Entwicklung hochspezifischer radioimmunometrischer Methoden zur Bestimmung von Human-β-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Kornelia Hell

aus Marbach am Neckar

Gießen 2000

Aus der Medizinischen Betriebseinheit
Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie
Leiter: Prof. Dr. H. Schmidt
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Teschemacher
Gutachter: Prof. Dr. Dr. Katz

Tag der Disputation: 27. März 2002

Meinen Eltern
mit herzlichem Dank

INHALTSVERZEICHNIS

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

1.	**EINFÜHRUNG**	1
1.1.	**Opioide und Opioidrezeptoren**	1
1.2.	**Opioidpeptide**	2
1.3.	**β_H-Endorphin und seine Fragmente**	2
1.3.1.	**Struktur**	2
1.3.2.	**Vorkommen im Organismus des Menschen**	4
1.3.3.	**Biogenese**	4
1.3.4.	**Physiologische Bedeutung**	5
1.3.5.	**Nachweis**	7
1.3.5.1.	Immunoradiometrische Bestimmungsmethoden	7
1.3.5.2.	Bestimmung von β-Endorphin und β-Endorphin-immuno-reaktivem Material	10
1.3.6.	**Vorkommen in Blutleukozyten: Pro und Kontra**	13
2.	**AUFGABENSTELLUNG**	15
3.	**MATERIAL**	17
3.1.	**Chemikalien, Reagenzien und Testsubstanzen**	17
3.2.	**Pufferlösungen und Kulturmedien**	19
3.3.	**Geräte und Zubehör**	20
3.4.	**Software für Personal Computer**	22
4.	**METHODEN**	23
4.1.	**Antikörper und Peptide**	23
4.1.1.	**Gewinnung von polyclonalen Antiseren gegen die C-Termini von β-Endorphinfragmenten**	23
4.1.1.1.	C-terminale β-Endorphinfragmente (Antigene zur Gewinnung polyclonaler Antiseren)	23
4.1.1.2.	Kopplung von Trägerprotein und β-Endorphinfragment	23
4.1.1.3.	Immunisierung	24
4.1.1.4.	Blutentnahmen	24
4.1.1.5.	Herstellung radioaktiv markierter Peptide	24
4.1.1.6.	Titerbestimmung mittels Fluid-Phase-One-Site-RIA	25
4.1.1.7.	Aufbewahrung der Antiseren	27

4.1.1.8.	Reinigung der Antiseren mittels Protein A-Sepharose	27
4.1.1.8.1.	Vorbereitung der Säule	27
4.1.1.8.2.	Durchführung der Fraktionierung	28
4.1.1.8.3.	Proteinbestimmung nach Bradford	28
4.1.1.8.4.	Dialyse	28
4.1.2.	**Antikörper gegen den N-Terminus von β_H-Endorphin**	29
4.1.2.1.	Eigenschaften des Antikörpers	29
4.1.2.2.	Radioaktive Markierung des Antikörpers	29
4.2.	**Zur Entwicklung spezifischer Bestimmungsmethoden für β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26) eingesetzte Radioimmunoassay-Varianten**	29
4.2.1.	**Solid-Phase-One-Site-Radioimmunoassay (SPOS-RIA)**	30
4.2.1.1.	Prinzip	30
4.2.1.2.	Durchführung	30
4.2.2.	**Solid-Phase-Two-Site-Radioimmunoassay (SPTS-RIA)**	32
4.2.2.1.	Prinzip	32
4.2.2.2.	Durchführung	33
4.2.3.	**Fluid-Phase-Immunoprecipitation-One-Site-Radioimmunoassay (FPIOS-RIA)**	34
4.2.3.1.	Prinzip	34
4.2.3.2.	Durchführung	34
4.2.4.	**Fluid-Phase-Immunoprecipitation-Two-Site-Radioimmunoassay (FPITS-RIA)**	36
4.2.4.1.	Prinzip	36
4.2.4.2.	Durchführung	36
4.3.	**Charakterisierung der entwickelten Methoden**	39
4.3.1.	**Reproduzierbarkeit (inter-assay coefficient of variation)**	39
4.3.2.	**Präzision (intra-assay coefficient of variation)**	40
4.3.3.	**Nachweisgrenze (detection limit)**	40
4.3.4.	**Spezifität (cross reactivities)**	41
4.4.	**Bestimmung der Bindungsparameter K_D und B_{max} der Interaktionen von β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26) mit ihren Antikörpern**	44
4.4.1.	**Theoretische Grundlagen**	44
4.4.2.	**Bestimmung der spezifischen Aktivität der radioaktiv markierten Peptide**	46
4.4.3.	**Durchführung der Experimente**	50
4.4.4.	**Bestimmung der Bindungsparameter K_D und B_{max}**	51
4.5.	**Bestimmung von β_H-Endorphin (1-31) in Blutleukozyten**	54

4.5.1 Buffy coat-Präparationen 54
4.5.1.1. Präparation von mononuklearen Blutzellen (PBMC-Präparation) 54
4.5.1.2. Präparation von Lymphozyten und Monozyten 55
4.5.2. Stimulation von PBMC, Lymphozyten und Monozyten 56
4.5.2.1. Stimulation von PBMC-Zellsuspensionen mit Interleukin-1β und CRF 56
4.5.2.2. Stimulation von Lymphozyten- und Monozytenzellsuspensionen mit Interleukin-1β und CRF 58

5. ERGEBNISSE 59
5.1. Antikörper gegen den N-Terminus, das Mittelfragment und die C-Termini von β_H-Endorphinfragmenten 59
5.2. Methodenentwicklung 60
5.2.1. Entwicklung eines Solid-Phase-ONE-Site-Radioimmunoassay (SPOS-RIA) zum Nachweis von β_H-Endorphin (28-31) immunoreaktivem Material 60
5.2.1.1. Methodenentwicklung 61
5.2.1.2. Optimierte Methode 64
5.2.2. Entwicklung eines Solid-Phase-TWO-Site-Radioimmunoassay (SPTS-RIA) zum Nachweis von β_H-Endorphin (1-31) 67
5.2.2.1. Methodenentwicklung 67
5.2.2.2. Optimierte Methode 67
5.2.3. Entwicklung von Fluid-Phase-Immunoprecipitation-ONE-Site-Radioimmunoassays (FPIOS-RIAs) zum Nachweis von β_H-Endorphin (28-31), (24-27), und (23-26) immunoreaktivem Material 71
5.2.4. Entwicklung von Fluid-Phase-Immunoprecipitation-TWO-Site-Radioimmunoassays (FPITS-RIAs) zum Nachweis von β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26) 73
5.2.4.1. Methodenentwicklung 73
5.2.4.2. Optimierte Methode 81
5.3. Charakteristika der entwickelten Methoden 86
5.3.1. Solid-Phase-ONE-Site-Radioimmunoassay (SPOS-RIA) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (28-31) immunoreaktivem Material 86
5.3.1.1. Reproduzierbarkeit (inter-assay coefficient of variation) 86
5.3.1.2. Präzision (intra-assay coefficient of variation) 86
5.3.1.3. Nachweisgrenze (detection limit) 86
5.3.1.4. Spezifität (cross reactivities) 87

5.3.2. Solid-Phase-TWO-Site-Radioimmunoassay (SPTS-RIA) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-31) 91
5.3.2.1. Reproduzierbarkeit (inter-assay coefficient of variation) 91
5.3.2.2. Präzision (intra-assay coefficient of variation) 91
5.3.2.3. Nachweisgrenze (detection limit) 91
5.3.2.4. Spezifität (cross reactivities) 91
5.3.3. Fluid-Phase-Immunoprecipitation-TWO-Site-Radioimmuno-assay (FPITS-RIA) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-31) 94
5.3.3.1. Reproduzierbarkeit (inter-assay coefficient of variation) 94
5.3.3.2. Präzision (intra-assay coefficient of variation) 94
5.3.3.3. Nachweisgrenze (detection limit) 94
5.3.3.4. Spezifität (cross reactivities) 94
5.3.4. Fluid-Phase-Immunoprecipitation-TWO-Site-Radioimmuno-assay (FPITS-RIA) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-27) 97
5.3.4.1. Reproduzierbarkeit (inter-assay coefficient of variation) 97
5.3.4.2. Präzision (intra-assay coefficient of variation) 97
5.3.4.3. Nachweisgrenze (detection limit) 97
5.3.4.4. Spezifität (cross reactivities) 97
5.3.5. Fluid-Phase-Immunoprecipitation-TWO-Site-Radioimmuno-assay (FPITS-RIA) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-26) 100
5.3.5.1. Reproduzierbarkeit (inter-assay coefficient of variation) 100
5.3.5.2. Präzision (intra-assay coefficient of variation) 100
5.3.5.3. Nachweisgrenze (detection limit) 100
5.3.5.4. Spezifität (cross reactivities) 100
5.4. Bindungsparameter K_D und B_{max} der Interaktionen zwischen β_H-Endorphin (1-31), (1-27) bzw. (1-26) und den an ihren C-Termini angreifenden Antikörpern in verschiedenen Assay-Systemen 105
5.4.1. Spezifische Aktivitäten der radioaktiv markierten Peptide 105
5.4.2. Bindungsparameter K_D und B_{max} 105
5.4.2.1. Graphische Darstellung der Bindungsdaten aus Tracer-sättigungs- und Tracerverdrängungsexperimenten in verschiedenen Assaysystemen 105
5.4.2.2. Vergleich der K_D- und B_{max}-Werte aus verschiedenen Assaysystemen 112
5.5. Untersuchungen zu Vorkommen und Biosynthese von β_H-Endorphin (1-31) in Blutleukozyten 114
5.5.1. Periphere mononukleare Blutzellen (PBMC) 114
5.5.2. Lymphozyten und Monozyten 121

6.	**DISKUSSION**	122
6.1.	**Antikörper**	122
6.1.1.	**Polyclonale Antiseren**	122
6.1.2.	**Monoclonaler Antikörper**	123
6.2.	**Entwickelte Nachweismethoden**	123
6.2.1.	**Solid-Phase-ONE-Site-Radioimmunoassay (SPOS-RIA) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (28-31) immunoreaktivem Material**	123
6.2.2.	**Solid-Phase-TWO-Site-Radioimmunoassay (SPTS-RIA) zur Bestimmung von authentischem β_H-Endorphin (1-31)**	128
6.2.3.	**Fluid-Phase-Immunoprecipitation-TWO-Site-Radioimmunoassays (FPITS-RIAs) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26)**	130
6.3.	**Bindungsparameter K_D und B_{max} der Interaktionen zwischen β_H-Endorphin (1-31), (1-27) bzw. (1-26) und den an ihren C-Termini angreifenden Antikörpern in verschiedenen Assaysystemen**	132
6.3.1.	**Spezifische Aktivitäten der radioaktiv markierten Peptide (Tracer)**	132
6.3.2.	**Bestimmung von K_D und B_{max} für die verschiedenen Assaysysteme**	133
6.3.3.	**K_D-Werte für die Interaktion zwischen β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26) und den an ihren C-Termini angreifenden Antikörpern 10P, 67P und 63P in den entwickelten Radioimmunoassays**	134
6.3.4.	**Bindungskapazitäten (B_{max}) der entwickelten Radioimmunoassays**	135
6.4.	**Bestimmung von authentischem β_H-Endorphin (1-31) in Blutleukozyten**	137
6.4.1.	**Wertung spezifischer und unspezifischer Nachweismethoden**	137
6.4.2.	**Einsatz des Fluid-Phase-Immunoprecipitation-TWO-Site-Radioimmunoassay (FPITS-RIA) zur Bestimmung von authentischem β_H-Endorphin (1-31) in bisher durchgeführten Studien**	139
6.4.2.1.	Präparation von Buffy coats (BC)	139
6.4.2.2.	Konzentration von authentischem β_H-Endorphin (1-31) in Buffy coat-Präparationen	139

6.5. Bewertung des neuentwickelten FPITS-RIA zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-31) 141

7. ZUSAMMENFASSUNG 142

8. LITERATURVERZEICHNIS 147

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	-	Abbildung
Ac	-	Acetyl
ACTH	-	Adrenocorticotropes Hormon
AK	-	Antikörper
ANP	-	Atriales natriuretisches Peptid
Aqua bidest.	-	Aqua bidestillata
B_0		Nullstandard
BC	-	Buffy coat
BL	-	Blank
B_{max}	-	maximal erreichbare Bindung (Konzentration an Bindungsstellen, Bindungskapazität)
BSA	-	Bovines Serumalbumin
°C	-	Grad Celsius
CB	-	Coating buffer
Ci	-	Curie
cm	-	Zentimeter
cpm	-	Counts per minute (gemessene Zerfälle eines Radio-isotops pro Minute)
CRF	-	Corticotropin releasing factor
CT	-	Total counts, insgesamt eingesetzte Radioaktivität pro Ansatz
DMEM	-	Dulbecco´s modified Eagle´s Medium
dpm	-	Desintegrations per minute (tatsächliche Zerfälle eines Radioisotops pro Minute)
EDTA	-	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	-	Enzym-linked immunosorbent assay
β_H-End	-	Human-β-Endorphin
β_H-Endorphin	-	Human-β-Endorphin
f	-	10^{-15}, femto
FPIOS-RIA	-	Fluid-Phase-Immunoprecipitation-ONE-Site Radio-immunoassay
FPITS-RIA	-	Fluid-Phase-Immunoprecipitation-TWO-Site-Radio-immunoassay
FPOS-RIA	-	Fluid-Phase-ONE-Site-Radioimmunoassay
FP-RIA	-	Fluid Phase Radioimmunoassay
g	-	Gramm oder Erdbeschleunigung
GARGG	-	Goat-Anti-Rabbit-Immunglobulin G
h	-	Stunde
HPLC	-	High performance liquid chromatography
IgG	-	Immunglobulin G
Il-1	-	Interleukin-1
Il-1β	-	Interleukin-1β
IRM	-	immunoreaktives Material
^{125}Jod, ^{125}I	-	radioaktives Jodisotop
K_D	-	Dissoziationskonstante
kg	-	Kilogramm
KHz	-	Kilohertz
Kon A	-	Konkanavalin A
l	-	Liter

β-LPH	-	β-Lipotropin
LPS	-	Lipopolysaccharide
M	-	Molar (molare Konzentration, Mol/l)
m	-	Meter oder 10^{-3}, Milli
μ	-	10^{-6}, Mikro
min	-	Minute
Mio	-	Million
ml	-	Milliliter
mm	-	Millimeter
mRNA	-	Messenger-Ribonucleinsäure
MSH	-	Melanozyten-stimulierendes Hormon
MW	-	Mittelwert
MWP	-	Monozytenwaschpuffer
n	-	10^{-9}, Nano
n.g.	-	nicht genannt
ng	-	Nanogramm
NRS	-	Normal Rabbit Serum
NWG	-	Nachweisgrenze
p	-	10^{-12}, pico
PBMC	-	periphere mononukleare Blutzellen
PBS	-	Phosphate-buffered saline (phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung)
pH	-	Potencia hydrogenii (negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
PHA	-	Phytohämagglutinin
polyclon.	-	polyclonal
POMC	-	Proopiomelanocortin
RA	-	Reaktionsansatz
RIA	-	Radioimmunoassay
RT	-	Raumtemperatur
s	-	Standardabweichung
SPOS-RIA	-	Solid-Phase-ONE-Site-Radioimmunoassay
SPTS-RIA	-	Solid-Phase-TWO-Site-Radioimmunoassay
TS	-	Tracersättigungskurve
TS-IEMA	-	Two-Site immunoenzymometric assay
TS-IRMA	-	Two-Site immunoradiometric assay
TV	-	Totalverdränger
TVK	-	Tracerverdrängungskurve
v	-	volume
V	-	Variationskoeffizient
VP	-	Vasopressin
V_r	-	relativer Variationskoeffizient
w	-	weight
$\bar{x}$	-	Mittelwert
ZKL	-	Zellkulturlabor

Aminosäuren:

Ala	-	Alanin
Asn	-	Asparagin
Gln	-	Glutamin
Glu	-	Glutamat
Gly	-	Glycin
Ile	-	Isoleucin
Leu	-	Leucin
Lys	-	Lysin
Met	-	Methionin
Phe	-	Phenylalanin
Pro	-	Prolin
Thr	-	Threonin
Tyr	-	Tyrosin
Val	-	Valin

1. EINFÜHRUNG

1.1. Opioide und Opioidrezeptoren

Opium, der eingetrocknete Milchsaft der Fruchtkapsel des Schlafmohns (papaver somniferum), wurde erstmals in den Schriften des Theophrastus im 3. Jahrhundert vor Christus erwähnt [Brownstein, 1993]. Das Wort Opium leitet sich von dem griechischen Wort für Saft ab. Opium enthält ca. 25 verschiedene Alkaloide; die Hauptalkaloide sind Morphin (3 - 23%), Codein (0,3 - 3%), Narcotin (2 - 12%) und Papaverin (1%) [Ditzel, 1983]. Morphin nimmt hierbei den Hauptanteil ein. Die Anwendung von Opium war schon arabischen Ärzten vertraut, welche es hauptsächlich aufgrund seiner antidiarrhoischen Wirkung einsetzten.

Paracelsus (1493 - 1541) wird zugeschrieben, die Verwendung von Opium in Europa eingeführt zu haben. 1804 isolierte der Paderborner Apotheker Friedrich Wilhelm Sertüner erstmals aus dem Saft des Schlafmohns die analgetisch und antidiarrhoisch wirkende Substanz und benannte sie nach dem griechischen Gott der Träume, Morpheus, „Morphin“. 1925 wurde die Strukturformel des Morphins durch Gulland und Robinson erstmals beschrieben, Gates und Tschudi gelang dann 1952 die erste Synthese. Eckenholf et al. verwendeten 1951 Nalorphin als Antidot bei Morphinvergiftungen, nachdem gezeigt werden konnte, daß Nalorphin die Morphin-Wirkung antagonisierte. Die Tatsache, daß die analgetische Opiatwirkung durch spezifische Antagonisten dosisabhängig gehemmt wurde, ließ vermuten, daß die Opiatwirkung über spezifische Opiatrezeptoren ausgelöst wurde [Teschemacher, 1987]. Tatsächlich konnten 1973 drei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander den Nachweis dieser Rezeptoren im ZNS von Säugetieren erbringen [Pert und Snyder, 1973; Simon et al., 1973; Terenius, 1973]. Die Isolierung der Opiatrezeptoren gelang 1980 durch Rüegg et al., des weiteren gelang der Nachweis mehrerer Rezeptortypen und -subtypen, an welche die Opiate mit unterschiedlicher Affinität binden [Übersicht bei Paterson et al., 1983; Akil et al., 1984; Teschemacher, 1987]. Die Opiatrezeptoren werden unterteilt in μ-, δ- und κ-Rezeptoren, die sich wiederum in die Subtypen wie μ_1- und μ_2-Rezeptoren unterteilen lassen. Als weiterer Rezeptor wird der ε-Rezeptor erwähnt [Herz, 1986]. Mittlerweile spricht man von **Opioidrezeptoren**, an welche sowohl Opiate als auch Opioidpeptide (s.u.) binden [Simon und Hiller, 1994]. Klinische Relevanz haben die Opiate aufgrund ihrer analgetischen, antitussiven und antidiarrhoischen Wirkung. Sie gehören auch heute noch zu den wichtigsten Medikamenten bei der Therapie schwerer Schmerzzustände.

1.2. Opioidpeptide

Mit dem Nachweis von spezifischen Opiatrezeptoren 1973 begann eine intensive Suche nach endogenen Liganden, die von den Opiatrezeptoren gebunden werden. Tatsächlich konnten 1975 die ersten einer ganzen Reihe endogener Opioide, die Enkephaline, im Gehirn von Säugetieren nachgewiesen werden [Hughes, 1975]. Die bis jetzt nachgewiesenen endogenen Opioide sind größtenteils Peptide. Ihr N-Terminus wird durch die Aminosäuresequenz Tyr-Gly-Gly-Phe gebildet und ist der opiataktive Anteil des Peptids, welcher mit den Opioidrezeptoren interagiert. Eine Acetylgruppe an der N-terminalen Aminogruppe des Tyrosins blockiert die Interaktion mit Opioidrezeptoren [Höllt, 1986; Teschemacher, 1987]. Von diesen „typischen" endogenen Opioiden (Opioidpeptiden) werden mittlerweile einige Randgruppen als „atypische" Opioidpeptide abgegrenzt. Es handelt sich z.B. um β-Casomorphine, Fragmente des Milchproteins β-Casein [Brantl et al., 1979; Teschemacher, 1987] oder um Dermorphine, nachgewiesen in der Haut von Amphibien [Broccardo et al., 1981]. Sie besitzen nicht die „typische" N-terminale Aminosäuresequenz, aber Opioidaktivität.

Die „typischen" endogenen Opioidpeptide werden durch enzymatische Spaltung aus drei verschiedenen Vorläuferproteinen („precursors") herausgespalten. Es handelt sich hierbei um Proenkephalin, Prodynorphin und Proopiomelanocortin (POMC).

Pro-Enkephalin enthält die Sequenzen der Enkephaline, Prodynorphin die der Dynorphine. Aus Proopiomelanocortin werden neben den Endorphinen auch die Hypophysenhormone ACTH (Adrenocorticotropes Hormon), MSH (Melanozyten-stimulierendes Hormon) und β-LPH (β-Lipotropin) freigesetzt [Höllt, 1986; Simon und Hiller, 1993; Young et al., 1993].

1.3. β_H-Endorphin und seine Fragmente

1.3.1. Struktur

Das Opioidpeptid β-Endorphin besteht aus 31 Aminosäuren und wird aus POMC abgespalten. Die Aminosäuresequenzen von β_H-Endorphin (1-31) und seinen Fragmenten β_H-Endorphin (1-27), β_H-Endorphin (1-26), β_H-Endorphin (1-17) und β_H-Endorphin (1-16) sind in Abb. 1.1 dargestellt.

Die Aminosäuresequenz von β_H-Endorphin (1-31) kann nach Kaiser und Kézdy (1984) und König (1993) in drei Fragmente mit unterschiedlicher Struktur bzw. Funktion aufgegliedert werden:

1. ein sehr spezifischer, den Opioidrezeptor erkennender N-Terminus (Aminosäurereste 1-5); er ist identisch mit [Met^5]-Enkephalin
2. eine hydrophile Spacerregion (Aminosäurereste 6 bis 12)

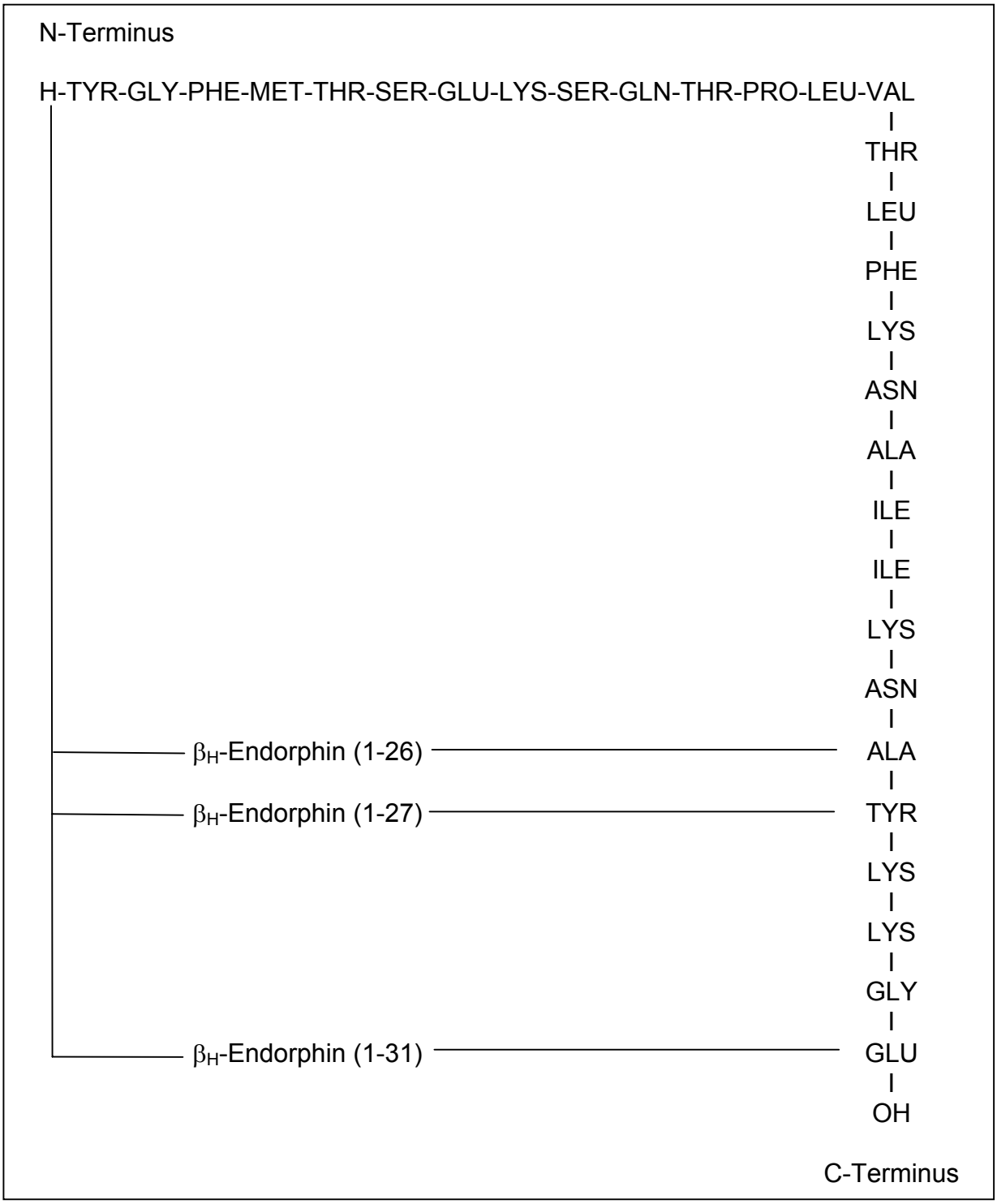


Abb. 1.1.: Aminosäuresequenz und Fragmente von β_H-Endorphin [aus Taylor et al., 1986 und Teschemacher, 1987]

3. eine Sequenz aus 16 Aminosäureresten zwischen Pro^{13} und Gly^{30}, welche in der Lage ist, eine amphiphile α- oder π-Helix zu formen.

Es wurde nachgewiesen, daß das N-terminale Ende für die analgetische Wirkung, das C-terminale Ende für die lipolytische Aktivität von β-Endorphin wichtig ist [König, 1993].

Vergleiche zwischen den Strukturen der β-Endorphine verschiedener Säugetierklassen haben gezeigt, daß die Gesamtlänge des Moleküls und die Aminosäuresequenzen der N-Termini gleich sind, sich im C-terminalen Abschnitt aber Unterschiede ergeben [Teschemacher, 1984; Taylor und Kaiser, 1986].

1.3.2. Vorkommen im Organismus des Menschen

Das 31 Aminosäurereste umfassende β_H-Endorphin war seit Entdeckung der „endogenen“ Opioidpeptide Gegenstand vieler Untersuchungen im Hinblick auf seine Lokalisation. Durch immunoradiometrische Nachweismethoden wurde β-Endorphin-immunoreaktives Material von vielen Arbeitsgruppen sowohl in humanen Geweben als auch im humanen Plasma nachgewiesen.

1976 gelang der Nachweis in der menschlichen Hypophyse [Li et al., 1976]. Des weiteren wurde immunoreaktives β_H-Endorphin im menschlichen Plasma [Höllt et al., 1979; Wiedemann, 1986; Gibson et al., 1993], in menschlichen Ovarien [Aleem et al., 1986], in Plazentaextrakten [Nakai et al., 1978], in fetalen Pancreaszellen [Hahn von Drosche et al., 1985 und 1992], in menschlichen Spermien [Singer et al., 1985] und in Zellen des menschlichen Immunsystems [Smith et al., 1985 und 1986; Sibinga und Goldstein, 1988; Kavelaars et al., 1989, 1990 und 1991; Sacerdote et al., 1990; Schäfer et al., 1994] gefunden.

Auch die β-Endorphin-Fragmente β_H-Endorphin (1-27) und (1-26) und ihre N-acetylierten Formen wurden in der Hypophyse und im Gehirn nachgewiesen [Zakarian und Smyth, 1982].

Bei Untersuchungen an jungen Männern wurde ein circadianer Rhythmus immunoreaktiver β-Endorphin-Konzentrationen im Plasma nachgewiesen, mit einer Höchstkonzentration am Morgen (6.00 Uhr) und der tiefsten Konzentration in der Nacht (24.00 Uhr); ältere Männer wiesen diesen Rhythmus nicht auf [Rolandi et al., 1987].

1.3.3. Biogenese

Das POMC-Gen besteht, wie heute bekannt ist, aus drei Exons, welche durch zwei Introns voneinander getrennt sind (siehe Abb. 1.2). Das erste Exon ist ca. 100 Nucleotide lang und enthält den 5´-untranslatierten Abschnitt der POMC mRNA. Das zweite Exon besteht aus ca. 150 Nukleotiden und codiert neben einem kleinen Anteil

der 5´-untranslatierten Sequenz für das Signalpeptid und die ersten 18 Aminosäuren des POMC. Das dritte Exon codiert für den Rest des POMC mit den Sequenzen der biologisch aktiven Peptide ACTH, α-, β-, und γ-MSH, β-LPH und β-Endorphin. Der Hauptort für die POMC-Expression ist die Hypophyse, in deren korticotrophen und melanotrophen Zellen das POMC synthetisiert wird. Die Länge des POMC-Transkripts der Hypophyse beträgt ungefähr 1200 Nukleotide, das POMC-Molekül besteht aus 267 Aminosäuren. POMC wird posttranslational durch enzymatische Vorgänge in seine biologisch aktiven Fragmente wie z.B. β-Endorphin, das aus 31 Aminosäuren bestehende C-terminale Fragment des POMC, aufgespalten. Durch weitere Abspaltungen am β-Endorphin (1-31)-Molekül entstehen die Fragmente β-Endorphin (1-27), (1-26), (1-17) und (1-16). β-Endorphin (1-31) und die hieraus abgeleiteten Fragmente können N-terminal acetyliert werden, verlieren hierdurch jedoch ihre Opioidaktivität [DeBold et al., 1988; Oates et al., 1988; van Woudenberg, 1990; Loh, 1992; Bertagna, 1994]

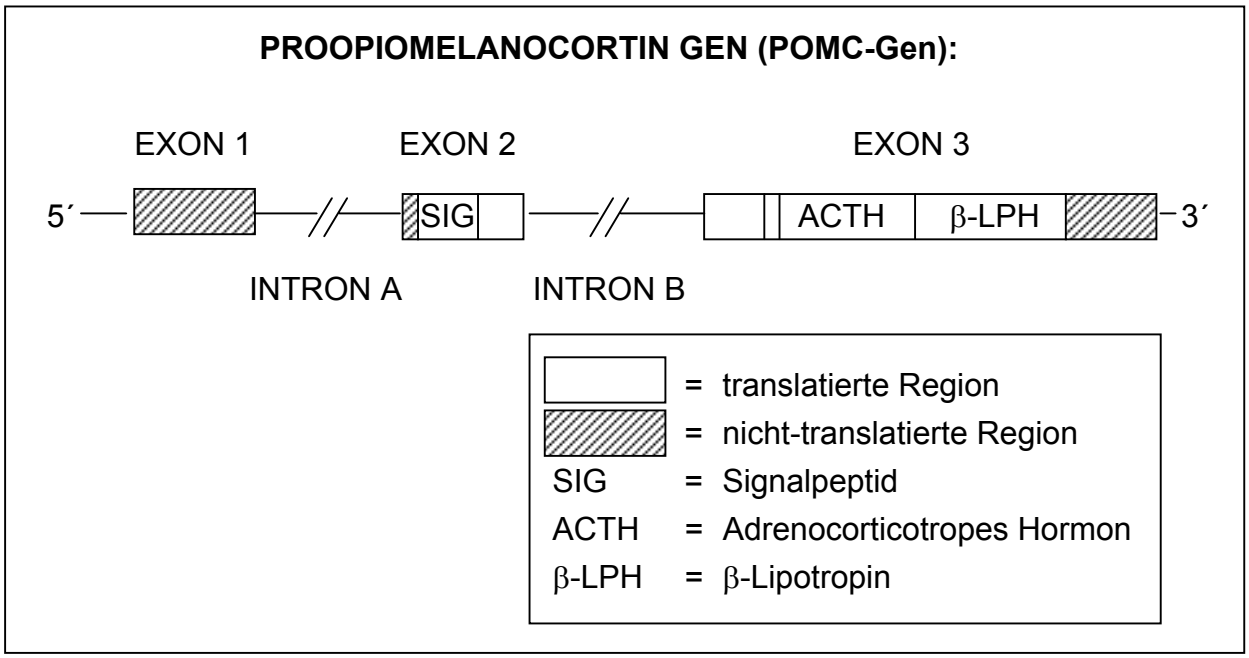


Abb. 1.2.: POMC-Gen und Transkripte [nach Oates et al., 1988; van Woudenberg, 1991]

1.3.4. Physiologische Bedeutung

Nach Entdeckung der Opioidrezeptoren und der endogenen Opioide wurden durch intensive Forschung viele Informationen zu deren Biosynthese, Struktur, Verteilung und Lokalisation gewonnen. Bezüglich der physiologischen Bedeutung sind zwar ebenfalls Fortschritte erzielt worden, aber prinzipiell konnte die Funktion der Endorphine bis jetzt nicht geklärt werden.

Hinweise auf Funktionen des β-Endorphins:

Opioidpeptide und Opioidrezeptoren des menschlichen Organismus werden als opioidpeptiderge Systeme verstanden. Den Opioidpeptiden und insbesondere dem β-Endorphin werden u.a. Hormon- und Neurotransmitterfunktionen zugeschrieben [Teschemacher, 1987]. Die Beeinflussung von Funktionen des Säugerorganismus durch β-Endorphin als Komponente opioidpeptiderger Systeme erscheint möglich. Zu diesen Funktionen zählen Schmerzverarbeitung, Regulation der Atmung, kardiovaskuläre Regulation, Aufnahme und Verwertung von Nährstoffen, Thermoregulation, endokrine und neuroendokrine Steuermechanismen, Steuerung von Verhaltensmustern und intellektuellen Leistungen sowie immunoregulatorische Funktionen [Teschemacher, 1987]. Übersichten über die vermutete physiologische Bedeutung finden sich bei Olson et al. (1980), König (1983), Akil (1984), Olson et al. (1988) und Dockray (1994).

Nachgewiesene Wirkungen des β_H-Endorphins:

Die analgetische Wirkung ist das Hauptmerkmal von β_H-Endorphin (1-31). Sie wurde am häufigsten gezeigt.

Die biologische Aktivität von β-Endorphin (1-31), welches die stärkste analgetisch wirkende natürliche Substanz darstellt [Bradbury, 1976; Van Ree et al., 1976; Deakin et al., 1980; Oyama et al., 1980; Zakarian und Smyth, 1982], ist abhängig von der Integrität seiner chemischen Struktur. Schon der Verlust des Tyrosin-Aminosäurerestes am N-terminalen Fragment führt zu einem Verlust der Opioidrezeptorbindungsfähigkeit. Verlust der vier C-terminalen Aminosäurereste führt zur Bildung von β-Endorphin (1-27), welches nur noch geringe analgetische Wirkung [Deakin et al., 1980; Akil et al., 1981; Frederickson und Geary, 1982; Zakarian und Smyth; 1982; König, 1993] besitzt bzw. sogar die durch β-Endorphin (1-31) hervorgerufene Analgesie antagonisieren kann [Hammonds, 1984; Hirsch und Millington, 1991; Loh, 1992; König, 1993].

Die analgetische Wirkung von β-Endorphin (1-31) nimmt durch Abspaltung des C-terminalen Tetrapeptids ab, die Beeinflussung der zentralen Kardioregulation nimmt jedoch zu, wie durch intracisternale Applikation von β-Endorphin (1-27) mit nachfolgender Senkung des arteriellen Mitteldruckes bewiesen wurde [Hirsch und Millington, 1991; Loh, 1992].

N-acetylierte Formen von β-Endorphin (1-31) und seinen Fragmenten wiesen keine Opioidaktivität auf [Deakin et al., 1980; Akil et al., 1981; Zakarian und Smyth, 1982; Hirsch und Millington, 1991; Loh, 1992].

Eine Opioidaktivität besteht auch für die β-Endorphin-Fragmente (1-17) und (1-16), welche jedoch durch eine separate Klasse von Non-Opioid-Rezeptoren vermittelt werden soll [Loh, 1992].

Bedeutung der verschiedenen Sequenzabschnitte von β-Endorphin:
Das N- und das C-terminale Fragment von β-Endorphin sind für verschiedene Wirkungen verantwortlich. Die vier Aminosäuren umfassende N-terminale Sequenz Tyr-Gly-Gly-Phe bindet an Opioidpeptidrezeptoren und ist für die opiatartige Wirkung verantwortlich [Bradbury, 1976; Teschemacher, 1987; König, 1993]. Der N-Terminus von β-Endorphin (1-31) ist gegenüber enzymatischem Abbau stabiler als derjenige seiner Fragmente, was auf eine spezielle Molekülkonformation zurückgeführt wird [Austen und Smyth, 1977]. Acetylierung des N-terminalen Fragments führt zu einem Verlust der Opiatwirkung durch Blockierung der Interaktion mit dem Opioidrezeptor. Der Verlust des N-terminalen Tyrosin-Aminosäurerests verhindert bereits die Interaktion mit dem Opioidrezeptor [Gramsch et al., 1983]. Das C-terminale Fragment bestimmt die Potenz der Opiatwirkung am Opioidrezeptor. Fehlt das C-terminale Tetrapeptid, wird die analgetische Wirkung schwächer [Deakin et al., 1980]. Das C-terminale Fragment von β-Endorphin bindet auch an sogenannte Non-Opioid-Rezeptoren auf Membranen immunkompetenter Zellen [Teschemacher, 1987] und an beide terminale Komplexe des menschlichen Komplements [Schweigerer et al., 1982; Hildebrand et al., 1989]. Des weiteren steigert es die Melanotropin-Wirkung [Carter et al., 1979].

1.3.5. Nachweis

Eine wichtige Methode, Informationen über die Funktion von β-Endorphin zu gewinnen, ist die Suche nach Korrelationen zwischen bestimmten Stimuli (z.B. Streß) und der β-Endorphinkonzentration im Plasma. Hieraus ergibt sich die Dringlichkeit der Bestimmung eindeutig definierter Sequenzen (N-, C-Terminus etc.) des β-Endorphin-Moleküls inclusive des Gesamtmoleküls, denn eindeutig definierte Parameter sind unabdingbare Voraussetzungen einer Korrelatfindung und somit einer klaren Aussage über Vorkommen und Bedeutung der β-Endorphine im menschlichen Organismus.

1.3.5.1. Immunoradiometrische Bestimmungsmethoden

Immunometrische Nachweismethoden sind mittlerweile aus der medizinischen Diagnostik, Mikrobiologie, Immunologie, Biochemie und vielen anderen Forschungsbereichen nicht mehr wegzudenken. Durch Nutzung von Antigen-Antikörper-Reaktionen gelingt die Erstellung sensitiver und spezifischer Nachweismethoden und hiermit der quantitative Nachweis von vielen, oft in sehr geringen Konzentrationen vorkommenden, biologisch aktiven Substanzen, bevorzugt in menschlichen Flüssigkeiten (Plasma/Serum), seltener in Geweben [Ekins, 1980]. In den letzten zwei Jahrzehnten wurden unterschiedliche Assaysysteme entwickelt, die durch

Verwendung unterschiedlicher Signalgeber (z.B. Radioisotope, Enzyme, fluoreszierende Substanzen) zum Nachweis der gesuchten Substanz führen. (Übersicht über Immunoassaysysteme bei Chard (1990) und Butler (1991)).
Unterschiede zwischen einzelnen immunometrischen Nachweismethoden ergeben sich bezüglich Prinzip und Durchführung. So ist die Anzahl der verwendeten Antikörper (ein oder zwei Antikörper), die Art des Signalgebers, der Ort der Antigen-Antikörper-Reaktionen (flüssige Phase, feste Phase), die Art der Reaktion von Antigen und Antikörper (kompetitiv oder nicht-kompetitiv) und die Art der Trennung von gebundenem und nicht gebundenem Antigen (Kohlefällung, Auswaschen, Immunpräzipitation) von Bedeutung - zum einen für die Einordnung der Nachweismethode, zum anderen für ihre Sensitivität und Spezifität.

Fluid-Phase-One-Site RIA

Fluid-Phase-Radioimmunoassays (FP-RIAs) werden als „klassische“ Radioimmunoassays bezeichnet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sie zur Verdeutlichung ihres Prinzips als Fluid-Phase-One-Site-Radioimmunoassays (FPOS-RIAs) bezeichnet, da nur ein Antikörper verwendet wird, das Antigen also nur über eine „Bindungsstelle“ mit einem Antikörper reagiert (im Vergleich zu Two-Site-RIAs). Das Prinzip dieses RIA beruht darauf, daß die Bindung einer konstanten Menge an radioaktiv markiertem Antigen („labelled antigen immunoassay“, [Chard, 1990]) an eine konstante Menge an Antikörper durch eine variable Menge an nicht markiertem Antigen (Standard oder Probe) kompetitiv gehemmt wird. Das Ausmaß dieser Hemmung wird als Maß für die Menge des zugegebenen nicht-markierten Antigens, ggf. in der Probe, verwendet [Roitt; 1988]. Da nur ein Antikörper verwendet wird, beinhaltet diese Methode einen wichtigen Nachteil. Es wird nur eine Antikörper-Determinante bzw. ein Epitop des Antikörpers auf dem Antigen nachgewiesen; Substanzen mit der gleichen Determinante können durch Kreuzreaktivität mit dem Antikörper eine zu hohe Konzentration der eigentlich nachzuweisenden Substanz, d.h. ein falsch positives Ergebnis, ergeben. Das bedeutet, daß die mit einem FPOS-RIA nachgewiesene Immunoreaktivität nicht mit der tatsächlichen Konzentration des nachzuweisenden Antigens übereinstimmen muß. Deshalb werden häufig vor der Durchführung eines FPOS-RIA Extraktions- und Chromatographieverfahren zur Entfernung kreuzreagierender Substanzen eingesetzt. Hierdurch geht allerdings häufig auch ein Teil der nachzuweisenden Substanz verloren [Nyberg et al., 1987].
Einen weiteren Nachteil stellt die mögliche Veränderung der Affinität des Antikörpers zu seinem Antigen durch dessen Jodierung dar [Chard, 1990].

Solid-Phase-One-Site-RIA

Im Gegensatz zu FPOS-RIAs ist bei einem Solid-Phase-Radioimmunoassay ein Bindungspartner an eine feste Phase (Oberfläche von Röhrchen, Mikrotiterplatten oder Kügelchen) gebunden. Dem Assayprinzip entsprechend wird bei Verwendung eines Antikörpers von einem Solid-Phase-One-Site-Radioimmunoassay (SPOS-RIA), gesprochen.

Beim Nachweis eines Antigens mit einem SPOS-RIA wird wie beim FPOS-RIA das kompetitive Bindungsprinzip angewendet. Ein nicht markiertes und ein radioaktiv markiertes Antigen konkurrieren um die Bindungsstellen am immobilisierten Antikörper. Bestimmung des gebundenen radioaktiv markierten Antigens nach Entfernung des nicht gebundenen Antigens ist auch hier ein Maß für die Konzentration an nachgewiesenem Antigen.

Als Nachteil der Immobilisierung von Antikörpern an Oberflächen erwies sich eine Veränderung des Antikörpers durch Adsorption und ein Verlust der Antikörper. Nach Bindung an eine feste Phase waren weniger als die Hälfte der in Lösung verfügbaren Bindungsstellen der Antikörper noch verfügbar [Butler et al., 1992].

Es wird davon ausgegangen, daß die stabile Bindung eines Antikörpers an eine feste Phase durch passive Adsorption infolge hydrophober Interaktionen zustande kommt [Butler et al., 1992].

Solid-Phase-Two-Site-RIA

Beim Nachweis eines Antigens durch einen Solid-Phase-Two-Site-RIA (SPTS-RIA) handelt es sich um ein nicht-kompetitives Bindungsprinzip, bei dem radioaktiv markierte Antikörper als Signalgeber verwendet werden [Ekins, 1980; Chard, 1980]. Durch Einsatz von zwei Antikörpern im Überschuß, von denen einer an eine feste Phase gebunden ist, wird das nachzuweisende Antigen, welches mindestens zwei unterschiedliche Epitope zur Bindung der beiden Antikörper aufweisen muß, gebunden. Hierdurch entstehen sogenannte „Sandwichkomplexe“, da sich das Antigen gebunden zwischen dem ersten, an eine feste Phase gebundenen Antikörper und dem zweiten, radioaktiv markierten Antikörper befindet.

Nach Entfernung des ungebundenen radioaktiv markierten Antikörpers wird die gebundene Radioaktivität gemessen. Sie verhält sich proportional zur Antigenkonzentration. Der Vorteil der SPTS-RIAs beruht darauf, daß sie eine höhere Spezifität aufweisen als FPOS- oder SPOS-RIAs, da der Antigennachweis durch zwei Antikörper, gerichtet gegen zwei verschiedene Abschnitte / Epitope des Antigenmoleküls, erfolgt [Schwarz et al., 1985; Chard, 1990].

Fluid-Phase-Two-Site-Immunoprecipitation-RIA

Eine weitere Form eines Two-Site-RIA stellt der Fluid-Phase-Immunoprecipitation-Radioimmunoassay (FPITS-RIA) dar. Sein Prinzip und seine Durchführung sind unter 4.2.4. dargestellt. Der Antigennachweis wird auch hier analog dem SPTS-RIA (nicht-kompetitiv) durch Ausbildung sogenannter Sandwich-Komplexe (1. Antikörper - Peptid - 2. (radioaktiv markierter) Antikörper) erreicht. Dies findet in flüssiger Phase statt, d.h. ohne Bindung eines Antikörpers an eine feste Phase. Durch Hinzufügen eines weiteren, dritten Antikörpers gegen den 1. Antikörper kommt es zur Immunpräzipitation und damit zur Trennung von gebundenem und nicht gebundenem radioaktiv markiertem Antikörper.

Die gemessene Radioaktivität verhält sich proportional zur Antigenkonzentration. Die Vorteile entsprechen z.T. denen des FPOS-RIA (die Antikörper sind frei zugänglich und es kommt zu keinem Antikörperverlust) und denen des SPTS-RIA (höhere Spezifität). Eine Übersicht über die Vor- und Nachteile des FPOS- und SPTS-RIA findet sich bei Scholl (1995).

1.3.5.2. Bestimmung von β-Endorphin und β-Endorphin-immunoreaktivem Material

Abhängig von dem Gewebe, in dem das POMC-Gen exprimiert wird, variiert die Anzahl der β-Endorphin-Derivate zwischen fünf und acht verschiedenen Peptiden [Smyth, 1983; Höllt, 1986; Lolait et al., 1986]. Da β-Endorphin in biologischen Geweben und Flüssigkeiten gemeinsam mit verschiedenen immunologisch verwandten Peptiden (Vorläufermoleküle wie β-LPH aber auch β-Endorphin-Fragmente und deren N-acetylierte Formen) vorkommt, ist es in der Vergangenheit mit den gängigen Methoden wie z.B. dem FPOS-RIA schwierig gewesen, eine Messung des Gehalts an authentischem β-Endorphin (1-31) in einer Probe durchzuführen.

Für die Durchführung der FPOS-RIAs wurden meist gegen das mittlere Fragment des β-Endorphins gerichtete Antikörper verwendet, welche eine Kreuzreaktivität mit den Vorläufermolekülen, den β-Endorphin-Fragmenten und den N-acetylierten Formen aufwiesen. Um die kreuzreagierenden Substanzen zu entfernen, wurde versucht, β-Endorphin durch verschiedene Extraktions- und Chromatographieverfahren wie z.B. Gelfiltration oder HPLC (high performance liquid chromatography) zu isolieren [Nyberg et al., 1987; Kramer, 1988]. Dies gelang, es kam hierbei aber auch immer zu einem Verlust an β-Endorphin. Trotz der Kombination aus Extraktionsverfahren und anschließendem RIA, wie von vielen Arbeitsgruppen angewendet [Laatikainen et al., 1985; Kramer, 1988; Bach et al., 1992] konnte hiermit nie das authentische β-Endorphin-Molekül nachgewiesen werden, sondern immer nur die Aminosäuresequenz, die von dem jeweilig eingesetzten Antikörper als

Epitop erkannt wurde. Der gleichzeitige Nachweis von kreuzreagierenden Substanzen war somit trotz Extraktionsverfahren möglich. Die tatsächlich vorhandene Menge an β-Endorphin in dem untersuchten Material konnte somit nicht exakt bestimmt werden. Aufgrund dessen wurde der Begriff des „immunoreaktiven β-Endorphins“ bzw. des „β-Endorphin-immunoreaktiven Materials“ eingeführt.
In den letzten Jahren wurde im Hinblick auf o.g. Problem der Bestimmung von authentischem β-Endorphin versucht, spezifischere Methoden mit nur geringer Kreuzreaktivität und hoher Sensitivität zu entwickeln. Sibinga und Goldstein (1988) forderten in Anbetracht der Misere der Nachweismethoden die präzise Bestimmung der Molekülform des Opioidpeptids durch Verwendung mehrerer (bis zu drei) Antikörper, um durch Erfassung verschiedener Epitope des Moleküls Kreuzreaktivitäten auszuschließen, und dadurch die physiologische Bedeutung von Opioidpeptiden im allgemeinen und von β-Endorphin im besonderen besser aufdecken zu können. Im Zuge dessen wurden zwar auch SPOS-RIAs, schwerpunktmäßig aber SPTS-RIAs entwickelt, da die Nachteile des FPOS-RIA prinzipiell auch für den SPOS-RIA gelten.
Tab. 1.1. zeigt eine Übersicht über die in der Literatur beschriebenen SPOS- und SPTS-RIAs zur Bestimmung von β-Endorphin. Von Sarma et al. (1986) wurde ein SPOS-ELISA beschrieben, welcher durch Bindung des β-Endorphins an Polystyrol-Platten gekennzeichnet war. Das gebundene β-Endorphin wurde durch einen ersten N-terminalen Antikörper und einen gegen den N-terminalen, mit Peroxidase-gekoppelten, zweiten Antikörper nachgewiesen. Die Spezifität des verwendeten N-terminalen Antikörpers wurde nicht genannt, da der N-Terminus aber bei allen β-Endorphinen und -Fragmenten gleich ist, ist das Verfahren als unspezifisch einzustufen.
Weitere Arbeitsgruppen haben SPTS-RIAs entwickelt, die z.T. einen C-terminal, z.T. einen N-terminal angreifenden Antikörper als ersten Antikörper an die feste Phase binden lassen; der zweite N- bzw. C-terminale Antikörper fungiert dann als radioaktiv markierter Signalantikörper. Die Spezifität in Form der Kreuzreaktivitäten werden z.T. nicht [Pasi et al., 1992] oder als nur gering bis nicht signifikant angegeben. Die jeweiligen Charakteristika der entwickelten Methoden sind der Tabelle 1.1 zu entnehmen.
Die der vorliegenden Literatur zu entnehmenden Informationen zeigten, daß es mit diesen Methoden zwar möglich war, eine gewisse Spezifität zu erreichen, der definitive Nachweis von authentischem β-Endorphin gelang jedoch nicht.

	Assay-Typ	Feste Phase	1. Antikörper / Antiserum gerichtet gegen:	2. Antikörper / Antiserum gerichtet gegen:	Nachweisgrenze(NWG) Präzision (Präz.) Reproduzierbarkeit (Rep.)	Kreuzreaktivität mit (in Prozent)	Nachweis in
Sarma et al. (1986)	OS-ELISA	Polystyrol-Platten	N-Terminus (β-Endorphin (4-7))	[Goat-anti-Rabbit IgG mit Peroxidase gekoppelt]	NWG: 10 pmol/well Präz.: n.g. Rep.: n.g.	n.g.	Plasma
Voellmy et al. (1988)	TS-IRMA	Nitro-cellulose-Scheiben	Fragment zwischen mittlerem Abschnitt und C-Terminus (polyclonales Antiserum)	N-Terminus (monoclonaler AK (3-E7), ^{125}I-markiert)	NWG: 10 fmol/100 µl Präz.: 14% Rep.: n.g.	β_H-Endorphin (100%) β_H-Endorphin (1-16) (100%) Met-Enkephalin (80%) Leu-Enkephalin (80%)	Gehirn, Hypophyse
Pasi et al. (1992)	TS-IEMA	Polystyrol-Mikrotiter-platten	C-Terminus (polyclonales Antiserum)	N-Terminus (monoclonaler Antikörper)	NWG: 2,4 fmol/200 µl Präz.: 8,3% Rep.: 10,8%	n.g.	Hirnstamm-regionen des Menschen
Han et al. (1992)	TS-IRMA	Avidin-beschichtete Matrix, n.g.	N-Terminus (monoclonaler Antikörper)	C-Terminus (Antikörper, ^{125}I-markiert)	NWG: 1,0 pg/ml Präz.: 3.9% Rep.: < 7%	Keine signifikante Kreuzreaktivität mit verwandten Peptiden angegeben	Blut
Gibson et al. (1993)	TS-IRMA	Sephacryl S-300	C-Terminus (β-Endorphin (18-27)) (monoclonaler Antikörper)	N-Terminus (β-Endorphin (1-5)) (monoclonaler Antikörper)	NWG: 1,7 pmol/l Präz.: 10% Rep.: 12,5%	keine nennenswerten Kreuzreaktivitäten angegeben	Plasma
Allégro, Nichols-Institute	SPTS-IRMA	Polystyrol Kugeln	n.g.	n.g.	NWG: 10 pg/ml Präz.: 4,4% Rep.: 7,7%	β-End (1-31) (100%) β-LPH (16%)	Serum oder Plasma

Tab 1.1.: Übersicht über Nachweismethoden zur Bestimmung von β-Endorphin
(NWG = Nachweisgrenze, Präzision / Intraassay-Variationskoeffizient, Reproduzierbarkeit / Interassay-Variationskoeffizient, n.g. = nicht genannt, OS-ELISA = one-site-enzyme-linked immunosorbent assay, TS-IRMA = two-site immunoradiometric assay, TS-IEMA = two-site immunoenzymometric assay, SPTS-IRMA = solid phase two-site immunoradiometric assay)

1.3.6. Vorkommen in Blutleukozyten: Pro und Kontra

Bei der Untersuchung der Biosynthese von Opioidpeptiden in Zellen des Immunsystems des Menschen konzentrierte man sich u.a. auf die Untersuchung der peripheren mononuklearen Blutzellen (PBMC) als Bildungsstätte und Reservoir für Abkömmlinge des POMC-Moleküls außerhalb der Hypophyse. Übersichten über die untersuchten Zellen und die nachgewiesenen Opioidpeptide finden sich bei Sibinga und Goldstein (1988), Teschemacher et al. (1990) und van Woudenberg (1991).

Pro:

Es gelang der Nachweis von POMC-Derivaten in bestimmten Situationen. So wurde beispielsweise β-Endorphin (1-17) (γ-Endorphin)-immunoreaktives Material in Lymphozyten des Menschen bei Infektion mit dem Newcastle Disease Virus nachgewiesen [Smith und Blalock, 1981]. β-Endorphin-Immunoreaktivität wurde bei LPS-induziertem Endotoxinschock in Blutlymphozyten nachgewiesen [Smith et al., 1985]. Van Woudenberg et al. gelang 1992 der Nachweis von β-Endorphin-Immunoreaktivität in Extrakten von PBMC (unstimuliert), allerdings in sehr geringer Konzentration. Verschiedene Arbeitsgruppen führten den Nachweis von β-Endorphin-Immunoreaktivität nach Stimulation von PBMC in vitro mit z.B. immunologischen und hormonellen Induktoren, so z.B. in CRF-stimulierten Leukozyten [Smith et al., 1986].
Kavelaars et al. (1989) wiesen in PBMC nach Stimulation mit CRF und Vasopressin (VP) die Bildung von β-Endorphin in der B-Lymphozyten-Population nach, welche durch die CRF- und VP-stimulierte Ausschüttung von Il-1 aus Monozyten vermittelt wurde. Die β-Endorphin-Produktion war durch Dexamethason hemmbar [Kavelaars et al., 1990a]. β-Endorphin-Immunoreaktivität wurde durch ein Antiserum (gerichtet gegen β-Endorphin (1-17) und einen Reverse Plaque forming cell assay (RPFC, ein immunologischer Test) nachgewiesen [Kavelaars et al., 1990a].
Der Nachweis von POMC mRNA in den peripheren mononuklearen Blutzellen galt ebenfalls als Indikator für die Synthetisierungsfähigkeit von β-Endorphin-immunoreaktivem Material. So wiesen Oates et al. (1988) POMC mRNA in mononuklearen Blutzellen nach Stimulation mit Phytohämagglutin nach, was durch Buzzetti et al. (1989) in Form des Nachweises einer verkürzten POMC mRNA (ca. 800 Nucleotide, Fehlen des Exon 1 und 2 und eines Stücks der 5´Region des Exon 3) in unstimulierten Zellen bestätigt werden konnte.

