

Multiple Sklerose:

**Charakterisierung oligoklonaler Antikörper
im Liquor von Patienten**

Dissertation

der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt von
Birgit Obermeier
aus Dingolfing

März 2011

erstellt am Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Abteilung Neuroimmunologie
Martinsried bei München

Erstgutachterin: Prof. Dr. Elisabeth Weiß

Zweitgutachter: PD Dr. Frank Bradke

Sondervotum: PD Dr. Klaus Dornmair

Dissertation eingereicht: 16. März 2011

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Juli 2011

Zusammenfassung

Multiple Sklerose ist eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen junger Erwachsener. Es handelt sich um eine Autoimmunerkrankung, bei der autoaggressive Lymphozyten die Myelinschicht von Nervenzellen im Gehirn angreifen. Innerhalb dieser Entzündungsherde sowie in der Zerebrospinalflüssigkeit (Liquor) sind expandierte B-Zellklone nachzuweisen. Deren Immunglobulin-Transkriptrepertoire zeigt somatische Hypermutationen als Zeichen einer Antigen-induzierten Affinitätsreifung.

Ein wichtiges diagnostisches Kriterium von Multiple Sklerose ist der Nachweis „oligoklonaler Banden“ im Liquor von Patienten. Die Banden repräsentieren expandierte und reife Antikörper, welche während des gesamten Krankheitsverlaufs produziert werden. Obwohl die oligoklonalen Banden erstmals vor mehr als 50 Jahren beschrieben wurden, konnte deren Funktion bis heute nicht aufgeklärt werden. Vor allem deren Zielstrukturen sowie die B-Zellen, welche diese markante Antikörperpopulation produzieren, sind immer noch unbekannt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb, diese elementaren Fragen zu beantworten.

Aufbauend auf vorläufigen Ergebnissen der Diplomarbeit konnte zu Beginn bestätigt werden, dass Liquor-residente Zellen der B-Zelllinie an der Produktion der oligoklonalen Antikörper beteiligt sind. Die zugrunde liegende Technologie beruht auf dem direkten Vergleich von Patienten-spezifischen Immunglobulin-Transkriptomen der B-Zellen mit Immunglobulin-Proteomen der oligoklonalen Banden.

Auch im Gehirn von Patienten sind affinitätsgereifte B-Zellen nachzuweisen. Durch Anwendung der eben genannten Technologie wurde gezeigt, dass die Antikörper im Liquor das B-Zellrepertoire der Entzündungsherde im Hirngewebe in großem Umfang widerspiegeln. Diese Beobachtung bestärkt die Relevanz der Antigensuche mit Liquor-Antikörpern, da diese einen direkten Einblick in die immunpathologischen Prozesse im Gehirn gewähren.

Zudem gelang es zum ersten Mal, Antigene zu identifizieren, welche eindeutig den Antikörpern der oligoklonalen Banden zuzuordnen sind. Hierfür wurde eine neue Methode entwickelt, welche die Bestimmung zusammengehöriger schwerer und leichter Immunglobulinketten einzelner oligoklonaler Antikörper aus Liquor erlaubt. Insgesamt konnten auf diese Weise fünf individuelle Antikörper von drei verschiedenen Patienten identifiziert und exprimiert werden. Diese wurden im Anschluss in zahlreichen Experimenten zur Antigensuche eingesetzt. Für zwei Antikörper wurden Sulfatide als Zielstrukturen nachgewiesen. Interessanterweise handelt es sich dabei um Glykolipide, welche wichtiger Bestandteil der Myelinschicht sind.

Die Ergebnisse der Arbeit tragen entscheidend dazu bei, die Rolle der oligoklonalen Banden bei Multipler Sklerose zu entschlüsseln und eröffnen insbesondere erstmals die Möglichkeit, Antigene einzelner oligoklonaler Antikörper zu untersuchen.

Teile dieser Arbeit sind oder werden veröffentlicht:

Obermeier B., Mentele R., Malotka J., Kellermann J., Kümpfel T., Wekerle H., Lottspeich F., Hohlfeld R. & Dornmair K.: Matching of oligoclonal Ig transcriptomes and proteomes of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Nat.Med.* **14**, 688-693 (2008); Originalarbeit

Obermeier B., Mentele R., Malotka J., Dornmair K.: Analysis of patient-specific immunoglobulin proteomes and transcriptomes by PCR cloning and mass spectrometry. *Nat.Protoc.* published online, doi:10.1038/nprot.2008.87 (2008); Protokoll

Obermeier B., Lovato L., Mentele R., Brück W., Forne I., Imhof A., Lottspeich F., Turk K.W., Willis S.N., Wekerle H., Hohlfeld R., Hafler D. A., O'Connor K. C. & Dornmair K.: Related B cell clones that populate the CSF and CNS of patients with multiple sclerosis produce CSF immunoglobulin. *J.Neuroimmunol.*; doi:10.1016/j.jneuroim.2011.01.010 (2011)

Brennan K.M.*, **Obermeier B.***, Galban-Horcajo F., Mentele R., Rinaldi S., O'Leary C.P., Goodyear C.S., Kalna G., Arthur A., Elliot C., Barnett S., Kümpfel T., Khademi M., Olsson T., Lington C., Lottspeich F., Wekerle H., Bennett J.L., Owens G.P., Willison H.J.*, Dornmair K.*: Lipid reactivity of individual oligoclonal band antibodies in multiple sclerosis. *Brain*; in Revision

* Diese Autoren trugen gleichermaßen zur Arbeit bei.

Eine Arbeit, auf die hier nicht Bezug genommen wird, wird veröffentlicht:

Bruder J., Siewert K., **Obermeier B.**, Malotka J., Scheinert P., Kellermann J., Ueda T., Hohlfeld R., Dornmair K.: Target specificity of an autoreactive human $\gamma\delta$ -T cell receptor in myositis. Manuskript eingereicht

Danke...

Mein Dank gilt allen, die mich während meiner Promotion begleitet und unterstützt haben.

Frau Prof. Elisabeth Weiß danke ich für ihre Bereitschaft, nach der Diplomarbeit auch meine Doktorarbeit innerhalb der Fakultät für Biologie der LMU zu betreuen. Für die hilfreichen Anregungen im Rahmen meiner Fortschrittsberichte, das Erstellen des Erstgutachtens und den damit verbundenen zeitlichen Aufwand möchte ich mich herzlich bedanken.

Ich bedanke mich bei **Herrn PD Dr. Frank Bradke** vom Max-Planck-Institut für Neurobiologie für das Verfassen des Zweitgutachtens sowie bei allen weiteren **Mitgliedern der Prüfungskommission**.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer am Institut, **Herrn PD Dr. Klaus Dornmair**, von dessen ständiger Diskussionsbereitschaft, intensiver Betreuung und herausragendem Fachwissen ich profitieren durfte. Das bereitgestellte Thema war begeisternd. Dadurch wurde mir nicht nur die Möglichkeit gegeben, viele verschiedene Techniken zu erlernen, sondern vor allem auch klinisch relevante Forschung zu betreiben.

Ich danke **Herrn Prof. Reinhard Hohlfeld** für das begeisterte Interesse an meiner Arbeit und die stets motivierenden Worte. Vielen Dank für die Möglichkeit, die Arbeit mitunter über das Institut für Klinische Neuroimmunologie durchzuführen zu können.

Herrn Prof. Hartmut Wekerle möchte ich für die fortwährende Unterstützung danken. Die hervorragenden Rahmenbedingungen in seiner Abteilung sowie die einzigartige Infrastruktur, auch auf internationaler Ebene, waren begeisternd.

Herrn Dr. Josef Kellermann und **Herrn Dr. Wolfgang Klinkert** möchte ich meinen Dank dafür aussprechen, dass sie mich im Rahmen des Thesis Advisory Committees begleitet und mit hilfreichen Anregungen technischer, konzeptioneller sowie persönlicher Art unterstützt haben.

Meinen **Kollegen in der Arbeitsgruppe** und allen **Mitarbeitern der Abteilung Neuroimmunologie** danke ich für das stets angenehme Arbeitsklima. Nicht nur so manche Hilfestellungen bei der Arbeit unterstützten mich, auch die persönlichen Gespräche waren immer wieder erheitend.

Katherina möchte ich für die unschätzbaren Gespräche und Erlebnisse danken. Perfekt organisierte Sightseeing-Touren in Paris, Istanbul und Japan sowie der unvergessliche Moment auf Mount Fuji waren die Highlights unserer gemeinsam durchlebten Doktorandenzeit.

Ein großer Dank geht an **Reinhard, Joachim** und **Ingrid** für die ständige Bereitschaft, mich im Labor in Theorie und Praxis zu unterstützen. Insbesondere Reinhard danke ich für das jederzeit offene Ohr. Seine ehrlichen Worte wusste ich immer sehr zu schätzen.

Bei **Jessica** bedanke ich mich für das gewissenhafte und motivierte Erlernen „meiner“ Techniken und wünsche ihr und **Joachim** (jun.) viel Erfolg bei der Weiterführung des OKB-Projekts.

Danke an **Petra**, sie weiß wofür...

Für die Bereitstellung von Patientenmaterial danke ich **PD Dr. Tania Kümpfel** vom Institut für Klinische Neuroimmunologie in München, **Prof. Tomas Olsson** vom Karolinska Institut in Stockholm, **Dr. Kevin C. O'Connor** von der Harvard Medical School in Boston und **Prof. Wolfgang Brück** vom Universitätsklinikum Göttingen.

Bei **Herrn PD Dr. Friedrich Lottspeich** vom Max-Planck-Institut für Biochemie möchte ich mich für die Ermöglichung der Massenspektrometrie besonders bedanken. Seine freundliche Art machte es mir immer möglich, Fragen zu stellen. Auch die Diskussionsbereitschaft vieler seiner Kollegen hat mir wertvolle Hilfe geleistet.

Ein großer Dank geht an **Prof. Hugh J. Willison, Prof. Christopher Linington** und **Dr. Kathyrin M. Brennan** der Universität von Glasgow. Sie haben mit ihrer bereit gestellten Glycolipidarray-Technik entscheidend dazu beigetragen, noch gegen Ende meiner Arbeit Antigene der OKB zu identifizieren.

Meiner Familie angemessen zu danken ist schwer. **Mama, Sylvia, Doris, Pa** und **Yvonne** haben mich über all die Jahre begleitet, ihren Stolz und ihre Liebe zum Ausdruck gebracht und mir immer das Gefühl gegeben, in unserer Patchwork-Familie zuhause zu sein.

Für die vielen guten Gespräche, die mir Zuversicht und Kraft gegeben haben, möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner **Doris** bedanken, die immer an mich geglaubt hat.

Mein größter Dank gilt meinem Schatz **Michael**, der über die gesamte Zeit der Doktorarbeit zu mir gestanden hat. Er hat mich mit unglaublich viel Liebe begleitet, mir immer wieder aufs Neue Selbstvertrauen gegeben und war mir durch seine Geborgenheit der nötige Ruhepol. Ich freue mich auf die gemeinsame Zeit, wo auch immer...

Mama, Dad und Sylvia, euch verdanke ich, dass ich bin und was ich bin.

Dad, ich vermisse dich. Ich weiß, dass du da bist und stolz auf mich bist.

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.2	Entstehung der Diversität von Immunglobulinen	2
1.2.1	Kombinatorische Diversität	3
1.2.2	Junktionale Diversität	3
1.2.3	Negative Selektion autoreaktiver B-Zellen	4
1.2.4	Affinitätsreifung und klonale Expansion	4
1.2.5	Antikörperproduktion und immunologisches Gedächtnis	5
1.2.6	Molekularer Aufbau eines IgG-Antikörpers	5
1.2.7	Faltung eines IgG-Antikörpers und CDR-Regionen	6
1.3	Autoimmunerkrankungen	8
1.4	Multiple Sklerose	8
1.4.1	Epidemiologie und genetische Prädisposition	9
1.4.2	Infektionshypothese	9
1.4.3	Immunpathophysiologie	10
1.5	Liquordiagnostik und oligoklonale Banden	11
1.5.1	Zusammensetzung und Zirkulation des Liquors	11
1.5.2	Liquordiagnostik	12
1.5.3	Bislang identifizierte Antigene von Liquor-Antikörpern	13
1.6	Fragestellung	14
2.	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1	Material	15
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	15
2.1.2	Oligonukleotide	15
2.1.3	Antikörper	15
2.1.4	Patientenmaterial	16
2.1.5	Allgemeine Geräte	17
2.2	Mikrobiologische Methoden	18
2.2.1	Herstellung von elektrisch kompetenten <i>E.coli</i> Bakterien	18
2.2.2	Transformation durch Elektroporation	18
2.2.3	Transformation durch Hitzeschock	19
2.2.4	Aufbewahrung als Glycerinkulturen	19
2.3	Zellbiologische Methoden	20
2.3.1	Einfrieren und Auftauen	20
2.3.2	Kultivierung	21
2.3.3	Bestimmung der Lebendzellzahl	21
2.3.4	Transfektion und transiente Proteinexpression	21

2.4	Molekularbiologische Methoden	23
2.4.1	Isolierung von RNA	23
2.4.1.1	RNA-Isolierung durch Phenolextraktion	23
2.4.1.2	RNA-Isolierung mit „RNeasy Micro Kit“	23
2.4.1.3	RNA-Isolierung aus Formalin-fixiertem Hirngewebe	23
2.4.2	Präparation von DNA	24
2.4.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	24
2.4.2.2	Agarosegel-Elektrophorese	24
2.4.2.3	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	25
2.4.2.4	Fällung von DNA	25
2.4.2.5	Anwendung weiterer Reagenzienpakete zur DNA-Präparation	25
2.4.2.6	DNA-Konzentrationsbestimmung	25
2.4.3	Enzymatische Behandlung von DNA	26
2.4.3.1	Reverse Transkription	26
2.4.3.2	Polymerase-Kettenreaktion	26
2.4.3.2.1	Kolonie-PCR	27
2.4.3.2.2	<i>Nested</i> PCR	27
2.4.3.2.3	<i>Semi-Nested</i> PCR	28
2.4.3.2.4	Mutagenese-PCR	29
2.4.3.3	TOPO-TA-Klonierung	30
2.4.3.4	Spaltung mit Restriktionsenzymen	30
2.4.3.5	Ligation	32
2.4.3.6	Gensynthese	32
2.4.3.7	DNA-Sequenzierung	32
2.4.4	Auswertung von DNA-Sequenzen	32
2.5	Proteinanalytik	33
2.5.1	Proteinbestimmung	33
2.5.1.1	Bicinchoninsäure-Test	33
2.5.1.2	Photometrische Messung	33
2.5.2	Proteinreinigung	34
2.5.2.1	Protein G-Affinitätschromatographie	34
2.5.2.2	Ni-NTA-Affinitätschromatographie	34
2.5.2.3	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>	35
2.5.2.4	Dialyse	36
2.5.2.5	Konzentrierung durch Ultrafiltration	36
2.5.2.6	Fällung mit Aceton	36
2.5.2.7	Aufschluss eukaryotischer Zellen	37
2.5.3	Gelelektrophorese	37
2.5.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	38
2.5.3.2	Isoelektrische Fokussierung	38
2.5.3.2.1	Rehydrierung der Gelmatrix und Probenapplikation	38
2.5.3.2.2	Fokussierungsprotokolle	39
2.5.3.3	Zweidimensionale Gelelektrophorese	40
2.5.3.3.1	24 cm IPG-Streifen/SDS-Maxigele	40
2.5.3.3.2	7 cm IPG-Streifen/SDS-Minigele	41
2.5.3.4	Proteinfärbung in Gelen	41
2.5.3.4.1	Coomassie®-Brilliant-Blau-Färbung	41
2.5.3.4.2	Kolloidale Coomassie-Färbung	42
2.5.3.4.3	Silberfärbung nach Heukeshoven	42
2.5.3.4.4	Silberfärbung nach Shevchenko	42
2.5.3.5	Elektroblotting	43

2.5.4	Enzymatische Behandlung von Proteinen	44
2.5.4.1	Deglykosylierung	44
2.5.4.2	Tryptische Spaltung in einer Gelmatrix	44
2.5.5	Massenspektrometrie	45
2.5.5.1	MALDI-TOF Massenspektrometrie	45
2.5.5.2	Auswertung von MALDI-TOF-Daten	46
2.5.5.3	LC-ESI Massenspektrometrie	46
2.5.6	Circulardichroismus-Spektroskopie	47
2.6	Immunologische Methoden	48
2.6.1	Durchflusszytometrie	48
2.6.2	Affinitätschromatographie	48
2.6.3	Western Blot	49
2.6.3.1	Detektion des His ₍₆₎ -Signalpeptids	49
2.6.3.2	Immunoblot	50
2.6.4	Kombinatorischer <i>Glycolipidarray</i>	50
2.6.5	Immunfluoreszenz	51
2.6.5.1	Immunfluoreszenzfärbung von Hirngewebe	51
2.6.5.2	Immunfluoreszenztests der Firma Euroimmun	52
3.	ERGEBNISSE	53
3.1	Ursprung der oligoklonalen Antikörper	53
3.1.1	B-Zellen im Liquor sind an der Produktion von OKB-Antikörpern beteiligt	53
3.1.1.1	Erstellen von Patienten-spezifischen Ig-V(D)J-Transkriptomen	53
3.1.1.2	Analyse der Patienten-spezifischen Ig-V(D)J-Transkriptome	54
3.1.1.3	Isoelektrische Fokussierung von Liquor-Antikörpern	55
3.1.1.4	Analyse der IgG-Proteome und Vergleich mit den Ig-V(D)J-Transkriptomen	55
3.1.2	Das Repertoire der oligoklonalen Antikörper ist Liquor-spezifisch	60
3.1.3	Das Repertoire der oligoklonalen Antikörper ist Patienten-spezifisch	60
3.2	Vergleich von Immunglobulin-Repertoires in Liquor und Gehirn	62
3.2.1	Einige B-Zellen im Liquor sind mit B-Zellen im Gehirn verwandt	62
3.2.2	B-Zellen im Gehirn tragen zum Liquor-Antikörperrepertoire bei	66
3.2.3	Untersuchungen mit Formalin-fixiertem Hirngewebe	69
3.2.3.1	Identifizierung klonal expandierter B-Zellen im Liquor	70
3.2.3.2	Klon-spezifische PCR mit Formalin-fixiertem Hirngewebe	70
3.3	Etablierung eines Protokolls für hochauflösende Antikörpertrennung	72
3.3.1	Dissoziation von H- und L-Ketten trotz nicht-reduzierender Bedingungen	72
3.3.2	Verschiedene Methoden der Probenapplikation	73
3.3.3	Deglykosylierung der Antikörper	75
3.3.4	IEF mit dem Agilent 3100 OFFGEL Fractionator	76
3.4	Identifizierung gepaarter H- und L-Ketten einzelner OKB-Antikörper	78
3.4.1	Identifizierung von OKB-Antikörpern der Patienten 1039 und HM-63	78
3.4.1.1	Trennung von Liquor-Antikörpern nach optimiertem Protokoll	78
3.4.1.2	MALDI-TOF Massenspektrometrie und deren Auswertung	79
3.4.1.3	Eindeutige Zuordnungen gepaarter H-/L-Ketten	80

3.4.1.3.1	Identifizierung eines OKB-Antikörpers von Patient 1039	81
3.4.1.3.2	Identifizierung von OKB-Antikörpern des Patienten HM-63	82
3.4.2	Identifizierung eines OKB-Antikörpers des Patienten NS-52	85
3.5	Expression und Charakterisierung von Fab-Fragmenten	87
3.5.1	Validierung des Molekulargewichts und der Reinheit der Präparation	87
3.5.2	Bestätigung der Heterodimerität	89
3.5.3	Überprüfung der Sekundärstruktur	90
3.5.4	Funktionstest mit MOG-spezifischem rFab-Fragment	91
3.6	Antigensuche	92
3.6.1	Humanes Hirngewebe	92
3.6.2	Virale und bakterielle Kandidatenantigene	93
3.6.2.1	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	94
3.6.2.2	Masern-Viren	95
3.6.3	Intrazelluläre Antigene	97
3.6.3.1	Indirekte Immunfluoreszenz gegen Zellkernbestandteile	97
3.6.3.2	Immunoblots mit Zelllysat	97
3.6.3.3	Affinitätschromatographie mit Zelllysat	98
3.6.4	Lipidantigene	99
4.	DISKUSSION	103
4.1	OKB-Antikörper stammen von B-Zellen im Liquor ab	104
4.1.1	Liquor-B-Zellen resultieren aus einer Antigen-induzierten Immunantwort	104
4.1.2	Das OKB-Antikörperrepertoire ist Komplement-aktivierend	105
4.2	Liquor und Gehirn weisen überlappende Ig-Repertoires auf	107
4.2.1	Ektopische Keimzentren erlauben eine intrathekale B-Zellreifung	107
4.2.2	B-Zellen im Liquor und Gehirn bilden ein Netzwerk verwandter Klone	108
4.2.3	Liquor-Antikörper spiegeln Ig-Transkripte parenchymaler B-Zellen wider	109
4.3	Strategien zur Identifizierung von Antigenen der OKB	111
4.3.1	Bisherige Studien	111
4.3.2	Das neue Protokoll erlaubt die Rekonstruktion einzelner OKB-Antikörper	112
4.3.2.1	Hochauflösende Antikörpertrennung	112
4.3.2.2	Semi-quantitative Auswertung von Massenspektren	113
4.4	Test der OKB-basierten Fab-Fragmente auf Kandidatenantigene	115
4.4.1	Hirngewebe sowie virale und bakterielle Erreger	115
4.4.2	Ubiquitäre intrazelluläre Antigene	116
4.4.3	Avidität und Affinität als limitierende Faktoren	117
4.5	Zwei OKB-basierte rFab-Fragmente erkennen Sulfatid	118
4.5.1	Die Myelinschicht im ZNS ist zu 80% aus Lipiden aufgebaut	118
4.5.2	Anti-Lipid-Antikörper haben in EAE und MS pathogenes Potential	119
4.5.3	Induziert molekulare Mimikry die Reaktivität gegen Myelinlipide?	120
4.5.4	Die Antigenbindungsstelle von Antikörpern bietet Platz für Polyspezifität	121

4.6	Weiterführende Experimente	122
4.6.1	Experimente zur Identifizierung weiterer Antigene	122
4.6.2	Validierung und Charakterisierung der Antikörper-Antigen-Bindung	124
4.7	Hypothese zur Funktion der OKB-Antikörper	125

LITERATURVERZEICHNIS

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ANHANG

I.	Primersequenzen	I
II.	Vektorkarten	IV
III.	Ergebnisse zu Abschnitt 3.2	VI
IV.	Ergebnisse zu Abschnitt 3.4	XII
V.	Aminosäuresequenzen der rFab-Fragmente	XVI
VI.	Cd	XVII

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

CURRICULUM VITAE

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Organismen sind ständig vielfältigen Einflüssen aus der Umwelt ausgesetzt, welche dem Körper schaden können. Die häufigsten Krankheitserreger sind Bakterien, Pilze, Parasiten und Viren. Auch Toxine beispielsweise pflanzlichen Ursprungs haben schädigende Wirkung, indem sie essentielle Stoffwechselprozesse von Zellen stören. Den Organismus davor zu schützen oder eingedrungene Erreger zu bekämpfen, ist Aufgabe des Immunsystems.

Als erste Front der Abwehr dient die angeborene Immunantwort. Sie umfasst verschiedene Zelltypen wie Makrophagen, natürliche Killerzellen und Granulozyten sowie das Komplementsystem. Pathogene, welche die äußeren Barrieren des Körpers wie Haut oder Schleimhäute überwunden haben, werden direkt angegriffen, wodurch Infektionen im Vorfeld verhindert werden. Vom angeborenen Immunsystem werden jedoch nicht alle fremden Mikroorganismen oder Substanzen erkannt. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn neue oder veränderte Erreger den Körper angreifen.

Im Gegensatz zur angeborenen Immunabwehr zeichnet sich das adaptive Immunsystem durch die Fähigkeit der laufenden Anpassung an neue Situationen aus. Hierfür hält jedes Individuum ein großes Repertoire an B- und T-Lymphozyten bereit, die mit jeweils einzigartiger Spezifität Epitope körperfremder Substanzen erkennen. Zusätzlich spielen Antigen-präsentierende Zellen, unter anderem dendritische Zellen und Makrophagen, eine entscheidende Rolle. Letztere gehören wiederum dem angeborenen Immunsystem an. Sie phagozytieren die Erreger und präsentieren den Lymphozyten prozessierte Bestandteile. Die Lymphozyten werden daraufhin aktiviert und greifen die Pathogene gezielt an.

Letztendlich wird durch das enge Zusammenspiel beider Mechanismen der Immunabwehr gewährleistet, dass Erkrankungen vom Eindringen des Erregers bis zu dessen vollständiger Eliminierung im Allgemeinen innerhalb weniger Tage abklingen. Das immunologische Gedächtnis sorgt zudem dafür, dass bei einer erneuten Infektion mit einem bereits bekannten Pathogen die Immunreaktion unmittelbar einsetzen und effizienter ablaufen kann.

1.2 Entstehung der Diversität von Immunglobulinen

Im Fokus der vorliegenden Arbeit standen B-Lymphozyten und Antikörper als wichtige Bestandteile des adaptiven Immunsystems. Neben ihrer Aufgabe als Antigen-präsentierende Zellen sind B-Lymphozyten, kurz B-Zellen genannt, für die humorale Immunantwort zuständig. Nach vollzogenem Reifungsprozess sezernieren sie als Plasmazellen eine Vielzahl verschiedener und hochspezifischer Antikörper (Immunglobuline, Ig). Jedes Individuum besitzt ein immenses Repertoire von mehr als 10^{11} unterschiedlichen Antikörpern, welches auf DNA-Ebene der B-Zellen codiert wird [94]. Diese enorme Vielfalt kann offensichtlich nicht durch alleinige Vererbung der Ig-Loci entstehen. Erst diverse Mechanismen auf somatischer Ebene sorgen im Verlauf der B-Zellreifung für die hohe Variabilität. Diese werden im Folgenden näher beleuchtet.

Die verschiedenen Stadien der B-Zellreifung sind in **Abbildung 1-1** zunächst in einer Übersicht zusammengefasst.

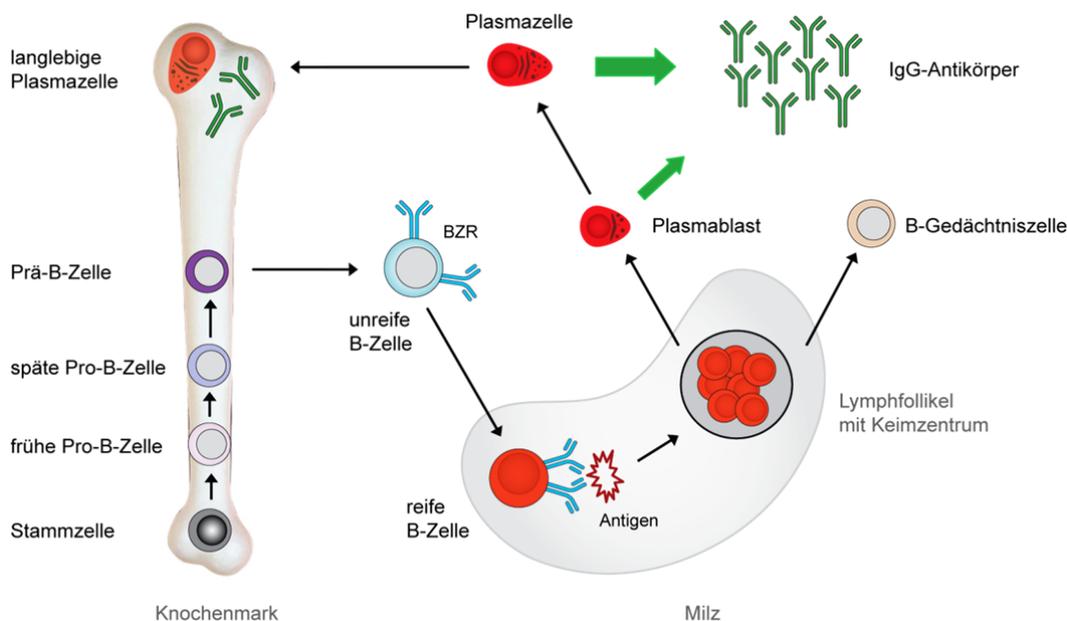


Abb. 1-1: Überblick über die verschiedenen Stadien der B-Zellreifung

Die B-Zellreifung beginnt im Knochenmark ausgehend von hämatopoetischen Stammzellen. Im Verlauf der V(D)J-Rekombination werden die einzelnen Stadien der Pro- und Prä-B-Zellen erreicht. Als unreife B-Zellen, welche den B-Zellrezeptor (BZR) auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, verlassen sie das Knochenmark und gelangen in periphere lymphatische Organe, beispielsweise die Milz. Bindet der BZR ein Antigen, so wandern die reifen B-Zellen in Lymphfollikel. Dort bilden sie Keimzentren, in denen sie die Affinitätsreifung durchlaufen. Positiv selektionierte Klone proliferieren stark und differenzieren zu Plasmablasten und B-Gedächtniszellen. Plasmazellen haben ausschließlich die Aufgabe, hochaffine IgG-Antikörper in großer Menge zu produzieren. Einige davon entwickeln sich zu langlebigen Plasmazellen, welche ins Knochenmark wandern und zum immunologischen Gedächtnis beitragen.

