

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN keine	2. Berichtsart: Abschlussbericht	
3a. Titel des Berichts: WK BioResponse/Verbundprojekt RHEUMA-CHIP		
3b. Titel der Publikation		
4a. Autoren des Berichts (Name, Vorname(n)): Prof. Dr. Michael Bachmann	5. Abschlussdatum des Vorhabens 31.03.2007	
4b. Autoren der Publikation (Name, Vorname(n))	6. Veröffentlichungsdatum: 30.10.2007	
	7. Form der Publikation: Bericht an BMBF	
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Institut für Immunologie Medizinische Fakultät der TU Dresden Fiedlerstrasse 42 D - 01307 Dresden	9. Ber. Nr. Durchführende Institution: Inst.für Immunologie; Medizinische Fakultät der TU Dresden	
	10. Förderkennzeichen 03WKR02B	
	11a. Seitenzahl Bericht: 17	
	11b. Seitenzahl Publikation	
	12. Literaturangaben	
13. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)	14. Tabellen	
	15. Abbildungen	
	16. Zusätzliche Angaben	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)		
18. Kurzfassung Zur Entwicklung eines Multiparameter-Assays für die Diagnose von systemischen rheumatoiden Autoimmunerkrankungen wurde ein neuartiges universelles Antigen-Festphase Kopplungssystem basierend auf zwei Peptid-Tags und einem bifunktionellen rekombinanten Antikörper entwickelt. Außerdem wurden zahlreiche putative neue Autoantigene kloniert, exprimiert und schließlich mit dem neuen Tag fusioniert. In ersten Tests konnte sowohl "proof of principle" für das neuartige Kopplungssystem, als auch neue Autoantikörperreaktivitäten in Seren von Autoimmunpatienten identifiziert werden.		
19. Schlagwörter Wachstumskern „BioResponse“, Multiparameterimmundiagnostik, Rheumachip		
20. Verlag Keine Angaben	21. Preis na	

*) Auf das Förderkennzeichen des BMBF soll auch in der Veröffentlichung hingewiesen werden.

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. Type of Report Final report	
3a. Report Title WK BioResponse/RHEUMA-CHIP		
3b. Title of Publication		
4a. Author(s) of the Report (Family Name, First Name(s))	5. End of Project 31.03.2007	6. Publication Date
4b. Author(s) of the Publication (Family Name, First Name(s))	30.10.2007	7. Form of Publication final report
8. Performing Organization(s) (Name, Address) Institute of Immunology Medical Faculty TU TU Dresden Fiedlerstrasse 42 D - 01307 Dresden	9. Originator's Report No.	10. Reference No. 03WKR02B
13. Sponsoring Agency (Name, Address) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)	11a. No. of Pages Report 17	11b. No. of Pages Publication
16. Supplementary Notes	12. No. of References	14. No. of Tables
17. Presented at (Title, Place, Date)	15. No. of Figures	
18. Abstract In order to facilitate the development of multiparameter-assays including for the diagnosis of systemic rheumatoid autoimmune diseases we established a novel universal antigen-coating system which bases on two novel described peptide-epitope tags in combination with a recombinantly expressed bifunctional antibody. In addition, we cloned, expressed and purified a series of putative novel autoantigens to which we fused the novel epitope tag. During our studies we could demonstrate the "proof of principle" for our novel antigen coating technique. Moreover, we could identify novel autoimmune responses in sera of patients suffering from systemic autoimmunity.		
19. Keywords Wachstumskern „BioResponse“, Multiparameterimmundiagnostik, Rheumachip		
20. Publisher	21. Price	

Abschlussbericht 2007 des Wachstumskerns BioResponse

Zuwendungsempfänger: TU Dresden, Institut für Immunologie Prof. Dr. Michael Bachmann	Förderkennzeichen: 03WKR02B
Vorhabensbezeichnung: WK BioResponse/Verbundprojekt RHEUMA-CHIP	
Laufzeit des Vorhabens: 01.04.2004 – 31.03.2007	
Berichtszeitraum: 01.04.2004 – 31.03.2007	

I. Darstellung

1. Aufgabenstellung:

Ziele unseres Teilprojektes waren: (i) die Entwicklung eines neuen universellen Tagging-Systems, (ii) die Identifikation, Klonierung, Expression und Reinigung neuer putativer Autoantigene, sowie (iii) das Tagging der rekombinanten Antigene.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde:

Das Projekt war ein Verbundprojekt im Wachstumskern Bioresponse

3. Planung und Ablauf des Vorhabens:

4. wissenschaftlichem und technischem Stand, an den angeknüpft wurde, insbesondere • Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden:

Für die Klonierung unserer rekombinanten Moleküle wurden öffentliche Medizinische Datenbanken (Medline, NCBI) verwendet.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen:

Die Zusammenarbeit konzentrierte sich auf die Kooperationspartner innerhalb des Wachstumskerns.