Kontra:

Durch van Woudenberg et al. (1992) wurde in Extrakten von unstimulierten PBMC, gewonnen aus Zellpräparationen von frischen Buffy coats mit Hilfe der Methode der Dichtegradientenzentrifugation unter Verwendung von Ficoll-Paque, β-Endorphin-Immunoreaktivität nachgewiesen, jedoch in nur sehr geringen Konzentrationen. Zum

Nachweis wurden Antiseren verwendet, welche gegen verschiedene Sequenzen des β-Endorphin (1-31)-Moleküls gerichtet waren (gegen die Aminosäuren 9-15, gegen C-terminale Aminosäuresequenzen von β-Endorphin (1-31), (1-17) und (1-16)); sie wiesen z.T. sehr hohe Kreuzreaktivitäten mit β-Endorphin -Vorläufern, -Fragmenten und N-acetylierten Formen auf.
Eine Stimulation der Zellen mit CRF und VP oder LPS (Lipopolysaccharid) ergab jedoch im Gegensatz zu den Ergebnissen o.g. Arbeitsgruppen keine Steigerung der β-Endorphin-Immunoreaktivität. Durch Stimulation der Zellen mit den Mitogenen Konkanavalin A (Kon A) und Phytohämagglutinin (PHA) konnte dies jedoch erreicht werden. Dies galt auch für die Subpopulationen β-, T-Lymphozyten und Monozyten.
Aufgrund der Tatsache, daß die gemessene β-Endorphin-Immunoreaktivität sowohl bei unstimulierten als auch bei stimulierten Zellen sehr gering ausfiel und, insbesondere eine uneffektive Stimulierung durch die Kombination von CRF und VP vorlag, stellte sich die Arbeitsgruppe um van Woudenberg et al. die Frage, ob die peripheren mononuklearen Blutzellen überhaupt über eine Kapazität zur Synthetisierung von POMC-abstammenden Peptiden verfügen. Diese Arbeitsgruppe zeigte 1991 und 1993, daß die POMC mRNA in voller Länge in mononuklearen Zellen des peripheren Blutes des Menschen zwar vorhanden ist, jedoch in so geringen Konzentrationen und nur nachweisbar nach Anwendung der PCR (polymerase chain reaction), daß aufgrund dieser Tatsache es eher unwahrscheinlich schien, daß das POMC-System der Lymphozyten eine endokrine Rolle bei der humoralen Informationsübertragung im Organismus des Menschen spielt (Übersicht über Nachweis von POMC mRNA in Zellen des Immunsystems bei van Woudenberg, 1991).
In Anbetracht der Diskrepanz der Befunde (zum einen Nachweis von β-Endorphin-immunoreaktivem Material in Zellen des peripheren Blutes des Menschen zum anderen Nachweis von verkürzter POMC mRNA und nur sehr geringen Konzentrationen an POMC mRNA in den Zellen des peripheren Blutes) stellt sich die Frage, inwieweit mit den verwendeten Assays zur Bestimmung von β-Endorphin-immunoreaktivem Material tatsächlich authentisches β-Endorphin nachgewiesen wurde. Wie oben z.T. dargestellt, wurden Antiseren mit hoher Kreuzreaktivität verwendet, so daß lediglich ein schlecht definiertes Peptidgemisch bestimmt werden konnte, jedoch kein authentisches β-Endorphin. Im Hinblick darauf scheint es dringend notwendig, hochspezifische Nachweismethoden für β-Endorphin zu entwickeln, um die physiologische Bedeutung von β-Endorphin soweit es im Plasma oder in Immunzellen vorhanden sein sollte, untersuchen zu können.

2. AUFGABENSTELLUNG

Trotz des in den letzten zwei Jahrzehnten gewonnenen Wissens über Biosynthese, Struktur, Vorkommen und Wirkung der endogenen Opioidpeptide bleiben viele Fragen hinsichtlich der physiologischen Bedeutung der Opioidpeptide offen. Eine Möglichkeit, Informationen über die physiologische Bedeutung von Opioidpeptiden zu gewinnen, besteht darin, nach Korrelationen bestimmter Stimuli mit Konzentrationen von Opioidpeptiden im Organismus, z.B. im Plasma zu suchen. Hierzu ist es nötig, die beteiligten Parameter eindeutig zu definieren. Für den Fall der β-Endorphin-Konzentration im Plasma wurde diese Bedingung bisher nicht erfüllt. Die der Literatur zu entnehmenden Informationen und Ergebnisse vieler Arbeitsgruppen basieren lediglich auf dem Nachweis von β-Endorphin-Immunoreaktivität und damit auf der Verwendung unspezifischer Methoden, mit denen ein Gemisch aus zehn und mehr Peptiden erfaßt wird. Die Ergebnisse und Aussagen über β-Endorphin sind somit kritisch zu betrachten.

Ziel dieser Arbeit war es, hochspezifische und hochempfindliche Nachweismethoden für den authentischen Nachweis von β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26) zu entwickeln. Hierfür war folgende Vorgehensweise vorgesehen:

1. Entwicklung von hochspezifischen Nachweismethoden zum Nachweis von β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26):

   Ein Fluid-Phase-One-Site-RIA zur Bestimmung von β_H-Endorphin-immunoreaktivem Material war bereits etabliert [Wiedemann et al., 1986, Kramer, 1988]. Hochspezifische Nachweismethoden für den Nachweis von β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26) waren in Form von Solid-Phase-One-Site- und Solid-Phase-Two-Site-Radioimmunoassays mit gereinigten Antiseren gegen die C-Termini o.g. Peptide mit Inkubationsvolumina von 50 und 200 µl im One-Site- und 50 µl im Two-Site-RIA (Durchführung in Mikrotiterplatten) entwickelt worden [Scholl, 1995].

   Diese Inkubationsvolumina waren gering und erlaubten somit nur das Einschleusen geringer Probenvolumina in die Nachweismethode. Es sollten daher hochspezifische Solid-Phase-One-Site- und Solid-Phase-Two-Site-RIAs mit größerem Inkubationsvolumen (1 ml) zur Untersuchung größerer Probenvolumina (und der damit verbundenen höheren Wahrscheinlichkeit des Nachweises von authentischem β_H-Endorphin) entwickelt werden.

   Auf die Entwicklung und Optimierung der Assays sollte deren Charakterisierung folgen.

   Desweiteren sollten hochspezifische Fluid-Phase-Immunoprecipitation-Radioimmunoassays zum Nachweis von authentischem β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26) auf der Stufe der Two-Site-Assays entwickelt werden. Die Entwicklung

dieser Assays eröffnete die Möglichkeit, große Verluste an Antikörpern, wie sie in den Solid-Phase-RIAs zu erwarten waren, zu vermeiden.

Nach Abschluß von Entwicklung und Optimierung sollte wiederum die Charakterisierung dieser Assays folgen.

2. Bestimmung der Bindungsparameter K_D und B_{max} der Interaktion von β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26) mit ihren Antikörpern:

   Durch die Quantifizierung der Peptid-Antikörper-Interaktion in Form der Bestimmung der K_D als Maß für die Affinität des betreffenden Peptids zu seinem Antikörper und der Bestimmung der B_{max} als Maß für die Bindungskapazität des betreffenden Assaysystems sollte der Einfluß des Assayprinzips der entwickelten Assays auf o.g. Parameter untersucht und somit ein quantitativer Vergleich der entwickelten Assays ermöglicht werden. Die Ergebnisse sollten bei der Entwicklung weiterer Nachweismethoden verwertet werden.

3. Nachweis von authentischem β_H-Endorphin (1-31) in Leukozyten des menschlichen Blutes:

   Nach erfolgter Charakterisierung sollten die entwickelten Methoden zur Bestimmung von authentischem β_H-Endorphin (1-31) in Leukozyten des menschlichen Blutes eingesetzt werden. Zum einen sollte damit die Anwendbarkeit der Methoden überprüft, zum anderen in einem Pilot-Experiment die Bildung von authentischem β_H-Endorphin (1-31) in unstimulierten und stimulierten Zellen des peripheren menschlichen Blutes untersucht werden.

3. MATERIAL

3.1. Chemikalien, Reagenzien und Testsubstanzen

Aktivkohle	Merck, Darmstadt
Anorganische Stoffe	
$CaCl_2$	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
$KHCO_3$	Merck, Darmstadt
KH_2PO_4	Merck, Darmstadt
K_2HPO_4	Merck, Darmstadt
$MgCl_2$	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
$NaHCO_3$	Merck, Darmstadt
Na_2HPO_4	Merck, Darmstadt
NaH_2PO_4	Merck, Darmstadt
ANP (1-28), human	Bachem, Heidelberg
α-Casomorphin-7 (bovin)	Novabiochem, Läufelfingen, Schweiz
α-Neoendorphin	Bachem, Heidelberg
[Tyr^6] α-Neoendorphin (6-10)	Novabiochem, Schweiz
Bactopepton	Biotest Diagnostics
Biogel P2 und P4	Bio-Rad, München
Bio-Rad Protein Assay Reagens	Bio-Rad, München
BSA (Albumin aus Rinderserum)	Sigma, München
β-Casomorphin-4-amid	Bachem, Heidelberg
β-Casomorphin-7 (human)	Novabiochem, Läufelfingen, Schweiz
[Tyr^{12}] β-Endorphin (12-16), human	Novabiochem, Läufelfingen, Schweiz
[Tyr^{13}] β-Endorphin (13-17), human	Novabiochem, Läufelfingen, Schweiz
[Tyr^{22}] β-Endorphin (22-26), human	Novabiochem, Läufelfingen, Schweiz
[Tyr^{23}] β-Endorphin (23-27), human	Novabiochem, Läufelfingen, Schweiz
β-Endorphin (27-31), human	Bachem, Heidelberg
β-Endorphin (1-16), human	Bachem, Heidelberg
β-Endorphin (1-17), human	Bachem, Heidelberg
β-Endorphin (1-26), human	Peninsula, Heidelberg
β-Endorphin (1-27), human	Bachem, Heidelberg
β-Endorphin (1-31), human	Peninsula, Heidelberg
β-Endorphin (1-31), human	Novabiochem, Schweiz
Chloramin T	Merck, Darmstadt
D(+)-Glucose	Merck, Darmstadt

[Tyr^4] Dynorphin A (4-8)	Novabiochem, Schweiz
Dynorphin A (1-6), human	Peninsula, Heidelberg
Dynorphin A (1-8), human	Saxon, Biochemicals, Bissendorf, Hannover
Dynorphin A (1-9), human	Bissendorf, Hannover
Dynorphin A (1-13), human	Novabiochem, Schweiz
Dynorphin A (1-17), human	Novabiochem, Schweiz
Essigsäure 100 %	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut	Riedel de Haën AG, Seelze
1-Ethyl-3 (3-dimethylaminopropyl)-Carbodiimid	Serva, Heidelberg
Freund´sches Adjuvans (inkomplett)	Sigma, Deisenhofen
Freund´sches Adjuvans (komplett)	Sigma, Deisenhofen
Gelatine	Merck, Darmstadt
Glycin (Glycocoll)	Merck, Darmstadt
Goat Anti-Rabbit IgG	Peninsula, Heidelberg
Guanidin-Hydrochlorid pur.	Peninsula, Heidelberg
Leu-Enkephalin	Serva, Heidelberg
L-Glutamine	Sigma, München
Magermilchpulver	Naturaflor, Töpfer, Dietmannsried
Met-Enkephalin	Serva, Heidelberg
N-Acetyl-β-Endorphin (1-16), human	Peninsula, Heidelberg
N-Acetyl-β-Endorphin (1-17), human	Peninsula, Heidelberg
N-Acetyl-β-Endorphin (1-26), human	Peninsula, Heidelberg
N-Acetyl-β-Endorphin (1-27), human	Bissendorf, Hannover
N-Acetyl-β-Endorphin (1-31), human	Peninsula, Heidelberg
Normal Rabbit Serum	Peninsula, Heidelberg
Protein-A-Sepharose CL-4B	Pharmacia, Freiburg
Ria-Buffer	Peninsula, Heidelberg
Thiomersal	Merck, Darmstadt
Thyroglobulin, porcin	Serva, Heidelberg
Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan	Boehringer, Mannheim
Triton X-100	Sigma, München
Tween 20	Sigma, München
Urodilatin	Dr. Brantl, Bissendorf, Hannover
[Arg^8]-Vasopressin (bovin)	Bachem, Heidelberg

3.2. Pufferlösungen und Kulturmedien

Coating buffer (CB):
50 mM Na_2CO_3
50 mM $NaHCO_3$
auf pH 9.6 titiert

PBS-Puffer:
137 mM NaCl
2,7 mM KCl
8,1 mM Na_2HPO_4
1,46 mM KH_2PO_4
0,5 mM $MgCl_2$ x 6 H_2O
pH 7,4, mit Aqua bidest. 1 : 10 verdünnt

PBS-Tween-Puffer:
0,1 % Tween 20 in PBS-Puffer
pH 7,4

Puffer C und D (nach Guillemin et al., 1977)

Puffer C:
0,02 M Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4; pH 7,4
0,15 M NaCl
0,1 % Gelatine (w/v)
0,01 % BSA (w/v)
0,01 % Thiomersal (w/v)

Puffer D:
Puffer C mit 0,01 % Triton X-100

RIA-Puffer / Peninsula:
200 ml A. bidest.mit
Triton X-100
RIA-Puffer (powder)

Waschpuffer für Monozyten (MWP):

NaCl	0,9 % (w/v)
EDTA	0,13 % (w/v)
BSA	1 % (w/v)

in A. bidest lösen, sterile Filtration

PBS-steril:
NaCl 100 ml
NaH_2PO_4 20 mM
Na_2HPO_4 80 mM
mit NaOH auf pH 7,4 titieren,
sterile Filtration (Selectron MFP 027/3, 0,2 μm,

	Schleicher u. Schüll) Aufbewahrung bei 4° C
Kulturmedium:	DMEM (Dulbecco´s modified Eagle´s Medium with L-glutamine and 4500 mg glucose / liter without sodium phosphat or sodium bicarbonate) (Sigma) 25 mM Hepes hinzufügen und mit NaOH auf pH 7,4 titieren, sterile Filtration Aufbewahrung bei 4° C
Krebs-Ringer-Hepes-Puffer:	NaCl 130 mM KCl 4,7 mM KH_2PO_4 1,2 mM $MgSO_4$ 1,2 mM $NaHCO_3$ 5 mM $CaCl_2$ 1,3 mM Hepes 10 mM Glucose 11,7 mM BSA 0,1 % (w/v) Bacitracin 2 x 10^{-5} M

3.3. Geräte und Zubehör

Biofuge 15	Heraeus Sepotech, Osterode
Combitips	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Dialyseschlauch 6,3 mm	Biomol-Feinchemikalien, Hamburg
Einmalspritzen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Eppendorf-Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Filter 0,45 μm Type HA	Millipore, Molsheim/France
Fraktionssammler	LKB Bromma, Schweden
Gamma-Zähler	1282 Compugamma CS, LKB Wallac, Turku, Finnland
Glasmaterialien (Meßkolben, etc.)	Schott, Mainz
Glaspipetten	Brand, Wertheim/Main
Handschuhe Latex	Ansell Medical, München

Hermle Z380-Zentrifuge	Hermle GmbH u. Co., Gosheim
Horizontal-Schüttler SM	Edmund Bühler, Tübingen
Kodan Tinktur Forte	Schülke + Mayr GmbH, Norderstedt
Kunststoff-Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Lamin Air HB 2448	Heraeus Instruments, Hanau
Magnetrührer 2002	Heidolph, Kehlheim
Mehrfach-Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Mettler AT250	Mettler Instrumente GmbH, Gießen
Mettler P162	Mettler-Waagen GmbH, Gießen
Mettler-Feinwaage	E. Mettler, Zürich
Microlance 2 - sterile Kanülen	Beton Dickinson GmbH, Heidelberg
Milli-Q50 Ultra pure water system	Millipore, Molsheim/France
Mixer 5432	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Mixer IKA-Combimag RC0	Janke u. Kunkel KG, Staufen
MP-3000 Chyco Electronic Balance	Chyco Balance Coop., Japan
Narrow-Mouth-Bottel, PP, 8 ml	Nalge Company, Rochester/USA
Nunc Immuno wash 6T	Nunc, Wiesbaden
Nunc Immuno-Röhrchen	Nunc, Wiesbaden
Ölpumpe	General Electric, Fort Wayne/USA
Parafilm	American Can Company, Dixie/Marathon, USA
pH-Meter 761 Calimatic	Knick, Berlin
Pipetten, verstellbar	Abimed, Langenfeld
Pipettenspitzen	ratiolab, Dreieich
Pipettenspitzen (0,5 - 10 µl)	Gilson Medical Electronic, Villiers-le-Bel/ France
Pipetus-Standard	Hirschmann Laborgeräte
Pyrex-Ganzglas-Filtrationsgerät (47 mm)	Millipore, Eschborn
Reaktionsröhrchen aus Polypropylen (3,5 ml, 4 ml, 13 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Rundschüttler-HT	Infors AG, Basel/Schweiz
Schüttler	Heidolph, Kehlheim
Selectron M FP027/3-Sterilfilter (0,2 µm)	Schleicher u. Schüll GmbH, Dassel
Sorvall RC-5B refrigerated superspeed Centrifuge	DuPont Instruments, Bad Homburg
Swinny Filterhalter aus Edelstahl	Millipore, Eschborn
Tischzentrifuge 5413	Eppendorf, Hamburg
Tuberkulin-Spritzen-monoject 1 ml	Sherwood Medical, Ballymoney/Ireland
Ultrospec 4050	LKB Biochrom, Cambridge/England

3.4. Software für Personal Computer

Word 8.0	Microsoft
ORIGIN	Microcal
EXCEL	Microsoft
LIGAND	Munson and Rodbard

4. METHODEN

4.1. Antikörper und Peptide

Die Gewinnung bzw. Beschaffung von Antikörpern und Peptiden und deren radioaktive Markierung waren Voraussetzung für die Entwicklung von Radioimmunoassays.

4.1.1. Gewinnung von polyclonalen Antiseren gegen die C-Termini von β-Endorphinfragmenten

Polyclonale Antiseren gegen die C-Termini von β_H-Endorphin-Fragmenten wurden bereits im Rahmen früherer Arbeiten [Scholl, 1995] nach einer Methode von Weber et al. (1982), modifiziert nach Wiedemann und Teschemacher (1986), gewonnen, die im folgenden beschrieben ist. Antiseren gegen die C-Termini von β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26) lagen bereits vor. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Methode dazu eingesetzt werden, Antiseren gegen die C-Termini von β_H-Endorphin (1-17) und (1-16) zu gewinnen.

4.1.1.1. C-terminale β-Endorphinfragmente (Antigene zur Gewinnung polyclonaler Antiseren)

Als Antigene dienten synthetisch hergestellte C-terminale Pentapeptide, deren N-terminale Aminosäure jeweils durch Tyrosin ersetzt worden war, um eine radioaktive Markierung mit ^{125}I für spätere Versuche zu ermöglichen. Zur Gewinnung polyclonaler Antiseren gegen die C-Termini von β_H-Endorphin (1-16) und (1-17) wurden [Tyr^{12}] β_H-Endorphin (12-16) und [Tyr^{13}] β_H-Endorphin (13-17) eingesetzt.

4.1.1.2. Kopplung von Trägerprotein und β-Endorphinfragment

Um die immunogenen Eigenschaften der synthetisch hergestellten Pentapeptide zu erhöhen, wurden diese als Haptene an Trägermoleküle (Thyroglobulin) gekoppelt. Hierzu wurden 25 mg Thyroglobulin in 1,5 ml Aqua bidest. gelöst und mit 0,5 ml einer 6 x 10^{-3} molaren Lösung des Pentapeptids gemischt. Diese Lösung wurde dann 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde 1 ml Carbodiimid-Lösung (2 mg 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid in 1 ml Aqua bidest.) zugesetzt und diese Lösung für weitere 60 min geschüttelt. Nach einer 16 - 20 stündigen Inkubation unter permanentem Schütteln bei 4° C wurde das entstandene Konjugat im Verhältnis 1 : 1 mit Aqua bidest. verdünnt. Ein Teil des hergestellten Konjugats wurde sofort verwendet, der verbliebene Rest auf Aliquots aufgeteilt und bei - 20° C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

4.1.1.3. Immunisierung

Für die Gewinnung von Antiseren wurden 3 Kaninchen (2,0-2,5 kg) eingesetzt. Diese wurden unter kontrollierten Bedingungen (12 Stunden hell, 12 Stunden dunkel, gleichmäßige Temperatur und Luftfeuchtigkeit) gehalten.
Zur Primärimmunisierung wurden 0,4 ml des Konjugates mit dem gleichen Volumen an komplettem Freund´schem Adjuvans versetzt und subcutan, auf 3 - 4 Portionen verteilt, injiziert. Dieses Verfahren wurde dreimal im Abstand von 7 Tagen wiederholt. Boosterungen erfolgten dann bis zu zehnmal im Abstand von jeweils 4 Wochen, wobei das Konjugat hier jeweils mit dem gleichen Volumen an inkomplettem Freund´schem Adjuvans versetzt wurde.

4.1.1.4. Blutentnahmen

Zwei Wochen nach Abschluß der Primärimmunisierung bzw. nach den einzelnen Boosterungen wurde den Kaninchen zur Antikörperbestimmung Blut entnommen. Hierzu wurden mittels Butterfly-Kanüle aus einer Vene der Ohraußenseite ca. 5 - 8 ml Blut entnommen und Serum wie folgt gewonnen: Das Blut wurde zunächst 1 Stunde bei Raumtemperatur und danach 20 Stunden bei 4° C stehengelassen. Anschließend wurde das Blut 15 min bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand (Serum) wurde abpipettiert und entweder sofort weiterverarbeitet oder bei - 20° C eingefroren.

4.1.1.5. Herstellung radioaktiv markierter Peptide

Um die Höhe des Antikörpertiters in den Kaninchenseren bestimmen zu können, mußten die Antigene radioaktiv markiert werden. Für die radioaktive Markierung der Peptide am Tyrosinrest wurde der γ-Strahler ^{125}I (Halbwertzeit 60 Tage) verwendet. Weitere, im Rahmen der Entwicklung der Nachweismethoden eingesetzte Peptide wurden ebenfalls mit Hilfe dieser Methode radioaktiv markiert. Die radioaktive Markierung erfolgte anhand der Chloramin T-Methode nach Hunter u. Greenwood (1962) mit Modifikation nach Wiedemann und Teschemacher (1986).

Durchführung:

50μl eines 0,5 molaren Natrium-Phosphat-Puffers (pH 7,5) und 10 μl einer $5 \cdot 10^{-4}$ molaren Lösung des zu jodierenden Peptids (in Aqua bidest.) wurden in einem silikonisierten Glasgefäß mit 0,5 mCi trägerfreiem Na ^{125}I, gelöst in 10 μl einer Natriumhydroxid-Lösung (Amersham, Braunschweig) gemischt. Die Jodierung wurde durch Zugabe von 20 μg Chloramin T, gelöst in 10 μl eines 0,05 molaren Natrium-Phosphat-Puffers, eingeleitet und nach 30 sec Inkubation durch Zugabe von 20 μg Natriummetabisulfit, gelöst in 10 μl eines 0,05 molaren Na-Phosphat-Puffers, beendet. Die Jodierung fand bei Raumtemperatur statt, die Lösungen außer Na-^{125}I wurden auf Eis gelagert. Anschließend wurde die säulenchromatographische

Reinigung des Jodierungsproduktes auf einer Bio-Gel P4-Säule (200 - 400 mesh, 1 x 40 cm) bei Zimmertemperatur durchgeführt. Die Säule wurde vor Aufgabe des Jodierungsproduktes mit 200 ml 1 % iger Essigsäure equilibriert. Eluiert wurde nach Aufgabe des Jodierungsproduktes mit 1,0 % iger Essigsäure und einer Fluß-geschwindigkeit von 12 ml/h. Bis zu 50 Fraktionen à 1 ml Eluat wurden gesammelt und ihre Radioaktivität im Gamma-Zähler bestimmt.
Die 2 - 4 Fraktionen mit dem höchsten Gehalt an radioaktivem Material wurden gepoolt, 1 : 1 mit 1-Propanol versetzt und bei 4° C aufbewahrt.

4.1.1.6. Titerbestimmung mittels Fluid-Phase-One-Site-RIA

Die Antikörpertiterbestimmung der jeweiligen gewonnenen Kaninchenseren wurde mit Hilfe eines Fluid-Phase-One-Site-RIA (FPOS-RIA) (s.u.) durchgeführt. Dieser RIA war eine schon bekannte und vielfach verwendete Methode. Er wurde hier zur Titerbestimmung der gewonnenen Antiseren verwendet.
Die gewonnenen Antiseren wurden mit Puffer C verdünnt (Verdünnungen von 1 : 100 bis 1 : 1000). Die Verdünnungen wurden mit einer definierten Menge an radioaktiv markiertem Antigen inkubiert. Befanden sich spezifische Antikörper im Antiserum, kam es zu einer Bindung des radioaktiv markierten Antigens an den Antikörper. Um nachzuweisen, daß es sich um einen spezifischen Antikörper handelte, wurde für die Serumverdünnung 1 : 100 zusätzlich ein sog. Totalverdränger-Ansatz mitgeführt. Hierbei wurde im Überschuß nicht markiertes Antigen (10^{-5} molare Konzentration) zusätzlich zu der definierten konstanten Menge an radioaktiv markierten Antigen den Antiserumverdünnungen hinzugegeben. Hierdurch wurde das radioaktiv markierte Antigen kompetitiv ggf. von seinem spezifischen Antikörper verdrängt und somit die Spezifität der Bindung nachgewiesen. Durch Zugabe von Adsorbentien (Aktivkohle) wurde eine Trennung von gebundenem und ungebundenem Antigen (Bindung des ungebundenen Antigens an die Aktivkohle) erreicht. Zentrifugation führte zur Trennung von fester und flüssiger Phase. Die anschließend gemessene Radioaktivität im Überstand war ein Maß für den Gehalt an spezifischen Antikörpern im Inkubationsansatz.

Durchführung des Fluid-Phase-One-Site-RIA

Material: Es wurden für die Versuchsansätze Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml) bzw. für die Serumverdünnungen Sarstedt-Röhrchen (3,5 ml) verwendet.

Puffer: Verwendung der Puffer C und D nach Guillemin et al. (1977) (s. 3.2.).

Inkubationsansätze:

CT-Wert: "Total counts"
Gesamtmenge an Radioaktivität im Inkubationsansatz

BL-Wert: "Blank-Wert" (Leerwert)
Radioaktivität im Überstand, die nicht auf die Bindung des markierten Peptids an den Antikörper, sondern auf Bindung an andere Komponenten zurückzuführen oder mit radioaktivem Jodid identisch war (einschl. Geräteleerwert). Der Blank-Wert wurde von allen anderen Werten abgezogen.

B_0-Wert: "Null-Standard"
Menge an radioaktiv markiertem Peptid, die vom Antikörper in Abwesenheit von nicht-radioaktiv markierten Liganden (Verdränger) gebunden werden konnte.

TV-Wert: "Totalverdränger-Wert"
Menge an radioaktiv markiertem Peptid, die in Anwesenheit einer im Überschuß hinzugegebenen Menge an nicht-radioaktiv markiertem Peptid noch im Überstand vorlag, d.h. an bestimmte Komponenten des Antiserums unspezifisch gebunden wurde.

Fluid-Phase-One-Site-RIA				
	CT	BL	B_0	TV
Puffer C	500	200	150	150
Puffer D	20	20	20	-
Nicht markiertes Peptid in Puffer D	-	-	-	20
Antiserum in Puffer C	-	-	50	50
Radioaktiv markiertes Peptid in Puffer D (Tracer)	20	20	20	20

Tab. 4.1.: Zusammensetzung der Inkubationsansätze des Fluid-Phase-One-Site-RIA (Angaben in µl)

Die quantitative Zusammensetzung der Inkubationsansätze ist in Tab. 4.1. gezeigt. Das radioaktiv markierte Peptid wurde mit Puffer D so verdünnt, daß in 20 µl dieser Lösung 2000 cpm zu messen waren. Alle Inkubationen wurden bei 4° C durchgeführt. Die einzelnen Komponenten wurden in der in Tab. 4.1. angegebenen Reihenfolge in die Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml) pipettiert. Nach Zugabe des radioaktiv markierten Peptids wurden die Inkubationsansätze 20 sec geschüttelt und 20 - 24 h bei 4° C inkubiert. Die Trennung von freiem und Antikörper-gebundenem Peptid erfolgte durch Adsorption des freien an Aktivkohle. Hierfür wurde allen Inkubationsansätzen (CT-Wert ausgenommen) 300 µl Kohlesuspension (Puffer C mit 1 % Aktivkohle und 0,5 % BSA) zugegeben, die Ansätze 20 sec geschüttelt und für 15 min bei 4° C inkubiert. Anschließend erfolgte eine 4-minütige Zentrifugation bei 8800 g; 450 µl des Überstandes wurden abpipettiert und die enthaltene Radioaktivität eine Minute im Gamma-Zähler gemessen.

4.1.1.7. Aufbewahrung der Antiseren

Ergaben die Titerbestimmungen der einzelnen Kaninchenseren ausreichend hohe Antikörpertiter, wurden die entsprechenden Kaninchen getötet und entblutet. Das Serum wurde aliquotiert und bei - 20° C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

4.1.1.8. Reinigung der Antiseren mittels Protein A-Sepharose

Die Antiseren wurden mit Hilfe einer Protein A-Sepharose-Säule gereinigt.

4.1.1.8.1. Vorbereitung der Säule

1,5 mg Protein A-Sepharose CL-4B (Pharmacia) wurden in 5 - 10 ml Waschpuffer (20 mM Natriumphosphatpuffer) aufgenommen und 1 - 2 min bei 4° C geschüttelt. Nachdem die Partikel dieser Suspension sich abgesetzt hatten, wurde der Überstand entfernt. Sofern dieser nicht klar war, wurde die gleiche Menge an frischem Waschpuffer zugegeben und oben beschriebener Vorgang solange wiederholt, bis der Überstand klar war. Anschließend wurde das Gel in die entsprechende Säule überführt. Es wurden folgende Wasch-, Elutions- und Reinigungspuffer hergestellt:

Natriumphosphatpuffer (200 mM): 200 mM Na_2HPO_4
+ 200 mM NaH_2PO_4
Titration auf pH 7,0 und Filtration (0,45 µm)

Natriumphosphatpuffer (20 mM): aus 200 mM Natriumphosphatpuffer (s.o.) mit Aqua bidest. auf 20 mM (pH 7,0) verdünnt und filtriert (0,45 µm)

Glycin / HCl-Puffer: 0,1 M Glycin-Lösung mit HCl (25 %) auf pH 2,7 eingestellt und filtriert (0,45 µm)

Guanidin-Puffer: 6,0 M Guanidin
Filtration (0,45 μm)

Aufbewahrung der Puffer bei 4° C

4.1.1.8.2. Durchführung der Fraktionierung

Alle Fraktionierungsschritte fanden bei 4° C statt.
Das als 1 ml-Aliquot eingefrorene Antiserum wurde aufgetaut, 1 ml 20 mM Natrium-Phosphat-Puffer dazugegeben und die Probe mikrofiltriert (4,5 μm-Filter). Die Säule wurde mit 5 ml 20 mM Natrium-Phosphat-Puffer equilibriert. Dann wurde 1 ml Serumprobe (s.o.) aufgegeben. Anschließend wurde die Säule mit 5 ml 20 mM Natrium-Phosphat-Puffer gewaschen. Jeweils 500 μl einer 200 mM Natrium-Phosphat-Puffer-Lösung wurden in 10 Eppendorfgefäße (1,5 ml) vorgelegt, 500 μl Glycin/HCl-Puffer je Eppendorfgefäß auf die Säule aufgegeben und das Eluat in den vorbereiteten Gefäßen aufgefangen. Anschließend wurde die Säule mit 5 ml Guanidin-Puffer gespült und ein neuer Reinigungsvorgang begonnen. Wenn während der folgenden 24 h keine erneute Fraktionierung erfolgte, wurde die Säule nach Spülung mit 20 % igem Ethanol bei 4° C gelagert.

4.1.1.8.3. Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung des Proteingehaltes der gewonnenen Eluat-Fraktionen wurde die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) angewendet. 200 μl BIO-RAD-Reagens, 790 μl Aqua bidest. und 10 μl Eluat wurden zusammenpipettiert, geschüttelt und bei RT für 5 min stehengelassen. Blaufärbung zeigte an, daß sich Protein in der Lösung befand. Photometrisch wurde der Proteingehalt bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen einen Leerwert (800 μl Aqua bidest. und 200 μl BIO-RAD-Reagens) gemessen. Eine Extinktion von 0,1 entsprach 3.25 μg Ovalbumin. Die Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt wurden gesammelt.

4.1.1.8.4. Dialyse

Die gesammelten Fraktionen wurden gegen 5 l Aqua bidest. 24 h lang dialysiert, wobei in dieser Zeit das Wasser dreimal gewechselt wurde. Anschließend wurde das Dialysat in 1 ml Aliquots eingefroren, lyophilisiert und bei - 20° C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.1.2. Antikörper gegen den N-Terminus von β_H-Endorphin

4.1.2.1. Eigenschaften des Antikörpers

Ein gegen den N-Terminus von β_H-Endorphin (Aminosäurereste 1 - 5) gerichteter Antikörper wurde freundlicherweise von C. Gramsch (Gramsch Laboratories, Dachau) zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um einen Protein A-Sepharose gereinigten Antikörper, ein monoclonales Maus-Immunoglobulin, welches die Codierung **3-E7** erhalten hatte.
Die Charakteristika wurden von Gramsch et al. (1983) beschrieben.

4.1.2.2. Radioaktive Markierung des Antikörpers

Die radioaktive Markierung des Antikörpers 3-E7 mit ^{125}I erfolgte ebenfalls nach der von Hunter u. Greenwood (1962) beschriebenen Chloramin T-Methode mit Modifikation nach Wiedemann u. Teschemacher (1986). 50 µl eines 0,5 molaren Natrium-Phosphat-Puffers (pH 7,5) und 10 µl Antikörper 3-E7-Lösung (45 µg lyophilisierter Antikörper in 10 µl Aqua bidest.) wurden in einem silikonisierten Glasgefäß mit 1 mCi trägerfreiem Na ^{125}I (gelöst in 10 µl Natriumhydroxid-Lösung) gemischt. Die Jodierung wurde durch Zugabe von 20 µg Chloramin T, gelöst in 10 µl eines 0,05 molaren Na-Phosphatpuffers, eingeleitet und nach 30 sec Inkubation bei Raumtemperatur durch Zugabe von 20 µg Natriummetabisulfit, gelöst in 10 µl 0,05 molarem Na-Phosphat-Puffer beendet. Die verwendeten Lösungen waren auf Eis hergestellt worden, die Inkubation und die sich anschließende säulenchromatographische Reinigung erfolgte bei Raumtemperatur. Für die Reinigung wurde eine Bio-Gel P4-Säule (200 - 400 mesh, 1 x 40 cm) verwendet. Vor Aufgabe des Jodierungsproduktes wurde die Säule mit 20 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7,4) in 60 mM NaCl equilibriert. Die Fraktionierung erfolgte mit 30 ml 20 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) in 60 mM NaCl bei einer Flußgeschwindigkeit von 12 ml/h. Es wurden bis zu 20 Fraktionen mit je 1 ml Eluat aufgefangen. Die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde im Gamma-Counter bestimmt und die 2 - 4 Fraktionen mit dem höchsten Gehalt an Radioaktivität wurden gesammelt. Nach Zugabe von 1/10 des Volumens an 1-Propanol und 1/10 an Stabilisator (Aqua bidest. mit 10 % 1-Propanol, 1 % Triton X-100, 0,1 % BSA) wurde der radioaktiv markierte Antikörper bei 4° C gelagert.

4.2. Zur Entwicklung spezifischer Bestimmungsmethoden für β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26) eingesetzte Radioimmunoassay-Varianten

Bei den im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten radioimmunometrischen Methoden handelte es sich um bereits bekannte Techniken. Sie mußten jedoch jeweils im Sinne

der hier vorliegenden Bedingungen und der zu bestimmenden Substanzen optimiert werden. In der Regel wurden die bei der Entwicklung einfacher Methoden gewonnenen Erfahrungen beim Aufbau komplexer Methoden genutzt. Einzelheiten zur Durchführung der Methoden sind zum Teil in den „Ergebnissen“ beschrieben. Im Rahmen der Methodenbeschreibung wird des besseren Verständnisses wegen nur auf „Antikörper“ (1. Antikörper etc.) Bezug genommen, auch wenn es sich ggf. um polyclonale Antiseren handelte. Tab. 4.2. zeigt eine Zusammenstellung der Methoden.

4.2.1. Solid-Phase-One-Site-Radioimmunoassay (SPOS-RIA)

Der Solid-Phase-One-Site-RIA sollte zum Nachweis von β_H-Endorphin (28-31) immunoreaktivem Material eingesetzt werden, d.h. Antigen war die Aminosäure-sequenz von β_H-Endorphin (28-31).

4.2.1.1. Prinzip

Das Prinzip des Solid-Phase-One-Site-RIA beruht darauf, daß der Antikörper gegen das Peptid sich nicht frei in Lösung befindet, sondern an eine feste Phase (z.B. Oberfläche / Wand eines Reaktionsgefäßes) gebunden ist. Bei dem hier benutzten Verfahren stellte die Wand eines Röhrchens die feste Phase dar, an die o.g. Antikörper durch Adsorption gebunden wurde. Durch Zugabe von nicht radioaktiv markiertem und radioaktiv markiertem Antigen wird dann ein konkurrierendes Verhalten beider um ihre spezifische Bindungsstelle am Antikörper ermöglicht. Die Menge des radioaktiv markierten Antigens wird konstant gehalten, die Menge des nicht radioaktiv markierten Antigens ist entweder definiert vorgegeben (Standards) oder sie ist unbekannt in einer zu untersuchenden Probe. Nach ausreichender Inkubation und Entfernung aller nicht gebundenen Reaktionspartner durch einen Waschschritt wird die verbliebene Radioaktivität in den Röhrchen gemessen. Sie ist ein Maß dafür, wieviel radioaktiv markiertes Antigen an den fixierten Antikörper bzw. auch direkt an die Wand des Röhrchens gebunden hat. Je mehr nicht radioaktiv markiertes Antigen sich im System befand, um so weniger radioaktiv markiertes Antigen wurde gebunden und umgekehrt. Um die Bindung an die Röhrchen-Wand möglichst gering zu halten, werden sogenannte Blockungssubstanzen verwendet, die selbst mit den „freien Stellen“ der Röhrchen-Wand feste Bindungen eingehen.

4.2.1.2. Durchführung

Material:

Es wurden für die Versuchsansätze Immuno-tubes der Firma Nunc (4 ml, Maxisorp) verwendet.

Puffer:
Es wurden folgende Puffer zur Beschichtung und zum Waschen verwendet:
1. Puffer zur Inkubation des 1. Antikörpers: Coating buffer
2. Puffer zum Waschen nach 1. Inkubation: PBS
3. Puffer zur Blockung: PBS
4. Puffer zum Waschen nach Blockung: PBS
5. Puffer zur Inkubation der Liganden: Puffer C und D
6. Puffer zum Waschen nach 2. Inkubation: PBS / Tween

Versuchsaufbau:
Der Solid-Phase-One-Site-RIA setzt sich aus folgenden Inkubationsansätzen zusammen (jeweils Doppelbestimmungen):
CT-Wert: "Total counts"
Mit diesem Wert wurde die Gesamtmenge an Radioaktivität im Inkubationsansatz bestimmt.
BL-Wert: "Blank-Wert" (Leerwert)
Der Blank-Wert zeigte im SPOS-RIA nur, wieviel radioaktiv markierter Ligand in der Lage war, mit oder ohne Blockunsreagenzien in Abwesenheit des Antikörpers an die Röhrchen-Wand zu binden. Er hatte geringe Bedeutung, da nach Bindung des 1. Antikörpers an die Röhrchen-Wand andere Bedingungen vorlagen, wurde aber als zusätzlicher Kontrollwert mitbestimmt.
B_0-Wert: "Null-Standard"
Mit diesem Wert wurde die Menge an radioaktiv markiertem Liganden bestimmt, die vom Antikörper in Abwesenheit nicht radioaktiv markierter Liganden gebunden werden konnte.
Standard-Werte:
Diesen Inkubationsansätzen wurden steigende Mengen an nicht radioaktiv markiertem Liganden zugegeben; hieraus wurde dann eine Standardkurve erstellt, die zur Bestimmung der Antigenkonzentration in einer zu untersuchenden Probe dienen sollte.

Die Maxisorp-Immuno-tubes wurden wie folgt behandelt:
Der erste Schritt war die Beschichtung der Röhrchen-Wand mit Protein A-Sepharose-gereinigtem Kaninchen-Antikörper. Hierzu war die Optimierung der Menge an gereinigtem Antikörper, des Inkubationsvolumens, der Inkubationszeit, der Inkubationstemperatur und der Inkubationsart Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit.
Dann wurden die Röhrchen mit Waschpuffer gewaschen. Als nächstes wurde Blockungssubstanz in Puffer zugefügt, wobei Substanz, Blockungszeit und

-temperatur ebenfalls durch Austestung zu optimieren waren. Es folgte ein erneuter Waschschritt mit Waschpuffer und anschließend die Inkubation mit nicht radioaktiv markiertem und mit radioaktiv markiertem Antigen. Hierfür wurde das nicht radioaktiv markierte Antigen in Puffer so gelöst, daß in dieser Lösung unterschiedliche Mengen an Peptid (Standards) vorlagen. Die Menge des radioaktiv markierten Peptids wurde mit Puffer so verdünnt, daß in dieser Lösung ca. 10 000 cpm zu messen waren.
Markiertes und nicht markiertes Peptid wurden nun zusammen für 20 - 24 h inkubiert. Abschließend wurden nicht gebundene Bestandteile des Inkubats durch einen letzten Waschschritt entfernt und die verbliebene Radioaktivität pro Röhrchen im Gamma-Zähler gemessen.

4.2.2. Solid-Phase-Two-Site-Radioimmunoassay (SPTS-RIA)

4.2.2.1. Prinzip

Der SPTS-RIA sollte zum Nachweis von β_H-Endorphin (1-31) eingesetzt werden. Im Vergleich zum Solid-Phase-One-Site-RIA wird β_H-Endorphin (1-31) im Two-Site-RIA nicht kompetitiv von einem C-terminal angreifenden Antikörper verdrängt; vielmehr wird das Peptid hier durch Einsatz von einem C-terminalen Antikörper und einem gegen das N-terminale Ende des Peptids gerichteten radioaktiv markierten Antikörper förmlich „in die Zange genommen“ und somit spezifisch nachgewiesen (Sandwich-Prinzip). Somit ist der Solid-Phase-TWO-Site-RIA eine Weiterentwicklung des Solid-Phase-ONE-Site-RIA. Genau wie in einem SPOS-RIA ist der erste, gegen das C-terminale Ende von β_H-Endorphin (1-31) gerichtete Antikörper an die Röhrchen-Wand gebunden. Antigen und zweiter, radioaktiv markierter Antikörper befinden sich frei in einem Inkubationspuffer. Da das nachzuweisende Peptid sowohl das C-terminale als auch das N-terminale Fragment besitzt, wird es an beide gebunden. Es bildet sich der Komplex 1. Antikörper - Antigen - 2. Antikörper (= „Sandwichkomplex“), welcher aufgrund der radioaktiven Markierung des 2. Antikörpers ein Signal aussendet, welches nachgewiesen werden kann. Fehlt eine der Komponenten, z.B. das nachzuweisende Peptid, so ergibt sich kein Signal. Durch Waschvorgänge werden nicht gebundene Bestandteile entfernt. Die im Sandwichkomplex gebundene Radioaktivität verhält sich proportional zur Peptidkonzentration im Reaktionsansatz. Das Verfahren entspricht dem von Thomas beschriebenen immunoradiometrischen Assay (Thomas 1988), wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch als SPTS-RIA bezeichnet um zu verdeutlichen, daß die einzelnen Assays aufeinander aufbauen.

4.2.2.2. Durchführung

Material:

Wie unter 4.2.1.2. beschrieben wurden für alle Versuchsansätze Maxisorp-Immuno-tubes verwendet.

Puffer:

Die Puffer zur Beschichtung und zum Waschen wurden aus dem SPOS-RIA (s.o.) übernommen.

1. Puffer zur Inkubation des 1. AK: Coating buffer
2. Puffer zum Waschen nach 1. u. 2. Inkubation u. nach Blockung: PBS
3. Puffer zur Blockung: PBS
4. Puffer zum Waschen nach 2. Inkubation: PBS / Tween
5. Puffer zur Inkubation mit Peptid: Puffer C und D
6. Puffer zur Inkubation mit 2. Antikörper: Puffer C und D

Versuchsaufbau:

Der SPTS-RIA setzt sich aus folgenden Inkubationsansätzen zusammen (jeweils Doppelbestimmungen)

CT-Wert: "Total Counts"

Mit diesem Wert wurde die Gesamtmenge an Radioaktivität im Inkubationsansatz bestimmt.

B_0-Wert: "Null-Standard"

Im Gegensatz zum SPOS-RIA war der Null-Standard ein Maß für die nicht spezifische Bindung des zweiten radioaktiv markierten Antikörpers an die Wand des Röhrchens in Abwesenheit des nicht markierten Peptids.

Standard-Werte:

Diesen Inkubationsansätzen wurden steigende Mengen an nicht radioaktiv markiertem β_H-Endorphin (1-31) bei konstanten Mengen an radioaktiv markiertem 2. Antikörper zugegeben und hieraus eine Standardkurve erstellt.

Die Maxisorp-Immuno-tubes wurden wie folgt behandelt:

Analog dem SPOS-RIA wurde die Röhrchen-Wand mit Protein A-Sepharose-gereinigtem, gegen den C-Terminus des Peptids gerichteten ersten Antikörper beschichtet. Menge des Antikörpers, Inkubationsvolumen, -medium, -zeit und -temperatur wurden aus der optimierten Form des SPOS-RIA übernommen. Nach der Beschichtung wurden die Röhrchen mit Waschpuffer gewaschen und mit BSA 1 % (in PBS) geblockt. Diese Blockungssubstanz ging aus der Optimierung des SPOS-RIA hervor. Jedoch wurden Blockungszeit und -temperatur nochmals ausgetestet. Zur Erstellung einer Standardkurve wurde nach dem Waschen nicht markiertes Peptid (Standard) analog dem SPOS-RIA hinzugegeben und für 20 - 24 h inkubiert (siehe SPOS-RIA). Erneutes Waschen entfernte nicht gebundene Bestandteile und

der radioaktiv markierte 2. Antikörper, gerichtet gegen den N-terminalen Anteil von β_H-Endorphin (1-31), wurde hinzugegeben und der letzte Inkubationsschritt eingeleitet (20 - 24 h). Abschließend wurde nicht gebundener 2. Antikörper durch Waschen entfernt und die verbliebene Radioaktivität pro Röhrchen im Gamma-Zähler gemessen.

4.2.3. Fluid-Phase-Immunoprecipitation-One-Site-Radioimmunoassay (FPIOS-RIA)

4.2.3.1. Prinzip

Der FPIOS-RIA wurde zum Nachweis von β_H-Endorphin (28-31)-, (24-27)-, und (23-26)-immunoreaktivem Material eingesetzt. Eine konstante Menge an radioaktiv markiertem Peptid ((^{125}I) β_H-Endorphin (1-31), (1-27) bzw. (1-26)) und eine variable Menge des entsprechenden nicht markierten Peptids konkurrieren um eine konstante Menge an Antikörper, gerichtet gegen das jeweilige Antigen, den C-Terminus des jeweiligen Peptids. Diese Reaktion findet in Lösung statt. Je höher die Menge an nicht markiertem Antigen ist, desto weniger radioaktiv markiertes Antigen kann gebunden werden, d.h. das radioaktive Signal verhält sich umgekehrt proportional zur Menge an nicht markiertem Antigen.
Die Trennung von freiem und gebundenem Antigen erfolgt durch Hinzufügen eines weiteren Antikörpers, gerichtet gegen den 1. Antikörper, der zusammen mit dem 1. Antikörper und weiteren Komponenten eines ebenfalls zugefügten „Normal-kaninchenserums“ ein Immunpräzipitat bildet. Das an den 1. Antikörper gebundene Antigen wird kopräzipitiert. Da der 1. Antikörper vom Kaninchen gewonnen wurde, wird zur Präzipitation ein gegen Kaninchen-Immunglobulin gerichteter 2. Antikörper verwendet. Die Radioaktivität des Immunpräzipitats wird nach Zentrifugation der Probe und Absaugen des Überstandes (Das Präzipitat enthält das gebunden radioaktiv markierte Peptid!) im Gamma-Zähler gemessen. Je höher die gemessene Radioaktivität, um so geringer die Menge an nicht markiertem Antigen im Reaktions-ansatz und umgekehrt.

4.2.3.2. Durchführung

Material

Es wurden für alle Inkubationsansätze Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml) verwendet.

Puffer

Es wurden nachstehende Puffer verwendet (s. 3.2.)
Puffer C
Puffer D

RIA-Puffer (Peninsula, Heidelberg)

Versuchsaufbau

Der Fluid-Phase-Immunoprecipitation-One-Site-RIA setzt sich aus folgenden Inkubationsansätzen zusammen (jeweils Doppelbestimmungen):

CT-Wert: "Total counts"

Mit diesem Wert wurde die Gesamtmenge an Radioaktivität im Inkubationsansatz bestimmt.

BL-Wert: "Blank-Wert" (Leerwert)

Im Inkubat fehlte der 1. Antikörper. Mit diesem Wert wurde die unspezifische Radioaktivität im Sediment, d.h. nicht an den spezifischen Antikörper, sondern an andere Komponenten (Reaktionsgefäß, zweiter Antikörper, weitere Bestandteile des Inkubats) gebundene Radioaktivität einschließlich des Geräteleerwertes bestimmt.

B_0-Wert: "Null-Standard"

Im Inkubat fehlte das nicht markierte Peptid. Der B_0-Wert war das Maß für die Menge an radioaktiv markiertem Peptid, welches in Abwesenheit von nicht radioaktiv markiertem Peptid vom Antikörper gebunden werden konnte.

Standard-Werte:

Diesen Inkubationsansätzen wurden steigende Mengen an nicht radioaktiv markiertem Peptid bei konstanten Mengen an radioaktiv markiertem Peptid hinzugefügt, um mit Hilfe dieser Werte eine Standardkurve erstellen zu können. Hiermit konnte die Menge des Antigens in einer unbekannten Probe bestimmt werden.

Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze richtete sich nach dem „klassischen“ und schon bekannten FPOS-RIA, zusätzlich wurde die Anleitung der Firma Peninsula, Heidelberg, zum „Radioimmunoassay for Alpha Human Atrial Natriuretic Polypeptide“ (Catalog No RIK-8798) für diese Versuche abgewandelt.

Die Inkubation erfolgte in Eppendorf-Reaktionsgefäßen (1,5 ml) bei 4° C.

Das radioaktiv markierte Peptid wurde mit Puffer D so verdünnt, daß im Inkubat etwa 10 000 cpm zu messen waren. Nach Zugabe von 1. Antikörper, markiertem und nicht markiertem Peptid sowie weiteren Komponenten des Inkubats wurden die Reaktionsgefäße geschüttelt und anschließend 20 - 24 h bei 4° C inkubiert. Es folgte dann die Zugabe von Goat-Anti-Rabbit-Immunglobulin G (GARGG) und Normal Rabbit Serum (NRS) (Firma Peninsula), wobei beide Komponenten in RIA-Puffer (Firma Peninsula) gelöst wurden. Nach einer 2-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde Puffer C hinzugegeben und die Reaktionsgefäße geschüttelt und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und die im Immunpräzipitat verbliebene Radioaktivität im Gamma-Zähler gemessen.

4.2.4. Fluid-Phase-Immunoprecipitation-Two-Site-Radioimmunoassay (FPITS-RIA)

4.2.4.1. Prinzip

Der FPITS wurde für den Nachweis von β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26) entwickelt. Das Prinzip des FPITS-RIA beruht darauf, daß die Peptide β_H-Endorphin (1-31), (1-26) und (1-27) jeweils durch zwei verschiedene Antikörper - einen ersten gegen den C-terminalen Teil gerichteten Antikörper und einen zweiten gegen den N-terminalen Teil gerichteten radioaktiv markierten Antikörper - regelrecht „in die Zange genommen werden“ d.h. ein sogenannter „Sandwichkomplex“ gebildet wird. Dieser wird jedoch im Vergleich zum SPTS-RIA in Lösung gebildet, also ohne Kontakt zu einer festen Matrix. Durch Zugabe eines 3. Antikörpers, welcher gegen den C-terminalen Antikörper gerichtet ist (Anti-Kaninchen-IgG-AK, GARGG), sowie von „Normal-Kaninchenserum“ (NRS) wird der Sandwich-Komplex analog zum FPIOS-RIA zusammen mit dem Immunpräzipitat ausgefällt und eine Trennung zwischen 1. Antikörper-Antigen-2. (markierter) Antikörper-Komplexen und ungebundenen markierten Antikörpern und anderen Bestandteilen erreicht. Das in Lösung befindliche Immunpräzipitat wird durch Zentrifugation als Pellet sichtbar. Die im Immunpräzipitat befindliche Radioaktivität wird nach Absaugen des Überstandes im Gamma-Zähler gemessen.

Beim FPITS-RIA tritt das Problem bzw. Phänomen des „high-dose-hook-Effekts“ auf [Thomas, 1988; Chard, 1990]. Dieser tritt auf, wenn steigende Mengen an zugesetztem Peptid steigende Mengen an (in konstanter Menge vorgegebenem, radioaktiv markiertem) Signalantikörper binden und diesen somit dem mit dem anderen Fragment an den 1. Antikörper gebundenen Peptid entziehen. Die zunehmende Abbindung des markierten Antikörpers an das Peptid führt somit zu abnehmenden Radioaktivitäten im zu messenden Sediment. Um ein der Antigenmenge proportionales Signal zu erhalten, muß im Äquivalenzbereich der Standardkurve nach Heidelberger und Kendall, d.h. im aufsteigenden Bereich, gearbeitet werden [Thomas, 1988].

4.2.4.2. Durchführung

Material

Es wurden für alle Inkubationsansätze Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml) verwendet.

Puffer

Es wurden analog dem FPIOS-RIA folgende Puffer verwendet (s. 3.2.):

Puffer C

Puffer D

RIA-Puffer (Peninsula, Heidelberg)

Versuchsaufbau

Der FPITS-RIA setzt sich aus folgenden Inkubationsansätzen zusammen (jeweils Doppelbestimmungen)

CT-Wert: "Total counts"

Mit diesem Wert wurde die Gesamtmenge an Radioaktivität im Inkubationsansatz bestimmt.

B_0-Wert: "Null-Standard"

Dieser Wert gab die Menge an radioaktiv markiertem 2. Antikörper an, welche in Abwesenheit des Peptids durch Bindung an andere Bestandteile des Präzipitats ausgefällt wurde (Geräteleerwert eingeschlossen).

Standard-Wert:

Diesen Inkubationsansätzen wurden steigende Mengen an Peptid zugesetzt; steigende Mengen an 1.AK-Peptid-2.AK-Komplexen und somit steigendes Signal an Radioaktivität ermöglichten die Erstellung einer Standardkurve.

Der FPITS-RIA baute auf den Ergebnissen der Entwicklung des FPIOS-RIA auf. Ausgetestet wurde, ob die einzeitige Inkubation aller Komponenten (1. AK, Peptid, 2. AK) Vorteile oder Nachteile gegenüber einer zweizeitigen Inkubation (Inkubation von 1. AK und Peptid, spätere Inkubation mit 2. AK) hatte. Die Mengen an eingesetztem 1. Antikörper wurden in Form von Antiserumverdünnungen bzw. Protein A-Sepharose gereinigtem Antiserum untersucht. Ziel war es, eine möglichst geringe Menge an Antikörper verwenden zu müssen, jedoch ausreichend um eine niedrige Nachweisgrenze und einen ausreichenden Meßbereich zu erhalten. Der N-terminale radioaktiv markierte Antikörper wurde mit Puffer D so gelöst, daß im Inkubat 10 000 cpm zu messen waren.

Die Durchführung der Immunpräzipitation mit einem 3. Antikörper, gerichtet gegen den 1. Antikörper, erfolgte analog der in 4.2.3.2. beschriebenen Methode des FPIOS-RIA: Goat-Anti-Rabbit-Immunglobulin G (GARGG) und Normal Rabbit Serum (NRS) (gelöst in RIA-Puffer, Peninsula) wurden zu allen Bo- und Standard-Inkubations-ansätzen pipettiert. Nach Schütteln wurden die Proben für 2 Stunden bei RT inkubiert. Dann wurde Puffer C hinzugegeben und die Ansätze zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die verbliebene Radioaktivität im Immunpräzipitat im Gamma-Zähler gemessen.

Tab. 4.2.: Zusammenstellung der Methoden zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26) bzw. β_H-Endorphin (28-31), (24-27) und (23-26) immunoreaktivem Material (IRM)

Methode	SPOS-RIA	SPTS-RIA	FPIOS-RIAs	FPITS-RIAs
Art des Assays	One-Site-RIA	Two-Site-RIA	One-Site-RIAs	Two-Site-RIAs
Prinzip der Methode	Radioaktiv markiertes und nicht markiertes Peptid konkurrieren um spezif. Bindungsstelle am 1. AK	Bildung eines 1.AK-Peptid-2.AK-Komplexes (Sandwich-Komplex)	Radioaktiv markiertes und nicht markiertes Peptid konkurrieren um spezif. Bindungsstelle am 1. AK	Bildung eines 1.AK-Peptid-2.AK-Komplexes (Sandwich-Komplex)
Einsatz der Methode für die Bestimmung von:	β_H-Endorphin (28-31) IRM	β_H-Endorphin (1-31)	β_H-Endorphin (28-31), (24-27) u. (23-26) IRM	β_H-Endorphin (1-31), (1-27) u. (1-26)
Spezifische Antikörper (Code siehe Ergebnisse!)	1 (10 P)	2 (10 P + 3-E7)	jeweils 1 (10 P bzw. 67 P bzw. 63 P)	jeweils 2 (10 P bzw. 67 P bzw. 63 P + 3-E7)
1. Antikörper (gegen C-terminales Fragment)	An feste Phase gebunden	An feste Phase gebunden	In flüssiger Phase gelöst	In flüssiger Phase gelöst
2. Antikörper (gegen N-terminales Fragment)	In Lösung zugesetzt	In Lösung zugesetzt	In Lösung zugesetzt	In Lösung zugesetzt
Radioaktiv markierter Signalgeber (= Tracer)	Opioidpeptid β_H-Endorphin (1-31)	2. Antikörper (3-E7)	Opioidpeptide β_H-Endorphin (1-31), (1-27) bzw. (1-26)	2. Antikörper (3-E7)
Trennung von freier und gebundener Radioaktivität zur Bestimmung der gebundenen Radioaktivität	Durch Waschen: Nicht gebundenes markiertes Peptid wird ausgewaschen	Durch Waschen: Nicht gebundener markierter 2. AK wird ausgewaschen	Immunpräzipitation: Durch Bindung eines 2. AK an 1. AK erfolgt eine Ausfällung der gebildeten AK-Peptid-Komplexe	Immunpräzipitation: Durch Bindung eines 3. AK an 1. AK erfolgt eine Ausfällung der gebildeten 1.AK-Peptid-2.AK-Komplexe

4.3. Charakterisierung der entwickelten Methoden

Folgende Charakteristika der neu entwickelten Methoden sollten bestimmt werden [Thomas, 1988; Chard, 1990]:

1. Reproduzierbarkeit (inter-assay coefficient of variation)
2. Präzision (intra-assay coefficient of variation)
3. Nachweisgrenze (detection limit)
4. Spezifität (cross-reactivities)

4.3.1. **REPRODUZIERBARKEIT** (inter-assay coefficient of variation)

Die Reproduzierbarkeit ist ein Maß für die Übereinstimmung von Wiederholungsmessungen an verschiedenen Tagen [Thomas, 1988].