1.2.1 Kombinatorische Diversität

B-Zellen haben ihren Ursprung in pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen und beginnen ihre Entwicklung als sogenannte Pro-B-Zellen im Knochenmark. Die Grundlage für die hohe Variabilität des Ig-Repertoires wird durch die Organisation des Ig-Locus und den Mechanismus der V(D)J-Rekombination geschaffen. Darauf basiert die kombinatorische Diversität.

Insgesamt gibt es drei verschiedene Arten von Ig-Ketten: die schwere Kette (H-Kette; *heavy*) sowie zwei verschiedene leichte Ketten (L-Kette; *light*), unterteilt in Kappa- (κ) und Lambda- (λ) Ketten. Jeder Typ von Ig-Kette ist im menschlichen Genom innerhalb eines Locus auf verschiedenen Chromosomen organisiert. Der Locus für die H-Kette befindet sich auf Chromosom 14, der κ -Locus auf Chromosom 2 und der λ -Locus auf Chromosom 22. Die einzelnen Loci beinhalten jeweils Gruppen von verschiedenen Gensegmenten in unterschiedlichen Kopienzahlen: V-Segmente (*variabel*), J-Segmente (*joining*) und im Fall der H-Kette zusätzliche D-Segmente (*diversity*). Jede einzelne Kopie unterscheidet sich von allen anderen in ihrer Keimbahnsequenz.

Im Verlauf der V(D)J-Rekombination wird von der VDJ-Rekombinase im Fall der H-Kette zunächst ein D- mit einem J-Segment (frühe Pro-B-Zelle) und im Anschluss zufällig mit einem V-Segment verknüpft (späte Pro-B-Zelle). Erst dann folgt die Zusammenführung eines V-Segments mit einem J-Segment der κ - beziehungsweise λ -Kette (Prä-B-Zelle). Das gebildete V(D)J-Exon wird im Anschluss auf mRNA-Ebene durch einen Spleißvorgang mit dem C-Segment (*constant*) verbunden. Es folgt die Translation am Ribosom und die Kombination einer H- mit einer L-Kette. Nur bei einer produktiven Genumordnung kann die Prä-B-Zelle den nächsten Schritt im Entwicklungsprozess gehen. Dabei exprimiert sie als sogenannte unreife B-Zelle ihr Immunglobulin als membranständiges IgM-Molekül, welches auch als B-Zellrezeptor bezeichnet wird.

1.2.2 Junktionale Diversität

Bei der V(D)J-Rekombination ist ein weiterer Mechanismus von Bedeutung, welcher zur Ig-Variabilität beiträgt. Dies betrifft insbesondere die H-Ketten bei der Verknüpfung des D-Segments mit dem V- beziehungsweise J-Segment. Exonukleasen entfernen dabei Nukleotide, Desoxynukleotidyltransferasen führen zusätzliche Nukleotide ein. Weniger stark ausgeprägt spielt sich dieser Prozess auch bei den L-Ketten zwischen V- und J-Segment ab. Da der zugrunde liegende Mechanismus einem Zufallsprinzip folgt, weist dieser Sequenzabschnitt eine enorm hohe Variabilität auf und wird deshalb auch hypervariabler Bereich

(CDR3, *complementarity determining region 3*) genannt (siehe **Abschnitt 1.2.8**). Er stellt einen einzigartigen Fingerabdruck im Ig-Repertoire dar.

1.2.3 Negative Selektion autoreaktiver B-Zellen

Zu diesem Entwicklungszeitpunkt hatten die B-Zellen noch keinen Kontakt zu einem Antigen und werden somit als unreife B-Zellen bezeichnet. Aufgrund der kombinatorischen und junktionalen Diversität weisen sie bereits ein enormes Ig-Repertoire mit mannigfaltiger Spezifität auf. Zufällig kann es dabei auch zu Reaktivitäten gegen körpereigene Epitope kommen. Um solche potentiell autoreaktive B-Zellen zu eliminieren bevor sie in den Lymphkreislauf gelangen, werden deren Spezifitäten noch im Knochenmark überprüft. Wird eine autoreaktive B-Zelle detektiert, so wird sie entweder durch Apoptose beseitigt (Deletion) oder inaktiviert (Anergie). Um diesen Mechanismen zu entgehen, kann die B-Zelle auch versuchen, durch erneute Umlagerung des V- und J-Segments der L-Kette ihre Antigen-spezifität zu ändern (*receptor editing*).

Die Überprüfung ist nicht immer effizient, sodass einige autoreaktive B-Zellen trotzdem in das nächste Stadium der Entwicklung eintreten. Sie verlassen das Knochenmark und wandern über den Blutkreislauf in die peripheren lymphatischen Organe wie Milz und Lymphknoten.

1.2.4 Affinitätsreifung und klonale Expansion

Im peripheren Lymphgewebe treffen die unreifen B-Zellen über folliculäre dendritische Zellen möglicherweise auf ihr Antigen. Ist dies der Fall, so werden sie aktiviert und in diesem Stadium als reif bezeichnet. Die Aktivierung erfolgt zuerst über die Quervernetzung des BZR auf der Oberfläche. Dann internalisieren die reifen B-Zellen das Antigen und präsentieren prozessierte Peptide über MHC-Klasse-II-Moleküle. Daran binden $CD4^+$ T-Helferzellen mit der Spezifität für dieses Peptid. Durch die Wechselwirkung werden costimulatorische Signale ausgeschüttet, woraufhin T- und B-Zellen zu proliferieren beginnen. Alle anderen B-Zellen erhalten keine Überlebenssignale. Sie sterben durch Apoptose oder werden in den Lymphkreislauf zurückgeführt. Aktivierte B-Zellen wandern in die Lymphfollikel und bilden Keimzentren.

In den Keimzentren setzt der nächste entscheidende Mechanismus in der Entstehung der Diversität des Ig-Repertoires ein: die somatische Hypermutation (SHM). Es kommt dabei zu einer Anhäufung von Punktmutationen in den Ig-Loci. Die Mutationsrate ist um ein 10^6 -faches höher als in anderen somatischen Zellen [100]. Das verantwortliche Enzym ist die

Aktivierungs-induzierte Deaminase (AID) [93]. Führen Mutationen zufällig zu einer höheren Affinität zum Antigen als mit dem ursprünglichen BZR, so wird diese B-Zelle positiv selektioniert. Deshalb wird die SHM auch als Affinitätsreifung bezeichnet. Insbesondere die drei CDR-Regionen von H- und L-Kette sind von diesen Mutationen betroffen, da diese unmittelbar an der Antigenbindung beteiligt sind (siehe **Abschnitt 1.2.7**). Im Verlauf der SHM entstehen auch viele unproduktive B-Zellrezeptoren: Stopcodons, Mutationen, welche die Faltung beeinträchtigen, oder Mutationen, die zu einer verringerten Affinität führen. Ein Großteil der B-Zellen stirbt aus diesem Grund im Keimzentrum ab. Die wenigen positiv selektionierten reifen B-Zellen hingegen beginnen mit einer ausgeprägten Zellteilung (klonale Expansion).

1.2.5 Antikörperproduktion und immunologisches Gedächtnis

Klonal expandierte B-Zellen mit der höchsten Affinität für ein bestimmtes Antigen differenzieren zu Plasmablasten. Diese sind weiterhin teilungsfähig und sezernieren durch den vollzogenen Klassenwechsel von IgM zu etwa IgG den hochaffinen löslichen Antikörper. Je nachdem, welches C-Segment exprimiert wird ($C\mu$ für IgM, $C\delta$ für IgD, $C\gamma 1/2/3/4$ für IgG1/2/3/4, $C\alpha 1/2$ für IgA1/2 und $C\epsilon$ für IgE), verfügt das generierte Ig-Molekül über bestimmte Effektorfunktionen, beispielsweise die Aktivierung des Komplementsystems (IgM und IgG), die Neutralisation von Toxinen (IgG) oder der Schutz vor Pathogenen in den Schleimhäuten (IgA).

Plasmablasten entwickeln sich weiter zu Plasmazellen, welche ausschließlich die Aufgabe haben, Antikörper zu produzieren. Kurzlebige Plasmazellen haben eine Halbwertszeit von wenigen Tagen und stellen große Antikörpermengen bereit. Langlebige Plasmazellen wandern ins Knochenmark und produzieren dort über mehrere Monate bis Jahre den hochaffinen Antikörper in kleineren Mengen. Sie tragen dadurch zum immunologischen Gedächtnis bei. Langlebige B-Gedächtniszellen haben die Antikörperproduktion eingestellt, können aber bei erneutem Auftreten desselben Antigens innerhalb kürzester Zeit reaktiviert und zur erneuten Antikörperproduktion stimuliert werden.

1.2.6 Molekularer Aufbau eines IgG-Antikörpers

Ein IgG-Molekül besteht aus vier Polypeptidketten: zwei H-Ketten mit einem Molekulargewicht von je etwa 50 kDa und zwei L-Ketten mit je etwa 25 kDa. Die einzelnen Polypeptidketten sind in Ig-Domänen aus jeweils circa 110 Aminosäuren organisiert, wobei

die L-Kette insgesamt aus zwei (V_L , C_L) und die H-Kette aus vier Ig-Domänen (V_H , C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}) besteht. Die aminoterminalen Ig-Domänen bilden den variablen Abschnitt (V-Region). Alle anderen Ig-Domänen werden als C-Region bezeichnet. Disulfidbrücken sorgen für Stabilität im IgG-Molekül. Intermolekular werden in der Gelenkregion eines IgG1-Isotyps zwei Disulfidbrücken zwischen den beiden H-Ketten sowie eine Disulfidbrücke zwischen H- und L-Kette ausgebildet. Die C_{H2} -Domäne verfügt über eine konservierte Glykosylierungsstelle: die Aminosäure Asparagin an Position 297. Die N-glykosidisch verknüpften Zuckerseitenketten sind unter anderem für die Wechselwirkung mit dem Komplementsystem von Bedeutung.

In **Abbildung 1-2** ist der Aufbau eines IgG-Antikörpers schematisch dargestellt.

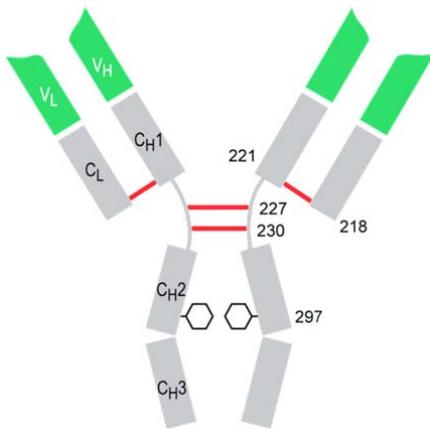


Abb. 1-2: Schemazeichnung eines IgG-Moleküls

Ein IgG-Molekül besteht aus insgesamt vier Polypeptidketten, wovon jeweils zwei identisch sind: zwei H-Ketten und zwei L-Ketten. H-Ketten sind aus vier Ig-Domänen aufgebaut (V_H , C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}), L-Ketten aus zwei (V_L , C_L). V_L und V_H bilden zusammen die variable Region (grün), alle C-Domänen gemeinsam die konstante Region (grau). H- und L-Kette sind mit Cysteinen durch eine Disulfidbrücke (rot) miteinander verbunden: C_{221} der H-Kette mit C_{218} der L-Kette. Zwischen den beiden H-Ketten wird das Heterodimer in der Gelenkregion über zwei Disulfidbrücken stabilisiert (C_{227} und C_{230}). Asparagin an Position 297 ist die konservierte Glykosylierungsstelle im IgG-Molekül.

1.2.7 Faltung eines IgG-Antikörpers und CDR-Regionen

Jede Ig-Domäne eines IgG-Moleküls besitzt als strukturelle Basis je sieben antiparallele β -Stränge. In den V_H - und V_L -Domänen ragen Schleifen aus dem Gerüst. Es handelt sich dabei um die CDR-Regionen. Der variable Teil jeder Ig-Kette enthält insgesamt drei CDR-Regionen: zwei in der V-Region (CDR1 und CDR2) und eine weitere an der Verknüpfungsstelle zwischen V-, (D)- und J-Segment (CDR3). Sie weisen eine höchst variable Sequenz auf, insbesondere aufgrund der Anhäufung von Punktmutationen während der Affinitätsreifung (siehe **Abschnitt 1.2.4**). Die CDR3-Region erhält ihre Hypervariabilität hauptsächlich durch das zufällige Einfügen oder Entfernen von Nukleotiden (siehe **Abschnitt 1.2.2**). Die stark exponierten Schleifen der CDR-Regionen bilden zusammen die Antigenbindungsstelle und bestimmen so die Spezifität des Antikörpers, daher auch ihre

Bezeichnung als „Komplementaritäts-bestimmende Region“. Wird ein IgG-Antikörper mit der Protease Papain gespalten, so erhält man die beiden funktionellen Einheiten „Fab“ und „Fc“. Das Fab-Fragment enthält die V-Regionen und ist damit für die Bindung von vielfältigen Epitopen prädestiniert. Das Fc-Fragment zeigt eine konstante Sequenz und gewährleistet die Effektorfunktionen des Antikörpers.

Sekundärstrukturen im gefalteten IgG-Molekül sowie die Einteilung in strukturelle und funktionelle Einheiten sind in **Abbildung 1-3** zusammengefasst.

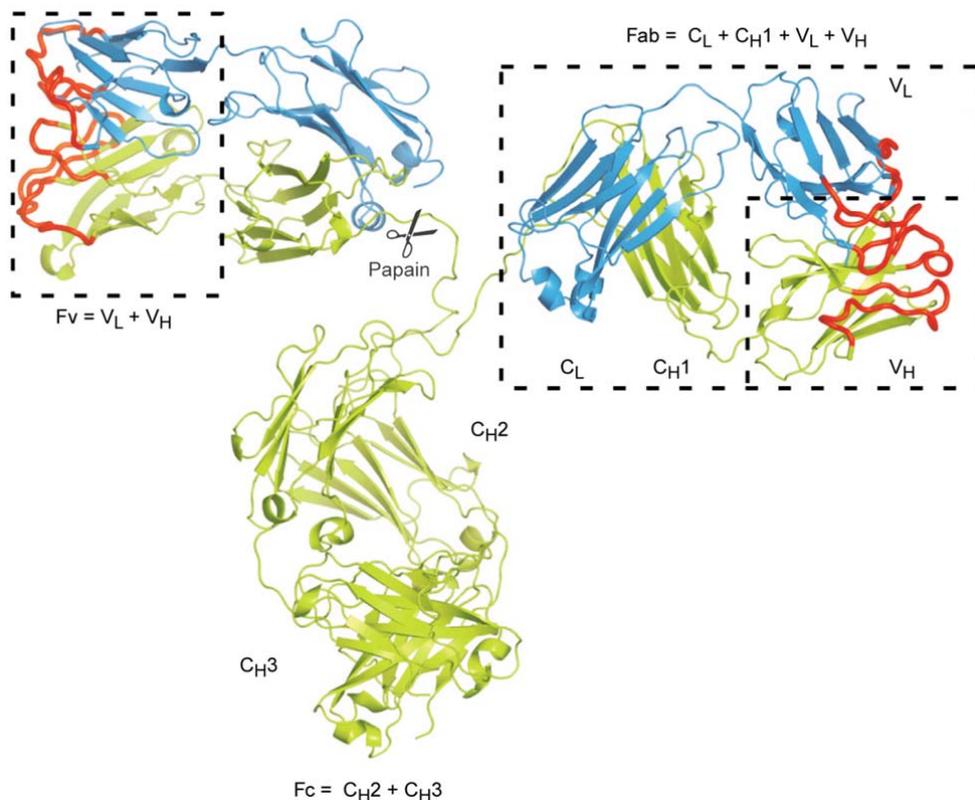


Abb. 1-3: Faltung eines IgG-Moleküls

Jede Ig-Domäne weist als stabilisierendes Gerüst sieben antiparallele β -Faltblätter auf. Die H-Kette ist in grün dargestellt und besteht aus vier Domänen (V_H, C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}), die L-Kette in blau aus zwei Domänen (V_L, C_L). In rot sind die exponierten Schleifen der CDR-Regionen (CDR1, CDR2, CDR3) gezeigt, welche gemeinsam die Antigenbindungsstelle bilden. Die kleinste funktionelle Einheit ist das Fv-Fragment, bestehend aus den beiden variablen Domänen V_H und V_L. Nimmt man die konstanten Domänen C_{H1} und C_L hinzu, so entsteht das Fab-Fragment. Die C_{H2}- und C_{H3}-Domänen der beiden H-Ketten repräsentieren das Fc-Fragment. Beim Verdau mit Papain werden Fab- und Fc-Fragment voneinander getrennt. (modifiziert nach [132])

1.3 Autoimmunerkrankungen

In **Abschnitt 1.2** wurde erläutert, wie B-Lymphozyten als Bestandteil der adaptiven Immunabwehr reifen und dabei ein enormes Ig-Repertoire generieren. Dabei kann es zufällig zu Reaktivitäten gegen körpereigene Epitope kommen. Es existieren mehrere Kontrollstationen, welche potentiell autoreaktive Lymphozyten beseitigen. Schlagen diese Kontrollmechanismen fehl, so kann dies zum Verlust der Selbsttoleranz und als Folge davon zu Autoimmunität führen.

Autoimmunerkrankungen können T-Zell- oder B-Zell-dominiert sein, beruhen aber vermutlich auf einem Zusammenspiel beider Komponenten des adaptiven Immunsystems. Psoriasis, eine chronische Entzündung der Haut, ist beispielsweise vorwiegend in der Infiltration autoreaktiver $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in die Epidermis und der damit einhergehenden Schädigung von Keratinozyten begründet [114]. Beim systemischen Lupus erythematoses (SLE) differenzieren B-Zellen mit der Spezifität für doppelsträngige DNA zu Autoantikörper-produzierenden Plasmazellen [29]. In rheumatoider Arthritis (RA) sind $CD4^+$ T-Zellen und B-Zellen mit Beteiligung von Makrophagen für die Zerstörung von Knorpel und Knochen in der entzündeten Gelenkkapsel verantwortlich [34].

Die Ursachen für den Verlust der Selbsttoleranz sowie die Pathomechanismen konnten für die meisten Autoimmunerkrankungen bislang noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Gleiches gilt auch für Multiple Sklerose (MS), eine chronische Entzündung des Zentralnervensystems (ZNS).

1.4 Multiple Sklerose

Ende des 19. Jahrhunderts führte der französische Neurologe Jean-Martin Charcot erste klinische Studien zum Krankheitsbild von MS durch. Er erkannte bereits, dass es sich pathologisch um eine Demyelinisierung der Nervenzellen handelt. Die entstehenden Läsionen sind im ZNS verteilt. Da die Myelinschicht der Axone für eine schnelle Signalweiterleitung sorgt, ist deren Schädigung mit Konsequenzen in zentral gesteuerten Abläufen verbunden. Abhängig von der betroffenen Gehirnregion treten unterschiedliche Symptome auf. Entzündungen im optischen Nerv führen zu Sehstörungen. Taubheitsgefühle sind in demyelinisierten Herden im sensorischen System begründet. Auch Lähmungen, schnelle Ermüdung, unkoordinierte Zuckungen und weitere vielfältige Beschwerden sind beschrieben [137]. Die Symptome treten zumeist schubförmig auf, dauern einige Tage bis wenige

Wochen an und lassen dann wieder nach. Eine Heilung ist nicht möglich. Derzeit stehen aber zahlreiche Medikamente zur Verfügung, die die Schubrate günstig beeinflussen und den Krankheitsverlauf deutlich verzögern können.

1.4.1 Epidemiologie und genetische Prädisposition

Weltweit sind heute rund 2,5 Millionen Menschen von MS betroffen, davon eine Million in den Industrieländern [25]. In Deutschland sind nach jüngsten Schätzungen etwa 130.000 Personen an MS erkrankt (Quelle: Internetseite des DMSG Bundesverbands). Frauen sind im Vergleich zu Männern doppelt so häufig betroffen [96]. Erste Symptome treten meist zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr auf, wodurch MS nach der Epilepsie als zweithäufigste neurologische Erkrankung junger Erwachsener gilt [89]. In den Zonen der gemäßigten Breiten ist die Anfälligkeit für MS höher als in der äquatorialen Zone [32]. Bei einer Migration in Regionen mit geringerer Häufigkeit von MS sinkt das Risiko deutlich. Diese Beobachtung zeigt, dass offensichtlich Umwelteinflüsse eine Rolle spielen.

Auch eine genetische Prädisposition hat Anteil am Risiko für MS. Während in der Gesamtbevölkerung das Erkrankungsrisiko lediglich 0,2% beträgt, so ist dieses für Verwandte ersten Grades um das bis zu 25-fache, für monozygotische Zwillinge sogar um das knapp 200-fache erhöht [31]. Das HLA-Klasse-II-Allel HLA-DRB1*1501 ist in Kombination mit HLA-DRB1*0801 häufig mit MS assoziiert [9]. Insgesamt wird heute angenommen, dass das Zusammenspiel mehrerer Risikogene in Abhängigkeit von ethnischem Hintergrund und Umweltfaktoren letztlich zur Manifestation von MS führen.

1.4.2 Infektionshypothese

Die Infektionshypothese bringt verschiedene Viren mit der Ätiologie von MS in Verbindung. Beispielsweise sind nahezu 100% der MS-Patienten seropositiv für das Epstein-Barr-Virus (EBV) im Vergleich zu 90% in der gesunden Bevölkerung [110]. Zudem sind in den Hirnhäuten von MS-Patienten EBV-infizierte B-Zellen nachzuweisen [129]. Neben weiteren Viren wie Herpes Simplex (HSV) [87] stehen auch bakterielle Erreger wie *Chlamydia pneumoniae* [28], in der Diskussion. Möglicherweise spielt molekulare Mimikry eine Rolle: bei einer Infektion werden zunächst Spezifitäten gegen das infektiöse Agens gebildet, welches ähnliche Epitope aufweist als das im zweiten Schritt angegriffene Autoantigen [101]. Dieser Mechanismus wurde unter anderem für das Guillain-Barré-Syndrom (GBS) beschrieben [3]. Molekulare Mimikry könnte auch an der Manifestation von MS beteiligt

sein, allerdings fehlten bisher die direkten Beweise. In einigen Studien wurden T-Zellen identifiziert, welche mit viralen Peptiden und mit Peptiden von Myelinproteinen kreuzreagieren [50, 86, 144, 162].

1.4.3 Immunpathophysiologie

Das Charakteristikum von MS, die demyelinisierten Herde, auch Läsionen oder Plaques genannt, zeichnen sich dadurch aus, dass sie eine Vielzahl verschiedenster Immunzellen aufweisen: expandierte CD8⁺ T-Zellen [7], darunter auch γ/δ T-Zellen [161], Makrophagen und zu einem geringeren Prozentsatz Zellen der B-Zelllinie [113].

Nach derzeitigem Wissensstand beruht die Demyelinisierung darauf, dass autoreaktive T-Zellen im ZNS mit Bestandteilen des Myelins reagieren und die Myelinschicht mithilfe von Makrophagen schädigen [26]. Kandidatenantigene konzentrieren sich demnach unter anderem auf das Basische Myelinprotein (MBP) oder das Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) [96]. Unterstützt wird diese Hypothese durch Studien am Tiermodell Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE). Der Transfer MBP-spezifischer CD4⁺ T-Zellen induziert eine Lähmung der Hinterbeine, welche ähnlich der Symptome beim schubförmig-remittierenden Verlauf der MS nach wenigen Tagen wieder abklingt [12].

Während den T-Zellen seit langem eine Schlüsselrolle in der Immunpathogenese zugesprochen wird, so gewinnen B-Zellen erst im Laufe der letzten Jahre mehr an Bedeutung [43, 75, 90]. Der überzeugendste Hinweis darauf sind Erfolge im Rahmen einer anti-CD20-Therapie. Der monoklonale Antikörper Rituximab führt zu einer Depletion von B-Lymphozyten, was in einer deutlichen Verringerung der Schubrate resultiert [45]. Sowohl Plasmazellen als auch Antikörper sind im Gehirn in der Nähe der Plaques nachweisbar [113]. Ein Teil dieser Antikörper zeigt unter anderem eine Spezifität für MOG [99]. Auch im Liquor cerebrospinalis sind affinitätsgereifte B-Zellen vorhanden und der Antikörpergehalt ist stark erhöht [24, 92, 103, 117, 125]. Dies unterstützt die Annahme einer Antigen-induzierten humoralen Immunreaktion bei MS. Die Antikörper im Liquor cerebrospinalis sind als sogenannte „oligoklonale Banden“ (OKB) ein markantes Merkmal von MS und werden im Folgenden näher beleuchtet.

1.5 Liquordiagnostik und oligoklonale Banden

Zur Diagnose von MS müssen mehrere Kriterien erfüllt sein, die sich aus Magnetresonanztomografie, elektrophysiologischen Tests und Untersuchung des Liquor cerebrospinalis, kurz Liquor genannt, ergeben. Elvin Kabat zeigte bereits in den 40er Jahren des 20. Jahrhunderts, dass der Antikörpergehalt im Liquor von MS-Patienten erhöht ist [57, 58]. Er schloss daraus, dass ein beträchtlicher Anteil der Antikörper im Liquor von einer intrathekalen Produktion stammt, also innerhalb des ZNS synthetisiert wird. Die Feststellung, dass diese Antikörper expandierte Ig-Populationen mit limitierter Heterogenität darstellen, gelang erstmals im Jahre 1960 [82] und war damit der erste Nachweis von OKB. Eine verbesserte Methode, welche eine höhere Auflösung der IgG-Fraktion im Liquor erlaubte, wurde später von Kjellin und Vesterberg vorgestellt [66]. Es war die Einführung der isoelektrischen Fokussierung (IEF), welche noch heute in der klinischen Routine angewandt wird (siehe **Abb. 1-5**). Der Nachweis von OKB ist bis heute fester Bestandteil in der MS-Diagnostik. Statistiken zeigen, dass mehr als 95% der MS-Patienten OKB im Liquor haben [2]. Nach neuesten Studien verfügen sie außerdem über prognostisches Potential, sowohl den Schweregrad des Krankheitsverlaufs betreffend [6], als auch in Bezug auf den Therapieerfolg bei OKB-positiven versus OKB-negativen MS-Patienten [14, 84]. Bis heute gelang es jedoch nicht, die Rolle der OKB in der Immunpathogenese von MS aufzuklären.

1.5.1 Zusammensetzung und Zirkulation des Liquors

Liquor ist eine klare, farblose Körperflüssigkeit, welche hauptsächlich Stofftransportfunktion hat und durch die schwimmende Lagerung das Gehirn vor Erschütterungen schützt [18]. Gebildet wird Liquor an der Blut-Liquor-Schranke, welche aus spezialisierten Epithelzellen des Plexus choroideus aufgebaut ist. Hier kommt es zur Ultrafiltration des Blutplasmas [122]. Die relative Proteinkonzentration ist von der Konzentration im Plasma und von der Molekülgröße abhängig. Je größer der hydrodynamische Radius eines Proteins, desto langsamer gelangt es in den Liquor und desto kleiner ist seine relative Konzentration [33]. Aufgrund der hohen Selektivität der Blut-Liquor-Schranke enthält Liquor lediglich 0,2% des Proteingehalts des Blutplasmas [122]. Liquor zirkuliert im Ventrikelsystem des Gehirns und dem Zentralkanal des Rückenmarks sowie dem Subarachnoidalraum. Die Resorption in den Blutkreislauf erfolgt an den Arachnoidalzotten im Gehirn und im Rückenmark. Im Laufe eines Tages wird Liquor bis zu dreimal vollständig erneuert [121]. Dadurch wird gewährleistet, dass Metaboliten aus dem Gehirn schnell und effizient entfernt werden.

In **Abbildung 1-4** ist der Liquorraum im anatomischen Kontext dargestellt.