II. Eingehende Darstellung

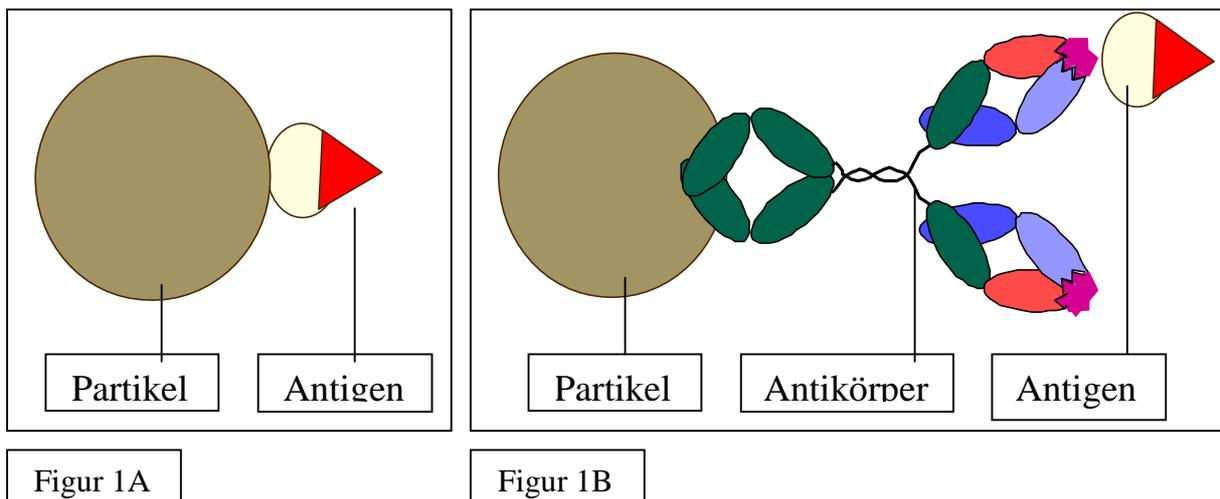
Die Hauptaufgaben unseres Teilprojektes bestanden in:

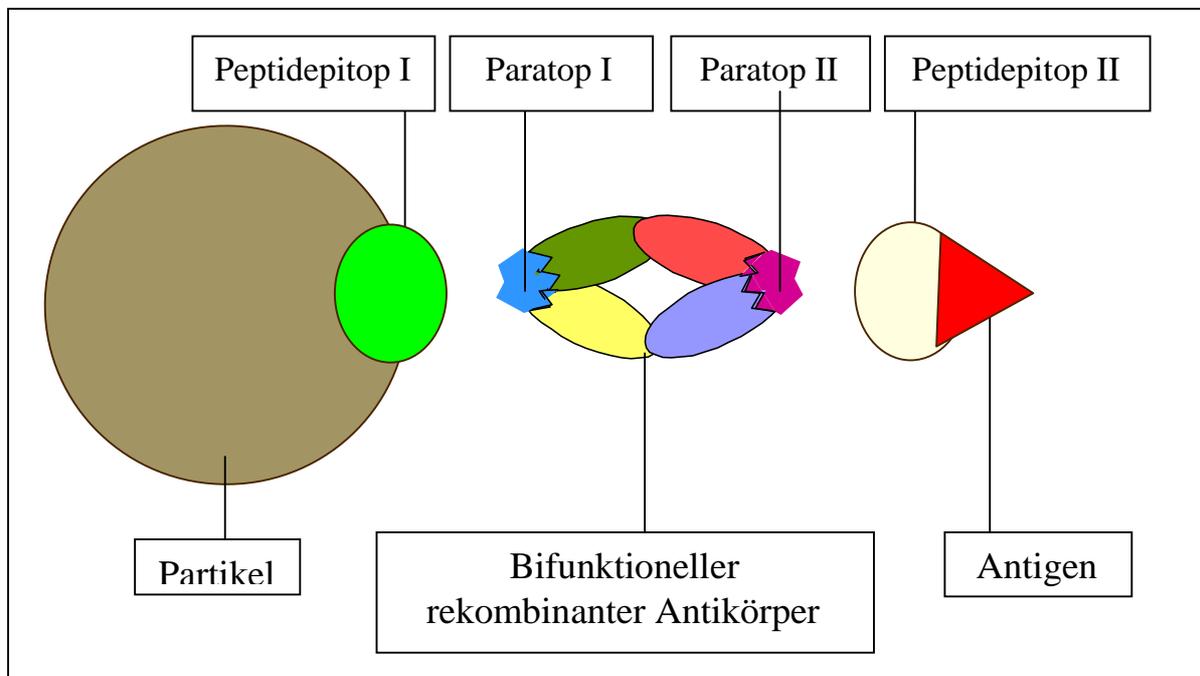
- (i) Entwicklung eines neuen universellen Tagging-Systems
- (ii) Identifikation, Klonierung, Expression und Reinigung neuer putativer Autoantigene
- (iii) Tagging der rekombinanten Antigene

Ursprünglich war geplant gewesen, zunächst das Tagging-System zu entwickeln und danach erst die Antigene zu klonieren. Denn dann hätten die Antigene nur einmal kloniert und exprimiert werden müssen. Davon wurde aber, wie in früheren Berichten begründet, abgewichen, weil ansonsten unser Partner Herr Dr. Roggenbuck erst nach der Entwicklung und Charakterisierung des Tagging-Systems mit der Evaluierung der Antigene hätte beginnen können. Insgesamt hatte diese Umstellung, wie in früheren Zwischenberichten aber bereits ausführlich beschrieben, begründet und vom Projektträger auch akzeptiert, nicht nur die Durchführung, sondern auch die Personalstruktur sowie die Kosten der Verbrauchsmittel beeinflusst.

