

# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

## Fakultät für Medizin

Rekombinante Produktion verschiedener HER2/neu - Rezeptor - Formen:  
Etablierung eines Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA) zur Detektion und  
Quantifizierung von Trastuzumab in humanem Serum

Anne Andrulat

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades  
einer Doktorin der Medizin  
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer\*Innen der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Viktor Magdolen

2. Prof. Dr. Marion B. Kiechle

Die Dissertation wurde am 07.04. 2022 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 12.10.2022 angenommen.

Meiner Familie,  
Julia und Steffi

# Inhaltsverzeichnis

<b>0</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>S. 5</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>S. 7</b>
1.1	Die ErbB (HER) Rezeptorfamilie	S. 7
1.2	Das HER2/neu-positive Mammakarzinom	S. 9
1.3	Klinische Bedeutung des HER2/neu Status beim Mammakarzinom	S. 11
1.4	HER2/neu - gerichtete Therapie	S. 11
1.5	Trastuzumab	S. 13
<b>2</b>	<b>Aufgabenstellung</b>	<b>S. 15</b>
<b>3</b>	<b>Material</b>	<b>S. 16</b>
3.1	Vektoren	S. 16
3.2	Bakterienstämme	S. 18
3.3	Medien Bakterienkultur	S. 18
3.4	Zelllinien	S. 19
3.5	PCR Reagenzien	S. 19
3.6	Molekulargewichtsstandards (Marker)	S. 20
3.7	Antikörper	S. 20
3.8	Chemikalien	S. 21
3.9	Puffer und Lösungen	S. 21
<b>4</b>	<b>Methoden</b>	<b>S. 22</b>
4.1	Klonierung von Anteilen des HER2/neu - Rezeptors	S. 22
4.2	Transformation von Plasmiden in kompetente <i>E. coli</i>	S. 27
4.3	Expression und Aufreinigung von Proteinen aus Prokaryoten	S. 28
4.4	Expression und Aufreinigung von Proteinen aus Eukaryoten	S. 30
4.5	Rückfaltung rekombinanter Proteine	S. 34
4.6	ELISA - <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>	S. 36
4.7	Assayvalidierung	S. 39
4.8	<i>semi dry</i> Westernblot	S. 43
4.9	Gewinnung von humanen Serumproben	S. 44
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>S. 44</b>
5.1	Klonierung der HER2/neu Domäne IV in den prokaryotischen Expressionsvektor pQE-100	S. 44
5.2	Klonierung der HER2/neu Domäne IV in den eukaryotischen Expressionsvektor pCEP-Pu/AC7	S. 55
5.3	Klonierung der HER2/neu Domäne IV in den eukaryotischen Expressionsvektor pSecTag2/HygroB	S. 57
5.4	Klonierung der HER2/neu ECD in den eukaryotischen Expressionsvektor pSecTag2/HygroB	S. 65

<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>S. 75</b>
6.1	Design der <i>capture antigens</i> für Trastuzumab	S. 75
6.2	Assayvalidierung	S. 78
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>S. 84</b>
<b>8</b>	<b>Appendix</b>	<b>S. 85</b>
8.1	pQE-100 HER2/neu Domäne IV	S. 85
8.2	pSecTag2/HygroB HER2/neu Domäne IV	S. 86
8.3	pCEP-Pu/AC7 HER2/neu Domäne IV	S. 88
8.4	pSecTag2/HygroB HER2/neu ECD	S. 91
8.5.	Sequenzierprimer	S. 92
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>S. 93</b>

## 0 Abkürzungsverzeichnis

TE	Puffer mit 5 mM Tris-Cl pH 8
Abb.	Abbildung
ADC	Antikörper-Wirkstoff-Konjugat
AGO	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
<i>Aqua dest.</i>	Destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-Triphosphat
BCIRG	<i>Breast Cancer International Research Group</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxiribonukleinsäure
CISH	Chromogene in situ-Hybridisierung
CMV	Cytomegalievirus
CV	Variationskoeffizient
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxiguanosintriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxiribonukleinsäure
dNTP	Mix aus den vier Desoxiribonukleotiden
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EMA	Europäische Arzneimittelagentur
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECD	Extrazelluläre Domäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ErbB	<i>erythroblastosis oncogene B</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> , Fötales Kälberserum
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> , Vereinigte Staaten
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GAM	<i>Gifu Anaerobic Medium</i>
HER	<i>human epidermal growth factor receptor</i>
His-Tag	Histidin-Tag (His -Peptid)
hKLLK	humanes Kallikrein
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
i.v.	intravenös

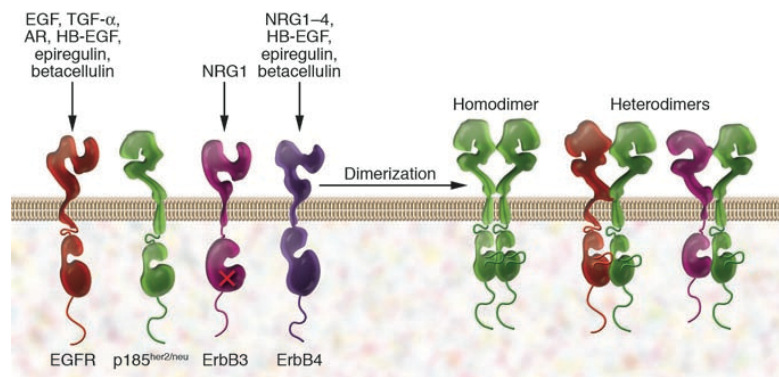
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LiCl	Lithiumchlorid
LLOQ	<i>lower level of quantification</i> , Untere Nachweisgrenze
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
mA	Milliampere
NACT	Neoadjuvante (primär systemische) Chemotherapie
NCCTG	<i>North Central Cancer Treatment Group</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NSABP	<i>National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project</i>
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAM50	<i>Prediction Analysis of Microarray 50</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , Phosphatpuffer
PCI	Mischung aus Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1
PCR	Polymerasekettenreaktion
pCR	Pathologische Komplettremission
pH	pH Wert
POD	Peroxidase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
T-DM1	Trastuzumab - Emtansin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
2 x TY	Medium für Bakterienkultur mit Trypton und Hefe ( <i>yeast</i> )
UKG	Echokardiographie
ULOQ	<i>upper level of quantification</i> , Obere Nachweisgrenze
ün	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt

# 1 Einleitung

Das Mammakarzinom ist eine sehr heterogene Erkrankung und wird im klinischen Alltag entsprechend der Rezeptorexpression auf den Tumorzellen in die folgenden Hauptsubgruppen eingeteilt: hormonrezeptor-positiv (Expression von Östrogen- und/oder Progesteronrezeptoren auf der Tumorzelloberfläche), HER2/neu-positiv (Überexpression oder Genamplifikation des HER2/neu - Rezeptors mit ggf. gleichzeitiger Expression von Hormonrezeptoren) und *triple*-negativ (keine relevante Expression der zuvor genannten Rezeptoren). Diese Untergruppen zeichnen sich durch unterschiedliche klinische Verläufe und therapeutische Optionen aus. Dies macht die Behandlung äußerst komplex. In der vorliegenden Arbeit wird ausschließlich die Subgruppe der HER2/neu-positiven Mammakarzinome betrachtet. Ziel war es einen rekombinanten HER2/neu - Rezeptor zu synthetisieren und diesen zur Messung von Trastuzumabkonzentrationen in Serum einzusetzen. Trastuzumab ist ein monoklonaler humanisierter Antikörper, der in der Therapie des HER2/neu-positiven Mammakarzinoms eine Schlüsselrolle spielt und im Folgenden ausführlich beschrieben wird.

## 1.1 Die ErbB (HER) Rezeptorfamilie

Bei der ErbB (*erythroblastosis oncogene B*) Rezeptorfamilie (Singh et al. 2014) handelt es sich um eine Gruppe von vier transmembranären Glykoproteinen von 170 – 185 kDa Größe (Abb. 1). Beim Menschen wird die Bezeichnung als HER (*human epidermal growth factor receptor*) Rezeptorfamilie synonym verwendet. Bis auf HER3 weisen alle Mitglieder eine Rezeptortyrosinkinasefunktion (RTK) auf (Yarden et al. 2012). Ihre Aufgabe ist die Steuerung von Zellwachstum und Zelldifferenzierung über Proteohormone wie Wachstumsfaktoren und Trophine. Die in der Zellmembran verankerten Rezeptoren sind in drei Domänen gegliedert: Eine extrazelluläre Domäne bestehend aus einem cysteinreichen N-Terminus, welcher die Ligandenbindung übernimmt, und einem Dimerisationsarm zur Bildung von Homo- und Heterodimeren, ein transmembranärer hydrophober Anteil sowie ein cytosolischer Anteil mit Tyrosinkinase und C-terminalen Tyrosinresten zur Phosphorylierung nach Aktivierung der Kinase. Durch Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Domäne wird die Tyrosinkinase aktiviert und vermittelt eine Signalkaskade bis in den Zellkern (Schlessinger 2000, Yarden et al. 2001). HER2 und HER3 stellen Ausnahmen dar, weil HER3 keine relevante Tyrosinkinaseaktivität besitzt und für HER2 kein Ligand bekannt ist. Die Extrazellulärdomäne der HER Rezeptoren hat zwei mögliche Konformationen: offen oder geschlossen. Der HER2/neu - Rezeptor bildet auch hier eine Ausnahme. Er liegt stets in der offenen Konformation vor. In der geschlossenen, inaktiven Form sind die Domänen IV und II so zueinander gestellt, dass eine Ligandenbindung verhindert wird (Garrett et al. 2002, Cho et al. 2003). In der offenen, aktiven Form kann ein Ligand von Domäne I und III gebunden werden. Die resultierende Konformationsänderung ermöglicht Domäne II die Dimerisation mit einem weiteren Rezeptor der ErbB Familie als Homo- oder Heterodimer (Ogiso et al. 2002).



**Abbildung 1 Die ErbB Rezeptorfamilie und ihre Liganden.**

EGFR (HER1): *human epidermal growth factor receptor*, EGF: *epidermal growth factor*, TGF-alpha: *transforming growth factor*, AR: *Amphiregulin*, HB-EGF: *heparin-binding EGF like growth factor*, NRG: *Neuregulin*. p185: *HER2/neu*, ErbB3: *HER3* und ErbB4: *HER4*. Nach Bindung eines Liganden kommt es zur Dimerisation von zwei Rezeptoren und durch deren Konformationsänderung zu konsekutiver Aktivierung einer Signalkaskade ins Zellinnere (Yarden et al. 2001, Zhang et al. 2007). Abbildung aus Zhang et al. 2007.

Die Dimerisierung bewirkt die Aktivierung des katalytischen Zentrums im Zellinneren. Es kommt zur wechselseitigen Phosphorylierung von Tyrosinresten im intrazellulären Anteil des Rezeptordimers und konsekutiv zu einer Autoaktivierung. Auf diesem Weg werden vor allem die Signalwege für Ras-Raf-MEK-ERK, PI3K-Akt-Tor, Src Kinasen und STAT Transkriptionsfaktoren aktiviert. Hochspezifische SH2 Domänen stellen hierbei sicher, dass, je nach Ligand, eine spezifische Signalkaskade in Gang gesetzt wird (Schlessinger 2000, für eine Übersicht siehe auch Yarden et al. 2012). Diese Wege fördern Zelldifferenzierung, -proliferation und -migration durch Änderung der Genexpressionsmuster. Die HER (ErbB) Rezeptoren spielen eine große Rolle in Entwicklung und Verlauf verschiedener maligner Tumore: eine Mutation in den für diese Rezeptoren kodierenden Genen kann zur Unabhängigkeit von externen Regulatoren führen und zu einer dauerhaften Aktivierung der Signalkaskade mit konsekutiver Entdifferenzierung der Zelle und ungebremstem Wachstum. Auch eine Überproduktion von Liganden führt zur Überaktivierung von ErbB Rezeptoren in Tumoren. Ebenso sind autokrine Aktivierungsmechanismen, *mistrafficking* (fehlgeleiteter Transport von Proteinen und Enzymen) und extrakrine Signalaktivität (*exosomal targeting receptor activation*) als Pathomechanismen für ErbB bezogene Onkogenese beschrieben worden (Singh et al. 2014). So beobachtet man dies auch in den Zellen solider Tumoren, weshalb die ErbB Rezeptoren eine große Rolle in der Entwicklung verschiedener Karzinome des Menschen spielen. Die pathologische Aktivierung der ErbB-Rezeptoren ist, unter anderem, mit der Entwicklung des Mammakarzinoms assoziiert, weshalb diese Rezeptorfamilie ein wichtiges Ziel spezifischer onkologischer Therapien darstellt (Tang et al. 1998).

### HER2/neu - Rezeptor

Der HER2/neu - Rezeptor (*human epidermal growth factor receptor 2*, ErbB2) ist, wie die anderen Mitglieder der ErbB-Familie, ein transmembranäres 185 kDa Protein mit

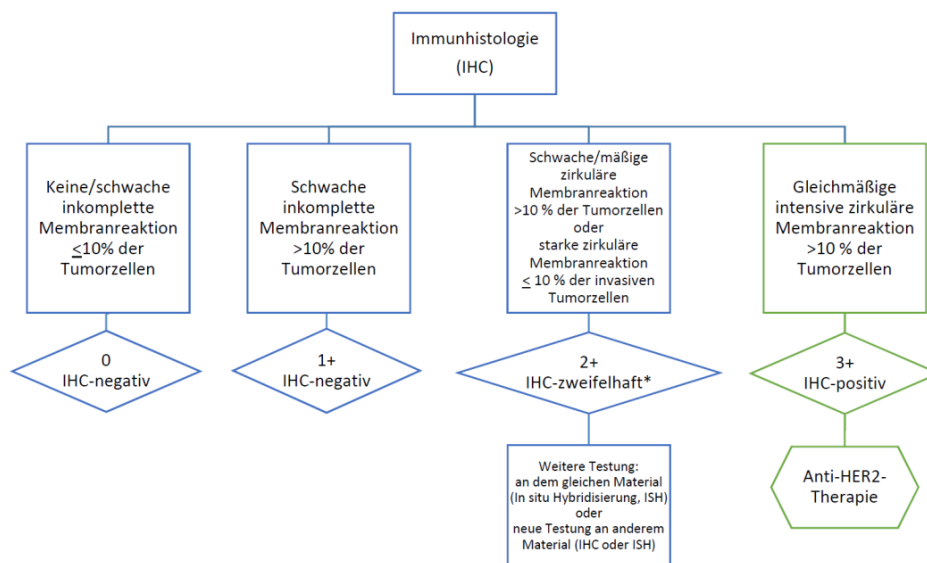


Tyrosinkinaseaktivität (King et al. 1985). Das kodierende Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosom 17(q21) (Schechter et al. 1985).

Für HER2/neu ist kein Ligand bekannt, wohl aber ist es der bevorzugte Bindungspartner für die anderen Mitglieder der ErbB Familie (Karunagaran et al. 1996, Graus-Porta et al. 1997). So liegt beispielsweise HER3 in HER2/neu amplifizierten Mammakarzinomen stets phosphoryliert, also in aktivierter Form, vor (Lee-Hoeflich et al. 2008). Man geht davon aus, dass HER3 eine unverzichtbare Rolle bei der pathophysiologischen Aktivität von HER2/neu in Mammakarzinomen spielt. Das Heterodimer aus HER2/neu und HER3 kann sehr potent den PI3K/Akt Signalweg aktivieren, da HER2/neu HER3 aktiviert und dieses wiederum via mehrerer Bindungsstellen die regulatorische Untereinheit der PI3-Kinase binden kann. Der erste Hinweis, dass HER2/neu eine Rolle in Tumoren spielt, ergab sich aus dessen Isolation aus Neuroblastomen in Ratten. Die isolierte DNA enthielt eine Mutation von HER2 genannt *neu* (Schechter et al. 1984). Inzwischen weiß man, dass der HER2/neu Überexpression beim Mamma-, Magen- oder Oesophaguskarzinom in der Regel eine Amplifikation, also keine Mutation, zugrunde liegt. Diese Amplifikation wurde bereits 1987 in 20 % der Mammakarzinome beschrieben (Slamon et al. 1987). HER2/neu Mutationen werden klassischerweise in „HER2/neu negativen“ Tumoren gefunden. So zum Beispiel in invasiv-lobulären Mammakarzinomen, Endometriumkarzinomen, Blasenkarzinomen, dem Adenokarzinom der Lunge und Magenkarzinomen (Cancer Genome Atlas Network 2012).

## **1.2 Das HER2/neu-positive Mammakarzinom**

Bei etwa 15% (7,1 – 27,3%) aller invasiven Mammakarzinome wird eine Überexpression oder Genamplifikation von HER2/neu nachgewiesen (Rüschoff et al. 2017). Sie gelten damit als HER2/neu-positiv. Die Bestimmung des HER2/neu Status mittels Immunhistochemie erfolgt routinemäßig bei der Diagnose eines invasiven Mammakarzinoms. In dieser Untersuchung wird die Intensität der Membranfärbung der Tumorzellen semiquantitativ von 0 bis 3+ eingeteilt (Abb. 2). Bei einer Membranfärbung von „0“ oder „1+“ gilt der Tumor als „HER2/neu negativ“. Mittels ISH (In-situ-Hybridisierung; v.a. Fluoreszenz-basierend (FISH) und Chromogen-basierend (CISH)) werden die 2+ klassifizierten Tumore auf Amplifikation des HER2/neu Gens untersucht, da hier immunhistochemisch keine sichere Bestimmung des HER2/neu Status möglich ist (15% der Fälle) und nur 24% der Karzinome eine Genamplifikation aufweisen (Rüdiger et al. 2003). HER2/neu-Positivität ist definiert als immunhistochemischer Score von 3+ (>10% der Tumorzellen zeigen eine gleichmäßige und kräftige Membranfärbung) oder bei positivem FISH bzw. CISH. Dieser ist definiert als Wert  $\geq 2,0$  aus dem Verhältnis von HER2-Gensignalen zu Signalen von Chromosom 17 (CEP-17), bzw. bei Verhältnis  $< 2,0$  wenn im Schnitt mehr als 6 HER2-Gensignale pro Zelle nachgewiesen werden (Wolff et al. 2013, Leitlinienprogramm Onkologie 2021).



\* Selten können drüsenbildende oder mikropapilläre Mammakarzinome eine inkomplette, aber starke Membranreaktion zeigen (basolateral oder U-förmig), die eventuell mit einer HER2-Genamplifikation einhergeht. Diese Fälle sollten ebenfalls dem IHC-Score 2+ zugeordnet und mit ISH überprüft werden.

**Abbildung 2 Algorithmus zur HER2/neu Diagnostik bei Mammakarzinomen.** Abbildung aus Leitlinienprogramm Onkologie 2021.

Wird bei PatientInnen ein invasives, HER2/neu-positives Mammakarzinom diagnostiziert, besteht ab einer Größe von 5 mm oder bei befallenen axillären Lymphknoten, sowie in der metastasierten Situation, die Indikation zur spezifischen HER2/neu gerichteten Therapie.

Eine Konversion des HER2/neu Status in einer sekundär aufgetretenen Metastase ist sowohl von negativ zu positiv als auch umgekehrt möglich, weshalb eine bioptische Sicherung und immunhistochemische Untersuchung des Gewebes empfohlen wird (Gancberg et al. 2002, AGO Kommission Mamma 2021).

Mittels Testung eines Genexpressionsprofils (z.B. PAM50) lässt sich das Her2/neu-positive Mammakarzinom in 4 intrinsische Subtypen unterteilen: *luminal A*, *luminal B*, *basal-like* und *HER2-enriched* (häufigste Form) (Prat et al. 2017). Hieraus ergeben sich unterschiedliche Prognosen. Zudem gewinnen die intrinsischen Subtypen zunehmend an Bedeutung bei der Wahl der Therapie. Inzwischen stehen verschiedenste therapeutische Strategien beim HER2/neu-positiven Mammakarzinom zur Verfügung (Abb. 4) und es wird angenommen, dass das Therapieansprechen abhängig vom intrinsischen Subtyp sein könnte (Prat et al. 2017). Die Testung des Genexpressionsprofils ist noch nicht Teil der klinischen Routinediagnostik. Es ist bekannt, dass molekularbiologisch und immunhistochemisch bestimmter Subtyp nicht kongruent zueinander sind. Dennoch gibt es eine Schnittmenge (Llombart-Cussac et al. 2017) zwischen ihnen, und die immunhistochemischen Untersuchungsergebnisse (hier unterscheidet man zwischen *luminal b-like* und *non-luminalen* HER2/neu-positiven Karzinomen) lassen Rückschlüsse auf die Prognose zu (Minckwitz et al. 2012).

### 1.3 Klinische Bedeutung des HER2/neu Status beim Mammakarzinom

HER2/neu-Positivität per se galt lange Zeit als prognostisch ungünstiger Faktor (Moja et al. 2012). Grund hierfür sind höhere Mitoseraten, eine verstärkte Neoangiogenese, Tumorzellmigration und Invasion in diesen Tumoren (Holbro et al. 2003). Aber auch innerhalb der Gruppe der HER2/neu-positiven Mammakarzinome zeigen sich unterschiedliche Krankheitsverläufe (Prat et al. 2017). Betrachtet man die verschiedenen intrinsischen Subtypen des HER2/neu-positiven Mammakarzinoms, das *luminale* Karzinom mit Hormonrezeptorexpression und das *non-luminale* Her2/neu-positive Karzinom ohne Hormonrezeptorexpression (Goldhirsch et al. 2013b), lassen sich deutliche Unterschiede in Bezug auf das Überleben und Lokalrezidivraten feststellen. In einer Analyse von 32.450 PatientInnen mit primärem Mammakarzinom (Diagnosejahre 2004-2015) des Tumorregister München wurde eine höhere Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Lokalrezidiven und Metastasen bei HER2/neu-positiven *non-luminalen* Tumoren im Vergleich zu HER2/neu-positiven *luminal B-like* Tumoren beobachtet. Hierbei wurden die Tumore den intrinsischen Subtypen anhand immunhistochemischer Befunde, welche als Surrogatparameter dienten, zugeordnet (Schrodi et al. 2017). Die Rate der primär metastasierten PatientInnen war bei Hormonrezeptor-negativen, HER2/neu-positiven Tumoren sogar höher als die bei *triple*-negativen Karzinomen (9,8% versus 6,3%) (Abb.3).

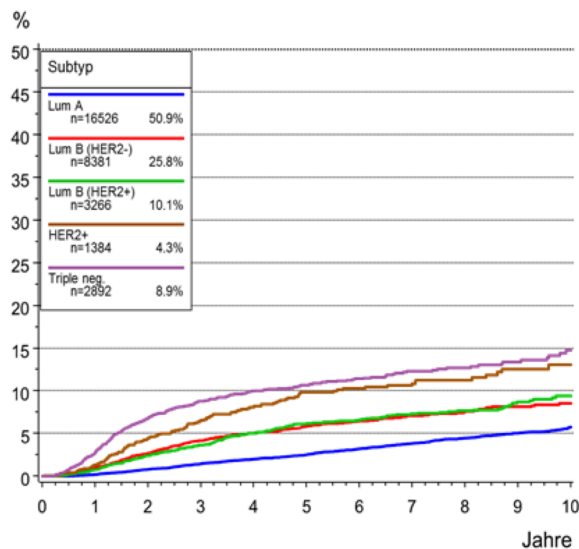


Abb. 2: Zeit bis Lokalrezidiv nach Subtypen (n=32450)

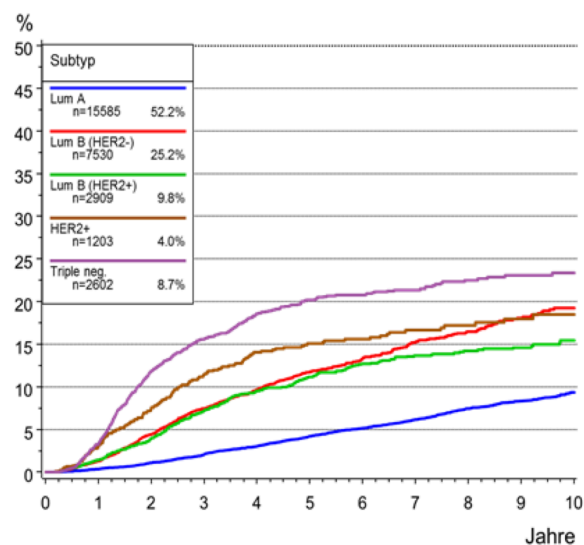


Abb. 3: Zeit bis Metastase bei M0 nach Subtypen (n=29829)

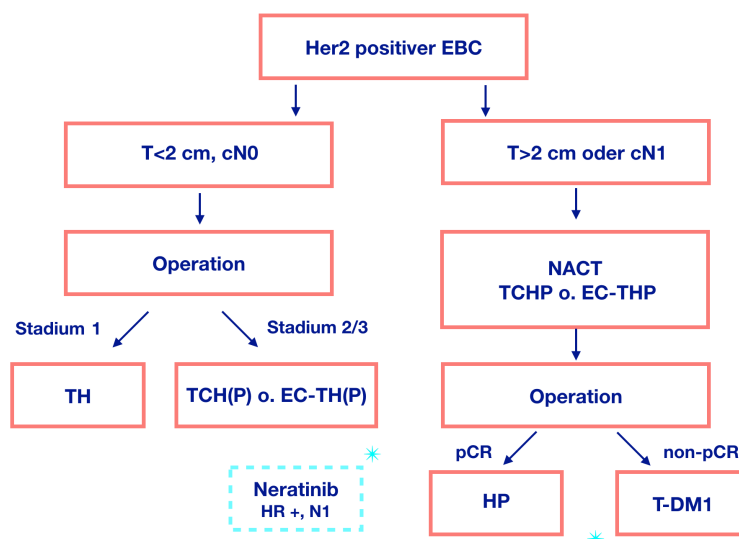
**Abbildung 3 Rezidiv- und Metastasierungswahrscheinlichkeit der unterschiedlichen intrinsischen Subtypen des Mammakarzinoms.** Abbildung aus: Outcome für Mammakarzinom-Patientinnen in Abhängigkeit von molekularen Subtypen, definiert anhand von Surrogatparametern - Eine bevölkerungsbezogene Analyse von Krebsregisterdaten. Schrodi et al. 2017.

### 1.4 HER2/neu - gerichtete Therapie

Inzwischen sind diverse HER2/neu - gerichtete Substanzen, v.a. Antikörper und Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (ADC), zur Therapie des HER2/neu-positiven Mammakarzinoms zugelassen. Diese Tumorentität ist besonders chemosensitiv. Dementsprechend ist ab einer Tumorgöße von 5 mm generell eine Kombinationstherapie aus spezifischen Antikörpern und

Zytostatika indiziert (Leitlinienprogramm Onkologie 2021). Im neoadjuvanten Setting werden im Vergleich zu anderen intrinsischen Subtypen höhere Raten pathologischer Komplettremission (pCR) erzielt (Cortazar et al. 2014). Die pCR nach neoadjuvanter Chemotherapie gilt als Surrogatmarker für ein verlängertes Gesamtüberleben (Minckwitz et al. 2012).

Seit dem routinemäßigen Einsatz von HER2/neu - gerichteten Agenzien hat sich die Bedeutung von HER2/neu - Überexpression als Prognosefaktor verändert. Darauf deuten auch die guten Überlebensdaten aktueller Studien hin. In einer Untersuchung zur Behandlung von HER2/neu-positiven Tumoren von bis zu 3 cm Größe und negativem Nodalstatus wurde durch Einsatz einer anthrazyklinfreien Chemotherapie (Paclitaxel) über 12 Wochen in Kombination mit Trastuzumab über ein Jahr ein 7- Jahres-Gesamtüberleben von 95% erreicht (Tolaney et al. 2019). Im (Hoch-) Risikokollektiv zeigte z.B. die adjuvante APHINITY Studie zum Einsatz der dualen Blockade von HER2/neu mittels der monoklonalen Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab in Kombination mit Chemotherapie ein invasiv-krankheitsfreies Überleben nach 3 Jahren von 92,3% im mit dualer Blockade behandelten Kollektiv und 90,6% im Trastuzumab Kollektiv (Minckwitz et al. 2017). Aufgrund des Themas dieser Arbeit soll im Folgenden vor allem auf Trastuzumab eingegangen werden. Die aktuellen Therapieempfehlungen für das frühe HER2/neu-positive Mammakarzinom sind schematisch in Abb. 4 dargestellt. Die therapeutische Strategie berücksichtigt dabei das individuelle Risiko an dem Tumor zu versterben. So ist z.B. im Risikokollektiv mit Tumoren größer 2 cm und/oder Lymphknotenbefall eine Eskalation der Therapie vorgesehen, während im Niedrigrisikokollektiv therapeutische Deeskalation angestrebt wird (Abb. 4).



**Abbildung 4 Aktuelle internationale Therapieempfehlungen beim frühen HER2/neu-positiven Mammakarzinom.** EBC: early breast cancer; T: Tumorgöße; cN: Nodalstatus axillär; NACT: neoadjuvante Chemotherapie; TH: Paclitaxel, Trastuzumab; TCH(P): Docetaxel, Carboplatin, Trastuzumab (Pertuzumab); EC-TH(P): Epirubicin, Cyclophosphamid, Paclitaxel, Trastuzumab (Pertuzumab), pCR: pathologische Komplettremission; HP: Trastuzumab, Pertuzumab; T-DM1: Trastuzumab-Emtansine; HR: Hormonrezeptor. Abbildung modifiziert nach Perez 2019.

## 1.5 Trastuzumab

Trastuzumab ist ein humanisierter monoklonaler Immunglobulin G1 *kappa* Antikörper (Goldenberg 1999) und wurde erstmals im Jahr 2000 von der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) zur Therapie des metastasierten HER2/neu-positiven Mammakarzinoms unter dem Namen Herceptin® (Fa. Roche) zugelassen. 2006 wurde die Indikation für die (neo-) adjuvante Situation erweitert (EMA 2020a). In den Jahren 2017 und 2018 sind von der Europäischen Arzneimittelagentur diverse Trastuzumab-Biosimilars zugelassen worden. Da zum Zeitpunkt des experimentellen Teils dieser Arbeit lediglich Herceptin® verfügbar war, wurde dieses in allen Versuchen eingesetzt.

Trastuzumab bindet an ein Epitop der extrazellulären Domäne IV des HER2/neu - Rezeptors und inhibiert so auf verschiedenen Wegen die durch HER2/neu induzierten Stimuli zur Zelldifferenzierung, -teilung und -migration (Cho et al. 2003). Der PI3K/Akt Signalweg spielt eine wichtige Rolle in Tumoren mit HER2/neu Amplifikation. Studien konnten zeigen, dass die Blockade dieses Weges auch den therapeutischen Effekt von Trastuzumab ausmacht (Chakrabarty et al. 2013). Sie induziert Apoptose in den Tumorzellen (Faber et al. 2011). Zudem behindert Trastuzumab nach Bindung des HER2/neu - Rezeptors dessen Dimerisierung mit anderen Mitgliedern der Rezeptorfamilie (Molina et al. 2001). In präklinischen Modellen wurde darüber hinaus beschrieben, dass Trastuzumab ebenfalls über antikörperabhängige zellvermittelte Toxizität wirkt (Hudis 2007). *De novo* Resistenzen gegen Trastuzumab werden unter anderem durch Mutationen im PI3K Signalweg oder Aktivierung dieses Signalweges durch andere Rezeptortyrosinkinasen verursacht (Rexer et al. 2013).

### Therapie mit Trastuzumab

In einer großen Übersichtsarbeit (Cochrane-Analyse) wurde der Nutzen von Trastuzumab beim frühen Mammakarzinom anhand von Daten aus 8 Studien mit knapp 12.000 Patientinnen analysiert. Sie zeigte eine statistisch signifikante Verlängerung des krankheitsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens. Die Mortalität wird durch Trastuzumab um ein Drittel gesenkt. Die wichtigste Nebenwirkung von Trastuzumab ist die Kardiotoxizität. Insbesondere bei PatientInnen mit niedrigem Rezidivrisiko kann dies den Nutzen der Therapie nivellieren (Moja et al. 2012). Aktuell wird Trastuzumab über den Zeitraum von einem Jahr verabreicht. Dieser Zeitraum gilt als Goldstandard, da in der HERA Studie kein Vorteil bei der Gabe über zwei Jahre belegt werden konnte und die PHARE Studie einen Nachteil bei kürzerer Gabe über 6 Monate zeigte (Goldhirsch et al. 2013a, Pivot et al. 2013).

In der metastasierten Situation wird Trastuzumab in Kombination mit Pertuzumab und Docetaxel standardmäßig als Erstlinientherapie eingesetzt. Nach 6 Zyklen kombinierter Chemo- und Antikörpertherapie wird die duale HER2/neu Blockade mit Trastuzumab und Pertuzumab bis zum Progress oder dem Auftreten nicht tolerabler Nebenwirkungen fortgeführt (AGO 2021).

Die klassischen zytostatischen Kombinationspartner von Trastuzumab im kurativen Setting, Epirubicin/Cyclophosphamid (EC) gefolgt von Paclitaxel in Kombination mit Trastuzumab, oder Docetaxel/Cyclophosphamid (TC) in Kombination mit Trastuzumab, ergeben sich aus den Daten der Studien BCIRG-006 (Slamon et al. 2011, 2015) sowie NSABP-B31 und NCCTG-N9831 (Romond et al. 2005, Perez et al. 2014, Ganz et al. 2017). Diese Schemata gelten als äquieffektiv mit tendenziell besserem, aber nicht statistisch signifikantem, krankheitsfreiem- und Gesamtüberleben im anthrazyklinfreien Arm. Das Auftreten von Grad 3/4 Herzinsuffizienzen wiederum war bei Einsatz von Anthrazyklinen 5-fach höher (2% vs. 0,4%) (Slamon et al. 2015). Am häufigsten wird ein Abfall der LVEF (linksventrikulären Ejektionsfraktion) diagnostiziert, seltener klinisch relevante Herzinsuffizienzen (Fiuza 2009, Moja et al. 2012). Während der Behandlung mit Trastuzumab und darüber hinaus sollte die LVEF regelmäßig überwacht werden. Bei einem Abfall der LVEF wird die Unterbrechung der Therapie empfohlen, je nach Ausmaß und Remission kann die Therapie im Verlauf wieder aufgenommen werden (Guarneri et al. 2006).

In den aktuellen Empfehlungen der AGO Kommission Mamma wird bei Tumoren größer 2 cm bzw. mit Lymphknotenbefall die neoadjuvante Chemotherapie empfohlen (AGO Kommission Mamma 2021). Argumente für die neoadjuvante, also präoperative, Chemotherapie sind neben der potenziellen Reduktion operativer Morbidität auch die dann mögliche Beurteilung des Therapieansprechens. Der histopathologische Remissionsstatus ist inzwischen als wichtiger prädiktiver Faktor anerkannt und dient als Surrogatmarker für das Gesamtüberleben (Cortazar et al. 2014). Eine pathologische Komplettremission, also post-therapeutisch kein invasiver residueller Tumor in Brust und Lymphknoten, ist insbesondere bei *triple*-negativen und HER2/neu-positiven Tumoren mit einer verbesserten Langzeitprognose verbunden (Cortazar et al. 2014). Zusätzlich dient der Remissionsstatus als Stratifizierungsmerkmal für Patientinnen mit hohem Rezidivrisiko (Cortazar et al. 2012). In der KATHERINE Studie wurden dementsprechend Patientinnen mit Residualtumor nach neoadjuvanter Chemotherapie postoperativ für die geplante Komplettierung der HER2/neu gerichteten Therapie in Behandlungsarme mit Trastuzumab oder T-DM1 randomisiert. Bei T-DM1 handelt es sich um ein Antikörper-Wirkstoff-Konjugat aus Trastuzumab und dem zytotoxischen Emtansin (DM1), das im Vorfeld bereits Überlegenheit gegenüber anderen etablierten Therapien in der metastasierten Situation gezeigt hatte. Das Studiendesign war überaus erfolgreich. In der mit T-DM1 behandelten Patientinnengruppe hatten 18% der Patientinnen ein invasives Rezidiv nach 3 Jahren, im Vergleich zur Trastuzumab - Gruppe mit 23% (Minckwitz et al. 2019). Die Antikörper-Wirkstoff-Konjugation mit Trastuzumab als Rückgrat ist weiterhin Thema intensiver Forschung. Trastuzumab-Deruxtecan (DS-8201) z.B. ist eine vielversprechende neue Therapieoption (Modi et al. 2020, Perez et al. 2021).

Die Applikation von Trastuzumab erfolgt in Deutschland zumeist intravenös, auch wenn die subcutane Injektion bei gleichem Wirkungs- und Sicherheitsprofil ebenfalls zugelassen ist (Ismael et al. 2012, Pivot et al. 2017). Die i.v. Dosierung erfolgt bezogen auf das Körpergewicht der PatientInnen und angepasst an die geplanten Applikationsintervalle (ein-, zwei- oder

dreiwöchentlich). Bei der gängigsten, dreiwöchentlichen, Applikation erhalten die PatientInnen initial eine „loading dose“ von 8 mg/kg KG über 90 min. Alle weiteren Gaben erfolgen in der sogenannten Erhaltungsdosis (6 mg/kg KG) und werden über mindestens 30 min verabreicht (EMA 2020b). Sollte das Applikationsintervall mehr als 7 Tage überschritten werden, ist erneut die *loading dose* zu verabreichen. Die Dosierung subcutan verabreichten Trastuzumabs beträgt 600 mg dreiwöchentlich, unabhängig vom Körpergewicht (EMA 2020a).

Der Einsatz von Trastuzumab zur Behandlung des HER2/neu-positiven Mammakarzinoms hat zu einer substanziellen Verbesserung der Prognose dieser PatientInnen geführt. Es ist heute aus der Therapie des HER2/neu-positiven Mammakarzinoms nicht mehr wegzudenken. Offen ist die Frage, ob eine weitere Anpassung der Dosis bei gleichem oder verbessertem (Neben-) Wirkungsprofil möglich wäre.

## 2 Aufgabenstellung

Die primäre Behandlung von HER2/neu-positivem Brustkrebs mit Trastuzumab, in Kombination mit weiteren Substanzen, entspricht dem Goldstandard. Dabei wird die Standarddosierung von Trastuzumab an das Körpergewicht der PatientInnen angepasst und in fest definierten zeitlichen Abständen verabreicht.

Trastuzumab ist ein humanisierter, monoklonaler Antikörper und scheint interindividuell unterschiedlich schnellen Metabolisierungsraten zu unterliegen. So wurden in den Phase II - Studien WO16229 und MO16982 unterschiedlich hohe Serumkonzentrationen von Trastuzumab bei den ProbandInnen nachgewiesen (Baselga et al. 1996, EMA 2020b). Insbesondere mögliche Unter- und Überdosierungen und die damit verbundenen negativen Folgen wie mangelnde Wirksamkeit oder unerwünschte Nebenwirkungen könnten durch Monitoring der Antikörperkonzentrationen im Blut von PatientInnen minimiert werden. Kardiotoxizität stellt bisher die bedeutendste unerwünschte Arzneimittelwirkung dar und kann therapielimitierend sein (Perez et al. 2004, Moja et al. 2012). Zudem sind die Kosten für eine Therapie mit Trastuzumab beträchtlich (Garrison et al. 2007, Blackwell et al. 2018, Gershon et al. 2019), und nicht jede PatientIn hat Zugang zu diesem teuren Medikament, obwohl Trastuzumab seit 2015 auf der *Model List of Essential Medicines* der *World Health Organization* steht (WHO 2019). Aus dem Monitoring der Trastuzumabkonzentrationen im Blut von PatientInnen könnte eventuell eine Reduzierung der einzusetzenden Menge resultieren, durch die in der Folge die Therapiekosten gesenkt werden könnten. Gleichzeitig ist bekannt, dass die Konzentration von HER2/neu ECD und deren Schwankungen unter Therapie mit Trastuzumab im Blut von Patientinnen mit HER2/neu-positivem, metastasierten Mammakarzinom prädiktiv für das Therapieansprechen sein kann. Patientinnen, deren HER2/neu ECD Serumspiegel im Verlauf nicht abfällt, haben womöglich eine schlechtere Prognose. Interessanterweise ist bei diesen Patientinnen die Halbwertszeit von Trastuzumab

besonders kurz (Pegram et al. 1998, Fornier et al. 2005). Hier müsste ggf. auch eine Dosiseskulation in Betracht gezogen werden.

Zur Detektion und Quantifizierung von Antikörpern in Proben wie Blut wird in der Regel der ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*), ein biochemisches quantitatives Nachweisverfahren, eingesetzt. Der ELISA findet häufig Anwendung in der Medizin. Er erfüllt die Anforderungen für Sensitivität und Quantifizierung zum Nachweis von Antikörpern und anderen Proteinen und wird bereits vielfach mit humanem Serum angewendet. Vorteile des Verfahrens sind die häufig geringen Kosten, zeitnahe Ergebnisse und leicht zugängliche Proben wie z.B. Serum. An die Blutentnahme selbst werden zumeist keine spezifischen Anforderungen gestellt.