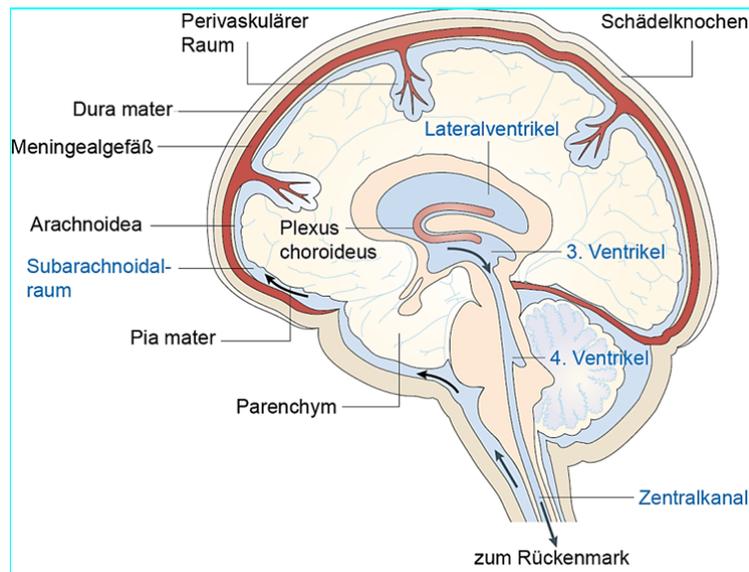


Abb. 1-4: Liquorraum

Der Liquor cerebrospinalis entsteht an der Blut-Liquor-Schranke. Diese wird von spezialisierten Epithelzellen des Plexus choroideus gebildet, welche sich unter anderem an beiden Lateralventrikeln und am dritten Hirnventrikel befinden. Liquor zirkuliert im Ventrikelsystem und im Zentralkanal des Rückenmarks sowie im Subarachnoidalraum zwischen Pia mater und Arachnoidea. Dadurch wird das gesamte ZNS inklusive Rückenmark umspült. Die am Liquorraum beteiligten Hirnstrukturen sind in blauer Schrift gekennzeichnet. (modifiziert nach [42])

1.5.2 Liquordiagnostik

Der Liquor von MS-Patienten ist pathologisch verändert und wird im Rahmen der klinischen Diagnostik auf verschiedene Parameter untersucht. Um hierfür Liquor vom Patienten zu gewinnen ist eine Lumbalpunktion notwendig. Mit einer Hohlnadel wird zwischen dem vierten und fünften Lendenwirbel in den Zentralkanal des Rückenmarks eingestochen und passiv zwischen einem und zehn Milliliter Flüssigkeit entnommen, je nach momentaner Zirkulationsrate des Liquors.

MS-Patienten weisen 10 bis 20 Zellen pro Mikroliter Liquor auf [27]. Es handelt sich zu 90% um Lymphozyten [27] und davon wiederum zu 5% um Zellen der B-Zelllinie [90].

Der Gehalt an IgG gilt ab 40 µg/ml als erhöht [27]. Im Vergleich zur Absolutmenge ist jedoch der Quotient aus dem IgG-Gehalt im Liquor zu Serum (IgG^Q) von klinischer Bedeutung. Je höher IgG^Q, desto geringer ist der Anteil von Serum IgG am Gesamtgehalt der IgG im Liquor.

OKB werden mittels IEF und anschließender Immunfixierung mit Anti-IgG-Antiserum nachgewiesen. Wie **Abbildung 1-5** zeigt, sind im Liquor auf einem Kontinuum einer

polyklonalen IgG-Hintergrundpopulation distinkte Banden expandierter Antikörper zu detektieren. Sie repräsentieren affinitätsgereifte Komplement-aktivierende IgG1-Antikörper [149] und stammen demnach von einer Antigen-induzierten Immunantwort ab. Da die Banden im Serum fehlen, handelt es sich folglich um eine intrathekale IgG-Synthese.

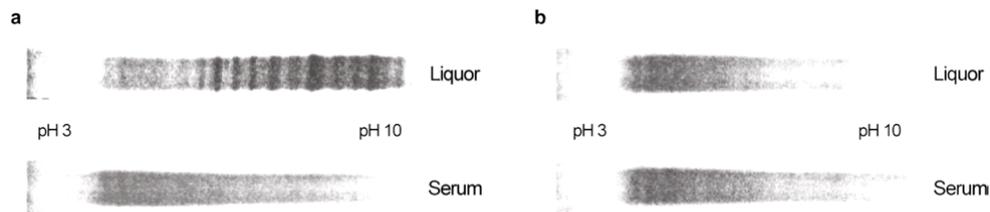


Abb. 1-5: Nachweis oligoklonaler Banden in der MS-Diagnostik

Bei Verdacht auf MS wird dem Patienten Blut und Liquor entnommen. Der IgG-Gehalt wird vor der Durchführung der IEF auf die gleiche Konzentration eingestellt. Die Detektion der Antikörper erfolgt über Immunfixierung mit Anti-IgG-Antiserum. **(a)** Im Liquor sind expandierte Antikörper als OKB nachweisbar. Da diese im Serum fehlen, stammen sie von einer intrathekalen IgG-Produktion. **(b)** Im Liquor sind keine Banden, sondern ausschließlich ein Kontinuum einer polyklonalen IgG-Population zu detektieren, welcher aus Serum an der Blut-Liquor-Schranke infiltriert wird. Während sich der Verdacht auf MS in **(a)** erhärtet, ist MS in **(b)** mit großer Wahrscheinlichkeit auszuschließen. (Bildquelle: Institut für Klinische Chemie, Klinikum Großhadern, München)

1.5.3 Bislang identifizierte Antigene von Liquor-Antikörpern

Bei den meisten entzündlichen ZNS-Erkrankungen richten sich die intrathekalen Antikörper gegen das infektiöse Agens, zum Beispiel *Treponema pallidum* bei Neurosyphilis [37]. Die bislang beschriebenen Zielstrukturen der Antikörper bei MS hingegen sind außerordentlich divers [90]. Eine Art Biomarker von MS stellt die MRZ-Reaktion dar. Es handelt sich dabei um die polyspezifische Reaktivität von Liquor-Antikörpern gegen Masern-, Röteln- und Varizella Zoster-Viren. Dies ist bei 89% aller MS-Patienten der Fall [123]. Reaktivitäten gegen EBV [20], HSV [87] und *Chlamydia pneumoniae* [28] sind ebenso beschrieben. In weiteren Studien wurden intrazelluläre Antigene wie Stoffwechsellzyme [69, 80] oder DNA [158] nachgewiesen. Auch Lipide werden als Antigene diskutiert [52, 61].

Unklar ist, wie es zu dieser Polyreaktivität von Liquor-Antikörpern kommt und ob die Immunantwort der B-Zellen bei MS möglicherweise nur als Nebeneffekt der T-Zell-vermittelten Entzündungsreaktion zu interpretieren ist. In der vorliegenden Arbeit wurden die oligoklonalen Antikörper sowie die B-Zellpopulation im Liquor eingehend charakterisiert, um eine mögliche Rolle der humoralen Immunantwort bei MS näher zu beleuchten.

1.6 Fragestellung

Seit den 40er Jahren des 20. Jahrhunderts ist bekannt, dass bei MS innerhalb des ZNS Antikörper produziert werden. Sie stellen eine oligoklonal expandierte Population reifer IgG1-Antikörper dar, welche in der klinischen Routine als OKB nachgewiesen werden. Bis heute sind OKB in Ergänzung zu bildgebenden Verfahren und elektrophysiologischen Tests ein entscheidendes Kriterium für die Diagnose von MS. Ob OKB auch an der Immunpathogenese beteiligt sind, ist nach wie vor unklar. Um diese elementare Frage zu klären, müssen die Zielstrukturen der oligoklonalen Antikörper identifiziert werden. Zwar wurden in zahlreichen Studien potentielle Antigene diskutiert, sie verfehlten jedoch die eindeutige Korrelation mit Antikörpern der OKB. Denn bislang war es noch nicht gelungen, das irrelevante polyklonale Repertoire vom expandierten oligoklonalen Repertoire zu unterscheiden.

Im Fokus der vorliegenden Arbeit stand deshalb die Entwicklung einer Methode, mit der einzelne OKB-Antikörper aus Liquor rekonstruiert werden können. Antigene, welche daraufhin mit rekombinant exprimierten monoklonalen Antikörpern identifiziert werden, sind dadurch eindeutig den OKB zuzuordnen.

Um diesen Teil der Arbeit zu ermöglichen, musste zunächst die Abstammung der OKB-Antikörper bestimmt werden. Im Liquor von MS-Patienten ist die Zahl an Zellen der B-Zelllinie erhöht. Diese B-Zellen hatten aufgrund ihres somatisch hypermutierten Ig-Transkriptrepertoires offensichtlich Antigenkontakt. Auch die Antikörper im Liquor stammen von einer Antigen-induzierten Immunantwort ab, da sie SHM enthalten und hauptsächlich den Komplement-aktivierenden IgG1-Isotyp repräsentieren. Mithilfe einer Kombination aus cDNA-Klonierung und Massenspektrometrie sollte durch Vergleich der Patienten-spezifischen Ig-Transkripte mit Peptiden der OKB-Antikörper geklärt werden, ob diese B-Zellpopulation die OKB-Antikörper im Liquor produziert.

Auch im Bereich der demyelinisierenden Herde im Gehirnparenchym sind affinitätsgereifte Zellen der B-Zelllinie lokalisiert. Ob auch diese zur Produktion der Antikörper im Liquor beitragen und Liquor damit als Spiegelbild der Entzündungsreaktionen im Gehirn angesehen werden kann, wurde in einem weiteren Projekt untersucht.

Anschließend musste die oben genannte Methode weiterentwickelt werden, um die Charakterisierung einzelner OKB-Antikörper aus einer insgesamt sehr heterogenen Antikörperpopulation im Liquor zu ermöglichen. Diese sollten als monoklonale Fab-Fragmente rekombinant exprimiert werden mit der Perspektive, deren Antigene zu identifizieren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Chemikalien stammten, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen). Verbrauchsmaterial wie Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, Zentrifugenröhrchen und Mikrotiterplatten wurden von den Firmen Biozym (Hess, Oldendorf), Eppendorf (Hamburg) und Becton Dickinson (Heidelberg) bezogen. Bei Bedarf wurden spezielle Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße aus Polypropylen verwendet, um die Adsorption von Nukleinsäuren und Proteinen an die Gefäßwand zu minimieren. Diese stammten von den Firmen Biozym und Eppendorf.

2.1.2 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert, mit Ausnahme der *Random Hexamer* Primer und M13 Primer (Invitrogen, Karlsruhe). Die Sequenzen sind im **Anhang Teil I** aufgelistet.

2.1.3 Antikörper

Spezifität	Kopplung	Klon	Spezies/ Isotyp	Konzentration	Bezugsquelle
Maus CD3e	-	145-2C11	Hamster/ IgG	0,5 mg/ml	eBioscience (Frankfurt)
6x His	-	HIS.H8	Maus/ IgG2b	1,0 mg/ml	Abcam (Cambridge, UK)
Polyhistidin	HRP	HIS-1	Maus/ IgG2a	8,2 mg/ml	Sigma
C-term. His	HRP	GG11-8F3.5.1	Maus/ IgG1	nicht bekannt	Miltenyi Biotech (Bergisch-Gladbach)
Maus	FITC	polyklonal	Ziege/ F(ab') ₂	1,0 mg/ml	Dako (Hamburg)
Maus	Alexa Fluor 488	polyklonal	Ziege/ F(ab') ₂	2,0 mg/ml	Invitrogen
MOG	-	8-18C5	Maus/ IgG1	2,4 mg/ml	Tobias Derfuß (AG Meinl, MPI für Neurobiologie)
Isotypkontrolle	-	X40	Maus/ IgG1	50 µg/ml	Becton Dickinson

2.1.4 Patientenmaterial

Für das Projekt wurden Liquor- und zum Teil Serumproben zur Verfügung gestellt. Den Patienten wurde nach den heute allgemein anerkannten Kriterien schubförmig-remittierende Multiple Sklerose diagnostiziert [111]. Proben der Patienten HM-03, HM-63, JN-02, NS-16 und NS-52 stammten vom Institut für Klinische Neuroimmunologie am Klinikum Großhadern, München (PD Dr. Tania Kümpfel) und wurden zum Zeitpunkt der Erstdiagnose entnommen. Die Lumbalpunktion des Patienten 1039 erfolgte am *Department of Clinical Neuroscience* des *Karolinska University Hospitals*, Stockholm, Schweden (Prof. Tomas Olsson) nach zwölfmonatiger Behandlung mit Natalizumab. Liquorproben der Patienten MS-4 sowie MS-B2A wurden vom *Center of Neurologic Disease* der *Harvard Medical School*, Boston, MA, USA (Dr. Kevin O'Connor) während der Autopsie entnommen. Von einem weiteren Patienten, L-296, wurde vom Institut für Neuropathologie der Georg-August-Universität in Göttingen ein Formalin-fixiertes Gewebstück einer Hirnläsion zur Verfügung gestellt (Prof. Wolfgang Brück). Die parallele Liquorprobe stammte von einer Punktion nach Kortisontherapie. Die für das Projekt relevanten Daten der Liquordiagnostik sind in **Tabelle 2-1** zusammengefasst.

ID	Liquormenge [ml]	IgG [g/l]	IgG ^q	Zellzahl [ml]	B-Zellen [ml]	Ausgangsmaterial der Zellen
HM-03	2,330	54	4,7	11.000	530	Sediment in RLT-Puffer
HM-63	2,720	146	14,7	40.700	2.030	Sediment in RLT-Puffer
JN-02	2,830	176	13,3	18.300	920	Sediment in RLT-Puffer
NS-16	5,080	104	8,6	12.300	620	Sediment in RLT-Puffer
NS-52	1,580	57	4,9	7.000	350	Sediment in RLT-Puffer
1039	2,600	51	5,5	3.000	150	cDNA
L-296	9,830	71	8,1	1.000	50	Sediment in Trizol®-Reagent
MS-4	5,400	262	19,3	k.A.	-	-
MS-B2A	5,000	72	11,9	k.A.	-	-

Tab. 2-1: Liquordiagnostische Daten der Patienten

In Spalte 1 sind die Patienten-Identifikationen (ID) aufgelistet. Es folgen die zur Verfügung stehende Gesamtmenge an Liquor, IgG-Gehalt und IgG-Quotient IgG^q. Dieser wird berechnet aus $[\text{IgG}]_{\text{Liquor}} \times 10^3 / [\text{IgG}]_{\text{Serum}}$. Weiterhin sind die Gesamtzellzahl und die Zahl an Zellen der B-Zelllinie angegeben. Letztere wurde aus der Gesamtzellzahl berechnet, da bei der Liquordiagnostik nicht zwischen verschiedenen Zelltypen unterschieden wird. Der B-Zellanteil im Liquor beträgt maximal 5% [90]. Es ist vermerkt, ob das Zellsediment in RLT-Puffer (Qiagen) oder Trizol®-Reagent (Invitrogen) bereitgestellt wurde. Von Patient 1039 erhielt man cDNA. (k.A. keine Angabe)

In der klinischen Routine wird Liquor direkt nach der Lumbalpunktion zentrifugiert und der lösliche Proteinanteil bei -80 °C gelagert. Die sedimentierten Zellen werden in 350 µl RLT-Puffer (Qiagen, Hilden, Zusammensetzung unbekannt) oder in 500 µl Trizol®-Reagent (Invitrogen) aufgenommen und ebenso bei -80 °C aufbewahrt. Im Fall von Patient 1039 wurde nicht das Zellsediment selbst, sondern cDNA zur Verfügung gestellt [95].

2.1.5 Allgemeine Geräte

Brutschrank	Jouan EB 53	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Dampfsterilisatoren	Varioklav Typ 500	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
	Webeco Typ A5	Webeco, Selmsdorf
Geldokumentation	Gel Doc™ XR	Bio-Rad, München
	Quantity One® Basic Software	Bio-Rad
	Perfection 4990 Photo	Epson, Meerbusch
Heizblock	Thermomixer Comfort 5436	Eppendorf
Inkubationsschüttler	HT	Infors, Bottmingen, CH
	LT-V	Adolf Kühner, Birsfelden, CH
Magnet-/Heizrührer	Ikamag RCT	IKA® Werke, Staufen
Netzgeräte	EPS 500/400	Amersham Pharmacia, München
	EPS 2A200	Hofer, San Francisco, CA, USA
pH-Meter	pH521	Bruno Kummer, Freiburg
Pipetten	Pipetman® P	Gilson, Middletown, USA
	Research®	Eppendorf
Plattformschüttler	Unimax 2010 (rotierend)	Heidolph Instruments, Schwabach
	Duomax 1030 (wippend)	Heidolph Instruments
Waagen	Präzisionswaage L2200P	Sartorius, Göttingen
	Analysenwaage 2001 MP2	Sartorius
Wasserbad	MA 6	Lauda, Lauda-Königshofen
Wasseraufbereitung	Milli-Q Advantage	Millipore, Schwalbach
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, NJ, USA
UV-Transilluminator	312 nm	Bachofen Laborgeräte, Reutlingen
Zentrifugen	Tischzentrifuge 5417 C	Eppendorf
	Tischzentrifuge 5417 R	Eppendorf
	Rotanta/R	Hettich, Tuttlingen
	Heraeus® Megafuge 1.0R	Thermo Fisher Scientific
	Sorvall RC-5C PLUS	Thermo Fisher Scientific
	Ultrazentrifuge L8-15 M/E	Beckman, Palo Alto, CA, USA

Spezielle Geräte, welche nur bei einzelnen Methoden zum Einsatz kamen, sind im jeweiligen Abschnitt in Anführungszeichen angegeben.

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Herstellung von elektrisch kompetenten *E.coli* Bakterien

Für die Transformation von Bakterien durch Elektroporation wurden elektrisch kompetente Zellen hergestellt. Zu Beginn wurde vom *E.coli* Stamm „MAX Efficiency® DH5αF'IQ™“ (Invitrogen) eine Vorkultur in zweimal 10 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Mit je 6 ml Vorkultur wurden dann zwei weitere Flüssigkulturen im Halbliter-Maßstab angeimpft und kultiviert, bis eine optische Dichte von 0,5 erreicht war. Die Wachstumskurve wurde am Spectrophotometer „UV-160A“ (Shimadzu, Duisburg) bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt. Sie beruht auf der Extinktion $E = \lg(I_0/I)$ mit I_0 als einfallender und I als austretender Strahlung. Die Zellen wurden durch viermalige Zentrifugation (Rotor SLA-1500: 4.000 rpm, 5 min, 4 °C) und Resuspension der Sedimente in sterilem 10%-igem Glycerin pH 7,0 (Carl Roth, Karlsruhe) schrittweise von 1000 ml auf 2 ml Endvolumen konzentriert. Die kompetenten Zellen wurden schließlich zu je 50 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Transformationseffizienz jeder neuen Charge wurde mit 10 pg pUC DNA (Invitrogen) pro 50 µl-Aliquot wie in **Abschnitt 2.2.2** beschrieben überprüft. Diese ist definiert als die Zahl der gewachsenen Kolonien pro Mikrogramm DNA und ergab Werte zwischen 10^8 und 10^9 .

- Bakterienstamm „MAX Efficiency® DH5αF'IQ™ Competent Cells“ (Invitrogen):
Genotyp: F-φ80*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rk-, mk+) *phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1/F' proAB+ lacIqZ*ΔM15 zzf.:Tn5 [KmR]
- LB-Medium (Luria-Bertani):
1% (w/v) Bacto Trypton (Becton Dickinson), 0,5% (w/v) Hefeextrakt (Becton Dickinson), 0,5% (w/v) NaCl; autoklaviert

2.2.2 Transformation durch Elektroporation

Elektrokompetente DH5α-Bakterien aus **Abschnitt 2.2.1** wurden durch Elektroporation mit Plasmid-DNA transformiert. Dabei wird die Zellmembran durch Anlegen eines elektrischen Feldes kurzzeitig permeabilisiert und dadurch die DNA in die Zellen eingeschleust. Zu einem 50 µl-Aliquot elektrokompetente Zellen wurden 1,8 µl DNA eines Ligationsansatzes pipettiert und luftblasenfrei in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette mit 0,2 cm Elektrodenabstand (Bio-Rad) überführt. Nach dem Elektroschock am „Gene Pulser II“ (Bio-Rad) (Einstellungen am Gerät: 2,5 kV, 25 µFD, 200 Ω) wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium für 1 Stunde bei 37 °C im Schüttelinkubator regeneriert. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit Ampicillin zur Selektion positiver Klone ausplattiert und

über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Als Positivkontrolle diente pUC DNA, als Negativkontrolle geschnittener Vektor ohne zu ligierendes DNA-Fragment.

- LB-Agar (+Amp):
LB-Medium mit 1,5% (w/v) Bacto Agar (Becton Dickinson); autoklaviert;
(+ 100 µg/ml Ampicillin)

2.2.3 Transformation durch Hitzeschock

Für die TOPO-TA-Klonierung wurde der chemisch kompetente *E.coli*-Stamm „One Shot® TOP10“ eingesetzt. 2 µl DNA wurden zu einem Aliquot Bakterien pipettiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dabei heftet sich die Plasmid-DNA an die Zellmembran der Bakterien an. Die kurzfristige Permeabilisierung der Zellmembran erfolgte durch Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42 °C im Wasserbad. Nach einer zweiminütigen Inkubation auf Eis wurden die transformierten Bakterien in 250 µl vorgewärmtem S.O.C.-Medium (Invitrogen) für 60 Minuten bei 37 °C im Schüttelinkubator regeneriert. Klone wurden im Anschluss über das Ampicillin-Resistenzgen des pCR®2.1-TOPO-Vektors selektiert. Für die zusätzliche Blau-Weiß-Selektion wurde auf LB(+Amp)-Agarplatten 40 µl X-Gal-Stammlösung aufgetragen. X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl-β-D-galactopranosid) wird durch β-Galactosidase, einem Enzym codiert durch das lacZ-Gen, zu Galactose und Indoxyl umgesetzt. Indoxyl oxidiert zu einem blauen Indigo-Farbstoff, wodurch sich das Zytoplasma der Zellen blau färbt. Durch die Insertion des PCR-Produkts in den pCR®2.1-TOPO-Vektor wird das lacZ-Gen unterbrochen. Positive Kolonien erscheinen damit weiß.

- Bakterienstamm “One Shot® TOP 10“ (Invitrogen):
Genotyp: F- *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 deoR recA1 endA1 araΔ139*
Δ(*ara, leu*) 7697 *galU galK λ- rpsL(StrR) nupG*
- X-Gal-Stammlösung (40 mg/ml):
400 mg X-Gal in 10 ml Dimethylformamid (DMF); steril filtriert

2.2.4 Aufbewahrung als Glycerinkulturen

Zur langfristigen Aufbewahrung positiver Klone wurde Flüssigkultur mit sterilem Glycerin im Verhältnis 1:1 gemischt und die Bakterien bei -80 °C eingefroren.

2.3 Zellbiologische Methoden

Im vorliegenden Projekt wurde mit Zellen der HEK293E-Linie gearbeitet. Es handelt sich dabei um modifizierte humane embryonale Nierenzellen (*human embryonic kidney cells*), welche als Suspensionszellen in Serum-freiem Medium wachsen. Sie sind stabil mit einem Plasmid codierend für das nukleäre EBV-Antigen 1 (EBNA-1) transfiziert. Zum dauerhaften Erhalt in den Zellen trägt das Plasmid eine Geneticin (G-418)-Resistenz. EBNA-1 wird für die episomale Replikation von Plasmiden benötigt, welche den EBV-spezifischen Replikationsursprung „oriP“ tragen [47]. Beim hier verwendeten pTT5-Vektor ist dies der Fall. Außerdem enthält der pTT5-Vektor einen Promotor des humanen Cytomegalovirus (CMV). Dadurch werden hohe Expressionsraten gewährleistet, da auch das adenovirale Protein E1a konstitutiv exprimiert wird. Letzteres transaktiviert den CMV-Promotor [41]. Alle Schritte im Rahmen der Zellkultur wurden in der „LaminAir®“ Sterilwerkbank (Heraeus, Hanau) durchgeführt.

- Zelllinie “HEK293E Large Scale Transient Expression System“: patentiert von Yves Durocher, NRC Biotechnology Research Institute, Ottawa, Ontario, CA; zur Verfügung gestellt von Dieter Jenne (Lizenzinhaber), MPI für Neurobiologie
- pTT5-Vektor (NRC Biotechnology Research Institute): 4401 bp, Amp^R, Vektorkarte siehe **Abbildung II-2** im **Anhang Teil II**; patentiert von Yves Durocher, NRC Biotechnology Research Institute; zur Verfügung gestellt von Dieter Jenne (Lizenzinhaber), MPI für Neurobiologie

2.3.1 Einfrieren und Auftauen

Um Zellen einzufrieren wurden je 10^7 HEK293E-Suspensionszellen sedimentiert (Rotor 2704: 1.200 rpm, 5 min, 10 °C), in 1 ml vorgekühltem Einfriermedium resuspendiert und bei -80 °C eingefroren. Dimethylsulfoxid (DMSO) wirkt dabei als Gefrierschutzmittel, indem es die Ausbildung von Eiskristallen und das damit verbundene Absterben der Zellen verhindert. Aufgetaut wurden die Zellen bei 37 °C im Wasserbad. Da DMSO auch ein Zellgift ist, wurde dessen Konzentration umgehend mit 10 ml vorgewärmtem FreeStyleTM 293 Expression Medium (Invitrogen) verdünnt, die Zellen zentrifugiert (Rotor 2704: 1.200 rpm, 5 min, 10 °C) und der Überstand abgesaugt. Anschließend wurde das Sediment in Kultivierungsmedium resuspendiert und dabei eine Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt.

- Einfriermedium:
GIBCO® FreeStyleTM 293 Expression Medium mit 10% (v/v) DMSO; steril filtriert
- Kultivierungsmedium:
GIBCO® FreeStyleTM 293 Expression Medium mit 0,1% (v/v) Pluronic® F-68 (Invitrogen) und 25 µg/ml G-418 Sulfat (PAA Laboratories, Cölbe)

2.3.2 Kultivierung

HEK293E-Zellen wurden im Inkubationsschüttler „Multitron“ (Infors) bei 37 °C, 5% CO₂, 70% Luftfeuchtigkeit und 90 rpm in Erlenmeyerkolben aus Polycarbonat mit Belüftungsdeckel (Corning, Amsterdam, NL) kultiviert. Das im Kultivierungsmedium enthaltene Pluronic® F-68 wirkt schaumdämpfend und verhindert, dass Zellmembranen durch hydrodynamische Scherkräfte verletzt werden. Das Antibiotikum G-418 sorgt für den Selektionsdruck zum Erhalt des EBNA-1 codierenden Plasmids. Beim Kultivieren und Expandieren der Zellen wurde darauf geachtet, dass die Zelldichte immer mindestens $0,1 \times 10^6$ Zellen/ml und maximal 3×10^6 Zellen/ml betrug. Das Verdünnen der Zellsuspension ging mit dem Zählen von Passagen (P) einher. Zellen aus $P > 30$ sollten nach Herstellerangaben nicht mehr verwendet werden.

2.3.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl und des Anteils toter Zellen wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit Trypanblaulösung gemischt und in eine Neubauer *improved* Zählkammer überführt. Der Farbstoff Trypanblau dringt in abgestorbene Zellen mit beschädigter Zellmembran ein und färbt deren Zytoplasma blau. Farblose Zellen aus vier Großquadraten wurden unter einem Lichtmikroskop („Biomed“, Leitz, Wetzlar) gezählt, daraus der Mittelwert errechnet, mit dem Verdünnungsfaktor 2 multipliziert und um den konstanten Faktor der Zählkammer 10^4 korrigiert. Der erhaltene Wert gibt die Zellzahl pro Milliliter an.

- Trypanblaulösung (0,1%):
0,4% Trypan Blue solution 1:4 in PBS pH 7,4 (Invitrogen); steril filtriert

2.3.4 Transfektion und transiente Proteinexpression

HEK293E-Zellen wurden für die Expression rekombinanter Proteine transient mit Plasmid-DNA transfiziert [30]. Eine Stunde vor der Transfektion wurden die Zellen mit vorgewärmtem Kultivierungsmedium auf eine Zelldichte von 10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Menge an zu transfizierender Plasmid-DNA wurde durch das Volumen der Zellsuspension vorgegeben: pro Milliliter Zellen war ein Mikrogramm Plasmid-DNA nötig. Die Produktion großer Mengen rekombinanter Proteine wurde im Halbliter-Maßstab durchgeführt. Pro heterodimerem Fab-Fragment wurden demnach 500×10^6 Zellen mit 500 µg Plasmid-DNA cotransfiziert, das heißt je 250 µg Plasmid-DNA der H-Kette und 250 µg der L-Kette. Unmittelbar vor der Transfektion wurde die Plasmid-DNA mit Ethanol gefällt und steril in H₂O aufgenommen (siehe **Abschnitt 2.4.2.4**).

