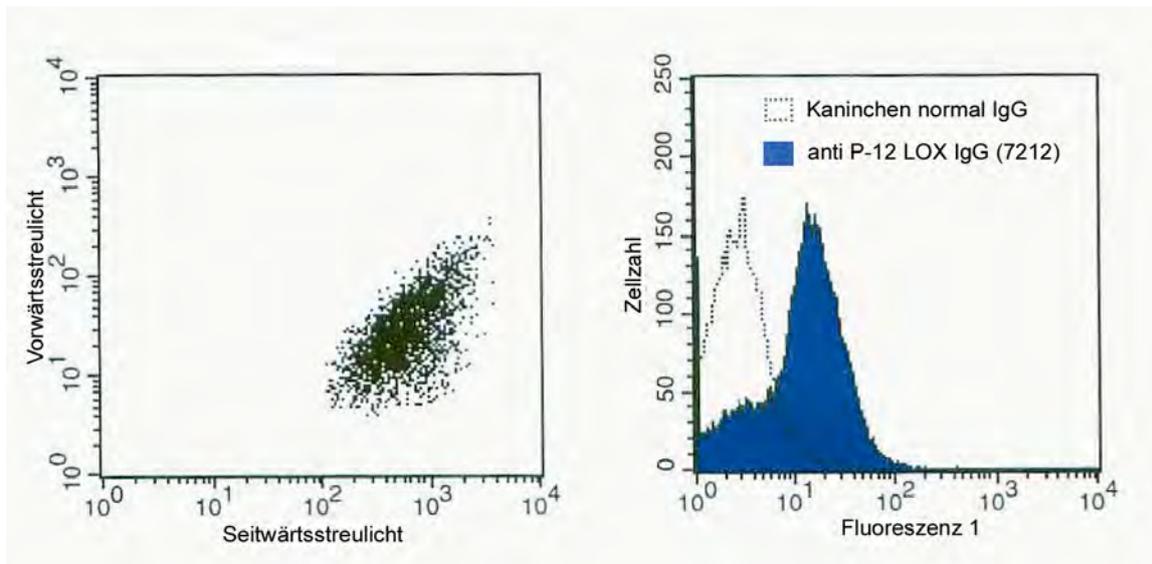


Abb. 20. Indirekte Färbung mit dem polyklonalen anti-P-12-LOX IgG 7212: Im Dot-Plot ist die Thrombozytenpopulation sichtbar. Der Nachweis erfolgte mit FITC-markiertem anti-Kaninchen-AK. Als Isotypkontrolle diente ein unspezifisches Kaninchen-IgG. Es ist eine deutliche Verschiebung des Fluoreszenzsignals nach rechts infolge Verstärkung feststellbar.

In Abb.21 sind die Histogramme nach Färbung mit den monoklonalen Antikörpern 7213, 7225 und 7228 zu sehen. Der Nachweis erfolgte mit einem PE-markiertem anti-Maus-Antikörper. Es wurde eine Isotypkontrolle sowie eine Positivkontrolle (Thrombozyten-spezifischer Marker CD41a) mitgeführt. Im Vergleich zur Isotypkontrolle (nur geringe Fluoreszenz) zeigte sich bei allen drei Antikörpern eine deutliche Verschiebung des Fluoreszenzsignals, wobei bei Antikörper 7228 zudem eine stärker positive Population sichtbar war.