Ziel dieser Arbeit war es demnach, einen solchen Immunoassay zur Detektion und Quantifizierung von Trastuzumab in (Serum-)Proben zu etablieren, wobei der Fokus auf einer Variante des ELISA, dem *one-sided ELISA* lag. Dabei wird anstatt eines *capture antibody* das formale Antigen direkt als „*capture antigen*“ eingesetzt. Hierzu wurden zunächst verschiedene HER2/neu – abgeleitete Proteine als Antigen für Trastuzumab in ausreichender Menge und Reinheit rekombinant produziert. Zum Zeitpunkt des experimentellen Teils dieser Arbeit waren diese nicht bzw. nicht kostengünstig zu erhalten. Dementsprechend erfolgte zunächst die Klonierung, Expression und Aufreinigung von Anteilen des HER2/neu - Rezeptors. Diese rekombinanten Proteine wurden als *capture antigens* in semi-quantitativen *proof of principle* Untersuchungen auf ihre Eignung zum Nachweis von Trastuzumab im ELISA getestet. Die Geeigneten dieser *capture antigens* wurden anschließend im komplexen System (Serum) evaluiert. So konnte ein erstes ELISA Protokoll zur Detektion von Trastuzumab in Serumproben in unserer Einrichtung etabliert werden.

Bei ausreichender Qualität des Tests sollte im Fortgang untersucht werden, ob die neu zugelassenen Biosimilars von Trastuzumab Einfluss auf den Assay haben, oder ob dieser auch ihrer Quantifizierung dient.

### **3 Material**

#### **3.1 Vektoren**

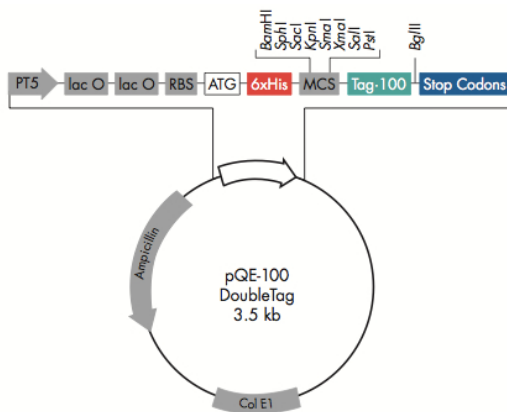
Als *capture antigen* für Trastuzumab dienen in dieser Arbeit Teile des HER2/neu - Rezeptors. Um diese synthetisieren zu können, mussten zunächst entsprechende Vektoren hergestellt werden. Die verschiedenen Klonierungsstrategien und die aus ihnen resultierenden Vektoren werden im Folgenden dargestellt. Die hierbei angewendeten Methoden sind dem gleichnamigen Kapitel zu entnehmen.



Das *template* (engl.; Vorlage), die cDNA des HER2/neu - Rezeptors, wurde freundlicherweise von Frau Prof. Bernhard (II. Medizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum Rechts der Isar, München) zur Verfügung gestellt.

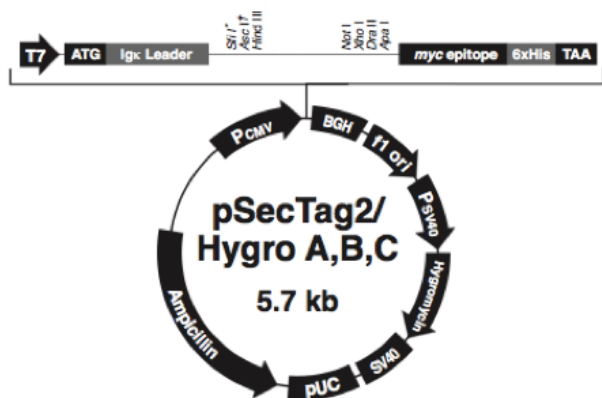
### pQE-100 Vektor

Der pQE-100 Vektor von Qiagen (Hilden, Deutschland) ist ein speziell für effiziente und gut steuerbare Expression rekombinanter Proteine in Prokaryoten konstruiertes Plasmid. Die Expression wird durch einen T5 Phagen-Promoter vermittelt. Als Repressoren dienen zwei *lac* Operatoren, die mittels Galaktoseanalogon Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid (IPTG), welches nicht verstoffwechselt wird, deaktiviert werden können (Abb. 5) (Qiagen 2003). Somit startet die Zugabe von IPTG Transkription und Translation des klonierten Genabschnitts. Des Weiteren findet sich eine Sequenz, welche für einen am späteren N-Terminus des Proteins befindlichen 6-fachen Histidinrest kodiert. Dieses Histidintag kann zur Aufreinigung des exprimierten Proteins aus Zelllysaten verwendet werden.



**Abbildung 5 Vektorkarte für pQE-100**

(Qiagen 2003). MCS: Multiple Klonierungssequenz, PT5: T5 Phagenpromoter, lac O: lac Repressor, RBS: ribosomale Bindungssequenz, ATG: Startcodon, 6xHis: Histidinrest, Tag-100: Tag-100 Epitop, Stop Codons: Stopcodons, Col E1: Replikationsursprung, Ampicillin: Gen für Ampicillinresistenz.



**Abbildung 6 Vektorkarte für pSecTag2/ HygroB** (Invitrogen 2012). T7: kommerzielle Primersequenz, ATG: Startcodon, Igk Leader: zur Proteinsekretion, myc epitope: zur Proteinaufreinigung, 6x His: Histidin-Tag, TAA: Stopcodon.

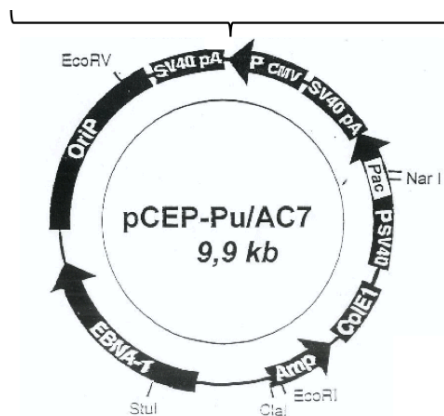
### pSecTag2/HygroB Vektor

Dieser Vektor ist geeignet für die Synthese und Sekretion rekombinanter Proteine in eukaryotischen Zellen. Deren spätere Aufreinigung bzw. Detektion wird durch das myc Epitop (10 AS) und Polyhistidin Tag am C-Terminus des Proteins ermöglicht. P<sub>cmv</sub> ist ein starker Proteinsynthesepromoter (Invitrogen 2012). Eine Induktion ist nicht nötig. T7 ist die kommerziell vertriebene *downstream* Primersequenz zur späteren Sequenzierung des Inserts. Der Vektor vermittelt Resistenzen für Ampicillin in *E. coli* und Hygromycin in Eukaryoten. Eine

ca. 20 Aminosäuren lange, hydrophobe, N-terminale Signalsequenz, die Ig $\kappa$ -chain-Sequenz, bewirkt nach Synthese an den Ribosomen den Transport des Proteins zum Golgi-Apparat und anschließende Sekretion in den Extrazellularraum (Invitrogen 2012). Die BGH *reverse priming site* beschreibt eine Polyadenylierung, welche den Abbau des Proteins durch Proteasen verlangsamen soll (Abb. 6).

### pCEP-Pu/AC7 Vektor

Dieser Vektor wurde als Alternative zur Transfektion mit pSecTag2/HygroB eingesetzt. Er vermittelt eine Ampicillinresistenz in *E. coli* und Puromycinresistenz in Eukaryoten (Abb. 7).



**Abbildung 7** Vektorkarte für pCEP Pu/AC7.

OriP: *origin of replication*, Klammer: Multiple Klonierungssequenz, Pcmv: Proteinsynthesepromoter, Pac: Gen für Puromycinresistenz, Col E1: Replikationsursprung, Amp: Gen für Ampicillinresistenz.

## 3.2 Bakterienstämme

### *E. coli* M15 [pREP4]

Genotyp *Nal<sup>S</sup>, Str<sup>S</sup>, Rif<sup>S</sup>, Thi<sup>-</sup>, Lac<sup>-</sup>, Ara<sup>+</sup>, Gal<sup>+</sup>, Mtl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, RecA<sup>+</sup>, Uvr<sup>+</sup>, Lon<sup>+</sup>*  
 Kontrollierte und ertragreiche Expression von Proteinen (Villarejo et al. 1974).

### *E. coli* XL1blue

Genotyp *recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F proAB, lacIqZΔM15Tn10(tetr)]*  
 Transformation von Plasmiden, tetrazyklinresistent (Bullock et al. 1987).

## 3.3 Medien Bakterienkultur

Die Kulturmedien wurden nach ihrer Herstellung bei 120°C für 20 min autoklaviert.

LB-Agarplatte	LB Medium	2 x TY Medium
1,5 % Agarose	10 g/l Trypton	16 g/l Trypton
LB Medium	5 g/l Hefeextrakt	10 g/l Hefeextrakt
	10 g/l NaCl	5 g/l NaCl
	pH 7,0	pH 7,0

### 3.4 Zelllinien

#### MDA-MB-231

MDA-MB-231 sind humane, aneuploide epitheliale Adenocarcinomzellen. Die Zellen wurden aus dem malignen Pleuraerguss einer kaukasischen Patientin mit metastasiertem Mammakarzinom gewonnen und kultiviert. Sie exprimieren EGFR (epidermal growth factor Rezeptor, HER1) und wachsen adhärent in Kultur (Cailleau et al. 1978).

#### ZR75-1

ZR75-1 sind humane, hypertriploide invasiv-ductale Mammacarcinomzellen. Die Zellen wurden aus malignem Aszites einer kaukasischen Patientin mit metastasiertem Mammakarzinom gewonnen und kultiviert. Sie wachsen ebenfalls adhärent in Kultur (Engel et al. 1978).

#### Zellkultur-spezifische Materialien

Lipofectin von Invitrogen (Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten)

DMEM Kompletmedium von Gibco (Karlsruhe, Deutschland)

### 3.5 PCR Reagenzien

#### Primer

Die Primer (0,02 µmol) wurden unseren Vorgaben entsprechend von der Firma metabion (Martinsried, Deutschland) synthetisiert. Die genauen Primersequenzen sind den Abbildungen der verschiedenen Klonierungsstrategien im Kapitel Ergebnisse zu entnehmen.

#### Polymerasen

iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase von BioRad (Hercules, Vereinigte Staaten)

HF Buffer 5x von BioRad

Herculase® II Fusion DNA Polymerase von Stratagene (Santa Clara, Kalifornien, Vereinigte Staaten)

Herculase® II Fusion DNA Polymerase Puffer 5x von Stratagene

*Pfu Ultra*® II Fusion HS DNA Polymerase von Stratagene

*Pfu Ultra* II Fusion HS DNA Polymerase Puffer 10x von Stratagene

Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase von Finnzymes (Espoo, Finnland)

Phusion HF Puffer 5x von Finnzymes

Alle Polymerasen wurden in einer Konzentration von 2 U/µl eingesetzt.

#### Restriktionsenzyme

Die Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs (Ipswich, Vereinigte Staaten) bezogen und nach folgenden Kriterien ausgewählt: Vorkommen in der multiplen Klonierungssequenz des Vektors. Die Erkennungssequenz des Enzyms kommt nicht in der Insert DNA vor und der Schnitt verursacht keinen *frame shift* bei der Translation. Zudem musste die Schnittstelle mittels PCR synthetisierbar sein. Die verwendeten Enzyme werden in

der jeweiligen Klonierungsstrategie für die einzelnen Plasmide erwähnt. Die Inkubation mit DNA erfolgte gemäß den Herstellerangaben unter Verwendung der empfohlenen Puffer.

### **3.6 Molekulargewichtsstandards (Marker)**

peqGOLD Protein-Marker IV (0.1 – 0.2 mg/ml pro Bande) für Westernblot.

peqGOLD Proteinmarker I (0.1 – 0.2 mg/ml pro Bande) für Proteingele.

peqGOLD 1kb DNA-Leiter (0.1 µg DNA/mm Spurbreite) für DNA-Gele.

Alle von peqlab (Erlangen, Deutschland).

### **3.7 Antikörper**

#### **Trastuzumab**

Trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>, Fa. Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) aus Stammlösung (21 mg/ml) in TBS plus 2% BSA auf 100 µg/ml verdünnt und nach Aliquotierung bei -80°C gelagert.

#### **Antikörper, unkonjugiert**

Humanes IgG (gesamtes Molekül) Konzentration 11,3 mg/ml von Jackson ImmunoResearch (West Grove, Vereinigte Staaten).

Maus IgG1 penta-His-Antikörper, unkonjugiert von Qiagen (Hilden, Deutschland) zur Detektion von N- und C-terminalen, sowie internen Histidin-Tags.

#### **Antikörper, konjugiert**

Kaninchen anti-Human IgG (ganzes Molekül)-Peroxidase A8792 von Sigma-Aldrich (St. Louis, Vereinigte Staaten).

Ziege anti-Human IgG F(ab')<sub>2</sub>-Peroxidase (Konzentration 0,5 mg/ml) von AbD Serotec (Morphosys, Martinsried, Deutschland).

Ziege anti-Maus IgG, Fc γ-Fragment spezifische-Peroxidase (Konzentration 0,8 mg/ml) von Jackson ImmunoResearch (West Grove, Pennsylvania, Vereinigte Staaten).

Maus IgG1anti-Penta His-Peroxidase von Qiagen (Hilden, Deutschland).

Maus anti-Human IgG (ganzes Molekül)-Alkalische Phosphatase (Konzentration 0,8 mg/ml) von Jackson ImmunoResearch.

Die Verdünnung wurde so gewählt, dass bei Messung der Absorption (Optische Dichte) bei 450 nm (POD) respektive 405 nm (AP) in der Positivkontrolle eine Absorption von 1-3 nach 30 min Substratinkubation erzielt wird.

### 3.8 Chemikalien

Die Chemikalien wurden fast ausschließlich von Merck (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma (München, Deutschland) bezogen.

### 3.9 Puffer und Lösungen

Listung in alphabetischer Reihenfolge

TE Puffer	10 mM Tris-Cl 0,5 mM EDTA	pH 8,0
Anodenpuffer	100 ml EtOH (20 % EtOH final) 100 ml Borsäurepuffer 5 x ad. 500 ml <i>Aqua bidest</i>	
ATP	100 mM ATP <i>Aqua bidest</i>	
Beladungspuffer Agarosegel	30 % Glycerin 0,25 % Bromphenolblau	
Borsäurepuffer 5 x	7,73 g Borsäure in 500 ml <i>Aqua bidest</i> (250 mM) pH 8,5	
Phosphatpuffer 10 x	0,68 M NaCl 0,58 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0,17 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	pH 7,4
dNTP Mix	für 400 µl einer 2,5 mM Lösung 360 µl <i>Aqua dest.</i> jeweils 10 µl dATP, dTTP, dGTP, dCTP aus 100 mM Stammlösung	
Kathodenpuffer	25 ml EtOH (5 % EtOH final) 100 ml Borsäurepuffer 5 x ad. 500 ml <i>Aqua bidest</i>	
Laufpuffer SDS-PAGE	250 mM Glycin 25 mM Tris 0,1 % SDS	
Ligationspuffer 5x	250 mM Tris/HCl, pH 7,6 50 mM MgCl <sub>2</sub> 5 mM DTT 15% Polyethylenglykol	
PCI Gemisch	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1	

Proteinase K Puffer 10x	100 mM TrisCl 50 mM EDTA 5 % SDS	
Reduzierender Beladungspuffer 3x	45 g Glycerol 15g SDS 15 ml 1 M TrisCl pH 6,8 6 ml $\beta$ -Mercaptoethanol 10 mg Bromphenolblau	ad 100ml
TBE Puffer	90 mM Tris 90 mM Borsäure 2,5 mM EDTA	pH 8,3
TBS	150 mM NaCl 7,7 mM TrisHCl	pH 7,5
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	pH 7,4

## 4 Methoden

### 4.1 Klonierung von Anteilen des HER2/neu - Rezeptors

In dieser Arbeit wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet um die gesamte extrazelluläre Domäne sowie die Domäne IV des HER2/neu - Rezeptors zu klonieren. Die PCR dient der Vervielfältigung eines spezifischen DNA-Fragmentes. Voraussetzung ist die Kenntnis kleiner Teile der relevanten Sequenz. Benötigt wird diese für die Erstellung von Primern. Diese Oligonucleotide binden die komplementären DNA-Stränge. Sie sind Start- und Endsignal für deren Vervielfältigung. Der DNA-Matrize werden neben den Primern noch die vier Desoxi-Nukleotidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP als Bausteine für die neu synthetisierten DNA-Stränge beigefügt. Die Enzyme bezeichnet man als Polymerasen. Die Reagenzien werden auf Eis pipettiert und anschließend das PCR-Programm im Lab Cycler (Sensoquest, Göttingen) gestartet. Die Reaktion läuft hier 20-30 Mal nach dem immer gleichen Prinzip ab:

Zunächst wird das oben genannte Reaktionsgemisch auf 95°C erhitzt. Man bezeichnet dies als Denaturierung, da sich nun die beiden Matrizen-DNA-Stränge voneinander lösen und einzeln vorliegen. Anschließend kühlt man das Reaktionsgemisch ab, woraufhin die Primer an den entsprechenden Stellen der Matrize binden, das sogenannte *Annealing*. Die *Annealing*-Temperatur ist von großer Wichtigkeit für die Spezifität der Reaktion, da bei zu hohen Temperaturen die Hybridisierung der Primer nicht stattfindet und bei zu niedrigen Temperaturen hingegen auch fehlerhafte Hybride stabil sind. Nach dem *Annealing* wird das Gemisch wieder erhitzt. Die Polymerase beginnt an den Primern die Synthese des neuen DNA-Stranges. Dies geschieht in 5' → 3' Richtung entlang der Matrize. Durch erneutes Erhitzen lösen

sich Matrize und neu synthetisierter DNA-Strang, so dass schon bei der zweiten Reaktion vier Matrizenstränge vorliegen. Der Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Polymerisation wird ca. 20-30 Mal wiederholt. Anschließend liegt die relevante DNA-Sequenz millionenfach kopiert vor. Um eventuelle Verunreinigungen nachzuweisen, wurde auch immer eine Negativkontrolle mitgeführt, in der sich der Reaktionsansatz ohne Matrizen-DNA befand. Am Ende der PCR ist die zu klonierende DNA-Sequenz Hauptbestandteil des Reaktionsgemischs und kann mittels Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Die genauen PCR-Programme sind im Appendix aufgeführt.

Karten der verwendeten Vektoren, relevante Nukleotidsequenzen des HER2/neu - Rezeptors und Primerdesign sind dem Kapitel Ergebnisse zu entnehmen. Ein beispielhafter Reaktionsansatz einer PCR zur Amplifizierung von Teilen der für den HER2/neu - Rezeptor kodierenden DNA ist im Folgenden aufgeführt:

<i>Pfu Ultra II</i> Polymerase 2,5 U/ $\mu$ l	1,0 $\mu$ l
<i>Pfu Ultra II</i> Puffer 10x	5,0 $\mu$ l
DNA-template (cDNA) 26 ng/ $\mu$ l	1,5 $\mu$ l
Primer <i>upstream</i> 10 $\mu$ M	1,25 $\mu$ l
Primer <i>downstream</i> 10 $\mu$ M	1,25 $\mu$ l
dNTPs (A,C,G,T) 2,5 mM	5,0 $\mu$ l
<i>Aqua dest.</i>	35,0 $\mu$ l
<hr/>	
Gesamtvolumen	50 $\mu$ l

### **Aufreinigung von DNA**

Um die amplifizierte DNA von den noch vorhandenen Reststoffen der PCR zu reinigen und zu konzentrieren, werden die folgenden Schritte durchgeführt:

1. PCI-Extraktion
2. Proteinase K-Verdau
3. PCI-Extraktion
4. Ethanol-fällung

### **PCI-Extraktion (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25: 24: 1)**

Diese Methode dient der Entfernung von Proteinresten aus dem PCR-Gemisch. Phenol löst Proteine ohne die Integrität der Nukleinsäurestränge zu beeinflussen. Chloroform dient als Lösungsmittel für Phenol. Isoamylalkohol verhindert störendes Schäumen der organischen Phase beim Abpipettieren.

#### *Durchführung*

Das DNA-Protein-Gemisch wird sorgfältig 1:1 mit dem PCI-Gemisch gevortext und anschließend bei maximaler Geschwindigkeit für 5 min zentrifugiert. Es entstehen zwei Phasen. Die obere, wässrige Phase enthält die hydrophile DNA, die untere Phase das in

Chloroform gelöste Phenol. Zwischen beiden Phasen lagern sich ausgefällte Proteine ab. Die obere Phase wird vorsichtig abpipettiert und der Rest verworfen.

### **Proteinase K-Verdau**

Mit der ersten PCI-Extraktion kann keine vollständige Entfernung der Proteinverunreinigung erzielt werden. Dementsprechend folgt die Behandlung der DNA mit Proteinase K. Diese Proteinase fungiert sowohl als Endo- als auch Exopeptidase. Sie gehört zur Gruppe der Serinproteasen, da sich in ihrem aktiven Zentrum unter anderem die Aminosäure Serin findet. Nach Zerkleinerung der Proteinreste in diesem Schritt können diese bei der zweiten PCI-Extraktion besser entfernt werden.

#### *Durchführung*

Bei einem Volumen der DNA-Lösung von 90 µl lautet der Reaktionsansatz wie folgt:

DNA Gemisch	90 µl
Proteinase K Puffer 10 x	10 µl
Proteinase K (20 mg/ml)	2 µl
<hr/>	
Gesamtvolumen	102 µl

Proteinase K und Puffer werden der DNA-Lösung zugefügt und bei 37°C für 30 min inkubiert. Anschließend wird das Gemisch für 10 min auf 68°C erhitzt um die Proteinase K zu deaktivieren. Nach Abkühlung auf Eis wird erneut eine PCI-Extraktion durchgeführt. Hierbei werden Proteinase K und ihre Spaltprodukte entfernt.

### **Ethanol-fällung**

Dieser Schritt dient der Reduzierung von DNA-Verunreinigungen durch kleine Moleküle. Zudem ermöglicht hier die Resuspension der DNA eine Verkleinerung des Lösungsvolumens und Erhöhung ihrer Konzentration. Hierbei macht man sich zunutze, dass DNA in Ethanol ausfällt und sich bei Zentrifugation am Boden des Gefäßes absetzt.

#### *Durchführung*

Der DNA-Lösung wird das doppelte Volumen an reinem Ethanol zugesetzt, sowie 1/10 des Volumens an 4 M Lithiumchlorid. Das Gemisch wird für 20 min bei -20°C eingefroren und anschließend für 15 min bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wird behutsam, unter Schonung des DNA-Pellets am Gefäßboden, abpipettiert und verworfen. Nach Waschen des Pellets mit 70% Ethanol wird die Lösung für weitere 5 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird bis auf ca. 30 µl abgenommen, das verbliebene Ethanol verdampft bei offenem Deckel. Die DNA kann anschließend im gewünschten Volumen 5 mM Tris (pH 8) oder H<sub>2</sub>O resuspendiert werden.



## **Agarose-Gelelektrophorese**

Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von Nukleinsäuren nach Größe. Trägt man zusätzlich noch eine Lösung mit DNA-Fragmenten bekannter Größe (Marker) auf, so kann man die Größe der DNA-Stränge in einer Probe bestimmen. Da hier die voraussichtliche Größe des PCR-Produktes bekannt ist, kann dieses gut mittels Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Das Agarosegel bildet nach Aushärtung Poren, deren Größe abhängig von der Agarosekonzentration sind. Je mehr Agarose, desto kleiner die Poren. Bringt man nun DNA auf das Gel auf und legt es in eine Flüssigkeit, die unter elektrischer Spannung steht, so wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren zum Pluspol. Dabei wandern kurze DNA-Stränge schneller als lange. Es ergibt sich eine Auftrennung nach Molekülgröße.

### *Durchführung*

Für ein 1% Agarosegel werden 40 ml 1x TBE Puffer und 0,4 g Agarose auf 100°C erhitzt. Nachdem die Agarose gelöst wurde, wird das Gemisch unter kontinuierlichem Rühren auf circa 50°C abgekühlt. Anschließend werden 0,5 µg/ml Ethidiumbromid beigemischt. Es interkaliert in Nukleinsäuren und erhöht die Intensität der Fluoreszenz-Emission der DNA unter UV-Strahlung um den Faktor 50-100. Das noch flüssige Gemisch wird in ein Geltablett gegossen und ein Taschenkamm eingesetzt. Nach Aushärtung des Gels folgt das Einbringen in eine Elektrophoresekammer. Diese ist so mit 1x TBE Puffer befüllt, dass das Gel gänzlich bedeckt ist. Nach Entfernung der Kämmen wird das PCR-Produkt in die Kammtaschen pipettiert. Die DNA wurde zuvor mit Beladungspuffer in einem Verhältnis von 1:4 gemischt. Um später die Größe der Banden erkennen zu können, wird zusätzlich DNA-Marker aufgebracht. Bei 100 V erfolgt die Auftrennung über ca. eine Stunde. Unter UV-Strahlung werden die DNA-Banden sichtbar.

### *freeze and squeeze - präparatives Agarosegel*

Mit dieser Methode kann DNA aus einem Agarosegel herauspräpariert und aufgereinigt werden. In dieser Arbeit wurden so die Inserts und Plasmide nach der Inkubation mit Restriktionsenzymen von unspezifischen Molekülen und DNA-Sequenzen getrennt. Unter UV-Licht wird die fluoreszierende Bande, welche der erwarteten Größe von Insert bzw. Plasmid entspricht, ausgeschnitten.

### *Durchführung*

Das präparierte Gelstück wird 20 min in einer Lösung aus 0,3 M Natriumacetat und 0,1 mM EDTA (pH 7,0) inkubiert und vorsichtig auf Zellstoff getrocknet. In einem Spin - X- Gefäß (Corning Incorporated, New York, Vereinigte Staaten) wird die Probe dreimal bei -80°C für 15 min eingefroren und bei 37°C wieder aufgetaut. Anschließend wird das Gefäß für 10 min bei 8000x g zentrifugiert. Eine im Gefäß befindliche Membran hält Agarosemoleküle und andere grobe Verunreinigungen zurück. Nach Entfernung dieses Filters überführt man die abzentrifugierte Lösung in ein neues Gefäß und gibt 1/50 des Volumens der DNA-Lösung an 1 M Magnesiumchlorid in 10 % Essigsäure sowie die dreifache Menge des Volumens an 100 %

Ethanol hinzu. Das Gemisch wird für mindestens 15 min bei -20°C eingefroren und anschließend bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und das DNA-Pellet analog der bereits beschriebenen Ethanolfällung vorsichtig in 70 % Ethanol gewaschen und weiter behandelt, bis die DNA in 5 mM Tris (pH 8,0) resuspendiert werden kann.

### Vorbereitung von Insert und Plasmid mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die DNA-Doppelstränge an spezifischen Basensequenzen schneiden können. Haben sie ihre, zumeist palindromische, Basensequenz gefunden, so hydrolysieren sie die Phosphodiesterbindung der DNA. Mithilfe von Ligasen können die so entstandenen Schnittebenen wieder verbunden werden. Auf diese Weise werden fremde DNA-Moleküle zusammengeführt. Die Restriktionsendonukleasen dienen hier der Vorbereitung der zu ligierenden DNA-Enden von Insert und Plasmid. Die geeigneten Schnittstellen und Restriktionsenzyme ergeben sich aus den Nukleotidsequenzen der *multiple cloning sites* der verwendeten Vektoren und der Inserts (hier Domäne IV und ECD des HER2/neu - Rezeptors). Siehe dazu die Klonierungsstrategien im Kapitel Ergebnisse und die Reaktionsansätze im Appendix. Umgekehrt kann auch eine sogenannte *Restriktionsanalyse* erfolgen, um nachzuweisen, dass ein Vektor ein bestimmtes Insert trägt. Die Banden von Vektor und Insert werden in einem Agarosegel sichtbar gemacht.

### Durchführung

Im Folgenden sind die Reaktionsansätze für die Klonierung von HER2/neu Domäne IV in pQE-100 aufgeführt:

<b>Ansatz Insert</b>		<b>Ansatz Plasmid</b>	
Restriktionsenzym Bam H1	2,0 µl	Restriktionsenzym Bam H1	4,0 µl
Restriktionsenzym Sal 1	2,0 µl	Restriktionsenzym Sal 1	4,0 µl
Puffer Nr. 3 10 x	5,0 µl	Puffer Nr. 3 10 x	10 µl
BSA 100 x	0,5 µl	BSA 100 x	1,0 µl
Insert-DNA (≈ 5µg DNA)	10 µl	Plasmid-DNA (≈ 5µg DNA)	30 µl
<i>Aqua bidest</i>	30,5 µl	<i>Aqua bidest</i>	51 µl
Gesamtvolumen		Gesamtvolumen	
50 µl		100 µl	

Die Reaktionsansätze werden nach dem oben genannten Schema pipettiert, und bei 37°C für 3 Stunden inkubiert. Die Zwischenlagerung erfolgt auf Eis.

### DNA-Ligation mit T<sub>4</sub>-Ligase

Die T<sub>4</sub>-Ligase kann in Anwesenheit ihres Kofaktors ATP DNA-Enden unter Ausbildung einer Esterbindung verbinden. So kann strangförmige DNA wie die von Insert und Plasmid zu einem ringförmigen Molekül zusammengefügt werden, dem Vektor. Dieser Vektor kann später in kompetente *E. coli* Stämme transformiert werden. Für eine erfolgreiche Ligation sollte das Insert im Verhältnis zum Plasmid in 5 bis 10-fachem molaren Überschuss vorliegen.

### Durchführung

Reaktionsansatz zur Ligation des Vektors pQE-100 HER2/neu Domäne IV:

#### Ligationsansatz Nr. 1

pQE-100 Vektor	1 $\mu$ l
Insert (HER2/neu Domäne IV)	2 $\mu$ l
Ligationspuffer 5x	4 $\mu$ l
10 mM ATP	3 $\mu$ l
T <sub>4</sub> -Ligase (400 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
<i>Aqua bidest</i>	9 $\mu$ l
<hr/>	
Gesamtvolumen	20 $\mu$ l

Der Ansatz wird für 2 h bei 25°C inkubiert. Neben dem Ansatz mit Insert und Plasmid werden zwei weitere Ansätze als Negativkontrollen mitgeführt. Ansatz Nr. 2 ohne Insert und Ansatz Nr. 3 ohne Insert und ohne Ligase. Aus diesen Ansätzen sollten nahezu keine ringförmigen Plasmide hervorgehen. Der Erfolg wird nach Transformation in kompetente *E. coli* geprüft.

#### 4.2 Transformation von Plasmiden in kompetente *E. coli*

Als Transformation bezeichnet man das Einbringen von DNA in Bakterienzellen. Hierfür eignen sich zu diesem Zweck optimierte, sogenannte „kompetente“ Stämme. Die DNA liegt als Plasmid, also ringförmiges Molekül vor. Um eine spätere Selektion der transformierten Bakterien zu ermöglichen, tragen die Plasmide eine Antibiotikaresistenz, so dass bei der Bebrütung der Bakterienkulturen in antibiotikaversetztem Medium nur solche Bakterien überleben, die das resistenzvermittelnde Plasmid tragen. In dieser Arbeit wurden kompetente *E. coli* XL1-blue (Stratagene, Heidelberg) verwendet.

### Durchführung

Zuerst werden die bei -80°C gelagerten *E. coli* XL1-blue langsam über 20-30 min auf Eis aufgetaut und anschließend jeweils 50  $\mu$ l der kompetenten Zellen mit 20  $\mu$ l TE und 8  $\mu$ l von Ligationsansatz 1-3 vermengt. Nach Inkubation auf Eis für 25 min wird der Ansatz für 1 min 45 sec auf 37°C erhitzt. Dieser „Hitzeschock“ bewirkt die eigentliche Aufnahme des Plasmids in die Zellen. Nach Abkühlung auf Eis für 5 min wird dem Ansatz 1 ml 2 x TY zugegeben. Die Regeneration der Zellen erfolgt bei 37°C und 220 rpm für 1 h. Die Kultur wird hiernach bei RT und 3000 x g für 1 min zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das Pellet in 200  $\mu$ l LB-Medium resuspendiert. Dieses wird auf drei mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin versetzten LB-Agarplatten ausplattiert und üN bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen können die transformierten Klone „gepickt“ werden.

#### Picken positiver Klone

Auf den über Nacht inkubierten Agarplatten sind am nächsten Morgen nur solche *E. coli* Klone sichtbar, die resistent gegen das Antibiotikum Ampicillin sind und somit das Plasmid tragen

müssen. Um diese Klone weiter untersuchen zu können, werden Proben entnommen und vermehrt.

#### *Durchführung*

Mit einem autoklavierten Zahnstocher wird jeweils Material aus einer Bakterienkolonie entnommen und in einem Übernachtkulturröhrchen mit 5 ml LB Medium und 100 µg/ml Ampicillin bei 37°C und 180 rpm üN inkubiert.

#### **„Mini-Prep“ zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid Kits von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) wird nach Anleitung des Herstellers die Plasmid-DNA der Klone präpariert und in jeweils 50 µl 3 mM Tris (pH 8,0) eluiert.

#### **Sequenzierung von Plasmid-DNA**

Um zu überprüfen, dass die amplifizierte Nukleotidsequenz von Domäne IV bzw. ECD des HER2/neu - Rezeptors in den Vektoren richtig ist, wurde die zuvor aufgereinigte Plasmid-DNA an die Firma Eurofins (Martinsried, Deutschland) geschickt. Die Plasmide wurden sequenziert und die Nukleotidfolge mit der cDNA verglichen. So konnten Mutationen wie Deletionen oder vertauschte Basen ausgeschlossen werden. Diese könnten andernfalls später zu einer falschen Aminosäuresequenz führen. Weist die DNA 100 % Übereinstimmung mit der cDNA auf, kann sie zur Herstellung rekombinanten Proteins verwendet werden.

### **4.3 Expression und Aufreinigung von Proteinen aus Prokaryoten**

#### **Transformation**

Zur kontrollierten Expression von Proteinen werden kompetente *E. coli* M15[pREP4] verwendet. Das in ihnen enthaltene pREP4 - Plasmid dient als Repressor für Expressionsvektoren wie pQE-100, indem es hohe Level an *lac* Repressorprotein in den Zellen hält. Durch Zugabe einer Substanz, die das *lac* Repressorprotein von seiner Bindung am *lac* Operator des pQE-100 Vektors verdrängt, kann die Expression gezielt induziert werden. In den folgenden Kapiteln werden diese Schritte erläutert. Zusätzlich trägt pREP4 ein Gen, welches Resistenz gegenüber Kanamycin vermittelt und so Verunreinigungen in der Bakterienkultur vermindert. Siehe Kapitel 4.2 für das Protokoll zur Transformation von Plasmiden in kompetente *E. coli*.

#### **Expression rekombinanter Plasmide in *E. coli***

Hierzu wurde das The QIAexpressionist® System von QIAGEN (Hilden, Deutschland) verwendet.

### *Durchführung*

Nach der Transformation des pQE-100 Vektor in *E. coli* M15[pREP4] wurden 5 ml der Übernachtskultur (LB Medium) verwendet, um 250 ml 2 x TY Medium zu beimpfen. Beide Medien enthielten Ampicillin (100 µg/ml) und Kanamycin (25 µg/ml). Die Kultur wuchs bei 37°C und 210 rpm im Inkubator, bis eine OD<sub>600nm</sub> von 0,5 bis 0,7 erreicht war. Nun konnte zur Induktion der Proteinexpression IPTG hinzugegeben werden (500 µl für eine Endkonzentration von 2 mM). Anschließend wurde die Kultur unter den gleichen Bedingungen für weitere 4-5 h inkubiert. Es folgte die Ernte der Zellen durch zentrifugieren bei 4000 x g und RT für 20 min. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen bei -80°C gelagert.

### **Aufreinigung von Proteinen (Ni<sup>2+</sup>-NTA Affinitätschromatographie)**

Das exprimierte Protein, hier zum Beispiel die Domäne IV des HER2/neu - Rezeptors, liegt nach der Induktion in großen Mengen in den *E. coli* Bakterien vor. Nachdem die Zellen lysiert worden sind, nutzt man das zuvor beschriebene Histidin-Tag am N-Terminus des Proteins zu dessen Aufreinigung. Die Methode wird als Affinitätschromatographie bezeichnet. Es handelt sich um eines der effektivsten Verfahren zur Isolation eines Analyten aus einem Stoffgemisch. Als Ligand fungiert Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni<sup>2+</sup>-NTA) - Agarose. NTA interagiert als Chelatbildner intensiv mit dem Nickelion und Histidin. Im basischen Milieu sind vier der sechs Bindungsstellen des Nickelions durch NTA gebunden, die übrigen zwei freien Bindungsstellen können eine stabile Bindung mit dem Histidin-Tag eingehen. Damit der Histidinrest für Reaktionen frei zugänglich ist, werden die Proteine mit denaturierenden Stoffen versetzt. Harnstoff in hoher Konzentration und das Disulfidbrücken reduzierende β-Mercaptoethanol sollen eine Denaturierung der Proteine bewirken. Sobald diese als einfache Polypeptidketten vorliegen, kann eine effiziente Bindung zwischen Histidinresten und Nickelionen erfolgen. Nachdem Proteine, die kein Histidin-Tag tragen, mit den Waschpuffern aus der Säule geschwemmt wurden, kann das relevante Protein geerntet werden. Durch starke Senkung des pH-Wertes werden die Histidinreste protoniert und sind unfähig, weiter an Nickel zu binden. So wird das Protein kontrolliert gelöst. Der Analyt wird spezifisch und mit hoher Ausbeute aufgereinigt.

### *Durchführung*

#### **Präparation des Zell-Lysates**

Die Zellpellets der induzierten *E. coli* M15[pREP4] werden 30 min auf Eis aufgetaut. Pro 1 g Pellet werden 5 ml Puffer 1 (Tab. 1) und 2,6 µl Mercaptoethanol hinzugegeben und das Gemisch für 1 h bei RT auf dem Rotator inkubiert. Anschließend werden mittels Zentrifugation (15 min, 10000 x g, bei 4°C) feste Zellbestandteile vom proteinhaltigen Lysat getrennt. Letzteres wird vorsichtig abpipettiert und in die Chromatographiesäule gefüllt.

#### **Aufreinigung des Proteins**

Die Chromatographiesäule wird mit der zuvor sorgfältig resuspendierten Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose nach Herstellerangaben gefüllt. Nach Hinzugabe von Zell-Lysat wird das Gemisch für 45 min auf dem Rotator inkubiert. Nach einer Ruhezeit von weiteren 45 min hat sich die Agarose

abgesetzt und die übrige Suspensionsflüssigkeit wird durch eine Öffnung am unteren Pol der Säule abgelassen. Es folgen fünf Waschschritte, um die Verunreinigung mit unspezifischen Proteinen zu minimieren. Anschließend wird durch Senkung des pH-Wertes in drei Schritten das Protein von der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose gelöst und eluiert. Sämtliche Eluate wurden nach Durchlaufen der Chromatographiesäule zur weiteren Analyse bei 4°C gelagert.

Siehe untenstehende Tabelle für die Zusammensetzung der verschiedenen für die Ni<sup>2+</sup>-NTA Affinitätschromatographie verwendeten Puffer.

Die Waschschritte erfolgen mit jeweils 80 bis 120 ml Volumen. Der pH-Wert wird durch Zugabe von HCl konsekutiv gesenkt. Die Elution erfolgt mit jeweils 10 ml von Puffer A und B, sowie 40 ml von Puffer C (Tab. 1).

Waschpuffer			
Puffer 1	6 M GuHCl 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM Tris-Cl 0,53 µl/ml β-Mercaptoethanol		pH 8,0
Puffer 2	8 M Urea 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM Tris-Cl 0,53 µl/ml β-Mercaptoethanol		pH 8,0
Puffer 3	siehe Puffer 2		pH 7,0
Puffer 4	siehe Puffer 2		pH 6,4
Puffer 5	siehe Puffer 2		pH 5,9
Elutionspuffer			
Puffer A	siehe Puffer 2		pH 5,4
Puffer B	siehe Puffer 2		pH 4,5
Puffer C	siehe Puffer 2		pH 4,0

**Tabelle 1** Protokoll zur Aufreinigung und Elution von Proteinen mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA Affinitätschromatographie.

#### 4.4 Expression und Aufreinigung von Proteinen aus Eukaryoten

##### Transfektion von Plasmiden in humane Zelllinien

Zur Expression von HER2/neu Domäne IV und ECD in Eukaryoten wurden aus humanem Mammakarzinomgewebe gewonnene, immortalisierte Zelllinien (ZR75-1 und MDA-MB-231) verwendet. Nach Synthetisierung eines entsprechenden Plasmides wird dieses in die Zellen eingeschleust. Der Vorgang des Einbringens von Fremd-DNA wird als Transfektion bezeichnet und entspricht der bakteriellen *Transformation*. Eine Transfektion kann entweder *transient* oder *stabil* sein. Bei einer transienten Transfektion wird die fremde DNA nicht in das Chromosom der Wirtszelle integriert. Daher geht sie im Laufe der Zellteilungen verloren. Bei einer stabilen Transfektion hingegen ist die transfizierte DNA fester Bestandteil des

Chromosoms. Alle folgenden Klone der Zellen werden die kodierten Merkmale ausprägen. Im Rahmen dieser Dissertation wurden Zelllinien ausschließlich transient transfiziert. Da die HER2/neu Domäne IV und ECD beim Vektordesign als sekretorische Proteine konzipiert wurden, wird das synthetisierte Zielprotein in das Zellkulturmedium sezerniert und aus diesem geerntet.