Als Transfektionsreagenz wurde lineares Polyethylenimin (PEI) in einer Endkonzentration von 2 µg/ml Zellsuspension verwendet [15]. PEI bindet aufgrund seiner positiven Ladung das negativ geladene Phosphat-Rückgrat der Plasmid-DNA. Diese Komplexe werden im Anschluss über Endozytose in die Zellen eingeschleust [39]. Vor der Transfektion wurde 1 ml PEI mit 4 ml OptiPro™ SFM (Invitrogen) verdünnt. Parallel dazu wurde Plasmid-DNA mit OptiPro™ SFM auf ein Endvolumen von 5 ml eingestellt. Anschließend wurde PEI zu DNA pipettiert und der Ansatz 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Laut Herstellerangaben wird die Ausbildung von PEI/DNA-Komplexen in OptiPro™ SFM erleichtert. Die Transfektion der Zellen erfolgte durch tropfweise Zugabe des PEI/DNA-Ansatzes zu den Zellen. Für eine optimale Verteilung wurde die Zellsuspension dabei von Hand leicht geschüttelt.

24 Stunden nach der Transfektion wurde 0,5% (w/v) Trypton zugesetzt. Diese tryptischen Proteinhydrolysate werden durch Proteasen in freie Aminosäuren zersetzt und können so direkt für die Proteinbiosynthese verwendet werden [46]. Zudem können sie im ersten Schritt der Reinigung leicht aus dem Zellüberstand entfernt werden [107].

Der Zellüberstand wurde 120 Stunden nach der Transfektion geerntet, indem die Zellen für 5 Minuten mit 1.500 rpm bei 4 °C (Rotor 4394) sedimentiert wurden. Die weitere Proteinreinigung ist im **Abschnitt 2.5.2.2** beschrieben.

- PEI-Stocklösung (1 mg/ml):
500 mg 25 kDa linear PEI (Polysciences Inc. Warrington, Eppelheim) in H₂O bei pH 2 gelöst, mit NaOH auf pH 7 eingestellt; mit H₂O auf 500 ml aufgefüllt; steril filtriert
- Trypton-Stammlösung (5%):
50 g Bacto TC Lactalbumin (Becton Dickinson) in 1 l H₂O; steril filtriert

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolierung von RNA

Während der RNA-Präparation wurden sämtliche Schritte in einer institutseigenen Werkbank durchgeführt, welche zur Sterilisation über Nacht mit UV-Licht bestrahlt wurde. In allen Reaktionsansätzen wurde RNase-freies ultraPURE-Wasser eingesetzt (Invitrogen).

2.4.1.1 RNA-Isolierung durch Phenolextraktion [21]

Das Zellsediment aus Liquor des Patienten L 296 lag in 500 µl Trizol®-Reagent vor. Zu den lysierten Zellen wurde 100 µl Trichlormethan gegeben, per Hand 15 Sekunden geschüttelt und das Gemisch aus wässriger und organischer Phase 2 Minuten bei RT inkubiert. Um die Phasentrennung zu beschleunigen, wurde der Ansatz für 15 Minuten mit 11.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert (5417 R). Die obere wässrige Phase mit der extrahierten RNA wurde anschließend mit 250 µl 2-Propanol präzipitiert (Inkubation 10 min RT; 5417 R: 11.000 rpm, 10 min, 4 °C), das RNA-Sediment mit 500 µl 80% Ethanol gewaschen (5417 R: 7.000 rpm, 5 min, 4 °C) und getrocknet. Dann wurde die RNA in 10 µl Wasser gelöst. Um Sekundärstrukturen zu verhindern, folgte im letzten Schritt eine zehnmünütige Inkubation bei 55 °C.

2.4.1.2 RNA-Isolierung mit „RNeasy Micro Kit“

Bei Zellsedimenten aus Liquor in RLT-Puffer wurde das Protokoll des „RNeasy Micro Kit“ (Qiagen) nach Herstellerangaben fortgesetzt. Dabei wurde die RNA auf eine Säule gebunden, gewaschen und in 14 µl H₂O eluiert. Das Zelllysate wurde mit 5 µl Träger-RNA (4 ng/µl) versetzt, da die erwartete Zellzahl weniger als 5.000 Zellen betrug (siehe **Tab. 2-1**).

2.4.1.3 RNA-Isolierung aus Formalin-fixiertem Hirngewebe

Das Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete (FFPE) Hirngewebe des Patienten L-296 mit einem Durchmesser von 1,5 mm wurde mithilfe eines Mikrotoms („Supercut 2065“, Leica Reichert-Jung, Wetzlar) in 80 10 µm dünne Schnitte geteilt. Je 20 Schnitte wurden in einem Reaktionsgefäß vereint. Für die Deparaffinisierung und RNA-Isolierung wurde das „High Pure FFPE RNA Micro Kit“ (Roche, Mannheim) nach Herstelleranweisung verwendet. Das Material wurde auf eine Säule gebunden, gewaschen und in 20 µl Endvolumen eluiert.

2.4.2 Präparation von DNA

2.4.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Um Plasmid-DNA aus *E.coli*-Kulturen im kleinen Maßstab von 1 bis 3 ml zu isolieren, wurde für einzelne Präparationen das „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (a) verwendet. Für Präparationen mit hohem Durchsatz war das „DirectPrep 96 Miniprep Kit“ (b) ideal, da dieses die parallele Aufarbeitung von 96 individuellen Bakterienklonen erlaubt. Große Plasmidmengen aus bis zu 500 ml Bakterienkultur wurden mit dem „Plasmid Maxi Kit“ (c) isoliert. In allen Fällen beruht die Aufarbeitung auf dem Prinzip der alkalischen Lyse der Bakterien. Es wurde nach Firmenprotokoll verfahren. Die Endvolumina der einzelnen Präparationen betragen 30 μ l (a), 50 μ l (b) beziehungsweise 200 bis 300 μ l (c) EB-Puffer (10 mM Tris, pH 7,5-8,5, Qiagen).

2.4.2.2 Agarosegel-Elektrophorese

Im elektrischen Feld wandert DNA aufgrund der negativ geladenen Phosphatreste zur Anode. Dies macht man sich zunutze, um DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe in einer Gelmatrix voneinander zu trennen. Die in TBE-Puffer gekochte und gelöste Agarose wurde vor dem Gießen des Gels mit Ethidiumbromid (0,5 μ g/ml Endkonzentration) versetzt, ebenso der TBE-Laufpuffer. Dieser organische Farbstoff interkaliert in die Doppelhelices der DNA und fluoresziert bei Anregung mit UV-Licht ($\lambda = 254$ bis 366 nm). Kurze DNA-Stränge wurden in einem höherprozentigen Gel aufgetrennt (bis zu 2,5%), längere Stränge in einem niederprozentigen Gel (1 bis 1,2%). Um die Größe der DNA-Fragmente zu bestimmen, wurden DNA-Längenstandards mit Abständen von 50 bp (PeqLab, Erlangen), 100 bp oder 1 kb (New England BioLabs, Frankfurt) eingesetzt. Vor dem Auftrag wurden die Proben mit der entsprechenden Menge an DNA-Probenpuffer gemischt.

Die angelegte Spannung betrug bei Gelen mit 250 ml Volumen 180 V, bei Gelen mit 35 ml Volumen 90 V. Alle verwendeten Elektrophoreseapparaturen wurden von der institutseigenen Werkstatt hergestellt.

- DNA-Probenpuffer (6x):
50% (v/v) Glycerin, 0,02% (w/v) Bromphenolblau (Serva, Heidelberg),
0,02% (w/v) Xylencyanol (Bio-Rad), 10 mM Tris, pH 7,5
- TBE-Puffer (10x):
0,89 M Tris, 0,89 M Borsäure, 0,02 M EDTA (Bio-Rad), pH 8,0
- Ethidiumbromid-Stammlösung (1 mg/ml):
1% Ethidiumbromidlösung (Carl Roth) 1:10 in H₂O

2.4.2.3 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

PCR-Produkte und DNA nach Restriktionsverdau wurden nach der Gelelektrophorese unter einem UV-Transilluminator mit einem Skalpell ausgeschnitten. Zur Extraktion aus der Gelmatrix wurde entweder das „Easypure® DNA Purification Kit“ von Biozym (10 µl Elutionsvolumen) oder das „QIAquick Gel Extraction Kit“ von Qiagen (30 µl Elutionsvolumen) nach Herstellerangaben angewendet.

2.4.2.4 Fällung von DNA

Bei kleinen DNA-Mengen wurde zur Fällung „Pellet Paint® Co-Precipitant“ (Novagen) nach Herstellerangaben eingesetzt. Es bietet den Vorteil der Visualisierung des Sediments durch Copräzipitation mit einem roten Farbstoff.

Bei genügend großen DNA-Mengen wurde eine Ethanolpräzipitation durchgeführt. Zunächst wurde die DNA mit 1/10 Volumen an 3 M Natriumacetat gemischt und im Anschluss durch Zugabe des 2,5-fachen Volumens an 100%-igem Ethanol und einer 30-minütigen Inkubation bei -80 °C gefällt. Nach Zentrifugation (5417 R: 14.000 rpm, 30 min, 4 °C) wurde der Überstand unter der Sterilwerkbank entfernt, das Sediment dort für 5 Minuten getrocknet und die DNA schließlich im gewünschten Volumen „ultraPURE“-Wasser in Lösung gebracht. Sterile DNA wurde im Anschluss in HEK293E-Zellen transfiziert.

2.4.2.5 Anwendung weiterer Reagenzienpakete zur DNA-Präparation

Für das Umpuffern zwischen verschiedenen Restriktionsverdaus stand als Alternative zur Fällung das „MinElute PCR Purification Kit“ von Qiagen zur Verfügung. Dabei wurden die DNA-Fragmente nach Herstellerangaben auf eine Säule gebunden, gewaschen und letztlich in 10 µl Endvolumen eluiert.

Falls bei einem Restriktionsverdau lediglich Überhangnukleotide entfernt werden mussten, konnten diese mithilfe des „QiaQuick Nucleotide Removal Kit“ von Qiagen über eine Säule vom größeren Fragment abgetrennt werden. Das gereinigte DNA-Fragment lag nach der Elution von der Säule letztlich in einem Endvolumen von 30 µl vor.

2.4.2.6 DNA-Konzentrationsbestimmung

In den meisten Fällen wurde die Konzentration von DNA photometrisch bestimmt. Das Messprinzip beruht auf deren Absorptionsmaximum bei 260 nm. Als Messgeräte standen die Photometer „GeneQuant II“ (Pharmacia Biotech) und „NanoDrop 1000“ (PiqLab) zur Verfügung.

Die photometrische Messung bei $\lambda = 260$ nm ist ungenau, wenn die Probe Verunreinigungen beispielsweise nach Anwendung des „Easypure® DNA Purification Kit“ enthält. Eine Alternative bot die Abschätzung der DNA-Menge über Ethidiumbromidfärbung. Die DNA-Probe und ein parallel aufgetragener DNA-Mengenstandard wurden über ein Agarosegel mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid getrennt. Unter dem UV-Leuchtschirm wurde dann die Probe mit bekannten DNA-Mengen verglichen und anhand des Färbegrads die Menge abgeschätzt.

2.4.3 Enzymatische Behandlung von DNA

2.4.3.1 Reverse Transkription

Um DNA vervielfältigen zu können, muss einzelsträngige RNA zunächst von einer Reversen Transkriptase in eine komplementäre einzelsträngige DNA-Sequenz (cDNA) übersetzt werden. Die hier verwendeten *Random Hexamer* Primer, ein Gemisch aus kurzen Nukleotiden unterschiedlicher Sequenz, hybridisieren mit jeder beliebigen Stelle der RNA, was zu einer Transkription der Gesamtheit aller RNA-Moleküle führt. Vorversuche in der Diplomarbeit zeigten, dass beim alleinigen Einsatz von *Random Hexamer* Primern die H-Ketten gegenüber den L-Ketten weniger effizient umgeschrieben werden. Deshalb wurde der Reaktionsansatz um einen Primer spezifisch für die H-Kette („HG-RT 1“) ergänzt. Außerdem wurden zwei verschiedene RNase-Inhibitoren eingesetzt. Als Matrize wurde das gesamte Eluat von 10 µl aus der RNA-Isolierung eingesetzt. Die Reaktion wurde für 90 Minuten im „T personal Thermocycler“ (Biometra, Göttingen) bei 37 °C durchgeführt.

- Reaktionsansatz (ad 20 µl):
0,5% (v/v) IGEPAL CA-630, 250 µM dNTP (10 mM) (GE Healthcare, Freiburg), 10 mM DTT (100 mM) (Invitrogen), 12 u RNasin®Plus RNase Inhibitor (40 u/µl) (Promega, Mannheim), 6,6 u Prime RNase Inhibitor (30 u/µl) (Eppendorf), 150 ng Random Hexamers (3 µg/µl), 0,25 µM HG-RT1 (100 µM), 1x First Strand Buffer (5x) (Invitrogen), 50 u SuperScript™III RT (200 u/µl) (Invitrogen)

2.4.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein Verfahren zur Amplifikation von DNA. Oligonukleotide flankieren eine bestimmte DNA-Sequenz (*forward* und *reverse* Primer), welche in mehreren Zyklen aus Hybridisierung, Amplifikation und Denaturierung vervielfältigt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Variationen der PCR-Technik angewendet, die im Folgenden näher erläutert werden. Bei allen Ansätzen wurde eine Negativkontrolle mit durchgeführt, bei der die DNA-Matrize durch H₂O ersetzt wurde. Die

Reaktionen wurden im „GeneAmp PCR System 9600 Thermocycler“ (Perkin Elmer, Wellesley, USA) oder im „T personal Thermocycler“ durchgeführt. Überprüft wurden die Ergebnisse über Agarosegel-Elektrophorese.

2.4.3.2.1 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR diente dazu, den Erfolg der Ligation eines DNA-Fragments in einen Vektor zu überprüfen. Einzelne Bakterienklone wurden mit einer Pipettenspitze von einer LB-Agarplatte gepickt und in den vorgelegten PCR-Reaktionsansatz überführt. Die Primerpaare flankierten das eingefügte DNA-Fragment im Vektor: „M13 Forward (-20)“ und „M13 Reverse“ beim pCR®2.1-TOPO-Vektor und „pTT5-for seq“ und „pTT5-rev seq“ beim pTT5-Vektor. Der PCR-Reaktionsansatz und das PCR-Programm setzten sich wie folgt zusammen:

- PCR-Reaktionsansatz (ad 20 µl):
1x PCR-Puffer (10x) (Roche), 200 µM dNTP (10 mM), 0,5 µM *forward* Primer (100 µM), 0,5 µM *reverse* Primer (100 µM), 1 u Taq-Polymerase (5 u/µl) (Roche)
- PCR-Programm:

3 Minuten	94 °C	Denaturierung	}	25 Zyklen
1 Minute	94 °C	Denaturierung		
1 Minute	53 °C	Hybridisierung		
1 Minute	72 °C	Elongation		
10 Minuten	72 °C	Elongation		

2.4.3.2.2 Nested PCR

Um Ig-V(D)J-Transkriptdatenbanken aus Liquor-B-Zellen zu erstellen, wurde eine *Nested* PCR (verschachtelte PCR) durchgeführt. Durch die höhere Spezifität wird die Vervielfältigung nicht gewünschter DNA-Sequenzen weitgehend ausgeschlossen.



Abb. 2-1: Prinzip der *Nested* PCR

Die *Nested* PCR diente der Erstellung von Ig-V(D)J-Transkriptdatenbanken aus Liquor-B-Zellen. In einer ersten PCR-Reaktion wurde mit *out* Primern eine Voramplifizierung durchgeführt. Die Primer der zweiten PCR-Reaktion hybridisierten weiter innen auf dem in der ersten Runde generierten Amplikon (*in*). Die *forward* (for) Primer lagen am variablen 5'-Ende. Aus diesem Grund wurden parallel mehrere Primer eingesetzt. Im Fall der *reverse* (rev) Primer war je H-, κ- und λ-Kette ein Primer ausreichend, da diese in der konstanten Region lagen.

Die *reverse* Primer hybridisierten im C-Teil der Ig-Ketten, sodass pro Reaktion für H-, κ- und λ-Kette jeweils ein einziger Primer ausreichend war. Im Gegensatz dazu mussten die *forward* Primer die Amplifikation möglichst vieler verschiedener Ketten erlauben, da diese in der

Leader-Sequenz und am 5'-Ende der zahlreichen V-Regionen hybridisierten [156]. Deshalb wurden Mischungen aus mehreren Oligonukleotiden oder degenerierte Primer eingesetzt. Der Reaktionsansatz entsprach dem der Kolonie-PCR, wobei als DNA-Matrize für die erste PCR (*out*) 3 µl cDNA und für die zweite PCR (*in*) 2 µl des resultierenden PCR-Produkts eingesetzt wurden. Das PCR-Programm wurde wie im Folgenden angegeben angepasst.

• PCR-Programm:	3 Minuten	94 °C	Denaturierung	} 50 Zyklen
	30 Sekunden	94 °C	Denaturierung	
	30 Sekunden	55 °C	Hybridisierung	
	55 Sekunden (<i>out</i>)			
	45 Sekunden (<i>in</i>)	72 °C	Elongation	
	10 Minuten	72 °C	Elongation	

2.4.3.2.3 Semi-Nested PCR

Für die Amplifikation von Ig-Ketten aus Hirngewebe wurde eine *Semi-Nested* PCR durchgeführt. Beim Ausgangsmaterial handelte es sich um FFPE-Gewebe einer Hirnläsion von Patient L-296. Dadurch musste mit einer unzureichenden RNA-Qualität gerechnet werden, die es nicht erlaubte, die gesamte Länge der gewünschten Ig-V(D)J-Sequenzen zu amplifizieren. Die eingesetzten Primer mussten deshalb folgende Voraussetzungen erfüllen: 1) kurzes Amplikon (50 bis 100 bp), 2) charakteristisches Amplikon (SHM oder CDR3-Region) 3) Primer mit mutiertem Nukleotid am 3'-OH-Ende. Zudem wurde versucht, für jede Kette zwei charakteristische DNA-Sequenzen in zwei unabhängigen PCR-Reaktionen zu amplifizieren.



Abb. 2-2: Prinzip der *Semi-Nested* PCR

Wie auch bei der *Nested* PCR wurden zwei PCR-Reaktionen durchgeführt, jedoch zweimal mit dem gleichen *forward* (for) Primer. Beim *reverse* (rev) Primer wurde zwischen *out* und *in* unterschieden. Es wurden Klon-spezifische Primer mit einem somatisch hypermutierten Nukleotid am 3'OH-Ende erstellt. Sie erlaubten die Amplifikation einer kurzen charakteristischen Sequenz (SHM und CDR3 in rot) der Ig-V(D)J-Region (grün).

Der Reaktionsansatz entsprach dem der *Nested* PCR. Die Elongationszeit wurde aufgrund der kürzeren Amplikons auf 30 Sekunden reduziert. Für die erste PCR wurde eine weniger stringente Hybridisierungstemperatur gewählt (53 °C) als in der zweiten PCR (55 °C). Damit sollte zunächst die Chance auf Amplifikation erhöht werden, um dann in der zweiten Runde eine genügend hohe Spezifität zu gewährleisten.

• PCR-Programm:	3 Minuten	94 °C	Denaturierung	} 40 Zyklen
	30 Sekunden	94 °C	Denaturierung	
	30 Sekunden	53 bzw. 55 °C	Hybridisierung	
	30 Sekunden	72 °C	Elongation	
	10 Minuten	72 °C	Elongation	

2.4.3.2.4 Mutagenese-PCR

Um DNA-Fragmente in Vektoren klonieren zu können, werden kompatible Nukleotidsequenzen benötigt, die von Restriktionsendonukleasen erkannt und geschnitten werden. Diese können gezielt durch Mutagenese-PCR eingeführt werden ohne dabei die resultierende Aminosäuresequenz zu verändern (stille Mutagenese).

Die Mutagenese-PCR wurde bei der Konstruktion von pTT5-Vektorkonstrukten eingesetzt. In **Abbildung 2-3** ist die Klonierungsstrategie dargestellt. Zunächst wurde die *Leader*-Sequenz der L-Kette (V κ I-O12) sowie die Sequenzen der C-Region für die H-Kette (C_{H1}-Domäne) und L-Kette (IgKC) aus cDNA amplifiziert. Für die *Leader*-Sequenz der κ -Kette wurde das Primerpaar „KappaLead1 EcoRI for“/“KappaLead1 HindBss rev“ verwendet, für die C-Region der κ -Kette das Primerpaar “CKappa HindKas for“/“CKappa BamHI rev” und für die C_{H1}-Domäne der H-Kette das Primerpaar „CHeavy Hind Sal for“/“Hinge His Bam rev“. Bei letzterem wurde gleichzeitig die Sequenz codierend für das C-terminale His₍₆₎-Peptid eingeführt (CACCATCACCATCACCAT). Die *Leader*-Sequenz der H-Kette (VH4-04) wurde von der Firma Metabion synthetisiert (“Heavy-Lead4 Link for”/“Heavy-Lead4 Link rev”). Beide *Leader*-Sequenzen enthielten direkt vor dem Startcodon die Kozak-Sequenz CACC, welche eine wichtige Rolle in der Initiation des Translationsprozesses spielt. Als Matrize für die Mutagenese-PCR der V(D)J-Sequenzen fungierten die jeweiligen pCR®2.1-TOPO-Vektorkonstrukte, welche bei der Erstellung der Ig-V(D)J-Transkriptdatenbanken generiert wurden (siehe **Abschnitt 2.4.3.3**). Für alle H-Ketten wurde der *reverse* Primer “CHeavy SalI rev” eingesetzt, um die *SalI*-Schnittstelle einzuführen. Die Sequenzen der *forward* Primer mussten an die verschiedenen VH-Subfamilien angepasst werden. Im Fall von Fab-1039-s1 und Fab-NS52 wurden demnach “VHeavy4-39 SacII for” und für Fab-HM63-s2, -s8 und -s9 “VHeavy3-07 SacII for“ verwendet, wodurch die *SacII*-Schnittstelle eingeführt wurde. Die Sequenzen der L-Ketten wurden mithilfe des *reverse* Primers “Kappa-V,C KasI rev” mit der *KasI*-Schnittstelle versehen, ausgenommen Fab-HM63-s2. Hierfür wurde “Lambda V,C KasI rev“ eingesetzt. Unter Berücksichtigung der verschiedenen VL-Subfamilien wurde die Sequenz von Fab-1039-s1 mit „Kappa-VK2 BssHII for“, Fab-HM63-s8 und Fab-NS52 mit “Kappa-VK1 BssHII for“, Fab-HM63-s9 mit “Kappa-VK3L2 BssH for” und Fab-HM63-s2 mit “Lambda-VL3 BssH for” mit einer *BssHII*-Schnittstelle mutagenisiert.

Alle PCR-Komponenten wurden in den gleichen Konzentrationen eingesetzt wie bereits bei allen bislang beschriebenen PCR-Techniken. Allerdings wurde das Endvolumen auf 50 µl erhöht, um eine ausreichende Menge für die nachfolgenden Klonierungsschritte zu erhalten. Das PCR-Programm entsprach dem der *Semi-Nested* PCR, jedoch wurde bei jeder Reaktion die Temperatur des Hybridisierungsschritts an die verwendeten Primer angepasst. Diese errechnete sich aus der Sequenz der einzelnen Primerpaare (2 °C für A/T, 4 °C für G/C) abzüglich 5 °C ausgehend von der niedrigeren Schmelztemperatur.

2.4.3.3 TOPO-TA-Klonierung

Für die Erstellung der Ig-V(D)J-Transkriptdatenbanken aus Liquor-B-Zellen wurde das „TOPO-TA Cloning® Kit“ der Firma Invitrogen verwendet. Das Prinzip dieser Klonierungsmethode beruht auf der Beobachtung, dass die Taq-Polymerase eine Transferase-Aktivität besitzt, mit der sie am 3'-Ende von PCR-Produkten ein einzelnes Desoxyadenosin anhängt. Der linearisierte pCR®2.1-TOPO®-Vektor besitzt entsprechende 3'-Desoxythymidin-Überhänge. Die Ligation von PCR-Produkt mit Vektor erfolgte durch fünfminütige Inkubation bei RT. Dabei wurde nach Herstellerangaben verfahren. Die anschließende Transformation in „One Shot® TOP10“ *E.coli* Bakterien durch Hitzeschock ist im **Abschnitt 2.2.3** beschrieben.

- pCR®2.1-TOPO®-Vektor (Invitrogen):
3908 bp, Amp^R, Kan^R Vektorkarte siehe **Abbildung II-1** im **Anhang Teil II**

2.4.3.4 Spaltung mit Restriktionsenzymen

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, welche spezifisch Sequenzen in doppelsträngiger DNA erkennen und dort die Phosphodiesterbrücke spalten. Im Fall von kompatiblen 5'- oder 3'-Überhängen können DNA-Fragmente im Anschluss gerichtet ligiert werden.

Eine Einheit (u) eines Restriktionsenzymen ist definiert als diejenige Menge, die benötigt wird, um unter Berücksichtigung optimaler Puffer- und Temperaturbedingungen ein Mikrogramm eines bestimmten DNA-Substrats, üblicherweise λ-DNA mit 48,5 kb, innerhalb einer Stunde vollständig zu verdauen. Die hier eingesetzte Enzymmenge musste entsprechend an Größe, Menge und Anzahl der Schnittstellen in der eigenen DNA-Matrize angepasst werden. Alle Restriktionsverdau wurden in einem Endvolumen von 25 bis 50 µl angesetzt und, falls der Reaktionspuffer kompatibel war, ein gleichzeitiger Verdau mit zwei Restriktionsenzymen durchgeführt. Da die Enzyme in 50% Glycerin gelagert werden, war insbesondere bei Doppelverdau darauf zu achten, dass die Glycerin-Endkonzentration im Ansatz 5% nicht überschritt. Alle Restriktionsenzyme stammten von der Firma New England BioLabs.

Die Klonierungsstrategie zur Erstellung der pTT5-Vektorkonstrukte ist in **Abbildung 2-3** veranschaulicht.

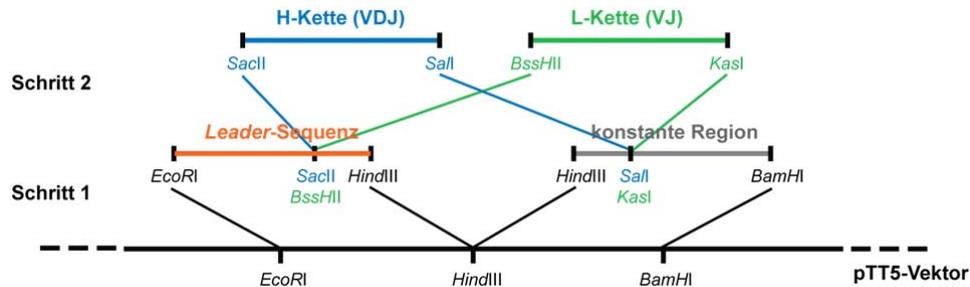


Abb. 2-3: Klonierungsstrategie

Im ersten Schritt wurden zwei Kassettenvektoren erstellt, welche die *Leader*-Sequenzen (orange) und die konstanten Regionen (grau) der H- beziehungsweise L-Kette enthielten. Die *Leader*-Sequenzen wurden über die *EcoRI*- und *HindIII*-Schnittstelle in das Rückgrat des pTT5-Vektors (schwarz) eingefügt, die konstanten Regionen über die *HindIII*- und *BamHI*-Erkennungssequenzen. In diese beiden Kassettenvektoren konnten im zweiten Schritt die einzelnen VDJ-Sequenzen der H-Kette (blau) beziehungsweise VJ-Sequenzen der L-Kette (grün) kloniert werden. Im Fall der H-Ketten geschah dies mithilfe der Restriktionsenzyme *SacII* und *SalI*, für die L-Ketten mit *BssHIII* und *KasI*. Die flankierenden Schnittstellen wurden im Vorfeld über Mutagenese-PCR eingeführt.

Zunächst wurden die *Leader*-Sequenzen VH4-04 der H-Kette und VκI-O12 der L-Kette über die *EcoRI*- und *HindIII*-Schnittstellen in den pTT5-Vektor kloniert. Dann wurde das Konstrukt aus pTT5-Vektor und *Leader*-Sequenz um die C-Regionen ergänzt. Dies war möglich über die *HindIII*- und *BamHI*-Erkennungssequenzen. Die C_{H1}-Domäne der H-Ketten war um die Sequenz codierend für das carboxyterminale His₍₆₎-Peptid verlängert. Damit waren die Kassettenvektoren „pTT5-H“ und „pTT5-L“ fertiggestellt (Vektorkarten siehe **Abb. II-3 im Anhang Teil II**).