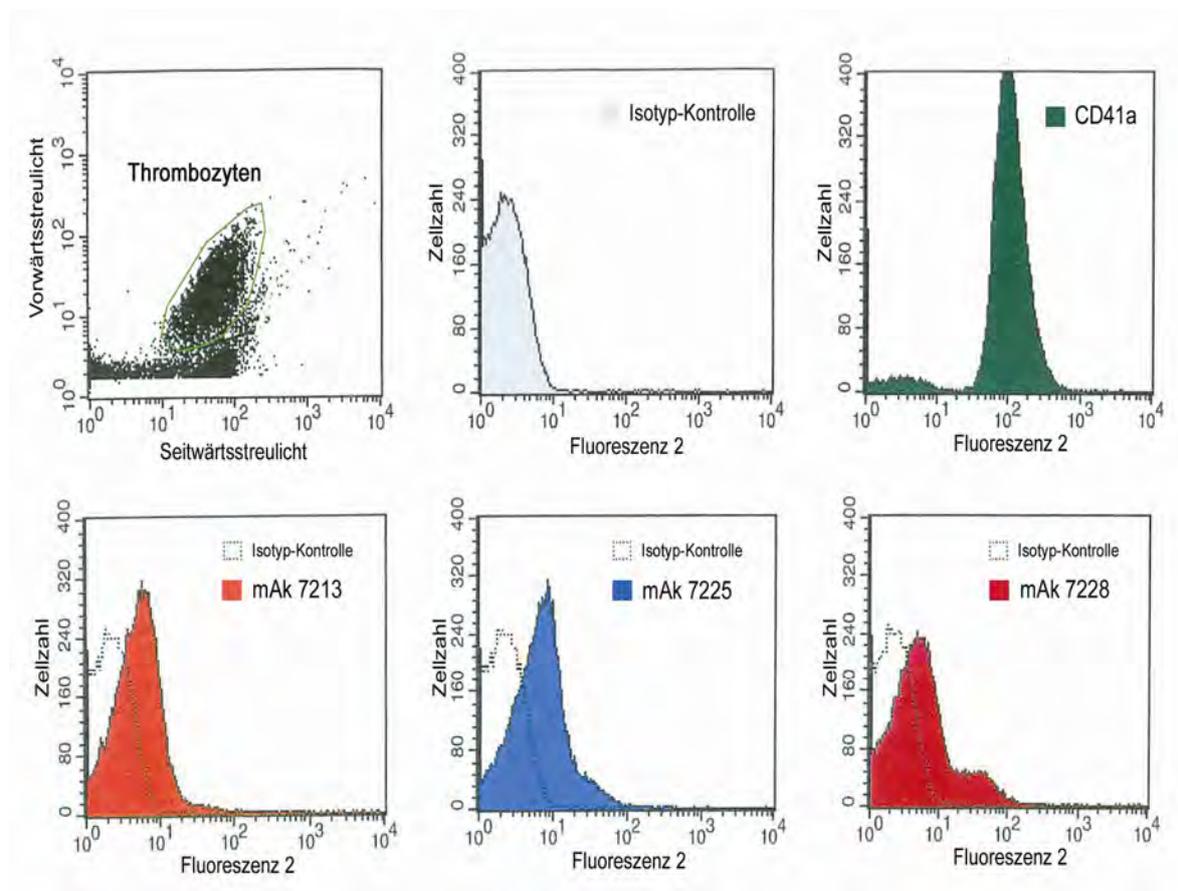


Abb. 21. Färbung mit den monoklonalen Antikörpern 7213, 7225 und 7228: Im Dot-Plot ist die Thrombozytenpopulation mit einem Analysefenster eingegrenzt. Detektiert wurde mit PE-markiertem anti-Maus-AK. Es wurde eine Isotypkontrolle sowie eine Positivkontrolle (CD41a) mitgeführt. Bei allen drei AK zeigt sich eine Verschiebung des Fluoreszenzsignals nach rechts. Bei Ak 7228 ist zudem eine stärker positive Population sichtbar.

In einem weiteren Versuch wurde eine Doppelfärbung mit dem polyklonalen anti-P-12-LOX IgG (7212) und dem Thrombozyten-spezifischen Marker CD41a durchgeführt. Nach der üblichen Probenvorbereitung wurde zuerst mit 7212 IgG (oder einem unspezifischen Kaninchen-IgG als Isotypkontrolle) und dann mit FITC-markiertem anti-Kaninchen-Antikörper gefärbt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und der zweite Färbeschritt durchgeführt. Hierzu wurde zunächst mit dem anti-CD41a Antikörper und anschließend mit PE-markiertem anti-Maus-Antikörper gefärbt. Im Vergleich zur Isotypkontrolle zeigte sich sowohl bei der Färbung mit CD41a als auch bei der Färbung mit 7212 IgG eine Verschiebung des Fluoreszenzsignals nach rechts im Histogramm. Dies entspricht einer positiven Reaktion. Im Dotplot wird deutlich, dass ca. 38% der CD41a-positiven Thrombozyten 12-Lipoxygenase exprimieren.

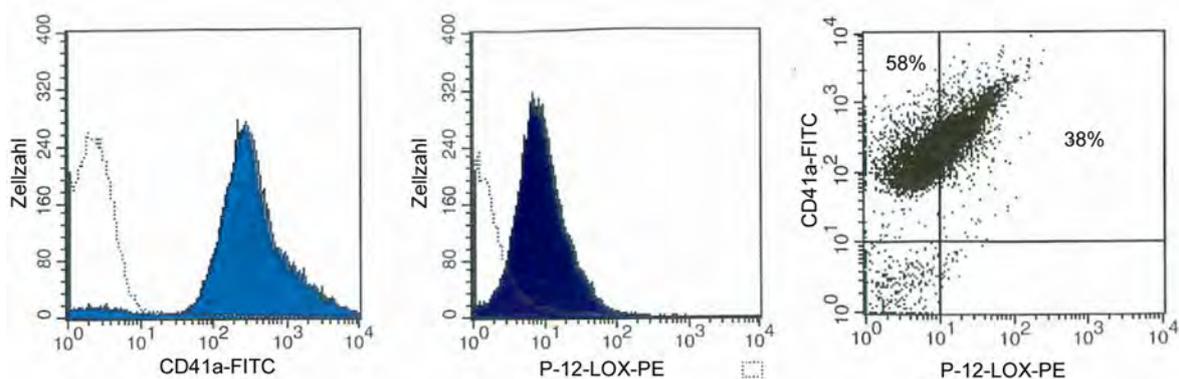


Abb. 22. Doppelfärbung mit anti-P-12-LOX IgG 7212 und dem thrombozyten-spezifischen Marker CD41a: Als Isotypkontrolle diente ein Kaninchen-Normal IgG (gestrichelte Linie). Der Nachweis erfolgte mit FITC-markiertem anti-Kaninchen-AK bzw. mit PE-markiertem anti-Maus-AK. Nahezu die gesamte Thrombozyten-Population (96 %) war CD41a-positiv, ca. 38 % dieser Zellen exprimierten zudem P-12-LOX.

## **4. Diskussion**

In dieser Arbeit sollte ein sog. Sandwich-ELISA zum Nachweis von P-12-LOX mit Hilfe eines Antikörperpaares entwickelt werden. P-12-LOX sollte in Körperflüssigkeiten und Gewebeextrakten mittels eines ELISAs nachgewiesen werden. Im Rahmen der Entwicklung des ELISAs sollten die verwendeten Antikörper weiter charakterisiert werden. Dies erfolgte mit Hilfe eines Western Blots.

