

Aus dem Institut für  
Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Univ.-Prof. Dr. M. Stangassinger

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Univ.-Prof. Dr. T. Göbel

**Entwicklung von sensitiven Nachweismethoden für canines HMGB1 und  
TNF $\alpha$  zur Untersuchung der Rolle dieser Faktoren bei der Sepsis**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Von

Stefan Härtle

aus Haupeltshofen

München 2006

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwigs-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. Märtlbauer  
1. Referent: Univ.-Prof. Dr. T. Göbel  
2. Referent: Univ.-Prof. Dr. U. Matis  
1. Korreferent: Priv.-Doz. Dr. B. Schalch  
2. Korreferent: Univ.-Prof. Dr. J. Hirschberger  
3. Korreferent: Univ.-Prof. Dr. C. Knospe

Tag der Promotion: 09. Februar.2007

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht.....	2
2.1	Definition der Sepsis.....	2
2.2	Induzierte Sepsismodelle.....	5
2.2.1	Exogene Verabreichung von Toxinen.....	6
2.2.2	Exogene Verabreichung von lebenden Pathogenen.....	7
2.2.3	Örtlich begrenzte Zerstörung endogener Schutzbarrieren.....	7
2.3	Immunpathogenese der Sepsis.....	9
2.3.1	Identifizierung des Pathogens.....	9
2.3.2	Zytokininduktion über TLR.....	10
2.3.3	Allgemeine Wirkung proinflammatorischer Zytokine.....	12
2.3.4	Antiinflammatorische Mechanismen.....	15
2.4	Diagnostische Parameter der Sepsis.....	17
2.5	Tumor-Nekrose-Faktor alpha.....	18
2.5.1	Allgemeines.....	18
2.5.2	Rezeptoren.....	19
2.5.3	Wirkung.....	20
2.6	High Mobility Group Box1.....	24
2.6.1	Allgemeines.....	24
2.6.2	Rezeptoren.....	25
2.6.3	Wirkung.....	27
3	Zielsetzung.....	33
4	Material und Methoden.....	34
4.1	Tiere und Tierhaltung.....	34
4.2	Gewinnung von primären Hundeleukozyten.....	34
4.3	Kultivierung von Zellen.....	35
4.4	Zellstimulationsassays.....	37
4.4.1	Canine PBL.....	37
4.4.2	RAW 264.7.....	38
4.5	WEHI-Bioassay.....	38
4.6	RNA Präparation.....	40
4.7	RT-PCR.....	42
4.7.1	cDNA Synthese.....	42
4.7.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	42
4.8	Agarose-Gelelektrophorese.....	45

---

4.9	TOPO®-Klonierung und Plasmid Präparation.....	46
4.10	Restriktionsenzymverdau und Gelaufreinigung.....	48
4.11	Ligation .....	48
4.12	DNA-Sequenzierung .....	50
4.13	SDS-Page .....	50
4.14	Western Blot.....	53
4.14.1	Blotting.....	55
4.14.2	Proteindetektion durch spezifische Antikörper.....	55
4.15	Rekombinante Proteinexpression in prokaryotischen Zellen.....	57
4.15.1	Material .....	57
4.15.2	Durchführung .....	57
4.16	Aufreinigung His-markierter Proteine .....	59
4.16.1	Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen .....	60
4.16.2	Aufreinigung unter nativen Bedingungen .....	61
4.17	LPS-Entfernung.....	65
4.17.1	Endotoxin Removing Gel.....	65
4.17.2	Phasenseparation mit TritonX 114.....	66
4.18	LPS Konzentrationsbestimmung und Neutralisation .....	66
4.19	Rekombinante Proteinexpression in eukaryotischen Zellen .....	67
4.19.1	Transiente Transfektion von 293T Zellen.....	67
4.19.2	Stabile Transfektion von CHO Zellen.....	67
4.19.3	Transiente Transfektion von SL3 Zellen.....	69
4.19.4	Stabile Transfektion von SL3 Zellen .....	69
4.20	Gewinnung polyklonaler Antiseren .....	71
4.20.1	Polyklonale Antiseren gegen rekombinantes canines TNF $\alpha$ und HMGB1 .....	71
4.20.2	Polyklonale Antiseren gegen synthetische Peptide .....	72
4.21	Aufreinigung polyklonaler Seren und Zellkulturüberstände.....	73
4.21.1	Aufreinigung polyklonaler Seren mit ProteinA-Sepharose .....	73
4.21.2	Aufreinigung polyklonaler Seren mit spezifischen Ligand-Matrizes .....	75
4.21.3	Aufreinigung von Zellkulturüberständen .....	78
4.22	ELISA.....	80
4.23	Zelllyse .....	83
4.24	Immunpräzipitation .....	85
4.25	Intrazytoplasmatische Färbung mittels POD-Konjugate.....	86
5	Ergebnisse .....	89
5.1	Klonierung, Expression und Aufreinigung von caninem TNF $\alpha$ .....	89
5.2	Klonierung, Expression und Aufreinigung von caninem P60.....	91
5.3	Bioaktivitätskontrolle des rekombinanten TNF $\alpha$ -FLAG und P60-Fc .....	92

---

5.4	Kreuzreaktivitätstest humaner anti-TNF $\alpha$ Therapeutika .....	93
5.5	Gewinnung polyklonaler Antikörper gegen canines TNF $\alpha$ .....	95
5.6	Aufbau verschiedener TNF $\alpha$ ELISA .....	96
5.7	Qualitätsparameter des TNF $\alpha$ ELISA2.....	98
5.8	Kreuzreaktivitätstest des TNF $\alpha$ ELISA2 .....	100
5.9	TNF $\alpha$ Messung bei spontaner caniner Sepsis.....	101
5.10	TNF $\alpha$ Messung bei caniner Magendrehung .....	102
5.11	Klonierung, Expression und Aufreinigung von caninem HMGB1 .....	102
5.12	Bioaktivitätskontrolle des rekombinanten HMGB1.....	104
5.13	Klonierung, Expression und Aufreinigung des caninen RAGE.....	106
5.14	Bioaktivitätskontrolle des rekombinanten RAGE-Fc .....	108
5.15	Gewinnung polyklonaler Antikörper gegen canines HMGB1 .....	109
5.16	Qualitative HMGB1 Messung bei caniner Sepsis im Western Blot .....	111
5.17	Antikörpergewinnung gegen spezifische Peptidsequenzen des caninen HMGB1.....	113
5.18	Aufbau eines HMGB1 Capture ELISA.....	115
5.19	Quantitative HMGB1 Messung bei caniner Sepsis im ELISA .....	116
6	Diskussion .....	118
6.1	Meßsysteme für canines TNF $\alpha$ .....	118
6.1.1	Expression von caninem TNF $\alpha$ .....	118
6.1.2	TNF $\alpha$ ELISA1 .....	119
6.1.3	Expression von caninem P60-Fc.....	120
6.1.4	TNF $\alpha$ ELISA2 .....	120
6.2	Neutralisation von caninem TNF $\alpha$ .....	121
6.2.1	Rekombinantes P60-Fc .....	122
6.2.2	Infliximab.....	122
6.2.3	Etanercept.....	122
6.3	TNF $\alpha$ in der caninen Sepsis.....	123
6.4	Klinische Bedeutung von TNF $\alpha$ beim Hund .....	123
6.5	Meßsysteme für canines HMGB1 .....	125
6.5.1	Expression von caninem HMGB1.....	126
6.5.2	Bioaktivität des rekombinanten HMGB1 .....	127
6.5.3	Aufbau eines Western Blots zur qualitativen HMGB1 Analyse.....	128
6.5.4	Expression und Bioaktivität des caninen RAGE.....	129
6.5.5	Antikörpergewinnung gegen Peptidsequenzen von HMGB1 .....	130
6.5.6	HMGB1 ELISA.....	130
6.6	HMGB1 in der caninen Sepsis .....	131

---

6.7	Beurteilung der Messergebnisse und klinische Bedeutung von HMGB1 beim Hund	131
6.8	TNF $\alpha$ , HMGB1 und weitere Faktoren im Blickfeld der Sepsistherapie	133
7	Zusammenfassung	135
8	Summary	137
9	Literaturverzeichnis	138

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: TNF $\alpha$ -Paradoxon in Mausmodellen für den septischen Schock.....	7
Abb. 2.2: Experimentelle Modelle der Sepsis.....	8
Abb. 2.3: Zellwandquerschnitt von Gram pos. und Gram neg. Bakterien.....	9
Abb. 2.4: TLRs und ihre Bindungspartner.....	10
Abb. 2.5: TLR Signaltransduktionsweg.....	11
Abb. 2.6: Wirkung der wichtigsten proinflammatorischen Zytokine .....	14
Abb. 2.7: Proteinsequenzhomologie von TNF $\alpha$ zwischen Hund, Mensch, Maus und Katze.....	18
Abb. 2.8: TNFR1 Signaltransduktionswege in der Übersicht.....	20
Abb. 2.9: Funktionsanalyse der humanen HMGB1-Proteinsequenz .....	24
Abb. 2.10: Proteinsequenzhomologie von HMGB1 zwischen Hund, Mensch, Maus und Rind ..	25
Abb. 2.11: HMGB1 Rezeptoren und deren Signaltransduktion.....	26
Abb. 2.12: Zytokinkinetik von HMGB1, TNF $\alpha$ und IL-1 in der Sepsis .....	31
Abb. 4.1: Klonierungsstelle des Vektors pCR3 – HA-FLAG.....	49
Abb. 4.2: Klonierungsstelle des Vektors pCR3 - huFc.....	49
Abb. 5.1: TNF $\alpha$ Aufreinigung über Ni-NTA Affinitätschromatographie .....	89
Abb. 5.2: Aufgereinigtes TNF $\alpha$ -FLAG – SDS-Page.....	90
Abb. 5.3: Zellkulturüberstand TNF $\alpha$ -FLAG – Western Blot .....	90
Abb. 5.4: Zellkulturüberstand P60-Fc – Western Blot.....	91
Abb. 5.5: P60-Fc Zellkultur-überstand aus SL3 Expression im Fc-Tag ELISA.....	92
Abb. 5.6: Bioaktivität und Konzentrationsbestimmung von TNF $\alpha$ -FLAG im WEHI-Bioassay ..	93
Abb. 5.7: Bioaktivität von P60-Fc im WEHI-Bioassay .....	93
Abb. 5.8: Infliximab und TNF $\alpha$ -FLAG im WEHI Bioassay.....	94
Abb. 5.9 Etanercept und TNF $\alpha$ -FLAG im WEHI-Bioassay.....	94
Abb. 5.10: Antikörper-Titerbestimmung des anti-TNF $\alpha$ Serum im ELISA.....	95
Abb. 5.11: Titration des Antikörpers Kaninchen-anti-Hund TNF $\alpha$ POD im ELISA .....	96
Abb. 5.12: Aufbau TNF $\alpha$ ELISA1 .....	96
Abb. 5.13: Aufbau TNF $\alpha$ ELISA2 .....	97
Abb. 5.14: Ermittlung der Detektionsgrenzen von TNF $\alpha$ ELISA1 und 2.....	98
Abb. 5.15: Verdünnungsexakteheit des TNF $\alpha$ ELISA2.....	100

---

Abb. 5.16: Überstände humaner und caniner PBL im TNF $\alpha$ ELISA2.....	101
Abb. 5.17: HMGB1 Aufreinigung über Ni-NTA Affinitätschromatographie .....	103
Abb. 5.18: HMGB1 Aufreinigung über M2-anti-FLAG Affinitätschromatographie .....	103
Abb. 5.19: RAW 264.7 Zellen mit 1 $\mu$ g/ml HMGB1-FLAG stimuliert .....	105
Abb. 5.20: HMGB1-FLAG Stimulation caniner PBL .....	106
Abb. 5.21: Vergleich der extrazellulären Proteinsequenz des caninen RAGE .....	107
Abb. 5.22: RAGE-Fc Zellkultur-überstand aus SL3 Expression im Fc-Tag ELISA.....	108
Abb. 5.23: Affinitätsgereinigtes RAGE-Fc – SDS Page.....	108
Abb. 5.24: Immunpräzipitation zwischen RAGE-Fc und rekombinatem HMGB1 .....	109
Abb. 5.25: RAGE-Fc im ELISA mit rekombinatem HMGB1.....	109
Abb. 5.26: Antikörpertiter- Bestimmung des anti-HMGB1 Serum im ELISA .....	110
Abb. 5.27: Titration Antikörpers Kaninchen-anti-Hund HMGB1 POD im ELISA .....	111
Abb. 5.28: Plasma gesunder Hunde im HMGB1 Western Blot.....	112
Abb. 5.29: Plasma sepsiskranker Hunde im HMGB1 Western Blot .....	113
Abb. 5.30: HMGB1 peptidspezifische Antikörper im Western Blot .....	114
Abb. 5.31: Titration der Kaninchen-anti-Hund HMGB1-Peptid1 und -Peptid2 Antikörper im ELISA .....	114
Abb. 5.32: Aufbau des HMGB1 Capture ELISA.....	115
Abb. 5.33: Ermittlung der Detektions-grenze des HMGB1 ELISA .....	116
Abb. 5.34: HMGB1 Plasamessung von gesunden und septischen Hunden.....	117



## Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: SIRS-Kriterien der Humanmedizin.....	2
Tab. 2.2: SIRS-Kriterien für Hunde .....	3
Tab. 2.3: Erweiterte SIRS-Kriterien der Humanmedizin .....	4
Tab. 2.4: Endogene Aktivatoren der Toll-like Rezeptoren .....	12
Tab. 4.1: Verwendete Zelllinien.....	36
Tab. 4.2: Verwendete Primer .....	44
Tab. 4.3: Im Western Blot verwendete Antikörper.....	56
Tab. 4.4: Induktionszeiten für bakterielle Proteinexpression.....	59
Tab. 4.5: Peptidsequenzen zur Gewinnung spezifischer Antiseren gegen HMGB1 .....	72
Tab. 4.6: Im ELISA verwendete Antikörper und Rezeptoren.....	82
Tab. 5.1: Intra-Assay-Präzision des TNF $\alpha$ ELISA2 .....	99
Tab. 5.2: Inter-Assay-Präzision des TNF $\alpha$ ELISA2 .....	99
Tab. 5.3: Verteilung der Patienten innerhalb der Sepsisstudie .....	101
Tab. 5.4: Unterschiedlich modifizierte Vektoren mit HMGB1 für die Transfektion eukaryotischer Zellen.....	104
Tab. Patientenverteilung innerhalb der qualitativen HMGB1 Western Blot Messung.....	112
Tab. 5.6: Statistische Eckdaten der HMGB1 Messwert-Analyse aus Abb. 5.34 .....	117

## Abkürzungsverzeichnis

ACCP/SCCM	Consensus Conference des American College of Chest Physicians und der Society of Critical Care Medicine
AEC	Amino-Ethyl-Carbazol
AGE	Advanced Glycation End Products
APACHE	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation
APS	Amoniumpersulfat
Aqua bidest	Aqua bidestilatatum
Aqua dest	Aqua destilatatum
AS	Aminosäure
β-ME	Beta-Mecaptoethanol
BSA	Bovines Serumalbumin
CASP	Colon Ascendens Stent Peritonitis
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Komplementäre DNA (engl. complementary DNA)
CLP	Caecum Ligation und Punktion
CRP	C-reaktives Protein
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. Desoxyribonucleid Acid)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl. Ethylendiamintetraacetic Acid)
ELISA	Enzym Linked Immunosorbant Assay
FBS	Bovines Fötalserum (engl. Fetal Bovine Serum)
Fc	Fragment crystallizable
FCA	Freudsches komplettes Adjuvans (engl. Freud's Complete Adjuvans)
FIA	Freudsches inkomplettes Adjuvans (engl. Freud's Incomplete Adjuvans)
HMG	High-Mobility-Group Proteine
HMGB1	High-Mobility-Group Box-1
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IPTG	Isopropylthiogalctose
LB	Lauria Broth Base
LD	Lethale Dosis
LPS	Lipopolysaccharid
mRNA	Massenger RNA
MW	Mittelwert

---

P60	TNF Rezeptor Typ1
PBL	Periphere Blutleukozyten
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (engl. Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. Polymerase Chain Reaction)
PIRO	Predisposition Insult/Infection Response Organ Dysfunction
POD	Meerrettich-Peroxidase
RAGE	Receptor for Advanced Glycation End Products
RNA	Ribonukleinsäure (engl. Ribonuclein Acid)
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung (engl. Standard Deviation)
SDS	Natrium-Duodecyl-Sulfat
SDS-Page	Natrium-Duodecyl-Sulfat-Polyacrylelektrophorese
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TLR	Toll like Receptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer RNA

## 1 Einleitung

Die Sepsis, Blutvergiftung oder auch Septikämie genannt, ist seit jeher sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin eine der meistgefürchteten Krankheitserscheinungen. Neueste Studien aus der Humanmedizin belegen, dass heute, trotz des Einsatzes verschiedenster Antibiotika und Antiphlogistika in Verbindung mit intensivmedizinischer Betreuung, immer noch zwischen 18 % und 30 % aller Sepsispatienten sterben. Allein in der Bundesrepublik Deutschland sind dies jährlich über 75000 Menschen, was Sepsis zur dritthäufigsten Todesursache überhaupt macht [1]. Diese hohe Zahl an Todesfällen blieb trotz intensiver Forschungsaktivitäten in den letzten 30 Jahren nahezu unverändert. Einerseits liegt dies sicherlich daran, dass es sich um ein sehr komplexes Krankheitsgeschehen handelt, bei dem eine Vielzahl an Faktoren beteiligt sind. Andererseits wurden für die Forschung überwiegend induzierte Tiermodelle (vor allem Mausmodelle) verwendet, die zwar gute Erkenntnisse zur Weiterentwicklung von Pharmaka gebracht haben, aber für die spontane Erkrankung nur eine begrenzte Aussagekraft besitzen.

Für ein besseres Verständnis der Immunpathogenese spontaner Sepsis wäre dementsprechend ein Tiermodell wünschenswert, welches sowohl die Untersuchung spontaner als auch induzierter Sepsis erlaubt und dabei möglichst repräsentativ für die Human- und Tiermedizin ist. All diesen Forderungen kommt sicherlich der sepsiskranke Hund am nächsten. Aus der Klinik sind viele verschiedene spontane Sepsisfälle bekannt. Sie gleichen in ihrer Ursache und ihrem klinischen Verlauf weitestgehend den humanmedizinischen. Darüber hinaus sind zwei verschiedene induzierte Sepsismodelle beim Hund beschrieben, welche bereits aufzeigt haben, dass die Zytokinkinetiken des Hundes zu Beginn der Sepsis der von Mensch und Maus gleichen.

Trotz erster Ergebnisse aus induzierten Sepsismodellen ist aber noch relativ wenig bekannt über die Immunpathogenese der spontanen caninen Sepsis, vor allem im Hinblick auf das Auftreten und die Kinetik verschiedener Zytokine. Diese sind von großem Interesse, da sie charakteristisch für den Verlauf und teils auch für die Prognose der Erkrankung sind.

Ziel dieser Arbeit war es, neue Messsysteme für die beiden caninen Zytokine High Mobility Group Box1 (HMGB1) und Tumor-Nekrose-Faktor alpha ( $TNF\alpha$ ) aufzubauen, um anschließend im Rahmen einer klinischen Studie mehr über das Auftreten und die Wirkung dieser Faktoren bei der natürlichen Sepsis des Hundes herauszufinden.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Definition der Sepsis

Die klassische Definition der Sepsis, erstmals 1914 vom deutschen Arzt Hugo Schottmüller postuliert, geht von einem Sepsisherd aus, von welchem konstant oder periodisch pathogene Keime in den Blutkreislauf gelangen. Das klinische Erscheinungsbild des Patienten in Kombination mit einem hämatogenen Erregernachweis galt demnach als die einzige Möglichkeit der Sepsisdiagnostik [2]. Schon bald erkannte man allerdings, dass auch mit besten mikrobiologischen Testverfahren ein regelmäßiger hämatogener Nachweis der Keime, trotz offensichtlicher Streuung aus einem Primärherd in den Blutkreislauf und klinischer Symptome, nicht zu erreichen war. Auch heute noch liegt die Anzahl positiver Blutkulturen bei solchen Patienten unter 30 % [3]. Die klinische Symptomatik der Erkrankung dagegen ist für eine alleinige Sepsisdiagnostik unzureichend. Auch andere Erkrankungen, deren Genese nicht auf der hämatogenen Verbreitung von pathogenen Keimen beruht, können vergleichbare systemische Entzündungsreaktionen hervorrufen. Deshalb einigte man sich 1992 auf die Einführung einer neuen Definition. Der Begriff Sepsis wurde durch die *Consensus Conference des American College of Chest Physicians* und der *Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM)* für Patienten mit Infektionen definiert, die mindestens zwei der vier Kriterien des sogenannten Systemic-Inflammatory-Response-Syndroms (SIRS) aufweisen [4]. Diese sind für den Menschen durch Über- oder Unterschreiten folgender Parameter definiert:

<b>Körpertemperatur</b>	<36°C bzw. >38°C
<b>Herzfrequenz</b>	>90/min
<b>Atemfrequenz</b>	>20/min bzw. PaCO <sub>2</sub> <32mmHg
<b>Leukozytenstatus</b>	<4000/μl bzw. >12000/μl

Tab. 2.1: SIRS-Kriterien der Humanmedizin

2004 erfolgte die Modifikation dieser SIRS-Kriterien für den Hund [5]:

	<b>kleine Hunde</b>	<b>große Hunde</b>
<b>Körpertemperatur</b>	<38°C bzw. >39,5°C	<37,5°C bzw. >39,3°C
<b>Herzfrequenz</b>	>140/min	>140/min
<b>Atemfrequenz</b>	>20/min	>20/min
<b>Leukozytenstatus</b>	<6000/ $\mu$ l bzw. >16000/ $\mu$ l oder im Normbereich mit >3 % stabkernigen Leukozyten	<6000/ $\mu$ l bzw. >16000/ $\mu$ l oder im Normbereich mit >3 % stabkernigen Leukozyten

**Tab. 2.2: SIRS-Kriterien für Hunde (nach Rau et al. [5])**

Im Weiteren wurden neben dem Begriff der Sepsis noch zwei weitere Schweregrade dieser Erkrankung definiert. Bei Vorliegen mindestens einer infektiionsbezogenen Organdysfunktion wird eine schwere Sepsis angenommen. Der Begriff des septischen Schocks ist auf Patienten beschränkt, die trotz entsprechender Maßnahmen weiterhin ein Kreislaufversagen aufweisen [4]. Damit wurden nun erstmals eindeutige Kriterien für die klinische Symptomatik festgelegt und gleichzeitig unterschiedliche Verlaufsformen der Krankheit definiert (Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock).

In der Humanmedizin erkannte man allerdings bald darauf, dass diese einfachen SIRS-Kriterien der Komplexität der Sepsis nicht gerecht werden und für eine genaue klinische Evaluation eines Patienten zu ungenau sind [6, 7]. Deshalb wurden 2001 wiederum von der ACCP/SCCM die Definitionskriterien für SIRS-Patienten der Humanmedizin stark erweitert [8]:

<b>Allgemeine Parameter</b>	Körpertemperatur <36°C bzw. >38,3°C
	Herzfrequenz >90/min
	Atemfrequenz >30/min
	geistiger Zustand
	deutlich erkennbare Ödeme bzw. pos. Flüssigkeitsbalance >20 ml/kg über 24 h
	Blutzucker >110 mg/dl bzw. >7.7mM/l (ohne Diabetes)
<b>Entzündungsparameter</b>	Leukozytenstatus >12000 bzw. <4000 Normbereich mit >10 % immaturren Leukozyten

	C-reaktives Protein >2xSD über dem Normwert
	Procalcitonin >2xSD über dem Normwert
<b>Hämodynamische Parameter</b>	arterieller Blutdruck <90mmHg systolisch bzw. <70mmHg mittlerer arterieller
	Sauerstoffsättigung >70 % gemischt venös
	Herzindex 3,5l/min*m <sup>2</sup>
<b>Parameter für Organversagen</b>	Sauerstoffsättigung arteriell PO <sub>2</sub> /FIO <sub>2</sub> <300
	Harnproduktion <0,5 ml/kg*h bzw. 45mM/l über mindestens 2 h
	Creatinin >0,5 mg/dl
	Gerinnungsstörung >1,5 internat. Standardration bzw. aPT>60 s
	fehlende Darmgeräusche
	Thrombozytenstatus <100000/μl
	Billirubin >4 mg/dl oder 70mmol/l
<b>Parameter für Gewebepfusion</b>	Lactatwert >3mmol/l
	kapilläre Füllungszeit verringert

**Tab. 2.3: Erweiterte SIRS-Kriterien der Humanmedizin**

Darüber hinaus wurden verschiedene Modelle entwickelt, mit deren Hilfe Risikobewertungen und prognostische Aussagen für Krankheiten wie Sepsis getroffen werden können [9]. Die bekanntesten sind die *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation* (APACHE) [10, 11] und das *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA) [12, 13]. Sie beruhen auf einer Bewertung verschiedenster klinischer und labortechnischer Parameter, welche zuvor durch eine große Anzahl an Patienten statistisch auf ihren Einfluss zum Verlauf der Erkrankung analysiert wurden. So erhält man ein Punktesystem, mit welchem sich die aktuelle Situation und die Prognose eines erkrankten Menschen bestimmen lassen. Da diese Parameter aber allgemein und unabhängig vom Krankheitsbild Sepsis ermittelt wurden, veröffentlichte die ACCP/SCCM 2001 ein neues, speziell für die humane Sepsis entwickeltes Punkteschema, das *Predisposition Insult/Infection Response Organ Dysfunction* (PIRO) System [8]. Angelehnt dem Tumor-Nodus-Metastase (TNM) -System der Onkologie beurteilt das PIRO-System nicht nur aktuelle klinische Daten des Sepsispatienten, sondern betrachtet auch genetische Prädispositionen (genetische Polymorphismen von CD14, TNF $\alpha$ , IL-1 und Toll-like-Rezeptoren) oder mögliche Erfolge bestimmter Therapieansätze. Da in der Tiermedizin allgemein und speziell beim Hund noch keine statistische Erfassung und Auswertung klinischer, labortechnischer und genetischer Parameter

sepsiskranker Patienten vorgenommen wird, kann dementsprechend auch noch kein vergleichbares Bewertungsmodell aufgestellt werden.

Allgemein lässt sich erkennen, dass der Sepsisbegriff in Folge neuer Erkenntnisse zur Genese und Pathophysiologie von Inflammationsreaktionen innerhalb der letzten 15 Jahre einen erheblichen Bedeutungswandel erfahren hat. Die klassische Definition Schottmüllers mit dem strengen Postulat des Sepsisherdes und der von dort ausgehenden hämatogenen Keimstreuung sowie der damit verbundenen diagnostischen Priorität des Bakteriämienachweises ist inzwischen einem Sepsisverständnis gewichen, das in der inflammatorischen Wirtsreaktion den entscheidenden Beitrag zur Pathogenese des Krankheitsbildes sieht. Im Hundemodell kann zwar noch nicht auf Risiko- und Prognosemodelle wie in der Humanmedizin zurückgegriffen werden, dennoch trägt die Evaluierung potentieller Sepsispatienten mit Hilfe der SIRS-Kriterien diesem Gedanken erstmals Rechnung.

## **2.2 Induzierte Sepsismodelle**

Die komplexe Pathogenese der Sepsis wird sicherlich durch die Betrachtung einer Vielzahl von spontanen Erkrankungen am besten beschrieben. Dennoch gibt es verschiedene Fragestellungen, die einfacher durch ein induziertes Sepsismodell beantwortet werden können. Vor allem in den ersten Stunden nach einer septischen Infektion, in denen der Patient noch keine klinische Symptomatik zeigt, besitzt das induzierte Sepsismodell am meisten Aussagekraft. Zudem ist es in solchen Modellen möglich, bestimmte Faktoren zu applizieren oder zu neutralisieren, um somit erste Anhaltspunkte über deren Bedeutung in der Pathogenese zu erhalten.

Je nach Vorgehensweise können prinzipiell drei verschiedene Kategorien von Sepsismodellen unterschieden werden: exogene Verabreichung von Toxinen (z.B. LPS), exogene Verabreichung von lebenden Pathogenen (z.B. Bakterien) und örtlich begrenzte Zerstörung endogener Schutzbarrieren (z.B. Colonperforation). Diese Methoden sind für eine Vielzahl verschiedener Tierspezies und teils auch für den Menschen beschrieben. Allerdings ist keines dieser Modelle in der Lage, die vollständige Komplexität der Krankheit widerzuspiegeln, so dass durch sie jeweils nur ein kleiner Ausschnitt der Immunpathogenese betrachtet werden kann. Im Folgenden werden vor allem die etablierten Sepsismodelle an Maus, Mensch und Hund beschrieben.



### 2.2.1 Exogene Verabreichung von Toxinen

Hierbei werden eine oder einige wenige Substanzen direkt injiziert, um somit sepsisähnliche klinische Erscheinungen hervorzurufen. Am meisten verbreitet ist dabei die Injektion von LPS. Sie aktiviert den TLR4 (s. 2.3.2) und bewirkt dementsprechend eine starke proinflammatorische Antwort mit hohem  $\text{TNF}\alpha$ -Anteil. Um bei der Maus diese Symptome hervorzurufen, müssen vergleichsweise hohe Konzentrationen an LPS eingesetzt werden ( $\text{LD}_{75} = 15 \text{ mg/kg}$ ) [14]. Man spricht bei diesem Modell deshalb auch von einer (letalen) Endotoxinämie. Aufgrund der hohen LPS-Spiegel im Blut und der starken inflammatorischen Reaktion entspricht dieses Modell daher am ehesten der humanen Meningokokkensepsis [15]. Um die Sensitivität gegenüber LPS bei der Maus zu steigern, werden häufig auch D-Galaktosamine zusätzlich injiziert [16]. Weit weniger verbreitet im Mausmodell ist dagegen die Verabreichung von CpG-DNA und von synthetischen Lipopeptiden, welche das Immunsystem über TLR9 bzw. über TLR2 aktivieren.

Auch für den Menschen sind LPS-Injektionsversuche beschrieben. Dabei werden Dosen von 1 bis 4 ng LPS pro kg Körpergewicht intravenös verabreicht. Diese Injektionen bewirken eine verminderte, aber charakteristische Zytokinkinetik. Nebenwirkungen dieser Versuche sind Fieber, Kopfschmerzen, Muskelschmerzen, Übelkeit und Photophobie [17].

Die meisten Daten über Zytokinkinetiken während akut inflammatorischer Reaktionen beim Hund stammen ebenfalls aus LPS-Injektionsversuchen [18, 19]. Hierbei zeigte sich je nach Versuchsaufbau eine ähnlich hohe Sensitivität gegenüber LPS wie beim Menschen. Auch die Kinetik von  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 und IL-1 gleichen denen von Maus und Mensch.

Das LPS-Sepsismodell ist zwar äußerst einfach in der Durchführung, vernachlässigt jedoch, wie alle nicht infektiösen Sepsismodelle, die Vermehrung von Keimen und deren Zerstörung durch das Immunsystem. Deutlich wird dies z.B. beim  $\text{TNF}\alpha$ -Paradoxon im Mausmodell für den septischen Schock. Wird eine Maus mit einer lethalen LPS Dosis behandelt kann ihr Tod durch die gleichzeitige Gabe von anti- $\text{TNF}\alpha$  Antikörpern verhindert werden. Wird die Sepsis allerdings durch eine chirurgische Blinddarmperforation hervorgerufen (Ceecal Ligation and Puncture (CLP) – siehe unten), welche allein nicht zum Ableben führt, bedeutet eine Behandlung mit anti- $\text{TNF}\alpha$  Antikörpern den sicheren Tod dieses Tieres.

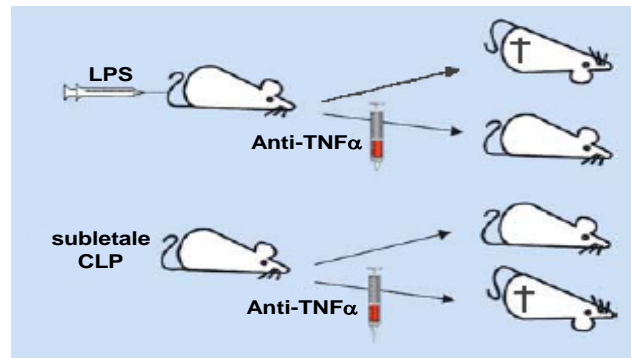


Abb. 2.1: TNF $\alpha$ -Paradoxon in Mausmodellen für den septischen Schock (nach Hörner et al. [15])

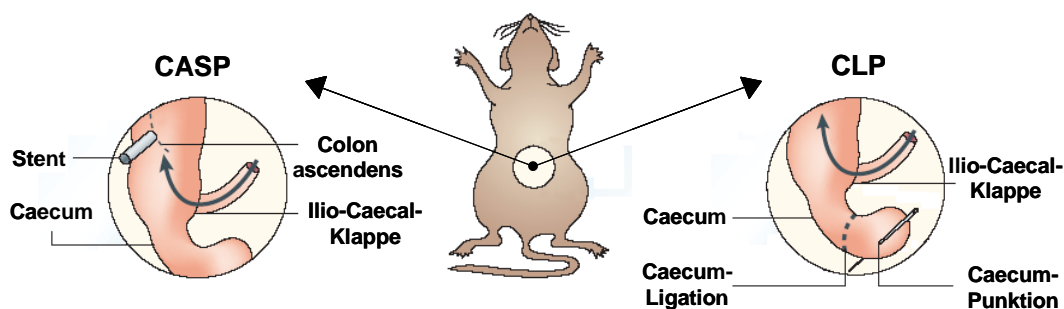
### 2.2.2 Exogene Verabreichung von lebenden Pathogenen

Bei diesem Sepsismodell werden lebende Pathogene, meist Bakterien eines einzelnen Klon, intravenös, intratracheal oder intraabdominal appliziert. Seit der Etablierung der Darmperforationsmodelle bei der Maus (siehe unten) wird bei dieser Spezies diese Methode zur Sepsisforschung kaum noch angewendet. Vor allem beim Hund ist die Applikation von Bakterien in die Bauchhöhle das Sepsismodell, welches der natürlichen Sepsis am nächsten kommt. Nach einem Protokoll des *Institutional Animal Care and Use Committee of the Clinical Center at the National Institutes of Health* werden dabei je nach Schweregrad der Infektion zwischen  $3 \times 10^9$  bis  $18 \times 10^9$  lebende CFU des *E.coli* Stammes 0111:B4 in ein Fibrinnetz eingearbeitet. Anschließend wird dieses Fibrinkoagel während einer Laparotomie unter Vollnarkose intraabdominal platziert [20]. Da die Versuchshunde sehr sensibel auf diese Form der Sepsis reagieren, erfolgt nach der Operation eine genau definierte intensivmedizinische Betreuung. Der Nachteil dieses Sepsismodells liegt in der Verwendung nur eines einzelnen Bakterienstammes. Es zeigte sich in verschiedenen Versuchen, dass die Immunreaktion durch die Wahl des Erregers gezielt beeinflusst wird. Da allerdings bei einer natürlichen Infektion oft eine Mischflora an verschiedenen Keimen vorliegt bzw. begleitende Sekundärinfektionen hinzu treten, ist diese Immunreaktion auf einen einzelnen Keim hin nicht vollständig vergleichbar mit einer echten, z.B. durch Darmperforation hervorgerufene Sepsis [16].

### 2.2.3 Örtlich begrenzte Zerstörung endogener Schutzbarrieren

Für dieses Vorgehen der Sepsisinduktion sind zwei Modelle bei der Maus beschrieben. Sie

beruhen auf einer chirurgischen Perforation des Darms mit anschließend austretendem Darminhalt (s. Abb. 2.2). Das erste Model ist das so genannte *Ceecal Ligation and Puncture* (CLP) Verfahren. Dabei wird die Maus in Vollnarkose laparotomiert und der Blinddarm in der Mitte abgebunden, so dass nur noch eine geringe Verbindung zwischen den beiden Anteilen besteht. Anschließend wird der distale Anteil mit einer Kanüle komplett durchstoßen, meist sogar etwas Stuhl aus dem Darm herausgedrückt, alles zurückverlagert und die Bauchwunde wieder verschlossen. Als zweites Model ist das so genannte *Colon Ascendens Stent Peritonitis* (CASP) Verfahren beschrieben. Wie bei der CLP wird die Maus narkotisiert, laparotomiert und diesmal der aufsteigende Dickdarmanteil vorgelagert. Kurz nach der Ileocaecal-Klappe wird eine Inzision gesetzt und ein Stent eingebracht. Somit ist eine ständige Verbindung zwischen Darmlumen und Bauchhöhle gewährleistet. Anschließend wird der Darm wieder zurückverlagert und die Bauchhöhle verschlossen [16].



**Abb. 2.2: Experimentelle Modelle der Sepsis: Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP) und Cecal Ligation and Puncture Verfahren (CLP) (nach Buras et al. [16])**

Der Vergleich der beiden Sepsismodelle zeigt allerdings, dass das CLP Verfahren eher einer intraabdominalen Abszessbildung gleicht, währenddessen die CASP einer natürlichen Sepsis weit ähnlicher ist [21]. Durch die Darmperforation können eine Vielzahl verschiedener Keime in die Bauchhöhle eintreten und setzen damit einen stetigen Entzündungsreiz. Das klinische Bild und die Reaktion des Immunsystems bei der CASP sind der Sepsis, wie sie z.B. nach abdominalen Chirurgie entstehen kann, sehr ähnlich. Dennoch sind die Erkenntnisse aus diesem Modell nicht vollständig auf andere Säugetiere übertragbar, da, wie bereits angesprochen, die Maus weit unempfindlicher auf Gram negative Keime reagiert als z.B. der Mensch, und sich die Darmflora der beiden Spezies ebenfalls deutlich unterscheidet.

## 2.3 Immunpathogenese der Sepsis

### 2.3.1 Identifizierung des Pathogens

Als auslösende Faktoren der Sepsis sind hauptsächlich Bakterien, aber auch Pilze, Parasiten und Viren beschrieben. Sie treten über Läsionen in den Organismus ein und werden vor Ort vom angeborenen Immunsystem erkannt. Die Identifikation der Pathogene erfolgt hauptsächlich über sog. *Pathogen Associated Molecular Pattern* (PAMPs) (s. Abb. 2.3). Als PAMPs bezeichnet man bestimmte konservierte molekulare Muster, welche nur auf Pathogenen, nicht aber auf eukaryotischen Zellen lokalisiert sind.

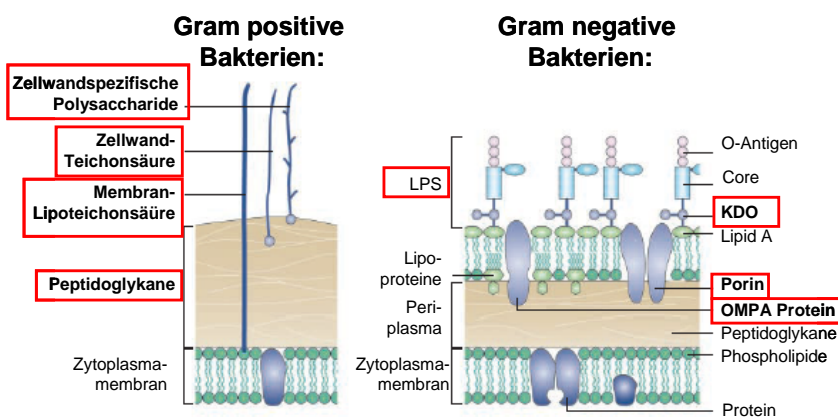


Abb. 2.3: Zellwandquerschnitt von Gram pos. und Gram neg. Bakterien

□ = PAMPs; KDO, 3-deoxy-D-mano-octulosonate; LPS, Lipopolisaccharid; OMPA, äußeres Membran-protein A; (nach Lolis et al. [22])

Die entsprechenden Rezeptoren des Immunsystems für diese Muster werden als *Pattern Recognition Receptors* (PRR) bezeichnet [23]. Sie finden sich sowohl als zellgebundene Rezeptoren auf der Zellmembran von Monozyten/Makrophagen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, in endosomalen Membranen als auch in löslicher Form in Zellplasma und Serum. Zu ihnen zählen Teile des Komplementsystems (z.B. Mannose bindendes Lectin) [24] und die sog. *Scavenger Rezeptoren* [25]. Die wohl bekanntesten PRRs sind die *Toll-like Rezeptoren* (TLR) [26, 27]. Die Folge einer Bindung zwischen PAMP und PRR ist die Phagozytose des Pathogens, vor allem durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten mit anschließender lysosomaler Aufspaltung [28] und/oder die Aktivierung einer der oben genannten Zellen mit anschließender Zytokinproduktion [29].

### 2.3.2 Zytokininduktion über TLR

Die bekannteste und wohl effektivste Art der Aktivierung zytokinproduzierender Zellen erfolgt über die Bindung des Pathogens an die TLRs [27]. Erstmals beschrieben bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* als *Toll-Rezeptor* erkannte man bald darauf, dass auch höher entwickelte Lebewesen über vergleichbare Rezeptoren des angeborenen Immunsystems verfügen [30]. Beim Menschen sind bis heute bereits zehn verschiedene TLRs bekannt [31], welche unterschiedliche Strukturen von Pathogenen erkennen:

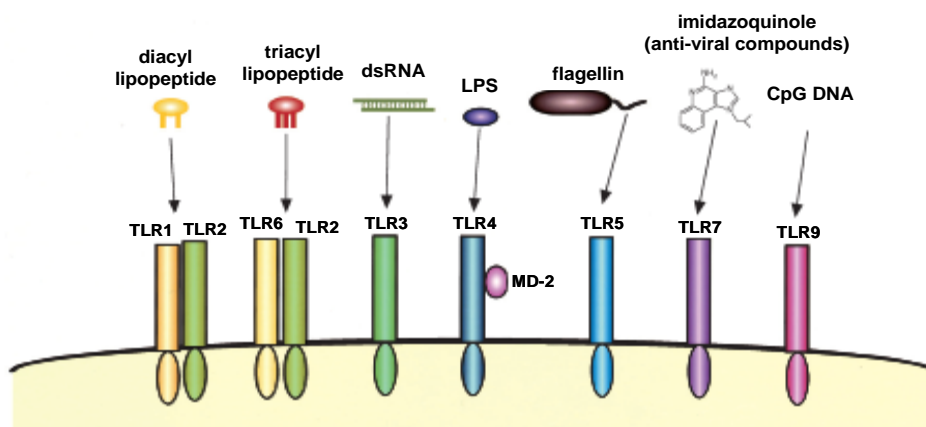


Abb. 2.4: TLRs und ihre Bindungspartner (nach Takeda et al. [27])

Auch für den Hund wurden bereits entsprechende Sequenzen für TLR2 und 4 im Genom lokalisiert [32]. Einmal aktiviert, wird durch den TLR über die Zellmembran hinweg intrazellulär eine Signalkaskade in Gang gesetzt: die MyD88 vermittelte Signaltransduktion.

#### Intrazelluläre Signaltransduktion

Die intrazelluläre Domäne eines TLRs wird als so genannte TIR-Domäne bezeichnet (*Toll/IL-1 Rezeptor*), ein Abschnitt, welcher identisch ist mit dem intrazytoplasmatischen Anteil des Interleukin-1 Rezeptors und daher auch dessen Bezeichnung trägt. Der aktivierte TLR bindet mit dieser Domäne das Adaptermolekül MyD88, welches im Zentrum des gesamten Signalwegs steht. Bei TLR2 und TLR4 wird MyD88 zusammen mit dem Molekül TIRAP gebunden. MyD88 besitzt ebenfalls eine TIR-Domäne, welche an die TIR-Domäne des Rezeptors bindet. Gleichzeitig besitzt MyD88 eine so genannte Todesdomäne. Diese bindet die Todesdomäne eines weiteren Moleküls, einer *Serin/Threonine innate immunity Kinase* kurz SIIK oder wegen der

Homologie zur *IL-1 Rezeptor assoziierten Kinase* auch IRAK genannt. IRAK aktiviert eine weitere Kinase mit der Bezeichnung TRAF6. Das aktivierte TRAF6 Molekül wiederum bindet und phosphoryliert die beiden Kinasen I $\kappa$ k $\alpha$  und I $\kappa$ k $\beta$ , welche sich daraufhin zusammenlagern und das Dimer I $\kappa$ k bilden. I $\kappa$ k, ebenfalls eine Kinase, phosphoryliert das inhibitorische Molekül I $\kappa$ B. Durch die Phosphorylierung spaltet sich I $\kappa$ B von seinem Bindungspartner NF- $\kappa$ B ab. Das freie NF- $\kappa$ B kann nun ungehindert vom Zytosol in den Zellkern gelangen und dort durch die Bindung an verschiedene Promotoren seiner Eigenschaft als Transkriptionsfaktor nachkommen. Dadurch wird zum einen die Synthese verschiedener proinflammatorischer Zytokine induziert, zum anderen aber auch das Gen für I $\kappa$ B aktiviert. Damit reguliert und deaktiviert sich NF $\kappa$ B von selbst [33, 34]. Ebenfalls aktiviert durch TRAF6 wird ein zweiter Transkriptionsfaktor mit der Bezeichnung AP1. Hierbei aktiviert TRAF6 das Molekül *Jun N-terminale Kinase* (JNK), welches seinem Namen entsprechend das Molekül Jun phosphoryliert. Aktiviertes Jun lagert sich mit dem Molekül FOS zusammen und bildet so gemeinsam den Transkriptionsfaktor AP1, welcher ebenfalls die Synthese verschiedener Zytokine induziert [27] (s. Abb. 2.5).

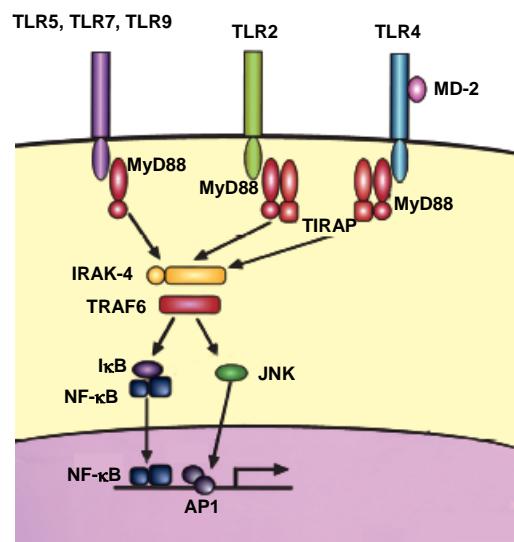


Abb. 2.5: TLR Signaltransduktionsweg (nach Takeda et al. [27])

Neben diesem Weg der Signalübermittlung vom aktivierten TLR zum Zellinneren gibt es für TLR3 und TLR4 Anzeichen für einen weiteren MyD88-unabhängigen Weg. Zwar werden bei diesem Weg die bekannten Transkriptionsfaktoren AP1 und NF- $\kappa$ B aktiviert, dennoch bleibt eine

Zytokininduktion aus [35]. Als Folge dieser Art der Signalübertragung gelten die Differenzierung von Dendritischen Zellen [36], die enzymale Prozessierung von IL-18 [37] und die Induktion so genannter Interferon-induzierbarer Gene über den Transkriptionsfaktor IRF-3 [38]. Die Bedeutung dieses Signalwegs im Bezug zur Sepsis ist allerdings noch nicht vollständig geklärt.

### **Bedeutung der TLRs in der Sepsis**

Immer mehr Forschungsergebnisse beweisen die zentrale Rolle der TLRs in der Immunpathogenese der Sepsis [39]. In TLR-„Knock-Out“ Versuchen konnte gezeigt werden, dass Mäuse ohne TLR4 auch nach der Verabreichung von letalen Dosen an LPS nicht erkranken. Die TLRs sind demnach diejenigen Rezeptoren, welche die Zytokinkaskade starten [40]. Neueste Erkenntnisse lassen sogar die Vermutung zu, dass einmal durch Pathogene aktivierte TLRs weiterhin durch endogene körpereigene Substanzen aktiviert bleiben [41] (s. Tab. 2.4), und dass durch diese Daueraktivität die überschießende Immunreaktion der Sepsis zu erklären ist [42]. Zukünftige Forschungsarbeiten müssen in diesem Bereich noch genauere Erkenntnisse liefern.

<b>Endogene TLR-Agonisten</b>	<b>Rezeptor</b>	<b>Lokalisation</b>
Hyaluronsäure	TLR4	Extrazelluläre Matrix, Synovium
Fibronectin-ExtrodomäneA	TLR4	Extrazelluläre Matrix, Serum
Heparansulfat	TLR4	Extrazelluläre Matrix, Zelloberfläche
Hitzeschockprotein 60	TLR4	Mitochondrien
Hitzeschockprotein 70	TLR2 + TLR4	Zytoplasma
Fibrinogen	TLR4	Serum
Surfactant Protein-A	TLR4	Lungenepithel
Chromatin-IgG Komplexe	TLR9	Zellkern, Serum

**Tab. 2.4:** Endogene Aktivatoren der Toll-like Rezeptoren (nach Johnson et al. [41])

### **2.3.3 Allgemeine Wirkung proinflammatorischer Zytokine**

Die durch TLR Aktivierung induzierten Zytokine in Monozyten/Makrophagen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sind bei der Sepsis vorrangig proinflammatorischer Natur. Ihre Wirkungsweise kann sowohl autokrin, parakrin also auch endokrin sein. Dementsprechend unterscheidet man funktionell auch zwischen den lokalen und den systemischen Effekten dieser

Proteine. Zu den am besten untersuchten proinflammatorischen Zytokinen gehören IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 und TNF $\alpha$ .

Das von residenten Gewebsmakrophagen am Entzündungsort lokal gebildete IL-1 bewirkt die Aktivierung von Gefäßendothelien, was eine Expression von Zelladhäsionsmolekülen auf der intravasalen Seite zur Folge hat. Diese Moleküle werden in drei Gruppen zusammengefasst (Selektine, Integrine und Mitglieder der Immunglobulin Superfamilie) und bewirken die Bindung von frei im Blutstrom zirkulierenden Leukozyten. Anschließend treten diese Zellen durch die von IL-1 und TNF $\alpha$  permeabilisierte Gefäßwand hindurch. IL-8 und eine Vielzahl anderer Chemokine, ebenfalls wie die Zytokine von aktivierten Phagozyten sezerniert, weisen den Leukozyten nun chemotaktisch den Weg von der Gefäßwand zum eigentlichen Ort der Entzündung. Die ersten so requirierten Zellen sind größtenteils neutrophile Granulozyten, also weitere Phagozyten. Etwas zeitversetzt folgen danach weitere Zellen des Immunsystems, wie Monozyten/Makrophagen, Lymphozyten und Natürliche-Killer Zellen (NK-Zellen). Letztere werden durch IL-12 aktiviert und erkennen und töten vorrangig intrazellulär infizierte Zellen. Darüber hinaus bewirkt IL-12 eine Differenzierung der CD4 positiven T-Lymphozyten in *T-Helfer-1 Zellen* (T<sub>H</sub>1), eine T-Zell Subpopulation, welche nach Aktivierung und Differenzierung wiederum verstärkt proinflammatorische Zytokine (TNF $\alpha$ , IL-2 und INF $\gamma$ ) sezerniert (s. Abb. 2.6). Die klinischen Folgen dieser molekularen Mechanismen sind die klassischen Entzündungserscheinungen. Durch die Permeabilisierung der Gefäßwände und dem Austritt von Zellen und Plasma kommt es zunächst zur verstärkten Durchblutung und damit zur Rötung (*rubor*) und zur Erwärmung (*calor*) der betroffenen Region. Gleichzeitig schwillt dadurch auch das entzündete Gewebe an (*tumor*). Der erhöhte Druck im Gewebe sensibilisiert die Nervenendigungen, so dass vor allem die Primärläsion verstärkt schmerzt (*dolor*). Die Folge aus diesen Veränderungen ist häufig ein Funktionsverlust der Entzündungsstelle (*functio laesa*).