Reproduzierbarkeit des SPOS-RIA:

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit des SPOS-RIA wurde an 10 verschiedenen Tagen jeweils eine Standardkurve angesetzt. Es wurden diejenigen Mengen an nicht radioaktiv markiertem Peptid bestimmt, die zu einer 50 %igen Verdrängung des radioaktiv markierten Peptids führten (IC-50-Wert am Wendepunkt der sigmoidal verlaufenden Kurve). Die Standardkurven wurden mit dem Computerprogramm ORIGIN sigmoidal (Logistic) gefittet. Anschließend wurde für jede der 10 gefitteten Kurven für den IC-50-Wert (das Meßsignal für 50 % Bindung des Tracers) über die Standardkurve die Menge (in fmol) an Peptid pro Reaktionsansatz bestimmt.
Aus diesen 10 Werten (n) wurden der Mittelwert (x) und die Standardabweichung (s) berechnet. Der relative Variationskoeffizient (Vr) ergab sich dann aus folgender Formel:

$$Vr\,[\%] = [s : (x \cdot \sqrt{n})] \times 100$$

Reproduzierbarkeit des SPTS-RIA und des FPITS-RIA:

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit des SPTS-RIA und des FPITS-RIA wurde an 10 verschiedenen Tagen jeweils eine Standardkurve angesetzt, welcher jeweils zusätzlich eine definierte Menge an Peptid als weiterer Standardwert (Doppelbestimmung) hinzugefügt war. Die Standardkurven wurden mit dem Computer-Programm ORIGIN sigmoidal (Logistic) gefittet und das für den zusätzlich eingesetzten Standardwert erhaltene Meßsignal (in cpm) in % der Bindung des im Ansatz vorliegenden Tracers ermittelt und über die Standardkurve in die Menge (in fmol) an Peptid pro Reaktionsansatz umgerechnet. Aus diesen 10 Werten (n) wurden der Mittelwert (x) und die Standardabweichung (s) berechnet. Der relative Variationskoeffizient berechnete sich dann folgendermaßen:

$$Vr\,[\%] = [s : (x \cdot \sqrt{n}) \cdot 100]$$

4.3.2. PRÄZISION (intra-assay coefficient of variation)

Die Präzision ist ein Maß für die Übereinstimmung wiederholter Messungen zum gleichen Zeitpunkt [Thomas, 1988].

Präzision des SPOS-RIA:

Es wurden 2 Experimente durchgeführt, welche zur Erstellung von Standardkurven dienten. Aus vorherigen Experimenten war eine Menge an nicht markiertem Peptid ermittelt worden, die zu einer etwa 50 %igen Verdrängung des markierten Peptids führte. Diese Menge an Peptid wurde in zwei RIAs in 10 Reaktionsansätzen mitgeführt. Diese 10 Reaktionsansätze ergaben 10 Meßwerte (in cpm bzw. in % Bindung der Gesamtradioaktivität). Über die Standardkurve wurden diese Meßwerte in die entsprechenden Peptidmengen (fmol) überführt. Aus diesen 10 bestimmten Werten (Peptidmengen) (bzw. 20 Werten aus den beiden RIAs) wurden der Mittelwert (x), die Standardabweichung (s) und der relative Variationskoeffizient (Vr) berechnet:

$Vr\ [\%] = [s : (x \cdot \sqrt{n})] \cdot 100$

Präzision des SPTS-RIA und FPITS-RIA:

Es wurden Standardkurven erstellt und aus dem aufsteigenden Bereich der Standardkurven wurde eine bestimmte Peptidmenge gewählt. In zwei RIAs wurden jeweils 10 Reaktionsansätze mit der gewählten Peptidmenge eingebracht. Die betreffenden Standardkurven wurden mit dem Computerprogramm ORIGIN sigmoidal (Logistic) gefittet und die Meßsignale der 10 Reaktionsansätze (in cpm bzw. in % Bindung der Gesamtradioaktivität) wurden über die Standardkurve den entsprechenden Peptidmengen zugeordnet. Aus den 10 bestimmten Werten (Peptidmengen) (bzw. 20 Werten aus beiden RIAs) wurden der Mittelwert (x), die Standardabweichung (s) und der relative Variationskoeffizient (Vr) berechnet:

$Vr\ [\%] = [s : (x \cdot \sqrt{n})] \cdot 100$

4.3.3. NACHWEISGRENZE (detection limit)

Die Nachweisgrenze ist ein Maß für die Empfindlichkeit einer Methode, indem sie die kleinste Menge an nachzuweisender Substanz, die signifikant vom sog. Nullstandard (keine Substanz vorhanden) unterschieden werden kann, angibt. Die Nachweisgrenzen der entwickelten Methoden wurden wie folgt bestimmt:

Nachweisgrenze des SPOS-RIA:

Es wurden in drei zeitlich voneinander getrennt erstellten Standardkurven jeweils zusätzlich 10 Nullstandards bestimmt. Hieraus wurden in jedem der drei Experimente

10 Meßsignale (in cpm) erhalten. Aus diesen jeweils 10 Werten wurde der Mittelwert ($\bar{x}$, für n = 10) und die Standardabweichung (s) (in % Bindung des Tracers) berechnet. Die Nachweisgrenze ergab sich über das sigmoidale Fitting der drei Standardkurven im Computerprogramm ORIGIN (Logistic) und die Zuordnung der Werte für **($\bar{x}$ - s, $\bar{x}$ - 2 s und $\bar{x}$ - 3s)** zu den entsprechenden Substanzmengen (aufgetragen auf der Abszisse der Standardkurven). Aus den Ergebnissen der drei Experimente wurde wiederum die Mittelwerte berechnet und damit die endgültigen Nachweisgrenzen festgelegt.

Nachweisgrenze des SPTS-RIA und FPITS-RIA

Auch hier wurden für jeden RIA-Typ in drei zeitlich voneinander getrennt erstellten Standardkurven jeweils zusätzlich 10 Nullstandards bestimmt. Hierfür wurden jeweils 10 Meßsignale (in cpm) erhalten. Hieraus wurde jeweils der Mittelwert ($\bar{x}$, für n = 10) und die Standardabweichung (s) (in % Bindung des Tracers) berechnet. Die Nachweisgrenze jedes einzelnen Assays ergab sich über das sigmoidale Fitting der Standardkurven im Computerprogramm ORIGIN (Logistics) und die Zuordnung der Werte für **($\bar{x}$ + s, $\bar{x}$ + 2s und $\bar{x}$ + 3s)** zu den entsprechenden Substanzmengen (aufgetragen auf der Abszisse der Standardkurven). Aus den Ergebnissen der drei Standardkurven wurde wiederum die Mittelwerte berechnet und damit die endgültigen Nachweisgrenzen festgelegt.

4.3.4. SPEZIFITÄT (cross reactivities)

Anhand der Bestimmung der Spezifität mittels Kreuzreaktivitäten kann die Wahrscheinlichkeit, mit der eine bestimmte Substanz nachgewiesen werden kann, ermittelt werden. Deshalb wurde jeder der entwickelten RIAs daraufhin überprüft, ob er neben dem eigentlich zu bestimmenden Peptid auch noch weitere Peptide erfassen würde. Die hierauf untersuchten Peptide entstammten den Opioidpeptid-Precursormolekülen Proopiomelanocortin, Proenkephalin und Prodynorphin, darüber hinaus wurden aber auch andere Substanzen eingesetzt.

Peptide, von denen eine Kreuzreaktivität zu erwarten war, wurden in 8 verschiedenen Konzentrationen (1 - 2 000 000 fmol / Reaktionsansatz) im SPOS-RIA, SPTS-RIA und FPITS-RIA eingesetzt. Peptide, bei denen eine Kreuzreaktivität aufgrund ihrer Aminosäuresequenz eher nicht zu erwarten war, wurden nur in einer sehr hohen Konzentration von 1 000 000 fmol / Reaktionsansatz in den entsprechenden Assays überprüft.

(Tabelle 4.3. gibt eine Übersicht über die auf Kreuzreaktivität getesteten Peptide und ihre eingesetzten Konzentrationen in den jeweiligen Assays).

Alle Reaktionsansätze wurden als Doppelbestimmungen angesetzt. Jeder neuentwickelte RIA wurde zweimal hinsichtlich seiner Spezifität überprüft.

Die erhaltenen Standardkurven wurden im Computerprogramm ORIGIN in halblogarithmischer Form dargestellt. Auf der Abszisse war die eingesetzte Menge an potentiell oder tatsächlich kreuzreagierendem Peptid in fmol pro Reaktionsansatz aufgetragen, auf der Ordinate das prozentuale Verhältnis von gebundenem zu insgesamt eingesetztem radioaktiv markiertem Peptid. Kreuzreaktivitäten wurden aus den IC_{50}-Werten der Verdrängungskurven abgeleitet.

Tab. 4.3.: Übersicht über die auf Kreuzreaktivität geprüften Peptide und ihre eingesetzten Konzentrationen in den jeweiligen RIAs

Die Peptide wurden in folgenden Mengen (in fmol pro Reaktionsansatz) eingesetzt:
„+“: 1 - 2 000 000 fmol, „*“: 1 000 000 fmol

Peptide	SPOS-RIA für β_H-End (28-31) IRM	SPTS-RIA für β_H-End (1-31)	FPITS-RIA für β_H-End (1-31)	FPITS-RIA für β_H-End (1-27)	FPITS-RIA für β_H-End (1-26)
β-Endorphin (1-31), human	+	+	+	+	+
β-Endorphin (1-27), human	+	*	+	+	+
β-Endorphin (1-26), human	+	*	+	+	+
β-Endorphin (1-17), human	+	*	+	*	*
β-Endorphin (1-16), human	+	*	*	*	*
N-Acetyl-β-Endorphin (1-31), human	+	+	+	+	+
N-Acetyl-β-Endorphin (1-27), human	+	*	*	+	*
N-Acetyl-β-Endorphin (1-26), human	+	*	*	*	+
N-Acetyl-β-Endorphin (1-17), human	*	*	*	*	*
N-Acetyl-β-Endorphin (1-16), human	*	*	*	*	*
β-Endorphin (27-31), human	+	+	+	*	*
[Tyr^{23}]-β-Endorphin (23-27), human	+	*	*	+	+
[Tyr^{22}]-β-Endorphin (22-26), human	*	*	*	+	+
β-Casomorphin-7, human	*	*	*	*	*
β-Casomorphin-7, bovin	*	*	*	*	*
β-Casomorphin-4-amid, bovin	*	*	*	*	*
ANP (1-28), human	*	*	*	*	*
Urodilatin, human	*	*	*	*	*
Met-Enkephalin	*	*	*	*	*
Leu-Enkephalin	*	*	*	*	*
Dynorphin A 1-6, human	*	*	*	*	*
Dynorphin A 1-8, human	*	*	*	*	*
Dynorphin A 1-9, human	*	*	*	*	*
Dynorphin A 1-13, human	*	*	*	*	*
Dynorphin A 1-17, human	*	*	*	*	*
[Tyr^{4}]-Dynorphin (4-8)	*	*	*	*	*
α-Neoendorphin (1-10)	*	*	*	*	*
[Tyr^{6}]-α-Neoendorphin-Fragment (6-10)	*	*	*	*	*

4.4. Bestimmung der Bindungsparameter K_D und B_{max} der Interaktionen von β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26) mit ihren Antikörpern

4.4.1. Theoretische Grundlagen

Die Interaktion zwischen Antikörper und Ligand kann durch die Bestimmung der Bindungsparameter K_D und B_{max} näher definiert und quantifiziert werden. Hierbei stellt die Dissoziationskonstante **K_D** ein Maß für die Affinität der Bindungsstelle des Antikörpers zum betreffenden Antigen dar; die **B_{max}** steht für die Bindungskapazität, d.h. die Menge an Antigen-Bindungsstellen im System des betreffenden Assays. Um einen quantitativen Vergleich der entwickelten Assays durchführen zu können, wurden o.g. Bindungsparameter bestimmt. Es wurde somit die Interaktion der C-terminal angreifende Antikörper mit den betreffenden Peptiden (β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26)) untersucht. Die Berechnung der Bindungsparameter erfolgte mittels Scatchard-Analyse (Scatchard, 1949).

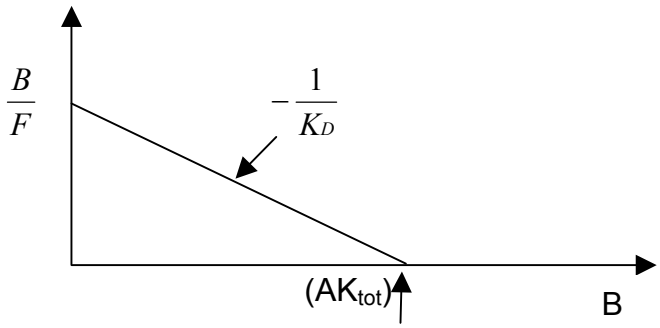
Bestimmung der K_D und B_{max} anhand von Sättigungsexperimenten

In Sättigungsexperimenten werden in den einzelnen Versuchsansätzen einer konstanten Menge an Antikörper steigende Mengen an radioaktiv markiertem Antigen zugesetzt. Es bilden sich Antigen-Antikörper-Komplexe aus, wobei mit steigender Menge an markiertem Antigen die Menge an Antikörper-gebundenem Antigen absolut zu-, aber prozentual abnimmt. Gemäß Betrachtung der Reaktionen nach dem Massenwirkungsgesetz und mehreren Umformungen der darauf basierenden Gleichungen ergibt sich folgende Gleichung nach Scatchard (Scatchard, 1949)

$$\frac{B}{F} = \frac{[AK_{tot}]}{K_D} - \frac{1}{K_D} B$$

B = gebundenes Antigen (Bound)
F = freies Antigen (Free)
AK_{tot} = Gesamtmenge an AK
K_D = Dissoziationskonstante

Die graphische Darstellung o.g. Geradengleichung entspricht dem sog. „Scatchard-Plot“ (Scatchard, 1949).



Durch Berechnung oder graphische Ermittlung der Steigung der Geraden ($\frac{1}{K_D}$)kann die Dissoziationskonstante $\mathbf{K_D}$ als Maß für die Affinität des jeweiligen Antikörpers zu dem entsprechenden Antigen bestimmt werden. Die Schnittstelle der Geraden mit der Abszisse ergibt die maximale Bindung des Liganden unter den gegebenen Bedingungen, d.h. die Bindungskapazität oder die Menge an Antikörper-Bindungsstellen im jeweiligen System (AK_{tot}).
Befinden sich in dem zu untersuchenden System mehrere Bindungsstellen, wie dies bei Verwendung polyclonaler Antiseren der Fall sein kann, können sich aus der graphischen Darstellung der Bindungsdaten mehrere Geraden ergeben, welche sich rechnerisch oder graphisch aus der primär erhaltenen Sammelkurve des Scatchard-Plots ermitteln lassen.

Bestimmung der K_D und B_{max} mit Hilfe von Verdrängungsexperimenten

In Verdrängungsexperimenten werden in den einzelnen Versuchsansätzen einer konstanten Menge an Antikörper und einer konstanten Menge an radioaktiv markiertem Antigen steigende Mengen an nicht radioaktiv markiertem Antigen zugesetzt. Hieraus resultiert ein konkurrierendes Verhalten von radioaktiv markiertem und nicht radioaktiv markiertem Antigen um die Bindungsstellen des Antikörpers. Das radioaktiv markierte Antigen wird durch steigende Mengen an nicht radioaktiv markiertem Antigen vom Antikörper „verdrängt“ (Verdrängungsprinzip). Weiterhin wird mit steigender Menge an nicht markiertem Antigen der prozentuale Anteil des markierten Peptids immer geringer, d.h. die „Markierung“ des mit Peptid besetzten Antikörpers verringert sich mehr und mehr (Markierungsprinzip / „Tracer“).
Durch Aufstellen von auf dem Massenwirkungsgesetz basierenden Gleichungen, durch die der o.g. Prozeß erfaßt wird, kann analog zur Beschreibung des Sättigungsexperiments ebenfalls eine Geradengleichung erhalten werden, welche graphisch umgesetzt dem o.g. Scatchard Plot entspricht (Scatchard, 1949). K_D und B_{max} können dann, wie oben dargestellt rechnerisch oder graphisch ermittelt werden. Eleganter und auch häufiger durchgeführt - geschieht dies mit Hilfe von

Computerprogrammen, mit denen K_D und B_{max} über nicht-lineare Regressionsanalyse berechnet werden können.

4.4.2. Bestimmung der spezifischen Aktivität der radioaktiv markierten Peptide

Prinzip

Zur Ableitung von K_D und B_{max} aus den Bindungsdaten nach dem Massenwirkungsgesetz, d.h. nach dem Scatchard-Plot sind die Angaben der Peptidkonzentrationen in Molaritäten (dies gilt auch für die Konzentrationen des markierten Peptids) und hierzu die Bestimmung der spezifischen Radioaktivität (in Ci/mmol) notwendig. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität der radioaktiv markierten Peptide wurde nach Dias und Reichert (1982) durchgeführt. Das Prinzip besteht darin, eine bestimmte Menge an Bindungsstellen in einem Experiment mit nicht markiertem Ligand und in einem weiteren Experiment mit radioaktiv markiertem Ligand jeweils zu gleichem Prozentsatz (z.B. 50 % der Bindungsstellen) mit Ligand zu besetzen; hierfür muß dann jeweils die gleiche Menge an radioaktiv markiertem bzw. nicht markiertem Ligand im Inkubat vorgelegen haben. Die Wendepunkte der Bindungskurven des markierten („Sättigungskurve“) und des nicht markierten („Verdrängungskurve“) Liganden entsprechen in etwa dieser Forderung. Diese beiden Werte werden aufeinander bezogen (Radioaktivität in Ci / Peptidmenge in mmol) und ergeben die spezifische Aktivität des verwendeten radioaktiv markierten Liganden (Tracer). Voraussetzung ist, daß beide, markierter und nicht markierter Ligand, die gleiche Affinität zur Bindungsstelle besitzen. Als „Bindungsstelle“ wurde ein gegen die Mittelfragmente der Peptide gerichteter Antikörper eingesetzt.

Hierfür wurden zwei Versuchsansätze parallel durchgeführt. Zum einen wurden einer konstanten Menge an Bindungsstellen (konstante Menge an Antikörper) steigende Mengen **an markiertem Liganden** (radioaktiv markiertes Peptid: β_H-Endorphin (1-31), (1-27) bzw. (1-26)) zugesetzt; die Bindung des markierten Liganden wurde gemessen und prozentual bezogen auf die Gesamtradioaktivität (CT-Wert) gegen die steigenden Mengen eingesetzter Radioaktivität aufgetragen. Die graphische Darstellung ergab eine sigmoidal verlaufende sogenannte **„Tracersättigungskurve“ (TS).** Zum anderen wurde einer konstanten Menge an Bindungsstellen (konstante Menge an Antikörper) konstante Mengen an markiertem Liganden und steigende Mengen an nicht markiertem Liganden hinzugegeben, die Bindung durch Bestimmung der gebundenen Radioaktivität gemessen und diese Bindung (ebenfalls in % des CT-Wertes) gegen die steigenden Mengen an nicht markiertem Liganden aufgetragen. Die graphische Darstellung ergab eine sigmoidal verlaufende sogenannte **„Tracerverdrängungskurve“ (TVK).**

Im Idealfall sollten beide Kurven parallel verlaufen und die Abszissenwerte der Wendepunkte können als Radioaktivität / Molmenge (Ci/mmol) aufeinander bezogen werden.

Durchführung:

Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität der verwendeten radioaktiv markierten Peptide (^{125}I) β_H-Endorphin (1-31), (^{125}I) β_H-Endorphin (1-27) und (^{125}I) β_H-Endorphin (1-26) (Tracer) wurde jeweils ein Tracersättigungsexperiment und ein Tracerverdrängungsexperiment in einem FPOS-RIA durchgeführt. Als „Bindungsstelle“ (s.o.) wurde ein polyclonales Antiserum (Codierung DA) verwendet, welches sich gegen die mittlere Region von β_H-Endorphin richtet [Weber et al. 1992]. Das Antiserum wurde in einer Verdünnung von etwa 1 : 8000 eingesetzt, wodurch sich im Tracerverdrängungsexperiment eine ca. 30 % ige Bindung des radioaktiv markierten Peptids an den im Antiserum vorhandenen Antikörper ergab.

Für das **Tracersättigungsexperiment** wurden für 13 verschiedene CT-Werte jeweils der BL-Wert und B_0-Wert (Bindungswert) bestimmt. Für das **Tracerverdrängungsexperiment** wurden der CT-Wert, der BL-Wert, der B_0-Wert und neun verschiedene Standardwerte (Verdrängungswerte) bestimmt.

Die Experimente schlossen folgende Inkubationsansätze ein (jeweils Doppelbestimmungen):

CT-Wert: "Total counts"

Der CT-Wert gab die insgesamt in einem Inkubationsansatz eingesetzte Menge an radioaktiv markiertem Peptid (Tracer) an.

Die Tracersättigungsexperimente wurden mit 13 verschiedenen CT-Werten durchgeführt. Hierfür wurde der Tracer mit Puffer D so verdünnt, daß in den dem Inkubat zugesetzten 20 µl dieser Lösungen Radioaktivitäten von 200 cpm bis 100 000 cpm zu messen waren. Für die Durchführung der Tracerverdrängungsexperimente wurde eine konstante Menge an Radioaktivität (2000 cpm) pro Inkubationsansatz (CT, BL, Bo, Standard), zugesetzt.

BL-Wert: "Blank-Wert"

Der BL-Wert gab die Menge an unspezifisch gebundener Radioaktivität einschließlich Geräteleerwert an und wurde von allen anderen Werten abgezogen.

B_0-Wert: "Null-Standard"

Der B_0-Wert gab die Menge an radioaktiv markiertem Peptid an, welche in Abwesenheit von nicht markiertem Peptid bei konstanten Mengen an Antikörper gebunden werden konnte.

Standard: "Standardwerte"

Für die Tracerverdrängungsexperimente wurden konstanten, definierten Mengen an Antikörper und radioaktiv markiertem Peptid steigende Mengen an nicht markiertem

Peptid in Form von sog. Standards hinzugegeben (1 - 10 000 fmol / Inkubationsansatz).

	CT_{1-13}	BL_{1-13}	B_{01-13}
Puffer C	500	200	150
Puffer D	20	20	20
Antiserum in Puffer C	-	-	50
Radioaktiv markiertes Peptid in Puffer D (Tracer)	20	20	20

Tab. 4.4.: Zusammensetzung der Inkubationsansätze des Tracersättigungsexperiments (Angaben in µl)

	CT	BL	B_0	Standard
Puffer C	500	200	150	150
Puffer D	20	20	20	-
Antiserum in Puffer C	-	-	50	50
Nicht markiertes Peptid in Puffer D (Standards)	-	-	-	20
Radioaktiv markiertes Peptid in Puffer D (Tracer)	20	20	20	20

Tab. 4.5.: Zusammensetzung der Inkubationsansätze des Tracerverdrängungsexperiments (Angaben in µl)

Die Inkubationsansätze wurden wie in den Tabellen 4.4. und 4.5. angegeben bei 4° C pipettiert und nach Schütteln für 20 - 24 h bei 4° C inkubiert. Die weitere Verarbeitung der Ansätze erfolgte analog 4.1.1.6. Die Radioaktivität der einzelnen Ansätze wurde im Gamma-Zähler gemessen.

Berechnung der spezifischen Aktivität:

Die erhaltenen Werte für CT, B_0 und Standard (in cpm) wurden zunächst um den BL-Wert bereinigt. Für die B_0-Werte des Tracersättigungsexperimentes und die B_0- und die Standard-Werte des Tracerverdrängungsexperimentes wurden jeweils die prozentuale Bindung des Tracers, bezogen auf die Gesamtmenge an Tracer (CT-Wert) im Ansatz unter Berücksichtigung von Inkubationsvolumen und gemessenem Volumen, berechnet.

Die berechneten Werte wurden nun graphisch dargestellt, wobei auf der logarithmisch unterteilten Abszisse zum einen die Menge an radioaktiv markiertem Peptid

(Träcersättigungsexperiment) in cpm / Inkubationsansatz und zum anderen die Menge an nicht markiertem Peptid (Tracerverdrängungsexperiment) in fmol / Inkubationsansatz, auf der Ordinate die prozentuale Bindung des radioaktiv markierten Peptids (Tracer) aufgetragen wurde (siehe Abb. 4.7.). Im parallel verlaufenden Kurvenabschnitt wurden - über die Minimalforderung des Wendepunkt-Vergleichs hinausgehend - für drei verschiedene Bindungswerte des markierten Peptids der eingesetzten Menge an nicht-radioaktiv markiertem Peptid (Tracerverdrängungskurve) die entsprechende Menge an radioaktiv markiertem Peptid (Tracersättigungskurve) zugeordnet und der Quotient cpm **/** fmol in Ci/mmol umgerechnet.

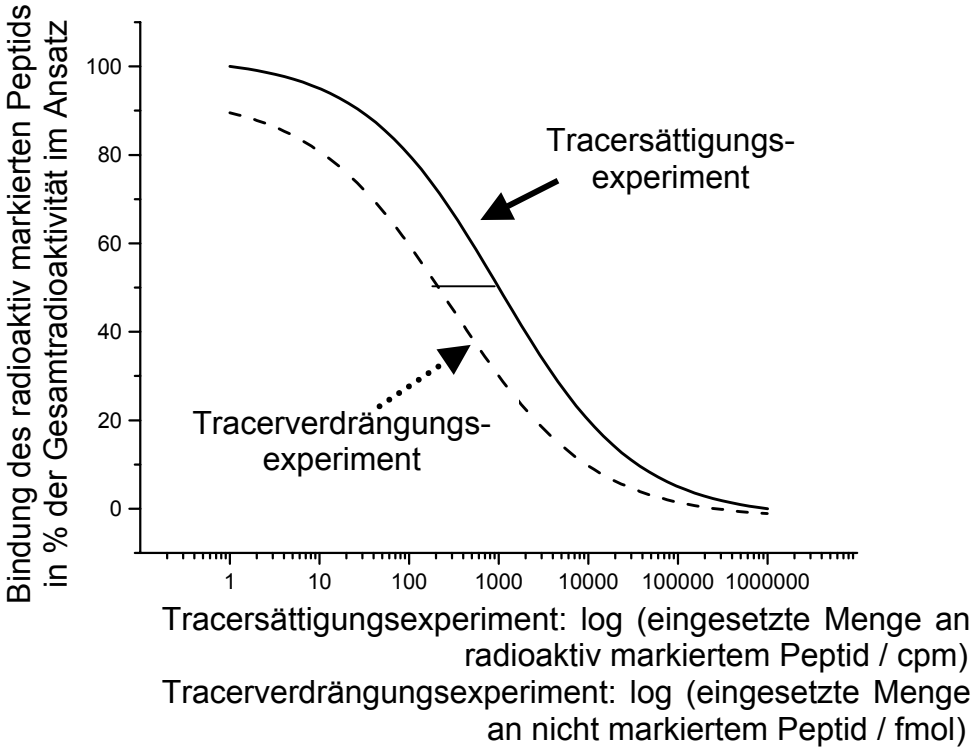


Abb. 4.7.: Schematische Darstellung der Bestimmung der spezifischen Aktivität

Der Mittelwert der 3 Quotienten in Ci/mmol ergab die spezifische Aktivität des untersuchten radioaktiv markierten Peptids.

Dieser wurde zur Berechnung der Bindungsparameter K_D und B_{max} verwendet. Dabei wurde der radioaktive Zerfall von ^{125}I zwischen dem Bestimmungsdatum der spezifischen Aktivität und den später durchgeführten Bindungsversuchen berücksichtigt, indem anhand der Zerfallstabelle für ^{125}I die spezifische Aktivität jeweils für den entsprechenden Versuchstag bestimmt wurde.

4.4.3. Durchführung der Experimente

Durchführung von Tracersättigungsexperimenten zur Bestimmung von K_D und B_{max}

Tracersättigungsexperimente (TS) wurden für den FPOS-RIA [Scholl, 1995] und den neu entwickelten SPOS-RIA durchgeführt. Hierzu wurden jeweils einer konstanten, definierten Menge an C-terminalem Antikörper steigende Mengen an radioaktiv markiertem β_H-Endorphin (1-31) hinzugegeben. Es wurden 13 verschiedene CT-Werte, von 200 cpm bis 200 000 cpm, sowie die entsprechenden BL- und B_0-Werte bestimmt. Zusätzlich wurde für jeden CT-Wert ein TV-Wert (Totalverdränger) angesetzt, bei dem das nicht radioaktiv markierte β_H-Endorphin (1-31) mit Puffer D so verdünnt wurde, daß eine 10^{-4} molare Lösung entstand. Durch diese hohe Konzentration an unmarkiertem Antigen sollte eine völlige Verdrängung des markierten Antigens erreicht werden. Damit war die Bestimmung der spezifischen und der unspezifischen Bindung des radioaktiv markierten Peptids möglich.

Das Tracersättigungsexperiment für den FPOS-RIA wurde wie folgt durchgeführt (siehe Tab. 4.6.):

FPOS-RIA				
	CT	BL	B_0	TV
Puffer C	500	200	150	150
Puffer D	20	20	20	-
Antikörper in Puffer C	-	-	50	50
Radioaktiv markiertes β_H-Endorphin (1-31) in Puffer D (Tracer)	20	20	20	20
Nicht markiertes β_H-Endorphin (1-31) in Puffer D (Totalverdränger)	-	-	-	20

Tab. 4.6.: Zusammensetzung der Inkubationsansätze des Fluid-Phase-One-Site-RIA (Angaben in µl)

Die Inkubationsansätze wurden bei 4° C pipettiert und wie unter 4.1.1.6. beschrieben weiterverarbeitet.
Die Bestimmung der Radioaktivität pro Inkubationsansatz erfolgte durch Messung im Gamma-Zähler.

Das Tracersättigungsexperiment für den SPOS-RIA wurde wie folgt durchgeführt:
Die Antikörper-Beschichtung und Blockung der Röhrchen erfolgte wie unter 4.2.1.2. beschrieben. Nach der Blockung wurden folgende Inkubationsansätze, wie in Tab. 4.7. angegeben, erstellt:

	CT	BL	B_0	TV
Puffer C	960	960	960	960
Puffer D	20	20	20	-
Radioaktiv markiertes β_H-Endorphin (1-31) in Puffer D (= Tracer)	20	20	20	20
Nicht radioaktiv markiertes β_H-Endorphin (1-31) in Puffer D (Totalverdränger)	-	-	-	20

Tab. 4.7.: Zusammensetzung der Inkubationsansätze des Solid-Phase-One-Site-RIA (Angaben in µl)

Nach 20 - 24 stündiger Inkubation bei 4° C wurden alle Ansätze (außer CT) 3 x mit 1 ml Waschpuffer (PBS / Tween) gewaschen, damit nicht gebundene Bestandteile entfernt und anschließend die verbliebene Radioaktivität im Röhrchen im Gamma-Zähler gemessen.

Durchführung von Tracerverdrängungsexperimenten zur Bestimmung von K_D und B_{max}

Tracerverdrängungsexperimente (TVK) wurden für den schon vorhandenen FPOS-RIA, den neu entwickelten SPOS-RIA und für den FPIOS-RIA durchgeführt. Hierfür wurden in dem jeweiligen Assaysystem der CT-Wert, der BL- und B_0-Wert und neun verschiedene Standardwerte (1 fmol bis 10 000 fmol pro Inkubationsansatz) bestimmt (jeweils Doppelbestimmungen). Es wurden einer konstanten Menge an C-terminalem Antikörper eine konstante Menge an radioaktiv markiertem Antigen (für FPOS-RIA (1-31) 2000 cpm pro Inkubationsansatz, für alle anderen Assays 10 000 cpm pro Inkubationsansatz) und steigende Mengen an nicht markiertem Antigen zugegeben und eine dem Verdrängungsprinzip folgende Interaktion der Liganden erreicht. Die Messung der Radioaktivität erfolgte im Gamma-Zähler.

4.4.4. Bestimmung der Bindungsparameter K_D und B_{max}

Voraussetzung für die Bestimmung der Bindungsparameter K_D (Dissoziations-konstante) und B_{max} (Bindungskapazität, Konzentration an Bindungsstellen) war die Bestimmung der spezifischen Aktivität der verwendeten radioaktiv markierten

Peptide. Sie ist unter 4.4.2. beschrieben und wurde aufgrund des radioaktiven Zerfalls von ^{125}I im Laufe der Zeit geringer. Dies wurde berücksichtigt, indem für jeden Versuchsansatz die aktuelle spezifische Aktivität anhand der Zerfallstabelle für ^{125}I für den Tag des Versuchs berechnet wurde.

Graphische Bestimmung von K_D und B_{max} aus Scatchard-Diagrammen: Tracersättigungsexperiment

Die durch das Tracersättigungsexperiment gewonnenen Werte für die Bindung des radioaktiv markierten Peptids (cpm) wurden zunächst im Tabellenkalkulationsprogramm EXCEL folgenden Berechnungsschritten unterzogen:

- Eingabe der bestimmten CT-, BL- und B_0-Werte (in cpm) und Bereinigung der CT- und B_0-Werte um den BL-Wert.
- Für FPOS-RIA wurden die blankbereinigten CT- und B_0-Werte (in cpm) noch unter Berücksichtigung des Verhältnisses von Inkubationsvolumen (240 µl) zu gemessenem Volumen (200 µl) neu berechnet.
- Umrechnung der eingesetzten Gesamtradioaktivität (dpm = cpm / Gamma-Zähler-Effizienz; die Gamma-Zähler-Effizienz betrug 80 %) unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivität in die eingesetzte Gesamtmenge an radioaktiv markiertem Peptid (ng) pro Inkubationsansatz.
- Umrechnung der gebundenen Radioaktivität (dpm = cpm / Gamma-Zähler-Effizienz) unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivität des radioaktiv markierten Peptids in die Menge an gebundenem radioaktiv markiertem Peptid (ng).
- Berechnung der Menge an nicht gebundenem (freiem) radioaktiv markiertem Peptid durch Differenzbildung beider o.g. Größen (ng).
- Bestimmung des Verhältnisses der Menge an gebundenem zur Menge an freiem radioaktiv markiertem Peptid.

Die berechneten Werte wurden im Anschluß daran mit Hilfe des Zeichenprogramms ORIGIN (unter Microsoft WINDOWS 3.1 laufend) in Form eines Scatchard-Plots in ein Koordinatensystem eingetragen. Hierzu wurde auf der Abszisse die Menge an gebundenem Peptid (ng), auf der Ordinate das Verhältnis von Menge an gebundenem Peptid zur Menge an freiem Peptid aufgetragen. Die Punkte wurden durch eine oder zwei Geraden verbunden und die Steigung der erhaltenen Geraden mit Hilfe eines linearen Regressionsprogramms berechnet.

Aus der Steigung der Geraden wurde die Dissoziationskonstante K_D berechnet, der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse ergab die Bindungskapazität (B_{max}), d.h. die Konzentration an Bindungsstellen in dem jeweiligen Assaysystem.

Tracerverdrängungsexperiment

Die durch das Tracerverdrängungsexperiment gewonnenen Werte für die Bindung des radioaktiv markierten Peptids (cpm) wurden zunächst im Tabellenkalkulationsprogramm EXCEL folgenden Berechnungsschritten unterzogen:

- Umrechnung der eingesetzten Gesamtradioaktivität (dpm = cpm / Gamma-Zähler-Effizienz) unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivität in die eingesetzte Menge an radioaktiv markiertem Peptid (ng) pro Inkubationsansatz
- Berechnung der Gesamtmenge an eingesetztem Peptid (nicht radioaktiv markiertes und radioaktiv markiertes Peptid) (ng)
- Umrechnung der gebundenen Radioaktivität (dpm aus cpm; s.o.) unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivität des radioaktiv markierten Peptids in die Menge an gebundenem radioaktiv markiertem Peptid (ng)
- Berechnung des Verhältnisses an eingesetzter Gesamtmenge an Peptid zu eingesetzter Menge an radioaktiv markiertem Peptid
- Berechnung der Gesamtmenge an gebundenem Peptid unter Berücksichtigung des Verhältnisses von eingesetzter Gesamtmenge an Peptid zu eingesetzter Menge an radioaktiv markiertem Peptid (ng)
- Berechnung der Gesamtmenge an freiem Peptid aus der Differenz von Gesamtmenge an eingesetztem Peptid und Gesamtmenge an gebundenem Peptid (ng)
- Bestimmung des Verhältnisses der Menge an insgesamt gebundenem Peptid zu der Menge an insgesamt freiem Peptid

Die berechneten Werte wurden im Anschluß daran mit Hilfe des Zeichenprogramms ORIGIN (unter Microsoft WINDOWS 3.1. laufend) in Form eines Scatchard-Plots in ein Koordinatensystem eingetragen. Hierzu wurde auf der Abszisse die Menge an gebundenem Peptid (ng), auf der Ordinate das Verhältnis von Menge an gebundenem Peptid zur Menge an freiem Peptid aufgetragen. Die Punkte wurden durch eine oder zwei Geraden verbunden und die Steigung der erhaltenen Geraden mit Hilfe eines linearen Regressionsprogramms berechnet. Aus der Steigung der Geraden wurde die Dissoziationskonstante (K_D) berechnet, der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse ergab die Bindungskapazität (B_{max}), d.h. die Konzentration an Bindungsstellen in dem jeweiligen Assaysystem.

Bestimmung von K_D und B_{max} mittels eines nicht-linearen iterativen Regressionsverfahrens auf der Basis der Scatchard-Transformation der Massenwirkungsgesetz-Gleichung:

Die Bindungsdaten aus den Tracerverdrängungexperimenten des FPOS-RIA, SPOS-RIA und der FPIOS-RIAs wurden zusätzlich zu den schon beschriebenen Verfahren zur Bestimmung von K_D und B_{max} auch mit Hilfe des Computer-Programms LIGAND (Munson und Rodbard, 1980) ausgewertet.

4.5. Bestimmung von β_H-Endorphin (1-31) in Blutleukozyten

4.5.1. Buffy coat-Präparationen

Pufferlösungen und Kulturmedium

Für die Buffy coat-Präparationen wurden der Puffer PBS-steril und die Kulturmedien DMEM-Hepes und Krebs-Ringer-Hepes verwendet (Zusammensetzung siehe 3.2.).

Herkunft und Verarbeitung der Buffy coats

Buffy coats (BC) von verschiedenen Blutspendern wurden von der Blutbank der Justus-Liebig-Universität (Gießen) zur Verfügung gestellt. Die weitere Verarbeitung gestaltete sich folgendermaßen:

4.5.1.1. Präparation von mononuklearen Blutzellen (PBMC-Präparation)

Die Gewinnung von mononuklearen Blutzellen (PBMC) erfolgte durch Anwendung der Dichte-Gradienten-Zentrifugation mit Ficoll-Paque (1,077 g/ml, Pharmacia) in Anlehnung an die durch Bøyum (1976) beschriebene Methode, wodurch aus den Buffy coats (BC) Lymphozyten und zu einem bestimmten Anteil auch Monozyten gewonnen werden können.

Die Präparation erfolgte in einem Zellkulturlabor (ZKL) unter sterilen Bedingungen, um die Lebens- und Vermehrungsfähigkeit der Zellen zu erhalten. Es wurden jeweils 25 ml PBS-steril-Puffer mit 25 ml BC vermischt. Ficoll-Paque wurde in ein Röhrchen vorgegeben und mit dem BC-Puffer-Gemisch überschichtet. Die überschichteten Ficoll-Paque-Röhrchen wurden anschließend für 40 min bei 4° C mit 400 x g zentrifugiert. Die Gewinnung der PBMC-Schicht erfolgte nach Zentrifugation durch steriles Abpipettieren des deutlich sichtbaren Zellrings zwischen Serum und Ficoll und Überführung in ein 12 ml-Röhrchen.

Es wurden 3 - 5 Tropfen Heparin-Natrium pro Röhrchen hinzugegeben und mit PBS-steril-Puffer auf ca. 12 ml Volumen aufgefüllt. Nach Schütteln wurden die Röhrchen erneut bei 4° C für 20 min mit 600 x g zentrifugiert. Als Ergebnis zeigte sich eine weiße Schicht (Lymphozyten) und ein roter Ring (Erythrozyten) am Boden der

Röhrchen. Der Überstand wurde entfernt und es schloß sich ein erneuter Waschgang durch Hinzugabe von Heparin-Natrium und PBS-steril-Puffer (wie oben beschrieben) an. Insgesamt wurde fünf mal zentrifugiert und viermal gewaschen, wobei die Zentrifugationen 2 - 4 bei jeweils 400 x g durchgeführt wurden. Beim 4. Waschgang wurden die am Röhrchenboden als „Zellklumpen“ angesammelten Zellen durch Zugabe von 3 - 4 ml Kulturmedium (DMEM - Hepes) resuspendiert; es folgte eine 5. Zentrifugation bei 4° C für 10 min mit 400 x g. Der Überstand wurde entfernt und die am Röhrchenboden verbliebenen Zellen mit 2 ml Kulturmedium je Röhrchen resuspendiert. Anschließend wurde die Bestimmung der Zellvitalität und Zellzahl vorgenommen. Hierzu wurden 10 µl o.g. Zellsuspensionen mit 90 µl Trypan-Blau-Lösung gemischt und 5 - 10 min lang bei 37° C im Begasungsbrutschrank inkubiert. Die Zellvitalität und Zellzahl wurden dann mit Hilfe einer Neubauer-Kammer bestimmt.

4.5.1.2. Präparation von Lymphozyten und Monozyten

Präparation von Lymphozyten:

Durch die Präparation von PBMC aus BC wurden Lymphozyten und zu einem bestimmten Anteil auch Monozyten gewonnen (s.o.). Um fast Monozyten-freie Lymphozyten-Präparationen zu erhalten, wurden die PBMC-Präparationen für 24 - 30 h im Begasungsbrutschrank unter konstanten und sterilen Bedingungen inkubiert. Dabei sollten die Lymphozyten am Kulturschalenboden haften bleiben und die in der Zellsuspension befindlichen Monozyten wurden durch Wechsel des Kulturmediums (DMEM-Hepes) eliminiert (Wechsel alle 8 h bei einer Zellzahl von 10^6 pro 1 ml). Anschließend wurden die Zellen resuspendiert, für 10 min bei 4° C und 400 x g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in DMEM-Hepes resuspendiert und eine Bestimmung der Zellvitalität und Zellzahl vorgenommen (s.o.). Die Lymphozytensuspension wurde dann mit DMEM-Hepes so verdünnt, daß eine Zellzahl von 10^6/ml entstand. Bis zur weiteren Verwendung wurde sie bei 37° C im Begasungsbrutschrank aufbewahrt.

Präparation von Monozyten:

Die Präparation von Monozyten erfolgte aus frischem, unverdünntem BC unter Anwendung der Dichte-Gradienten-Zentrifugation und Berücksichtigung des unterschiedlichen Verhaltens von Lymphozyten und Monozyten gegenüber Veränderungen der Osmolarität [Bøyum, 1983; Bøyum, 1984]. Hierfür war von der Firma Nycomed, Norwegen, eine hypertone Lösung (mit einer Dichte von 1.068 g/ml und einer Osmolarität von 335 mOsm), genannt Nycodenz® bzw. Nycoprep.™ 1.068, entwickelt worden. Die Präparation erfolgte entsprechend der vorgegebenen Anleitung der Firma Nycomed. Es wurden in bis zu 7 sterilen 12 ml-Röhrchen jeweils

3 ml Nycoprep.1.068 vorgelegt und mit jeweils 5 ml BC überschichtet. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 4° C mit 600 x g wurde das Serum bis auf 5 mm oberhalb der Trennlinie zum Nycoprep.1.068 abgesaugt und verworfen. Das verbliebene Serum und ca. die obere Hälfte des Nycoprep.1068 wurden zusammen abgesaugt und in ein steriles Röhrchen überführt und mit Monozytenwaschpuffer (MWP) auf 9 ml aufgefüllt. Nach einer weiteren Zentrifugation (4° C, 600 x g, 7 min) war in den Röhrchen eine weißliche Zellschicht am Röhrchenboden sichtbar. Nach Absaugen des Überstandes wurde jede Zellschicht mit 2 ml MWP resuspendiert und alle Präparationen gepoolt und das Volumen mit MWP auf 25 ml aufgefüllt. Es wurde nochmals zentrifugiert (4° C, 600 x g, 7 min), der Überstand maximal abgesaugt und die Zellpellets in 1 ml DMEM-Hepes resuspendiert. Es folgte die Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität und die Aufbewahrung bei 37° C im Begasungsbrutschrank bis zur weiteren Verwendung.

4.5.2. Stimulation von PBMC, Lymphozyten und Monozyten

4.5.2.1. Stimulation von PBMC-Zellsuspensionen mit Interleukin-1β und CRF

Die Inkubation der PBMC-Zellsuspensionen mit den Substanzen Interleukin-1β (IL-1β) und CRF fand unter sterilen Bedingungen statt. Die PBMC-Zellsuspension wurde mit DMEM-Hepes so verdünnt, daß eine Zellkonzentration von ca. 10^6 - 10^7 Zellen/ml entstand. Es wurde dann folgender Stimulationsversuch durchgeführt: 980 µl Zellsuspension wurden mit jeweils 20 µl einer Interleukin-1β-Lösung (Konzentrationen: 10^{-5} M / 10^{-7} M / 10^{-9} M) bzw. einer CRF-Lösung (Konzentrationen: 10^{-5} M / 10^{-7} M / 10^{-9} M) inkubiert. Interleukin-1β und CRF wurden hierfür mit Puffer D so verdünnt, daß o.g. Konzentrationen entstanden.

Als Leerwerte wurden jeweils 1 ml DMEM-Hepes, 1 ml Zellsuspension, 980µl DMEM-Hepes mit 20 µl IL-1β 10^{-5} M und 980 µl DMEM-Hepes mit 20 µl CRF 10^{-5} M angesetzt. Alle Inkubationsansätze wurden als Doppelbestimmungen in sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäßen (1,5 ml) durchgeführt. Die Inkubation der Versuche fand gleichzeitig für 3 h bei 37° C für eine Versuchsreihe im **Begasungsbrutschrank** (steril), für eine andere Versuchsreihe mit identischer Zusammensetzung des Inkubats im **Schüttelwasserbad** (unsteril, Begasung mit Carbogen 95 % O_2 / 5 % CO_2) statt. Nach Abschluß der Inkubation wurden alle Inkubationsansätze bei 4° C für 10 min mit 400 x g zentrifugiert. Der Überstand (ca. 980 µl) wurde bei 4° C abpipettiert. Überstand und verbliebenes Zellpellet wurden zur weiteren Verarbeitung bei - 20° C aufbewahrt.

Der Stimulationsversuch mit PBMC-Zellsuspensionen unter Zusatz von IL-1β und CRF wurde insgesamt 3 x wiederholt (Stimulationsversuche Nr. 1-4, siehe Tab. 4.8.). Hierzu wurden die Inkubationsvarianten (Begasungsbrutschrank oder Schüttel-

wasserbad) und die Verwendung anderer Inkubationsmedien (PBS-steril, Krebs-Ringer-Hepes-Puffer) ausgetestet. Zusätzlich wurde die Zellvitalität vor und während der Stimulationsversuche untersucht.

Stimulationsversuch Nr.	Art der Inkubation	Kulturmedium
1 a	Begasungsbrutschrank	DMEM-Hepes
1 b	Schüttelwasserbad	DMEM-Hepes
2 a	Begasungsbrutschrank	DMEM-Hepes
2 b	Schüttelwasserbad	DMEM-Hepes
2 c	Begasungsbrutschrank	DMEM-Hepes
3 a	Begasungsbrutschrank	DMEM-Hepes
3 b	Schüttelwasserbad	DMEM-Hepes
3 c	Begasungsbrutschrank	DMEM-Hepes
4 a	Begasungsbrutschrank	DMEM-Hepes
4 b	Begasungsbrutschrank	PBS-steril
4 c	Begasungsbrutschrank	Krebs-Ringer-Hepes-Puffer
4 d	Schüttelwasserbad	Krebs-Ringer-Hepes-Puffer

Tab. 4.8.: Übersicht über die Inkubationsart und die verwendeten Kulturmedien der Stimulationsversuche Nr. 1 - 4.

Die Überstände und Zellpellets aus den Stimulationsversuchen wurden auf ihren Gehalt an β_H-Endorphin (1-31) hin überprüft, indem die Überstände als Proben in den **SPTS-RIA** (500 µl pro Inkubationsansatz) und in den **FPITS-RIA** (150 µl pro Inkubationsansatz), die Zellpellets nach Durchführung einer Extraktion (s.u.) als Proben in den FPITS-RIA (150 µl Extrakt gelöst in Puffer C pro Inkubationsansatz) eingebracht wurden.

Durchführung der Extraktion von stimulierten Zellen

Die bei - 20° C aufbewahrten Zellpellets wurden aufgetaut und anschließend mit 100 µl 1 M Essigsäure pro 10^6 Zellen/ml Stimulationsansatz resuspendiert. Die Proben wurden 10 min lang gekocht, auf Eis abgekühlt und für 10 min in einem Ultraschallbad homogenisiert (35 KHz). Dann erfolgte eine Zentrifugation der Proben für 10 min bei 4° C mit 2 100 x g. Der Überstand wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße übernommen und diese zur Verdunstung in einen Speed-Vac-Concentrator gebracht. Die Verdunstungsdauer betrug je nach Ausgangsvolumen 3 - 4 h für 300 µl und 5 - 6 h für 700 µl. Anschließend konnte der erhaltene Zellextrakt mit Puffer C für weitere Untersuchungen (s.o.) resuspendiert werden oder wurde bei - 20° C aufbewahrt.

4.5.2.2. Stimulation von Lymphozyten- und Monozytenzellsuspensionen mit Interleukin-1β und CRF

Die Stimulation der Lymphozyten- und Monozytenzellsuspensionen mit den Substanzen IL-1β und CRF wurde unter sterilen Bedingungen in Eppendorf-Reaktionsgefäßen (1,5 ml) durchgeführt. Die Stimulation fand unter konstanten Bedingungen im Begasungsbrutschrank bei 37° C statt. Die Stimulatorsubstanzen wurden mit Puffer D so verdünnt, daß Lösungen zum einen von IL-1β, zum anderen von CRF (Konzentrationen: 10^{-5} M / 10^{-7} M / 10^{-9} M) entstanden. Die Lymphozytenzellsuspension wurde mit DMEM-Hepes auf eine Konzentration von 10^6 Zellen/ml, die Monozytenzellsuspension mit DMEM-Hepes auf eine Konzentration von etwa 120 000 Zellen/ml eingestellt. Zusätzlich wurde eine Zellsuspension, bestehend aus Lymphozyten- und Monozytenzellsuspension, hergestellt, welche dem physiologischen Verhältnis von Monozyten und Lymphozyten von 1 : 8 entsprach.

Die 3 verschiedenen Zellsuspensionen (Lymphozyten, Monozyten, Lympho-/Monozyten) wurden jeweils mit den beiden o.g. Substanzen inkubiert.

Das Volumen betrug 1 ml pro Inkubationsansatz (980 µl Zellsuspension + 20 µl Stimulationslösung 10^{-5} M bzw. 10^{-7} M bzw. 10^{-9} M). Als Leerwerte wurden 1 ml DMEM-Hepes und jeweils 1 ml Monozyten- und Lymphozytenzellsuspension in DMEM-Hepes angesetzt.

Nach Abschluß der Inkubation wurden alle Inkubationsansätze bei 4° C für 10 min mit 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf den DMEM-Hepes-Leerwert-Ansatz abpipettiert. Überstände und Zellpelletts wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei - 20° C aufbewahrt.

Die gewonnenen Stimulationsüberstände wurden im FPITS-RIA (150 µl Überstand pro Inkubationsansatz) auf ihren Gehalt an β_H-Endorphin (1-31) hin untersucht.

5. ERGEBNISSE

5.1. Antikörper gegen den N-Terminus, das Mittelfragment und die C-Termini von β_H-Endorphinfragmenten

Antikörper gegen die C-Termini von β_H-Endorphin (1-17) und (1-16)

Es wurden jeweils 3 Kaninchen mit an Thyroglobulin gekoppeltem [Tyr^{13}]-β_H-Endorphin (13-17) bzw. [Tyr^{12}]-β_H-Endorphin (12-16) immunisiert. Es wurden insgesamt 8 Immunisierungen und 6 Blutentnahmen durchgeführt. Die Höhe des Antikörpertiters wurde jeweils in 3 Verdünnungen (1 : 100, 1 : 500, 1 : 1000) des gewonnenen Antiserums in einem FPOS-RIA bestimmt (siehe 4.1.1.6.). Wiederholte Titerbestimmungen zeigten keinen Titeranstieg, so daß davon ausgegangen werden mußte, daß eine Immunisierung der Kaninchen gegen die Opioidpeptidfragmente unter den gegebenen Bedingungen nicht möglich war.

Antikörper gegen die C-Termini von β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26)

Für den Nachweis von β_H-Endorphin (28-31) immunoreaktivem Material im SPOS-RIA und FPIOS-RIA bzw. den Nachweis von authentischem β_H-Endorphin (1-31) im SPTS-RIA und FPITS-RIA wurde ein bereits vorhandenes polyclonales Antiserum (Codierung: 10P) verwendet [Wiedemann et al., 1986]. Dieses, gegen den C-Terminus von β_H-Endorphin (1-31) gerichtete Antiserum, wurde mit Protein A-Sepharose gereinigt und die gewonnenen Antikörper sowohl als Festphasen-Antikörper als auch in Lösung agierende Antikörper eingesetzt.

Für den Nachweis von β_H-Endorphin (24-27) und (23-26) immunoreaktivem Material im FPIOS-RIA bzw. von authentischem β_H-Endorphin (1-27) und (1-26) im FPITS-RIA wurden ebenfalls bereits vorhandene polyclonale Antiseren (Codierung: 66P und 67P), gerichtet gegen den C-Terminus von β_H-Endorphin (1-27), bzw. Antiseren (Codierung: 62P und 63P), gerichtet gegen den C-Terminus von β_H-Endorphin (1-26), verwendet [Scholl, 1995].

Antikörper gegen den N-Terminus der β_H-Endorphinfragmente.

Für den SPTS-RIA zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-31) und die FPITS-RIAs für die Bestimmung von β_H-Endorphin (1-31), (1-27) bzw. (1-26) wurde ein gegen den N-Terminus von β-Endorphin gerichteter monoclonaler Antikörper (Codierung: 3-E7), gewonnen von der Maus, verwendet [Gramsch et al., 1983]. Der N-Terminus war für alle β-Endorphinfragmente gleich. Dieser Antikörper wurde nach radioaktiver Markierung mit ^{125}I als zweiter, signalgebender Antikörper in den Two-Site Assays eingesetzt.

Antikörper gegen das Mittelfragment von β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26).

Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität der radioaktiv markierten Peptide (β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26)) wurde in den FPOS-RIAs ein Antiserum (Code: DA) verwendet, welches sich gegen den mittleren Abschnitt des β_H-Endorphins

richtete [Weber et al., 1982]. Die polyclonalen Antiseren bzw. der monoclonale Antikörper lagen in gereinigtem und lyophilisiertem Zustand vor.

Eine Übersicht über die zur Methodenentwicklung eingesetzten Antikörper zeigt Tab. 5.1.

Codierung	Typ	gewonnen durch Immunisierung gegen (Antigen)	in Tierspezies	gerichtet gegen
10P	Polyclonales Antiserum	β_H-End (27-31) Tyr-Lys-Lys-Gly-Glu	Kaninchen	β_H-Endorphin (28-31)
66P 67P	Polyclonales Antiserum	[Tyr^{23}]-β_H-End (23-27) Tyr-Lys-Asn-Ala-Tyr	Kaninchen	β_H-Endorphin (24-27)
62P 63P	Polyclonales Antiserum	[Tyr^{22}]-β_H-End (22-26) Tyr-Ile-Lys-Asn-Ala	Kaninchen	β_H-Endorphin (23-26)
DA	Polyclonales Antiserum	β_P-End (1-31)	Kaninchen	β_H-Endorphin (17-26)
3-E7	Monoclonaler Antikörper	β_H-End (1-31)	Maus	β_H-Endorphin (1-5)

Tab. 5.1.: Zur Methodenentwicklung eingesetzte Antikörper gegen verschiedene Fragmente von β_H-Endorphin (1-31)
(β_H-End = β_H-Endorphin,
β_P-End = β_P-Endorphin, p = porcin)

5.2. Methodenentwicklung

Es wurde versucht, die Methoden zum Nachweis von authentischem β_H-Endorphin (1-31), (1-26) und (1-27) stufenweise aufeinander aufbauend zu entwickeln. Zum Teil wurden bekannte Methoden übernommen, zum Teil wurde getestet, inwieweit Änderungen von Versuchsbedingungen im jeweiligen Assay zu einer Verbesserung der Methoden führen würden.

5.2.1. Entwicklung eines Solid-Phase-ONE-Site-Radioimmunoassay (SPOS-RIA) zum Nachweis von β_H-Endorphin (28-31) immunoreaktivem Material

Als feste Phase wurden für alle Versuchsansätze Polystyrol-Röhrchen (Immunotubes, Maxisorp, 4 ml) der Firma Nunc, Dänemark, verwendet. Die Wände der Röhrchen sollten mit den Antiseren beschichtet werden. Um eine optimale Adsorption der Antikörper zu erreichen, wurden die Konzentration der Antikörper, das Volumen des

Beschichtungspuffers, die Beschichtungstemperatur, und der Beschichtungstyp variiert. Desweiteren wurde ausgetestet, ob eine Blockung unspezifischer Bindungsstellen der Röhrchen-Wand von Vorteil war. Hierfür wurden verschiedene Blockungssubstanzen, die Blockungsart und die Blockungstemperatur ausgetestet.

5.2.1.1. Methodenentwicklung

Austestung der zur Beschichtung eingesetzten Konzentrationen der C-terminalen Antiseren:

Durch Erstellung von sogenannten „Binder-Verdünnungskurven" sollten diejenigen Konzentrationen an C-terminalen Antiseren ermittelt werden, die bei Vorgabe einer festen Menge an radioaktiv markiertem Peptid in der Lage waren, dies zu 50 Prozent zu binden [Chard, 1980]. Im Idealfall ergab sich bei halblogarithmischer Darstellung der Verdünnungskurven ein sigmoidaler Verlauf. Die der 50-prozentigen Bindung entsprechende „Binder-Konzentration" sollte anschließend für die Erstellung von Standardkurven verwendet werden.

Die gereinigten polyclonalen Antiseren (10P, 66P, 67P, 62P, 63P) wurden mit Coating buffer (CB) so verdünnt, daß Konzentrationen von 200 - 3,125 μg pro 1 ml Beschichtungsvolumen entstanden. Die Beschichtung der Röhrchen erfolgte mit 1 ml Beschichtungsvolumen.