Es folgte die Klonierung der V(D)J-Fragmente. Mithilfe der Mutagenese PCR waren bereits direkt 5' vor der *HindIII*-Schnittstelle der *Leader*-Sequenzen für die H-Kette eine *SacII*- und für die L-Kette eine *BssHIII*-Erkennungssequenz eingeführt worden. Die Sequenzen der C-Regionen wurden durch stille Mutagenese direkt 3' nach der *HindIII*-Schnittstelle mit einer *SalI*-Schnittstelle für die H-Kette und mit einer *KasI*-Erkennungssequenz für die L-Kette versehen. Diese Schnittstellen wurden nun im zweiten Schritt für die Klonierung der verschiedenen V(D)J-Sequenzen verwendet. Denn diese waren ihrerseits von *SacII*-/*SalI*- im Fall der H-Kette und von *BssHIII*-/*KasI*-Erkennungssequenzen im Fall der L-Ketten flankiert und konnten so in die entsprechenden Kassettenvektoren eingefügt werden (Vektorkarten am Beispiel von Fab-1039-s1 siehe **Abb. II-4 im Anhang Teil II**).

2.4.3.5 Ligation

Nach Restriktionsverdau wurden DNA-Fragment und Vektor ligiert. Das Enzym T4 DNA Ligase (Invitrogen) katalysiert dabei die Reaktion aus einem freien 3'-Hydroxylende mit einem freien 5'-Phosphatrest zu einer Phosphodiester-Brücke. Diese Reaktion benötigt ATP, welches im Ligase-Puffer (Invitrogen) mit einer Endkonzentration von 1 mM enthalten ist. Um die Eigenligation des Vektors und damit die Bildung von Konkatermen weitgehend zu vermeiden, wurde das DNA-Fragment im vierfachen molaren Überschuss zugegeben.

Jeder Ligationsansatz mit einem Endvolumen von 20 µl enthielt 1 u T4 DNA Ligase, 100 ng Vektor und die entsprechende molare Menge DNA-Fragment in 1x T4 Ligase-Puffer. Parallel dazu wurde mit einer Negativkontrolle ohne DNA-Fragment die Eigenligation des Vektors überprüft. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 16 °C. 1,8 µl des Ligationsansatzes wurden anschließend in elektrokompente DH5α-Bakterien transformiert (siehe **Abschnitt 2.2.2**).

2.4.3.6 Gensynthese

Die V(D)J-Sequenzen des Antikörpers „8-18C5“ [22, 76, 78] wurden von der Firma GeneArt (Regensburg) synthetisiert.

2.4.3.7 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden von den Serviceeinrichtungen des MPI für Biochemie (Martinsried) und des Biozentrums der LMU (München) durchgeführt.

2.4.4 Auswertung von DNA-Sequenzen

Mit dem Programm „Chromas“ Version 1.45 wurde das Chromatogramm der Sequenzierung angezeigt (Urheber: *Griffith University Australia*). Die detaillierte Auswertung der DNA-Sequenzen von Ig-Ketten erfolgte mit „IMGT/V-Quest“ Version 3.2.14 unter „http://imgt.cines.fr/IMGT_vquest/vquest?livret=0&Option=humanIg“ (Urheber: *International ImMunoGeneTics Information System*) [17]. Mit dem „Translate Tool“ auf „<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>“ (Urheber: *Swiss Institute of Bioinformatics*) wurden DNA- in Aminosäuresequenzen übersetzt. Informationen über Keimbahnsequenzen waren über „<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk>“ erhältlich (Urheber: *MRC Centre for Protein Engineering*). Damit wurden alle Nukleotidaustausche infolge von SHM identifiziert.

2.5 Proteinanalytik

2.5.1 Proteinbestimmung

2.5.1.1 Bicinchoninsäure-Test (BCA-Test) [134]

Der BCA-Test basiert auf der sogenannten Biuret-Reaktion, bei der Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert wird. Die Peptidbindung selbst, sowie die Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Cystein spielen dabei die Rolle des reduzierenden Agens. Bicinchoninsäure bildet mit Cu^+ -Ionen im alkalischen Milieu einen violetten Farbkomplex, welcher kolorimetrisch bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen werden kann.

Der BCA-Test wurde mit dem „Pierce® BCA Protein Assay Kit“ (Thermo Fisher Scientific) im Mikrotiterplattenformat nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Vergleichsprotein diente eine Verdünnungsreihe bekannter Konzentrationen von Rinderserumalbumin (BSA). Die resultierende BSA-Standardkurve wurde dazu verwendet, die Proteinkonzentration der Proben in Duplikaten zu bestimmen. Als Blindprobe wurde der Probenpuffer PBS eingesetzt. Die Messung der Absorption bei 550 nm erfolgte am Photometer „Dynatech MR 4000“ (Dynatech, Denkendorf).

- PBS (10x):
18,8 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 83,8 mM Na_2HPO_4 , 1,5 M NaCl

2.5.1.2 Photometrische Messung

Zur Konzentrationsbestimmung eines gereinigten Proteins bietet sich die photometrische Messung an. Üblicherweise wird die Absorption bei $\lambda = 280$ nm gemessen, zu der hauptsächlich die aromatische Aminosäure Tryptophan und zu einem geringeren Anteil auch Tyrosin und Phenylalanin beitragen. Für die exakte Konzentrationsbestimmung müssen das Molekulargewicht sowie der molare Extinktionskoeffizient eines Proteins einbezogen werden, da der Anteil der absorbierenden Aminosäuren stark schwanken kann. Dieser lässt sich aus der Aminosäuresequenz berechnen [38] und wurde mithilfe des „ProtParam Tools“ auf „<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>“ des „ExPASy Proteomics Servers“ bestimmt (Urheber: *Swiss Institute of Bioinformatics*). Die Messung der Absorption bei 280 nm wurde am Spektrophotometer „NanoDrop 1000“ durchgeführt.

2.5.2 Proteinreinigung

2.5.2.1 Protein G-Affinitätschromatographie

Zur Reinigung von IgG-Antikörpern aus Liquor- und Serumproben von MS-Patienten wurde die Protein G-Affinitätschromatographie mit Dynabeads® Protein G (Invitrogen) angewendet. Rekombinantes Protein G, welches an einer Matrix immobilisiert ist, bindet den Fc-Teil von IgG-Antikörpern. Alle anderen Proteine im Liquor binden nicht und befinden sich im Überstand.

Vor der Verwendung wurden die Dynabeads® Protein G dreimal in Waschpuffer gereinigt. Da das Protein G irreversibel an magnetische Kügelchen gekoppelt ist, kann der Überstand bequem abgenommen werden, indem das Reaktionsgefäß an einen Dynal® Magneten (Invitrogen) gehalten wird. Je Mikrogramm IgG wurden 2 µl Dynabeads® Protein G-Suspension eingesetzt und der Ansatz für 60 Minuten bei RT geschüttelt. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Dynabeads® Protein G wurden dreimal gewaschen.

Die Elution der IgG-Antikörper aus Liquor und Serum der Patienten HM-03, JN-02, NS-16 und NS-52 erfolgte in zweimal 50 µl Harnstoff-haltigem Puffer, welcher dem Probenpuffer der IEF entspricht. Die Eluate mit einem Endvolumen von je 100 µl wurden demnach direkt im Anschluss in die IEF eingesetzt (siehe **Abschnitt 2.5.3.2**).

Zur Elution von IgG-Antikörpern der Patienten HM-63, 1039, MS-B2A, MS-4 und L-296 wurden die Dynabeads® Protein G in 10 µl 1% (w/v) SDS (Carl Roth) resuspendiert, kurz gevortext und anschließend für 2 Minuten bei 37 °C inkubiert. Das Eluat wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Elutionsschritt wiederholt. SDS bewirkt die Auffaltung der Proteine, wodurch die Bindung zwischen Adsorbent und Ligand aufgelöst wird.

- Dynabeads®-Waschpuffer:
0,1 M Na-Acetat, 150 mM NaCl, pH 5,0
- IEF-Probenpuffer:
6 M Urea, 2 M Thiourea, 4% (w/v) CHAPS, 40 mM Tris

2.5.2.2 Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Rekombinant exprimierte Proteine wurden mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aus dem Überstand von HEK293E-Zellen gereinigt. Der Komplex aus Nitriloessigsäure (NTA) mit Ni²⁺-Ionen gekoppelt an eine Agarose-Matrix bildet die stationäre Phase. Proteine mit einem His₍₆₎-Peptid in der mobilen Phase binden mit hoher Affinität an die Ni-NTA-Matrix, da Histidin über einen Imidazol-Ring verfügt. Die Elution erfolgt mit einem Überschuss an Imidazol, wodurch Proteine mit His₍₆₎-Peptid von der Matrix verdrängt werden.

Die Reinigung wurde im Säulenverfahren durchgeführt (1,5 x 10 cm Luer-Lock-Säulen mit Durchflussadapter von Sigma). 5 ml Bettvolumen der Ni-NTA-Agarose (Qiagen) wurden zunächst mit 10 Säulenvolumen H₂O gewaschen, um das Ethanol im Ausgangsmaterial restlos zu entfernen. Anschließend wurde die Säulenmatrix mit PBS/10 mM Imidazol, pH 8,0 äquilibriert. Der Zellüberstand wurde nach der Sedimentation der Zellen von Zelltrümmern befreit (Rotor SLA-1500: 12.500 rpm, 30 min, 4 °C). Daran schloss sich ein weiterer Zentrifugationsschritt in der Ultrazentrifuge (UZ) an, um auch unlösliche Membranbestandteile abzutrennen (Rotor Typ 60 Ti: 40.000 rpm, 45 min, 4 °C). Der gereinigte Überstand wurde mit 1 M Tris pH 8,6 auf einen pH-Wert von 7,5 justiert und mit 100 µM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), einem Proteaseinhibitor, versetzt. Außerdem wurde eine Endkonzentration von 1x PBS für die nötige Ionenstärke und 10 mM Imidazol eingestellt. Die geringe Konzentration an Imidazol im Äquilibrierungspuffer der Säule und im Zellüberstand sollte unspezifische Bindungen reduzieren. 500 ml Zellüberstand wurden mit einer Flussrate von 1,5 ml pro Minute auf die Säule geladen. Dann wurde mit 50 ml PBS/20 mM Imidazol, pH 8,0 gewaschen. Die Elution der His₍₆₎-Proteine erfolgte mit PBS/200 mM Imidazol, pH 8,0 an der nachfolgend beschriebenen FPLC-Apparatur. Alle Puffer wurden mit einem 0,2 µm Filter (Millipore) filtriert, um Kleinstpartikel zu entfernen.

2.5.2.3 *Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)*

Die Elution der über Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigten Proteine wurde an einem FPLC-System von Amersham Pharmacia Biotech durchgeführt. Da an der Apparatur ein UV-Detektor („Uvicord SD“) angeschlossen ist, kann die Elution durch Messung bei $\lambda = 277$ nm basierend auf der Absorption der aromatischen Aminosäuren verfolgt werden. Das FPLC-System besteht aus zwei Pumpen. Eine davon wird mit PBS, die andere mit PBS/200 mM Imidazol versorgt. Dem System wird über eine Kontrolleinheit („LCC-501 Plus“) vorgegeben, zu welchen Anteilen die Puffer gemischt werden sollen. Zunächst wurde an der FPLC-Apparatur der Waschschrift mit PBS/20 mM Imidazol solange fortgesetzt, bis keine unspezifisch gebundenen Proteine mehr von der Säule eluierten. Dann wurde die Imidazolkonzentration auf 200 mM erhöht. Nach 6 ml Ausschlussvolumen stieg die Absorption am UV-Detektor an und das Eluat wurde gesammelt. Es folgten Konzentrierung, Dialyse gegen PBS und Proteinbestimmung. Die Lagerung erfolgte in PBS, 0,07% Natriumazid und 100 µM PMSF bei 4 °C.

2.5.2.4 Dialyse

Müssen Pufferbestandteile aus der Probe entfernt werden oder gänzlich umgepuffert werden, so wird die Probe dialysiert. Gemäß des Konzentrationsunterschiedes diffundieren kleine Moleküle durch eine Dialysemembran, während große Moleküle an der Membran mit entsprechender Molekulargewichtsausschlussgröße (MWCO) zurückgehalten werden.

Für kleine Volumina von maximal 200 µl wurden „D-tube™ Dialyzer Mini“-Gefäße verwendet, für Volumina bis zu 3 ml „D-Tube™ Dialyzer Maxi“-Gefäße (Novagen, Darmstadt), beide mit MWCO von 12 bis 14 kDa. Dialysen gegen 6 M Urea wurden bei RT, Dialysen gegen PBS im Kühlraum unter Rühren durchgeführt.

Um im Fall der IgG-Antikörper aus Liquor vor der IEF das negativ geladene SDS aus dem Deglykosylierungspuffer restlos zu entfernen, wurde ein Dialyseschritt durchgeführt, der durch Elektrophorese getrieben wird. Die „D-tube™ Dialyzer Mini“-Gefäße wurden nach Herstellerangaben in eine Trägerkammer eingespannt und in einer horizontalen Elektrophoresekammer platziert. Die Kammer wurde mit 6 M Urea gefüllt. Durch Anlegen einer Spannung von 50 V für 15 Minuten kam es zur gerichteten Wanderung der negativ geladenen SDS-Moleküle in den Puffer, wohingegen die Proteine an der Membran zurückgehalten wurden.

2.5.2.5 Konzentrierung durch Ultrafiltration

Um Proteine in ihrer nativen Form zu konzentrieren, wurden spezielle Zentrifugationsröhrchen der Firma Millipore verwendet („Amicon®“). Zur Konzentrierung gereinigter Fab-Fragmente (50 kDa) wurden Membranen mit einem Ausschluss von 30 kDa gewählt. Für Proben mit einem Ausgangsvolumen von 0,5 bis 1 ml waren „Amicon® Ultra-0.5“ ideal, welche in einer Tischzentrifuge mit 6.000 rpm zentrifugiert wurden, bis das gewünschte Endvolumen von 15 bis 30 µl erreicht war. Bei größeren Ausgangsvolumina wurden „Amicon® Ultra-4“ verwendet, welche ein Fassungsvermögen von 4 ml haben. In diesem Fall wurde in der Heraeus® Megafuge 1.0R mit 4.000 rpm (Rotor 2704) zentrifugiert.

2.5.2.6 Fällung mit Aceton

Die Fällung von Proteinen kann zur Reinigung und zur Konzentrierung von Proben genutzt werden. Zur Probe wurde das zehnfache Volumen eiskaltes Aceton (100%) gegeben und für 10 Sekunden gemischt. Die Fällung erfolgte entweder über Nacht bei -20 °C oder für mindestens 1 Stunde bei -80 °C. Die gefällten Proteine wurden sedimentiert (5417 R: 14.000 rpm, 45 min, 4 °C) und mit eiskaltem Aceton (80%) gewaschen. Nach einem zweiten

Zentrifugationsschritt (5417 R: 14.000 rpm, 30 min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Sediment bei RT getrocknet, bis das Aceton vollständig verdampft war.

2.5.2.7 Aufschluss eukaryotischer Zellen

Zur Reinigung intrazellulärer Proteine unter nativen Bedingungen wurde ein Sediment von Jurkatzellen mit 5 g Nassgewicht zur Verfügung gestellt (Martina Sölch, AG Dornmair). Zunächst wurden die Zellen lysiert, indem sie in 50 ml destilliertem Wasser resuspendiert wurden. In dieser hypotonischen Umgebung kommt es zu einem starken Anschwellen der Zellen durch den osmotischen Einstrom von Wasser, wodurch die Zellen letztlich platzen. Um die Denaturierung von Proteinen durch die reduzierte Ionenstärke zu verhindern, wurde das Zelllysate unmittelbar auf 50 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 7,5 eingestellt. Der Zellaufschluss wurde durch 15-minütiges Beschallen mit dem „Sonifier 450“ (Branson, Genf, CH) auf Eiswasser unter Rühren unterstützt. Das Lysat wurde von Zelltrümmern und weiteren unlöslichen Bestandteilen getrennt (Rotor SS-34: 17.500 rpm, 30 min, 4 °C; Rotor Typ 60 Ti: 40.000 rpm, 45 min, 4 °C). Proteine im Überstand dienen als mobile Phase in der Affinitätschromatographie (siehe **Abschnitt 2.6.2**).

Um intrazelluläre Proteine unter denaturierenden Bedingungen zu reinigen, wurde ein Sediment der Zelllinie „Fe-EBV“ mit 700 mg Nassgewicht (zur Verfügung gestellt von Klaus Dornmair) in 5 ml eines Lysepuffers resuspendiert. Der Lysepuffer basierte auf dem Rehydrierungspuffer für die IEF. Das Zelllysate wurde wie oben beschrieben 15 Minuten beschallt und unlösliche Bestandteile wurden durch zwei Zentrifugationsschritte abgetrennt. Im Anschluss wurde das Zelllysate auf eine Endkonzentration von 2% (v/v) Pharmalyte™ 3-10 (GE Healthcare) eingestellt und mit einer Spatelspitze Bromphenolblau versetzt, um die IEF-Gelmatrix über Nacht darin quellen zu lassen (siehe **Abschnitt 2.5.3.2.1**).

- Lysepuffer:
8 M Urea, 2 M Thiourea, 2% (w/v) CHAPS, 10 mM DTT

2.5.3 Gelelektrophorese

Das Prinzip der Gelelektrophorese beruht auf der Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld. In einer porösen Gelmatrix wird die größenabhängige Trennung erreicht, da kleine Moleküle schneller wandern als große. Im Gegensatz zu DNA, welche aufgrund ihrer Phosphatreste negativ geladen ist, weisen Proteine ein weites Spektrum an Nettoladungen auf. Deshalb können Proteine auch abhängig von ihrer Ladung getrennt werden.

2.5.3.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine nach Größe zu trennen, müssen deren Eigenladungen überdeckt werden. Hierfür wird das Proteingemisch mit einem Überschuss des anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) versetzt. Außerdem bewirkt SDS die Auffaltung von Sekundärstrukturen. Die Trennung hängt dadurch weder von der Ladung noch von der Faltung, sondern ausschließlich von der Größe ab.

Für die SDS-PAGE wurden Novex® Tris-Glycine Minigele (8 cm x 8 cm x 1 mm) der Firma Invitrogen mit unterschiedlichen Acrylamid-Prozentsätzen (10%, 12%, 4-20%) verwendet, abhängig von der Komplexität des zu trennenden Proteingemischs. Als Molekulargewichtsstandard wurde der „Wide Range SigmaMarker™“ eingesetzt. Die Proben wurden entweder mit reduzierendem oder nicht-reduzierendem Auftragspuffer versetzt. Der reduzierende Puffer enthält β -Mercaptoethanol, wodurch Disulfidbrücken aufgebrochen werden. Proteine zerfallen in ihre Untereinheiten, welche dann getrennt im Gel laufen. Die vollständige Reduktion und Denaturierung wurde durch fünfminütiges Erhitzen auf 95 °C unterstützt.

Die Elektrophorese wurde in der „Mighty Small“-Apparatur (Hoefer) mit SDS-Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 130 V für 90 Minuten durchgeführt.

- SDS-Laufpuffer (10x):
1% (w/v) SDS, 0,24 M Tris, 1,92 M Glycin
- Auftragspuffer, nicht-reduzierend (5x):
0,2 M Tris-HCl pH 6,8, 7,5% (w/v) SDS, 20% (v/v) Glycerin, 0,02% (w/v) Bromphenolblau
- Auftragspuffer, reduzierend (3x):
0,15 M Tris-HCl pH 6,8, 15% (w/v) SDS, 45% (v/v) Glycerin, 0,01% (w/v) Bromphenolblau, 6% (v/v) β -Mercaptoethanol

2.5.3.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Zur ladungsabhängigen Trennung von Proteinen dient die IEF. Die Eigenladung eines Proteins setzt sich zusammen aus der Summe der Ladungen aller Aminosäureseitenketten und deren Modifikationen. Wenn sich Proteine entlang eines pH-Gradienten bewegen, so ändern sich je nach Anzahl geladener Aminosäuren sowie den pK-Werten der Amino- und Carboxylgruppen ihre Nettoladungen. Am isoelektrischen Punkt erreicht die Nettoladung den Wert Null, das Protein bleibt vom elektrischen Feld unberührt und wird fokussiert.

2.5.3.2.1 Rehydrierung der Gelmatrix und Probenapplikation

Als Trägermedium für die IEF wurden 7 cm beziehungsweise 24 cm lange Polyacrylamidgelstreifen mit immobilisiertem pH-Gradienten (IPG) eingesetzt: „ReadyStrip IPG Strips“,

pH 3-10, 7 cm (Bio-Rad) und „Immobiline™ DryStrip“, pH 3-10, 24 cm (GE Healthcare). Die Gelmatrix musste zunächst über Nacht quellen. Dies geschah entweder zwischen zwei Glasplatten, deren Hohlraum mit 20 ml Rehydrierungspuffer befüllt war, oder das zu fokussierende Proteingemisch wurde direkt mit dem Rehydrierungspuffer versetzt und die IPG-Streifen mit Probe in einer Trägerkammer nach Herstellerangaben gequollen. Bei allen Liquorproben wurde der IPG-Streifen ohne Probe rehydriert und das Proteingemisch in IEF-Probenpuffer mithilfe eines Trogs (GE Healthcare oder institutseigene Werkstatt) auf den IPG-Streifen geladen. Bei den Patientenproben HM-03, JN-02, NS-16 und NS-52 wurde noch nach Herstellerangaben verfahren und der Trog am alkalischen Ende des Gels platziert. Während der Protokolletablierung wurde die Position variiert, um die optimalen Bedingungen zu bestimmen. Letztlich stellte sich die Probenapplikation zwischen pH 4,5 und 5 als optimal heraus.

- Rehydrierungspuffer:
8 M Urea, 2 M Thiourea, 2% (v/v) Pharmalyte™ 3-10, Bromphenolblau
- IEF-Probenpuffer:
6 M Urea, 2 M Thiourea, 10% (v/v) Glycerin, Bromphenolblau

2.5.3.2.2 Fokussierungsprotokolle

Zur Durchführung der IEF standen zwei verschiedene Apparaturen zur Verfügung: Das „Multiphor II Electrophoresis System“ (Amersham Pharmacia) und der „Agilent 3100 OFFGEL Fractionator“ (Agilent Technologies, Böblingen).

Zur Fokussierung gereinigter IgG-Antikörper der Patienten HM-03, JN-02, NS-16 und NS-52 wurde die „Multiphor“-Apparatur nach Firmenangaben angewendet und das folgende Fokussierungsprotokoll bei 20 °C („Multi Temp™ III Thermostatic Circulator“, Amersham Pharmacia) durchgeführt:

Netzgerät “EPS 3501 XL” (Amersham Pharmacia):			Netzgerät “LKB 2297 Macrodrive” (Pharmacia):	
1 h	300 V	→	15 min	3500 V
15 min	600 V		15 min	4000 V
15 min	900 V		15 min	4500 V
15 min	1200 V		ad 24 h	5000 V
15 min	1500 V			
15 min	1800 V			
15 min	2100 V			
15 min	2500 V			
15 min	3000 V			

Das optimierte IEF-Protokoll, welches auf die Patientenproben HM-63, 1039, MS-B2A, MS-4 und L-296 angewendet wurde, beinhaltet die Durchführung der Fokussierung am

„Agilent 3100 OFFGEL Fractionator“. Grundsätzlich wurde nach Firmenangaben im *in-gel* Modus verfahren, es wurden jedoch folgende Parameter angepasst. Das mit IEF-Probenpuffer versetzte Probengemisch wurde mithilfe eines Trogs (8 x 2 mm, konisch, institutseigene Werkstatt) im schwach sauren pH-Bereich zwischen pH 4,5 und 5 auf rehydrierte IPG-Streifen geladen. Das Fokussierungsprotokoll wurde so programmiert, dass während der gesamten Elektrophorese maximal 8.000 V und 50 μ A erlaubt waren. In den ersten 30 Minuten war die Spannung auf 500 V und dann nochmals für 30 Minuten auf 1000 V limitiert, um einen langsameren Spannungsanstieg zu gewährleisten. Die Elektrophorese war beendet, sobald 120 kWh erreicht waren.

IPG-Streifen wurden nach der Fokussierung entweder gefärbt (siehe **Abschnitt 2.5.3.4**) oder in die nachfolgend beschriebene zweite Dimension der Proteintrennung eingesetzt.

2.5.3.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Zur hochauflösenden Trennung von Proteinen dient die 2D-Gelelektrophorese. In der ersten Dimension werden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt, in der zweiten Dimension folgt die Trennung nach Molekulargewicht mittels SDS-PAGE.

2.5.3.3.1 24 cm IPG-Streifen/SDS-Maxigele

Gereinigte IgG-Antikörper aus Liquor der Patienten HM-63, 1039, MS-B2A, MS-4 und L-296 wurden im großen Maßstab zweidimensional getrennt. Hierfür wurden zunächst mithilfe der „Ettan DALTsix Gel Caster“-Gießvorrichtung (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Herstellerangaben 9%-ige Polyacrylamidgele gegossen und über Nacht polymerisiert. Die IEF wurde mit 24 cm langen „ImmobilineTM DryStrip“, pH 3-10, im „Agilent 3100 OFFGEL Fractionator“ nach oben beschriebenem optimiertem Protokoll (siehe **Abschnitt 2.5.3.2.2**) durchgeführt. Nach beendeter IEF wurden die IPG-Streifen für 20 Minuten in Äquilibrierungspuffer geschwenkt. Dies diente dazu, die Proteine mit SDS zu sättigen, um im Anschluss die Trennung ausschließlich nach Molekulargewicht zu ermöglichen. Das Bromphenolblau im Puffer erzeugt eine sichtbare Lauffront während der SDS-PAGE. Die äquilibrierten IPG-Streifen wurden kurz in SDS-Laufpuffer eingetaucht und luftblasenfrei auf den geradlinigen Abschluss des Polyacrylamidgels gelegt. Anschließend wurde am rechten äußeren Ende des Gels ein kleines Stück Filterpapier appliziert, auf das zuvor der „Broad Range Marker“ (Bio-Rad) aufgetragen worden war. Der IPG-Streifen wurde mit 60 °C heißer 0,5%-iger Agaroselösung in SDS-Laufpuffer überschichtet und dadurch auf dem SDS-Gel fixiert. Die Pufferkammern (institutseigene Werkstatt) wurden mit SDS-Laufpuffer gefüllt. Die Elektrophorese wurde zunächst für 1 Stunde bei 10 mA

durchgeführt, damit die Probe am Übergang zwischen IPG-Streifen und SDS-Gel langsam einlaufen kann. Über Nacht wurde die Stromstärke auf 30 mA erhöht und die Kammer mithilfe des Durchlaufkühlers „Paratherm“ (Julabo, Juchheim) gekühlt.

- Lösung für 9%-ige Polyacrylamidgele (600 ml, ergibt 5 Maxigele):
270 ml H₂O, 150 ml Trenngelpuffer, 180 ml 30%-ige Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (Serva), gelöst; entgast; 300 µl Temed (Amersham Pharmacia) und 3 ml 10%-ige APS-Lösung zugegeben
- Trenngelpuffer:
1,5 M Tris, 0,4% (w/v) SDS, pH 8,8
- Äquilibrierungspuffer:
6 M Urea, 4% (w/v) SDS, 30% (w/v) Glycerin, 50 mM Trenngelpuffer, Bromphenolblau

2.5.3.3.2 7 cm IPG-Streifen/SDS-Minigele

Im kleinen Maßstab wurden 7 cm lange „ReadyStrip IPG Strips“, pH 3-10, in Kombination mit „Novex® 4-20% Tris-Glycine ZOOM®“ Gelen, 8 cm x 8 cm x 1 mm (Invitrogen) verwendet. Die IPG-Streifen wurden in Trägerkammern mit je 125 µl „Fe-EBV“-Zelllysate (siehe **Abschnitt 2.5.2.7**) über Nacht gequollen. Die Fokussierung wurde im „Agilent 3100 OFFGEL Fractionator“ im *in-gel* Modus nach unten angegebenem Protokoll durchgeführt. Die Stromstärke wurde während der gesamten Elektrophorese auf 25 µA limitiert. Nach beendeter Fokussierung wurden die IPG-Streifen wie oben beschrieben für die zweite Dimension vorbereitet und die Elektrophorese für 90 Minuten bei 125 V durchgeführt. Als Größenstandard wurde der „Full Range Rainbow Marker“ (GE Healthcare) verwendet.