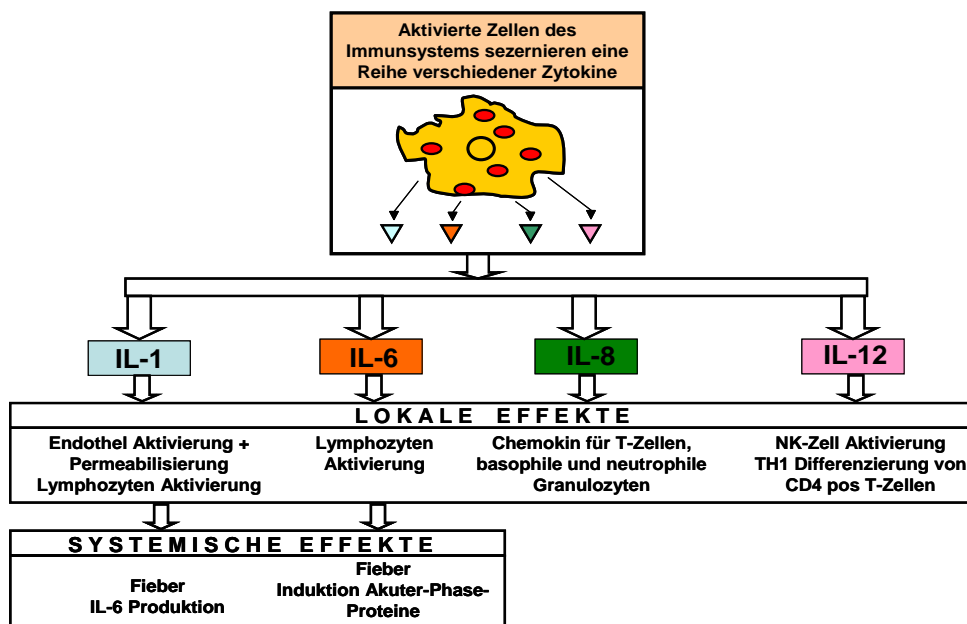


Abb. 2.6: Wirkung der wichtigsten proinflammatorischen Zytokine (nach Janeway et al. [43])

Zusätzlich zu diesen lokalen Effekten wirken vor allem IL-1 und IL-6 auch systemisch auf den betroffenen Organismus ein. Beide Zytokine können im Hypothalamus Fieber induzieren, wodurch das Wachstum vieler Keime behindert wird.

Eine zentrale Rolle bei der systemischen Bekämpfung von Entzündungen besitzt die Leber. Durch den Stimulus von IL-6 werden von diesem Organ aus so genannte *Akute-Phase-Proteine* in den Kreislauf abgegeben. Zu dieser inhomogenen Gruppe zählen unter anderem das Serum-Amyloid-Protein, Fibrinogen, das Mannose bindende Protein, IL-1 Rezeptoragonisten, LPS bindendes Protein, lösliches CD14 und das *C-reaktive Protein* (CRP). Sie unterstützen und stabilisieren die unspezifische Körperabwehr in den Bereichen Gerinnung, Komplementsystem und antiinflammatorische Mechanismen. Das von dieser Gruppe am besten untersuchte Protein ist das CRP. Es bindet Phosphorylcholin in einer Konformation, wie es nur bei Bakterien und Pilzen vorkommt, und startet mit dieser Opsonisierung den klassischen Weg des Komplementsystems [43].

Die proinflammatorischen Wirkungsmechanismen von  $\text{TNF}\alpha$  werden unter 2.5 noch genauer beschrieben.

### 2.3.4 Antiinflammatorische Mechanismen

Um eine Überreaktion proinflammatorischer Zytokine zu vermeiden, versucht der Organismus dieser mit verschiedenen antiinflammatorischen Mechanismen entgegenzuwirken. Dabei können grundsätzlich drei verschiedene Prinzipien unterschieden werden: antiinflammatorische Zytokine, lösliche Rezeptoren und Neurotransmitter.

Im Entzündungsgeschehen aktivierte CD4-positive T-Zellen können zwei grundlegend gegensätzliche Muster an Zytokinen sezernieren. Die proinflammatorischen Zytokine wie  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{INF}\gamma$  oder IL-2 werden durch  $\text{T}_{\text{H}1}$  Zellen produziert und induzieren eine vorrangig zelluläre Immunantwort. Die antiinflammatorischen Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 werden von  $\text{T}_{\text{H}2}$  Zellen gebildet und induzieren eine verstärkt humorale Immunität [44]. Obwohl bei der Sepsis stets das proinflammatorische Zytokinmuster der  $\text{T}_{\text{H}1}$ -Zellen überwiegt, stehen sich beide Subpopulationen immer in einem gewissen Verhältnis gegenüber, so dass auch bei dieser Krankheit antiinflammatorische Zytokine von  $\text{T}_{\text{H}2}$ -Zellen sezerniert werden [45]. Wann welche der beiden T-Zellsubpopulationen wie stark aktiviert wird, ist nicht vollständig geklärt. Es gibt Hinweise darauf, dass dies unter anderem von der Art des Pathogens und dem Ort der Entzündung abhängig ist [46].

Die Wirkung von IL-4 und IL-10, welche eine Unterdrückung der  $\text{T}_{\text{H}1}$ -Antwort zur Folge haben, basiert auf der Niederregulierung von IL-12 in Makrophagen. Dabei wird vor allem durch IL-10 der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B bei seiner Translokation in den Zellkern gehemmt [47]. Als Folge davon wird in Makrophagen die Synthese der Zytokine  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 und *macrophage inflammatory protein* (MIP)-1 $\alpha$  blockiert [45]. Gleichzeitig wird die vorhandene mRNA, welche für proinflammatorische Zytokine kodiert, abgebaut [48]. IL-10 verhindert ebenso eine weitere Expression von  $\text{TNF}\alpha$ -Rezeptoren an der Zelloberfläche und bewirkt eine verstärkte enzymatische Abspaltung der membrangebundenen Moleküle zu löslichen Rezeptoren, welche wiederum lösliches  $\text{TNF}\alpha$  binden und somit neutralisieren [49].

IL-6 besitzt beides, sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften. Wie bereits beschrieben, induziert systemisch auftretendes IL-6 die Sekretion Akuter-Phase-Proteine, welche teilweise antiinflammatorische Eigenschaften besitzen. Eines von ihnen, lösliches CD14, neutralisiert zusammen mit dem LPS-bindenden Protein freies LPS, so dass dieses nicht mehr in der Lage ist, den TLR4 zu aktivieren. Ein anderes, Interleukin-1-Rezeptor-Agonist hemmt kompetitiv den IL-1 Rezeptor und verhindert somit seine Aktivierung [50]. Des Weiteren

vermindert IL-6 die Synthese von  $\text{TNF}\alpha$  und IL-1, hemmt die Synthese von  $\text{INF}\gamma$ , dem *Granulozyten/Makrophagen stimulierenden Faktor* (GM-CSF) und MIP-2 und induziert dabei gleichzeitig die Synthese von Glukokortikoiden [45].

IL-11 ist ebenfalls in der Lage, die IL-1- und  $\text{TNF}\alpha$ -Synthese zu verhindern. Um dies zu erreichen, steigert IL-11 die Synthese des NF- $\kappa$ B Inhibitors in Makrophagen, welches wiederum das aktive NF- $\kappa$ B bindet und somit seine Translokation in den Zellkern blockiert [51]. Darüber hinaus kann IL-11 CD4 positive T-Zellen in ihrer  $\text{INF}\gamma$  und IL-2 Produktion hemmen und induziert gleichzeitig die Produktion von IL-4 [52], unterstützt somit also eine  $T_H2$  Antwort.

IL-13 bindet an denselben Rezeptor wie IL-4, den IL-4 Rezeptor Typ1, und besitzt dementsprechend die gleichen inhibitorischen Eigenschaften auf die Synthesehemmung von  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 und MIP-1 $\alpha$ . Dabei hat IL-13 allerdings im Gegensatz zu IL-4 keinerlei Effekte auf  $T_H2$ -Zellen [53, 54].

Eine zweite funktionelle Gruppe von antiinflammatorischen Proteinen sind lösliche Rezeptoren für proinflammatorische Zytokine. Durch die Bindung des Zytokins an seinen löslichen Rezeptor wird es in seiner Wirkung neutralisiert. Lösliche Rezeptoren sind für IL-1,  $\text{TNF}\alpha$  und IL-18 beschrieben [45].

Ein dritter antiinflammatorischer Mechanismus ist die Wirkung des vegetativen Nervensystems und seiner Neurotransmitter. Der durch IL-1 und  $\text{TNF}\alpha$  stimulierte Hypothalamus sezerniert das *Corticotrope Releasing Hormon* (CRH), welches im Hypophysenvorderlappen die Ausschüttung des *adrenocorticotropen Hormons* (ACTH) bewirkt. ACTH gelangt über den Kreislauf zum Nebennierenmark und stimuliert dort die Freisetzung von Corticosteroiden und Adrenalin. Adrenalin bindet unter anderem an  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren, verringert somit die Produktion von  $\text{TNF}\alpha$  und NO und erhöht gleichzeitig diejenige von IL-8 und IL-10 [55, 56].

Ein weiterer im Gehirn gebildeter antiinflammatorischer Neurotransmitter ist das  *$\alpha$ -Melanozyten stimulierende Hormon*. Sein genauer Wirkmechanismus ist noch unklar, dennoch reduziert es systemisch die Produktion proinflammatorischer Zytokine [57]. Zwei kleinere Neuropeptide, welche ebenfalls antiinflammatorische Eigenschaften besitzen, sind das *Vasoaktive intestinale Peptid* und das *Aktivierende Peptid der Hypophysenadenylatcyclase* [58, 59].

Ein dagegen eher gut untersuchter Mechanismus ist die antiinflammatorische Wirkung des Neurotransmitters Acetylcholin. Es bindet an die  $\alpha 7$ -Untereinheit von nicotinerger Rezeptoren auf Makrophagen und blockiert dadurch die Produktion von  $\text{TNF}\alpha$  und HMGB1 [60, 61].

## 2.4 Diagnostische Parameter der Sepsis

Nach wie vor ist in vielen Fällen eine eindeutige Sepsisdiagnostik schwierig. Zwar sind die klinischen und labortechnischen Parameter für die Sepsis, wie unter 2.1 erläutert, relativ klar definiert, dennoch treffen viele dieser Kriterien auch auf nicht infektiöse Entzündungen zu. Der Nachweis von Pathogenen im Blutkreislauf dauert oft mehrere Tage und ist nur in ca. 25-30 % aller Fälle wirklich aussagekräftig. Deshalb ist man seit längerer Zeit schon auf der Suche nach löslichen Biomarkern in Serum oder Plasma, die schnell und zuverlässig eine eindeutige Diagnostik ermöglichen. Bis jetzt erfüllt keiner der publizierten Faktoren all diese Voraussetzungen, dennoch haben einige der im Folgenden beschriebenen Parameter Einzug in den klinischen Alltag der Humanmedizin gefunden und liefern wertvolle Anhaltspunkte, um so ein spezifischeres Gesamtbild einer Entzündungsreaktion zu erhalten.

Das bereits unter 2.3.3 beschriebene Akute-Phase-Protein CRP ist das am häufigsten verwendete diagnostische Hilfsmittel. Zwar ist dieses Protein im Rahmen jeder entzündlichen Reaktion oder jedes Traumas hoch reguliert und damit als Sepsismarker viel zu unspezifisch, dennoch lassen die Höhe des Serumspiegels und sein zeitlicher Verlauf teilweise Rückschlüsse auf die Schwere der verursachenden Noxe zu [62].

Ein weiterer Parameter, welcher standardmäßig in klinischen Tests bestimmt werden kann, ist Procalcitonin (PCT). PCT gilt als sehr spezifisch für eine bakterielle Sepsis [63], ist aber bei anderen Sepsisursachen, wie z.B. bei Viren nicht erhöht. Zudem ist PCT stets nach Operationen, Polytraumen, Hitzeschocks, bei Neugeborenen oder nach einem multiplen Organversagen erhöht [64]. In klinischen Studien wurde gezeigt, dass PCT deshalb vor allem bei Fällen von schwerer Sepsis oder septischen Schocks aussagekräftig ist, kaum jedoch bei normaler Sepsis [65]. In diesen schweren Fällen korreliert PCT zudem mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung [66].

Darüber hinaus wird momentan eine Vielzahl von Faktoren klinisch validiert, bei denen *in vitro* bzw. im Mausmodell eine Korrelation zwischen deren Serumspiegel und dem Auftreten einer Sepsis festgestellt wurde. Zu ihnen zählen unter anderem der lösliche *Triggering Receptor Expression on Myeloid Cells* (TREM)-1 [67], der hochaffine Fc $\gamma$ -Rezeptor CD64 auf neutrophilen Granulozyten [68], der *Vascular Endothelial Groth Factor* [69] oder das Hormon Follistatin [70].

## 2.5 Tumor-Nekrose-Faktor alpha

### 2.5.1 Allgemeines

Bereits im späten 19. Jahrhundert wurde zum ersten Mal die Wirkung des Tumor-Nekrose-Faktor alpha ( $TNF\alpha$ ) beschrieben. Der New Yorker Arzt William Coley injizierte bakterielle Toxine in menschliche Tumore und beobachtete Nekrosen im betreffenden Gewebe [71]. Er bezeichnete diesen Stoff als Coley's Toxin und vermutete ihn unter den bakteriellen Toxinen. 1985 konnte ein Faktor im Serum von endotoxinbehandelten Kaninchen identifiziert werden, welcher für die hämorrhagische Nekrotisierung von Tumoren verantwortlich war [72]. Von dieser Beobachtung aus leitete sich der Name des Proteins ab.

$TNF\alpha$  wird als 26 kDa Protein synthetisiert und anschließend als Homotrimer auf der Zellmembran exprimiert. Seine lösliche Form von 17 kDa entsteht durch enzymatische Abspaltung mit Hilfe einer Metalloproteinase, dem *TNF $\alpha$ -converting enzyme* (TACE). Eine Vielzahl verschiedener Zellen sind in der Lage,  $TNF\alpha$  zu exprimieren, dennoch sind mengenmäßig vor allem die Zellen des Immunsystems und hier vor allem Makrophagen und CD4 positive  $T_{H1}$  Zellen von Bedeutung. Biologische Aktivität besitzt sowohl das membrangebundene als auch das lösliche Protein nur als Trimer [73].

Das canine  $TNF\alpha$  wurde erstmals 1994 beschrieben [74]. Seine Sequenz zeigt im Bereich des löslichen Proteins 91,1 % Übereinstimmung zum humanen, 76,6 % zum murinen und 92,4 % zum felines Homolog (s. Abb. 2.7).

Hund	M	S	T	E	S	M	I	R	D	V	E	L	A	E	E	P	L	P	K	K	A	G	G	P	P	G	S	R	R	C	F	C	L	S	L	F	S	F	L	L	V	A	G	A	T	T	L	F	C	L
Mensch	M	S	T	E	S	M	I	R	D	V	E	L	A	E	E	A	L	P	K	K	T	G	G	P	Q	Q	S	R	R	C	L	F	L	S	L	F	S	F	L	I	V	A	G	A	T	T	L	F	C	L
Maus	M	S	T	E	S	M	I	R	D	V	E	L	A	E	E	A	L	P	K	M	G	G	F	Q	N	S	R	R	C	L	C	L	S	L	F	S	F	L	L	V	A	G	A	T	T	L	F	C	L	
Katze	M	S	T	E	S	M	I	R	D	V	E	L	A	E	E	A	L	P	K	K	A	G	G	P	Q	G	S	G	R	C	L	C	L	S	L	F	S	F	L	L	V	A	G	A	T	T	L	F	C	L
Hund	L	H	F	G	V	I	G	P	P	E	E	E	-	L	P	N	C	L	Q	L	I	S	P	L	A	Q	T	V	-	-	K	S	S	S	R	T	P	S	D	K	P	V	A	H	V	V	A	N	P	E
Mensch	L	H	F	G	V	I	G	P	Q	R	E	E	-	F	P	R	D	L	S	L	I	S	P	L	A	Q	A	V	-	-	R	S	S	S	R	T	P	S	D	K	P	V	A	H	V	V	A	N	P	Q
Maus	L	M	F	G	V	I	G	P	Q	R	D	E	K	F	P	M	G	L	P	L	I	S	S	M	A	Q	T	L	T	L	R	S	S	S	Q	N	S	S	D	K	P	V	A	H	V	V	A	N	H	Q
Katze	L	H	F	G	V	I	G	P	Q	R	E	E	-	L	P	H	G	L	Q	L	I	N	P	L	P	Q	T	L	-	-	R	S	S	S	R	T	P	S	D	K	P	V	A	H	V	V	A	N	P	E
Hund	A	E	G	Q	L	Q	W	L	S	R	R	A	N	D	L	L	A	N	D	V	E	L	T	D	N	Q	L	I	V	P	S	D	G	L	Y	L	D	S	S	Q	V	L	F	K	Q	G	C	P	S	
Mensch	A	E	G	Q	L	Q	W	L	N	R	R	A	N	A	L	L	A	N	G	V	E	L	R	D	N	Q	L	V	V	P	S	E	G	L	Y	L	I	Y	S	Q	V	L	F	K	Q	G	C	P	S	
Maus	V	E	E	Q	L	E	W	L	S	Q	R	A	N	A	L	L	A	N	G	M	D	L	K	D	N	Q	L	V	V	P	A	D	G	L	Y	L	V	Y	S	Q	V	L	F	K	Q	G	C	P	D	
Katze	A	E	G	Q	L	Q	R	L	S	R	R	A	N	A	L	L	A	N	G	V	E	L	T	D	N	Q	L	K	V	P	S	D	G	L	Y	L	I	Y	S	Q	V	L	F	T	G	Q	G	C	P	S
Hund	T	H	V	L	L	T	H	T	I	S	R	F	A	V	S	Y	Q	T	K	V	N	L	L	S	A	I	K	S	P	C	Q	R	E	T	P	E	G	A	E	A	K	P	W	Y	E	P	I	Y	L	G
Mensch	T	H	V	L	L	T	H	T	I	S	R	I	A	V	S	Y	Q	T	K	V	N	L	L	S	A	I	K	S	P	C	Q	R	E	T	P	E	G	A	E	A	K	P	W	Y	E	P	I	Y	L	G
Maus	-	Y	V	L	L	T	H	T	V	S	R	F	A	I	S	Y	Q	E	K	V	N	L	L	S	A	V	K	S	P	C	P	K	D	T	P	E	G	A	E	L	K	P	W	Y	E	P	I	Y	L	G
Katze	T	H	V	L	L	T	H	A	I	S	R	F	A	V	S	Y	Q	T	K	V	N	L	L	S	A	I	K	S	P	C	Q	R	E	T	P	E	G	A	E	A	K	P	W	Y	E	P	I	Y	L	G
Hund	G	V	F	Q	L	E	K	G	D	R	L	S	A	E	I	N	L	P	M	Y	L	D	F	A	E	S	G	Q	V	Y	F	G	I	A	L	.														
Mensch	G	V	F	Q	L	E	K	G	D	R	L	S	A	E	I	N	R	P	D	Y	L	D	F	A	E	S	G	Q	V	Y	F	G	I	A	L	.														
Maus	G	V	F	Q	L	E	K	G	D	Q	L	S	A	E	V	N	L	P	K	Y	L	D	F	A	E	S	G	Q	V	Y	F	G	V	I	A	L	.													
Katze	G	V	F	Q	L	E	K	G	D	R	L	S	T	E	I	N	L	P	A	Y	L	D	F	A	E	S	G	Q	V	Y	F	G	I	A	L	.														

Abb. 2.7: Proteinsequenzhomologie von  $TNF\alpha$  zwischen Hund, Mensch, Maus und Katze

## 2.5.2 Rezeptoren

Für TNF $\alpha$  sind zwei Rezeptoren beschrieben: TNF $\alpha$ -Rezeptor Typ 1 (TNFR1, p60, p55 oder CD120a) und TNF $\alpha$ -Rezeptor Typ 2 (TNFR2, p80, p75 oder CD120b). Beide Rezeptoren sind transmembrane Glykoproteine mit extrazytoplasmatischen N-Terminus und besitzen eine sehr hohe Affinität zu ihrem Liganden. Sie sind mit stark unterschiedlicher Frequenz auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Rezeptor Typ1 und Typ2 gleichen einander stark in ihrem Extrazellular- und Transmembrananteil, allerdings besitzt nur der Rezeptor vom Typ1 intrazellulär eine so genannte Todesdomäne [75].

Über diese Domäne werden die proinflammatorischen Signale, aber auch Apoptose-Signale ins Zellinnere vermittelt. Zur Aktivierung des TNFR1 bindet ein TNF $\alpha$ -Trimer an den ebenso trimerisierten Rezeptor. Dabei löst sich im Zellinneren ein inhibitorisches Molekül von der Todesdomäne ab, das so genannte *Silencer of Death Domains* (SODD) Protein. Die nun freiliegende Domäne wird von dem Adapterprotein *TNF Receptor-Associated Death Domain* (TRADD) erkannt und gebunden. Im Folgenden werden von dem so aktivierten Protein TRADD weitere Hilfsproteine gebunden und aktiviert. Unter ihnen sind das *Receptor-Interacting-Protein* (RIP), der *TNF-R-Associated Factor 2* (TRAF2) und die *Fas-Associated Death Domain* (FADD). Das letztgenannte initiiert unter bestimmten Bedingungen eine Protease-Kaskade über Caspase 8, welche zur Apoptose der Zelle führt [76]. TRAF2 und RIP dagegen aktivieren zusammen zwei verschiedene Signalwege. Wie in Abb. 2.8 dargestellt, wird dabei zum einen über die *NF- $\kappa$ B-Inducing Kinase* (NIK) der I $\kappa$ k-Komplex gebildet und somit eine Kaskade gestartet, an deren Ende die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B steht (s. auch 2.3.2). Die Folge davon ist eine verstärkte Synthese verschiedenster proinflammatorischer Zytokine. Zum anderen wird die so genannte *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAP-Kinase) Kaskade gestartet. Diese besteht aus jeweils drei Kinasen, welche sich nacheinander durch Phosphorylierung aktivieren. Die erste ist die MAP-Kinase-Kinase-Kinase, welche die MAP-Kinase-Kinase aktiviert, welche wiederum die MAP-Kinase (MAPK) aktiviert. Der Begriff MAPK ist ein Sammelbegriff für verschiedene Kinase-Kaskaden, welche alle nach dem gleichen Schema verlaufen. Die zwei wichtigsten durch TRAF2 und RIP parallel initiierten sind die *Extracellular Signal-Regulated Kinase* (MEKK1) und die *Apoptosis-Stimulated Kinase 1* (ASK1). Beide MAPK-Wege führen über die JNK-Kinase zur Aktivierung der JNK Kaskade, an deren Ende wie unter 2.3.2 beschrieben die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP1 steht. Zudem wird ein weiterer Faktor mit der Bezeichnung p38

aktiviert, welcher über noch nicht genau bekannte Mechanismen die TNF $\alpha$  Synthese steigert und gleichzeitig die Zelle vor Apoptose schützt [77, 78].

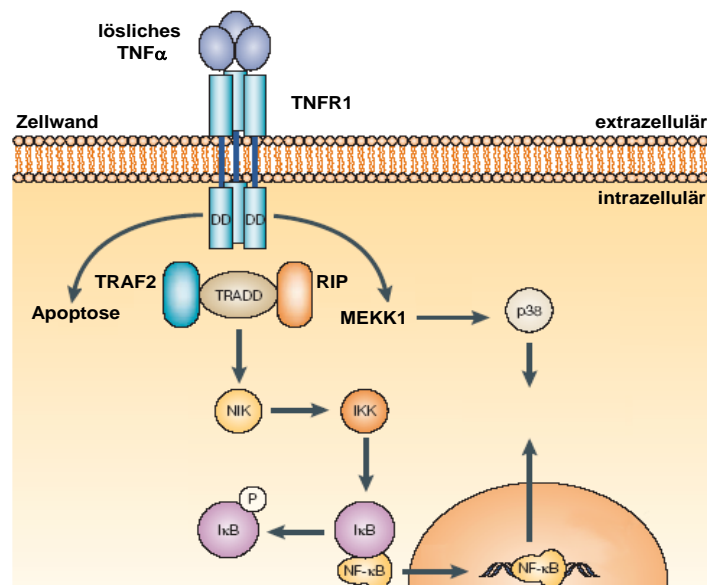


Abb. 2.8: TNFR1 Signaltransduktionswege in der Übersicht (nach Palladino et al. [75])

Der TNFR2 weist zwar intrazellulär keine Todesdomäne auf, besitzt aber dennoch funktionelle Eigenschaften. Wie bereits erwähnt, besitzt auch der TNFR2 eine sehr hohe Affinität zu seinem Liganden. Während jedoch die Bindung an TNFR1 als nahezu irreversibel zu betrachten ist, ist bei TNFR2 die on-off-Kinetik sehr hoch. Wegen dieser Eigenschaft wurde längere Zeit vermutet, dass es sich bei TNFR2 um einen Ligandentransporter auf der Zelloberfläche für TNFR1 handelt [75]. Heute ist allerdings bekannt, dass über den TNFR2 je nach Umgebung auch direkt Proliferation oder Apoptose bei T-Zellen induziert werden [79].

### 2.5.3 Wirkung

TNF $\alpha$  ist an mehreren pathologischen Vorgängen im Organismus beteiligt und gilt deshalb als multifunktionaler biologischer Faktor. Sein Mitwirken ist nicht nur bei akuten Entzündungsreaktionen wie der Sepsis, sondern auch bei chronischen Prozessen wie Krebs, Osteoporose, Multipler Sklerose, Rheumatoider Arthritis und chronischen Darmentzündungen beschrieben [76]. Darüber hinaus kann TNF $\alpha$  in den Energie- und Fettstoffwechsel eingreifen

und je nach Voraussetzung sowohl Kachexie als auch Fettleibigkeit bewirken [80]. Im Folgenden soll allgemein die Wirkung von  $\text{TNF}\alpha$  bei akuten und chronischen Entzündungen lokal und systemisch betrachtet werden.

### **Akute lokale Entzündung**

Bei lokalen Entzündungen übernimmt  $\text{TNF}\alpha$  eine Art Initiatorrolle des angeborenen Immunsystems. Nach Keimeintritt und Aktivierung zytokinproduzierender Zellen, wie unter 2.3.1 beschrieben, wird es sezerniert und wirkt sofort auf die lokalen Gefäßendothelien. Diese werden dadurch angeregt, verschiedene Zelladhäsionsmoleküle auf ihrer luminalen Seite zu exprimieren. Zu ihnen zählen die bereits erwähnten Selektine, Intergrine und verschiedene Mitglieder der Immunglobulinsuperfamilie. Diese Moleküle ermöglichen es den Leukozyten im Blutstrom sich ganz gezielt in der Nähe der Entzündung zu sammeln. Darüber hinaus bewirkt  $\text{TNF}\alpha$  eine Permeabilisierung der Gefäßwände, wodurch die gebundenen Leukozyten und eine Reihe anderer Proteine wie Immunglobuline und Komplementfaktoren ins betroffene Gewebe auswandern können [81]. Durch den Einfluss von  $\text{TNF}\alpha$  werden neben den Adhäsionsmolekülen auch Gerinnungsfaktoren auf der Endotheloberfläche exprimiert. Zentraler Faktor hierfür ist der *Tissue Factor* (TF). An ihn bindet der Faktor VII und startet somit die extrinsische Gerinnungskaskade [82]. Ziel dieser lokalen Gerinnung ist es, ein Abwandern der Pathogene über den Kreislauf in den gesamten Organismus zu verhindern. Gleichzeitig wird dadurch erreicht, dass die über die permeablen Gefäße ausgetretene Flüssigkeit in Form von Lymphe zum nächsten Lymphknoten abfließen muss. Hierbei werden nicht nur Lymphe, sondern auch Antigen präsentierende Zellen wie Makrophagen und dendritische Zellen in die regionären Lymphknoten abtransportiert. Die Folge hiervon ist eine Aktivierung des erworbenen Immunsystems.

Gleichgültig ob bei lokalen oder systemischen Entzündungen:  $\text{TNF}\alpha$  ist stets in der Lage, andere Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems zur weiteren Zytokinsekretion anzuregen und phagozytierende Zellen zu aktivieren [83].

### **Akute systemische Entzündung**

Die bedeutende Rolle von  $\text{TNF}\alpha$  bei akut systemischen inflammatorischen Reaktionen wie bei der Sepsis wurde schon Mitte der 80er Jahre erkannt. Es wurde ein direkter Zusammenhang zwischen der Höhe des  $\text{TNF}\alpha$ -Spiegels und der Überlebensrate von Patienten mit schwerer



Sepsis beobachtet [84]. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die bekannten klinischen Symptome und Organläsionen der Sepsis auch durch die Verabreichung von rekombinantem TNF $\alpha$  erzielt werden können [85, 86]. Des Weiteren konnte durch eine Blockade von TNF $\alpha$  kurz vor oder mit der Verabreichung von LPS die klassische Symptomatik der Endotoxinämie unterdrückt werden [87, 88]. Dies alles führte zu der Erkenntnis, dass es sich bei TNF $\alpha$  um einen der zentralen Faktoren in der Entstehung von akuten Entzündungsreaktionen handelt.

Zu den beschriebenen lokalen Effekten am Ort der Primärinfektion kommen bei systemischem Auftreten des Zytokins weitere Effekte hinzu. So induziert TNF $\alpha$  Fieber im Hypothalamus, rekrutiert weitere neutrophile Granulozyten aus dem Knochenmark, bewirkt eine allgemeine Energiemobilisierung aus Fett- und Muskelzellen und stimuliert dendritische Zellen auf ihrem Weg zum Lymphknoten zur Migration und weiteren Ausdifferenzierung. Die größte Gefahr für den Organismus besteht allerdings in der systemischen Aktivierung des Gerinnungssystems. Was lokal äußerst wirksam und hilfreich funktioniert, führt bei gleichzeitiger Aktivierung im gesamten Organismus schnell zum Verbrauch wichtiger Gerinnungsfaktoren, ein Vorgang, der allgemein als *Dissiminierte Intravasale Koagulation* (DIC) bezeichnet wird. Einerseits können die bei der DIC entstehenden Mikrothromben Gefäßverschlüsse und damit Mikroinfarkte hervorrufen. Am stärksten sind davon Nieren und Lungen betroffen, was zu einer enormen Beeinträchtigung der Organleistung führen kann. Andererseits kann es bei einer DIC aufgrund der verbrauchten Gerinnungsfaktoren zum kompletten Ausfall des Gerinnungssystems kommen, wodurch bereits kleine Blutungen nicht mehr ausreichend gestillt werden können. Im schlimmsten Fall führt dies zum Absinken des Blutdrucks und zur Minderdurchblutung der Organe mit drohendem Organversagen. Können ein oder mehrere Organe ihre Funktion nicht mehr erfüllen, führt dies unweigerlich zum Tod [82].

Die Hoffnung, durch eine Blockade von TNF $\alpha$  bei klinisch an Sepsis erkrankten Patienten die Überlebensrate verbessern zu können, zerschlug sich allerdings schnell. Große klinische Studien zeigten, dass durch die Verabreichung von monoklonalen Antikörpern oder löslichen TNF $\alpha$ -Rezeptoren kein Effekt erzielt werden konnte [89-91]. Die Antwort dafür liegt in der Serumkinetik von TNF $\alpha$ . Bei akuten Entzündungen - unabhängig davon, ob lokal oder systemisch - ist TNF $\alpha$  das Zytokin, welches am schnellsten hochreguliert wird (s. auch Abb. 2.12). Erste Serumspiegel können bei einer Endotoxinämie oder bei einer Sepsis bereits nach 5 Minuten gemessen werden, die höchste Konzentration ist nach ca. 90 Minuten erreicht und nach

ca. 5 bis 6 Stunden sinkt der Serumspiegel meist wieder unter den messbaren Bereich [18, 19, 92]. Im Vergleich zu den anderen bedeutenden proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 $\beta$  und IL-6 ist dies die schnellste Kinetik. Erste klinische Symptome treten allerdings erst 5 bis 8 Stunden nach der Infektion auf, so dass der zur Behandlung vorgestellte Patient bereits keine messbaren TNF $\alpha$ -Serumkonzentrationen aufweist und deshalb auch nicht auf eine Blockade dieses Faktors anspricht.

### **Chronische Entzündung**

In vielen Fällen ist die Ursache einer chronischen inflammatorischen Reaktion kein exogenes Pathogen, sondern häufig eine lokale Autoimmunreaktion. Wie nachgewiesen wurde, sind für den ständigen Entzündungsreiz bei Rheumatoider Arthritis (RA), Diabetes Typ1 und Multipler Sklerose autoreaktive T-Zellen verantwortlich [75, 93, 94]. Sie greifen entweder direkt körpereigene Zellen an und zerstören diese oder aktivieren, wie im Fall von RA und Morbus Crohn, zusätzlich Makrophagen. Diese somit ständig aktivierten Makrophagen sezernieren dauerhaft proinflammatorische Zytokine. Das wichtigste dieser Zytokine ist dabei TNF $\alpha$ . Es wurde bei RA-Patienten in erheblichen Mengen in der Gelenksflüssigkeit nachgewiesen [95]. Auch bei Patienten mit Morbus Crohn oder ulzerativer Colitis konnte man, im Gegensatz zu anderen Darmentzündungen, dieses Zytokin regelmäßig im Serum nachweisen [96]. Aufgrund dieses ständig erhöhten Spiegels an TNF $\alpha$  erwiesen sich diese Krankheiten als optimale Modelle einer anti-TNF $\alpha$  Therapie. Die drei Wirkstoffe Etanercept (lösliches TNFR2-Fc Fusionsprotein), Infliximab (humanisierter Maus-anti-human TNF $\alpha$ -Antikörper) und Adalimumab (humaner anti-human TNF $\alpha$ -Antikörper) erwiesen sich alle in verschiedenen humanmedizinischen Studien als äußerst effektiv in der Behandlung von RA [97, 98]. Sie werden vor allem zur Behandlung von akuten Entzündungsschüben eingesetzt, aber auch zur Langzeitbehandlung in Kombination mit Methotrexate. Als Nebenwirkungen dieser TNF $\alpha$  Antagonisten gelten eine generell erhöhte Infektionsgefahr und ein erhöhtes Herzinfarkttrisiko. Mittlerweile wurden diese Therapeutika auch zur Behandlung von Morbus Crohn zugelassen. Umfangreiche klinische Studien über die Wirksamkeit der Therapeutika bei dieser Krankheit sind im Gange.

## 2.6 High Mobility Group Box1

### 2.6.1 Allgemeines

Das Protein High Mobility Group Box1 (HMGB1) wurde erstmals in den 70er Jahren als High Mobility Group1 (HMG1) beschrieben. Es war Teil einer ganzen Gruppe von Proteinen, welche die Fähigkeit besitzt, an Chromatin zu binden und nicht den Histonen zugeordnet werden kann [99]. Ihre Bezeichnung High Mobility Group (HMG) Proteine erhielten sie auf Grund ihrer hohen elektrophoretischen Mobilität im Polyacrylamidgel [100]. So besitzt HMGB1 z.B. ein rechnerisches Molekulargewicht von ca. 25 kDa, wird allerdings im Polyacrylamidgel als ca. 30 kDa Protein angezeigt. 2001 wurde die Nomenklatur für HMG Proteine neu strukturiert, so dass nun aus HMG1 die Bezeichnung HMGB1 verwendet wurde [101]. Neben seiner löslichen Form existiert auch eine membrangebundene Variante des HMGB1. Sie wurde erstmals 1987 auf Zellen des sich entwickelnden Nervensystems gefunden und als Amphoterin oder p30 bezeichnet [102]. Erst später wurde die Sequenzhomologie zu HMGB1 entdeckt, so dass das membrangebundene HMGB1 heute immer noch häufig als Amphoterin bezeichnet wird [103].

Erstmals 1991 kloniert und in Bakterien exprimiert [104], konnten mit Hilfe des so gewonnenen rekombinanten HMGB1 verschiedene Strukturanalysen durchgeführt werden. Dabei wurden, wie in Abb. 2.9 dargestellt, innerhalb des Proteins zweimal drei große  $\alpha$ -Helices identifiziert, welche als A-Box und B-Box bezeichnet wurden. Beide waren in der Lage, getrennt voneinander an DNA zu binden [105]. Des Weiteren wurden Sequenzabschnitte identifiziert, welche die proinflammatorischen Eigenschaften vermitteln und welche an den *Receptor for Advanced Glycation End Products* binden [106, 107]. Diese Untersuchungen wurden mit rekombinatem HMGB1 von Mensch und Maus durchgeführt.

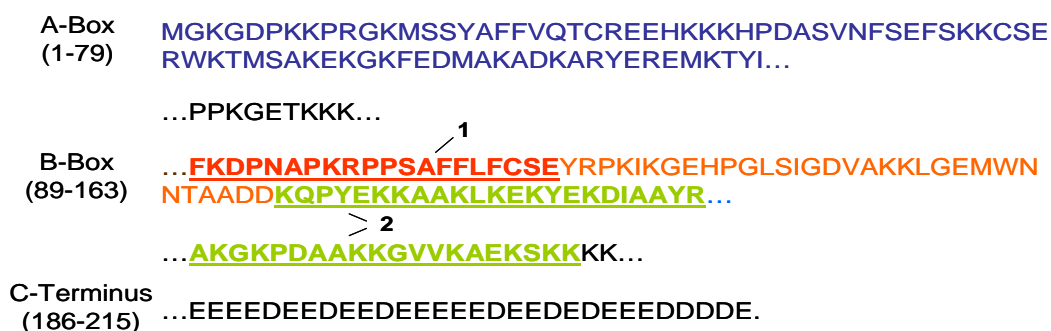


Abb. 2.9: Funktionsanalyse der humanen HMGB1-Proteinsequenz

1 = proinflammatorische Sequenz; 2 = RAGE bindende Sequenz

2004 wurde auch das canine HMGB1-Gen kloniert, sequenziert und näher charakterisiert [108]. Es zeigte sich, dass HMGB1 eine extrem hohe Sequenzhomologie unter den Säugetieren besitzt (s Abb. 2.10). So ist die Proteinsequenz zwischen Hund und Mensch zu 100 % und die zwischen Hund, Maus und Rind zu über 99 % identisch [108]. Auch im Pflanzengenom sind dem HMGB1 entsprechende Proteine entdeckt worden. Dies alles lässt darauf schließen, dass es sich hierbei um ein entwicklungs geschichtlich hoch konserviertes Protein handelt.

Hund	M G K G D P K K P R G K M S S Y A F F V Q T C R E E H K K K H P D A S V N F S E F S K K C
Mensch	M G K G D P K K P R G K M S S Y A F F V Q T C R E E H K K K H P D A S V N F S E F S K K C
Maus	M G K G D P K K P R G K M S S Y A F F V Q T C R E E H K K K H P D A S V N F S E F S K K C
Rind	M G K G D P K K P R G K M S S Y A F F V Q T C R E E H K K K H P D A S V N F S E F S K K C
Hund	S E R W K T M S A K E K G K F E D M A K A D K A R Y E R E M K T Y I P P K G E T K K K F K
Mensch	S E R W K T M S A K E K G K F E D M A K A D K A R Y E R E M K T Y I P P K G E T K K K F K
Maus	S E R W K T M S A K E K G K F E D M A K A D K A R Y E R E M K T Y I P P K G E T K K K F K
Rind	S E R W K T M S A K E K G K F E D M A K A D K A R Y E R E M K T Y I P P K G E T K K K F K
Hund	D P N A P K R P P S A F F L F C S E Y R P K I K G E H P G L S I G D V A K K L G E M W N N
Mensch	D P N A P K R P P S A F F L F C S E Y R P K I K G E H P G L S I G D V A K K L G E M W N N
Maus	D P N A P K R P P S A F F L F C S E Y R P K I K G E H P G L S I G D V A K K L G E M W N N
Rind	D P N A P K R P P S A F F L F C S E Y R P K I K G E H P G L S I G D V A K K L G E M W N N
Hund	T A A D D K Q P Y E K K A A K L K E K Y E K D I A A Y R A K G K P D A A K K G V V K A E K
Mensch	T A A D D K Q P Y E K K A A K L K E K Y E K D I A A Y R A K G K P D A A K K G V V K A E K
Maus	T A A D D K Q P Y E K K A A K L K E K Y E K D I A A Y R A K G K P D A A K K G V V K A E K
Rind	T A A D D K Q P Y E K K A A K L K E K Y E K D I A A Y R A K G K P D A A K K G V V K A E K
Hund	S K K K K E E E E D E E D E E D E E E E E D E E D E E D E E E D D D D E .
Mensch	S K K K K E E E E D E E D E E D E E E E E D E E D E E D E E E D D D D E .
Maus	S K K K K E E E E D E E D E E D E E E E E E E E E E D E E D E E D D D D E .
Rind	S K K K K E E E E D E E D E E D E E E E E D E E D E E E E E E D D D D E .

Abb. 2.10: Proteinsequenzhomologie von HMGB1 zwischen Hund, Mensch, Maus und Rind

HMGB1 findet sich in allen Körperzellen wieder, seine höchste Konzentration ist allerdings in lymphoidem Gewebe nachgewiesen. Auffällig an der Sequenz und der Struktur ist auch die starke Ladungsverteilung innerhalb eines Proteins. So ist der N-Terminus reich an positiv geladenen Lysininen und der C-Terminus, welcher auch oft als saures Ende bezeichnet wird, reich an negativ geladenen Aspartat- und Glutamat-Säuren. Zusätzlich besitzt das Protein kein Signalpeptid, wird aber stark sekundär modifiziert. So sind Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Glykosilierung und ADP-Ribosylierung wichtig für die Konformation, für die metabolische Stabilität und für die DNA-bindenden Eigenschaft des Proteins [109].

## 2.6.2 Rezeptoren

Für HMGB1 sind, wie in Abb. 2.11 dargestellt, verschiedene Rezeptoren beschrieben. Zum einen bindet das Protein an den bereits erwähnten *Receptor for Advanced Glycation End Products*

(RAGE) [110]. RAGE ist ein Multiligandrezeptor, welcher auf Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Nervenzellen, dendritischen Zellen, T-Zellen und Monozyten/Makrophagen exprimiert wird [111, 112]. Seine größte Dichte erreicht RAGE allerdings auf Typ1 Pneumozyten und gilt im Lungengewebe auch als spezifischer Marker für diese Zelle [113]. RAGE bindet eine Vielzahl verschiedener so genannter *Advanced Glycation End Products* (AGEs). Dies sind mehrfach glykosilierte Proteine wie z.B. das Calgranulin Protein S100A12, Amyloid-Fibrillen oder eine Vielzahl von Zucker-Protein-Verbindungen, wie sie bei Diabetes entstehen [111]. Im Vergleich zu diesen Produkten besitzt HMGB1 allerdings eine 7-fach höhere Affinität zu RAGE [114]. Der aktivierte Rezeptor kann zwei verschiedene Signalkaskaden initiieren. Zum einen werden CDC42 und Rac aktiviert und so letztendlich das Wachstum von Nervenzellen reguliert. Diese Form der Aktivierung wurde vor allem durch das membranständige HMGB1 untersucht [103]. Zum anderen wird über Ras eine Vielzahl verschiedener MAP-Kinasen aktiviert (p38, p42/44, ERK1/2 und c-Jun N-terminale Kinase). Diese so initiierten Kinase-Kaskaden münden, wie unter 2.3.2 beschrieben, in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP1 und bewirken unter anderem die Synthese verschiedener proinflammatorischer Zytokine.

Strukturanalysen haben allerdings gezeigt, dass die RAGE-bindende Sequenz und die proinflammatorische Sequenz von HMGB1 nicht übereinstimmen. Auch konnten durch eine Blockierung von RAGE mit Antikörpern die proinflammatorischen Effekte nicht vollständig verhindert werden [107]. Es zeigte sich daraufhin, dass HMGB1 auch an TLR 2 und 4 bindet [115]. Die proinflammatorischen Folgen ihrer Aktivierung wurden bereits unter 2.3.2 erläutert. Darüber hinaus gibt es Anzeichen für die Existenz weiterer noch unbekannter Rezeptoren für HMGB1.

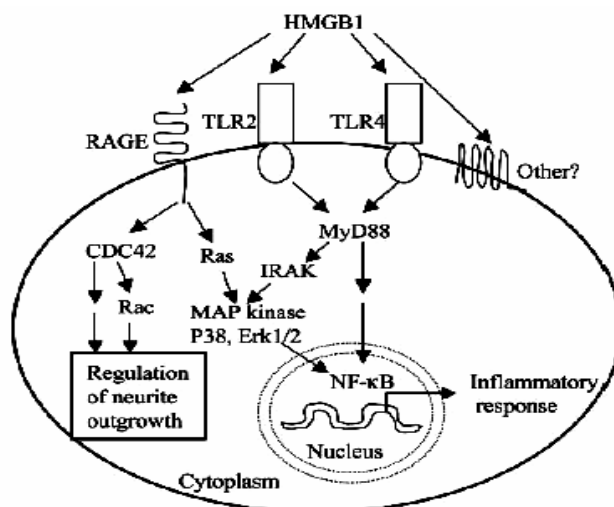


Abb. 2.11: HMGB1 Rezeptoren und deren Signaltransduktion (nach Yang et al. [116])

### 2.6.3 Wirkung

Lange Zeit als reiner Transkriptionsfaktor betrachtet, erweist sich HMGB1 heute durch seine vielfältigen Wirkungen als multifunktionaler biologischer Faktor. Nach aktueller Kenntnis wirkt das Protein demnach auch als proinflammatorisches Zytokin, als Wachstumsfaktor für Nervenzellen, als Anti-Apoptose Faktor, als Aktivator der Gerinnung und als Differenzierungsfaktor für bestimmte Zellen des Immunsystems.

#### HMGB1 als Transkriptionsfaktor

HMGB1 befindet sich in nicht aktivierter Form im Zytosol. In diesem Stadium sind zwei Bereiche des Proteins, die so genannten *Nuclear Localization Signals* (NLS) 1 und 2 (Aminosäuren 28-44 und Aminosäuren 180-185) mehrfach azetyliert. Die Aktivierung erfolgt durch Deazetylierung dieser Bereiche mit anschließender Translokation in den Zellkern. Dort ist HMGB1 im Zusammenwirken mit anderen Faktoren an der Transkriptionsmodulation einer Vielzahl verschiedener Proteine beteiligt. Zu ihnen zählen unter anderem der Steroid-Hormon-Rezeptor, p53, *Homeobox Containing Proteins* und das *Recombining Activating Gene 1/2* (RAG 1/2) [117]. Untersuchungen mit HMGB1-„Knock-Out“-Mäusen haben gezeigt, dass diese Tiere zwar lebend geboren werden, aber innerhalb eines Tages versterben. Der Grund dafür liegt an der Unterexpression des Steroid-Hormon-Rezeptors und einer daraus resultierenden akuten Hypoglykämie. Auch mit ständigen Glukoseinfusionen überleben diese Tiere nur wenige Tage. Sie besitzen keine Fettreserven, sind kleiner und disproportioniert mit überlangen Hinterfüßen und struppigem Fell [118].

Auch in der Tumorforschung sind die DNA-bindenden Eigenschaften von HMGB1 von Interesse. *In vitro* konnte beobachtet werden, dass Tumorzellen nach Oestrogenbehandlung verstärkt HMGB1 synthetisieren. Diese Zellen sind weit empfindlicher gegenüber Cisplatin als die unbehandelten. Es zeigte sich, dass HMGB1 die durch Cisplatin hervorgerufenen DNA-Strangbrüche vor Reparatur schützt und somit eine Cisplatinbehandlung in ihrer Effektivität stark steigert [119]. Des Weiteren wurde festgestellt, dass eine Blockade der Bindung zwischen extrazellulärem HMGB1 und RAGE das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren in Mäusen hemmt [120] [106].

#### HMGB1 als antiapoptotisches Protein und Wachstumsfaktor für Nervenzellen

Bei der Suche nach noch unbekanntem antiapoptotischen Faktoren gegen das Bcl-2-

Familienmitglied Bak wurde HMGB1 als ein solcher Faktor identifiziert. Expressionsstudien in Tumorzellen und Transfektionsstudien mit Bak-Plasmiden mit oder ohne HMGB1-Plasmiden zeigten eindeutig die antiapoptotische Wirkung von HMGB1. Dabei scheint es nicht nötig zu sein, dass HMGB1 einen direkten Kontakt mit den Apoptoseeffektoren eingeht. Neben Bak wurden auch noch weitere proapoptotische Faktoren wie UV-Strahlung, CD95, TRAIL, Caspase 8 und Bax ermittelt, deren Wirkung durch HMGB1 reduziert werden [121].

HMGB1 wird nicht nur als löslicher Faktor synthetisiert, sondern befindet sich auch auf den Zellmembranen von Neuronen und Neuroblastomzellen des sich entwickelnden Gehirns [102]. Dort bewirkt es über eine Bindung an RAGE ein Wachstum der Nervenendigungen [110] dieser Zellen. Zusätzlich soll in der Embryonalphase zellgebundenes HMGB1 als Migrationsfaktor für Nervenzellen dienen.

### **HMGB1 als Aktivator der Gerinnung und Differenzierungsfaktor für Zellen des Immunsystems**

Bei der Bildung von Thrombozyten aus Megakaryozyten wird sowohl HMGB1 als Protein als auch die entsprechende mRNA in das Plasma dieser Zellen mit eingeschlossen. Bei Aktivierung der Blutplättchen wird ein Teil des HMGB1 an der Thrombozytenoberfläche präsentiert. Dieses ist nun in der Lage, andere Thrombozyten über die Bindung von Fibrinogen und Fibrin quer zu vernetzen [122].

Dendritische Zellen (DCs) dagegen sind in der Lage, nach TLR9-Aktivierung lösliches HMGB1 zu sezernieren. Gleichzeitig wird bei diesen Zellen RAGE hochreguliert, so dass ein autokriner Mechanismus entsteht. Die Blockade dieser HMGB1-RAGE-Interaktion verhindert z.B. die Reifung der DCs und ihre Interferon Typ-1 Antwort. Dies zeigt, wie wichtig HMGB1 im Verlauf der DC Reifung ist [112]. Darüber hinaus unterstützt das von DCs sezernierte HMGB1 die T-Zell Antwort. Bei der Präsentation von Antigenen durch die DCs kommt es parallel dazu zu einem positiven Signal in Form von HMGB1 Sekretion. Dieses wird von den T-Zellen zum Überleben, zur klonalen Expansion und zur funktionellen Ausdifferenzierung benötigt [123].

### **HMGB1 als proinflammatorisches Zytokin**

Wie bereits bei der Struktur von HMGB1 beschrieben, befindet sich die proinflammatorische Sequenz von HMGB1 am Beginn der B-Box (Aminosäure 89 bis 108). Deshalb kann auch die B-Box alleine dem Gesamtprotein vergleichbare proinflammatorische Reaktionen bewirken [107].

Dagegen besitzt die A-Box für sich alleine genommen antiinflammatorische Eigenschaften und ist in der Lage, die Wirkungen der B-Box zu neutralisieren [14]. Der genaue Mechanismus und die biologische Funktion dieses neutralisierenden Effekts der A-Box sind allerdings noch unklar.

Intrazelluläres HMGB1 kann entweder passiv oder aktiv sezerniert werden. Passiv gelangt es aus nekrotischen Zellen in die benachbarte Umgebung und ruft dort eine entzündliche Reaktion hervor. Monozyten werden zur TNF $\alpha$ -Sekretion stimuliert und weitere Leukozyten werden zum Ort der Nekrose geleitet [124]. Dies alles sind sinnvolle Mechanismen um einerseits zerstörte Zellen und beschädigtes Bindegewebe zu beseitigen und andererseits durch die Produktion von Wachstumsfaktoren und weiteren Zytokinen einen geordneten Wiederaufbau einzuleiten. Zusätzlich wird vor Ort ein immunologischer Schutz aufgebaut, um eventuell vorhandene Pathogene sofort und effektiv zu bekämpfen [125]. In Apoptose gegangene Zellen setzen im Gegensatz zu nekrotischen Zellen kein HMGB1 frei. Bei diesen Zellen sind die Histone weniger stark azetyliert, was dazu führt, dass das Zytokin fest an die DNA gebunden bleibt. Die große Bedeutung von HMGB1 im Rahmen von nekrotisierenden Entzündungen zeigt sich bei HMGB1-defizienten Zellen, welche nur geringfügige inflammatorische Reaktionen hervorrufen können [124].

