

Andrea Agnes Zimmermann
Dr. med.

Isolierung der Alkalischen Knochenphosphatase zur Erzeugung monoklonaler Antikörper und Wiederverwendbarkeitsprüfung verschiedener in der Routine befindlicher Assays zur Bestimmung der knochenspezifischen Alkalischen Phosphatase

Geboren am 18.09.1970 in Budapest (Ungarn)
Reifeprüfung am 08.05.1990 in Heidelberg
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1994 bis SS 2001
Physikum am 10.09.1996 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Schwetzingen
Staatsexamen am 08.05.2001 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Laboratoriumsmedizin
Doktorvater: Prof. Dr. med. H. Schmidt-Gayk

Die knochenspezifische Alkalische Phosphatase (= Bone ALP) ist eines der Isoenzyme der Alkalischen Phosphatase. Die Bone ALP ist ein Glykoprotein, eine Ortho-Phosphorsäure-Monoester-Phosphohydrolase, die die Mineralisation im Knochenstoffwechsel fördert. Sie hat ein Molekulargewicht von 57,2 kDa. Die Bone ALP ist ein Ektoenzym, welches ausschließlich von den Osteoblasten gebildet wird. Die Bestimmung der Bone ALP im Serum ist ein wichtiger Parameter von ossären Erkrankungen.

Osteocalcin (OC) ist neben der Bone ALP ein weiterer wichtiger Parameter in der Diagnostik von Knochenstoffwechselerkrankungen. OC hat im Vergleich zur Bone ALP die Nachteile, dass es bei eingeschränkter Nierenfunktion akkumuliert und nach der Blutentnahme einem enzymatischen Abbau unterliegt. Darüber hinaus wird auch nicht das ganze gebildete OC ins Plasma abgegeben.

In der vorliegenden Arbeit wurde die knochenspezifische Alkalische Phosphatase aus einem Zellkulturüberstand isoliert. Bei der Zellkultur handelt es sich um Osteosarkomzellen eines jungen Mannes, HOS 58-Zellen, welche mit Betaglycerophosphat und Vitamin C stimuliert wurden.

Die Isolierung der Bone ALP aus dem HOS 58-Überstand erfolgte mittels Weizenkeimagglutination. Die an das Weizenkeimlektin (WKL) gebundene Bone ALP wurde mit N-Acetyl-D-Glucosamin (NAG) vom WKL eluiert. NAG hat eine viel höhere Affinität zum WKL als die Bone ALP. Mit Tris-HCl-Puffer, pH 8,6, wurde der Zucker wieder vom WKL eluiert. Nach Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung steht das WKL einer erneuten Bone ALP-Isolierung zur Verfügung.

Die so gewonnene Bone ALP soll als Immunogen, zur Immunisierung von Mäusen, zur Herstellung von noch spezifischeren monoklonalen Antikörpern Anwendung finden. Dies ist ein Ansatz einen noch spezifischeren Immunoassay zur Bestimmung der Bone ALP zu entwickeln, da es wichtig ist die Kreuzreaktivität mit dem Leberisoenzym weiter zu reduzieren.

Ein weiterer Bestandteil dieser Arbeit lag darin, bereits in der Routinediagnostik befindliche, kommerziell erwerbliche Assays auf ihre Wiederverwendbarkeit hin zu überprüfen. Dies ist in der heutigen Zeit ein wichtiger Punkt im Rahmen der wichtiger werdenden Einsparungen im Gesundheitssystem.

In Anlehnung an die Veröffentlichung von der University of Birmingham Medical School über verschiedene Elutionslösungen für Antikörper und Antigene („Antibodies Volume I“), wurden in dieser Arbeit unterschiedliche Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten zum Desorbieren eingesetzt.

Es wurden Glycin-HCl-Puffer mit verschiedenen im sauren Bereich liegenden pH-Werten, Diethylamin und Kaliumthiocyanat, die beiden letzteren mit im alkalischen Bereich liegenden pH-Werten, eingesetzt.

Das sich bereits in der Routine befindliche Testverfahren Tandem^R-R OstaseTM der Fa. Hybritech hat sich die Tandem-Technik zu Nutze gemacht um die Kreuzreaktivität zu reduzieren. In der Tandem-Technik werden zwei verschiedene für die Bone ALP spezifische monoklonale Antikörper eingesetzt.

Bei der Überprüfung auf Wiederverwendbarkeit erhielt man nach Desorption mit Kaliumthiocyanat eine ein- bis zweimalige Wiederverwendbarkeit.

Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit auch der Assay der Fa. Metra Biosystems GmbH Alkphase-BTM getestet. Es zeigte sich hier mit den angewendeten Verfahren keine Möglichkeit der Wiederverwendung.