Für Antiserum 10P ergab sich eine deutliche Bindung von (^{125}I) β_H-Endorphin (1-31) (siehe Abb. 5.1.). Der ca. 50-prozentigen Bindung des radioaktiv markierten Peptids ((^{125}I) β_H-Endorphin(1-31)) entsprach eine Antiserumkonzentration von 20 μg/ml: Diese Konzentration wurde bei der Erstellung von Standardkurven und bei der Methodenentwicklung eingesetzt. Alle anderen ausgetesteten Antiseren (62P, 63P, 66P, 67P) zeigten bei einem Beschichtungslösungsvolumen von 1 ml pro Röhrchen keine bis nur geringe Bindung der radioaktiv markierten Peptide. In der Annahme, durch Erhöhung des Konzentrationsdrucks im Beschichtungsvolumen eine Erhöhung der Bindung an die feste Phase zu erreichen, wurde das Beschichtungsvolumen auf 50 μl pro Röhrchen reduziert; dies zeigte aber keine Veränderung des Bindungsverhaltens o.g. Antiseren. Die Entwicklung einer Methode zum Nachweis von β_H-Endorphin (24-27) und (23-26) immunoreaktivem Material im Immuno-tube war somit nicht möglich.

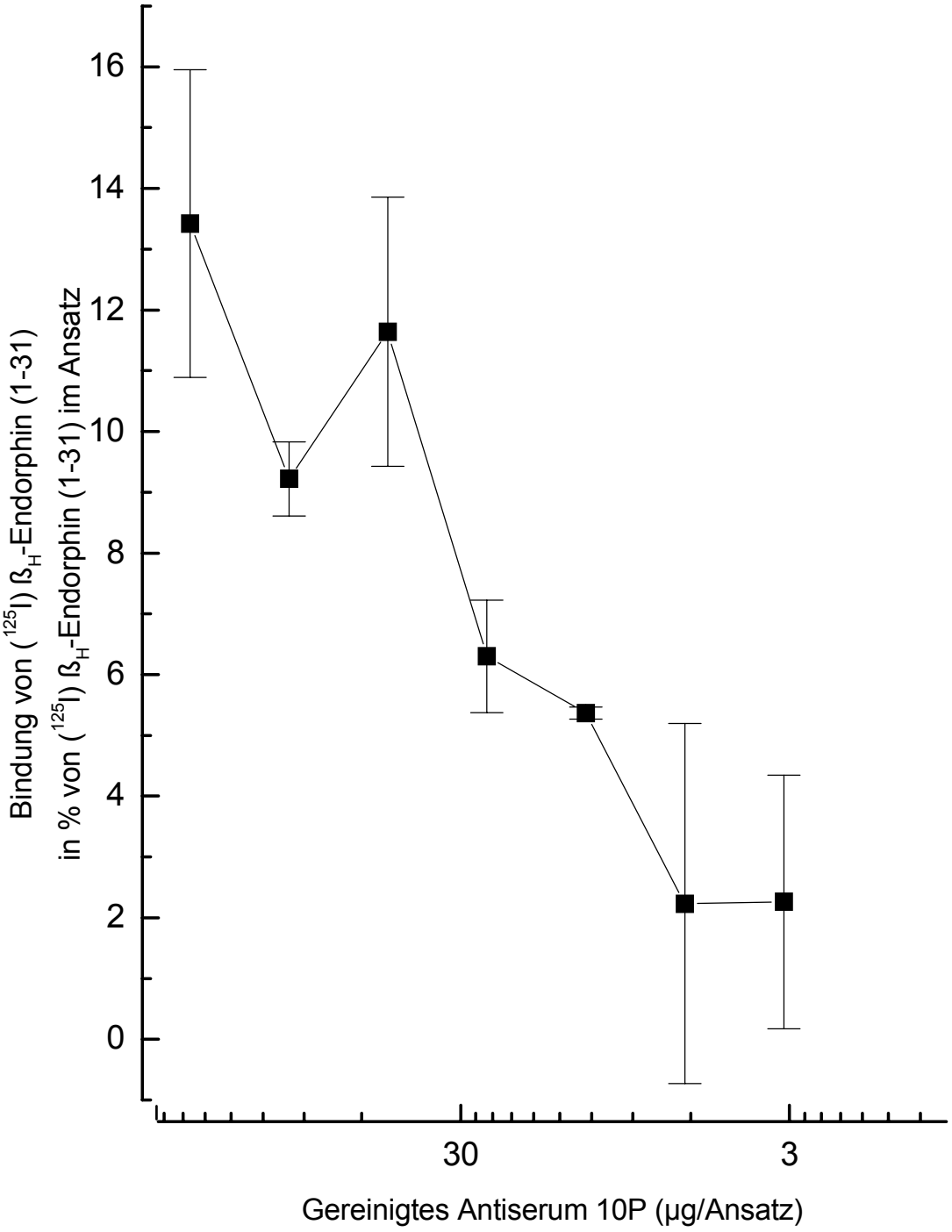


Abb. 5.1.: Solid-Phase-One-Site-RIA (SPOS-RIA) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (28-31) immunoreaktivem Material:
Einfluß der Konzentration an Antiserum 10P in der Lösung zur Beschichtung von Immuno-tubes (Maxisorp).
Bindung von (^{125}I) β_H-Endorphin (1-31) in Abhängigkeit von der Antikörperkonzentration: MW $\pm$ s aus Doppelwerten

Austestung von Beschichtungszeit und Beschichtungstemperatur
Weiterhin konnte gezeigt werden, daß eine Änderung in der Art der Beschichtung mit Antiserum 10P von 2 h bei RT auf 20 - 24 h bei 4° C nicht zu einer Zunahme der Bindung des radioaktiv markierten Peptids an den Fest-Phasen-Antikörper führte (nicht gezeigt).

Austestung der Beschichtungsmechanik (Bewegung der Proben):
Es ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen Proben, die während des Beschichtungszeitraums bewegt bzw. nicht bewegt wurden. Es konnte gezeigt werden, daß die Bindung des radioaktiv markierten Peptids höher war bei Proben, die auf einem Rundschüttler geschüttelt wurden als bei Proben, die während dieser Zeit ohne Bewegung standen (nicht gezeigt).

Austestung verschiedener Substanzen zur Blockung unspezifischer Bindungsstellen:
Der Blank-Wert im SPOS-RIA (keine Beschichtung mit Antiserum) zeigte nach Inkubation und Waschschritten eine deutliche Radioaktivität, welche auf die unspezifische Bindung des radioaktiv markierten Peptids an die Röhrchen-Wand zurückzuführen war. Aufgrund dessen wurde versucht, mit sogenannten Blockungssubstanzen die nicht durch Komponenten des ersten Antiserums besetzten Stellen der Röhrchen-Wand zu besetzen, um eine unspezifische Adsorption des markierten Peptids zu vermeiden. Es wurden unterschiedliche Substanzen (BSA 1 %, Magermilchpulver 1 %, Bactopepton 1 % und Pferdeserum 5 %) bei unterschiedlichen Temperaturen (4° C bzw. RT) und für jeweils unterschiedlich lange Zeiträume (2 h bzw. 20 - 24 h) untersucht. Alle Blockungssubstanzen wurden in PBS-Puffer gelöst. Nach Beschichtung der Röhrchen-Wände mit Antiserum wurden die Röhrchen mit 1 ml o.g. Blockungssubstanzen inkubiert (s.o.). Anschließend wurden die Röhrchen gewaschen und mit radioaktiv markiertem Peptid inkubiert. Durch die Blockung mit **BSA (1 %ig in PBS-Puffer)** unter Schütteln über 20 - 24 h bei 4° C konnte im Vergleich mit allen anderen ausgetesteten Blockungssubstanzen die unspezifisch gebundene Radioaktivität am meisten reduziert werden. Deshalb wurden alle weiteren Versuche mit einem Blockungsschritt unter Verwendung von einprozentigem **BSA (w/v, gelöst in PBS)** für 20 - 24 h bei 4° C im Anschluß an die Antikörperbeschichtung durchgeführt (nicht gezeigt).

5.2.1.2. Optimierte Methode

Inkubationsansätze: Die unter 4.2.1.2. aufgeführten Inkubationsansätze (CT-, BL-, B_0- und Standard-Wert) wurden verwendet.

Alle Inkubationen wurden in Polystyrol-Röhrchen (Immuno-tubes, Maxisorp, 4 ml) durchgeführt.

Durchführung:

Zuerst wurden die Polystyrol-Röhrchen mit Protein A-Sepharose-gereinigtem C-terminalem Antiserum (10P), gerichtet gegen β_H-Endorphin (28-31), für 2 h bei RT auf einem Rundschüttler beschichtet. Das Volumen des Beschichtungspuffers betrug 1 ml, das Antiserum wurde in Coating buffer so gelöst, daß eine Konzentration von 20 µg/ml entstand. Durch dreimaliges Waschen der Röhrchen mit jeweils 1 ml PBS-Puffer wurde nicht adsorbierter Antikörper wieder entfernt. Es folgte die Blockung, noch freier Bindungsstellen der Röhrchen-Wände mit 1 ml einer 1 %igen BSA-Lösung (w/v) in PBS-Puffer (CT-Wert ausgenommen) für 20 - 24 h bei 4° C unter permanentem Schütteln. Dreimaliges Waschen der Röhrchen mit jeweils 1 ml PBS-Puffer entfernte nicht gebundene Komponenten der Blockungslösung. Anschließend wurde das an die feste Phase adsorbierte Antiserum 10P mit steigenden Mengen an nicht markiertem β_H-Endorphin (1-31) (Standards) und einer definierten, konstanten Menge an mit ^{125}I radioaktiv markiertem β_H-Endorphin (1-31) (Tracer) für weitere 20 - 24 h bei 4° C unter permanentem Schütteln inkubiert. Hierfür wurde β_H-Endorphin (1-31) in Puffer D so gelöst, daß Konzentrationen von 1 - 10 000 fmol pro ml (Inkubationsansatz) entstanden. Das ^{125}I markierte β_H-Endorphin (1-31) wurde mit Puffer D auf 10 000 cpm / 20 µl Puffer D eingestellt (Gesamtradioaktivität pro Inkubationsansatz). Durch dreimaliges Waschen der Röhrchen mit jeweils 1 ml PBS-Tween-Puffer wurden das freie, nicht Antikörper-gebundene Peptid vom Antikörper-gebundenen Peptid getrennt. Anschließend wurde die verbliebene, gebundene Radioaktivität im Röhrchen in einem Gamma-Zähler eine Minute lang gemessen. Eine Übersicht über die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Inkubationsansätze sowie Durchführung des Assays gibt Tab. 5.2. In Abb. 5.2. ist eine Standardkurve dargestellt.

	Zeit (h)	Temp. (°C)	Agens	Konzentration bzw. Menge	Puffer	Volumen (µl)	CT	BL	B_0	Standard
Beschichtung	2	RT	Antiserum 10P	20 µg	Coating buffer	1000	-	-	+	+
Waschen	-	-	-	-	PBS	3 x 1000	-	-	+	+
Blockung	20 - 24	4	BSA	1 %	PBS	1000	-	+	+	+
Waschen	-	-	-	-	PBS	3 x 1000	-	+	+	+
Inkubation	20 - 24	4	Standard (β_H-Endorphin (1-31))	0 - 10 000 fmol	Puffer D	20	-	-	-	+
					Puffer C	960	+	+	+	+
					Puffer D	20	+	+	+	-
			Tracer ((^{125}I) β_H-Endorphin (1-31))	10 000 cpm	Puffer D	20	+	+	+	+
Waschen	-	-	-	-	PBS-Tween	3 x 1000	-	+	+	+

Tab: 5.2.: Durchführung des SPOS-RIA zur Bestimmung von β_H-Endorphin (28-31) immunoreaktivem Material: Zusammensetzung der Inkubationsansätze

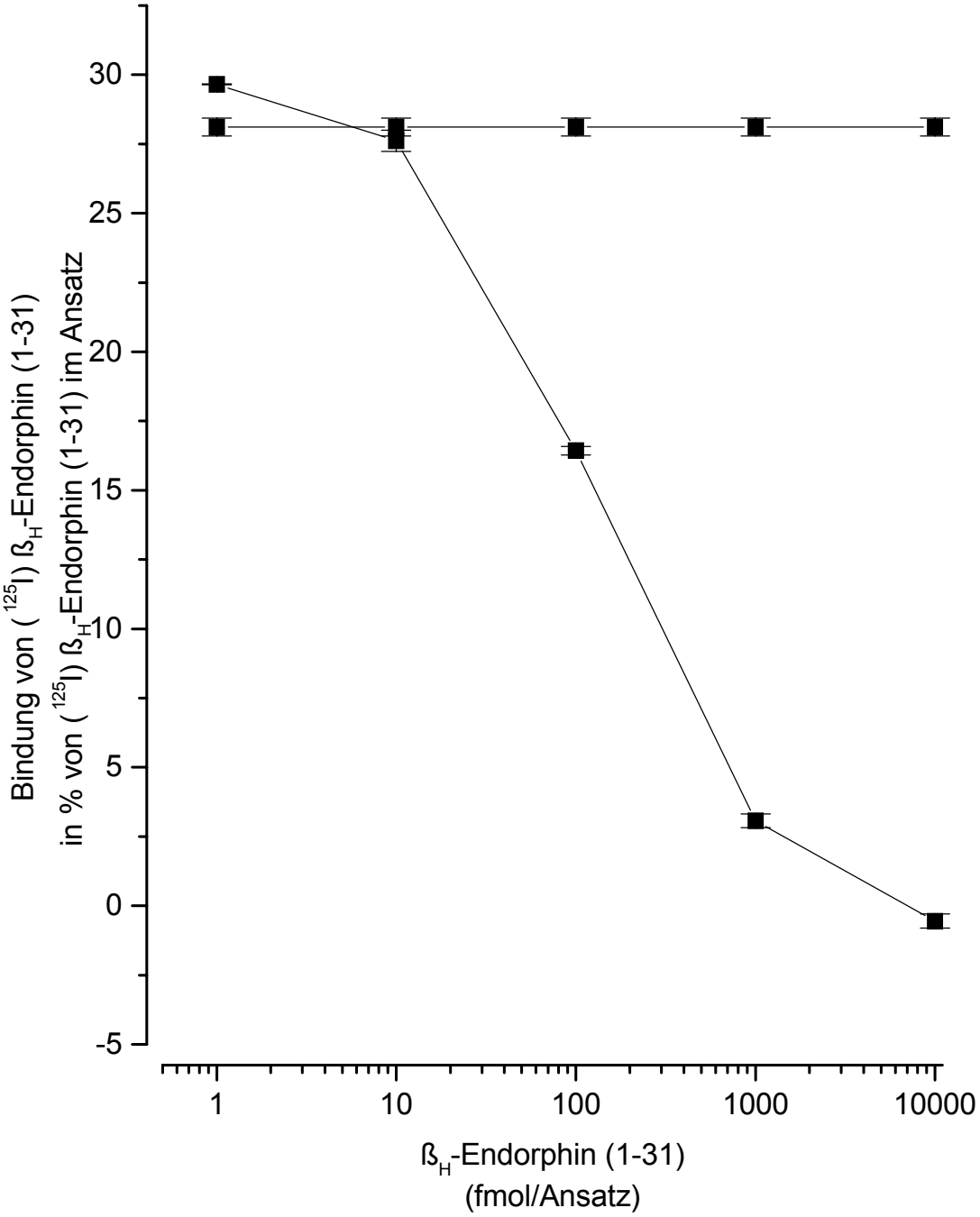


Abb. 5.2.: Solid-Phase-One-Site-RIA (SPOS-RIA) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (28-31) immunoreaktivem Material (Optimierte Methode): Standardkurve
Bindung von (^{125}I) β_H-Endorphin (1-31) in Abhängigkeit von der Konzentration an nicht markiertem β_H-Endorphin (1-31).
Nullstandard und Standardwerte: MW ± s aus Doppelwerten eines Experiments.

5.2.2. Entwicklung eines Solid-Phase-TWO-Site-Radioimmunoassay (SPTS-RIA) zum Nachweis von β_H-Endorphin (1-31)

Die Entwicklung des SPTS-RIA zum Nachweis von β_H-Endorphin (1-31) baute auf seiner Vorstufe, dem SPOS-RIA zum Nachweis von β_H-Endorphin (28-31) immunoreaktivem Material, auf. Im Gegensatz zum SPOS-RIA war nun durch Einsatz eines zweiten, monoclonalen Antikörpers (3-E7), gerichtet gegen den N-Terminus von β_H-Endorphin, eine Weiterentwicklung zu einem spezifischen RIA möglich, welcher durch Verwendung eines ersten, C-terminal angreifenden Antiserums (10P) und eines zweiten, N-terminal angreifenden Antikörpers (3-E7) das zu bestimmende Peptid, β_H-Endorphin (1-31), mittels 1. AK / Peptid / 2. AK-Komplexen (Sandwichkomplexen) nachwies. β_H-Endorphin-Derivate wurden somit nicht erfaßt. Dies erlaubte es, nicht mehr vom Nachweis immunoreaktiven Materials, sondern von einem spezifischen Nachweis des betreffenden Peptids zu sprechen. Für die Durchführung des SPTS-RIA wurden bis auf die Blockung alle Schritte des optimierten SPOS-RIA übernommen. Die Inkubation von nicht markiertem Peptid (β_H-Endorphin (1-31)) und radioaktiv markiertem 2. Antikörper (3-E7) erfolgte, entsprechend dem Versuchsprinzip, nacheinander unter gleichen Versuchsbedingungen.

5.2.2.1. Methodenentwicklung

Austestung von Blockungszeit und Blockungstemperatur:

Die Blockungsbedingungen des SPOS-RIA wurden zunächst für die Durchführung des SPTS-RIA übernommen (BSA 1 %ig in PBS-Puffer, 20 - 24 h, 4° C, unter Schütteln). Durch Verkürzung der Blockungszeit auf 4 h bei Veränderung der Temperatur auf RT wurde überprüft, ob dies die Blockungsfähigkeit von BSA 1 %ig in PBS-Puffer beeinflußt. Durch Bestimmung des B_0-Wertes von jeweils geblockten und ungeblockten Röhrchen konnte zum einen mehrmals nachgewiesen werden, daß eine Reduzierung der unspezifisch gebundenen Radioaktivität durch Blockung erreicht wurde, zum anderen, daß eine Veränderung der Blockungszeit und -temperatur wie oben beschrieben nicht zu einer Erhöhung unspezifisch gebundener Radioaktivität führte (nicht gezeigt).

Für die optimierte Methode des SPTS-RIA wurden die veränderten Blockungsbedingungen angewendet: **BSA 1 %ig in PBS-Puffer, 4 h bei RT, unter Schütteln.**

5.2.2.2. Optimierte Methode

Inkubationsansätze: Es wurden die unter 4.2.2.2. aufgeführten Inkubationsansätze (CT-, B_0-, Standard-Wert) verwendet

Alle Inkubationen wurden in Polystyrol-Röhrchen (Immuno-tubes, Maxisorp, 4 ml) durchgeführt.

Durchführung:

Die Polystyrol-Röhrchen wurden zunächst mit Protein A-Sepharose gereinigtem C-terminalem Antiserum (10P), gerichtet gegen β_H-Endorphin (28-31), für 2 h bei RT auf einem Rundschüttler beschichtet. Das Volumen des Beschichtungspuffers betrug 1 ml, das Antiserum (10P) wurde darin so gelöst, daß eine Konzentration von 20 µg/ml entstand. Durch dreimaliges Waschen der Röhrchen mit jeweils 1 ml PBS-Puffer wurde nicht adsorbierter Antikörper wieder entfernt. Die Blockung freier Bindungsstellen der Röhrchen-Wand wurde mit 1 ml BSA 1 %ig in PBS-Puffer (ausgenommen CT-Wert) für 4 h bei RT auf einem Rundschüttler durchgeführt. Dreimaliges Waschen mit jeweils 1 ml PBS-Puffer entfernte nicht gebundene Komponenten der Blockungslösung. Anschließend wurde das an die feste Phase adsorbierte Antiserum (10P) mit steigenden Mengen an nicht markiertem β_H-Endorphin (1-31) (Standards) für weitere 20 - 24 h bei 4° C unter permanentem Schütteln inkubiert. β_H-Endorphin (1-31) wurde hierfür mit Puffer D so gelöst, daß Konzentrationen von 1 - 10 000 fmol pro ml (Inkubationsansatz) entstanden. Nicht gebundene Komponenten der Standardlösungen wurden dann durch erneutes dreimaliges Waschen der Röhrchen mit jeweils 1 ml PBS-Puffer entfernt. Durch weitere Inkubation mit einer konstanten Konzentration an radioaktiv markiertem monoclonalem Antikörper (3-E7) für 20 - 24 h bei 4° C unter permanentem Schütteln wurden 1. Antikörper / Peptid / 2. Antikörper-Komplexe im Sinne von Sandwich-komplexen gebildet. Der radioaktiv markierte Antikörper (3-E7) wurde mit Puffer D auf 10 000 cpm / 20 µl Puffer D eingestellt (Gesamtradioaktivität pro Inkubations-ansatz). Durch dreimaliges Waschen der Röhrchen mit jeweils 1 ml PBS-Tween-Puffer wurde nicht gebundener monoclonaler Antikörper (3-E7) entfernt. Anschließend wurde die im Röhrchen gebundene Radioaktivität in einem Gamma-Zähler eine Minute lang gemessen.

Eine Übersicht über die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Inkubationsansätze sowie Durchführung des Assays gibt Tab. 5.3.. In Abb. 5.3. ist eine Standardkurve dargestellt, wie sie zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-31) in einer Probe mit unbekanntem Gehalt an β_H-Endorphin (1-31) verwendet werden kann.

	Zeit (h)	Temp. (°C)	Agens	Konzentration bzw. Menge	Puffer	Volumen (µl)	CT	B_0	Standard
Beschichtung	2	RT	Antiserum 10P	20 µg	Coating buffer	1000	-	+	+
Waschen	-	-	-	-	PBS	3 x 1000	-	+	+
Blockung	4	RT	BSA	1 %	PBS	1000	-	+	+
Waschen	-	-	-	-	PBS	3 x 1000	-	+	+
Inkubation I	20 - 24	4	Standard (β_H-Endorphin (1-31))	0 - 10 000 fmol	Puffer D	20	-	-	+
					Puffer C	980	-	+	+
					Puffer D	20	-	+	-
Waschen	-	-	-	-	PBS	3 x 1000	-	+	+
Inkubation II	20-24	4	radioaktiv markierter monoclonaler Antikörper 3-E7 (Tracer)	10 000 cpm	Puffer D	20	+	+	+
					Puffer C	980	+	+	+
Waschen	-	-	-	-	PBS-Tween	3 x 1000	-	+	+

Tab. 5.3.: Durchführung des SPTS-RIA zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-31): Zusammensetzung der Inkubationsansätze

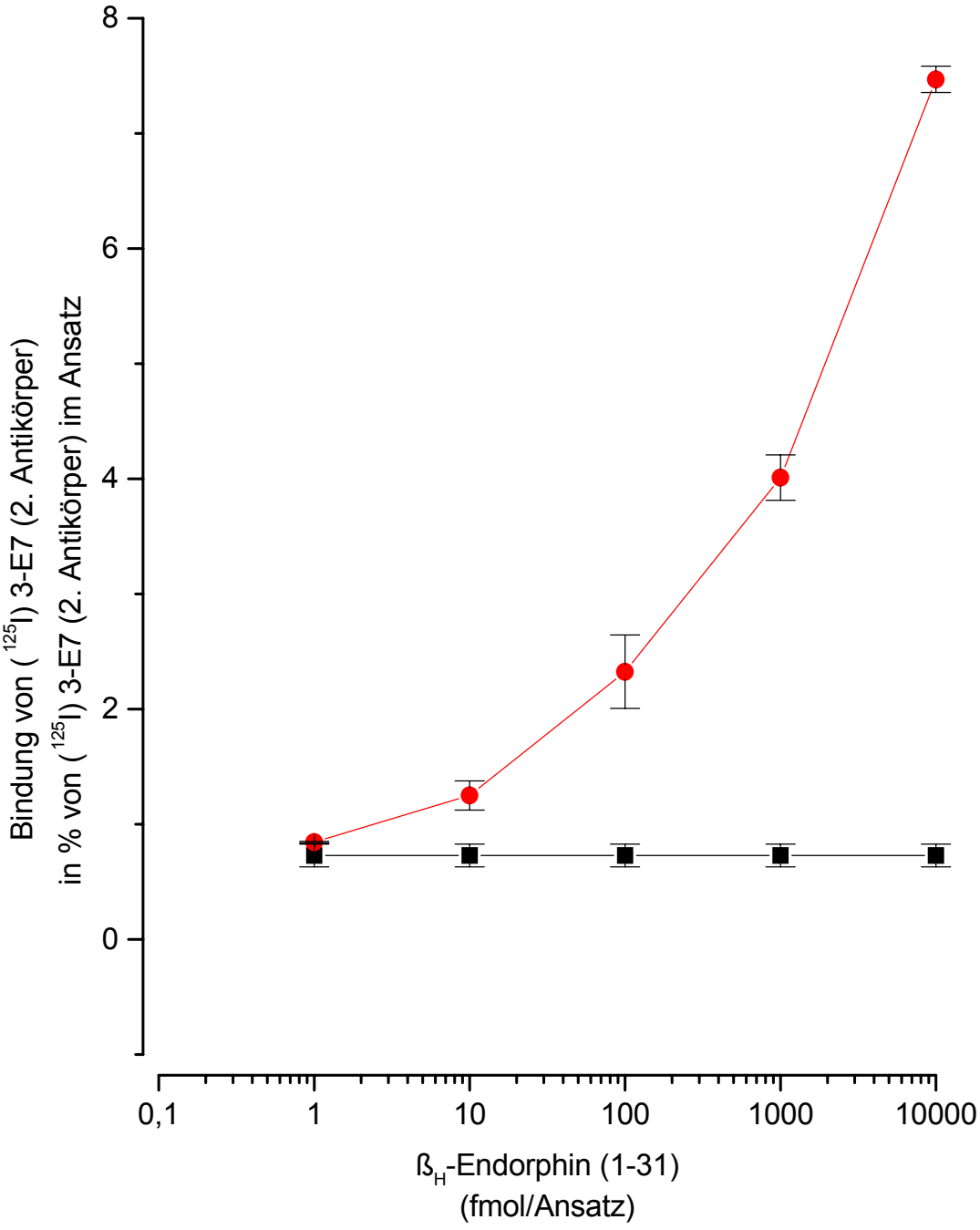


Abb. 5.3.: Solid-Phase-Two-Site-RIA (SPTS-RIA) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-31) (Optimierte Methode): Standardkurve
Bindung von (^{125}I) 3-E7 in Abhängigkeit von der Konzentration an nicht markiertem β_H-Endorphin (1-31).
Nullstandard und Standardwerte: MW ± s aus Doppelwerten eines Experiments.

5.2.3. Entwicklung von Fluid-Phase-Immunoprecipitation-ONE-Site-Radio-immunoassays (FPIOS-RIAs) zum Nachweis von β_H-Endorphin (28-31), (24-27), und (23-26) immunoreaktivem Material

Die prinzipielle Durchführung eines FPIOS-RIA war bekannt und leitete sich zum einen aus dem Prinzip des FPOS-RIA, zum anderen aus dem Prinzip des FPI-RIA, welcher z.B. zur Bestimmung von Alpha Human Atrial Natriuretic Polypeptid (Firma Peninsula) eingesetzt wird, ab.

Im Gegensatz zum FPOS-RIA werden beim FPIOS-RIA die gebildeten Peptid-Antikörper-Komplexe durch einen zweiten, gegen den ersten gerichteten Antikörper in Gegenwart von Kaninchenserum gefällt und die Radioaktivität im Immunpräzipitat gemessen. Die Durchführung der Methode im Rahmen dieser Arbeit wurde aus früheren Studien übernommen [Scheffler, 1995] und wird deshalb hier nicht im einzelnen beschrieben. Sie stellt die Vorstufe bzw. einen Zwischenschritt auf dem Weg zur Entwicklung des FPITS-RIA dar.

Prinzip und Durchführung des FPIOS-RIA zum Nachweis von β_H-Endorphin (28-31), (24-27) und (23-26) immunoreaktivem Material sind unter 4.2.3. dargestellt. Anwendung fand die Methode des FPIOS-RIA im Rahmen dieser Arbeit nur bei der Bestimmung der Bindungsparameter der Interaktionen zwischen den verwendeten gereinigten Antiseren und den betreffenden Antigenen.

Hierfür wurden die Protein A-Sepharose-gereinigten Antiseren 10P, 67P und 63P mit Puffer C verdünnt, so daß folgende Konzentrationen sich ergaben: 10 µg 10P/50 µl, 20 µg 67P/50 µl, und 10 µg 63P/50 µl. Die nicht markierten Peptide β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26) wurden als Standards in Konzentrationen von 1 - 10 000 fmol/ 20 µl Puffer D eingesetzt. Als Tracer wurden die entsprechenden radioaktiv markierten Peptide ((^{125}I) β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26)) mit Puffer D auf 10 000 cpm/20 µl Puffer D eingestellt. Der hier in Kürze beschriebene FPIOS-RIA war wie o.a. im Prinzip bekannt und für den Nachweis von β-Endorphin-immuno-reaktivem Material anwendbar.

FPIOS-RIA				
	CT	BL	B_0	Standard
Puffer C	500	200	150	150
Puffer D	-	20	20	-
Nicht markiertes Peptid in Puffer D	-	-	-	20
Antikörper in Puffer C	-	-	50	50
Radioaktiv markiertes Peptid in Puffer D (Tracer)	20	20	20	20
Inkubation: 20 - 24 h bei 4° C				
GARGG	-	100	100	100
NRS	-	100	100	100
Inkubation: 2 Stunden bei Raumtemperatur				
Puffer C	-	500	500	500

Tab. 5.4.: Zusammensetzung der Inkubationsansätze des Fluid-Phase-Immunoprecipitation-One-Site-RIA (Angaben in µl)

Alle Inkubationsansätze wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen (1,5 ml) bei 4° C in der in Tab. 5.4. angegebenen Reihenfolge pipettiert.
Das radioaktiv markierte Peptid wurde mit Puffer D so verdünnt, daß in 20 µl dieser Lösung etwa 10 000 cpm zu messen waren. Nach Zugabe von 1. Antikörper, markiertem und nicht markiertem Peptid sowie weiteren Komponenten des Inkubats wurden die Reaktionsgefäße 20 sec lang geschüttelt und anschließend 20 - 24 h bei 4° C inkubiert. Es folgte dann die Zugabe von 100 µl Goat-Anti-Rabbit-Immunglobulin G (GARGG) und 100 µl Normal Rabbit Serum (NRS) (Firma Peninsula). Beide Komponenten wurden in RIA-Puffer (Firma Peninsula) so gelöst, daß in 100 µl Lösung sich 1000 µg GARGG bzw. 400 µg NRS enthalten waren. Nach 20 sec Schütteln folgte eine 2-stündige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 500 µl Puffer C hinzugegeben und die Reaktionsgefäße nach Schütteln 10 min lang bei 8000 x g zentrifugiert. Die in Lösung befindlichen 1. AK-Antigen-Komplexe wurden somit durch den hinzugefügten 2. Antikörper (GARGG) und die NRS-Komponenten präzipitiert und durch Zentrifugation absedimentiert. Der Überstand wurde abpipettiert und die im Pellet verbliebene Radioaktivität eine Minute lang im Gamma-Zähler gemessen.

5.2.4. Entwicklung von Fluid-Phase-Immunoprecipitation-TWO-Site-Radioimmunoassays (FPITS-RIAs) zum Nachweis von β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26)

Die FPITS-RIAs wurden zum Nachweis von β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26) entwickelt. Das Prinzip der RIAs beruht analog dem SPTS-RIA auf der Erfassung eines bestimmten Peptids durch Verwendung zweier unterschiedlicher Antikörper - eines ersten gegen den C-terminalen Teil und eines zweiten gegen den N-terminalen Teil des Peptids gerichteten Antikörpers. Durch Erfassung des nachzuweisenden Peptids von zwei Seiten durch zwei Antikörper wird ein sogenannter Sandwich-Komplex gebildet und das Peptid somit „in die Zange“ genommen. Anders als im SPTS-RIA erfolgt die Bildung von „Sandwich-Komplexen“ frei in Lösung und die Trennung des über den 2. Antikörper radioaktiv markierten „Sandwich-Komplexes“ von dem nicht gebundenen radioaktiv markierten 2. Antikörper durch Hinzufügen eines weiteren Antikörpers (gerichtet gegen den C-terminalen Antikörper) und der hierdurch bedingten Ausbildung eines Immunpräzipitats. Dieses wird abzentrifugiert und sein Gehalt an Radioaktivität, d.h. an Sandwich-Komplex, gemessen (siehe 4.2.4.1.).

Die Entwicklung des FPITS-RIA baute auf den schon bekannten FPIOS-RIAs auf [Scheffler, 1995]. Die Inkubationsbedingungen (Volumen, Puffer und Inkubationszeiten) sowie die Bedingungen für die Immunpräzipitation wurden aus dem FPIOS-RIA übernommen. Für die Durchführung aller Versuche wurde eine Gesamtradioaktivität im Ansatz von 10 000 cpm gewählt.

5.2.4.1. Methodenentwicklung

Die Mengen an eingesetztem ersten Antikörper wurden in Form von Antiserumverdünnungen und Protein A-Sepharose gereinigtem Antiserum untersucht. Hierfür wurden die ungereinigten und gereinigten Antiseren 10P, 67P und 63P ausgewählt. Die Antiseren wurden mit Puffer C so verdünnt, daß zum einen Antiserumkonzentrationen von 1 : 100 bis 1 : 5 000 pro 50 µl, zum anderen gereinigte Antiserumkonzentrationen von jeweils 10 µg und 20 µg pro 50 µl entstanden. Unter Verwendung der jeweiligen Peptide als Standards (β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26) in den Konzentrationen von 1 - 10 000 fmol pro 20 µl Puffer D) und des radioaktiv markierten zweiten N-terminalen Antikörpers 3-E7 (Gesamtradioaktivität im Ansatz von 10 000 cpm) als Signalgeber wurden Standardkurven erstellt.

Unter Berücksichtigung der bei Chard (1990) beschriebenen zwei Möglichkeiten der Durchführung eines TWO-Site-RIAs wurden die einzelnen RIAs jeweils mit einer Inkubationsdauer von zwei bzw. drei Tagen durchgeführt (siehe Tab. 5.5.). Bei der Durchführung über zwei Tage wurden alle Komponenten (1. Antikörper, unmarkiertes Peptid und radioaktiv markierter 2. Antikörper) gemeinsam inkubiert, bei einer Inku-

bationsdauer von drei Tagen wurden zunächst nur 1. Antikörper und unmarkiertes Peptid (Standards) zusammen inkubiert und anschließend der radioaktiv markierte zweite Antikörper (3-E7) hinzugefügt.

Anti-serum	Inkubations-dauer (Tage)	Antiserum-Verdünnungen (Anzahl der Versuche)					Menge an gereinigtem Antiserum (Anzahl der Versuche)	
		1:100	1:500	1:1000	1:3000	1:5000	10 μg	20 μg
10P	2	1	-	5	-	1	6	5
	3	3	-	4	-	3	4	4
67P	2	-	-	1	1	-	1	2
	3	-	-	1	1	-	1	1
63 P	2	-	1	1	-	-	3	1
	3	-	1	1	-	-	1	1

Tab. 5.5.: Übersicht über die Anzahl der durchgeführten RIAs unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen (Inkubationsdauer, Antiserumverdünnungen, Konzentrationen an gereinigtem Antiserum)

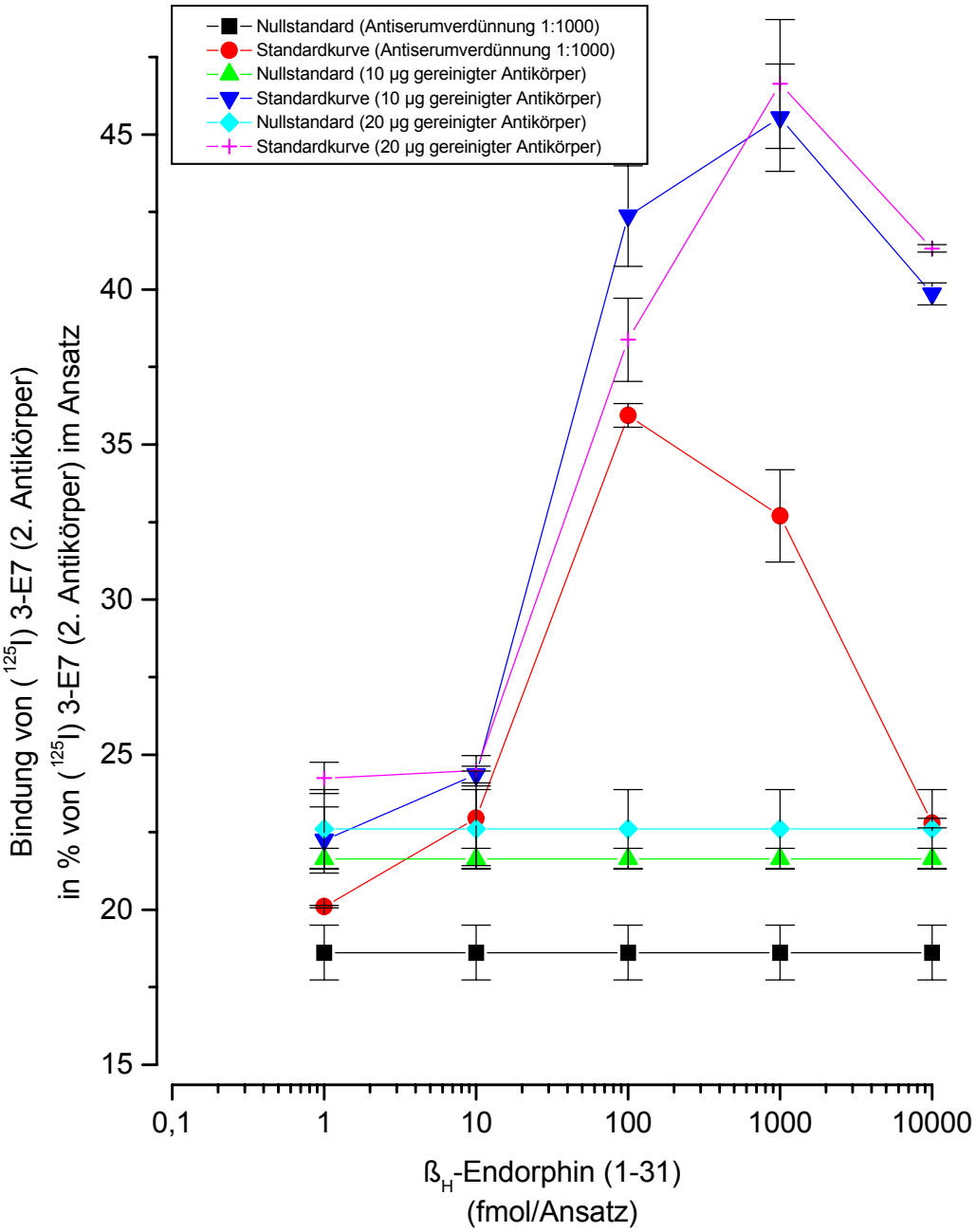


Abb. 5.4.: Fluid-Phase-Immunoprecipitation-Two-Site-RIA (FPITS-RIA) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-31):
Einsatz verschiedener Verdünnungen des Antiserums 10P und verschiedener Mengen an gereinigtem Antiserum 10P bei einer Versuchsdauer von 2 Tagen bei der Erstellung von Standardkurven: Bindung von (^{125}I) 3-E7 in Abhängigkeit von der Konzentration an nicht markiertem β_H-Endorphin (1-31).
Nullstandard und Standardwerte: MW ± s aus Doppelwerten eines Experiments.

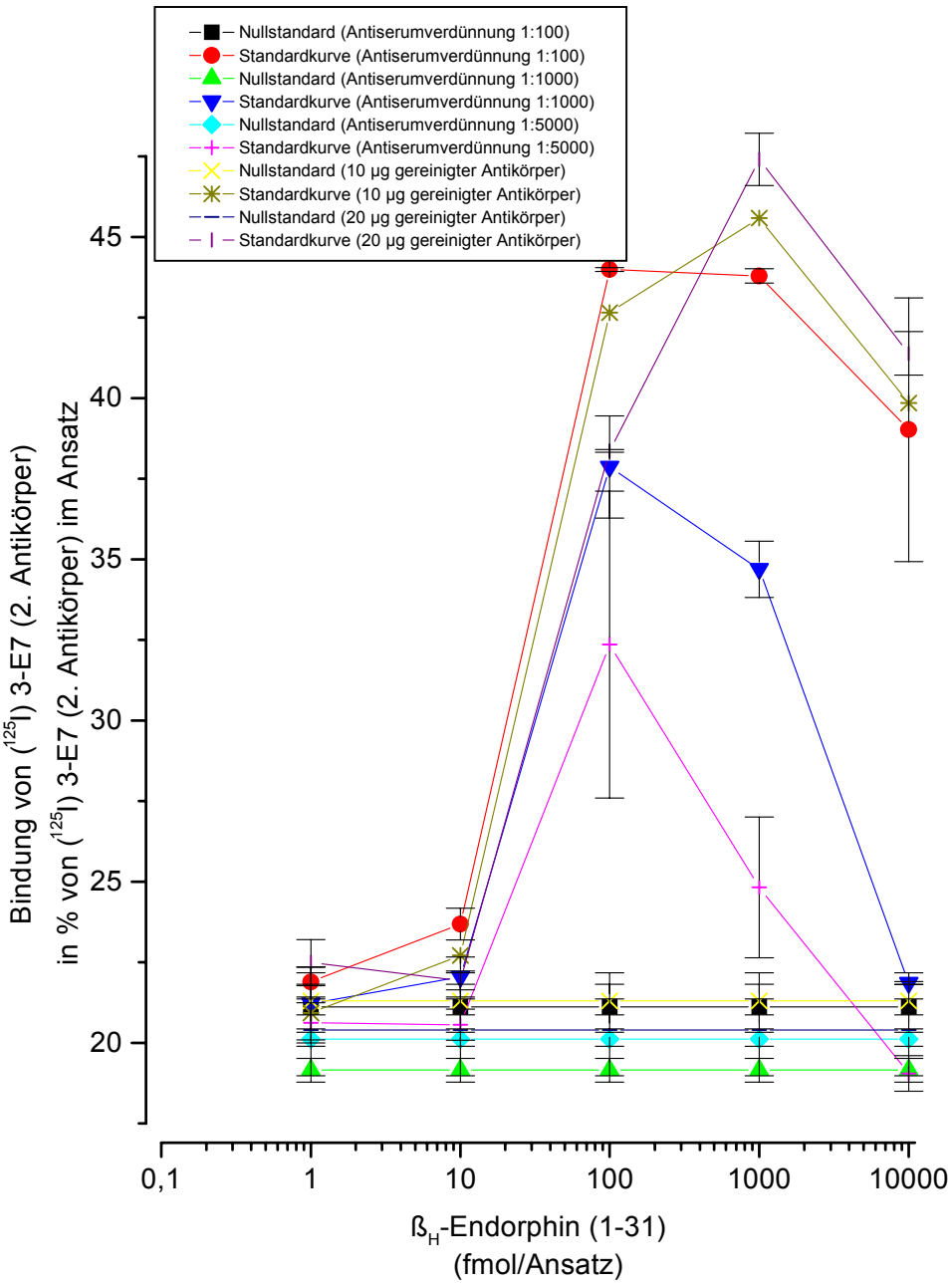


Abb. 5.5.: Fluid-Phase-Immunoprecipitation-Two-Site-RIA (FPITS-RIA) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-31):
Einsatz verschiedener Verdünnungen des Antiserums 10P und verschiedener Mengen an gereinigtem Antiserum 10P bei einer Versuchsdauer von 3 Tagen bei der Erstellung von Standardkurven: Bindung von (^{125}I) 3-E7 in Abhängigkeit von der Konzentration an nicht markiertem β_H-Endorphin (1-31).
Nullstandard und Standardwerte: MW ± s aus Doppelwerten eines Experiments.

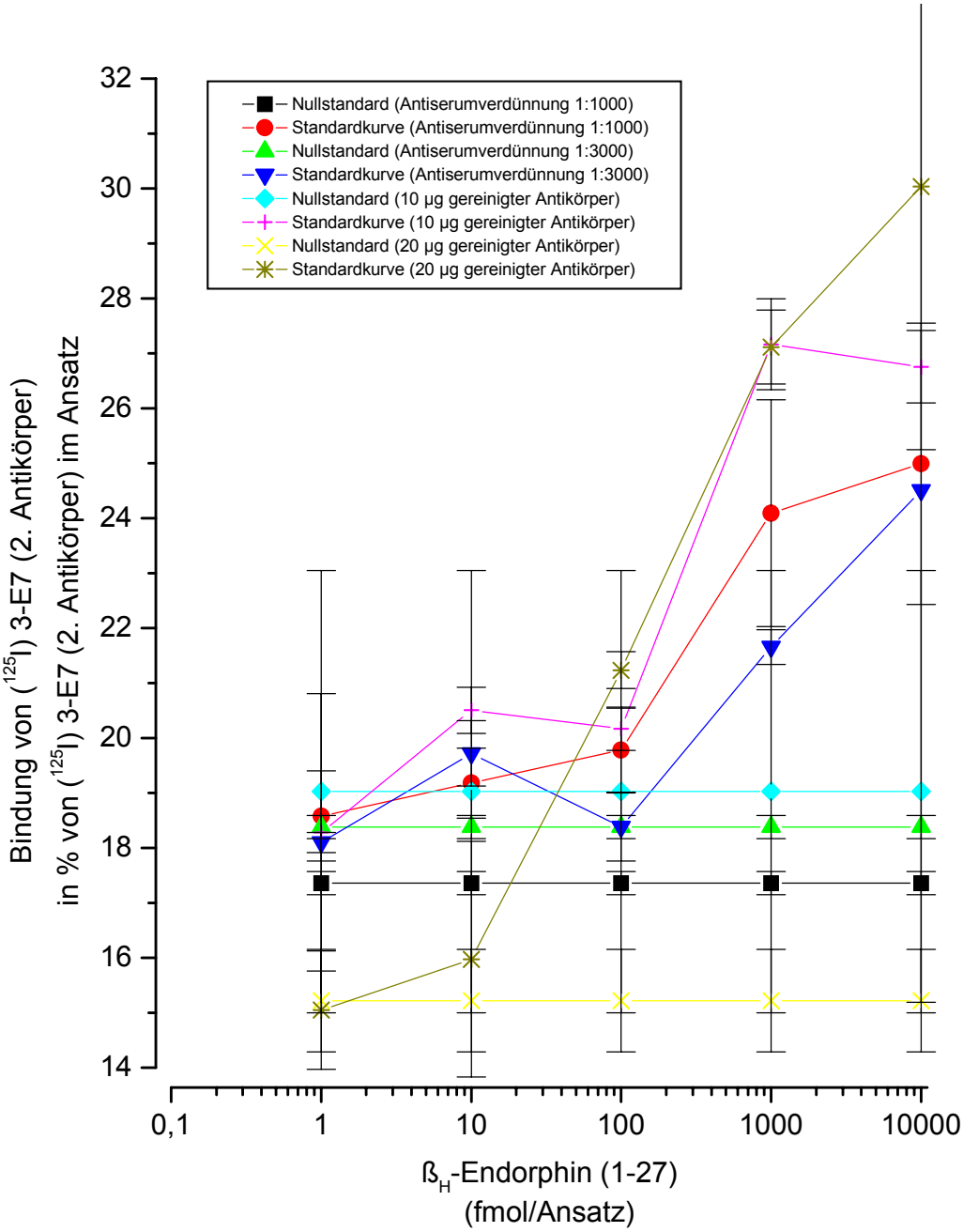


Abb. 5.6.: Fluid-Phase-Immunoprecipitation-Two-Site-RIA (FPITS-RIA) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-27):
Einsatz verschiedener Verdünnungen des Antiserums 67P und verschiedener Mengen an gereinigtem Antiserum 67P bei einer Versuchsdauer von 2 Tagen bei der Erstellung von Standardkurven: Bindung von (^{125}I) 3-E7 in Abhängigkeit von der Konzentration an nicht markiertem β_H-Endorphin (1-27).
Nullstandard und Standardwerte: MW ± s aus Doppelwerten eines Experiments.

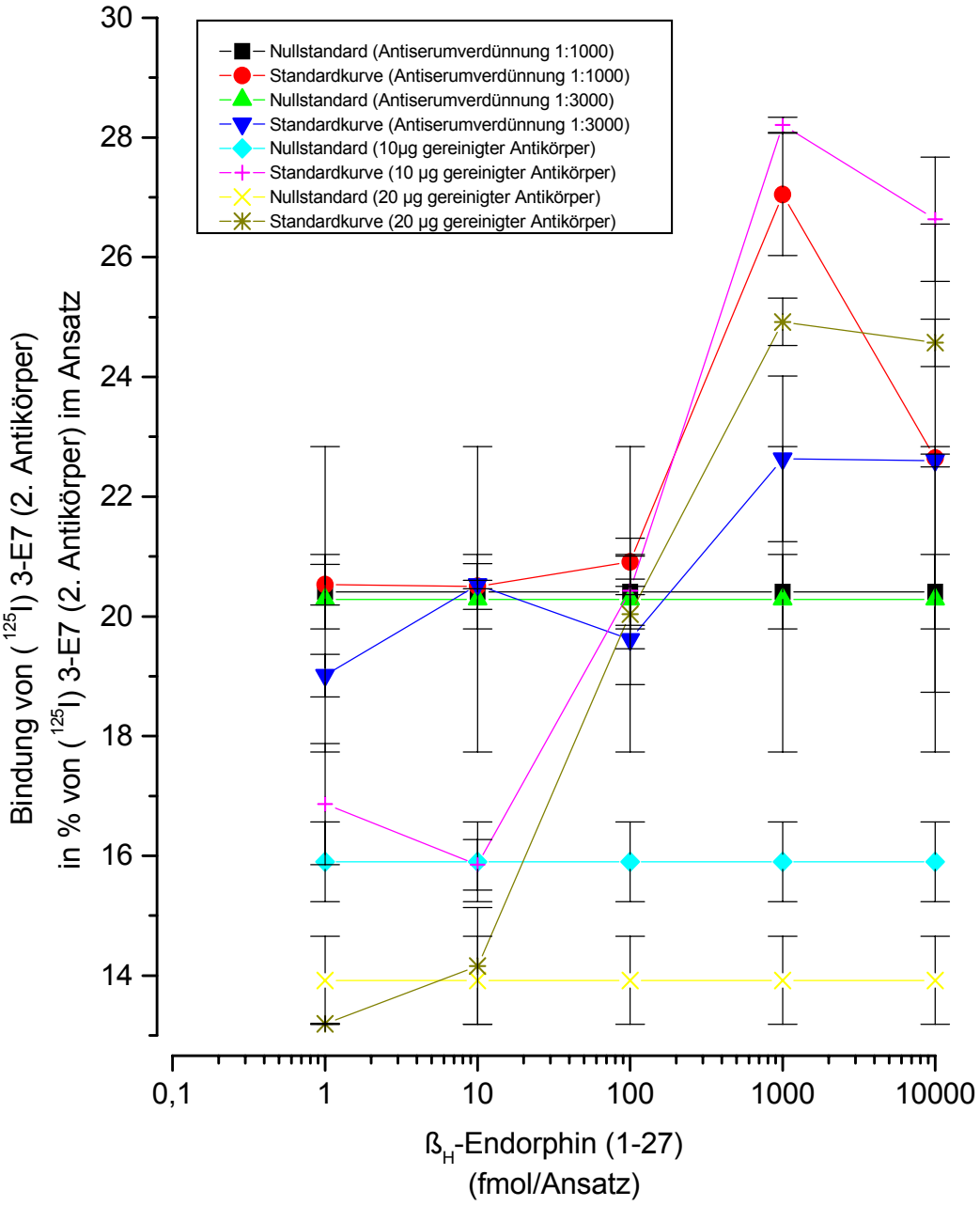


Abb. 5.7.: Fluid-Phase-Immunoprecipitation-Two-Site-RIA (FPITS-RIA) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-27):
Einsatz verschiedener Verdünnungen des Antiserums 67P und verschiedener Mengen an gereinigtem Antiserum 67P bei einer Versuchsdauer von 3 Tagen bei der Erstellung von Standardkurven: Bindung von (^{125}I) 3-E7 in Abhängigkeit von der Konzentration an nicht markiertem β_H-Endorphin (1-27).
Nullstandard und Standardwerte: MW ± s aus Doppelwerten eines Experiments.

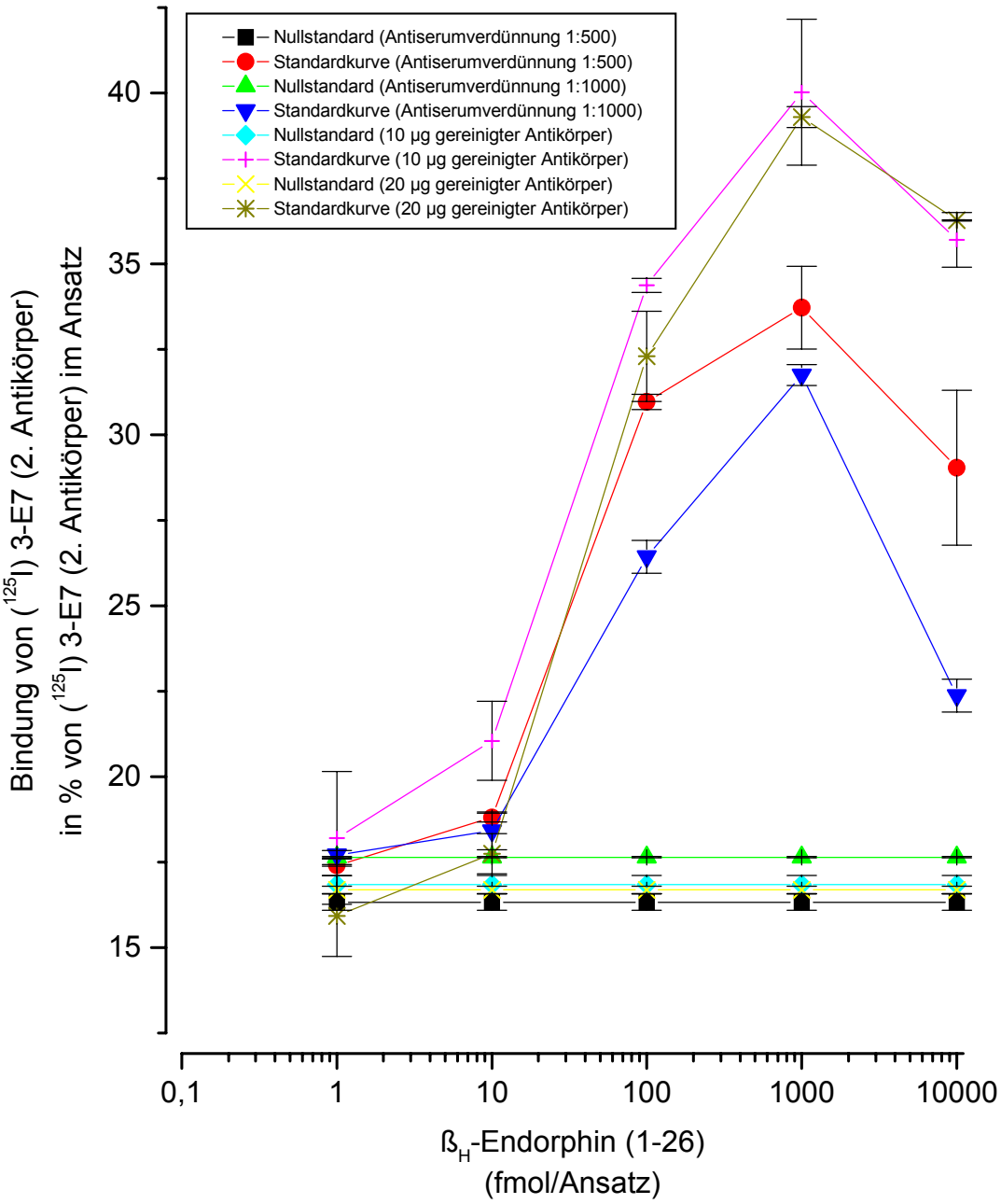


Abb. 5.8.: Fluid-Phase-Immunoprecipitation-Two-Site-RIA (FPITS-RIA) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-26):
Einsatz verschiedener Verdünnungen des Antiserums 63P und verschiedener Mengen an gereinigtem Antiserum 63P bei einer Versuchsdauer von 2 Tagen bei der Erstellung von Standardkurven: Bindung von (^{125}I) 3-E7 in Abhängigkeit von der Konzentration an nicht markiertem β_H-Endorphin (1-26).
Nullstandard und Standardwerte: MW ± s aus Doppelwerten eines Experiments.

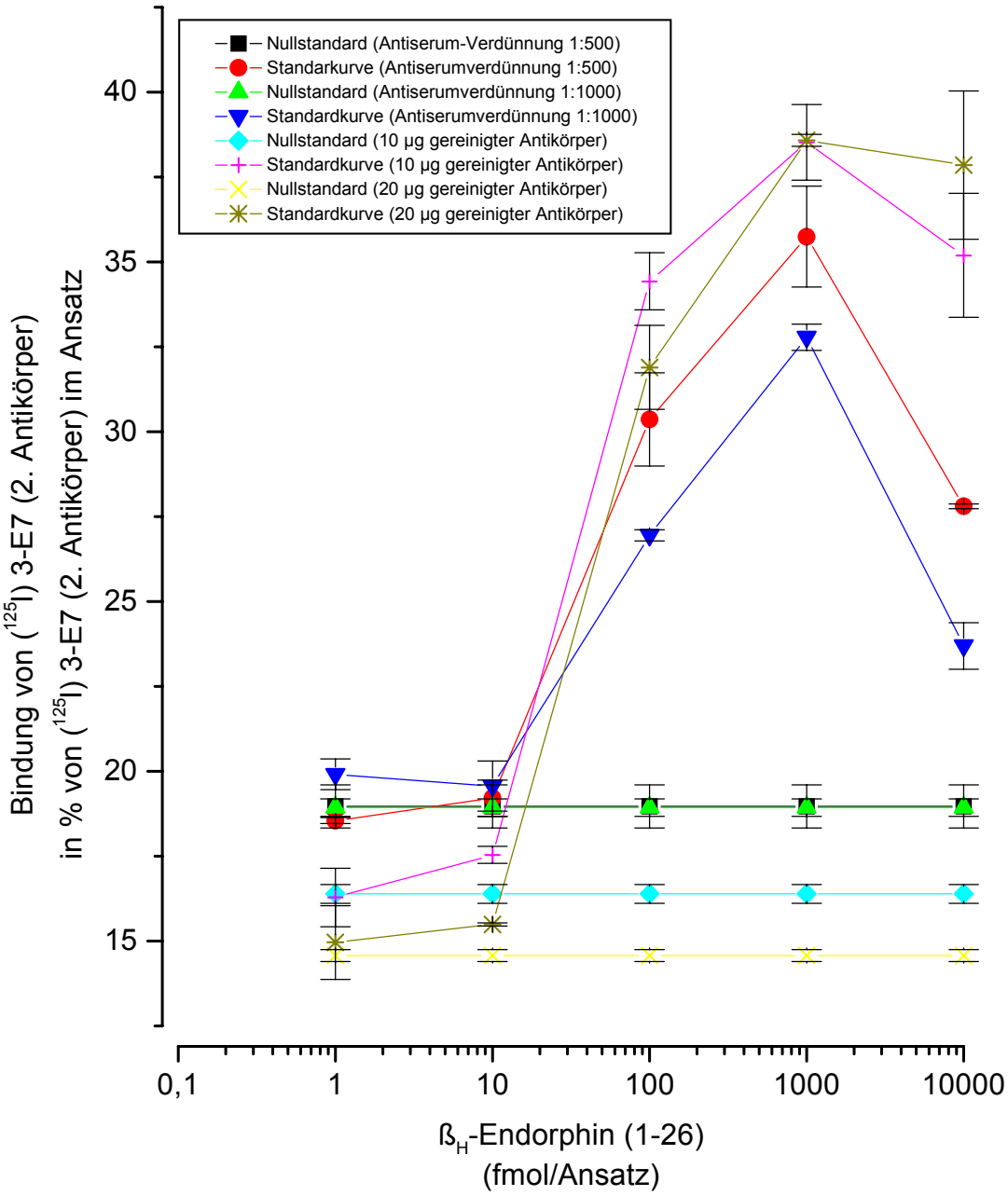


Abb. 5.9.: Fluid-Phase-Immunoprecipitation-Two-Site-RIA (FPITS-RIA) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-26):
Einsatz verschiedener Verdünnungen des Antiserums 63P und verschiedener Mengen an gereinigtem Antiserum 63P bei einer Versuchsdauer von 3 Tagen bei der Erstellung von Standardkurven: Bindung von (^{125}I) 3-E7 in Abhängigkeit von der Konzentration an nicht markiertem β_H-Endorphin (1-26).
Nullstandard und Standardwerte: MW ± s aus Doppelwerten eines Experiments.