Durch seine eigentlich streng intrazelluläre Lokalisation kann demnach passiv sezerniertes HMGB1 aus immunologischer Sicht als nekrotischer Marker oder *Damage-Associated Molecular Pattern* (DAMP) betrachtet werden [117].

Im Vergleich dazu erfolgt die aktive Sekretion von HMGB1 vor allem durch Zellen des Immunsystems. Nach Stimulation durch andere proinflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$  und IL-1 oder durch Endotoxine sezernieren vor allem Monozyten/Makrophagen HMGB1 [126].

Im Gegensatz zu den meisten anderen Zytokinen wird HMGB1 auf diesen ersten Stimulus hin nicht neu synthetisiert. Wie bereits bei den DNA bindenden Eigenschaften gezeigt, wird die Translokation des Moleküls zwischen Zellkern und Zytoplasma über die Azetylierung gesteuert. Bei der proinflammatorischen Aktivierung von Monozyten wird HMGB1 daher verstärkt azetyliert und im Zytosol angesammelt. Anschließend erfolgt die extrazelluläre Sekretion über einen noch nicht genau bekannten Mechanismus in Form von sekretorischen Vesikeln [127]. Durch *in vitro* Stimulation von Makrophagen konnte eine Zunahme der mRNA-Spiegel und damit eine Steigerung der *de novo*-Synthese von HMGB1 nicht eindeutig geklärt werden [128,



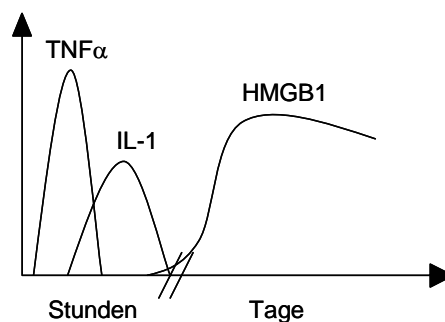
129]. Allerdings müssen aufgrund eines fehlenden Signalpeptids alle neu synthetisierten HMGB1 Moleküle diesen Weg der sekretorischen Vesikel bei aktiver Sekretion beschreiten. Dies ist auch der Grund dafür, dass sich das aktiv sezernierte HMGB1 mit seiner mehrfachen Azetylierung molekular stark von dem der passiven Sekretion unterscheidet. Die funktionellen Konsequenzen daraus sind momentan noch unklar.

Die Wirkung des extrazellulären HMGB1 kann ähnlich wie bei TNF $\alpha$  in lokal chronische und systemisch akute Entzündungsreaktionen unterteilt werden. Eine solche chronische und lokal auf bestimmte Gelenke beschränkte Erkrankung ist die RA. Bei diesen Patienten wurde in der Synovia der betroffenen Gelenke regelmäßig ein erhöhter Spiegel an HMGB1 nachgewiesen. Im Vergleich dazu zeigten Patienten mit Osteoarthritis weit weniger hohe Spiegel, was einen Zusammenhang zwischen Autoimmunität und der Aktivierung von HMGB1 als proinflammatorischer Faktor nahe legt [130]. Eine Blockierung dieses Zytokins bei Mäusen und Ratten mit RA (Kollagen induziert) ermöglichte die erfolgreiche Therapie dieser Erkrankung, was wiederum die Bedeutung von HMGB1 in der Immunpathogenese von RA unterstreicht [131]. Eine weitere chronische Erkrankung, bei der HMGB1 eventuell an der Immunpathogenese beteiligt sein könnte, ist die Arteriosklerose. HMGB1 wurde als sehr potenter chemotaktischer Faktor für glatte Muskelzellen identifiziert, auf dessen Reiz hin diese Zellen vom äußeren Tunika-Bereich bis in die Intima-Region eines Gefäßes wandern können und so die Elastizität des Gefäßes reduzieren [132].

Bei akuten systemischen Entzündungsreaktionen ist HMGB1 vor allem in der Immunpathogenese von Endotoxinämie und Sepsis ein bedeutender proinflammatorischer Faktor. Wie die meisten proinflammatorischen Zytokine bewirkt auch HMGB1 bei diesen Krankheiten eine ständige Aktivierung von Monozyten/Makrophagen, dendritischen Zellen und neutrophilen Granulozyten. Die Folge ist eine ständige Zytokinsynthese und -sekretion. Hierbei wurden vor allem IL-1, IL-1RA, IL-6, IL-8, TNF $\alpha$  und MIP-1, jedoch nicht IL-10 und IL-12 nachgewiesen [133-135]. Ebenso konnte eine verstärkte Expression von Oberflächenadhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1 und RAGE auf Endothelzellen beobachtet werden [136], welche, wie unter 2.3.3 beschrieben, die Auswanderung von Leukozyten aus dem Blutkreislauf ermöglichen. Die klinischen Folgen von systemisch wirkendem HMGB1 sind vielseitig. Im Gehirn induziert es die Synthese proinflammatorischer Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL-1 und IL-6 und bewirkt somit die Entstehung von Fieber, Appetitlosigkeit und Gewichtsverlust [137]. In der Lunge werden ebenfalls lokal weitere Zytokine durch HMGB1 Stimulation sezerniert. Zu ihnen gehören unter

anderem IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und MIP-2. Des Weiteren bewirkt HMGB1 dort eine Akkumulation von neutrophilen Granulozyten und die Bildung von Lungenödemen [138]. Am Herzen kann es durch HMGB1-Wirkung zu Rhythmusstörungen kommen [116]. Auf Enterozytenkulturen bewirkt HMGB1 dagegen eine verstärkte NO-Produktion und erhöht damit deren Permeabilität [139]. Aufgrund seines stark sauer geladenen C-Terminus besitzt das Zytokin eine sehr potente bakterizide Wirkung. *In vitro*-Experimente zeigten, dass verschiedene Kulturen z.B. von *E.coli* binnen weniger Minuten bis zu 95 % zerstört werden konnten [140].

Von besonderem Interesse ist bei der Sepsis und der Endotoxinämie vor allem die Kinetik von HMGB1. Wie in Abb. 2.12 dargestellt, erreichen die meisten anderen bedeutenden proinflammatorischen Zytokine wie TNF $\alpha$  und IL-1 binnen zwei bis vier Stunden nach einer Infektion ihre maximalen Serumspiegel und sinken danach genauso schnell wieder ab. HMGB1 dagegen kann erst nach ca. 18 Stunden im Serum von septischen Mäusen gemessen werden, erreicht seinen Maximalwert nach ca. 24 Stunden und bleibt über mehrere Tage erhöht [141].



**Abb. 2.12: Zytokinkinetik von HMGB1, TNF $\alpha$  und IL-1 in der Sepsis (nach Ulloa et al. [141])**

Damit ist HMGB1 der erste bekannte spät-inflammatorische Faktor bei akuten Entzündungsreaktionen. Diese verzögerte und länger anhaltende Sekretion des Proteins ermöglicht es nun auch zum ersten Mal, einen proinflammatorischen Faktor beim bereits klinisch an Sepsis erkrankten Patienten gezielt zu blockieren. Im Mausmodell konnte durch eine Blockade von HMGB1 mit polyklonalen Antikörpern 24 Stunden nach induzierter abdominaler Sepsis die durchschnittliche Überlebensrate von 28 % auf 72 % gesteigert werden [14]. Während hohe TNF $\alpha$ -Spiegel zu Beginn der Erkrankung eher einen septischen Schock hervorrufen, gilt aufgrund dieser Gesamtkinetik HMGB1 eher als Indikator für eine schwere Sepsis.

Über die prognostische Aussagekraft der Serumkonzentrationen an HMGB1 gibt es allerdings

---

widersprüchliche Angaben. Im Mausmodell starben endotoxämische Mäuse mit einer HMGB1 Serumkonzentration über 100-300 ng/ml. Auch die Injektion von rekombinantem HMGB1 führt meist zum Tod [126]. In humanmedizinischen Studien dagegen wurde gezeigt, dass sowohl hohe Spiegel mit den Überlebensraten als auch mit den Nichtüberlebensraten der Krankheit korrelieren können [126, 142]. Die Ursache dieser widersprüchlichen Aussagen könnte in der Unterschiedlichkeit der Meßmethoden liegen.

### 3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, sensitive Nachweismethoden für die beiden caninen Zytokine TNF $\alpha$  und HMGB1 aufzubauen. Im Rahmen einer klinischen Studie sollte daran anschließend mit Hilfe dieser Testsysteme die Plasmakonzentration der beiden Proteine und deren Kinetik im Verlauf der spontanen caninen Sepsis untersucht werden, um somit mehr über deren Funktion während der Erkrankung zu erfahren.

Dazu wurden im Einzelnen folgende Teilziele angestrebt:

- Klonierung und rekombinante Expression der beiden Zytokine HMGB1 und TNF $\alpha$  sowie deren Rezeptoren RAGE und P60
- Etablierung von zellbasierten Assays zur Bioaktivitätskontrolle der rekombinanten Proteine
- Gewinnung polyklonaler Antikörper gegen TNF $\alpha$  und HMGB1 durch Immunisierung zweier Kaninchen mit dem rekombinanten Protein
- Gewinnung polyklonaler Antikörper gegen spezifische Sequenzen von HMGB1 durch Immunisierung zweier Kaninchen mit zwei unterschiedlichen synthetischen Peptiden
- Aufbau eines hochempfindlichen ELISA zur Messung von caninem Plasma-TNF $\alpha$
- Aufbau eines Western Blots und eines ELISA zur qualitativen und quantitativen Analyse von caninem Plasma-HMGB1
- Messung von TNF $\alpha$  und HMGB1 im Plasma von spontan an Sepsis erkrankten Hunden
- Statistische Auswertung der gemessenen Zytokinwerte
- Erste *in vitro*-Untersuchungen zur Neutralisation von caninem TNF $\alpha$

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Tiere und Tierhaltung

#### Kaninchen

Zur Gewinnung der polyklonalen Antiseren wurden Kaninchen immunisiert, die freundlicherweise vom Institut für Pharmakologie der tierärztlichen Fakultät zur Verfügung gestellt wurden. Die Tiere wurden einzeln in Käfigen gehalten und mit handelsüblichem Alleinfutter und Wasser ad libitum versorgt. Die Genehmigung der Immunisierungen erfolgte unter der Nummer 211-2531.6-14/2001 durch die Regierung von Oberbayern.

### 4.2 Gewinnung von primären Hundeleukozyten

#### Material

##### Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,2

8,0 g	Natriumchlorid (NaCl) <sup>1</sup>
1,45 g	Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O) <sup>1</sup>
0,2 g	Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sup>1</sup>
0,2 g	Kaliumchlorid (KCL) <sup>1</sup>

ad 1000 ml Aqua dest

pH-Wert mit HCl bzw. NaOH auf 7,2 eingestellt, für die Verwendung in der Zellkultur autoklaviert

##### Ficoll-Paque<sup>2</sup>

##### Heparinlösung (500 U/ml)

1 ml	Heparin-Natrium 20.000 <sup>3</sup>
------	-------------------------------------

ad 40 ml RPMI 1640<sup>4</sup>

##### Trypanblau-Lösung<sup>2</sup>

### Gewinnung von peripheren Blutleukozyten (PBL)

Je nach Bedarf wurden 10 oder 20 ml Spritzen mit 0,1 bis 0,2 ml Heparinlösung beschichtet. Die Blutentnahme erfolgte aus der V. jugularis. Maximal 10 ml Blut wurden mit gleichem Volumen an PBS verdünnt und vorsichtig über 20 ml Ficoll-Paque geschichtet. Nach 15-minütiger Dichtezentrifugation bei RT mit 225 xg konnten die an der Interphase befindlichen Leukozyten mit einer Pipette abgenommen und 2-mal mit kaltem PBS durch Zentrifugation bei 4°C und 350 xg (erstes Mal) bzw. 225 xg (zweites Mal) für 10 min gewaschen werden.

Nach einer lebend/tot-Färbung durch Zusatz von Trypanblau (30 µl Zellsuspension mit 30 µl Trypanblau) wurden die Zellen mit Hilfe einer modifizierten Zählkammer nach Neubauer beurteilt und gezählt.

## 4.3 Kultivierung von Zellen

### Zellkulturmedien und Zusätze

Wenn nicht anders aufgeführt, wurden die Medien und Zusätze bei 4°C aufbewahrt.

#### **PBS-EDTA**

**200 mg**      200 mg Ethylendiamintetraacetic Acid Tetra-Natrium Hydrat  
(EDTA)<sup>1</sup>

ad 1l PBS (s. 4.2)

#### **Trypsin/EDTA<sup>4</sup> 1x**

#### **Standardmedium (10 % FBS – 1 % P/S))**

**445 ml**      RPMI 1640 GlutaMaxI<sup>7</sup> (mit 0,532 g/l stabilem Glutamin)<sup>4</sup> (im  
Folgenden RPMI)

**50 ml**      bovines Kälberserum<sup>4</sup> (fetal bovine serum (FBS), 30 min bei  
56°C inaktiviert)

**5 ml**      Penicillin-Streptomycin-Lösung<sup>4</sup> (100 IE/ml Penicillin, 100  
µg/ml Streptomycin)

FBS und Penicillin-Streptomycin in Aliquots bei –20°C lagern

**SL3 Medium**

<b>94 ml</b>	SF900II mit GlutaMaxI <sup>7</sup>
<b>5 ml</b>	bovines Kälberserum <sup>4</sup> (fetal bovine serum ( <i>FBS</i> ), 30 min bei 56°C inaktiviert)
<b>1 ml</b>	Penicillin-Streptomycin-Lösung <sup>4</sup>

**Einfriermedium**

<b>45 ml</b>	FBS <sup>4</sup>
<b>5 ml</b>	Dimethylsulfoxid ( <i>DMSO</i> ) <sup>1</sup>

**LPS Stam mlösung**

<b>10 mg</b>	Lipopolysaccharid ( <i>LPS</i> ) aus <i>E.coli</i> , lyophilisiert <sup>5</sup> ad 10 ml Aqua bidest., in Aliquots von 500 µl bei -20°C lagern
--------------	---

**Verwendete Zelllinien**

<b>Zelllinie</b>	<b>Zellart</b>	<b>Spezies</b>	<b>Medium</b>	<b>Referenz</b>
293-T	Nierenfibroblasten	Mensch	Standard	[143]
CHO	Ovarialzellen	Hamster	Standard	[144]
RAW264.7	Makrophagen	Maus	Standard	[107, 145]
SL3	Embryoblasten	Fruchtfliege	SL3 Medium	[146, 147]
WEHI 164	Fibroblasten	Maus	Standard	[148, 149]

**Tab. 4.1: Verwendete Zelllinien****Herstellung von stimulierten PBL**

Die aus Hundeblood gewonnenen PBL (s. 4.2) wurden nach dem letzten Waschschrift in Standardmedium aufgenommen, nach Auszählung auf eine Zelldichte von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt und in eine Petrischale mit Ø 100 mm gegeben (14 ml Gesamtvolumen). Die so verteilten Zellen wurden anschließend für 24 h mit 1 µg/ml Endkonzentration an Lipopolysaccharid (*LPS*)<sup>5</sup> im Brutschrank stimuliert. Am darauf folgenden Tag wurden Überstand und Zellen abpipettiert, abzentrifugiert (225 xg – 10 min – 4°C) und für die weitere Bearbeitung präpariert.

## **Kultivierung von Zellen**

Die adhärent wachsenden Zelllinien WEHI 164 und CHO wurden mit Trypsin/EDTA<sup>4</sup> von den Kulturflaschen gelöst, 293T-Zellen durch PBS/EDTA-Lösung, RAW264.7 Zellen durch Abschaben und SL3 Zellen durch kräftiges Abklopfen. Die Zellen wurden anschließend mit PBS durch Zentrifugation gewaschen (225 xg – 10 min – 4°C), in Kulturmedium resuspendiert, gezählt und in der gewünschten Dichte erneut ausgesät. Die Inkubation der Zellen erfolgte stets im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>.

## **Einfrieren von Zellen**

Die Zellen wurden gezählt und in einer Zelldichte von ca.  $5 \times 10^6$ /ml Einfriermedium auf dafür geeignete 1,8 ml Kryo-Röhrchen verteilt. Diese wurden in einer Einfrierbox, die zur Hälfte mit Isopropanol gefüllt war, bei -80°C um ca. 1°C/min heruntergekühlt. Bei -80°C können Zellen bis zu einem Jahr gelagert werden. Zur langfristigen Lagerung wurden einige Röhrchen nach ca. 5 Tagen von -80°C in flüssigen Stickstoff verbracht.

## **Auftauen von Zellen**

Zum Auftauen wurden die Zellen im Kryo-Röhrchen in einem 37°C-Wasserbad schnellstmöglich aufgetaut und mit ca. 50 ml RT-warmen Zellkulturmedium gewaschen. Das Zellpellet wurde in 5 bzw. 10 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine Delle einer 6-Loch-Platte bzw. in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche gegeben.

## **4.4 Zellstimulationsassays**

### **4.4.1 Canine PBL**

Nach der Präparation (s.4.2) wurden die Hundeleukozyten in Standardmedium aufgenommen und auf eine Zellzahl von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Die Zellen wurden nun auf eine 24-Loch-Platte verteilt (1 ml/Delle) und für 2-3 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit LPS<sup>1</sup> und rekombinanten Zytokinen für 16 h bzw. 24 h.



#### **4.4.2 RAW 264.7**

Es wurden stets Zellen aus Kulturen verwendet, die höchstens zu 90 % konfluent waren. Die adhärenen Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit Hilfe eines sterilen Zellschabers abgelöst, mit PBS abgespült und abzentrifugiert (225 xg – 10 min – 4°C). Für die Stimulation der Zellen wurden zwei unterschiedlich sensitive Assayvarianten etabliert.

##### **Assayform 1**

Die Zellen wurden in OptiMem-Medium mit GlutaMaxI<sup>7</sup> aufgenommen und auf eine Zellzahl von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurden die Zellen auf eine 24-Loch-Platte verteilt (1 ml/Delle) und für 16 h bzw. 24 h mit LPS bzw. den rekombinanten Zytokinen stimuliert

##### **Assayform 2**

Zur Steigerung der Sensitivität wurden die Zellen in Standardmedium aufgenommen und auf eine Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Die Zellen wurden nun auf eine 24-Loch-Platte verteilt (1 ml/Delle) und für ca. 4-6 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach dieser Zeit wurde der Überstand abgenommen und die nun adhärenen Zellen einmal mit 2 ml OptiMem Medium mit GlutaMaxI<sup>7</sup> vorsichtig gewaschen. Anschließend wurde in jede Delle 1 ml OptiMem-Medium gegeben und die Zellen für 16 h bzw. 24 h mit LPS bzw. den rekombinanten Zytokinen stimuliert.

#### **4.5 WEHI-Bioassay**

Der WEHI-Bioassay basiert auf der murinen Fibrosarkomzelllinie WEHI 164, welche in Anwesenheit von TNF $\alpha$  dosisabhängig mit Zelltod reagiert. Dadurch lässt sich zum einen die Bioaktivität von rekombinantem TNF $\alpha$  belegen, zum anderen ist es möglich, die Konzentration an TNF $\alpha$  in einer Probe zu bestimmen. Zudem können in diesem Assay auch verschiedene Substanzen auf ihre Eigenschaft zur Neutralisation des Zytokins hin überprüft werden. Überlebende Zellen können mit Hilfe des XTT-Assays detektiert werden.

#### **Material**

**ActinomycinD<sup>5</sup>**

**XTT<sup>1</sup>** (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-5-((phenylamino)carbonyl)-2H-tetrazolium Hydroxid)

### **PMS-Lösung**

**1,53 g** N-methyldibenzopyrazin Methylsulfat (PMS)<sup>5</sup>  
ad 1 ml PBS (s. 4.2); lichtgeschützt bei 4°C lagern; ca. 3 Monate haltbar

### **RPMI 1640 Medium<sup>7</sup>**

## **Durchführung WEHI-Assay**

WEHI-Zellen einer konfluenten Zellkulturflasche wurden mit Trypsin/EDTA<sup>4</sup> abgelöst, in PBS gewaschen (Zentrifugation bei 225 xg – 10 min – RT) und in Standardmedium auf eine Zelldichte von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. 100 µl dieser Zellsuspension wurden pro Delle einer sterilen 96-Loch Flachbodenplatte pipettiert und für ca. 3-4 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach dieser Zeit wurden zuerst 50 µl einer ActinomycinD-Lösung von 4 µg/ml (→ Endkonzentration/Delle 1 µg/ml) dazu gegeben. Danach wurden die zu testenden Proben auf einer sterilen 96-Loch Rundbodenplatte log<sub>2</sub> verdünnt und jeweils 50 µl davon auf die WEHI-Zellen gegeben. Als Standard wurde stets rekombinantes humanes TNFα (rhuTNFα) mitgeführt, welches freundlicherweise von Dr. Pascal Schneider (University of Lausanne) zur Verfügung gestellt wurde. Dieser Standard wurde in einer Endkonzentration von 2 ng/ml log<sub>2</sub> über 12 Dellen im Doppelansatz eingesetzt, wobei der lineare Bereich des Assays ungefähr zwischen 1 ng/ml und 30 pg/ml rhuTNFα liegt. Nach 24 h Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte die Detektion noch lebender Zellen mit XTT<sup>1</sup>.

## **Durchführung XTT-Assay**

Pro 96-Loch-Platte wurden 5 mg XTT<sup>1</sup> abgewogen, in 5 ml 37°C warmen RPMI 1640 Medium<sup>7</sup> gelöst und mit 25 µl PMS-Lösung versetzt. 50 µl davon wurden nun in jede Delle des WEHI-Assays gegeben. Anschließend wurde der Assay für weitere 2-3 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Durch mitochondriale Succinat-Dehydrogenasen noch lebender Zellen kam es zur Umwandlung des gelblichen Tetrazoliumsalzes XTT<sup>1</sup> in ein orange-rotes Formazan-Produkt. Zur Quantifizierung dieser Umwandlung wurde der Assay nach Ablauf der Inkubationszeit im Plattenphotometer bei 450 nm gemessen.

## 4.6 RNA Präparation

Alle Arbeiten wurden unter Verwendung von RNAase freiem Einwegmaterial und Handschuhen durchgeführt. Arbeitsgeräte, Arbeitsflächen und Handschuhe wurden weitestgehend mit 10 % SDS-Lösung behandelt. Wiederverwendbare Geräte und Gegenstände wurden nach Benutzung über Nacht mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert und anschließend mit RNAse-freiem Wasser (DEPC-Wasser) gespült oder nach Eintauchen in 96 % Ethanol abgeflammt.

### Material

Wenn nicht anders aufgeführt, wurden die Reagenzien bei RT gelagert.

#### 10 % SDS-Lösung

100 g Natrium-Dodecyl-Sulfat<sup>1</sup>  
ad 1 ml Aqua dest.

#### TRIZOL®-Reagenz<sup>7</sup>

bei 4°C aufbewahren

#### DEPC-Wasser

1 ml Diethylpyrocarbonat (DEPC)<sup>5</sup>  
ad 1l Aqua dest., 1 h bei 37°C inkubieren, danach autoklavieren

#### Chlorophorm ad analysis<sup>6</sup>

#### Isopropanol<sup>6</sup>

#### Ethanol 70 %

70 ml Ethanol reinst<sup>1</sup>  
30 ml DEPC-Wasser

### Prinzip der RNA Präparation

Um Gesamt-RNA aus Zellen zu gewinnen, wurde TRIZOL®-Reagenz, eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidin Isothiocyanat, verwendet. Dadurch wurden die Zellen

zerstört, die Integrität der RNA blieb jedoch erhalten. Durch Zugabe von Chloroform wurde die organische und die wässrige Phase getrennt und die RNA durch Präzipitation der wässrigen Phase gewonnen.

## **Durchführung**

### **PBL**

$5 \times 10^7$  bis  $1 \times 10^8$  PBL (LPS stimuliert: s. 4.3; nicht stimuliert: s. 4.2) wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 4°C mit 225 xg pelletiert und in 1 ml TRIZOL® mit Hilfe einer auf eine Spritze aufgesetzten 20G-Kanüle resuspendiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben, kurz geschüttelt, 2 min bei RT inkubiert und dann 15 min bei 4°C mit 12000 x g zentrifugiert. Die obere, wässrige, RNA-haltige Schicht wurde in ein neues Röhrchen überführt, 500 µl Isopropanol dazupipettiert, kurz geschüttelt, 10 min bei RT, 30 min bei -20°C inkubiert und anschließend 10 min bei 4°C mit 12000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttelt, das Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und nochmals 5 min bei 4°C mit 7500 x g zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde getrocknet, in 100 µl DEPC-Wasser resuspendiert und bei -80°C gelagert. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt und betrug ungefähr 200-500 ng/µl.

### **Lunge**

Die Entnahme von Lungengewebe erfolgte am frisch euthanasierten Hund (Euthanasie wegen Bandscheibenvorfall). Die Proben wurden in kleine quadratische Stücke (max. 0,5cm<sup>3</sup>) zerschnitten, auf Kryo-Röhrchen verteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden sie bis zur RNA-Präparation bei -80°C gelagert. Zur RNA-Isolierung wurden die Organstücke nach Entnahme aus der Gefriertruhe sofort in einem Handhomogenisator<sup>20</sup> unter Zugabe von 1 - 3 ml TRIZOL® homogenisiert und in 1 ml Fraktionen in 2 ml Eppendorfcups überführt. Danach wurde die Gewebeprobe, wie bei der Präparation der PBL beschrieben, weiter aufgearbeitet.

## 4.7 RT-PCR

### 4.7.1 cDNA Synthese

Die in der RNA-Präparation enthaltene messenger-RNA (*mRNA*) wurde durch eine rekombinante reverse Transkriptase in komplementäre DNA (*cDNA*) umgeschrieben, welche daraufhin als Matrize in der Polymerase Ketten Reaktion eingesetzt wurde.

Es wurde ein **RT-PCR System**<sup>8</sup> verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Reaktion wurde am Ende mit Wasser auf ein Volumen von 100 µl gebracht.

### 4.7.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Bei der PCR wird durch eine hitzeresistente DNA Polymerase mit Hilfe von spezifischen Primern und Puffern eine bestimmte cDNA Sequenz amplifiziert. Dabei durchläuft das PCR-Reaktionsgemisch mit Hilfe eines Thermocyclers ein genau definiertes Temperaturprogramm:

Schritt	Temperatur	Zeit	Funktion
1	96°C	15 s (Taq) 2 min (Herculase; Pfu)	Initiale Denaturierung
2	48-65°C (primerspez.)	30 sec	Amplifikations- Zyklus: 34-malige Wiederholung
3	72°C	2 min	
4	96°C	15 s	
5	72°C	10 min	Endamplifikation
6	4°C	-	Lagerungstemperatur

### Material

Alle Substanzen wurden bei -20°C gelagert. Für Klonierungsarbeiten wurde ausschließlich das Herculase® und das Pfu®-Polymerasesystem verwendet.

#### Taq-DNA Polymerase<sup>9</sup>

#### 10xPCR Taq Puffer mit 15 mM MgCl<sub>2</sub><sup>9</sup>

**Herculase® Enhanced DNA Polymerase<sup>7</sup>****10xPCR Herculase® Puffer mit 15 mM MgCl<sub>2</sub><sup>7</sup>****Pfu®-DNA Polymerase<sup>10</sup>****10xPCR Pfu® Puffer mit 15 mM MgCl<sub>2</sub><sup>10</sup>****dNTP 2mM<sup>8</sup>****PCR-Wasser<sup>10</sup>****Primer<sup>11</sup>** (Einsatz in der PCR: 1pmol/μl)

Ziel-sequenz	Primer-Nr. Orientierung	Sequenz (5'→3')	Verwendung
TNF $\alpha$	604 sense	CACCGTCAAATCATCTTCTCGAACC	Klonierung in pET100 <sup>7</sup>
TNF $\alpha$	605 antisense	TCACAGGGCAATGATCCCAAAGTAGAC	Klonierung in pET100 <sup>7</sup>
HMGB1	606 sense	CACCATGGGCAAAGGAGATCCTAAG	Klonierung in pET100 <sup>7</sup>
HMGB1	607 antisense linking PCR FLAG	TTATTCATCATCATCATCTTCTTCTCA TC	Klonierung in pET100 <sup>7</sup> , pcDNA3.1 <sup>7</sup> + pMT/V5 <sup>7</sup>
TNF $\alpha$	640 sense	CTGCAGGTCAAATCATCTTCTCGAACC	Klonierung in pCR3-Flag*
TNF $\alpha$	633 antisense	GAATTCTCACAGGGCAATGATCCCAA GTAGAC	Klonierung in pCR3-Flag*
P60	665 sense	AAGCTTATGGGCCTCCCCACCGTGCCT G	Klonierung in pCR3-huFc* + pMT/V5 <sup>7</sup>
P60	666 antisense	GGATCCGGTGGAGCCTGGGTCCTGG	Klonierung in pCR3-huFc*
HMGB1	717 sense linking PCR FLAG	GACGATGACGATAAAATGGGCAAAGG AGATC	Klonierung in pcDNA3.1 <sup>7</sup> + pMT/V5 <sup>7</sup>
HA-SP FLAG HMGB1	664 sense linking PCR HMGB1	ATGGCTATCATCTACCTCATCCTCCTG	Klonierung in pcDNA3.1 <sup>7</sup> + pMT/V5 <sup>7</sup>
HA-SP FLAG HMGB1	716 antisense linking PCR HMGB1	GATCTCCTTTGCCCATTTTATCGTCATC GTC	Klonierung in pcDNA3.1 <sup>7</sup> + pMT/V5 <sup>7</sup>

RAGE	641 sense RAGE-Fc + linking PCR huFc	GAATTCATGGCAGCAGGGGCGGCAGC GG	Klonierung in pcDNA3.1 <sup>7</sup> + pMT/V5 <sup>7</sup>
RAGE	718 antisense linking PCR huFc	CGGTGGGCATGTGTGAGTTTTAGTTCC CAGCCCCTGCCCT	Klonierung in pcDNA3.1 <sup>7</sup> + pMT/V5 <sup>7</sup>
huFc	719 antisense linking PCR RAGE	AGGGCAGGGGCTGGGAATAAACTC ACACATGCCACCG	Klonierung in pcDNA3.1 <sup>7</sup> + pMT/V5 <sup>7</sup>
huFc	720 antisense P60-Fc + linking PCR RAGE	GAATTCTCATTTACCCGGAGACAGGGA	Klonierung in pcDNA3.1 <sup>7</sup> + pMT/V5 <sup>7</sup>
HMGB1	918 sense	ATGAATTCGCCACCATGGGCAAAGGA G	Klonierung in pMT/V5 <sup>7</sup>
HMGB1- FLAG	919 antisens	ATGAATTCTTATTTATCGTCATCGTCTT TGTAATCTTCATCATCATCATC	Klonierung in pMT/V5 <sup>7</sup> + pET100 <sup>7</sup>

Tab. 4.2: Verwendete Primer

## Durchführung

Ansatz für eine PCR-Reaktion:

<b>2,8 µl</b>	PCR-Wasser <sup>10</sup>
<b>1,5 µl</b>	10xPuffer
<b>1,5 µl</b>	dNTP's 2mM
<b>3 µl</b>	Sense-Primer (Konz. 1pmol/µl)
<b>3 µl</b>	Antisense-Primer (Konz. 1pmol/µl)
<b>0,2 µl</b>	DNA-Polymerase (Endkonzentration 1U)
<b>3 µl</b>	DNA-Matritze

Als DNA-Matritze wurde entweder cDNA oder Plasmid (1:200 bis 1:1000 vorverdünnt) verwendet. Für die Kontrolle von transformierten Bakterienkolonien bzw. für Negativkontrollen wurde als Volumenersatz für die DNA-Matritze PCR-Wasser verwendet.

Für die 2. PCR einer Linking-PCR wurde zuvor die 1. PCR auf einem Agarosegel aufgetragen, gefärbt (s. 4.8) und anschließend die entsprechenden Banden unter UV-Licht ausgeschnitten. Die Aufreinigung der PCR-Produkte aus dem Gel erfolgte mit Hilfe des **PCR clean-up Gel extraction Kit**<sup>13</sup> nach Herstellerangaben. Für die folgende Linking-PCR wurden je 2 µl der

Gelaufreinigungen als Template und 1,8 µl PCR-Wasser eingesetzt.

Die verschiedenen Ansätze wurden im Thermocycler auf die oben beschriebenen Temperaturen automatisch aufgeheizt bzw. abgekühlt und anschließend auf einem Agarosegel analysiert.

#### 4.8 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese kann die Größe von DNA-Stücken bestimmt werden, wie sie z. B. bei der PCR entstehen. Durch Anlegen einer konstanten Spannung werden die Stücke der Länge nach im Gel aufgetrennt und durch Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht sichtbar gemacht. Als Referenzgröße dient ein ebenso aufgetragener und gefärbter Marker.

##### Material

EDTA-Lösung (0,5M, pH8,0)

**186,1 g** Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure (*EDTA*)-Dinatrium-Dihydrat  
( $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \times 2H_2O$ )<sup>1</sup>

**20 g** Natriumhydroxid (NaOH)<sup>6</sup>

ad 700 ml Aqua dest., pH 8,0 mit NaOH einstellen, bei RT lagern

##### 0,5xTBE Puffer

**54 g** Tris(hydroxymethyl)aminomethan<sup>1</sup>

**27,5 g** Borsäure<sup>6</sup>

**20 ml** EDTA-Lösung (0,5M, pH8,0)

ad 10l Aqua dest., bei RT lagern

##### 1 % Agarose

**0,5 g** Agarose<sup>12</sup>

**50 ml** 0,5xTBE Puffer

vor Gebrauch ansetzen

##### 6x Loading Dye Solution (Ladepuffer) <sup>8</sup>

##### GeneRuler™100bp DNA Ladder plus <sup>8</sup>



**Ethidiumbromid-Stammlösung**

**10 mg** Ethidiumbromid<sup>5</sup>

ad 1 ml Aqua dest., bei 4°C lagern

vor Gebrauch wurde die Lösung 1:1000 in Aqua dest. verdünnt

**Durchführung**

Die 1 %-ige Agarose wurde in einem Mikrowellenherd so lange erhitzt, bis sie vollkommen geschmolzen und die Lösung klar war. Anschließend wurde sie auf ca. 50°C abgekühlt und in eine Elektrophoresekammer mit Probenaschenkamm gegossen. Nachdem das Gel vollständig abgekühlt war, konnte der Probenkamm entfernt und das Gel mit 0,5xTBE-Puffer überschichtet werden. Die Proben wurden nun mit dem Ladepuffer vermischt (5 µl PCR-Produkt + 1 µl 6x Loading Dye) und in die Probenaschen pipettiert. Als Referenz wurde eine Probenasche mit Marker befüllt. Danach wurde so lange eine konstante Spannung an der Kammer von 120 V angelegt, bis die Proben ausreichend weit im Gel aufgetrennt wurden. Die beiden Farbstoffe Bromphenolblau und Xylen-Cyanol-FF im Ladepuffer und im Marker wurden dabei als Orientierung verwendet. Zur Sichtbarmachung der aufgetrennten DNA-Fragmente wurde das Gel 30 min lang in einer Ethidiumbromid-Gebrauchslösung geschwenkt und anschließend unter UV-Licht fotografiert.

**4.9 TOPO®-Klonierung und Plasmid Präparation****Material****pET100/D-TOPO® Expression Kit<sup>7</sup>**

Vektorsystem für Expression in Bakterienzellen

mit chemokompetenten TOP10 E-coli und SOC Broth Medium

**pcDNA3.1/V5-His©TOPO® TA Expression Kit<sup>7</sup>**

Vektorsystem für Expression in Säugerzellen

mit chemokompetenten TOP10 E-coli und SOC Broth Medium

**pMT/V5-His©TOPO® TA Expression Kit<sup>7</sup>**

Vektorsystem für Expression in Drosophilazellen

mit chemokompetenten TOP10 *E.coli* und SOC Broth Medium

**LB-Agar**

25 g LB-Agar Pulver<sup>1</sup>

ad 1l Aqua dest.; LB-Agar in 0,5l Flaschen à 250 ml autoklaviert; bei 4°C gelagert

**LB-Medium**

25 g LB-Medium Pulver<sup>1</sup>

ad 1l Aqua dest.; LB-Agar in 0,5l Flaschen autoklaviert; bei 4°C gelagert

**PCR clean-up Gel extraction Kit<sup>13</sup>****Ampicillin 100 mg/ml**

1 g Ampicillin Pulver<sup>1</sup>

ad 10 ml Aqua bidest.; steril filtriert (0,22µm Filter); in 1 ml Portionen auf -20°C gelagert

**NucleoSpin®Plasmid Kit<sup>13</sup>****Durchführung**

Für die Klonierung in Vektorsysteme wurden die PCR-Amplifikate zuvor stets über Agarose-Gelelektrophorese (s. 4.8) aufgetrennt, gefärbt und anschließend die entsprechenden Banden unter UV-Licht ausgeschnitten. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der PCR-Produkte aus dem Gel mit Hilfe des PCR clean-up Gel extraction Kit<sup>13</sup> nach Herstellerangaben.

Die Klonierung der so gereinigten PCR-Produkte in die angegebenen TOPO® Vektoren erfolgte nach Herstellerangaben. Für die erforderlichen A-Überhänge am 3'-Ende für pcDNA3.1/V5-His©TOPO® und pMT/V5-His©TOPO® wurden die Amplifikate mit Herculase® Polymerase erstellt. Die Amplifikate für pET100/D-TOPO wurden ohne Überhang mit Pfu® Polymerase erstellt.

Anschließend erfolgte eine Transformation des Plasmids in chemokompetente TOP 10 *E.coli* und Ausplattierung dieser auf LB-Agarplatten nach Herstellerangaben. Die entstandenen

Kolonien wurden durch PCR getestet. Die positiven Kolonien wurden über Nacht in 5 ml LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin vermehrt, das Plasmid mit dem NucleoSpin®Plasmid Kit nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Das Plasmid wurde zur Sequenzanalyse, zum Restriktionsenzymverdau und als Matritze für weitere PCRs weiterverwendet.

## 4.10 Restriktionsenzymverdau und Gelaufreinigung

### Durchführung

Ansatz für einen Restriktionsverdau (Gesamtvolumen 10 µl):

<b>1-3 µl</b>	Plasmid bzw. PCR-Produkt
<b>1 µl</b>	10xPuffer (enzymspezifisch) <sup>8</sup>
<b>0,5 µl</b>	Restriktionsenzym 1 <sup>8</sup>
<b>0,5 µl</b>	eventuell Restriktionsenzym 2 <sup>8</sup>
<b>5-7,5 µl</b>	PCR-Wasser <sup>10</sup>

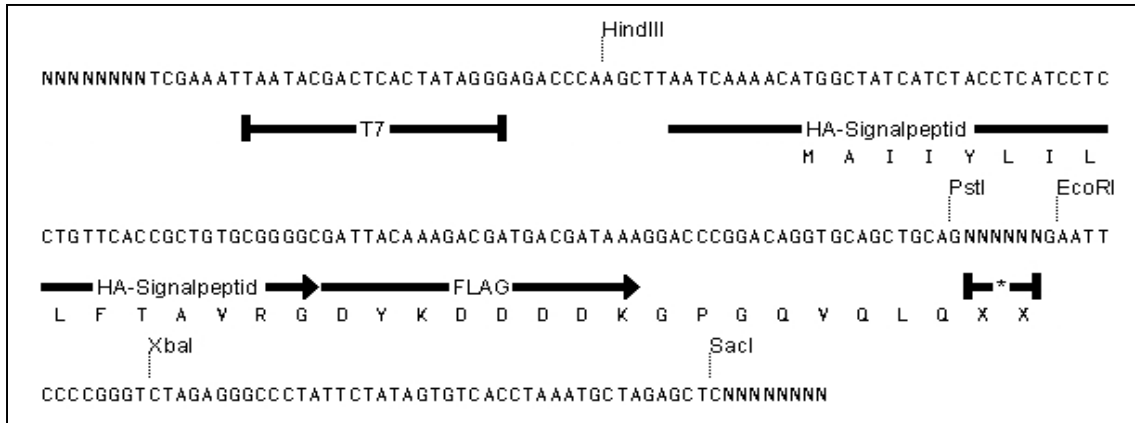
Wenn beim ausgewählten Enzym nicht anders vermerkt, wurde der Ansatz 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Für eine weitere Klonierung wurden die entsprechenden Fragmente nach Ethidiumbromid-Färbung aufgrund ihrer Längen unter UV-Licht identifiziert und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die enthaltene DNA konnte mit Hilfe des PCR clean-up Gel extraction Kit<sup>13</sup> nach Herstellerangaben gereinigt werden. Anschließend wurde photometrisch die Konzentration bestimmt.

## 4.11 Ligation

Für die Ligation lagen bereits modifizierte Vektoren vor, welche automatisch die Expression des gewünschten PCR-Produktes zusammen mit einer zusätzlicher Markersequenz (FLAG oder humanFc) erlaubten. Diese Sequenz diente später dazu, das exprimierte rekombinante Protein einfacher im Zellkulturüberstand zu detektieren und aufzureinigen.

**Material**

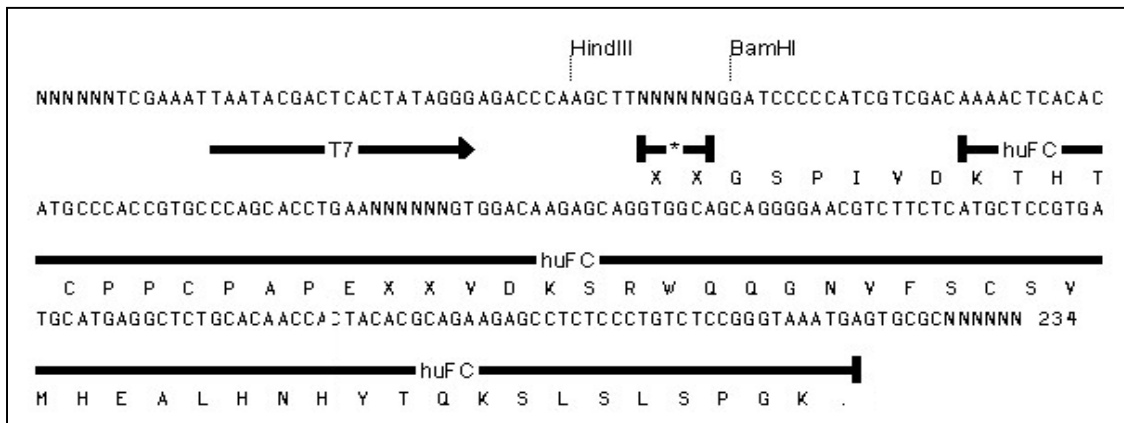
**pCR3 – HA-FLAG:**



☐ = Klonierungsstelle

**Abb. 4.1: Klonierungsstelle des Vektors pCR3 – HA-FLAG**

**pCR3 – huFc:**



☐ = Klonierungsstelle

**Abb. 4.2: Klonierungsstelle des Vektors pCR3 - huFc**

**Rapid DNA Ligation Kit<sup>8</sup>**

**Alkalische Phosphatase, Shrimp<sup>21</sup>**

## Präparation von Vektor und PCR-Produkt

Die Vektoren wurden mit den entsprechenden Endonukleasen verdaut (ca. 10 µg Plasmid – Verdau über 3 h bei 37°C). Nach Beendigung des Verdauens wurden sie noch einmal mit alkalischer Phosphatase nachbehandelt (10 % des Verdauvolumens an alkalischer Phosphatase direkt in den Verdauansatz – 30 min bei 37°C), um im Agarosegel anschließend aufgetrennt, ausgeschnitten und aufgereinigt zu werden (s.4.10). Die entsprechenden PCR-Amplifikate wurden entweder in einen T/A Vektor zwischenkloniert, um anschließend aus diesem durch Endonukleaseverdau wieder herausgeschnitten und gereinigt zu werden (über Agarosegelaufreinigung) oder direkt nach Amplifikation verdaut und aufgereinigt. Bei letzterem Vorgehen (es müssen dafür mindestens 2 Nukleotide am Ende der Restriktionsschnittstelle des Primer überstehen) wurden die PCR-Produkte über ein Agarosegel aufgetrennt, anschließend ausgeschnitten, aufgereinigt und mit den entsprechenden Endonukleasen verdaut (17 µl Gelaufreinigung + 1 µl (bzw. 2 x 1 µl bei 2 verschiedenen) Endonuklease + 17 (bzw. 16) µl PCR-Wasser – 1 h bei 37°C – abschließend 20 min bei 65°C zur Inaktivierung der Endonukleasen).

## Durchführung

Die Ligation erfolgte nach Herstellerangaben. Das Ligationsprodukt wurde anschließend, wie in Abschnitt 4.9 beschrieben, in chemokompetente TOP10 *E.coli* transformiert, diese mit PCR getestet, vermehrt und das Plasmid zur Sequenzierung und Transfektion aufgereinigt.

## 4.12 DNA-Sequenzierung

DNA-Proben wurden zur Sequenzierung zu GATC/Konstanz versandt.

## 4.13 SDS-Page

### Material

#### 10 % APS

1 g Amoniumpersulfat

ad 10 ml Aqua bidest., in Aliquots bei -20°C lagern

**4x TrisCl/SDS Puffer pH 8,8**

**91 g** Tris(hydroxymethyl)aminomethan<sup>1</sup>

**2 g** Natriumdodecylsulfat (SDS)<sup>1</sup>

ad 500 ml Aqua bidest., mit HCl auf pH8,8 einstellen, bei 4°C lagern

**4x TrisCl/SDS Puffer pH 6,8**

**6,05 g** Tris(hydroxymethyl)aminomethan<sup>1</sup>

**0,4 g** Natriumdodecylsulfat (SDS)<sup>1</sup>

ad 100 ml Aqua bidest., mit HCl auf pH6,8 einstellen, bei 4°C lagern

**6x SDS-Probenpuffer**

**7 ml** 4x TrisCl/SDS Puffer pH6,8

**3 ml** Glycerol<sup>1</sup>

**1 g** Natriumdodecylsulfat (SDS)<sup>1</sup>

**1,2 mg** Bromphenolblau<sup>5</sup>

ad 24 ml Aqua bidest., Aliquots à 1 ml bei -20°C lagern

**2x SDS Probenpuffer**

**200 µl** 6xSDS-Probenpuffer

**400 µl** Aqua bidest.

Aliquots à 1 ml bei -20°C lagern

**β-Mercaptoethanol<sup>1</sup>****Isobutanol<sup>6</sup>****10x Elektrophoresepuffer**

**30,2 g** Tris(hydroxymethyl)aminomethan<sup>1</sup>

**72 g** Glycin<sup>1</sup>

**5 g** Natriumdodecylsulfat (SDS)<sup>1</sup>

ad 1000 ml Aqua bidest., vor Gebrauch mit Aqua dest. 1:10 verdünnen, bei 4°C lagern

**Page Ruler Protein Ladder 10-180 kDa<sup>8</sup>****Tetramethylethylendiamin (TEMED)<sup>1</sup>****Trenngel (kurz vor Gebrauch mischen):**

	5 %	6 %	7 %	8 %	9 %	10 %	12 %	15 %
<b>30 % Acrylamid</b>	1,66ml	2,0ml	2,33ml	2,66ml	3,0ml	3,33ml	4,0ml	5,0ml
<b>4xTris-CI/SDS, pH8,8</b>	2,5ml	2,5ml	2,5ml	2,5ml	2,5ml	2,5ml	2,5ml	2,5ml
<b>aqua dest.</b>	5,83ml	5,5ml	5,16ml	4,83ml	4,5ml	4,16ml	3,5ml	2,5ml
<b>APP</b>	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl
<b>TEMED</b>	10µl	10µl	10µl	10µl	10µl	10µl	10µl	10µl

**Sammelgel**

(Zusammensetzung bei jeglicher Konzentration des Trenngels gleich; kurz vor Gebrauch mischen):

<b>30 % Acrylamid</b>	0,65ml
<b>4xTris-CI/SDS, pH6,8</b>	1,25ml
<b>Aqua dest.</b>	3,05ml
<b>APP</b>	25µl
<b>TEMED</b>	7,5µl

**Färbelösung:**

<b>2 g</b>	Coomassie-Brilliant-Blue <sup>15</sup>
<b>500 ml</b>	Methanol <sup>1</sup>
<b>100 ml</b>	Essigsäure <sup>1</sup>
<b>400 ml</b>	aqua dest.

**Entfärbelösung:**

<b>250 ml</b>	Methanol <sup>1</sup>
<b>70 ml</b>	Essigsäure <sup>1</sup>
<b>680 ml</b>	aqua dest.

**Durchführung**

Das Trenngel (meist 12 %) wurde in eine BioRad mini Protean II Gießkammer eingefüllt und mit 500 µl Isobutanol überschichtet. Nach einer Polymerisationszeit von ca. 30 min bei RT wurde das Isobutanol durch Auswaschen mit Aqua dest. entfernt, das 4 %-ige Sammelgel über das Trenngel geschichtet und ein Probenaschenkamm eingesetzt. Das polymerisierte Gel (wiederum nach ca.30-40 min) wurde in die Elektrophoresekammer eingespannt und mit 1x Elektrophoresepuffer überschichtet. Es wurden nun 10 µl Probe mit 2 µl 6x SDS-Probenpuffer und wahlweise mit 0,5 µl β-Mercaptoethanol versetzt, 5 min. bei 95°C gekocht und die Proben in die Geltaschen eingefüllt. Für Serumanalysen (ausschließlich im Western Blot) wurden zwischen 1-3 µl Plasma bzw. Serum mit Aqua bidest. auf 10 µl aufgefüllt, mit demselben Volumen an 2xSDS Probenpuffer und wahlweise mit 1 µl β-Mercaptoethanol versetzt und anschließend verkocht. Als Marker wurden 12 µl Page Ruler Protein Ladder aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 150V (ca. 65 min) durchgeführt. Anschließend wurde das SDS-Gel in der Coomassie-Färbelösung 15 min lang bei leichter Bewegung inkubiert, um danach das unspezifisch gebundene Coomassie durch wechselnde Bäder mit Entfärbelösung wieder zu entfernen.

**4.14 Western Blot**

Der Western Blot diente zum Nachweis eines Proteins und dessen relativen Molekulargewichts durch einen spezifischen Antikörper. Die Bestimmung des Molekulargewichts erfolgte durch einen Vergleich mit einem ebenso in der SDS-PAGE aufgetrennten Marker.