(i) *Entwicklung eines neuen universellen Tagging-Systems*

Wie schematisch in Figur 1A dargestellt, wird bei einem immunologischen Testsystem normalerweise das nachzuweisende Antigen an eine Festphase (z.B. ELISA Platte, Immunoblot oder Partikel) gekoppelt. Alternativ kann das Antigen auch über einen ersten Antikörper aus einem Totalextrakt gefischt (z.B. Capture ELISA) werden (Figure 1B). Der



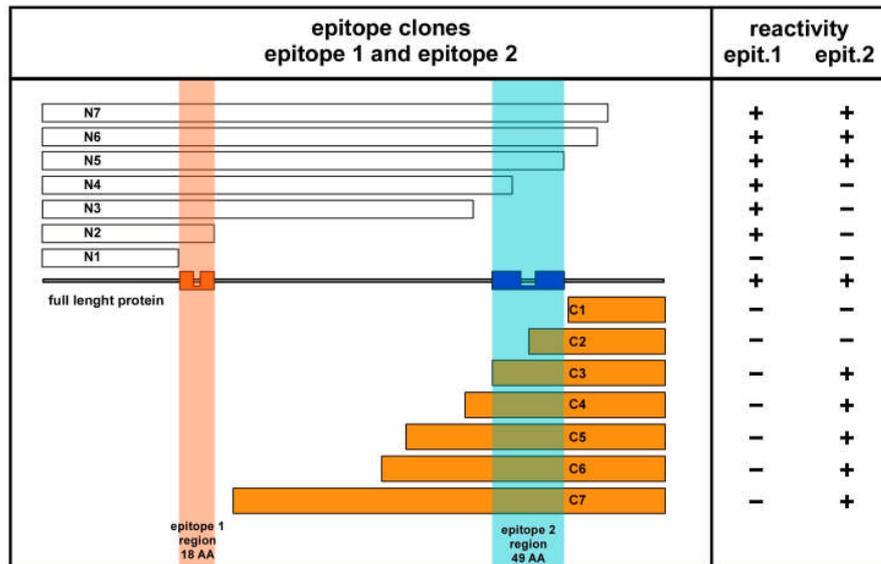


Figur 1C

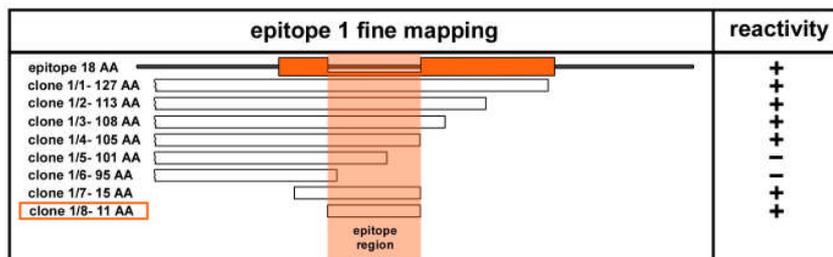
Nachweis erfolgt dann über einen zweiten Antikörper, der ein anderes Epitop erkennen muß, wie der zum Koppeln verwendete erste Antikörper. Eine dritte völlig neue Variante ist in Figur 1C schematisch dargestellt. In diesem Fall wird an die feste Phase ein kurzes Peptid gekoppelt. An dieses Peptidepitop kann ein bifunktionelles rekombinantes Antikörperderivat binden. Da dieser Antikörper zwei verschiedene Paratope enthält und darüber an zwei verschiedene Epitope binden kann, kann man ihn theoretisch zum Koppeln eines jeden beliebigen Antigens an eine Festphase verwenden, an das sich das zweite Peptidepitop binden läßt. Besonders einfach ist dies im Falle von Proteinantigenen, da man das Peptidepitop rekombinant an den N- oder C-Terminus des Antigens klonierungstechnisch fusionieren kann. Die in Figur 1C dargestellte Variante hat den Vorteil, dass man nur einen Typ Festphasepartikel für alle Antigene herstellen muß. Es ist leicht ersichtlich, dass die Kopplung eines kleinen Peptidepitops wesentlich unproblematischer ist als die Kopplung von einem Protein z.B. einem Antikörper. Denn ein kleines lineares Peptid ist wesentlich robuster als ein Protein, dessen Funktion oder Struktur bedingt durch die Kopplungsbedingungen leicht verloren gehen kann. Somit ließe sich mit diesem neuen System die Kopplung von Antigenen wesentlich erleichtern und damit die Herstellung der Antigen-beladenen Partikel wesentlich beschleunigen, da man nicht für jedes zu koppelnde Antigen die hierfür optimalen Bedingungen ermitteln müßte. Alternativ zu dem System in Figur 1C kann auch die weniger komplexe Variante in Figur 1B genutzt werden, vorausgesetzt, dass der Antikörper für eine Kopplung an die Festphase stabil genug ist und die Affinität zu dem Peptidepitop ausreichend ist. Vorversuche hatten gezeigt, dass Antikörper gegen kommerzielle Tags wie z.B. der His-Tag oder Myc-Tag nicht affin genug sind. Deshalb suchten wir nach neuen besser geeigneten Peptid-Tags.

In früheren Versuchen waren von uns zahlreiche Hybridomalien etabliert worden. Aus diesen wurden mögliche Kandidaten ausgewählt und deren Epitop-Regionen charakterisiert. Die Epitope der am besten geeignet erscheinenden Kandidaten wurden mittels N- und C-terminaler Deletionsklone zunächst grob (Figur 2A) und mit zahlreichen weiteren Deletionsklonen fein gemappt, wie in Figur 2 (B,C) zusammengefasst.