Die Standardkurven (siehe Abb. 5.4. - 5.9.) wurden nach Kurvenverlauf und Kurvensteigung im Bereich niedriger Peptid-Konzentrationen (1-10 fmol/Reaktionsansatz) beurteilt. Ein deutlicher Kurvenanstieg im Anfangsbereich der Kurve war erwünscht, da dies eine niedrige Nachweisgrenze bedeutete (der gemessene Unterschied in Prozent des gebundenen Tracers für 1 und 10 fmol pro Reaktionsansatz sollte so groß wie möglich sein). Der Vergleich der Standardkurven mit einer Inkubationsdauer von zwei bzw. drei Tagen zeigte hierbei keinen deutlichen Unterschied. Der Vergleich der Verwendung von Antiserum in unterschiedlichen Verdünnungen mit gereinigtem Antiserum in unterschiedlichen Mengen zeigte insbesondere für Standardkurven mit hoher Antiserumverdünnung abnehmende Kurvensteigungen der gesamten Kurve. Es kristallisierten sich zunächst zwei Versuchsbedingungen als qualitätssteigernd heraus: Verwendung von gereinigtem Antiserum und eine Inkubationsdauer von 2 Tagen. Bei einer Inkubationsdauer von 2 Tagen ergab sich für die FPITS-RIAs zum Nachweis von β_H-Endorphin (1-31) und (1-26), daß der Einsatz von jeweils 10 µg bzw. 20 µg gereinigtem Antikörper 10P bzw. 63P in etwa gleiche Kurvenverläufe mit einer ausreichenden Kurvensteigung im Anfangsbereich der Standardkurve zeigte, so daß aufgrund der begrenzt vorhandenen Antiserummenge für die Durchführung beider Assays jeweils 10 µg gereinigtes Antiserum in allen weiteren Versuchen verwendet wurden. Für den FPITS-RIA zum Nachweis von β_H-Endorphin (1-27) zeigte sich beim Vergleich von 10 µg mit 20 µg gereinigtem Antiserum 67P ein deutlich günstigerer Kurvenverlauf für den Einsatz von 20 µg pro Reaktionsansatz. In allen weiteren Versuchen wurde deshalb eine Menge von 20 µg gereinigtem Antiserum 67P verwendet.

5.2.4.2. Optimierte Methode

Inkubationsansätze: Es wurden die unter 4.2.4.2. aufgeführten Inkubationsansätze verwendet (CT, B_0, Standard)

Alle Inkubationen wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen (1,5 ml) durchgeführt.

Durchführung:

Die Inkubationsansätze des FPITS-RIA wurden in Volumina und Reihenfolge nach unten aufgeführtem Schema (Tab. 5.6) bei 4° C pipettiert. Die Protein A-Sepharose-gereinigten Antiseren 10P, 67P und 63P wurden jeweils mit Puffer C so verdünnt, daß sich folgende Konzentrationen ergaben: 10 µg 10P/50 µl, 20 µg 67P/50 µl und 10 µg 63P/50 µl. Sie dienten als „erster C-terminaler Antikörper“. Die nicht markierten Peptide β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26) wurden durch Verdünnung mit Puffer D in Konzentrationen von 1 - 10 000 fmol / 20 µl eingesetzt. Der radioaktiv markierte N-terminale zweite Antikörper (3-E7) wurde mit Puffer D auf 10 000 cpm / 20 µl eingestellt.

Das C-terminale Antiserum, das unmarkierte Peptid und der N-terminale Antikörper wurden gemeinsam unter Schütteln für 20 - 24 h bei 4° C inkubiert. Es bildeten sich 1.Antikörper / Peptid / 2.Antikörper-Komplexe aus. Nach erfolgter Inkubation wurden allen Inkubationsansätzen (außer CT) jeweils 100 µl GARGG-Lösung (Goat-Anti-Rabbit-IgG, 1 000 µg / 100 µl RIA-Puffer) und 100 µl NRS-Lösung (Normal Rabbit Serum, 400 µg / 100 µl RIA-Puffer) hinzugefügt. Nach Schütteln und 2-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 500 µl Puffer C hinzugegeben und alle Inkubationsansätze für 10 min bei 8 000 x g zentrifugiert. Durch Hinzufügen eines 3. Antikörpers, gerichtet gegen den ersten C-terminalen Antikörper, sowie weiterer Komponenten wie Normal-Rabbit-Serum kommt es zur Ausfällung der gebildeten 3.Antikörper/1.Antikörper/Peptid/2.Antikörper-Komplexe. Eine Trennung in Immunpräzipitat und flüssige Phase mit allen nicht präzipitierten Bestandteilen der Lösung wurde durch Zentrifugation erreicht. Nach Absaugen des Überstandes wurde die Radioaktivität des Immunpräzipitats eine Minute lang im Gamma-Zähler gemessen.

Mit den somit optimierten FPITS-RIAs konnten die in Abb. 5.10. - 5.12. gezeigten Standardkurven erstellt werden.

FPITS-RIA			
	CT	B_0	Standard
Puffer C	500	150	150
Puffer D	-	20	-
Nicht markiertes Peptid in Puffer D	-	-	20
Protein A-Sepharose gereinigtes Antiserum in Puffer C	-	50	50
Radioaktiv markierter N-terminaler Antikörper (3-E7) in Puffer D (Tracer)	20	20	20
Inkubation: 20 - 24 h bei 4° C			
GARGG	-	100	100
NRS	-	100	100
Inkubation: 2 h bei RT			
Puffer C	-	500	500

Tab. 5.6.: Zusammensetzung der Inkubationsansätze der Fluid-Phase-Immunoprecipitation-Two-Site-RIAs (FPITS-RIAs) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26) (Angaben in µl).

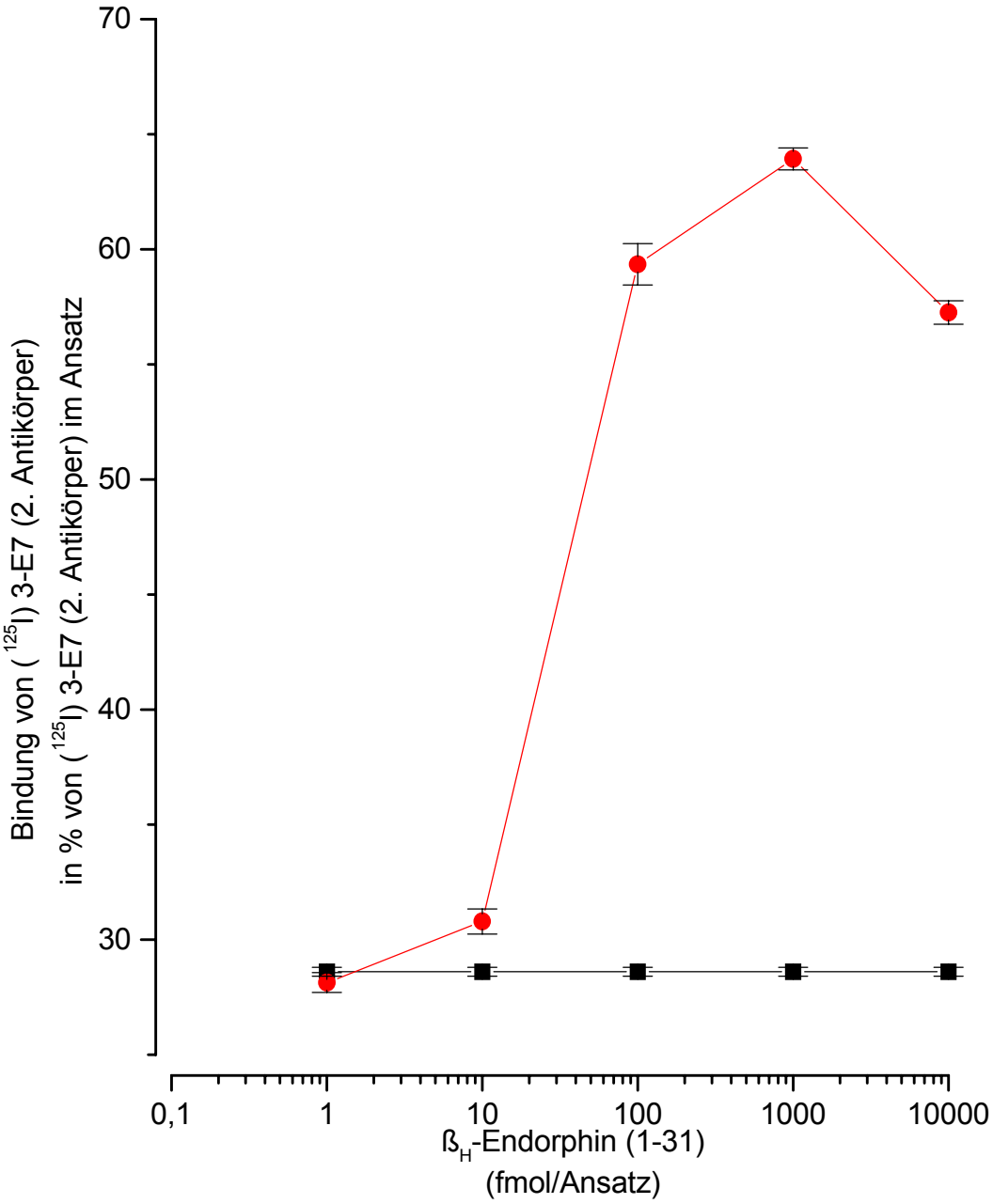


Abb. 5.10.: Fluid-Phase-Immunoprecipitation-Two-Site-RIA (FPITS-RIA) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-31): Optimierte Methode.
Standardkurve:
Bindung von (^{125}I) 3-E7 in Abhängigkeit von der Konzentration an nicht markiertem β_H-Endorphin (1-31).
Nullstandard und Standardwerte: MW ± s aus Doppelwerten eines Experiments.

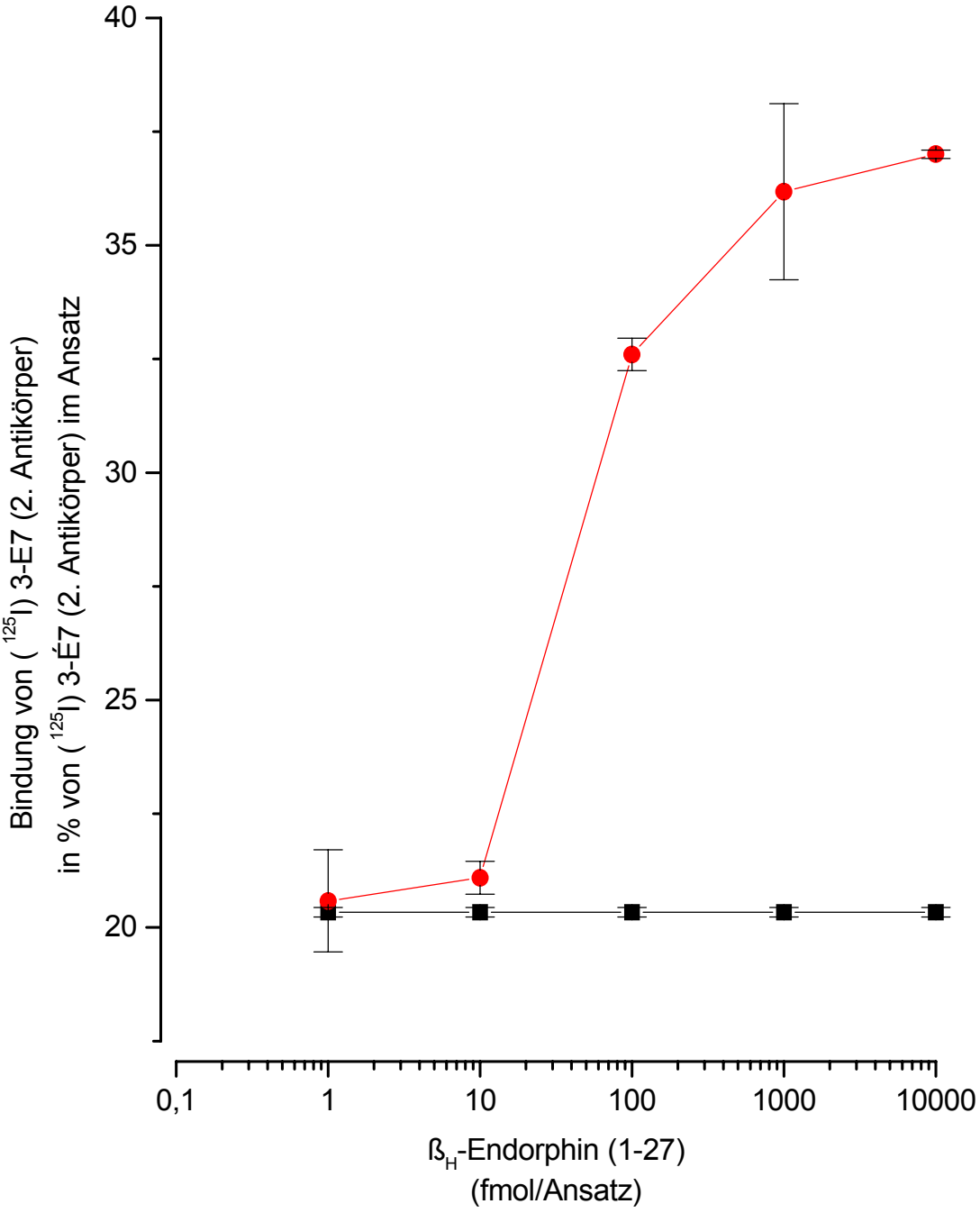


Abb. 5.11.: Fluid-Phase-Immunoprecipitation-Two-Site-RIA (FPITS-RIA) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-27): Optimierte Methode.
Standardkurve:
Bindung von (^{125}I) 3-E7 in Abhängigkeit von der Konzentration an nicht markiertem β_H-Endorphin (1-27).
Nullstandard und Standardwerte: MW ± s aus Doppelwerten eines Experiments.

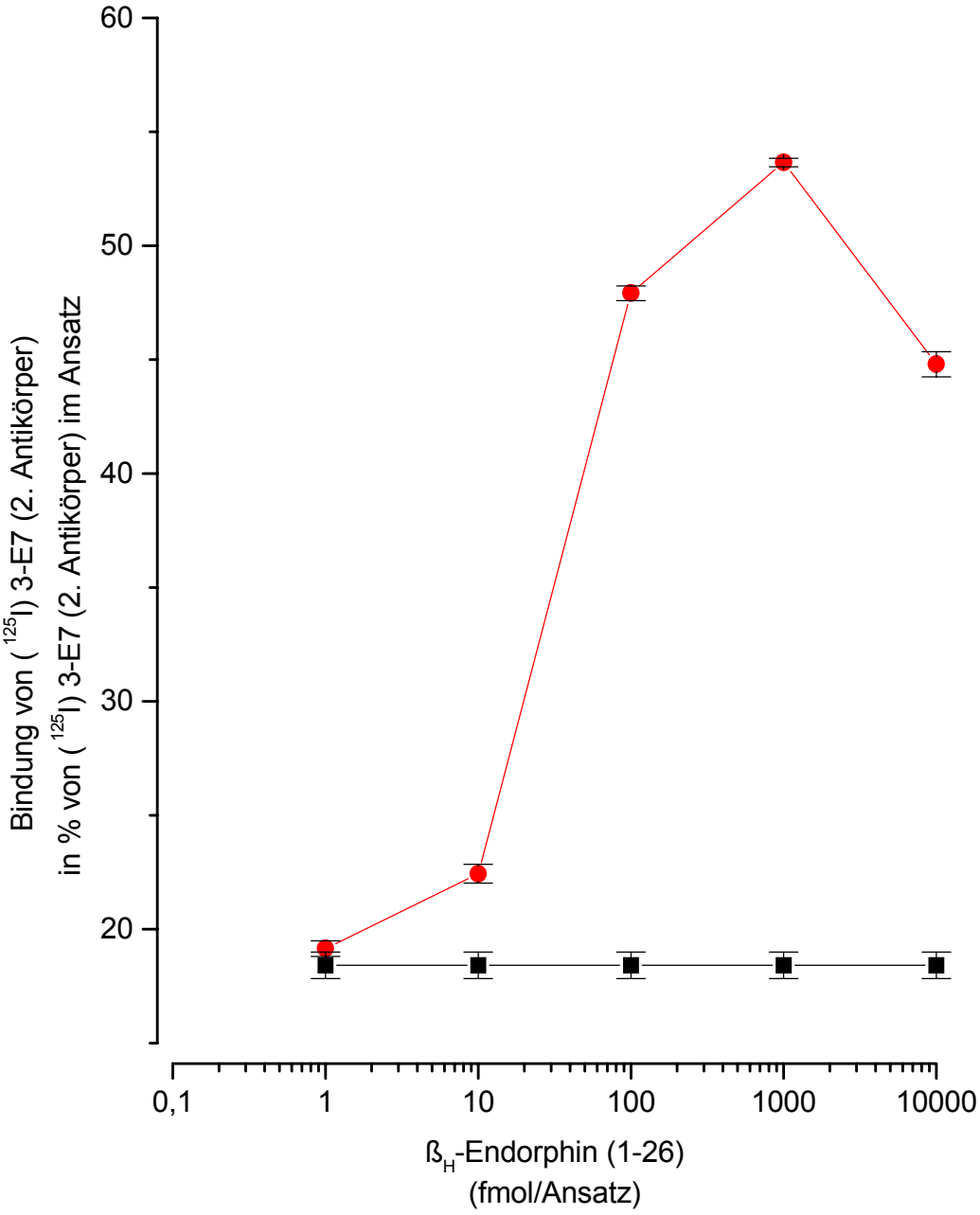


Abb. 5.12.: Fluid-Phase-Immunoprecipitation-Two-Site-RIA (FPITS-RIA) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-26): Optimierte Methode.
Standardkurve:
Bindung von (^{125}I) 3-E7 in Abhängigkeit von der Konzentration an nicht markiertem β_H-Endorphin (1-26).
Nullstandard und Standardwerte: MW ± s aus Doppelwerten eines Experiments.

5.3. Charakteristika der entwickelten Methoden

Die entwickelten Nachweismethoden wurden in ihrer optimierten Form wie unter 4.3. beschrieben charakterisiert.

Es wurden jeweils bestimmt:

1. Reproduzierbarkeit (inter-assay coefficient of variation)
2. Präzision (intra-assay coefficient of variation)
3. Nachweisgrenze (detection limit)
4. Spezifität (cross reactivities)

5.3.1. Solid-Phase-ONE-Site-Radioimmunoassay (SPOS-RIA) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (28-31) immunoreaktivem Material

5.3.1.1. Reproduzierbarkeit (inter-assay coefficient of variation)

$\bar{x}$ = 186,85 fmol (n = 10)
s = 50,58
V = 0,27
Rel. Variationskoeffizient **Vr = 8,56 %**

5.3.1.2. Präzision (intra-assay coefficient of variation)

1. Experiment: $\bar{x}$ = 148,49 fmol (n = 10)
s = 46,89
V = 0,32
Vr_1 = 9,98 %

2. Experiment: $\bar{x}$ = 162,69 (n = 10)
s = 49,9
V = 0,31
Vr_2 = 9,70 %

Als Mittelwert aus Vr_1 und Vr_2 ergab sich der folgende relative Variationskoeffizient: **Vr = 9,84 %**

5.3.1.3. Nachweisgrenze (detection limit)

Nachweisgrenze ($\bar{x}$ - s) = **7 fmol / Ansatz**
Nachweisgrenze ($\bar{x}$ - 2s) = **15 fmol / Ansatz**
Nachweisgrenze ($\bar{x}$ - 3s) = **26 fmol / Ansatz**

5.3.1.4. Spezifität (cross reactivities)

Die Spezifität des SPOS-RIA zum Nachweis von β_H-Endorphin (28-31) immunoreaktivem Material wird in den Abbildungen 5.13. - 5.15. graphisch dargestellt. Hieraus ist zu ersehen, daß neben β_H-Endorphin (1-31) auch, allerdings mit geringerer Wahrscheinlichkeit, N-Ac-β_H-Endorphin (1-31) und β_H-Endorphin (28-31) nachzuweisen sind. Alle anderen aufgeführten Substanzen wurden mit dem SPOS-RIA nicht erfaßt (siehe auch Tabelle 5.7.).

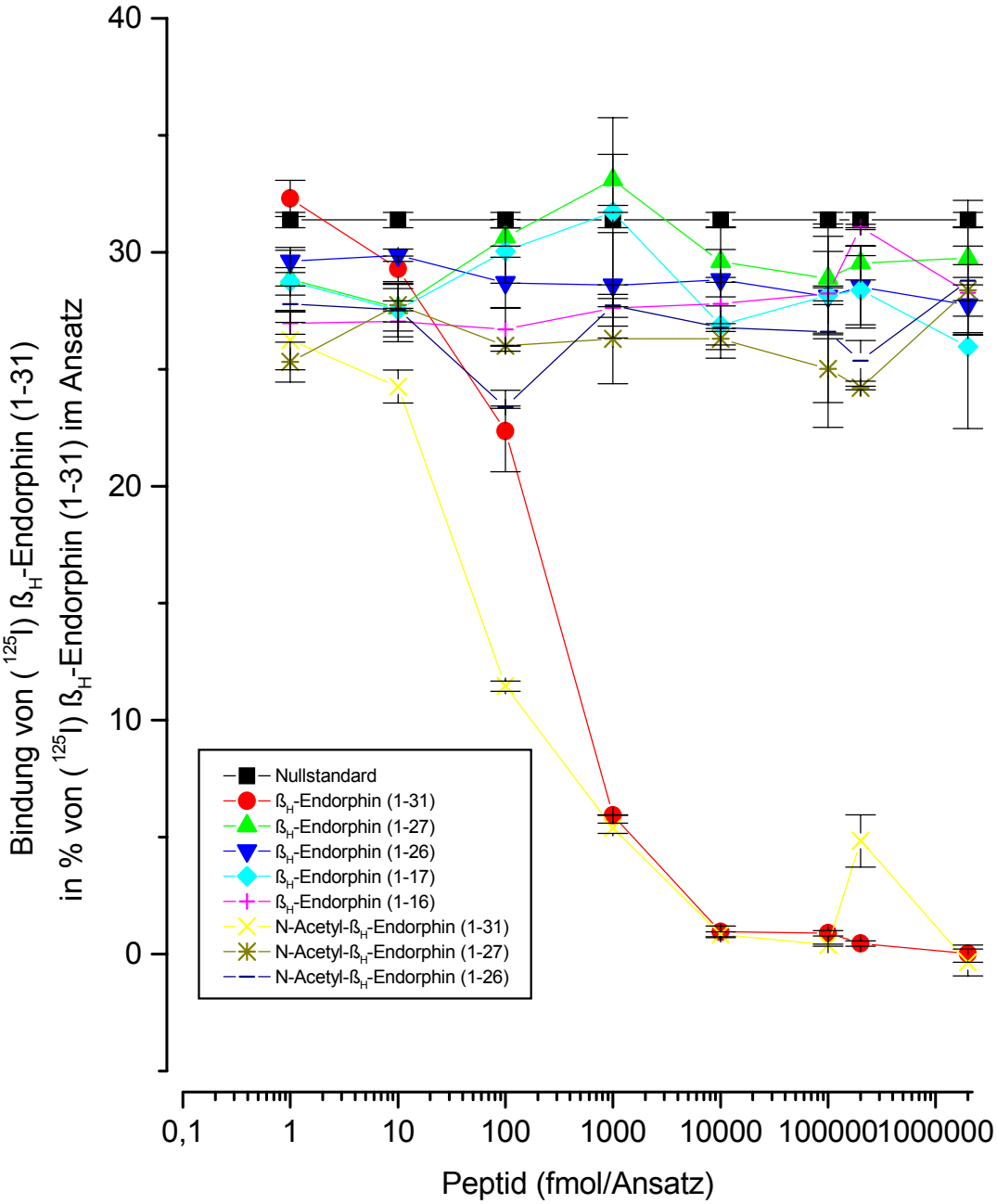


Abb. 5.13.: Solid-Phase-One-Site-RIA (SPOS-RIA) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (28-31) immunoreaktivem Material (Optimierte Methode): Darstellung der Spezifität.
Bindung von (^{125}I) 3-E7 in Anwesenheit von β_H-Endorphin (1-31) und anderen Peptiden (Konzentrationen: 1 - 2 000 000 fmol / Ansatz).
Nullstandard und Standardwerte: MW ± s aus Doppelwerten eines Experiments.

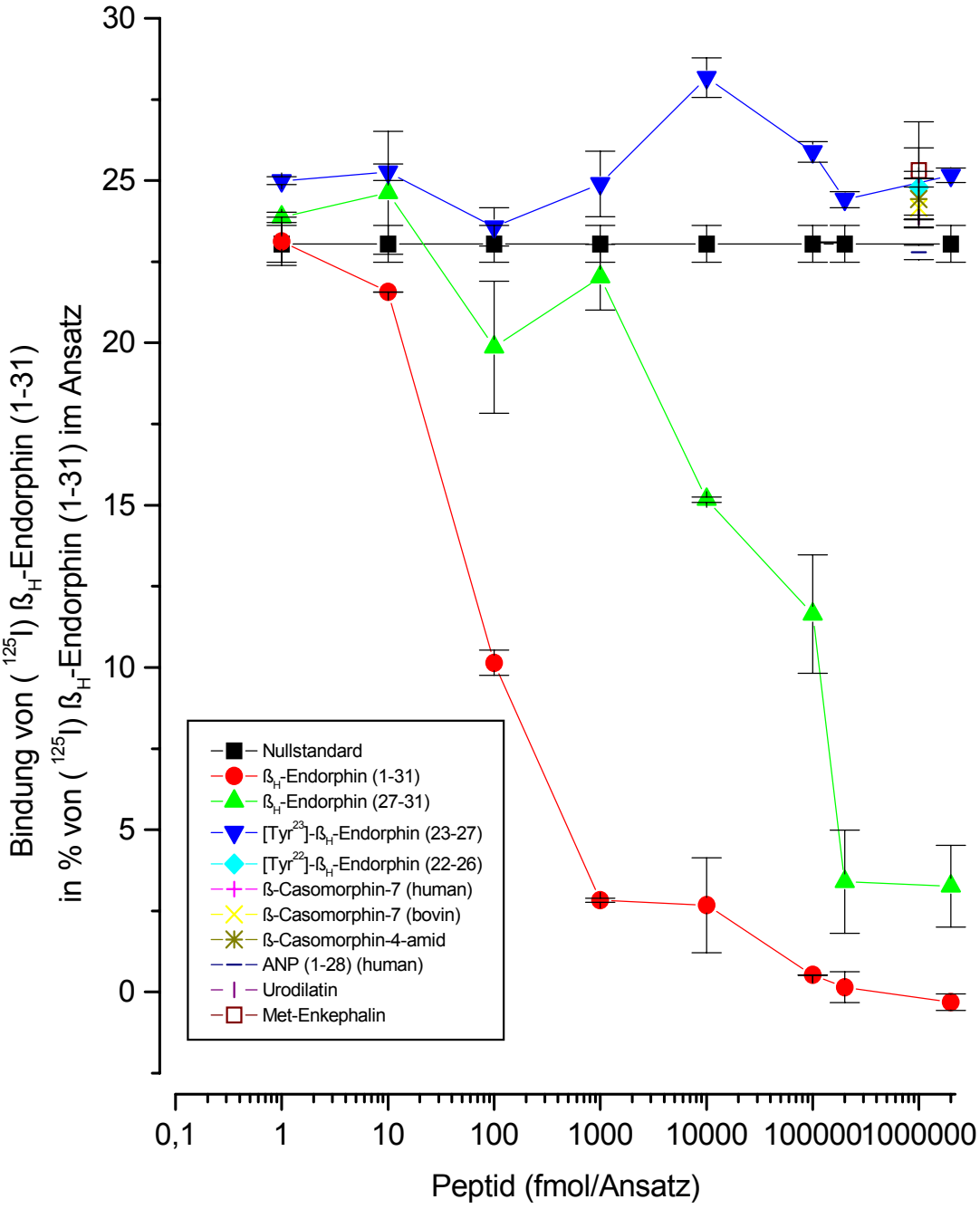


Abb. 5.14.: Solid-Phase-One-Site-RIA (SPOS-RIA) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (28-31) immunoreaktivem Material (Optimierte Methode): Darstellung der Spezifität.
Bindung von (^{125}I) 3-E7 in Anwesenheit von β_H-Endorphin (1-31) und anderen Peptiden (Konzentrationen: 1 - 2 000 000 fmol / Ansatz).
Nullstandard und Standardwerte: MW ± s aus Doppelwerten eines Experiments.

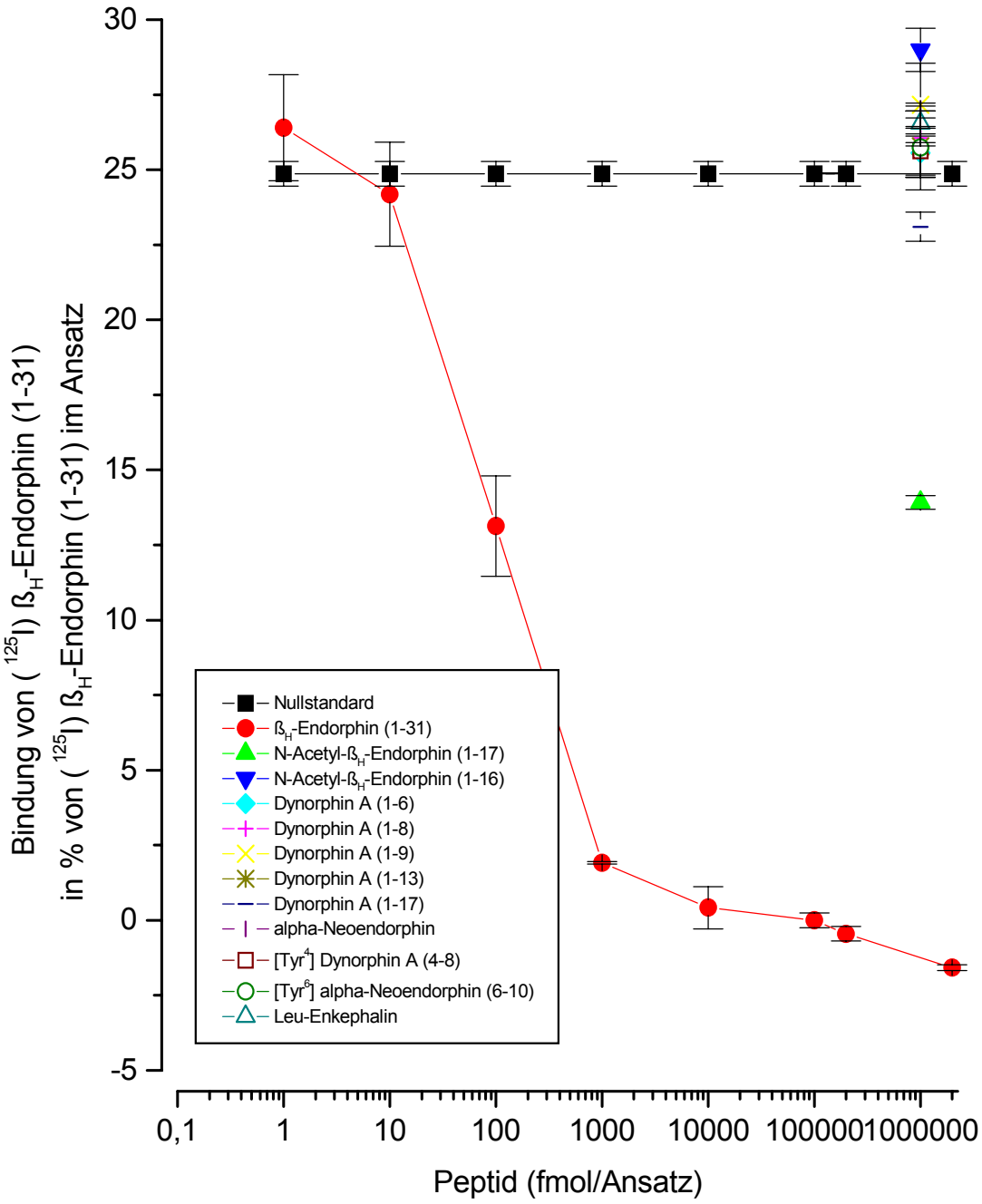


Abb. 5.15.: Solid-Phase-One-Site-RIA (SPOS-RIA) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (28-31) immunoreaktivem Material (Optimierte Methode): Darstellung der Spezifität.
Bindung von (^{125}I) 3-E7 in Anwesenheit von β_H-Endorphin (1-31) und anderen Peptiden (Konzentrationen: 1 - 2 000 000 fmol / Ansatz).
Nullstandard und Standardwerte: MW ± s aus Doppelwerten eines Experiments.

5.3.2. Solid-Phase-TWO-Site-Radioimmunoassay (SPTS-RIA) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-31)

5.3.2.1. Reproduzierbarkeit (inter-assay coefficient of variation)

$\bar{x}$ = 408,6 mol (n = 10)
s = 42,2
V = 0,10
Rel. Variationskoeffizient **Vr = 3.27 %**

5.3.2.2. Präzision (intra-assay coefficient of variation)

1. Experiment: $\bar{x}$ = 377,57 fmol (n = 10)
s = 132,16
V = 0,35
Vr_1 = 11,25 %

2. Experiment: $\bar{x}$ = 394,26 fmol (n = 10)
s = 78,72
V = 0,20
Vr_2 = 6,31 %

Als Mittelwert aus Vr_1 und Vr_2 ergab sich der folgende relative Variationskoeffizient: **Vr = 8,78 %**

5.3.2.3. Nachweisgrenze (detection limit)

Nachweisgrenze ($\bar{x}$ + s) = **6,1 fmol / Ansatz**
Nachweisgrenze ($\bar{x}$ + 2s) = **20,3 fmol / Ansatz**
Nachweisgrenze ($\bar{x}$ + 3s) = **38,7 fmol / Ansatz**

5.3.2.4. Spezifität (cross reactivities)

Die Kreuzreaktivitäten des SPTS-RIA zum Nachweis von β_H-Endorphin (1-31) sind den Abbildungen 5.16. und 5.17. zu entnehmen. Hieraus ist zu erkennen, daß neben β_H-Endorphin (1-31) nur noch eine zu vernachlässigende sehr geringe Wahrscheinlichkeit ($<$ 0,01 %) für den Nachweis von β_H-Endorphin (1-27) und (1-26) vorliegt. Das bedeutet, daß im Vergleich zum SPOS-RIA im SPTS-RIA nur das nachzuweisende Peptid β_H-Endorphin (1-31) erkannt und gebunden wird. Tab. 5.7. gibt eine Übersicht über die Kreuzreaktivitäten der getesteten Substanzen in den verschiedenen RIAs.

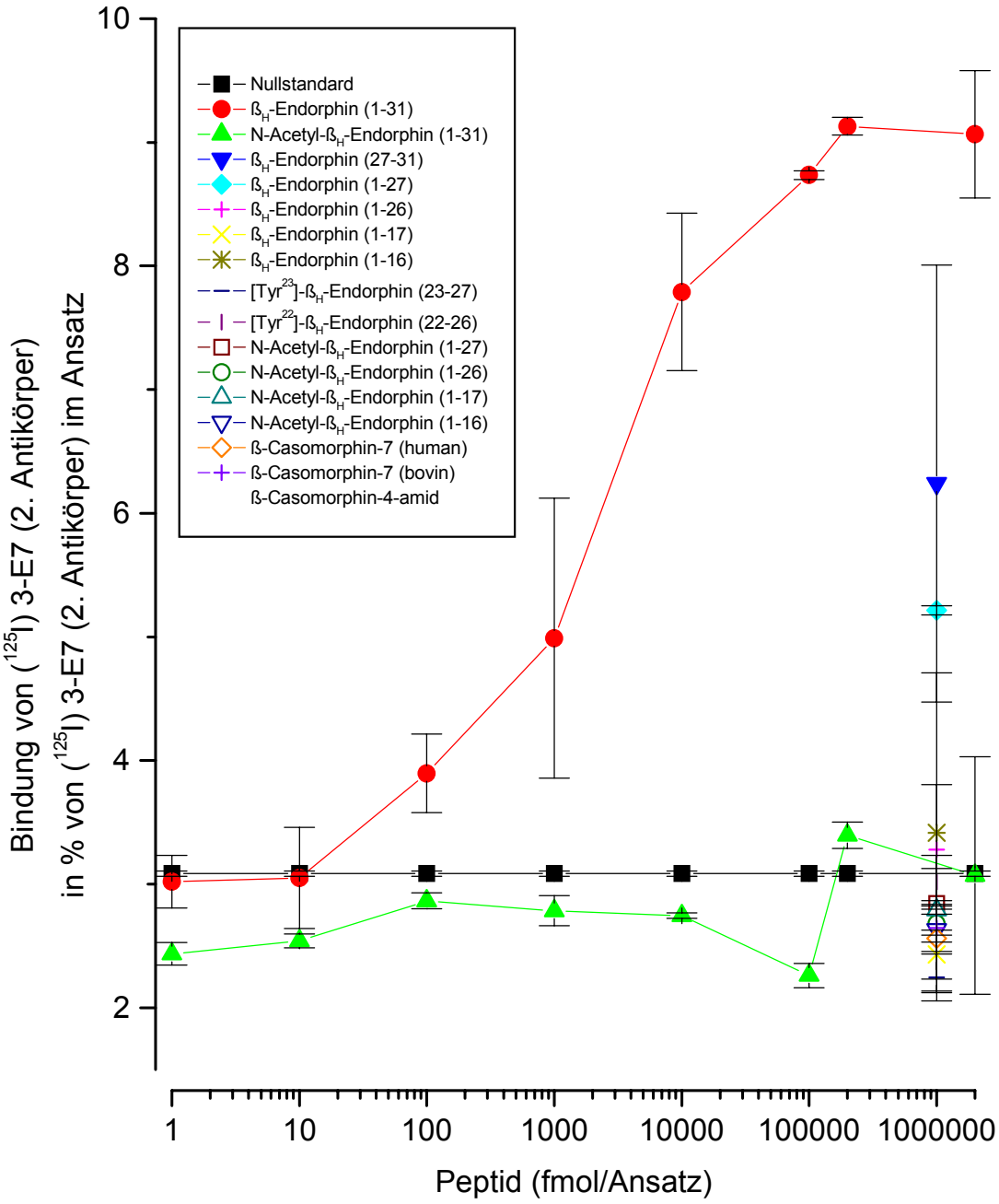


Abb. 5.16.: Solid-Phase-Two-Site-RIA (SPTS-RIA) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-31) (Optimierte Methode): Darstellung der Spezifität. Bindung von (^{125}I) 3-E7 in Anwesenheit von β_H-Endorphin (1-31) und anderen Peptiden (Konzentrationen: 1 - 2 000 000 fmol / Ansatz). Nullstandard und Standardwerte: MW ± s aus Doppelwerten eines Experiments.

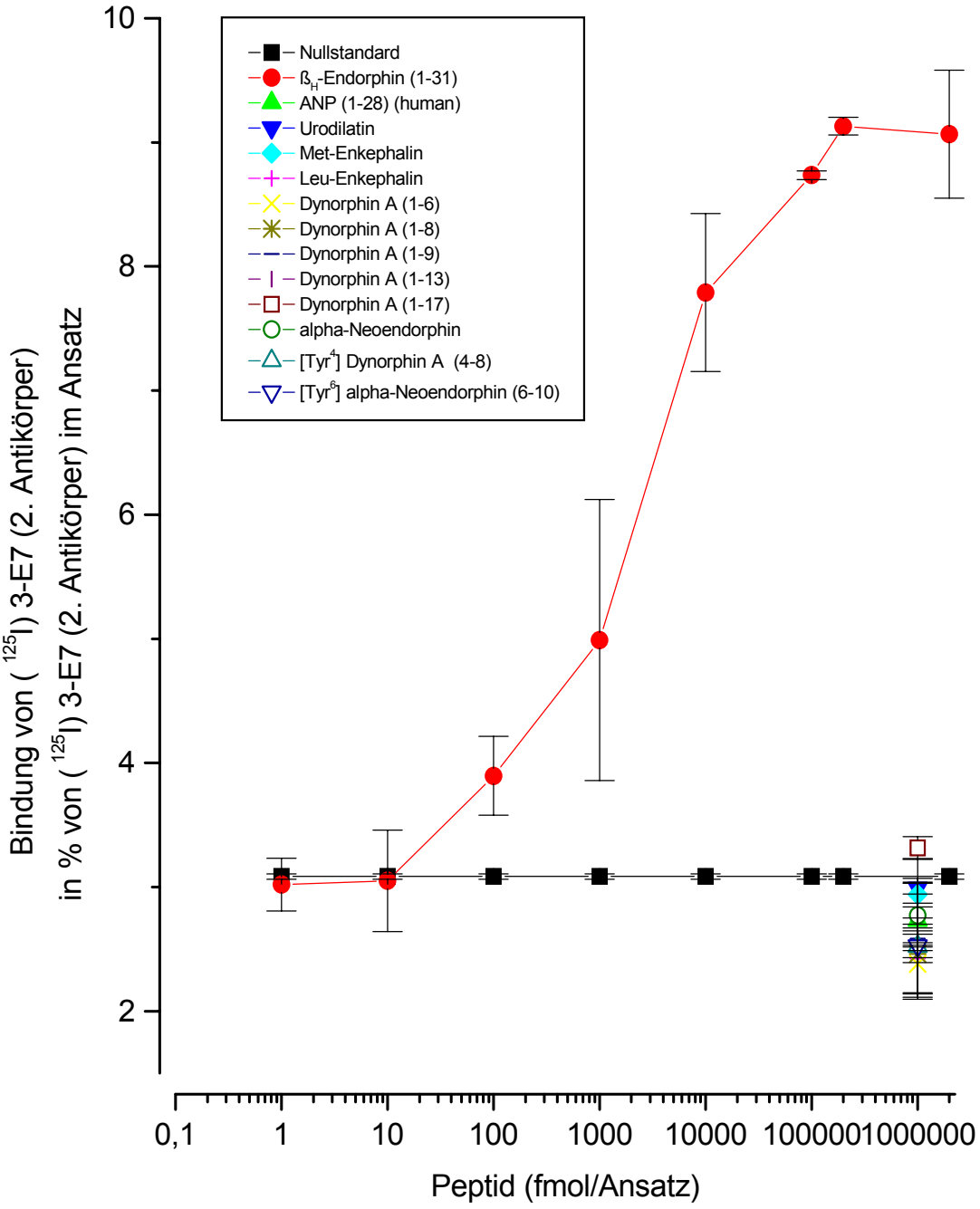


Abb. 5.17.: Solid-Phase-Two-Site-RIA (SPTS-RIA) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-31) (Optimierte Methode): Darstellung der Spezifität. Bindung von (^{125}I) 3-E7 in Anwesenheit von β_H-Endorphin (1-31) und anderen Peptiden (Konzentrationen: 1 - 2 000 000 fmol / Ansatz). Nullstandard und Standardwerte: MW ± s aus Doppelwerten eines Experiments.

5.3.3. Fluid-Phase-Immunoprecipitation-TWO-Site-Radioimmunoassay (FPITS-RIA) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-31)

5.3.3.1. Reproduzierbarkeit (inter-assay coefficient of variation)

$\bar{x}$ = 21,18 fmol (n = 10)
s = 2,56
V = 0,04
Rel. Variationskoeffizient **Vr = 3,81 %**

5.3.3.2. Präzision (intra-assay coefficient of variation)

1. Experiment: $\bar{x}$ = 22.03 fmol (n = 10)
s = 2.03
V = 0,09
Vr_1 = 2,92 %

2. Experiment $\bar{x}$ = 23,28 fmol (n = 10)
s = 2,74
V = 0,12
Vr = 3,72 %

Als Mittelwert aus Vr_1 und Vr_2 ergab sich der folgende relative Variationskoeffizient: **Vr = 3,32 %**

5.3.3.3. Nachweisgrenze (detection limit)

Nachweisgrenze ($\bar{x}$ + s) = **3,5 fmol / Ansatz**
Nachweisgrenze ($\bar{x}$ + 2s) = **5,6 fmol / Ansatz**
Nachweisgrenze ($\bar{x}$ + 3s) = **7,5 fmol / Ansatz**

5.3.3.4. Spezifität (cross reactivities)

Die Spezifität des FPITS-RIA zum Nachweis von β_H-Endorphin (1-31) ist den Abbildungen 5.18. und 5.19. zu entnehmen. Es ist deutlich zu erkennen, daß nur das Peptid β_H-Endorphin (1-31) nachgewiesen wird.
Die Tab. 5.7. gibt eine Übersicht über die Kreuzreaktivitäten der getesteten Substanzen mit den verschiedenen RIAs.

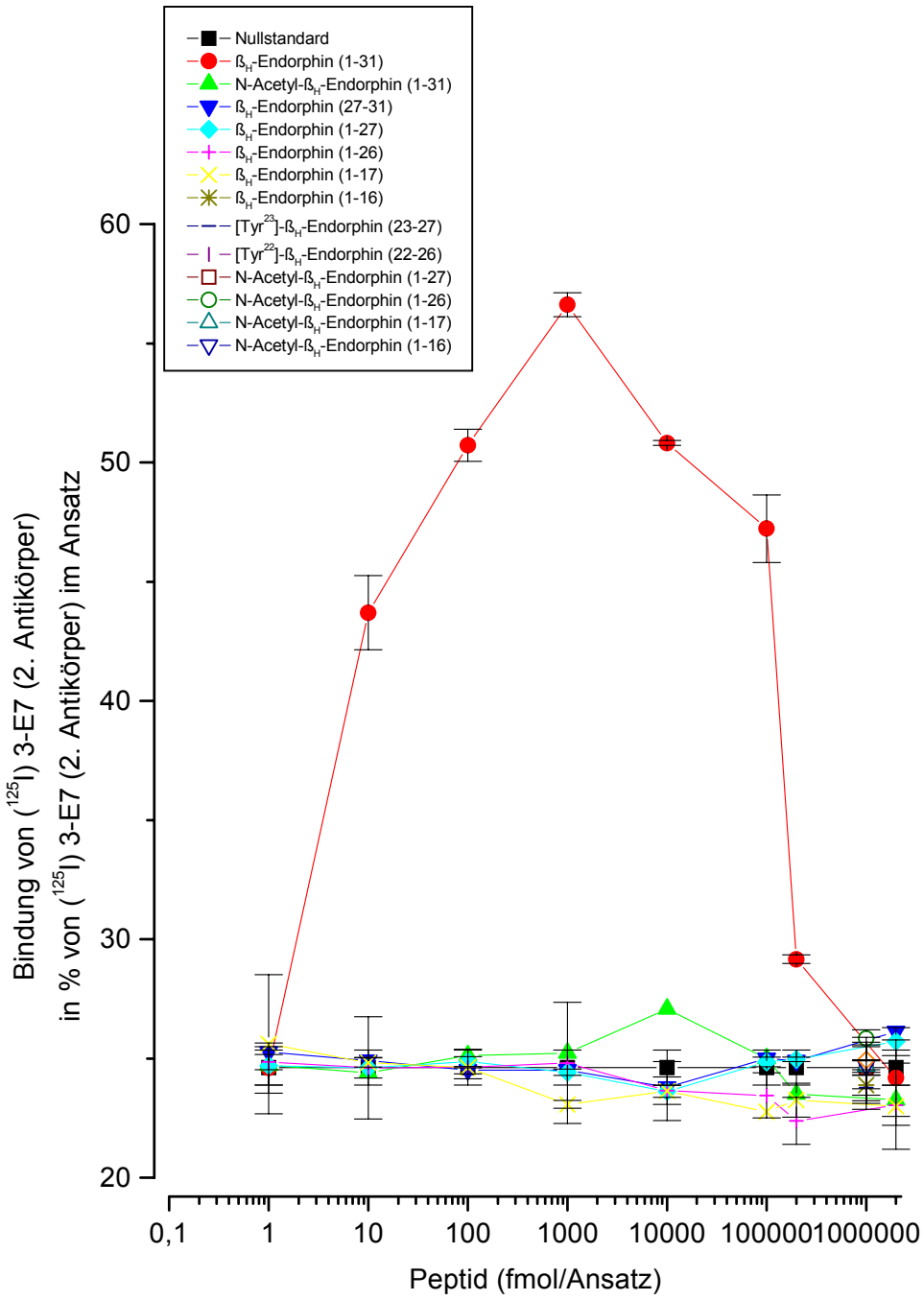


Abb. 5.18.: Fluid-Phase-Immunoprecipitation-Two-Site-RIA (FPITS-RIA) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-31) (Optimierte Methode): Darstellung der Spezifität.
Bindung von (^{125}I) 3-E7 in Anwesenheit von β_H-Endorphin (1-31) und anderen Peptiden (Konzentrationen: 1 - 2 000 000 fmol / Ansatz).
Nullstandard und Standardwerte: MW ± s aus Doppelwerten eines Experiments.

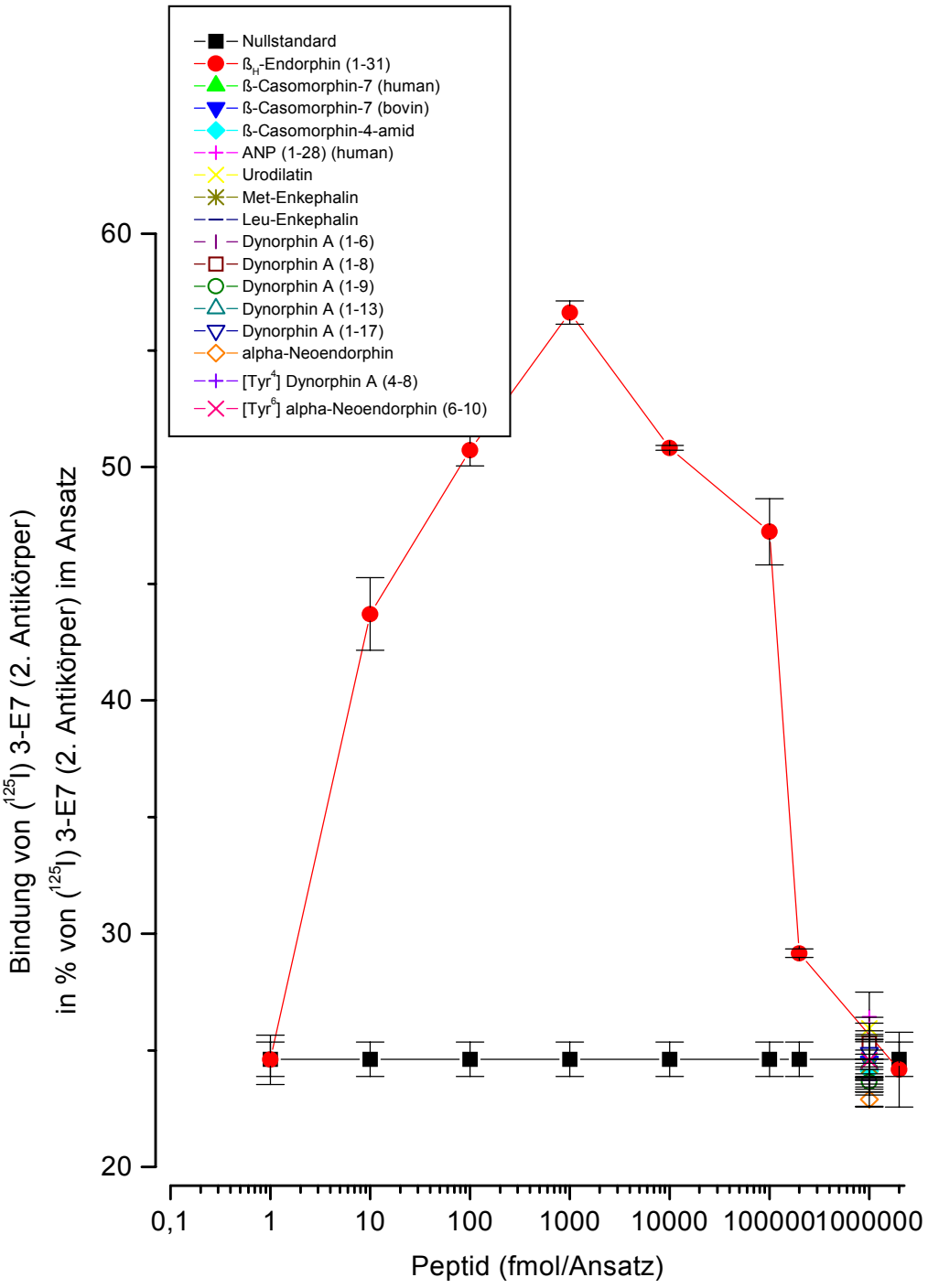


Abb. 5.19.: Fluid-Phase-Immunoprecipitation-Two-Site-RIA (FPITS-RIA) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-31) (Optimierte Methode): Darstellung der Spezifität.
Bindung von (^{125}I) 3-E7 in Anwesenheit von β_H-Endorphin (1-31) und anderen Peptiden (Konzentrationen: 1 - 2 000 000 fmol / Ansatz).
Nullstandard und Standardwerte: MW ± s aus Doppelwerten eines Experiments.

5.3.4. Fluid-Phase-Immunoprecipitation-TWO-Site-Radioimmunoassay (FPITS-RIA) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-27)

5.3.4.1. Reproduzierbarkeit (inter-assay coefficient of variation)

$\bar{x}$ = 192,82 fmol (n = 10)
s = 30,14
V = 0,16
Rel. Variationskoeffizient **Vr = 4,94 %**

5.3.4.2. Präzision (intra-assay coefficient of variation)

1. Experiment:
$\bar{x}$ = 216,60 fmol (n = 10)
s = 49,66
V = 0,23
Vr_1 = 7,25 %

2. Experiment:
$\bar{x}$ = 188,04 fmol (n = 10)
s = 42,78
V = 0,23
Vr_2 = 7,19 %

Als Mittelwert aus Vr_1 und Vr_2 ergab sich der folgende relative Variationskoeffizient: **Vr = 7,22 %**

5.3.4.3. Nachweisgrenze (detection limit)

Nachweisgrenze ($\bar{x}$ + s) = **10,4 fmol / Ansatz**
Nachweisgrenze ($\bar{x}$ + 2s) = **17,2 fmol / Ansatz**
Nachweisgrenze ($\bar{x}$ + 3s) = **18,9 fmol / Ansatz**

5.3.4.4. Spezifität (cross reactivities)

Die Spezifität des FPITS-RIA zum Nachweis von β_H-Endorphin (1-27) ist den Abbildungen 5.20. und 5.21. zu entnehmen. Es ist zu erkennen, daß nur das Peptid β_H-Endorphin (1-27) nachgewiesen wird.
Die Tab. 5.7. gibt eine Übersicht über die Kreuzreaktivitäten der getesteten Substanzen mit den verschiedenen RIAs.