**Material**

**Siehe SDS-Page 4.13**



**Prestained Protein Ladder, 10-180 kDa<sup>8</sup>****ECL Protein M.W. Marker****Anodenpuffer I (0,3M, pH10,4):**

**18,17 g** Tris(hydroxymethyl)aminomethan<sup>1</sup>

**100 ml** Methanol, reinst<sup>1</sup>

ad 500 ml Aqua dest., auf pH10,4 einstellen, bei RT lagern

**Anodenpuffer II (25mM, pH10,4):**

**1,51 g** Tris(hydroxymethyl)aminomethan<sup>1</sup>

**100 ml** Methanol, reinst<sup>1</sup>

ad 500 ml Aqua dest., auf pH10,4 einstellen, bei RT lagern

**Kathodenpuffer (pH9,4):**

**1,51 g** Tris(hydroxymethyl)aminomethan<sup>1</sup>

**100 ml** Methanol, reinst<sup>1</sup>

**2,63 g**  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure<sup>14</sup>

ad 500 ml Aqua dest., auf pH9,4 einstellen, bei RT lagern

**5 % Magermilchpulverlösung:**

**5 g** Magermilchpulver<sup>1</sup>

ad 100 ml Aqua dest., kurz vor Gebrauch ansetzen

**Nitrozellulosemembran BA83 Porengröße 0,2  $\mu\text{m}$ <sup>16</sup>****Filterpapier Nr.3<sup>17</sup>****PBS-T (0,05 % Tween20®):**

**500  $\mu\text{l}$**  Tween20®<sup>1</sup>

ad 1000 ml PBS (s. 4.2), pH-Wert auf 7,2 einstellen

#### 4.14.1 Blotting

Die zu analysierenden Proben wurden, wie unter 4.13 beschrieben, in einer SDS-Page aufgetrennt. Als Marker wurde hierbei der **Prestained Protein Ladder** oder der biotinylierte **ECL Protein M.W. Marker** verwendet. Anschließend wurden die der Größe nach aufgetrennten Proteine mit Hilfe des Semi-Dry-Elektroblotters auf Nitrozellulose transferiert. Dabei wurde zuerst die untere Anodenplatte ausreichend mit destilliertem Wasser benetzt. Anschließend wurden vier Lagen Filterpapier (in Anodenpuffer I getränkt) und zwei Lagen Filterpapier (in Anodenpuffer II getränkt) übereinander geschichtet. Daraufhin folgten die Nitrozellulosemembran (in Aqua dest. getränkt) und darüber das SDS-Gel. Abschließend wurden weitere vier Lagen Filterpapier (in Kathodenpuffer getränkt) über das Gel geschichtet. Die jeweiligen Lagen entsprachen der Größe des SDS-Gels (ca. 5,5 x 8,5cm) und wurden sorgfältig ohne Lufteinschlüsse übereinander gelegt. Abschließend wurde die ebenfalls mit Aqua dest. benetzte Kathodenplatte aufgelegt und für 80 min eine konstante Stromstärke von 0,8mA/cm<sup>2</sup> angelegt (ca. 40mA/Gel). Nach Beendigung des Blot-Vorganges wurde die Nitrozellulosemembran über Nacht bei 4°C unter Bewegung mit 5 % Magermilchpulverlösung blockiert. Alternativ erfolgte die Blockierung für 90 min bei RT, anschließend wurde die Membran 3-mal für 10 min mit PBS-T gewaschen und über Nacht bei 4°C unter Bewegung mit dem 1. Antikörper inkubiert.

#### 4.14.2 Proteindetektion durch spezifische Antikörper

##### Material

##### **ECL Detektionslösung:**

Tris-Cl 0,1M pH8,6

**12,11 g** Tris(hydroxymethyl)aminomethan<sup>1</sup>

ad 1000 ml Aqua dest., pH-Wert mit HCL auf 8,6 eingestellt; Lagerung bei RT

##### Lösung A:

**50 mg** Luminol<sup>5</sup>

ad 200 ml Tris-Cl 0,1M pH8,6; Lagerung bei 4°C

##### Lösung B:

**11 mg** para-Hydroxycoumarinsäure<sup>5</sup>

ad 10 ml DMSO<sup>5</sup>; Lagerung lichtgeschützt bei RT

Lösung C: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>1</sup> - 30 % - Lagerung lichtgeschützt bei RT

**Kurz vor Gebrauch mischen: 4 ml LösungA + 400 µl LösungB + 1,2 µl LösungC**

**Kodak BioMax MR (Röntgenfilm)**

**Verwendete Antikörper:**

Antikörper	gebundenes Antigen	Isotyp	Tierart	Konzentration	Referenz
goat-α-rabbit IgG- POD	Kaninchen IgG	poly IgG	Ziege	1:20000	Jackson <sup>28</sup>
goat-α-mouse IgG- POD	Maus IgG	poly IgG	Ziege	1:20000	Jackson <sup>28</sup>
goat-α-human IgG- POD	Mensch IgG (γ-Ketten spez.)	poly IgG	Ziege	1:2000	SBA <sup>27</sup>
SA-POD	Biotin	-	-	1:2000	SBA <sup>27</sup>
M2 mouse-α-FLAG- POD <sup>5</sup>	FLAG-Epitop	IgG1	Maus	1:10000	Sigma <sup>5</sup>
15G6 mouse-α- FLAG	FLAG-Epitop	IgG3	Maus	1 µg/ml	#
mouse-α-His	6 His Epitop	IgG1	Maus	2 µg/ml	Connex <sup>32</sup>
goat-α-human IgG	Mensch IgG	poly IgG	Ziege	1:2000	SBA <sup>27</sup>
mouse-α-human HMGB1	Mensch HMGB1	IgG2	Maus	2 µg/ml	R+D Sys. <sup>29</sup>
rabbit-α-canine TNFα	Hund TNFα	poly IgG	Kaninchen	1:4000	s. 4.20.1 + 4.21.1
rabbit-α-canine HMGB1	Hund HMGB1	poly IgG	Kaninchen	1:4000	s. 4.20.1 + 4.21.1s.
rabbit-α-canine HMGB1–Peptid1	Hund HMGB1 Peptid1	poly IgG	Kaninchen	1:4000	s. 4.20.2+ 4.21.2.2
rabbit-α-canine HMGB1–Peptid2	Hund HMGB1 Peptid2	poly IgG	Kaninchen	1:1000	s. 4.20.2+ 4.21.2.2
rabbit-α-canine TNFα-POD	Hund TNFα	poly IgG	Kaninchen	1:10000	s. 4.20.1

# 15G6 α-Flag von Thomas Göbel und Birgit Viertlböck zur Verfügung gestellt

**Tab. 4.3: Im Western Blot verwendete Antikörper**

## Durchführung

Die über Nacht blockierte Nitrocellulosemembran des Western Blots wurde am nächsten Morgen mit PBS-T gewaschen (1x15 min und 4x5 min - pro Waschschrift ca.50ml PBS-T - ca.60rpm - RT) und daraufhin mit dem 1. Antikörper für 1,5 h inkubiert (ca. 20-25 ml Gesamtvolumen; RT; ca.60rpm). Danach wurde die Membran wieder mit PBS-T gewaschen und mit einem sekundären Meerrettich-Peroxidase (POD) markierten Antikörper für eine Stunde inkubiert (in 20 ml Gesamtvolumen; RT; ca.60rpm). Abschließend wurde die Membran 5x10 min mit PBS-T gewaschen, mit mit ECL Detektionslösung (4 ml/Membran) 5 min lang inkubiert, in eine Klarsichthülle eingelegt und in einer Röntgenkassette einem Röntgenfilm unter Lichtabschluss 30 sec – 10 min aufgelegt. Die Peroxidase des sekundären Antikörpers katalysiert die Oxidation von Luminol im Chemolumineszenz-Substrat, das dabei entstandene Dioxetan zerfällt unter Energieabgabe, welche durch den Röntgenfilm spezifisch detektiert werden kann.

## 4.15 Rekombinante Proteinexpression in prokaryotischen Zellen

### 4.15.1 Material

**LB-Medium** (siehe 4.7.1)

**Ampicillin 100 mg/ml** (siehe 4.7.1)

**IPTG (1M)**

**2,38 mg**      Iso-propyl-thio-galactosid<sup>1</sup>

ad 10 ml Aqua bidest.; steril filtriert (0,22µm), aliquotiert und bei -20°C gelagert

**BL21 Star (DE3) One Shot<sup>®7</sup> *E.coli***

chemokompetent mit SOC Broth Medium

### 4.15.2 Durchführung

#### Transformation in BL21

Für die Proteinexpression in prokaryotischen Zellen wurde zunächst das gewünschte cDNA

Amplifikat in den Vektor **pET100/D-TOPO<sup>®7</sup>** kloniert. Nach Transformation in chemokompetente TOP 10 Zellen, anschließender Plasmidpräparation und Sequenzierung konnte das so gewonnene Plasmid nun in den chemokompetenten *E.coli* Expressionsstamm **BL21 Star (DE3) One Shot<sup>®7</sup>** eingebracht werden. Die Transformationen erfolgten jeweils nach Herstellerangaben.

### **Probeexpression**

Die gesamte Bakterienkultur wurde nach Abschluß der Transformation in 10 ml LB-Amp Medium (10ml LB-Medium mit 10 µl Ampicillin-Lösung) in einem sterilen 50ml Erlenmeyer Kolben über Nacht bei 37°C und 225rpm inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde ein Teil der Bakterien in einem sterilen Kryo-Röhrchen auf -80°C tiefgefroren (850 µl Bakterienkultur mit 150 µl sterilem Glycerol). Für die Probeexpression wurden 1,5ml der restlichen Kultur in 100ml LB-Amp-Medium überführt und für ca. 80 bis 120 min bei 37°C und 225rpm inkubiert, bis eine optische Dichte bei 600nm (OD600) zwischen 0,5 bis 0,8 erreicht wurde. Anschließend wurde die 100ml Bakterienkultur in zwei 50ml Kulturen geteilt und eine Kultur mit 50 µl 1M IPTG-Lösung induziert. Die Kulturen wurden für weitere 3 bis 6 h bei 37°C und 225rpm inkubiert. Zur Darstellung der Expressionskinetik des gewünschten Proteins wurden zum Zeitpunkt der Induktion und zu jeder vollen Stunde 500 µl Kulturlösung entnommen und bei 16000 xg für 30 sec abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das so erhaltene Bakterienpellet bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Am Ende der Probeexpression wurden die beiden Kulturen im Gesamten abzentrifugiert (10 min - 3000 xg – 4°C), der Überstand abgenommen und die Bakterienpellets ebenfalls bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

### **Kinetik der Probeexpression**

Die gewonnenen Proben der einzelnen Zeitabschnitte wurden in 80 µl 1x SDS-Probenpuffer resuspendiert und anschließend in einem SDS-Gel aufgetrennt. Die einzelnen Proteinfractionen konnten durch Coomassie-Blue Färbung sichtbar gemacht werden, so dass die optimale Induktionszeit für das gesuchte rekombinante Protein ermittelt werden konnte.

**Ermittelte Induktionszeiten:**

<b>Rekombinantes Protein</b>	<b>Induktionszeit mit IPTG</b>
His - TNF $\alpha$	4 Stunden
His - HMGB1	6 Stunden
His - HMGB1 - Flag	4 Stunden

**Tab. 4.4: Induktionszeiten für bakterielle Proteinexpression****Expression in großen Volumina (4x500 ml)**

4x10ml LB-Amp-Medium wurden in jeweils einem sterilen 50ml Erlenmeyerkolben mit einigen Kristallen des oben beschriebenen Bakterienaliquots (aufbewahrt bei -80°C) beimpft und über Nacht bei 37°C und 225rpm inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die vier Ansätze zusammengeführt und 4 x 500 ml 37°C warmes LB-Amp-Medium in vier sterilen 2l-Kolben mit jeweils 9,5 ml mit der Übernachtskultur beimpft. Anschließend wurden die Kulturen so lange inkubiert (ca. 90 min - 37°C – 225 rpm) bis eine OD600 von 0,5 bis 0,8 erreicht wurde. Ab diesem Zeitpunkt wurden die vier Ansätze mit jeweils 500  $\mu$ l 1M-IPTG-Lösung induziert und für weitere drei bis sechs Stunden inkubiert. Zur Darstellung der Expressionskinetik wurden wie oben beschrieben zu jeder vollen Stunde 500  $\mu$ l entnommen. Am Ende wurden die Ansätze in mehreren Schritten (2x250 ml in einer 250 ml Flasche) abzentrifugiert (25 min - 7000 xg – 4°C), die Überstände verworfen, die Bakterienpellets für die Aufreinigung unter nativen Bedingungen in kaltem Ultraschallpuffer (12 ml pro 1 g nasses Bakterienpellet) resuspendiert und in einem 50 ml Röhrchen bei -20°C gelagert. Für eine Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen wurden die Bakterienkulturen in 50 ml Röhrchen abzentrifugiert (5 x 50 ml pro Röhrchen), der Überstand jeweils verworfen und die Pellets anschließend direkt auf -20°C gelagert.

**4.16 Aufreinigung His-markierter Proteine**

Die im *E.coli* Stamm **BL21 Star (DE3)**<sup>7</sup> exprimierten Proteine wurden mit Hilfe ihres Expressionsvektors **pET100/D-TOPO**<sup>7</sup> N-terminal mit einer ca. 3 kDa langen Sequenz markiert. Diese Markierung beinhaltet sechs aufeinander folgende Histidine (sog. 6 His-Tag), welche eine besonders starke Affinität zu positiv geladenen Nickel-Ionen aufweisen. Mit Hilfe dieser Eigenschaft lässt sich nun das gesuchte rekombinante Protein aus den übrigen bakteriellen

Proteinen durch Ni-Affinitäts-Chromatographie herausreinigen.

#### 4.16.1 Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen

##### Material

**Ni-NTA-Agarose<sup>19</sup>**

**Poly-Prep®-Chromatographie-Säule**

##### Lysispuffer pH8,0

<b>1,38 g</b>	Natrium-dihydrogen-phosphat-monohydrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ) <sup>1</sup>
<b>0,12 g</b>	Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) <sup>1</sup>
<b>48,05 g</b>	Harnstoff <sup>1</sup>
<b>136 mg</b>	Imidazol

ad 100 ml Aqua dest.; mit NaOH auf pH8,0 einstellen; bei 4C gelagert

##### Waschpuffer pH6,3

<b>1,38 g</b>	Natrium-dihydrogen-phosphat-monohydrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ) <sup>1</sup>
<b>0,12 g</b>	Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) <sup>1</sup>
<b>48,05 g</b>	Harnstoff <sup>1</sup>

ad 100 ml Aqua dest.; mit HCL auf pH6,3 einstellen; bei 4C gelagert

##### Elutionspuffer pH4,5

<b>1,38 g</b>	Natrium-dihydrogen-phosphat-monohydrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ) <sup>1</sup>
<b>0,12 g</b>	Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) <sup>1</sup>
<b>48,05 g</b>	Harnstoff <sup>1</sup>
<b>17,02 g</b>	Imidazol

ad 100 ml Aqua dest.; bei 4C gelagert

##### Durchführung

Die Bakterienpellets wurden auf Eis langsam aufgetaut, in Lysispuffer rersuspendiert (ca.2 ml Lysispuffer pro 500 ml Expressionsvolumen) und anschließend 1 h bei RT unter Bewegung inkubiert. Danach wurden die Bakterien 25 min bei RT und 10000 xg abzentrifugiert und der

klare Überstand zu 4 ml Ni-NTA-Agarose (50 % Lagerungslösung/50 % Ni-Agarose) gegeben und für eine weitere Stunde bei RT unter Bewegung inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Suspension in eine Poly-Prep®-Chromatographie-Säule überführt und der Überstand abgelassen. Anschließend wurde die Säule 3-mal mit je 5 ml Waschpuffer gewaschen und das gebundene Protein nach Zugabe von 7 ml Elutionspuffer in sechs Fraktionen zu je 1 ml eluiert. Um die erfolgreiche Aufreinigung zu überprüfen, wurden Bakterienlysate, Durchlauf, die einzelnen Waschfraktionen und die Eluate mittels SDS-Page getestet (s. 4.13). Die proteinreichen Eluate wurden nun über Nacht gegen 5l PBS dialysiert. Das weitere Vorgehen während und nach der Dialyse entspricht dem der nativen Proteinaufreinigung (s. 4.16.2).

#### 4.16.2 Aufreinigung unter nativen Bedingungen

##### Material

###### NaCl 5M

146,1 g Natriumchlorid<sup>1</sup>

ad 500 ml Aqua bidest; bei RT lagern

###### Imidazol 1M

6,08 g Imidazol (C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>)<sup>5</sup>

ad 100 ml Aqua bidest; bei RT lagern

###### Tris-Cl 1M

60,55 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (*Tris*)<sup>1</sup>

ad 500 ml Aqua bidest; pH-Wert mit HCl auf 8,0 eingestellt; bei RT lagern

###### MgCl<sub>2</sub> 1M

20,33 g Magnesiumdichlorid<sup>1</sup>

ad 100 ml Aqua bidest; bei RT lagern

###### KCl 1M

7,46 g Kaliumchlorid<sup>1</sup>

ad 100 ml Aqua bidest; bei RT lagern



**Protease Inhibitor Cocktail for purification of Histidin-Tagged Proteins<sup>5</sup>****25x Complete ohne EDTA (Protease Inhibitor)**1 Tabl. Complete ohne EDTA<sup>21</sup>

ad 2 ml Aqua bidest; bei RT lagern

**Ni-NTA-Agarose<sup>19</sup>** **$\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME)<sup>1</sup>****BCA Protein Dedection Kit<sup>18</sup>****Poly-Prep®-Chromatographie-Säule<sup>14</sup>****Glycerin (wasserfrei)<sup>1</sup>****Spectra/Por Dialyseschlauch MWCO 2000Da<sup>24</sup>****Ultraschallpuffer-Stammlösung**

100 ml	NaCl 5M
50 ml	Tris-Cl 1M pH8,0
5 ml	MgCl <sub>2</sub> 1M
100 ml	Glycerin
1 ml	NP-405

ad 1000 ml Aqua bidest;

autoklavieren oder frisch autoklavierte Lösungen (ohne NP-40) benutzen; bei RT lagern

**Waschpuffer 2-Stammlösung**

50 ml	KCl 5M
10 ml	Tris-Cl 1M pH8,0
2,5 ml	MgCl <sub>2</sub> 1M
100 ml	Glycerin

5 ml	Imidazol 1M
0,5 ml	NP-405

ad 500 ml Aqua bidest;

autoklavieren oder frisch autoklavierte Lösungen (ohne NP-40) benutzen; Lagerung: RT

#### **Elutionspuffer-Stammlösung**

50 ml	KCl 5M
10 ml	Tris-Cl 1M pH8,0
2,5 ml	MgCl <sub>2</sub> 1M
100 ml	Glycerin
8,5 g	Imidazol5 (=250mM)
0,5 ml	NP-405

ad 500 ml Aqua bidest;

autoklavieren oder frisch autoklavierte Lösungen (ohne NP-40) benutzen; Lagerung: RT

#### **Ultraschallpuffer**

1 ml	25x Complete ohne EDTA (bzw. 250 µl Protease Inhibitor Cocktail <sup>5</sup> für HMGB1 Aufreinigung)
10 µl	β-ME
50 µl	Imidazol 1M

ad 25 ml Ultraschallpuffer-Stammlösung; vor Gebrauch frisch ansetzen

#### **Waschpuffer 1**

1 ml	25x Complete ohne EDTA (bzw. 250 µl Protease Inhibitor Cocktail <sup>5</sup> für HMGB1 Aufreinigung)
10 µl	β-ME
0,5 ml	Imidazol 1M

ad 25 ml Ultraschallpuffer Stammlösung; vor Gebrauch frisch ansetzen

**Waschpuffer 2**

1 ml	25x Complete ohne EDTA (bzw. 250 µl Protease Inhibitor Cocktail <sup>5</sup> für HMGB1 Aufreinigung)
10 µl	β-ME

ad 25 ml Waschpuffer 2 Stammlösung; vor Gebrauch frisch ansetzen

**Equilibrierungspuffer**

50 ml	Imidazol 1M
-------	-------------

ad 25 ml Ultraschallpuffer-Stammlösung; vor Gebrauch frisch ansetzen

**Elutionspuffer**

20 µl	β-ME
-------	------

ad 50 ml Elutionspuffer-Stammlösung; vor Gebrauch frisch ansetzen

**Durchführung**

Die unter 4.15 beschriebene Bakteriensuspension der Expression in großen Volumina wurde langsam auf Eis aufgetaut (Gesamtvolumen ca. 25 bis 30 ml aus 2l Expressionsvolumen). Alle weiteren Schritte erfolgten ebenfalls auf Eis mit gekühlten Pufferlösungen.

Zum Aufbrechen der Zellen mittels Ultraschall wurde die Bakteriensuspension 10 x 30 sec mit je 30 sec Pause zwischen den einzelnen Schritten beschallt (Cycle 90, Power MS 72). Anschließend wurden die so behandelten Zellen für 25 min bei 4°C und 12.000 xg zentrifugiert. Währenddessen erfolgte die Equilibrierung der Ni-Agarose. Hierzu wurden pro Liter Bakterienkultur jeweils 5 ml Ni-Agarose (= 50 % Ni-Agarose und 50 % Lagerungspuffer) in einem 50 ml Röhrchen nacheinander mit 25 ml Aqua bidest., 25 ml Elutionspuffer und 25 ml Equilibrierungspuffer gewaschen, d.h. vorsichtig aufsuspendiert und abzentrifugiert (3 min - 60 xg - 4°C). Der Bakterienüberstand wurde nun auf die equilibrierte Ni-Agarose gegeben und für zwei Stunden bei 4°C rotierend inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Ni-Agarose Suspension in eine Poly-Prep®-Chromatographie-Säule überführt und der Überstand abgelassen. Die Säule wurde mit je 25 ml Waschpuffer 1 und Waschpuffer 2 gewaschen. Zur Elution wurde 3-mal je 5 ml Elutionspuffer auf die Säule gegeben und das Eluat in 18 Fraktionen zu je ca. 500 µl aufgefangen. Nach Überprüfung der erfolgreichen Reinigung in der SDS-PAGE wurden die proteinreichen Fraktionen zusammen in einem gewässerten Dialyseschlauch (MWCO 2000Da)

über Nacht gegen 5l PBS (s. 4.2) umgepuffert. Nach Konzentrationsbestimmung mit Hilfe des BCA-Protein Assays (Durchführung nach Herstellerangaben) wurde die gereinigte Proteinlösung aliquotiert und bei -20°C gelagert. Da die Ni-Agarose bis zu 5-mal verwendbar ist, wurde sie zur Regeneration mit weiteren 5 ml Elutionspuffer gespült, in 30 % Ethanol aufgenommen, zusammen mit diesem mit einer Pasteurpipette in ein 50 ml Röhrchen transferiert und bei 4°C gelagert.

## **4.17 LPS-Entfernung**

Bei der Aufreinigung beakteriell exprimierter Proteine kommt es stets zur Kontamination mit Lipopolysacchariden (LPS), einem Zellwandbestandteil Gram negativer Bakterien. Da LPS bei Stimulationsversuchen mit rekombinanten Zytokinen stören würden, müssen sie weitestgehend entfernt bzw. neutralisiert werden. Zur Überprüfung der erfolgreichen LPS-Entfernung wurde anschließend der Limulus Amebocyte Lasyte (LAL)-Test durchgeführt.

### **4.17.1 Endotoxin Removing Gel**

#### **Material**

**Detoxi-Gel™ Endotoxin Removing Gel<sup>18</sup>**

**Wasser für die Molekularbiologie<sup>1</sup> (LPS-frei)**

**Natriumdeoxycholat-Puffer 1 %**

1 g Natriumdeoxycholat<sup>1</sup>

ad 100 ml LPS freies Wasser; bei 4°C lagern

**Ethanol 25 %**

12,5 ml Ethanol (reinst)<sup>1</sup>

ad 50 ml Aqua bidest., bei 4°C lagern

#### **Durchführung**

Die LPS Entfernung der dialysierten Proteinlösungen erfolgte nach Herstellerangaben. Für diese

Art der LPS Entfernung eigneten sich vor allem kleinere Volumina höherer Proteinkonzentrationen. Die Überprüfung des Probendurchlaufs (Einzelfractionen zu je 500 µl) wurde mit Hilfe SDS-Page durchgeführt (s. 4.13)

#### **4.17.2 Phasenseparation mit TritonX 114**

##### **Material**

###### **TritonX 114<sup>1</sup>**

##### **Durchführung**

Die LPS-Entfernung mittels TritonX 114 erfolgte nach Aida und Pabst [150]. Maximal 10 ml der dialysierten Proteinlösung wurde in ein 15 ml Röhrchen gegeben und anschließend mit 1 % des Gesamtvolumens an TritonX 114 versetzt. Die Lösungen wurden gründlich miteinander vermischt (Vortex®) und anschließend 5 min lang im Eiswasser inkubiert. Danach wurde die so entstandene klare, homogene Lösung wieder ausgiebig durchmischt und für 5 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die nun trübe Lösung wurde zentrifugiert (ca. 3 min bei 6000 xg), so dass eine Phasentrennung stattfand. Im oberen Bereich sammelte sich eine wässrige proteinhaltige Schicht (ca. 95 % des Gesamtvolumens), welche vorsichtig in ein neues 15 ml Röhrchen überführt wurde. Die untere Phase enthielt das dazugegebene TritonX 114 und das von ihm gebundene LPS. Sie wurde beim Abpipettieren der wässrigen Phase nicht berührt.

Dieser gesamte Vorgang wurde insgesamt 3-mal hintereinander durchgeführt. Nach dem letzten Schritt wurde die Proteinlösung ohne erneute TritonX 114 Zugabe noch einmal ausgiebig durchmischt, für 5 min bei 37°C inkubiert und wie oben beschrieben abzentrifugiert und abpipettiert.

#### **4.18 LPS Konzentrationsbestimmung und Neutralisation**

Die LPS Konzentrationsbestimmung erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe des **E-Toxate KIT<sup>5</sup>**, welcher auf dem Limulus Amebocyte Lasyte (LAL)-Test basiert. Die verbleibende LPS-Kontamination der Proteinproben wurde in den Stimulationsassays mit **PolymyxinB<sup>1</sup>** neutralisiert (6Units PolymyxinB pro pg LPS).

## **4.19 Rekombinante Proteinexpression in eukaryotischen Zellen**

Für die Expression von rekombinanten Proteinen in eukaryotischen Zellen wurde zunächst die genetische Information des gewünschten Proteins mit Hilfe von Expressionsvektoren (s. 4.9) und liposomalen Transfektionsreagenzien in die gewünschte Zelllinie eingebracht. Die erfolgreiche Proteinexpression wurde anschließend durch Analyse des Zellkulturüberstandes im Western Blot (s. 4.14) oder im Elisa (s. 4.22) nachgewiesen.

### **4.19.1 Transiente Transfektion von 293T Zellen**

#### **Material**

**Metafectene<sup>22</sup>**

**RPMI 1640 Medium<sup>7</sup>**

#### **Durchführung**

4,4 x 10<sup>6</sup> Zellen einer zu 90 % konfluenten Zellkulturflasche wurden in 14 ml Standardmedium in eine Petrischale mit Ø 100 mm gesät und über Nacht bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert (nächster Tag ca. 90 % Konfluenz). In einem sterilen Polypropylen-Röhrchen wurden am nächsten Morgen 15 µg Plasmid in 500 µl RPMI 1640 Medium gelöst, in einem zweiten Röhrchen 70 µl Metafectene in 430 µl RPMI 1640 Medium. Beides wurde miteinander vermischt, 15 min bei RT inkubiert und tropfenweise auf die nun adhärenen Zellen gegeben. Nach weiteren 48 h Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde der Zellüberstand analysiert. Für Transfektionen in einer 24-Loch-Platte wurden pro Delle 5x10<sup>5</sup> Zellen in 0,5 ml Standardmedium gesät. Am nächsten Morgen wurden 1 µg Plasmid und 3 µl Metafectene getrennt in jeweils 50 µl RPMI 1640 Medium gelöst, wie oben beschrieben miteinander inkubiert und auf die Zellen gegeben.

### **4.19.2 Stabile Transfektion von CHO Zellen**

#### **Material**

s. 4.19.1

**XTT-Assay (s. 4.5)****G418-Stammlösung (50 mg/ml)**

**250 mg** Geneticin418 (*G418*)<sup>5</sup> (Mengenangabe auf biologisch aktive Substanz bezogen)

ad 5 ml RPMI<sup>7</sup>

**Durchführung**

Zunächst wurde die toxische Konzentration an G418 für untransfizierte CHO Zellen ermittelt. Dabei wurden 100 µl einer Zellsuspension von  $3,3 \times 10^4$  CHO Zellen/ml pro Delle einer sterilen 96-Loch-Flachbodenplatte gegeben (Standardmedium). Nach 4 h Adhärenzzeit bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden weitere 100 µl Standardmedium mit verschiedenen Konzentrationen an G418 auf die Zellen pipettiert (Endkonzentration an G418 pro Delle zwischen 0 µg/ml bis 1200 µg/ml in 100 µg/ml Schritten – 3-fach Ansatz).

Nach 7 Tagen Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde die Anzahl der lebenden Zellen mit Hilfe des Tetrazolumsalzes XTT photometrisch bestimmt (s. 4.5). Die Konzentration von G418, welche gerade noch alle Zellen im Ansatz abtötet, wurde mit 850 µg/ml ermittelt. Im weiteren Verlauf wurde zur Selektion der stabil transfizierten Zellen diese Konzentration an G418 verwendet.

Zur stabilen Transfektion von CHO Zellen wurden  $1 \times 10^5$  Zellen/ml in eine Delle einer 24Loch Platte pipettiert (Standardmedium). Nach ca. 4 h wurden die Zellen, wie unter 4.19.1 beschrieben, transfiziert. Nach weiteren ca. 48 h wurden die Zellen mit PBS (s. 4.2) gewaschen und mit Trypsin/EDTA<sup>4</sup> 1x gelöst. Anschließend wurden die Zellen erneut in 50 ml PBS gewaschen und bei 225 xg abzentrifugiert. Die Zellen wurden nun in Standardmedium mit 850 µg/ml G418<sup>5</sup> aufgenommen, auf eine Zelldichte von  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$  und  $5 \times 10^2$  Zellen/ml eingestellt und auf 96-Loch-Flachbodenplatten verteilt (200 µl/Delle). Nach ca. 7-10 Tagen konnten einzelne Zellklone identifiziert werden und der Überstand dieser auf das gesuchte rekombinante Protein hin analysiert werden.

### 4.19.3 Transiente Transfektion von SL3 Zellen

#### Material

**Easy Grip Petri Schalen (#3009)<sup>25</sup>**

**CellFECTIN®-Reagent<sup>7</sup>**

**Kupfersulfat-Stammlösung (CuSO<sub>4</sub>) 1M**

**1,6 g** Kupfersulfat<sup>5</sup>

ad 10 ml Aqua dest.; steril filtriert bei 4°C gelagert

#### Durchführung

Am Vorabend der Transfektion wurde ca. die Hälfte aller Zellen einer zu 90 % bedeckten 25cm<sup>2</sup> SL3 Zellkulturflasche auf eine Easy Grip Petri Schale mit 4 ml SF900 II<sup>7</sup> Medium gegeben und bei RT (25°C) inkubiert. Am nächsten Morgen sollte die Petrischale zu 80-90 % mit SL3-Zellen bedeckt sein. In einem sterilen Polypropylen-Röhrchen wurden nun 1 µg Plasmid (Vektor pMT/V5-His©TOPO® mit Insert) in 100 µl SF900 II Medium gelöst, in einem zweiten Röhrchen 20 µl CellFECTENE® in 80 µl SF900 II Medium. Beide Ansätze wurden miteinander vermischt, 15 min bei RT inkubiert und anschließend mit 800 µl SF900 II Medium aufgefüllt. Das Medium der semi-adhären SL3 Zellen wurde nun vorsichtig abgenommen, ohne diese aufzuwirbeln. Der Transfektionsansatz wurde daraufhin unverzüglich tropfenweise unter schwenkenden Bewegungen der Petri Schale auf die Zellen gegeben. Nach weiteren 24 h Inkubation bei RT wurde nun ein weiterer ml SF900 II Medium mit 20%FBS<sup>4</sup> auf die Zellen gegeben und die Expression des rekombinanten Proteins mit 20 µl steriler 1M CuSO<sub>4</sub>-Lösung induziert. Nach weiteren 2-3 Tagen Inkubation bei RT konnte der Überstand auf das gesuchte rekombinante Protein hin analysiert werden.

### 4.19.4 Stabile Transfektion von SL3 Zellen

#### Material

siehe 4.19.3

**pRmHa-3 Puromycin-Resistenz-Vektor** (von T.Göbel zur Verfügung gestellt)



**Puromycin-Stammlösung 10 mg/ml****100 mg** Puromycin<sup>5</sup>

ad 10 ml steriles aqua bidest.; steril filtriert und aliquotiert bei -20°C gelagert

**Puromycin-Selektionsmedium****194 ml** SF900 II Medium<sup>7</sup>**6 ml** FBS<sup>4</sup>**200 µl** Puromycin-Stammlösung 10 mg/ml

bei 4°C gelagert

**Durchführung**

Die Transfektion wurde, wie unter 4.19.3 beschrieben, durchgeführt. Zu den 1 µg des Vectors, welcher die eigentliche genetische Information des rekombinanten Proteins trägt, wurde nun zusätzlich 0,1 µg des pRmHa-3 Puromycin-Resistenz-Vektors gegeben. 24 h nach der Transfektion wurden 2 ml SF900 II Medium mit 20%FBS auf die Zellen gegeben und diese für weitere 24 h bei Raumklima inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber von der Petri-Schale gelöst und auf 60 ml Gesamtvolumen mit Puromycin-Selektionsmedium aufgefüllt. Zusätzlich werden alle Zellen einer konfluenten nicht transfizierten 25cm<sup>2</sup> SL3-Zellkulturflasche zu den 60 ml dazugegeben. Sie dienen den transfizierten Zellen im weiteren Verlauf als Ammenzellen. Aus diesem 60 ml Ansatz (Lösung A) werden nun zwei weitere Verdünnungen erstellt:

Lösung B: 10 ml Lösung A mit 40 ml Puromycin-Selektionsmedium

Lösung C: 1 ml Lösung B mit 50 ml Puromycin-Selektionsmedium

Alle drei Zellsuspensionen werden in sterilen 48-Loch-Platten ausgesät (1 ml/Delle) und für 10 bis 14 Tage bei Raumklima inkubiert. Nach dieser Zeit werden einzelne Klone sichtbar, welche nach Duplikation und erneuter Inkubation bis zur Konfluenz mit 1M CuSO<sub>4</sub> Lösung (1 µl CuSO<sub>4</sub>/ml Zellmedium) für ca. drei Tage induziert werden. Die Überstände der induzierten Duplikate werden auf das gesuchte rekombinante Protein hin analysiert, die Zellen der Duplikate sterben durch die Kupferinduktion ab und werden, wenn nicht anders vermerkt, verworfen.

## **4.20 Gewinnung polyklonaler Antiseren**

### **4.20.1 Polyklonale Antiseren gegen rekombinantes canines TNF $\alpha$ und HMGB1**

#### **Material**

**Freundsches komplettes Adjuvans (FCA)<sup>5</sup>**

**Freundsches inkomplettes Adjuvans (FIA)<sup>5</sup>**

**Rekombinantes Protein (s. 4.16.1)**

**PBS (s. 4.2)**

**SDS-Page (s. 4.13)**

#### **Durchführung**

Zur Gewinnung polyklonaler Antiseren gegen rekombinantes HMGB1 und TNF $\alpha$  wurden die unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigten Proteine (s. 4.15 und 4.16.1) über einen breiten Kamm in der SDS-Page aufgetrennt (pro Immunisierung ca. 500 $\mu$ g Protein). Anschließend wurden die Gele für ca. 10 min in Coomassie-Blue gefärbt und mit Aqua dest. bei RT und Bewegung wieder entfärbt. Nach ca. 1 h wurden die gewünschten Banden sichtbar und mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. In mehreren Zyklen wurden die Gelstreifen auf -20°C eingefroren und anschließend mit dem Kolben einer sterilen Spritze gemörsert. Die so zerstückelten Gelstreifen wurden nun zur weiteren Zerkleinerung in etwas PBS aufgenommen und mehrmals mit Spritzen durch Kanülen verschiedener Größe gepresst, bis sie ohne größeren Druck durch eine 22G-Kanüle passten. Anschließend wurde der Protein-Gel-Mix mit gleichem Volumen an Freudschem Adjuvans ausgiebig vermischt (Erstimmunisierung mit FCA, alle weiteren Immunisierungen mit FIA) und dem entsprechenden Kaninchen an mehreren Stellen s.c. und eine Injektion i.m. (lange Sitzbeinmuskulatur) injiziert (max. 0,5 ml/Injektionsstelle). Vor Versuchsbeginn (Präimmunserum) und nach drei aufeinander folgenden Immunisierungen im Abstand von je drei Wochen wurde zwei Wochen nach der letzten Immunisierung (Immunsrum) dem Kaninchen ca. 20-40 ml Blut aus der mittleren Ohrarterie zur Serumgewinnung entnommen. Das Vollblut wird zur Gerinnung für ca. eine Stunde bei 37°C aufbewahrt. Nach Zentrifugation

(10 min – 3000 xg) wird das Serum abgenommen, nochmals für 10 min bei 4°C und 800 xg abzentrifugiert und bei -20°C gelagert.

#### 4.20.2 Polyklonale Antiseren gegen synthetische Peptide

##### Material

*FCA*<sup>5</sup>

*FIA*<sup>5</sup>

**Inject Maleimide Activated Immunogen Conjugation Kit**<sup>18</sup>

**lyophilisierte synthetische Peptide**<sup>26</sup>

##### Peptidsynthese und Kopplung

Die Proteinsequenz von HMGB1 wurde mit Hilfe des Computerprogramms DNASTar – Protean analysiert, um so zwei hochimmunogene Abschnitte des Zytokins zu identifizieren. Für die an die Synthese anschließende Kopplung musste diesen Peptiden stets ein Cystein (Bindung an das Trägerprotein über Schwefelbrückenbindung) vorangestellt werden:

Peptidname	Sequenz	Proteinabschnitt	C-Terminus	Anzahl der Aminosäuren
Peptid 1	C-GKGDPPKKPRGK	Aminosäure 2 bis 12	-CONH <sub>2</sub>	12
Peptid 2	C-SEYRPKIKGEHPG	Aminosäure 107 bis 119	-CONH <sub>2</sub>	14

**Tab. 4.5: Peptidsequenzen zur Gewinnung spezifischer Antiseren gegen HMGB1**

Die Peptidsynthese wurde beim Analytischen Zentrallabor des Biomedizinischen Forschungszentrums der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf in Auftrag gegeben. Die synthetisierten Peptide (Peptid1 = 40,5 mg; Peptid2 = 116,1 mg) wurden lyophilisiert geliefert. Je 2 mg Peptid wurden nun mit Hilfe des Inject Maleimide Activated Immunogen Conjugation Kit<sup>18</sup> nach Herstellerangaben an das Protein Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) gekoppelt und anschließend umgepuffert.

## Immunisierung

Jeweils 500µg der gekoppelten Peptide wurden mit FCA emulgiert (Erstimmunisierung mit FCA, alle weiteren Immunisierungen mit FIA) und den entsprechenden Kaninchen direkt, wie unter 4.20.1 beschrieben, injiziert. Auch die Serumentnahmen (Präimmun- und Immuns Serum) erfolgten analog dazu.

## 4.21 Aufreinigung polyklonaler Seren und Zellkulturüberstände

### 4.21.1 Aufreinigung polyklonaler Seren mit ProteinA-Sepharose

#### Material

##### Startpuffer pH7,0

**1,424 g**  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}^1$  in 400 ml Aqua dest. lösen (Lösung1)

**0,936 g**  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1\text{H}_2\text{O}^1$  in 300 ml Aqua dest. lösen (Lösung2)

Lösung 1 unter Zugabe von Lösung 2 auf pH7 einstellen; bei 4°C gelagert

##### Elutionspuffer pH2,5

**3,75 g** Glycin<sup>1</sup>

ad 500 ml Aqua dest.; mit HCl auf pH2,5 einstellen; bei 4°C lagern

##### Tris-Lösung 1M

**1,211 g** Tris(hydroxymethyl)aminomethan (*Tris*)<sup>1</sup>

ad 10 ml Aqua dest.; bei 4°C lagern

##### Dialysepuffer pH7,8

**1,65 g**  $\text{KH}_2\text{PO}_4^1$

**29,03 g**  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}^1$

**45 g**  $\text{NaCl}^1$

ad 5l Aqua dest.; mit HCl auf pH7,8 einstellen; vor Gebrauch frisch ansetzen

**Guanidinhydrochlorid 6M**

57,32 g Guanidinhydrochlorid<sup>1</sup>

ad 100 ml Aqua dest.; bei 4°C lagern

**Ethanol 20 % (unvergällt)****ProteinA-Sepharose 4 fast flow<sup>2</sup>****Dialysierschlauch Visking, (MWCO 14 kDa)<sup>24</sup>****Chromatographie-Säule<sup>14</sup>****Durchführung**

Die gesamte ImmunglobulinG-Fraktion der polyklonalen Kaninchenserum ( $\alpha$ -TNF $\alpha$ ,  $\alpha$ -HMGB1,  $\alpha$ -Peptid1,  $\alpha$ -Peptid2) wurde mit Hilfe der ProteinA Affinitätschromatographie aufgereinigt. Das Serum wurde vorab 40 min bei 12000 xg zentrifugiert, der Überstand steril filtriert (0,45 $\mu$ m Filter) und anschließend 1:2 mit Startpuffer verdünnt. Nach Equilibrierung der Säule (ca. 1,5 ml ProteinA-Sepharose 4 fast flow) mit Startpuffer wurden ca. 5 ml Serum mit einer peristaltischen Pumpe (1 ml/min) aufgetragen. Das darauf folgende Waschen der Säule mit Startpuffer wurde über einen Monitor kontrolliert und so lange fortgesetzt, bis die Extinktion bei 280 nm zur Basislinie zurückgekehrt war. Zur Elution des gebundenen IgG wurde Elutionspuffer auf die Säule aufgebracht, das Eluat aufgefangen und sofort mit Tris-Lösung auf pH7 bis pH8 neutralisiert. Zur Regeneration der Säule wurde diese nach der Elution zunächst erneut mit ca. 30 ml Startpuffer gespült, dann mit 20 ml Guanidinhydrochlorid regeneriert, nochmals mit 30 ml Startpuffer gewaschen und zuletzt zur Aufbewahrung bei 4°C mit einer 20 % Ethanol-Lösung versetzt.

Das Eluat wurde in einen gewässerten Dialyseschlauch überführt und über Nacht bei 4°C in 5 l Dialysepuffer umgepuffert. Der IgG-Gehalt wurde anschließend photometrisch bestimmt.

## 4.21.2 Aufreinigung polyklonaler Seren mit spezifischen Ligand-Matrizes

### 4.21.2.1 Aufreinigung über CnBr-Ligand Matrix

#### Material

Startpuffer (s. 4.21.1)

Ethanol 20 % (unvergällt)

CnBr-aktivierte Sepharose<sup>2</sup>

Dialysierschlauch Visking, (MWCO 14 kDa)<sup>24</sup>

#### Säuerungslösung 1mM

1 ml HCl 1M<sup>1</sup>

ad 1000 ml Aqua dest.; vor Gebrauch auf Eis lagern

#### Ligandenpuffer pH8,3

84,01 g NaHCO<sub>3</sub><sup>1</sup>

146,1 g NaCl<sup>1</sup>

ad 5000 ml Aqua dest.; mit HCl auf pH8,3 einstellen; vor Gebrauch frisch ansetzen

#### Blockierungspuffer pH8,0

1,51 g Glycin<sup>1</sup>

ad 100 ml Aqua dest.; mit HCl auf pH8,0 einstellen; vor Gebrauch frisch ansetzen

#### Waschpuffer pH4

4,1 g Natriumazetat<sup>5</sup>

14,61 g NaCl<sup>1</sup>

ad 500 ml Aqua dest.

#### Gesinterter Glasfilter G3

Säule<sup>14</sup>

### **Ligandenkopplung**

Zur Kopplung an die CnBr-aktivierte Sepharose wurde TNF $\alpha$  (ca. 18 mg) und HMGB1 (ca. 2,5 mg) aus bakterieller Expression (native Aufreinigung) verwendet. Zunächst wurde die Proteinlösung über Nacht in Ligandenpuffer umdialysiert und anschließend auf eine Konzentration von 0,5 - 10 mg/ml eingestellt. Aktivierte CnBr-Sepharose wurde daraufhin abgewogen und 15 min lang in der Säuerungslösung rehydriert. Anschließend wurde die Sepharose mit Hilfe des gesinterten Glasfilters und einer Wasserstrahlpumpe gewaschen (200 ml Säuerungslösung pro 1 g getrockneter Sepharose). Nach dem Waschen besitzt die Sepharose nun ca. 3-mal mehr Volumen als zuvor. Es wurden nun 2,8 ml (TNF $\alpha$ -Kopplung) und 1 ml (HMGB1-Kopplung) gewaschene Sepharose mit den entsprechenden Ligandenlösungen (Ligandenlösung = 2xSepharosevolumen) 2 h bei RT (bzw. 16 h bei 4°C) unter ständiger Rotation („end-over-end“) inkubiert. Zur Überprüfung der erfolgreichen Ligandenkopplung wurde vor und nach diesem Schritt die Extinktion der Ligandenlösung bei 280 nm gemessen. Bei erfolgreicher Kopplung konnte bei der 2. Messung nahezu keine Extinktion mehr festgestellt werden. Anschließend wurden die noch freien Bindungsstellen der Matrix mit Blockierungspuffer (ca. gleiches Volumen wie Ligandenlösung – direkt auf den vorherigen Ansatz) blockiert (2 h bei RT bzw. 16 h bei 4°C unter Rotation). Nach dem Ende der Blockierung wurde die Matrix erneut über dem gesinterten Glasfilter 5-mal abwechselnd mit Ligandenpuffer und Waschpuffer gewaschen (jeweils 5-faches Sepharosevolumen). Danach wurde die gekoppelte Matrix in eine Chromatographie-Säule überführt, zuerst mit Startpuffer und anschließend mit 20 % Ethanol gespült und in diesem bei 4°C gelagert.

### **Aufreinigung**

Die Aufreinigung der beiden polyklonalen Seren gegen HMGB1 und TNF $\alpha$  erfolgte genauso, wie in 4.21.1 beschrieben. Auf eine Regeneration der Säule mit Guanidinhydrochlorid-Lösung nach Beendigung der Chromatographie wurde dabei stets verzichtet.

### **POD-Markierung**

Die spezifisch gegen die Zytokine HMGB1 und TNF $\alpha$  gereinigten polyklonalen Antikörper wurden teils direkt POD-konjugiert. Dazu wurde aktivierte Peroxidase<sup>21</sup> verwendet, die Konjugation erfolgte nach Herstellerangaben.

#### 4.21.2.2 Aufreinigung über NHS-Ligand Matrix

Zur Kopplung von Peptiden an Sepharose wurde aktivierte NHS-Sepharose verwendet. Sie ermöglicht im Gegensatz zu CnBr-Sepharose die Bindung an so genannte Spacer, eine Brücke zwischen Ligand und Sepharose von 10 Atomen. Dadurch können auch kurze Aminosäuresequenzen optimal dreidimensional präsentiert werden, um ein Maximum an Antikörpern durch die Aufreinigung zu erhalten.

#### Material

**NHS-aktivierte Sepharose 4 fast flow<sup>2</sup>**

**Ligandenpuffer pH8,3 (s. 4.21.2.1)**

**Blockierungspuffer pH8,3**

**15 ml** Ethanolamine<sup>5</sup>

**14,61 g** NaCl<sup>1</sup>

ad 500 ml aqua dest.; mit HCl auf pH8,3 einstellen; vor Gebrauch frisch ansetzen

**Säuerungslösung 1mM (s. 4.21.2.1)**

**Waschpuffer pH4 (s. 4.21.2.1)**

**Ethanol 20 % (unvergällt)**

**Gesinterter Glasfilter G3**

**Säule<sup>14</sup>**

#### Ligandenkopplung

Jeweils 5 mg der synthetischen Peptide<sup>1 +2</sup> (s. 4.20.2) wurden zur spezifischen Aufreinigung der entsprechenden polyklonalen Antiseren an NHS-Sepharose gekoppelt. Dabei wurde das jeweilige Peptid in 1 ml Ligandenpuffer gelöst und anschließend eine pH-Kontrolle durchgeführt (pH 8,3). Danach wurden für jede Kopplung ca. 1,5 ml der aktivierten Sepharose auf einem gesinterten



Glasfilter mit eiskalter Säuerungslösung (insgesamt ca. 20-25 ml) gewaschen und anschließend mit der Ligandenlösung (Matrix:Ligandenlösung ca. 1:1) für 4 h bei Raumtemperatur (bzw. für 16 h bei 4°C) ohne Bewegung in einer Chromatographiesäule inkubiert. Anschließend wurde die Ligandenlösung abgelassen und zur Blockierung der freien Bindungsstellen der Matrix doppeltes Volumen an Blockierungspuffer zugegeben (4 h bei Raumtemperatur bzw. 16 h bei 4°C ohne Bewegung). Nach dem Ende der Blockierung wurde die Matrix erneut über dem gesinterten Glasfilter 5-mal abwechselnd mit Ligandenpuffer und Waschpuffer gewaschen (jeweils 5-faches Sepharosevolumen). Anschließend wurde die gekoppelte Matrix erneut in eine Chromatographiesäule überführt, zuerst mit Startpuffer und anschließend mit 20 % Ethanol gespült und in diesem bei 4°C gelagert.

### **Aufreinigung**

Die Aufreinigung der beiden polyklonalen Seren gegen Peptid 1 und Peptid 2 erfolgte genau wie in 4.21.1 beschrieben. Dabei wurde stets auf eine Regeneration der Säule mit Guanidinhydrochlorid-Lösung nach Beendigung der Chromatographie verzichtet.

## **4.21.3 Aufreinigung von Zellkulturüberständen**

### **4.21.3.1 Aufreinigung über ProteinG-Sepharose**

Die im eukaryotischen Zellsystem exprimierten löslichen rekombinanten Rezeptoren wurden stets mit dem konstanten Teil eines humanen Immunglobulins G<sub>1</sub> markiert (Fc). Dadurch war es möglich, diese aus dem Zellkulturüberstand mittels ProteinG Affinitätschromatographie heraus zu reinigen.

### **Material**

**ProteinG-Sepharose 4 fast flow<sup>2</sup>**

**siehe 4.21.1**

### **Durchführung**

Die Zellkulturüberstände wurden vor der Aufreinigung 20 min bei 4°C und 5000 xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein steriles Gefäß überführt und auf Eis gekühlt. Große

Volumina wurden entweder direkt über Nacht auf die equilibrierte ProteinG-Sepharose Säule gegeben (ca. 2 ml ProteinG-Sepharose 4 fast flow - Fließgeschwindigkeit 1 ml/min) oder vorher mit Hilfe des Amicon-Rührzellensystems<sup>31</sup> eingengt (Anwendung nach Herstellerangaben). Im Folgenden wurde, wie unter 4.21.1 beschrieben, fortgefahren. Die Konzentration des Proteins wurde nach der Dialyse mit Hilfe des BCA-Protein-Assays<sup>18</sup> ermittelt. Die Reinheit des Proteins wurde stets mittels SDS-Page überprüft (s. 4.13)

#### **4.21.3.2 Aufreinigung über M2 Anti-FLAG-Gel**

Die im eukaryotischen Zellsystem exprimierten löslichen rekombinanten Zytokine wurden stets mit einem FLAG-Epitop markiert. Ebenso wurde ein Teil des bakteriell exprimierten HMGB1 zusätzlich zum N-terminalen 6 His-Tag am C-Terminus mit einem Flag Epitop markiert. Dadurch war es möglich, die gesuchten Proteine aus der Lösung mittels M2 anti-FLAG Affinitätschromatographie heraus zu reinigen.

#### **Material**

##### **M2 Anti-FLAG-Gel<sup>5</sup>**

##### **Natriumcitratpuffer 0,1M pH2,5**

**2,94 g**      Tri-Natriumcitrat<sup>5</sup>

ad 100 ml Aqua dest.; mit HCl auf pH2,5 einstellen; bei 4°C lagern

##### **PBS (s. 4.2)**

##### **Tris-Lösung 1M (s. 4.21.1)**

#### **Durchführung**

Zellkulturüberstand oder über Ni-Agarose gereinigte HMGB1-Flag Proteinlösung (nach LPS Entfernung s. 4.17.2) wurde auf die mit PBS equilibrierte M2 Anti-Flag Säule gegeben (ca. 1 ml M2 Anti-FLAG-Gel). Das anschließende Waschen der Säule (mit PBS), die Elution des gebundenen Proteins (mit Citratpuffer) und die Neutralisation des Eluats (mit 1M Tris-Lösung) sowie die weitere Behandlung des Proteins erfolgten, wie unter 4.21.1 beschrieben. Die M2 Anti-

FLAG Matrix wurde dabei nicht mit Guanidinhydrochlorid regeneriert. Die Konzentration des Proteins wurde nach der Dialyse mit Hilfe des BCA-Protein-Assays<sup>18</sup> ermittelt. Die Reinheit des Proteins wurde stets in der SDS-Page überprüft (s. 4.13).