Diese Experimente werden in einer Reinraumwerkbank, der sogenannten *hood*, durchgeführt. Bei der Arbeit mit Zellkulturen muss stets auf eine aseptische Arbeitsweise geachtet werden, um Kontaminationen mit Bakterien, Viren oder anderen Organismen zu verhindern. Die Zellen wurden während der Transfektion in 24 *well* Platten (Volumen/*well* 3,4 ml), danach in T75 Zellkulturflaschen, kultiviert und in eigens dafür vorgesehenen, wasserdampfgesättigten, 5 % CO<sub>2</sub> enthaltenden Inkubatoren bei 37°C gelagert.

### **Ablösen von adhären Zellen (Splitting) und Aussaat**

Die Zelllinien MDA-MB-231 und ZR75-1 sind epithelialen Ursprungs und somit adhären. In vitalem Zustand haften sie den Wänden des Zellkulturgefäßes an und bilden einen einschichtigen Rasen. Die immortalisierten Zellen teilen sich kontinuierlich weiter, wobei eine Verdoppelung der Zellzahl circa alle 24 h erreicht wird. Für Experimente ist eine Konfluenz von 70 - 80 % optimal. Daher werden die Zellen so geteilt, dass diese Vorgabe erreicht werden kann (*splitting*).

#### *Durchführung*

Die Zellen werden zunächst mit PBS gewaschen. Danach wird EDTA auf 50 mM in PBS verdünnt und die Zellen mit 2 - 4 ml dieser *Splitting*-Lösung pro T75 Flasche für 15 min im Inkubator behandelt. Anschließend werden die Zellen durch Beklopfen der Flasche von den Wänden gelöst und in einem 15 ml Falcon bei 22°C und 320 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 5 ml Komplettmedium resuspendiert. Die Zellmenge wird mit der Neubauer - Zählkammer unter dem Mikroskop ermittelt. Hierzu werden 10 µl einer Suspension (100 µl des resuspendierten Pellets 1:10 verdünnt) in die Zählkammer eingebracht. Um 70 – 80% Konfluenz nach 24 h zu erreichen, werden in 1 ml Komplettmedium von MDA-MB-231  $7 \times 10^4$  Zellen, und von ZR75-1  $2,5 \times 10^4$  Zellen pro *well* ausgesät. Zur Vorbereitung der Zellen auf die Transfektion wird DMEM durch 1 ml GAM Medium ersetzt (Adaptationsphase).

### **Herstellung des Transfektionsansatzes**

Als Transfektionsreagenz wird Lipofectin (Thermo Fsher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten) verwendet. Es formt Liposomen, in denen die Vektoren durch die Lipidmembranen der Zellen in deren Inneres geschleust werden können.

#### *Durchführung*

Der Transfektionsansatz wird in sterilen Transfektionsröhrchen mit jew. 100 µl GAM plus 2 µl Lipofectin für 45 min bei RT inkubiert. In einem Parallelansatz werden je 100 µl GAM mit 0,5

$\mu\text{g}$  oder  $1 \mu\text{g}$  Vektor DNA versetzt. Nach Inkubation werden beide Ansätze vereint und nach kräftiger Durchmischung für 15 min bei RT inkubiert.

#### **Transfektionsansatz**

GAM	200 $\mu\text{l}$
Lipofectin	2 $\mu\text{l}$
Vektor DNA	10 $\mu\text{l}$
<hr/>	
Gesamtvolumen	212 $\mu\text{l}$

Die Zellen werden mit PBS gewaschen und anschließend pro *well* 300  $\mu\text{l}$  GAM und der Transfektionsansatz zugeführt. Während der sechsstündigen Inkubation im Brutschrank können die Zellen die Liposomen aufnehmen. Anschließend wird GAM durch 1 ml Komplettmedium ersetzt und die Zellen weiter im Inkubator bebrütet. Nach 72 h kann der Zellkulturüberstand abgenommen werden. Er wird als *konditioniertes* Medium bezeichnet, weil die von transfizierten Zellen sezernierten Proteine enthalten sind.

Da Transfektion und die resultierende Proteinexpression Stress für die Zellen bedeuten, werden sie täglich mikroskopisch beurteilt, um morphologische Auffälligkeiten sowie die Rate abgestorbener Zellen zu beurteilen. Je nach Situation kann mit Protokollmodifikationen reagiert werden.

#### ***Ni<sup>2+</sup>-NTA - Agarose - Aufreinigung von konditioniertem Zellkulturmedium unter nativen Bedingungen***

Mit Hilfe des Histidin-Tags am N - Terminus der rekombinanten Proteine können diese auch unter nicht denaturierenden Bedingungen aufgereinigt werden. So bleibt die dreidimensionale Integrität des Proteins erhalten. Es ist davon auszugehen, dass das rekombinante Protein nur circa 0,1 bis 1 % der Gesamtproteinproduktion von transfizierten Zellen ausmacht und dementsprechend nur in geringer Menge im konditionierten Medium vorliegt. Da die native Konformation des Proteins das Histidin-Tag weniger zugänglich für eine Chelatbildung macht, werden bei der Aufreinigung unspezifische Bindungen begünstigt und die Reinheit des Proteins beträgt maximal 90% (Qiagen 2003).

#### ***Durchführung***

Zunächst werden 200  $\mu\text{l}$  *Ni<sup>2+</sup>-NTA - Agarose - Suspension* mit PBS auf einen neutralen pH in einem 1,5 ml Eppendorftube äquilibriert. Anschließend wird das Gemisch für 1 min bei 1000x g zentrifugiert und die flüssige Phase abpipettiert. Die *Ni<sup>2+</sup>-NTA - Agarose* wird mit 500  $\mu\text{l}$  konditioniertem Medium und 2 mM Imidazol für 2 h auf dem Rotator bei RT inkubiert. Die His getaggten Proteine können nun mit dem *Ni<sup>2+</sup>-NTA* Chelate bilden. Imidazol vermindert unspezifische Bindungen zwischen *Ni<sup>2+</sup>-NTA* und Proteinen mit Histidinen in ihrer Aminosäuresequenz. Nach der Inkubation wird die *Ni<sup>2+</sup>-NTA - Agarose* dreimal mit PBS gewaschen, wie oben beschrieben zentrifugiert und die flüssige Phase abpipettiert. Um nun das aufgereinigte, rekombinante Protein zu lösen, wird die *Ni<sup>2+</sup>-NTA - Agarose* mit 200  $\mu\text{l}$  PBS und 200 mM Imidazol für 2 h auf dem Rotator inkubiert. So wird die Chelatbindung des His



getaggten Proteins und Ni<sup>2+</sup>-NTA aufgehoben. Das Protein befindet sich nach Zentrifugation bei 1500x g und RT für 1 min in der flüssigen Phase. Diese Schritte werden dreimal wiederholt, um möglichst viel Protein zu lösen. Die Lösung mit dem aufgereinigten Protein wird in Zellooseschläuche gefüllt und in PBS üN bei 4°C unter kontinuierlichem Rühren dialysiert. Das Verhältnis von Proteinlösung zu Puffervolumen sollte dabei 1:100 nicht unterschreiten. Anschließend wird das Protein aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### **Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Dieses auch als „SDS-PAGE“ (Abkürzung für englisch *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) bezeichnete Verfahren dient der Auftrennung von Molekülen, vor allem Proteinen, nach ihrer Größe. Als Matrix dient Polyacrylamid (PAA). Es entsteht durch Polymerisation von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid. Unter Anlage eines elektrischen Spannungsfeldes wandern die Proteine durch das Gel. SDS (Natriumdodecylsulfat), ein anionisches, stark negativ geladenes Tensid, kann die Eigenladung der Proteine überdecken. Sie stoßen sich so gegenseitig ab und wandern im Gel alle in Richtung des Pluspols. Denaturierung durch Hitze und Reduktion durch β-Mercaptoethanol dienen ebenfalls der Linearisierung der Proteine. Diese laufen nun in der Geschwindigkeit ihrer Größe entsprechend durch die Gelmatrix. Je nach erwarteter Größe der zu analysierenden Proteine kann man durch Veränderung der Polyacrylamidkonzentration die Dichte und damit Laufgeschwindigkeit in der Matrix verändern. Ein Gel besteht aus zwei Anteilen: dem Sammel- und dem Trenngel. Letzteres dient der Auftrennung nach Molekülgröße, nachdem sich alle Proteine zunächst an der Grenze zwischen großporigem Sammelgel und feinporigem Trenngel gestapelt haben. Als Startsubstanz für die Polymerisation des PAA wird Ammoniumpersulfat (APS) verwendet. Tetramethylethyldiamin (TEMED) dient als Katalysator der Reaktion.

#### *Durchführung*

<b>15 % iges Trenngel (Stärke 1mm)</b>		<b>5 % iges Sammelgel (Stammlösung)</b>	
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) 40%	1,875 ml	Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) 40%	2,5 ml
<i>Aqua dest.</i>	1,777 ml	<i>Aqua dest.</i>	11,95 ml
Tris 1,5 M (pH 8,8)	1,25 ml	Tris-Cl 0,5M (pH 6,8)	5 ml
SDS 10%	0,05 ml	SDS 10 %	200 µl
APS	40 µl		
TEMED	5 µl		
		<hr/>	
		Gesamtvolumen	19,65 ml
<hr/>			
Gesamtvolumen	5 ml		

Nachdem die Glaskammer, in welcher später die Proben durch das PAA-Gel laufen sollen, gereinigt und gemäß Anleitung zusammengebaut wurde, wird die Lösung für das Trenngel eingefüllt und mit 0,5 % SDS bedeckt. Nachdem das Gel vollständig auspolymerisiert ist, wird nach Entfernung des SDS das Sammelgel aufgetragen. Auch hier werden APS und TEMED zum Start der Polymerisation zur Stammlösung hinzugegeben. Zusätzlich wird ein Kamm

eingesetzt, welcher Taschen für die später zu applizierenden Proben formt. Nach Einbringen des Gels in die Elektrophoresekammer und vollständigem Bedecken mit SDS-Puffer wird der Kamm entfernt, und die Geltaschen werden mit Proben beladen.

### Proteinproben

In einem Verhältnis von 2:1 werden die Proteinproben mit 3 x reduzierendem Beladungspuffer versetzt und anschließend bei 95°C für 5 min inkubiert. Die Hitze und das im Puffer enthaltene  $\beta$ -Mercaptoethanol denaturieren die Proteine. Nach Abkühlung auf Eis werden die Geltaschen mit den Proben beladen. Zusätzlich wird peqGOLD Protein-Marker I (peqlab, Erlangen) aufgetragen, um die Größe der jeweiligen Proteine bestimmen zu können. Bei einer Spannung von 150 V laufen die Proteine circa 2 h durch das Gel, bis eine ausreichende Auftrennung erzielt wurde.

### Färbung mit Coomassie

Um die Proben auf dem Gel sichtbar zu machen, wurde der Farbstoff *Coomassie* verwendet. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,1 - 0,5  $\mu$ g Protein pro Bande in einem Polyacrylamidgel.

### Durchführung

Vor dem Färbeprozess wird das Gel zunächst mit einer Fixierlösung behandelt. Sie verhindert das Auswaschen der Proteine in den weiteren Behandlungsschritten. Anschließend wird das Gel für circa 1 Stunde in der Färbelösung inkubiert. Danach erfolgt unter konstantem Schwenken das Entfernen von überschüssigem Farbstoff über ungefähr 20 h. Nach dem Einlegen in Trockenlösung werden die Gele bei 60°C für 45 min getrocknet.

Fixierlösung	Entfärbelösung	Färbelösung	Trockenlösung
40% Ethanol 10% Essigsäure <i>Aqua dest.</i>	10% Essigsäure <i>Aqua dest.</i>	10% Essigsäure 0,1% Coomassie <i>Aqua dest.</i>	25% Glycerin 5% Ethanol <i>Aqua dest.</i>

## 4.5 Rückfaltung rekombinanter Proteine

### Rückfaltung der rekombinanten Domäne IV des HER2/neu - Rezeptors

Die von *E. coli* M15[pREP4] synthetisierten Proteine liegen nach der Reinigung (s. Kap. 4.3) in denaturiertem Zustand als Polypeptidketten vor und sind funktionell inaktiv. Proteine müssen sich in einem bestimmten Faltungszustand befinden, um ihre vielfältigen Funktionen ausführen zu können. Welche Form sie annehmen, wird unter anderem von ihrer Aminosäuresequenz und Ladungsverteilungen bestimmt. Die sich daraus ergebende native Konformation ist zudem der energetisch günstigste Zustand und kann in vitro in einem künstlichen Rückfaltungssystem mit einem Redoxsystem erreicht werden. Dazu werden verschiedene Dialyseschritte verwendet, die den stark denaturierenden Harnstoff langsam aus der Proteinlösung filtrieren und gleichzeitig mit einem Redoxsystem verschiedene

Protonierungs- und dadurch Faltungsmöglichkeiten bereitstellen. Vor Beginn der Rückfaltung spaltet Dithiothreitol (DTT) eventuell noch bestehende Disulfidbrücken und dient somit der gänzlichen Entfaltung von Proteinen. Das Eluat aus der Aufreinigung wird in einen Dialyseschlauch aus regenerierter Zellulose gefüllt und in ein Puffersystem gelegt. Schrittweise wird durch verschiedene Pufferlösungen der Harnstoff entzogen und das Protein kann sich rückfalten. Als Qualitätskontrolle dient zum einen der optische Aspekt, da nicht korrekt gefaltete Proteine in der Regel nicht löslich sind und sichtbare Präzipitate bilden. Zum anderen kann in Antikörper-Antigen-Bindungsanalysen, wie zum Beispiel dem *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA), die funktionell korrekte Rückfaltung geprüft werden.

### Durchführung

Zunächst wird die Proteinlösung mit 2 M DTT versetzt (Endkonzentration: 10 mM DTT). Der Dialyseschlauch (Zellutrans, Flachbreite 19 mm, Fa. Roth, Karlsruhe) sollte eine Porengröße von einem Drittel der Größe des rückzufaltenden Proteins aufweisen. Die Proteinkonzentration im Dialyseschlauch sollte bei 100-200 µg pro Milliliter liegen. Nach Einweichen der Zellulosemembran in *Aqua dest.* wird der Schlauch befüllt und nach dem dargestellten Schema konsekutiv in Puffern verschiedener Zusammensetzung inkubiert (Tab. 2). Der Stoffaustausch erfolgt nach dem Prinzip der Diffusion über eine semipermeable Membran. Die Proteinlösung wurde nach abgeschlossener Rückfaltung aliquotiert und bei -20°C für weitere Analysen gelagert.

Rückfaltungspuffer				
	Puffer 1	4 M Urea 350 mM NaCl 250 mM L-Arginin 50 mM Glycin 5 mM Glutathion, reduziert 0,25 mM Glutathion, oxidiert 2,2 mM CaCl <sub>2</sub> 2 mM MgCl <sub>2</sub> 50 µM ZnCl <sub>2</sub> 0,005 % Tween 20 ultra	pH 8,0	24 h
	Puffer 2	2 M Urea wie Puffer 1	pH 8,0	24 h
	Puffer 3	1 M Urea wie Puffer 1	pH 8,0	72 h
Lagerungspuffer				
	1. Durchgang	100 mM NaCl 50 mM Tris	pH 8,0	18 h
	2. Durchgang	100 mM NaCl 50 mM Tris	pH 8,0	8 h

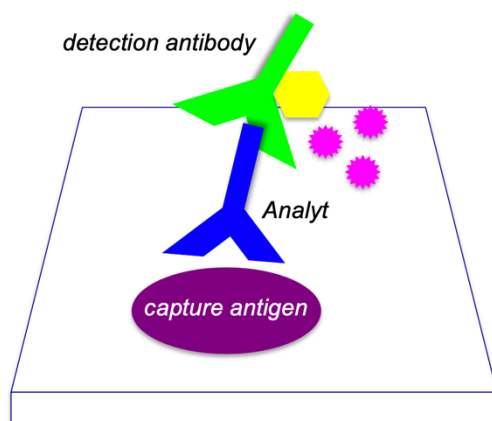
**Tabelle 2** Protokoll für die Rückfaltung der rekombinanten Domäne IV des HER2/neu-Rezeptors.

Das Volumen der Puffer beträgt jeweils 2 Liter. Während der Dialyse wird die Lösung auf 4°C gekühlt und durch kontinuierliches Rühren in Bewegung gehalten.

#### 4.6 ELISA - enzyme linked immunosorbent assay

Der ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren. Es dient der Detektion und Quantifizierung von Proteinen. Deren antigene Eigenschaften werden genutzt, indem spezifische Antikörper an die relevanten Proteine binden. Diese Antikörper vermitteln dann Folgereaktionen, die den Proteinnachweis messbar machen. Es gibt viele verschiedene Modifikationen dieses Assays für die große Vielfalt an Proteinen, die auf diese Art nachgewiesen werden können. Im Folgenden soll zunächst das Grundprinzip des klassischen Sandwich-ELISA erläutert werden.

Beim ersten Schritt, dem *coating*, wird der Boden einer 96 *well* Mikrotiterplatte (von engl. *well* für Schacht) aus lichtdurchlässigem Polystyrol mit einer Antikörperlösung bedeckt und inkubiert, bis diese fest anhaften. Man nennt sie *capture antibody*. Es folgt ein Waschschrift. Danach wird eine Proteinlösung aufgetragen, die keine antigenen Eigenschaften für die verwendeten Antikörper besitzt. Sie blockt noch freie Stellen an Boden und Wänden des *wells*, um unspezifische Reaktionen zu verhindern. Anschließend wird die Platte erneut gewaschen. Nun kann die Lösung mit dem nachzuweisenden Antigen, also dem relevanten Protein, aufgetragen werden. Es wird von dem *capture antibody* „eingefangen“. Nach dem Waschen verbleibt nur der Antikörper-Antigen Komplex in den *wells*. Es folgt der *detection antibody*. Um Interferenzen zu vermeiden, sollte dieser gegen ein anderes Epitop gerichtet sein als der *capture antibody*. Nach dem Waschen liegt ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex vor. Ähnlich einem Sandwich. Es folgt ein Substrat, welches durch die enzymatische Aktivität des an den *detection antibody* gekoppelten Enzyms umgesetzt wird. Meist handelt es sich um chromogene Substanzen, welche einen Farbumschlag bewirken. Dieser kann dann durch Absorptionsmessungen photometrisch quantifiziert werden und gibt Aufschluss über die Menge des Antigens. Um genau quantifizieren zu können, werden Eichkurven mit Standards bekannter Konzentration erstellt und später die Werte der Analyten mit Ihnen verglichen. In dieser Arbeit wurde hauptsächlich ein modifizierter Assay, der *one-sided ELISA* verwendet, welcher im Folgenden beschrieben wird (Abb. 8).



**Abbildung 8 Schematische Darstellung one-sided ELISA.**

Lila: *capture antigen* (rekombinanter HER2/neu-Rezeptor). Blau: Analyt (Trastuzumab). Grün: *detection antibody* mit enzymatischer Aktivität (gelb). Magenta: Substrat.

### **one-sided ELISA zum Nachweis von Trastuzumab**

Bei diesem Assay wird das formale Antigen, also die HER2/neu Domäne IV, als „*capture antigen*“ anstatt eines *capture antibodies* direkt auf die Böden der Mikrotiterwells gecoatet. Diese Modifikation erfolgte, weil der Antikörper Trastuzumab als Antigen bei diesem Ansatz nachgewiesen und quantifiziert wird. Die Messwerte wurden tabellarisch aufgetragen und mit Excel (Microsoft) bearbeitet und dargestellt.

#### *Durchführung*

Zunächst werden die 96 *well* Mikrotiterplatten über Nacht mit 100 µl in Puffer verdünnter, rekombinanter Domäne IV oder ECD des HER2/neu - Rezeptors (mind. 0,2 µg/ml) gecoatet. Am nächsten Tag wird die Mikrotiterplatte dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Dazu wird sie in einem 45° Winkel gehalten und vorsichtig übergossen, anschließend umgedreht und leicht ausgeklopft. Das im Waschpuffer enthaltene Tween 20 dient als Detergens zur Minimierung unspezifischer Bindungen in den *wells*. Anschließend werden durch Blocken für 1 h mit jeweils 200 µl TBS plus 2% *bovine serum albumin* (BSA) oder *fetal calf serum* (FCS) die noch nicht gesättigten Flächen der *wells* bedeckt. BSA und FCS tragen keine Antigene, die mit Anteilen des Her2/neu - Rezeptors oder den verwendeten Antikörpern interferieren würden. Nach erneutem Waschen werden Standards wie Trastuzumab versetzter Puffer oder Serum sowie Negativkontrollen aufgetragen. Nach der Inkubation über 1 h wird erneut gewaschen. Während der Inkubationen sind die Platten stets mit einem *plate sealer* abgedeckt, um Kontaminationen zu vermeiden.

Als *detection antibody* werden für Trastuzumab als humanisierten Antikörper anti-human IgG-Peroxidasen (POD) und Alkalische Phosphatasen verwendet. Die Peroxidasen werden für 1 h bei RT inkubiert und die Platte für diese Zeit zum Schutz vor Lichteinfall abgedeckt. Nach erneutem Waschen wird das chromogene Substrat für die Peroxidase 1:1 gemischt und 200 µl/*well* aufgetragen (TMB Peroxidase Substrate und Substrate Solution von Thermo Fisher Inc. (Rockford, IL, Vereinigte Staaten)). Es enthält Wasserstoffperoxid, welches von der Meerrettichperoxidase umgesetzt wird. Die durch ihre Aktivität freigesetzten Protonen oxidieren das im Substrat enthaltene Chromogen und bilden ein farbiges Molekül. Nach 1 h wird die Reaktion mit 50 µl 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt. Die Messung der Extinktion und somit Quantifizierung des aufgetragenen Trastuzumab erfolgt bei 450 nm in einem Photometer (TECAN Spectra Reader). Der anti-human IgG-Alkalische Phosphatase (AP) dient in Trispuffer aufgelöstes *p*-Nitrophenylphosphat (pNPP) als Substrat. Durch Abspaltung eines Phosphatrestes entsteht *p*-Nitrophenol, ein farbiges Molekül, dessen Extinktion nach 1 h Inkubation bei 405 nm im Photometer gemessen wird. Während der Inkubation mit AP und ihrem Substrat wird die Mikrotiterplatte lichtdicht abgedeckt. Die Konzentration der *detection antibodies* sollte nach Herstellerangaben so gewählt werden, dass nach 1h Inkubation eine OD von 1-3 erreicht wird (Tab. 3, 4).

<i>coating</i>	HER2/neu Domäne IV Carbonatpuffer (pH 9,5)	100 µl/well	ün bei 4°C
Waschen	TBS + 0,05% Tween 20 (TBST)		3 x bei RT
Blocken	TBS + 2% BSA/FCS	200 µl/well	1h bei RT
Waschen	TBST		3 x bei RT
Trastuzumab	In Serum oder TBST + 0,5% BSA/FCS	100 µl/well	1h bei RT
Waschen	TBST		3 x bei RT
<i>detection antibody</i>	anti-human IgG-Peroxidase in TBST + 0,5% BSA/FCS (1:10 000)	100 µl/well	1h bei RT
Waschen	TBST		3 x bei RT
Substrat	TMB Peroxidase Substrate / Substrate Solution (1:1)	200 µl/well	1 h bei RT
Reaktionsstop	0,5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	50 µl/well	3 x bei RT
Messung	Photometer		bei 450 nm

**Tabelle 3 Protokoll *one-sided* ELISA mit HER2/neu Domäne IV.**

Modifikationen des Protokolls werden im Fortgang explizit erwähnt.

<i>coating</i>	HER2/neu ECD (0,5 oder 1 µg/ml) PBS	100 µl/well	ün bei 4°C
Waschen	PBS + 0,05% Tween 20 (PBST) + 0,1% FCS		3 x bei RT
Blocken	PBS + 2% FCS	200 µl/well	1h bei RT
Waschen	TBST + 0,1% FCS		3 x bei RT
Trastuzumab	In Serum oder PBS + 2% FCS	100 µl/well	1h bei RT
Waschen	PBST + 0,1% FCS		3 x bei RT
<i>detection antibody</i>	anti-human IgG-AP in 1 M NaCl (1:1000)	100 µl/well	1h bei RT
Waschen	PBST + 0,1% FCS		3 x bei RT
Substrat	1 Tbl. pNNP + 1 Tbl. Trispuffer in 20 ml <i>Aqua dest.</i>	100 µl/well	1 h bei RT
Messung	Photometer		bei 405 nm

**Tabelle 4 Protokoll *one-sided* ELISA mit HER2/neu ECD.**

Diesem Protokoll liegt ein von Fr. K. Mengele entwickelter ELISA zugrunde, welcher mit der ehemals von Roche (Grenzach-Wyhlen) vertriebenen HER2/neu ECD etabliert wurde. Modifikationen des Protokolls werden im Fortgang explizit erwähnt.

#### 4.7 Assayvalidierung

Um einen ELISA bezüglich seiner Reproduzierbarkeit bewerten und im Fortgang Qualitätssicherung betreiben zu können, sollten stets die folgenden drei Grundsätze beim Plattendesign berücksichtigt werden (FDA 2018): Jede Messung sollte aus Replikaten erfolgen ( $n > 1$ ). Zudem sollten stets *wells* für die Messung des *backgrounds* angelegt werden. Aus ihnen wird später der Schwellenwert berechnet. Zu jeder Probenmessung gehört die parallele Messung von Standards im selben Lauf. Im Folgenden wird die für die Assayvalidierung essentielle Terminologie erläutert. In Tabelle 5 sind dann die einzelnen Parameter der Assayvalidierung übersichtlich dargestellt.

##### Standard und Probe

Als *Standard* bezeichnet man eine Lösung, welche den nachzuweisenden Analyten, in diesem Fall Trastuzumab, in bekannter Konzentration enthält. Die *Probe* ist ein Gemisch mit unbekannter Konzentration des Analyten, welche im Assay quantifiziert werden soll. Ein *blank* ist ein geblocktes *well* gefüllt mit Standardlösung ohne Analyten (Null-Standard).

##### Matrix

Als *Matrix* bezeichnet man das den Analyten enthaltende Medium. Sie kann komplex (z.B. Serum) oder einfach (z.B. 0,5 M NaCl) sein. Bei komplexen Matrices wie Serum wird häufig ein *Matrixeffekt* beobachtet. Dies sind falsch gemessene Werte für den Analyten. Die vielen unterschiedlichen Moleküle in der komplexen Matrix sind problematisch, da sie an sich eine hohe Absorption und darüber hinaus unspezifische Interaktionen bewirken können. Falsch (hohe) Extinktionsmessungen sind die Folge. Da Serum unverdünnt im ELISA zu hohe Matrixeffekte bedingt, wird es in Puffer verdünnt und die Messdaten um den Grad der Verdünnung korrigiert.

##### **Background, Schwellenwert und untere Nachweisgrenze (Armbruster et al. 2008).**

Der *background* (*limit of blanks*, LoB) beschreibt die Extinktion, die in einem leeren *well* (kein *capture antigen*) mit einem Standard, der keinen Analyten enthält, entsteht (*blank* oder Negativkontrolle).

Berechnung:  $LoB = \bar{x}_{blank} + 1.645 (SD_{blank})$

$\bar{x}$  = arithmetischer Mittelwert aller Messwerte

SD = Standardabweichung der Messwerte

Der Schwellenwert (*limit of detection*, LoD), auch als Toleranzgrenze bezeichnet, trifft eine Aussage darüber, ab wann eine Probe als positiv gilt.

Berechnung:  $LoD = \bar{x}_{blank \text{ oder Null-Standard}} + 2 * SD_{blank \text{ oder Null-Standard}}$

Die untere Nachweisgrenze (*lower level of quantification*, LLOQ) bildet die niedrigste, noch zuverlässig messbare Konzentration des Analyten im Assay. Der Variationskoeffizient (CV) für diese Messungen muss bei <25 % liegen (FDA 2018). Die untere Nachweisgrenze muss für jeden Assay individuell bestimmt werden.

### ***Intra- und Interassayvarianz***

Diese Werte dienen der Bestimmung der Reproduzierbarkeit von Messergebnissen innerhalb eines Assays (*intra*) und in verschiedenen zeitlich voneinander unabhängigen Assays (*inter*). Gemessen werden die zu diesem Zweck hergestellten Qualitätskontrollen (QC, Standards mit verschiedenen Analytenkonzentrationen). Hierzu wurden stets mindestens zwei Wertpaare verwendet. Zur Berechnung der Varianz wird folgende Formel angewendet:

$$CV \% = SD/x * 100$$

CV % = Variationskoeffizient in %

x = arithmetischer Mittelwert aller Messwerte<sub>QC</sub>

SD = Standardabweichung der Messwerte<sub>QC</sub>

Die Zielwerte für Intraassayvarianz und Interassayvarianz in der Literatur liegen bei <10% und <15% (Gauchez et al. 2008, Jamieson et al. 2009), für den mit unserem Ansatz am besten vergleichbaren Assay lagen die Werte bei <20 % (Maple et al. 2004). Für Liganden-bindende Assays liegt die allgemeine Empfehlung für den CV % bei <20 % im dynamischen Messbereich und <25 % im Bereich der unteren (LLOQ) bzw. der oberen Nachweisgrenze (ULOQ) (FDA 2018).



**Tabelle 5 Schematische Übersicht und Erläuterung der wichtigsten zur Assayvalidierung herangezogenen Parameter, modifiziert nach U. S. Food and Drug Administration (FDA 2018).**

Parameter	Bedeutung	Ermittlung	Zielwerte
<b>Standardkurve</b>	<p>Während der Assayentwicklung ist das Erzielen einer Standardkurve Grundvoraussetzung („proof of principle“) für weitere Validierungsschritte.</p> <p>Während der Assayvalidierung und der späteren Messung von Proben dient das Mitführen der Standardkurve sowohl der Qualitätssicherung als auch der Festlegung des Messbereichs für Proben. Standards bestehen aus der gleichen Matrix wie Proben.</p> <p>Alle Messungen erfolgen mind. als Duplikate.</p>	<p>1 Negativkontrolle und 6 Standards mit Analytenkonzentrationen im Messbereich des Assays. Davon muss ein Standard die untere Nachweisgrenze abdecken.</p> <p>Berechnung der gemessenen Konzentrationen mit 4-Parameter-Logistikfunktion (4PL). Zum Beispiel mit im Internet erhältlicher kostenloser Software (<a href="https://www.elisaanalysis.com">https://www.elisaanalysis.com</a>).</p>	<p>Für die Standards gilt:</p> <p><math>\pm 20\%</math> der zuvor errechneten, theoretischen Konzentration.</p> <p><math>\pm 25\%</math> der zuvor errechneten, theoretischen Konzentration im Bereich des LLOQ und ULOQ</p>
<b>Qualitätskontrollen (QC)</b>	<p>Dienen der Überwachung der Testperformance.</p> <p>Als Qualitätskontrollen (QC) dienen Standards am LLOQ, ULOQ, sowie mit geringer (L), mittlerer (M) und hoher (H) Analytenkonzentration.</p>	<p>Zur Testung der Inter- und Intraassayvariabilität während Assayoptimierung: Messung aller QCs mit mind. 3 Replikaten in 6 Läufen.</p> <p>Zur einfachen Validierung und parallel zur Probenmessung: 3 QCs (L, M und H) in Duplikaten</p>	<p>Für die Qualitätskontrollen gilt:</p> <p><math>\pm 20\%</math> der zuvor errechneten, theoretischen Konzentration bei <math>\geq 67\%</math> der Messungen.</p> <p><math>\geq 50\%</math> pro QC sollen innerhalb <math>\pm 20\%</math> der zuvor errechneten, theoretischen Konzentration liegen.</p>
<b>Spezifität</b>	<p>Dient dem Nachweis, dass gemessene Substanz tatsächlich der Analyt ist und keine Kreuzreaktivitäten dessen Messung behindern.</p>	<p>Funktionelle Tests mit Identifikation des <i>capture antigens</i> und Analyten im Assay.</p>	<p>Extinktion höher als das Zweifache des <i>backgrounds</i></p> <p><math>\pm 25\%</math> der zuvor errechneten, theoretischen Konzentration im Bereich des LLOQ und ULOQ</p>

<b>Selektivität</b>	Ausschluss von Interaktion der Matrix (z.B. Serum) mit dem Analyten. Negativkontrollen werden in geblockten <i>wells</i> gemessen.	Verwendung von Matrix (z.B. Serum) verschiedener Quellen als Negativkontrollen.	> 80 % der gemessenen Negativkontrollen sollen unterhalb des Schwellenwertes liegen.
	Parallelismus ist gegeben, wenn die Messung von Standards in verschiedenen Verdünnungsstufen der Matrix nach Korrektur um den Verdünnungsfaktor reliabel die gleiche Konzentration ergibt.	Messung von Standardkurven (s.o.) in verschiedenen Verdünnungsstufen.	Die gemessene Analytenkonzentration der Standards soll im Bereich $\pm 20\%$ , bzw. für LLOQ und ULOQ, $\pm 25\%$ der zuvor errechneten, theoretischen Konzentration liegen.
	Linearität der Verdünnung Der Analyt wird hier in Standardmatrix ebenso erkannt wie in Probenmatrix.	Messung von Standardkurven (s.o.) in verschiedenen Matrices.	Die gemessene Analytenkonzentration der Standards soll im Bereich $\pm 20\%$ , bzw. für LLOQ und ULOQ, $\pm 25\%$ der zuvor errechneten, theoretischen Konzentration liegen.
<b>Sensitivität</b>	Der niedrigste, noch zuverlässig messbare, Nicht-Null-Standard entspricht der unteren Nachweisgrenze (LLOQ).	Messung in mind. drei Replikaten und 6 Läufen.	Der Variationskoeffizient (CV %) soll $\pm 25\%$ der zuvor errechneten, theoretischen Konzentration betragen.
<b>Inter- und Intraassayvariabilität (Precision)</b>	Diese Werte dienen der Beurteilung der Reproduzierbarkeit von Messergebnissen innerhalb eines Assays ( <i>intra</i> ) und in verschiedenen zeitlich voneinander unabhängigen Assays ( <i>inter</i> ).  Die Inter- und Intraassayvariabilität wird bereits während der Entwicklung eines Assays bestimmt. Werden die Zielvorgaben für die QCs (L, M und H sowie LLOQ und ULOQ) erfüllt, kann die weitere Validierung für die spätere Messung von Proben eingeleitet werden.	Zur Testung der Inter- und Intraassayvariabilität während der Assayoptimierung: Messung aller QCs mit mind. 3 Replikaten in 6 Läufen.  $CV \% = SD/x * 100$  $CV \% = \text{Variationskoeffizient in } \%$ $x = \text{arithmetischer Mittelwert aller Messwerte}_{QC}$ $SD = \text{Standardabweichung der Messwerte}_{QC}$	$CV \pm 20\%$ der zuvor errechneten, theoretischen Konzentration.  $CV \pm 25\%$ der zuvor errechneten, theoretischen Konzentration im Bereich des LLOQ und ULOQ.

#### 4.8 *semi dry* Westernblot

Als Westernblot bezeichnet man ein Verfahren zum Nachweis von Proteinen. Diese werden zunächst in einem SDS Gel mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und dann durch elektrische Spannung von dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran *geblottet*, also übertragen. Das *geblottete* Protein lässt sich, analog zum ELISA, mit Antikörpern nachweisen. Die Visualisierung des Proteins geschieht durch Chemolumineszenz (ECL Substrat von Pierce, Thermo Fisher Scientific Inc., IL, Vereinigte Staaten). Das emittierte Licht wird in speziellen, lichtdichten Entwicklungsmappen direkt auf einen Film übertragen und dieser anschließend wie ein Foto entwickelt. Menge und auch molekulare Größe des Proteins werden so sichtbar gemacht. Als *semi dry* bezeichnet man einen Westernblot, bei dem nur die Blotpapiere flüssigkeitsgetränkt sind, während ein *Tank-Blot* in einer flüssigkeitsgefüllten Kammer durchgeführt wird.

##### *Durchführung*

Ein 15% SDS - Trenngel wird für die Gelelektrophorese mit Proben und einem Proteinmarker beschickt und läuft in der bereits beschriebenen Gelelektrophoresekammer. Nach Auftrennung der Proteinbanden nach Größe wird das Gel auf die Nitrozellulosemembran gelegt. Die zuvor in Anoden- bzw. Kathodenpuffer eingelegten Blotpapiere werden dahinter bzw. davor gelegt, und in der Westernblotkammer (Fast Blott, Biometra) fixiert. An diese werden für 2 h 75 mA Strom angelegt. Die Proteine wandern nun vom Gel auf die Blotmembran in Richtung Anode. Nach Übertragung der Proteine folgt das Blockieren der Membran mit 10 ml PBS + 5% Milchpulver für 1 h bei RT auf einer Schüttelplatte oder alternativ  $\text{üN}$  bei 4°C, um alle freien Bindungsstellen in der Membran mit unspezifischem Protein zu sättigen. Die Membran wird anschließend dreimal für 10 min in PBS + 1% Milchpulver gewaschen. Es folgt die Inkubation mit dem ersten Antikörper. Hier wird ein anti-Penta His Antikörper verwendet, welcher 1:1.000 in 5 ml PBS + 1% Milchpulver verdünnt und  $\text{üN}$  bei 4°C, oder alternativ 1 h bei RT, auf einer Rüttelplatte inkubiert wird. Alternativ kann Trastuzumab auf 100 ng/ml in 5 ml PBS + 1% Milchpulver verdünnt und inkubiert werden. Anschließend wird die Membran wie zuvor beschrieben gewaschen und mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Bei der Ziege anti-Maus Peroxidase zum Nachweis des anti-Penta His Antikörpers wird eine Verdünnung von 1:10.000 in 5 ml PBS + 1% Milchpulver gewählt und für 1 h bei RT inkubiert. Zum Nachweis von Trastuzumab wird in 5 ml PBS + 1% Milchpulver anti-human IgG Peroxidase 1:10.000 verdünnt und wie zuvor beschrieben inkubiert. Die Membran wird erneut gewaschen und vorsichtig abgetupft, um überschüssige Flüssigkeit zu entfernen. Unmittelbar vor dessen Einsatz wird ECL Substrat 1:1 angemischt und 1,5 ml auf die Proteinseite der Blotmembran pipettiert. Nach 1 min wird überschüssiges Substrat mit einem weichen Zellulose Tuch vorsichtig abgenommen. Die Membran wird in eine lichtdichte Entwicklungsmappe gelegt und mit einem Film bedeckt. Dieser wird nach 40 sec entfernt und entwickelt. Je nach Bedarf können weitere Filme mit variierenden Belichtungszeiten entwickelt werden.

#### **4.9 Gewinnung von humanen Serumproben**

Zur Gewinnung von humanem Serum wurde freiwilligen ProbandInnen (n = 6) unter aseptischen Bedingungen 14 ml venöses Vollblut aus der Armvene entnommen und nach Einsetzen der Gerinnung bei 4°C und 2.000 x g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum abpipettiert, in Eppendorfgefäße zu je 1 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert. Um die Verunreinigung durch korpuskuläre Bestandteile zu vermeiden, wurde mindestens 1 cm der Serumphase oberhalb des Blutkuchens belassen.

Bei Entnahme der Proben lagen anamnestisch keine Infektionskrankheiten und keine Erkrankungen aus dem rheumatischen oder autoimmunen Formenkreis vor. Auch die letzte Impfung lag länger als 12 Wochen zurück. Die ProbandInnen wurden nie zuvor mit Trastuzumab oder anderen Antikörpern therapiert. Es kann dementsprechend davon ausgegangen werden, dass die Zusammensetzung der Immunglobuline im Blut der ProbandInnen keine pathologischen Veränderungen aufweist.

Bei den Patientenproben (genannt 5-2 und 5-4) stammt das Serum von Patientinnen mit Mammakarzinom, die mit Trastuzumab behandelt wurden. Sie wurden freundlicherweise von der Frauenklinik der LMU Campus Großhadern zur Verfügung gestellt. Der Abstand zwischen Trastuzumabgabe und Blutentnahme war nicht bekannt.