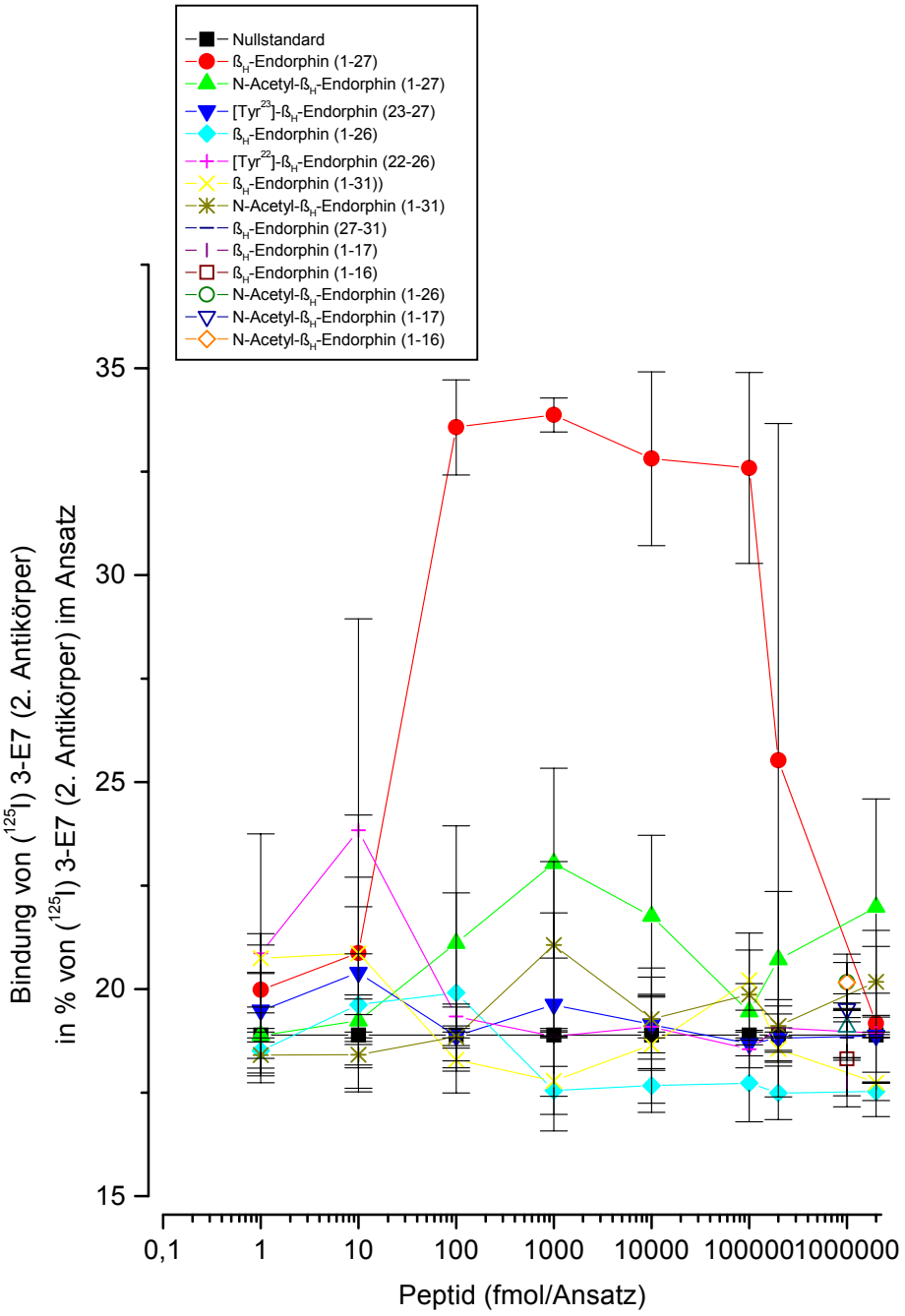


Abb. 5.20.: Fluid-Phase-Immunoprecipitation-Two-Site-RIA (FPITS-RIA) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-27) (Optimierte Methode): Darstellung der Spezifität.
Bindung von (^{125}I) 3-E7 in Anwesenheit von β_H-Endorphin (1-27) und anderen Peptiden (Konzentrationen: 1 - 2 000 000 fmol / Ansatz).
Nullstandard und Standardwerte: MW ± s aus Doppelwerten eines Experiments.

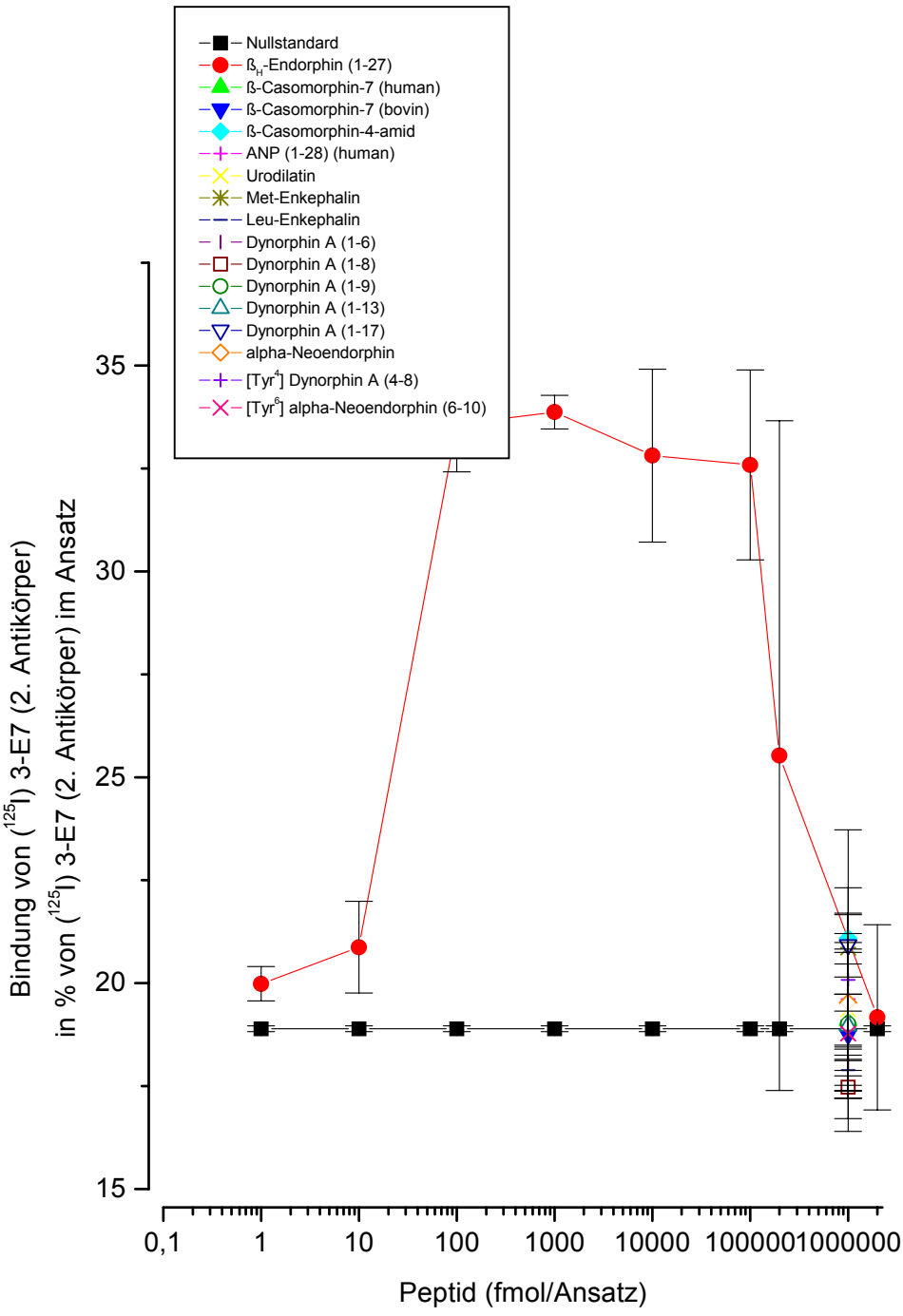


Abb. 5.21.: Fluid-Phase-Immunoprecipitation-Two-Site-RIA (FPITS-RIA) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-27) (Optimierte Methode): Darstellung der Spezifität.
Bindung von (^{125}I) 3-E7 in Anwesenheit von β_H-Endorphin (1-27) und anderen Peptiden (Konzentrationen: 1 - 2 000 000 fmol / Ansatz).
Nullstandard und Standardwerte: MW ± s aus Doppelwerten eines Experiments.

5.3.5. Fluid-Phase-Immunoprecipitation-TWO-Site-Radioimmunoassay (FPITS-RIA) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-26)

5.3.5.1. Reproduzierbarkeit (inter-assay coefficient of variation)

$\bar{x}$ = 45,39 fmol (n = 10)
s = 2,62
V = 0,06
Rel. Variationskoeffizient **Vr = 1,82 %**

5.3.5.2. Präzision (intra-assay coefficient of variation)

1. Experiment: $\bar{x}$ = 48,98 fmol (n = 10)
s = 7,15
V = 0,15
Vr_1 = 4,62 %

2. Experiment: $\bar{x}$ = 45,22 fmol (n = 10)
s = 4,42
V = 0,09
Vr_2 = 3,10 %

Als Mittelwert aus Vr_1 und Vr_2 ergab sich der folgende relative Variationskoeffizient: **Vr = 3,86 %**

5.3.5.3. Nachweisgrenze (detection limit)

Nachweisgrenze ($\bar{x}$ + s) = **2,1 fmol / Ansatz**
Nachweisgrenze ($\bar{x}$ + 2s) = **3,6 fmol / Ansatz**
Nachweisgrenze ($\bar{x}$ + 3 s) = **7,0 fmol / Ansatz**

5.3.5.4. Spezifität (cross reactivities)

Die Spezifität des FPITS-RIA zum Nachweis von β_H-Endorphin (1-26) wird in den Abbildungen 5.22. und 5.23 graphisch dargestellt. Es ist auch hier deutlich zu erkennen, daß nur das Peptid β_H-Endorphin (1-26) nachgewiesen wird.

Die Tab. 5.7. gibt eine Übersicht über die Kreuzreaktivitäten der getesteten Substanzen mit den verschiedenen RIAs.

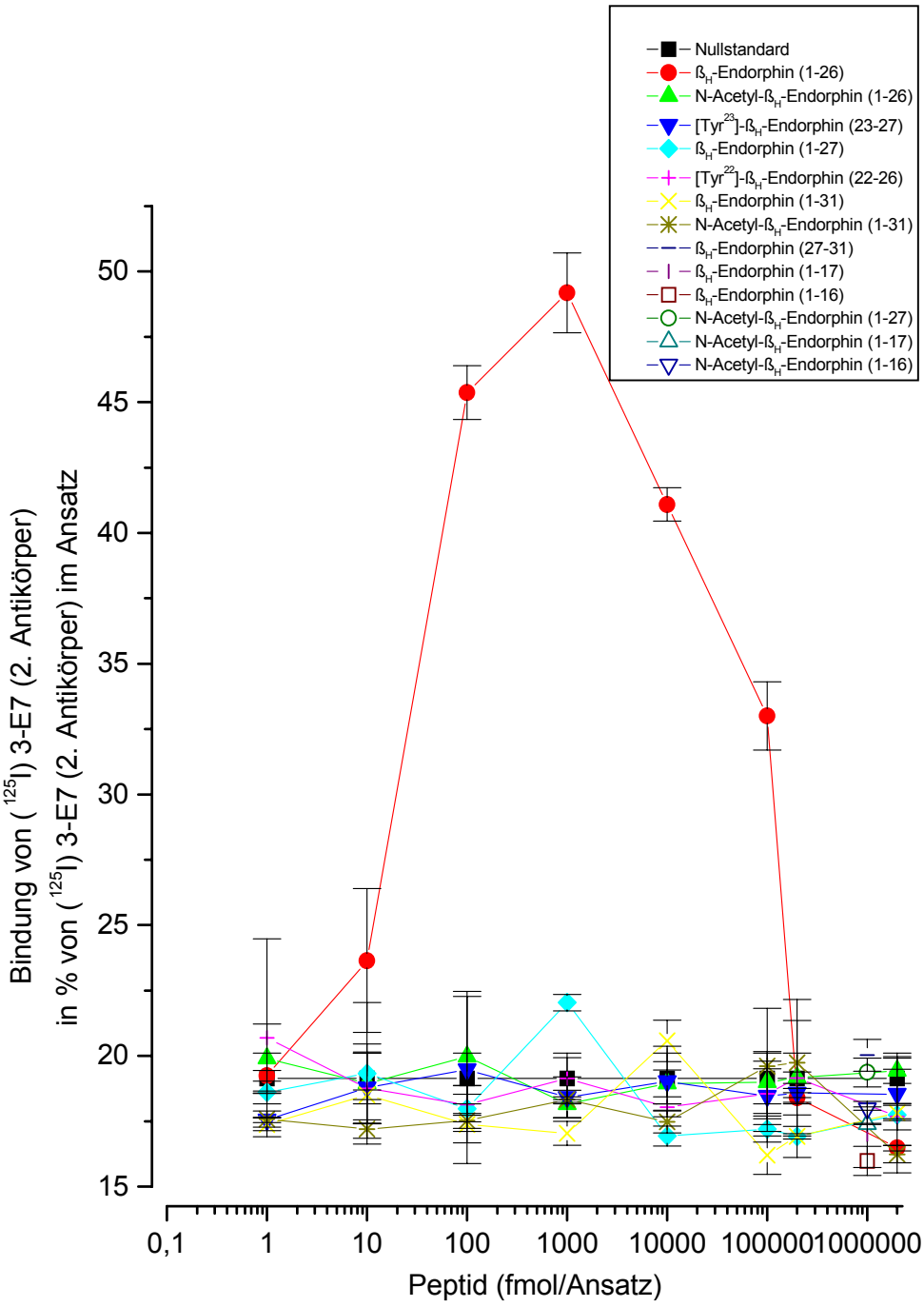


Abb. 5.22.: Fluid-Phase-Immunoprecipitation-Two-Site-RIA (FPITS-RIA) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-26) (Optimierte Methode): Darstellung der Spezifität.
Bindung von (^{125}I) 3-E7 in Anwesenheit von β_H-Endorphin (1-26) und anderen Peptiden (Konzentrationen: 1 - 2 000 000 fmol / Ansatz).
Nullstandard und Standardwerte: MW ± s aus Doppelwerten eines Experiments.

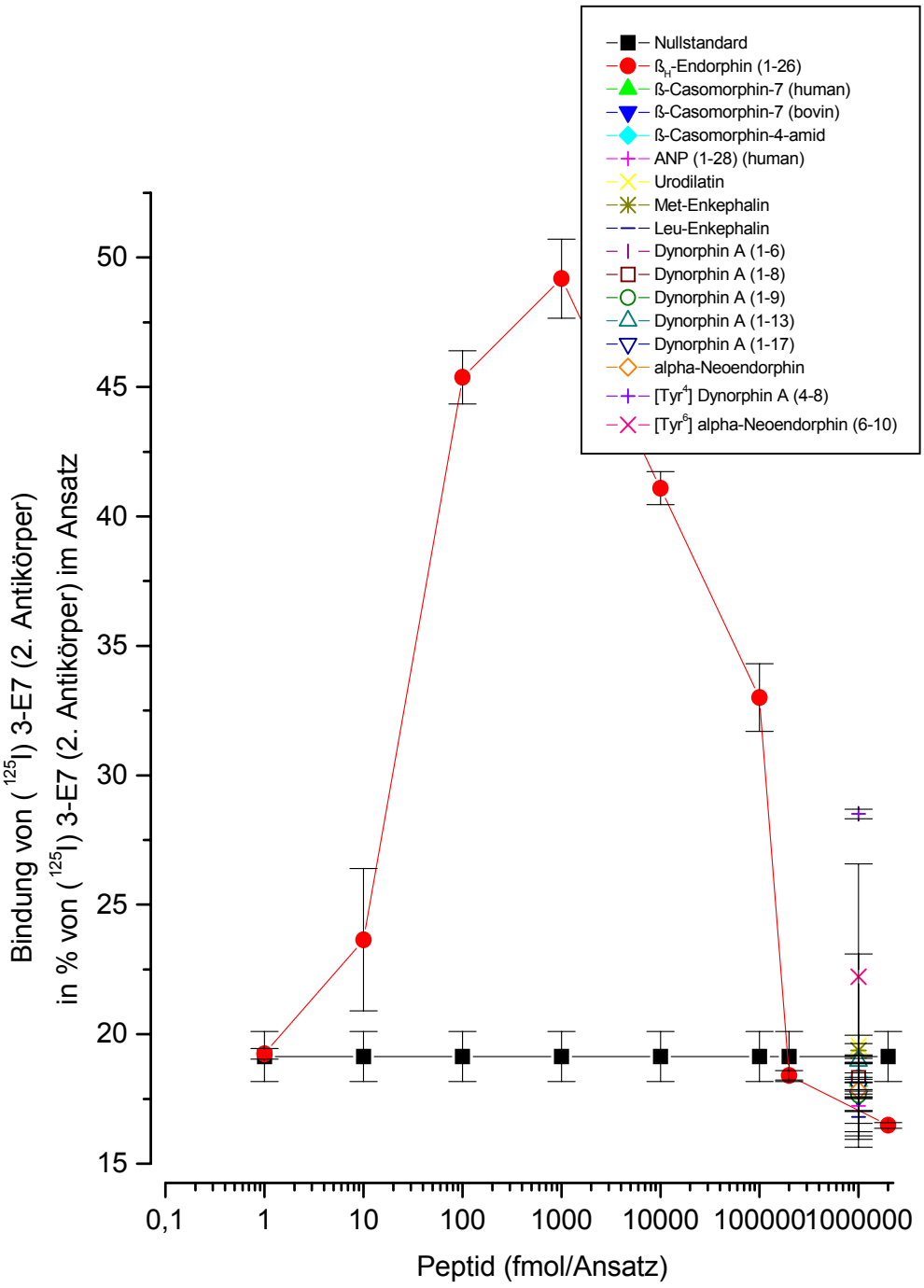


Abb. 5.23.: Fluid-Phase-Immunoprecipitation-Two-Site-RIA (FPITS-RIA) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-26) (Optimierte Methode): Darstellung der Spezifität.
Bindung von (^{125}I) 3-E7 in Anwesenheit von β_H-Endorphin (1-26) und anderen Peptiden (Konzentrationen: 1 - 2 000 000 fmol / Ansatz).
Nullstandard und Standardwerte: MW ± s aus Doppelwerten eines Experiments.

Kreuzreaktivität (%)					
Peptide	SPOS-RIA für β-End (28-31) IRM	SPTS-RIA für β-End (1-31)	FPITS-RIA für β-End (1-31)	FPITS-RIA für β-End (1-27)	FPITS-RIA für β-End (1-26)
β_H-Endorphin (1-31)	100	100	100	-	-
β_H-Endorphin (1-27)	0	< 0,01	0	100	-
β_H-Endorphin (1-26)	0	< 0,01	0	-	100
β_H-Endorphin (1-17)	0	0	0	-	-
β_H-Endorphin (1-16)	0	0	0	-	-
N-Ac-β_H-Endorphin (1-31)	> 100	0	0	-	-
N-Ac-β_H-Endorphin (1-27)	0	0	0	-	-
N-Ac-β_H-Endorphin (1-26)	0	0	0	-	-
N-Ac-β_H-Endorphin (1-17)	0	0	0	-	-
N-Ac-β_H-Endorphin (1-16)	0	0	0	-	-
β_H-Endorphin (27-31)	0,3	< 0,01	0	-	-
[Tyr^{23}]-β_H-Endorphin (23-27)	0	0	0	-	-
[Tyr^{22}]-β_H-Endorphin (22-26)	0	0	0	-	-
β-Casomorphin-7, human	0	0	0	-	-
β-Casomorphin-7, bovin	0	0	0	-	-
β-Casomorphin-4-amid	0	0	0	-	-
ANP (1-28), human	0	0	0	-	-
Urodilatin	0	0	0	-	-
Met-Enkephalin	0	0	0	-	-
Leu-Enkephalin	0	0	0	-	-

Kreuzreaktivität (%)					
Peptide	SPOS-RIA für β-End (28-31) IRM	SPTS-RIA für β-End (1-31)	FPITS-RIA für β-End (1-31)	FPITS-RIA für β-End (1-27)	FPITS-RIA für β-End (1-26)
Dynorphin A (1-6), human	0	0	0	-	-
Dynorphin A (1-8), human	0	0	0	-	-
Dynorphin A (1-9), human	0	0	0	-	-
Dynorphin A (1-13), human	0	0	0	-	-
Dynorphin A (1-17), human	0	0	0	-	-
[Tyr^4] Dynorphin A (4-8)	0	0	0	-	-
α-Neoendorphin	0	0	0	-	-
[Tyr^6] α-Neoendorphin (6-10)	0	0	0	-	-

Tab. 5.7.: Übersicht über die Spezifitäten, d.h. Kreuzreaktivitäten aller entwickelten und charakterisierten Methoden (β-End = β-Endorphin; IRM = immunoreaktives Material; Ac = Acetyl; Angaben in Prozent), soweit es sich um quantifizierbare SPOS-Daten handelte oder soweit sie daraus abgeleitet werden konnten (SPTS-RIA und FPITS-RIA für β_H-Endorphin (1-31)). Auch bei den FPITS-RIAs für β_H-Endorphin (1-26) und (1-27) ergaben sich keine Kreuzreaktivitäten, was jedoch nicht quantifiziert werden konnte.

5.4. Bindungsparameter K_D und B_{max} der Interaktionen zwischen β_H-Endorphin (1-31), (1-27) bzw. (1-26) und den an ihren C-Termini angreifenden Antikörpern in verschiedenen Assay-Systemen

5.4.1. Spezifische Aktivitäten der radioaktiv markierten Peptide

Zur Berechnung der Bindungsparameter K_D und B_{max} der Interaktion von Peptiden und Antikörpern in den einzelnen Assays war die Kenntnis der Spezifischen Aktivitäten der radioaktiv markierten Peptide notwendig (siehe Tab. 5.8.). Sie wurde nach Dias und Reichert (1982) bestimmt (s. 4.4.2.).
Die spezifische Aktivität wurde auf den Tag der Herstellung der radioaktiv markierten Peptide bezogen und dann auf den betreffenden Tag der Experimente umgerechnet.

^{125}I-markiertes Peptid	Spezifische Aktivität
(^{125}I) β_H-Endorphin (1-31)	71,2 Ci / mmol
(^{125}I) β_H-Endorphin (1-31)	60,8 Ci / mmol
(^{125}I) β_H-Endorphin (1-27)	50,3 Ci / mmol
(^{125}I) β_H-Endorphin (1-26)	94,6 Ci / mmol

Tab. 5.8.: Spezifische Aktivitäten der radioaktiv markierten Peptide

5.4.2. Bindungsparameter K_D und B_{max}

5.4.2.1. Graphische Darstellung der Bindungsdaten aus Tracersättigungs- und Tracerverdrängungsexperimenten in verschiedenen Assaysystemen

Tracersättigungsexperimente

Die Durchführung eines Tracersättigungsexperimentes (TS) ist unter 4.4.3. beschrieben. Die gewonnenen Daten für die Bindung von (^{125}I) β_H-Endorphin (1-31) an Antikörper des Antiserums 10P wurden unter Verwendung der Computerprogramme EXCEL und ORIGIN graphisch ausgewertet, d.h. in Scatchard-Diagramme überführt und die Bindungsparameter K_D und B_{max} aus den Scatchard-Diagrammen abgeleitet. (Die Kurvenanpassung über Tangenten erfolgte von Hand, d.h. ohne die Möglichkeit einer statistischen Signifikanzberechnung). In Abb. 5.24. und 5.25. sind die Scatchard-Plots für den Fall des FPOS-RIA mit gereinigtem Antiserum 10P (Inkubationsvolumen 240 µl, AK 10P, 20 µg) und des SPOS-RIA mit gereinigtem Antiserum 10P (Inkubationsvolumen 1 ml, AK 10P, 20 µg) dargestellt.
Die Bindungsparameter sind den Tabellen 5.9. und 5.10. zu entnehmen.

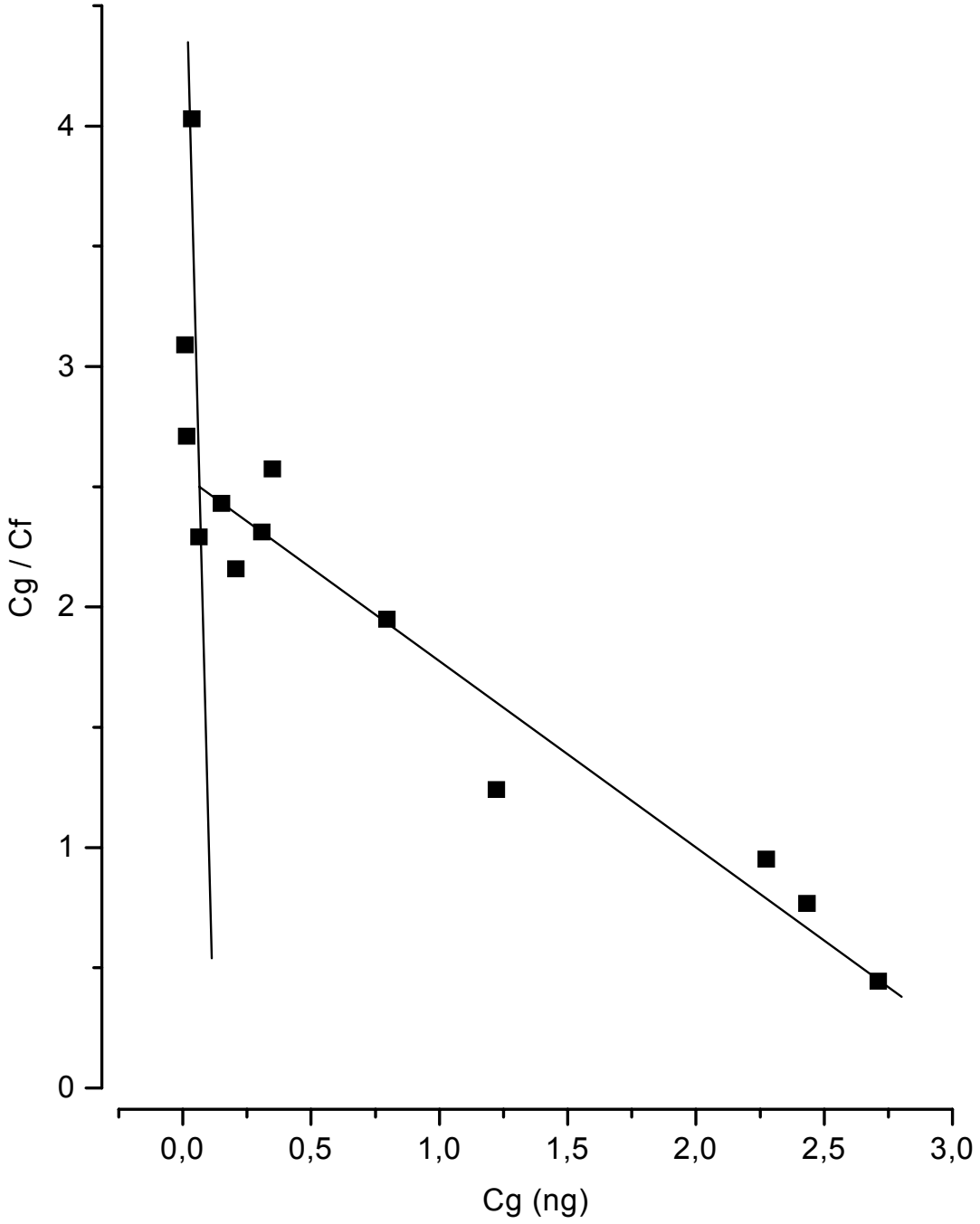


Abb. 5.24.: Bindung von (^{125}I) β_H-Endorphin an Antikörper des Antiserums 10P: Scatchard-Plot aus Daten eines Tracersättigungsexperiments im FPOS-RIA (Inkubationsvolumen 240 µl).

Cg = Konzentration des an Antikörper 10P gebundenen (^{125}I) β_H-Endorphin (1-31)

Cf = Konzentration des freien, nicht an Antikörper 10P gebundenen (^{125}I) β_H-Endorphin (1-31)

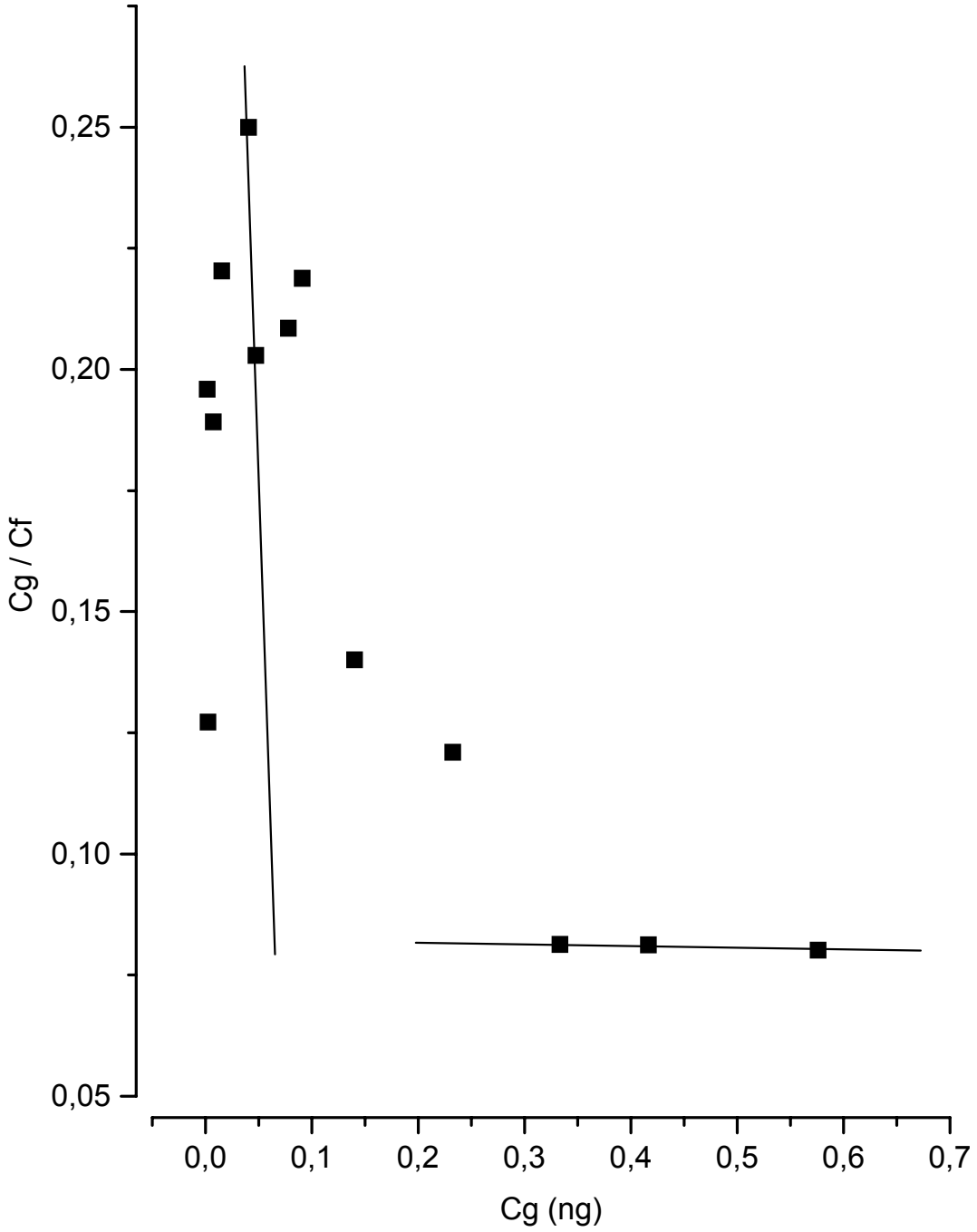


Abb. 5.25.: Bindung von (^{125}I) β_H-Endorphin (1-31) an die Antikörper des Antiserums 10P: Scatchard-Plot aus Daten eines Tracersättigungsexperiments im SPOS-RIA (Inkubationsvolumen 1 ml).
Cg = Konzentration des an Antikörper 10P gebundenen (^{125}I) β_H-Endorphin (1-31)
Cf = Konzentration des freien, nicht an Antikörper 10P gebundenen (^{125}I) β_H-Endorphin (1-31)

Tracerverdrängungsexperimente

Die Durchführung eines Tracerverdrängungsexperimentes (TVK) ist unter 4.4.3. beschrieben. Die gewonnenen Bindungsdaten wurden wie unter 4.4.4. beschrieben zum einen über das Computerprogramm LIGAND, zum anderen auch über das Tabellenkalkulationsprogramm EXCEL und das Zeichenprogramm ORIGIN ausgewertet und in Scatchard-Diagramme zur Berechnung der Bindungsparameter K_D und B_{max} überführt.

Das nicht-lineare iterative Kurvenanpassungsprogramm LIGAND berechnete unter Berücksichtigung statistischer Signifikanzen die Bindungsparameter K_D und B_{max} unter der Vorgabe **einer** Bindungsstelle (one binding site fit). Das Programm schloß das Vorliegen **zweier** Bindungsstellen aus.

Die Datenauswertung durch die Computerprogramme EXCEL und ORIGIN erfolgte wie oben beschrieben durch Kurvenanpassung der Scatchard-Diagramme von Hand. Aus den Scatchard-Plots wurden ohne Berücksichtigung statistischer Signifikanzen K_D und B_{max} abgeleitet.

In Abb. 5.26., 5.27. und 5.28. sind beispielhaft drei Scatchard-Plots (graphische Darstellung mittels ORIGIN) basierend auf Daten von Tracerverdrängungsexperimenten im FPOS-RIA, im SPOS-RIA und im FPIOS-RIA dargestellt, wie sie für die Bindung von β_H-Endorphin (1-31) und (^{125}I) β_H-Endorphin (1-31) an die Antikörper des Antiserums 10P erhoben wurden.

Die Bindungsparameter sind den Tab. 5.9. und 5.10. zu entnehmen.

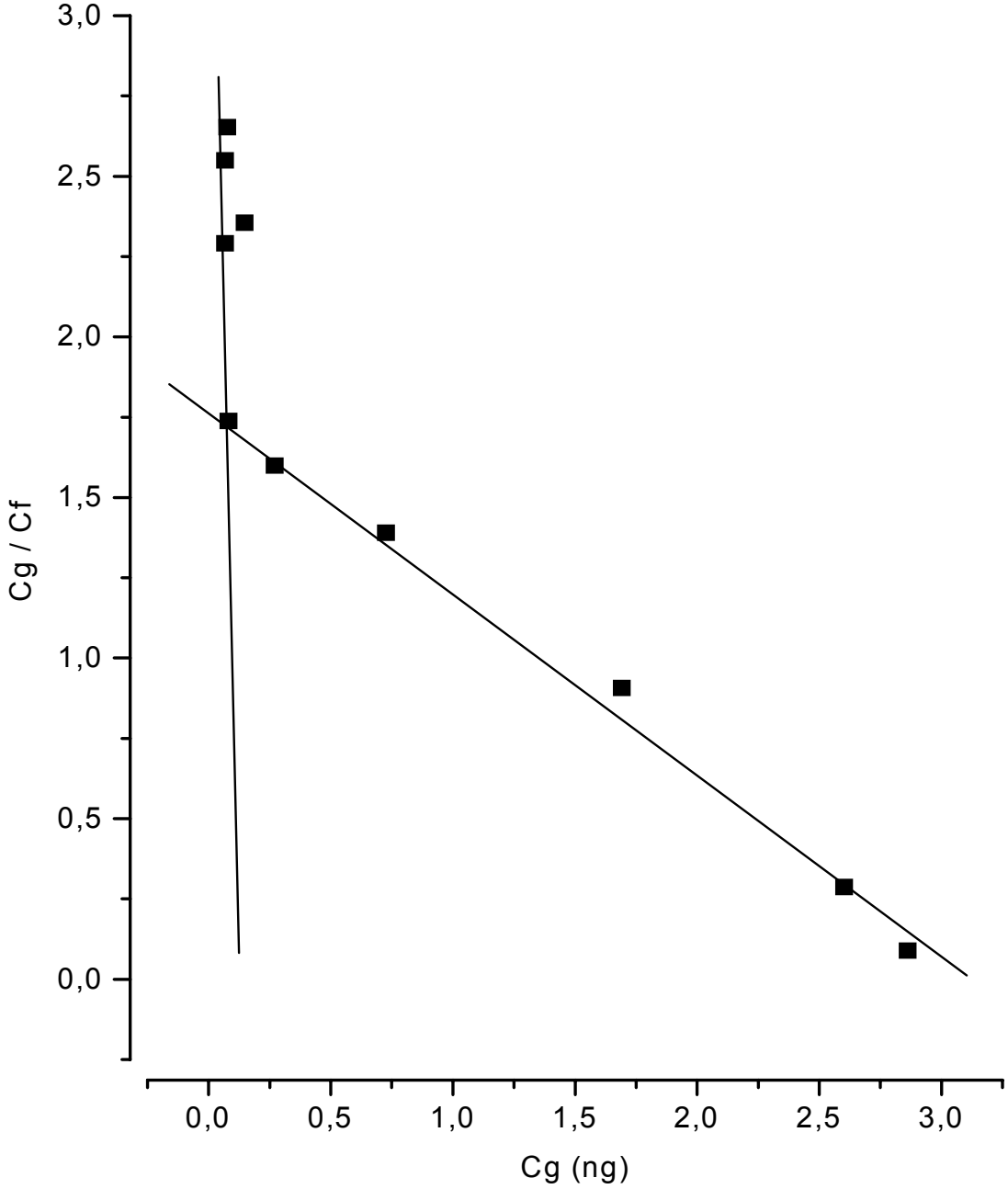


Abb. 5.26.: Bindung von β_H-Endorphin (1-31) [und (^{125}I) β_H-Endorphin (1-31)] an die Antikörper des Antiserums 10P: Scatchard-Plot aus Daten eines Tracerverdrängungsexperiments im FPOS-RIA (Inkubationsvolumen 240 µl).

Cg = Konzentration des an die Antikörper 10P gebundenen β_H-Endorphin (1-31) [und (^{125}I) β_H-Endorphin (1-31)]

Cf = Konzentration des freien, nicht an die Antikörper 10P gebundenen β_H-Endorphin (1-31) [und (^{125}I) β_H-Endorphin (1-31)]

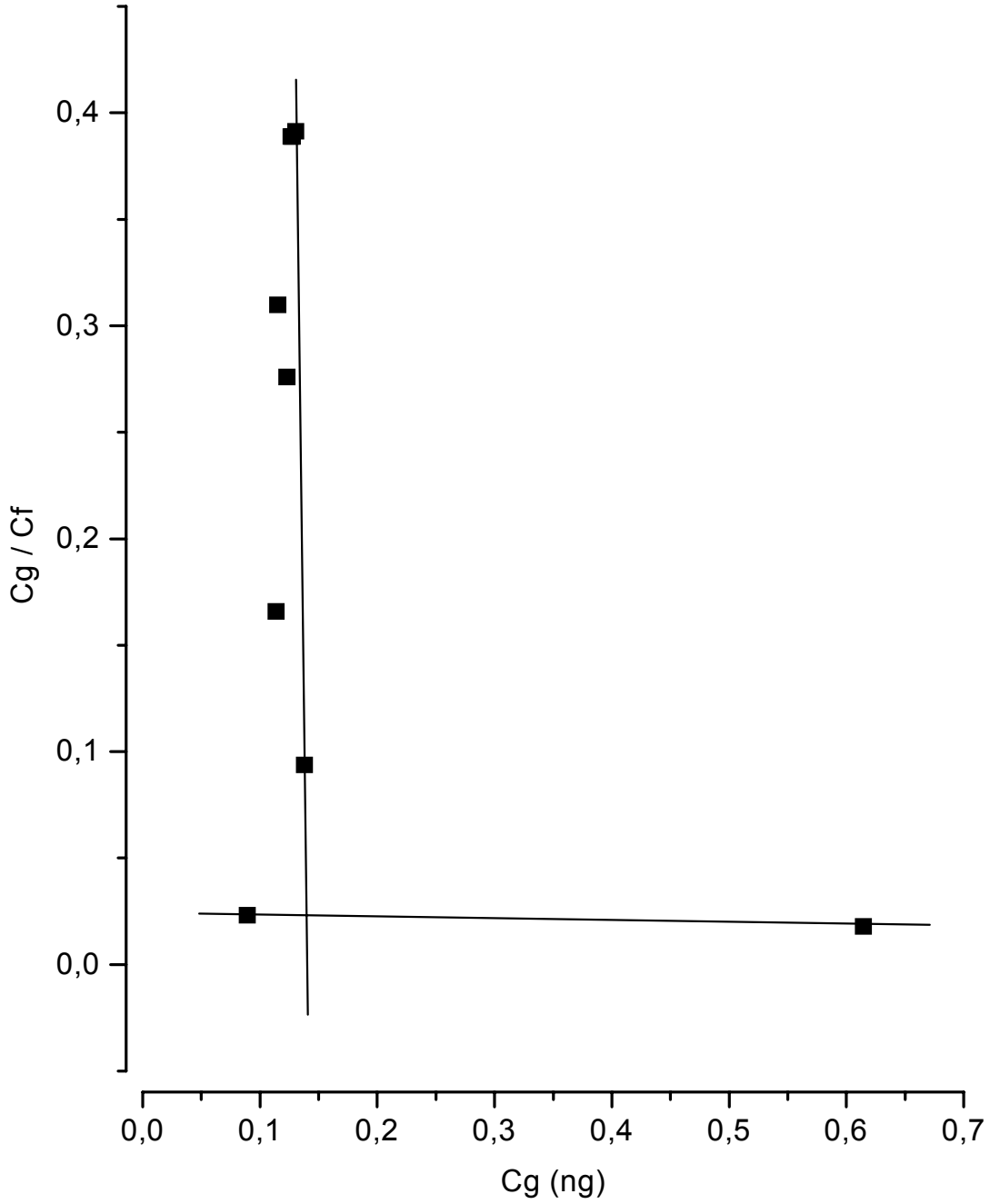


Abb. 5.27.: Bindung von β_H-Endorphin (1-31) [und (^{125}I) β_H-Endorphin (1-31)] an die Antikörper des Antiserums 10P: Scatchard-Plot aus Daten eines Tracerverdrängungsexperiments im SPOS-RIA (Inkubationsvolumen 1 ml).

Cg = Konzentration des an die Antikörper 10P gebundenen β_H-Endorphin (1-31) [und (^{125}I) β_H-Endorphin (1-31)]

Cf = Konzentration des freien, nicht an die Antikörper 10P gebundenen β_H-Endorphin (1-31) [und (^{125}I) β_H-Endorphin (1-31)]

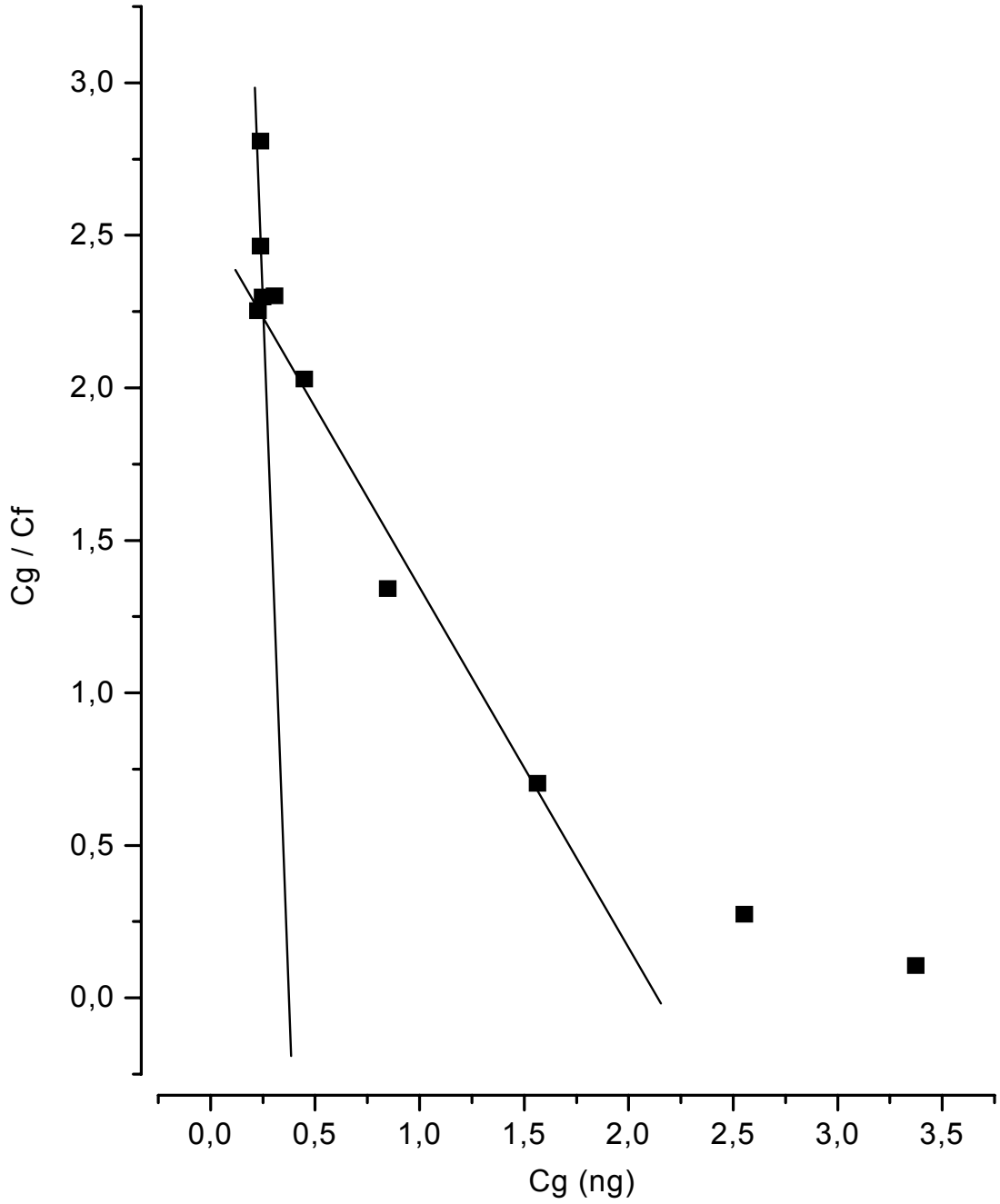


Abb. 5.28.: Bindung von β_H-Endorphin (1-31) [und (^{125}I) β_H-Endorphin (1-31)] an die Antikörper des Antiserums 10P: Scatchard-Plot aus Daten eines Tracerverdrängungsexperiments im FPIOS-RIA (Inkubationsvolumen 240 µl).

Cg = Konzentration des an die Antikörper 10P gebundenen β_H-Endorphin (1-31) [und (^{125}I) β_H-Endorphin (1-31)]

Cf = Konzentration des freien, nicht an die Antikörper 10P gebundenen β_H-Endorphin (1-31) [und (^{125}I) β_H-Endorphin (1-31)]

Auch hier wurden unterschiedliche Werte für K_D und B_{max} in den verschiedenen Assaysystemen für die Interaktionen zwischen dem C-terminalen Antikörper 10P und β_H-Endorphin (1-31) bestimmt.

5.4.2.2. Vergleich der K_D- und B_{max}-Werte aus verschiedenen Assaysystemen

In Tab. 5.9. und 5.10. sind die Bindungsparameter K_D und B_{max} der Interaktionen von β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26) mit ihren jeweiligen C-terminalen Antikörpern dargestellt. Zu beachten ist, daß im Rahmen des SPOS-RIA die Peptid-Antikörper-Interaktion an einer Oberfläche unbekannter Dimension stattfindet [Butler et al., 1992]. Die im SPOS-RIA bestimmten K_D- und B_{max}-Werte gelten deshalb nur für die gewählten Versuchsbedingungen (Inkubationsvolumen, Geometrie des Gefäßes, Blockung, Pufferlösungen etc.). Um eine Vergleichbarkeit der bestimmten K_D- und B_{max}-Werte aus den verschiedenen Assaysystemen (FPOS-RIA, SPOS-RIA, FPIOS-RIA) zu ermöglichen, wurden die K_D- und B_{max}-Werte aus FPOS- und FPIOS-RIA auf „10^{-15} mol/ml“ extrapoliert. Die Beschichtungsoberfläche im SPOS-RIA betrug bei einem Volumen der Beschichtungslösung von 1 ml 4,775 cm^2.

gereinigtes Antiserum, RIA-Typ, β_H-Endorphin (1-31), (1-27) oder (1-26) (n = Anzahl der Experimente)	TS (EXCEL/ORIGIN)		TVK (EXCEL/ORIGIN)		TVK (LIGAND)
	K_D1	K_D2	K_D1	K_D2	K_D
10P, FPOS-RIA, (1-31), (n = 1)	19,40	1550,01	15,0	2100,65	1400,41
10P, SPOS-RIA, (1-31), (n = 1)	42,67	836,15	7,17	28000,89	-
10P, FPIOS-RIA, (1-31), (n = 2)	-	-	49,60	94.20	85,83
67P, FPIOS-RIA, (1-27), (n = 2)	-	-	712,08	12200,47	3200,55
63P, FPIOS-RIA, (1-26), (n = 2)	-	-	264,10	4940,91	3990,38

Tab. 5.9.: K_D-Werte für die Interaktion von β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26) mit den gereinigten Antiseren 10P, 67P und 63P (Angaben in 10^{-15} mol/ml)
(TS = Ergebnisse aus Tracersättigungsexperimenten,
TVK= Ergebnisse aus Tracerverdrängungsexperimenten)

KD-Werte:

In der Tab. 5.9. sind die K_D-Werte für die verschiedenen Assaysysteme, ermittelt durch Tracersättigungs- und Tracerverdrängungsexperimente und unterschiedliche Auswertungsverfahren, aufgeführt.

Bei Auswertung durch das Computerprogramm LIGAND wies der Antikörper 10P im FPIOS-RIA für die Interaktion mit β_H-Endorphin (1-31) den niedrigsten K_D-Wert und damit die höchste Affinität zu dem Peptid auf.

Die niedrigsten K_D-Werte beim Vergleich aller aufgeführten Assaysysteme und Auswertungsverfahren ergaben sich jedoch für den Antikörper 10P im SPOS-RIA und FPOS-RIA bei Erhebung der Bindungsdaten in Tracerverdrängungsexperimenten und deren Auswertung mit Hilfe von EXCEL / ORIGIN.
Bei einem Vergleich der verschiedenen Auswertungsverfahren der Tracersättigungs- und Tracerverdrängungsexperimente ergab sich, daß die in den Tracersättigungsexperimenten bestimmten K_D-Werte höher waren als die in den Tracerverdrängungsexperimenten (EXCEL / ORIGIN) bestimmten K_D-Werte. Das Computerprogramm LIGAND berechnete in allen Fällen nur eine K_D für eine Bindungsstelle; ihr Wert lag, verglichen mit der Auswertung der Tracerverdrängungsexperimente über EXCEL / ORIGIN jeweils zwischen den beiden mit EXCEL / ORIGIN bestimmten K_D-Werten.

gereinigtes Antiserum, RIA-Typ, β_H-Endorphin (1-31), (1-27) oder (1-26)	TS (EXCEL/ORIGIN)		TV (EXCEL/ORIGIN)		TV (LIGAND)
(n = Anzahl der Experimente)	$B_{max}1$	$B_{max}2$	$B_{max}1$	$B_{max}2$	B_{max}
10P, FPOS-RIA, (1-31), (n = 1)	119	3950	109	4260	2780
10P, SPOS-RIA, (1-31), (n = 1)	23	164	41	677	-
10P, FPIOS-RIA, (1-31), (n = 2)	-	-	274	3020	2630
67P, FPIOS-RIA, (1-27), (n = 2)	-	-	53	499	128
63P, FPIOS-RIA, (1-26), (n = 2)	-	-	105	1750	1250

Tab. 5.10.: B_{max}-Werte für die verschiedenen RIA-Typen (Angaben in 10^{-15} mol/ml).
(TS = Tracersättigungsexperiment, TVK = Tracerverdrängungsexperiment)

B_{max}-Werte:
In der Tab. 5.10. sind die B_{max}-Werte für die verschiedenen RIA-Systeme, ermittelt durch Tracersättigungs- und Tracerverdrängungsexperimente sowie unterschiedliche Auswertungsverfahren, aufgeführt. Vergleicht man die verschiedenen RIA-Typen durchgeführt mit dem gereinigten Antiserum 10P bei Auswertung der Tracerverdrängungsexperimente mit Hilfe von EXCEL / ORIGIN untereinander, ergibt sich für den SPOS-RIA die geringste Menge an Bindungsstellen im System; die Bestimmung der B_{max} aus den Bindungsdaten des Tracersättigungsexperiments ergab jedoch für den Fall des SPOS-RIA eine noch geringere Bindungsstellenkonzentration. Die Bindungsstellenkonzentrationen, die aus Tracerverdrängungsexperimenten bestimmt und mit dem Computerprogramm LIGAND ausgewertet wurden lagen jeweils zwischen den über EXCEL / ORIGIN ermittelten Werten für B_{max1} und B_{max2}.
Ein Vergleich der Bindungsstellenkonzentrationen der FPIOS-RIAs (bei Bestimmung aus Tracerverdrängungsexperimenten und Auswertung mit EXCEL / ORIGIN) ergab

für den FPIOS-RIA mit dem gereinigten Antiserum 10P die höchste Konzentration an Bindungsstellen.
Der Vergleich der B_{max}-Werte zeigte für den SPOS-RIA die niedrigste Bindungskapazität; dies war kompatibel mit der Erfahrung, daß bei der Beschichtung von Oberfläche im Rahmen von solid-phase-RIA-Prozeduren viel Antikörper verloren geht.

5.5. Untersuchungen zu Vorkommen und Biosynthese von β_H-Endorphin (1-31) in Blutleukozyten

Durch Präparation von Buffy coats und Stimulation der hieraus gewonnenen Leukozyten des peripheren Blutes mit Interleukin-1β (Il-1β) und CRF (siehe 4.5.) sollte der Versuch gemacht werden, β_H-Endorphin (1-31) aus diesen Zellen freizusetzen. Nach Trennung der stimulierten Zellsuspensionen in Überstände und Zellsedimente wurden diese auf ihren Gehalt an authentischem β_H-Endorphin (1-31) geprüft. Hierfür wurden die neuentwickelten und charakterisierten Nachweismethoden, der SPTS-RIA und der FPITS-RIA, zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-31) eingesetzt.

5.5.1. Periphere mononukleare Blutzellen (PBMC)

Inkubationsart: Periphere mononukleare Blutzellen (PBMC) wurden aus Präparationen von Buffy coats gewonnen. Diese wurden wie unter 4.5.2. beschrieben mit Il-1β und CRF stimuliert. In den Stimulationsversuchen (Nr. 1 – 4, siehe 4.5.2.1.) wurden zwei verschiedene Inkubationsarten (Begasungsbrutschrank und Schüttelwasserbad) ausgetestet. Bei der Inkubation der Stimulationsansätze Nr. 1, 2 und 4 im Schüttelwasserbad ging ein Teil des Inkubationsvolumens durch Verdunstung verloren. Die Zellsuspensionen wurden in diesem Fall nicht weiterverarbeitet.
Die Inkubation im Begasungsbrutschrank für 3 h bei 37° C unter sterilen Bedingungen führte zu keinem Verlust des Inkubationsvolumens. Alle Stimulationsansätze konnten in Überstände und Zellsedimente aufgetrennt und die betreffenden Proben weiterverarbeitet werden.

Zellkonzentration und Zellvitalität:
Die Konzentration der Zellen zu Beginn der Stimulationsversuche war vorgegeben und lag bei 10^6 - 10^7 Zellen pro 1 ml Kulturmedium. Die Zellvitalität wurde vor und während der Stimulationsversuche überprüft.
Tab. 5.11. gibt eine Übersicht über die Zellvitalität vor und während der Versuche. Soweit aufgrund der geringen Versuchsanzahl festzulegen, betrug der Verlust an Zellen unter den vorgegebenen Versuchsbedingungen ca. 7 - 20 %:

Zeitpunkt der Bestimmung der Zellvitalität	Zellvitalität (%)		
vor Stimulationsbeginn	67 - 99		
	Zellen ohne Stimulation	Zellen stimuliert mit 10^{-5} M Il-1β	Zellen stimuliert mit 10^{-5} M CRF
1 h nach Stimulationsbeginn	79 - 92	76 - 90	74 - 93
½ h vor Stimulationsende	63 - 75	60 - 70	53 - 80

Tab. 5.11.: Bestimmung der Zellvitalität vor und während den Stimulationsversuchen (Angaben in Prozent der insgesamt vorhandenen Zellen im Ansatz)

Überprüfung der stimulierten peripheren mononuklearen Blutzellen (PBMC) auf ihren Gehalt an authentischem β_H-Endorphin (1-31)
Die Überstände und Zellsedimente aus den Stimulationsversuchen wurden auf ihren Gehalt an β_H-Endorphin (1-31) hin überprüft, indem zum einen die Überstände als Proben in den SPTS-RIA (Ersatz von 500 µl Puffer C durch 500 µl Probe) und in den FPITS-RIA (Ersatz von 150 µl Puffer C durch 150 µl Probe) eingebracht wurden; zum anderen wurden die Zellsedimente nach Durchführung einer Extraktion als Proben (gelöst in 150 µl Puffer C) in den FPITS-RIA eingebracht. Es wurden Standardkurven mit β_H-Endorphin (1-31) sowohl in Puffer C als auch in den entsprechenden, bei den Stimulationsversuchen verwendeten Kulturmedien mitgeführt. Es handelte sich hierbei jeweils um einmalig durchgeführte Experimente zu Testzwecken, um die Anwendbarkeit der Methode zu überprüfen (Pilot-Experimente). Das Ergebnis dieser Experimente zeigte, daß in mit dem FPITS-RIA untersuchten Überständen von mit Il-1β und CRF stimulierten PBMC kein authentisches β_H-Endorphin (1-31) nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 5.29 und Abb. 5.30). Die Untersuchung o.g. Überstände im SPTS-RIA erbrachte das gleiche Resultat (Ergebnisse nicht dargestellt). Dies entsprach den Ergebnissen von Woudenberg et al. (1992).
Die Untersuchung von Zellextrakten eines Stimulationsversuches unter Einsatz des FPITS-RIA ergab mit Abnahme der Konzentration an Il-1β von 10^{-5} bis 10^{-9} einen Anstieg des Gehaltes an β_H-Endorphin (1-31) in den untersuchten Proben. In Proben

aus CRF-Stimulationsansätzen fand sich der niedrigste Wert bei Stimulation mit CRF in 10^{-7} M Konzentration (siehe Abb. 5.31 und Abb. 5.32). Es muß jedoch nochmals betont werden, daß es sich um Ergebnisse einer Pilot-Studie handelt.