## 4.22 ELISA

### Material

#### **PBS-T (0,05 % Tween20) pH7,2 (s. 4.14)**

#### **Magermilchlösung 5 % (s. 4.14)**

#### **Beschichtungspuffer pH 9,6**

**3,11 g** Natriumcarbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)<sup>1</sup>

**6,0 g** Natriumhydrogencarbonat (NaHCO<sub>3</sub>)<sup>1</sup>

ad 1000 ml Aqua bidest.; pH auf 9,6 einstellen; bei 4°C lagern

#### **2 % BSA-PBS**

**2 g** Bovines Serum Albumin Fraktion V (BSA)<sup>1</sup>

ad 100 ml PBS (steril); vor Gebrauch frisch ansetzen

#### **TMB-Puffer pH5,0**

**8,2 g** Natriumazetat (CH<sub>3</sub>COONa)<sup>5</sup>

**3,15 g** Zitronensäure-Monohydrat (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>·xH<sub>2</sub>O)<sup>1</sup>

ad 1000 ml Aqua bidest.; auf pH5,0 einstellen; bei 4°C lagern

#### **1 % BSA-TBS-Puffer pH6,8**

**24,23 g** Tris(hydroxymethyl)aminomethan (*Tris*)<sup>1</sup>

**8,77 g** NaCl<sup>1</sup>

ad 1000 ml Aqua dest.; mit HCl auf pH6,8 einstellen; bei 4°C lagern;  
kurz vor Gebrauch 1 % BSA<sup>1</sup> auf das benötigte Volumen zugeben

**TMB Stammlösung**

**6 mg**            3,3',5,5'Tetramethylbenzidin (TMB)<sup>5</sup>

ad 1 ml DMSO<sup>5</sup>; lichtgeschützt bei RT lagern; haltbar ca. 1Woche

**TMB Gebrauchslösung**

**10 ml**            TMB-Puffer (vor Gebrauch auf 37°C erwärmt)

**332 µl**            TMB-Stammlösung

**3,3 µl**            30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>1</sup>

vor Gebrauch frisch ansetzen und sofort verbrauchen

**NUNC-Maxisorp® Polystyren 96-Loch-Platten<sup>23</sup>****Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1M**

**472ml**            Aqua dest.

**28ml**            Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 96 %<sup>1</sup>

Säure unter Rühren über einen Glasstab ins Wasser laufen lassen; bei RT lagern

**Antikörper und lösliche Rezeptoren:**

Antikörper bzw. Rezeptor	gebundenes Antigen	Isotyp	Tierart	Konzentration	Referenz
goat-α-rabbit IgG-POD	Kaninchen IgG	poly IgG	Ziege	1:10000	Jackson <sup>28</sup>
goat-α-mouse IgG-POD	Maus IgG	poly IgG	Ziege	1:10000	Jackson <sup>28</sup>
goat-α-human IgG-POD	Mensch IgG (γ-Ketten spez.)	poly IgG	Ziege	1:4000	SBA <sup>27</sup>
SA-POD	Streptavidin	-	-	1:4000	SBA <sup>27</sup>
M2 mouse-α-FLAG-POD <sup>5</sup>	FLAG-Epitop	IgG1	Maus	1:10000	Sigma <sup>5</sup>
rabbit-α-canine HMGB1-POD	Hund HMGB1	poly IgG (HMGB1 affinitätsgereinigt)	Kaninchen	1:10000	s. 4.20.1 + 4.21.2.1
rabbit-α-canine TNFα-POD	Hund TNFα	poly IgG (TNFα affinitätsgereinigt)	Kaninchen	1:10000	s. 4.20.1 +4.21.2.1
15G6 mouse-α-	FLAG-Epitop	IgG3	Maus	3 µg/ml	#

FLAG					
goat- $\alpha$ -human IgG	Mensch IgG ( $\gamma$ -Ketten spez.)	poly IgG	Ziege	3 $\mu$ g/ml	SBA <sup>27</sup>
goat- $\alpha$ -canine TNF $\alpha$	Hund TNF $\alpha$	poly IgG	Ziege	0,5 $\mu$ g/ml	R+D Sys. <sup>29</sup>
goat- $\alpha$ -canine TNF $\alpha$ - biot.	Hund TNF $\alpha$	poly IgG	Ziege	0,4 $\mu$ g/ml	R+D Sys. <sup>29</sup>
mouse- $\alpha$ -human HMG1	Mensch HMGB1	IgG2	Maus	2 $\mu$ g/ml	R+D Sys. <sup>29</sup>
rabbit- $\alpha$ -canine TNF $\alpha$	Hund TNF $\alpha$	poly IgG (ProteinA affinitätsgereinigt)	Kaninchen	1:4000	s. 4.20.1
rabbit- $\alpha$ -canine HMGB1	Hund HMGB1	poly IgG (ProteinA affinitätsgereinigt)	Kaninchen	1:4000	s. 4.20.1
rabbit- $\alpha$ -canine HMGB1–Peptid1	Hund HMGB1 Peptid1	poly IgG (Peptid 1 affinitätsgereinigt)	Kaninchen	5 $\mu$ g/ml	s. 4.20.2
rabbit- $\alpha$ -canine HMGB1–Peptid2	Hund HMGB1 Peptid2	poly IgG (Peptid 2 affinitätsgereinigt)	Kaninchen	5 $\mu$ g/ml	s. 4.20.2
P60-Fc	Hund TNF $\alpha$	rekombinantes Fusionsprotein	Mensch- Hund	1:200	s. 4.19.3 + 4.21.3.1
RAGE-Fc	Hund HMGB1 und andere AGE	rekombinantes Fusionsprotein	Mensch- Hund	1:200	s. 4.19.3 + 4.21.3.1

# 15G6  $\alpha$ -Flag von Thomas Göbel und Birgit Viertlböck zur Verfügung gestellt

**Tab. 4.6: Im ELISA verwendete Antikörper und Rezeptoren**

### Standardverfahren

Alle folgenden Volumenangaben beziehen sich jeweils auf eine Kavität einer NUNC-Maxisorp® Polystyren 96-Loch-Platte. Sofern nicht anders aufgeführt, wurden die ELISA-Platten über Nacht bei 4°C mit jeweils 100  $\mu$ l Antikörperlösung (Verdünnung in Beschichtungspuffer) beschichtet und im Folgenden zwischen den jeweiligen Arbeitsschritten mit Hilfe eines ELISA-Waschers je 3-mal mit 300  $\mu$ l PBS-T gewaschen. Die Blockierung der restlichen Bindungsstellen am nächsten morgen erfolgte mit 200  $\mu$ l Magermilchpulver für eine Stunde bei 37°C. Falls nicht anders vermerkt, erfolgte jeder folgende Inkubationsschritt mit einem Antikörper für 60 min bei 37°C und die Verdünnung der Antikörper in PBS-T. Zur Entwicklung des ELISA wurden 100  $\mu$ l TMB Gebrauchslösung zugegeben und für ca. 4-10 min in Dunkelheit bei 37°C inkubiert. Eine positive Reaktion wurde durch eine Blaufärbung der Delle angezeigt. Ohne Waschen die

Peroxidasereaktion durch Zugabe von 50  $\mu$ l 1M Schwefelsäure gestoppt, wobei sich ein Farbumschlag von blau nach gelb ergab. Zur Quantifizierung wurde der ELISA im Plattenphotometer bei 450 nm gemessen.

### **TNF $\alpha$ ELISA2**

Der TNF $\alpha$  ELISA2 wurde nach der Beschichtung mit 2 % BSA-PBS Lösung blockiert. Die Verdünnung der verwendeten Antikörper erfolgte in 1 % BSA-PBS Lösung. Das weitere Vorgehen entsprach dem Standardverfahren.

### **HMGB1 Capture ELISA**

Die Beschichtung der ELISA-Platte erfolgte über Nacht bei RT. Der Beschichtungsantikörper wurde dabei in PBS (s. 4.2) verdünnt. Die Blockierung der übrigen Bindungsstellen erfolgte durch eine 2 % BSA-PBS Lösung für 2 h bei RT. Die aufgetragenen Proben wurden mindestens zu 50 mit 1 % BSA-TBS Lösung vorverdünnt, wobei alle weiteren Verdünnungen der Proben ebenfalls in 1 % BSA-TBS vorgenommen wurden. Die Probeninkubation erfolgte für 24 h bei RT. Der Detektionsantikörper wurde in 1 % BSA-PBS Lösung verdünnt. Die Inkubation der Platte mit diesem Antikörper erfolgte für eine Stunde bei RT. Das weitere Vorgehen entsprach dem Standardverfahren.

### **IL-6 ELISA**

Für die Messung von caninem IL-6 wurde das **DuoSet ELISA Development Kit**<sup>29</sup> verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

## **4.23 Zellyse**

Zur Gewinnung der Gesamtproteinfraktion einer Zelle wurden die Zellen mit dem Detergens Triton-X-100 lysiert, zentrifugiert und danach der proteinhaltige Überstand weiter analysiert.

**Material****NaCl-Lösung 5M**

**29,22 g** NaCl<sup>1</sup>

ad 100 ml Aqua bidest.; bei RT lagern

**Tris-Lösung 0,5M pH7,4**

**6,05 g** Tris(hydroxymethyl)aminomethan (*Tris*)<sup>1</sup>

ad 100 ml Aqua bidest.; mit HCl auf pH7,4 einstellen; bei RT lagern

**10 % Natriumazid-Lösung**

**10 g** Natriumazid (NaN<sub>3</sub>)<sup>5</sup>

ad 100 ml PBS; bei RT lagern

**10 % TritonX 100**

**1 ml** TritonX 100<sup>5</sup>

ad 10 ml Aqua bidest; bei 4°C lagern

**25x Complete (Proteaseinhibitor)**

**1 Tabl.** Complete<sup>21</sup>

ad 2 ml Aqua bidest; Aliqots à 40 µl; bei -20°C lagern

**2x Lysestammlösung**

**10 ml** Tris-Lösung 0,5M pH7,4

**3 ml** NaCl-Lösung 5M

**1 ml** EDTA-Lösung 0,5M pH8,0 (s.0)

**1 ml** 10 % Natriumazid-Lösung

ad 50 ml Aqua bidest.; bei 4°C lagern

**Lysepuffer**

<b>500 µl</b>	2xLysestammlösung
<b>100 µl</b>	10 % - TritonX 100
<b>40 µl</b>	25xComplete
<b>360 µl</b>	aqua bidest.

vor Gebrauch frisch ansetzen

**Durchführung**

$5 \times 10^7$  bis  $1 \times 10^8$  Zellen wurden 10 min bei 4°C mit 225 xg zentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml Lysepuffer resuspendiert. Nach 45 min Inkubation auf Eis und 30 min Zentrifugation mit 16000 x g bei 4°C wurde der Überstand (=Zellysat) in ein neues Röhrchen überführt und bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C aufbewahrt.

**4.24 Immunpräzipitation****Material****ProteinG-Sepharose 4 fast flow<sup>2</sup>****1x SDS-Probenpuffer**

<b>200 µl</b>	6xSDS-Probenpuffer (s.0)
<b>1 ml</b>	Aqua bidest.

in Aliquots à 1 ml bei -20°C lagern

**PBS (s. 4.2)****Durchführung**

Pro Ansatz wurden 60 µl ProteinG-Sepharose (50 % Sepharose und 50 % Lagerungspuffer) mit 940 µl PBS versetzt und abzentrifugiert (200 xg für 3 min bei 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und 100 µl der gereinigten Fc-Fusionsproteinlösung zusammen mit 900 µl PBS auf die Sepharose gegeben und für 3 h bei 4°C end-over-end inkubiert. Die Sepharose wurde abzentrifugiert (200 xg für 3 min bei 4°C) und der Überstand abermals verworfen. Die



gekoppelte Sepharose wurde nun mit den zu testenden Proben (Gesamtvolumen auf 1 ml mit PBS aufgefüllt) über Nacht bei 4°C end-over-end inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Sepharose abermals 4-mal abzentrifugiert und dazwischen jeweils mit 1 ml PBS gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, die Sepharose in 100 µl 1xSDS Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 100°C gekocht, um die Bindung zwischen Probenprotein,

Rezeptorprotein und Sepharose zu zerstören. Das Gemisch wurde kurz zentrifugiert (11000 xg 10 s), die nun im Überstand enthaltene Proteinlösung in ein neues Röhrchen überführt und bei -20°C bis zur Analyse aufbewahrt.

#### 4.25 Intrazytoplasmatische Färbung mittels POD-Konjugate

Zur Detektion intrazytoplasmatischer rekombinanter Zytokine wurden 293T-Zellen mit dem entsprechenden Plasmid in einer 24-Loch-Platte transfiziert (s. 4.19.1). Zwei Tage nach der Transfektion wurden diese Zellen fixiert und gefärbt.

#### Material

##### PBS (s. 4.2)

##### Aceton-Methanol Lösung

50 ml Aceton<sup>1</sup>

50 ml Methanol<sup>1</sup>

bei RT lagern; vor Gebrauch lichtgeschützt auf -20°C kühlen - Vorsicht Explosionsgefahr!

##### FBS-PBS Lösung

2,5 ml FBS<sup>4</sup>

50 mg Natriumazid (NaN<sub>3</sub>)<sup>5</sup>

ad 50 ml PBS; vor Gebrauch frisch ansetzen; bei 4°C lagern

##### NaAzetat Lösung 0,1M pH4,8

0,82 g NaAzetat<sup>5</sup>

auf pH4,8 einstellen; bei RT lagern

**Amino-Ethyl-Carbazol Lösung (AEC)<sup>5</sup>**

Zusammensetzung der Lösung nach Herstellerangaben; bei RT lagern

**Färbelösung**

<b>560 µl</b>	NaAzetat-Lösung 0,1M pH4,8
<b>2 µl</b>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 % <sup>1</sup>
<b>30 µl</b>	Amino-Ethyl-Carbazol

erst kurz vor Gebrauch mischen; lichtgeschützt behandeln

**1. Antikörperlösung**

<b>19 µg</b>	15G6 α-FLAG Antikörper*
--------------	-------------------------

\*von T. Göbel und B. Viertböck zur Verfügung gestellt

ad 1 ml FBS-PBS verdünnen; erst kurz vor Gebrauch mischen; lichtgeschützt behandeln

**2. Antikörperlösung**

<b>5 µl</b>	rabbit-α-mouse Ig POD <sup>30</sup>
-------------	-------------------------------------

ad 1 ml PBS; erst kurz vor Gebrauch mischen; lichtgeschützt behandeln

**Durchführung**

Der Überstand der transfizierten 293T Zellen wurde vorsichtig abgenommen, abzentrifugiert (5 min – 3000 xg) und für weitere Analysen auf -20°C gelagert. Alle Volumenangaben im Weiteren beziehen sich auf eine Delle einer 24-Loch-Platte. Sofort nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen einmal vorsichtig mit 500 µl PBS gewaschen und anschließend mit 500 µl Aceton-Methanol Lösung für 10 min bei RT fixiert. Danach wurden die Zellen wiederum 3-mal mit 500 µl PBS/Delle gewaschen und die restlichen möglichen Bindungsstellen der Kavität mit 500 µl FBS-PBS Lösung für 1 h bei RT blockiert. Nach einer Stunde wurde die Lösung abgenommen und 300 µl der 1. Antikörperlösung für eine weitere Stunde bei RT auf die Zellen gegeben. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die 1. Antikörperlösung abgenommen, die Zellen 3-mal mit je 500 µl PBS gewaschen und anschließend die 2. Antikörperlösung für eine weitere Stunde bei RT dazugegeben. Nach Ablauf dieser Zeit erfolgte die Abnahme der 2. Antikörperlösung, danach wurden die Zellen wiederum 3-mal mit 500 µl PBS gewaschen. 300 µl der frisch angesetzten

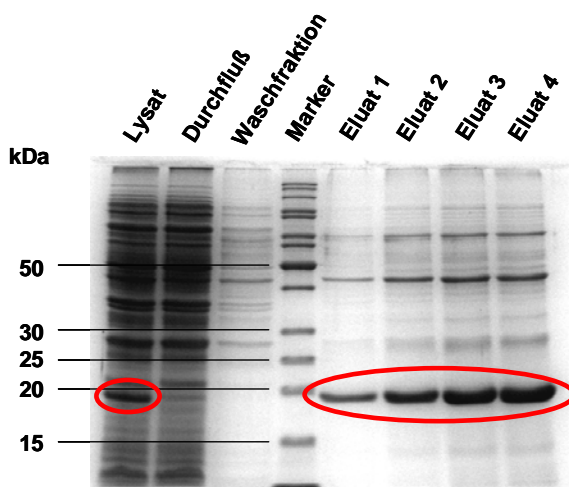
Färbelösung wurden nun unter Lichtabschluss für 1 h bei RT auf die Zellen gegeben. Am Ende der Färbung wurden die Zellen nun dreimal mit 500  $\mu$ l Aqua bidest. gewaschen und zum Schluss mit 500  $\mu$ l Aqua bidest. überschichtet. Die Zellen konnten nun unter dem Lichtmikroskop beurteilt werden.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Klonierung, Expression und Aufreinigung von caninem TNF $\alpha$

Für die Klonierung von caninem TNF $\alpha$  wurden zu Beginn Primer nach bereits publizierten Sequenzen [74] konstruiert (s. 4.7). Anschließend konnten mit diesen aus cDNA, welche aus LPS stimulierten PBL gewonnen wurde, die gesuchte genetische Information per PCR amplifiziert werden. Durch die Wahl der Primer war es dabei möglich, nur den löslichen Anteil des Proteins zu vervielfältigen [74]. Das so erhaltene, ca. 500bp lange DNA Stück wurde nun in die entsprechenden Vektoren kloniert und das fertige Plasmid zur Kontrolle über die Insertionsstelle hinweg sequenziert (s. 4.12).

Für die Proteinexpression in Bakterien wurde der Vektor pET100/D-TOPO verwendet. Dieser Vektor fügt dem rekombinanten Protein eine ca. 3 kDa lange Markierung hinzu, welche einen Abschnitt aus sechs aufeinander folgenden Histidinen beinhaltet (6 His-Tag). Über diese Markierung war es später möglich, das gesuchte rekombinante Protein aus der Gesamtheit aller bakteriellen Proteine zu identifizieren und aufzureinigen. Bei der Expression des rekombinanten Proteins wurde wie unter Abschnitt 4.15 beschrieben vorgegangen. Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe der Ni-NTA Affinitätschromatographie (s. 4.16). Die Analyse der Expression und der Aufreinigung wurde, wie in Abb. 5.1 dargestellt, mit Hilfe der SDS-Page durchgeführt. Aus 2l Expressionsvolumen konnten somit ca. 10 mg rekombinantes Protein aufgereinigt werden.

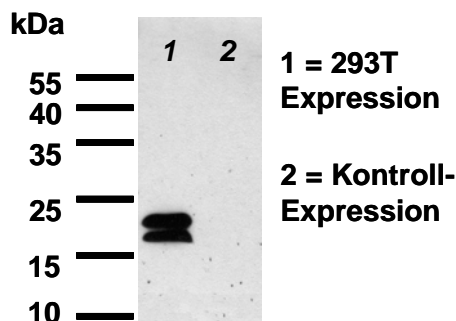


**Abb. 5.1: TNF $\alpha$  Aufreinigung über Ni-NTA Affinitätschromatographie**

10  $\mu$ l der verschiedenen Stufen der Aufreinigung (Bakterienlysat, Durchfluß der nicht gebundenen bakteriellen Proteine, Waschfraktion der Ni-NTA Agarose und Eluate) wurden in einer SDS-Page (12 %) aufgetragen und anschließend mit Coomassie Blue gefärbt.

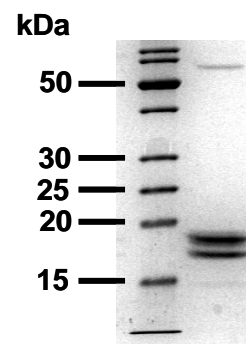
Im Lysat ist deutlich das rekombinante Protein bei ca. 19 kDa zu erkennen. Erst bei der Elution löst sich das gebundene Protein in hoher Konzentration und Reinheit von der Ni-Agarose.

Für die Expression in eukaryotischen Zellen wurde der modifizierte Vektor pCR3–HA-FLAG verwendet. Er fügt dem rekombinanten TNF $\alpha$  N-terminal das Signalpeptid des Hämagglutininproteins (HA) und eine so genannte FLAG Markierung (FLAG-Tag) hinzu. Das HA-Signalpeptid wurde benötigt, damit das rekombinante Protein in das endoplasmatische Retikulum eintritt, dort sekundäre Modifikationen erhält und anschließend extrazellulär sezerniert wird. Mit Hilfe des FLAG-Tags konnte das Protein wiederum im Zellkulturüberstand identifiziert und aufgereinigt werden. Die Expression des rekombinanten Proteins erfolgte, wie im Abschnitt 4.19 beschrieben. Für die Expression größerer Mengen wurden dabei mehrere Petri-Schalen 293T Zellen transient transfiziert. Dieser Zellkulturüberstand enthielt durchschnittlich 6  $\mu\text{g/ml}$  des gesuchten Zytokins (gemessen im WEHI-Assay s. 5.3). Wie in Abb. 5.3 dargestellt, zeigte sich im Western Blot für TNF $\alpha$ -FLAG aus eukaryotischer Expression typischerweise eine Doppelbande bei ca. 17 kDa und 19 kDa. Das FLAG markierte Protein wurde anschließend über M2-anti-FLAG Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die zur Kontrolle nach der Aufreinigung durchgeführte SDS-Page zeigte hierbei wiederum die für das rekombinante TNF $\alpha$ -FLAG typischen Banden bei ca. 17 und 19 kDa (s. Abb. 5.2).



**Abb. 5.3: Zellkulturüberstand TNF $\alpha$ -FLAG – Western Blot**

10  $\mu\text{l}$  Zellkulturüberstand transient mit TNF $\alpha$ -FLAG transfizierter 293T Zellen wurden in der SDS-Page (12 %) aufgetrennt und auf Nitrouzellulose transferiert. Die Detektion des rek. Proteins erfolgte mit M2-anti-FLAG POD (1  $\mu\text{g/ml}$ ). Deutliche Doppelbanden bei ca. 17 und 19 kDa zeigen das FLAG markierte TNF $\alpha$  an (1). Als Negativkontrolle wurden ebenfalls 10  $\mu\text{l}$  einer 293T Transfektion mit einem membranständigen Protein aufgetragen (2).



**Abb. 5.2: Aufgereinigtes TNF $\alpha$ -FLAG – SDS-Page**

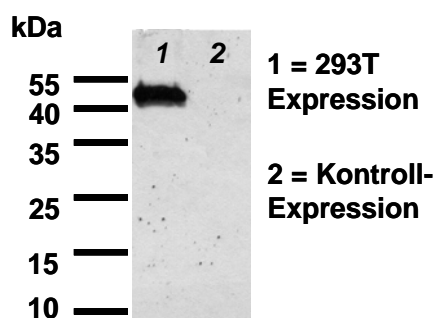
10  $\mu\text{l}$  über M2-anti-FLAG Affinitätschromatographie gereinigter Zellkulturüberstand transient mit TNF $\alpha$ -FLAG transfizierter 293T Zellen wurden in der SDS-Page (12 %) aufgetragen und mit Coomassie Blue gefärbt. Die Banden bei ca. 17 kDa und 19 kDa repräsentieren das rekombinante TNF $\alpha$ .

Parallel zur transienten Transfektion wurden CHO Zellen stabil mit TNF $\alpha$ -FLAG transfiziert (s. 4.19.2). Nach Selektion und Kontrolle der Überstände (s. 4.19.2) konnte somit die Zelllinie CHOTA1 etabliert werden. Ihr Überstand enthielt im Durchschnitt 0,4 $\mu$ g rekombinantes Protein pro ml Zellkulturüberstand (gemessen im WEHI-Assay s. 5.3). Dieser Überstand wurde aliquotiert, bei -80°C gelagert und direkt als Standard in den etablierten ELISA Systemen (s. 5.6) eingesetzt.

## 5.2 Klonierung, Expression und Aufreinigung von caninem P60

Für die Klonierung von caninem P60, dem TNF $\alpha$  Rezeptor vom Typ 1, wurden für den extrazellulären Anteil des Rezeptors nach bereits publizierten Sequenzen [151] Primer konstruiert (s. 4.7.2). Damit konnte auf cDNA von LPS stimulierten PBL die gesuchte genetische Information per PCR amplifiziert werden. Das so erhaltene ca. 650bp lange DNA-Stück wurde nun in die entsprechenden Vektoren kloniert und das fertige Plasmid zur Kontrolle über die Insertionsstelle hinweg sequenziert.

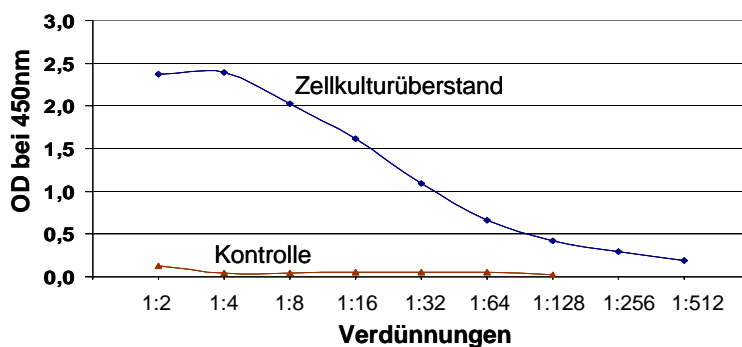
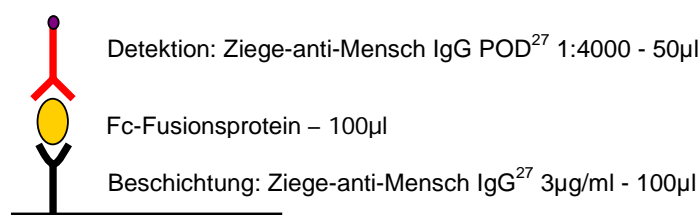
Für die Proteinexpression in Säugerzellen wurde der modifizierte Vektor pCR3-huFc verwendet. Er fügt dem eigentlichen rekombinanten P60 C-terminal die Teilsequenz (Hinge Region, CH<sub>2</sub>- und CH<sub>3</sub>-Domäne) des konstanten Anteils eines humanen Immunglobulins (IgG) 1 hinzu (Fc-Tag). Dieser wird, vergleichbar dem FLAG-Tag des rekombinanten TNF $\alpha$ , benötigt, um das Fusionsprotein im Zellkulturüberstand zu identifizieren und aufzureinigen. Es wurden sowohl 293T Zellen transient als auch CHO Zellen stabil mit dem Rezeptorkonstrukt transfiziert. Zur Kontrolle wurde jeweils mit einem membranständigen Kontrollprotein transfiziert. Das exprimierte Fusionsprotein P60-Fc konnte, wie berechnet, bei einem molekularen Gewicht von ca. 50 kDa detektiert werden (s. Abb. 5.4).



**Abb. 5.4: Zellkulturüberstand P60-Fc – Western Blot**

Jeweils 10  $\mu$ l Zellkulturüberstand transient mit P60-Fc oder einem membranständigen Kontrollprotein transfizierter 293T Zellen wurden im Western Blot aufgetragen. Die Detektion des rekombinanten Proteins erfolgte bei ca. 50 kDa mit den Antikörpern Kaninchen-anti-Mensch IgG<sup>27</sup> und Ziege-anti-Kaninchen IgG POD<sup>28</sup>.

Da die Menge des exprimierten Proteins im Säugerzellsystem äußerst gering war, wurde die genetische Information für P60-Fc zusätzlich in den Vektor pMT/V5-His TOPO kloniert. Mit diesem Vektor konnten nun SL3 Drosophilazellen transfiziert werden. Zur Kontrolle der Expression wurde ein Fc-Tag ELISA verwendet. Wie Abb. 5.5 zeigt, konnten dabei im Zellkulturüberstand deutliche Mengen an Fc-Fusionsprotein detektiert werden. Die Aufreinigung des Fusionsproteins erfolgte über ProteinG Affinitätschromatographie (s. 4.21.3), die Reinheit des Proteins wurde wiederum in der SDS-Page kontrolliert.



**Abb. 5.5: P60-Fc Zellkulturüberstand aus SL3 Expression im Fc-Tag ELISA**

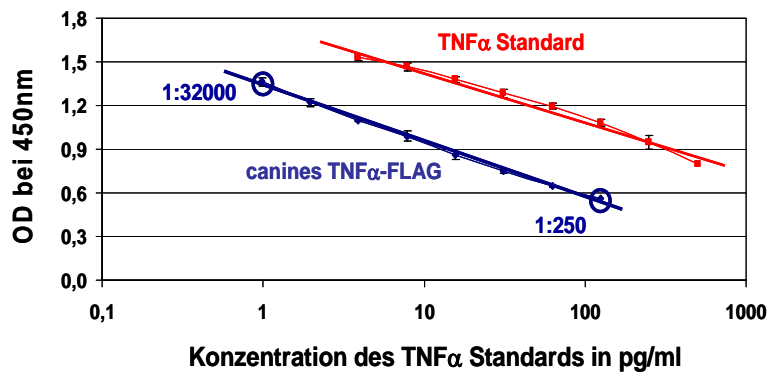
**Oben:** Aufbau des Fc-Tag ELISA

**Unten:** P60-Fc Zellkulturüberstand aus SL3 Expression wurde im Fc-Tag ELISA positiv in log<sub>2</sub> Verdünnungen getestet; Als Kontrolle diente dabei Zellkulturüberstand untransfizierter SL3 Zellen.

### 5.3 Bioaktivitätskontrolle des rekombinanten TNF $\alpha$ -FLAG und P60-Fc

Die biologische Aktivität der rekombinanten Proteine wurde im WEHI-Bioassay getestet. Die murinen Fibrosarkomzellen WEHI 164 sterben in Anwesenheit von biologisch aktivem TNF $\alpha$ . Durch die Titration des TNF $\alpha$ -FLAG im Assay konnte damit abhängig von der eingesetzten Konzentration des rekombinanten Proteins die Vitalität der WEHI Zellen bestimmt werden. Die lebenden Zellen im Ansatz wurden durch das Tetrazoliumsalz XTT detektiert. Gleichzeitig wurde neben caninem TNF $\alpha$ -Flag auch ein TNF $\alpha$  Standard (rekombinantes humanes TNF $\alpha$ ) bekannter Konzentration mitgeführt, so dass der Vergleich der Extinktionen im linearen Bereich der beiden Verdünnungen zusätzlich eine Konzentrationsbestimmung des caninen TNF $\alpha$ -FLAG

erlaubte (s. Abb. 5.6). Der messbare Bereich für TNF $\alpha$  im WEHI-Assay liegt ungefähr zwischen 10 bis 400pg/ml.

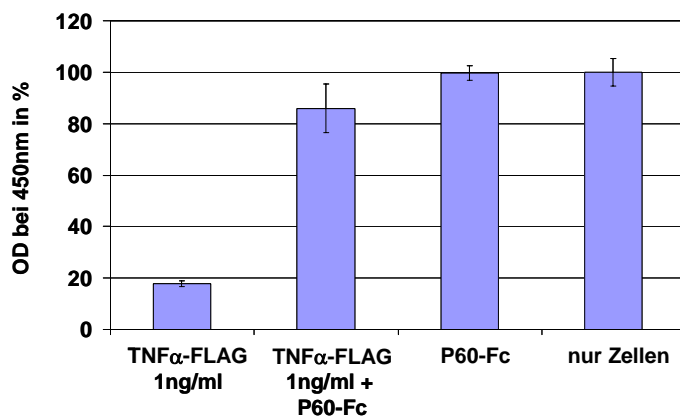


**Abb. 5.6: Bioaktivität und Konzentrationsbestimmung von TNF $\alpha$ -FLAG im WEHI-Bioassay**

Darstellung des linearen Bereichs mit Regressionsgerade der log<sub>2</sub> Titration von TNF $\alpha$  Standard und caninem TNF $\alpha$ -FLAG (CHOTA1 Zellkulturüberstand, Verdünnungen von 1:250 bis 1:32000). Je höher die Konzentration an TNF $\alpha$ -FLAG oder TNF $\alpha$  Standard im Ansatz, desto mehr WEHI-Zellen sterben und desto geringer ist die optische Dichte.

Der Vergleich der Extinktionen im linearen Bereich zwischen Standard und Probe ermöglicht die Berechnung der Ausgangskonzentration des eingesetzten TNF $\alpha$ -FLAG.

Zur Überprüfung der biologischen Aktivität des rekombinanten P60-Fc wurde dieses mit TNF $\alpha$ -FLAG vermischt und anschließend auf die WEHI Zellen gegeben. Die erfolgreiche Bindung zwischen Rezeptor und Ligand neutralisierte die zytotoxische Wirkung des TNF $\alpha$ -FLAG (s. Abb. 5.7).



**Abb. 5.7: Bioaktivität von P60-Fc im WEHI-Bioassay**

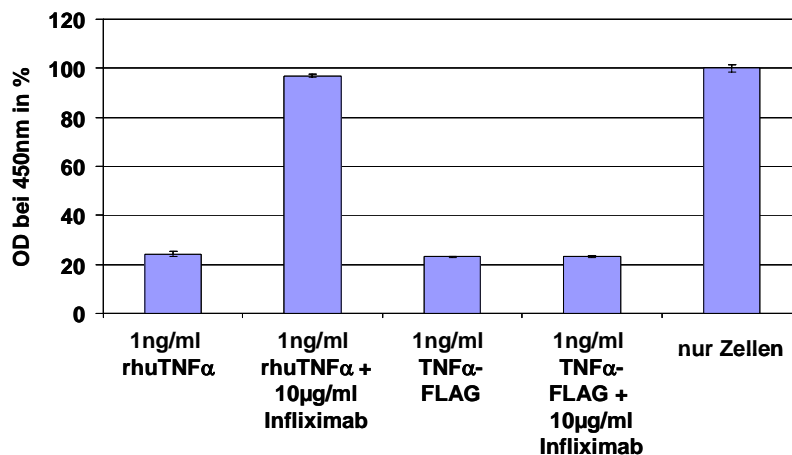
1 ng/ml TNF $\alpha$ -Flag ist toxisch für nahezu alle WEHI Zellen im Ansatz. Die gleiche Menge des Zytokins wird von P60-Fc Zellkulturüberstand aus 293T Expression fast vollständig neutralisiert (125  $\mu$ l Zellkulturüberstand pro ml Gesamtansatz). P60-Fc allein hat dabei keinerlei Effekte auf die WEHI Zellen. (MW und SD aus 3 getrennten Versuchen; jeweils im 3-fach Ansatz)

## 5.4 Kreuzreaktivitätstest humaner anti-TNF $\alpha$ Therapeutika

Mit Hilfe des WEHI Bioassays und des rekombinanten TNF $\alpha$ -FLAG war es möglich, zwei humane anti-TNF $\alpha$  Therapeutika auf ihre mögliche Kreuzreaktivität gegenüber caninem TNF $\alpha$  zu testen. Dabei wurde überprüft, ob die eingesetzten Wirkstoffe Infliximab und Etanercept in der



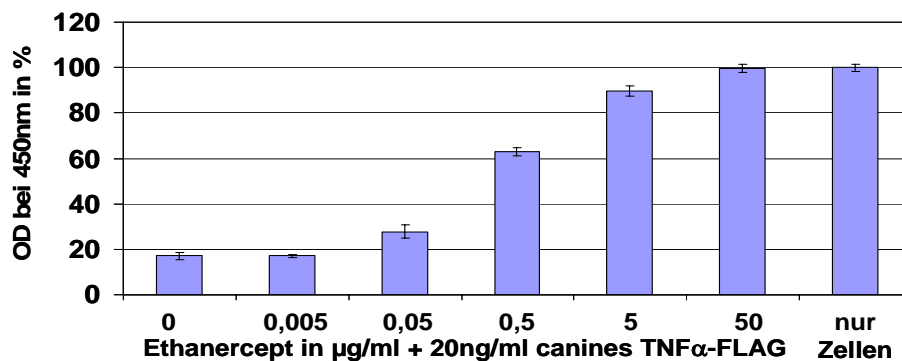
Lage waren, die zytotoxische Wirkung von TNF $\alpha$ -FLAG zu neutralisieren. Infliximab, ein humanisierter Maus-anti-Mensch TNF $\alpha$  Antikörper, konnte zwar die Wirkung von rekombinantem humanen TNF $\alpha$  (rhuTNF $\alpha$ ) neutralisieren, nicht aber die des caninen TNF $\alpha$ -FLAG (s. Abb. 5.8).



**Abb. 5.8: Infliximab und TNF $\alpha$ -FLAG im WEHI Bioassay**

Die zytotoxische Wirkung von 1 ng/ml rhuTNF $\alpha$  auf die WEHI-Zellen wurde von Infliximab nahezu vollständig neutralisiert. Im Vergleich dazu konnte keinerlei Effekt von Infliximab auf die zytotoxische Wirkung von caninem TNF $\alpha$ -FLAG beobachtet werden. (MW und SD aus 3 getrennten Versuchen; jeweils im 3-fach Ansatz)

Im Vergleich dazu zeigte Etanercept, der lösliche humane TNF-Rezeptor Typ II, als Fc-Fusionsprotein neben der zu erwartenden Neutralisation von humanem TNF $\alpha$  auch sehr gute dosisabhängige, neutralisierende Wirkung gegenüber den zytotoxischen Eigenschaften von rekombinantem caninen TNF $\alpha$ -FLAG (s. Abb. 5.9).

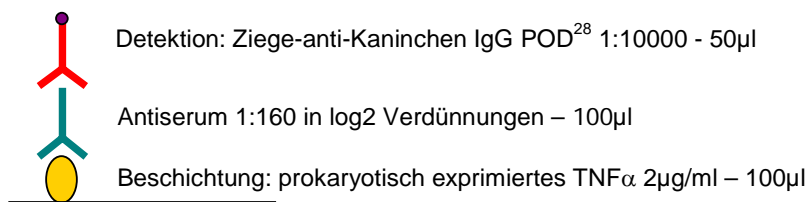


**Abb. 5.9: Etanercept und TNF $\alpha$ -FLAG im WEHI-Bioassay**

Etanercept neutralisiert dosisabhängig auch hohe Konzentrationen von 20 ng/ml an rekombinantem caninen TNF $\alpha$ -FLAG im WEHI-Bioassay (MW und SD aus 3 getrennten Versuchen; jeweils im 4-fach Ansatz).

## 5.5 Gewinnung polyklonaler Antikörper gegen canines TNF $\alpha$

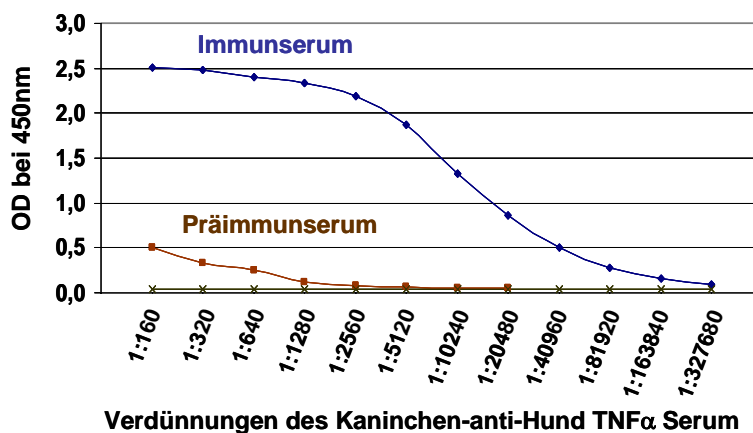
Zur Gewinnung polyklonaler Antikörper gegen canines TNF $\alpha$  wurde ein Kaninchen, wie in Abschnitt 4.20 beschrieben, mehrfach mit rekombinantem Protein aus bakterieller Expression (s. 5.1) immunisiert. Zwei Wochen nach der letzten Immunisierung wurde dem Tier erstmals Blut entnommen. Das daraus gewonnene Serum konnte nun im ELISA auf seinen spezifischen  $\alpha$ -TNF $\alpha$  Antikörper Titer hin getestet (s. Abb. 5.10) werden. Daraus ergaben sich gebräuchliche Verdünnungen des Serums für weitere ELISA von 1:4000 und für Western Blots von 1:1000.



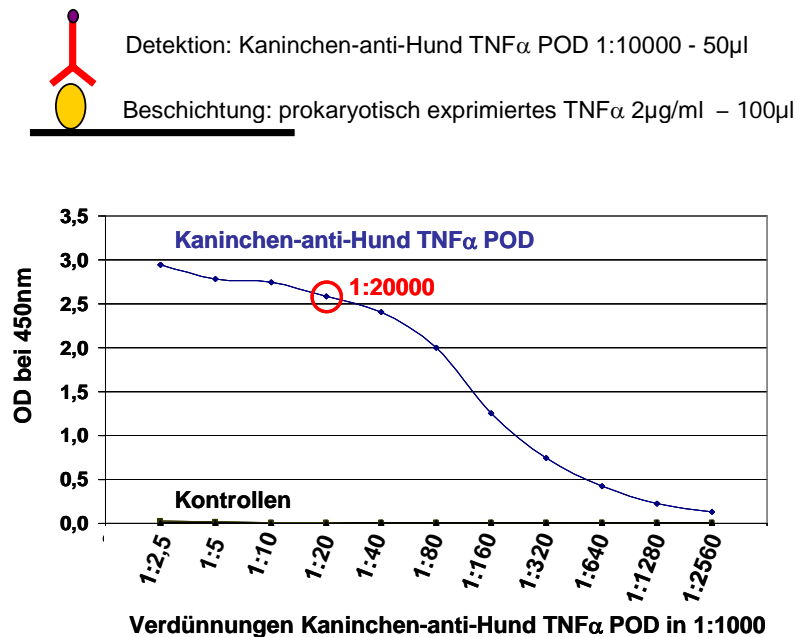
**Abb. 5.10: Antikörper-Titerbestimmung des anti-TNF $\alpha$  Serum im ELISA**

**Oben:** Aufbau des ELISA

**Unten:** Titration des Kaninchenserums vor und nach der Immunisierung mit rekombinantem caninem TNF $\alpha$  im ELISA.



Um die spezifischen Antikörper gegen canines TNF $\alpha$  aus dem polyklonalen Serum zu isolieren und diese dann direkt mit POD zu koppeln, wurde das Serum affinitätsgereinigt. Dazu wurde zunächst rekombinantes TNF $\alpha$  aus bakterieller Expression an CnBr aktivierte Sepharose gekoppelt. Anschließend konnten die TNF $\alpha$  spezifischen Antikörper über Affinitätschromatographie an der so erstellten Ligandenmatrix gereinigt werden. Diese Antikörper wurden nun direkt an POD gekoppelt. Der Erfolg der Kopplung wurde im ELISA überprüft (s. Abb. 5.11).



**Abb. 5.11: Titration des direkt POD gekoppelten Antikörpers Kaninchen-anti-Hund TNF $\alpha$  POD im ELISA**

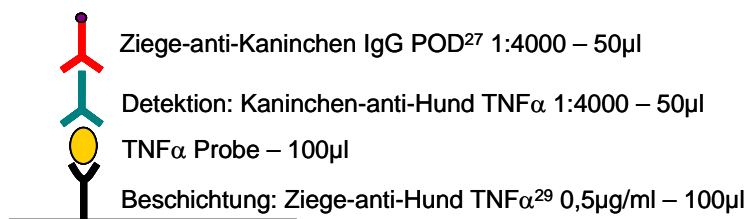
**Oben:** Aufbau des ELISA

**Unten:** Titration des direkt POD gekoppelten anti-TNF $\alpha$  Serums. Als Kontrolle diente das poliklonale Ziege-anti-Mensch IgG POD<sup>27</sup> Serum; Gebräuchliche Verdünnung für weitere ELISA: 1:20000;

## 5.6 Aufbau verschiedener TNF $\alpha$ ELISA

Mit dem aufgereinigten rekombinanten TNF $\alpha$  aus prokaryotischer und eukaryotischer Expression, dem löslichen TNFR1-Konstrukt P60-Fc, dem polyklonalen Kaninchen-anti-Hund TNF $\alpha$  Serum und kommerziell erhältlichen Antikörpern gegen canines TNF $\alpha$  konnten nun zwei verschiedene Capture ELISA für canines TNF $\alpha$  etabliert werden.

Der Fängerantikörper im ersten ELISA (TNF $\alpha$  ELISA1) ist das kommerziell erhältlich polyklonale Ziege-anti-Hund TNF $\alpha$  Serum. Zur Detektion des an diese Antikörper gebundene TNF $\alpha$  wurde das polyklonale Kaninchen-anti-Hund TNF $\alpha$  Serum verwendet (s. Abb. 5.12). Dabei erwies sich der direkte Einsatz des Serums, gefolgt vom sekundären Ziege-anti-Kaninchen IgG POD Antikörper, als sensitiver gegenüber den direkt POD gekoppelten Kaninchenantikörpern.



**Abb. 5.12: Aufbau TNF $\alpha$  ELISA1**

Als Fänger im zweiten TNF $\alpha$  ELISA wurde das P60-Fc Fusionsprotein eingesetzt. Seine optimale Verdünnung wurde in einem vorangegangenen ELISA bestimmt und auf 0,5  $\mu\text{g/ml}$  festgesetzt. Hierbei wurde das Fusionsprotein direkt an die Platte gebunden und zur Detektion das goat- $\alpha$ -human IgG POD<sup>27</sup> Serum verwendet. Zur Detektion im TNF $\alpha$  ELISA2 wurde der kommerziell erhältliche polyklonal-biotinylierte Ziege-anti-Hund TNF $\alpha$  Antikörper eingesetzt. Die gebundenen biotinylierten Antikörper wurden wiederum durch ein Streptavidin-POD Konjugat angezeigt (s. Abb. 5.13).

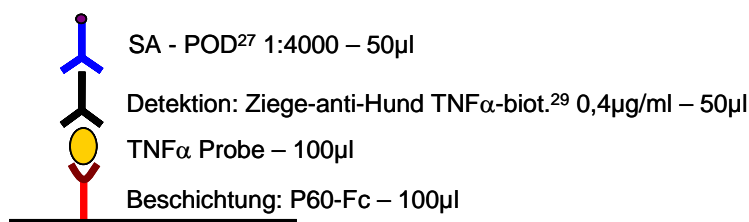
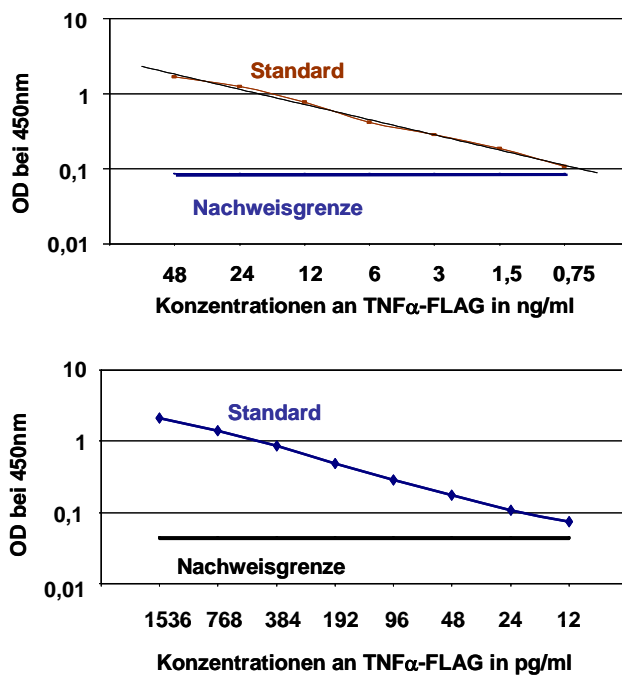


Abb. 5.13: Aufbau TNF $\alpha$  ELISA2

Die Beschichtung der ELISA erfolgte in Beschichtungspuffer. Beide Assays wurden mit 2 % BSA-PBS Lösung blockiert und die Proben bzw. die Antikörper in 1 % BSA-PBS Lösung verdünnt.

Um die Messgrenzen der beiden ELISA-Systeme zu ermitteln, wurde mit Hilfe von Zellkulturüberstand der stabil transfizierten Zelllinie CHOTA1 (s. 5.1) ein Standard etabliert. Die Konzentration an TNF $\alpha$ -FLAG im Überstand wurde im WEHI-Bioassay ermittelt (400 ng/ml), der Überstand aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Die absolute Nachweisgrenze wurde durch die höchste Summe des Mittelwerts der jeweiligen Kontrollen im 4- bis 8-fachen Ansatz und deren 3-fache Standardabweichung (absolute Nachweisgrenze = Kontrolle + 3 x SD) festgelegt. Da allerdings eine exakte Probenmessung nur im linearen Bereich eines Assays vorzunehmen ist und dieser bei beiden ELISA über der absoluten Nachweisgrenze liegt, wurde jeweils das Detektionslimit für das Ende des linearen Bereichs in der doppelt-logarithmischen Darstellung definiert (s. Abb. 5.14). Daraus ergab sich für den TNF $\alpha$  ELISA1 eine untere Nachweisgrenze von ca. 1 ng/ml canines TNF $\alpha$  und für den TNF $\alpha$  ELISA2 ein Limit von ca. 12 pg/ml.



**Abb. 5.14: Ermittlung der Detektionsgrenzen von TNF $\alpha$  ELISA1 und 2**

Titration des rekombinanten caninen TNF $\alpha$ -FLAG Standards; Darstellung des linearen Messbereichs und der absoluten Nachweisgrenze (MW Kontrolle + 3 x SD) in der doppelt-logarithmischen Darstellung;

**Oben:** TNF $\alpha$  ELISA1 Messkurve mit Regressionsgerade; Messgrenze bei 1 ng/ml

**Unten:** TNF $\alpha$  ELISA2; tatsächliche Messgrenze als Ende des linearen Bereichs bei 12pg/ml

## 5.7 Qualitätsparameter des TNF $\alpha$ ELISA2

Um die Messgenauigkeit des TNF $\alpha$  ELISA2 zu charakterisieren, vor allem im Hinblick auf die Qualität des Assays zur Messung von Plasma und Zellkulturüberständen, wurden verschiedene Testkriterien festgesetzt und überprüft. Zu diesen Kriterien gehören die Intra-Assay-Präzision, die Inter-Assay-Präzision und die Überprüfung der Verdünnungsechtheit.

### Intra-Assay-Präzision

Zur Bestimmung der Intra-Assay-Präzision wurden zwei verschiedene Überstände von LPS stimulierten caninen PBL (s. 4.2) und zwei verschiedene, mit rekombinantem TNF $\alpha$ -FLAG versetzte Hundeplasmen 8-mal in der gleichen Testplatte eingesetzt, um so die Varianz der Ergebnisse innerhalb eines Testansatzes zu bestimmen. Die hierbei eingesetzte TNF $\alpha$  Konzentration der Proben befand sich jeweils im linearen Messbereich des ELISA (Absolutwerte s. Tab. 5.2). Die Intra-Assay-Präzision sollte einen Variationskoeffizienten (= (Standardabweichung/Mittelwert) x 100 %) von unter 20 % erreichen, denn nur dann ist eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gegeben [152]. Die Variationskoeffizienten des Testsystems lagen alle unter 10 % (s. Tab. 5.1).

	<b>Mittelwert (OD bei 450nm)</b>	<b>Standardabweichung (OD bei 450nm)</b>	<b>Variationskoeffizient (in %)</b>
<b>Plasma 1</b>	1,452	0,071	<b>4,897</b>
<b>Plasma 2</b>	0,637	0,050	<b>7,829</b>
<b>Überstand 1</b>	1,595	0,120	<b>7,485</b>
<b>Überstand 2</b>	0,289	0,027	<b>9,192</b>

**Tab. 5.1: Intra-Assay-Präzision des TNF $\alpha$  ELISA2**

8-malige Testwiederholung in einer Mikrotiterplatte

### **Inter-Assay-Präzision**

Zur Bestimmung der Inter-Assay-Präzision wurden die bereits zur Bestimmung der Intra-Assay-Präzision verwendeten Plasmen und Zellkulturüberstände in acht verschiedenen Testplatten im 4-fach Ansatz eingesetzt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten bearbeitet. So konnte die Varianz der Ergebnisse des Testsystems zwischen den einzelnen Testansätzen ermittelt werden.