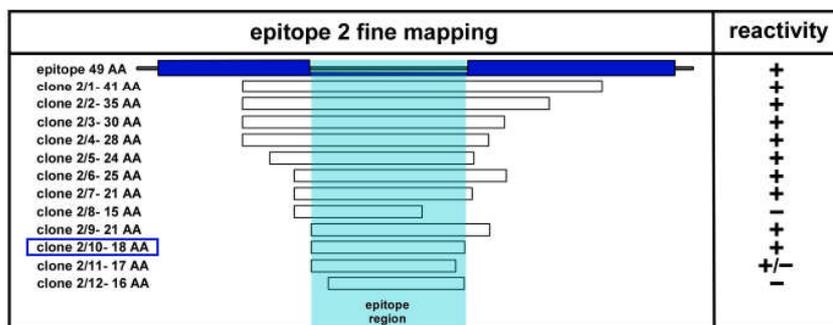
A



B



C



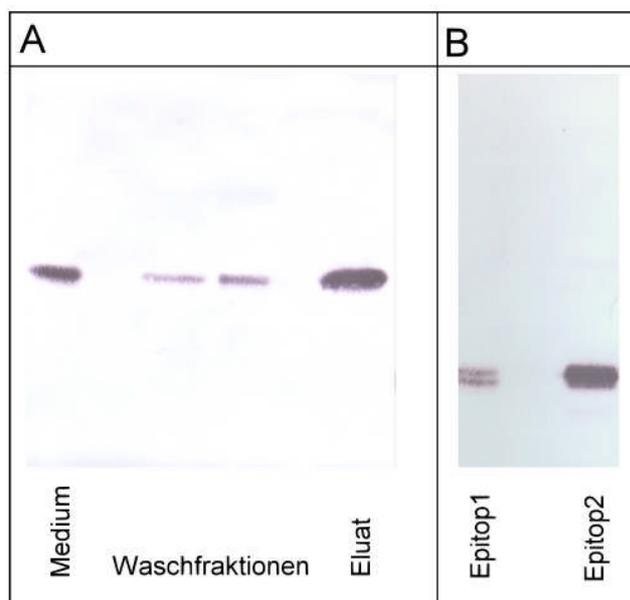
Figur 2

Schließlich wurden zwei Antikörper ausgewählt. Im weiteren wurden die schweren (VH1, VH2) und leichten (VL1, VL2) Ketten dieser beiden Antikörper mittels PCR amplifiziert, subkloniert und sequenziert. Anschließend wurden die Fragmente über geeignete Linkerelemente zu einem Gesamtmolekül wie schematisch in Figur 3 gezeigt zusammenkloniert.



Figur 3

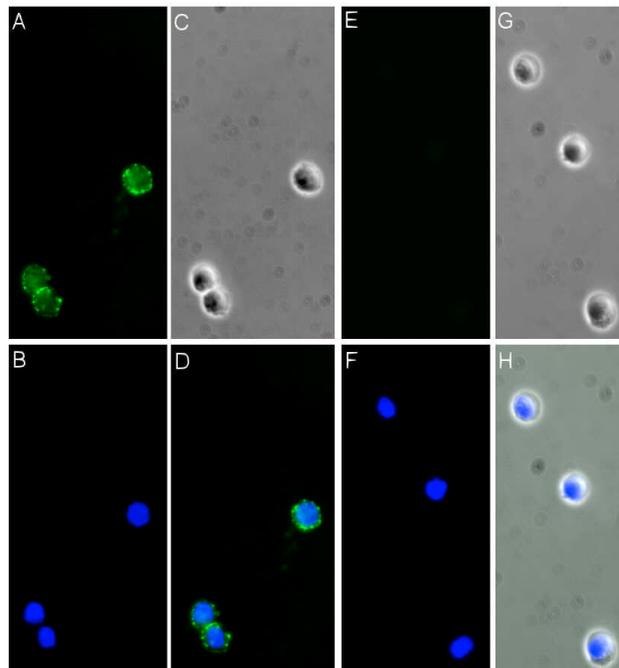
Dadurch entstand ein Konstrukt, das für einen rekombinanten bispezifischen Antikörper codiert, der auf der einen Seite das Peptidepitop1 auf der anderen Seite das Peptidepitop2 erkennt. Dieses Konstrukt wurde zunächst in einen prokaryontischen Expressionsvektor subkloniert. Leider konnte mit diesem Expressionssystem kein funktionelles Molekül exprimiert werden. Vermutlich wurde der Antikörper nicht korrekt in *E. coli* gefaltet, möglicherweise weil die Disulfidbrücken des Moleküls nicht korrekt ausgebildet werden. Deshalb wurde das Konstrukt in einen eukaryontischen Expressionsvektor umkloniert und dabei mit einem eukaryontischen Signalpeptid versehen. Danach wurden HEK293T Zellen mit diesem Vektor zunächst transient transfiziert. Da nun ein funktioneller Antikörper aus dem Zellkulturüberstand mittels Nickelaffinitätschromatographie gereinigt werden konnte, wurde im weiteren das Molekül in einen viralen Transduktionsvektor umkloniert und damit eine stabile Zelllinie hergestellt. Wie in Figur 4A gezeigt, kann schon in dem Zellkulturüberstand (Medium) das exprimierte Protein mittels Immunblots nachgewiesen werden. Mittels einer



Nickelaffinitätschromatographie kann man den Antikörper daraus anreichern (Figur 4A, Eluat). Wie in Figur 4B gezeigt, kann der Antikörper sowohl das rekombinant exprimierte Epitop1 als auch Epitop2 im Immunoblot binden.