- Fokussierungsprotokoll:

30 Minuten	150 V
30 Minuten	300 V
30 Minuten	500 V
90 Minuten	1500 V
	3000 V bis 10 kWh erreicht

2.5.3.4 Proteinfärbung in Gelen

2.5.3.4.1 Coomassie®-Brilliant-Blau-Färbung

Die Färbung mit Coomassie®-Brilliant-Blau wurde gewählt, wenn mindestens 500 ng des nachzuweisenden Proteins zu erwarten waren. Zudem ist mit dieser Färbemethode eine weiterführende Identifizierung über Massenspektrometrie möglich.

Novex® Minigele wurden für 30 Minuten, große 2D-Gele für 2 Stunden in Coomassie®-Färbelösung geschwenkt. Die Essigsäure fällt dabei das Protein, wodurch es im Gel fixiert wird. Zur Entfernung unspezifischer Hintergrundfärbungen wurde in Entfärbelösung gewaschen.

- Coomassie®-Färbelösung:
0,1% (w/v) Coomassie® Brilliant-Blue R-250, 40% Methanol, 10% Essigsäure
- Entfärbelösung: 50% Methanol, 7% Essigsäure

2.5.3.4.2 Kolloidale Coomassie-Färbung

IPG-Streifen nach eindimensionaler IEF wurden mit Roti®-Blue (Carl Roth), einer kolloidalen Coomassie-Lösung, gefärbt. Dadurch soll laut Herstellerangaben die unspezifische Färbung der Gelmatrix minimiert und eine Empfindlichkeit von 30 ng erreicht werden. Gefärbte Proteinbanden können im Anschluss einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen werden.

Die Fixierung der Proteine im IPG-Streifen erfolgte für 30 Minuten in 12% (w/v) Trichlor-essigsäure. Die Färbe- und Entfärbeprozedur entsprach dem Firmenprotokoll.

2.5.3.4.3 Silberfärbung nach Heukeshoven [48]

Silberfärbungen zeigen eine weitaus höhere Empfindlichkeit als die Färbung mit Coomassie®-Brilliant-Blau. Proteinmengen von 5 ng und weniger sind nachweisbar.

Die Proteine wurden zunächst für 30 Minuten im Gel fixiert und anschließend für 1 Stunde sensitiviert. An dieser Stelle sei erwähnt, dass die quervernetzende Wirkung von Glutaraldehyd eine weiterführende Analyse über Massenspektrometrie ausschließt. Nach dreimaligem Waschen mit Wasser wurden die Gele für 45 Minuten gefärbt. Ag^+ -Ionen binden dabei an die Proteine. Danach wurde das Gel erneut kurz mit Wasser gewaschen. Die Entwicklung erfolgte in einer alkalischen Lösung, wodurch die Silberionen zu metallischem Silber reduziert wurden. Die Proteinbanden färbten sich braun bis schwarz. Sobald der gewünschte Färbegrad erreicht war, wurde die Reaktion gestoppt.

- H-Fixierlösung: 40% Ethanol, 10% Essigsäure
- H-Sensitivierungslösung:
0,2% (w/v) Natriumthiosulfat, 0,5 M Natriumacetat, 0,5% (v/v) Glutaraldehyd, 30% Ethanol
- H-Färbelösung: 0,1% (w/v) Silbernitrat, 0,02% (v/v) Formaldehyd
- H-Entwicklerlösung: 0,01% (v/v) Formaldehyd, 2,5% (w/v) Natriumcarbonat
- H-Stopplösung: 1,5% (w/v) EDTA

2.5.3.4.4 Silberfärbung nach Shevchenko [131]

Die Silberfärbung nach Shevchenko basiert auf Rabilloud *et al.* [118], verzichtet aber auf das quervernetzende Agenz Glutaraldehyd und ist dadurch mit Massenspektrometrie kompatibel. Die Nachweisgrenze liegt bei circa 5 ng.

Nach der Fixierung der Proteine für mindestens 20 Minuten wurden die Gele für je 10 Minuten in 50% Methanol und Wasser geschüttelt. Anschließend wurden die Gele für 1 Minute sensitiviert und dreimal mit Wasser gewaschen. Während der Färbung für 20 Minuten im Kühlraum sorgte die Vorbehandlung mit Natriumthiosulfat dafür, dass unspezifisch gebundene Silber-Ionen in löslichen Komplexen abgefangen wurden. Vor der Entwicklung wurden die Gele zweimal mit Wasser gewaschen. Sobald sich die Entwicklerlösung gelblich verfärbte, wurde sie durch eine neue ersetzt. Durch Absenken des pH-Werts wurde die Reaktion schließlich gestoppt.

- S-Fixierlösung: 50% Methanol, 5% Essigsäure
- S-Sensitivierungslösung: 0,02% (w/v) Natriumthiosulfat
- S-Färbelösung: 0,1% (w/v) Silbernitrat; gekühlt
- S-Entwicklerlösung: 0,04% (v/v) Formaldehyd, 2% (w/v) Natriumcarbonat
- S-Stopplösung: 5% Essigsäure

2.5.3.5 Elektroblothing

Beim Elektroblothing werden Proteine aus Gelen durch Elektrophorese auf eine Membran übertragen, um sie für die weitere Analyse zu immobilisieren.

Als Apparatur wurde ein *Semi-dry*-System verwendet. Auf der anodischen Plattenelektrode wurden drei in Anodenpuffer getränkte Whatman-Filterpapiere (GE Healthcare) gelegt und darauf die Blotmembran aus Polyvinylidenfluorid (Hybond-P PVDF-Membran, GE Healthcare) platziert. Die Membran wurde kurz in Methanol aktiviert, mit Wasser gewaschen und anschließend in Anodenpuffer angefeuchtet. Auf die Membran wurde dann das Polyacrylamidgel gelegt. Mit drei weiteren Whatman-Filterpapieren, welche in Kathodenpuffer äquilibriert wurden, und mit der kathodischen Plattenelektrode war das Blotsandwich abgeschlossen. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wanderten die negativ geladenen Proteine aus der Gelmatrix in Richtung Anode, sprich zur Membran. Der Transfer erfolgte bei 35 mA für 3 Stunden.

- Anodenpuffer:
50 mM Borsäure, 20% Ethanol, pH 9,0
- Kathodenpuffer:
50 mM Borsäure, 5% Ethanol, pH 9,0

2.5.4 Enzymatische Behandlung von Proteinen

2.5.4.1 Deglykosylierung

IgG-Antikörper besitzen eine konservierte N-Glykosylierungsstelle im Fc-Teil. An dessen Zuckerreste können Sialinsäuren gebunden sein, welche den isoelektrischen Punkt eines Antikörpers beeinflussen können. Zur Reduktion der Heterogenität des Antikörpergemischs aus Liquor wurde deshalb vor der IEF eine Deglykosylierung durchgeführt.

Als Enzym wurde N-Glycosidase F eingesetzt, welche alle N-Glykane vom Asparagin-Peptidrückgrat des Proteins abspaltet. Vor der Reaktion wurden die Antikörper in 1% (w/v) SDS für 1 Minute bei 95 °C gekocht, um das Protein zu entfalten und die Glykosylierungsstellen zugänglich zu machen. Hierfür wurden die Antikörper nach dem Reinigungsschritt mit Dynabeads® Protein G (siehe **Abschnitt 2.5.2.1**) direkt in 50 bis 100 µl 1% (w/v) SDS eluiert. Anschließend wurde die Probe 1:1 mit Deglykosylierungspuffer versetzt und für 2 Minuten mit 3.300 rpm zentrifugiert (5417 C). Das nicht-ionische Detergenz MEGA-10 unterstützt in Ergänzung zu SDS die Entfaltung des Proteins und damit die Zugänglichkeit der Zuckerreste [98]. Nach Zugabe von 100 u/ml N-Glycosidase F *recombinant* (1 u/µl, Roche) wurde die Reaktion für 3 Stunden bei 37 °C durchgeführt.

- Deglykosylierungspuffer:
PBS mit 1% (w/v) MEGA-10, pH 7,2

2.5.4.2 Tryptische Spaltung in einer Gelmatrix

Vor jeder massenspektrometrischen Analyse wurden die Proteine nach Gelelektrophorese proteolytisch verdaut. Die Endopeptidase Trypsin hydrolysiert die Peptidbindung nach Lysin und Arginin. Spaltstellen, an denen carboxyterminal ein Prolin folgt, entfallen.

Coomassie-gefärbte Proteine konnten direkt tryptisch verdaut werden. Gele nach Silberfärbung hingegen mussten zunächst entfärbt werden [36]. 30 mM Kaliumferrocyanid und 100 mM Natriumthiosulfat wurden zu gleichen Teilen gemischt, davon pro Gelstück 120 µl pipettiert und der Ansatz bei RT geschüttelt. Sobald die Gelmatrix entfärbt war, wurde die Reaktion durch fünfmaliges Waschen mit H₂O gestoppt. Es folgte die Inkubation für 20 Minuten in 200 mM Ammoniumbicarbonat, gefolgt von weiteren fünf Waschschritten mit H₂O. Dann wurde das Protokoll mit dem tryptischen Verdau nach Shevchenko *et al.* fortgesetzt [131].

Durch abwechselnde Inkubation in 50 mM Ammoniumbicarbonat, pH 8,5 und 100% Acetonitril wurden die Gelstücke gewaschen. In Acetonitril schrumpft die Gelmatrix, sodass beim erneuten Quellen Puffer und Reagenzien ins Innere aufgesogen werden. Zur Reduktion

von Disulfidbrücken wurden die Gelstücke zunächst für 30 Minuten bei 60 °C in 20 µl 10 mM DTT inkubiert. Um die entstandenen freien Cystein-Seitenketten zu stabilisieren, wurden durch Zugabe von 20 µl 50 mM Iodacetamid für 15 Minuten bei RT alle Thiolgruppen alkyliert. Die Reagenzien wurden durch erneutes Waschen mit 10 mM Ammoniumbicarbonat und zweimal 100% Acetonitril entfernt. Mit 1 µl Trypsin *modified* (0,1 µg/µl, Roche) in 20 µl 10 mM Ammoniumbicarbonatpuffer, pH 8,5 wurde die Reaktion über Nacht bei 37 °C durchgeführt.

2.5.5 Massenspektrometrie

Mit der Massenspektrometrie werden Molekülmassen bestimmt. Das Prinzip beruht darauf, dass Moleküle zunächst in die Gasphase überführt und ionisiert werden, um im Anschluss durch ein elektrostatisches Feld beschleunigt zu werden. Die Beschleunigung ist abhängig von Masse (m) und Ladungszustand (z). Ein Detektor nimmt das Massenspektrum auf, welches die analysierten Ionen unterschiedlicher m/z -Quotienten und deren relative Häufigkeit in der Probe abbildet.

MALDI-TOF-Messungen wurden von Monica Zobawa durchgeführt (MPI für Biochemie, Abteilung Proteinanalytik), LC-ESI-Messungen von Ignasi Forne (Zentrallabor für Proteinanalytik, Adolf-Butenandt-Institut, München). Mit MALDI-TOF generierte Massenspektren wurden selbst ausgewertet (siehe **Abschnitt 2.5.5.2**). Die Auswertung der LC-ESI-Daten wurde vom Zentrallabor für Proteinanalytik übernommen.

2.5.5.1 MALDI-TOF Massenspektrometrie

In den meisten Fällen wurde im vorliegenden Projekt die MALDI-TOF-Technik angewendet: *Matrix assisted Laser desorption/ionization - Time of Flight*. Das Massenspektrometer „Proteomics Analyzer 4700 MALDI-TOF/TOF“ nutzt als Protonendonator eine Matrix, hier α -Cyano-4-hydroxymizsäure, bestehend aus kleinen organischen Molekülen. Wird die Spatlösung des tryptischen Verdaus im Verhältnis 1:1 mit der Matrix gemischt und auf einem metallischen Probenhalter (*target*) appliziert, so werden die Peptide während des Trocknens in die Matrix eingebettet. Durch kurzzeitiges Bestrahlen des Matrix-Proben-Kristalls mit einem Laser werden Teile des Kristalls vom festen in den gasförmigen Zustand überführt und durch Anlagerung eines Protons ionisiert. Die Molekülonen werden dadurch einfach geladen (MH^+). Die Matrix hat neben ihrer Funktion als Protonendonator auch die Aufgabe, die Energie des Lasers zu absorbieren, da ansonsten die Analytmoleküle zerstört

würden. Im elektrostatischen Feld des Hochvakuums folgt die Beschleunigung der Ionen im TOF-Analysator hin zum Detektor. Leichte Ionen erreichen den Detektor schneller als schwere Ionen. Die verstrichene Zeit wird gemessen und in ein Massenspektrum konvertiert. Zum Teil ist es möglich, zusätzlich zur Masse auch die Aminosäuresequenz der Peptide zu bestimmen. Dies geschieht über Tandem-Massenspektrometrie, auch als MS/MS oder MALDI-TOF/TOF bezeichnet. Hierbei werden zunächst Peptide, die sequenziert werden sollen, ausgewählt (*precursor ion*). Eine Ablenkelektrode (*precursor ion selector*) sorgt dafür, dass nur Ionen dieser Masse erneut durch einen Laser, jedoch mit höherer Energie, beschossen werden. Dabei zerfallen die Peptide durch Brüche im Peptidrückgrat in kleinere Fragmente. Sie werden ionisiert, beschleunigt, im TOF-Analysator getrennt und detektiert. Das resultierende MS/MS-Spektrum mit den Massen der Fragment-Ionen eines bestimmten Peptids ermöglicht letztlich die Rekonstruktion der Aminosäuresequenz.

2.5.5.2 Auswertung von MALDI-TOF-Daten

Mit der „Data Explorer Software“ wurden Massenlisten der Massenspektren erstellt und in das Programm „Mascot Peptide Mass Fingerprint“ im Fall von MALDI-TOF-Spektren, beziehungsweise „Mascot MS/MS Ion Search“ bei MALDI-TOF/TOF-Spektren kopiert (Matrix Science, London, UK). Als Datenbanken fungierten die Patienten-spezifischen Ig-V(D)J-Transkriptomte aus Liquor-B-Zellen, wenn Liquor-Antikörper analysiert wurden. Unbekannte Proteine wurden mit der Proteindatenbank von NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) analysiert. In der Suchmaske wurde vermerkt, dass alle Cysteine aufgrund der Behandlung mit Iodacetamid eine um 57 Da größere Masse aufwiesen. Es war zu beachten, dass bestimmte Aminosäuren potentiell Modifikationen tragen konnten. Für Histidine, Tryptophane und Methionine war eine Oxidation möglich (plus 16 Da), N-terminales Glutamin bildete eventuell einen Ringschluss (minus 17 Da). Außerdem wurde vorgegeben, dass die Peptidionen einfach geladen waren (MH^+). Beim Programm „Peptide Mass Fingerprint“ wurde eine Massentoleranz von 100 ppm sowie eine Fehlsplaltung erlaubt, bei „MS/MS Ion Search“ wurde die Toleranz für Fragment-Ionen auf 0,6 Da gesetzt. Übereinstimmende Peptidmassen wurden in der „Data Explorer Software“ nochmals überprüft, da es oftmals zu falschen automatischen Annotationen der Signale kam.

2.5.5.3 LC-ESI Massenspektrometrie

Spots aus 2D-Gelen gereinigter IgG-Antikörper der Patienten MS-B2A, MS-4 und L-296 wurden zur Hälfte mit LC-ESI Massenspektrometrie analysiert. Diese Methode kombiniert Elektrospray als Ionisationsquelle (ESI: *Electrospray Ionisation*) mit einer vorgeschalteten

Trennung der zu analysierenden Peptide über *Reversed Phase* Flüssigkeitschromatographie (LC: *Liquid Chromatography*). Das Eluat der Säule wird über eine sehr feine Kapillare in das „LTQ Orbitrap“ Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific) injiziert, dabei ionisiert und in die Gasphase überführt. In einer Ionenfalle werden die Massen analysiert. Zunächst werden Übersichts-Massenspektren von 300 bis 2000 Da aufgenommen. Jeweils sechs Signale mit der höchsten Intensität werden für eine Fragmentierung zur Erstellung eines MS/MS-Spektrums weitergeleitet. Davon ausgeschlossen wurden Peptide aus der C-Region von Ig-Ketten sowie von Trypsin und humanem Keratin. Für die Auswertung der Daten dienten wiederum die Patienten-spezifischen Ig-V(D)J-Transkriptdatenbanken.

2.5.6 Circulardichroismus-Spektroskopie

Mit der Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie wurde überprüft, ob die rekombinant exprimierten Fab-Fragmente (rFab) korrekt gefaltet sind. Die Methode beruht auf der optischen Aktivität von Proteinen aufgrund des chiralen α -C-Atoms aller Aminosäuren außer Glycin. Übergeordnete Strukturen wie α -Helices oder β -Faltblätter tragen ebenso zur optischen Aktivität eines Proteins bei. Dadurch wird in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ des eingestrahlten Lichts circular polarisiertes Licht unterschiedlich absorbiert. Die Messgröße in einem CD-Spektrum wird Elliptizität θ genannt. Sie beruht auf der Differenz der Absorption von links (ϵ_L) und rechts (ϵ_R) circular polarisiertem Licht mit Berücksichtigung der Konzentration c der Probe und der Schichtdicke d der verwendeten Küvette: $\theta(\lambda) = (\epsilon_L - \epsilon_R) \cdot c \cdot d$

Die Aufnahme und Auswertung der CD-Spektren aller rFab-Fragmente wurden unter Anleitung von Elisabeth Weyher-Stingl von der *Microchemistry Core Facility* am MPI für Biochemie durchgeführt. Am „J-715“-Spektrometer (Jasco, Gross-Umstadt) wurde die Absorption zwischen 195 und 260 nm bei 4 °C mit einer Geschwindigkeit von 50 nm/min gemessen. Für jedes Protein wurden acht Einzelspektren kumuliert. Als Referenz wurde der Probenpuffer PBS verwendet und dessen Eigenabsorption vom Spektrum der Proben abgezogen. Mithilfe des Programms „Spectra Manager CDpro Analysis“ (Jasco) wurde im Anschluss der Anteil an α -Helices, β -Faltblättern, Schleifen sowie ungefalteten Polypeptidketten durch den Vergleich mit 56 Referenzproteinen („Contin SMP56“) berechnet [115].

2.6 Immunologische Methoden

2.6.1 Durchflusszytometrie (FACS)

Um die Funktionalität des rFab-Fragments Fab-8-18C5 zu testen, wurden TE671-Zellen („TE671 Subline 2 Human Medullablastoma“) zur Verfügung gestellt, welche mit MOG-cDNA im pRSVneo-Plasmid transfiziert waren (Petra Sperl, AG Meinel, MPI für Neurobiologie). Sie exprimieren MOG auf ihrer Oberfläche. Fab-8-18C5 enthält im variablen Teil die Sequenz des MOG-spezifischen Antikörpers „8-18C5“ [22, 76, 78]. Mittels Durchflusszytometrie konnte damit überprüft werden, ob das rFab-Fragment spezifisch MOG bindet.

Je 10.000 TE671-Zellen wurden mit 1,5 µg Fab-8-18C5 in 50 µl PBS/2% BSA inkubiert. Als Isotypkontrolle diente Fab-1039-s1. Nach zwei Waschschritten in je 200 µl PBS (Rotor 2704: 1.200 rpm, 5 min, 10 °C) wurde als sekundärer Antikörper ein anti-Polyhistidin-Antikörper aus der Maus (Klon HIS-1) in einer 1:50-Verdünnung in PBS/2% BSA zugegeben. Wiederum wurde zweimal in PBS gewaschen. Zur Detektion wurde ein FITC-markierter anti-Maus-Antikörper aus der Ziege im Verhältnis 1:150 in PBS/2% BSA eingesetzt. Nach weiteren zwei Waschschritten in PBS wurde die Fluoreszenz unter Anleitung von Martina Sölch (AG Klaus Dornmair) am „FACScalibur“-Spektrometer (Becton Dickinson, Heidelberg) gemessen. Als Positivkontrolle dienten 0,5 µg des „8-18C5“-Antikörpers. Die entsprechende Isotypkontrolle war ein IgG1-Antikörper aus der Maus (Klon X40). Als Negativkontrolle wurde auf die jeweiligen primären Antikörper verzichtet, um zu überprüfen, ob die sekundären Antikörper unspezifisch an die Zellen binden. In allen Fällen wurden die Antikörper für 30 Minuten auf Eiswasser inkubiert. Als Totfarbstoff wurde Propidiumiodid 1:500 in PBS verwendet. Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte mit der „FlowJo Software“ (Tree Star, OR, USA).

2.6.2 Affinitätschromatographie

Ob rFab-Fragmente intrazelluläre Proteine in ihrer nativen Konformation erkennen, wurde mittels Affinitätschromatographie getestet.

Zu diesem Zweck wurde Lysat aus Jurkat-Zellen hergestellt (siehe **Abschnitt 2.5.2.7**). Fab-Fragmente sowie Neurofascin-155 (NF-155) wurden an 5 ml Ni-NTA-Agarose gebunden und mit PBS/20 mM Imidazol, pH 8,0 gewaschen (siehe **Abschnitt 2.5.2.2**). Davon wurden je 1 ml Säulenmatrix in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und mit je 10 ml Zelllysat bei 4 °C im *batch*-Verfahren inkubiert. Dabei werden Ligand und Adsorbent kontinuierlich

über ein Drehrad vermischt. Nach 45 Minuten wurde der Ansatz in eine Säule überführt und mit PBS/20 mM Imidazol gewaschen. Die Elution erfolgte an der FPLC-Apparatur mit Detektion bei $\lambda = 277$ nm und einer Flussrate von 1 ml/min (siehe **Abschnitt 2.5.2.3**). Dort wurde auf 200 mM Imidazol erhöht und Fraktionen à 1 ml gesammelt. Zur weiteren Analyse wurden je 500 μ l der dritten Elutionsfraktion gefällt, um die Proben zu konzentrieren (siehe **Abschnitt 2.5.2.6**). Die Sedimente wurden in reduzierendem SDS-Probenpuffer gelöst, die Proteine über SDS-PAGE getrennt (siehe **Abschnitt 2.5.3.1**) und interessante Banden mit MALDI-TOF Massenspektrometrie identifiziert (siehe **Abschnitt 2.5.5.1**).

2.6.3 Western Blot

2.6.3.1 Detektion des His₍₆₎-Signalpeptids

Der Nachweis von rFab-Fragmenten nach Elektroblothing (siehe **Abschnitt 2.5.3.5**) erfolgte über die Detektion des His₍₆₎-Signalpeptids.

Unspezifische Bindungsstellen wurden zunächst für 2 Stunden mit Blockierungspuffer abgesättigt. Dann wurde die Membran mit einem anti-Polyhistidin-Antikörper (Klon HIS-1) 1:1.000 in Blockierungspuffer für 1 Stunde inkubiert (RT). Es folgte ausgiebiges Waschen in PBS-T für insgesamt 45 Minuten mit fünfmaligem Wechseln der Waschlösung. Zur Detektion diente das ECL-System (*enhanced chemiluminescence*). An den Polyhistidin-spezifischen Antikörper ist das Enzym Peroxidase gekoppelt. Peroxidase oxidiert in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid das in der ECL A-Lösung enthaltene Luminol und erhöht somit dessen Energiezustand. Bei der Rückkehr in den Grundzustand wird die freigewordene Energie in Form von Licht emittiert. Der Röntgenfilm wird dort geschwärzt, wo sich auf der Membran ein Polyhistidin-Protein befindet. Zur Verstärkung des Lichtsignals enthält die ECL B-Lösung p-Hydroxycoumarinsäure. Pro Membran wurden 10 ml ECL A-Lösung mit 3,1 μ l 30% H₂O₂ aktiviert und mit 100 μ l ECL B-Lösung versetzt. Das Gemisch wurde auf der Membran verteilt und für 1 Minute inkubiert. Dann wurde die Membran in eine lichtgeschützte Filmkassette gelegt und der Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare) im Dunkelraum entwickelt („OPTIMAX®“, Protec, Oberstenfeld).

- Blockierungspuffer:
5% (w/v) Milchpulver, *blotting grade* (Bio-Rad) in PBS-T (= PBS mit 0,05% (v/v) Tween-20)
- ECL A-Lösung:
0,25% (w/v) Luminol in 1M Tris pH 8.6
- ECL B-Lösung:
0,11% (w/v) para-Hydroxycoumarinsäure in DMSO

2.6.3.2 Immunoblot

Intrazelluläre Proteine als mögliche Antigene wurden neben der Affinitätschromatographie auch über Immunoblot getestet.

Zellysate der „Fe-EBV“-Zelllinie wurden unter denaturierenden Bedingungen hergestellt (siehe **Abschnitt 2.5.2.7**) und die Proteine wurden über 2D-Gelelektrophorese getrennt (siehe **Abschnitt 2.5.3.3.2**). Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran (siehe **Abschnitt 2.5.3.5**) wurden unspezifische Bindungsstellen mit PBS-T/2% BSA für 2 Stunden blockiert. Im Anschluss wurden die Membranen mit je 30 µg rFab-Fragment, welche im weniger stringenten Puffer aus PBS mit 0,01% Tween-20 und 0,4% BSA verdünnt wurden, inkubiert. Dabei wurde das Volumen möglichst klein gehalten (5 ml, in Folie eingeschweißt) und die Inkubation über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Nach kurzem Waschen in PBS-T wurde der Peroxidase-gekoppelte Polyhistidin-spezifische Sekundärantikörper (Klon HIS-1) zugegeben, welcher zuvor 1:1.000 in PBS/0,01% Tween-20/0,4% BSA verdünnt wurde. Nach 1 Stunde (RT) wurde für 45 Minuten mit fünfmaligem Pufferwechsel in PBS-T gewaschen. Die Detektion erfolgte über Chemilumineszenz wie in **Abschnitt 2.6.3.1** erläutert.

2.6.4 Kombinatorischer *Glycolipidarray*

Um Lipide als Antigene der rFab-Fragmente zu testen, wurde ein kombinatorischer *Glycolipidarray* angewendet [124]. Die benötigte Ausstattung wurde von Prof. Hugh J. Willison am *Biomedical Research Center* der Universität von Glasgow zur Verfügung gestellt. Die Durchführung erfolgte zunächst unter Anleitung von Dr. M. Kathryn Brennan und wurde im Anschluss eigenständig wiederholt.

Die Lipide Sulfatid (Sul), Galactocerebroside (GalC), Ceramid (Cer), Cardiolipin (Cardio), D-Sphingosin (SS), Sphingomyelin (SM), Cholesterin (Chol), Digalactosyldiglycerid (Dgdg), Monogalactosyldiglycerid (Mgdg) und Phosphatidylcholin (PC) in Methanol wurden vor ihrer Verwendung 2 Minuten in einem Wasserbad beschallt. Des Weiteren wurden Glasobjektträger (VWR International, Darmstadt) im Vorfeld mit 20 mm x 25 mm großen PVDF-Membranen beklebt und an Luft getrocknet. Mithilfe des „Automatic TLC sampler 4“ (Camag, Berlin) und der „winCATS Software“ (Camag) wurden die Lipide auf einer PVDF-Membran immobilisiert. In der hier angewendeten Anordnung werden die Lipide sowohl einzeln als auch in 1:1-Kombinationen aus jeweils zwei Lipiden getestet (**Abb. 2-4**). Die Felder enthalten je 10 ng Lipid. Als Negativkontrolle wurde in einer diagonal verlaufenden Reihe Methanol auf die Membran aufgebracht.