Die Ergebnisse der Inter-Assay-Präzision sind, im Gegensatz zu den Werten der Intra-Assay-Präzision, in Konzentrationen (pg/ml) angegeben, da bei dem Vergleich verschiedener Platten eine Standardkurve als Bezugspunkt mitgeführt werden muß. Bei der Intra-Assay-Präzision war dies nicht erforderlich, da nur die Varianz innerhalb ein und derselben ELISA-Platte überprüft wurde. Die Inter-Assay-Präzision sollte, ebenso wie die Intra-Assay-Präzision, einen Variationskoeffizienten unter 20 % ergeben [152]. Auch bei der Inter-Assay-Präzision lagen die Variationskoeffizienten des Testsystems im vorgegebenen Rahmen (s. Tab. 5.2).

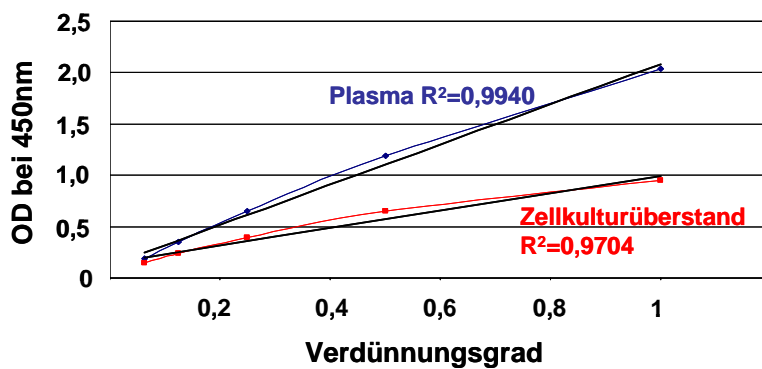
	<b>Mittelwert (in pg/ml)</b>	<b>Standardabweichung (in pg/ml)</b>	<b>Variationskoeffizient (in %)</b>
<b>Plasma 1</b>	1156,01	154,31	<b>13,35</b>
<b>Plasma 2</b>	78,73	14,70	<b>18,68</b>
<b>Überstand 1</b>	1021,03	160,56	<b>15,73</b>
<b>Überstand 2</b>	453,79	81,36	<b>17,93</b>

**Tab. 5.2: Inter-Assay-Präzision des TNF $\alpha$  ELISA2**

8-malige Testwiederholung in 8 verschiedenen Mikrotiterplatten an 8 verschiedenen Tagen (4-fach Ansatz)

### Verdünnungsechtheit

Um die Verdünnungsechtheit des ELISA zu überprüfen, wurden die schon zur Ermittlung der Varianzen verwendeten Proben in fünf verschiedenen Verdünnungsstufen in einer Mikrotiterplatte eingesetzt. Die ermittelten Extinktionen wurden gegen die entsprechenden Verdünnungsstufen in einem Graphen aufgetragen und eine Trendlinie eingefügt. Das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) gibt an, inwieweit die berechnete Ausgleichsgerade mit den tatsächlichen Testwerten übereinstimmt und kann Werte von 0 bis 1 annehmen. Nähert sich das Bestimmtheitsmaß dem Wert 1, besteht für die Stichprobe eine gute Korrelation mit der Geraden. Nähert sich dagegen das Bestimmtheitsmaß dem Wert 0, besteht kein linearer Zusammenhang zwischen den Testwerten. Das Bestimmtheitsmaß im TNF $\alpha$  ELISA2 betrug 0,97 für die beiden Plasmaproben und 0,99 für die beiden Zellkulturüberstände (s. Abb. 5.15).

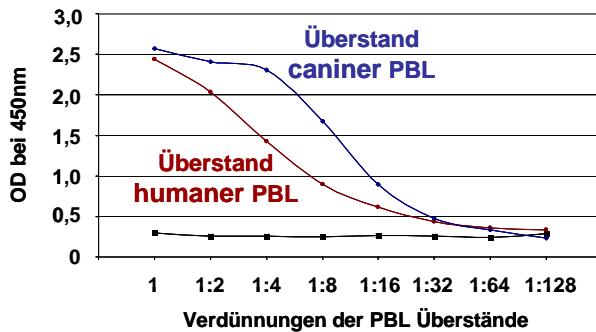


**Abb. 5.15: Verdünnungsechtheit des TNF $\alpha$  ELISA2**

Plasma und Zellkulturüberstand in fünf log<sub>2</sub> Verdünnungsschritten; das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  ist der Referenzwert für die Verdünnungsechtheit, welches sowohl für Plasma als auch für Serum nahe am Maximalwert 1 liegt;

### 5.8 Kreuzreaktivitätstest des TNF $\alpha$ ELISA2

Zum Test auf Kreuzreaktivität des TNF $\alpha$  ELISA2 gegenüber humanem TNF $\alpha$  wurden sowohl humane als auch canine PBL präpariert und anschließend mit LPS stimuliert (s. 4.2). Der Überstand dieser Stimulationen wurde im WEHI-Assay getestet und mit Hilfe von Standardmedium auf die gleiche TNF $\alpha$  Konzentration eingestellt. Beide Überstände wurden anschließend im TNF $\alpha$  ELISA2 gemessen. Wie Abb. 5.16 zeigt, kann mit dem ELISA sowohl natürliches canines als auch humanes TNF $\alpha$  gemessen werden, wobei die Sensitivität zu humanem TNF $\alpha$  geringer ist.



**Abb. 5.16: Überstände humaner und caniner PBL im TNF $\alpha$  ELISA2**

Jeweils  $3 \times 10^6$  PBL/ml wurden für 24 h mit 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS stimuliert und die Überstände anschließend im WEHI-Assay auf ihre Konzentration an TNF $\alpha$  getestet. Die im TNF $\alpha$  ELISA2 eingesetzten Proben wurden zuvor mit Hilfe von Zellkulturmedium auf die gleiche TNF $\alpha$  Konzentration eingestellt und anschließend getestet.

Neben dem caninem konnte auch humanes TNF $\alpha$  gemessen werden, allerdings mit verringerter Sensitivität. (MW und SD aus 3 unabhängigen Versuchen jeweils im Doppelansatz)

## 5.9 TNF $\alpha$ Messung bei spontaner caniner Sepsis

Im Rahmen einer klinischen Studie über die canine Sepsis wurden in Zusammenarbeit mit der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München und der Poliklinik für kleine Haustiere der FU Berlin Plasmaproben von sepsiskranken Hunden gesammelt. Das Vorliegen einer Sepsis wurde dabei durch die Erfüllung der SIRS Kriterien für Hunde (s. Tab. 2.2) und dem Nachweis einer Infektion definiert. Die Probenentnahme erfolgte zum Zeitpunkt der Einlieferung in die Klinik und nach weiteren 6, 24 und 48 Stunden. Insgesamt konnten somit Proben von 43 an Sepsis erkrankten Hunden und weiteren 36 Patienten mit SIRS-Symptomatik ohne mikrobiologischen oder histologischen Befund einer Infektion gesammelt werden (s. Tab. 5.3).

Patienten	SIRS		Sepsis		schwere Sepsis		septischer Schock	
		in %		in %		in %		in %
Überlebende	21	58	15	75	5	24	0	0
Gestorbene	15	52	5	25	16	76	5	100
Gesamt	36	100	20	100	21	100	2	100

**Tab. 5.3: Verteilung der Patienten innerhalb der Sepsisstudie (nach Rau et al. [5])**

Alle Proben wurden unverdünnt im TNF $\alpha$  ELISA2 gemessen. Nur eine einzige Probe eines SIRS-Patienten mit Pneumonie zeigte kurz vor dem Tod des Tieres einen messbar erhöhten Spiegel an TNF $\alpha$  im Plasma (289,1pg/ml). Ansonsten konnte bei keinem der Sepsis- oder den



anderen SIRS-Patienten ein erhöhter Spiegel des Zytokins im Plasma detektiert werden.

### **5.10 TNF $\alpha$ Messung bei caniner Magendrehung**

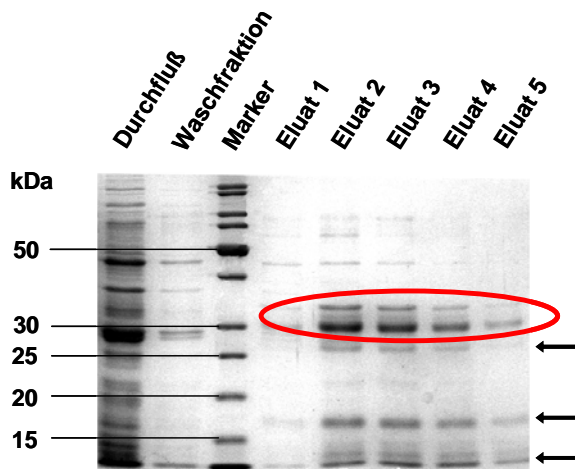
Zur weiteren Abklärung der Beteiligung von TNF $\alpha$  an der Genese von akut-inflammatorischen Reaktionen beim Hund wurde eine klinische Studie in Zusammenarbeit mit der Chirurgischen Kleintierklinik der LMU München über die TNF $\alpha$ -Kinetik während der natürlich auftretenden Magendrehung durchgeführt. Dabei wurden den Patienten Serumproben bei Einlieferung in die Klinik, direkt nach erfolgter Operation und 12 h später entnommen. Die Diagnose wurde anhand des radiologischen Befundes und des Vorberichtes gestellt und konnte jeweils intra operationem bestätigt werden. Insgesamt konnten somit Proben von 5 Patienten gesammelt und im TNF $\alpha$  ELISA2 analysiert werden. Wiederum konnte in keiner der untersuchten Seren ein messbar erhöhter Spiegel an TNF $\alpha$  detektiert werden.

### **5.11 Klonierung, Expression und Aufreinigung von caninem HMGB1**

Auch für die Klonierung von caninem HMGB1 wurden Primer nach bereits publizierten Sequenzen [108] konstruiert (s. 4.7) und anschließend für die Amplifikation der gewünschten Sequenz auf cDNA LPS stimulierter PBL verwendet. Das so erhaltene, ca. 650bp lange DNA Stück wurde in die entsprechenden Vektoren kloniert und das fertige Plasmid zur Kontrolle über die Insertionsstelle hinweg sequenziert.

Wie für TNF $\alpha$  wurde auch für HMGB1 für die bakterielle Proteinexpression der Vektor pET100/D-TOPO verwendet. Bei der Expression des rekombinanten Proteins wurde wie unter Abschnitt 4.15 beschrieben vorgegangen. Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe der Ni-NTA Affinitätschromatographie (s. 4.16). Die Analyse der Expression und der Aufreinigung erfolgte, wie in Abb. 5.17 dargestellt, mit Hilfe der SDS-Page. Aus 2l Expressionsvolumen konnten somit ca. 2 mg rekombinantes Protein aufgereinigt werden.

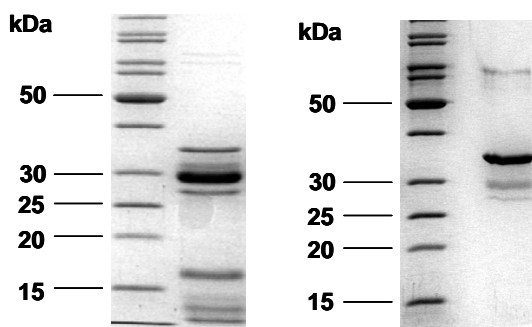
Das errechnete Molekulargewicht des rekombinanten Proteins lag bei 27 kDa, sichtbar in der SDS-Page wurde es allerdings bei ungefähr 32 und 30 kDa. Sowohl die Doppelbande als auch das erhöhte Molekulargewicht sind jedoch speziesunabhängig für HMGB1 typisch und mehrfach in der Literatur beschrieben [99, 153].



**Abb. 5.17: HMGB1 Aufreinigung über Ni-NTA Affinitätschromatographie**

Die verschiedenen Stufen der Aufreinigung wurden in einer SDS-Page (12 %) aufgetragen und anschließend mit Coomassie Blue gefärbt. Im Eluat ist das rekombinante Protein deutlich bei ca. 30 und 32 kDa zu erkennen (s. Kreis). Zusätzlich sind weitere Proteinfractionen bei ca. 27 kDa, 17 kDa und weniger zu erkennen (s. Pfeile).

Neben dem eigentlichen Protein waren in der SDS-Page stets auch weitere Proteine in einer distinkten Größe von ca. 27 kDa, 17 kDa und weniger gut abgegrenzt zu erkennen (s. Abb. 5.17). Im Western Blot konnte durch eine Färbung gegen den 6-His-Tag (s. 4.14) gezeigt werden, dass alle diese Banden das 6-His-Epitop des rekombinanten Proteins besitzen. Demnach entsprechen die Proteine bei 27 und 17 kDa N-terminalen Fragmenten des Gesamtproteins. Um nun HMGB1 in voller Länge und großer Reinheit zu erhalten, wurde dem Protein C-terminal eine zweite Markierung hinzugefügt. Hierfür wurde der Antisenseprimer um die genetische Sequenz des FLAG-Epitops erweitert (s. 4.7). Mit dem so modifizierten Plasmid wurden erneut BL21 *E.coli* Bakterien transformiert und das rekombinante Protein, wie oben beschrieben, exprimiert und über Ni-NTA Affinitätschromatographie aufgereinigt. Im Anschluß daran wurde das Protein ein zweites Mal über M2-anti-FLAG Affinitätschromatographie gereinigt (s. 4.21.3.2). Die Analyse der Expression und der beiden Aufreinigungen erfolgte, wie in Abb. 5.18 dargestellt, mit Hilfe der SDS-Page.



**Abb. 5.18: HMGB1 Aufreinigung über M2-anti-FLAG Affinitätschromatographie**

Das aufgereinigte Protein (jeweils 10  $\mu$ l) wurde in einer SDS-Page (12 %) aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt.

**Links:** Erste Aufreinigungsstufe von HMGB1-FLAG über Ni-NTA Affinitätschromatographie.

**Rechts:** Zweite Aufreinigungsstufe von HMGB1-FLAG über M2-anti-FLAG Affinitätschromatographie; hohe Reinheit des rekombinanten Proteins bei ca. 32 kDa; Proteinfraction bei 27 kDa nur noch in geringen Mengen vorhanden; die kleineren Produkte wurden vollständig eliminiert.

Des Weiteren wurde versucht, HMGB1 rekombinant in eukaryotischen Zellen zu exprimieren. Dafür wurde die genetische Information des Proteins in Kombination mit verschiedenen Epitopen in entsprechende Vektoren kloniert (s. Tab. 5.4).

Epitop N-terminal	Epitop C-terminal	Vektor	Transfizierte Zelllinie
HA-Signalpeptid und FLAG Epitop		pcDNA3.1	293T - transient CHO – stabil
HA-Signalpeptid und FLAG Epitop	6 His-Tag	pMT/V5	SL3 – transient + stabil
	FLAG Epitop	pMT/V5	SL3 – transient + stabil

**Tab. 5.4: Unterschiedlich modifizierte Vektoren mit HMGB1 für die Transfektion eukaryotischer Zellen**

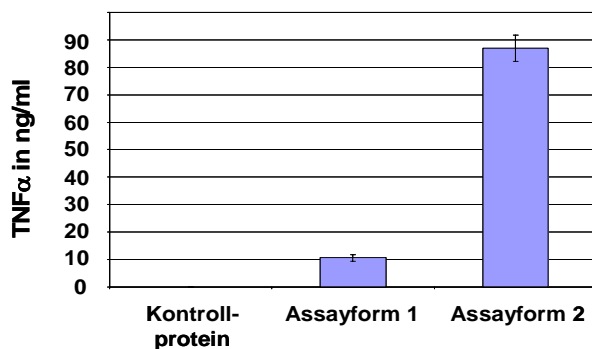
Die Kontrolle der Transfektionen erfolgte mittels Western Blot der Zellkulturüberstände und Zelllysate sowie einer intrazytoplasmatischen Färbung der transfizierten Zellen (s. 4.25). Die Nachweise erfolgten jeweils mit epitopspezifischen Antikörpern und mit den unter 5.15 und 5.17 beschriebenen anti-HMGB1 spezifischen Antikörpern. Bei keiner der Transfektionen konnte jedoch rekombinantes HMGB1 detektiert werden.

## 5.12 Bioaktivitätskontrolle des rekombinanten HMGB1

Beide Expressionsformen von HMGB1 (HMGB1 mit 6 His-Tag oder HMGB1 mit 6 His-Tag und FLAG Epitop) wurden auf ihre proinflammatorischen Eigenschaften hin getestet. Dafür wurden RAW 264.7 Zellen und canine PBL mit dem rekombinanten Zytokin für 16 h wie unter 4.4 beschrieben inkubiert. Zuvor wurde die in den HMGB1 Aufreinigungen enthaltene Konzentration an LPS im Limulus Amebocyte Lysate Test untersucht (s. 4.18)). Für 1µg rekombinanten Proteins wurde dabei eine Konzentration von 60pg LPS festgestellt. Durch die Zugabe von 6 Units PolymyxinB pro pg LPS konnte im Stimulationsansatz die Wirkung des LPS neutralisiert werden [153] (s. 4.18). Zur Kontrolle wurde zusätzlich ein Protein aus gleicher Expression und Aufreinigung verwendet, welches keine stimulativen Effekte besitzt.

Während HMGB1 aus der Ni-Affinitätschromatographie keinerlei stimulative Effekte zeigte, konnten dagegen bei doppelt gereinigtem HMGB1-FLAG sehr gute stimulative Eigenschaften beobachtet werden. Für die Stimulation von RAW 264.7 Zellen wurden, wie unter 4.4.2

beschrieben, zwei verschiedene Assayvarianten ausgearbeitet. Bei der ersten Assayform wurden  $5 \times 10^5$  Zellen/ml direkt mit dem rekombinanten Zytokin auf OptiMEM Medium inkubiert. Bei der zweiten Assayform wurden  $1 \times 10^6$  Zellen/ml auf Vollmedium ausgesät und für vier Stunden vorinkubiert, so dass die Zellen vor Versuchsbeginn adhären konnten. Anschließend wurde das Vollmedium durch OptiMem-Medium ersetzt und das rekombinante Zytokin dazugegeben. In beiden Assayvarianten wurde mit  $1 \mu\text{g/ml}$  HMGB1-Flag stimuliert und anschließend der Überstand im WEHI Assay auf den Gehalt an  $\text{TNF}\alpha$  getestet (s. Abb. 5.19). Die wesentlich sensitivere Assayform 2 reagierte mit einer ca. 8-fach höheren  $\text{TNF}\alpha$  Konzentration im Überstand als die Assayform 1.



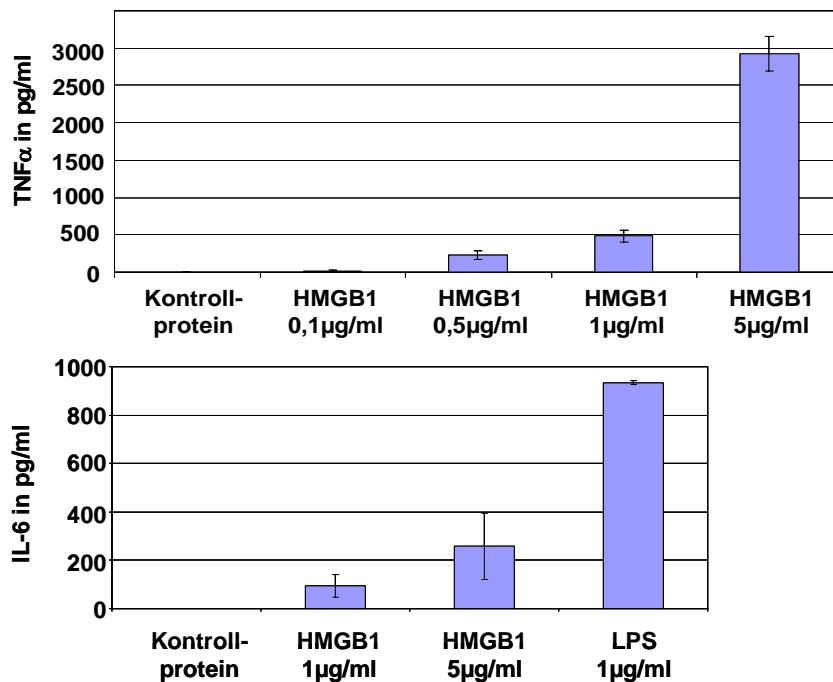
**Abb. 5.19: RAW 264.7 Zellen mit  $1 \mu\text{g/ml}$  HMGB1-FLAG stimuliert**

$5 \times 10^5$  bzw.  $1 \times 10^6$  RAW 264.7 Zellen wurden für 16 h mit  $1 \mu\text{g/ml}$  HMGB1-FLAG stimuliert. Anschließend wurde der Überstand im WEHI-Assay auf  $\text{TNF}\alpha$  getestet; das Kontrollprotein zeigte bei beiden Assayvarianten keinerlei stimulative Effekte;

**Assayform 1** in Anlehnung an Li et al [153] zeigte vergleichbar stimulative Werte für rekombinantes HMGB1;

**Assayform 2** reagiert im Vergleich dazu ca. 8-mal sensitiver; (MW und SD aus 3 getrennten Versuchen; jeweils im 2-fach Ansatz)

Neben den beschriebenen Versuchen mit der Zelllinie RAW 264.7 wurde die Bioaktivität des rekombinanten HMGB1 auch auf primären Zellen getestet. Hierfür wurden, wie unter 4.4.1 beschrieben, canine PBL mit verschiedenen Konzentrationen an rekombinatem HMGB1-FLAG stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden im  $\text{TNF}\alpha$  ELISA2 und im IL-6 ELISA analysiert (s. Abb. 5.20). Die beobachtete Stimulation der PBL war von der eingesetzten Konzentration des rekombinanten Zytokins abhängig. Parallel dazu zeigte das Kontrollprotein wiederum keinerlei stimulative Effekte.



**Abb. 5.20: HMGB1-FLAG Stimulation caniner PBL**

$5 \times 10^6$  canine PBL wurden für 16 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an HMGB1-FLAG stimuliert; in Abhängigkeit von der Konzentration des eingesetzten Zytokins konnten sowohl TNF $\alpha$  (**oben**) als auch IL-6 (**unten**) im Überstand nachgewiesen werden; (MW und SD aus 3 unabhängigen Versuchen; jeweils im 2-fach Ansatz)

### 5.13 Klonierung, Expression und Aufreinigung des caninen RAGE

Für die Klonierung von RAGE, dem am besten charakterisierten Rezeptor für HMGB1 bei Mensch, Maus und Ratte, standen keine hundespezifischen Sequenzen zur Verfügung. Deshalb wurde mit Hilfe boviner und humaner RAGE-Sequenzen eine Genomanalyse in der Ensembl Datenbank durchgeführt ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). In dieser Datenbank ist die nahezu komplette Genomsequenz eines Hundes aufgelistet. Mit Hilfe der homologen Sequenzen anderer Spezies konnte daher die Sequenz des caninem RAGE im Hundegenom lokalisiert werden. Die daraus abgeleitete Proteinsequenz wurde anschließend in Programmen zur Identifizierung der Transmembranabschnitte von Rezeptoren untersucht ([www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)). Dadurch war es möglich, den extrazellulären Anteil des Proteins zu identifizieren und Primer speziell für diesen Abschnitt synthetisieren zu lassen. Mit Hilfe der PCR wurde nun auf cDNA, gewonnen aus caninem Lungengewebe (s. 4.7) [113], ausschließlich dieser Abschnitt des Rezeptors amplifiziert.

Das so erhaltene ca. 1000 bp lange DNA-Stück wurde nun in einer zweiten, so genannten Linking-PCR mit dem Fc-Abschnitt eines humanen Immunglobulins verbunden und anschließend in die entsprechenden Vektoren kloniert (s. 4.7.2). Das fertige Plasmid wurde zur

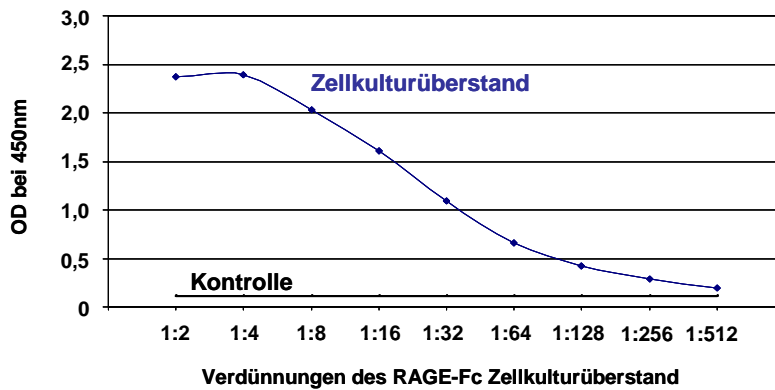
Kontrolle über die Insertionsstelle hinweg sequenziert. Die so erhaltene Sequenz für den extrazellulären Anteil des RAGE wurde mit derjenigen aus der Ensembl-Datenbankanalyse verglichen. Zusätzlich wurde im März 2006 die Sequenz des caninen RAGE publiziert (NCBI AAX38183) [154]. Auch sie stimmt wie die Sequenz der Ensemble-Datenbank weitestgehend mit der klonierten Sequenz für den extrazellulären Anteil des Rezeptors überein (s. Abb. 5.21).

<b>Ensembl Sequenz</b>	M A A G A A A A A G A U V L V L S L W G A V V G D R N I T A R I G K P L V L N C R G A P K K P P Q Q
<b>Klonierte Sequenz</b>	M A A G A A A A A G A U V L V L S L W G A V V G D R N I T A R I G K P L V L N C R G A P K K P P Q Q
<b>NCBI Sequenz</b>	M A A G A A A A A G A U V L V L S L W G A V V G D R N I T A R I G K P L V L N C R G A P K K P P Q Q
<b>Ensembl Sequenz</b>	L E W K L N T G R T E A W K V L S P Q G G P W D S V A R V L P N G S L L L P A V G I Q D E G T F R C
<b>Klonierte Sequenz</b>	L E W K L N T G R T E A W K V L S P Q G G P W D S V A R V L P N G S L L L P A V G I Q D E G T F R C
<b>NCBI Sequenz</b>	L E W K L N T G R T E A W K V L S P Q G G P W D S V A R V L P N G S L L L P A V G I Q D E G T F R C
<b>Ensembl Sequenz</b>	R A T S R N G K E T R S T Y Q V R V Y Q I P G K P E I I N P A S E L M A G V P S K V G T C V S E G G
<b>Klonierte Sequenz</b>	R A T S R N G K E T R S T Y Q V R V Y Q I P G K P E I I N P A S E L M A G V P S K V G T C V S E G G
<b>NCBI Sequenz</b>	R A T S R N G K E T R S T Y Q V R V Y Q I P G K P E I I N P A S E L M A G V P S K V G T C V S E G G
<b>Ensembl Sequenz</b>	Y P A G T L S W H W D G K P L I P D G K G V S V Q E E T R R H P E T G L F T L Q S E L M V T P A Q G
<b>Klonierte Sequenz</b>	Y P A G T L S W H W D G K P L I P D G K G V S V Q E E T R R H P E T G L F T L Q S E L M V T P A Q G
<b>NCBI Sequenz</b>	Y P A G T L S W H W D G K P L I P D G K G V S V Q E E T R R H P E T G L F T L Q S E L M V T P A Q G
<b>Ensembl Sequenz</b>	G A P H P T F S C S F S P G L P R R R A L H A A P I Q L N V W E S V P L E V Q V M V E P G G M L A P
<b>Klonierte Sequenz</b>	G A P H P T F S C S F S P G L P R R R A L H A A P I Q L N V W E S V P L E V Q V M V E P G G M L A P
<b>NCBI Sequenz</b>	G A P H P T F S C S F S P G L P R R R A L H A A P I Q L N V W E S V P L E V Q V M V E P G G M L A P
<b>Ensembl Sequenz</b>	G G T V T L T C E T P A Q S S V Q I H W I K D G M P L P L P P S P M L V L S E V K P E D Q G T Y S C
<b>Klonierte Sequenz</b>	G G T V T L T C E T P A Q S S V Q I H W I K D G M P L P L P P S P M L V L S E V K P E D Q G T Y S C
<b>NCBI Sequenz</b>	G G T V T L T C E T P A Q S S V Q I H W I K D G M P L P L P P S P M L V L S E V K P E D Q G T Y S C
<b>Ensembl Sequenz</b>	V A M H P S H G S Q E S R G V S V V I E T D K E G P T T G Y V E G Q Q L
<b>Klonierte Sequenz</b>	V A M H P S H G S Q E S R G V S V V I E T D K E G P T T G Y V E G Q Q L
<b>NCBI Sequenz</b>	V A M H P S H G S Q E S R G V S V V I E T D K E G P T T A M W K G R G W

**Abb. 5.21: Vergleich der extrazellulären Proteinsequenz des caninen RAGE**

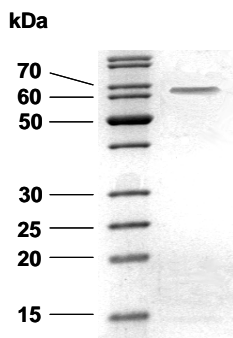
Die klonierte Sequenz stimmt bis auf eine Aminosäure vollständig mit der Sequenz der Ensembl-Datenbankanalyse überein. Auch die im März 2006 publizierte Sequenz der NCBI Datenbank mit der Nummer AAX38183 ist weitestgehend mit der klonierten Sequenz identisch.

Für die Proteinexpression in eukaryotischen 293T Zellen wurde der Vektor pcDNA3.1 verwendet. Da die Menge des so exprimierten Proteins zu gering war, wurde die genetische Information für RAGE-Fc zusätzlich in den Vektor pMT/V5-His kloniert. Mit diesem Vektor konnten nun SL3 Drosophilazellen stabil transfiziert werden. Zur Kontrolle der Expression wurde der bereits in Abb. 5.5 erläuterte Fc-Tag ELISA verwendet. Wie Abb. 5.22 zeigt, konnten im Zellkulturüberstand transfizierter SL3-Zellen deutliche Mengen an Fc-Fusionsprotein detektiert werden. Die Aufreinigung des Fusionsproteins erfolgte über ProteinG Affinitätschromatographie (s. 4.21.3), die Reinheit und die Größe des Proteins wurde in der SDS-Page kontrolliert (s. Abb. 5.23). Dabei wurde das errechnete Molekulargewicht von ca. 60 kDa um rund 5 kDa überschritten.



**Abb. 5.22: RAGE-Fc Zellkulturüberstand aus SL3 Expression im Fc-Tag ELISA**

Aufbau des Fc-Tag ELISA s. Abb. 5.5; RAGE-Fc Zellkulturüberstand aus SL3 Expression wurde im Fc-Tag ELISA positiv in log<sub>2</sub> Verdünnungen auf Fc-Fusionsprotein hin getestet. Als Negativkontrolle diente dabei Zellkulturüberstand untransfizierter SL3 Zellen.



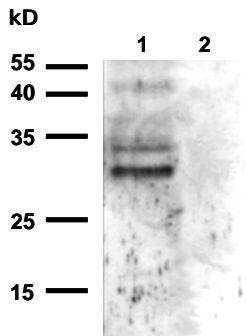
**Abb. 5.23: Affinitätsgereinigtes RAGE-Fc – SDS Page**

Zur Kontrolle der ProteinG Affinitätsreinigung des Fusionsproteins RAGE-Fc wurden 2 µg des Proteins in der SDS-Page aufgetrennt und anschließend Coomassie gefärbt. Das gereinigte Protein konnte deutlich und ohne Verunreinigungen bei ca. 65 kDa angefärbt werden.

## 5.14 Bioaktivitätskontrolle des rekombinanten RAGE-Fc

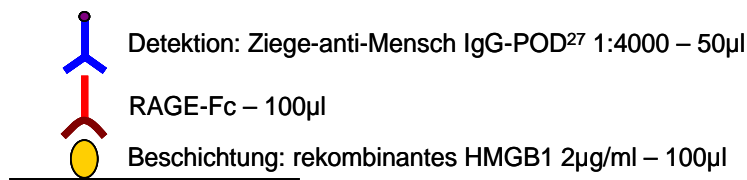
Die biologische Aktivität des exprimierten Fusionsproteins RAGE-Fc wurde durch seine Bindung an das rekombinante HMGB1 überprüft. Dabei wurde zum einen das Fusionsprotein RAGE-Fc wie unter 4.24 beschrieben an ProteinG Sepharose gebunden und anschließend im Rahmen der Immunpräzipitation mit dem rek. HMGB1 zusammen inkubiert. Die Analyse der Bindung erfolgte im Western Blot mit dem unter 5.15 beschriebenen polyklonalen Kaninchen-anti-Hund HMGB1 Serum. Dabei konnte im Vergleich zur Immunpräzipitation mit einem anderen Fc-markierten Kontrollprotein deutlich die Bindung zwischen RAGE und HMGB1 nachgewiesen werden.

Zum anderen konnte auch im ELISA eine Bindung zwischen RAGE-Fc und rek. HMGB1 gezeigt werden. Dabei wurde der Rezeptor über das an die Platte gebundene rekombinante Zytokin titriert und der Fc-Teil der gebundenen Fusionsproteine durch einen sekundären gegen humane IgG gerichteten POD markierten Antikörper detektiert (s. Abb. 5.25).



**Abb. 5.24: Immunpräzipitation zwischen RAGE-Fc und rekombinatem HMGB1**

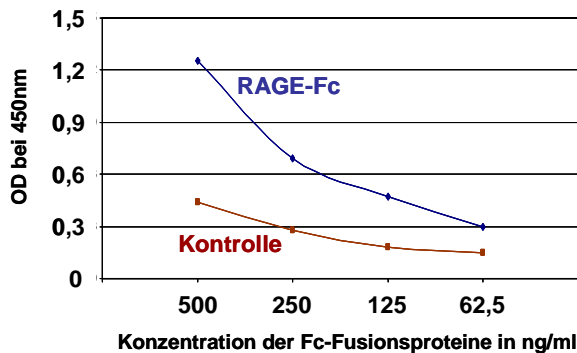
5  $\mu$ g des Fusionsproteins RAGE-Fc (1) bzw. dem Fc-markierten Kontrollprotein (2) wurden an ProteinG Sepharose gebunden und anschließend mit rek. HMGB1 inkubiert. 20  $\mu$ l der Immunpräzipitation (s. 4.24) wurden im Western Blot mit dem anti-HMGB1 spezifischen polyklonalen Serum analysiert. Nur bei RAGE-Fc und nicht beim Kontrollprotein konnte eine für das rek. HMGB1 typische Doppelbande beobachtet und dadurch die Bindung zwischen Rezeptor und Ligand nachgewiesen werden.



**Abb. 5.25: RAGE-Fc im ELISA mit rekombinatem HMGB1**

**Oben:** Aufbau des ELISA

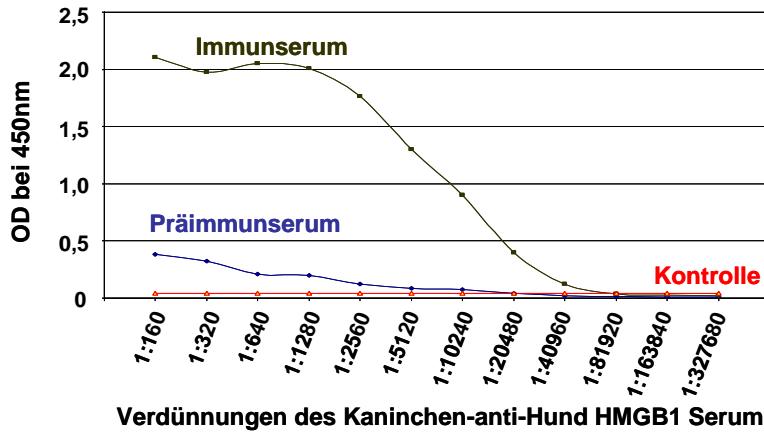
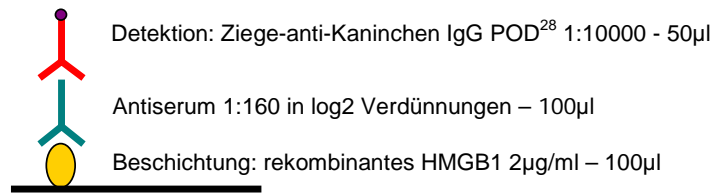
**Unten:** Titration des gereinigten RAGE-Fc im Vergleich zu einem Fc-markierten Kontrollprotein auf rekombinatem HMGB1. Die spezifische Bindung zwischen RAGE-Fc und rek. HMGB1 ist im Vergleich zur Kontrolle deutlich zu erkennen.



### 5.15 Gewinnung polyklonaler Antikörper gegen canines HMGB1

Zur Gewinnung polyklonaler Antikörper gegen canines HMGB1 wurde ein Kaninchen mit rekombinatem Protein aus bakterieller Expression (nur mit 6 His-Epitop versehen) wie unter Abschnitt 4.20 beschrieben immunisiert. Zwei Wochen nach der letzten Immunisierung wurde dem Tier erstmals Blut entnommen und das daraus gewonnene Serum im ELISA auf seinen spezifischen  $\alpha$ -HMGB1 Antikörpertiter hin getestet (s. Abb. 5.26). Aufgrund dessen wurde die Verdünnung des Serums für weitere ELISA auf 1:4000 und für weitere Western Blots auf 1:1000 festgelegt.



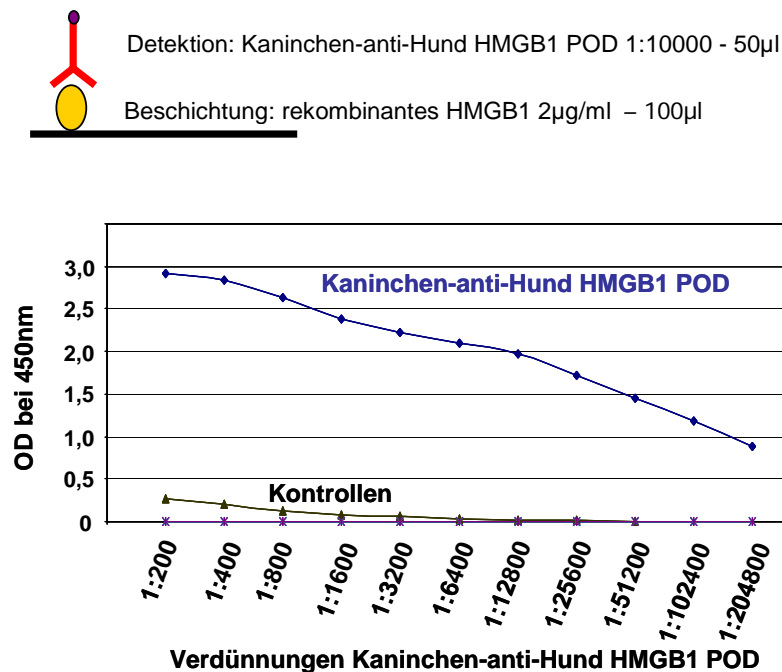


**Abb. 5.26: Antikörpertiter-Bestimmung des anti-HMGB1 Serum im ELISA**

**Oben:** Aufbau des ELISA

**Unten:** Titration des Kaninchenserums vor und nach der Immunisierung mit rekombinantem caninem HMGB1 im ELISA

Für den Aufbau des unter 5.18 beschriebenen ELISA wurden die spezifischen Antikörper gegen canines HMGB1 aus dem polyklonalen Serum affinitätsgereinigt. Dazu wurden zuerst 2,5 mg rekombinantes HMGB1 an 1 ml CnBr aktivierte Sepharose gebunden (s. 4.21.2). Anschließend konnten die HMGB1 spezifischen Antikörper über Affinitätschromatographie an der so erstellten Ligandenmatrix gereinigt werden. Die so gereinigten Antikörper wurden nun abschließend direkt an POD gekoppelt. Der Erfolg der Kopplung wurde im ELISA überprüft (s. Abb. 5.27). Daraus ergab sich für diesen Antikörper eine optimale Verdünnung für weitere ELISA von 1:10000.



**Abb. 5.27: Titration des direkt POD gekoppelten Antikörpers Kaninchen-anti-Hund HMGB1 POD im ELISA**

**Oben:** Aufbau des ELISA

**Unten:** Kaninchen-anti-Hund HMGB1 POD Titration auf rekombinantes HMGB1; Ermittlung einer gebräuchlichen Verdünnung für weitere ELISA bei ca. 1:10000; Als Kontrolle wurde der POD markierte Antikörper ohne Antigen bzw. mit einem anderen Antigen titriert;

## 5.16 Qualitative HMGB1 Messung bei caniner Sepsis im Western Blot

Die am weitesten verbreitete Methode zur Bestimmung der HMGB1 Konzentration in Serum oder Plasma bei Mensch und Maus ist das Western Blot Verfahren mit anschließender Densitometrie. Mit Hilfe des polyklonalen Kaninchen-anti-Hund HMGB1 Serum wurde nun versucht, ein vergleichbares System zu etablieren.

Dafür wurden die Plasmaproben 10 gesunder und 30 sepsiskranker Tiere rein qualitativ ohne anschließende Densitometrie getestet. Das Vorgehen dabei erfolgte wie unter Abschnitt 4.13 und 4.14 beschrieben. Zur Detektion wurden über ProteinA Sepharose gereinigte polyklonale Immunglobuline des Kaninchen-anti-Hund HMGB1 Serum verwendet (s. 4.21.1). Die gebundenen Antikörper wurden wiederum durch den sekundären Ziege-anti-Kaninchen IgG POD Antikörper sichtbar gemacht. Die an Sepsis erkrankten Tiere waren Teil der unter 5.9 beschriebenen Studie, ihre Verteilung ist in Tab. 5.5 dargestellt.

Abb. 5.28 zeigt die Proben der gesunden Tiere. Hierbei konnte stets eine Proteinfraction in der Größe von HMGB1 mit den spezifischen polyklonalen Antikörpern nachgewiesen werden.

Patienten	SIRS	in %	Sepsis	in %	schwere Sepsis	in %
Überlebende	5	63	9	69	1	11
Gestorbene	3	37	4	31	8	89
Gesamt	8	100	13	100	9	100

Tab. 5.5: Verteilung der Patienten innerhalb der qualitativen HMGB1 Western Blot Messung

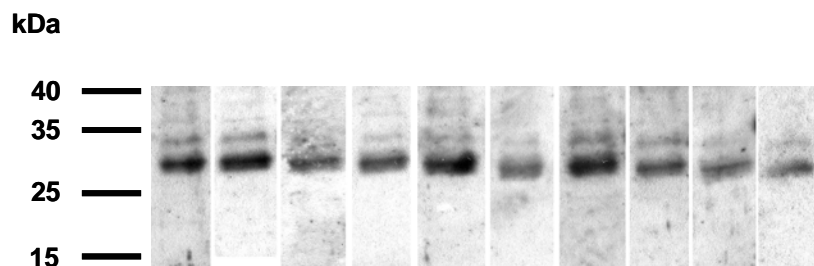
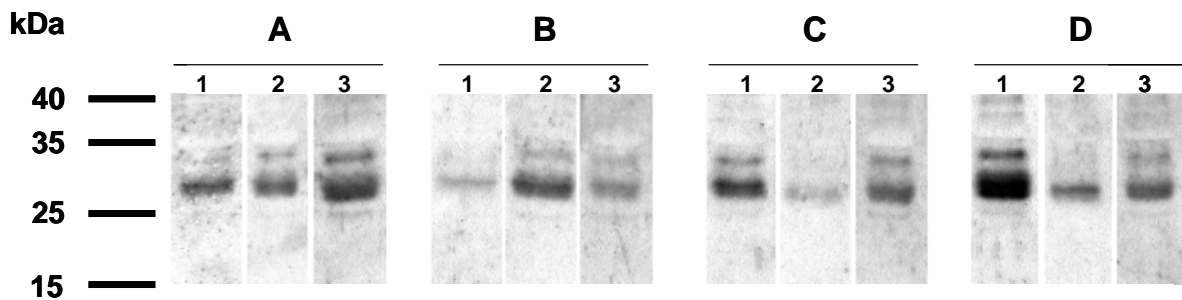


Abb. 5.28 Plasma gesunder Hunde im HMGB1 Western Blot

Jeweils 1  $\mu$ l Plasma der 10 gesunden Tiere wurde im Western Blot mit den HMGB1 spezifischen polyklonalen Kaninchen-anti-Hund HMGB1 Antikörpern untersucht. In allen Proben konnte eine HMGB1 spezifische Bande bei ca. 30 kDa nachgewiesen werden.

Im Vergleich dazu sind in Abb. 5.29 Plasmaproben verschiedener sepsiskranker Hunde dargestellt. Dabei sind jeweils nacheinander Proben vom Tag der Einlieferung und der beiden Folgetage dargestellt. In den untersuchten Proben konnte kein Unterschied im HMGB1 Plasmaspiegel zwischen gesunden und kranken Tieren festgestellt werden. Ebenso konnte keine eindeutige Tendenz in der Kinetik des Zytokins während der drei untersuchten Tagen festgestellt werden. Auch die Analyse mit anderen HMGB1 spezifischen Antikörpern (s. 5.17 und 4.14) erbrachte das gleiche Ergebnis.

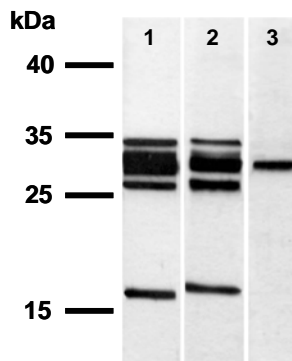


**Abb. 5.29: Plasma sepsiskranker Hunde im HMGB1 Western Blot**

Abgebildet sind 4 (A bis D) der 30 untersuchten Patienten mit einfacher Sepsis. Jeweils 1  $\mu$ l Plasma der kranken Hunde wurde von drei aufeinander folgenden Tagen (Einlieferung, 1. und 2. Folgetag entsprechen den Ziffern 1,2 und 3) im Western Blot mit den HMGB1 spezifischen polyklonalen Kaninchen-anti-Hund HMGB1 Antikörpern analysiert. Es konnte vergleichbar den gesunden Tieren (s. Abb. 5.28) stets eine HMGB1 spezifische Bande bei ca. 30 kDa nachgewiesen werden. Es ist keine eindeutige Kinetik des Zytokins während der drei untersuchten Tage nachzuvollziehen.

### 5.17 Antikörpergewinnung gegen spezifische Peptidsequenzen des caninen HMGB1

Zum Aufbau weiterer Nachweissysteme für canines HMGB1 wurden weitere polyklonale Seren gegen spezifische Abschnitte des HMGB1 Moleküls gewonnen. Dazu wurden die zwei unter 4.20.2 näher beschriebenen synthetischen Peptide an das Trägerprotein KLH gekoppelt und anschließend zur Immunisierung von Kaninchen verwendet (s. 4.20.2). Zwei Wochen nach der letzten Immunisierung wurde den beiden Tieren erstmals Blut entnommen. Die daraus gewonnenen Seren Kaninchen-anti-Hund HMGB1-Peptid1 und Kaninchen-anti-Hund HMGB1-Peptid2 wurden im Western Blot auf ihren Gehalt an spezifischen Antikörpern gegen rekombinantes HMGB1 getestet (s. Abb. 5.30). Das A-Box spezifische Serum gegen Peptid 1 erkennt die gleichen Proteinfractionen, wie das Serum gegen das gesamte Protein. Das Serum gegen Peptid 2, welches aus dem Bereich der B-Box stammt, erkennt nur die Bande bei ca. 30 kDa. Dieses Bandenmuster zeigt die spezifische Erkennung von HMGB1 bzw. seiner Zerfallsprodukte durch die Antikörper der beiden Seren.



**Abb. 5.30: HMGB1 peptidspezifische Antikörper im Western Blot**

Pro Streifen wurden 0,25µg rekombinantes HMGB1 aus Ni-NTA Aufreinigung aufgetragen und im Western Blot mit den verschiedenen polyklonalen anti-HMGB1 Seren inkubiert. Zur Detektion wurde der sekundäre Ziege-anti-Kaninchen IgG POD verwendet.

Linie1: Kaninchen-anti-Hund HMGB1 1:1000 verdünnt (s.5.15)

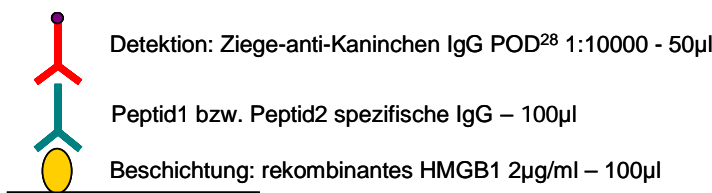
Linie2: Kaninchen-anti-Hund HMGB1-Peptid 1 1:4000 verdünnt

Linie3: Kaninchen-anti-Hund HMGB1-Peptid 2 1:1000 verdünnt

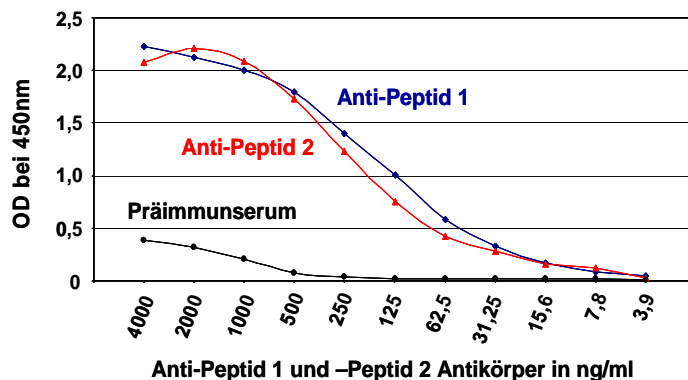
Das polyklonale Serum gegen das gesamte Protein (1) und das A-Box spezifische Serum gegen HMGB1-Peptid 1 (2) erkennen die gleichen Degradationsstufen der HMGB1 Aufreinigung. Das B-Box spezifische Serum gegen HMGB1-Peptid 2 (3) erkennt nur die zweitoberste Bande.

Beide Seren wurden zur Kontrolle ebenfalls im unter 5.16 beschriebenen Western Blot Verfahren zur Detektion von HMGB1 im Plasma gesunder und sepsiskranker Tiere eingesetzt. Das Ergebnis zeigte die gleichen Bandenmuster, wie durch das polyklonale Kaninchen-anti-Hund HMGB1 Serum erzielt wurden (vgl. Abb. 5.28 und Abb. 5.29).

Darüber hinaus wurden die beiden Seren, wie unter Abschnitt 4.21.2.2 beschrieben, über eine peptidspezifische Matrix affinitätsgereinigt und die so erhaltenen Antikörper im ELISA getestet. Wie in Abb. 5.31 dargestellt, konnten mit einer Konzentration von 1 µg/ml für beide Antikörperlösungen noch maximale Extinktionswerte erzielt werden. Davon abgeleitet wurde für die direkte Beschichtung von Mikrotiterplatten eine Konzentration von 5 µg/ml der Antikörper verwendet.



**Abb. 5.31: Titration der Kaninchen-anti-Hund HMGB1-Peptid1 und -Peptid2 Antikörper im ELISA**



**Oben:** Aufbau des ELISA

**Unten:** Beide peptidspezifischen Antikörperlösungen Kaninchen-anti-Hund HMGB1-Peptid1 und -Peptid2 wurden log<sub>2</sub> über rekombinantes HMGB1 titriert (Aufbau des ELISA vgl. Abb. 5.26). Für beide Antikörper wurde eine Mindestkonzentration von 1 µg/ml für die Detektion von HMGB1 ermittelt. Als Negativkontrolle dienten IgG das Präimmunserum.

### 5.18 Aufbau eines HMGB1 Capture ELISA

Mit Hilfe der peptidspezifischen Antikörper gegen canines HMGB1 (Kaninchen-anti-Hund HMGB1-Peptid1 und -Peptid2), dem kommerziell erhältlichen monoklonalen Antikörper gegen humanes HMGB1 (Maus-anti-Mensch HMGB1 - s. 4.22), den polyklonalen Antikörpern gegen das Gesamtprotein (Kaninchen-anti-Hund HMGB1) und dem Rezeptor-Fusionsprotein RAGE-Fc wurde nun ein Capture ELISA aufgebaut. Dabei wurden verschiedene Kombinationen der Antikörper und des Rezeptors getestet. Als sensitivste Variante hat sich der in Abb. 5.32 dargestellte ELISA erwiesen.