Außerdem sollte getestet werden, ob P-12-LOX mittels Durchflusszytometrie in Thrombozyten nachgewiesen werden kann.

### **4.1. Entwicklung des P-12-LOX Enzym Immuntests (ELISA) und Charakterisierung der hierfür verwendeten Antikörper**

Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte ELISA und die dabei verwendeten mono- und polyklonalen Antikörper wurden im Hinblick auf verschiedene Eigenschaften ausführlich charakterisiert.

Mit den Antikörpern gegen P-12-LOX wurden zunächst verschiedene Kombinationen im ELISA getestet. Sie mussten eine hohe Affinität für P-12-LOX aufweisen, um sie als Fänger für die P-12-LOX aus dem Blut einsetzen zu können. Darüber hinaus musste eine Paarbildung möglich sein. Hierbei wurde eine Antikörperkombination für die weiteren Versuche ausgewählt, die ein besonders gutes Signal erzeugte. Es handelt sich hierbei um den polyklonalen Antikörper IgG 7212 zur Beschichtung der Platte und den monoklonalen Antikörper 7213-POX mAb als Nachweis-Antikörper. Die Eignung dieser Antikörper ist möglicherweise darauf zurück zu führen, dass diese unterschiedliche Epitope der Zielmoleküle erkennen. Dies bleibt aber zum gegenwärtigen Zeitpunkt eine Vermutung, da keine weiteren Untersuchungen zur Epitopspezifität durchgeführt wurden.

Für die Durchführung des ELISAs mussten geeignete Beschichtungspuffer, Blockierungspuffer, Verdünnungspuffer sowie Substrate und Stopplösungen ausgewählt werden. Dabei war es wichtig, dass mit Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatten auch bei Lagerung bei unterschiedlichen Temperaturen stabil waren. Die besten Ergebnisse

wurden erzielt bei Beschichtung mit Carbonatbeschichtungspuffer, Blockierung mit Liquid Plate Sealer, Verdünnung mit Assayverdünnungspuffer von Virotech oder PBS mit 0,05 % Tween. Das Substrat wurde von der Firma Virotech in Verbindung mit Citratstopplösung verwendet, da sich bei der Kombination aus TMB von der Firma American Diagnostica mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Stopplösung bei hoher OD ein Präzipitat bildete.

Bei den erarbeiteten Bedingungen handelt es sich um durchaus unter Routinebedingungen verwendbare Protokolle und Reagenzien, weshalb die Anwendung des ELISAs in der Routinediagnostik denkbar ist.

Die Sensitivität des Testsystems wurde bestimmt, indem die untere Nachweisgrenze ermittelt wurde. Für die Bestimmung der unteren Nachweisgrenze wurde der folgende experimentelle Ansatz gewählt: aus 8 Leerwerten wurde der Mittelwert herangezogen. Die untere Nachweisgrenze wird als dreifache Standardabweichung über dem Mittelwert des Leerwertes angegeben (Shah et al. 2000). Mit Hilfe dieser Methode wurde ein Wert von 0,6 ng P-12-LOX/ml ermittelt. Dieser Wert sichert eine zufrieden stellende Sensitivität des Testsystems.

Die Intra-Assay Variabilität wurde untersucht, um den Bereich festzulegen, in dem ausreichend präzise Messungen möglich sind. Dafür wurden drei verschiedene P-12-LOX-Konzentrationen (100 ng/ml, 25 ng/ml, 6,25 ng/ml) 8 mal gemessen. Eine hinreichende Genauigkeit liegt nur in Konzentrationsbereichen mit Variationskoeffizienten unter 10 % vor (Shah et al. 2000). Diese Voraussetzungen waren bei den untersuchten ELISAs jeweils für den Konzentrationsbereich von 6,25 ng/ml bis 100 ng/ml erfüllt.

Durch die Bestimmung der Reproduzierbarkeit oder „Inter-Assay Variabilität“ des Testsystems wurden Schwankungen der Messergebnisse bei wiederholten Testungen konstanter Antigenkonzentrationen (100 ng/ml, 25 ng/ml, 6,25 ng/ml) an 5 unterschiedlichen Tagen wiedergegeben. Auch hierbei lag eine hinreichende Genauigkeit bei allen verwendeten Antigenkonzentrationen vor, da der Variationskoeffizient nie über 10 % lag (Shah et al. 2000).

Ein wichtiges Kriterium war die Spezifität des Tests bzw. der Antikörper. Besondere Beachtung fand hierbei die Spezifität der verwendeten monoklonalen Antikörper, da deren epitop-spezifische Antigenerkennung im wesentlichen die Spezifität der Testsysteme bedingt (Luttmann et al., 2004). Die Spezifität der Antikörper gegen P-12-LOX wurde mittels Immuno-Blot überprüft. Die Reaktivität der Antikörper wurde mit 12-LOX, 5-LOX, 15-LOX-1, 15-LOX-2, r15-LOX, eLOX und 12R-LOX getestet. Keiner der eingesetzten Antikörper zeigte eine Kreuzreaktion mit anderen Typen von LOX.