	Sul	GalC	Cer	Cardio	SS	SM	Chol	Dgdg	Mgdg	PC
Sul	-									
GalC		-								
Cer			-							
Cardio				-						
SS					-					
SM						-				
Chol							-			
Dgdg								-		
Mgdg									-	
PC										-

Abb. 2-4: Kombinatorik *Glycolipidarray*

Auf einem kombinatorischen *Glycolipidarray* befinden sich die Lipide sowohl einzeln als auch in 1:1-Mischungen mit einem zweiten Lipid auf der PVDF-Membran. Außerdem werden alle Lipide in Duplikaten getestet. Als Negativkontrolle befindet sich in einer diagonal verlaufenden Reihe Methanol („-“). Sul = Sulfatid, GalC = Galactosylcerebrosid, Cer = Ceramid, Cardio = Cardiolipin, SS = Sphingosin, SM = Sphingomyelin, Chol = Cholesterin, PC = Phosphatidylcholin, Dgdg = Digalactosyldiglycerid, Mgdg = Monogalactosyldiglycerid

Nach der Immobilisierung der Lipide wurden die Membranen für 10 Minuten (RT) getrocknet. Unspezifische Bindungsstellen wurden für 1 Stunde bei 4 °C mit PBS/2% BSA blockiert und die Membranen kurz mit PBS gespült. Die rFab-Fragmente wurden in PBS/0,1% BSA auf eine Endkonzentration von 10 µg/ml verdünnt und insgesamt 250 µl auf die Membran pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei 4 °C. Anschließend wurden alle nicht gebundenen rFab-Fragmente entfernt, indem zweimal für 5 Minuten in einer Küvette mit PBS gewaschen wurde. Als Sekundärantikörper wurde ein Peroxidasegekoppelter Antikörper gegen das C-terminale His₍₆₎-Signalpeptid (Klon GG11-8F3.5.1) in einer 1:5.000-Verdünnung in PBS/0,1% BSA eingesetzt. Davon wurden 250 µl auf die Membran pipettiert und für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Membranen für 10 Minuten (RT) getrocknet. Die Detektion erfolgte über Chemilumineszenz mit „ECL PlusTM Western Blotting Detection Reagents“ (GE Healthcare) nach Firmenangaben. Die Expositionszeiten betragen zwischen 1 Sekunde und 16 Stunden.

2.6.5 Immunfluoreszenz

Mit Immunfluoreszenz wurde getestet, ob die rFab-Fragmente Antigene auf beziehungsweise in Zellen oder Geweben erkennen. Es wurden indirekte Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt, bei denen mit Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern detektiert wird.

2.6.5.1 Immunfluoreszenzfärbung von Hirngewebe

Es standen 10 µm dünne Gefrierschnitte von Hirngewebe auf Glasobjektträgern zur Verfügung (Ingrid Eiglmeier, AG Dornmair). Das Gewebe wurde zunächst in 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS/2% BSA für 30 Minuten in einer Küvette fixiert und anschließend

dreimal für 2 Minuten mit PBS gewaschen. Dann wurden für 1 Stunde unspezifische Bindungsstellen mit PBS/2% BSA abgesättigt. Auf die Gewebefläche von etwa 2 mm² wurden je 2,5 µg rFab-Fragmente in 100 µl PBS/2% BSA pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es folgte ein Waschschrift in PBS und anschließend die Inkubation für 1 Stunde (RT) mit einem Polyhistidin-spezifischen Antikörper (Klon HIS-1), welcher zuvor 1:400 in PBS/2% BSA versetzt mit 1% Maus-Serum (Dako) verdünnt wurde. Maus-Serum blockiert dabei potentielle Bindungsstellen am Fc-Teil des HIS-1-Antikörpers aus der Maus. Der Waschschrift in PBS wurde wiederholt. Zur Detektion wurde ein anti-Maus Alexa Fluor 488-markierter Antikörper in einer 1:100-Verdünnung in PBS/2% BSA verwendet und lichtgeschützt für 1 Stunde (RT) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS wurden die Gewebeschnitte mit Eindeckmedium und Deckglas versehen und am Fluoreszenzmikroskop „AxioPhot2“ (Carl Zeiss, Jena) mit der „AxioVision 4 Software“ (Carl Zeiss) ausgewertet.

2.6.5.2 Immunfluoreszenztests der Firma Euroimmun

Die Firma Euroimmun (Lübeck) bietet eine Reihe standardisierter Immunfluoreszenztests an. Die Reaktivität gegen Masern-, Röteln- und Varizella Zoster-Viren, HSV-1 und -2 sowie EBV wurde mithilfe fixierter infizierter Zellen untersucht. Zum Test auf Zellkerne standen humane Epithelzellen zur Verfügung. Außerdem wurde getestet, ob die rFab-Fragmente gegen Antigene des bakteriellen Erregers *Chlamydia pneumoniae* gerichtet sind.

In allen Fällen wurden die Positiv- und Negativkontrollen der Firma in Form von IgG-Antikörpern nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Bei den rFab-Fragmenten musste das Protokoll angepasst werden. Pro Testfeld wurden äquimolare Präkomplexe aus je 0,5 µg rFab-Fragment mit 0,75 µg des His₍₆₎-spezifischen Antikörpers (Klon HIS.H8) durch Inkubation für 30 Minuten (RT) gebildet. Die einzelnen Testfelder (circa 25 mm²) wurden für 30 Minuten mit den Präkomplexen inkubiert. Nach fünfminütigem Waschen in einer Küvette mit PBS-Tween (Euroimmun) wurde ein anti-Maus FITC-markierter Antikörper 1:100 in PBS-Tween verdünnt und lichtgeschützt für 30 Minuten inkubiert. Das Waschen in PBS-Tween wurde wie oben beschrieben wiederholt, Eindeckmedium und Deckglas aufgebracht und das Ergebnis am Fluoreszenzmikroskop „AxioVert 200M“ (Carl Zeiss) und der „MetaMorph® Software“ (Molecular Devices, Downingtown, PA, USA) ausgewertet. Als Negativkontrollen wurden der HIS.H8-Antikörper sowie der FITC-markierte Antikörper jeweils ohne rFab-Fragmente eingesetzt.

3. Ergebnisse

3.1 Ursprung der oligoklonalen Antikörper

Antikörper in Form von oligoklonalen IEF-Banden sowie eine erhöhte Zahl an Zellen der B-Zelllinie sind wichtige diagnostische Merkmale im Liquor von MS-Patienten. Vorläufige Ergebnisse aus der Diplomarbeit zeigten anhand von Liquorproben zweier Patienten (NS-52, JN-02), dass diese B-Zellen an der Produktion der OKB-Antikörper beteiligt sind. Hierfür wurde eine Methode etabliert, mit der Ig-Transkriptome und -Proteome korreliert werden können. Sie besteht darin, Patienten-spezifische Ig-V(D)J-Transkriptdatenbanken aus RNA von Liquor-B-Zellen zu erstellen, um dann mittels Massenspektrometrie nach übereinstimmenden „charakteristischen“ Peptiden in den Liquor-Antikörpern zu suchen. Charakteristische Peptide zeichnen sich dadurch aus, dass sie Aminosäureaustausche infolge von SHM beinhalten oder in der hypervariablen CDR3-Region liegen. Nur diese Sequenzbereiche sind aufgrund ihrer zufälligen Entstehung im Gegensatz zu Keimbahncodierten Abschnitten Patienten-spezifisch und damit signifikant.

Um das Ergebnis der Diplomarbeit zu stützen, wurden im ersten Teil der vorliegenden Arbeit Liquorproben von zwei weiteren MS-Patienten analysiert (HM-03, NS-16). Zur Übersicht sind die Ergebnisse aller vier untersuchten Patientenproben gezeigt (**Abschnitt 3.1.1**). Als Kontrollexperiment wurden äquivalent IgG-Antikörper aus Serum derselben Patienten analysiert (**Abschnitt 3.1.2**). Außerdem wurde ein wichtiger Spezifitätstest entwickelt, um zu zeigen, dass die Zuordnung von Peptiden signifikant war (**Abschnitt 3.1.3**).

3.1.1 B-Zellen im Liquor sind an der Produktion von OKB-Antikörpern beteiligt

3.1.1.1 Erstellen von Patienten-spezifischen Ig-V(D)J-Transkriptomen

Liquorproben der Patienten HM-03, JN-02, NS-16 und NS-52 bestanden jeweils aus 1,5 bis 5 ml zellfreiem Liquorüberstand und dem Zellsediment. Aus dem Zellsediment wurde Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels PCR spezifisch Ig-V(D)J-Transkripte von H-, κ - und λ -Ketten amplifiziert.

Für alle vier Patienten konnte für jede Art von Ig-Kette ein Amplikon der erwarteten Größe nachgewiesen werden (hier nicht gezeigt). H-Ketten zeigten eine Größe von 450 bis 500 bp. Diese Variation ist begründet in den unterschiedlichen Längen der hypervariablen CDR3-Region. κ -Transkripte waren circa 350 bp und λ -Transkripte etwa 400 bp lang. Die Negativkontrollen mit Wasser statt cDNA-Matrize waren in allen Fällen negativ.

PCR-Produkte wurden in den pCR®2.1-TOPO®-Vektor kloniert. Pro Patient und pro H-, κ - und λ -Kette wurden bis zu 60 Klone für die Sequenzierung in Auftrag gegeben. Zunächst wurden die Transkripte den verschiedenen Ig-Allelen zugeordnet, um dann alle Aminosäureaustausche infolge von SHM durch den Vergleich mit den Keimbahnsequenzen zu identifizieren. Die erstellten Patienten-spezifischen Ig-V(D)J-Transkriptdatenbanken bestanden insgesamt aus 131 Sequenzen für Patient HM-03 (44x H, 49x κ , 38x λ), 129 Sequenzen für Patient NS-52 (46x H, 47x κ , 36x λ), 101 Sequenzen für Patient JN-02 (34x H, 40x κ , 27x λ) und 116 Sequenzen für Patient NS-16 (39x H, 36x κ , 41x λ).

3.1.1.2 Analyse der Patienten-spezifischen Ig-V(D)J-Transkriptome

Das detaillierte Ergebnis der Sequenzanalyse ist in den **Abbildungen 3.1-1 bis 3.1-4** gemeinsam mit den Ergebnissen der Massenspektrometrie dargestellt. In Spalte 1 ist gezeigt, wie oft ein bestimmtes Ig-V(D)J-Transkript detektiert wurde. Einige Sequenzen kamen mehrfach vor, wohingegen die meisten Transkripte nur jeweils einmal nachgewiesen wurden. In manchen Fällen gab es dominante Ketten infolge von klonaler Expansion. Ein Beispiel ist V κ I-A20/a von Patient NS-52 mit 24 aus 47 analysierten Bakterienklonen (**Abb. 3.1-2c**) Auch VH4-b/e des Patienten HM-03 ist mit 18 aus 55 Transkripten klonal expandiert (**Abb. 3.1-1b**). Die Sequenzen sind nach Subfamilien geordnet (Spalte 2). Bei allen Patienten waren die VH3- und VH4-Subfamilie der H-Kette sowie die V κ I- und V κ III-Subfamilien der κ -Ketten am häufigsten.

Alle Aminosäuren, welche durch V(D)J-Rekombination und SHM eingeführt wurden, sind rot markiert. Sie waren über die gesamte V-Region verteilt, häuften sich jedoch zum Teil in den CDR-Regionen. In der J-Region waren SHM selten zu beobachten. Ketten mit identischer CDR3-Sequenz unterschieden sich häufig durch einzelne Aminosäureaustausche in der V-Region. Für die H-Ketten war es anhand der Position des *reverse* Primers möglich, die Expression verschiedener IgG-Subtypen zu quantifizieren. Es stellte sich eine deutliche Dominanz von IgG1 heraus: NS-52 91%, JN-02 100%, NS-16 97% und HM-03 98%.

In der Diplomarbeit wurde in diesem Zusammenhang ein Kontrollexperiment mit B-Zellen aus Blut eines gesunden Probanden durchgeführt. Hier war zum einen eine deutlich heterogene Verteilung mit IgG2 als dominantem Subtyp zu beobachten. Zum anderen ließ sich im Blut erwartungsgemäß weder eine klonale Expansion noch ausgeprägte SHM nachweisen.

3.1.1.3 Isoelektrische Fokussierung von Liquor-Antikörpern

IgG-Antikörper wurden mit Protein G aus Liquor isoliert und über IEF getrennt. Äquivalent wurde mit korrespondierenden Serumproben verfahren, deren IgG-Gehalt vor der Elektrophorese an die Konzentration im Liquor angepasst wurde. Bei Patient HM-03 zeigte das IEF-Gel keine scharfen Banden (**Abb. 3.1-1a**). Hier waren die Antikörper über den gesamten pH-Bereich verteilt. Bei drei der vier Patienten waren im Liquor jedoch deutlich OKB zu sehen (**Abb. 3.1-2a**, **Abb. 3.1-3a** und **Abb. 3.1-4a**). Insbesondere von pH 5 bis pH 8 war die Trennung in distinkte Banden effizient. Am alkalischen Ende aller vier IEF-Gele der Liquorproben fiel eine starke Färbung in Form eines breiten Schmiere auf. IgG-Antikörper aus Serum waren bei allen Patienten als polyklonales Kontinuum nachzuweisen.

3.1.1.4 Analyse der IgG-Proteome und Vergleich mit den Ig-V(D)J-Transkriptomen

OKB wurden, wie in den **Abschnitten a** der **Abbildungen 3.1-1** bis **3.1-4** gezeigt, aus den IEF-Gelen ausgeschnitten. Bei Patient HM-03 wurde aufgrund fehlender Banden der gesamte Streifen in 30 Abschnitte geteilt. Es folgte die tryptische Spaltung und die Analyse der Spaltpeptide mit MALDI-TOF Massenspektrometrie. Die Zuordnung von Peptidmassen zu Aminosäuresequenzen erfolgte mithilfe des Programms „Mascot“. Hier waren die Patientenspezifischen Ig-V(D)J-Transkriptdatenbanken aus **Abschnitt 3.1.1.1** hinterlegt, welche *in silico* mit Trypsin verdaut wurden. Peptide, für welche übereinstimmende Massen aus Ig-Transkriptom und -Proteom ermittelt wurden, sind in **Abbildungen 3.1-1b,c** bis **3.1-4b,c** blau markiert. Es sind jeweils die Ergebnisse für die H- und κ -Ketten gezeigt. Die Ig-V(D)J-Transkriptome der λ -Ketten wurden durch kein einziges Peptid aus Liquor-Antikörper abgedeckt. Aus diesem Grund ist dieser Teil der Analyse hier nicht gezeigt.

Bei allen vier Patientenproben konnte eine Vielzahl an übereinstimmenden Peptiden identifiziert werden. Daraus resultierte eine ausgeprägte Überlappung zwischen dem Antikörperrepertoire und dem Ig-V(D)J-Transkriptorepertoire. Eine signifikante Zahl an identifizierten Peptiden enthielten Aminosäureaustausche infolge von SHM oder lagen in der hypervariablen CDR3-Region. Diese Sequenzabschnitte waren einzigartig für das Ig-V(D)J-Transkriptom eines Patienten, das heißt, sie wiederholten sich nicht im Repertoire eines anderen Patienten. Sie werden deshalb als charakteristisch bezeichnet. Peptide mit Keimbahnsequenzen sind nicht charakteristisch, da sie in jedem Individuum vorkommen. Mit Ausnahme von Patient NS-16 konnte für den Großteil der Ig-V(D)J-Transkriptome jeder Kette mindestens ein charakteristisches Peptid zugeordnet werden. Das Ergebnis für die H-Ketten von Patient NS-16 fiel durch eine geringere Ausbeute an überlappenden Peptiden aus dem Rahmen (**Abb. 3.1-4b**).

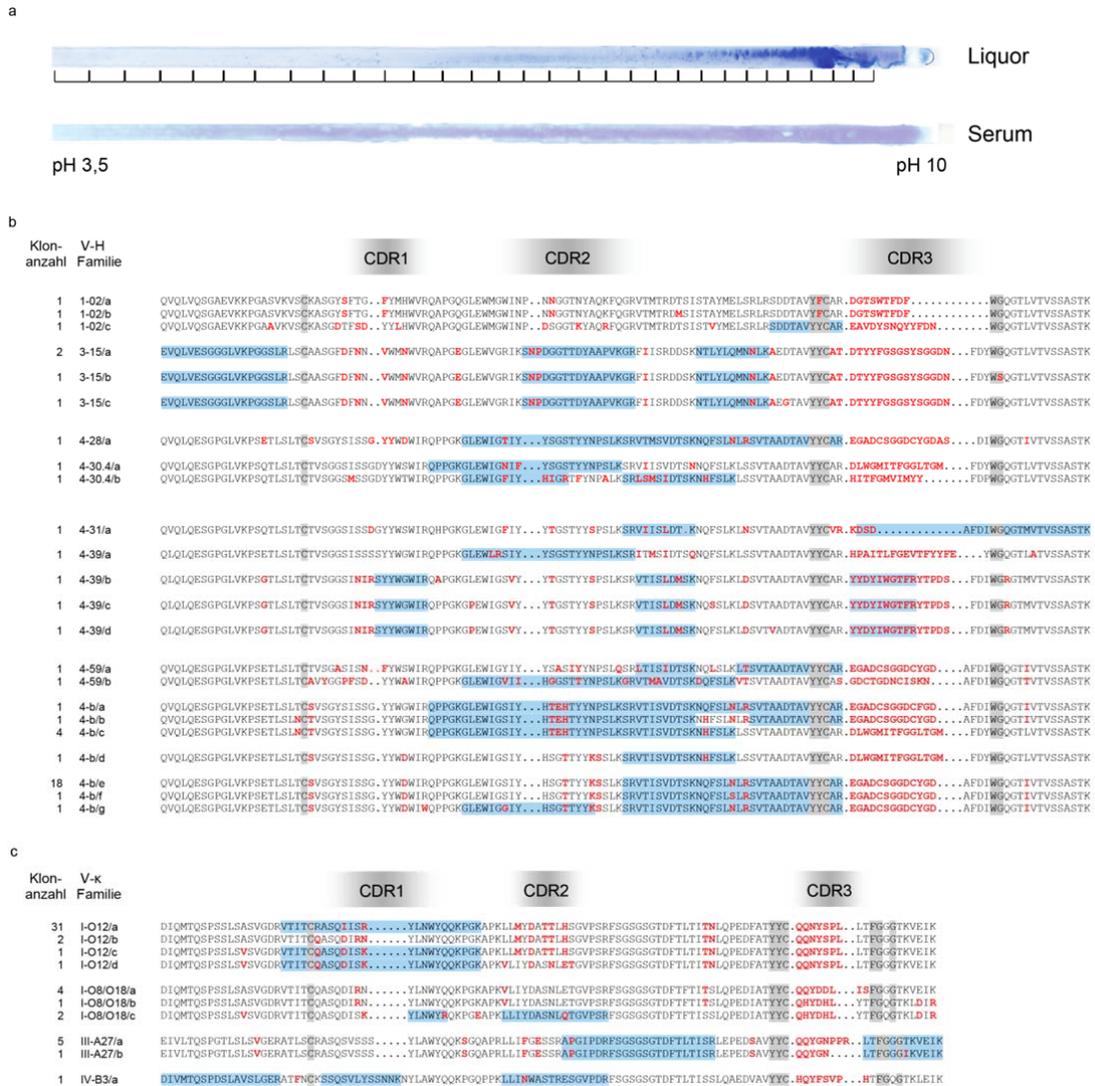


Abb. 3.1-1: Überlappung von Ig -V(D)J-Transkriptom und - Proteom im Liquor des MS - Patienten HM-03

(a) IPG-Streifen nach IEF von IgG-Antikörpern aus Liquor und Serum. Die gekennzeichneten Bereiche des Gels wurden ausgeschnitten und die Antikörper mit MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert. (b,c) Daten aus Transkriptom- und Proteomanalyse für die H-Kette (b) und κ-Kette (c). In Spalte 1 ist aufgelistet, wie oft ein bestimmtes Ig-V(D)J-Transkript bei der Sequenzdatenanalyse aus Liquor-B-Zellen detektiert wurde. Insgesamt wurden 44 H- und 49 κ-Ketten analysiert. Spalte 2 zeigt die Zuordnung der Ketten zu Subfamilien. Ein zusätzlicher Buchstabe unterscheidet Ketten der gleichen Subfamilie mit unterschiedlicher Sequenz. In Spalte 3 sind die Aminosäuresequenzen aufgeführt. Keimbahn-codierte Aminosäuren sind schwarz, Aminosäureaustausche infolge von SHM sowie die hypervariable CDR3-Region rot. Die Sequenzen sind anhand konservierter Aminosäuren (grau) ausgerichtet: zwei Cysteine in der V-Region, das WG-Motiv in der J-Region der H-Kette und das FGXG-Motiv in der J-Region der κ-Kette (X stellt eine beliebige Aminosäure dar). Die Positionen von CDR1-, CDR2- und CDR3-Region sind als Boxen eingezeichnet [59].

Diese Abbildung befindet sich auch auf einer der Arbeit beigefügten Cd (siehe Anhang Teil VI).

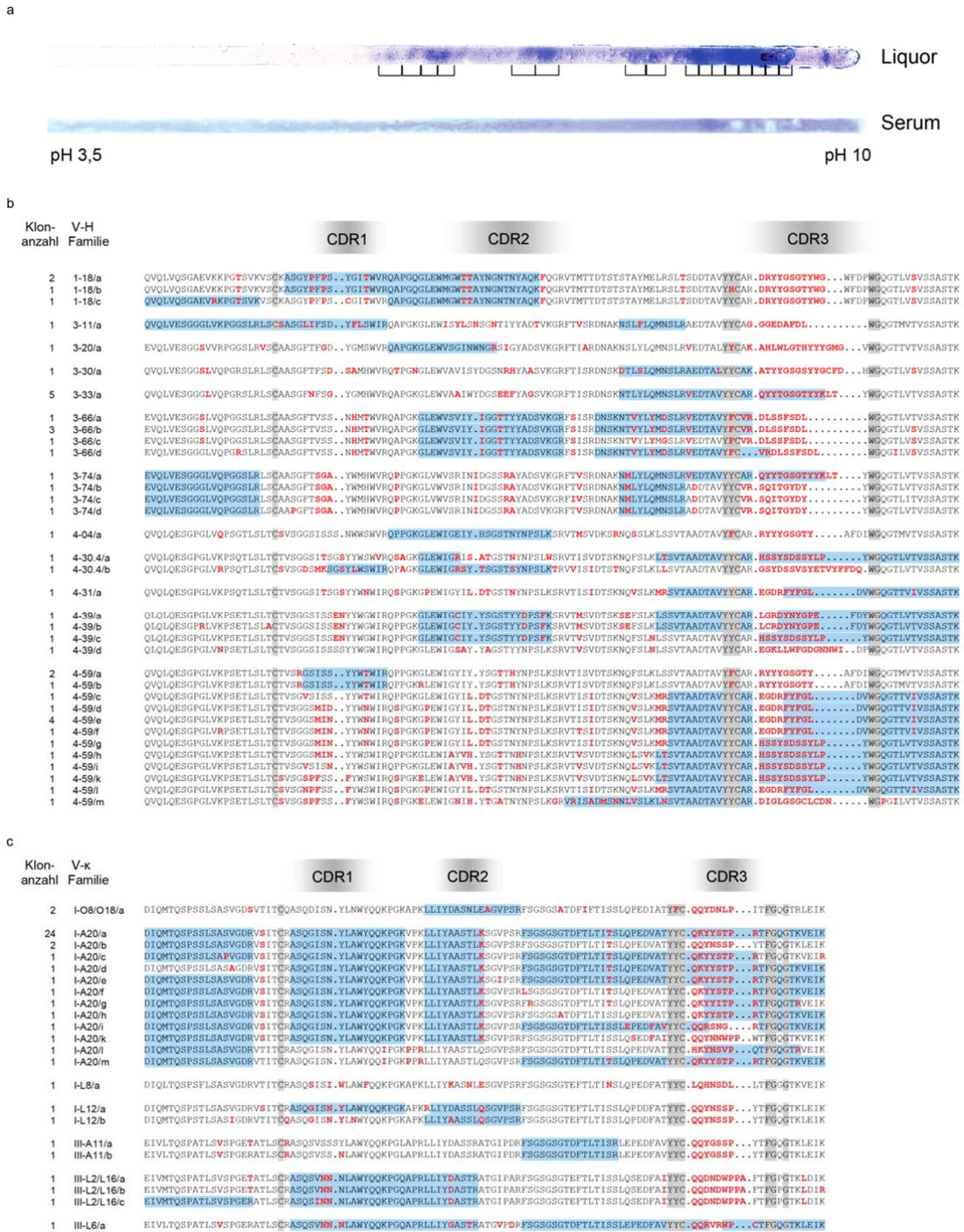


Abb. 3.1-2: Überlappung von Ig-V(D)J-Transkriptom und -Proteom im Liquor des MS-Patienten NS-52

(a-c) Legende entspricht Abbildung 3.1-1. Insgesamt wurden 46 H- und 47 κ-Ketten analysiert. Diese Abbildung befindet sich auch auf einer der Arbeit beigefügten Cd (siehe Anhang Teil VI).

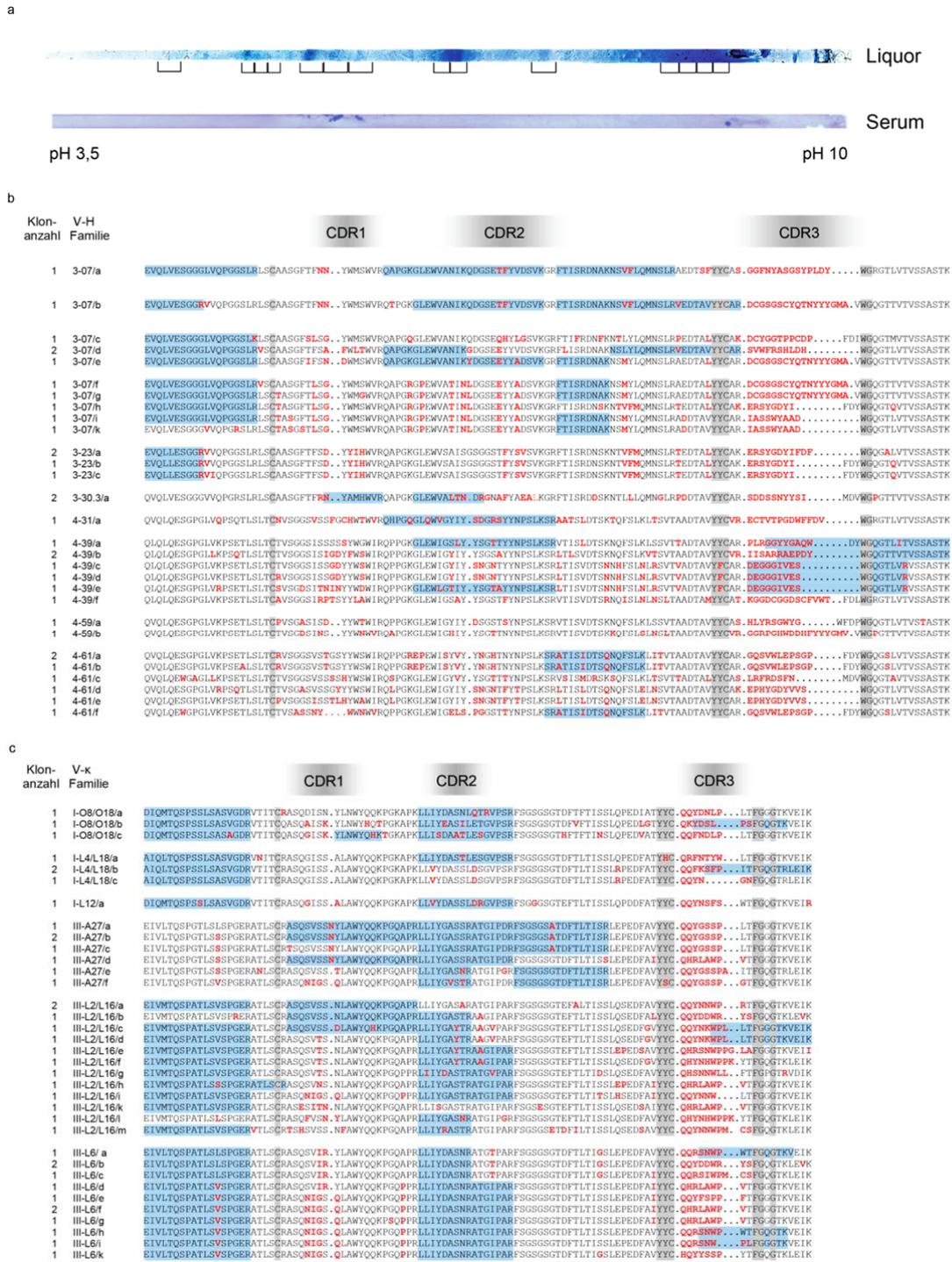


Abb. 3.1-3: Überlappung von Ig-V(D)J-Transkriptom und -Proteom im Liqueur des MS-Patienten JN-02

(a-c) Legende entspricht Abbildung 3.1-1. Insgesamt wurden 34 H- und 40 kappa-Ketten analysiert. Diese Abbildung befindet sich auch auf einer der Arbeit beigefügten Cd (siehe Anhang Teil VI).