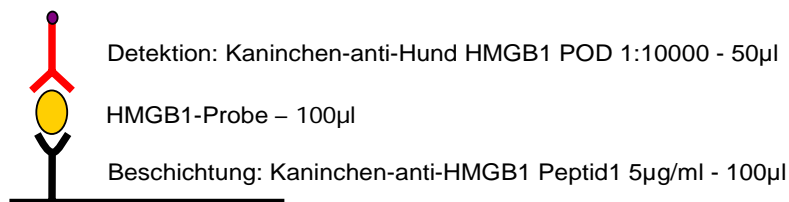


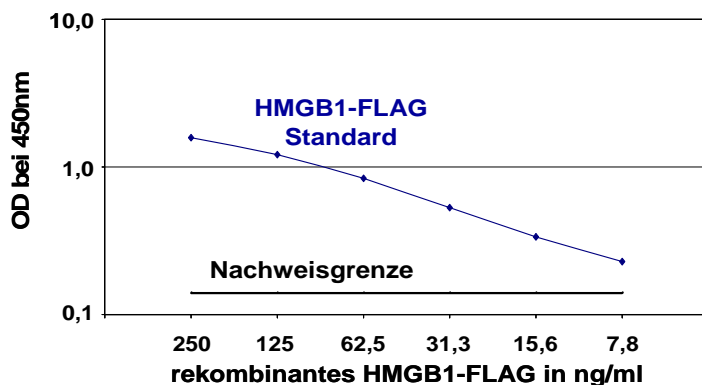
Abb. 5.32: Aufbau des HMGB1 Capture ELISA

Bei der Durchführung des HMGB1-ELISA wurden abweichend vom Standardprotokoll für ELISA (s. 4.22) Inkubationszeit, -temperatur und die verwendeten Lösungen geändert. Die zu messenden Proben und der Standard wurden jeweils vorab mit gleichem Volumen an 1 % TBS-BSA vorverdünnt. Alle weiteren Verdünnungen der Proben erfolgten dabei ebenfalls mit dieser Lösung. Die Beschichtung (Antikörper verdünnt in PBS – Inkubation über Nacht), die Blockierung (300 µl/Delle 2 % BSA-PBS für 2 Stunden), die Inkubation der zu testenden Probenverdünnungen (für 24 Stunden) und die Detektion des gebundenen HMGB1 durch den POD markierten Kaninchen-anti-Hund HMGB1 Antikörper (Inkubation für 2 Stunden) erfolgten stets bei Raumtemperatur. Durch diese Veränderungen konnte die Sensitivität des ELISA erhöht und gleichzeitig die unspezifischen Bindungen auf ein Minimum reduziert werden.

Um die Messgrenze des ELISA zu ermitteln, wurde ein Standard aus rekombinantem HMGB1-FLAG (2-fach gereinigt, s. 5.11) eingeführt und in Aliquots bis zum einmaligen Gebrauch bei -20°C gelagert. Seine Konzentration wurde mehrfach im BCA-Protein Assay (s. 4.16.2) bestimmt. Als Negativkontrolle diente ein Protein aus gleicher Aufreinigung.

Die absolute Nachweisgrenze wurde wie im TNF $\alpha$  ELISA2 durch die höchste Summe des Mittelwerts der Kontrolle im 4-fach Ansatz und deren 3-fache Standardabweichung (absolute

Nachweisgrenze = Kontrolle + 3 x SD) festgelegt. Auch im HMGB1 Capture ELISA lag das Ende des linearen Bereichs in der doppelt-logarithmischen Darstellung über der so festgelegten absoluten Nachweisgrenze. Für eine exakte Probenmessungen wurde deshalb das Detektionslimit für das Ende des linearen Bereichs in dieser Darstellung definiert (s. Abb. 5.33). Daraus ergab sich für den ELISA eine untere Nachweisgrenze von ca. 8 ng/ml rekombinantes HMGB1.



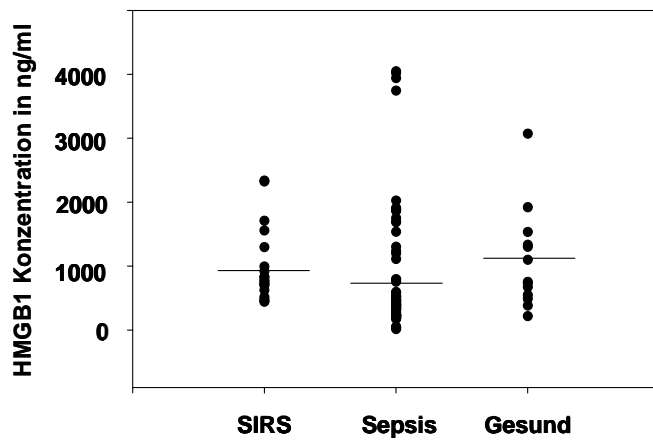
**Abb. 5.33: Ermittlung der Detektionsgrenze des HMGB1 ELISA**

Der rekombinante canine HMGB1-FLAG Standard wurde log<sub>2</sub> titriert. Dargestellt ist der lineare Bereich der Titrationskurve und die absolute Nachweisgrenze (MW Kontrolle + 3 x SD) in der doppelt-logarithmischen Darstellung. Die Messgrenze innerhalb dieses ELISA wurde bei 8 ng/ml festgelegt.

## 5.19 Quantitative HMGB1 Messung bei caniner Sepsis im ELISA

Mit Hilfe des HMGB1 Capture ELISA war es nun möglich, das Zytokin nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ zu erfassen. Hierfür wurden die bereits im Western Blot unter Abschnitt 5.16 - Tab. 5.5 untersuchten Plasmen sepsiskranker und gesunder Hunde vergleichend im ELISA gemessen.

Wie im Western Blot unter 5.16 qualitativ gezeigt, konnte auch im ELISA kein quantitativer Unterschied zwischen kranken und gesunden Tiere gemessen werden (s. Abb. 5.34). Dabei wurden die untersuchten Tiere in SIRS Patienten, septische Patienten und gesunde Tiere untergliedert. Auch die Unterteilung der einzelnen Gruppen nach überlebenden und gestorbenen Patienten bzw. eine Untersuchung der Kinetik zwischen den drei Behandlungstagen eines Patienten (Tag der Einlieferung, 1. und 2. Behandlungstag) erbrachte aufgrund der weiten Streuung der Messwerte in der Gruppe der gesunden Tier keinen Zusammenhang zwischen HMGB1 Plasmaspiegel und dem Verlauf der Krankheit. Die statistische Analyse der Messwerte der drei Gruppen ist in Tab. 5.6 zusammengefasst.



**Abb. 5.34: HMGB1 Plasmamessung von gesunden und septischen Hunden und Tieren mit SIRS Symptomatik**

Die HMGB1 Konzentration im Plasma von SIRS- Patienten, sepsiskranken und gesunden Hunden wurde im ELISA bestimmt. Aufgetragen wurden die Einzelmesswerte und der Mittelwert (Querstrich) der jeweiligen Gruppe.

	<b>SIRS</b>	<b>SEPSIS</b>	<b>GESUND</b>
<b>Mittelwert</b>	999,52	794,7	1081,2
<b>Standardabweichung</b>	582,9	962,5	777,6
<b>Standardfehler</b>	133,7	114,7	215,7
<b>Minimum</b>	441,9	14,7	216,2
<b>Maximum</b>	2337,4	4048,6	3072,6

**Tab. 5.6: Statistische Eckdaten der HMGB1 Messwert-Analyse aus Abb. 5.34 (Werteangaben in ng/ml)**



## 6 Diskussion

### 6.1 Meßsysteme für canines TNF $\alpha$

Zu Beginn dieser Arbeit waren zur Messung von caninem TNF $\alpha$  ausschließlich zellbasierte Assays wie z.B. der WEHI Bioassay [148] beschrieben. Wie unter 5.3 beschrieben, basieren diese Assays auf dem Prinzip der TNF $\alpha$  induzierten Zelllyse. Durch ihre hohe Sensitivität gegenüber dem Zytokin eignen sich diese Verfahren besonders gut zur Messung und Bioaktivitätskontrolle rekombinanten Proteins bzw. zur Bestimmung der TNF $\alpha$  Konzentration in Zellkulturüberständen. Hierbei konnte eine Nachweisgrenze in einem Bereich von ungefähr 3 bis 30 pg/ml erzielt werden [14, 155]. Bei der TNF $\alpha$  Konzentrationsbestimmung in Serum, Plasma oder Synovia erwiesen sich diese Assays allerdings als weit weniger sensitiv. Da dieses Probenmaterial in hohen Konzentrationen auch frei von TNF $\alpha$  die Zellen im Assay lysiert, müssen sie entsprechend vorverdünnt werden. Für canines Serum wurde hierfür eine Verdünnung von 1:20 ermittelt [148], was die Nachweisgrenze in diesen Assays für canines Serum-TNF $\alpha$  auf 60 bis 600 pg/ml erhöht.

Für eine Untersuchung der TNF $\alpha$  Spiegel sepsiskranker Hunde ist diese Nachweisgrenze jedoch ungenügend. Aus humanmedizinischen Studien ist bekannt, dass bei sepsiskranken Patienten das Zytokin in einer Konzentration von 50pg/ml und weniger im Serum vorliegt [156]. Die zellbasierten Assays waren für eine aussagekräftige Analyse dementsprechend nicht sensitiv genug. Darüber hinaus ist der Zeit- und Materialaufwand für einen solchen Assay ungleich höher als beispielsweise für ein entsprechendes ELISA System. Aus diesen Gründen mußte für die Messung der TNF $\alpha$ -Spiegel sepsiskranker Hunde ein neues ELISA-System entwickelt werden.

#### 6.1.1 Expression von caninem TNF $\alpha$

Das rekombinante Protein wurde sowohl im prokaryotischen als auch im eukaryotischen System exprimiert. Für die prokaryotische Expression wurde die TNF $\alpha$ -Sequenz in den Expressionsvektor pET100 kloniert. Durch Expression dieses Konstruktes in *E.coli* konnte ein Protein gewonnen werden, welches am aminoterminalen Ende mit sechs Histidinen (6-His Tag) versehen ist. Mit Hilfe dieser Markierung war es möglich, das Protein über eine Ni-NTA

Affinitätschromatographie aufzureinigen. Rekombinantes TNF $\alpha$  konnte dadurch rasch in großer Menge (4-5 mg pro 1l Expressionsvolumen) und akzeptabler Reinheit (ca. 95 %) erhalten werden. Mit diesem Protein wurde nun ein Kaninchen immunisiert, um dadurch ein polyklonales Antiserum gegen canines TNF $\alpha$  zu gewinnen.

Der Nachteil der prokaryotischen Expression besteht allerdings darin, dass im Vergleich zur eukaryotischen Zelle das rekombinante Zytokin unterschiedlich prozessiert und sekundär modifiziert wird. Um in den neu aufzubauenden Messsystemen einen Standard zu etablieren, der dem natürlichen Zytokin möglichst ähnlich ist, wurde das Zytokin deshalb parallel auch im eukaryotischen System exprimiert. Dafür wurde es in den Expressionsvektor pCR3 - HA-FLAG kloniert und in 293T Zellen bzw. in CHO Zellen exprimiert. Das rekombinante Protein wurde durch den Vektor mit einem FLAG-Tag versehen (TNF $\alpha$ -FLAG) und konnte dadurch im Zellkulturüberstand identifiziert und über M2-anti-FLAG Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Die biologische Aktivität des Proteins konnte durch seine zytotoxische Wirkung auf die Zelllinie WEHI 164 im gleichnamigen Bioassay bestätigt werden (s. Abb. 5.6). Da dieser Effekt dosisabhängig ist, konnte zudem im Vergleich zu einem humanen rekombinanten TNF $\alpha$  Standard die Konzentration des caninen TNF $\alpha$ -FLAG ermittelt werden. Anschließend wurde das canine TNF $\alpha$ -FLAG in mehreren Aliquots bei -80°C gelagert und für alle weiteren Anwendungen als laboreigener Standard verwendet.

### 6.1.2 TNF $\alpha$ ELISA1

Mit Hilfe des polyklonalen Kaninchenserums gegen canines TNF $\alpha$ , dem eukaryotisch exprimierten TNF $\alpha$  und einem kommerziellen polyklonalen Ziege-anti-Hund TNF $\alpha$  Antikörper konnte nun ein erster ELISA zur Detektion des caninen Zytokins aufgebaut werden (TNF $\alpha$  ELISA1). Hierbei wurde die Mikrotiterplatte mit dem kommerziellen Antikörper beschichtet, die Detektion des gebundenen Antigens erfolgte mit dem polyklonalen Kaninchenserum (Abb. 5.12). Im Vergleich mit den direkt POD konjugierten Kaninchen-anti-Hund TNF $\alpha$  Antikörpern erwies sich der Einsatz der unmarkierten Antikörper zusammen mit dem sekundären Ziege-anti-Kaninchen IgG-POD Antikörper als weit sensitiver. Mit diesem Assay war es nun erstmals möglich, die Konzentration von caninem TNF $\alpha$  im ELISA zu bestimmen. Die Nachweisgrenze des Systems lag mit 1 ng/ml allerdings über den benötigten Anforderungen.

### 6.1.3 Expression von caninem P60-Fc

Zum Aufbau eines sensitiveren ELISA zur Messung von caninem TNF $\alpha$  wurde ein Bindungspartner benötigt, welcher eine höhere Affinität zum Zytokin besitzt, als die polyklonalen Kaninchenantikörper. Deshalb wurde der in der Literatur beim Menschen als hochaffin geltende TNF $\alpha$  Rezeptor Typ1 (P60) [75] für den Hund kloniert und exprimiert.

Dabei wurde der extrazelluläre Anteil des Rezeptors in den Expressionsvektor pCR3 – huFc ligiert. Dieser Vektor fügt dem exprimierten Protein zusätzlich den konstanten Anteil eines humanen IgG1 Moleküls hinzu, so dass ein so genanntes Fc-Fusionsprotein entsteht (P60-Fc). Mit Hilfe dieser Markierung war es möglich, das Protein aus dem Zellkulturüberstand der Expression über ProteinG Affinitätschromatographie aufzureinigen. Für die Kontrolle der Expression und zur Überprüfung der Bioaktivität des rekombinanten Proteins wurden 293T Zellen transient transfiziert. Der Überstand der Expression wurde zuerst erfolgreich im Fc-Tag ELISA analysiert (s. Abb. 5.5) und anschließend zusammen mit rekombinatem TNF $\alpha$ -FLAG im WEHI-Assay getestet. Die Bioaktivität des exprimierten P60-Fc konnte durch die Neutralisation der zytotoxischen Wirkung des rekombinanten Zytokins erfolgreich nachgewiesen werden (s. Abb. 5.7).

Für die Expression größerer Mengen an rekombinatem Protein wurden CHO Zellen stabil transfiziert. Trotz verschiedener Modifikationen der Expressionsbedingungen war die Menge des rekombinanten Proteins jedoch relativ gering. So konnten aus 1l Zellkulturüberstand nur etwa 10-20 $\mu$ g Protein aufgereinigt werden. Aus diesem Grund wurde die genetische Information für P60-Fc zusätzlich in den Vektor pMT/V5-His TOPO kloniert und damit Drosophila SL3 Zellen stabil transfiziert. Bei gleichem Expressionsvolumen konnte in diesem System ca. 11-mal mehr rekombinantes Protein gewonnen werden.

### 6.1.4 TNF $\alpha$ ELISA2

Mit Hilfe des rekombinanten P60-Fc wurde nun ein zweiter TNF $\alpha$  ELISA aufgebaut. Dabei wurde das Fusionsprotein direkt an die Mikrotiterplatte gebunden. Zur Detektion des daran bindenden Zytokins wurden sowohl das Kaninchen-anti-Hund TNF $\alpha$  Serum und das kommerzielle biotynilierte Ziege-anti-Hund TNF $\alpha$  Serum getestet. Es zeigte sich, dass das vom Rezeptor gebundene Antigen nur das kommerzielle Serum erkannt wurde. Die gebundenen

Detektionsantikörper konnten wiederum durch ein Streptavidin-POD Konjugat sichtbar gemacht werden (s. Abb. 5.13). Die Nachweisgrenze des Systems wurde mit Hilfe des rekombinanten TNF $\alpha$ -FLAG Standards bei 12pg/ml ermittelt.

Da der ELISA zur Detektion von TNF $\alpha$  in Plasma und Zellkulturüberständen auch nahe der Nachweisgrenze noch präzise, reproduzierbare und dadurch untereinander vergleichbare Werte liefern sollte, wurden die Qualitätsparameter Verdünnungsechtheit, Intra-Assay- und Inter-Assay-Präzision bestimmt. Hierfür wurden Zellkulturüberstände aus zwei verschiedenen Stimulationen von caninen PBL mit LPS und zwei verschiedene canine Plasmaproben, versetzt mit unterschiedlichen Konzentrationen an rekombinatem TNF $\alpha$ -FLAG, mehrfach getestet (s. 5.7). Alle ermittelten Werte lagen dabei innerhalb der allgemein anerkannten Qualitätsparameter für ELISA [152], so dass auch für Messungen nahe der Nachweisgrenze keine Abweichungen oder Ungenauigkeiten zwischen zwei verschiedenen Messwerten zu erwarten waren. Es zeigte sich auch, dass für die exakte Messung von caninem TNF $\alpha$  in diesem Messverfahren keine Vorverdünnung der Plasmaproben notwendig war, so dass auch die Nachweisgrenze für diese Proben bei 12pg/ml lag. Des Weiteren konnte durch die Messung von Zellkulturüberständen stimulierter PBL gezeigt werden, dass der ELISA nicht nur rekombinantes, sondern auch natürliches Zytokin detektieren konnte.

Durch den Einsatz des Rezeptors als Fängermolekül konnten die Vorzüge eines zellbasierten Assays teilweise in das ELISA System integriert werden. Da die Bindung zwischen Rezeptor und Ligand die biologischen Verhältnisse widerspiegelt, kann davon ausgegangen werden, dass nur biologisch aktives Protein im Assay gemessen wird. Der TNF $\alpha$  ELISA2 erfüllte demnach alle Anforderungen, die zur Messung von TNF $\alpha$  im Plasma sepsiskrankter Hunden notwendig waren.

## 6.2 Neutralisation von caninem TNF $\alpha$

Bei verschiedenen Krankheitsmodellen der Humanmedizin konnten in den vergangenen Jahren große Behandlungserfolge durch die Anwendung einer so genannten anti-Zytokintherapie erzielt werden. Eine besonders beeindruckende Verbesserung der klinischen Symptomatik wurde dabei durch die Blockade von TNF $\alpha$  bei entzündlichen Reaktionen mittels Antikörper oder löslichem Rezeptor erreicht. Durch die aufgebauten und etablierten Systeme zur Messung von caninem TNF $\alpha$  (TNF $\alpha$  ELISA2 und WEHI-Bioassay) war nun erstmals auch die *in vitro* Untersuchung

neutralisierender Effekte verschiedener Substanzen für den Hund möglich.

### **6.2.1 Rekombinantes P60-Fc**

Wie bei der Entwicklung des TNF $\alpha$  ELISA2 beschrieben, wurde die Bioaktivität des rekombinanten Rezeptor-Fc Fusionsproteins P60-Fc durch seine neutralisierende Wirkung auf canines TNF $\alpha$  im WEHI-Bioassay gezeigt. Dadurch war bereits eine erste Substanz zur erfolgreichen Bindung und Neutralisation von caninem TNF $\alpha$  entwickelt und identifiziert worden. Für eine eventuelle klinische Erprobung bzw. für einen dauerhaften klinischen Einsatz würden allerdings große Mengen des rekombinanten Proteins benötigt werden. Der vergleichbare lösliche humane Rezeptor (Etanercept) wird z.B. zur Behandlung von Rheumatoider Arthritis mit einer Dosierung von 50 mg/Patient und Woche appliziert [157]. Bei einer Behandlung von Hunden würden dementsprechend ebenfalls Mengen in Bereichen von einigen mg P60-Fc pro Injektion benötigt. Da die Herstellung solcher Mengen aus arbeitstechnischen und finanziellen Gründen schwierig durchzuführen gewesen wäre, wurden die kommerziell erhältliche humane anti-TNF $\alpha$  Therapeutika auf ihre Eigenschaft zur Blockade von caninem TNF $\alpha$  hin getestet.

### **6.2.2 Infliximab**

Infliximab ist ein chimärer (humanisierter) monoklonaler Antikörper, welcher den variablen Anteil eines murinen und den konstanten Anteil eines humanen Immunglobulins trägt. Wie unter Abschnitt 5.4 beschrieben, konnte mit diesem Antikörper erfolgreich die Zelllyse durch rekombinantes humanes TNF $\alpha$  im WEHI-Bioassay blockiert werden. Im Gegensatz dazu konnte jedoch auch mit hohen Konzentrationen von Infliximab keine Neutralisation des caninen TNF $\alpha$ -FLAG erreicht werden.

### **6.2.3 Etanercept**

Versuche zur Kreuzreaktivität zwischen humanem TNF $\alpha$  und dem caninen Rezeptorfusionsprotein P60-Fc im TNF $\alpha$  ELISA2 zeigten bereits deren Interaktion und die hohe Kompatibilität des caninen und des humanen TNF $\alpha$  Rezeptor-Ligand Systems (s. 5.8). Auch die umgekehrte Bindung von caninem TNF $\alpha$  und an den humanen Rezeptor war deshalb sehr

wahrscheinlich. Mit Etanercept, einem Fusionsprotein ähnlich dem P60-Fc aus dem extrazellulären Anteil des humanen TNF $\alpha$  Rezeptor Typ2 und dem konstanten Anteil eines humanen Immunglobulins, war ein entsprechendes Präparat aus der Humanmedizin verfügbar. Neutralisationstests im WEHI-Assay mit caninem TNF $\alpha$ -FLAG und Etanercept bestätigten die erfolgreiche Bindung und Neutralisation des Zytokins (s. 5.4). Mit Etanercept steht nun erstmals ein kommerziell erhältliches Präparat zur Verfügung, mit welchem auch im Hund eine anti-TNF $\alpha$  Therapie durchgeführt werden könnte.

### **6.3 TNF $\alpha$ in der caninen Sepsis**

Die große Homologie des caninen und des humanen TNF $\alpha$  Rezeptor-Ligand Systems konnte durch die gegenseitige Bindung der Zytokine an die jeweiligen Rezeptoren der anderen Spezies schon gezeigt werden (s. 6.2.3). Nicht nur strukturell, sondern auch funktionell weist dieses System bei beiden Spezies viele Gemeinsamkeiten auf. So konnte in induzierten Sepsis- oder Endotoxinämie-Modellen gezeigt werden, dass TNF $\alpha$  bei beiden Spezies zu Beginn der Erkrankung innerhalb weniger Minuten hoch reguliert wird, um nach 2-4 Stunden genauso schnell wieder abzusinken [19, 141]. Im Vergleich dazu ist über die Bedeutung von TNF $\alpha$  in der spontanen Sepsis beim Hund, deren pathologische Gegebenheiten im Vergleich zum induzierten Modell ungleich komplizierter sind, noch nichts bekannt. Mit dem neu aufgebauten und etablierten TNF $\alpha$  ELISA2 war es nun erstmals möglich, auch basale Spiegel des Zytokins während des Fortgangs der Erkrankung zu detektieren.

Zu diesem Zweck wurden Plasmaproben von 79 an Sepsis bzw. SIRS erkrankten Tieren zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten gesammelt (0 h, 6 h, 24 h und 48 h nach Einlieferung in die Klinik) um diese anschließend im TNF $\alpha$  ELISA2 zu analysieren (s. 5.9). Es zeigte sich, dass keiner der klinisch an Sepsis erkrankten Tiere einen messbaren Spiegel an TNF $\alpha$  aufwies. Dieses Ergebnis entspricht ebenfalls den Beobachtungen aus der Humanmedizin [92].

### **6.4 Klinische Bedeutung von TNF $\alpha$ beim Hund**

Lange Zeit hoffte man in der Humanmedizin, die Überlebensrate der an Sepsis erkrankten Patienten verbessern zu können, indem man gezielt die proinflammatorischen Wirkungen von

TNF $\alpha$  blockierte. Alle hierfür eingesetzten Antikörper und löslichen Rezeptorkonstrukte zeigten allerdings keinen Effekt [158]. Der Grund dafür lag in der schnellen Senkung des Zytokins, so dass bei den klinisch erkrankten Patienten nahezu kein TNF $\alpha$  mehr im Kreislauf zu detektieren war und dementsprechend auch kein Zytokin neutralisiert werden konnte. Die gleiche Kinetik des Zytokins im Verlauf der spontanen Sepsis konnte nun auch für den Hund belegt werden, so dass auch hier davon auszugehen ist, dass eine anti-TNF $\alpha$  Therapie keine Verbesserung der bisherigen Behandlungsmethoden bewirken dürfte.

Auch bei anderen akut inflammatorischen Reaktionen, wie sie z.B. nach chirurgischer Reposition einer Magendrehung beim Hund und dem darauf folgenden Reperfusionssyndrom entsteht, konnten keine erhöhten TNF $\alpha$ -Spiegel im Serum nachgewiesen werden (s. 5.10). Für diese Untersuchungen wurde von den Patienten jeweils direkt vor und nach dem Eingriff sowie ca. 8 h später Serum gewonnen, wodurch auch eine schnelle Kinetik des Zytokins erfasst werden hätte müssen. Aus all diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass bei Mensch und Hund durch eine zusätzliche anti-TNF $\alpha$  Therapie bei akut inflammatorischen Reaktionen keine Verbesserung der bisherigen Therapie erzielt werden dürfte.

Im Gegensatz dazu könnte ein solcher Therapieansatz bei chronisch inflammatorischen Krankheiten weit mehr Erfolg versprechen. Wie die Behandlung von Rheumatoider Arthritis oder Morbus Crohn beim Menschen gezeigt hat, konnte hierbei durch den Einsatz von anti-TNF $\alpha$  Therapeutika eine enorme Verbesserung der klinischen Symptomatik erreicht werden [98, 157, 159]. Aufgrund der hohen funktionellen Homologie des TNF $\alpha$  Systems zwischen Mensch und Hund könnten auch vergleichbare Krankheitsbilder beim Hund, wie z.B. die Rheumatoide Arthritis oder bestimmte Formen der „Chronic Bowel Disease“ mit einer anti-TNF $\alpha$  Therapie eventuell erfolgreich behandelt werden. Der TNF $\alpha$  ELISA2 eignet sich dabei als ideales Testsystem für erhöhte Zytokin-Spiegel im Serum, um entsprechende Patienten für eine anti-TNF $\alpha$  Therapie zu identifizieren.

Auffällig bei der Verteilung der Krankheitsbilder ist, dass nur solche mit nachgewiesener (z.B. RA) oder äußerst wahrscheinlicher autoimmuner Pathogenese (z.B. Ulzerative Colitis) erhöhte TNF $\alpha$  Spiegel aufweisen. So konnte z.B. bei einer Studie von Menschen mit verschiedenen Formen von Darmentzündungen festgestellt werden, dass Patienten mit Morbus Crohn oder Ulzerativer Colitis einen erhöhten TNF $\alpha$ -Spiegel im Serum aufwiesen (>100 pg/ml) [96]. Aus diesen Überlegungen heraus könnte der TNF $\alpha$  ELISA2 auch zu einer zusätzlichen Hilfe in der

Diagnostik von autoimmunbedingten chronischen Entzündungsreaktionen Verwendung finden. Für eine mögliche anti-TNF $\alpha$  Therapie würde sich das bei Hund erfolgreich *in vitro* getestete kommerziell erhältliche Präparat Etanercept eignen. Bei einer einmaligen Verabreichung des Präparates oder wenigen Injektionen in kurzem Abstand sind aufgrund der allgemeinen Zulassungsbestimmungen keine Komplikationen oder Unverträglichkeiten beim Hund zu erwarten. Dagegen kann eine länger andauernde Gabe eventuell die sog. Serumkrankheit hervorrufen. Da Etanercept ein humanes rekombinantes Fusionsprotein ist, würde es im Körper eines Hundes eine gezielte Antikörperantwort hervorrufen. Bei erneuter Verabreichung des Fremdproteins könnten daraufhin Antigen-Antikörperkomplexe entstehen und möglicherweise klinische Symptome wie Fieber, Ausschläge, Arthritis oder Glomerulonephritis hervorrufen. Ob und wie stark diese Reaktion ausfällt, hängt allerdings vom jeweils behandelten Patienten ab. Aufgrund der angesprochenen Kinetik für TNF $\alpha$  in der spontanen Sepsis und der dadurch bedingten Wirkungslosigkeit einer anti-TNF $\alpha$  Therapie wurde nun in den vergangenen Jahren vielfach nach so genannten „late inflammatory factors“ gesucht. Dies sind vor allem proinflammatorische Zytokine, welche erst später im Verlauf der Pathogenese der Sepsis auftreten und demnach für das Andauern der Krankheit zumindest mitverantwortlich sind. Mit HMGB1 wurde nun erstmals ein solcher Faktor identifiziert. Im Gegensatz zu TNF $\alpha$  erscheint er erst ca. 16 h nach Beginn der Infektion im Serum der Patienten, also zu einem Zeitpunkt, zu dem bereits klinische Symptome der Krankheit aufgetreten sind. Durch diese Kombination aus verspäteter Kinetik und proinflammatorischer Wirkung gilt HMGB1 als potentieller Faktor für eine Erfolg versprechende Anti-Zytokintherapie im Rahmen der Sepsis. Um auch die Bedeutung von HMGB1 für die canine Sepsis zu untersuchen, wurden nun auch Nachweissysteme für dieses Zytokin aufgebaut.

## 6.5 Meßsysteme für canines HMGB1

Die zu Beginn dieser Arbeit am besten beschriebene Methode zur Messung von HMGB1 in Serum, Plasma oder Zellkulturüberstand war das Western Blot Verfahren. Zur Quantifizierung des spezifischen HMGB1 Gehalts wurden die erhaltenen Banden anschließend densitometrisch analysiert. Für dieses Verfahren mussten die Proben allerdings stets vorbehandelt werden, wofür zwei unterschiedliche Protokolle in der Literatur beschrieben sind. Bei der ersten Methode nach Rouhiainen [122] wurden die Proben zusammen mit Heparin-Sepharose bei einem NaCl Gehalt



von 0,4M inkubiert und anschließend das an die Heparin-Sepharose gebundene HMGB1 durch Aufkochen mit Lämmli Puffer wieder gelöst. Dieser Puffer mit dem gelösten HMGB1 wurde nun im Western Blot aufgetragen. Bei der zweiten Methode nach Wang [126] wurden die Proben zuerst durch einen 100 kDa Centricon® Filter zentrifugiert, um anschließend mit Hilfe eines 10 kDa Centricon® Filter eingengt zu werden. Die so erhaltenen Konzentrate wurden nun wiederum mit Lämmli Puffer aufgeköcht und aufgetragen.

Beim direkten Vergleich der beiden Methoden konnte jedoch festgestellt werden, dass bei der Analyse der gleichen Proben verschiedene Ergebnisse erzielt wurden [142]. Ein Grund dafür liegt sicherlich in der unterschiedlichen Vorbehandlung der Proben. Da jede Manipulation von Probenmaterial vor der eigentlichen Analyse stets die natürlichen Ausgangsbedingungen verändert und somit auch verfälschen kann, war es ein Ziel dieser Arbeit, Nachweissysteme für HMGB1 aufzubauen, welche ohne Vorbehandlung der Proben durchzuführen sind und das Zytokin in einem Bereich von mindestens 10 ng/ml nachweisen können.

### 6.5.1 Expression von caninem HMGB1

HMGB1 wurde rekombinant im prokaryotischem System exprimiert. Die cDNA Sequenz des Zytokins wurde hierfür zuerst in den Expressionsvektor pET100 kloniert, welcher dem eigentlichen Protein wie unter 5.11 beschrieben aminoterminal einen 6-His Tag anfügt. Die Expression des Konstruktes erfolgte in BL21 *E.coli* Bakterien und mit Hilfe des 6-His Tag war es anschließend möglich, das Protein über Ni-NTA Affinitätschromatographie aufzureinigen. Rekombinantes HMGB1 konnte dadurch rasch hergestellt werden, allerdings war die Menge des exprimierten Proteins im Vergleich zur TNF $\alpha$  Expression (s. 6.1.1) mit ca. 1 mg/l Expressionsvolumen eher gering. Dieses Problem wurde in der Literatur schon mehrmals beschrieben und kann auf die starke Polarität des Proteins und seine daraus resultierende toxische Wirkung auf Bakterien zurückgeführt werden [104]. Auch die Reinheit des rekombinanten Proteins aus diesem System war nicht zufriedenstellend. Neben den zu erwartenden Proteinfraktionen in einer Größe von ca. 32 kDa und 30 kDa, welche für rekombinantes HMGB1 aus bakterieller Expression typisch sind [153], fanden sich stets auch äußerst deutlich Proteinfraktionen bei 27 kDa, 17 kDa und weniger (s. Abb. 5.17). Durch eine Analyse der aufgereinigten Proteine im Western Blot mit verschiedenen Antikörpern, wie dem kommerziellen anti-6-His-Tag Antikörper, den beiden HMGB1 pepitdspezifischen Antikörpern (s. 5.15) und

dem kommerziellen Maus-anti-Mensch HMGB1 Antikörper, konnte eindeutig gezeigt werden, dass es sich bei den kleineren Proteinfractionen um N-terminale Fragmente des rekombinanten HMGB1 Proteins handelt (s. Abb. 5.30). Um nicht fragmentiertes HMGB1 zu erhalten, wurde das Protein zusammen mit einem C-terminalen FLAG-Tag erneut in den Expressionsvektor pET100 kloniert. Das so in *E.coli* exprimierte Protein besaß daraufhin N-terminal einen 6-His Tag und C-terminal den neu hinzugefügten FLAG-Tag. Dadurch war es möglich, das rekombinante Protein zunächst über Ni-NTA Affinitätschromatographie und im Anschluss daran über M2-anti-FLAG Affinitätschromatographie aufzureinigen. Die Reinheit der so erhaltenen Proteinlösung lag bei ca. 98 % (s. Abb. 5.18) rekombinantes HMGB1-FLAG. Mit diesem Protein wurde nun ein Kaninchen immunisiert und ein polyklonales Antiserum gegen canines HMGB1 gewonnen.

Da Proteine aus prokaryotischer Expression im Vergleich zur eukaryotischen Expression eine unterschiedliche Struktur und posttranslationale Modifizierung besitzen, wurde versucht, HMGB1 in verschiedenen Säugerzellen rekombinant zu exprimieren. Das so exprimierte Protein sollte in den Testsystemen später als Standard eingesetzt werden. Trotz verschiedenster Modifikationen ist es dabei jedoch nicht gelungen, HMGB1 in Säugerzellen oder in *Drosophila* SL3 Zellen rekombinant zu exprimieren. Der Grund dafür ist nicht genau bekannt. Es ist jedoch zu vermuten, dass das rekombinante Protein in der eukaryotischen Zelle biologische Aktivität besitzt und durch seine Funktion als Transskriptionsfaktor die Zelle in ihrem Wachstum behindert.

### **6.5.2 Bioaktivität des rekombinanten HMGB1**

Um die biologische Aktivität des bakteriell exprimierten HMGB1 zu überprüfen, wurden Zellen *in vitro* mit dem rekombinanten Zytokin stimuliert und anschließend deren Überstände auf die Anwesenheit weiterer proinflammatorischer Zytokine getestet. Da allerdings rekombinantes Protein aus bakterieller Expression stets mit LPS kontaminiert ist und dies Stimulationsversuche erheblich beeinflussen würde, musste dieses vorab aus den Proben entfernt werden. Dies erfolgte mit Hilfe der TritonX 114 Phasenseparation und über Polymyxin B Affinitätschromatographie. Um letzte Spuren von LPS zu detektieren, wurde die Proteinlösung anschließend noch einmal im Limulus Amebocyt Lysat Test analysiert und die noch verbleibende LPS Kontamination mit 6Units Polymyxin B pro pg LPS im Stimulationsansatz neutralisiert.

Für die Stimulation der murinen Makrophagenzelllinie RAW 264.7 wurden zwei verschiedene Assayformen ausgearbeitet und mit rekombinantem HMGB1 aus beiden Aufreinigungen (aufgereinigt über Ni-NTA Agarose oder über Ni-NTA Agarose und M2-anti-FLAG Sepharose) inkubiert. HMGB1, welches nur den 6-His Tag besaß und dementsprechend nur einmal aufgereinigt wurde, konnte die Makrophagenzelllinie nicht zur Sekretion weiterer Zytokine anregen. Wie schon unter 6.5.1 erläutert, enthält diese Proteinlösung verschiedene N-terminale Teilfragmente des Gesamtproteins, darunter auch eine Fraktion bei ca. 17 kDa, welche der A-Box von HMGB1 entspricht. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass dieser Teilbereich des HMGB1 Proteins für sich alleine antiinflammatorische Wirkung besitzt [14]. In Kombination mit dem eigentlich proinflammatorischen HMGB1 neutralisierte die A-Box demnach dessen Wirkung im Assay.

Im Vergleich dazu konnten für das doppeltgereinigte HMGB1-FLAG sehr gute stimulative Effekte beobachtet werden. Die Assayvariante 1, welche in Anlehnung an Li et al. [153] aufgebaut wurde, zeigte dabei pro 1 µg rekombinantem HMGB1 einen TNF $\alpha$ -Gehalt im Überstand von ca. 10 ng/ml. Dies entspricht relativ genau den Werten, welche auch bei Li beschrieben wurden. Darüber hinaus wurde noch eine zweite Assayvariante etabliert, bei welcher die RAW Zellen durchschnittlich ca. 8-mal sensitiver auf das rekombinante Protein reagierten (s. Abb. 5.19). Zusätzlich wurden canine PBL mit verschiedenen Mengen des rekombinanten HMGB1-FLAG stimuliert und nach ca. 20 h deren Überstände auf canines TNF $\alpha$  und IL-6 hin analysiert. Es zeigte sich eine dosisabhängige proinflammatorische Stimulation der PBL durch das rekombinante Zytokin (s. Abb. 5.20).

### **6.5.3 Aufbau eines Western Blots zur qualitativen HMGB1 Analyse**

Mit Hilfe des rekombinanten HMGB1 und des damit erzeugten polyklonalen Antiserums konnte nun ein Western Blot zur Detektion von HMGB1 in Serum und Plasma aufgebaut werden.

Hierfür wurde das Probenmaterial aufgrund des hohen Proteingehalts und der daraus resultierenden schlechten Auftrennung im SDS-Gel mit destilliertem Wasser 1:10 vorab verdünnt und anschließend mit gleichem Volumen an Laemmli Puffer versetzt aufgetragen. Im Gegensatz zu den bereits etablierten Western Blot Verfahren musste somit das Probenmaterial nicht vorbehandelt werden. Die Western Blot Membran wurde anschließend mit dem Kaninchen-anti-Hund HMGB1 Serum inkubiert und die gebundenen Antikörper wiederum mit dem sekundären

Ziege-anti-Kaninchen IgG POD detektiert.

#### **6.5.4 Expression und Bioaktivität des caninen RAGE**

Ein weiteres Ziel neben dem Aufbau eines Western Blot Verfahrens zur qualitativen Bestimmung von HMGB1 war es, einen entsprechenden ELISA für eine zusätzliche quantitative Analyse zu entwickeln. Zu diesem Zweck wurde RAGE, der am besten charakterisierte Rezeptor für HMGB1, kloniert.

Am Beginn der Klonierungsarbeiten war die entsprechende Sequenz dieses Rezeptors für den Hund noch nicht bekannt. Mit Hilfe von Ensembl Datenbankanalysen konnten im komplett sequenzierten Hundegenom mit homologen RAGE Sequenzen anderer Spezies vergleichbare Abschnitte identifiziert werden. Anhand der so ermittelten Sequenz wurden nun Primer konstruiert. Dabei wurde wiederum nur der extrazelluläre Anteil des Rezeptors amplifiziert und zusammen mit dem Fc-Teil eines humanen IgG1 in den Expressionsvektor pcDNA3.1 kloniert. Ein Vergleich zwischen der potentiellen Sequenz des caninen RAGE aus der Datenbankanalyse, der tatsächlich klonierten Sequenz und einer im März 2006 publizierten Sequenz zeigte eine nahezu komplette Übereinstimmung (s. Abb. 5.21).

Zur Kontrolle der Expression wurden 293T Zellen mit diesem Konstrukt transient transfiziert und anschließend der Überstand auf die Anwesenheit von RAGE-Fc im Fc-Tag ELISA analysiert. Nach positiver Kontrolle der Expression wurde die genetische Information in den Expressionsvektor pMT/V5-His TOPO kloniert. Mit diesem Vektor war es nun möglich, die Drosophilazellen SL3 stabil zu transfizieren, um dadurch größere Mengen des rekombinanten Proteins zu erhalten. Die Aufreinigung des rekombinanten Fusionsproteins erfolgte wiederum über ProteinG Affinitätschromatographie (s. Abb. 5.23).

Zur Kontrolle der biologischen Aktivität von RAGE-Fc wurde dessen Bindung an das rekombinante HMGB1 überprüft. Sowohl durch Immunpräzipitation (s. Abb. 5.24) als auch im ELISA (s. Abb. 5.25) konnte diese Bindung gezeigt werden. Allerdings konnte eine Bindung an HMGB1 nur bei hohen Rezeptorkonzentrationen nachgewiesen werden, was auf eine geringe Affinität zwischen Rezeptor und Ligand hinweist. Damit war eine Verwendung von RAGE-Fc vergleichbar des P60-Fc in einem Capture ELISA System ausgeschlossen.

### 6.5.5 Antikörpergewinnung gegen Peptidsequenzen von HMGB1

Aufgrund der geringen Affinität zwischen HMGB1 und RAGE-Fc wurden nun weitere Antikörper zur Bindung des Proteins und zum Aufbau eines Capture ELISA benötigt. Dafür wurden zwei polyklonale Seren gegen spezifische Peptidsequenzen des HMGB1 Proteins erzeugt.

Die erste Peptidsequenz (Peptid1) repräsentiert einen Abschnitt innerhalb der A-Box im N-terminalen Bereich des Proteins. Dieser Abschnitt unterscheidet sich in seiner Sequenz zu dem hoch homologen HMGB2 Protein und ermöglicht dadurch eine spezifische Identifizierung von HMGB1. Das zweite Peptid (Peptid2) befindet sich in der Mitte des Proteins innerhalb der B-Box und repräsentiert einen Teilbereich der Sequenz, welche für die proinflammatorischen Eigenschaften von HMGB1 verantwortlich ist [107]. Die beiden Peptide wurden nach der Synthese an das Trägerprotein KLH gekoppelt, um anschließend zwei Kaninchen damit zu immunisieren. Die so gewonnenen Seren wurden sowohl im ELISA als auch im Western Blot auf ihre Bindungsfähigkeit gegenüber rekombinantem HMGB1 erfolgreich getestet (s. Abb. 5.30 und Abb. 5.31). Die Reinigung der Antikörper erfolgte über Affinitätschromatographie an einer dafür hergestellten peptidgekoppelten NHS-Sepharose.

### 6.5.6 HMGB1 ELISA

Zum Aufbau eines HMGB1 Capture ELISA wurden neben dem bereits erwähnten RAGE-Fc Fusionsprotein die drei polyklonalen Kaninchenantikörper (anti-Hund HMGB1, anti-Hund HMGB1-Peptid1 und anti-Hund HMGB1-Peptid2) sowie ein kommerziell erhältlicher monoklonaler Maus-anti-Mensch HMG1<sup>29</sup> Antikörper getestet. Alle Antikörper und der Rezeptor wurden in verschiedenen Kombinationen mit dem rekombinanten HMGB1-FLAG getestet. Die sensitivste Variante ergab sich dabei durch eine Beschichtung mit anti-Hund HMGB1-Peptid1 und einer Detektion mit anti-Hund HMGB1 Antikörpern. Zur Vereinfachung wurden der polyklonale Detektionsantikörper direkt an POD gekoppelt (Aufbau s. Abb. 5.32). Aufgrund der hohen Polarität von HMGB1 treten bei der Messung dieses Proteins im ELISA viele unspezifische Bindungen auf. Vor allem bei der Messung des Standards erwies sich dies als äußerst problematisch. Erst durch die Verwendung von Tris im Probenverdünnungspuffer konnte dieses Problem gelöst werden, so dass im linearen Messbereich keinerlei unspezifischen Bindungen mehr auftraten. Verschiedene Tests mit unterschiedlichen Inkubationszeiten zeigten

darüber hinaus, dass sich eine Probeninkubationszeit von ca. 24 h bei Raumtemperatur ebenfalls positiv auf die Verringerung der unspezifischen Bindungen bei gleichzeitiger Verbesserung der Sensitivität auswirkte.

Mit Hilfe des HMGB1-FLAG Standards, dessen Konzentration zuvor mehrmals im BCA Proteinassay getestet wurde, konnte die Nachweisgrenze des ELISA bei ca. 8 ng/ml festgestellt werden (s. Abb. 5.33).

## **6.6 HMGB1 in der caninen Sepsis**

Wie vorangegangene Untersuchungen bei Maus und Mensch bereits gezeigt hatten, konnte bei gesunden Probanden kein HMGB1 im Plasma detektiert werden. Bei sepsiskranken Patienten dagegen wurde das Zytokin regelmäßig nachgewiesen [14, 142]. Durch das aufgebaute Western Blot Verfahren konnte nun auch Plasma von gesunden und an Sepsis erkrankten Hunden erstmals auf HMGB1 untersucht werden. Bei den durchgeführten Western Blots wurde das Zytokin allerdings sowohl bei sepsiskranken als auch bei gesunden Hunden in vergleichbaren Mengen nachgewiesen (s. Abb. 5.28 und Abb. 5.29). Dies wurde auch durch die Überprüfung der gesunden Tiere im Western Blot mit anderen anti-HMGB1 spezifischen Antikörpern, wie sie bei der Entwicklung des Capture ELISA verwendet wurden, bestätigt.

Mit Hilfe des neu entwickelten HMGB1 Capture ELISA konnten die Proben nun zusätzlich quantifiziert werden. Darüber hinaus wurde durch den Einsatz von zwei Antikörpern bei der Antigenerkennung die Spezifität des Testsystems im Vergleich zum Western Blot weiter erhöht. Aber auch hier ergab die Messung der Plasmen gesunder Hunde ein positives Ergebnis. Die Höhe der HMGB1 Spiegel von gesunden und kranken Tieren waren dabei vergleichbar (s. Abb. 5.34).

## **6.7 Beurteilung der Messergebnisse und klinische Bedeutung von HMGB1 beim Hund**

Bei induzierten murinen Sepsismodellen wurde festgestellt, dass HMGB1 durch seine im Vergleich zu TNF $\alpha$  verspätete Kinetik ein möglicher therapeutischer Faktor ist. Seine Blockade in diesen Modellen erhöhte die Überlebensrate der septischen Mäuse dramatisch [14]. Serum-Bestimmungen von HMGB1 zeigten dabei stets nur eine Erhöhung des Zytokins beim Vorliegen einer klinischen Sepsis, jedoch niemals bei gesunden Tieren. Des Weiteren wurde aufgrund

verschiedener Studien am Menschen lange Zeit vermutet, dass die Serumkonzentration des Zytokins im Verlauf der Sepsis diagnostische und prognostische Aussagekraft besitzt [107, 142]. Diese Erwartung an HMGB1 als möglicher therapeutischer, diagnostischer und prognostischer Faktor konnte jedoch aufgrund der hier durchgeführten Untersuchungen beim Hund nicht bestätigt werden.

Ein generelles Problem bestand darin, dass trotz verschiedenster Modifikationen der Messtechnik HMGB1 in vergleichbaren Konzentrationen sowohl bei kranken als auch bei gesunden Tieren messbar war. Diese Tatsache wirft vor allem im Zusammenhang mit anderen publizierten Daten aus der Humanmedizin einige Fragen über die Funktion und die Messtechnik von HMGB1 auf.

Zur funktionellen Charakterisierung von HMGB1 konnte gezeigt werden, dass rekombinantes canines HMGB1-FLAG canine PBL zur Sekretion weiterer Zytokine wie  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6 anregt und somit als proinflammatorisches Zytokin wirkt. Dennoch konnte aufgrund der Messergebnisse keine HMGB1 Kinetik zwischen gesunden und sepsiskranken Hunden beobachtet werden. Eine generelle Erhöhung eines proinflammatorischen Zytokins auch beim gesunden Hund scheint eher unwahrscheinlich. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die sekundäre Modifikation von HMGB1 sein. Schon mehrere Untersuchungen haben gezeigt, dass HMGB1 durch Azetylierung, Phosphorylierung und Glykosylierung seine Funktion z.B. als Transkriptionsfaktor regulieren kann [160]. Auch für die proinflammatorischen Eigenschaften des Proteins wird eine solche Form der Regulierung schon seit längerem diskutiert [109]. Im Capture ELISA könnte demnach die gesamte Konzentration an HMGB1 und nicht allein der proinflammatorisch wirkende Anteil gemessen worden sein. Da allerdings das Auftreten von HMGB1 im Serum gesunder Menschen bisher noch nicht beschrieben wurde, müsste demzufolge der Hund einen physiologisch sehr hohen Anteil des nicht-inflammatorisch wirkenden HMGB1 im Serum besitzen.

Ein weiterer Widerspruch zu den humanmedizinischen Daten zeigt sich in der Höhe der gemessenen HMGB1 Spiegel. Veröffentlichungen, bei welchen die beiden Western Blot Verfahren zur Messung verwendet wurden, berichten hierbei von HMGB1 Konzentrationen im Serum septischer Patienten in einem Bereich von 20 bis 60 ng/ml [142]. In einem kürzlich publizierten ELISA wurden dagegen im Durchschnitt nur ca. 10 ng/ml HMGB1 gemessen [161]. Im aufgebauten Capture ELISA für HMGB1 beim Hund wurde durchschnittlich ein Wert von ca. 800 ng/ml beim septischen Patienten ermittelt. Ein Unterschied zwischen Serum- oder Plasmaproben konnte dabei nicht festgestellt werden. Diese Varianz an Konzentrationen ist sicherlich zum einen durch die Unterschiedlichkeit der Meßsysteme und der eingesetzten

Standards zu erklären. Wie bereits unter 6.5 erläutert, konnte schon im Vergleich der beiden meistpublizierten Western Blot Methoden ein erheblicher Unterschied in deren Messgenauigkeit gezeigt werden [142]. Zum anderen gilt es allerdings, den aufgebauten HMGB1 Capture ELISA zukünftig weiteren Tests zu unterziehen, um dadurch vollkommen auszuschließen, dass kein anderes Protein mit ähnlicher Sequenz, wie z.B. HMGB2, die Messung verfälscht. Um dies zu testen, könnte, wie bereits beim Menschen publiziert, ein weiterer peptidspezifischer Antikörper generiert werden, welcher noch deutlicher zwischen HMGB1 und HMGB2 unterscheidet als der hier verwendete HMGB1-Peptid1 Antikörper [162]. Des Weiteren könnten die beiden Proteine nativ aus dem Überstand von bestimmten Zelllinien oder Lungenlavagen über Affinitätschromatographie und Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt werden [162-165], um somit die verwendeten Antikörper auf Kreuzreaktivität gegenüber natürlichem eukaryotischen Protein zu testen. Auf Grund der äußerst hohen Sequenzhomologie von HMGB1 zwischen Hund und Mensch könnten auch humane Seren gesunder und sepsiskranker Individuen mit dem Capture ELISA untersucht werden, um somit eventuell die Sonderstellung des Zytokins beim Hund weiter zu belegen. Gleichzeitig wäre es möglich, bei erfolgreicher speziesübergreifender Reaktivität des Testsystems den ELISA auch im humanmedizinischen Bereich einzusetzen.

## **6.8 TNF $\alpha$ , HMGB1 und weitere Faktoren im Blickfeld der Sepsistherapie**

Eines der wichtigsten Ziele der Sepsisforschung ist es nach wie vor, Faktoren zu identifizieren, die wesentlichen Einfluss auf die Immunpathogenese der Krankheit besitzen. Man hofft, mit Hilfe solcher Schlüsselmoleküle sowohl die Diagnose als auch die Therapie der Sepsis entscheidend verbessern zu können. Sowohl HMGB1 als auch TNF $\alpha$  sind zwar wichtige Faktoren in der Immunpathogenese der Sepsis, eignen sich allerdings nur bedingt oder gar nicht als mögliches Ziel einer verbesserten Sepsistherapie.