Bei der Nativgelelektrophorese konnte festgestellt werden, dass der im ELISA gut funktionierende mAb 7213 nur eine geringe Reaktion mit P-12-LOX zeigte. Der mAb 7225 erzeugte hingegen ein stärkeres Signal. Eine Erklärung wäre, dass durch die Gelelektrophorese die Konformation der Proteine geändert wird. Die Nativgelelektrophorese findet zwar nicht unter denaturierenden Bedingungen jedoch aber unter reduzierenden Bedingungen statt. Erkennt ein Antikörper nun ein spezifisches Epitop der Tertiärstruktur eines Proteins, so kann es sein, dass dieses Epitop bei der Auftrennung der Proteine nicht mehr vorhanden ist. Darüber hinaus ist bei der Wahl des Antikörpers zu bedenken, dass dieser unter Umständen nur eine Form – die native oder die denaturierte – des Proteins erkennt. Die Aktivität der P-12-LOX ist außerdem davon abhängig, inwiefern sie Multimere oder Aggregate bildet. Natürlicherweise kommt sie nicht als Monomer vor.

Der Einfluss der Probenmatrix Plasma auf die Wiederfindung des Antigens und das Linearitätsverhalten der Standardkurve wurde geprüft. Hierbei war eine geringe Abnahme der Extinktion von 13 % in Anwesenheit von Plasma feststellbar. Auf die Linearität hatte diese Probenmatrix jedoch keinen Einfluss. Eine mögliche Erklärung für die geringe Abnahme der Extinktion in Gegenwart von Plasma könnte sein, dass es zu einer Kreuzreaktion von im Plasma enthaltenen Komponenten mit der P-12-LOX kommt. Der Antikörper kann dann das Enzym nicht mehr im vollen Ausmaß erkennen und binden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass der Antikörper unspezifisch von Komponenten des Plasmas gebunden wird und in weiteren Reaktionsschritten mit ausgewaschen wird.

Der Nachweis von P-12-LOX mit Hilfe der ausgewählten Antikörper in PFP von Normalpersonen gelang nicht. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass P-12-LOX in Thrombozyten lokalisiert ist. Diese sind jedoch im PFP nicht vorhanden. Zusätzlich muss bedacht werden, dass das PFP von Normalpersonen stammte und somit auch nicht mit einem erhöhten Vorkommen von P-12-LOX gerechnet werden konnte.

Um dies genauer zu untersuchen, wurde Natrium-Citrat-, EDTA- und Heparinplasma unterschiedlich stark zentrifugiert: 10 min bei 150 g, 15 min bei 2000 g und 5 min bei 15000 g. Die Plasmen wurden im ELISA getestet. Wie schon zuvor vermutet, wurden die höchsten Extinktionswerte erreicht, wenn das Blut auf niedriger Stufe zentrifugiert wurde. Dadurch waren im Plasma viele Plättchen vorhanden. Am meisten Lipoxigenase konnte in Natrium-Citrat-Plasma nachgewiesen werden.

In Thrombozytenkonzentrat, welches aus der Blutbank von Heidelberg zur Verfügung gestellt wurde, konnte P-12-LOX eindeutig nachgewiesen werden. Dies ist durch das Vorkommen von P-12-LOX in Thrombozyten zu erklären. Eine stärkere Extinktion war messbar, wenn die Thrombozyten durch unterschiedliche Verfahren (Ultraschallhomogenisation, Zusatz von Detergenzien) lysiert wurden. Dies unterstützt die Annahme, dass P-12-LOX hauptsächlich im Inneren von Thrombozyten lokalisiert ist (Hagmann et al, 1996) und beim Lysieren ins Plasma übergeht bzw. die Antikörper die Möglichkeit haben, das Enzym im Zellinneren zu binden.

Die Fähigkeit der Antikörper, P-12-LOX aus PRP zu binden, wurde zusätzlich durch Immunpräzipitation getestet. Immunpräzipitierte P-12-LOX wurde in einer SDS-PAGE nachgewiesen. Es zeigte sich eine Reaktion im Bereich von 78 kDa.

Bei der im Rahmen der Untersuchung der Spezifität der Antikörper durchgeführten Nativgelelektrophorese fand hingegen eine Reaktion der Antikörper mit P-12-LOX im Bereich von 132 kDa statt. Dies lässt sich dadurch erklären, dass bei der Nativgelelektrophorese native, also gefaltete Proteine im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Dabei werden die physiologischen Eigenschaften der aufzutrennenden Proteine erhalten. Die Trennung der Proteine findet nach Größe und Struktur statt. Bei der SDS-PAGE werden Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine aufgebrochen. Die Proteine werden hierbei aufgrund ihrer Molekularmasse aufgetrennt. Die unterschiedliche Art und

Weise der Trennung könnte eine Erklärung sein für den unterschiedlichen Bereich der Antikörper-Bindung.

Um zu testen, ob P-12-LOX auch in Gewebeproben mit Hilfe der verwendeten Antikörper nachweisbar ist, wurde ein ELISA mit Zytosol von xenotransplantierten humanen Brustkrebszellen durchgeführt. Es war ein deutliches Signal messbar. Da hierbei Gewebelysat verwendet wurde, kann keine Aussage gemacht werden, in welchen Zellen die nachgewiesene P-12-LOX im Gewebe vorlag. Da Tumorgewebe neben eigentlichen Tumorzellen auch Gefäße mitsamt den darin enthaltenen Blutzellen (auch Thrombozyten) enthält, muss die Frage nach dem zellulären Ursprung im Tumorgewebe offen bleiben. Hierzu wären immunhistologische Untersuchungen hilfreich, bei denen unter Umständen die hierbei beschriebenen Antikörper eingesetzt werden können. Die Eignung der Antikörper für immunhistologische Untersuchungen muss jedoch in weiteren Untersuchungen noch geprüft werden.