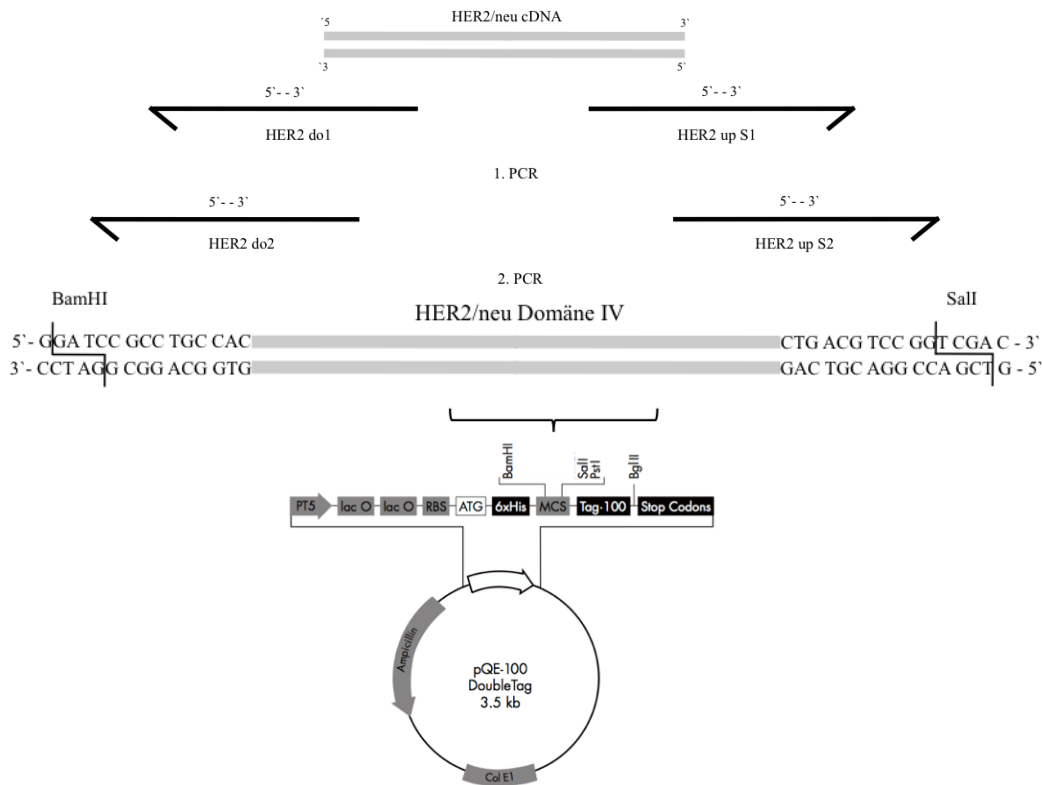
## **5 Ergebnisse**

### **5.1 Klonierung der HER2/neu Domäne IV in den prokaryotischen Expressionsvektor pQE-100**

In Anbetracht der multiplen Klonierungssequenz (Polylinker) des Vektors pQE-100 und Nukleotidsequenz des Inserts HER2/neu Domäne IV wurden die Restriktionsendonukleasen Bam HI und Sal I gewählt. Beide Restriktionsschnittstellen kommen im Insert nicht vor und entsprechen singulären Restriktionsschnittstellen im Polylinker, erlauben also eine gerichtete Klonierung des Inserts. Die Klonierungsstrategie zur Synthetisierung der Schnittstellen und DNA-Multiplikation ist in Abbildung 9 dargestellt.

#### **Klonierung**

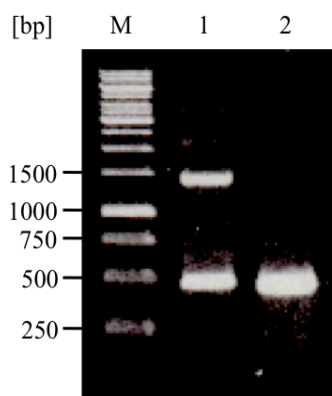
Als *template* (*engl.*; Vorlage) für die PCR wurden 26 ng cDNA des HER2/neu - Rezeptors eingesetzt. Es wurden zwei aufeinander folgende PCRs durchgeführt. Der erste Lauf diente der Amplifikation des Domäne IV kodierenden Genabschnittes (AS 510 – 653), die zweite PCR der Synthese von Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Bam HI und Sal I an beiden Enden des amplifizierten DNA Fragmentes (Abb. 10). Anschließend wurde die amplifizierte DNA mittels PCI-Extraktion, Proteinase K-Verdau und erneuter PCI-Extraktion aufgereinigt und dann mit Ethanol gefällt. Vektor und Insert wurden mit den Restriktionsenzymen Bam HI und Sal I gespalten und anschließend ein präparatives Agarosegel angefertigt. Um UV-bedingte Schädigungen (Thymidin-Dimere) der zu ligierenden DNA zu minimieren, wurde auf Abfotografieren des Agarosegels verzichtet. Vektor und Insert wurden anschließend mit T<sub>4</sub>-Ligase ligiert.



**Abbildung 9 Klonierung von HER2/neu Domäne IV in den pQE-100 Vektor.**

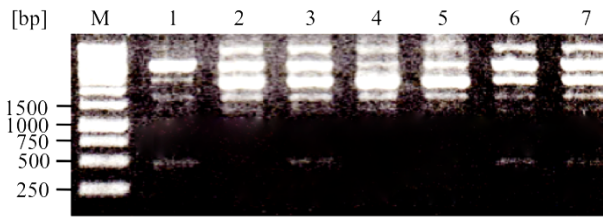
PCR, Inkubation des PCR Produktes mit den Restriktionsendonukleasen Bam HI und Sal I und Ligation in den pQE-100 Vektor.

Nach Transformation in kompetente *E. coli* XL1blue Zellen und deren Ausplattierung auf Agarplatten, wurden nach Inkubation die Klone 1-7 selektiert. Die Restriktionsanalyse der Plasmid-DNA dieser Klone ergab, dass Klon Nummer 1, 3, 6 und 7 Vektor und Insert trugen (Abb. 11). Klon 3 wurde im Folgenden zur Sequenzierung geschickt. Diese ergab eine 100% Übereinstimmung mit der cDNA inklusive N- und C-terminalen Sequenzen des Expressionsvektors (N-terminal: Histidin-Tag; C-terminal: Tag 100-Epitop) (Abb. 12).



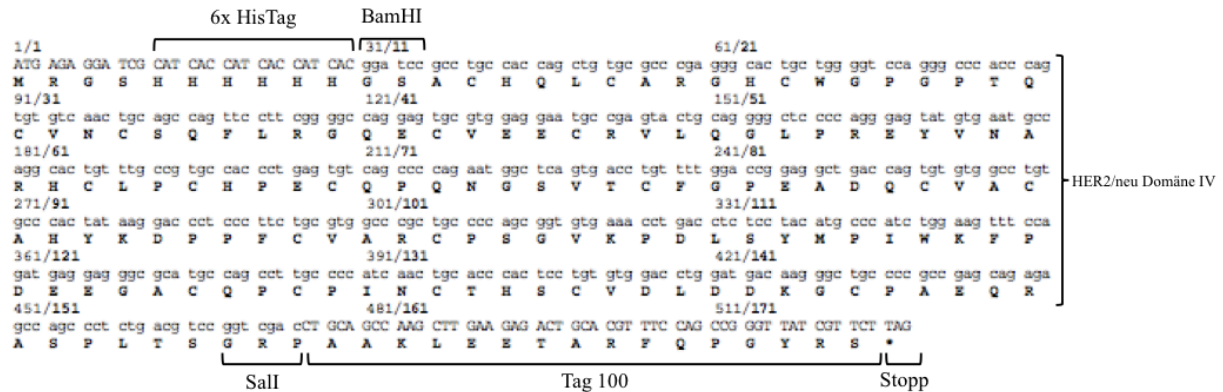
**Abbildung 10 Klonierung von pQE-100 HER2/neu Domäne IV (Agarosegel).**

M: 1 kb DNA-Marker, 1: Produkt der 2. PCR mit HER2/neu Domäne IV bei ca. 450 bp und zusätzlicher, unspezifischer Bande bei ca. 1500 bp 2: Produkt der 1. PCR. Die mit Pfeil markierten Banden entsprechen der HER2/neu Domäne IV



**Abbildung 11 Restriktionsanalyse von pQE-100 HER2/neu Domäne IV mit Bam HI und Sal I, Klone 1 bis 7 (Agarosegel).**

M: 1 kb DNA Marker, die Spuren 1 bis 7 entsprechen den Klonen 1 bis 7. Die oberen Banden im Bereich von ca. 2500 bp zeigen den (unvollständig gespaltenen) Vektor pQE-100. Die mit Pfeil markierte ca. 500 bp große Bande bei Klon 1, 3, 6 und 7 entspricht dem Insert HER2/neu Domäne IV.



**Abbildung 12 Sequenzierungsergebnis des Inserts HER2/neu Domäne IV aus Vektor pQE-100.**

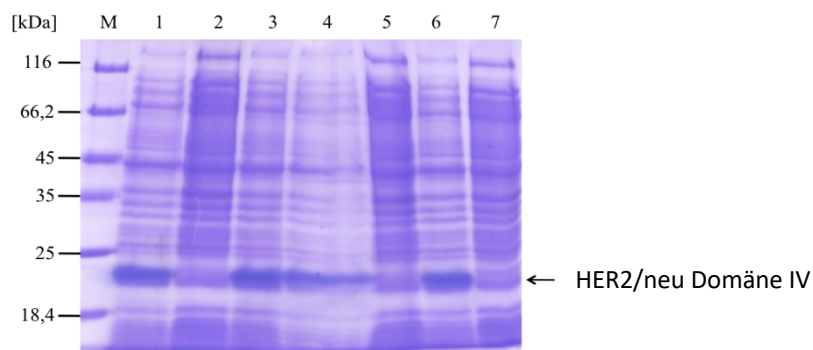
Nach Klonierung des PCR Fragmentes entsteht im Expressionsvektor pQE-100 ein offener Leserahmen mit N-terminalem Histidin-Tag des Expressionsvektors für die Aufreinigung des rekombinanten Proteins, gefolgt von der Sequenz für HER2/neu Domäne IV und C-terminaler Sequenz des Expressionsvektors, dem Tag 100-Epitop. Dieses dient der Detektion des rekombinanten Proteins mittels eines gegen dieses Epitop gerichteten monoklonalen Antikörpers

### Expression und Aufreinigung

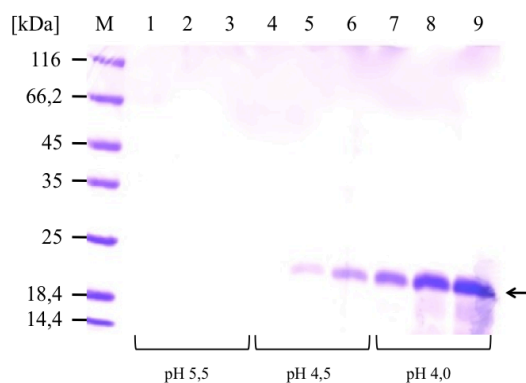
Nach Transformation von pQE-100 HER2/neu Domäne IV in *E. coli* M15[pREP4] wurde die Expression des rekombinanten Proteins mit IPTG induziert. Die Zellproben wurden anschließend lysiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Es wurden parallel Negativkontrollen mitgeführt, welche nicht mit IPTG induzierten Bakterienkulturen entsprechen (Abb. 13). In Spur 1, 3, 4 und 6 ist im Vergleich zu den Negativkontrollen deutlich erkennbar, dass rekombinantes Protein stark produziert wird.

### Aufreinigung von HER2/neu Domäne IV (Ni<sup>2+</sup>-NTA Affinitätschromatographie)

Zur Aufreinigung von HER2/neu Domäne IV aus Zelllysaten wurde die Ni<sup>2+</sup>-NTA Affinitätschromatographie eingesetzt. Nach Waschen des Gemisches wurde durch Senkung des pH-Wertes bis auf pH 4,0 in drei Schritten das Protein HER2/neu Domäne IV von der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose gelöst und eluiert (Abb. 14).



**Abbildung 13** Zelllysat von *E. coli* M15[pREP4] pQE-100 HER2/neu Domäne IV vor und nach Induktion mit IPTG (SDS-PAGE). Die mit Pfeil markierte kräftige Bande bei ca. 20 kDa entspricht HER2/neu Domäne IV. M: peqGold Proteinmarker I; Spur 1: Klon 9 (+ IPTG); Spur 2: Klon 9 (- IPTG); Spur 3: Klon 6 (+ IPTG); Spur 4: Klon 3 (+ IPTG); Spur 5: Klon 3 (- IPTG); Spur 6: Klon 1 (+ IPTG); Spur 7: Klon 1 (- IPTG).



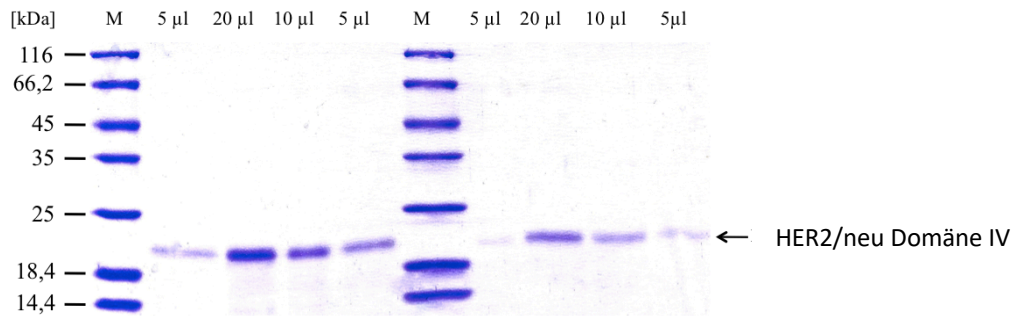
**Abbildung 14** Eluat der Ni<sup>2+</sup>-NTA Affinitätschromatographie von HER2/neu Domäne IV aus *E. coli* M15[pREP4] (SDS-PAGE). Die mit Pfeil markierte Bande bei ca. 20 kDa entspricht HER2/neu Domäne IV.

## Rückfaltung

Dem hier verwendeten Protokoll liegen im Labor bereits etablierte Rückfaltungsprotokolle zugrunde (Tab. 2). Die Proteinlösungen hatten nach der Ni<sup>2+</sup>-NTA Affinitätschromatographie ein Volumen von 4,4 ml (Probe 1; Eluat bei pH 4,5) und 12 ml (Probe 2; Eluat bei pH 4,0). Sie wurden mit 22 bzw. 60 µl DTT versetzt und in Dialyseschläuche (Zellutrans, Flachbreite 19 mm, Porengröße 4-6 kDa, Fa. Roth, Karlsruhe) gefüllt. Durch die Dialyse kommt es zum Pufferausgleich und damit zur Renaturierung und Entfernung des Reduktionsmittels DTT. Nach Abschluss der Rückfaltung erhielten wir eine klare Proteinlösung ohne Präzipitate. Das Endvolumen der Probe 1 betrug 5 ml, das Endvolumen der Probe 2 14 ml. Die Lösungen wurden in Aliquots zu je 100 µl aufgeteilt und bei -20°C gelagert.

## Konzentrationsbestimmung

Um die Konzentration des rückgefalteten Proteins zu bestimmen, wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Anhand der Bandenintensitäten des aufgetragenen Proteinmarkers (Proteinkonzentration von 0,2 mg/ml pro Bande) wurde die Konzentration des rückgefalteten Proteins auf 70 µg/ml in Probe 1 und 30 µg/ml in Probe 2 geschätzt (Abb. 15).



**Abbildung 15 Konzentrationsbestimmung der rückgefalteten Domäne IV des HER2/neu - Rezeptors (SDS-PAGE).** M: 10 µl pEqGold Proteinmarker I (0,2 mg/ml / Proteinbande). Spur 2 bis 5: Probe 1. Spur 7 bis 10: Probe 2. Aus dem Vergleich der unterschiedlichen Bandenintensitäten, ergibt sich eine geschätzte Proteinkonzentration von 70 µg/ml in Probe 1 und 30 µg/ml in Probe 2.

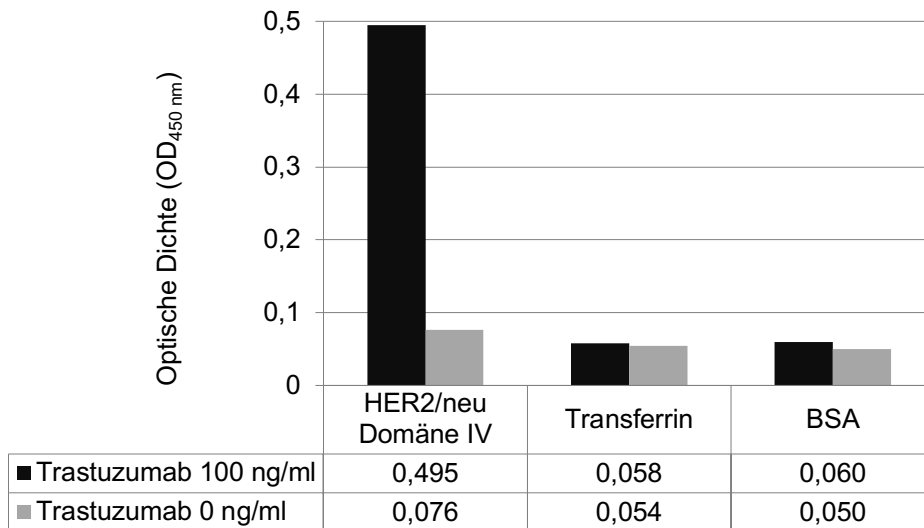
### ELISA mit rekombinanter HER2/neu Domäne IV aus *E. coli*

#### Nachweis spezifischer Bindung

Um die spezifische Bindung von Trastuzumab an Domäne IV des HER2/neu - Rezeptors nachzuweisen, wurde im Puffersystem ein dem Basisprotokoll (Tab. 3) entsprechender ELISA durchgeführt. HER2/neu Domäne IV wurde mit 7 µg/ml *gecoatet*. Zusätzlich wurde getestet, ob im ELISA eine Kreuzreaktivität zwischen Trastuzumab und anderen humanen Proteinen besteht (Abb. 16). Als irrelevantes Protein bekannter Struktur diente Transferrin, welches ebenfalls mit 7 µg/ml *gecoatet* wurde. Eine Interaktion zwischen Transferrin oder anderen physiologisch im Blut vorkommenden Proteinen und Trastuzumab ist nicht bekannt. Als weitere Negativkontrolle wurden *wells* mit 10 mg/ml BSA *gecoatet*. Dieses Protein dient zur Absättigung (Blocken) noch freier Bindungsstellen im *well* nach dem *coating* (s. Tab. 3). Aus diesen *blanks* werden *background* und Schwellenwert berechnet.

Bei Inkubation der HER2/neu Domäne IV mit Trastuzumab liegt die gemessene Extinktion um ein Vielfaches höher als *background* und berechneter Schwellenwert. Somit ist die Probe als positiv zu bewerten. Im Vergleich dazu ist die Extinktion der Negativkontrolle mit Transferrin wie erwartet im Bereich des *backgrounds* und der Schwellenwert wird nicht überschritten. Es hat keine Bindung von Trastuzumab an Transferrin stattgefunden. Hieraus lässt sich die hohe Extinktion in *wells* mit HER2/neu Domäne IV und Trastuzumab als Ausdruck der spezifischen Interaktion dieser Proteine ableiten.





**Abbildung 16 Spezifische Bindung von Trastuzumab an HER2/neu Domäne IV (ELISA).** Im Vergleich sind die Absorptionswerte von Transferrin- bzw. BSA- *gecoateten wells* (Negativkontrollen) dargestellt. Alle Werte sind Mittelwerte aus doppelt angelegten Messungen.

### Standardkurve

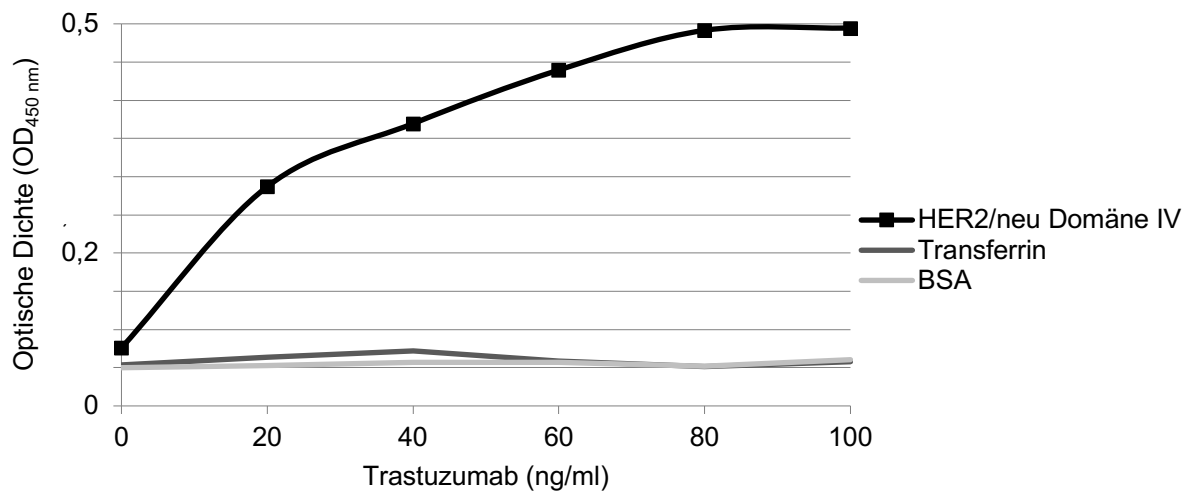
Um später Patientenproben im ELISA zuverlässig messen zu können, muss neben der spezifischen Bindung von Trastuzumab (Analyt) und HER2/neu Domäne IV eine positive Korrelation zwischen der Analytenkonzentration einer Probe und der gemessenen Signalintensität bestehen. Es wurde daher im nächsten Schritt eine Standardkurve etabliert. Die Standards bekannter Konzentration wurden aus einer Stammlösung des Analyten (100 µg/ml Trastuzumab) hergestellt. Sie wurden als Duplikate bzw. Triplikate auf den Assayplatten angelegt.

### Standardkurve im Puffersystem

Zunächst wurden Standardkurven nach dem Basisprotokoll für ELISA (Tab. 3) etabliert bei denen Trastuzumab in einem Puffer (TBST + 0,5% BSA) verdünnt wurde. Diese „einfache“ Matrix hat den Vorteil das keine störenden Interferenzen mit anderen Inhaltsstoffen wie Fremd-Proteinen bei der Messung des Analyten zu erwarten sind. Verwendet wurden Standards mit Konzentrationen von 0, 20, 40, 60, 80 und 100 ng/ml Trastuzumab. Es konnte eine positive Korrelation von Trastuzumab-Konzentration und gemessener Extinktion nachgewiesen werden (Abb. 17).

### Effekt verschiedener Verdünnungsstufen auf Standardkurven in Serum

Nach Etablierung des Protokolls zur Messung von Standardkurven im Puffersystem wurde dieses auf Versuche mit Serum übertragen. Serum wird aufgrund des hohen Vorkommens vieler verschiedener Proteine auch als „komplexe“ Matrix bezeichnet. Diese Proteine können die Bindung von Trastuzumab und HER2/neu Domäne IV stören. In dieser Arbeit wurde für die Standards ausschließlich Serum von Personen verwendet, die nie zuvor eine Trastuzumabtherapie erhalten hatten. Diesem Serum wurden bekannte Konzentrationen von Trastuzumab hinzugefügt.

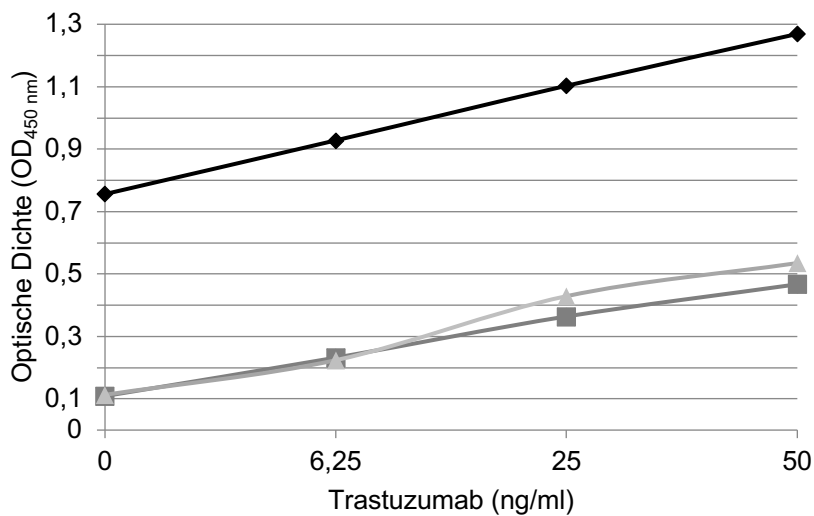
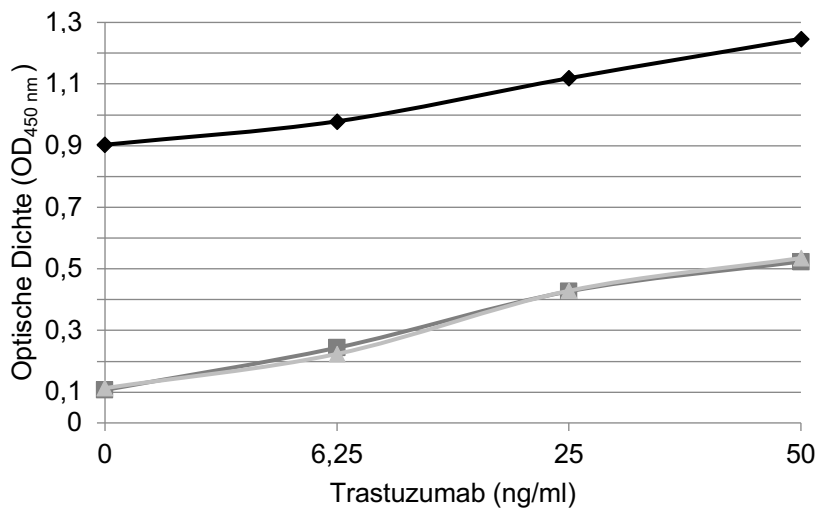


**Abbildung 17 Standardkurve für Trastuzumab (ELISA).**

Das *coating* für die Standardkurve erfolgte mit HER2/neu Domäne IV (8 µg/ml). Transferrin wurde als Kontrollprotein mitgeführt (Negativkontrolle). BSA *gecoatete wells* dienen der Bestimmung des *backgrounds* und des Schwellenwerts (Negativkontrolle).

Da unverdünntes Serum im ELISA zu starke Matrixeffekte verursacht, wurde es zunächst in Puffer verdünnt und dann mit Trastuzumab versetzt. Das Messergebnis wurde dementsprechend um den Verdünnungsfaktor korrigiert. Zur Bestimmung des *backgrounds* wurden stets auch mit BSA *gecoatete wells* gemessen. Bei dem in Abbildung 18 und 19 gezeigten ELISA wurden als Standards die Serumproben zweier verschiedener ProbandInnen („S.T.“ und „C.N.“) in Puffer (TBST + 0,5% BSA) verdünnt und anschließend Trastuzumab bekannter Konzentration hinzugegeben. Der Einsatz verschiedener Seren soll die Stabilität des Trastuzumab-Nachweises in biologisch unterschiedlichen Stoffgemischen nachweisen (Selektivität). Beispielhaft werden hier die Ergebnisse für Proben mit niedrigem (1:500) und hohem (1:32.000) Verdünnungsfaktor dargestellt. Als Referenz wurde in Puffer verdünntes Trastuzumab parallel zu den Serumstandards gemessen.

Bei einer Serumverdünnung von 1:500 sind die Absorptionswerte hoch, auch in Proben, denen kein Trastuzumab hinzugefügt wurde. Es ist jedoch eine Zunahme der Extinktion in Abhängigkeit von der Trastuzumabkonzentration gegeben. Bei 32.000-facher Verdünnung des Serums kann die Absorption von Proben ohne Trastuzumab auf die im ELISA in der Regel geforderte OD 0,2 (bei einer Standardkurve von OD 1-2) gesenkt werden (s. Abb. 18). Sie entspricht nun in etwa den Extinktionswerten, die in Proben, welche kein Serum enthielten, gemessen werden. Die Kurven überlagern sich. Zudem verlaufen alle gemessenen Kurven parallel zueinander. Nach Korrektur um den Verdünnungsfaktor wurde die gleiche Analytenkonzentration in den Standards gemessen (Parallellismus). Die Verdünnung um den Faktor 32.000 ist für die klinische Anwendung aufgrund des hohen Messfehlers jedoch nicht zulässig. Die hohe Verdünnung minimiert zudem die Absorption in toto (Abb. 18 und 19). Ein Unterschied zwischen den unterschiedlichen Seren „S.T.“ und „C.N.“ ist nicht erkennbar. Somit ist bewiesen, dass mit diesem ELISA Trastuzumab bei hoher Serumverdünnung konzentrationsabhängig nachgewiesen werden kann (Spezifität).

**A****B****Abbildung 18 Nachweis von Trastuzumab in Serum (ELISA).**

A: Einsatz der Serumprobe „S.T“. B: Einsatz der Serumprobe „C.N.“.

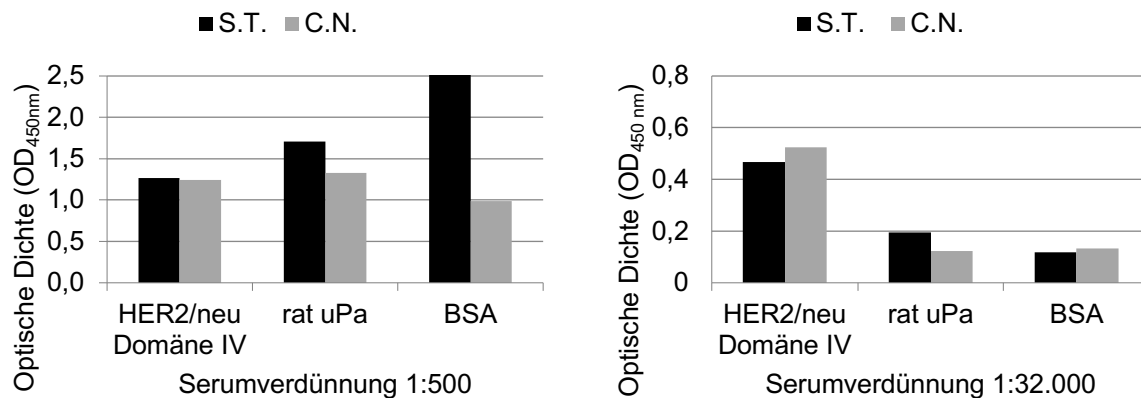
Schwarze Kurve: Serum 1:500 verdünnt.

Mittelgraue Kurve: Serum 1:32.000 verdünnt.

Hellgraue Kurve: kein Serum, Verdünnung von Trastuzumab in Puffer.

Inwiefern der Einsatz humanen Serums verschiedener Verdünnungsstufen die Detektion von Trastuzumab im ELISA beeinträchtigt, ist in Abbildung 19 dargestellt. Graphisch aufbereitet sind erneut die Ergebnisse für niedrige (hier beispielhaft 1:500) und hohe (bspw. 1:32.000) Verdünnungsfaktoren. Es wurde humanes Serum der ProbandInnen „S.T.“ und „C.N.“ verwendet. Bei Proben mit einer Serumverdünnung von 1:500 und einer Trastuzumabkonzentration von 100 ng/μl wird beim Einsatz des *capture antigens* HER2/neu Domäne IV eine Absorption erwartet, die deutlich über der von Proben liegt, die mit irrelevanten Proteinen im ELISA inkubiert wurden. Beim Einsatz von HER2/neu Domäne IV liegt die gemessene Absorption bei 1,2. Dementsprechend sollte die gemessene Optische Dichte beim Einsatz von *rat* uPA (rekombinanter Urokinase Plasminogen-Aktivator aus

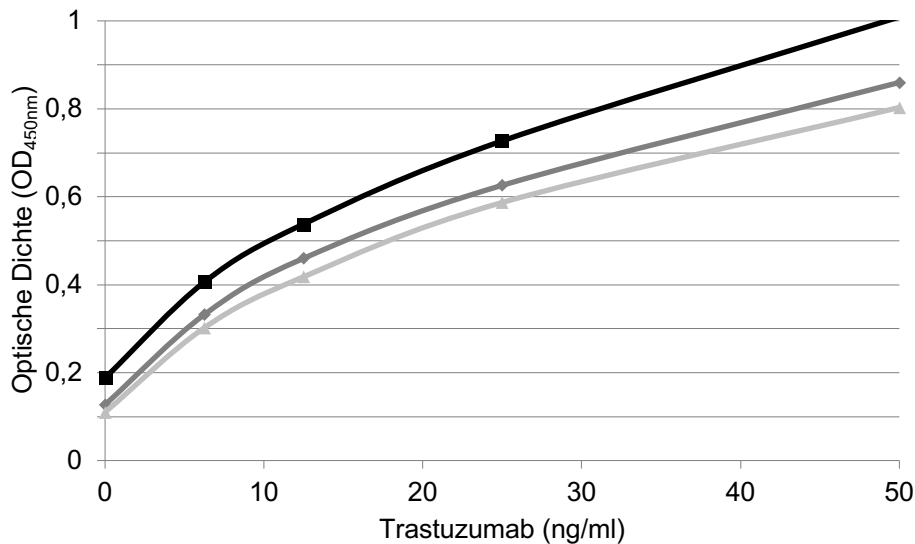
Ratten), einem Protein von dem keine Interaktion mit Trastuzumab bekannt ist (Negativkontrolle), deutlich geringer sein. Dennoch unterschieden sich die Messwerte nur unwesentlich. Bei Messung von *wells*, die lediglich mit BSA (*bovines* Serumalbumin) blockiert wurden, liegen ebenfalls hohe Absorptionswerte vor. In mit BSA blockierten *wells* wird im ELISA der *background*, also das minimale Hintergrundrauschen gemessen. Bei Einsatz des Serums „S.T.“ ist dieser *background* sogar höher als beim Versuch des Nachweises von Trastuzumab mit HER2/neu Domäne IV. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass humanes Serum, bedingt durch seine komplexe Zusammensetzung Störeffekte im ELISA verursacht, die zu hohen Absorptionswerten führen und so die Detektion der spezifischen Bindung von Trastuzumab an HER2/neu Domäne IV überlagern. Erst bei hoher Serumverdünnung (hier 1:32.000) wird diese Bindung nachweisbar und resultiert in einer ca. 5-fach höheren gemessenen Absorption im Vergleich zu Reaktionsansätzen in denen kein *capture antigen* für Trastuzumab eingesetzt wurde (*rat* uPA, BSA).



**Abbildung 19 Einfluss der Serumverdünnung auf die Optische Dichte (ELISA).**

Das *coating* erfolgte mit HER2/neu Domäne IV (Positivkontrolle). Als Negativkontrolle wurden *rat* uPA (rekombinanter Urokinase Plasminogen-Aktivator aus Ratten) sowie BSA (*bovines* Serumalbumin) eingesetzt. Die Serumproben („S.T.“ und „C.N.“ jeweils in einer Verdünnung von 1:500 und 1:32.000) enthielten Trastuzumab in einer Konzentration von 100 ng/ml.

Durch serielles Testen unterschiedlicher Serumverdünnungen konnte mit dem Basisprotokoll eine 10.000-fache Verdünnung von Serum als geringstmöglicher Verdünnungsfaktor für die Messung einer Standardkurve mit diesem *capture antigen* identifiziert werden (Abb. 20). Bei dieser Verdünnung ist der *background* akzeptabel und die Höhe der Absorption proportional zu Trastuzumabgehalt und Grad der Probenverdünnung (Parallelismus). Dies zeigt der Vergleich von Standardkurven mit Serumverdünnungen von 1:10.000, 1:20.000 und 1:25.000 (Abb. 20). Aufgrund mangelnder Reproduzierbarkeit der gezeigten Messergebnisse wurde keine Berechnung von Parametern wie Intra- und Interassayvarianz angestrebt. Für den Einsatz in der klinischen Routine sind die angewandten Verdünnungsfaktoren weiterhin zu hoch.



**Abbildung 20 Einfluss verschiedener Serumverdünnungen auf die Standardkurve.**

Coating mit dem *capture antigen* für Trastuzumab (HER2/neu Domäne IV; 10 µg/ml). Die Serumprobe „C.N.“ wurde 1:10.000 (schwarze Kurve), 1:20.000 (mittelgraue Kurve), und 1:25.000 (hellgraue Kurve), in Puffer verdünnt und mit Trastuzumab in Konzentrationen von 0, 6, 25, 12,5, 25 und 50 ng/ml versetzt.

### Assayoptimierung

Wie erwartet zeigten sich aufgrund der Komplexität des Serums Matrixeffekte. Diese wirkten sich erheblich auf die Reproduzierbarkeit der Messwerte aus (Daten nicht gezeigt). Um mögliche Störfaktoren systematisch zu prüfen, wurden Versuche zur Assayoptimierung durchgeführt. Die Bedeutendsten sind im Folgenden tabellarisch aufgelistet (Tab. 6). Sämtliche Maßnahmen konnten jedoch die Ergebnisse nicht ausreichend verbessern (Daten nicht gezeigt). Zudem wurden Assays gleichen Versuchsaufbaus parallel von verschiedenen erfahrenen Mitarbeitern durchgeführt um auszuschließen, dass es sich um einen Anwenderfehler handeln könnte. Auch hier konnte keine Verbesserung des Ergebnisses erzielt werden.

Als glykosylierte Alternative synthetisierten wir daher im nächsten Schritt Her2/neu Domäne IV in eukaryotischen Zellen. Zur Erhöhung der Wahrscheinlichkeit ein hochaffines *capture antigen* zu erhalten wurde neben pCEP-Pu/AC7 - HER2/neu Domäne IV ebenfalls das Plasmid pSecTag2/HygroB – HER2/neu Domäne IV generiert.

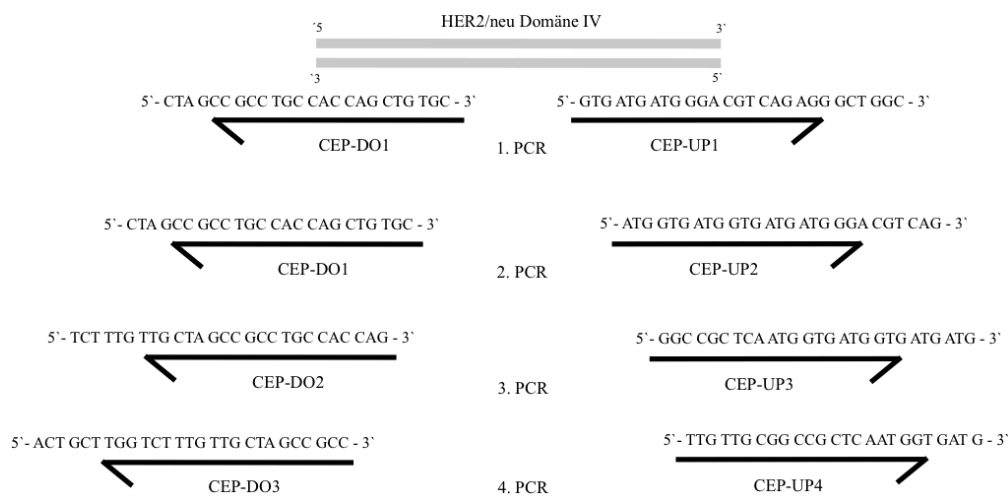
Aspekt	Maßnahme	Effekt auf Standardkurve und Reproduzierbarkeit
Komplexe Matrix	Verdünnung von Serum (1:200 bis max. 1:32.000)	Keine signifikante Verbesserung bei mittlerer Verdünnung
Puffersysteme	Alternative Puffersysteme a) <i>Coating</i> (1) Carbonatpuffer 0,1 M (pH 9,5) (2) PBS (3) NaCl 1M b) Probenpuffer (1) TBST + 0,5% / 2% FCS (2) TBST + 0,5% / 2% BSA (3) PBS + 2% FCS c) Puffer Detektionsantikörper (1) TBST + 0,5% / 2% BSA (2) TBST + 0,5% / 2% FCS (3) NaCl (0,5 M / 1M)	Keine Verbesserung
Inkubationszeiten	a) Blocken 1 h versus 4 h b) Standards 1 h versus 2 h c) Waschen sofort versus Inkubation mit Waschpuffer	Keine Verbesserung
Interferenzen mit unspezifischen Serumbestandteilen	Vorinkubation der Proben auf einer Absorptionsplatte (MAPLE Protokoll; Maple et al., 2004)  Kommerzielles Puffer Kit zur Minimierung unspezifischer Bindungen (LowCross Buffer <sup>®</sup> , The Blocking Solution, Washing Buffer Tris 10x von CANDOR Bioscience GmbH, Wangen, Deutschland)	Keine Verbesserung
Assayaufbau	<i>Sandwich</i> ELISA: a) <i>Coating</i> Antikörper: anti Penta His b) <i>capture antigen</i> : HER2/neu Domäne IV c) Primärer Antikörper: Trastuzumab d) (Sekundärer) Detektionsantikörper: Kaninchen anti-Human IgG (ganzes Molekül)-Peroxidase	Keine Verbesserung
Detektionssysteme	a) Kaninchen anti-Human IgG-Peroxidase (ganzes Molekül)  b) Maus anti-Human IgG-Alkalische Phosphatase (ganzes Molekül)  c) Ziege anti-Human IgG-Peroxidase (F(ab') <sub>2</sub> spezifisch)	Keine Verbesserung

**Tabelle 6 Übersicht aller Maßnahmen zur Assayoptimierung mit dem Protein HER2/neu Domäne IV aus *E. coli* und Bewertung ihres Effektes auf die Ergebnisse.**

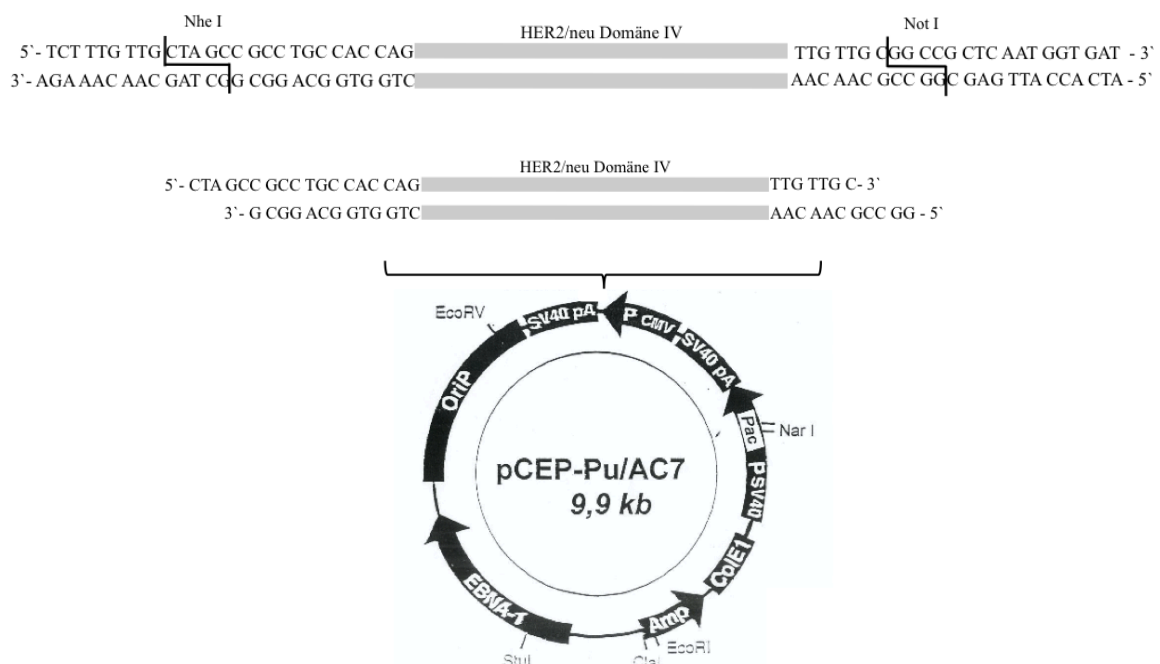
## 5.2 Klonierung der HER2/neu Domäne IV in den eukaryotischen Expressionsvektor pCEP-Pu/AC7

Als *template* wurden 10 ng DNA des Vektors pQE-100 mit dem Insert der HER2/neu Domäne IV eingesetzt. In vier konsekutiven PCR Läufen wurde die Domäne IV amplifiziert. Dies war nötig um einen Polyhistidintag am C Terminus des Proteins zu integrieren und die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen Not I und Nhe I für die Klonierung in pCEP-Pu/AC7 (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten) zu synthetisieren. Aufgrund der Nukleotidsequenzen des Vektors pCEP-Pu/AC7 und HER2/neu Domäne IV wurden die Restriktionsendonukleasen Not I und Nhe I für die gerichtete Klonierung gewählt (Abb. 21).