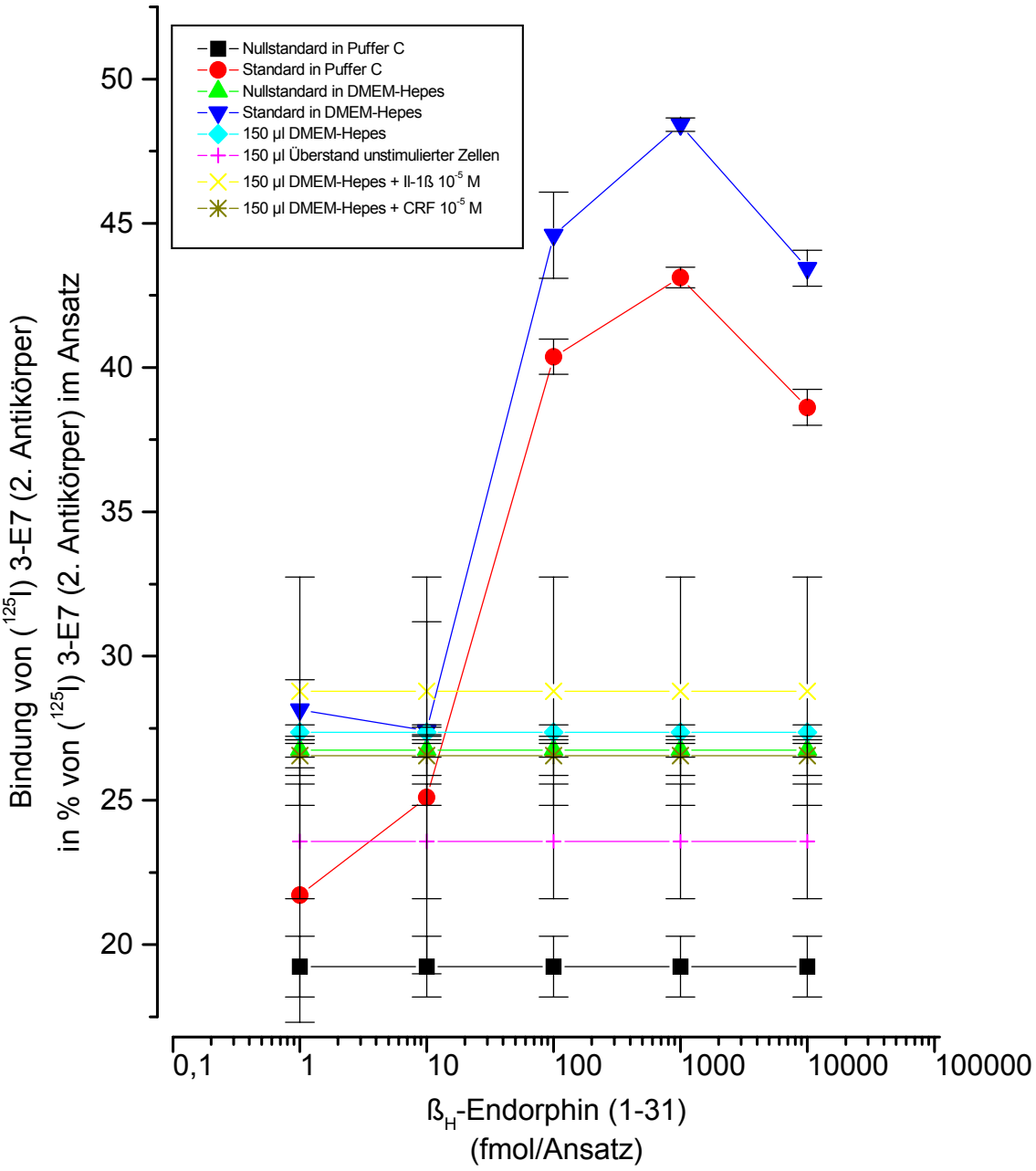


Abb. 5.29.: Bestimmung von β_H-Endorphin (1-31) in Pufferlösungen und Kontrollmedien im FPITS-RIA: Standardkurven und Kontrollwerte.
(Bindung von (^{125}I) 3-E7 in Abhängigkeit von der Konzentration an β_H-Endorphin (1-31) in Puffer C bzw. DMEM-Hepes; MW $\pm$ s aus Doppelwerten eines Experiments).

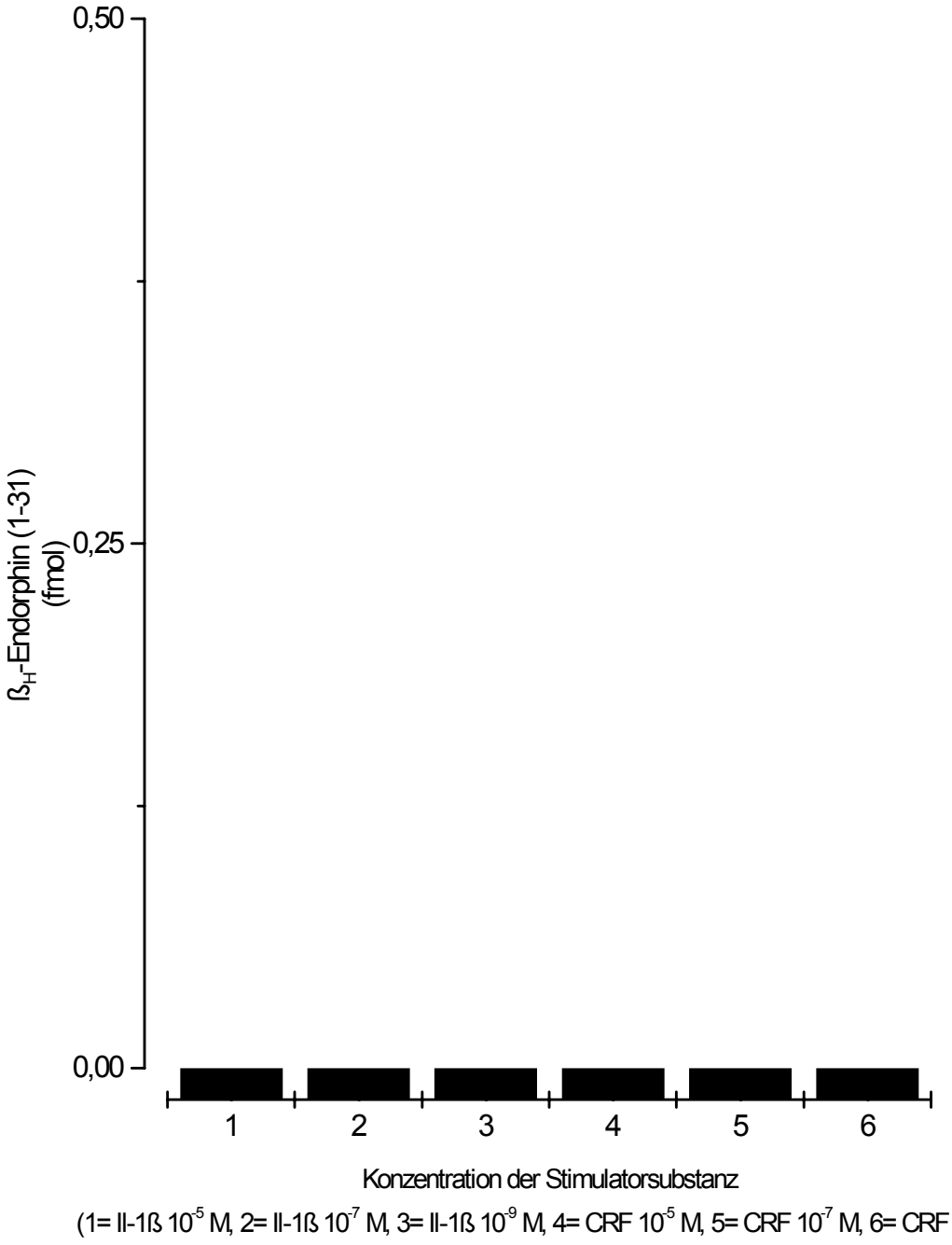


Abb. 5.30.: Bestimmung von β_H-Endorphin (1-31) im Überstand von mit Il-1β und CRF stimulierten PBMC im FPITS-RIA: Werte aus Stimulationsansätzen.
Ableitung der Menge an β_H-Endorphin (1-31) in fmol pro untersuchter Probe (150 μl) aus der Standardkurve (DMEM-Hepes) in Abb. 5.29. Versuch unter Einsatz verschiedener Konzentrationen der Stimulationssubstanzen.

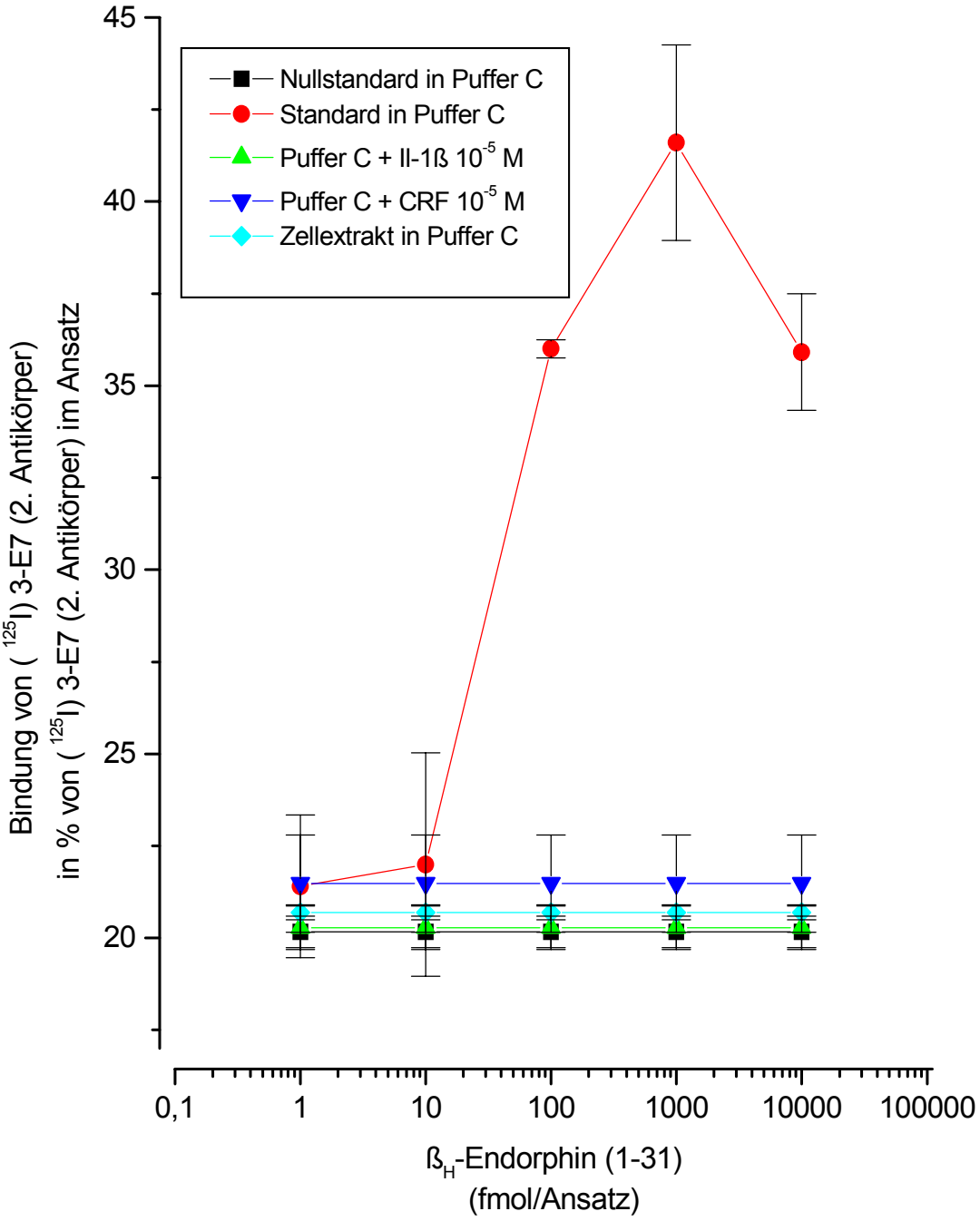


Abb. 5.31.: Bestimmung von β_H-Endorphin (1-31) in Puffer C im FPITS-RIA: Standardkurve und Kontrollwerte.
(Bindung von (^{125}I) 3-E7 in Abhängigkeit von der Konzentration an β_H-Endorphin (1-31) in Puffer C; MW ± s aus Doppelwerten eines Experiments).

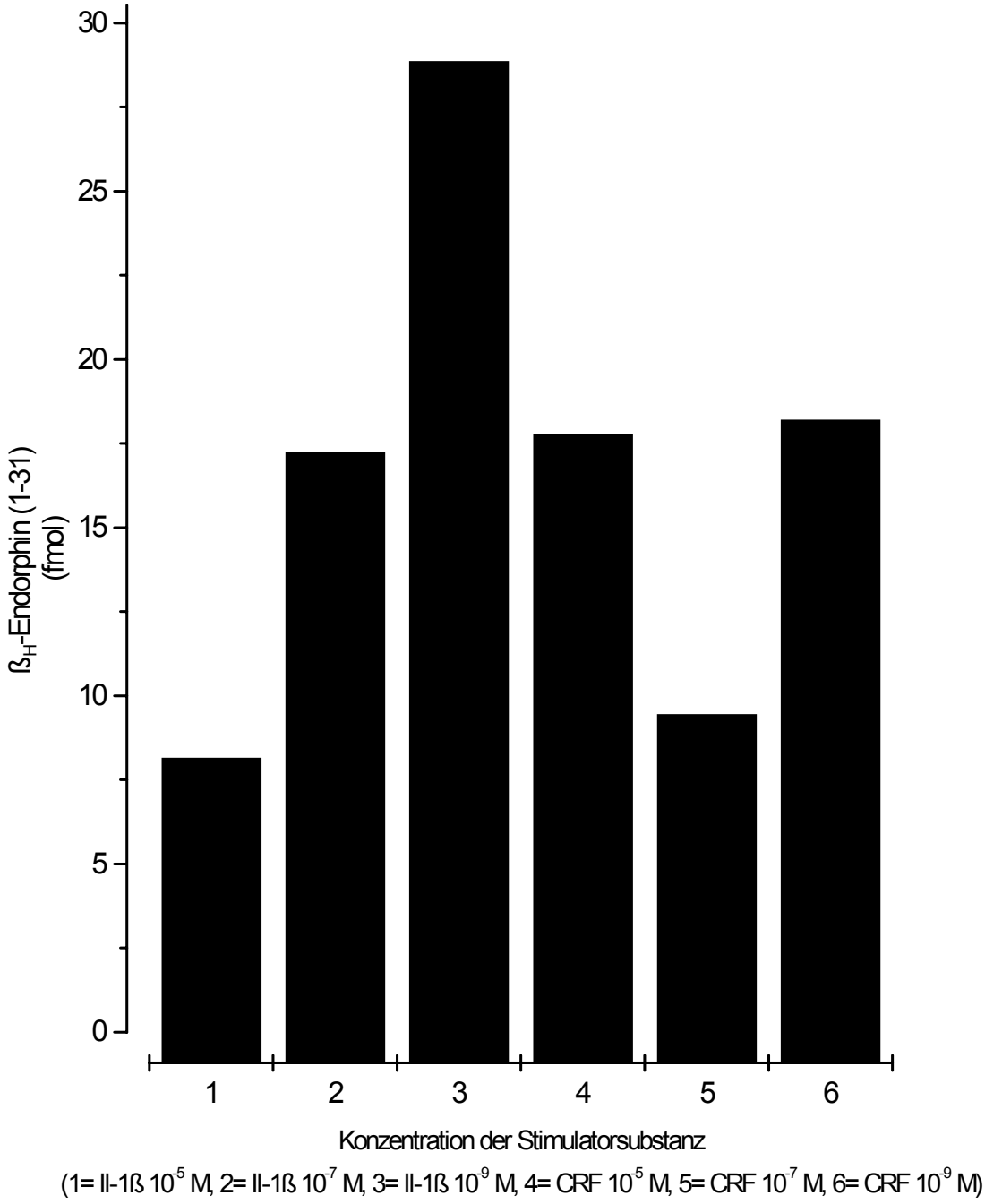


Abb. 5.32.: Bestimmung von β_H-Endorphin (1-31) in Zellextrakten von mit Il-1β und CRF stimulierten PBMC im FPITS-RIA: Werte aus Stimulationsansätzen.
Ableitung der Menge an β_H-Endorphin (1-31) in fmol pro untersuchter Probe (150 μl) aus der Standardkurve (Puffer C) in Abb. 5.31. Versuch unter Einsatz verschiedener Konzentrationen der Stimulationssubstanzen; Darstellung der Werte in Form eines Säulendiagramms.

5.5.2. Lymphozyten und Monozyten

Stimulationsversuche wurden mit Lymphozyten-, Monozyten- und Lymphozyten-Monozyten-Zellsuspensionen durchgeführt. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Il-1β und CRF (10^{-5} M - 10^{-9} M) unter vorgegebenen Versuchsbedingungen (siehe 4.5.2.) inkubiert. Die Bestimmung der Zellvitalität wurde vor Beginn des Stimulationsversuches durchgeführt. Für die Lymphozyten-präparation ergab sich eine Zellkonzentration von 10^6 / ml und eine Zellvitalität von 81 %, für die Monozytenpräparation eine Zellkonzentration von etwa 120 000 / ml und Zellvitalität von 98 %. Die Lymphozyten-Monozyten-Zellsuspension wurde im Verhältnis 8 : 1 (physiologisches Verhältnis) angesetzt. Alle Stimulationsansätze konnten in Überstände und Zellsedimente aufgetrennt und die betreffenden Proben weiterverarbeitet werden.

Überprüfung der stimulierten Lymphozyten und Monozyten auf ihren Gehalt an authentischem β_H-Endorphin (1- 31)

Die Überstände wurden im FPITS-RIA auf ihren Gehalt an authentischem β_H-Endorphin (1-31) überprüft (Ersatz von 150 µl Puffer C durch 150 µl Probe).

Standardkurven mit β_H-Endorphin (1- 31) in Puffer C und in Kulturmedium DMEM-Hepes wurden zur Bestimmung der Konzentration von β_H-Endorphin (1-31) mitgeführt.

In den Überständen stimulierter Lymphozyten bzw. Monozyten konnte kein authentisches β_H-Endorphin (1-31) nachgewiesen werden. Geringe Mengen an authentischem β_H-Endorphin (1-31) wurden in den Überständen von mit Il-1β 10^{-9} M und CRF 10^{-5} M stimulierten Lymphozyten-Monozyten-Zellgemischen gefunden (Ergebnisse nicht dargestellt). Auch hier handelte es sich um einmalig durchgeführte Experimente zur Überprüfung der Anwendbarkeit der Methodik. Die Bestätigung dieser Ergebnisse ist Gegenstand weiterführender Untersuchungen.

6. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden ein Solid-Phase-One-Site-Radioimmunoassay (SPOS-RIA) zum Nachweis von β_H-Endorphin (28-31) immunoreaktivem Material, ein Solid-Phase-Two-Site-Radioimmunoassay (SPTS-RIA) zum Nachweis von authentischem β_H-Endorphin (1-31) sowie Fluid-Phase-Immunoprecipitation-Two-Site-Radioimmunoassays (FPITS-RIAs) zum Nachweis von authentischem β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26) entwickelt und charakterisiert.
Der Entwicklung o.g. RIAs lag Folgendes zugrunde:

1. Nach Durchsicht der Literatur existierten nur wenige Verfahren auf der Basis eines TWO-Site-Assays für den Nachweis von β_H-Endorphin (1-31) und anderer β-Endorphin-Derivate (Fragmente) (s. 1.3.5.2.).
2. Es existieren mit Ausnahme der von Scholl (1995) entwickelten RIAs keine weiteren Verfahren für den Nachweis von authentischem β_H-Endorphin (1-31).
3. Es existieren mit Ausnahme der von Scholl (1995) entwickelten RIAs insbesondere keine weiteren Verfahren für den Nachweis von authentischem β_H-Endorphin (1-27) und (1-26).

6.1. Antikörper

6.1.1. Polyclonale Antiseren

Polyclonale Antiseren gegen die C-Termini von β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26):
Antikörper gerichtet gegen die C-Termini von β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26) lagen in Form polyclonaler Antiseren vor. Die polyclonalen Antiseren wurden durch Immunisierung von Kaninchen mit den C-terminalen Fragmenten der Peptide gewonnen. Der Erfolg der Immunisierung der Versuchstiere wurde durch Bestimmung der Antikörpertiter im Serum überprüft. Polyclonale Antiseren enthalten mehrere Antikörperpopulationen gerichtet gegen verschiedene Epitope der vorgegebenen Antigene.
Serumbestandteile, die sich störend auf die Beschichtung einer festen Phase mit den Antikörpern der polyclonalen Antiseren auswirken konnten, wurden durch die Protein A-Sepharose-Reinigung weitestgehend eliminiert. Es handelte sich hierbei um eine verlustarme Reinigungsmethode, durch welche die IgG-Fraktion der Kaninchen-antiseren isoliert wurde [Rott et al., 1991].

Polyclonale Antiseren gegen die C-Termini von β_H-Endorphin (1-17) und (1-16):
Polyclonale Antiseren gegen die C-Termini von β_H-Endorphin (1-17) und (1-16) sollten im Rahmen dieser Arbeit durch Immunisierung von Kaninchen nach der unter

4.1.1. beschriebenen Methode hergestellt werden. Durch Bestimmung der Antikörpertiter im Serum wurde der Erfolg der Immunisierung überprüft. Die Antikörpertiterbestimmungen ergaben trotz mehrfacher Boosterungen keinen Antikörpertiteranstieg, so daß weitere Immunisierungen nicht durchgeführt wurden. Der fehlende Antikörpertiteranstieg beruht sicherlich darauf, daß die verwendeten Pentapeptide trotz Koppelung an Thyroglobulin eine zu geringe immunogene Eigenschaft besaßen, so daß das Immunsystem der Kaninchen diese nicht als Antigen erkannte. Die geringe immunogene Eigenschaft könnte darauf beruhen, daß das verwendete Antigen-Molekül an sich zu klein war, um als „fremd“ eingestuft zu werden bzw. die Aminosäuresequenz der Pentapeptide dem Immunsystem der Kaninchen bekannt war.

6.1.2. Monoclonaler Antikörper

Der von Gramsch Laboratories freundlicherweise zur Verfügung gestellte Antikörper (3-E7), gerichtet gegen den N-Terminus von β-Endorphin, war monoclonal, d.h. gegen ein Epitop des Antigens gerichtet, und durch Protein A-Sepharose gereinigt. Seine Charakteristika wurden von Gramsch et al. (1983) beschrieben. Durch Einsatz des monoclonalen Antikörpers in TWO-Site-RIAs in Kombination mit gereinigten polyclonalen Antiseren war die Entwicklung von hochspezifischen Nachweismethoden für β_H-Endorphin möglich.

6.2. Entwickelte Nachweismethoden

6.2.1. Solid-Phase-ONE-Site-Radioimmunoassay (SPOS-RIA) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (28-31) immunoreaktivem Material

Es wurde ein Solid-Phase-One-Site-Radioimmunoassay mit einem Inkubationsvolumen von 1 ml zur Bestimmung von β_H-Endorphin (28-31) immunoreaktivem Material entwickelt. Desweiteren wurden Versuche durchgeführt, welche zur Entwicklung von Solid-Phase-ONE-Site-Radioimmunoassays zur Bestimmung von β_H-Endorphin (24-27) und (23-26) immunoreaktivem Material führen sollten.

Material der festen Phase:

Für die Antikörperadsorption mußte als feste Phase ein geeignetes Material ausgewählt werden. Ergebnisse der Arbeit von Scholl (1995) zeigten, daß die gereinigten polyclonalen Antiseren gerichtet gegen die C-Termini von β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26) besser an Maxisorp-Mikrotiterplatten aus Polystyrol als an Polysorp-Platten banden, da durch ein Zusammenspiel von hydrophilen und hydrophoben Wechselwirkungen eine feste Bindung zwischen fester Phase und Antikörper erreicht wird [Esser, 1988]. Aufgrund dessen wurden Maxisorp-Röhrchen aus Polystyrol (4 ml) für die Methodenentwicklung verwendet.

Reinigung der polyclonalen Antiseren:

Um die polyclonalen Antiseren für die Beschichtung der festen Phase einsetzen zu können, mußten durch ein geeignetes Reinigungsverfahren Serumbestandteile aller Art entfernt werden. Als antikörperverlustarme Methode erwies sich die Reinigung mit Protein A-Sepharose [Scholl, 1995], mit welcher die IgG-Fraktion der Antiseren isoliert wurde. Die Antigen-spezifische Affinitätschromatographie als alternative Methode wurde aufgrund ihrer hohen Antikörperverluste nicht gewählt.

Wahl des Festphasen-Antikörpers:

Für die Entwicklung von Solid-Phase-One-Site-Radioimmunoassays standen die gegen den C-Terminus von β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26) gerichteten gereinigten polyclonalen Antiseren 10P, 67P, 63P und 62P zur Verfügung. Im Hinblick auf die Weiterentwicklung des One-Site-Assay zum Two-Site-Assay, in dem ein zweiter signalgebender Antikörper zum Einsatz kommt, wurden die gereinigten polyclonalen Antiseren für die Beschichtung der festen Phase verwendet, gemäß der Forderung, daß der Festphasen-Antikörper eine höhere Affinität zu dem Liganden besitzen soll als der zweite Antikörper [Porstmann et al. 1992] und polyclonale Antikörper häufig eine höhere Affinität aufweisen als monoclonale Antikörper [Schwarz et al., 1985]. Ein weiterer Vorteil der Immobilisierung des C-terminalen Antikörpers im Two-Site-Assay beruhte darauf, daß im Gegensatz zum N-terminalen Antikörper nicht alle Opioidpeptide gebunden wurden (gleicher N-Terminus für alle Opioidpeptide), sondern nur diejenigen, die das zu erkennende Epitop besitzen. Dies erhöhte die Wahrscheinlichkeit des authentischen Nachweises. Des weiteren lag der C-terminale Antikörper im Gegensatz zum N-terminalen monoclonalen Antikörper in größeren Mengen vor.

Auch hätte man bei Absorption des N-terminalen, monoclonalen Antikörpers an die feste Phase mit einer stärkeren Denaturierung des Antikörpers im Vergleich zu polyclonalen Antikörpern rechnen müssen [Butler et al., 1992].

Pufferlösung zur Antikörperbeschichtung:

Für die Beschichtung von Polystyroloberflächen wird im allgemeinen ein pH-Wert von 9,6 (pH-Wert über dem isoelektrischen Punkt des Proteins) und ein Karbonatpuffer ($<$ 0,1M) empfohlen [Løvberg, 1984; Nunc Produktinformation, 1989; Chard, 1990].

Die Tatsache, daß eine Beschichtung bei einem pH-Wert von 9,6 bevorzugt wird, könnte an der besseren Präsentation des IgG mit dem Fc-Abschnitt des Moleküls gegenüber der festen Phase liegen [Sorensen und Brodbeck, 1986]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf Untersuchungen zu Veränderungen des pH-Wertes bei der Beschichtung der festen Phase verzichtet, nachdem durch Scholl (1995) gezeigt worden war, daß eine Veränderung nicht zu einer Steigerung der Antikörper-absorption an die Polystyroloberfläche führte. Es wurde ein pH-Wert von 9,6 für die Beschichtung gewählt.

Antikörperkonzentration für die Beschichtung der festen Phase:

Die Konzentration des gereinigten C-terminalen Antiserums 10P für die Beschichtung der Polystyrol-Röhrchen bei einem Beschichtungslösungsvolumen von 1 ml wurde durch Erstellung sogenannter „Binder-Verdünnungskurven“ ermittelt. Es ergab sich für die Beschichtung der festen Phase im SPOS-RIA mit o.g. Antiserum eine Konzentration von 20 μg in 1 ml Beschichtungslösung, das entspricht 4,19 μg pro cm^2 beschichteter Oberfläche (beschichtete Oberfläche = 4,775 cm^2). Nach Esser (1988) können durchschnittlich 0,4 μg Protein pro cm^2 gebunden werden. Die Konzentration, die für die Sättigung der beschichteten Oberfläche benötigt wird, soll aus dieser Zahl (0,4 μg) multipliziert mit dem Flächen-Volumen-Verhältnis (cm^2/cm^3) berechnet werden können [Esser, 1988]. Für ein Beschichtungsvolumen von 1 ml müßten hierfür 1,91 μg Protein (0,4 μg x 4,775) pro 1 ml eingesetzt werden.

Der Unterschied zwischen tatsächlich eingesetzter (20 μg/ml) und zur Sättigung der Beschichtungsoberfläche empfohlener Konzentration (1,91 μg/ml) an gereinigtem polyclonalem Antiserum läßt sich durch die Art der Reinigung und damit dem Gehalt an spezifischem Antikörper erklären. Durch die Protein A-Sepharose-Reinigung wird die IgG-Fraktion eines Versuchstieres gewonnen, innerhalb derer sich sowohl spezifisch gegen das Antigen gerichtete Antikörper als auch nicht gegen das zu bestimmende Antigen gerichtete Antikörper befinden. Könnten diese verschiedenen Antikörper-Anteile durch ein geeignetes Verfahren (z.B. die Antigen-spezifische Affinitätschromatographie) voneinander getrennt werden, könnte der spezifisch gegen das zu bestimmende Antigen gerichtete Antikörper in einer höheren Konzentration eingesetzt werden bei geringer werdender Gesamtprotein-Konzentration. Nach Porstmann et al. (1992) soll die Antikörperkonzentration 10 μg/ml IgG nicht überschreiten, da sich ab einer Konzentration von 1 $\mu g/cm^2$ instabile Zwei- und Mehrfachlagen des Immunglobulins aufgrund der limitierten Kapazität der festen Phase für die Bindung von Protein bilden. Trotz dieser Überlegungen mußte für die Beschichtung der Röhrchen-Wände zur Entwicklung und Durchführung des SPOS-RIA eine höhere Konzentration an gereinigtem polyclonalen Antiserum 10P verwendet werden.

Mögliche Erklärungen hierfür sind:

1. Geringe Affinität des Antikörpers zu seinem Antigen.
2. Ein zu geringer Anteil des spezifischen Antikörpers am Gesamt-IgG.
3. Konformationsänderung des Antikörpers und eine daraus folgende Verminderung der Affinität zu seinem Antigen durch ungünstige Versuchsbedingungen (Temperatur, Dauer, pH-Wert).
4. Durch Adsorption des Antikörpers an die feste Phase bedingte Konformationsveränderung und hierdurch bedingte Verminderung der Affinität zu seinem Antigen.

In verschiedenen Arbeiten konnte bestätigt werden, daß o.g. Punkte ursächlich für die benötigten hohen Antikörperkonzentrationen verantwortlich sind [Butler et al., 1992; Scholl, 1995]. Insbesondere konnte gezeigt werden, daß die Verluste an spezifischem Antikörper durch den Beschichtungsvorgang an der Polystyrol-Oberfläche (Verluste durch Nicht-Adsorption oder Verluste der Antikörperaktivität) bis zu 99 % betragen können [Scholl, 1995].

Die Beschichtung der Polystyrol-Röhrchen mit den gereinigten polyclonalen Antiseren 66P und 67P zum Nachweis von β_H-Endorphin (24-27) immunoreaktivem Material und den Antiseren 62P und 63P zum Nachweis von β_H-Endorphin (23-26) immunoreaktivem Material bei einem Beschichtungslösungsvolumen von 1 ml gelang im Rahmen dieser Arbeit nicht. Als Ursache sind sicherlich u.a. oben genannte Gründe (Punkt 1 - 4) zu nennen; eine Untersuchung hierzu erfolgte jedoch nicht. Da es im Rahmen einer früheren Arbeit [Scholl, 1995] gelungen war, Polystyrol-Oberflächen (d.h. Maxisorp-Microtiterplatten) mit oben genannten Antiseren in einem Beschichtungslösungsvolumen von 50 und 200 µl zu beschichten, lag die Überlegung nahe, dies auf die Beschichtung der Polystyrol-Röhrchen zu übertragen und das Beschichtungslösungsvolumen von 1 ml auf 50 µl pro Röhrchen zu reduzieren, in der Annahme, daß durch eine Erhöhung des Konzentrationsdrucks eine bessere Adsorption an die feste Phase erzielt werden könnte. Die Ergebnisse zeigten jedoch keine höheren Bindungswerte, so daß weitere Untersuchungen diesbezüglich eingestellt wurden.

Dauer der Beschichtung:

Abhängig von den unterschiedlichen Voraussetzungen variieren die Angaben zur Dauer des Beschichtungsvorgangs zwischen einer Stunde und einem Tag [Uotila et al., 1981; Helenius et al., 1986]. Sicher ist, daß die Dauer der Beschichtung genauso wichtig ist für die Adsorption der Antikörper an die feste Phase [Catt et al., 1970] wie die Antikörperkonzentration. Gewählt wurde eine Beschichtungsdauer von zwei Stunden, nachdem gezeigt wurde, daß sich nach dieser Zeit ein Gleichgewicht zwischen Adsorption und Desorption eingestellt hatte [Scholl, 1995].

Blockung der unspezifischen Bindung des eingesetzten Tracers (radioaktiv markiertes Peptid):

Die unspezifische Bindung eines Tracers ist die Bindung des Tracers, die nicht auf Antigen-Antikörper-Interaktionen zurückzuführen ist. Ein Maß für die unspezifische Bindung ist im SPOS-RIA der Blank-Wert. Dieser setzt sich nach Chard (1990) aus folgenden Komponenten zusammen:

1. Geräteleerwert („back ground counts“).
2. Bindung von Tracer in dem Antigen-Antikörper-Komplex.
3. Unreinheiten des Tracers (z.B. ^{125}I).

4. Adsorption von Tracer z.B. an die Röhrchen-Wand, an das Blockungsmittel oder den Festphasen-Antikörper.
5. Inkomplette Trennung von nicht gebundenem und gebundenem Tracer.

Der Blank-Wert wurde durch Messung der Radioaktivität in Abwesenheit des spezifischen Binders (Antikörper) und des nicht-radioaktiv markierten Antigens (Standard) bestimmt. Um die unspezifische Bindung des radioaktiv markierten Antigens an die Polystyrol-Oberfläche zu verringern, wurde versucht, die freien Bindungsstellen der festen Phase mit Blockungsmitteln zu besetzen. Hierfür wurden verschiedene Blockungssubstanzen ausgetestet (s. 5.2.1.1.). Die Blockungssubstanz BSA (1 % ig in PBS-Puffer) reduzierte im Vergleich mit allen anderen ausgetesteten Substanzen den Blank-Wert am deutlichsten.

Beschichtungsmechanik:

Alle Beschichtungs-, Blockungs- und Inkubationsvorgänge wurden unter ständiger Bewegung der Proben durchgeführt. Die Bindung des radioaktiv markierten Peptids war bei bewegten Proben höher als bei unbewegten. Dies ist sicherlich bei dem relativ großen Probenvolumen von 1 ml auf den Effekt der gleichmäßigeren Durchmischung alle Komponenten zurückzuführen. Alleinige Diffusion der Reaktionspartner in einer ruhenden Probe bedeutet wohl in einer Probe von 1 ml einen zu großen Weg um eine optimale Interaktion von Antikörper und Antigen in einer angemessenen Zeit zu erreichen.

Nachteile des SPOS-RIA:

a. Nach den theoretischen Überlegungen von Esser (1988) zur Sättigung einer Beschichtungsoberfläche mit Protein wären zur Beschichtung der Röhrchen-Wand bei einem Beschichtungsvolumen von 1 ml nur 1,91 μg Protein erforderlich. Tatsächlich mußten 20 μg gereinigtes polyclonales Antiserum 10P eingesetzt werden, um die Entwicklung des Solid-Phase-One-Site-RIA zu ermöglichen. Um geringere Mengen an gereinigtem polyclonalen Antiserum verwenden zu können, müßten wahrscheinlich spezifischere Reinigungsmethoden verwendet werden, wie z.B. die Antigen-spezifische Affinitätschromatographie, durch die der spezifisch gegen das Antigen gerichteten Antikörper in einer höheren Konzentration gewonnen und eingesetzt werden könnte. Auch die Gewinnung bzw. Herstellung von Antiseren (Antikörper) mit einer höheren Antigen-Affinität sowie die Verbesserung der Antigen-Affinität der Antikörper durch Veränderung von Versuchsbedingungen (Temperatur, Dauer, pH-Wert) können zu einer Reduktion der benötigten Antikörper-Menge beitragen.
b. Die Bestimmung der Kreuzreaktivitäten im Solid-Phase-One-Site-RIA ergab eine Kreuzreaktivität von über 100 % mit N-Acetyl-β_H-Endorphin (1-31) und von 0,3 % mit β_H-Endorphin (27-31). Dies beruhte auf dem Prinzip des Assays, ein One-Site-

Assay, welcher durch Einsatz nur eines Antikörpers zum Nachweis des Antigens β_H-Endorphin (1-31) führen sollte. Da der Antikörper 10P jedoch den C-Terminus von β_H-Endorphin (1-31) erkennt und bindet, wurden alle ausgetesteten Peptide, die eben diesen C-Terminus besaßen, nachgewiesen. Dies ist logisch und im Rahmen des Solid-One-Site-Assay nicht zu vermeiden. Da es sich hierdurch nicht um einen hochspezifischen Assay zum alleinigen Nachweis von β_H-Endorphin (1-31) handelte, mußte vom Nachweis von β_H-Endorphin (28-31) immunoreaktivem Material gesprochen werden. Aussagen über das genaue Vorkommen von β_H-Endorphin (1-31) in einer unbekannten Probe waren mit dem SPOS-RIA nicht möglich. Hierzu bedarf es der Weiterentwicklung zum Solid-Phase-Two-Site-RIA.

Vorteile des SPOS-RIA:

Als ein Vorteil des SPOS-RIA muß die einfachere Trennung von gebundenen und freien Reaktionspartnern sowie die Möglichkeit der Automatisierung von Wasch- und Absaugvorgängen gesehen werden.

6.2.2. Solid-Phase-TWO-Site-Radioimmunoassay (SPTS-RIA) zur Bestimmung von authentischem β_H-Endorphin (1-31)

Die Weiterentwicklung des SPOS-RIA für den Nachweis von β_H-Endorphin (28-31) immunoreaktivem Material zum SPTS-RIA bedeutete eine Erhöhung der Spezifität des RIAs bedingt durch die Kombination der Selektivität von zwei verschiedenen Antikörpern (polyclonales Antiserum 10P gerichtet gegen den C-Terminus von β_H-Endorphin (1-31) und monoclonaler Antikörper 3-E7 gerichtet gegen den N-Terminus von β_H-Endorphin). Durch die Kombination der Selektivität beider Antikörper bildeten sich bei Hinzugabe von Antigen (β_H-Endorphin 1-31) sogenannte Sandwichkomplexe aus. Hierdurch entstand ein hochselektiver Assay, welcher nachgewiesen durch die Bestimmung der Kreuzreaktivitäten, nur β_H-Endorphin (1-31) erfaßte. Selbst strukturell eng verwandte Peptide, wie z.B. N-Acetyl-β_H-Endorphin (1-31), β_H-Endorphin (1-27) und (1-26) wurden nur mit einer Wahrscheinlichkeit von < 0.01 % erfaßt (s. Tab. 5.7). Man kann somit vom Nachweis von authentischem β_H-Endorphin (1-31) sprechen. Ein vergleichbarer Two-Site-Assay wurde durch Pasi et al. (1992) entwickelt, es fehlen hier jedoch genaue Angaben zur Kreuzreaktivität, so daß die Spezifität dieses Assays nicht zu beurteilen ist (siehe Tab. 1.1.).

Der entscheidende Fortschritt bei der Entwicklung des SPTS-RIA bedeutete der Einsatz des monoclonalen Antikörpers 3-E7, welcher nach Interaktion des Antigens mit dem an die feste Phase adsorbierten Antikörper die für Opioidpeptide typische N-terminale Aminosäuresequenz Tyr-Gly-Gly-Phe erkannte und hieran band. Durch seine radioaktive Markierung wurde er zum Signalgeber.

Die Charakterisierung des hochspezifischen SPTS-RIA zum Nachweis von β_H-Endorphin (1-31) zeigte im Vergleich zum SPOS-RIA einen Verlust an Sensitivität. Die Nachweisgrenze des SPOS-RIA lag bei 26,0 fmol, diejenige des SPTS-RIA lag bei 38,7 fmol pro Ansatz, d.h. der SPTS-RIA hatte an Empfindlichkeit eingebüßt. Auf mögliche Gründe hierfür wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter eingegangen.

Nachteile des SPTS-RIA:

a. Der Verlust an Antikörpern bei der Beschichtung der festen Phase mit gereinigtem polyclonalem Antiserum ist wie auch im Rahmen des SPOS-RIA ein Problem. Da polyclonale Antiseren nicht unbegrenzt zur Verfügung stehen und immer wieder durch Neuimmunisierung von Versuchstieren hergestellt werden müssen, sollte die Produktion und Anwendung von unbegrenzt zur Verfügung stehenden monoclonalen Festphasen-Antikörpern in Betracht gezogen werden.
b. Weitere Nachteile stellen das Auftreten von verdeckter Kreuzreaktivität und Interferenz durch Antikörper-bindende Substanzen bei der Untersuchung von biologischem Material dar [Boscato et al., 1986]. Verdeckte Kreuzreaktivität tritt im SPTS-RIA auf, wenn eine Substanz nur an einen von beiden Antikörper bindet ohne von dem zweiten Antikörper erkannt zu werden. Damit entsteht zwar kein meßbares Signal, da kein Sandwichkomplex gebildet wurde, sie führt aber zu einem Verlust der Antikörper, welche dann für eine Bindung mit dem eigentlich nachzuweisenden Peptid nicht mehr zur Verfügung stehen. Interferenzen, definiert als Hemmung eines biologischen Vorgangs durch einen gleichzeitigen anderen, nehmen ebenfalls Einfluß auf SPTS-RIAs, indem sogenannte exogene und endogen Interferenzen auftreten können [Pesce und Michael, 1992]. Exogene Interferenzen beeinflussen den Assay bevor dieser durchgeführt wird und beruhen z.B. auf Einflüssen durch Probengewinnung, -aufbereitung und -aufbewahrung. Diese Einflüsse können durch sorgfältige Versuchsdurchführung und -planung sowie Optimierung der Assays so weit als möglich minimiert werden. Endogene Interferenzen werden u.a. durch Komplement [Käpyaho et al., 1989], kreuzreagierende Substanzen und Antikörper gegen das Analysat verursacht. Ihre Aufdeckung und Beseitigung ist schwierig.

Vorteile des SPTS-RIA:

a. Durch den SPTS-RIA wurden außer dem Peptid β_H-Endorphin (1-31) keine weiteren relevanten Peptide erfaßt (siehe Kreuzreaktivitäten Tab. 5.7), d.h. der Assay ist hochspezifisch für den Nachweis von β_H-Endorphin (1-31). Ein Vergleich mit den bisher in der vorhandenen Literatur beschriebenen Assays ergab, daß es neben dem von Scholl (1995) entwickelten Assay keinen weiteren Two-Site-Assay gibt, soweit angegeben, welcher ebenfalls nur β_H-Endorphin (1-31) erfaßt.

b. Durch die Verwendung von Polystyrol-Röhrchen mit einem maximalen Inkubationsvolumen von 980 µl besteht die Möglichkeit größere Probenvolumina zu untersuchen als in Mikrotiterplatten [Pasi et al., 1992, Inkubationsvolumen 200 µl; Scholl, 1995, Inkubationsvolumen 50 µl].
c. Ebenso wie bei der Durchführung des SPOS-RIA besteht die Möglichkeit der Automatisierung von Wasch- und Absaugvorgängen.

6.2.3. Fluid-Phase-Immunoprecipitation-TWO-Site-Radioimmunoassays (FPITS-RIAs) zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26)

Es gelang die Entwicklung von hochspezifischen Nachweismethoden für die Bestimmung von authentischem β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26) mit Hilfe von Fluid-Phase-Immunoprecipitation-Two-Site-Radioimmunoassays. Die Entwicklung von Flüssigphasenassays bot im Vergleich zum SPTS-RIA die Möglichkeit, eine bestimmte Mengen an gereinigtem polyclonalem Antiserum einzusetzen ohne mit Antikörperverlusten durch Beschichtungsvorgänge an eine feste Phase rechnen zu müssen. Die Antikörper sind in flüssiger Phase für eine Bindung mit dem Antigen frei zugänglich, ohne Zwang an eine feste Phase zu binden und ohne den damit eventuell verbundenen Nachteil sterischer Veränderungen der Molekülkonformation. In welcher Konformation die Antikörper jedoch in Lösung vorliegen ist unklar. In Lösung sind auch Bindungen der nachzuweisenden Substanz (des Antigens) an andere Stellen des Antikörpers, z.B. Fc-Teil und damit Kettenbildung vorstellbar.
Die entwickelten Fluid-Phase-Immunoprecipitation-Two-Site-RIAs stellen hochspezifische Bestimmungsmethoden zum Nachweis von authentischem β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26) dar. Die kombinierte Selektivität der verwendeten C- und N-terminalen Antikörper ermöglicht durch Bildung von Sandwichkomplexen den spezifischen Nachweis o.g. Peptide. Durch Bestimmung der Kreuzreaktivitäten der einzelnen Assays konnte dies bestätigt werden, wobei jedoch folgendes zu berücksichtigen ist: Die Kreuzreaktivität aller drei entwickelten FPITS-RIAs wurde durch Einsatz von verschiedenen Peptiden in unterschiedlichen Konzentrationen (siehe Tab. 4.3. und 5.7.) bestimmt. Hierbei wurden zum einen Peptide, bei denen eine Kreuzreaktivität zu erwarten war, in unterschiedlich hohen Konzentrationen (1-2 000 000 fmol), zum anderen Peptide mit einer geringen Wahrscheinlichkeit für eine Kreuzreaktivität nur durch eine extrem hohe Konzentration (Extremwert = 1 000 000 fmol) überprüft.
a. Für die Bestimmung der Kreuzreaktivität des FPITS-RIA zum Nachweis von β_H-Endorphin (1-31) gilt, daß alle untersuchten Peptide schon im SPOS-RIA quantifiziert und hieraus für den SPTS-RIA und den FPITS-RIA abgeleitet wurden. Im SPTS-RIA zum Nachweis von β_H-Endorphin (1-31) konnten keine Kreuzreakti-

vitäten außer mit β_H-Endorphin (1-31) nachgewiesen werden, sei es im Rahmen von Standardkurven-Untersuchungen (1 - 2 000 000 fmol) oder als Extremwert-Untersuchung (1 000 000 fmol). Dies wurde auch durch Scholl (1995) bestätigt.

b. Die Bestimmung der Kreuzreaktivität des FPITS-RIA zum Nachweis von β_H-Endorphin (1-26) ergab ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit, daß mit den untersuchten Peptiden (Standardkurven- und Extremwert-Untersuchungen) keine Kreuzreaktivitäten vorlagen. Dies konnte jedoch nicht aus vorangehenden Untersuchungen wie im Falle des FPITS-RIA zum Nachweis von β_H-Endorphin (1-31) abgeleitet werden, Vergleiche mit Scholl (1995) sichern jedoch die Ergebnisse bezüglich der Kreuzreaktivitäten ab.

c. Für den FPITS-RIA zum Nachweis von β_H-Endorphin (1-27) ergab sich in Abb. 5.20. eine wahrscheinliche Kreuzreaktivität mit N-Acetyl-β_H-Endorphin (1-27) im Rahmen einer Standardkurven-Untersuchung. Da der Antikörper 3-E7 normalerweise den acetylierten N-Terminus der β-Endorphine nicht erkennt, stellt sich hier die Frage, ob die Kreuzreaktivität streuungsbedingt zustande kam oder hookverdächtig ist. Am ehesten handelt es sich wohl um eine Kontamination der Probe mit β_H-Endorphin (1-27). Auch hier können die Kreuzreaktivitäten nicht aus vorangehenden Untersuchungen (s.o.) abgeleitet werden, d.h. eine Quantifizierung ist wie beim FPITS-RIA zum Nachweis von β_H-Endorphin (1-31) nicht möglich, es konnte jedoch gezeigt werden, daß für die wichtigen relevanten Peptide keine Kreuzreaktivitäten vorlagen.

Fehlermöglichkeiten der FPITS-RIAs:

Ein Problem der Two-Site-RIAs konnte auch bei der Entwicklung der FPITS-RIAs festgestellt werden:

1. Der „high-dose-hook“-Effekt, der durch eine paradoxe Abnahme des Meßsignals bei sehr hohen Antigen(Peptid)-Konzentrationen gekennzeichnet ist [Ryall et al., 1982; Chard, 1990]. Im Überschuß vorhandenes Antigen sättigt die Bindungsstellen des 1. Antikörpers (polyclonales Antiserum) ab. An dieses Antigen bindet der radioaktiv markierte monoclonale Antikörper (2. Antikörper, Menge im System konstant). Zusätzlich bindet der radioaktiv markierte monoclonale Antikörper an das noch ungebundene Antigen. Je größer die Menge an ungebundenem Antigen ist, um so größer ist die Menge an radioaktiv markiertem Antikörper gebunden an dieses Antigen. Bei der nachfolgenden Trennung von 1.Antikörper-Antigen-2.Antikörper-Komplexen von allen anderen Bestandteilen wird der Antigen-2.Antikörper-Komplex entfernt und es resultiert abhängig von der Menge der zusätzlich gebildeten Antigen-2.Antikörper-Komplexe ein vermindertes Meßsignal. Voraussetzung hierfür ist die gleichzeitige Inkubation von Antigen und 2. Antikörper. Die Verdünnung hoher Probenkonzentrationen erlaubt jedoch eine

Korrektur falsch negativer Ergebnisse, wie sie im Falle des „high-dose-hook"-Effektes zu erwarten sind.
2. Weitere Nachteile der FPITS-RIAs stellen die verdeckte Kreuzreaktivität und Interferenz durch Antikörper-bindende Substanzen dar [Boscato et al., 1986], welche auch auf den SPTS-RIA zutrafen und dort beschrieben sind.

Vergleich FPITS-RIA und SPTS-RIA zum Nachweis von β_H-Endorphin (1-31):

1. Nachweisgrenze: Die Nachweisgrenze des SPTS-RIA lag bei 38,7 fmol pro Ansatz, die Nachweisgrenze des FPITS-RIA lag bei 7,5 fmol pro Ansatz. Der FPITS-RIA besaß somit die höhere Empfindlichkeit. Eine Erklärung hierfür könnte die höhere Menge an C-terminalem Antikörper 10P im System sein, da im Rahmen des Flüssigphasen-Assay es im Vergleich zum Festphasen-Assay zu keinerlei Antikörperverlusten durch Beschichtungs- und Waschvorgänge kam. Somit stand die insgesamt eingesetzte Menge an 1. Antikörper ohne Verluste zur Interaktion mit allen weiteren Assay-Komponenten zur Verfügung.
2. Kreuzreaktivitäten: Beide Assays zeigten bezüglich der untersuchten Peptide die gleichen Kreuzreaktivitäten, d.h. es wurde durch beide Assays nur β_H-Endorphin (1-31) erfaßt und somit hochspezifisch nachgewiesen.
3. Probenvolumina: Die Untersuchung größerer Probenvolumina ist nur im SPTS-RIA möglich (maximal 980 µl Probe), da der FPTS-RIA lediglich ein maximales Probenvolumen von 150 µl zur Verfügung stellt.

6.3. Bindungsparameter K_D und B_{max} der Interaktionen zwischen β_H-Endorphin (1-31), (1-27) bzw. (1-26) und den an ihren C-Termini angreifenden Antikörpern in verschiedenen Assaysystemen

6.3.1. Spezifische Aktivitäten der radioaktiv markierten Peptide (Tracer)

Die in den entwickelten Assays als Signalgeber (Tracer) dienenden Peptide wurden mit ^{125}I radioaktiv markiert. Es ist bekannt, daß die Jod-Atome hierbei an die aromatische Seitenkette der Aminosäure Tyrosin und zu geringen Anteilen auch an Histidin und Phenylalanin binden [Chard, 1990]. β_H-Endorphin (1-31) und (1-27) besitzen in Position 1 und 27 jeweils einen Tyrosinrest und in Position 4 und 18 jeweils einen Phenylalaninrest. β_H-Endorphin (1-26) besitzt in Position 1 einen Tyrosin- und in Position 4 und 18 zwei Phenylalaninreste. Die Aminosäure Histidin ist kein Bestandteil der Aminosäuresequenzen der drei Peptide. Somit besitzen β_H-Endorphin (1-31) und (1-27) jeweils zwei Tyrosin- und Phenylalanin-Moleküle, β_H-Endorphin (1-26) besitzt nur drei Jodbindungsstellen. Die spezifischen Aktivitäten der Tracer wurden nach einem von Dias und Reichert (1982) beschriebenen Verfahren bestimmt (siehe 4.4.2.). Die höchste spezifische Aktivität der Peptid-Tracer wurde für

(^{125}I) β_H-Endorphin (1-26) bestimmt. Dies konnte z.B. an der sterischen Konfiguration des β_H-Endorphin (1-27)-Moleküls liegen, welche die Jodierung des C- oder N-terminalen Tyrosinrestes gegebenenfalls behinderte. Die im Rahmen dieser Arbeit bestimmten spezifischen Aktivitäten widersprachen den Ergebnissen von Scholl (1995). Von Scholl wurde die höchste spezifische Aktivität für (^{125}I) β_H-Endorphin (1-31), die niedrigste für (^{125}I) β_H-Endorphin (1-26) bestimmt und ein Hinweis dafür abgeleitet, daß der Tyrosinrest in Position 27 eher jodiert wurde als in Position 1. Dies konnte anhand der Ergebnisse der Bestimmung der spezifischen Aktivitäten im Rahmen dieser Arbeit nicht nachvollzogen werden.
Die Bestimmung der spezifischen Aktivitäten der verwendeten Tracer war Voraussetzung für die Berechnung der K_D- und B_{max}-Werte.

6.3.2. Bestimmung von K_D und B_{max} für die verschiedenen Assaysysteme

Die K_D- und B_{max}-Werte der Interaktionen zwischen β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26) und den an ihren C-Termini angreifenden Antikörpern wurden in der vorliegenden Arbeit mit zwei verschiedenen Methoden bestimmt.

1. Zum einen wurden die K_D- und B_{max}-Werte mit Hilfe eines iterativen Kurvenanpassungsprogramms (LIGAND) unter Berücksichtigung statistischer Signifikanzen bestimmt.
2. Zum anderen wurden Scatchard-Diagramme mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms EXCEL und mit dem technisch-wissenschaftlichen Zeichenprogramm ORIGIN erstellt und K_D und B_{max} aus von Hand an die erkennbaren Kurvenverläufe angelegten Tangenten ohne Berücksichtigung statistischer Signifikanzen abgeleitet.

Da die verwendeten Antikörper 10P, 67P und 63P aus polyclonalen Antiseren stammen, wurde vermutet, daß für mindestens zwei Bindungsparameter die K_D-Werte bestimmt werden könnten. Mit der Methode EXCEL / ORIGIN war die Bestimmung der K_D-Werte von zwei Bindungsstellen für alle Peptid-Antikörper-Interaktionen möglich. Hieraus wurde geschlossen, daß durch letztere Methode ein Bereich angegeben werden konnte, in dem die K_D-Werte der Bindungsstellen des polyclonalen Antiserums lagen. Durch das Computerprogramm LIGAND wurde unter Zuhilfenahme von statistischen Signifikanzen ein Wert berechnet, dessen Streubereich sich mit jenem Bereich decken könnte.
Ein Vergleich mit den durch EXCEL / ORIGIN bestimmten K_D-Wert-Bereichen für zwei Bindungsstellen zeigte, daß sich die durch LIGAND berechneten K_D-Werte innerhalb dieser Wertebereiche befanden (siehe Tab. 5.9.).
Hieraus wurde geschlossen, daß die Bestimmungsmethode mit Hilfe von EXCEL / ORIGIN eine zulässige und einfache Methode zur Bestimmung eines K_D-Wert-Bereiches einer Peptid-Antikörper-Interaktion darstellte. Durch sie konnten auch aus

Bindungsdaten von Tracersättigungsexperimenten die Parameter K_D und B_{max} berechnet und mit den Werten aus Tracerverdrängungsexperimenten verglichen werden. Damit war es möglich, Änderungen der Affinität des Antikörpers zu dem Antigen durch die radioaktive Markierung des Antigens zu erfassen (siehe Tab. 5.9).

6.3.3. K_D-Werte für die Interaktion zwischen β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26) und den an ihren C-Termini angreifenden Antikörpern 10P, 67P und 63P in den entwickelten Radioimmunoassays

Die Bestimmung der K_D-Werte der Interaktion zwischen Festphasen- bzw. Flüssigphasen-Antikörpern und den radioaktiv markierten Peptiden erfolgte, zum einen, um die Reaktionen an der festen Phase besser verstehen zu können, zum anderen war hierdurch ein Vergleich der entwickelten Radioimmunoassays anhand des Bindungsverhaltens möglich.

Vergleich der K_D-Werte:

Um die K_D-Werte der verschiedenen Assaysysteme miteinander vergleichen zu können, wurde eine Extrapolation der Ansatzvolumina der Flüssigphasen-Assays auf das Ansatzvolumen des SPOS-RIA (1 ml) durchgeführt, in der Annahme, daß die Reaktionsbedingungen innerhalb der Flüssigphasen-Assays bei entsprechender Anpassung der Mengen an ein anderes Volumen gleich bleiben. Die K_D-Werte wurden in der Einheit 10^{-15} mol/ml für alle entwickelten Assays angegeben.

a. Beim Vergleich der K_D-Werte (LIGAND) der entwickelten Assaysysteme fiel auf, daß mit dem Antikörper 10P der K_D-Wert für die Interaktion mit β_H-Endorphin (1-31) im FPITOS-RIA am niedrigsten, d.h. die Affinität am höchsten war. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß der K_D-Wert für die Interaktion zwischen β_H-Endorphin (1-31) und dem Antikörper 10P im SPOS-RIA durch das Computerprogramm LIGAND nicht berechnet wurde, da die gewonnenen Bindungsdaten durch das Computerprogramm nicht ausgewertet werden konnten. Die Gründe hierfür wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht, die Bindungsdaten wurden mit Hilfe von EXCEL / ORIGIN bestimmt. Ein Vergleich zwischen den K_D-Werten des SPOS-RIA und des FPIOS-RIA für die Interaktion von β_H-Endorphin (1-31) und dem Antikörper 10P war deshalb nur auf der Basis der Bestimmung mit EXCEL / ORIGIN möglich.
b. Ein Vergleich der K_D-Werte berechnet durch EXCEL/ORIGIN aus Daten von Tracerverdrängungsexperimenten (TVK) ergab für die spezifische Bindungsstelle (K_{D1}) für den Antikörper 10P in der Interaktion mit β_H-Endorphin (1-31) im SPOS-RIA den niedrigsten K_D-Wert und somit die höchste Affinität aller entwickelten Assays. Der Vergleich der K_D-Werte der Antikörper in der Reihenfolge 10P, 67P und 63P für ihre Interaktion mit ihren jeweiligen Peptiden im FPIOS-RIA ergab für diese Reihenfolge zunehmende K_D-Werte und somit abnehmende Affinitäten der

Antikörper, was durch die LIGAND-Berechnung bestätigt werden konnte. Der höchste K_D-Wert war hier für den Antikörper 67P im FPIOS-RIA berechnet worden. Dies könnte auf eine zu hohe Konzentration des Flüssigphasen-Antikörpers (im Vergleich zu den anderen Antikörpern 10P und 63P) und damit verbundene sterische Behinderung zurückzuführen sein. Die Affinität eines Antikörpers sinkt mit steigender Dichte im System [Pesce und Michael, 1992].

c. Es wurden sowohl im FPOS-RIA als auch im SPOS-RIA mit dem Antikörper 10P je ein Tracersättigungs- und ein Tracerverdrängungsexperiment durchgeführt. Die Bindungsparameter wurden miteinander verglichen und zeigten, daß neben der Bindung des Antikörpers an die feste Phase auch die radioaktive Markierung des Antigens den K_D-Wert der Peptid-Antikörper-Reaktion verändert. Wenn die Affinität eines Antikörpers zu dem entsprechenden radioaktiv markierten und nicht-radioaktiv markierten Antigen gleich sein soll, müßten auch die im Tracersättigungsexperiment (überwiegend radioaktiv markiertes Peptid) und Tracerverdrängungsexperiment (überwiegend nicht-radioaktiv markiertes Peptid) bestimmten K_D-Wert-Bereiche der Antigen-Antikörper-Interaktion gleich sein. Die aus Tracersättigungs- und Tracerverdrängungsexperimenten bestimmten K_D-Wert-Bereiche für den SPOS-RIA und FPOS-RIA zum Nachweis von β_H-Endorphin (28-31) immunoreaktivem Material konnten diese Vorstellung nicht eindeutig bestätigen (siehe Tab. 5.9.); vielmehr waren die K_{D1}-Werte aus Tracerverdrängungsexperimenten niedriger als diejenigen aus Tracersättigungsexperimenten, die K_{D2}-Werte aus Tracerverdrängungsexperimenten waren im Gegensatz dazu höher als diejenigen aus Tracersättigungsexperimenten. Das heißt, die K_D-Wert-Bereiche bestimmt im Tracersättigungsexperiment lagen innerhalb der K_D-Wert-Bereiche bestimmt im Tracerverdrängungsexperiment (sowohl für SPOS-RIA als auch FPOS-RIA). Da hier eine gewisse Übereinstimmung der K_D-Wert-Bereiche vorliegt, könnte o.g. Überlegung dennoch mit den hier bestimmten Werten bestätigt werden. Die von Scholl (1995) beobachtete Erhöhung der Affinität zum Antikörper durch radioaktive Markierung des Antigens konnte nicht bestätigt werden.