Insgesamt haben die Versuche jedoch gezeigt, dass die bei dieser Arbeit verwendeten Antikörper nicht nur rekombinante P-12-LOX sondern auch native P-12-LOX aus Thrombozyten und Gewebe erkennen. Zum Nachweis von nativer P-12-LOX in Plasma muss PRP verwendet werden. Das Blut müsste dementsprechend niedrig zentrifugiert werden. Es sollten Plättchenlysate verwendet werden, damit die in den Plättchen lokalisierte P-12-LOX den Antikörpern zugänglich ist. Diese können mit Hilfe eines Ultraschallhomogenisators oder auch durch Zusatz von Detergenzien hergestellt werden. Bei zusätzlich durchgeführter Immunpräzipitation kann die Sensitivität verstärkt werden, da es zu einem Konzentrationsanstieg der gebundenen P-12-LOX kommt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass bei Verwendung von Natrium-Citrat-Blut Lipoxigenase am besten nachgewiesen werden konnte.

Mit Hilfe des in dieser Arbeit entwickelten ELISAs steht ein Verfahren zum Nachweis von P-12-LOX zur Verfügung. Der ELISA ist spezifisch, präzise und reproduzierbar für den Nachweis von P-12-LOX. Die Anwendung dieses Tests unter Routinebedingungen ist vorstellbar.

## 4.2. Nachweis von P-12-LOX mit Hilfe von Durchflusszytometrie

Beim Nachweis von P-12-LOX mit Hilfe von Durchflusszytometrie mussten geeignete Bedingungen der Probenvorbereitung gefunden werden.

Da keine direkt mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Antikörper zur Verfügung standen, wurde eine indirekte Färbung mit einem unmarkierten Primärantikörper und einem markierten Sekundärantikörper durchgeführt.

Zunächst musste beachtet werden, dass sich P-12-LOX im Zellinneren befindet und somit die Zellmembran zuerst permeabilisiert werden muss, bevor die Antikörper an das Antigen binden können. Wichtig hierbei ist, dass die Zellen nicht komplett lysiert werden, sondern nur deren Zellmembran permeabilisiert wird. Durch die permeabel gewordene Zellmembran wird den Antikörpern der Zugang in Richtung Antigen erst ermöglicht. Zur Permeabilisierung werden sog. Detergenzien (Saponin, Triton-X-100) eingesetzt. So kann eine intrazelluläre Färbung durchgeführt werden. Sowohl bei Saponin als auch bei Triton-X-100 in der Konzentration 0,1 % wurden alle im Blut enthaltenen Zellen lysiert. Das Problem ist, dass im Durchflusszytometer nur Zellen gemessen und erkannt werden. Sollte bei einer zu starken Permeabilisierung bzw. Lysierung der Zellen die P-12-LOX ins umliegende Plasma austreten, können die sich bildenden Antigen-Antikörper-Komplexe nicht erkannt und gemessen werden. Außerdem muss man bedenken, dass auch Zelltrümmer gemessen werden (Ereignisse) und so nach 10000 Ereignissen nicht automatisch ebenso viele Zellen gemessen wurden.

Bei einer geringen Konzentration Saponin von 0,25 % kommt es lediglich zu einer Permeabilisierung der Zellen. Sie bleiben in ihrer Struktur größtenteils erhalten. Die Antikörper können jedoch ins Zellinnere und dort an ihr Enzym binden.

Die vorhergehende Fixierung der Zellen mit Formaldehyd ist Voraussetzung für die nachfolgende Permeabilisierung mit Saponin. So wird das exprimierte Antigen über einen längeren Zeitraum stabil gehalten und dadurch der Antigenverlust möglichst gering gehalten. Über den Antigenitätsverlust von P-12-LOX kann keine genaue Aussage gemacht werden.

Wurde eine Fixierung sowie die Permeabilisierung der Thrombozyten durchgeführt, so konnten die Primärantikörper an P-12-LOX binden und diese durch Zugabe von PE- bzw. FITC-markierten Sekundärantikörpern, welche an den konstanten Fc-Teil des unmarkierten Antikörpers binden, nachgewiesen werden.

Um falsch-positive Ergebnisse zu erkennen, wurden jeweils eine Negativkontrolle sowie eine Isotypkontrolle mitgeführt. Die Negativkontrolle entspricht dabei einem Färbeansatz ohne Zugabe eines primären Antikörpers. Hierdurch wird die Eigenfluoreszenz der Zellen wiedergegeben. Bei der Isotypkontrolle wird hingegen ein unspezifischer primärer Antikörper desselben Isotyps hinzugegeben. Somit sollten unspezifische Bindungen der Antikörper, die zu einer falsch-positiven Reaktion führen, erkannt werden. Als Isotypkontrolle diente ein unspezifisches Kaninchen-IgG. Als Positivkontrolle diente CD41a, ein thrombozyten-spezifischer Marker, der sowohl an ruhende als auch an aktivierte Thrombozyten bindet.

In einem Versuch (Kapitel 3.3., Abb. 19) wurde eine Doppelfärbung mit dem polyklonalen anti-P-12-LOX IgG (7212) und einem Thrombozyten-spezifischen Marker durchgeführt. Bei beiden Färbungen war im Vergleich zur Isotypkontrolle eine Verschiebung des Fluoreszenzsignals nach rechts im Histogramm feststellbar. Somit konnte gezeigt werden, dass eine Doppelfärbung von Thrombozyten möglich ist.

Zusammengefasst kann man sagen, dass der Nachweis von P-12-LOX in Blutproben mit Hilfe der Durchflusszytometrie bei entsprechender Probenvorbereitung möglich ist.