Figur 4

Allerdings zeigten diese Daten noch nicht, dass der bispezifische Antikörper simultan beide Epitope binden kann. Da uns zu diesem Zeitpunkt noch keine geeigneten synthetischen Partikel zur Verfügung gestellt werden konnten, haben wir ein Surrogat hierfür geschaffen,



Figur 5

um die simultane Bindefähigkeit des bifunktionellen Antikörpers nachweisen zu können. Hierzu wurde der Leserahmen eines Membranproteins mit dem Peptidepitop2 klonierungstechnisch fusioniert, sodass nach einer Transfektion das Peptidepitop2 auf der Oberfläche von Zellen exprimiert wurde. Parallel wurde das Markerprotein Green Fluoreszenz Protein (GFP) sowohl am N- als auch dem C-Terminus mit dem Peptidepitop1 getaggt. Anschließend wurden Zellen mit dem Membran-Peptidepitop1-Fusionsprotein transfiziert und die transfizierten Zellen mit dem rekombinant exprimierten Peptidepitop2-getaggten GFP Protein inkubiert und die Zellen mittels Epifluoreszenzmikroskopie sowie mittels FACS Analyse untersucht. Als Negativkontrolle diente nicht getaggtetes GFP (Daten nicht gezeigt). Wie in Figur 5 (A-D) dargestellt, konnte eine eindeutige Färbung auf der Oberfläche von Zellen mit dem getaggten GFP Protein gezeigt werden. Die Bildung des Komplexes konnte auch erwartungsgemäß durch Präinkubation der Zellen mit dem maternalen monoklonalen Antikörper gegen das Peptidepitop2 geblockt werden, was die Spezifität der Bindung des bispezifischen Antikörpers weiter untermauert (Figur 5, E-H). Insgesamt zeigen diese Daten, dass der bifunktionelle Antikörper nicht nur beide Epitope binden kann, sondern dies auch simultan möglich ist.

Zusammenfassend zeigen diese Daten: Es ist uns gelungen

- (i) zwei für das neue Tagging System geeignete Peptidepitope zu charakterisieren, sowie
- (ii) klonierungstechnisch diese Peptidepitope funktionell auf Zielproteine zu übertragen.
- (iii) die getaggtten Proteine mit dem jeweiligen Antikörper nachzuweisen.
- (iv) die schweren und leichten Ketten der Antikörper zu klonieren.
- (v) aus den vier variablen Ketten einen bispezifischen Antikörper zu klonieren und erfolgreich zu exprimieren.
- (vi) zu zeigen, dass beide Paratope des rekombinanten Antikörpers ihre jeweiligen Epitope erkennen und simultan binden können.

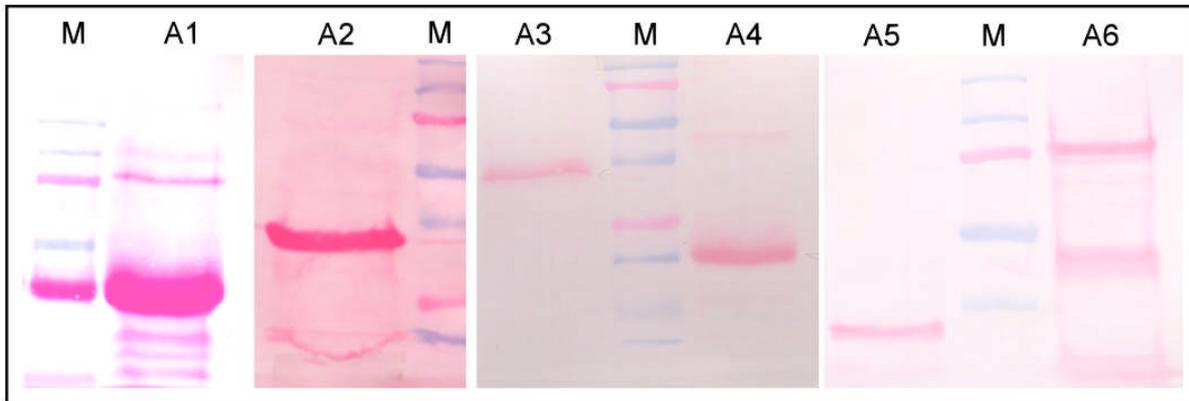
Somit ist es uns gelungen, alle Komponenten für ein universelles Tagging System, wie es von uns angestrebt und in Figur 1C schematisch beschrieben worden war, aufzubauen und "proof of principle" für das System zeigen können. Und somit haben wir alle von unserer Seite möglichen Arbeiten zu dem Programmpunkt (i) damit erfolgreich abgeschlossen.

(ii) *Identifikation, Klonierung, Expression und Reinigung neuer putativer Autoantigene und*

(ii) *Tagging der rekombinanten Antigene mit dem neuen Proteinepitop1*

Parallel zu der Entwicklung des Tagging-Systems waren von uns zahlreiche Proteinantigene kloniert und exprimiert worden. Basierend auf Literaturstudien war hierzu bereits im Vorfeld des Antrages eine Liste von ca. 60 interessanten Autoantigenen zusammengestellt worden. Alle diese interessanten Proteinleserahmen wurden mittlerweile erfolgreich mittels PCR als Volllängeklone amplifiziert, in pGEM-T subkloniert und sequenziert. Danach wurden die Leserahmen in prokaryontische Expressionsvektoren subkloniert und in *E. coli* exprimiert. Für jedes rekombinante Expressionskonstrukt wurden die optimalen Expressionsbedingungen durch Variation der Temperatur bzw. anderer Wachstumsbedingungen individuell ermittelt. Nach der Expression wurden die Proteine aus Totalextrakten mittels eines Nickelaffinitätschromatographie Schrittes aufgereinigt.