6.3.4. Bindungskapazitäten (B_{max}) der entwickelten Radioimmunoassays

Bei einem Vergleich der Konzentrationen an Bindungsstellen (B_{max}) in den verschiedenen Assaysystemen muß beachtet werden, daß die Peptid-Antikörper-Interaktionen in dem SPOS-RIA auf einer Oberfläche unbekannter Dimension stattfanden [Butler et al., 1992]. Trotzdem wurde, um eine Vergleichbarkeit der Assaysysteme untereinander zu erreichen, eine Extrapolation der Ansatzvolumina der Flüssigphasen-Assays auf das Ansatzvolumen des SPOS-RIA (1 ml) aus den unter 6.3.3. aufgeführten Überlegungen heraus durchgeführt. Die Konzentration der

Bindungsstellen wurde in der Einheit 10^{-15} mol/ml für alle entwickelten Assays angegeben.

Vergleich der B_{max}-Werte:

a. Der Vergleich der B_{max}-Werte der entwickelten Radioimmunoassays zeigte, daß die B_{max}-Werte der Flüssigphasen-Assays größer waren als die des SPOS-RIA. Es kam wohl im Rahmen der Beschichtung und bei nachfolgenden Wasch- und Inkubationsschritten im SPOS-RIA zu deutlichen Antikörperverlusten, die sich in einer Abnahme der Bindungskapazität widerspiegelten. Nach Berechnungen von Esser (1988) binden auf den Maxisorp-Oberflächen bis zu 400 ng Protein / cm^2. Die Berechnungen stützen sich auf Schätzungen der IgG-Größe (linsenförmiges Sphäroid mit einem Durchmesser von 15 nm und einer Dicke von 3 nm) und auf die Art und Weise, wie die IgG-Moleküle an die feste Oberfläche adsorbieren. Bei 150 000 g pro Mol IgG binden 2 667 fmol IgG pro cm^2 an die Polystyrol-Oberfläche. An diese 2 667 fmol IgG können wegen der Fähigkeit des IgG kein, ein oder zwei Antigenmoleküle zu binden maximal 5 334 fmol β_H-Endorphin (1-31) pro cm^2 gebunden werden. Die Beschichtungsoberfläche beträgt bei 1 ml Beschichtungsvolumen 4,775 cm^2. Dies bedeutet, daß im SPOS-RIA maximal 25 470 fmol β_H-Endorphin (1-31) gebunden werden könnten. Die hier bestimmten Bindungskapazitäten betrugen im SPOS-RIA 41 fmol pro 1 ml oder 9 fmol pro cm^2. Da nicht bekannt ist, ob ein Festphasen-Antikörper ein oder zwei Peptidmoleküle bindet, würden bei Bindung von einem Peptidmolekül 9 fmol Antikörper pro cm^2 Polystyrol-Oberfläche gebunden. Bindet jeder Antikörper zwei Peptidmoleküle, wären nur 4 - 5 fmol Antikörper pro cm^2 Polystyrol-Oberfläche gebunden. Diese Überlegungen deuten darauf hin, daß nur 0,1 - 0,3 % des an die Röhrchen-Oberfläche gebundenen Antikörpers spezifisch gegen β_H-Endorphin (1-31) gerichtete Antikörper darstellen. Anscheinend sind durch Nicht-Adsorption des IgG an die Polystyrol-Oberfläche und durch weitere Inkubations- und Waschschritte doch deutliche Antikörperverluste entstanden. Dies veranlaßt zu der Aussage, daß effektive Methoden zur Beschichtung eingesetzt werden müssen, um den Antikörperverlust zu verringern. Eine Erhöhung des Anteils an spezifischem Antikörper am Gesamt-IgG könnte durch Neuproduktion oder stärkere Reinigung der Antiseren erzielt werden und zu einer Erhöhung der Menge des an die feste Phase adsorbierten spezifischen Antikörpers führen.

b. Die Bindungskapazitäten der FPIOS-RIAs waren unterschiedlich. Trotz einer doppelt so hohen Menge an Antikörper 67P pro Reaktionsansatz (20 µg) (verglichen mit den Antikörpern 10P und 63P (jeweils 10 µg)) im FPIOS-RIA ergab sich für den Antikörper 67P der niedrigste B_{max}-Wert. Die höchste Bindungskapazität konnte für den Antikörper 10P im FPIOS-RIA bestimmt werden. Versucht man die unter a. aufgeführten Überlegungen auf die entwickelten FPIOS-RIAs zu

übertragen, muß beachtet werden, daß bei der Durchführung von FPIOS-RIAs Antikörperverluste durch Bindung an eine feste Phase und Waschschritte nicht entstehen. Das heißt, die eingesetzte Menge an Antikörper (IgG) bleibt zur Interaktion mit dem Peptid in voller Menge erhalten. Für den Antikörper 10P soll der Anteil an spezifischem Antikörper am eingesetzten Gesamt-IgG im FPIOS-RIA anhand der bestimmten Bindungskapazität nachvollzogen werden. Die eingesetzte Menge betrug 10 μg pro Reaktionsansatz (RA). Bei 150 000 g pro Mol IgG würden sich 66 667 fmol IgG im RA befinden. An diese 66 667 fmol IgG könnten wegen der Fähigkeit des IgG kein, ein oder zwei Antigenmoleküle zu binden, maximal 133 334 fmol β_H-Endorphin (1-31) gebunden werden. Die bestimmte Bindungskapazität (LIGAND) lag bei 2 630 fmol pro ml bzw. 632 fmol pro RA.

Für den Fall, daß ein Antikörper ein Peptidmolekül bindet, würden 632 fmol an spezifischem Antikörper sich im RA befinden; bindet jeder Antikörper zwei Peptidmoleküle, würden sich nur 316 fmol an spezifischem Antikörper im RA befinden. Trotz des fehlenden Antikörperverlustes würde dies bedeuten, daß nur 0,5 - 1 % des insgesamt eingesetzten IgG spezifisch gegen β_H-Endorphin (1-31) gerichtete Antikörper darstellten. Ein Prozentsatz, der nur wenig über dem Ergebnis der Berechnungen für den SPOS-RIA liegt. Dies bedeutet auch für den FPIOS-RIA, daß durch Neuproduktion oder bessere Reinigungsverfahren der Anteil an spezifischem Antikörper am Gesamt IgG erhöht werden muß.

6.4. Bestimmung von authentischem β_H-Endorphin (1-31) in Blutleukozyten

6.4.1. Wertung spezifischer und unspezifischer Nachweismethoden

Als gängige Nachweismethode für β_H-Endorphin (1-31) und seine Fragmente existiert der FPOS-RIA. Es handelt sich hierbei um eine etablierte Methode, welche jedoch deutliche Nachteile in sich birgt. Durch Verwendung eines einzelnen Antikörpers (polyclonales Antiserum), meist gerichtet gegen das mittlere Fragment des β-Endorphinmoleküls, war eine hohe Kreuzreaktivität mit Vorläufermolekülen und Peptidfragmenten sowie Peptiden mit ähnlicher Aminosäuresequenz zu erwarten. Das heißt, es gelang nie die Bestimmung eines einzelnen Peptids, sondern nur die Bestimmung eines undefinierten Peptidgemisches, weshalb dieser RIA-Typ keinerlei Aussagen über die Qualität des untersuchten Peptid-Gemisches oder darin enthaltener einzelner Bestandteile zuließ. Um die Spezifität der Assays zu erhöhen, wurde u.a. versucht, kreuzreagierende Substanzen durch verschiedene Extraktionsverfahren zu eliminieren. Dennoch gelang auch durch die Kombination von RIA und Extraktionsverfahren kein eindeutiger Nachweis des β_H-Endorphin (1-31)-Moleküls.

Aufgrund dessen wurde von immunoreaktivem β-Endorphin bzw. β-Endorphin-immunoreaktivem Material gesprochen. FPOS-RIAs ohne oder in Kombination mit Extraktionsverfahren zählen somit zu den unspezifischen Nachweismethoden. Ziel ist es jedoch, eine möglichst genaue Bestimmung von einzelnen Peptidmolekülen in einer zu untersuchenden Probe biologischen Materials (Plasma, Gewebe) durchführen zu können. Dies führte Ende der achtziger, Anfang der neunziger Jahre zur Entwicklung von sogenannten TWO-Site-RIAs. Durch Einsatz von zwei verschiedenen Antikörpern, gerichtet gegen unterschiedliche Epitope des nachzuweisenden Peptids, sollte eine möglichst genaue Bestimmung erreicht werden. Für den Nachweis von β_H-Endorphin (1-31) wurden C- und N-terminale Antikörper (teils polyclonal, teils monoclonal) verwendet, wobei einer von beiden Antikörpern an eine feste Phase gebunden wurde (Übersicht über die entwickelten Assays und ihre Charakteristika unter 1.3.5.2.). Die Signalgebung erfolgte entweder durch radioaktive Markierung oder enzymatische Reaktion. Die entwickelten TWO-Site-Assays sollten sich durch eine geringe Kreuzreaktivität und eine hohe Sensitivität auszeichnen. Bezüglich der Sensitivität waren der Literatur jedoch sehr unterschiedliche Nachweisgrenzen zu entnehmen (siehe Tab. 1.1.). Desgleichen sind auch die Informationen über vorliegende Kreuzreaktivitäten sehr unterschiedlich (relativ hohe Kreuzreaktivitäten mit unterschiedlichen Peptidvorläufern und Fragmenten, keine Angaben zur Kreuzreaktivität bis zu keine signifikanten Kreuzreaktivitäten); Fazit ist, daß es gelungen war, TWO-Site-RIAs zu entwickeln, die die Bestimmung von β-Endorphin ermöglichten, jedoch mit mehr oder weniger genauen Angaben zu deren Kreuzreaktivität. Aufgrund dessen handelt es sich bei diesen Nachweismethoden nicht um spezifische Methoden zum Nachweis von β_H-Endorphin (1-31). Nur mit den von Scholl (1995) entwickelten SPTS-RIAs zum Nachweis von β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26) ist bis jetzt eine eindeutige Differenzierung zwischen β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26) möglich gewesen.

Damit gehören diese RIAs durch genaue Angaben zur Spezifität und Nachweis einer sehr geringen Kreuzreaktivität ($< 0{,}1$ %) mit β-Endorphin-Fragmenten und -Vorläufern zu den spezifischen Nachweismethoden für β_H-Endorphin. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten TWO-Site-RIAs (SPTS-RIA zum Nachweis von β_H-Endorphin (1-31) und die FPITS-RIAs zum Nachweis von β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26)) sind ebenso wie die von Scholl (1995) entwickelten Assays in der Lage o.g. Peptide hochspezifisch mit einer sehr geringen Kreuzreaktivität nachzuweisen und unterscheiden sich so von den bis dahin verwendeten und auf dem Markt z.T. kommerziell erhältlichen Nachweismethoden für β-Endorphin (siehe Tab. 1.1.) erheblich.

Der FPITS-RIA zum Nachweis von β_H-Endorphin (1-31) wurde erstmals zur Untersuchung von Blutleukozyten auf ihren Gehalt an β_H-Endorphin (1-31) eingesetzt.

6.4.2. Einsatz des Fluid-Phase-Immunoprecipitation-Two-Site-Radio-immunoassay (FPITS-RIA) zur Bestimmung von authentischem β_H-Endorphin (1-31) in bisher durchgeführten Studien

6.4.2.1. Präparation von Buffy coats (BC)

Die Gewinnung von peripheren mononuklearen Blutzellen (PBMC) erfolgte durch Trennung der PBMC von Erythrozyten und Thrombozyten durch Anwendung der Dichte-Gradienten-Zentrifugation (siehe 4.5.1.1.). Hierdurch wurden vornehmlich Lymphozyten und zu einem geringen Anteil auch Monozyten gewonnen. Das Verfahren lehnte sich an das durch Bøyum (1976) beschriebene Verfahren an und wurde auch von anderen Arbeitsgruppen angewandt [van Woudenberg et al., 1992].
Die Gewinnung von Lymphozyten erfolgte durch Elimination der Monozyten. Die Gewinnung von Monozyten erfolgte aus frischen unverdünnten Buffy coats durch Anwendung der Dichte-Gradienten-Zentrifugation (siehe 4.5.1.2.).
Ein optimales Nährmedium für die Zellen wurde erreicht, indem die Zellen (PBMC) in ihrem natürlichen Medium (BC-Plasma) belassen wurden. Dieses wurde allerdings bei den weiteren Präparationsvorgängen durch Puffer bzw. Kulturmedium verdünnt. Durch die Präparation von PBMC wurde ein Zellgemisch gewonnen mit der Möglichkeit der Interaktion der Zellen untereinander mit Hilfe von eigenen (also nicht hinzugefügten) Mediatoren (z.B. Lymphokinen).
Im Falle der Stimulation reiner Lymphozyten- bzw. Monozytenpräparate konnte von einer Interaktion mit anderen Zellen nicht ausgegangen werden, jedoch bei der Inkubation und Stimulation eines definierten Verhältnisses von Lymphozyten und Monozyten als Zellgemisch.

6.4.2.2. Konzentration von authentischem β_H-Endorphin (1-31) in Buffy coat-Präparationen

1995 gelang Scholl durch Entwicklung von SPTS-RIAs mit den Antikörpern 10P, 66P und 63P der Nachweis von authentischem β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26) in BC-Präparationen. Die Stimulation von PBMC mit CRF und AVP führte im Rahmen dieser Untersuchung nicht zu einer Freisetzung von β_H-Endorphin (1-31). Unter Berücksichigung der Ergebnisse einer niederländischen Arbeitsgruppe [Kavelaars et al., 1989 und 1990b], die nachgewiesen hatte, daß durch Stimulation von PBMC mit CRF eine Il-1 vermittelte Ausschüttung von β-Endorphin aus B-Lymphozyten erfolgt (CRF stimulierte Il-1-Ausschüttung aus Monozyten) (siehe 1.3.6.), wurden sowohl PBMC als auch Lymphozyten, Monozyten und Lymphozyten-Monozyten-Zellgemische mit CRF und Il-1β stimuliert. Die Proben (Überstände und Zellextrakte) wurden zur Untersuchung auf authentisches β_H-Endorphin (1-31) in den SPTS- und

FPITS-RIA eingebracht. Die Ergebnisse hierzu sind unter 5.5.1. und 5.5.2. aufgeführt:

Zusammenfassung der Ergebnisse:

a. Authentisches β_H-Endorphin (1-31) konnte in Überständen von stimulierten PBMC **nicht** nachgewiesen werden. In Zellextrakten Il-1β-stimulierter PBMC wurde jedoch β_H-Endorphin (1-31) gefunden, wobei in einem Konzentrationsbereich von 10^{-9} bis 10^{-5} M Il-1β der Gehalt an β_H-Endorphin (1-31) umso höher war, je geringer die Il-1β-Konzentration war; bei Stimulation mit CRF waren trotz unterschiedlicher Konzentrationen an Stimulationssubstanz keine großen Unterschiede im β_H-Endorphin (1-31)-Gehalt in den untersuchten Proben nachzuweisen (siehe 5.5.1.).

b. Authentisches β_H-Endorphin (1-31) konnte **nicht** in Überständen stimulierter Lymphozyten bzw. Monozyten nachgewiesen werden. In den Überständen von Lymphozyten-Monozyten-Zellgemischen wurden jedoch geringe Mengen an β_H-Endorphin (1-31) gefunden (siehe 5.5.2.). Dieses Ergebnis würde durchaus in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Kavelaars et al. stehen (siehe 6.4.2.2.!).

   Daß andererseits nur geringe Mengen an β_H-Endorphin (1-31) nachgewiesen wurden, würde ebenso den Ergebnissen von van Woudenberg et al. (1992) entsprechen. Diese Arbeitsgruppe konnte zwar β-Endorphin-Immunoreaktivität in Extrakten von PBMC nachweisen, jedoch in nur sehr geringen Mengen (siehe 1.3.5.). Aufgrund dessen stellte sich die Frage, inwieweit die peripheren mononuklearen Blutzellen überhaupt in der Lage sind, POMC-abstammende Peptide zu synthetisieren und auszuschütten. Dieser Aspekt wurde durch van Woudenberg et al. (1991 und 1993) und andere Arbeitsgruppen [Oates et al., 1988; Buzetti et al., 1989] weiter untersucht. Sie wiesen POMCmRNA in peripheren mononuklearen Zellen des peripheren Blutes des Menschen nach, aber in nur sehr geringer Konzentration und nur nach Anwendung der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), so daß sie hieraus schlossen, daß das POMC-System der Lymphozyten keine bedeutende endokrine Rolle im Immunsystem des Menschen spielt.

   Träfe dieser Aspekt zu, hieße das, daß die PBMC, Lymphozyten oder Monozyten mit oder ohne Stimulation keine oder nur sehr geringe Mengen an β_H-Endorphin (1-31) synthetisieren würden und die verwendeten Methoden nicht sensitiv genug gewesen sein könnten, um β_H-Endorphin nachweisen zu können.

   Die Tatsache, daß kein bzw. nur geringe Mengen an β_H-Endorphin (1-31) unter den gegebenen Versuchsbedingungen nachgewiesen wurden, kann natürlich ebenso darauf zurückzuführen sein, daß die gewählten Versuchsbedingungen

nicht optimal waren und eine Optimierung der Versuchsbedingungen zu einer höheren Ausbeute an β_H-Endorphin (1-31) führen würde.

6.5. Bewertung des neuentwickelten FPITS-RIA zum Nachweis von β_H-Endorphin (1-31)

Es sei nochmals darauf verwiesen, daß es sich bei den oben diskutierten Stimulationsversuchen um Pilot-Experimente handelte, mit denen die Anwendbarkeit der Methodik überprüft werden sollte. Im Rahmen dieser Untersuchungen war das Ergebnis positiv.

Inzwischen konnte die Anwendbarkeit in mehreren Studien belegt werden. Die Methode des FPITS-RIA zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-31) wurde bereits in zwei Arbeiten publiziert (Harbach et al., 2000 und Schulz et al., 2000). Eine Reihe weiterer Publikationen ist in Vorbereitung.

Den unspezifischen radioimmunometrischen Methoden zur Bestimmung von β_H-Endorphin-immunoreaktivem Material (One site RIAs) oder auch den halb-spezifischen Two site RIAs mit der Begrenzung der Bestimmung auf wenige β_H-Endorphin-Derivate ist der entwickelte FPITS-RIA ohnehin überlegen. Die auf Extraktion und FPITS-RIA basierende Bestimmungsmethode leistet jedoch auch mehr als die spezifischen Methoden zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-31), bei denen radioimmunometrische Techniken (One site RIAs) mit chromatographischen Methoden kombiniert werden: Von einem Labor üblicher Ausstattung können erheblich mehr Proben innerhalb eines bestimmten Zeitraums analysiert werden.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Ausgangslage

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden viele Erkenntnisse über die Biosynthese, die Struktur, das Vorkommen und die Wirkung des Opioidpeptids β_H-Endorphin (1-31) gewonnen. Über die beiden β_H-Endorphin (1-31)-Fragmente β_H-Endorphin (1-27) und (1-26) ist jedoch wenig bekannt. Hinsichtlich der physiologischen Bedeutung von β_H-Endorphin (1-31) und seinen Fragmenten gibt es zwar Hinweise - insbesondere das Immunsystem betreffend. Trotz zahlreicher Untersuchungen konnten jedoch bis jetzt keine eindeutigen Beweise für eine immunologische Funktion erbracht werden.

Eine der Ursachen hierfür ist sicherlich methodischer Art. Auf der Suche nach der physiologischen Bedeutung des β-Endorphins wurde häufig nach Korrelationen bestimmter Stressoren mit den Konzentrationen des β-Endorphins im Plasma gesucht. Da β-Endorphin jedoch nicht spezifisch bestimmt werden konnte - oder allenfalls mit sehr aufwendigen Methoden und deshalb nur nur in kleinen Probenkontingenten - wurde in den meisten Studien „β-Endorphin-immunoreaktives Material“ bestimmt. Hierunter sind neben authentischem β-Endorphin, d.h. β-Endorphin (1-31), bis zu 10 β-Endorphin-Derivate zu verstehen. Da all diese Endorphine unterschiedliche Funktionen besitzen können, ist es erklärlich, daß Versuche zur Klärung ihrer Funktionen u.a. daran scheiterten, daß bei der o.g. Suche nach Korrelationen der „Korrelatparameter β-Endorphin-Konzentration“ nie eindeutig definiert war: Ein bestimmter Stressor wurde immer einem ganzen Bündel von β-Endorphinen zugeordnet.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, hochspezifische und hochempfindliche Nachweismethoden für die Bestimmung von authentischem β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26) zu entwickeln und diese probeweise zur Bestimmung der Opioidpeptide in Immunzellen des peripheren Blutes des Menschen einzusetzen. Hochspezifische Nachweismethoden für β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26) waren zwar von dieser Arbeitsgruppe bereits entwickelt worden (Scholl, 1995). Da hiermit jedoch nur kleine (50 µl) Probenvolumina verwertet werden konnten, erwiesen sich diese Methoden als nicht empfindlich genug und eine Nutzung zur β-Endorphin-Bestimmung, beispielsweise in Plasmaproben, war nicht möglich. Im Rahmen dieser Arbeit sollten nun hochspezifische Nachweismethoden entwickelt werden, die die Untersuchung größerer Probenvolumina zuließen. Es sollte dabei versucht werden, dieses Ziel sowohl auf dem Wege des Festphasen- als auch auf dem Wege des Flüssigphasen-Two-site-RIA zu erreichen.

Vorgehen und Ergebnisse:

Polyclonale Antiseren (Kaninchen), gerichtet gegen die C-Termini von β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26), lagen bereits vor. Die IgG-Fraktion der Antiseren wurde mit Hilfe von Protein A-Sepharose isoliert. Ein monoclonaler Antikörper (Maus) gerichtet gegen den N-Terminus der Opioidpeptide wurde zur Verfügung gestellt. Die polyclonalen Antiseren und der monoklonale Antikörper wurden einerseits teils zur Entwicklung von Festphasen-Assays (Solid-Phase-One-Site- und Solid-Phase-Two-Site-Radioimmunoassays) und andererseits zur Entwicklung von Flüssigphasen-Assays (Fluid-Phase-Immunoprecipitation-Two-Site-Radioimmunoassays) verwendet:

1. Es gelang die Entwicklung eines Solid-Phase-ONE-Site Radioimmunoassay (SPOS-RIA) zum Nachweis von β_H-Endorphin (28-31) immunoreaktivem Material und, darauf aufbauend, die Entwicklung eines Solid-Phase-TWO-Site-Radioimmunoassay (SPTS-RIA) zum Nachweis von authentischem β_H-Endorphin (1-31). Als Festphasen-Antikörper wurde in beiden RIAs ein polyclonales Antiserum, gerichtet gegen den C-Terminus von β_H-Endorphin (1-31), verwendet. Als Signalgeber (Tracer) diente im SPOS-RIA das radioaktiv markierte Peptid β_H-Endorphin (1-31); für den SPTS-RIA wurde der gegen den N-Terminus der Opioidpeptide gerichtete monoclonale Antikörper radioaktiv markiert. Der SPOS-RIA und der SPTS-RIA wurden charakterisiert. Wie sich bei Bestimmung der Kreuzreaktivitäten zeigte, erwies sich der SPTS-RIA als hochspezifische Nachweismethode: Nur das Peptid β_H-Endorphin (1-31) wurde erkannt. Das Inkubationsvolumen von 980 µl ermöglichte die Untersuchung größerer Probenvolumina als bei Scholl (1995).
2. Es gelang die Entwicklung von Fluid-Phase-Immunoprecipitation-TWO-Site-Radioimmunoassays (FPITS-RIAs) zum Nachweis von authentischem β_H-Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26). Das „Sandwich-Prinzip“ des Assay beruhte auf der gemeinsamen Inkubation eines polyclonalen Antiserums (gerichtet gegen den C-Terminus von β_H-Endorphin (1-31), bzw. (1-27) oder (1-26)) als 1. Antikörper und dem radioaktiv markierten, gegen den N-Terminus der Opioidpeptide gerichteten monoclonalen Antikörper, dem 2. Antikörper, sowie dem nachzuweisenden Peptid (in einer Standardlösung oder in einer unbekannten Probe. Durch Hinzufügen eines dritten Antikörpers, gerichtet gegen den 1. Antikörper („goat anti-rabbit IgG“), wurde in dem sich bildenden Immunpräzipitat der Komplex 1. Antikörper / Peptid / 2. Antikörper präzipitiert und mittels Zentrifugation von dem noch freien, radioaktiv markierten Antikörper getrennt. Die entwickelten FPITS-RIAs wurden charakterisiert. Anhand der Bestimmung der Kreuzreaktivitäten konnte nachgewiesen werden, daß es sich bei allen drei entwickelten Nachweismethoden um hochspezifische Assays handelte, welche jeweils nur die Peptide β_H-Endorphin (1-31), (1-27) bzw. (1-26) erfaßten. Ein Probenvolumen von

150 µl ermöglichte auch hier die Untersuchung größerer Probenvolumina als bei Scholl (1995).

Der Vergleich der Nachweisgrenze des SPTS-RIA mit der Nachweisgrenze des FPITS-RIA zur Bestimmung von authentischem β_H-Endorphin (1-31) zeigte, daß es sich bei dem FPITS-RIA um den deutlich empfindlicheren Assay handelte. Aufgrund dessen wurde er auf seine Anwendbarkeit im Rahmen dieser Arbeit geprüft und später in einer Reihe von Studien eingesetzt.

Um die Interaktion zwischen dem Festphasen-Antikörper (SPOS-RIA) bzw. den Flüssig-Phasen-Antikörpern (FPIOS-RIAs) und dem jeweiligen Peptid quantifizieren zu können, wurden mittels Scatchard-Analyse die Parameter K_D (als Maß für die Affinität der Peptide zu den betreffenden Antikörpern) und B_{max} (die Konzentration an Bindungsstellen) bestimmt. Anhand der K_D-Werte konnte nachgewiesen werden, daß die Affinität des β_H-Endorphin (1-31) zu dem am C-Terminus angreifenden Antikörper 10P im SPOS-RIA am höchsten war - vermutlich eine Folge der Fixierung des Antikörpers. Durch die Bestimmung der B_{max}-Werte konnte gezeigt werden, daß in den Fest-Phasen-Assays durch Beschichtungs- und Waschvorgänge große Antikörperverluste auftraten, was für die Flüssig-Phasen-Assays nicht zuzutreffen schien (Bestimmung von deutlich höheren Konzentrationen an Bindungsstellen im System). Des weiteren konnte festgestellt werden, daß nur ein geringer Anteil der an die feste Phase adsorbierten Antikörper des Antiserums 10P im SPOS-RIA und auch der frei in Lösung befindlichen Antikörper des Antiserums 10P im FPIOS-RIA spezifisch gegen β_H-Endorphin (1-31) gerichtet war.

Anwendung der neuentwickelten Nachweismethoden

Die neu entwickelten Methoden zum Nachweis von authentischem β_H-Endorphin (1-31) (SPTS-RIA und FPITS-RIA) wurden zur Untersuchung von unstimulierten und mit CRF und Il-1β stimulierten peripheren mononuklearen Zellen des menschlichen Blutes (PBMC) sowie von Lymphozyten- und Monozyten-Präparaten eingesetzt; nach Literaturangaben werden menschliche Immunzellen durch o.g. Stimulatoren zu einer Produktion von β_H-Endorphin (1-31) angeregt. Die gewonnenen Ergebnisse hierzu beruhen auf einmalig durchgeführten Experimenten und müssen deshalb als Vorläufer detaillierter Untersuchungen gewertet werden. Ein Nachweis von authentischem β_H-Endorphin in Überständen stimulierter Zellen gelang unter den gegebenen Versuchsbedingungen und mit den gewählten Nachweismethoden nicht. Die Untersuchung von Zellextrakten stimulierter Zellen erbrachte jedoch den Nachweis von authentischem β_H-Endorphin (1-31). Es sei nochmals darauf verwiesen, daß es sich hier nur um eine Pilot-Untersuchung handelte, mittels derer die Anwendbarkeit der neuentwickelten Nachweismethoden im Rahmen dieser Arbeit geprüft werden sollte.

Die Anwendbarkeit des FPITS-RIA zur Bestimmung von β_H-Endorphin (1-31) steht inzwischen allerdings außer Zweifel. Die Methode wurde im Rahmen mehrerer sportmedizinischer Untersuchungen mit Erfolg eingesetzt, von denen zwei bereits publiziert wurden (Harbach et al., 2000; Schulz et al., 2000); weitere sind in Vorbereitung. Es handelt sich um die erste radioimmunometrische, d.h. für große Probenkontingente einsetzbare Nachweismethode zur Bestimmung von authentischem β_H-Endorphin (1-31)!

Veröffentlichungen, in die Teile der vorliegenden Dissertationsschrift eingegangen sind:

Publikationen:

1. HARBACH, H., HELL, K., GRAMSCH, C., KATZ, N., HEMPELMANN, G., TESCHEMACHER, H.:
   β-Endorphin (1-31) in the plasma of male volunteers undergoing physical exercise.
   Psychoneuroendocrinology, 25, 551-562 (2000)

2. HARBACH, H., HELL, K., HEMPELMANN, G., TESCHEMACHER, H.:
   Unterscheidung zwischen β-Endorphin (1-31) und β-Endorphin-immunoreaktivem Material in menschlichem Plasma durch vergleichende Anwendung einer hochspezifischen radioimmunometrischen Nachweismethode und konventionellen Radioimmunoassays.
   Der Anästhesist, 45, 1227-1228 (1996)

Vorträge und Poster:

SCHOLL, S., HELL, K., SCHEFFLER, U., HARBACH, H., SCHEFFLER, H., WENZLAFF, H., DICKOPF, B., TESCHEMACHER, H.:
Entwicklung radioimmunometrischer Nachweisverfahren zur Untersuchung der Funktion von Opioidpeptiden im Organismus des Menschen.
4. Werkstattbericht aus der experimentellen Biologie und Experimentellen Medizin, Gießen, 11.2.1995

HARBACH, H., HELL, K., DICKOPF, B., ANTRECHT, K., MOLL, B., SCHULZ, A., REUBER, F., TESCHEMACHER, H.:
Determination of human plasma β-endorphin (1-31) in different stress situations using a novel highly specific fluid phase two-site immunometric assay.
26th Congress of the International Society of Psychoneuroendocrinology, München, 12.9.1995

HARBACH, H., DICKOPF, B., SCHRÖDER-ROSENSTOCK, K., BUSCH, H., GRAMSCH, C., TESCHEMACHER, H.:
Proopiomelanocortin processing products in the plasma of humans in acute or chronic stress.
26th Congress of the International Society of Psychoneuroendocrinology, München, 12.9.1995

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. AKIL, H., WATSON, S.J., YOUNG, E., LEWIS, M.E., KHACHATURIAN, H., and WALKER, J.M.:
   Endogenous opioids: Biology and Function.
   Ann. Rev. Neurosci., 7, 223-255 (1984)
2. AKIL, H., YOUNG, E., WATSON, S.J., and COY, D.H.:
   Opiate binding properties of naturally occurring N- and C-terminus modified beta endorphins.
   Peptides, 2, 289-292 (1981)
3. AKIL, H., SHIOMI, H., and MATTHEWS, J.:
   Induction of intermediate pituitary by stress: synthesis and release of nonopioid form of β-endorphin.
   Science, 227, 424-426 (1984)
4. ALEEM, F.A., OMAR, R.A., and ELTABBAKH, G.H.:
   Immunoreactive β-endorphin in human ovaries.
   Fert. Ster., 45, 507-511 (1986)
5. AUSTEN, B.M., and SMYTH, D.G.:
   The NH_2-terminus of C-fragment is resistant to the action of amino-peptidases.
   Biochem. Biophys. Res. Commun., 76, 477-482 (1977)
6. BACH, F.W., SCHMIDT, J.F., and FABER, T.:
   Radioimmunoassay of β-Endorphin in ventricular and lumbar cerebro-spinal fluid.
   Clin. Chem., 38/6, 847-852 (1992)
7. BERTAGNA, X.:
   Proopiomelanocortin-derived peptides.
   Endocrinology and metabolism clinics of North America., 23, 467-485 (1994)
8. BOSCATO, L.M., EGAN, G., and STUART, M.C.:
   Covert cross reactants in a two-site immunoassay studied with mono-clonal antibodies.
   Analyt. Biochem., 146, 393-401 (1985)
9. BOSCATO, L.M., and STUART, M.C.:
   Incidence and specifity of interference in two-site immunoassays.
   Clin. Chem., 32, 1491-1495 (1986)
10. BØYUM, A.:
    Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages.
    Scand. J. Immunol., 5, Suppl. 5, 9-15 (1976)
11. BØYUM, A.:
    Isolation of monocytes.
    Scand. J. Immunol., 17, 429-436 (1983)
12. BØYUM, A.:
    In jodinated density gradient media. A practical approach.
    IRL Press (ed. D. Rickwood), 147-171 (1983)
13. BRADBURY, A.F., SMYTH, D.G., SNELL, C.R., BIRDSALL, N.J., and HULME, E.C.:
    C fragment of lipotropin has a high affinity for brain opiate receptors.
    Nature, 260, 793-795 (1976)

14. BRADFORD, M.M.:
A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilization the principle of protein-dye binding.
Analyt. Biochem., 72, 248-254 (1976)
15. BRANTL, V., TESCHEMACHER, H., HENSCHEN, A., and LOTTSPEICH, F.:
Novel opioid peptides derived from casein (β-casomorphins)
Hoppe-Seyler´s Z. Physiol. Chem., 360, 1211-1216 (1979)
16. BROCCARDO, M., ERSPAMER, V., FALCONIERI ERSPAMER, G., IMPROTA, G., LINARI, G., MELCHIORRI, P., and MONTECUCCHI, P.C.:
Pharmacological data on dermorphins, a new class of potent opioid peptides from amphibian skin.
Brit. J. Pharm., 73, 625-631 (1981)
17. BROWNSTEIN, M.J.:
A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5391-5393 (1993)
18. BUTLER, J.E.:
Immunochemistry of solid-phase immunoassays.
CRC Press (1991)
19. BUTLER, J.E., NI, L., NESSLER, R., JOSHI, K.S., SUTER, M., ROSENBERG, B., CHANG, J., BROWN, W.R., and CANTARERO, L.A.:
The physical and functional behavior of capture antibodies adsorbed on polystyrene.
J. Immunolog. Meth., 150, 77-90 (1992)
20. BUZZETTI, R., McLOUGHLIN, L., LAVENDER, P.M., CLARK, A.J.L., and REES, L.H.:
Expression of pro-opiomelanocortin gene and quantification of adreno-corticotropic hormone-like immunoreactivity in human normal peripheral mononuclear cells and lymphoid and myeloid malignancies.
J. Clin. Invest., 83, 733-737, (1989)
21. CARTER, R.J., SHUSTER, S., and MORLEY, J.S.:
Melanotropin potentiating factor is the C-terminal tetrapeptide of human β-lipotropin.
Nature, 279, 74-75 (1979)
22. CATT, K.J., TREGEAR, G.W., BURGER, H.G., and SKERMER, C.:
Antibody-coated tube method for radioimmunoassay of human growth hormone.
Clin. Chim. Acta, 27, 267-279 (1970)
23. CHARD, T.:
An introduction to radioimmunoassay and related techniques.
Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 6, Part 2, 4. Ed. (1990)
24. DE BOLD, C.R., NICHOLSON, W.E., and ORTH, D.N.:
Immunoreactive proopiomelanocortin (POMC) peptides and POMC-like messenger ribonucleic acid are present in many rat nonpituitary tissues.
Endocrinology, 66, 2648-2657 (1988)
25. DEAKIN, J.F.W., DOSTRÖVSKY, J.O., and SMYTH, D.G.:
Influence of N-terminal acetylation and C-terminal proteolysis on analgesic activity of β-endorphin.
Biochem. J., 189, 501-506 (1980)

26. DIAS, J.A., and REICHERT, L.E.:
Characterization of a follitropin-binding component prepared from immature bovine testes in absence of detergent.
J. Biol. Chem., 257, 613-620 (1982)
27. DITZEL, P.:
Sertürner, Morphin und die Schmerzbekämpfung.
Deutsche Apotheker Zeitung, 123. Jahrgang, Nr. 25, 1221-1224 (1983)
28. DOCKRAY, G.J.:
The opioid peptides.
in: Gut peptides: biochemistry and physiology.
Ed. Wlash, J.H., Dockray, D.J.
Raven Press, New York (1994)
29. EKINS, R.:
More sensitive immunoassays.
Nature, 284, 14-15 (1980)
30. ESSER, P.:
Principles in adsorption to polystyrene.
Nunc Bulletin, 6 (1988)
31. FREDERICKSON, R.C.A., and GEARY, L.E.:
Endogenous opioid peptides: review of physiological, pharmacological and clinical aspects.
Progress in Neurobiology, 19, 19-29 (1982)
32. GATES, M., and TSCHUDI, G.:
The synthesis of morphine.
J. Am. Chem. Soc., 74, 1109-1114 (1952)
33. GIBSON, S., CROSBY, S.R., and WHITE, A.:
Discrimination between β-endorphin and β-lipotrophin in human plasma using two-site immunoradiometric assays.
Clin. Endocrin., 39, 445-453 (1993)
34. GRAMSCH, C., MEO, T., RIETHMÜLLER, G., and HERZ, A.:
Binding characteristics of a monoclonal β-endorphin antibody recognizing the N-terminus of opioid peptides.
J. Neurochem., 40, 1220-1226 (1983)
35. GUILLEMIN, R., LING, N., and VARGO, T.:
Radioimmunoassays for α-endorphin and β-endorphin.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 77, 361-366 (1977)
36. HAHN VON DORSCHE, H., FÄLT, K., and ZÜHLKE, H.:
Immunohistochemical investigations of β-endorphin in human pancreatic islets.
Acta histochem., 85, 131-134 (1989)
37. HAHN VON DORSCHE, H., RÖSE, I., and FÄLT, K.:
β-Endorphin-immunoreactive cells in human fetal pancreas.
Acta histochem., 93, 357-362 (1992)
38. HAMMONDS, R.G., NICOLAS, P., and LI, C.H.:
β-endorphin-(1-27) is an antagonist of β-endorphin analgesia.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 1389-1390 (1984)
39. HAN, C., MOKHTARI, A., BRENNAN, G., LU, J., HUTCHINSON, S., HILL, C., KENNEDY, C., NAMEI, N., and CALLAHAN, N.:
Development of an immunoradiometric assay for direct measurement of intact beta-endorphin.
Clin. Chem., 38, 1082 (1992)

40. HARBACH, H., HELL, K., HEMPELMANN, G. und TESCHEMACHER, H.:
Unterscheidung zwischen β-Endorphin (1-31) und β-Endorphin-immunoreaktivem Material in menschlichem Plasma durch vergleichende Anwendung einer hochspezifischen radioimmunometrischen Nachweismethode und konventionellen Radioimmunoassays.
Der Anästhesist, 45, 1227-1228 (1996)
41. HARBACH, H., HELL, K., GRAMSCH, C., KATZ, N., HEMPELMANN, G., and TESCHEMACHER, H.:
β-Endorphin (1-31) in the plasma of male volunteers undergoing physical exercise.
Psychoneuroendocrinology, 25, 551-562 (2000)
42. HELENIUS, T., and TIKANOJA, S.:
A sensitive and practical immunoradiometric assay of thyrotropin.
Clin. Chem., 32, 514-518 (1986)
43. HERZ, A.:
Opioide und das Schmerzgeschehen.
Internist, 27, 412-417 (1986)
44. HILDEBRAND, A., PREISSNER, K.T., MÜLLER-BERGHAUS, G., and TESCHEMACHER, H.:
A novel β-endorphin binding protein.
J. Biolog. Chem., 264, 15429-15434 (1989)
45. HIRSCH, M.D., and MILLINGTON, W.R.:
Endoproteolytic conversion of β-endorphin-1-31 to β-endorphin-1-27 potentiates its central cardioregulatory activity.
Brain Res., 550, 61-68 (1991)
46. HÖLLT, V.:
Opioid peptide processing and receptor selectivity.
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 26, 59-77 (1986)
47. HÖLLT, V., MÜLLER, O.A., and FAHLBUSCH, R.:
β-endorphin in human plasma: basal and pathologically elevated levels.
Life Sci., 25, 37-44 (1979)
48. HUGHES, J.:
Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine.
Brain Res., 88, 295-308 (1975)
49. HUNTER, W.M., and GREENWOOD, F.C.:
Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity.
Nature, 194, 495-496 (1962)
50. KAISER, E.T., and KÉZDY, F.J.:
Amphiphilic secondary structure: Design of peptide hormones.
Science, 223, 249-255 (1984)
51. KÄPYAHO, K., TANNER, P., and WEBER, T.:
Effect of complement binding on solid-phase immunometric TSH assay.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 49, 211-216 (1989)
52. KAVELAARS, A., BALLIEUX, R.E., and HEIJNEN, C.J.:
The role of Il-1 in the corticotropin-releasing factor and arginine-vasopressin-induced secretion of immunoreactive β-endorphin by human peripheral blood mononuclear cells.
The Journal of Immunology, 142, 2338-2342 (1989)

53. KAVELAARS, A., BALLIEUX, R.E., and HEIJNEN, C.J.:
β-Endorphin secretion by human peripheral blood monoclonal cells: Regulation by glucocorticoids.
Life Sci., 46, 1235-1240 (1990a)
54. KAVELAARS, A., BERKENBOSCH, F., CROISET, G., BALLIEUX, R.F., and HEIJNEN, C.J.:
Induction of β-endorphin secretion by lymphocytes after subcutaneous administration of corticotropin-releasing factor.
Endocrinology, 126, 759-764 (1990b)
55. KAVELAARS, A., BALLIEUX, R.E., and HEIJNEN, C.J.:
Two different signalling pathways for the induction of immunoreactive β-endorphin secretion by human peripheral blood mononuclear cells.
Endocrinology, 128, 765-770 (1991)
56. KÖNIG, W.:
Peptide and protein hormes: structure, regulation, activity; a reference manual.
VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (1993)
57. KRAMER, D.:
Weiterentwicklung und Einsatz einer neuen Methode zur Bestimmung β-Endorphin-immunoreaktiver Substanzen in menschlichem Plasma: Diskrepanz zwischen Peptid und Peptid-immunoreaktiven Material.
Inaugural-Dissertation, Fachbereich Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen (1988)
58. LAATIKAINEN, T., SALMINEN, K., STENMAN, U.-H., and LEPPÄLUOTO, J.:
Determination of plasma β-endorphin and β-lipotropin by cation-exchange liquid chromatography and radioimmunoassay.
Clin. Chem., 31/1, 134-136 (1985)
59. LI, C.H., CHUNG, D., and DONEEN, B.A.:
Isolation, characterization and opiate activity of β-endorphin from human pituitary glands.
Biochem. Biophys. Res. Com., 72, 1542-1547 (1976)
60. LOH, Y.P.:
Molecular mechanisms of β-endorphin biosynthesis.
Biochem. Pharmacol., 44, 843-849 (1992)
61. LOLAIT, S.J., CLEMENTS, J.A., MARKWICK, A.J., CHENG, C., McNALLY, M., SMITH, A.I., and FUNDER J.W.:
Pro-opiomelanocortin messenger ribonucleic acid and posttranslational processing of β-endorphin in spleen makrophages.
J. Clin. Invest.m 77, 1776-1779 (1986)
62. LØVBORG, U.:
Guide to solid phase immunoassays.
A/S Nunc, Roskilde, Denmark (1984)
63. MUNSON, P.J., and RODBARD, D.:
LIGAND: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems.
Anal. Biochem., 107, 220-239 (1980)
64. NAKAI, Y., NAKAO, K., OKI, S., and IMURA, H.:
Presence of immunoreactive β-lipotropin and β-endorphin in human placenta.
Life Sci., 23, 2013-2018 (1978)

65. NYBERG, F., CHRISTENSSON-NYLANDER, I., and TERENIUS, L.:
Measurement of opioid peptides in biologic fluids by radioimmunoassay.
In: Radioimmunoassay in Basic and Clinical Pharmacology.
Eds: Patrono, C., Peskar, B.A.
Handbook of Experimental Pharmacology, Springer New York, 82 (1987)
66. OATES, E.L., ALLAWAY, G.P., ARMSTRONG, G.R., BOYAJIAN, R.A., KEHRI, J.H., and PRABHAKAR, B.S.:
Human lymphocytes produce pro-opiomelanocortin gene-related transcripts.
J. Biol. Chem., 263, 10041-10044 (1988)
67. OLSON, G.A., OLSON, R.D., KASTIN, A.J., and COY, D.H.:
Endogenous opiates: 1980.
Peptides, 2, 349-369 (1981)
68. OLSON, G.A., OLSON, R.D., and KASTIN, A.J.:
Endogenous opiates: 1988.
Peptides, 10, 1253-1280 (1989)
69. OYAMA, T., JIN, T., YAMAYA, R., LING, N., and GUILLEMIN, R.:
Profound analgesic effects of β-endorphin in man.
Lancet, 1, 122-124 (1980)
70. PANERAI, A.E., and SACERDOTE, P.:
Brain and gut neuropeptides in peripheral blood mononuclear cells.
J. Physiology, 87, 283-289 (1993)
71. PASI, A., LANSEL, N., MAHLER, H., BÄR, W., and MESSIHA, F.S.:
A novel two-site enzyme immunoassay fo sensitive detection of beta-endorphin in specific human brain stem regions.
Res. Com. Chem. Path. Pharm., 76, 75-87 (1992)
72. PATERSON, S.J., ROBSON, L.E., and KOSTERLITZ, H.W.:
Classification of opioid receptors.
in: Opioid peptides (Hughes, J., ed.), pp 31-36
Churchill Livingstone, London (1983)
73. PERT, C.B., and SNYDER, S.H.:
Opiate receptor: Demonstration in nervous tissue.
Science, 179, 1011-1014 (1973)
74. PESCE, A.J., and MICHAEL, J.G.:
Artifacts and limitations of enzyme immunoassay.
J. Immunolog. Meth., 150, 111-119 (1992)
75. PORSTMANN, T., and KIESSIG, S.T.:
Enzyme immunoassay techniques. An overview.
J. Immunolog. Meth., 150, 5-21 (1992)
76. ROITT, I.M.:
Leitfaden der Immunologie.
Steinkopf Verlag, Darmstadt, 3. Auflage (1988)
77. ROITT, I.M., BROSTOFF, J., und MALE, D.K.:
Kurzes Lehrbuch der Immunologie
Thieme Verlag Stuttgart New York, 2. Auflage (1991)
78. ROLANDI, E., FRANCESCHINI, R., MARABINI, A., MESSINA, V., CATALDI, A., SALVEMINI, M., and BARRECA, T.:
Twenty-four-hour beta-endorphin secretory pattern in the elderly.
Acta Endocrin. (Copenh.), 115, 441-446 (1987)

79. RUEGG, U.T., HILLER, J.M., and SIMON, E.J.:
Solubilization of an active opiate receptor from bufo marinus.
Europ. J. Pharmacol. 64, 367-368 (1980)
80. RYALL, R.G., STORY, C.J., and TURNER, D.R.:
Reappraisal of the causes of the “hook effect” in two-site immunoradiometric assays.
Analyt. Biochem., 127, 308-315 (1982)
81. SACERDOTE, P., RUBBOLI, F., LOCATELLI, L., CICILIATO, J., MANTEGAZZA, P., and PANERAI, A.E.:
Pharmacological modulation of neuropeptides in peripheral mononuclear cells.
Neuroimmunology, 32, 35-41 (1991)
82. SARMA, J.K., HOFFMANN, S.R., and HOUGHTEN, R.A.:
Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for β-endorphin and its antibodies.
Life Sci., 38, 1723-1732 (1986)
83. SCATCHARD, G.:
The attractions of proteins for small molecules and ions.
Ann. NY Acad. Sci., 51, 660-672 (1949)
84. SCHÄFER, M., CARTER, L., and STEIN, C.:
Interleukin 1β and corticotropin-releasing factor inhibit pain by releasing opioids from immune cells in inflamed tissue.
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91, 4219-4223 (1994)
85. SCHEFFLER, U.:
Entwicklung radioimmunometrischer Nachweisverfahren zur Bestimmung der Opioidpeptide Dynorphin A (1-8) und α-Neoendorphin (1-10).
Inaugural-Dissertation, Fachbereich Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen (1995)
86. SCHOLL, S.:
Entwicklung von Solid Phase-Two-Site Radioimmunoassays zur Bestimmung der Opioidpeptide β-Endorphin (1-31), β-Endorphin (1-27) und β-Endorphin (1-26) in Extrakten aus Leukozyten des menschlichen Blutes.
Inaugural-Dissertation, Fachbereich Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen (1995)
87. SCHULZ, A., HARBACH, H., KATZ, N., GEIGER, L., and TESCHEMACHER, H.:
β-Endorphin immunoreactive material and authentic β-endorphin in the plasma of males undergoing anerobic exercise on a rowing ergometer.
Int. J. Sports Med., 21, 1-6 (2000)
88. SCHWARZ, S., BERGER, P., and WICK, G.:
Epitope-selective, monoclonal-antibody-based immunoradiometric assays of predictable specificity for differential measurement of choriogonadotropin and its subunits.
Clin. Chem., 31, 1322-1328 (1985)
89. SCHWEIGERER, L., BHAKDI, S., and TESCHEMACHER, H.:
Specific non-opiate binding sites for human β-endorphin on the terminal complex of human complement.
Nature, 296, 572-574 (1982)

90. SHARP, B., and LINNER, K.:
Editorial: What do we know about the expression of proopiomelanocortin transcripts and related peptides in lymphoid tissue?
Endocrinology, 133, 1921-1922 (1993)
91. SIBINGA, N.E.S., and GOLDSTEIN, A.:
Opioid peptides and opioid receptors in cells of the immune system.
Ann. Rev. Immunol., 6, 219-249 (1988)
92. SIMON, E.J., HILLER, J.M., and EDELMAN, I.:
Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (^{3}H)etorphine to rat-brain homogenate.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 1947-1949 (1973)
93. SIMON, E.J., and HILLER, J.M.:
Opioid peptides and opioid receptors.
In: Basic neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects.
Ed.: Siegel, J.G.
Raven Press, New York (1994)
94. SINGER, R., BRUCHIS, S., BARNET, M., SAGIV, M., KAUFMAN, H., and SERVADIO, C.:
β-Endorphin in normozoospermic and pathologic human semen.
Experientia, 41, 64-65 (1985)
95. SMITH, E.M., HARBOUR-McMENAMIN, D., and BLALOCK, J.E.:
Lymphocyte production of endorphins and endorphin-mediated immunoregulatory activity.
J. Immunology, 135, 779-782 (1985)
96. SMITH, E.M., MORRILL, A.C., MEYER, W.J., and BLALOCK, J.E.:
Corticotropin releasing factor inducing of leukocyte-derived immuno-reactive ACTH and endorphins.
Nature, 321, 881-882 (1986)
97. SMITH, E.M., and BLALOCK, J.E.:
Human lymphocyte production of corticotropin and endorphin-like substances: Association with leukocyte interferone.
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 78, 7530-7534 (1981)
98. SMYTH, D.G.:
β-Endorphin and related peptides in pituitary, brain, pancreas and antrum.
Brit. Med. Bull., 39, 25-30 (1983)
99. SORENSEN, K., and BRODBECK, U.:
Assessment of coating-efficiency in ELISA plates by direct protein determination.
J. Immunol. Meth., 95, 291-293 (1986)
100. TAYLOR, J.W., and KAISER, E.T.:
The structural characterization of β-endorphin and related peptide hormones and neurotransmitters.
Pharmacolog. Rev., 38, 291-315 (1986)
101. TERENIUS, L.:
Characteristics of the “receptor” for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fraction from rat brain.
Acta pharmacol. toxicol. (Copenh.), 33, 377-384 (1973)
102. TESCHEMACHER, H.:
Opioid peptides: Phylogenetic aspects.
Nova acta Leopoldina NF 56, 255, 195-206 (1984)

103. TESCHEMACHER, H.:
Opioidrezeptoren und Opioidpeptide.
Pharmazeutische Zeitung, 132, 556-567 (1987)
104. TESCHEMACHER, H.:
Atypical opioid peptides.
in: Opioids I. Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 104/I. Ed.: Herz, A. (1993)
105. TESCHEMACHER, H., KOCH, G., SCHEFFLER, H., HILDEBRAND, A., and BRANTL, V.:
Opioid peptides immunological significance?
Ann. N. Y. Acad. Sci., 594, 66-77 (1990)
106. THOMAS, L.:
Immunchemische Labortechniken
in: Labor und Diagnose, Ed. Thomas, L., Med. Verl.-Ges., 3. Aufl. (1988)
107. UOTILA, M., RUOSLAHTI, E., and ENGVALL, E.:
Two-site sandwich enzyme immunoassay with monoclonal antibodies to human alpha-fetoprotein.
J. Immunolog. Meth., 42, 11-15 (1981)
108. VAN REE, J.M., DE WIED, D., BRADBURG, A.F., HULME, E.C., SMYTH, D.G., and SNELL, C.R.:
Induction of tolerance to the analgesic action of lipotropin C-fragment.
Nature, 264, 792-794 (1976)
109. VAN WOUDENBERG, A.D.:
β-Endorphin and related peptides in human peripheral blood mononuclear cells: pressent or absent?
Dissertation der Universität Utrecht, (1991)
110. VAN WOUDENBERG, A.D., HOL, E.M., and WIEGANT, V.M.:
Endorphin-like immunoreactivities in uncultured and cultured human peripheral blood mononuclear cells.
Life Sci., 50, 705-714 (1992)
111. VAN WOUDENBERG, A.D., METZELAAR, M.J., VAN DER KLEIJ, A.A.M., and DE WIED, D.:
Analysis of proopiomelanocortin (POMC) messenger ribonucleic acid and POMC-derived peptides in human peripheral blood mononuclear cells: no evidence for a lymphocyte-derived POMC system.
Endocrinology, 133, 1922-1933 (1993)
112. VOELLMY, D.R., KÜLLING, P., GRAMSCH, C., HÄNI, M., MEHRAEIN, P., MESSIHA, F.S., and PASI, A.:
A novel two-site immunoradiometric assay for β-endorphin using nitrocellulose as solid phase.
Neurosci. Biobehav. Rev., 12, 199-204 (1988)
113. WEBER, E., EVANS, C.J., CHANG, J.K., and BARCHAS, J.D.:
Antibodies specific for α-N-acetyl-β-endorphins: Radioimmunoassays and detection of acetylated β-endorphins in pituitary extracts.
J. Neurochem., 38, 436-447 (1982)
114. WIEDEMANN, K., and TESCHEMACHER, H.:
Determination of β-endorphin and fragments thereof in human plasma using high-performance liquid chromatography and a multiple radioimmunoassay system.
Pharm. Res., 3, 142-149 (1986)

115. YOUNG, E., BRONSTEIN, D., and AKIL, H.:
Proopiomelanocortin biosynthesis, processing and secretion: Functional implications.
Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 104/I, Ed.: A. Herz, Springer Verlag (1993)
116. ZAKARIAN, S., and SMYTH, D.G.:
β-Endorphin is processed differently in specific regions of rat pituitary and brain.
Nature, 296, 250-252 (1982)

LEBENSLAUF

Persönliches:

Name:	Kornelia Hell
Anschrift:	Burgunderstr. 21
	71711 Steinheim
geboren am:	20. Mai 1968
Geburtsort:	Marbach a.N.

Schulausbildung:

1974 - 1978	Grundschule Höpfigheim
1978 - 1987	Gymnasium der Oscar-Paret-Schule Freiberg a.N. (Allgemeine Hochschulreife: 21.05.1987)

Studium und Berufsausbildung:

01.09.1987 - 15.05.1988	Betriebswirtschaftliches Praktikum, Firma Siemens, Stuttgart
Mai 1988 - Oktober 1993	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
Oktober 1993 - November 1994	Studium der Humanmedizin an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (Praktisches Jahr im Klinikum Ludwigsburg)
08.11.1994	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
01.12.1994 - 31.05.1996	Ärztin im Praktikum an der Gefäßchirurgischen Klinik des Klinikums Ludwigsburg
01.06.1996 - 31.12.1996	Assistenzärztin an der Gefäßchirurgischen Klinik des Klinikums Ludwigsburg
01.01.1997 - 31.03.1998	Assistenzärztin an der Städtischen Frauenklinik Stuttgart
seit 01.04.1998	Assistenzärztin an der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Klinikums Ludwigsburg

DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. Hansjörg Teschemacher für die Überlassung des Themas sowie seine intensive Beratung und profunde wissenschaftliche Unterstützung. Ohne ihn hätte die vorliegende Arbeit nicht vollendet werden können.
Ich danke Frau Dr. med. vet. Heike Scheffler, damals Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie, für ihre Einführung in die Versuchsmethoden.
Herrn Dr. med. Holger Wenzlaff danke ich für seine Unterweisung am PC, seine Hilfe bei der Erstellung der Graphiken sowie deren Einbringen in die vorliegende Arbeit.
Mein besonderer Dank geht an Frau Beate Dickopf für ihre qualifizierte Unterstützung bei der Durchführung der Laborarbeiten und ihre stets vorhandene Hilfsbereitschaft.
Frau Angelika Holaschke danke ich für ihre exzellente Arbeit am PC, ohne welche diese Arbeit nicht in dieser Form vorliegen würde. Dies war mir eine sehr große Hilfe.
Bei allen damaligen Mitarbeitern des Rudolf-Buchheim-Instituts der Justus-Liebig-Universität bedanke ich mich für ihre nützlichen Ratschläge.
Schließlich möchte ich meiner Familie für ihre stets vorhandene moralische Unterstützung danken.