### **4.3. P-12-LOX und Krebs**

Nach Fürstenberger und Mitarbeiter (2006) ist P-12-LOX als Prokarzinogen anzusehen. Mohammad et al (2006) konnten nachweisen, dass P-12-LOX in Brustkrebszellen vermehrt exprimiert wird im Vergleich zum normalen angrenzenden Gewebe. P-12-LOX üben darüber hinaus auch wichtige Einflüsse bei Prostata- (Timar et al. 2000) und Hautkrebs (Raso et al. 2004) aus. Produkte P-12-LOX-katalysierter Reaktionen haben tief greifende Stimulationseffekte auf Krebszellen. Dies wird durch Untersuchungsergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen belegt:

Von Pidgeon und Mitarbeiter (2003) wurde gezeigt, dass 12-LOX in zwei Krebszelllinien Zellüberleben und Apoptose reguliert, indem sie die Bildung und Lokalisation von Vitronectinrezeptor  $\alpha_v\beta_3$   $\alpha_v\beta_5$  beeinflusst. McCabe et al. (2006) stellten fest, dass Prostatakrebszellen mit erhöhter Konzentration von P-12-LOX die VEGF Produktion stimulieren und dadurch die Angiogenese fördern. Dass VEGF ein zentrales Glied in der 12-LOX stimulierten Tumorangiogenese ist, wurde auch durch Versuche von Nie und Mitarbeitern (2006) belegt.

Die funktionelle Beteiligung von 12-LOX im Metastasierungsprozess bei Prostatakrebs wurde durch Timar und Mitarbeiter (2000) nachgewiesen. Dies wurde in einem Versuch demonstriert, in dem Prostatakrebszellen in vitro mit 12-LOX-Inhibitoren (z.B. Baicalein) behandelt wurden und dadurch die Ansiedlung von Krebszellen in der Lunge verhindert wurde. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass 12-LOX in metastasierenden Prostatakarzinomzellen in einem signifikant höheren Ausmaß exprimiert wird als in nicht-metastasierenden Krebszellen.

Die in der vorgelegten Arbeit beschriebenen Verfahren erlauben Untersuchungen zur Rolle von P-12-LOX als potentieller Biomarker bei Krebserkrankungen. Dass P-12-LOX als nützlicher Biomarker im Rahmen der Früherkennung von Krebs in Epidermiszellen fungieren könnte, belegen Untersuchungsergebnisse von Winer und Mitarbeitern (2002). Demnach konnte P-12-LOX vermehrt in dysplastischen Nävi und Melanomen im Vergleich zu normalen humanen Melanozyten bzw. Nävi nachgewiesen werden. P-12-LOX könnte auch als Risikomarker für die Entstehung von Metastasen Anwendung finden. Es konnte gezeigt werden, dass eine hohe Konzentration von 12-LOX in humanen Hauttumoren ein hohes Risiko für die Entwicklung von Metastasen darstellt (Raso et al. 2004).

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Antikörper und Nachweisverfahren (ELISA und Durchflusszytometrie) ergänzen das methodische Repertoire für wissenschaftliche Untersuchungen zur Rolle von P-12-LOX in der Pathophysiologie von Krebserkrankungen.

Darüber hinaus erlauben die Untersuchungsergebnisse von Piao und Mitarbeitern (2008) die Schlussfolgerung, dass der P-12-LOX-Stoffwechselweg ein effektiver Angriffspunkt für die Chemoprävention bei der Entstehung von Hautkrebs darstellen könnte.

In einer aktuellen Arbeit beschreiben Zeeneldin und Kollegen (2009), dass das krankheitsfreie Überleben bei Patientinnen mit Brustkrebs höher war in Patientinnen, die 12-LOX im Tumorgewebe überexprimierten. Dies steht offensichtlich im Widerspruch zu den eingangs genannten Hypothesen einer pro-karzinogenen und ggf. auch metastasenfördernden Wirkung von P-12-LOX. In den Untersuchungen von Zeeneldin und Kollegen wurden allerdings keine antikörpergestützten Verfahren eingesetzt, sondern eine PCR zum Nachweis von P-12-LOX-spezifischer mRNA. Hier wäre es interessant zu untersuchen, ob sich eine ähnliche Korrelation finden lässt, wenn der P-12-LOX-Nachweis auf Proteinebene geführt wird. Entsprechende Untersuchungen sind unter Verwendung des hier vorgestellten ELISA Tests in Vorbereitung.

## 5. Zusammenfassung

P-12-LOX gehört zur Gruppe der Dioxygenasen und katalysiert die Reaktion von Arachidonsäure zu 12-HETE. P-12-LOX wird bei verschiedenen Krebserkrankungen vermehrt exprimiert. Es liegen Hinweise vor, dass Produkte von P-12-LOX-katalysierten Reaktionen eine Rolle bei Tumorentwicklung, Tumorwachstum und Metastasierung spielen. Bisher gab es keine Möglichkeit, P-12-LOX mit Hilfe eines routinefähigen Verfahrens, z.B. eines ELISA, nachzuweisen. Grund hierfür war das Fehlen eines geeigneten Antikörperpaares für P-12-LOX.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein ELISA-Test zum Nachweis von P-12-LOX in Körperflüssigkeit und Gewebeextrakten entwickelt. Der Test wurde auf seine Eignung für den quantitativen Nachweis von P-12-LOX geprüft.

Darüber hinaus wurde untersucht, ob P-12-LOX mittels Durchflusszytometrie in Thrombozyten nachgewiesen werden kann.