Dabei zeigte sich: Einige der Proteine ließen sich, wie in Figur 6 exemplarisch gezeigt (A1 bis A6; M=Markerproteine), unproblematisch exprimieren und aufreinigen (z.B. A1, A2).

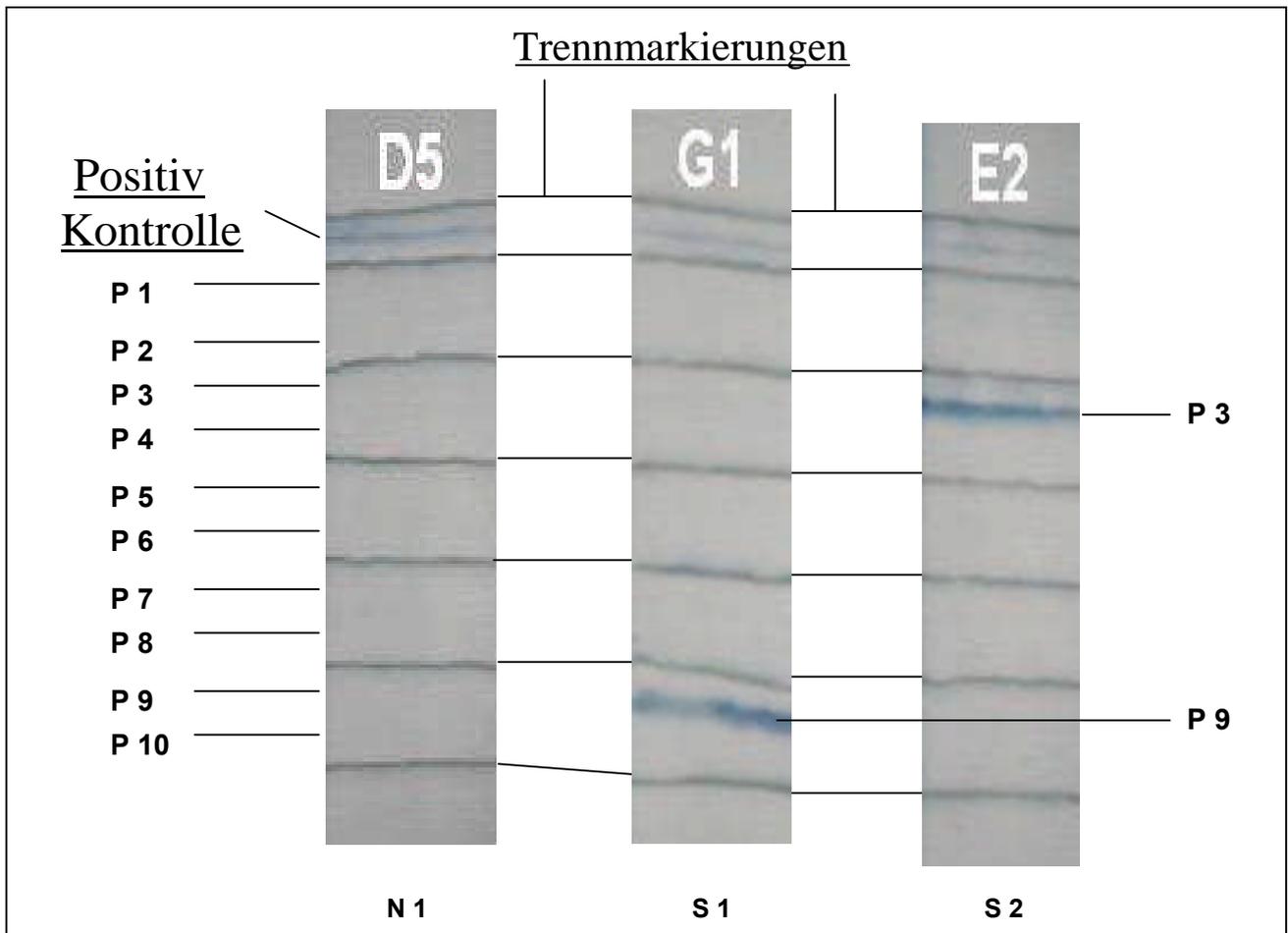


Figur 6

Bei anderen funktionierte die prokaryontische Expression deutlich weniger effizient (z.B. Figur 6, A3, A5) oder sogar nicht. In einigen Fällen fanden sich nach der Reinigung neben dem Volllängeprotein zusätzliche Proteinbruchstücke (z.B. Figure 6, A6), die je nach Anwendung der Antigene eine weitere Aufreinigung notwendig machen. In Fällen, bei denen eine prokaryontische Expression unmöglich war, wurde der entsprechende Leserahmen in ein eukaryontisches Expressionsvektorsystem umkloniert. In zwei Fällen ließ sich das rekombinante Protein trotzdem nicht exprimieren. In dem einen Fall konnte kein Volllängeprotein exprimiert werden, sodaß wir den Leserahmen in mehrere Teilstücke zerlegten und die Stücke getrennt exprimierten. In dem zweiten Fall ließ sich aber selbst im humanen Zellsystem die Expression des betreffenden Proteins nicht erfolgreich nachweisen. Zumindest konnte mit den vorhandenen Kontrollseren in stabil transduzierten Zellen kein Unterschied zwischen nicht transduzierten und transduzierten Zellen gesehen werden und auch nach der Aufreinigung reagierten die rekombinanten Proteine nicht mit den Kontrollseren. Dieses Problem kann zwei Ursachen haben: (i) die uns zur Verfügung gestellten Kontrollseren haben nicht die beschriebene Spezifität und sie erkennen das nominale Antigen deshalb nicht, weil sie gegen ein anderes Antigen gerichtet sind oder (ii) das native Autoantigen wird in irgendeiner Weise posttranslational modifiziert, aber unser eukaryontisches Expressionssystem kann diese Modifikation nicht. Dann aber müßten die Autoantikörper der Kontrollseren nur gegen diese Epitope gerichtet sein. Dies erscheint aber eher unwahrscheinlich. Eine letztliche Klärung konnten wir für dieses Problem bisher noch nicht finden, da keine anderen Kontrollseren uns zur Verfügung standen.