Vor allem in der Entstehungsphase der Sepsis ist TNF $\alpha$  der zentrale Faktor [87, 88]. Durch eine Blockade des Zytokins kurz vor oder mit der Induktion einer septischen Infektion konnten die klinischen Symptome komplett unterdrückt werden. Es zeigte sich allerdings auch, dass dieses proinflammatorische Molekül im Stadium der klinischen Erkrankung sowohl beim Menschen als auch beim Hund kaum noch nachweisbar ist. Aus diesem Grund bewirkte auch eine Neutralisation des Zytokins im sepsiskranken Menschen keine Verbesserung der Therapie.



Daraus folgt, dass  $\text{TNF}\alpha$  im Rahmen der Sepsis weder diagnostisch noch therapeutisch verwendbar ist.

Mit HMGB1 wurde dagegen zum ersten Mal ein proinflammatorisches Zytokin beschrieben, dessen Hochregulation erst nach Beginn der klinischen Symptomatik bei Mensch und Maus erfolgt. Wegen dieser verspäteten, dafür aber lang andauernden Sekretion des Zytokins gilt HMGB1 daher in der Humanmedizin als vielversprechendes Ziel einer anti-Zytokintherapie. Auf Grundlage der hier durchgeführten Untersuchungen konnte allerdings gezeigt werden, dass HMGB1 beim Hund wahrscheinlich gänzlich anders reguliert wird. So konnte im Gegensatz zum Menschen kein Unterschied in der HMGB1 Konzentration zwischen gesunden und sepsiskranken Hunden festgestellt werden. Deshalb scheint beim Hund auch dieser Faktor kein Erfolg versprechendes Ziel einer anti-Zytokintherapie zu sein.

Neben diesen etablierten Zytokinen wird momentan eine Vielzahl weiterer verschiedener Moleküle auf ihre Funktion in der Immunpathogenese der Sepsis hin untersucht. Zu ihnen zählen unter anderen auch TREM, CD64, C2TA, Follistatin, Procalcitonin, TLR4 und Cortistatin [15, 42, 62, 68, 166, 167]. Untersuchungen beim Hund über diese Faktoren liegen noch nicht vor. Zukünftige Studien müssen demnach zeigen, ob einer dieser Faktoren oder eventuell ein anderer noch unbekannter Faktor das Potential besitzt, Ziel einer verbesserten Sepsistherapie zu sein.

## 7 Zusammenfassung

Trotz des Einsatzes verschiedenster sehr potenter Antibiotika und Antiphlogistika in Verbindung mit einer ausgereiften intensivmedizinischen Betreuung ist die Sepsis sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin heute immer noch eine der häufigsten Todesursachen. Die Immunpathogenese der Erkrankung ist gekennzeichnet durch eine systemische Entzündungsreaktion, hervorgerufen durch eine frühe Sekretion des Zytokins *Tumor Nekrose Faktor alpha* (TNF $\alpha$ ). Im Vergleich zu TNF $\alpha$  gilt dagegen das erst kürzlich entdeckte Zytokin *High Mobility Group Box 1* (HMGB1) als später proinflammatorischer Faktor. Um nun die Rolle dieser beiden Zytokine in der caninen Sepsis näher zu untersuchen, wurden neue sensitive Nachweismethoden etabliert und zusätzlich zwei bereits kommerziell erhältliche Substanzen aus der Humanmedizin zur Neutralisation von caninem TNF $\alpha$  *in vitro* getestet.

Anhand bereits publizierter Sequenzen und mit Hilfe der Ensembl Datenbank konnten per PCR die Sequenzen für canines TNF $\alpha$ , TNFR1 (P60), HMGB1 und dessen Rezeptor RAGE kloniert und die Proteine rekombinant exprimiert werden. Die Bioaktivität und die Konzentration des rcanTNF $\alpha$  wurden in einem Zytotoxizitäts Assay mit der Zelllinie WEHI164 getestet. Die Bioaktivität des P60-Fc Fusionsproteins wurde durch seine neutralisierende Wirkung auf das zytotoxische rcanTNF $\alpha$  im gleichen Assay nachgewiesen. Mit Hilfe des P60-Fc Fusionsproteins und einem kommerziellen biotinylierten Ziege-anti-Hund TNF $\alpha$  Antikörper konnte ein entsprechender sensitiver ELISA aufgebaut werden. Gleichzeitig wurden ebenfalls im WEHI-Bioassay die zwei humanen anti-TNF $\alpha$  Therapeutika Infliximab und Ethanercept auf ihre Eigenschaft zur Bindung und Neutralisation von caninem TNF $\alpha$  hin getestet. Nur Ethanercept konnte dabei das Zytokin binden und neutralisieren.

Anschließend wurden Plasmaproben von 79 klinisch an Sepsis erkrankten Hunden analysiert und im TNF $\alpha$  ELISA quantifiziert. Keine der untersuchten Proben wies dabei jedoch einen erhöhten Spiegel an TNF $\alpha$  im Plasma auf.

Aus diesem Grund wurden nun auch mit Hilfe zweier polyklonaler Seren gegen rcanHMGB1 und gegen eine spezifische Peptidsequenz des Zytokins ein Western Blot Verfahren und ein Capture ELISA für die Messung von HMGB1 aufgebaut. HMGB1 konnte dabei allerdings sowohl bei gesunden als auch bei sepsiskranken Hunden in vergleichbaren Mengen nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der Einsatz der beschriebenen Messsysteme einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis der Immunpathogenese der caninen Sepsis leisten kann. Dies kann zukünftig dazu beitragen, bessere Diagnose- und Therapieansätze für die canine Sepsis zu entwickeln und eventuell die spontane Sepsis beim Hund als mögliches Tiermodell für die Humanmedizin zu etablieren.

## 8 Summary

### **Development of sensitive detection systems for the functional characterization of HMG-B1 and TNFalpha in canine sepsis**

Despite significant advances in intensive care therapy, antibiotics and anti-inflammatory agents, like in human sepsis is still one of the leading causes of death in canine internal veterinary medicine. The immunopathology is characterized by a systemic inflammatory response mediated by an early release of Tumor Necrosis Factor alpha (TNF $\alpha$ ). In contrary to TNF $\alpha$  the recently identified cytokine High Mobility Group Box 1 (HMGB1) is supposed to be a late mediator in acute inflammatory reactions. To examine the role of these two cytokines in canine sepsis we established novel sensitive detection systems and tested two commercially available substances for the neutralization of canine TNF $\alpha$  in vitro.

Cloning of canine TNF $\alpha$ , the TNF $\alpha$ -R 1(P60), HMGB-1 and its receptor (RAGE) was performed by PCR using previously published sequence information and the canine genome Ensembl sequence. The bioactivity and concentration of purified rcanTNF $\alpha$  were verified using a standard cytotoxicity bioassay based on WEHI164 cells. The bioactivity of a P60-Fc fusion-protein was determined by its ability to neutralize the cytotoxic effect of rcanTNF $\alpha$  in the WEHI bioassay. Using the P60-Fc as capture reagent combined with a commercially available goat-anti-canine TNF $\alpha$  biotin conjugate a novel sensitive ELISA could be established. To examine possible crossreactive activities of two human anti-TNF $\alpha$  therapeutics Infliximab and Etanercept, their ability to bind and neutralize canTNF $\alpha$  was tested in the WEHI bioassay. Thus we could show that Etanercept but not Infliximab can bind and neutralize canTNF $\alpha$ .

We next analysed plasma from 79 dogs with diagnosed sepsis and quantified TNF $\alpha$ . Interestingly the TNF $\alpha$  levels were not elevated in these dogs.

For this reason we furthermore established a Western Blot and an ELISA to detect HMGB1 using two polyclonal antisera raised against procaryotically expressed recombinant HMGB1 and a synthetic peptide coding for HMGB1. In contrast to data obtained in human and mouse HMGB1 could be detected regularly in septic as well as in healthy dogs.

In conclusion, the established assays are important tools to characterize the immunopathogenesis of canine sepsis. This will ultimately lead to improved understanding, diagnosis and therapy of canine sepsis and may serve as a spontaneous animal model for human sepsis.

## 9 Literaturverzeichnis

- 1 **Brunkhorst F.M, E. C., Reinhart K, Bone H.-G, Brunkhorst R, Burchardi H, Eckhardt K.-U, Forst, H, G. H., Grond S, Gründling M, Huhle G, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, and Rossaint R, S. W., Stüber F, Weiler N, Welte T, and Loeffler M.** Epidemiology of severe sepsis and septic shock in Germany - results from the German "Prevalence" Study. *Critical Care* 2005. **9(Suppl 1):** S83.
- 2 **Psyhyrembel,** *Klinisches Wörterbuch.* de Gruyter Verlag, Hamburg: 1994.
- 3 **Reinhart, K., Brunkhorst, F. M., Bone, H. G., Gerlach, H., Grundling, M., Kreymann, G., Kujath, P., Marggraf, G., Mayer, K., Meier-Hellmann, A., Peckelsen, C., Putensen, C., Quintel, M., Ragaller, M., Rossaint, R., Stuber, F., Weiler, N., Welte, T. and Werdan, K.,** [Diagnosis and Therapy of Sepsis : Guidelines of the German Sepsis Society Inc. and the German Interdisciplinary Society for Intensive and Emergency Medicine.]. *Internist (Berl)* 2006. **47:** 356-373.
- 4 **Committee, M. o. t. A. C. o. C. P. S. o. C. C. M. C. C.,** Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Critical Care Medicine* 1992. **20:** 864-874.
- 5 **Rau, S., Kohn, B., Richter, C., Fenske, N., Küchenhoff, H., Hartmann, K., Härtle, S., Kaspers, B. and Hirschberger, J.,** Plasma IL-6 response is predictive for severity and mortality in canine SIRS and sepsis. in review process.
- 6 **Vincent, J.-L.,** Dear SIRS, I'm sorry to say that I don't like you. *Critical Care Medicine* 1997. **25:** 372-374.
- 7 **Marshall, J.,** SIRS and MODS: what is their relevance to the science and practice of intensive care? *Shock* 2000. **14:** 586-589.
- 8 **Mitchell M. Levy, M. P. F., John C. Marshall, Edward Abraham, Derek Angus, Deborah Cook, Jonathan Cohen, Steven M. Opal, Jean-Louis Vincent, Graham Ramsay for the International Sepsis Definitions Conference,** 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Medicine* 2003. **29:** 530-538.
- 9 **Rosenberg, A. L.,** Recent innovations in intensive care unit risk-prediction models. *Current Opinion in Critical Care* 2002. **8:** 321-330.
- 10 **De Silva, R. J., Anderson, A., Tempest, H. and Ridley, S.,** Sequential organ scoring as a measure of effectiveness of care in the high-dependency unit. *Anaesthesia* 2001. **56:** 850-854.
- 11 **Moreno, R., Vincent, J. L., Matos, R., Mendonca, A., Cantraine, F., Thijs, L., Takala, J., Sprung, C., Antonelli, M., Bruining, H. and Willatts, S.,** The use of maximum SOFA score to quantify organ dysfunction/failure in intensive care. Results of a prospective, multicentre study. Working Group on Sepsis related Problems of the ESICM. *Intensive Care Medicine* 1999. **25:** 686-696.
- 12 **Knaus, W. A., Draper, E. A., Wagner, D. P. and Zimmerman, J. E.,** APACHE II: a severity of disease classification system. *Critical Care Medicine* 1985. **13:** 818-829.
- 13 **Knaus, W. A., Wagner, D. P., Draper, E. A., Zimmerman, J. E., Bergner, M., Bastos, P. G., Sirio, C. A., Murphy, D. J., Lotring, T., Damiano, A. and et al.,** The APACHE III prognostic system. Risk prediction of hospital mortality for critically ill hospitalized adults. *Chest* 1991. **100:** 1619-1636.
- 14 **Yang, H., Ochani, M., Li, J., Qiang, X., Tanovic, M., Harris, H. E., Susarla, S. M., Ulloa, L., Wang, H., DiRaimo, R., Czura, C. J., Roth, J., Warren, H. S., Fink, M. P.,**

- Fenton, M. J., Andersson, U. and Tracey, K. J.,** Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2004. **101**: 296-301.
- 15 **Hörner, C., Bouchon, A., Bierhaus, A., Nawroth, P., Martin, E., Bardenheuer, H. and Weigand, M.,** Bedeutung der angeborenen Immunantwort in der Sepsis. *Der Anästhesist* 2004. **53**: 10-28.
- 16 **Buras, J. A., Holzmann, B. and Sitkovsky, M.,** Animal models of sepsis: setting the stage. *Nature Reviews Drug Discovery* 2005. **4**: 854-865.
- 17 **Lowry, S. F.,** Human endotoxemia: a model for mechanistic insight and therapeutic targeting. *Shock* 2005. **24 Suppl 1**: 94-100.
- 18 **LeMay, D. R., LeMay, L. G., Kluger, M. J. and D'Alecy, L. G.,** Plasma profiles of IL-6 and TNF with fever-inducing doses of lipopolysaccharide in dogs. *Am J Physiol* 1990. **259**: R126-132.
- 19 **Miyamoto, T., Fujinaga, T., Yamashita, K. and Hagio, M.,** Changes of serum cytokine activities and other parameters in dogs with experimentally induced endotoxic shock. *The Japanese Journal of Veterinary Research* 1996. **44**: 107-118.
- 20 **Minnecci, P. C., Deans, K. J., Banks, S. M., Costello, R., Csako, G., Eichacker, P. Q., Danner, R. L., Natanson, C. and Solomon, S. B.,** Differing effects of epinephrine, norepinephrine, and vasopressin on survival in a canine model of septic shock. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004. **287**: H2545-H2554.
- 21 **Maier, S., Traeger, T., Entleutner, M., Westerholt, A., Kleist, B., Huser, N., Holzmann, B., Stier, A., Pfeffer, K. and Heidecke, C. D.,** Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock* 2004. **21**: 505-511.
- 22 **Lolis, E. and Bucala, R.,** Therapeutic approaches to innate immunity: severe sepsis and septic shock. *Nature Reviews Drug Discovery* 2003. **2**: 635-645.
- 23 **Janeway CA, M. R.,** The role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin Immunol* 1998. **10**: 349-350.
- 24 **Fraser, I. P., Koziel, H. and Ezekowitz, R. A.,** The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin Immunol* 1998. **10**: 363-372.
- 25 **Gough, P. J. and Gordon, S.,** The role of scavenger receptors in the innate immune system. *Microbes Infect* 2000. **2**: 305-311.
- 26 **Kaisho, T. and Akira, S.,** Critical roles of Toll-like receptors in host defense. *Crit Rev Immunol* 2000. **20**: 393-405.
- 27 **Takeda, K. A., S,** Toll receptors and pathogen resistance. *Cellular Microbiology* 2003. **5**: 143-153.
- 28 **Aderem, A. and Underhill, D. M.,** Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 1999. **17**: 593-623.
- 29 **Svanborg, C., Godaly, G. and Hedlund, M.,** Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. *Curr Opin Microbiol* 1999. **2**: 99-105.
- 30 **Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. and Janeway, C. A., Jr.,** A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997. **388**: 394-397.
- 31 **Kaisho, T. and Akira, S.,** Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* 2006. **117**: 979-987; quiz 988.
- 32 **Roach, J. C., Glusman, G., Rowen, L., Kaur, A., Purcell, M. K., Smith, K. D., Hood,**

- L. E. and Aderem, A.**, The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005. **102**: 9577-9582.
- 33 **Muzio, M., Polentarutti, N., Bosisio, D., Manoj Kumar, P. P. and Mantovani, A.**, Toll-like receptor family and signalling pathway. *Biochem Soc Trans* 2000. **28**: 563-566.
- 34 **Medzhitov, R. and Janeway, C., Jr.**, The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol* 2000. **8**: 452-456.
- 35 **Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. and Akira, S.**, Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999. **11**: 115-122.
- 36 **Kaisho, T., Takeuchi, O., Kawai, T., Hoshino, K. and Akira, S.**, Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *J Immunol* 2001. **166**: 5688-5694.
- 37 **Seki, E., Tsutsui, H., Nakano, H., Tsuji, N., Hoshino, K., Adachi, O.**, Lipopolysaccharide-induced IL-18 secretion from murine Kupffer cells independently of myeloid differentiation factor 88 that is critically involved in induction of production of IL-12 and IL-1b. *J Immunol* 2001. **166**: 2651-2657.
- 38 **Weaver, B. K., Kumar, K. P. and Reich, N. C.**, Interferon regulatory factor 3 and CREB-binding protein/p300 are subunits of double-stranded RNA-activated transcription factor DRAF1. *Mol Cell Biol* 1998. **18**: 1359-1368.
- 39 **Hunter, P.**, Sepsis under siege: A new understanding of sepsis might lead to the development of therapies to treat septic shock. *EMBO Rep* 2006. **7**: 667-669.
- 40 **Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y.**, Cutting Edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps hene product. *J Immunol* 1999. **162**: 3749-3752.
- 41 **Johnson, G. B. e. a.**, Activation of mammalian toll-like receptors by endogenous agonists. *Crit Rev Immunol* 2003. **23**: 15-44.
- 42 **Brunn, G. J. and Platt, J. L.**, The etiology of sepsis: turned inside out. *Trends in Molecular Medicine* 2006. **12**: 10-16.
- 43 **Janeway, C., Travers, P., Walport, M. and Shlomchik, M.**, *Immunobiology*. Garland - Churchill Livingstone: 2001.
- 44 **Abbas, A. K., Murphy, K. M. and Sher, A.**, Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996. **383**: 787-793.
- 45 **Opal, S. M. and DePalo, V. A.**, Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 2000. **117**: 1162-1172.
- 46 **Hotchkiss, R. S. and Karl, I. E.**, The pathophysiology and treatment of sepsis. *New England Journal of Medicine* 2003. **348**: 138-150.
- 47 **Clarke, C., Hales, A, Hunt, A, et al**, IL-10 mediated suppression of TNF- production is independent of its ability to inhibit NF-B activity. *Eur J Immunol* 1996. **28**: 1719-1726.
- 48 **Opal, S., Wherry, JC, Grint, P**, Interleukin-10: potential benefits and possible risks in clinical infectious diseases. *Clin Infect Dis* 1998. **27**: 1497-1507.
- 49 **Joyce, D., Gibbons, DP, Geen, P, et al** Two inhibitors of pro-inflammatory cytokine release, interleukin-10 and interleukin-4, have contrasting effects on release of soluble p75 tumor necrosis factor receptor by cultured monocytes. *Eur J Immunol* 1994. **24**: 2699-2705.
- 50 **Annane, D., Bellissant, E. and Cavillon, J. M.**, Septic shock. *The Lancet* 2005. **365**: 63-78.
- 51 **Trepicchio, W., Wang, L, Bozza, N, et al** Interleukin-11 regulates macrophage effector function through the inhibition of nuclear factor-B. *J Immunol* 1997. **159**: 5661-5669.
- 52 **Hill, G., Cooke, KR, Teshima, T, et al** Interleukin-11 promotes T cell polarization and

- prevents acute graft-vs-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 1988. **201**: 115-123.
- 53 **Zurawski, G., de Vries, JE** Interleukin 13, an interleukin-4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. *Immunol Today* 1994. **15**: 19-26.
- 54 **Callard, R., Matthews, DJ, Hibbert, L,** IL-4 and IL-13 receptors: are they one and the same. *Immunol Today* 1996. **17**: 108-110.
- 55 **Severn, A., Rapson, N. T., Hunter, C. A. and Liew, F. Y.,** Regulation of tumor necrosis factor production by adrenaline and beta-adrenergic agonists. *J Immunol* 1992. **148**: 3441-3445.
- 56 **van der Poll, T., Coyle, S. M., Barbosa, K., Braxton, C. C. and Lowry, S. F.,** Epinephrine inhibits tumor necrosis factor-alpha and potentiates interleukin 10 production during human endotoxemia. *J Clin Invest* 1996. **97**: 713-719.
- 57 **Delgado Hernandez R, D. M., Carlin A, et al.,** Inhibition of systemic inflammation by central action of the neuropeptide alpha-melanocyte- stimulating hormone. *Neuroimmunomodulation* 1999. **6**: 187-192.
- 58 **Delgado, M., Pozo, D., Martinez, C., Leceta, J., Calvo, J. R., Ganea, D. and Gomariz, R. P.,** Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit endotoxin-induced TNF-alpha production by macrophages: in vitro and in vivo studies. *J Immunol* 1999. **162**: 2358-2367.
- 59 **Martinez, C., Abad, C., Delgado, M., Arranz, A., Juarranz, M. G., Rodriguez-Henche, N., Brabet, P., Leceta, J. and Gomariz, R. P.,** Anti-inflammatory role in septic shock of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002. **99**: 1053-1058.
- 60 **Borovikova, L. V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G. I., Watkins, L. R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J. W. and Tracey, K. J.,** Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000. **405**: 458-462.
- 61 **Wang, H., Yu, M., Ochani, M., Amella, C. A., Tanovic, M., Susarla, S., Li, J. H., Wang, H., Yang, H., Ulloa, L., Al-Abed, Y., Czura, C. J. and Tracey, K. J.,** Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 2003. **421**: 384-388.
- 62 **Mitaka, C.,** Clinical laboratory differentiation of infectious versus non-infectious systemic inflammatory response syndrome. *Clin Chim Acta* 2005. **351**: 17-29.
- 63 **Whang, K. T., Steinwald, P. M., White, J. C., Nysten, E. S., Snider, R. H., Simon, G. L., Goldberg, R. L. and Becker, K. L.,** Serum calcitonin precursors in sepsis and systemic inflammation. *J Clin Endocrinol Metab* 1998. **83**: 3296-3301.
- 64 **Meisner, M. and Reinhard, K.,** Is procalcitonin really a marker of sepsis? *International Journal of Intensive Care* 2001. **8**: 15-25.
- 65 **Zeni, F., Viallon, A., Assicot, M., Tardy, B., Vindimian, M., Page, Y. et al.,** Procalcitonin serum concentrations and severity of sepsis. *Clin Intensive Care* 1994. **5** (Suppl 2): 89-98.
- 66 **Meisner, M., Tschaikowsky, K., Palmaers, T. and Schmidt, J.,** Comparison of procalcitonin (PCT) and C-reactive protein (CRP) plasma concentrations at different SOFA scores during the course of sepsis and MODS. *Crit Care (Lond)* 1999. **3**: 45-50.
- 67 **Gibot, S., Kolopp-Sarda, M. N., Bene, M. C., Cravoisy, A., Levy, B., Faure, G. C. and Bollaert, P. E.,** Plasma level of a triggering receptor expressed on myeloid cells-1: its diagnostic accuracy in patients with suspected sepsis. *Ann Intern Med* 2004. **141**: 9-15.
- 68 **Davis, B. H.,** Improved diagnostic approaches to infection/sepsis detection. *Expert Rev Mol Diagn* 2005. **5**: 193-207.



- 69 **Yano, K., Liaw, P. C., Mullington, J. M., Shih, S. C., Okada, H., Bodyak, N., Kang, P. M., Toltl, L., Belikoff, B., Buras, J., Simms, B. T., Mizgerd, J. P., Carmeliet, P., Karumanchi, S. A. and Aird, W. C.,** Vascular endothelial growth factor is an important determinant of sepsis morbidity and mortality. *J Exp Med* 2006. **203**: 1447-1458.
- 70 **Jones, K. L., de Kretser, D. M., Patella, S. and Phillips, D. J.,** Activin A and follistatin in systemic inflammation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2004. **225**: 119-125.
- 71 **Coley, W. B.,** The treatment of malignant tumours by repeated inoculations of erysipelas; with a report of ten original cases. *American Journal of Medical Science* 1898. **105**: 487-511.
- 72 **Old, L. J.,** Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 1985. **230**: 630-632.
- 73 **Fiers, W.,** Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and *in vivo* level. *FEBS Let* 1991. **285**: 199.
- 74 **Zucker, K., Lu, P., Fuller, L., Asthana, D., Esquenazi, V. and Miller, J.,** Cloning and expression of the cDNA for canine tumor necrosis factor-alpha in *E. coli*. *Lymphokine and Cytokine Research* 1994. **13**: 191-196.
- 75 **Palladino, M. A., Bahjat, F. R., Theodorakis, E. A. and Moldawer, L. L.,** Anti-TNF-alpha therapies: the next generation. *Nature Reviews Drug Discovery* 2003. **2**: 736-746.
- 76 **Chen, G. and Goeddel, D. V.,** TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 2002. **296**: 1634-1635.
- 77 **Wajant, H. and Scheurich, P.,** Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2001. **33**: 19-32.
- 78 **Guicciardi, M. E. and Gores, G. J.,** AIP1: a new player in TNF signaling. *J Clin Invest* 2003. **111**: 1813-1815.
- 79 **Grell, M., Becke, F. M., Wajant, H., Mannel, D. N. and Scheurich, P.,** TNF receptor type 2 mediates thymocyte proliferation independently of TNF receptor type. *Eur J Immunol* 1998. **28**: 257-263.
- 80 **Argiles, J. M., Lopez-Soriano, J., Busquets, S. and Lopez-Soriano, F. J.,** Journey from cachexia to obesity by TNF. *Faseb J* 1997. **11**: 743-751.
- 81 **Krishnaswamy, G., Kelley, J., Yerra, L., Smith, J. K. and Chi, D. S.,** Human endothelium as a source of multifunctional cytokines: molecular regulation and possible role in human disease. *J Interferon Cytokine Res* 1999. **19**: 91-104.
- 82 **van der Poll, T.,** Coagulation and inflammation. *Journal of Endotoxin Research* 2001. **7**: 301-304.
- 83 **Cavaillon, J. M., Adib-Conquy, M., Fitting, C., Adrie, C. and Payen, D.,** Cytokine cascade in sepsis. *Scand J Infect Dis* 2003. **35**: 535-544.
- 84 **Waage, A., Halstensen, A. and Espevik, T.,** Association between tumour necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. *Lancet* 1987. **1**: 355-357.
- 85 **Remick, D. G., Larrick, J. and Kunkel, S. L.,** Tumor necrosis factor-induced alterations in circulating leukocyte populations. *Biochem Biophys Res Commun* 1986. **141**: 818-824.
- 86 **Tracey, K. J., Beutler, B., Lowry, S. F., Merryweather, J., Wolpe, S., Milsark, I. W., Hariri, R. J., Fahey, T. J., 3rd, Zentella, A., Albert, J. D. and et al.,** Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 1986. **234**: 470-474.
- 87 **Tracey, K. J., Fong, Y., Hesse, D. G., Manogue, K. R., Lee, A. T., Kuo, G. C., Lowry, S. F. and Cerami, A.,** Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 1987. **330**: 662-664.
- 88 **Beutler, B., Milsark, I. W. and Cerami, A. C.,** Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science*

1985. **229**: 869-871.
- 89 **Fisher, C. J., Jr., Agosti, J. M., Opal, S. M., Lowry, S. F., Balk, R. A., Sadoff, J. C., Abraham, E., Schein, R. M. and Benjamin, E.,** Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *N Engl J Med* 1996. **334**: 1697-1702.
- 90 **Abraham, E., Anzueto, A., Gutierrez, G., Tessler, S., San Pedro, G., Wunderink, R., Dal Nogare, A., Nasraway, S., Berman, S., Cooney, R., Levy, H., Baughman, R., Rumbak, M., Light, R. B., Poole, L., Allred, R., Constant, J., Pennington, J. and Porter, S.,** Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock. NORASEPT II Study Group. *Lancet* 1998. **351**: 929-933.
- 91 **Abraham, E., Glauser, M. P., Butler, T., Garbino, J., Gelmont, D., Laterre, P. F., Kudsk, K., Bruining, H. A., Otto, C., Tobin, E., Zwingelstein, C., Lesslauer, W. and Leighton, A.,** p55 Tumor necrosis factor receptor fusion protein in the treatment of patients with severe sepsis and septic shock. A randomized controlled multicenter trial. Ro 45-2081 Study Group. *Jama* 1997. **277**: 1531-1538.
- 92 **van der Poll, T. and van Deventer, S.,** Cytokines and anti-cytokines in the pathogenesis of sepsis. *Infect Dis Clin North Am* 1999. **13**: 413-426.
- 93 **Steinman, L.,** Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell* 1996. **85**: 299-302.
- 94 **Tisch, R. and McDevitt, H.,** Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 1996. **85**: 291-297.
- 95 **Saxne, T., Palladino, M. A. J., Heinegard, D., Talal, N. and Wollheim, F. A.,** A. Detection of tumor necrosis factor  $\alpha$  but not tumor necrosis factor  $\beta$  in rheumatoid arthritis synovial fluid and serum. *Arthritis Rheum* 1988. **31**: 1041-1045.
- 96 **Maeda, M., Watanabe, N., Neda, H., Yamauchi, N., Okamoto, T., Sasaki, H., Tsuji, Y., Akiyama, S., Tsuji, N. and Niitsu, Y.,** Serum tumor necrosis factor activity in inflammatory bowel disease. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1992. **14**: 451-461.
- 97 **Moreland, L. W.,** Drugs that block tumour necrosis factor: experience in patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacoeconomics* 2004. **22**: 39-53.
- 98 **Olsen, N. J. and Stein, C. M.,** New drugs for rheumatoid arthritis. *The New England Journal of Medicine* 2004. **350**: 2167-2179.
- 99 **Goodwin, G. H., Sanders, C. and Johns, E. W.,** A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur J Biochem* 1973. **38**: 14-19.
- 100 **Goodwin, G. H. and Johns, E. W.,** The isolation and purification of the high mobility group (HMG) nonhistone chromosomal proteins. *Methods in Cell Biology* 1977. **16**: 257-267.
- 101 **Bustin, M.,** Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. *Trends in Biochemical Science* 2001. **26**: 152-153.
- 102 **Rauvala, H. and Pihlaskari, R.,** Isolation and some characteristics of an adhesive factor of brain that enhances neurite outgrowth in central neurons. *J Biol Chem* 1987. **262**: 16625-16635.
- 103 **Parkkinen, J., Raulo, E., Merenmies, J., Nolo, R., Kajander, E. O., Baumann, M. and Rauvala, H.,** Amphoterin, the 30-kDa protein in a family of HMG1-type polypeptides. Enhanced expression in transformed cells, leading edge localization, and interactions with plasminogen activation. *Journal of Biological Chemistry* 1993. **268**: 19726-19738.

- 104 **Bianchi, M. E.**, Production of functional rat HMG1 protein in Escherichia coli. *Gene* 1991. **104**: 271-275.
- 105 **Bustin, M., Lehn, D. A. and Landsman, D.**, Structural features of the HMG chromosomal proteins and their genes. *Biochem Biophys Acta* 1990. **1049**: 231-243.
- 106 **Huttunen, H. J., Fages, C., Kuja-Panula, J., Ridley, A. J. and Rauvala, H.**, Receptor for advanced glycation end products-binding COOH-terminal motif of amphoterin inhibits invasive migration and metastasis. *Cancer Research* 2002. **62**: 4805-4811.
- 107 **Li, J., Kokkola, R., Tabibzadeh, S., Yang, R., Ochani, M., Qiang, X., Harris, H. E., Czura, C. J., Wang, H., Ulloa, L., Wang, H., Warren, H. S., Moldawer, L. L., Fink, M. P., Andersson, U., Tracey, K. J. and Yang, H.**, Structural basis for the proinflammatory cytokine activity of high mobility group box 1. *Molecular Medicine* 2003. **9**: 37-45.
- 108 **Escobar, H. M., Meyer, B., Richter, A., Becker, K., Flohr, A. M., Gullerdiek, J. and Nolte, I.**, Molecular characterization of the canine HMGB1. *Cytogenetic and Genomic Research* 2003. **101**: 33-38.
- 109 **Yang, H., Wang, H. and Tracey, K. J.**, HMG-1 rediscovered as a cytokine. *Shock* 2001. **15**: 247-253.
- 110 **Huttunen, H. J., Fages, C. and Rauvala, H.**, Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *J Biol Chem* 1999. **274**: 19919-19924.
- 111 **Stern, D., Yan, S. D., Yan, S. F. and Schmidt, A. M.**, Receptor for advanced glycation endproducts: a multiligand receptor magnifying cell stress in diverse pathologic settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002. **54**: 1615-1625.
- 112 **Dumitriu, I. E., Baruah, P., Bianchi, M. E., Manfredi, A. A. and Rovere-Querini, P.**, Requirement of HMGB1 and RAGE for the maturation of human plasmacytoid dendritic cells. *European Journal of Immunology* 2005. **35**: 2184-2190.
- 113 **Shirasawa, M., Fujiwara, N., Hirabayashi, S., Ohno, H., Iida, J., Makita, K. and Hata, Y.**, Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I lung alveolar cells. *Genes to Cells* 2004. **9**: 165-174.
- 114 **Hori, O., Brett, J., Slattery, T., Cao, R., Zhang, J., Chen, J. X., Nagashima, M., Lundh, E. R., Vijay, S., Nitecki, D. and et al.**, The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphoterin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphoterin in the developing nervous system. *J Biol Chem* 1995. **270**: 25752-25761.
- 115 **Park, J. S., Svetkauskaite, D., He, Q., Kim, J. Y., Strassheim, D., Ishizaka, A. and Abraham, E.**, Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem* 2004. **279**: 7370-7377.
- 116 **Yang, H., Wang, H., Czura, C. J. and Tracey, K. J.**, The cytokine activity of HMGB1. *J Leukoc Biol* 2005. **78**: 1-8.
- 117 **Ulloa, L. and Messmer, D.**, High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: Friend and foe. *Cytokine Growth Factor Review* 2006. **17**: 189-201.
- 118 **Calogero, S., Grassi, F., Aguzzi, A., Voigtlander, T., Ferrier, P., Ferrari, S. and al., e.**, The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. *Nature Genetic* 1999. **22**: 276-280.
- 119 **He, Q., Liang, C. H. and S.J., L.**, Steroid hormones induce HMG1 overexpression and sensitize breast cancer cells to cisplatin and carboplatin. *Proc natl Acad Science* 2000. **97**: 5768-5772.

- 120 **Taguchi, A., Blood, D. C., del Toro, G., Canet, A., Lee, D. C., Qu, W., Tanji, N., Lu, Y., Lalla, E., Fu, C., Hofmann, M. A., Kislinger, T., Ingram, M., Lu, A., Tanaka, H., Hori, O., Ogawa, S., Stern, D. M. and Schmidt, A. M.,** Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature* 2000. **405**: 354-360.
- 121 **Brezniceanu, M. L., Volp, K., Bosser, S., Solbach, C., Lichter, P., Joos, S. and Zornig, M.,** HMGB1 inhibits cell death in yeast and mammalian cells and is abundantly expressed in human breast carcinoma. *Faseb J* 2003. **17**: 1295-1297.
- 122 **Rouhiainen, A., Imai, S., Rauvala, H. and Parkkinen, J.,** Occurrence of amphoterin (HMG1) as an endogenous protein of human platelets that is exported to the cell surface upon platelet activation. *Thromb Haemost* 2000. **84**: 1087-1094.
- 123 **Dumitriu, I. E., Baruah, P., Valentinis, B., Voll, R. E., Herrmann, M., Nawroth, P. P., Arnold, B., Bianchi, M. E., Manfredi, A. A. and Rovere-Querini, P.,** Release of high mobility group box 1 by dendritic cells controls T cell activation via the receptor for advanced glycation end products. *J Immunol* 2005. **174**: 7506-7515.
- 124 **Scaffidi, P., Misteli, T. and Bianchi, M. E.,** Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002. **418**: 191-195.
- 125 **Palumbo, R., Sampaolesi, M., De Marchis, F., Tonlorenzi, R., Colombetti, S., Mondino, A., Cossu, G. and Bianchi, M. E.,** Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. *J Cell Biol* 2004. **164**: 441-449.
- 126 **Wang, H., Bloom, O., Zhang, M., Vishnubhakat, J. M., Ombrellino, M., Che, J., Frazier, A., Yang, H., Ivanova, S., Borovikova, L., Manogue, K. R., Faist, E., Abraham, E., Andersson, J., Andersson, U., Molina, P. E., Abumrad, N. N., Sama, A. and Tracey, K. J.,** HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999. **285**: 248-251.
- 127 **Lotze, M. T. and Tracey, K. J.,** High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol* 2005. **5**: 331-342.
- 128 **Rendon-Mitchell, B., Ochani, M., Li, J., Han, J., Wang, H., Yang, H., Susarla, S., Czura, C., Mitchell, R. A., Chen, G., Sama, A. E. and Tracey, K. J.,** IFN-gamma induces high mobility group box 1 protein release partly through a TNF-dependent mechanism. *The Journal of Immunology* 2003. **170**: 3890-3897.
- 129 **Bonaldi, T., Talamo, F., Scaffidi, P., Ferrera, D., Porto, A., Bachi, A., Rubartelli, A., Agresti, A. and Bianchi, M. E.,** Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *Embo J* 2003. **22**: 5551-5560.
- 130 **Taniguchi, N., Kawahara, K., Yone, K., Hashiguchi, T., Yamakuchi, M., Goto, M., Inoue, K., Yamada, S., Ijiri, K., Matsunaga, S., Nakajima, T., Komiya, S. and Maruyama, I.,** High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. *Arthritis Rheum* 2003. **48**: 971-981.
- 131 **Kokkola, R., Sundberg, E., Ulfgren, A. K., Palmblad, K., Li, J., Wang, H., Ulloa, L., Yang, H., Yan, X. J., Furie, R., Chiorazzi, N., Tracey, K. J., Andersson, U. and Harris, H. E.,** High mobility group box chromosomal protein 1: a novel proinflammatory mediator in synovitis. *Arthritis Rheum* 2002. **46**: 2598-2603.
- 132 **Degryse, B., Bonaldi, T., Scaffidi, P., Muller, S., Resnati, M., Sanvito, F., Arrighoni, G. and Bianchi, M. E.,** The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear protein HMGB1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells. *J Cell Biol* 2001. **152**: 1197-1206.
- 133 **Andersson, U., Wang, H., Palmblad, K., Aveberger, A. C., Bloom, O., Erlandsson-**

- Harris, H., Janson, A., Kokkola, R., Zhang, M., Yang, H., and Tracey, K. J., HMG-1 stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med* 2000. **192**: 565-570.
- 134 Park, J. S., Arcaroli, J., Yum, H. K., Yang, H., Wang, H., Yang, K. Y., and Choe, K. H., Strassheim, D., Pitts, T. M., Tracey, K. J., Abraham, E., Activation of gene expression in human neutrophils by high mobility group box 1 protein. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003. **284**: C870-C879.
- 135 Messmer, D., Yang, H., Telusma, G., Knoll, F., Li, J., Messmer, B., Tracey, K. J. and Chiorazzi, N., High Mobility Group Box Protein 1: An Endogenous Signal for Dendritic Cell Maturation and Th1 Polarization. *The Journal of Immunology* 2004. **173**: 307-313.
- 136 Fiuza, C., Bustin, M., Talwar, S., Tropea, M., Gerstenberger, E., Shelhamer, and J. H., S., A. F., Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood* 2003. **101**: 2652-2660.
- 137 O'Connor, K. A., Hansen, M. K., Rachal, P. C., Deak, M. M., Biedenkapp, J. C., M., E. D., Johnson, J. D., Wang, H., Maier, S. F., Tracey, K. J., and Watkins, L. R., Further characterization of high mobility group box 1 (HMGB1) as a proinflammatory cytokine: central nervous system effects. *Cytokine* 2003. **24**: 254-265.
- 138 Abraham, E., Arcaroli, J., Carmody, A., Wang, H., Tracey, K. J., HMG-1 as a mediator of acute lung injury. *J Immunol* 2000. **165**: 2950-2954.
- 139 Sappington, P. L., Yang, R., Yang, H., Tracey, K. J., Delude, R. L., Fink, M. P., HMGB1 B box increases the permeability of Caco-2 enterocytic monolayers and impairs intestinal barrier function in mice. *Gastroenterology* 2002. **123**: 790-802.
- 140 Zetterstrom, C. K., Bergman, T., Rynnel-Dagoo, B., Erlandsson-Harris, H., and Soder, O., Andersson, U., Boman, H. G., High mobility group box chromosomal protein 1 (HMGB1) is an antibacterial factor produced by the human adenoid. *Pediatr Res* 2002. **52**: 148-154.
- 141 Ulloa, L. and Tracey, K. J., The 'cytokine profile': a code for sepsis. *Trends in Molecular Medicine* 2005. **11**: 56-63.
- 142 Sunden-Cullberg, J., Norrby-Teglund, A., Rouhiainen, A., Rauvala, H., Herman, G., Tracey, K. J., Lee, M. L., Andersson, J., Tokics, L. and Treutiger, C. J., Persistent elevation of high mobility group box-1 protein (HMGB1) in patients with severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 2005. **33**: 564-573.
- 143 DuBridge, R. B., Tang, P., Hsia, H. C., Leong, P. M., Miller, J. H. and Calos, M. P., Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* 1987. **7**: 379-387.
- 144 Running Deer, J. and Allison, D. S., High-level expression of proteins in mammalian cells using transcription regulatory sequences from the Chinese hamster EF-1alpha gene. *Biotechnol Prog* 2004. **20**: 880-889.
- 145 Peterbauer, A., Eperon, S., Jungi, T. W., Werner, E. R. and Werner-Felmayer, G., Interferon-gamma-primed monocytoid cell lines: optimizing their use for in vitro detection of bacterial pyrogens. *Journal of Immunological Methods* 2000. **233**: 67-76.
- 146 Benting, J., Lecat, S., Zacchetti, D. and Simons, K., Protein expression in Drosophila Schneider cells. *Anal Biochem* 2000. **278**: 59-68.
- 147 Lefkovits, I., *Immunology Methods Manual 1*: 1997.
- 148 Yamashita, K., Fujinaga, T., Hagio, M., Miyamoto, T., Izumisawa, Y. and Kotani, T., Bioassay for interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor-like activities in canine sera. *J Vet Med Sci* 1994. **56**: 103-107.
- 149 Clemens, M., Morris, A. and Gearing, A., *Lymphokines and interferons – a practical*

- approach.*
- 150 **Aida, Y. and Pabst, M. J.**, Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. *J Immunol Methods* 1990. **132**: 191-195.
- 151 **Campbell, S. E., Nasir, L., Argyle, D. J., Gault, E. A., Duthie, S. and Bennett, D.**, Cloning of canine IL-1ra, TNFR and TIMP-2. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2001. **78**: 207-214.
- 152 **Zebandt, S.**, Etablierung und Evaluierung zweier IgG Subklassen - ELISA für die Borreliose - Diagnostik beim Menschen *Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere*. Justus - Liebig - Universität Gießen, Gießen, Germany 2001, pp 100.
- 153 **Li, J., Wang, H., Mason, J. M., Levine, J., Yu, M., Ulloa, L., Czura, C. J., Tracey, K. J. and Yang, H.**, Recombinant HMGB1 with cytokine-stimulating activity. *Journal of Immunological Methods* 2004. **289**: 211-223.
- 154 **Murua Escobar, H., Soller, J. T., Sterenczak, K. A., Sperveslage, J. D., Schlueter, C., Burchardt, B., Eberle, N., Fork, M., Nimzyk, R., Winkler, S., Nolte, I. and Bullerdiek, J.**, Cloning and characterization of the canine receptor for advanced glycation end products. *Gene* 2006. **369**: 45-52.
- 155 **Eskandari, M. K., Nguyen, D. T., Kunkel, S. L. and Remick, D. G.**, WEHI 164 subclone 13 assay for TNF: sensitivity, specificity, and reliability. *Immunol Invest* 1990. **19**: 69-79.
- 156 **Gogos, C. A. D., E.; Bassaris, H. P.; Skoutelis, A.**, Pro- versus Anti-inflammatory Cytokine Profile in Patients with Severe Sepsis: A Marker for Prognosis and Future Therapeutic Options. *Journal of Infectious Diseases* 2000. **181**: 176-180.
- 157 **Goldblatt, F. and Isenberg, D. A.**, New therapies for rheumatoid arthritis. *Clinical & Experimental Immunology* 2005. **140**: 195-204.
- 158 **Remick, D. G.**, Cytokine therapeutics for the treatment of sepsis: why has nothing worked? *Current Pharmaceutical Design* 2003. **9**: 75-82.
- 159 **Warrington, K. J.**, Anti-tumor necrosis factor alpha therapy in rheumatoid arthritis: hitting two birds with one stone? *Arthritis & Rheumatism* 2004. **51**: 309-310.
- 160 **Erlandsson Harris, H. and Andersson, U.**, Mini-review: The nuclear protein HMGB1 as a proinflammatory mediator. *European Journal of Immunology* 2004. **34**: 1503-1512.
- 161 **Hatada, T., Wada, H., Nobori, T., Okabayashi, K., Maruyama, K., Abe, Y., Uemoto, S., Yamada, S. and Maruyama, I.**, Plasma concentrations and importance of High Mobility Group Box protein in the prognosis of organ failure in patients with disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 2005. **94**: 975-979.
- 162 **Izuishi, K., Tsung, A., Jeyabalan, G., Critchlow, N. D., Li, J., Tracey, K. J., Demarco, R. A., Lotze, M. T., Fink, M. P., Geller, D. A. and Billiar, T. R.**, Cutting edge: high-mobility group box 1 preconditioning protects against liver ischemia-reperfusion injury. *Journal of Immunology* 2006. **176**: 7154-7158.
- 163 **Yamada, S., Yakabe, K., Ishii, J., Imaizumi, H. and Maruyama, I.**, New high mobility group box 1 assay system. *Clinica Chimica Acta* 2006.
- 164 **Sanders, C.**, A method for the fractionation of the high-mobility-group non-histone chromosomal proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1977. **78**: 1034-1042.
- 165 **Chou, D. K., Evans, J. E. and Jungalwala, F. B.**, Identity of nuclear high-mobility-group protein, HMG-1, and sulfoglucuronyl carbohydrate-binding protein, SBP-1, in brain. *Journal of Neurochemistry* 2001. **77**: 120-131.
- 166 **Gonzalez-Rey, E., Chorny, A., Robledo, G. and Delgado, M.**, Cortistatin, a new antiinflammatory peptide with therapeutic effect on lethal endotoxemia. *J Exp Med* 2006.

- 
- 203: 563-571.
- 167 **Novotny, A., Emmanuel, K., Bartels, H., Siewert, J. R. and Holzmann, B.**, [Indicators for early prediction of outcome in sepsis]. *Chirurg* 2005. **76**: 837-844.

## Anhang

### A) Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Die Bezugsquellen wurden als Hochzahlen entsprechend nachfolgender Tabelle in Kapitel 4, Material und Methoden integriert.

1	AppliChem, Darmstadt
2	Amersham Pharmacia, Freiburg
3	Ratiopharm, Ulm
4	Biochrom, Berlin
5	Sigma, Deisenhofen
6	Merck, Darmstadt
7	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
8	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
9	Eppendorf, Köln
10	Stratagene, Amsterdam, NL
11	MWG, Ebersberg
12	Cambrex, Nottingham, GB
13	Machery-Nagel, Düren
14	Biorad, München
15	Serva, Heidelberg
16	Schleicher und Schuell, Dassel
17	Whatman, Maidstone, GB
18	Pierce, Rockford, Illinois, USA
19	Qiagen, Hilden
20	Braun, Melsungen
21	Roche, Penzberg
22	Biontex, München
23	Nunc, Wiesbaden
24	Roth, Karlsruhe
25	Falcon, Washington, USA
26	Heinrich-Heine-Universität, BMFZ-Analytisches Zentrallabor, Düsseldorf
27	SBA, Birmingham, Alabama, USA
28	Jackson, Newmarket-Suffolk, GB
29	R+D Systems, Wiesbaden
30	Dako, Hamburg
31	Millipore, Schwalbach
32	Connex, München



**B) Geräte in alphabetischer Reihenfolge**

<b>Geräte</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Affinitätschromatograph	GradiFrac™System mit PeristalticPump P-1, Monitor UV-1 und Recorder REC 102	Pharmacia Biotech, Freiburg
Brutschrank	CO <sub>2</sub> -Auto-Zero	Heraeus Instruments, München
Elektroblotter	Multiphor II	LKB Pharmacia
ELISA-Washer	Tecan M8/4R Columbus plus	SLT Labinstruments, Crailsheim
Gel-Dokumentation	Gel Doc 2000 Software: Quantity One 4.1.1	BioRad, München
Mikroskop	Leica DMR	Leica, Bensheim
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5415R	Eppendorf, Köln
Photometer	Biophotometer	Eppendorf, Köln
Photometer Küvette	Spectrophotometer Quartz-Küvette	Sigma, Deisenhofen
Platten-Photometer	Sunrise-Remote	Tecan, Crailsheim
Power-Supply	Power Pac 300	BioRad, München
Schüttler	Kombischüttler KL-2	Johanna-Otto GmbH, Hechingen
SDS-Gel-Gießkammer	BioRad mini Protean II	BioRad, München
Sterile Werkbank	Microflow	Nunc, Wiesbaden
Thermocycler	Biometra, TRIO Heated Lid	Biotron, Göttingen
Ultraschallgerät	Sonoplus GM 200	Bandelin, Berlin
Zählkammer	Modifizierte Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim
Zentrifuge	Sigma 4K15C	Sigma, Deisenhofen

## Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Thomas Göbel für die Möglichkeit, in seinem Labor und unter seiner Leitung diese Arbeit anfertigen zu dürfen. Seine fachlich hervorragende und dabei stets kollegiale Betreuung hatte nicht nur wesentlichen Anteil am Gelingen der Arbeit, sondern vermittelte mir darüber hinaus auch große Freude und Motivation am wissenschaftlichen Arbeiten.

Ebenfalls ein großes Dankeschön möchte ich an Herrn Prof. Dr. Bernd Kaspers richten. Durch sein großes Engagement für das Institut im Allgemeinen und für das initiierte Sepsisprojekt im Besonderen, seine kollegiale Unterstützung auf allen Bereichen des Zusammenarbeitens und durch seine stete Bereitschaft zur Diskussion und konstruktiven Kritik hat er diese Arbeit entscheidend mitgeprägt.

Herrn Prof. Dr. Stangassinger danke ich für den am Institut zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Mein besonderer Dank gilt auch der Hanns-Seidel-Stiftung, die mir für die Dauer der Promotion ein Stipendium gewährt hat.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Stefanie Rau, Frau Constance Richter, Frau Prof. Dr. Barbara Kohn und Herrn Prof. Dr. Johannes Hirschberger für die hervorragende Zusammenarbeit im Arbeitskreis Sepsis bedanken. Erst durch ihre Mithilfe war es möglich, entsprechendes Material für die durchgeführten klinischen Studien zu gewinnen.

Auch bei Frau Dr. Daniela Murgia und Frau Prof. Dr. Ulrike Matis möchte ich mich für die hervorragende Zusammenarbeit und die Bereitstellung des Probenmaterials für die Magendrehungsstudie bedanken.

Prof. Dr. Joachim Roth, Dr. Pascal Schneider, Prof. Dr. Thomas Jungi, Prof. Dr. Victor Rutten, Dr. Aad Hoek, Dr. Sabine Metzger, Dr. Sabine André, Dr. Marion Frankenberger und der Tierärztlichen Hochschule der Universität von North Carolina möchte ich für die kollegiale Zusammenarbeit und für die Bereitstellung von Arbeitsmaterialien und Zelllinien bedanken.

Allen Labormitgliedern möchte ich für das freundlich Arbeitsklima und ihre stete Hilfsbereitschaft danken.

Für die Betreuung der Tiere bedanke ich mich bei Hedi Opitz, Fritz Meggendorfer und Thomas Hoschka.

Frau Dr. Sarah Hadry möchte ich für die technische und moralische Unterstützung danken.

Meinen Eltern danke ich für ihre fortwährende Unterstützung und dafür, dass sie mir das Tiermedizinstudium ermöglicht haben.

Schließlich möchte ich mich ganz herzlich bei Sonja Kothlow bedanken, die mir während der ganzen Zeit ein großer Rückhalt war und mich stets aufgemuntert und motiviert hat.