Die Spezifität von anti-P-12-LOX Antikörpern wurde detailliert untersucht. Mit Hilfe zweier ausgesuchter Antikörper (polyklonaler Antikörper IgG 7212 und monoklonaler Antikörper 7213 mAb) wurde ein sog. „Sandwich-ELISA“ aufgebaut. Der ELISA hat eine ausreichende Sensitivität und Genauigkeit für den Einsatz unter Routinebedingungen. Der ELISA wird durch die Probenmatrix „Plasma“ praktisch nicht beeinflusst und kann zur Quantifizierung von P-12-LOX in Plasma eingesetzt werden.

Nach Permeabilisierung mittels Detergenzbehandlung ist es mit den charakterisierten Antikörpern möglich, P-12-LOX in Thrombozyten durchflusszytometrisch nachzuweisen.

Der entwickelte ELISA-Test ist eine geeignete routinefähige Methode zum Nachweis von P-12-LOX. Auch die Durchflusszytometrie ermöglicht einen Nachweis von P-12-LOX unter Routinebedingungen.

Zusammengefasst erlauben die in der vorgelegten Arbeit beschriebenen Verfahren Untersuchungen zur Rolle von P-12-LOX als Biomarker unter physiologischen und pathologischen Bedingungen.

## 5. Summary

P-12-LOX constitutes a group of dioxygenases. It catalyses the reaction of arachidonic acid yielding 12-HETE. Elevated levels of p-12-LOX are expressed in a variety of tumors. There is evidence that products of the p-12-LOX-catalysed reactions play a role in tumor development, tumor growth and metastatic potential. Up to now the detection of p-12-LOX with routine methods, such as for example ELISA, was not feasible.

In this dissertation, an ELISA-test for the detection of p-12-LOX in body fluids and tissue extracts has been developed and checked for its ability to quantitate p-12-LOX.

Moreover, it has been explored whether p-12-LOX can be detected in platelets by flow cytometry.

Reactivity and specificity of several anti p-12-LOX antibodies was explored in detail. By using two selected antibodies (polyclonal antibody 7212 and monoclonal antibody 7213) a sandwich-ELISA-test was established. Sensitivity and precision of the ELISA were found to be sufficient for routine conditions. Moreover, basic reactivity of the ELISA-test was not found to be affected by the sample matrix plasma. In conclusion the ELISA can be used for quantification of p-12-LOX in blood plasma.

Anti p-12-LOX antibodies were also used for flow cytometry. A staining procedure with a permeabilization step was developed that allows detecting intracellular p-12-LOX in platelets by flow cytometry.

Taken together, the methods developed in this dissertation are important tools for research on the role of p-12-LOX as a biomarker under physiological und pathological conditions.

## 6. Literatur

- Brash A.R. (1999) Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J. Biol. Chem.*, 274: 23679–23682
- De Groot, JJMC, Veldink, GA, Vliegthart, JFG, Boldingh, J, Wever, R, Van Gelder, BF (1975) Demonstration by EPR spectroscopy of the functional role of iron in soybean lipoxygenases-1. *Biochem. Biophys. Acta* 377: 71-79
- Funk CD, Furci L, FitzGerald GA. (1990) Molecular cloning, primary structure and expression of the human platelet/erythroleukemia cell 12-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87: 5638 –5642
- Fürstenberger G., Krieg P., Müller-Decker K. and Habe nicht A.J.R. (2006) What are cyclogenases and lipoxygenases doing in the driver's seat of carcinogenesis? *Int.J.Cancer*, 119: 2247-2254
- Hagmann, W (1997) 12-Lipoxygenase in human tumor cells. *Pathol. oncol. Res.*, 3: 83–88
- Hagmann, W., Gao, X., Timar, J., Chen, Y.Q., Strohmayer, A.-R., Fahrenkopf, C., Kagawa, D., Lee, M., Zachareck, A. and Honn, K.V. (1996) 12-Lipoxygenase in A431 cells: genetic identity, modulation of expression and intracellular localization. *Exp. Cell Res.*, 228: 197–205
- Izumi T, Hoshiko S, Radmark O, Samuelsson S. (1990) Cloning of the cDNA for human 12-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87: 7477–7481
- Liu, B., Maher, R.J., Hannun, Y.A., Porter, A.T. and Honn, K.V. (1994) 12-(S)-HETE enhancement of prostate tumor cell invasion: selective role of PKCa. *J. natl. Cancer Inst.*, 86: 1145–1151
- Ludwig J.A. and Weinstein J.N. (2005) Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nature Reviews* 5: 845-856

- Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M., Myrtek, D. (2004) Der Experimentator Immunologie, editor. Spektrum Akademischer Verlag, München. 103-118
- Mc Cabe NP, Selman SH, Jankun J. (2006) Vascular endothelial growth factor production in human prostate cancer cells is stimulated by overexpression of platelet 12-lipoxygenase. *Prostate* 66(7): 779-787
- Mohammad A.M., Abdel H.A., Abdel W., Ahmed A.M., Wael T. and Eiman G. (2006) Expression of cyclooxygenase-2 and 12-lipoxygenase in human breast cancer and their relationship with HER-2/neu and hormonal receptors: Impact on prognosis and therapy. *Indian Journal of Cancer*, 43: 163-168
- Nie D., Krishnamoorthy S., jin R., Tang K., Chen Y., Qiao Y., Zacharek A., Guo Y., Milanini J., Pages G. and Honn K.V. (2006) Mechanisms Regulating Tumor Angiogenesis by 12-Lipoxygenase in Prostate Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 281: 18601-18609
- Piao Y.S., Du Y.C., Oshima H., Jin J.C., Nomura M., Yoshimoto T and Oshima M. (2008) Platelet-type 12-lipoxygenase accelerates tumor promotion of mouse epidermal cells through enhancement of cloning efficiency. *Carcinogenesis*, 440-447
- Pidgeon G.P., Tang K., Cai Y.L., Piasentin E. and Honn K.V. (2003) Overexpression of platelet-type 12-lipoxygenase promotes tumor cell survival by enhancing  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_v\beta_5$  Integrin expression. *Cancer Research*, 63: 4258-4267
- Rásó E., Döme B., Somlai B., Zacharek A., Hagmann W., Honn K. and Timár J. (2004) Molecular identification, localization and function of platelet-type 12-lipoxygenase in human melanoma progression, under experimental and clinical conditions. *Melanoma Research*, 14: 245-250
- Shah VP, Midha KK, Findlay JW, et al. Bioanalytical method validation – a revisit with a decade of progress. *Pharm Res* 2000;17:1551-1557

- Shureiqi I. and Lippman S.M. (2001) Lipoxygenase Modulation to Reverse Carcinogenesis. *Cancer Res.*, 61: 6307–6312
- Tang DG, Chen YQ, Honn KV (1996). Arachidonate lipoxygenases as essential regulators of cell survival and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93: 5241–5246
- Timar J., Raso E., Döme B., Li L., Grignon D., Nie D., Honn KV. and Hagmann W. (2000) Expression, subcellular localization and putative function of platelet-type 12-lipoxygenase in human prostate cancer cell lines of different metastatic potential. *Int. J. Cancer*, 87: 37-43
- Timar, J., Tang, D., Bazaz, R., Haddad, M.M., Kimler, V.A., Taylor, J.D. and Honn, K.V., PKC mediates (1993) 12(S)-HETE-induced cytoskeletal rearrangement in B16a melanoma cells. *Cell Motil. Cytoskel.*, 26: 49–65
- Winer I., Normolle D.P., Shureiqi I., Sondak V.K., Johnson T., Su L. and Brenner D.E. (2002) Expression of 12-lipoxygenase as biomarker for melanoma carcinogenesis. *Melanoma Research* 12: 429-434
- Yamamoto S. (1992) Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions. *Biochem Biophys Acta*. 1128: 117–131
- Zeeneldin A., Mohamed A., Abdel H., Taha F., Goda I. and AboDeef W. (2009) Survival effects of cyclooxygenase-2 and 12-lipoxygenase in Egyptian women with operable breast cancer. *Indian Journal of Cancer* 46: 54-60

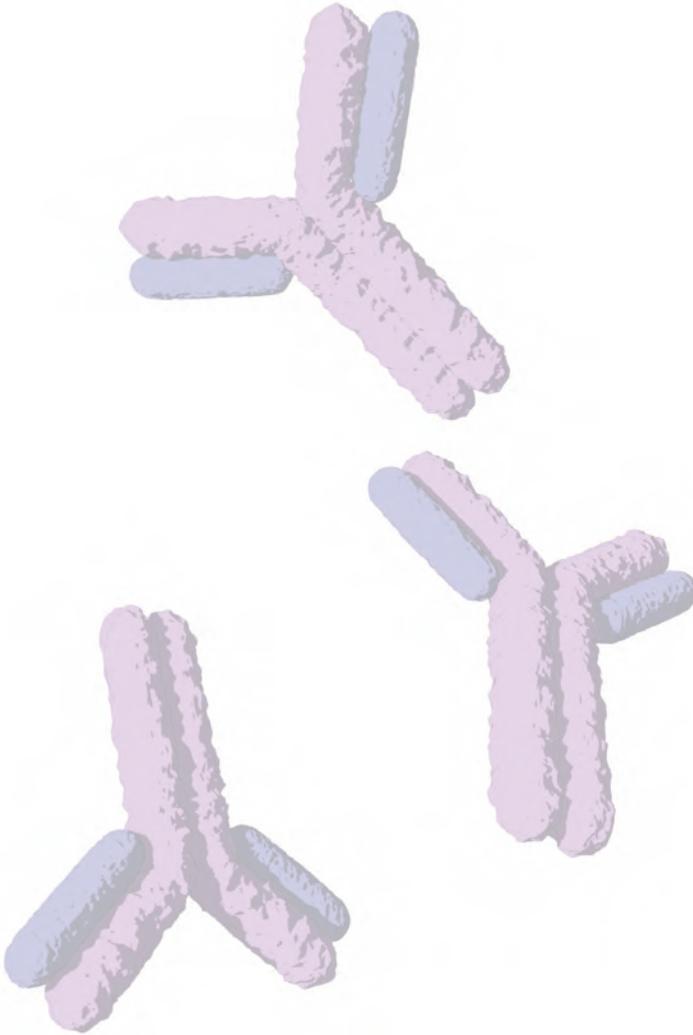
## **7. Danksagung**

Prof. Dr. M. Kramer danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Zu besonderem Dank verpflichtet bin ich Dr. Jeannette Reinartz für die großartige Unterstützung bei der praktischen Durchführung meiner Arbeit und für die Durchsicht des Manuskripts.

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. H.-C. Siebert danke ich herzlich für seine Bereitschaft, die Arbeit vor dem Fachbereich zu vertreten.

“Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die ich wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFBENGRING 15  
D-35396 GIESSEN

ISBN: 978-3-8359-5702-2

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de



9 783835 957022