**A**



**B**

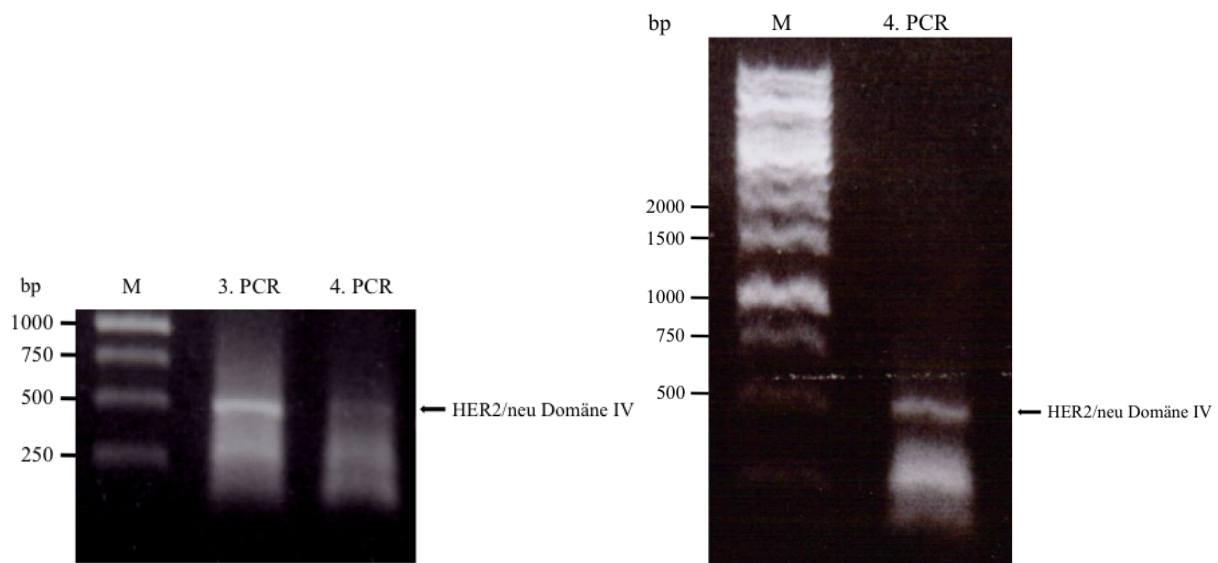


**Abbildung 21** Klonierungsstrategie für pCEP Pu/AC7 HER2/neu Domäne IV.

A: Primerpaare für PCR. B: Inkubation des PCR-Produktes mit Restriktionsendonukleasen Not I und Nhe I und Ligation in den pCEP-Pu/AC7 Vektor.

## Klonierung

Nach Abschluss der PCR Läufe für das Insert HER2/neu Domäne IV wurde ein Agarosegel mit jeweils 10 µl Probe der 3. und 4. PCR beschickt (Abb. 23). Im Reaktionsansatz der 3. und 4. PCR lagen viele unspezifische Amplifikate, vermutlich sogenannte Primerdimere, neben dem Fragment für HER2/neu Domäne IV vor. Um die Verunreinigung durch diese Fragmente zu minimieren, wurde ein präparatives Agarosegel mit dem Produkt der 2. PCR durchgeführt. Mit der aufgereinigten DNA wurden die 3. und 4. PCR wiederholt. Da die Reinheit des erzielten PCR Produktes unbefriedigend blieb, wurde nach dem 3. Lauf ein weiteres präparatives Agarosegel angefertigt. Anschließend stellte sich eine klare Bande bei ca. 450 bp im Agarosegel dar, welche dem aufgereinigten Fragment für HER2/neu Domäne IV entsprach (Abb. 22).



**Abbildung 22 PCR Produkte des Inserts HER2/neu Domäne IV für pCEP-Pu/AC7 (Agarose-Gelelektrophorese).**

**Links** M: 1kb DNA-Marker, daneben 10 µl Produkt der 3. PCR mit Primerdimeren und 10 µl Produkt der 4. PCR. Die Bande bei ca. 450 bp entspricht HER2/neu Domäne IV. Nach der 4. PCR ist die Ausbeute an Domäne IV DNA sehr gering. Es liegen viele unspezifische Amplifikate vor.

**Rechts:** M: 1 kb DNA Marker und aufgereinigte HER2/neu Domäne IV aus der 4. PCR nach DNA Aufreinigung.

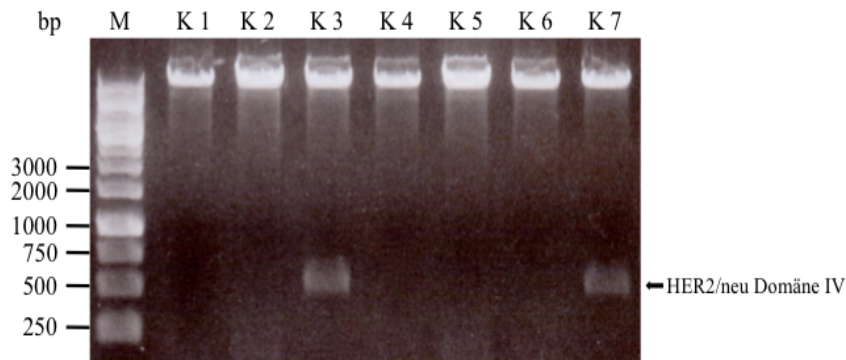
Anschließend wurde die Insert DNA (HER2/neu Domäne IV) mittels PCI-Extraktion, Proteinase K-Verdau und erneuter PCI-Extraktion aufgereinigt und dann mit Ethanol gefällt. Vektor und Insert wurden mit den Restriktionsenzymen Not I und Nhe I inkubiert und anschließend ein präparatives Agarosegel angefertigt. Die photometrische Konzentrationsbestimmung im Spectrometer bei 260 nm ergab nach Aufreinigung eine Gesamtmenge von circa 200 ng DNA.

### Ligation von HER2/neu Domäne IV und pCEP-Pu/AC7

Das Insert HER2/neu Domäne IV wurde anschließend in den Vektor pCEP-Pu/AC7 ligiert, das Plasmid in *E. coli* XL1blue Zellen transformiert und die Zellen auf Agarplatten plattiert. Es wurden nach Inkubation 8 Klone selektiert und in Übernachtskulturen vermehrt. Bei der Restriktionsanalyse der präparierten Plasmid-DNA wurden jeweils ca. 500 ng DNA eingesetzt und mit den Restriktionsendonukleasen Not I und Nhe I behandelt. (Abb. 23). Klon 3 und 7

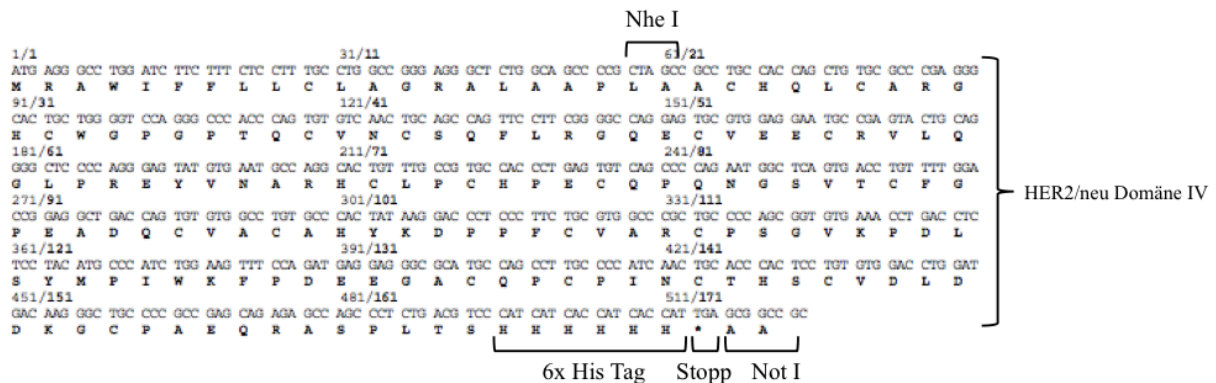


zeigten eine Bande in der erwarteten Größe von ca. 450 bp, dem Insert der HER2/neu Domäne IV entsprechend.



**Abbildung 23 Restriktionsanalyse von pCEP-Pu/AC7 HER2/neu Domäne IV mit Not I und Nhe I (Agarosegel).** Links 10 µl 1 kb DNA Marker, daneben die Klone 1 bis 7. Die obere Bande im Bereich von >10.000 bp zeigt den Vektor pCEP-Pu/AC7. Die ca. 450 bp große Bande bei Klon 3 und 7 entspricht dem Insert HER2/neu Domäne IV.

Klon 3 wurde zur Sequenzierung an die Firma Eurofins in Martinsried geschickt. Bei 100 % Übereinstimmung zwischen cDNA und Insert DNA von HER2/neu Domäne IV (Abb. 24) wurde der Vektor zur Herstellung des rekombinanten Proteins verwendet.

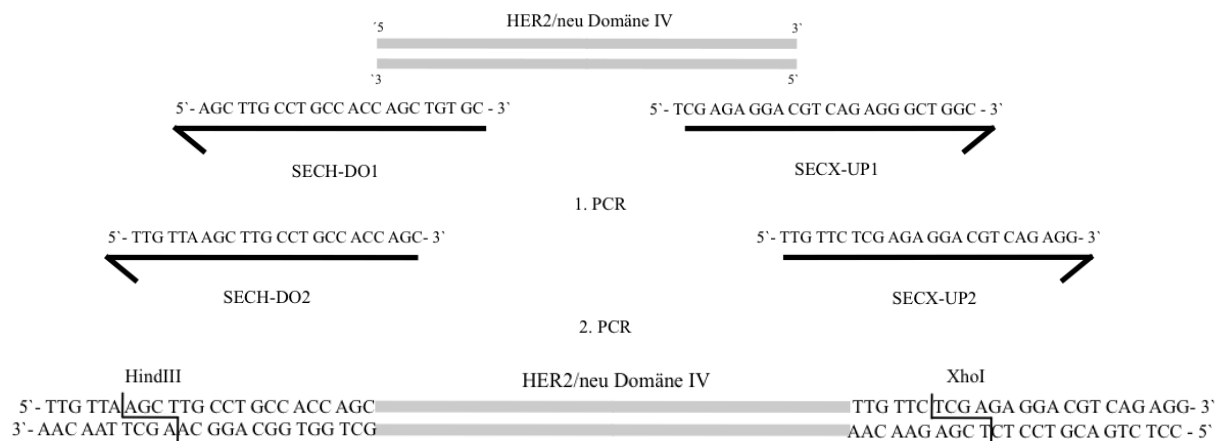


**Abbildung 24 Sequenzierungsergebnis für pCEP-Pu/AC7 – Her2/neu Domäne IV.** Nach Klonierung des PCR Fragments entsteht im Expressionsvektor pCEP-Pu/AC7 ein offener Leserahmen mit N-terminaler Signalsequenz zum Export aus der Zelle, gefolgt von der Sequenz für Her2/neu Domäne IV und C-terminalem Histidin Tag für die Aufreinigung des rekombinanten Proteins.

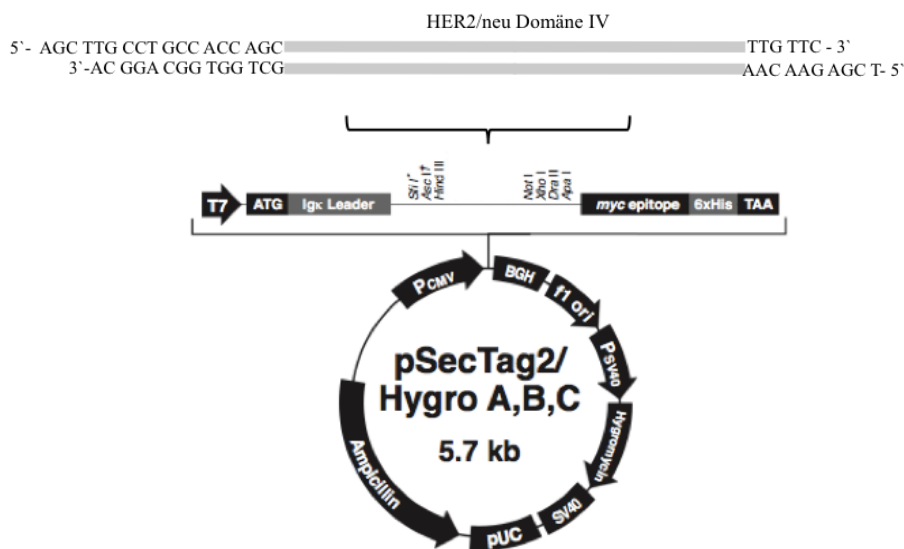
### 5.3 Klonierung der HER2/neu Domäne IV in den eukaryotischen Expressionsvektor pSecTag2/HygroB

Zur Klonierung von HER2/neu Domäne IV in diesen Vektor wurden wiederum 10 ng des zuvor beschriebenen Plasmids pQE-100 HER2/neu Domäne IV verwendet. Es wurden zwei PCRs durchgeführt. Die erste PCR diente der Amplifikation des die HER2/neu Domäne IV kodierenden Genabschnittes. Die zweite PCR erfolgte zur Synthese von Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Hind III und Xho I (Abb. 25). Die Wahl der Restriktionsenzyme ergab sich aus dem Vektordesign.

A



B



**Abbildung 25** Klonierungsstrategie für pSecTag2/HygroB – Her2/neu Domäne IV.

A: Primerpaare für PCR. B: Inkubation des PCR Produktes mit Restriktionsendonukleasen Hind III und Xho I und Ligation in den pSecTag2/HygroB Vektor (Invitrogen 2012).

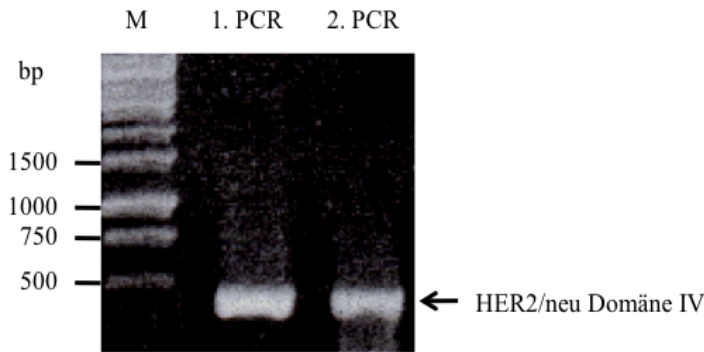
## Klonierung

Nach abgeschlossener Polymerasekettenreaktion für das Insert HER2/neu Domäne IV für pSecTag2/HygroB wurde das Reaktionsgemisch auf ein Agarosegel aufgebracht. In Abbildung 26 ist jeweils eine DNA-Bande bei 450 bp sichtbar. Sie entspricht der amplifizierte HER2/neu Domäne IV. Das Produkt der 2. PCR wurde vor weiterem Gebrauch mittels PCI-Extraktion, Proteinase K-Verdau und erneuter PCI-Extraktion aufgereinigt und dann mit Ethanol gefällt.

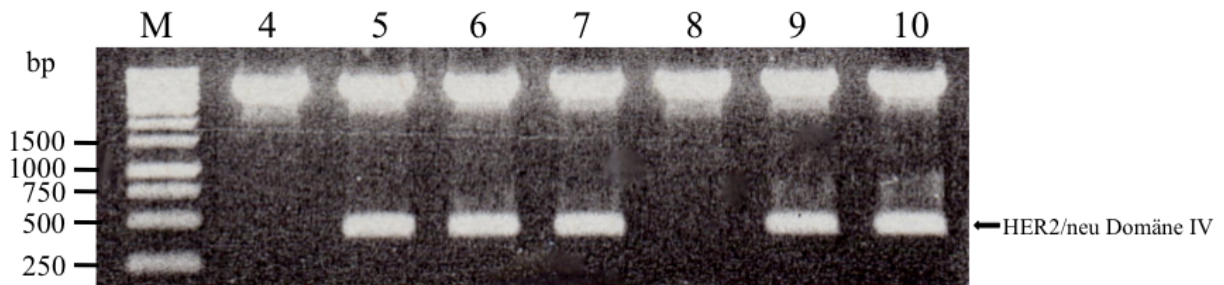
## Ligation von Vektor und Insert

Für die Ligation von Vektor mit Insert, wurden pSecTag2/HygroB und das Insert HER2/neu Domäne IV mit den Restriktionsendonukleasen Hind III und Xho I inkubiert und anschließend ligiert. *E. coli* XL1blue Zellen wurden daraufhin mit dem Vektor transformiert und die Kulturen nach Inkubation auf Agarplatten ausgesät. Plasmid DNA der selektierten Klone wurde dann einer Restriktionsanalyse mit Hind III und Xho I unterzogen (Abb. 27). Eine Bande in der

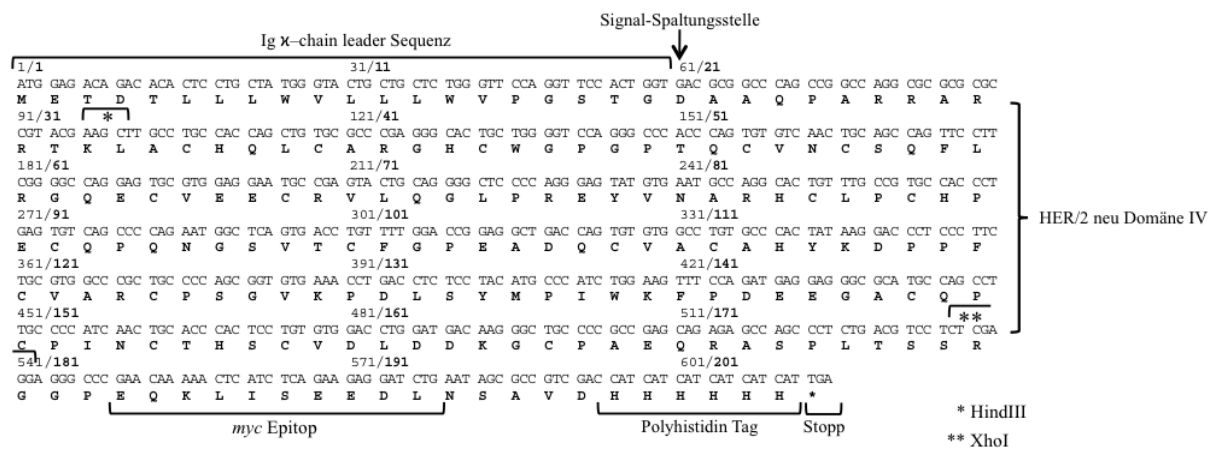
erwarteten Größe von ca. 450 bp zeigte sich bei den Klonen 5, 6, 7, 9 und 10. Klon 6 wurde sequenziert (Eurofins, Martinsried, Deutschland) und eine vollständige Übereinstimmung zwischen cDNA und Nukleotidfolge des Inserts bestätigt. Dieser Vektor wurde im Folgenden zur Transfektion in humanen MDA-MB-231 und ZR75-1 Zellen verwendet (Abb. 28).



**Abbildung 26 PCR Produkte des Inserts HER2/neu Domäne IV für pSecTag2/HygroB (Agarosegel).** M: 1 kb DNA Marker; daneben Produkte der 1. und 2. PCR für das Insert HER2/neu Domäne IV (Bande bei ca. 450 bp).



**Abbildung 27 Restriktionsanalyse von pSecTag2/HygroB - HER2/neu Domäne IV mit Hind III und Xho I (Agarosegel).** M: 1 kb DNA Marker; Spur 4-10: Klon 4 bis 10. Die obere Bande entspricht dem Vektor pSecTag2/HygroB. Die untere Bande bei ca. 450 bp (Klon 5, 6, 7, 9 und 10) entspricht dem Insert HER2/neu Domäne IV.



**Abbildung 28: Sequenzierungsergebnis für pSecTag2/HygroB – Her2/neu Domäne IV.**

Nach Klonierung des PCR Fragments entsteht im Expressionsvektor pSecTag2/HygroB ein offener Leserahmen mit N-terminaler Ig kappa chain leader Sequenz zur Sekretion aus der Zelle, gefolgt von der Sequenz für Her2/neu Domäne IV und C-terminalem myc Epitop und Polyhistidin Tag für die Detektion und Aufreinigung des rekombinanten Proteins.

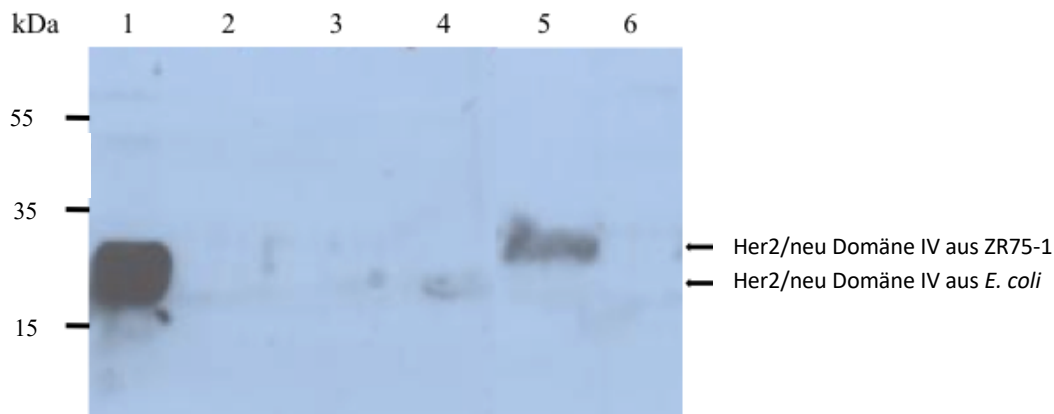
## **Transiente Transfektion der Vektoren pSecTag2/HygroB HER2/neu Domäne IV und pCEP-Pu/AC7 HER2/neu Domäne IV in MDA-MB-231 und ZR75-1 Zellen**

Zellen der humanen Zelllinien MDA-MB-231 und ZR75-1 wurden bei einer Konfluenz von mindestens 70% und maximal 85% 24 h nach Aussaat verwendet. Nach der Transfektion kam es zu Veränderungen der Zellmorphologie und vermehrtem Absterben der Zellen. Die erfolgreiche Transfektion wurde durch den Nachweis der HER2/neu Domäne IV aus konditioniertem Medium mittels Westernblot-Analyse und ELISA belegt (Abb. 29).

### **Aufreinigung konditionierten Zellkulturmediums unter nativen Bedingungen**

Um die HER2/neu Domäne IV mit (Immuno)Assays und -blots besser nachweisen zu können, muss sie aus den unspezifischen Proteinen im konditionierten Medium extrahiert werden. Die Aufreinigung erfolgte unter nativen Bedingungen, weil die Domäne IV durch den Sekretionsprozess der transfizierten Zellen unter Mithilfe von Chaperonen bereits in ihre native Konformation gefaltet wurde. Mithilfe des His-Tags und der Ni<sup>2+</sup>-NTA - Agarose - Aufreinigung wurde HER2/neu Domäne IV unter nativen Bedingungen aus dem konditionierten Medium aufgereinigt. Abbildung 29 zeigt den Nachweis der HER2/neu Domäne IV nach Aufreinigung aus konditioniertem Medium von ZR75-1 und MDA-MB-231 Zellen mittels Westernblot-Analyse. Als Kontrolle wurde rückgefaltete Her2/neu Domäne IV aus *E. coli* eingesetzt. Da alle eingesetzten Proteine ein Histidin-Tag tragen, wurde ein anti-Penta His Antikörper zur Detektion eingesetzt. Es fehlt die erwartete Proteinbande in Spur 2 (HER2/neu Domäne IV aus pCEP-Pu/AC7 / MDA-MB-231), was auf eine nicht erfolgreiche Transfektion bzw. Proteinproduktion schließen lässt. Die Proteinbande bei ca. 20 kDa in Spur 4 entspricht HER2/neu Domäne IV aus pSecTag2/HygroB / MDA-MB-231. Offenbar ist das Protein nicht oder nur kaum glykosyliert im Vergleich zu HER2/neu Domäne IV aus pCEP-Pu/AC7 / ZR75-1. Das Protein aus diesen Zellen hat eine Größe von ca. 30 kDa (Spur 5), während die Domäne IV aus pSecTag2/HygroB / MDA-MB-231 in seiner Größe der nicht glykosylierten HER2/neu Domäne IV aus *E. coli* gleicht.

Aufgrund der geringen Mengen Protein, die in den im Labor gängigen Zellkulturvolumina synthetisiert werden konnten, wurde nach erfolgreichen ersten Tests die weitere transiente Transfektion des Vektors pCEP-Pu/AC7 HER2/neu Domäne IV in zwei Litern serumfreier HEK 293 Suspensionszellen durch Dr. Franz Welsch (EMP Genetech, Ingolstadt) realisiert. HEK (*human embryonic kidney*) 293 Suspensionszellen sind besonders gut für die Produktion von rekombinanten Proteinen geeignet. Das Protein wurde gereinigt und konzentriert geliefert (Abb. 30). Im Westernblot zeigte sich eine Proteinbande, welche der His-getaggen HER2/neu Domäne IV aus HEK 293 Zellen entspricht, mit einer Größe von ca. 35 kDa. Der im Vergleich zu HER2/neu Domäne IV aus *E. coli* deutliche Größenunterschied der rekombinanten Proteine ist auf deren unterschiedlichen Glykosylierungsstatus zurückzuführen. In *E. coli* erfolgt keine Glykosylierung von Proteinen. Die Proteinmengen aus HEK 293 Zellen erlaubten quantitative Tests zur Etablierung eines ELISA.



**Abbildung 29 Nachweis von HER2/neu Domäne IV aus konditioniertem Medium (Westernblot).**

Spur 1: Kontrollprobe mit rückgefalteter Her2/neu Domäne IV aus pQE-100 / *E. coli*.

Spur 2: HER2/neu Domäne IV aus pCEP-Pu/AC7 / MDA-MB-231.

Spur 3: Negativkontrolle aus pSecTag2/HygroB / MDA-MB-231.

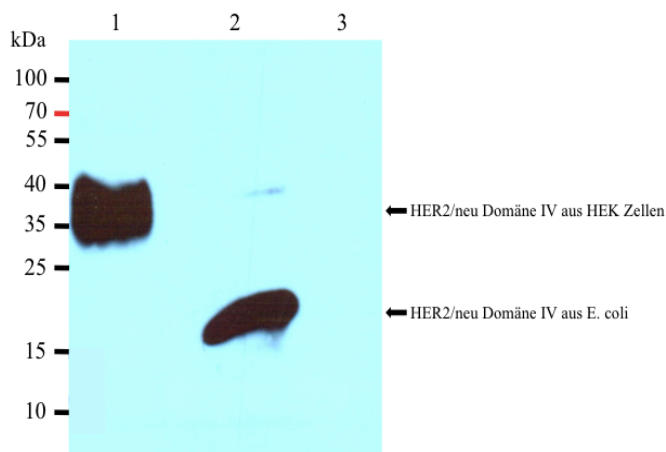
Spur 4: HER2/neu Domäne IV aus pSecTag2/HygroB / MDA-MB-231.

Spur 5: HER2/neu Domäne IV aus pCEP-Pu/AC7 / ZR75-1.

Spur 6: Negativkontrolle aus pSecTag2/HygroB / ZR75-1.

Marker: peqGOLD Protein-Marker IV.

Es wurde ein gegen das His-Tag gerichteter Antikörper verwendet.



**Abbildung 30 Nachweis von HER2/neu Domäne IV aus HEK 293 Suspensionszellen und ZR75-1 Zellen (Westernblot).**

Spur 1: HER2/neu Domäne IV (EMP Genetech) nach  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA – Agarose- Aufreinigung.

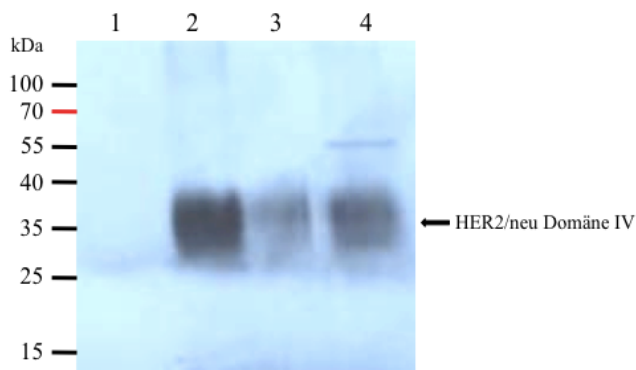
Spur 2: HER2/neu Domäne IV aus pQE-100 / *E. coli*.

Spur 3: HER2/neu Domäne IV aus ZR75-1 nach  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA - Agarose Aufreinigung.

Marker: peqGOLD Protein-Marker IV. Es wurde ein gegen das His-Tag gerichteter Detektions- Antikörper verwendet. Durch die Glykosylierung von Proteinen in eukaryotischen Zellen sind diese größer und laufen langsamer durch das Gel. Die Anzahl der Aminosäuren ist in beiden Fällen gleich.

Ob Trastuzumab an die HER2/neu Domäne IV aus Eukaryoten binden kann, hängt von deren Konformation ab. Unter nicht reduzierenden Bedingungen konnte im Westernblot die spezifische Bindung bewiesen werden (Abb. 31). Als primärer Antikörper wurde Trastuzumab (100 ng/ml) verwendet und eine Kaninchen anti-human IgG (whole molecule) - Peroxidase

(1:10.000) als Detektionsantikörper. Humanes Kallikrein 5 (hKLK5) diente als Negativkontrolle. Der Nachweis gelang unabhängig davon ob das Protein bereits Aufreinigungsverfahren wie die Ni<sup>2+</sup>-NTA – Agarose- Aufreinigung durchlaufen hatte oder nicht. In allen Proben mit HER2/neu Domäne IV konnte die Proteinbande erwarteter Größe detektiert werden. Die Unschärfe der Bande ist bedingt durch den heterogenen Glykosylierungszustand von Proteinen aus humanen Zelllinien.



**Abbildung 31 Nachweis der spezifischen Bindung von Trastuzumab an HER2/neu Domäne IV (Westernblot unter nicht reduzierenden Bedingungen).**

Spur 1: Negativkontrolle (hKLK5).

Spur 2: HER2/neu Domäne IV (EMP Genetech) ohne Aufreinigung.

Spur 3: HER2/neu Domäne IV (EMP Genetech) nach externer Aufreinigung.

Spur 4: HER2/neu Domäne IV (EMP Genetech) nach Ni<sup>2+</sup>-NTA - Agarose - Aufreinigung.

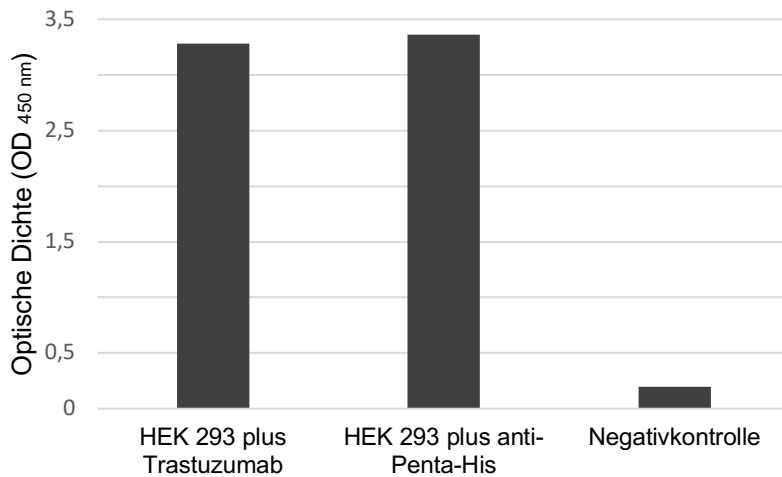
Marker: peqGOLD Protein-Marker IV. Als primärer Antikörper wurde Trastuzumab (100 ng/ml) eingesetzt und eine Kaninchen anti-human IgG (whole molecule) - Peroxidase (1:10.000) als Detektionsantikörper. Humanes Kallikrein 5 (hKLK5) diente als Negativkontrolle.

### **Nachweis der Interaktion von HER2/neu Domäne IV aus eukaryotischen Zellen mit Trastuzumab im ELISA**

Die spezifische Bindung von Trastuzumab an die eukaryotische HER2/neu Domäne IV sowie deren strukturelle Integrität (Nachweis des His-Tags) konnten in qualitativen Assays belegt werden. Die hohe Absorption in mit Trastuzumab inkubierten *wells* lässt indirekt auf eine native Konformation der HER2/neu Domäne IV schließen (Abb. 32).

### **Erstellung von Standardkurven mit HER2/neu Domäne IV aus eukaryotischen Zellen im ELISA**

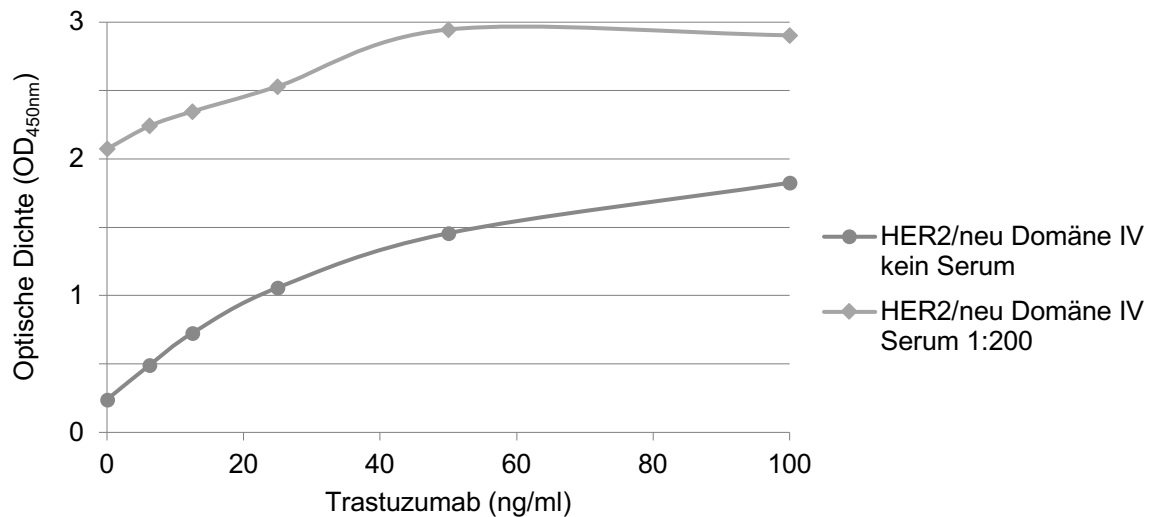
In diesen Versuchsreihen wurden Standards mit Trastuzumab bekannter Konzentration gemessen. Trastuzumab wurde entweder Puffer (einfache Matrix) oder mit Puffer verdünntem Serum (komplexe Matrix) zugesetzt. Die Abbildungen 33 und 34 zeigen exemplarisch Versuchsergebnisse mit HER2/neu Domäne IV aus eukaryotischen Zellen. Während bei der Testung von Standards ohne Serum eine konzentrationsabhängige Zunahme der gemessenen Extinktion bei niedrigem *background* zu beobachten ist, steigt dieser *background* durch Einsatz von verdünntem Serum überproportional stark an.



**Abbildung 32 Nachweis des His-Tags sowie spezifische Bindung von Trastuzumab an HER2/neu Domäne IV (ELISA).** Für das *coating* wurde HER2/neu Domäne IV aus eukaryotischen Zellen (HEK 293 Suspensionszellen) verwendet. Mit dem anti-Penta-His-Antikörper wurde das Histidin-Tag nachgewiesen. Zum Nachweis der spezifischen Bindung wurde Trastuzumab eingesetzt. Die Extinktion bei Einsatz von HER2/neu Domäne IV aus HEK 293 Suspensionszellen und Trastuzumab ist hoch, die spezifische Bindung somit im Vergleich zur Negativkontrolle (geblocktes *well* mit Trastuzumab) bewiesen.

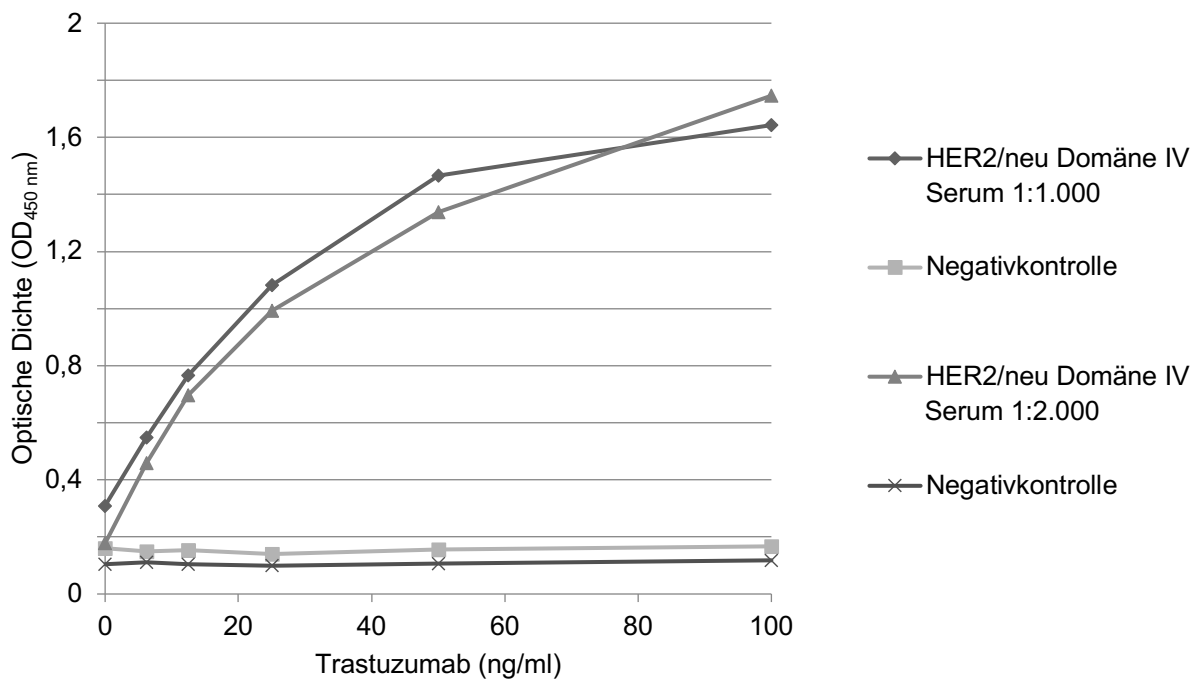
Diese Ergebnisse zeigen den kleinstmöglichen Verdünnungsfaktor für Serum, mit dem die gemessene Extinktion noch konzentrationsabhängig ist. Der *background* liegt jedoch deutlich über dem für den Einsatz in der klinischen Routine geforderten Maximum. Erst bei Serumverdünnungen von 1:1.000 oder 1:2.000 lässt sich dieser Wert auf das geforderte Niveau senken (Abb. 34). In Abbildung 34 wird anhand der Negativkontrollen deutlich, dass die gemessene Extinktion und der Grad der Serumverdünnung korrelieren. In mit BSA geblockten *wells* war die gemessene Extinktion zwar unabhängig von der Trastuzumabkonzentration, nicht aber von der Serumverdünnung. Je mehr Serum in der Probe, desto höher die gemessene Extinktion (Daten nicht gezeigt).

