

Patrik Lay
Dr. med.

Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers gegen humanen Tumor-Nekrose-Faktor-alpha zur Anwendung in einem immunologischen Test (ELISA) und Untersuchung des Tumor-Nekrose-Faktor-alpha-Testsystems

Geboren am 27.03.1965 in Quierschied
Reifeprüfung am 18.06.1984
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1986 bis WS 1994
Physikum am 14.03.1987 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Heidelberg
Staatsexamen am 29.11.1994 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin
Doktorvater: Herr Priv.-Doz. Dr. med. B. Heilig

Tumor-Nekrose-Faktor- α ist ein pluripotentes Zytokin mit antitumoralen, immunmodulatorischen, proinflammatorischen und metabolischen Wirkungen. Ihm kommt als endogenem Pyrogen eine wichtige Rolle bei Infektionen, Autoimmunerkrankungen und auch allogenen Organtransplantationen zu. Die Messung von TNF α -Spiegeln kann zum Beispiel beim septischen Schock, der zerebralen Malaria, der rheumatoiden Arthritis, der chronisch entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn und nach Organtransplantationen Aufschluß über Prognose und Krankheitsverlauf geben und wertvolle Hilfe bei Diagnosestellung sowie bei der Festlegung und Überwachung der Therapie sein. Bei der Messung in biologischen Proben gibt es jedoch diskrepante Ergebnisse. Unser Ziel war es, unter der Verwendung eines neuen monoklonalen Antikörpers einen Test zur Messung von TNF α zu etablieren und das TNF α -Testsystem auf mögliche Störeinflüsse zu untersuchen.

Von den hergestellten monoklonalen Antikörpern gegen TNF α erwies sich nur der Klon TNF G1 als dauerhaft stabil. Bei TNF G1 handelt es sich um einen hochaffinen Antikörper der Klasse IgG1- κ . Er ist in der Lage, im biologischen Assay die zytotoxische Wirkung von TNF α zu neutralisieren und erkennt im Vergleich mit den getesteten monoklonalen Antikörpern ein neues Epitop. Bei der Antigenbindung von TNF G1 kommt es zu Interferenzen mit der TNF-Rezeptor-Bindungsstelle. Theoretische Betrachtungen legen den Schluß nahe, daß die TNF G1-Bindungsstelle an der Basis des TNF α -Moleküls gelegen ist und eine Überlappung mit der Bindungsstelle für TNF-Rezeptoren aufweist.

Mit TNF G1 als Beschichtungsantikörper wurde ein ELISA zur Messung von TNF α entwickelt. Als Nachweisantikörper setzten wir den kommerziell vertriebenen Peroxidase-markierten monoklonalen Antikörper des Klons 195 ein. Dieser erkennt ein anderes TNF α -Epitop als TNF G1 ist jedoch ebenfalls fähig, die biologische Wirkung von TNF α zu neutralisieren. Die untere Nachweisgrenze des Tests ist mit 10 pg/ml vergleichbar mit der käuflicher Testsysteme. Dies trifft auch für weitere Kriterien wie Testspezifität, Testsensitivität und Präzision zu.

Um die Vergleichbarkeit von TNF α -Testergebnissen zu objektivieren, wurden die TNF α -Werte in Seren von Patienten und Kontrollpersonen parallel mit dem in der vorliegenden Arbeit etablierten ELISA und vier weiteren kommerziellen TNF α -Tests bestimmt. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Wilcoxon-Rangsummen-Tests untereinander verglichen. Dabei kam es in 6 von 10 Vergleichsfällen zu signifikanten Unterschieden der bestimmten TNF α -Werte.

Bei allen Assays, die miteinander verglichen wurden, handelte es sich um Enzymimmunoassays die unterschiedliche Antikörperkombinationen einsetzen und damit andere TNF α -Epitope erkennen. Durch eine weitere Versuchsanordnung zeigte sich, daß die Epitopvielfalt mitverantwortlich für diskrepante Meßergebnisse gemacht werden kann. Eine ebenfalls wichtige Rolle spielen Faktoren in biologischen Materialien, die bei immunologischen Tests die Antigenerkennung beeinflussen. Hier sind Autoantikörper und lösliche TNF-Rezeptoren zu nennen, die durch Interferenz am erkannten Epitop zu falsch niedrigen Messungen führen können. Andererseits kann deren Bindung an TNF α auch eine biologische Inaktivierung zur Folge haben, obwohl das Protein immunologisch noch erkannt wird. Die Testergebnisse werden auch durch unmittelbare Veränderungen von TNF α , wie die Depolymerisierung des natürlich vorkommenden Trimers, Denaturierung und proteolytische Fragmentation, beeinflusst.

Durch die gleichzeitige Durchführung von Bio- und Immunoassays sowie die Parallelbestimmung von TNF-Rezeptoren läßt sich der Einfluß von Inhibitoren und funktionellen Veränderungen am TNF α -Molekül besser beurteilen. Wegen der geringen Korrelation der TNF α -Meßwerte unterschiedlicher Assays sollte innerhalb einer Meßreihe oder Studie immer das gleiche Testsystem verwandt werden. Mit dem Wissen um die Einfluß- und Störfaktoren bei der TNF α -Bestimmung im Allgemeinen und der Kenntnis um die Beeinflussbarkeit des eigenen Tests im Speziellen kann so dennoch eine sinnvolle TNF α -Messung durchgeführt werden.