Die exprimierten rekombinanten Proteine wurden dann auf ihre Antigenität in einem ersten Test gegen 200 Seren von Patienten mit systemischen Autoimmunerkrankungen, sowie eine entsprechend gematchte Alterskontrollgruppe getestet. In Ermangelung der Mikrobeads wurden die rekombinanten Proteine hierzu auf einen miniaturisierten Mikroblot transferiert. Wie in Figur 7 gezeigt, konnten neben einer Positivkontrolle pro Mikroblot 10 Antigene aufgetragen werden (Figur 7, P1 bis P10) und gegen ein Serum getestet werden. Beispiel für ein Negativkontrollserum ist in Figur 7 (D5) gezeigt. Beispiele für Patientenseren, die positiv mit einem der Antigene reagierten, sind in Figur 7 (G1, E2) gezeigt. Die

Ergebnisse von diesen Tests zeigen, dass in der Tat neue Autoantikörper, die bisher in Seren von Patienten mit systemischen Autoimmunerkrankungen noch nicht nachgewiesen worden waren, mit unseren rekombinanten Proteinen identifiziert werden konnten. Deshalb versprechen wir uns von diesen zusätzlichen Reaktivitäten erweiterte diagnostische Aussagen zu erhalten. Hierzu müssen allerdings noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.



Figur 7

Als letzten Schritt wurden die neuen Autoantigene mit dem neuen Peptid-Epitop1-Tag fusioniert, um sie gegebenenfalls über den rekombinanten Antikörper an eine mit dem Peptidepitop2 gekoppelte Festphase zu binden.

Zusammenfassend für die Ziele (ii) und (iii) können wir somit sagen: Es ist uns gelungen

- (i) alle ausgewählten Leserahmen erfolgreich als Volllänge zu amplifizieren und klonieren.
- (ii) die Konstrukte in prokaryontische Expressionsvektoren zu klonieren.
- (iii) die optimalen Bedingungen für die Expression in *E. coli* zu ermitteln bzw. aufzuzeigen, welche der Antigene eukaryontisch exprimiert werden müssen.
- (iv) mit einer Ausnahme, wo nötig, die Antigene eukaryontisch zu exprimieren. Allerdings war in diesen Fällen die Proteinausbeute sehr niedrig und die Expression sehr Kosten intensiv.
- (v) mit einem ersten Multiparameter Screening Test eine Reaktivität von Seren von Patienten mit SLE gegen die exprimierten Antigene zu zeigen.
- (vi) Schließlich wurden die exprimierbaren Proteine mit dem neuen Peptidtag1 klonierungstechnisch fusioniert.

Abgesehen von einer Ausnahme, haben wir somit alle gewünschten Proteingene erfolgreich kloniert, eine Reaktivität gegen Autoimmunpatientenseren gezeigt und die Leserahmen mit dem neuen Peptidepitop fusioniert.

Damit haben wir alle drei ursprünglich an uns gestellten Aufgaben erfolgreich abgeschlossen.

Summary

The aims of our proposal were

- (i) Development of a novel universal tagging system
- (ii) Identification, cloning, expression and purification of novel putative autoantigens
- (iii) Fusion of the novel tag to the autoantigens

(i) In order to facilitate the coating process of an antigen, we wanted to develop a novel universal tagging system. This system should consist of a short peptide that can covalently be linked to beads or any other platform (e.g. ELISA plate). All antigens should also be tagged but with another peptide epitope. In order to bind the antigens to the beads, a bispecific antibody should be used. Such a system would have the advantage that every antigen could rapidly be bound to any kind of platform. In order to realize this idea, two short peptide epitopes had to be characterized and a bispecific antibody with sufficient binding affinity had to be cloned and expressed. For that purpose, we screened a series of monoclonal antibodies (mabs) which were developed previously in our lab. Using deletion mutants two suitable epitope regions were mapped to small continuous aa sequences. The identified peptide sequences were recombinantly fused to protein reading frames and the expressed proteins were checked for their reactivity against the mabs. Thereby, the epitope mapping data were confirmed. Next the heavy and light chain sequences of both mabs were amplified with PCR, subcloned and sequenced. Thereafter, a single chain bispecific diabody (scbsDB) was cloned and expressed. The scbsDB was shown to bind to both epitopes simultaneously. Thus, we showed proof of principle of the novel tagging system.