Im Vergleich zu Testungen von HER2/neu Domäne IV aus *E. coli* (Abb. 20) konnte der für die Erstellung einer Standardkurve erforderliche Serumverdünnung mit Einsatz von HER2/neu Domäne IV aus eukaryotischen Zellen um den Faktor 10 gesenkt werden (1:10.000 vs. 1:1.000). Daraus lässt sich schließen, dass die Affinität zwischen *capture antigen* aus eukaryotischen Zellen und Trastuzumab höher ist und die durch das Serum bedingten Störeffekte im Assay weniger starken Einfluss auf die Messergebnisse haben. Eine weitere Senkung des Verdünnungsfaktors war nicht möglich. Wie in Abbildung 33 deutlich wird, ist bei einer Serumverdünnung 1:200 der *background* noch über dem zulässigen Mindestwert und somit eine Messung von Proben nicht zulässig. Bei einer Serumverdünnung von 1:2.000 oder 1:1.000 konnten keine ausreichend reproduzierbaren Messergebnisse erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Dementsprechend sollte die Affinität von Trastuzumab zum *capture antigen* noch erhöht werden. Deshalb erfolgte im nächsten Schritt die Klonierung der gesamten extrazellulären Domäne des HER2/neu - Rezeptors.



**Abbildung 33 Einfluss von Serum (komplexe Matrix) auf die Standardkurve (ELISA).**

Coating: HER2/neu Domäne IV. Die Standards (Puffer oder in Puffer verdünntes Serum) wurden mit Trastuzumab gespiked (100, 50, 25, 12,5, 6,25 und 0 ng/ml) und nach identischem Protokoll gemessen. Parallel wurden Negativkontrollen auf der Platte mitgeführt (Daten nicht gezeigt). Detektionsantikörper: Anti human IgG (whole molecule) POD (1:10.000; Sigma).



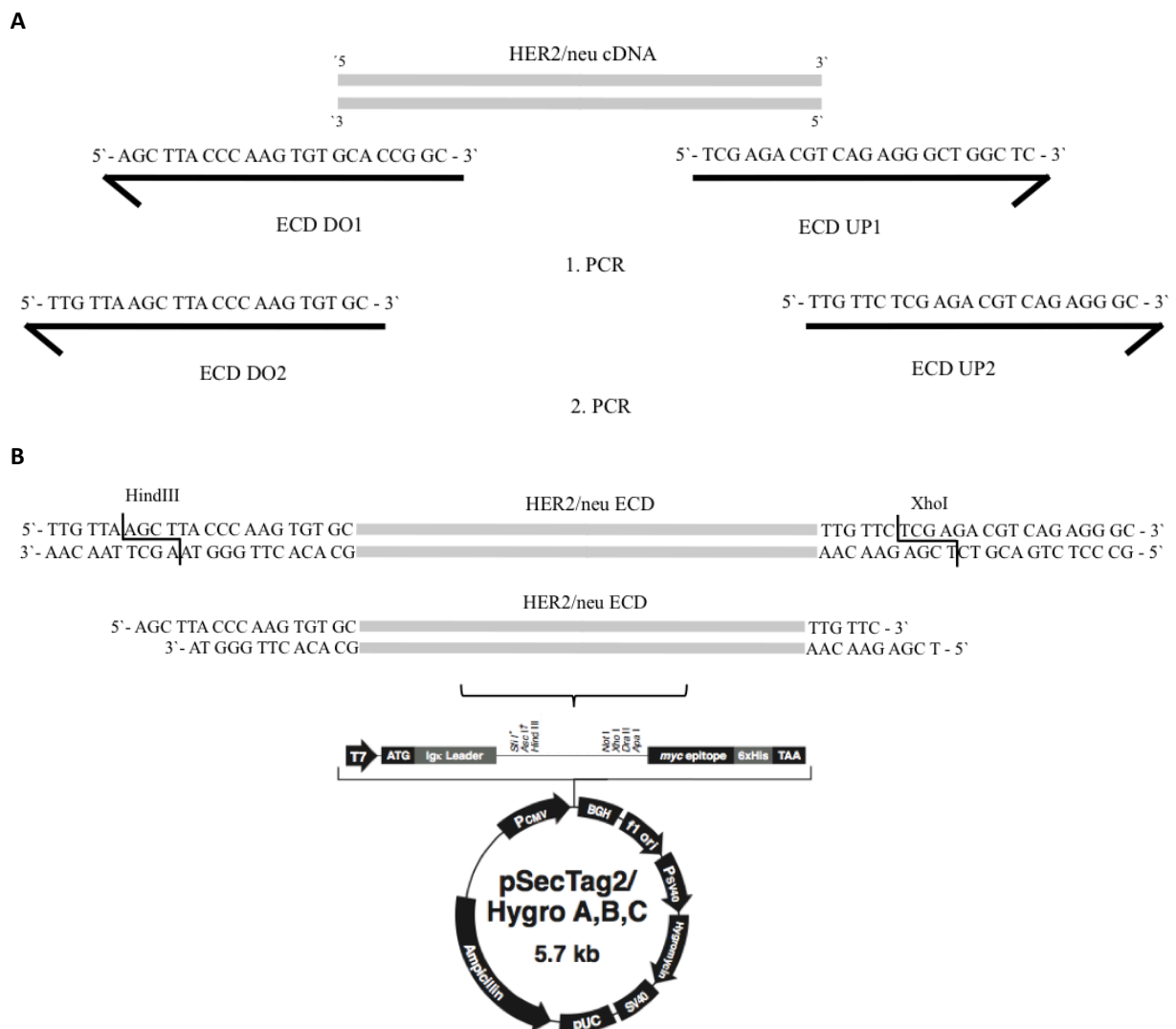
**Abbildung 34 Standardkurven für HER2/neu Domäne IV (EMP Genetech) (ELISA).**

HER2/neu Domäne IV wurde entsprechend dem Standardprotokoll für ELISA gecoated. Für die Standards wurde Serum in einer Verdünnung von 1:2.000 oder 1:1.000 in Puffer verdünnt und mit Trastuzumab gespiked (100, 50, 25, 12,5, 6,25 und 0 ng/ml). Als Negativkontrolle wurden *wells* lediglich mit BSA geblockt und mit den o.g. Standards inkubiert. Die Höhe der Extinktion korreliert mit dem Verdünnungsgrad des humanen Serums. Verwendeter Detektionsantikörper: Anti human IgG (whole molecule) POD (1:10.000; Sigma).



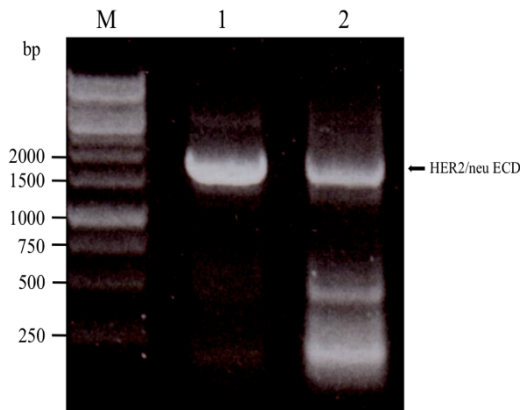
## 5.4 Klonierung der HER2/neu ECD in den eukaryotischen Expressionsvektor pSecTag2/HygroB

Für die rekombinante eukaryotische Expression der gesamten extrazellulären Domäne des HER2/neu - Rezeptors (HER2/neu ECD; AS 23 - 652) wurden HEK 293 Zellen gewählt. Als extrazelluläre Domäne des HER2/neu - Rezeptors wurden die Aminosäuren 23 bis 652 definiert. Die Größe des DNA-Doppelstranges und späteren Inserts beträgt somit circa 1887 bp. Die Gesamtgröße des Vektors von 7,5 kb ergibt sich aus Insert und Plasmid (pSecTag2/HygroB; 5,2 kb). Als *template* diente die cDNA (26 ng/ml) für den HER2/neu - Rezeptor. In zwei PCR Läufen wurde das Insert amplifiziert und Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen Hind III und Xho I hinzu-synthetisiert (Abb. 35). In einem Agarosegel wurde das PCR Ergebnis geprüft. Das Insert war bei ca. 1900 bp, neben unspezifischen Amplifikaten, nachweisbar (Abb. 36). Das Produkt der 2. PCR wurde vor weiterem Gebrauch mittels PCI-Extraktion, Proteinase K-Verdau und erneuter PCI-Extraktion aufgereinigt und dann mit Ethanol gefällt



**Abbildung 35** Klonierungsstrategie für pSecTag2/HygroB – HER2/neu ECD.

A: Primerpaare für PCR; B: Inkubation des PCR Produktes mit Restriktionsendonukleasen und Ligation in den pSecTag2/HygroB Vektor (Invitrogen 2012).

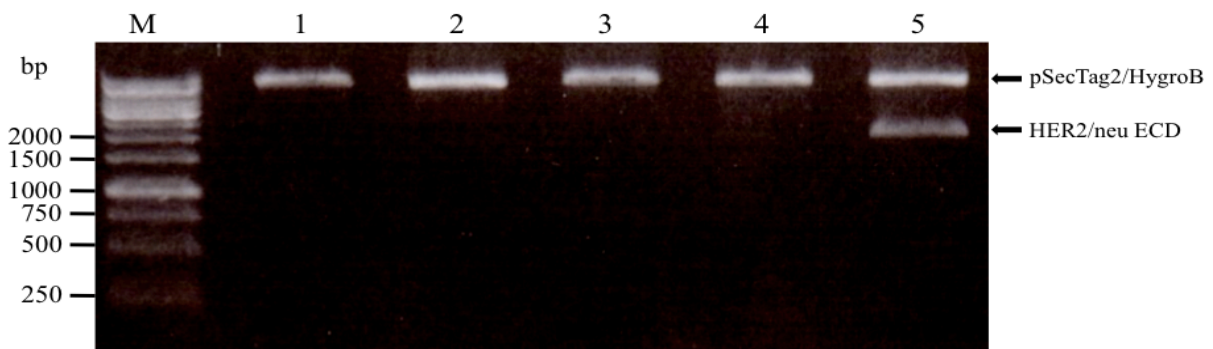


**Abbildung 36 Insert HER2/neu ECD (Agarosegel).**

M: 1 kb DNA Marker. Spur 1: Produkt der 1. PCR; Spur 2: Produkt der 2. PCR mit unspezifischen Amplifikaten (v.a. Primer-Dimeren) bei 250 – 500 bp. Die Banden bei ca. 1900 bp entsprechen der ECD.

### Ligation und Transformation von HER2/neu ECD und pSecTag2/HygroB

Um die Schnittstellen zur Ligation von Vektor mit Insert zu generieren, wurden pSecTag2/HygroB und HER2/neu ECD mit den Restriktionsendonukleasen Hind III und Xho I inkubiert und anschließend ligiert. *E. coli* XL1blue Zellen wurden daraufhin mit dem Ligationsansatz transformiert und die Kulturen nach Inkubation auf Agarplatten ausgesät. Einige Klone wurden ausgewählt und einer Restriktionsanalyse mit Hind III und Xho I unterzogen (Abb. 37). Eine Bande in der erwarteten Größe von ca. 1900 bp zeigte sich bei Klon 5. Dieser wurde zur Sequenzierung an die Firma Eurofins in Martinsried geschickt. Hier wurde die vollständige Übereinstimmung der Nukleotidfolge des Inserts mit der cDNA bestätigt (Abb. 38). Aufgrund der Länge von HER2/neu ECD wurden zwei Primersets zur Sequenzierung eingesetzt.



**Abbildung 37 Restriktionsanalyse von pSecTag2/HygroB HER2/neu ECD mit Hind III und Xho I (Agarosegel).**

M: 1 kb DNA Marker. Spur 1-5: entspricht Klon 1-5. Die Bande in Spur 5 bei ca. 1900 bp entspricht HER2/neu ECD, die darüber gelegene Bande dem Vektor pSecTag2/HygroB.

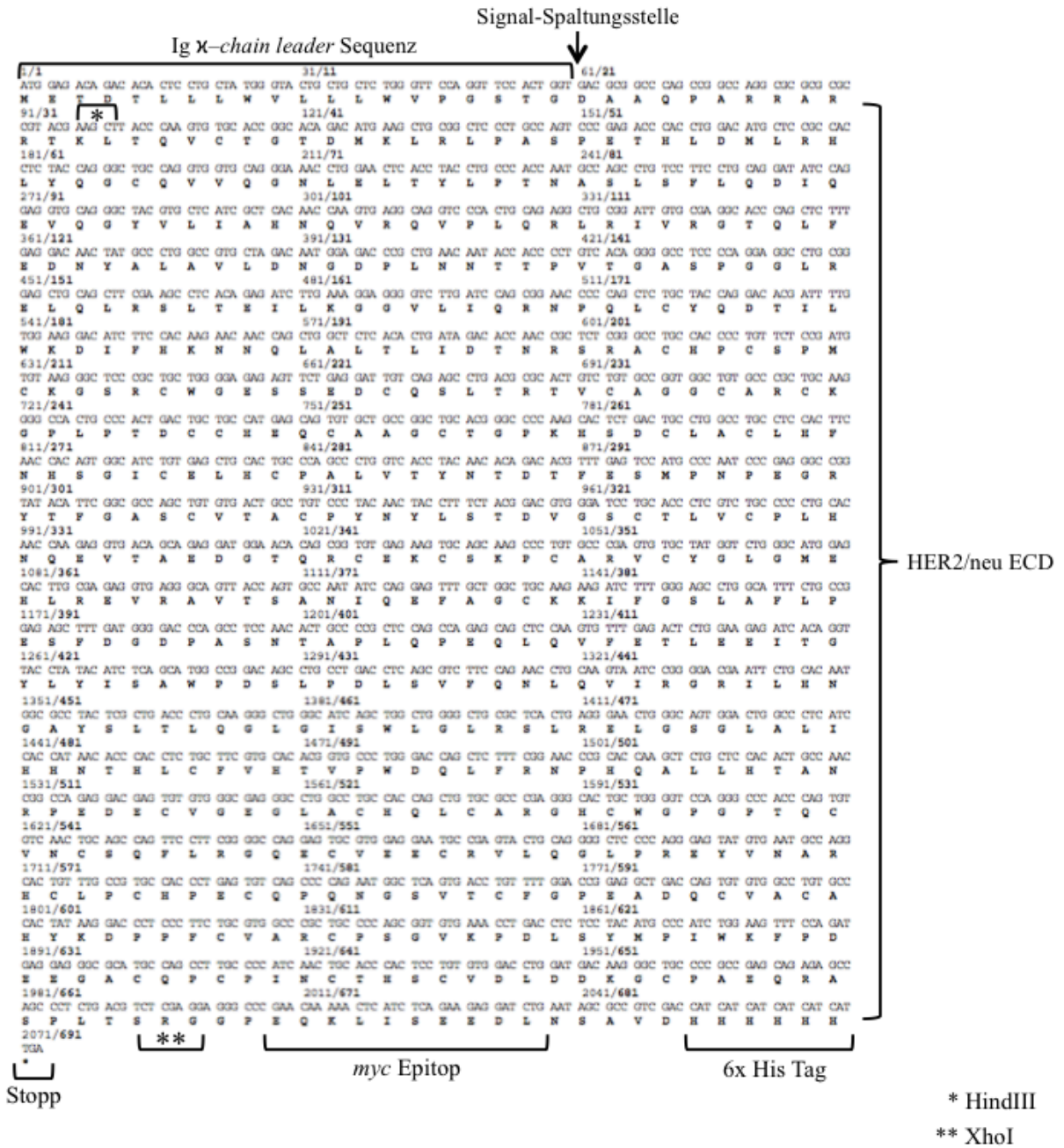
Die Herstellung des rekombinanten Proteins erfolgte nach transienter Transfektion von pSecTag2/HygroB HER2/neu ECD in zwei Litern serumfreier HEK 293 Suspensionszellen durch Dr. Franz Welser, Fa. EMP Genetech, Ingolstadt. Das Protein wurde mittels seines His-Tags und Ni<sup>2+</sup>-NTA Affinitätschromatographie gereinigt und konzentriert geliefert.

Im nächsten Schritt wurde die strukturelle Integrität durch Nachweis des His-Tags am C-terminalen Ende der rekombinanten HER2/neu ECD mittels Westernblot-Analyse (Abb. 39A)

geprüft. Nach Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten anti-Penta His Antikörper zeigte sich eine Bande bei ca. 120 kDa. Diese entspricht der ECD, welche eigentlich bei ca 110 kDa zu erwarten gewesen wäre. Das Protein läuft jedoch aufgrund seiner Glykosylierung langsamer durch das Gel. Zudem wurde unter nicht reduzierenden Bedingungen getestet, ob Trastuzumab an HER2/neu ECD bindet, da Trastuzumab ein konformationsabhängiger Antikörper ist. In Abbildung 39B wird daher das Vorliegen von HER2/neu ECD in nativer Konformation durch Nachweis der spezifischen Bindung von Trastuzumab indirekt belegt. Die native Konformation muss nach vorangegangener Sekretion durch die eukaryotischen Zellen und Aufreinigung des rekombinanten Proteins aus dem konditionierten Medium weiterhin gegeben sein um damit Trastuzumabkonzentrationen in Proben messen zu können. Nach Inkubation mit Trastuzumab und einer anti-Human IgG Peroxidase zeigt sich eine kräftige Bande bei 120 kDa (Abb. 38B). In der Negativkontrolle mit rückgefaltetem hKLL7 (*humanes Kallikrein 7*) fehlt diese Bande, da Trastuzumab nicht an hKLL 7 bindet.

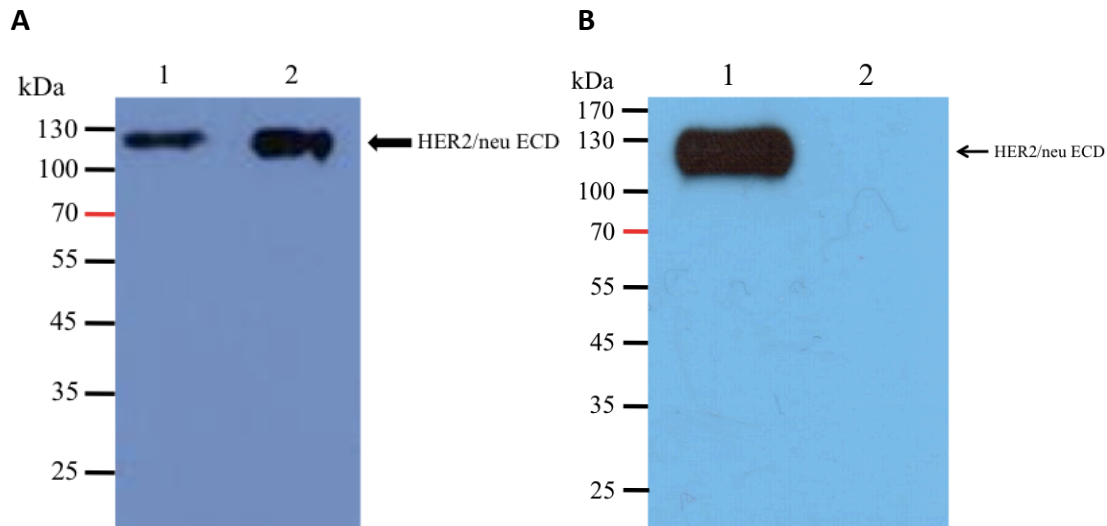
### **HER2/neu ECD im ELISA**

Nachdem die spezifische Bindung von Trastuzumab an rekombinante HER2/neu ECD im Westernblot bewiesen werden konnte, erfolgte schließlich der Nachweis mittels ELISA (Abb. 40). Der Histidin-Tag der HER2/neu ECD und von hKLL7 konnten wie erwartet nachgewiesen werden, wie der Anstieg der gemessenen Extinktion im Vergleich zur Negativkontrolle belegt (Abb. 40A). Auch im ELISA konnte die spezifische Bindung von Trastuzumab an die ECD reproduziert werden (Abb. 40B). Lediglich bei Einsatz von HER2/neu ECD führt die Inkubation mit Trastuzumab später zu einem Anstieg der gemessenen Extinktion. Im Vergleich dazu entspricht die Extinktion beim Einsatz von hKLL7 der von mit BSA blockierten *wells*, also dem sog. *background*. Diese Ergebnisse wurden erwartet, da Trastuzumab nicht an hKLL7 bindet



**Abbildung 38 Sequenzierungsergebnis für pSecTag2/HygroB HER2/neu ECD.**

Nach Klonierung des PCR Fragments entsteht im Expressionsvektor pSecTag2/HygroB ein offener Leserahmen mit N-terminaler Ig  $\kappa$  chain leader Sequenz zur Sekretion aus der Zelle, gefolgt von der Sequenz für Her2/neu ECD und C-terminalem *myc* Epitop und Polyhistidin Tag für die Detektion und Aufreinigung des rekombinanten Proteins.



**Abbildung 39 Charakterisierung von HER2/neu ECD aus eukaryotischen Zellen (Westernblot).**

**A Nachweis des His-Tags in HER2/neu ECD (Westernblot).**

Marker links: peqGOLD Protein Marker IV.

Spur 1: HER2/neu ECD (EMP Genetech) (5 µl).

Spur 2: HER2/neu ECD (EMP Genetech) (10 µl).

Es wurden ein Penta His Antikörper (1:1.000) zur Detektion des His Tags der HER2/neu ECD und ein anti mouse POD (1:10.000) Detektionsantikörper eingesetzt.

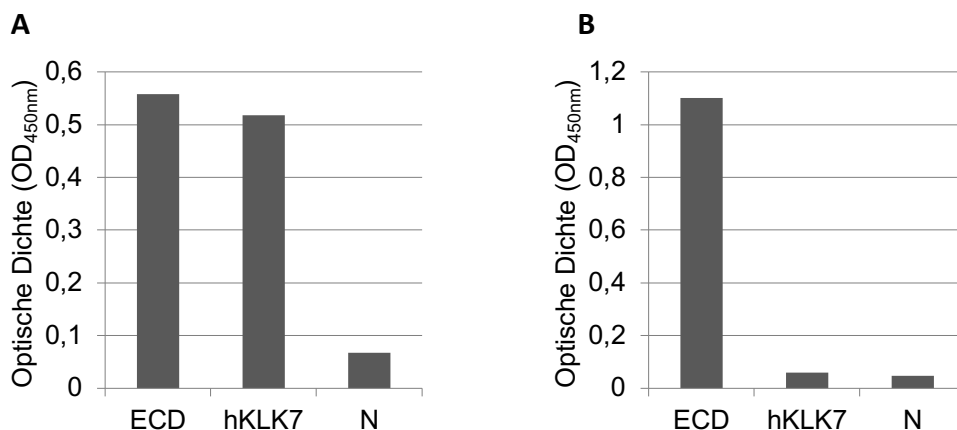
**B Nachweis der Bindung von Trastuzumab an HER2/neu ECD (Westernblot, nicht reduzierende Bedingungen).**

Marker links: peqGOLD Protein-Marker IV.

Spur 1: HER2/neu ECD (EMP Genetech).

Spur 2: Rückgefaltetes hKLK 7 (als Negativkontrolle).

Es wurde Trastuzumab (100 ng/ml) als Antikörper eingesetzt und als Detektionsantikörper anti-Human IgG POD (1:10.000). Der Westernblot erfolgte unter nicht reduzierenden Bedingungen um die, für die Bindung von Trastuzumab essentielle, native Konformation der HER2/neu ECD zu erhalten.



**Abbildung 40 Charakterisierung von HER2/neu ECD aus eukaryotischen Zellen (ELISA).**

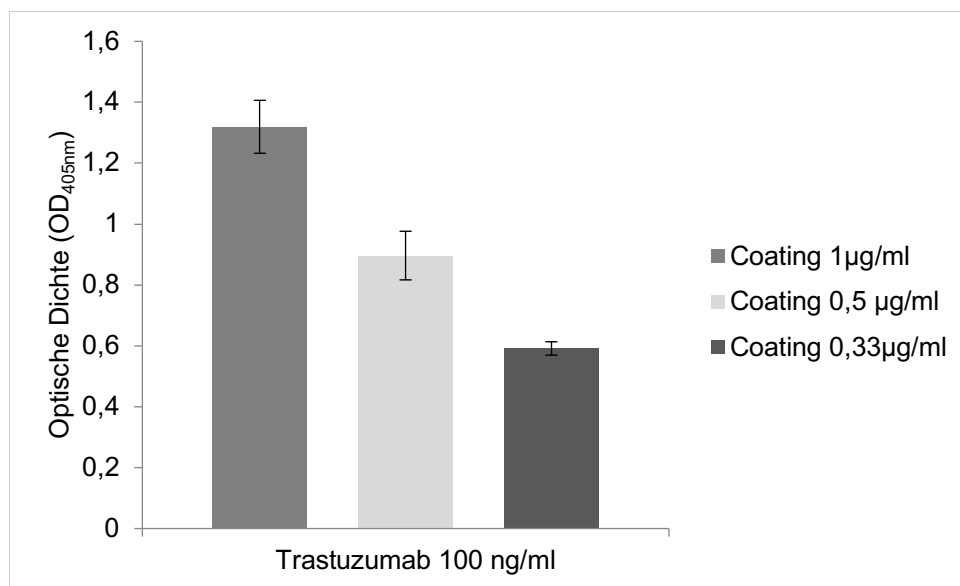
**A Nachweis des His-Tags von HER2/neu ECD (ELISA).** Coating: HER2/neu ECD (1 µg/ml); ebenfalls His-getaggt, rückgefaltetes hKLK7 (1 µg/ml) als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle (N) wurden wells mit BSA blockiert. Als primärer Antikörper wurde *anti* Penta His (1:2.000), eingesetzt und mit *anti* mouse POD (1:10.000) detektiert.

**B Nachweis der spezifischen Bindung von Trastuzumab an HER2/neu ECD (ELISA).**

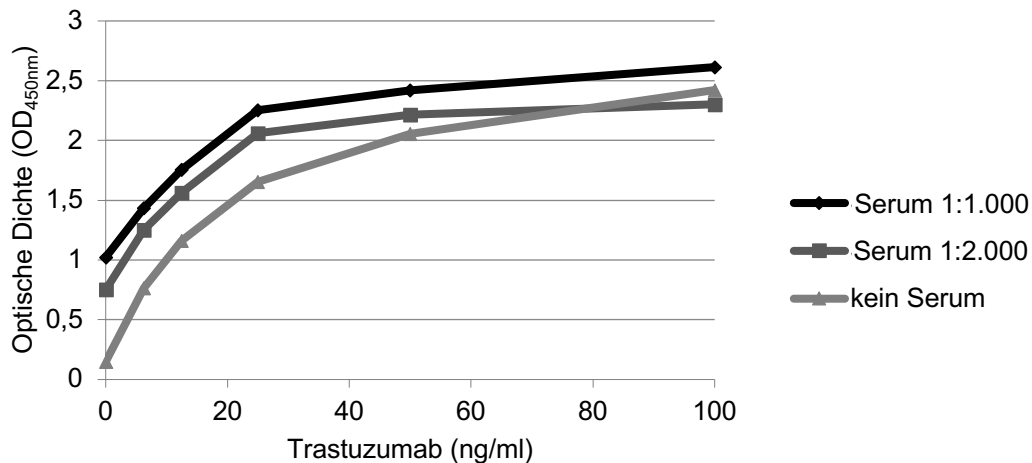
Coating: HER2/neu ECD (1 µg/ml). Als Negativkontrolle diente rückgefaltetes hKLK7 (1 µg/ml) sowie mit BSA blockierte wells (N). Dann wurde mit Trastuzumab (100 ng/ml) inkubiert und dieses mit *anti* human IgG POD (1:10.000) detektiert.

### Etablierung von Standardcoating und Serumverdünnung

Nach erfolgreichen vorausgegangenen Tests zur Charakterisierung der HER2/neu ECD, sollten als nächstes Standardkurven in Puffer und verdünntem Serum (Puffer versus Serumstandards) gemessen werden. Mit der rekombinanten HER2/neu ECD konnten nach Etablierung eines Standardcoatings in der Folge Standardkurven zufriedenstellender Reproduzierbarkeit erzielt werden (Abb. 41-42). Für das *coating* sollte aufgrund der limitierten Menge vorliegenden *capture antigens*, die geringste Konzentration ermittelt werden, die noch zu einer adäquaten Extinktion bei Einsatz des Analyten Trastuzumab führt. Als adäquate Extinktion wurde bei Einsatz von 100 ng/ml Trastuzumab eine OD von ca. 1, gemessen bei 405 nm, betrachtet. Dieses Ziel wurde mit einer *coating*-Konzentration von 0,5 µg/ml HER2/neu ECD erreicht (Abb. 41). In späteren Versuchen zur Bestimmung von Inter- und Intrassayvarianz, zeigte sich eine *coating*-Konzentration von 1 µg/ml jedoch als geeigneter. Die Abweichungen der Messwerte fielen deutlich geringer aus (Tab. 7). Im Fortgang erfolgten nur noch Messungen nach *coating* mit 1 µg/ml HER2/neu ECD. Die unter Verwendung des etablierten Standardcoatings erzielten Messergebnisse ergaben eine Standardkurve mit Extinktionswerten die bei Einsatz von Trastuzumab deutlich über denen der Negativkontrollen lag (Abb. 42). Die Höhe der gemessenen Extinktion war zudem proportional zur Serumverdünnung (Parallelismus). Die absolut gemessenen Werte unterschieden sich für Standardkurven von in Serum und in Puffer verdünntem Analyten nur geringfügig, was indirekt die höhere Affinität von Trastuzumab zu HER2/neu ECD bestätigt.



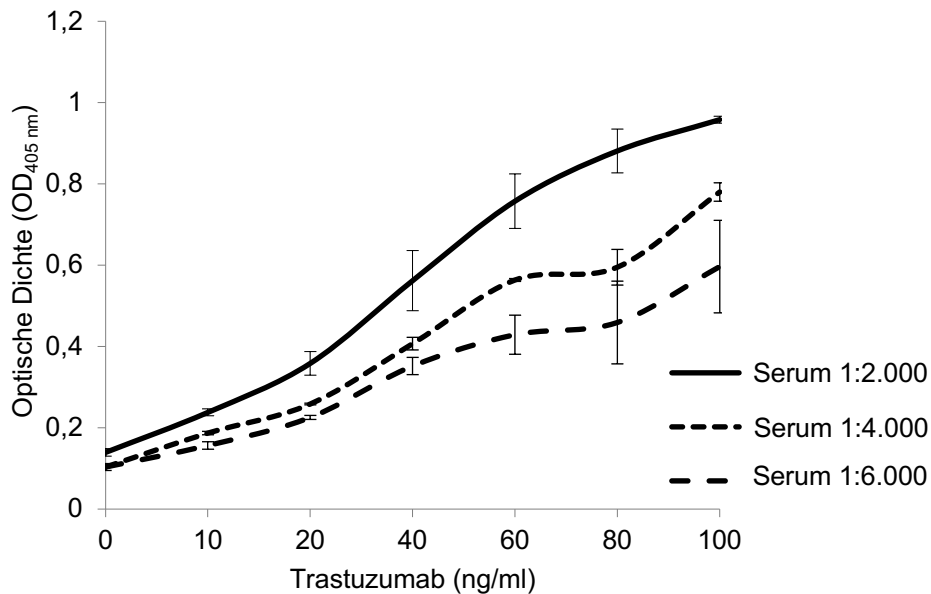
**Abbildung 41 Optimierung des Standardcoatings für HER2/neu ECD in komplexer Matrix (ELISA).** Das *coating* mit HER2/neu ECD erfolgte in Konzentrationen von 1, 0,5 oder 0,33 µg/ml. In Puffer verdünntes Serum (1:1.000) wurde mit Trastuzumab (100 ng/ml) versetzt. Als Detektionsantikörper diente anti human IgG AP in 1 M NaCl (1:1.000).



**Abbildung 42 Standardkurven für Trastuzumab und HER2/neu ECD in einfacher und komplexer Matrix (ELISA).** Coating: HER2/neu ECD (0,5 µg/ml). Trastuzumab (0, 25, 50 und 100 ng/ml) in Puffer (einfache Matrix) oder Serum (komplexe Matrix; Verdünnung 1:1.000 und 1:2.000). Detektionsantikörper: anti human IgG POD (1:10.000).

Bei stabilen Testergebnissen unter Verwendung komplexer Matrix (Serum) wurde mit der Bestimmung von Intra- und Interassayvarianz begonnen. Hierzu wurden identisch beschickte ELISAs nach dem im Kapitel 4 benannten Protokoll parallel und an verschiedenen Tagen durchgeführt. Es wurden sowohl verschiedene Serumverdünnungen (Tab. 7) und die *coating*-Konzentration in Hinblick auf die Messgenauigkeit bewertet. Aufgrund des in diesen Testreihen günstigeren Verhältnisses von hohen Absorptionswerten bei der Messung von Trastuzumabkonzentrationen und vergleichsweise geringer Inter- und Intraassayvarianz wurde das Standardcoating auf 1 µg/ml HER2/neu ECD festgelegt (Daten nicht gezeigt). Ab einer Serumverdünnung von 1:2.000 war eine Standardkurve mit geringem *background* und hoher Extinktion bei Messung des Analyten ableitbar (Abb. 43). Geringere Verdünnungsstufen führten zu einem zu hohen *background*, der eine Konzentrationsbestimmung von Trastuzumab unmöglich machte (Daten nicht gezeigt). Höhere Verdünnungen wie 1:4.000 und 1:6.000 senkten die gemessene Extinktion ohne den *background* relevant zu beeinflussen, so dass diese als weniger geeignet anzusehen sind.

Zur Bewertung der geeignetsten Serumverdünnung wurde erneut die Inter- und Intraassayvarianz bestimmt. Für die Intraassayvarianz wurden jeweils 8 Replikate für niedrige Trastuzumabkonzentrationen (L1-4; Trastuzumabkonzentration 10 ng/ml) und hohe Trastuzumabkonzentrationen (H1-4; Trastuzumabkonzentration 100 ng/ml) angelegt (Tab. 7). Parallel wurde die Standardkurve gemessen (Abb. 43). Der Variationskoeffizient lag für alle gemessenen Konzentrationen sowohl für Standards mit niedriger, als auch hoher Trastuzumabkonzentration unter 5% und somit im geforderten Bereich (Tab. 5). Die Ergebnisse waren unabhängig vom Grad der Serumverdünnung stabil.



**Abbildung 43 Standardkurven für Trastuzumab und HER2/neu ECD in einfacher und komplexer Matrix (ELISA).** Coating: HER2/neu ECD (0,5 µg/ml). Trastuzumab (0, 25, 50 und 100 ng/ml) in Puffer (einfache Matrix) oder Serum (komplexe Matrix in verschiedenen Verdünnungsstufen). Detektionsantikörper: anti human IgG POD (1:10.000). Die Absorption in ungecoateten wells wurde berücksichtigt (background).

Bei Bestimmung der Interassayvarianz (Tab.7) wurde der geforderte Variationskoeffizient (CV%) von max. 20% bei einer Serumverdünnung von 1:2.000 und Berücksichtigung von 7 Läufen nur bei hohen Trastuzumabkonzentrationen von 100 ng/ml (H und T100) geringfügig überschritten. Der Variationskoeffizient für alle gemessenen Werte in den 7 Läufen lag bei 16,5%. Für eine Serumverdünnung von 1:4.000 konnten 6 Läufe ausgewertet werden. Hier lag der Variationskoeffizient für hohe Trastuzumabkonzentrationen von 100 ng/ml (H und T100) bei 24%. Der Variationskoeffizient für alle gemessenen Werte in den 6 Läufen lag jedoch bei 15,1%. Aufgrund der in Serumproben erwarteten Trastuzumabkonzentrationen wurde ein niedriger CV% im Bereich hoher Trastuzumabkonzentrationen als besonders relevant betrachtet. Dementsprechend wurde die Standardserumverdünnung auf 1:2.000 festgelegt.

Es erfolgte die probatorische Messung von zwei durch die Frauenklinik des Klinikum Rechts der Isar zur Verfügung gestellten Patientenproben (Serum von Patientinnen unter laufender Therapie mit Trastuzumab bei Mammakarzinom ohne Angabe des Zeitpunktes der letzten Trastuzumabgabe). Hierzu wurde ein ELISA nach den hier etablierten Protokollen unter Verwendung von Standard coating 1 µg/ml HER2/neu ECD und Serumverdünnung 1:2.000 durchgeführt. Parallel zur Standardkurve mit Trastuzumabkonzentrationen bekannter Höhe, wurden die Patientenproben gemessen. Alle Messungen wurden als Duplikate angelegt. Die Messwerte wurden in ein kommerzielles Programm eingespielt (ElisaAnalysis.com (Version 3.2) 2014). In diesem Programm wurde mittels 4-Parameter Logistikkfunktion die Eichkurve erstellt (Abb. 44A) und anhand dieser der Trastuzumabgehalt in den gemessenen Patientenproben bestimmt (Abb. 44B). Die Anforderungen an die Intraassayvarianz waren erfüllt.



### Intra-Assayvarianz

	Serum 1:2.000								Serum 1:4.000							
	H1	H2	H3	H4	L1	L2	L3	L4	H1	H2	H3	H4	L1	L2	L3	L4
n	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
MW OD 405 nm	0,97	0,96	0,96	0,96	0,29	0,3	0,2	0,23	0,78	0,78	1,13	0,53	0,19	0,19	0,21	0,19
SD	0,02	0,01	0,02	0,01	0,004	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,01	0,004	0,004	0,002	0,01
CV (%)	2,3	0,9	2	0,9	1,7	3,6	4	2,1	2,9	2,9	1,6	1,1	2,3	2,3	1	2,7

### Inter-Assayvarianz

	Serum 1:2.000								Serum 1:4.000							
	H	L	T10	T20	T40	T60	T80	T100	H	L	T10	T20	T40	T60	T80	T100
n	7	7	7	7	7	7	7	7	6	6	6	6	6	6	6	6
MW OD 405 nm	0,91	0,24	0,24	0,35	0,57	0,74	0,84	0,91	0,8	0,2	0,2	0,29	0,46	0,60	0,68	0,8
SD	0,19	0,03	0,03	0,05	0,10	0,13	0,16	0,19	0,12	0,012	0,012	0,04	0,08	0,12	0,16	0,19
CV %	20,8	11,1	11,1	14,7	17,7	17,6	18,6	20,8	24	6,2	6,2	12,9	16,5	20,1	23,7	24

Inter-Assay CV %

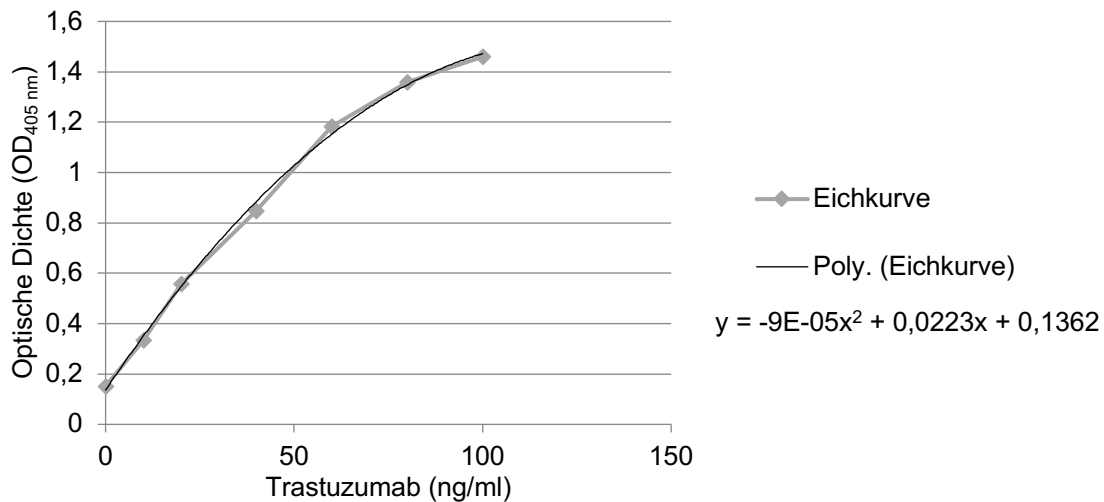
16,5 %

15,1 %

**Tabelle 7 Bestimmung der Intra- und Interassayvarianz von verschiedenen Serumverdünnungen (ELISA) modifiziert nach Jamieson et al. 2009).** *Coating* der HER2/neu ECD mit 1 µg/ml. Die Standards L und H entsprechen einer Trastuzumabkonzentration von 10 bzw. 100 ng/ml. Die Standards T10 bis T100 entsprechen Trastuzumabkonzentrationen von 10, 20, 40, 60, 80 und 100 ng/ml. Bei der Berechnung der Intraassayvarianz bezeichnet n die Anzahl der Replikate, bei der Interassayvarianz die Anzahl der Läufe.

Die Messung der Patientenprobe 5-2 (bezeichnet als U1 in den Konzentrationsberechnungen) wies eine Trastuzumabkonzentration von 43,5 ng/ml auf. Die Trastuzumab-Konzentration in der Patientenprobe 5-4 (bezeichnet als U8 in den Konzentrationsberechnungen) lag bei 46,7 ng/ml. Somit konnte unter Einsatz der rekombinanten HER2/neu ECD ein den gebräuchlichen Qualitätsanforderungen entsprechender ELISA zur Messung von Trastuzumabkonzentrationen in Serum etabliert werden.

**A**



**B**

Well Category	Well	Well Position	Well Optical Density	Mean Optical Density	Mean Concentration	Confidence Interval
Standard	S1	C1,D1	1.464,1.456	1.46	100	N/A
Standard	S2	C2,D2	1.392,1.327	1.36	80	N/A
Standard	S3	C3,D3	1.167,1.2	1.184	60	N/A
Standard	S4	C4,D4	0.868,0.826	0.847	40	N/A
Standard	S5	C5,D5	0.573,0.541	0.557	20	N/A
Standard	S6	C6,D6	0.342,0.325	0.334	10	N/A
Negative	N1	C7,D7	0.143,0.161	0.152	0	N/A
Unknown	U1	A1,B1	0.931,0.956	0.944	43.549	29.658 - 57.428
Unknown	U8	A11,B11	0.965,1.014	0.99	46.69	30.358 - 62.97

**Abbildung 44 A: Standardkurve mit HER2/neu ECD bei Serumverdünung 1: 2.000 (ELISA) und B: Konzentrationsberechnungen von Proben anhand der Standardkurve (ELISAAanalysis.com (Version 3.2) 2014). U1 entspricht der Patientenprobe 5-2 und U8 der Probe 5-4.**

## 6 Diskussion

Um den Trastuzumabgehalt in Patientenblut messbar zu machen, muss zunächst eine zuverlässige, quantitative Nachweismethode von Trastuzumab existieren. Ziel dieser Arbeit war es eine solche Methode zu etablieren. Als Nachweismethode wurde der ELISA gewählt. Grundvoraussetzung für erfolgreiche Testung in diesem System ist die Verfügbarkeit eines *capture antigens* für Trastuzumab in vitro. Im Verlauf könnte dann die Messung von Standards und Proben erfolgen. Durch Korrelation mit klinischen Daten könnten aus diesen Messungen evt. Ober- und Untergrenzen für Trastuzumabspiegel erarbeitet werden. Dies könnte in der Folge die therapeutische Effizienz von Trastuzumab verbessern und die Minimierung von unerwünschten Arzneimittelwirkungen wie Kardiotoxizität ermöglichen.

In diversen Phase II und III Studien schien der Nachweis unterschiedlich hoher Trastuzumab-Konzentrationen im Serum von ProbandInnen keinen relevanten Einfluss auf Effektivität und Sicherheit der Therapie zu haben (Quartino et al. 2016, 2019). Diese Untersuchungen zur Pharmakodynamik von Trastuzumab und Korrelation mit klinischen Daten wurden im Wesentlichen nach Abschluss des experimentellen Teils dieser Arbeit veröffentlicht. Bei einer Fluktuation von Trastuzumab-Spiegeln zwischen 57 und 170 µg/ml (Tal- und Höchstspiegel) bei i.v. Gabe (Quartino et al. 2016), bleibt die Frage bestehen, welche die erforderliche Mindestkonzentration für optimale Therapieergebnisse wäre. In Mausmodellen wurde ein Talspiegel von 20 µg/ml Trastuzumab als effektiv definiert (Cobleigh et al. 1999).

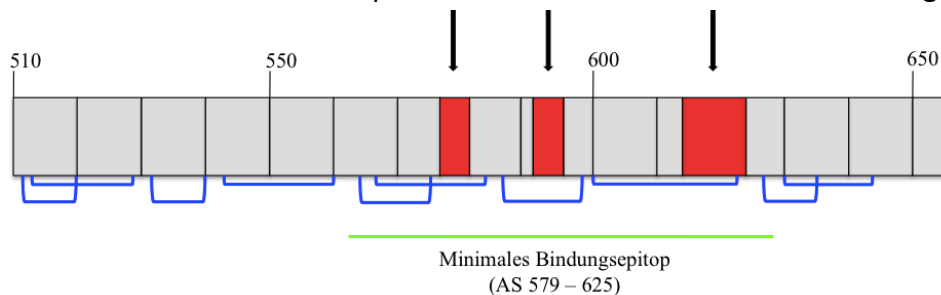
### 6.1 Design der *capture antigens* für Trastuzumab

Das spezifische Bindungsepitop für Trastuzumab befindet sich innerhalb der Domäne IV des HER2/neu - Rezeptors (Cho et al. 2003), welche zum Zeitpunkt des experimentellen Teils dieser Dissertation nicht kommerziell erhältlich war. Dementsprechend war es das erste Ziel dieser Doktorarbeit das Bindungsepitop rekombinant herzustellen und als *capture antigen* einzusetzen. Die Anforderung an das *capture antigen* ist eine ausreichend hohe Affinität zu Trastuzumab um einen robusten Immunoassay zur Messung von Standards etablieren zu können. Die Bindung von Trastuzumab an Domäne IV des HER2/neu-Rezeptors ist konformationsabhängig, das heißt sie entsteht erst bei nativer Konfiguration des Proteins (Cho et al. 2003). Diese wird über Disulfidbrücken vermittelt (Kanthala et al. 2017).

Im ersten Schritt wurde die Domäne IV des HER2/neu - Rezeptors in einem prokaryotischen System synthetisiert (AS 510 bis 653; Größe ca. 20 kDa). Als stabiles, effektives und günstiges System zur Produktion rekombinanter Proteine bietet sich die Expression in *E. coli* an. Diese Bakterien sind wenig anspruchsvoll und ermöglichen binnen kurzer Zeit eine hohe Ausbeute an Protein. Auf die Herstellung der gesamten HER2/neu ECD wurde zunächst verzichtet, da das Bindungsepitop von Trastuzumab vollständig in Domäne IV des extrazellulären Anteils liegt und alle für die zur Ausbildung der natürlichen Konformation notwendigen Strukturen beinhalten sollte. Das Bindungsepitop wird von den Aminosäuren 557 bis 625 gebildet. Die HER2/neu ECD ist mit ca. 100 kDa grenzwertig groß, um erfolgreich in Prokaryoten exprimiert zu werden. Auch die darauffolgende Rückfaltung im Puffersystem hin zur nativen Konformation ist bei dieser Proteingröße störungsanfällig, wenn nicht sogar unmöglich, weil

29 Disulfidbrücken gebildet werden müssten. Es gibt allerdings Daten über die erfolgreiche Rückfaltung von HER2/neu ECD aus *E. coli* unter Verwendung eines Glutathion S-Transferase (GST)-Tags (Liu et al. 2007). Das rekombinante Protein wurde jedoch nicht für den Nachweis von Trastuzumab verwendet, so dass von der Synthese der HER2/neu ECD in Prokaryoten primär abgesehen wurde.

Alternativ wurde die Produktion des minimalen Bindungsepitops von Trastuzumab in der Domäne IV (AS 579 bis 625; Cho et al. 2003) diskutiert (Abb. 45). Dieser Sequenz fehlt jedoch ein Cystein, welches zur Bildung der Disulfidbrücken benötigt wird. Dies könnte die Ausbildung der natürlichen Konformation bei der Rückfaltung beeinflussen. Da Trastuzumab ein konformationsabhängiger Antikörper ist, ist diese jedoch obligat für eine erfolgreiche Interaktion beider Moleküle. Dementsprechend wurde dieser Ansatz nicht verfolgt.



**Abbildung 45 Schematische Darstellung der Domäne IV des HER2/neu - Rezeptors (AS 510 - 653).** Mit Pfeilen gekennzeichnet sind die Hauptinteraktionsstellen mit Trastuzumab, die loops der AS 557-561, 570-573 sowie AS 593-603 (Cho et al. 2003). Disulfidbrücken sind blau markiert. Lokalisationen Disulfidbrücken (C – C): 511 – 520; 515 – 528; 531 – 540; 544 – 560; 563 – 576; 567 – 584; 587 – 596; 600 – 623; 626 – 634; 630 – 642 (Uniprot 2020).

Aufgrund mangelnder Reproduzierbarkeit der Testergebnisse bei Verwendung der HER2/neu Domäne IV als *capture antigen* im ELISA wurden, neben den im Ergebnisteil aufgeführten Modifikationen des Protokolls wie z.B. Assayaufbau als *Sandwich* ELISA (Tab. 6), weitere Alternativen diskutiert. Ein alternatives *capture antigen* für Trastuzumab böte lediglich der humane Immunglobulin G-Anteil des Antikörpers (Goldenberg 1999, Hudis 2007). Dieser Ansatz ist jedoch nicht zielführend, weil aufgrund der physiologisch vorkommenden hohen Mengen anderer Immunglobuline der Klasse G im menschlichen Serum kein spezifischer Nachweis von Trastuzumab im ELISA möglich wäre. Alternativ zur Expression in *E. coli* und humanen Zelllinien hätte die Expression von HER2/neu Domäne IV in anderen Zelllinien, wie z.B. Schneider 2 Zellen (*Drosophila melanogaster*) erfolgen können (Kanthala et al. 2017), da die Glykosylierung von Proteinen in Insekten, eine Affinitätssteigerung zur Folge haben könnte.

Mit dem Einsatz von HER2/neu Domäne IV aus Eukaryoten, im Vergleich zu dem von *E. coli* exprimierten Protein, konnten bereits bessere Ergebnisse im ELISA erzielt werden. Diese waren jedoch nicht optimal in Bezug auf ihre Reproduzierbarkeit. Wir beschlossen deshalb im nächsten Schritt die Synthese eines größeren Proteins, nämlich der gesamten HER2/neu ECD in Eukaryoten. Grund für diese Entscheidung war die Annahme, dass die Expression der

gesamten ECD zu einer größeren strukturellen Stabilität des Proteins führen würde und so die Affinität von Trastuzumab noch weiter steigern könnte.

Um ein Protein von der Größe der HER2/neu ECD (624 AS,  $\approx$  100 kDa) in nativer Konformation zu synthetisieren, ist die Expression in Eukaryoten der Bakterienkultur überlegen. Im Zytosol der Eukaryoten befinden sich sogenannte Chaperone. Diese tonnenförmigen Proteine heften sich während der Translation an Polypeptidketten und ermöglichen ATP-abhängig die Faltung zu Proteinen. Komplexe Faltungen und cis/trans Isomerisierungen sind so möglich. Da sich in *E. coli* das rekombinante Protein in unlöslichen Einschlusskörpern im Zytosol ablagert (Rosano et al. 2014), ist die Gewinnung reaktiven Proteins hier üblicherweise nur über denaturierende Verfahren mit anschließender Rückfaltung in Redoxsystemen möglich (Liu et al. 2007).

Wie bereits erwähnt, erfolgt in humanen Zelllinien ähnlich der in vivo Situation neben der aktiven Faltung des Proteins zudem dessen Glykosylierung im sekretorischen Prozess. Diese Glykosylierung erfolgt nicht bei Expression in *E. coli* (Sahdev et al. 2008), wie wir im Westernblot mit HER2/neu Domäne IV aus *E. coli* und humanen Zelllinien bestätigen konnten (Abb. 29). Im Westernblot ist die HER2/neu Domäne IV aus *E. coli* aufgrund fehlender Glykosylierung deutlich kleiner. Da die Affinität von Trastuzumab zu nicht glykosylierter HER2/neu Domäne IV im ELISA nicht ausreichend war, wurde dies als möglicherweise relevanter Unterschied zur in vivo Situation betrachtet. Grundsätzlich hat die Glykosylierung von Proteinen einen Einfluss auf die Erreichbarkeit von Epitopen oder ist selbst Teil des Epitops. In einer neueren Arbeit wurde der Effekt der Glykosylierung des HER2/neu - Rezeptors auf die Bindung von Trastuzumab untersucht. Die auf einem Biosensor-Chip immobilisierten, HER2/neu überexprimierenden Zelllinien und, in einem weiteren Ansatz, rekombinantes HER2/neu Protein zeigten nach Deglykosylierung eine gesteigerte Bindung von Trastuzumab. Gleichzeitig stieg jedoch die Dissoziationskonstante, was von den Autoren auf eine geringere Stabilität des HER2/neu – Trastuzumab - Komplexes nach Deglykosylierung zurückgeführt wird (Peiris et al. 2017). Die Ergebnisse sind nur bedingt übertragbar auf die Testsituation im ELISA. Dennoch lässt sich der Rückschluss ziehen, dass glykosyliertes Protein eine geringere Dissoziationskonstante bedeutet. Die Stabilität des HER2/neu - Trastuzumab - Komplexes ist in Anbetracht der diversen Waschschriffe zur Entfernung unspezifischer Proteine aus dem ELISA jedoch von großer Relevanz.

Des Weiteren ist neben der Qualität des Proteins auch dessen Verfügbarkeit für Versuchsreihen von größter Bedeutung. Da die in unserem Labor möglichen Zellkulturvolumina eine geringe Ausbeute von rekombinantem Protein erwarten ließen (Yuan et al. 2003), wurde die Transfektion und Proteinherstellung bei der Fa. EMP Genetech in einem größeren Volumen von HEK293 Suspensionzellen beauftragt. Diese Zellen sind bekannt für ihre besonders naturnahe posttranslationale Modifizierung rekombinanter Proteine und die hohe Proteinausbeute (Bandaranayake et al. 2014).

Zur besseren Übersicht sind in Tabelle 8 noch einmal sämtliche im Rahmen dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Proteine, deren jeweiliger Vektor und die sie synthetisierenden Zellen aufgeführt.

	pQE-100	pSecTag2/HygroB	pCEP-Pu/AC7
<i>E. coli</i>	Domäne IV	o	o
MDA-MB-231	o	Domäne IV	Domäne IV
ZR75-1	o	Domäne IV	Domäne IV
HEK 293	o	Domäne IV	ECD

**Tabelle 8 Übersicht aller rekombinant hergestellten Proteine mit Angabe von Vektor und Syntheseort.**

## 6.2 Assayvalidierung

Wie im Kapitel „Methoden“ bereits dargestellt, ist Grundvoraussetzung für einen Assay zur Messung von Proben, dass Selektivität und Spezifität für den Analyten vorliegen, und eine Standardkurve mit reproduzierbaren Messergebnissen erstellt werden kann (FDA 2018). Sind diese Voraussetzungen gegeben, werden im nächsten Schritt die Ergebnisse aus Messungen der Qualitätskontrollen und Standardkurven in verschiedenen Matrices und Verdünnungen ausgewertet. Die in Tabelle 5 aufgeführten Zielwerte sollten erreicht werden, damit der Assay für weitere Testungen, z.B. in klinischen Studien, in Betracht gezogen werden kann (FDA 2018). In Kenntnis der in anderen Assays gemessenen Trastuzumabkonzentrationen in Patientenblut und der eingesetzten Serumverdünnungen wurden nach orientierenden Experimenten (Daten nicht gezeigt) die Konzentrationen der Standards zwischen 0 – 100 ng/ml Trastuzumab gewählt (Maple et al. 2004, Jamieson et al. 2009, Quartino et al. 2016, 2019). Die mit den verschiedenen *capture antigens* erzielten Ergebnisse werden im Folgenden anhand o.g. Bewertungskriterien (Tab. 5) diskutiert.

### HER2/neu Domäne IV aus *E. coli*

In qualitativen Funktionstests konnte die erfolgreiche Rückfaltung der rekombinanten HER2/neu Domäne IV aus *E. coli* durch Nachweis der spezifischen Bindung von Trastuzumab an das rekombinante Protein belegt werden (Abb. 16). Als unspezifisches Protein diente Transferrin (Größe ca. 80 kDa), ein physiologisch im Serum vorkommendes Protein zum Eisentransport. Zudem wurde BSA verwendet, das bovine Serumalbumin (Größe ca. 66,5 kDa). BSA wird im ELISA standardmäßig nach dem *coaten* zur Absättigung der freien Bindungsstellen im *well* verwendet (Gibbs 2001). Trastuzumab wurde dafür in einer einfachen Matrix ohne Zusatz von Serum verdünnt, und es wurden ELISAs nach dem im Methodenteil beschriebenen Protokoll durchgeführt. Die Affinität von Trastuzumab zu rekombinanter HER2/neu Domäne IV in einfacher Matrix ist als ausreichend hoch zu bewerten. Die unspezifische Extinktion der mit Domäne IV *gecoateten wells* ohne Trastuzumab und der Negativkontrollen erklärt sich durch die Proteine selbst. Sie verursachen bei der Durchleuchtung im Spektrometer auch eine Lichtabsorption, die als *background* bezeichnet wird. Als spezifische Extinktion gilt nur die durch gebildete Farbmoleküle bedingte Absorption, da sie mit dem Analyten korreliert.

Deshalb wird bei der Quantifizierung des Analyten der *background* von den Absorptionswerten abgezogen (Pruslin et al. 1991).

Die Anforderungen an den Nachweis spezifischer Bindung eines Analyten sind uneinheitlich und werden in der Regel mit Werten definiert, die erst zu einem späteren Zeitpunkt in der Assayvalidierung erhoben werden können (EMA 2011). Dazu gehören u.a. die Forderung für den *background*  $< 1/3$  des gemessenen LLOQ (*lower level of quantification*) (Azadeh et al. 2019) oder die Empfehlung zu Messungen des Analyten im Bereich des LLOQ und ULOQ (*upper level of quantification*). Hierbei sollten die Messwerte max. 25% von der theoretischen, errechneten Konzentration abweichen (EMA 2011). Dementsprechend haben wir zu diesem frühen Zeitpunkt der Assayvalidierung als Nachweis für eine spezifische Bindung von Trastuzumab an HER2/neu Domäne IV zunächst eine Extinktion höher als das Zweifache des *backgrounds* für Standards gefordert, die den Analyten enthielten und gleichzeitig Extinktionen im Bereich des *backgrounds* für Standards ohne Analyten (EMA 1995). Diese Vorgaben wurden erfüllt.

Im nächsten Schritt wurde geprüft, ob eine positive Korrelation zwischen Analytenkonzentration und Extinktion besteht, also die Erstellung einer Standardkurve möglich ist. Hierzu wurde zunächst in einfachen Matrices (Puffer) Trastuzumab-Gebrauchslösung bekannter Konzentration verdünnt und diese Standards gemessen (Abb. 17). Es zeigte sich eine typische sigmoidale Sättigungskurve. Bei niedrigen Trastuzumabkonzentrationen von 20 bis 60 ng/ml war der Anstieg annähernd linear. Im Bereich von 80 bis 100 ng/ml erschien die Plateauphase erreicht. Die zuverlässige quantitative Messung eines Analyten erfolgt idealerweise im Bereich des linearen Anstiegs der Kurve. In Patientenblut ist eine Trastuzumabkonzentration von  $63 \pm 23 \mu\text{g/ml}$  zu erwarten (Jamieson et al. 2009). Da die Quantifizierung nur im exponentiellen Anteil der Kurve möglich ist, müssen später bei der Messung Proben weiter verdünnt, und das Messergebnis um den Verdünnungsfaktor korrigiert werden.

Der *background* sollte im ELISA bei einer Standardkurve im Bereich von ca. 1,0 bis 3,0 Optische Dichte (OD) nicht höher als 0,3 sein (Azadeh et al. 2019). Dieses Ziel wurde erreicht. Die Standardkurven in einfacher Matrix waren ausreichend genau reproduzierbar (Daten nicht gezeigt), um im nächsten Schritt die Testung in komplexer Matrix (Serum) zu rechtfertigen. Dieser Schritt ist essenziell, da zu messende Proben ebenfalls aus komplexer Matrix (Serum) bestehen würden. In folgenden Versuchen mit Serum stieg, im Vergleich zu einfachen Matrices, die gemessene Absorption bei identischer Trastuzumabkonzentration. Serum ist ein bekannter Störfaktor, da es sich um eine extrem komplexe Matrix handelt (EMA 2011). Beim Einsatz von Standards in komplexer Matrix (Serum) konnte jedoch der *proof of principle* erbracht werden. Die Messung einer Standardkurve war möglich, und auch die Anforderungen an Spezifität und Selektivität wurden erfüllt (Abb. 18 - 20). Jedoch waren die Messergebnisse wenig konstant, und die in Tabelle 5 genannten Zielwerte konnten nicht erreicht werden, sodass Intra- und Interassayvariabilität nicht bestimmt wurden (Daten nicht gezeigt).

Weitere Schritte zur Assayvalidierung deuteten darauf hin, dass die Bindungsaffinität von Trastuzumab zu HER2/neu Domäne IV aus *E. coli* nicht ausreicht, um konstante Messergebnisse zu erzielen. Sehr hohe Serumverdünnungen ergaben bessere Resultate. Die in der klinischen Routine zugelassenen ELISA arbeiten jedoch mit deutlich niedrigeren Verdünnungen im Bereich 1:100 oder 1:200. Eine Probenverdünnung im Bereich von 1:32.000 wäre in der klinischen Routine aufgrund des resultierenden Messfehlers (Noble et al. 2008) und der zu erwartenden Trastuzumab-konzentration in Proben (Jamieson et al. 2009) nicht anwendbar.

Um die unspezifischen Interaktionen von Serum im Assay zu minimieren und die Affinität von Trastuzumab zu rekombinanter HER2/neu Domäne IV zu steigern, wurden sämtliche Aspekte des Protokolls geprüft und Modifizierungen vorgenommen (Tab. 6). Eine ausreichende Assaystabilität resultierte daraus nicht. Dementsprechend musste eine grundsätzlich zu geringe Affinität zwischen rekombinanter HER2/neu Domäne IV aus *E. coli* und Trastuzumab für dessen quantitativen Nachweis in Serum angenommen werden. Als mögliche Ursache für die mangelnde Affinität wurde das Syntheseverfahren in *E. coli* diskutiert. Bei der Expression rekombinanter Proteine in Prokaryoten wird das Protein im Überschuss gebildet und präzipitiert oft. Es entstehen Proteinaggregate. Neben der Überexpression kann auch die fehlende Ausbildung der nativen Konformation und insbesondere die Ausbildung von Disulfidbrücken im reduzierenden Milieu des Zytoplasmas ursächlich sein (Sahdev et al. 2008, Rosano et al. 2014). Dementsprechend erfolgt der Aufschluss der Bakterien und das Lösen sowie Aufreinigen des rekombinanten Proteins unter denaturierenden Bedingungen. Anschließend muss das Protein *in vitro* rückgefaltet werden (Yamaguchi et al. 2014). Welche Konformation es dabei annimmt, ist nicht exakt bestimmbar. Die Wahrscheinlichkeit, dass die energieärmste und somit bevorzugte Faltung der nativen bzw. aktiven Konformation entspricht, ist jedoch hoch. Man weiß aus Versuchen mit z.B. humanen Kallikreinen, deren Aktivität nach Rückfaltung gemessen werden kann, dass *in vitro* Rückfaltungen durchaus erfolgreich sind (Debela et al. 2006). Anhand unserer Ergebnisse kann angenommen werden, dass ein hoher Anteil an Domäne IV nicht in die aktive Konformation zurückgefaltet werden konnte. Zum einen liegt kaum genug aktives Protein für eine optimale Extinktion bei einer Standardmessung in einfacher Matrix vor (Abb. 32). Zum anderen ist die Affinität nicht hoch genug, um in komplexer Matrix reproduzierbar spezifische Bindungen zu ermöglichen und den Analyten zu quantifizieren. Dies könnte daran liegen, dass nur einige, nicht jedoch alle vier Disulfidbrücken bei der Rückfaltung ausgebildet wurden. Denkbar ist auch, dass die anderen Domänen des HER2/neu - Rezeptors einen größeren Anteil an der Bindung von Trastuzumab haben als angenommen (Cho et al. 2003).

Ein weiterer wichtiger Faktor könnte die fehlende Glykosylierung der von *E. coli* exprimierten Proteine sein (Sahdev et al. 2008). Bei Experimenten zur Stabilität des Trastuzumab-HER2/neu – Komplexes führte die Deglykosylierung des Rezeptors zu verminderter Stabilität des Komplexes und einer erhöhten Dissoziationskonstante (Peiris et al. 2017). Aufgrund der immensen Bedeutung des Glykosylierungsstatus für die Trastuzumabbindung, wurden Ansätze zur Optimierung der Expression in *E. coli* wie Einsatz von Chaperonen, Proteinsekretion ins Periplasma, Einsatz von *E. coli* Stämmen mit einem oxidativen



zytoplasmatischen Milieu, etc. (Sahdev et al. 2008, Rosano et al. 2014) nicht weiterverfolgt. Stattdessen sollte die Proteinsynthese in eukaryotischen Zellen erfolgen.

### **Her2/neu Domäne IV aus eukaryotischen Zellen**

Zunächst wurde rekombinante HER2/neu Domäne IV in humanen Tumorzelllinien synthetisiert. Hierzu wurden Plasmide hergestellt, die für sekretorische Proteine kodieren. Die rekombinante Synthese und Glykosylierung der Her2/neu Domäne IV konnte im Westernblot nachgewiesen werden (Abb. 30). Prinzipiell konnte belegt werden, dass die so synthetisierten Proteine von Trastuzumab erkannt werden (Abb. 31). Die im Labor realisierbaren Reaktionsvolumina, und damit das aufgereinigte Protein, waren jedoch so gering, dass lediglich qualitative Tests durchgeführt werden konnten. Um über ausreichend Protein für quantitative Messungen zu verfügen, wurde für die Proteinsynthese in HEK 293 Suspensionszellen die Fa. EMP Genetech (Ingolstadt) beauftragt. Diese Zelllinie ist bekannt für effiziente transiente Transfektion und hohe Proteinausbeute von 1 - 80 mg/l (Aricescu et al. 2013). Zudem sind große Zellkulturvolumina von mehreren Litern einsetzbar (Bandaranayake et al. 2014).

Die Glykosylierungsmuster rekombinanter Proteine sind je nach eingesetzter Zelllinie unterschiedlich. So zum Beispiel sind rekombinante Proteine aus HEK 293 und CHO (*chinese hamster ovary*) Zellen derart unterschiedlich glykosyliert, dass dies Einfluss auf ihre Laufgeschwindigkeit in der SDS-PAGE hatte und unterschiedliche Isoformen in der isoelektrischen Fokussierung ergab (Croset et al. 2012). Trastuzumab wird in CHO Zellen synthetisiert. Um jedoch eine der in vivo Situation möglichst ähnliche Glykosylierung zu erreichen, wurden HEK 293 Zellen ausgewählt. Das Glykosylierungsmuster des inzwischen zugelassenen rekombinanten Gerinnungsfaktors VIII (Human-cl rhFVIII; Nuwiq®) aus HEK 293 Zellen hat große Ähnlichkeit mit dem des aus humanem Plasma gewonnenen Faktor VIII (Durmont et al. 2015). Dies bestätigt die Auswahl dieser Zelllinie zur Herstellung eines rekombinanten HER2/neu Rezeptors.

Die weiteren qualitativen Tests zur spezifischen Bindung von Trastuzumab an die Her2/neu Domäne IV waren erfolgreich (Abb. 32). Beim Einsatz von Serum als Matrix waren jedoch erneut bei niedrigeren Verdünnungen von z.B. 1:200 keine akzeptablen Standardkurven messbar (Abb. 33). Hier fällt, wie auch bei den Tests mit HER2/neu Domäne IV aus *E. coli* zuvor, auf dass auch die Extinktion in *wells* mit Nullstandards hoch ist (Abb. 18, 33). Dies lässt auf eine unbekannte Interaktion zwischen Domäne IV und Immunglobulinen schließen. Ursächlich könnten Autoantikörper sein oder andere Antikörper-bindende Substanzen, die sich wie der Analyt verhalten. Letztere wurden in einer Untersuchung in bis zu 40% aller getesteten Seren gefunden (Tate et al. 2004). Diese hätten vermutlich mit den anti-Immunglobulin G Detektionsantikörpern nachgewiesen werden können, was die hohe Extinktion erklären würde. Dies würde bedeuten, dass der spezifische Nachweis von Trastuzumab durch Bindung an HER2/neu Domäne IV möglich ist, jedoch in humanem Serum unbekannte Interaktionen der rekombinanten HER2/neu Domäne IV mit unspezifischen Antikörpern und anderen Substanzen bestehen, die die Quantifizierung des Analyten erschweren. Dagegen spricht, dass die Vorinkubation der in Serum gelösten Standards auf einer Absorptionsplatte die

Interferenzen mit unspezifischen Serumbestandteilen nicht ausreichend minimieren konnte (Daten nicht gezeigt) (Maple et al. 2004). Eine Hitzedenaturierung der Immunglobuline im Serum (Akazawa-Ogawa et al. 2018) ist aufgrund des intendierten Nachweises eines humanisierten monoklonalen Antikörpers mit diesem Assay, nicht sinnvoll möglich und hitzestabilen Analyten vorbehalten.

Bei höheren Serumverdünnungen von z.B. 1:1.000 und 1:2.000 (Abb. 34) hingegen waren zuverlässig Standardkurven messbar. Inter- und Intraassayvarianz (Tab. 5) der Standards mit humanem Serum schwankten jedoch oberhalb des zulässigen Maximums von 20% (Daten nicht gezeigt). In der Folge sollte die Affinität von Trastuzumab zum rekombinanten HER2/neu - Rezeptor noch weiter gesteigert werden.

### **HER2/neu ECD aus eukaryotischen Zellen**

Um einen Assay, der die von EMA und FDA veröffentlichten Kriterien für die Messung von Proben erfüllt, zu etablieren, wurde schließlich die gesamte extrazelluläre Domäne (ECD) des HER2/neu - Rezeptors synthetisiert (EMA 2011, FDA 2018). Aufgrund der ermutigenden Ergebnisse aus den Experimenten mit HER2/neu Domäne IV aus Eukaryoten, wie Nachweis spezifischer Bindung auch in komplexer Matrix, wurde das Plasmid pSecTag2/HygroB-HER2/neu ECD nach Bestätigung der korrekten Sequenz durch DNA-Sequenzanalyse (Abb. 35 - 38) an die Fa. EMP Genetech (Ingolstadt) versandt, um ausreichend rekombinantes Protein in HEK 293 Suspensionszellen produzieren zu lassen. Die initialen Experimente zum Nachweis des Proteins anhand seines His-Tags und der spezifischen Bindung von Trastuzumab waren erfolgreich (Abb. 39, 40). Im nächsten Schritt ergaben erste ELISAs zufriedenstellende Standardkurven (Daten nicht gezeigt), sodass mit der Validierung einzelner Parameter begonnen wurde.

### **Etablierung Standardcoating und Dilution**

Zur Ermittlung der optimalen Konzentration beim *Coating* von HER2/neu ECD (einzusetzende Mindestmenge) wurden nach den Erfahrungen aus Assays mit HER2/neu Domäne IV max. 1 µg/ml Protein aufgetragen, sowie weitere Verdünnungen in Coatingpuffer von 0,5 µg/ml und 0,33 µg/ml (Abb. 41). Selbst bei einer relativ geringen Serumverdünnung von 1:1.000 zeigte sich eine zufriedenstellende Intra- und Interassayvarianz der Extinktion bei einem *coating* von 1 µg/ml. Bei Anwendung geringerer Konzentrationen von HER2/neu ECD überstieg die Interassayvarianz den zulässigen Höchstwert von  $\pm 20\%$  (FDA 2018). Bei einem *coating* mit 0,33 µg/ml war das Verhältnis umgekehrt. Weil für die Bestimmung der Coatingkonzentration keine Messung und Extrapolation der zuvor errechneten, theoretischen Konzentration des Analyten vorgesehen wurde, wurde für diesen Optimierungsschritt die von der FDA geforderte Anzahl von Replikaten und Läufen unterschritten (Tab. 5).

In folgenden Experimenten sollte die optimale Serumverdünnung bestimmt werden (Abb. 42, 43). Bei einer Serumverdünnung von 1:1.000, wie sie zur Bestimmung der Coatingkonzentration eingesetzt wurde, ist insbesondere bei Nullstandards und Standards niedriger Analytenkonzentration ein starker Matrixeffekt zu beobachten (Abb. 42). Die unspezifischen Bindungen bedingen eine hohe Extinktion und CV% oberhalb des zulässigen

Maximums von 20% (Tab. 5). Bei höheren Serumverdünnungen ab 1:2.000 waren diese Effekte deutlich reduziert. Dies ermöglichte im Verlauf auch eine erneute Reduktion der Coatingkonzentration auf bis zu 0,5 µg/ml ohne Einbußen in der Präzision der Messergebnisse (Abb. 42). In der Literatur sind für Assays zur Bestimmung von Trastuzumab Serumverdünnungen bis 1:2.000 beschrieben (Maple et al. 2004).

Zur Bewertung der Intra- und Interassayvariabilität verschiedener Serumverdünnungen wurden Experimente mit Duplikaten in mind. 6 Läufen unternommen (Tab. 7). Bei einer Serumverdünnung von 1:2.000 konnten die Anforderungen an die CV % von max. 20% (FDA 2018) vollständig eingehalten werden (Tab. 7), wobei die L - Standards 10 ng/ml Trastuzumab beinhalteten und somit das LLOQ (*lower level of quantification*, Tab. 5) abdeckten. Die H - Standards deckten mit 100 ng/ml das ULOQ (*upper level of quantification*, Tab. 5) ab. Serumverdünnungen von 1:4.000 ergaben eine Überschreitung des zulässigen Maximums der CV% in Standards höherer Konzentration, die noch unterhalb des ULOQ lagen. So betrug der Variabilitätskoeffizient 23,7 % bei einer Trastuzumabkonzentration von 80 ng/ml (Tab. 7). Dementsprechend lag für eine Serumverdünnung von 1:2.000 ein ausreichend präziser Assay vor, um Proben damit zu messen. Hierfür wurden mit o.g. Serumverdünnung Standards hergestellt und im gleichen Lauf Patientenproben (Serum gleicher Verdünnung) gemessen (Abb. 44 A, B). Die Konzentration der Proben wurde mit der 4 Parameter-Logistikfunktion in einer frei erhältlichen Software berechnet (Abb. 44B).

Mit der HER2/neu ECD aus HEK 293 Zellen existiert nun ein vielversprechendes *capture antigen* für Trastuzumab, das affin genug ist, um größere Testreihen zur Assayoptimierung zu rechtfertigen (Tab. 7,9).

Aufgrund der Vielzahl an synthetisierten *capture antigens* und Evaluierungsverfahren werden in Tabelle 9 die Ergebnisse noch einmal schematisch dargestellt, um die Herangehensweise zur systematischen Bewertung der rekombinanten Proteine im ELISA zu verdeutlichen.

		Spezifische Bindung	Standardkurve	Probenanalyse	
				Einfache Matrix	Komplexe Matrix
<b>Prokaryot</b>	Domäne IV	+	+	-	(-)
	ECD	o	o	o	o
<b>Eukaryot</b>	Domäne IV	+	+	-	(-)
	ECD	+	+	+	(+)

**Tabelle 9 Schematische Übersicht aller Evaluationsschritte der rekombinanten Proteine und Bewertung der Ergebnisse.**

erfolgreich +	nicht erfolgreich -	möglich (+)	nicht möglich (-)	nicht zutreffend o
---------------	---------------------	-------------	-------------------	--------------------

## 7 Zusammenfassung

In der Behandlung des HER2/neu-positiven Mammakarzinoms ist Trastuzumab, in Kombination mit anderen Substanzen, das zentrale Agens und führt zu einer signifikanten Verbesserung der Prognose der behandelten PatientInnen. Trotz des günstigen Nebenwirkungsprofils kann die Kardiotoxizität von Trastuzumab potenziell therapielimitierend sein. Global betrachtet sind auch die Therapiekosten ein limitierender Faktor für ubiquitären Zugang zu dem Wirkstoff - trotz Zulassung von Biosimilars.

In retrospektiven Analysen zur Pharmakodynamik von Trastuzumab schienen unterschiedlich hohe Trastuzumab-Konzentrationen im Serum von ProbandInnen keinen relevanten Einfluss auf Effektivität und Sicherheit der Therapie zu haben. Das i.v. Dosierungsschema wird lediglich an das individuelle Körpergewicht angepasst, bei der subcutanen Applikation wird keine Dosisanpassung vorgenommen. Unklar ist, wie niedrig die Trastuzumab-Spiegel im Blut sein können, ohne die Wirksamkeit negativ zu beeinflussen.

Ziel dieser Arbeit war es zunächst die Voraussetzungen zum Monitoring von Trastuzumab-Konzentrationen in Serum zu schaffen. Hierzu sollte ein Immunoassay zur Detektion und Quantifizierung von Trastuzumab entwickelt werden. Als Modifikation des klassischen ELISA wurde der sog. *one sided* ELISA gewählt. Hier wird anstatt eines *capture antibodies* das formale Antigen als *capture antigen* eingesetzt um die Mikrotiterwells zu *coaten*. Da das Antigen für Trastuzumab, der HER2/neu - Rezeptor, zum Zeitpunkt des experimentellen Teils dieser Arbeit nicht verfügbar war, wurde dieser im ersten Teil der Arbeit rekombinant hergestellt. Hierzu wurden verschiedene, für die Bindung von Trastuzumab relevante, Abschnitte des Rezeptors in eu- und prokaryotischen Expressionssystemen synthetisiert.

In den anschließend durchgeführten Immunoassays konnte der Beweis erbracht werden, dass Trastuzumab in Prokaryoten produzierte, rekombinante Anteile des HER2/neu - Rezeptors bindet. Die Affinität war jedoch zu niedrig, um reliable Messungen in Serum vornehmen zu können, da dieses als komplexe Matrix einen Störfaktor im ELISA darstellt. Im nächsten Schritt folgte die Produktion von Anteilen sowie der gesamten extrazellulären Domäne des HER2/neu Rezeptors in Eukaryoten mit dem Ziel durch posttranslationale Protein-Modifikationen wie z.B. Glykosylierung die Affinität von Trastuzumab zum rekombinanten Rezeptoranteil zu steigern.

Mit der in Eukaryoten hergestellten rekombinanten extrazellulären Domäne des HER2/neu Rezeptors wurden nach Etablierung eines Standardprotokolls Proben-Messungen vorgenommen und der Assay weiter validiert. Hierbei wurden die Anforderungen an Inter- und Intraassayvariabilität auch bei Einsatz von Serum erfüllt. Die rekombinante extrazelluläre Domäne des HER2/neu - Rezeptors als *capture antigen* des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Immunoassays zur Detektion und Messung von Trastuzumab in Serum ist geeignet um in größeren Testreihen weiter validiert zu werden.

## 8 Appendix

### 8.1 pQE-100 HER2/neu Domäne IV

Im Folgenden sind die Reaktionsansätze für die erste und zweite PCR aufgeführt. Die Klonierungsstrategie und weitere Reaktionsansätze sind dem Kapitel Ergebnisse zu entnehmen. Das entsprechende PCR Programm ist in Tabelle 10 dargestellt.

<u>1. PCR</u>	<u>50 µl</u>	<u>2. PCR</u>	<u>200 µl</u>
<i>Pfu II Ultra</i> Polymerase	0,5 µl	<i>Pfu II Ultra</i> Polymerase	2 µl
<i>Pfu</i> Puffer 10x	5 µl	<i>Pfu</i> Puffer 10x	20 µl
template (cDNA HER2)	1 µl	template (Produkt 1. PCR)	0,5 µl
Primer <i>HER2 up S1</i>	1,25 µl	Primer <i>HER2 up S2</i>	5 µl
Primer <i>HER2 do B1</i>	1,25 µl	Primer <i>HER2 do B2</i>	5 µl
dNTPs (A,C,G,T)	5 µl	dNTPs (A,C,G,T)	20 µl
<i>Aqua dest.</i>	36 µl	<i>Aqua dest.</i>	147,5 µl

Anzahl Zyklen	Schritt	Temperatur	Dauer
1	Denaturierung	95°C	2 min
10	Denaturierung	95°C	20 sec
	Annealing	40°C	20 sec
	Polymerisation	72°C	15 sec
15	Denaturierung	95°C	20 sec
	Annealing	60°C	20 sec
	Polymerisation	72°C	15 sec
1	Polymerisation	72°C	3 min
1	Reaktionsende	4°C	∞

**Tabelle 10** PCR-Programm zur Amplifizierung der DNA-Sequenz HER2/neu Domäne IV für die spätere Klonierung in den Vektor pQE-100. Die hier verwendeten Temperaturen und Zeiten ergeben sich aus den für Primer und Polymerase empfohlenen, optimalen Werten für Annealing und Polymerisation.