(ii) and (iii) In parallel to the development of the novel tagging system, we tried to identify putative candidates of novel autoantigens that are recognized from sera of patients suffering from systemic autoimmunity. The full length reading frames of about 60 proteins were cloned into prokaryotic expression vectors, and where necessary in eucaryotic expression vectors. The proteins were recombinantly expressed and purified. The expressed proteins were used in a first multiparameter assay for the detection of autoantibodies in sera of patients with systemic autoimmune diseases. When 200 sera of patients with systemic lupus erythematosus and/or primary Sjögren's syndrome were analysed and compared to the same number of an age-matched control group, we indeed found reactivities against some of the expressed recombinant proteins. The significance of these reactivities, however, needs further future evaluation.

2. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans:

Wie ursprünglich im Projekt geplant, gelang es uns, ein neuartiges, universelles Tagging System zu entwickeln, neue Autoantigene zu identifizieren und rekombinant mit dem neuartigen Tagging System zu fusionieren. Es konnte "proof of principle" für das Tagging System gezeigt werden. Erste Nachweise von Immunreaktionen gegen unsere neuen Antigene in Seren von Patienten mit SLE und Sjögren's Syndrom konnten ebenfalls gezeigt werden. Damit kann nun von uns für das gesamte Projekt ein einfaches universelles Kopplungssystem nicht nur für die von uns entwickelten Antigene, sondern auch für die vielen verschiedenen im WK Bioresponse zum Einsatz kommenden anderen Antigene zur Verfügung gestellt bzw. weiterentwickelt werden. Ausgetestet werden muß allerdings noch, wie das Peptidepitop1 optimal an die feste Phase (beads) gekoppelt werden kann. Danach müssen die Stabilität der Komplexe (bead, bifunktionaler Antikörper, Antigen) evaluiert werden. Sollte sich hierbei zeigen, dass das System nicht die notwendigen Affinitäten besitzt, können diese noch durch gezielte Mutagenese optimiert werden. Alternativ kann auch der mAk gegen das Peptidepitop2 an die feste Phase gekoppelt werden und damit die Antigene universell an die beads gekoppelt werden. Da bei der Kopplung die Funktionalität des mAk erhalten bleiben muß, ist allerdings diese Kopplung sicherlich schwieriger als die Kopplung des Peptidepitops1. Andererseits ist dies immer noch einfacher als die Kopplungsbedingungen für jedes der Antigene individuell zu ermitteln und die beads für jedes Antigen separat herzustellen. Im Falle der neuen Antikörperreaktivitäten müssen deren Spezifitäten und Sensitivitäten, sowie deren Frequenzen noch weiter charakterisiert werden, um zu lernen, ob sie eine Verbesserung bzw. eine sinnvolle Ergänzung gegenüber den bisher eingesetzten Antigenen bringen können.

3. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordene Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen:

keine

4. Erfolgte oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses:

Publikationen:

Im Bericht sind keine Einzelheiten angegeben, die vertraulich zu behandeln sind.

Dem Antragsteller Prof. Dr. M. Bachmann liegen zwei schriftliche Einladungen vor, die erhaltenen Daten in zwei Artikeln zu veröffentlichen.

Darüberhinaus sind zwei Originalarbeiten zur Zeit in Vorbereitung, wovon ein Manuskript bereits zum Einreichen fertiggestellt ist:

Dresden 30.10.2007

Prof. Dr. Michael Bachmann

Erfolgskontrollbericht

Förderkennzeichen: 03WKR02B

1. Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen des Förderprogramms

Die Entwicklung des neuartigen universellen Antigenfestphase-Kopplungsprinzips stellt ein wesentlicher Beitrag bei der Entwicklung der im WK BioResponse geplanten verschiedenen Multiparameter Assays dar. Denn die Nutzung dieses Systems wird die Herstellung individueller Antigen-Beads erheblich erleichtern, beschleunigen und die Kosten der Herstellung erheblich reduzieren. Die Identifizierung neuer Autoantikörper in Patienten mit systemischer Autoimmunität könnte zur Entwicklung verbesserter Tests und damit zu einem Alleinstellungsmerkmal eines neuen Tests führen.

2. Wissenschaftliche oder technische Ergebnisse des Vorhabens incl. erreichter Nebenergebnisse und gesammelter wesentlicher Erfahrungen

Siehe auch Abschlussbericht:

Es wurde ein neuartiges Festphasen Antigen-Kopplungsprinzip entwickelt und neue Autoantikörper in Seren von Patienten mit systemischer Autoimmunität identifiziert.

3. Fortschreibung des Verwertungsplans

Wie im Projekt angestrebt konnten wir ein neuartiges, universelles Tagging System etablieren. Außerdem haben wir neue Autoantigene identifizieren und rekombinant mit dem neuartigen Tagging System fusionieren können. Wir konnten "proof of principle" für das Tagging System zeigen. Erste Nachweise von Immunreaktionen gegen unsere neuen Antigene in Seren von Patienten mit SLE und Sjögren's Syndrom untermauern unsere begründete Suche nach weiteren Autoantikörpern in Seren von Patienten mit systemischen Autoimmunerkrankungen. Wir können nun für das gesamte Projekt ein einfaches universelles Kopplungssystem nicht nur für die von uns entwickelten Antigene, sondern auch für die vielen verschiedenen im WK BioResponse zum Einsatz kommenden anderen Antigene zur Verfügung stellen bzw. weiterentwickeln.

4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Keine

5. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer

Schutzrechtsanmeldungen sind bisher keine entstanden. Es ist aber geplant, die Entwicklung des neuartigen Kopplungssystems anzumelden.

6. Einhaltung Ausgabenplan und Zeitplan

Der Finanzierungsplan und der Zeitplan der Untersuchungen wurden eingehalten.