## 8.2 pSecTag2/HygroB HER2/neu Domäne IV

Im Folgenden sind die Reaktionsansätze für die erste und zweite PCR aufgeführt. Die Klonierungsstrategie ist dem Kapitel Ergebnisse zu entnehmen. Die entsprechenden PCR Programme sind in den Tabellen 11 und 12 dargestellt.

<u>1. PCR</u>		<u>2. PCR</u>	
<i>iProof</i> Polymerase (2U/μl)	50 μl	<i>iProof</i> Polymerase (2U/μl)	200 μl
<i>HF</i> Puffer 5x	0,5 μl	5x <i>HF</i> Puffer	1,5 μl
<i>pQE-100</i> Domäne IV (10 ng)	10 μl	Produkt 1. PCR	40 μl
Primer <i>SECH up1</i>	3 μl	Primer <i>SECX up2</i>	5 μl
Primer <i>SECH do1</i>	2,5 μl	Primer <i>SECH do2</i>	10 μl
dNTPs (A,C,G,T)	2,5 μl	dNTPs (A,C,G,T)	10 μl
<i>Aqua dest.</i>	4 μl	<i>Aqua dest.</i>	16 μl
	27,5 μl		117,5 μl

Anzahl Zyklen	Schritt	Temperatur	Dauer
1	Denaturierung	98°C	3 min
10	Denaturierung	98°C	10 sec
	Annealing	40°C	25 sec
	Polymerisation	72°C	15 sec
15	Denaturierung	98°C	10 sec
	Annealing	63°C	20 sec
	Polymerisation	72°C	15 sec
1	Polymerisation	72°C	5 min
1	Reaktionsende	4°C	∞

**Tabelle 11** PCR Programm für die erste PCR zur Amplifizierung der DNA-Sequenz HER2/neu Domäne IV für die spätere Klonierung in den Vektor pSecTag2/HygroB. Die bei Annealing und Polymerisation verwendeten Temperaturen und Zeiten ergeben sich aus den vom Hersteller empfohlenen optimalen Werten für Primer und Polymerase.

Anzahl Zyklen	Schritt	Temperatur	Dauer
1	Denaturierung	98°C	3 min
10	Denaturierung	98°C	10 sec
	Annealing	40°C	30 sec
	Elongation	72°C	15 sec
15	Denaturierung	98°C	10 sec
	Annealing	60°C	25 sec
	Polymerisation	72°C	15 sec
1	Elongation	72°C	5 min
1	Reaktionsende	4°C	∞

**Tabelle 12 PCR Programm für die zweite PCR zur Synthese von Schnittstellen für Restriktionsenzyme zur späteren Klonierung der DNA-Sequenz HER2/neu Domäne IV in den Vektor pSecTag2/HygroB.** Die bei Annealing und Polymerisation verwendeten Temperaturen und Zeiten ergeben sich aus den vom Hersteller empfohlenen optimalen Werten für Primer und Polymerase.

Im Folgenden werden die Reaktionsansätze für die Vorbereitung von Vektor pSecTag2/HygroB und Insert HER2/neu Domäne IV mit den Restriktionsendonukleasen Hind III und Xho I und deren spätere Ligation aufgeführt:

Inkubation mit Restriktionsenzymen:

<u>Ansatz Insert</u>	<u>40,4 µl</u>	<u>Ansatz Plasmid</u>	<u>200 µl</u>
Hind III	1,5 µl	Hind III	3,0 µl
Xho I	1,5 µl	Xho I	1,5 µl
Puffer Nr. 2 10x	4 µl	Puffer Nr. 2 10x	20 µl
BSA 100x	0,4 µl	BSA 100x	2 µl
<u>Insert-DNA</u>	<u>33 µl</u>	Plasmid (2,5 µg/µl)	3 µl
		<u>Aqua bidest</u>	<u>170,5 µl</u>

Ligationsansatz:

<u>Vektor + Insert</u>	<u>20 µl</u>
Vektor pSecTag2/HygroB	2 µl
Insert HER2/neu Domäne IV	3 µl
10x ATP-Puffer	2 µl
T <sub>4</sub> DNA Ligase	1 µl
<u>Aqua bidest</u>	<u>12 µl</u>

### 8.3 pCEP-Pu/AC7 HER2/neu Domäne IV

Im Folgenden sind die Reaktionsansätze für die vier konsekutiven PCRs zur Amplifizierung der DNA-Sequenz HER2/neu Domäne IV zur späteren Klonierung in den Vektor pCEP-Pu/AC7 aufgeführt. Die Klonierungsstrategie ist dem Kapitel Ergebnisse zu entnehmen. Die entsprechenden PCR Programme sind in den Tabellen 13 bis 16 dargestellt. Die konsekutiven PCRs sind für die Synthetisierung von späteren Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen und eines Histidin-Tags erforderlich.

<u>1. PCR</u>	<u>50 µl</u>	<u>2. PCR</u>	<u>50 µl</u>
<i>Phusion High Fidelity</i>	0,5 µl	Polymerase	0,5 µl
<i>5x HF Puffer</i>	10 µl	<i>5x HF Puffer</i>	10 µl
pQE-100-Domäne IV	3 µl	Produkt 1. PCR	2,5 µl
Primer <i>CEP up1</i>	2,5 µl	Primer <i>CEP up2</i>	2,5 µl
Primer <i>CEP do1</i>	2,5 µl	Primer <i>CEP do1</i>	2,5 µl
dNTPs (A,C,G,T)	4 µl	dNTPs (A,C,G,T)	4 µl
<u><i>Aqua dest.</i></u>	<u>27,5 µl</u>	<u><i>Aqua dest.</i></u>	<u>28 µl</u>
<u>3. PCR</u>	<u>50 µl</u>	<u>4. PCR</u>	<u>200 µl</u>
<i>Phusion High Fidelity</i>	0,5 µl	<i>Phusion High Fidelity</i>	1,5 µl
<i>5x HF Puffer</i>	10 µl	<i>5x HF Puffer</i>	40 µl
Produkt 2. PCR	1 µl	Produkt 3. PCR	4 µl
Primer <i>CEP do2</i>	2,5 µl	Primer <i>CEP up4</i>	10 µl
Primer <i>CEP up3</i>	2,5 µl	Primer <i>CEP do3</i>	10 µl
dNTPs (A,C,G,T)	4 µl	dNTPs (A,C,G,T)	16 µl
<u><i>Aqua dest.</i></u>	<u>29,5 µl</u>	<u><i>Aqua dest.</i></u>	<u>130,5 µl</u>

Anzahl Zyklen	Schritt	Temperatur	Dauer
1	Denaturierung	98°C	3 min
10	Denaturierung	98°C	10 sec
	Annealing	40°C	25 sec
	Elongation	72°C	15 sec
15	Denaturierung	98°C	10 sec
	Annealing	63°C	20 sec
	Polymerisation	72°C	15 sec
1	Elongation	72°C	5 min
1	Reaktionsende	4°C	∞

**Tabelle 13 PCR Programm für die erste PCR zur Amplifizierung der DNA-Sequenz HER2/neu Domäne IV zur späteren Klonierung in den Vektor pCEP-Pu/AC7.** Die bei Annealing und Polymerisation verwendeten Temperaturen und Zeiten ergeben sich aus den vom Hersteller empfohlenen optimalen Werten für Primer und Polymerase.



Anzahl Zyklen	Schritt	Temperatur	Dauer
1	Denaturierung	98°C	3 min
10	Denaturierung	98°C	10 sec
	Annealing	40°C	30 sec
	Elongation	72°C	15 sec
17	Denaturierung	98°C	10 sec
	Annealing	60°C	25 sec
	Polymerisation	72°C	15 sec
1	Elongation	72°C	5 min
1	Reaktionsende	4°C	∞

**Tabelle 14 PCR Programm für die zweite PCR zur späteren Klonierung der DNA-Sequenz HER2/neu Domäne IV in den Vektor pCEP-Pu/AC7.** Die bei Annealing und Polymerisation verwendeten Temperaturen und Zeiten ergeben sich aus den vom Hersteller empfohlenen optimalen Werten für Primer und Polymerase.

Anzahl Zyklen	Schritt	Temperatur	Dauer
1	Denaturierung	98°C	3 min
10	Denaturierung	98°C	10 sec
	Annealing	40°C	30 sec
	Elongation	72°C	15 sec
15	Denaturierung	98°C	10 sec
	Annealing	61°C	25 sec
	Polymerisation	72°C	15 sec
1	Elongation	72°C	5 min
1	Reaktionsende	4°C	∞

**Tabelle 15 PCR Programm für die dritte PCR zur Amplifizierung der DNA-Sequenz HER2/neu Domäne IV zur späteren Klonierung in den Vektor pCEP-Pu/AC7.** Die bei Annealing und Polymerisation verwendeten Temperaturen und Zeiten ergeben sich aus den vom Hersteller empfohlenen optimalen Werten für Primer und Polymerase.

Anzahl Zyklen	Schritt	Temperatur	Dauer
1	Denaturierung	98°C	3 min
10	Denaturierung	98°C	10 sec
	Annealing	40°C	30 sec
	Elongation	72°C	15 sec
15	Denaturierung	98°C	10 sec
	Annealing	59°C	25 sec
	Polymerisation	72°C	15 sec
1	Elongation	72°C	5 min
1	Reaktionsende	4°C	∞

**Tabelle 16 PCR Programm für die vierte PCR zur Amplifizierung der DNA-Sequenz HER2/neu Domäne IV zur späteren Klonierung in den Vektor pCEP-Pu/AC7.** Die bei Annealing und Polymerisation verwendeten Temperaturen und Zeiten ergeben sich aus den vom Hersteller empfohlenen optimalen Werten für Primer und Polymerase.

Im Folgenden wird der Reaktionsansatz für die Vorbereitung von Vektor pCEP-Pu/AC7 und Insert HER2/neu Domäne IV mit den Restriktionsendonukleasen Nhe I und Not I aufgeführt. Da der Verdau mit diesen Enzymen unterschiedlich hohe Salzkonzentrationen erfordert (Nhe I 50 mM NaCl und Not I 100 mM NaCl), wurden zwei sequenzielle Inkubationen durchgeführt, zwischen welchen der Salzgehalt angepasst und 2,5 µl bzw. 5 µl Not I hinzugefügt wurden.

<u>Ansatz Insert</u>	<u>46,2 µl</u>	<u>Ansatz Plasmid</u>	<u>200 µl</u>
Restriktionsenzym Nhe I	2 µl	Restriktionsenzym Nhe I	5 µl
10x Puffer Nr. 2	4,7 µl	10x Puffer Nr. 2	20 µl
100x BSA	0,47 µl	100x BSA	2,0 µl
<u>Insert-DNA (≈ 4µg DNA)</u>	<u>39 µl</u>	Plasmid (≈ 12 µg DNA)	2,5 µl
		<u>Aqua bidest</u>	<u>163 µl</u>

Im Folgenden wird der Reaktionsansatz für die Ligation von HER2/neu Domäne IV und pCEP-Pu/AC7 aufgeführt:

<u>Vektor + Insert</u>	<u>20 µl</u>
Vektor pCEP-Pu/AC7	2 µl
Insert HER2/neu Domäne IV	3 µl
10x ATP-Puffer	2 µl
T <sub>4</sub> DNA Ligase	1 µl
<u>Aqua bidest</u>	<u>12 µl</u>

## 8.4 pSecTag2/HygroB HER2/neu ECD

Im Folgenden sind die Reaktionsansätze für die zwei konsekutiven PCRs zur Amplifizierung der DNA-Sequenz HER2/neu ECD zur späteren Klonierung in den Vektor pSecTag2/HygroB aufgeführt. Die Klonierungsstrategie ist dem Kapitel Ergebnisse zu entnehmen. Die entsprechenden PCR Programme sind in Tabelle 17 dargestellt.

1. PCR	50 $\mu$ l	2. PCR	200 $\mu$ l
<i>Phusion High Fidelity</i>	0,5 $\mu$ l	<i>Phusion High Fidelity</i>	2 $\mu$ l
10x HF Puffer	5 $\mu$ l	10x HF Puffer	40 $\mu$ l
template HER2/neu ECD	1,5 $\mu$ l	template 1. PCR Zyklus	4 $\mu$ l
Primer <i>ECD up1</i>	1,5 $\mu$ l	Primer <i>ECD up2</i>	10 $\mu$ l
Primer <i>ECD do1</i>	1,5 $\mu$ l	Primer <i>ECD do2</i>	10 $\mu$ l
dNTPs (A,C,G,T)	5 $\mu$ l	dNTPs (A,C,G,T)	20 $\mu$ l
<i>Aqua dest.</i>	35 $\mu$ l	<i>Aqua dest.</i>	114 $\mu$ l

Anzahl Zyklen	Schritt	Temperatur	Dauer
1	Denaturierung	98°C	3 min
10	Denaturierung	98°C	10 sec
	Annealing	40°C	30 sec
	Elongation	72°C	15 sec
15	Denaturierung	98°C	10 sec
	Annealing	1. PCR 59°C 2. PCR 51°C	25 sec
	Polymerisation	72°C	15 sec
1	Polymerisation	72°C	5 min
1	Reaktionsende	4°C	$\infty$

**Tabelle 17 PCR Programme zur Amplifizierung der DNA-Sequenz HER2/neu ECD und Synthetisierung von Schnittstellen für Restriktionsenzyme zur späteren Klonierung in den Vektor pSecTag2/HygroB.** Die bei Annealing und Polymerisation verwendeten Temperaturen und Zeiten ergeben sich aus den vom Hersteller empfohlenen optimalen Werten für Primer und Polymerase.

Im Folgenden wird der Reaktionsansatz für die Vorbereitung von Vektor pSecTag2/HygroB und Insert HER2/neu ECD mit den Restriktionsendonukleasen Hind III und Xho I aufgeführt:

<u>Insert HER2/neu ECD</u>	<u>50 µl</u>	<u>Vektor pSecTag2/HygroB</u>	<u>100µl</u>
Hind III	2 µl	Hind III	3 µl
Xho I	2 µl	Xho I	3 µl
10x Puffer 2	5 µl	10x Puffer 2	10 µl
100x BSA	0,5 µl	100x BSA	1 µl
Insert ECD (5 µg DNA)	40,5 µl	Vektor (2,56 µg DNA)	2 µl
		<u>Aqua bidest</u>	<u>81 µl</u>

Im Folgenden wird der Reaktionsansatz für die Ligation von HER2/neu ECD und Vektor pSecTag2/HygroB aufgeführt:

<u>Vektor + Insert</u>	<u>20 µl</u>
Vektor	1 µl
Insert	13 µl
10x ATP Puffer	2 µl
T <sub>4</sub> DNA Ligase	1 µl
<u>Aqua bidest</u>	<u>3 µl</u>

## 8.5 Sequenzierprimer

pQE-100 HER2/neu Domäne IV	pQEfPR: 5`- GTA TCA CGA GGC CCT TTC GTC T - 3` pQErev: 5`- CAT TAC TGG ATC TAT CAA CAG GAG - 3`
pCEP-Pu/AC7 HER2/neu Domäne IV	pCEP forward: 5`- AGC AGA GCT CGT TTA GTG AAC - 3` pCEP reverse (EBV-reverse primer): 5`- GTG GTT TGT CCA AAC TCA TC - 3`
pSecTag2/HygroB HER2/neu Domäne IV	T7: 5`- AATACGACTCACTATAG -3` BGH: 5`- TAGAAGGCACAGTCGAGG - 3`.
pSecTag2/HygroB HER2/neu ECD	ECD DO2: 5`- TTG TTA AGC TTA CCC AAG TGT GC - 3` ECD UP2: 5`- TTG TTC TCG AGA CGT CAG AGG GC - 3` ECD-VEU: 5`- GGT AGG TGA GTT CCA GGT TTC - 3` ECD-VED: 5`- AAC TGC AGC CAG TTC CTT CGG - 3`  Eine Sequenzierung ist für max. 600-800 bp in Folge möglich, deshalb wurden 2 Sets Sequenzierprimer verwendet.

## 9 Literaturverzeichnis

AGO Kommission Mamma (2021). Diagnostik und Therapie früher und fortgeschrittener Mammakarzinome, Version 2021.1 [https://www.ago-online.de/fileadmin/ago-online/downloads/\\_leitlinien/kommission\\_mamma/2021/Alle\\_aktuellen\\_Empfehlungen\\_2021.pdf](https://www.ago-online.de/fileadmin/ago-online/downloads/_leitlinien/kommission_mamma/2021/Alle_aktuellen_Empfehlungen_2021.pdf). Abgerufen am 16.02.2022

Akazawa-Ogawa Y, Nagai H, Hagihara Y (2018) Heat denaturation of the antibody, a multi-domain protein. *Biophys Rev* 10: 255–58

Aricescu AR, Owens R J (2013) Expression of recombinant glycoproteins in mammalian cells: towards an integrative approach to structural biology. *Curr Opin Struct Biol* 23: 345–56

Armbruster DA, Pry T (2008) Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin Biochem Rev* 29: 49–52

Azadeh M, Sondag P, Wang Y, Raines M, Sailstad J (2019) Quality controls in ligand binding assays: recommendations and best practices for preparation, qualification, maintenance of lot to lot consistency, and prevention of assay drift. *AAPS J* 21: 89

Bandaranayake A, Almo S (2014) Recent advances in mammalian protein production. *FEBS Lett* 588

Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, Baughman S, Benz CC, Dantis L, Sklarin NT, Seidman AD, Hudis CA, Moore J, Rosen PP, Twaddell T, Henderson IC, Norton L (1996) Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 14: 737–44

Blackwell K, Gligorov J, Jacobs I, Twelves C (2018) The global need for a trastuzumab biosimilar for patients with HER2-positive breast cancer. *Clin Breast Cancer* 18: 95–113

Bullock WO, Fernandez JM, Short JM (1987) XL1-blue—a high-efficiency plasmid transforming *recA* Escherichia coli strain with  $\beta$ -galactosidase selection. *BioTechniques* 5: 376-79

Cailleau R, Olivé M, Cruciger QV (1978) Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In vitro* 14: 911–15

Cancer Genome Atlas Network (2012) Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 490: 61–70

Chakrabarty A, Bhola NE, Sutton C, Ghosh R, Kuba MG, Dave B, Chang JC, Arteaga CL (2013) Trastuzumab-resistant cells rely on a HER2-PI3K-FoxO-survivin axis and are sensitive to PI3K inhibitors. *Cancer Res* 73: 1190–1200

Cho HS, Mason K, Ramyar KX, Stanley AM, Gabelli SB, Denney DW Jr, Leahy DJ (2003) Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* 421: 756–60

Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, Wolter JM, Paton V, Shak S, Lieberman G, Slamon DJ (1999) Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 17: 2639-48

Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, Bonnefoi H, Cameron D, Gianni L, Valagussa Zujewski JA, Justice R, Loibl S, Wickerham DL, Bogaerts J, Baselga J, Perou C, Blumenthal G, Blohmer J, Mamounas EP, Bergh J, Semiglazov V, Prowell T, Eidtmann H, Paik S, Piccart M, Sridhara R, Fasching PA, Swain SM, Slaets L, Tang S, Gerber B, Geyer CE Jr, Pazdur R, Ditsch N, Rastogi P, Eiermann W, von Minckwitz G (2012) Abstract S1-11: Meta-analysis results from the Collaborative Trials in Neoadjuvant Breast Cancer (CTNeoBC). *Cancer Res* 72: 1-11

Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, Bonnefoi H, Cameron D, Gianni L, Valagussa P, Swain SM, Prowell T, Loibl S, Wickerham DL, Bogaerts J, Baselga J, Perou C, Blumenthal G, Blohmer J, Mamounas EP, Bergh J, Semiglazov V, Justice R, Eidtmann H, Paik S, Piccart M, Sridhara R, Fasching PA, Slaets L, Tang S, Gerber B, Geyer CE Jr, Pazdur R, Ditsch N, Rastogi P, Eiermann W, von Minckwitz G (2014) Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet* 384: 164–72

Croset A, Delafosse L, Gaudry JP, Arod C, Glez L, Losberger C, Begue D, Krstanovic A, Robert F, Vilbois F, Chevalet L, Antonsson B (2012) Differences in the glycosylation of recombinant proteins expressed in HEK and CHO cells. *J Biotechnol* 161: 336–48

Debela M, Magdolen V, Schechter N, Valachova M, Lottspeich F, Craik CS, Choe Y, Bode W, Goettig P (2006) Specificity profiling of seven human tissue kallikreins reveals individual subsite preferences. *JBC* 281: 25678–88

Dumont J, Euwart D, Mei B, Estes S, Kshirsagar R (2016) Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Crit Rev Biotechnol* 36: 1110–22

ElisaAnalysis.com (Version 3.2) (Software). (2014). Australia: LTG Ventures Pty Ltd. Abgerufen von <http://elisaanalysis.com>, zuletzt am 22.07.2017

Engel LW, Young NA, Tralka TS, Lippman ME, O'Brien SJ, Mary M, Joyce J (1978) Establishment and characterization of three new continuous cell lines derived from human breast carcinomas. *Cancer Res* 38: 3352-64

EMA (Europäische Arzneimittelagentur) (1995) Note for guidance on validation of analytical procedures: text and methodology. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf).  
Abgerufen am 15.01.2022.

EMA (Europäische Arzneimittelagentur) (2011) Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2.  
[https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf). Abgerufen am 15.01.2022.

EMA (Europäische Arzneimittelagentur) (2020a) Herceptin, trastuzumab. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/herceptin#authorisation-details--section>.  
Abgerufen am 13.04.2020 und 07.06.2020.

EMA (Europäische Arzneimittelagentur) (2020b) Summary of product characteristics. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/herceptin-epar-product-information\\_de.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/herceptin-epar-product-information_de.pdf). Abgerufen am 15.06.2020.

Faber AC, Corcoran RB, Ebi H, Sequist LV, Waltman BA, Chung E, Incio J, Digumarthy SR, Pollack SF, Song Y, Muzikansky A, Lifshits E, Roberge S, Coffman EJ, Benes CH, Gómez HL, Baselga J, Arteaga CL, Rivera MN, Dias-Santagata D, Jain RK, Engelman JA (2011) BIM expression in treatment-naive cancers predicts responsiveness to kinase inhibitors. *Cancer Discov* 1: 352–65

FDA, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research & Center for Veterinary Medicine (2018) Bioanalytical method validation, guidance for industry. Biopharmaceutics <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>. Abgerufen am 18.07.2020.

Fiúza M (2009) Cardiotoxicity associated with trastuzumab treatment of HER2+ breast cancer. *Adv Ther* 26: 9–17

Fornier MN, Seidman AD, Schwartz MK, Ghan F, Thiel R, Norton L, Hudis C (2005) Serum HER2 extracellular domain in metastatic breast cancer patients treated with weekly trastuzumab and paclitaxel: association with HER2 status by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization and with response rate. *Ann Oncol* 16: 234–39

Gancberg D, Di Leo A, Cardoso F, Rouas G, Pedrocchi M, Paesmans M, Verhest A, Bernard-Marty C, Piccart MJ, Larsimont D (2002) Comparison of HER-2 status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites. *Ann Oncol* 13: 1036–43

Ganz PA, Romond EH, Cecchini RS, Rastogi P, Geyer CE Jr, Swain SM, Jeong JH, Fehrenbacher L, Gross HM, Brufsky AM, Flynn PJ, Wahl TA, Seay TE, Wade JL 3rd, Biggs DD, Atkins JN, Polikoff J, Zapas JL, Mamounas EP, Wolmark N (2017) Long-term follow-up of cardiac function and quality of life for patients in NSABP protocol B-31/NRG oncology: A randomized trial comparing the safety and efficacy of doxorubicin and cyclophosphamide (AC) followed by paclitaxel with AC followed by paclitaxel and trastuzumab in patients with node-positive breast cancer with tumors overexpressing Human Epidermal Growth Factor Receptor 2. *J Clin Oncol* 35: 3942–48

Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Zhu HJ, Walker F, Frenkel MJ, Hoyne PA, Jorissen RN, Nice EC, Burgess AW, Ward CW (2002) Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell* 110: 763–73

Garrison LP Jr, Lubeck D, Lalla D, Paton V, Dueck A, Perez EA (2007) Cost-effectiveness analysis of trastuzumab in the adjuvant setting for treatment of HER2-positive breast cancer. *Cancer* 110: 489–98

Gauchez AS, Ravanel N, Villemain D, Brand FX, Pasquier D, Payan R, Mousseau M (2008) Evaluation of a manual ELISA kit for determination of HER2/neu in serum of breast cancer patients. *Anticancer Res* 28: 3067–73

Gershon N, Berchenko Y, Hall PS, Goldstein DA (2019) Cost effectiveness and affordability of trastuzumab in sub-Saharan Africa for early stage HER2-positive breast cancer. *Cost Eff Resour Alloc* 17: 5

Gibbs J (2001) ELISA Technical Bulletin - No 3. Corning Inc., Life Sciences. Effective Blocking Procedures

Goldenberg MM (1999) Trastuzumab, a recombinant DNA-derived humanized monoclonal antibody, a novel agent for the treatment of metastatic breast cancer. *Clin Ther* 21: 309–18

Goldhirsch A, Gelber RD, Piccart-Gebhart MJ, de Azambuja E, Procter M, Suter TM, Jackisch C, Cameron D, Weber HA, Heinzmann D, Dal Lago L, McFadden E, Dowsett M, Untch M, Gianni L, Bell R, Köhne CH, Vindevoghel A, Andersson M, Brunt AM, Otero-Reyes D, Song S, Smith I, Leyland-Jones B, Baselga J, Herceptin Adjuvant (HERA) Trial Study Team (2013a) 2 years versus 1 year of adjuvant trastuzumab for HER2-positive breast cancer (HERA): an open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 382: 1021–28



Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, Senn HJ, Panel members (2013b) Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2013. *Ann Oncol* 24: 2206–23

Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE (1997) ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* 16: 1647–55

Guarneri V, Lenihan DJ, Valero V, Durand JB, Broglio K, Hess KR, Michaud LB, Gonzalez-Angulo AM, Hortobagyi GN, Esteva FJ (2006) Long-term cardiac tolerability of trastuzumab in metastatic breast cancer: the M.D. Anderson Cancer Center experience. *J Clin Oncol* 24: 4107–15

Holbro T, Civenni G, Hynes NE (2003) The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res* 284: 99–110

Hudis CA (2007) Trastuzumab-mechanism of action and use in clinical practice. *NEJM* 357: 39–51

Invitrogen (2012) pSecTag2/Hygro A, B, and C. Catalog number V910-20; Revision date 19 January 2012 Publication Part number 28-0171. [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFSAssets%2FLSG%2Fmanuals%2Fpsectag2hygro\\_man.pdf&title=cFNIY1RhZzlvSHlncR8gQSwgQiBhbmQgQw==](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFSAssets%2FLSG%2Fmanuals%2Fpsectag2hygro_man.pdf&title=cFNIY1RhZzlvSHlncR8gQSwgQiBhbmQgQw==). Zuletzt abgerufen am 15.06.2020.

Ismael G, Hegg R, Muehlbauer S, Heinzmann D, Lum B, Kim SB, Pienkowski T, Lichinitser M, Semiglazov V, Melichar B, Jackisch C (2012) Subcutaneous versus intravenous administration of (neo)adjuvant trastuzumab in patients with HER2-positive, clinical stage I-III breast cancer (HannaH study): a phase 3, open-label, multicentre, randomised trial. *Lancet Oncol* 13: 869–78

Jamieson D, Cresti N, Verrill MW, Boddy AV (2009) Development and validation of cell-based ELISA for the quantification of trastuzumab in human plasma. *J Immunol Methods* 345: 106–11

Kanthala S, Mill CP, Riese DJ 2nd, Jaiswal M, Jois S (2016) Expression and purification of HER2 extracellular domain proteins in Schneider2 insect cells. *Protein Expr Purif* 125: 26–33

Karunagaran D, Tzahar E, Beerli RR, Chen X, Graus-Porta D, Ratzkin BJ, Seger R, Hynes NE, Yarden Y (1996) ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *EMBO J* 15: 254–64

King CR, Kraus MH, Aaronson SA (1985) Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* 229: 974–76

Lee-Hoeflich ST, Crocker L, Yao E, Pham T, Munroe X, Hoeflich KP, Sliwkowski MX, Stern HM (2008) A central role for HER3 in HER2-amplified breast cancer: implications for targeted therapy. *Cancer Res* 68: 5878–87

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) (2021). S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.4, 2021, AWMF Registernummer: 032-045OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/>. Abgerufen am: 16.02.2022.

Liu X, He Z, Zhou M, Yang F, Lv H, Yu Y, Chen Z (2007) Purification and characterization of recombinant extracellular domain of human HER2 from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 53: 247–54

Llombart-Cussac A, Cortés J, Paré L, Galván P, Bermejo B, Martínez N, Vidal M, Pernas S, López R, Muñoz M, Nuciforo P, Morales S, Oliveira M, de la Peña L, Peláez A, Prat A (2017) HER2-enriched subtype as a predictor of pathological complete response following trastuzumab and lapatinib without chemotherapy in early-stage HER2-positive breast cancer (PAMELA): an open-label, single-group, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 18: 545–54

Maple L, Lathrop R, Bozich S, Harman W, Tacey R, Kelley M, Danilkovitch-Miagkova A (2004) Development and validation of ELISA for herceptin detection in human serum. *J Immunol Methods* 295: 169–82

von Minckwitz G, Untch M, Blohmer JU, Costa SD, Eidtmann H, Fasching PA, Gerber B, Eiermann W, Hilfrich J, Huober J, Jackisch C, Kaufmann M, Konecny GE, Denkert C, Nekljudova V, Mehta K, Loibl S (2012) Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *J Clin Oncol* 30: 1796–1804

von Minckwitz G, Procter M, de Azambuja E, Zardavas D, Benyunes M, Viale G, Suter T, Arahmani A, Rouchet N, Clark E, Knott A, Lang I, Levy C, Yardley DA, Bines J, Gelber RD, Piccart M, Baselga J, APHINITY Steering Committee and Investigators (2017) Adjuvant Pertuzumab and Trastuzumab in early HER2-positive breast cancer. *NEJM* 377: 122–13

von Minckwitz G, Huang CS, Mano MS, Loibl S, Mamounas EP, Untch M, Wolmark N, Rastogi P, Schneeweiss A, Redondo A, Fischer HH, Jacot W, Conlin AK, Arce-Salinas C, Wapnir I, Jackisch C, DiGiovanna MP, Fasching PA, Crown JP, Wülfing P, Shao Z, Caremoli ER, Wu H, Lam LH, Tesarowski D, Smitt M, Douthwaite H, Singel SM, Geyer CE, KATHERINE Investigators (2019) Trastuzumab Emtansine for residual invasive HER2-positive breast cancer. *NEJM* 380: 617–28

Modi S, Saura C, Yamashita T, Park YH, Kim SB, Tamura K, Andre F, Iwata H, Ito Y, Tsurutani J, Sohn J, Denduluri N, Perrin C, Aogi K, Tokunaga E, Im SA, Lee KS, Hurvitz SA, Cortes J, Lee C, Chen S, Zhang L, Shahidi J, Yver A, Krop I, DESTINY-Breast01 Investigators (2020) Trastuzumab Deruxtecan in previously treated HER2-positive breast cancer. *NEJM* 382: 610–21

Moja L, Tagliabue L, Balduzzi S, Parmelli E, Pistotti V, Guarneri V, D'Amico R (2012) Trastuzumab containing regimens for early breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev* CD006243

Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Arribas J, Baselga J (2001) Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res* 61: 4744–49

Noble JE, Wang L, Cerasoli E, Knight AE, Porter RA, Gray E, Howe C, Hannes E, Corbisier P, Wang J, Wu L, Altieri I, Patriarca M, Hoffman A, Resch-Genger U, Ebert B, Voigt J, Shigeri Y, Vonsky MS, Konopelko LA, Gaigalas AK, Bailey MJ (2008) An international comparability study to determine the sources of uncertainty associated with a non-competitive sandwich fluorescent ELISA. *Clin Chem Lab Med* 46: 1033–1045

Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim JH, Saito K, Sakamoto A, Inoue M, Shirouzu M, Yokoyama S (2002) Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 110: 775–787

Pegram MD, Lipton A, Hayes DF, Weber BL, Baselga JM, Tripathy D, Baly D, Baughman SA, Twaddell T, Glaspy JA, Slamon DJ (1998) Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *JCO* 16: 2659–71

Peiris D, Spector AF, Lomax-Browne H, Azimi T, Ramesh B, Loizidou M, Welch H, Dwek MV (2017) Cellular glycosylation affects Herceptin binding and sensitivity of breast cancer cells to doxorubicin and growth factors. *Sci Rep* 7, 43006

Perez EA, Rodeheffer R (2004) Clinical cardiac tolerability of trastuzumab. *J Clin Oncol* 22: 322–29

Perez EA, Romond EH, Suman VJ, Jeong JH, Sledge G, Geyer CE Jr, Martino S, Rastogi P, Gralow J, Swain SM, Winer EP, Colon-Otero G, Davidson NE, Mamounas E, Zujewski JA, Wolmark N (2014) Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: planned joint analysis of overall survival from NSABP B-31 and NCCTG N9831. *J Clin Oncol* 32: 3744–52

Perez EA (2019) (Oral presentation) Aktuelle internationale Therapieempfehlungen beim frühen HER2/neu-positiven Mammacarcinom. Educational Session on early breast cancer HER2 positive; Adjuvant therapy; ESMO Breast 2019, Berlin

Perez J, Garrigós L, Gion M, Jänne PA, Shitara K, Siena S, Cortés J (2021) Trastuzumab deruxtecan in HER2-positive metastatic breast cancer and beyond. *Expert Opin Biol Ther* 7: 811-24

Pivot X, Romieu G, Debled M, Pierga JY, Kerbrat P, Bachelot T, Lortholary A, Espié M, Fumoleau P, Serin D, Jacquin JP, Jouannaud C, Rios M, Abadie-Lacourtoisie S, Tubiana-Mathieu N, Cany L, Catala S, Khayat D, Pauporté I, Kramar A, PHARE trial investigators (2013) 6 months versus 12 months of adjuvant trastuzumab for patients with HER2-positive early breast cancer (PHARE): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 14: 741–748

Pivot X, Verma S, Fallowfield L, Müller V, Lichinitser M, Jenkins V, Sánchez Muñoz A, Machackova Z, Osborne S, Gligorov J, PrefHer Study Group (2017) Efficacy and safety of subcutaneous trastuzumab and intravenous trastuzumab as part of adjuvant therapy for HER2-positive early breast cancer: Final analysis of the randomised, two-cohort PrefHer study. *Eur J Cancer* 86: 82–90

Prat A, Pascual T, Adamo B (2017) Intrinsic molecular subtypes of HER2+ breast cancer. *Oncotarget* 8: 73362–63

Pruslin F, To S, Winston R, Rodman T (1991) Caveats and suggestions for the ELISA. *J Immunol Methods* 137: 27-35

Qiagen (2003) The QIAexpressionist™, A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=79ca2f7d-42fe-4d62-8676-4cfa948c9435&lang=en>. Zuletzt abgerufen am 15.06.2020

Quartino AL, Hillenbach C, Li J, Li H, Wada RD, Visich J, Li C, Heinzmann D, Jin JY, Lum BL (2016) Population pharmacokinetic and exposure-response analysis for trastuzumab administered using a subcutaneous "manual syringe" injection or intravenously in women with HER2-positive early breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 77:77-88

Quartino AL, Li H, Kirschbrown WP, Mangat R, Wada DR, Garg A, Jin JY, Lum B (2019) Population pharmacokinetic and covariate analyses of intravenous trastuzumab (Herceptin®), a HER2-targeted monoclonal antibody, in patients with a variety of solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 83: 329-40

Rexer BN, Shyr Y, Arteaga CL (2013) Phosphatase and tensin homolog deficiency and resistance to trastuzumab and chemotherapy. *J Clin Oncol* 31: 2073–75

Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer E Jr, Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman PA, Swain SM, Pisansky TM, Fehrenbacher L, Kutteh LA, Vogel VG, Visscher DW, Yothers G, Jenki RB, Brown AM, Dakhil SR, Mamounas EP, Lingle WL, Klein PM, Ingle JN, Wolmark N (2005) Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *NEJM* 353: 1673–84

Rosano GL, Ceccarelli EA (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol* 5: 172

Rüdiger T, Höfler H, Kreipe H, Nizze H, Pfeifer U, Stein H, Dallenbach F, Fischer H, Mengel M, Wasielewski R, Müller-Hermelink H (2003) Ringversuch 2000 "Immunhistochemie" der Deutschen Gesellschaft für Pathologie und des Berufsverbandes der Deutschen Pathologen. *Pathologe* 24: 70–78

Rüschhoff J, Lebeau A, Kreipe H, Sinn P, Gerharz C, Koch W, Morris S, Ammann J, Untch M (2017) Assessing HER2 testing quality in breast cancer: variables that influence HER2 positivity rate from a large, multicenter, observational study in Germany. *Mod Pathol* 30: 217-26

Sahdev S, Khattar SK, Saini KS (2008) Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Mol Cell Biochem* 307: 249–64

Schechter AL, Hung MC, Vaidyanathan L, Weinberg RA, Yang-Feng TL, Francke U, Ullrich A, Coussens L (1985) The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. *Science* 229: 976–78

Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Greene MI, Weinberg RA (1984) The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* 312: 513–16

Schlessinger J (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103: 211–25

Schrodi S, Eckel R, Hölzel D, Schubert-Fritschle G, Engel J (2017) (Poster) 37. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Senologie 29.6.-1.7.2017 in Berlin. [https://www.tumorregistermuenchen.de/facts/spec/spec\\_C50f\\_\\_20\\_20170629\\_OutmodSubtypPoster.pdf](https://www.tumorregistermuenchen.de/facts/spec/spec_C50f__20_20170629_OutmodSubtypPoster.pdf); Abgerufen am 13.07.2020

Singh B, Coffey RJ (2014) Trafficking of epidermal growth factor receptor ligands in polarized epithelial cells. *Annu Rev Physiol* 76: 275–300

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235: 177–82

Slamon DJ, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T, Marti M, Press M, Mackey J, Glaspy J, Chan A, Pawlicki M, Pinter T, Valero V, Liu MC, Sauter G, von Minckwitz G, Visco F, Bee V, Buyse M, Bendahmane B, Tabah-Fisch I, Lindsay M, Riva A, Crown J, Breast Cancer International Research Group (2011) Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *NEJM* 365: 1273–83

Slamon DJ, Eiermann W, Robert N, Giermek J, Martin M, Jasiowka M, Mackey J, Chan A, Liu M, Pinter T, Valero V, Falkson C, Fornander T, Shiftan T, Bensfia S, Hitier S, Xu N, Bée-Munteanu V, Drevot P, Press M, Crown J, BCIRG-006 Investigators (2015) (Abstract) Ten year follow-up of BCIRG-006 comparing doxorubicin plus cyclophosphamide followed by docetaxel (AC→T) with doxorubicin plus cyclophosphamide followed by docetaxel and trastuzumab (AC→TH) with docetaxel, carboplatin and trastuzumab (TCH) in HER2+ early breast cancer. San Antonio Breast Cancer Symposium; Abstract S5-04. Published February 2016

Tang CK, Lippman ME (1998) EGF family receptors and their ligands in human cancer. *Hormones and Signaling* 1: 113-65

Tate J, Ward G (2004) Interferences in immunoassay. *Clinical Biochem Rev* 25: 105–20

Tolaney SM, Guo H, Pernas S, Barry WT, Dillon DA, Ritterhouse L, Schneider BP, Shen F, Fuhrman K, Baltay M, Dang CT, Yardley DA, Moy B, Marcom PK, Albain KS, Rugo HS, Ellis MJ, Shapira I, Wolff AC, Carey LA, Overmoyer B, Partridge AH, Hudis CA, Krop IE, Burstein HJ, Winer EP (2019) Seven-year follow-up analysis of adjuvant paclitaxel and trastuzumab trial for node-negative, human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 37: 1868–75

Uniprot (2020) UniProtKB - P04626 (ERBB2\_HUMAN), Amino acid modifications. <https://www.uniprot.org/uniprot/P04626>. Abgerufen am 15.07.2020

Villarejo R, Zabin I (1974)  $\beta$ -galactosidase from termination and deletion mutant strains. *J Bacteriol* Oct. 1974: 466-74

Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilou M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF, American Society of Clinical Oncology & College of American Pathologists (2013) Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 31: 3997–4013

World Health Organization (WHO) (2019) Model List of Essential Medicines, 21st List. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325771/WHO-MVP-EMP-IAU-2019.06-eng.pdf?ua=1>. Abgerufen am 26.4.2020

Yamaguchi H, Miyazaki M (2014) Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies. *Biomolecules* 4: 235–51

Yarden Y, Sliwkowski MX (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 127–37

Yarden Y, Pines G (2012) The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat Rev Cancer* 12: 553–63

Yuan CX, Lasut AL, Wynn R, Neff NT, Hollis GF, Ramaker ML, Rupar MJ, Liu P, Mead R (2003) Purification of Her-2 extracellular domain and identification of its cleavage site. *Protein Expr Purif* 29: 217–22

Zhang H, Berezov A, Wang Q, Zhang G, Drebin J, Murali R, Greene MI (2007) ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *J Clin Investig* 117: 2051–58