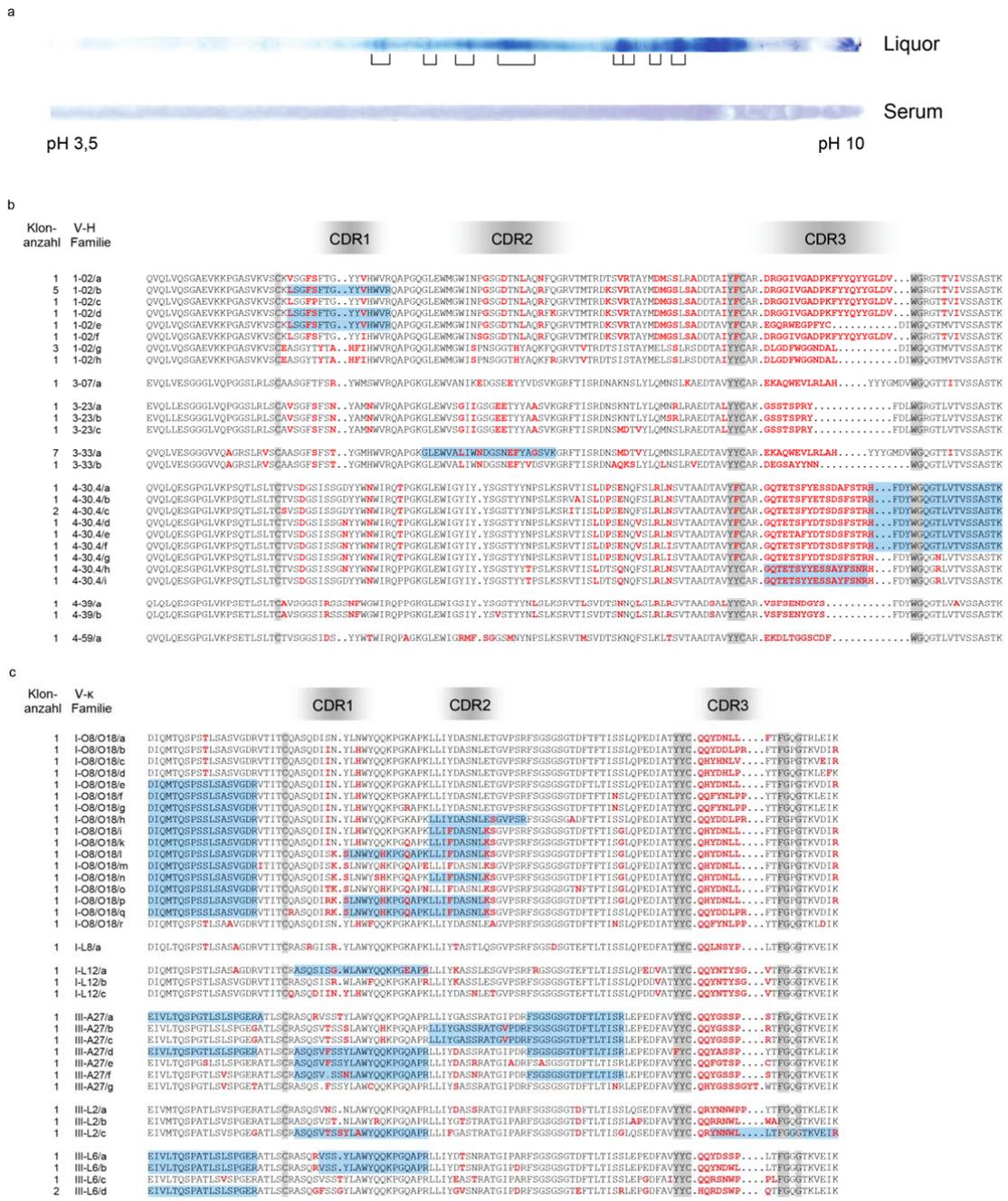


Abb. 3.1-4: Überlappung von Ig-V(D)J-Transkriptom und -Proteom im Liqueur des MS-Patienten NS-16

(a-c) Legende entspricht Abbildung 3.1-1. Insgesamt wurden 39 H- und 36 κ-Ketten analysiert. Diese Abbildung befindet sich auch auf einer der beigefügten Cd (siehe Anhang Teil VI).

3.1.2 Das Repertoire der oligoklonalen Antikörper ist Liquor-spezifisch

Die ausgeprägte und insbesondere charakteristische Überlappung der IgG-Proteome mit den Ig-V(D)J-Transkriptomen aus **Abschnitt 3.1.1** zeigen, dass Antikörper der OKB ihren Ursprung in Zellen der B-Zelllinie im Liquor haben. Um die Spezifität der Überlappung im Liquor zu überprüfen, wurden parallel IgG-Antikörper aus korrespondierenden Serumproben analysiert. Da OKB-Antikörper per Definition intrathekal synthetisiert werden, musste sich das Peptidrepertoire von Serum-IgG grundlegend vom Peptidrepertoire der Liquor-IgG unterscheiden.

Sera wurden zunächst auf die gleichen IgG-Konzentrationen der jeweiligen Liquorproben verdünnt, IgG-Antikörper über Protein G gereinigt und durch IEF getrennt. Serum-Antikörper wurden an exakt denselben Positionen aus dem IEF-Gel isoliert wie Liquor-Antikörper (**Abb. 3.1-1a, 3.1-2a, 3.1-3a und 3.1-4a**) und die Spaltpeptide mit MALDI-TOF Massenspektrometrie identifiziert. Für die Auswertung mit „Mascot“ dienten zuerst die Patienten-spezifischen Ig-V(D)J-Transkriptome aus **Abschnitt 3.1.1.1** als Datenbanken, jedoch führte diese Analyse zu keinen übereinstimmenden charakteristischen Peptiden. Im zweiten Schritt wurde eine Datenbank verwendet, welche alle Keimbahnsequenzen umfasste [59]. Dabei stellte sich heraus, dass sich der Großteil der Peptide von Serum-Antikörpern aus Keimbahn-codierten Sequenzen zusammensetzte. Sie deckten sich, im entscheidenden Gegensatz zu Liquor-Antikörpern, nicht mit dem Patienten-spezifischen Ig-V(D)J-Transkriptom der Liquor-B-Zellen. Außerdem wurde beobachtet, dass in Serumproben Peptide aus dem konstanten Teil der H-Ketten überwiegend als IgG2-Subtyp identifiziert wurden, wohingegen OKB-Antikörper hauptsächlich als IgG1 exprimiert wurden. Letzteres war ein weiterer Hinweis darauf, dass die Überlappung von IgG-Proteom und Ig-V(D)J-Transkriptom Liquor-spezifisch war, da bereits bei den Transkripten IgG1 dominierte.

3.1.3 Das Repertoire der oligoklonalen Antikörper ist Patienten-spezifisch

In einem weiteren Kontrollexperiment wurde überprüft, ob die Zuordnungen der Peptide aus **Abschnitt 3.1.1.4** möglicherweise auf falsch positiven Übereinstimmungen beruhten. Dies ist möglich, da Peptide mit gleicher Aminosäurezusammensetzung aber unterschiedlicher Sequenz eine identische Peptidmasse aufweisen. Außerdem können falsch positive Zuordnungen zustande kommen, wenn sich bei zwei Peptiden mit unterschiedlicher Aminosäurezusammensetzung innerhalb der Fehlertoleranz zufällig dieselbe Masse ergibt. Für den Spezifitätstest wurden Peptidmassen aus dem IgG-Proteom jeweils eines Patienten mit Ig-V(D)J-Transkriptomen aller anderen Patienten abgeglichen. Zusätzlich wurden Peptide, welche den H-Ketten zugeordnet wurden, den Transkriptdatenbanken der κ -Ketten

gegenübergestellt und umgekehrt. Für die Analyse wurden ausschließlich charakteristische Peptide herangezogen, da Keimbahn-codierte Peptide ohnehin in jedem Individuum vorkommen können. Das Resultat des Spezifitätstest zeigt **Tabelle 3.1-1**.

		Peptid- anzahl	JN-02 Ig-H	JN-02 Ig-κ	NS-52 Ig-H	NS-52 Ig-κ	NS-16 Ig-H	NS-16 Ig-κ	HM-03 Ig-H	HM-03 Ig-κ
JN-02	Ig-H	17	17	0	0	0	0	0	0	0
JN-02	Ig-κ	26	0	26	0	0	1	2	0	1
NS-52	Ig-H	29	0	0	29	1	1	0	2	0
NS-52	Ig-κ	17	1	0	1	17	0	1	2	0
NS-16	Ig-H	4	0	0	0	0	4	0	0	0
NS-16	Ig-κ	9	0	0	0	0	3	9	0	0
HM-03	Ig-H	26	0	0	2	0	0	0	26	1
HM-03	Ig-κ	10	0	1	0	1	0	0	0	10

Tab. 3.1-1: Spezifitätstest

Spalte 1 listet die Patienten sowie den Typ der Ig-Kette (H oder κ). Spalte 2 zeigt die Anzahl der Peptide, welche durch den Vergleich mit der jeweiligen Patienten-spezifischen Ig-V(D)J-Transkriptdatenbank als charakteristisch identifiziert wurden. Fettgedruckte und eingerahmte Zahlen in den folgenden Spalten geben die Zuordnungen in „korrekten“ Datenbanken wieder. Das bedeutet, dass Peptidmassen aus dem IgG-Proteom beispielsweise von Patient JN-02 entsprechend mit der Ig-V(D)J-Transkriptdatenbank desselben Patienten verglichen wurden. Diese Übereinstimmungen waren erwartet. Alle anderen Zahlen bilden Übereinstimmungen in „falschen“ Datenbanken ab, das heißt Datenbanken anderer Patienten oder eines anderen Ig-Typs.

Der Spezifitätstest ließ erkennen, dass Peptide nur in sehr wenigen Fällen auch in „falschen“ Datenbanken anderen Sequenzen zugeordnet wurden. Da größtenteils ausschließlich die Masse und nicht die Sequenz der identifizierten Peptide bekannt war, war es in diesen wenigen Fällen nicht möglich, zwischen „richtig“ und „falsch positiv“ zu unterscheiden. In 41 der insgesamt 56 Vergleiche war keine einzige falsch positive Übereinstimmung zu beobachten. Bei zehn Vergleichen wurde lediglich eine Zuordnung in einer „falschen“ Datenbank getroffen, in vier Fällen zwei Zuordnungen. Nur in einem Fall, bei Patient NS-16, wurden drei Peptidmassen der κ-Kette auch in der Datenbank der H-Kette desselben Patienten gefunden. Der Spezifitätstest machte deutlich, dass die als charakteristisch identifizierten Peptide aus **Abschnitt 3.1.1.4** tatsächlich Patienten-spezifisch waren und offensichtlich größtenteils nicht auf zufällig identischen Peptidmassen beruhen.

Anhand der ausgeprägten und signifikanten Überlappung von IgG-Proteomen und Ig-V(D)J-Transkriptomen konnte erstmals gezeigt werden, dass OKB-Antikörper ihren Ursprung in Zellen der B-Zelllinie im Liquor haben. Dennoch ist es denkbar, dass die B-Zellpopulation im Liquor nicht das gesamte OKB-Repertoire abdeckt, sondern noch weitere B-Zellen zur Produktion der oligoklonalen Antikörper beitragen. Damit beschäftigte sich das zweite Projekt der vorliegenden Arbeit (**Abschnitt 3.2**).

3.2 Vergleich von Immunglobulin-Repertoires in Liquor und Gehirn

Affinitätsgereifte Zellen der B-Zelllinie sind bei MS-Patienten nicht nur im Liquor nachzuweisen, sondern auch nahe der demyelinisierenden Herde im Gehirnparenchym. Ob auch diese an der Produktion der Antikörper im Liquor beteiligt sind, wurde durch Anwendung der in **Abschnitt 3.1** vorgestellten Technologie untersucht. Hierfür wurde zunächst das IgG-Proteom aus Liquor mittels Massenspektrometrie analysiert und im Anschluss mit den Ig-V(D)J-Transkriptomen von Liquor und Läsionen im Gehirn verglichen. Liquor und Hirngewebe desselben Patienten liegen nur äußerst selten parallel vor. Für diese Studie stand aber dennoch Material von drei MS-Patienten zur Verfügung.

Liquor sowie Gehirnmateriale der Patienten MS-4 und MS-B2A wurden unmittelbar nach Entnahme bei Autopsien, welche am *Center for Neurologic Diseases* am *Brigham and Women's Hospital* (Boston) durchgeführt wurden, eingefroren. Die Rohdaten der Ig-V(D)J-Transkriptomanalyse aus Liquor und Gehirn wurden von der Arbeitsgruppe um Dr. Kevin C. O'Connor an der *Harvard Medical School* (Boston) generiert. Die Auswertung dieser Sequenzen sowie die Analyse des IgG-Proteoms aus Liquor wurden eigenständig bearbeitet. Die Ergebnisse sind in den **Abschnitten 3.2.1** und **3.2.2** zusammengefasst. **Abschnitt 3.2.3** beschäftigt sich mit der Analyse von Patient L-296. Die Arbeiten zu diesem Teil des Projekts wurden vollständig selbst durchgeführt. Hier war die molekularbiologische Analyse der Hirnbiopsie, wie später noch erläutert wird, nur eingeschränkt möglich, da das Material in Formalin fixiert war.

3.2.1 Einige B-Zellen im Liquor sind mit B-Zellen im Gehirn verwandt

Von Patient MS-4 wurden drei anatomisch voneinander getrennte Plaques untersucht, von Patient MS-B2A sechs verschiedene Plaques. Die Plaques waren in allen Fällen in der weißen Gehirnschicht lokalisiert. Von der Arbeitsgruppe in Boston wurden aus Gefrierschnitten sowie korrespondierenden Liquores Gesamt-RNA isoliert, cDNA der Ig-V(D)J-Regionen amplifiziert und einzelne Ketten sequenziert. Die so generierten Rohdaten wurden mir für das weitere Vorgehen zur Verfügung gestellt. Äquivalent zum ersten Projekt wurden die Ig-V(D)J-Transkripte den verschiedenen Subfamilien zugeordnet und durch den Vergleich mit den Keimbahnsequenzen Aminosäureaustausche infolge von SHM identifiziert. Die gesamte Ig-V(D)J-Transkriptomanalyse für die H-Ketten von Patient MS-4 ist in **Abbildung 3.2-1** gezeigt. Diese Abbildung beinhaltet auch die eigens durchgeführte IgG-Proteomanalyse, in der parallel Liquor-Antikörper mit Massenspektrometrie untersucht wurden. Die Ergebnisse dieses Teils der Arbeit werden aber erst in **Abschnitt 3.2.2** erläutert.

Transkripte mit identischer oder ähnlicher CDR3-Region sind in **Abbildung 3.2-1** gruppiert. Dadurch wurden bei den H-Ketten von Patient MS-4 Überlappungen im Ig-V(D)J-Transkriptom von Liquor und Gehirn erkennbar. Insgesamt vier CDR3-Sequenzen konnten sowohl im Liquor als auch im Gehirn detektiert werden (VH1-02/a bis m, VH2-05/a bis c, VH2-05/d bis VH2-26/a, VH3-48/a bis VH3-09/a). Innerhalb einer Gruppe mit übereinstimmender CDR3-Region wiesen die Sequenzen ein nahezu identisches SHM-Muster auf. Interessanterweise gab es innerhalb dieser vier Gruppen drei Sequenzen, welche in unterschiedlichen Kompartimenten eine exakt gleiche Aminosäuresequenz zeigten: VH1-02/b (Liquor, Plaques 4 und 10), VH2-05/b (Liquor, Plaque 4) und VH3-48/c (Liquor, Plaques 5 und 10). Zudem gab es eine Gruppe von Sequenzen, welche mit gleicher CDR3-Region und ähnlicher V-Region in zwei verschiedenen Läsionen nachzuweisen waren: VH3-48/h bis VH3-48/o in Plaques 4 und 10. Die Ketten VH3-48/i und VH3-48/n waren sogar mit identischer VDJ-Sequenz in beiden Läsionen zu detektieren. Alle weiteren H-Ketten des Patienten MS-4 waren spezifisch für eine bestimmte Läsion oder für Liquor.

Die äquivalente Darstellung der Ergebnisse für die L-Ketten von Patient MS-4 sowie für H- und L-Ketten von Patient MS-B2A ist im **Anhang Teil III** aufgeführt.

Bei den L-Ketten von Patient MS-4 konnten drei Gruppen mit gleicher CDR3-Region definiert werden, welche in beiden Kompartimenten vorkamen: V κ I-A20/a bis V κ I-L5/a, V κ I-O8/a bis c, V κ I-O8/e bis V κ III-A27/c (**Abb. III-1**). Die Sequenzen der V-Regionen wiesen jedoch große Unterschiede auf. Wie bei der H-Kette gab es auch bei den L-Ketten eine Läsions-überlappende CDR3-Sequenz: V κ I-O2/d bis V κ I-A20/b in Plaques 4 und 5. Alle weiteren Sequenzen waren einzigartig für Liquor beziehungsweise eine bestimmte Läsion.

Bei Patient MS-B2A war die Überlappung zwischen den Kompartimenten weniger stark ausgeprägt als bei Patient MS-4. Im Fall der H-Ketten wurden zwei identische CDR3-Sequenzen im Liquor und Gehirn (VH1-18/a und b, VH1-18/c bis e) und weitere drei CDR3-Regionen detektiert, welche aus verschiedenen Läsionen isoliert werden konnten (VH1-18/f und g, VH3-07/a, VH3-23/a bis VH3-30/a) (**Abb. III-2a**). Die H-Ketten VH1-18/d, VH1-18/f, VH3-07/a, VH3-23/a und VH3-23/b stimmten mit ihrer gesamten V(D)J-Region in unterschiedlichen Plaques überein. Für die κ -Ketten ergaben sich ebenso zwei CDR3-Sequenzen im Liquor und Gehirn (V κ I-O2/a bis V κ I-L2/b, V κ I-A30/a bis V κ I-L5/a) sowie vier CDR3-Regionen in unterschiedlichen Läsionen (V κ I-O2/b bis V κ I-O2/l, V κ I-O2/m bis V κ I-L12/c, V κ I-O2/r und s, V κ III-A27/a) (**Abb. III-2b**). In den jeweiligen Gruppen unterschieden sich die Mutationsmuster zum Teil stark. Nur in einem einzigen Fall konnten identische Sequenzen im gesamten V- und J-Teil nachgewiesen werden (V κ I-O2/m, Plaques 3, 6 und 7). 17 von 18 analysierten Ig- λ -Transkripten waren spezifisch für Liquor, V λ 1-c/a wurde ausschließlich in Plaque 11 nachgewiesen (**Abb. III-2c**).

Plaque Nr.	Liquor				V-H	Familie
	4	1	9	10		
3-74/a	x					EVOLVESGGILVDPGGSLRUSCAASGFTFSS... HMMIWRQ PEKGIWVVRSLNK... DGSEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... DIGQWZKADYWGQTLVTVSSASSTK
5-a	x					EVOLVSGAEVKKPKRSIRITISKGGSGYFETS... YMLSWVR QKRGLEWMMGRDP... SDEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
5-a/b		x				EVOLVSGAEVKKPKRSIRITISKGGSGYFETS... YMLSWVR QKRGLEWMMGRDP... SDEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
1-02/a			x			EVOLVSGAEVKKPKRSIRITISKGGSGYFETS... YMLSWVR QKRGLEWMMGRDP... SDEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
1-02/b				x		EVOLVSGAEVKKPKRSIRITISKGGSGYFETS... YMLSWVR QKRGLEWMMGRDP... SDEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
1-03/a						EVOLVSGAEVKKPKRSIRITISKGGSGYFETS... YMLSWVR QKRGLEWMMGRDP... SDEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
1-08/a						EVOLVSGAEVKKPKRSIRITISKGGSGYFETS... YMLSWVR QKRGLEWMMGRDP... SDEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
1-18/a						EVOLVSGAEVKKPKRSIRITISKGGSGYFETS... YMLSWVR QKRGLEWMMGRDP... SDEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
1-58/a						EVOLVSGAEVKKPKRSIRITISKGGSGYFETS... YMLSWVR QKRGLEWMMGRDP... SDEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
2-26/a						EVOLVSGAEVKKPKRSIRITISKGGSGYFETS... YMLSWVR QKRGLEWMMGRDP... SDEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
3-23/a						EVOLVSGAEVKKPKRSIRITISKGGSGYFETS... YMLSWVR QKRGLEWMMGRDP... SDEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
3-48/a						EVOLVSGAEVKKPKRSIRITISKGGSGYFETS... YMLSWVR QKRGLEWMMGRDP... SDEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
3-48/b						EVOLVSGAEVKKPKRSIRITISKGGSGYFETS... YMLSWVR QKRGLEWMMGRDP... SDEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
3-48/c						EVOLVSGAEVKKPKRSIRITISKGGSGYFETS... YMLSWVR QKRGLEWMMGRDP... SDEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
3-48/d						EVOLVSGAEVKKPKRSIRITISKGGSGYFETS... YMLSWVR QKRGLEWMMGRDP... SDEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
3-11/a						EVOLVSGAEVKKPKRSIRITISKGGSGYFETS... YMLSWVR QKRGLEWMMGRDP... SDEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
3-15/a						EVOLVSGAEVKKPKRSIRITISKGGSGYFETS... YMLSWVR QKRGLEWMMGRDP... SDEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
2-05/a						QVTLIKESGPTLVKAPQTLTITCTVRSRSTLTSKQWGMVTRKPTKAKHMLAIHY... WNDRK ILTPISKSRITITKPTKSKQVVLTPMMPVITA TYCAIE ... ENYIR SRHLYCYPAR...FDYWGQTLVTVSSASSTK
2-26/a						QVTLIKESGPTLVKAPQTLTITCTVRSRSTLTSKQWGMVTRKPTKAKHMLAIHY... WNDRK ILTPISKSRITITKPTKSKQVVLTPMMPVITA TYCAIE ... ENYIR SRHLYCYPAR...FDYWGQTLVTVSSASSTK
2-26/b						QVTLIKESGPTLVKAPQTLTITCTVRSRSTLTSKQWGMVTRKPTKAKHMLAIHY... WNDRK ILTPISKSRITITKPTKSKQVVLTPMMPVITA TYCAIE ... ENYIR SRHLYCYPAR...FDYWGQTLVTVSSASSTK
2-26/c						QVTLIKESGPTLVKAPQTLTITCTVRSRSTLTSKQWGMVTRKPTKAKHMLAIHY... WNDRK ILTPISKSRITITKPTKSKQVVLTPMMPVITA TYCAIE ... ENYIR SRHLYCYPAR...FDYWGQTLVTVSSASSTK
2-26/d						QVTLIKESGPTLVKAPQTLTITCTVRSRSTLTSKQWGMVTRKPTKAKHMLAIHY... WNDRK ILTPISKSRITITKPTKSKQVVLTPMMPVITA TYCAIE ... ENYIR SRHLYCYPAR...FDYWGQTLVTVSSASSTK
3-07/a						EVOLVESGELIVDPGGSLRUSCAASGFTFSS... YMMIWR QAKCK GLEWVANIKQ ... DGSEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
3-07/b						EVOLVESGELIVDPGGSLRUSCAASGFTFSS... YMMIWR QAKCK GLEWVANIKQ ... DGSEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
3-07/c						EVOLVESGELIVDPGGSLRUSCAASGFTFSS... YMMIWR QAKCK GLEWVANIKQ ... DGSEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
3-07/d						EVOLVESGELIVDPGGSLRUSCAASGFTFSS... YMMIWR QAKCK GLEWVANIKQ ... DGSEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
3-07/e						EVOLVESGELIVDPGGSLRUSCAASGFTFSS... YMMIWR QAKCK GLEWVANIKQ ... DGSEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
3-07/f						EVOLVESGELIVDPGGSLRUSCAASGFTFSS... YMMIWR QAKCK GLEWVANIKQ ... DGSEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
3-07/g						EVOLVESGELIVDPGGSLRUSCAASGFTFSS... YMMIWR QAKCK GLEWVANIKQ ... DGSEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
3-07/h						EVOLVESGELIVDPGGSLRUSCAASGFTFSS... YMMIWR QAKCK GLEWVANIKQ ... DGSEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
3-07/i						EVOLVESGELIVDPGGSLRUSCAASGFTFSS... YMMIWR QAKCK GLEWVANIKQ ... DGSEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
3-07/k						EVOLVESGELIVDPGGSLRUSCAASGFTFSS... YMMIWR QAKCK GLEWVANIKQ ... DGSEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
3-07/l						EVOLVESGELIVDPGGSLRUSCAASGFTFSS... YMMIWR QAKCK GLEWVANIKQ ... DGSEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
3-07/m						EVOLVESGELIVDPGGSLRUSCAASGFTFSS... YMMIWR QAKCK GLEWVANIKQ ... DGSEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
3-07/n						EVOLVESGELIVDPGGSLRUSCAASGFTFSS... YMMIWR QAKCK GLEWVANIKQ ... DGSEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
3-07/o						EVOLVESGELIVDPGGSLRUSCAASGFTFSS... YMMIWR QAKCK GLEWVANIKQ ... DGSEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
3-33/a						EVOLVESGELIVDPGGSLRUSCAASGFTFSS... YMMIWR QAKCK GLEWVANIKQ ... DGSEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
3-07/p						EVOLVESGELIVDPGGSLRUSCAASGFTFSS... YMMIWR QAKCK GLEWVANIKQ ... DGSEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
3-07/q						EVOLVESGELIVDPGGSLRUSCAASGFTFSS... YMMIWR QAKCK GLEWVANIKQ ... DGSEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
3-07/r						EVOLVESGELIVDPGGSLRUSCAASGFTFSS... YMMIWR QAKCK GLEWVANIKQ ... DGSEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
3-07/s						EVOLVESGELIVDPGGSLRUSCAASGFTFSS... YMMIWR QAKCK GLEWVANIKQ ... DGSEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
3-07/t						EVOLVESGELIVDPGGSLRUSCAASGFTFSS... YMMIWR QAKCK GLEWVANIKQ ... DGSEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
3-07/u						EVOLVESGELIVDPGGSLRUSCAASGFTFSS... YMMIWR QAKCK GLEWVANIKQ ... DGSEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
3-07/v						EVOLVESGELIVDPGGSLRUSCAASGFTFSS... YMMIWR QAKCK GLEWVANIKQ ... DGSEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
3-07/w						EVOLVESGELIVDPGGSLRUSCAASGFTFSS... YMMIWR QAKCK GLEWVANIKQ ... DGSEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
3-09/a						EVOLVESGELIVDPGGSLRUSCAASGFTFSS... YMMIWR QAKCK GLEWVANIKQ ... DGSEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
3-11/a						EVOLVESGELIVDPGGSLRUSCAASGFTFSS... YMMIWR QAKCK GLEWVANIKQ ... DGSEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK
3-15/a						EVOLVESGELIVDPGGSLRUSCAASGFTFSS... YMMIWR QAKCK GLEWVANIKQ ... DGSEIIV YADSVK REFTLSR NRKNTLYLQMSLRRAEDTAVYCAR... INAAIDV IRSRPPIH...WFDYWGQTLVTVSSASSTK

Abb. 3.2-1: Überlappung des Liquor-Proteoms mit Ig-V(D)J-Transkriptomen aus Liquor und drei verschiedenen Plaques von Patient MS-4

Analyse der H-Ketten. Insgesamt wurden 108 Ig-H-Transkripte aus Liquor und drei Gehirnplaques untersucht. „X“ in Spalte 1 gibt an, in welcher Läsion beziehungsweise in welchem Kompartiment die Sequenz detektiert wurde. Alle mit MALDI-TOF Massenspektrometrie identifizierten Peptide aus Liquor-Antikörpern sind blau unterlegt. Diese Ergebnisse sind in **Abschnitt 3.2.2** näher erläutert. Ketten, für welche mindestens ein charakteristisches Peptid identifiziert wurde, sind in der linken Spalte blau markiert. Identische Transkripte in beiden Kompartimenten sind rosa gekennzeichnet. Über Tandem-Massenspektrometrie verifizierte Peptide sind unterstrichen. Weitere Details siehe Legende der **Abbildung 3.1-1**. Diese Abbildung befindet sich auch auf einer der Arbeit beigefügten Cd (siehe **Anhang Teil VI**).

3.2.2 B-Zellen im Gehirn tragen zum Liquor-Antikörperrepertoire bei

Die eben erläuterte Analyse der Ig-V(D)J-Transkriptome aus Liquor und Gehirn der Patienten MS-4 und MS-B2A diene als Grundlage für den Vergleich mit dem IgG-Proteom aus Liquor. Antikörper wurden über Protein G aus Liquor gereinigt, deglykosyliert, mittels 2D-Gelelektrophorese unter nicht-reduzierenden Bedingungen getrennt und schließlich aus dem Gel isoliert. Die Ausschnitte der 2D-Gele, welche die ausgestanzten Spots für die weiterführende massenspektrometrische Analyse zeigt, sind in **Abbildung 3.2-2** aufgeführt.

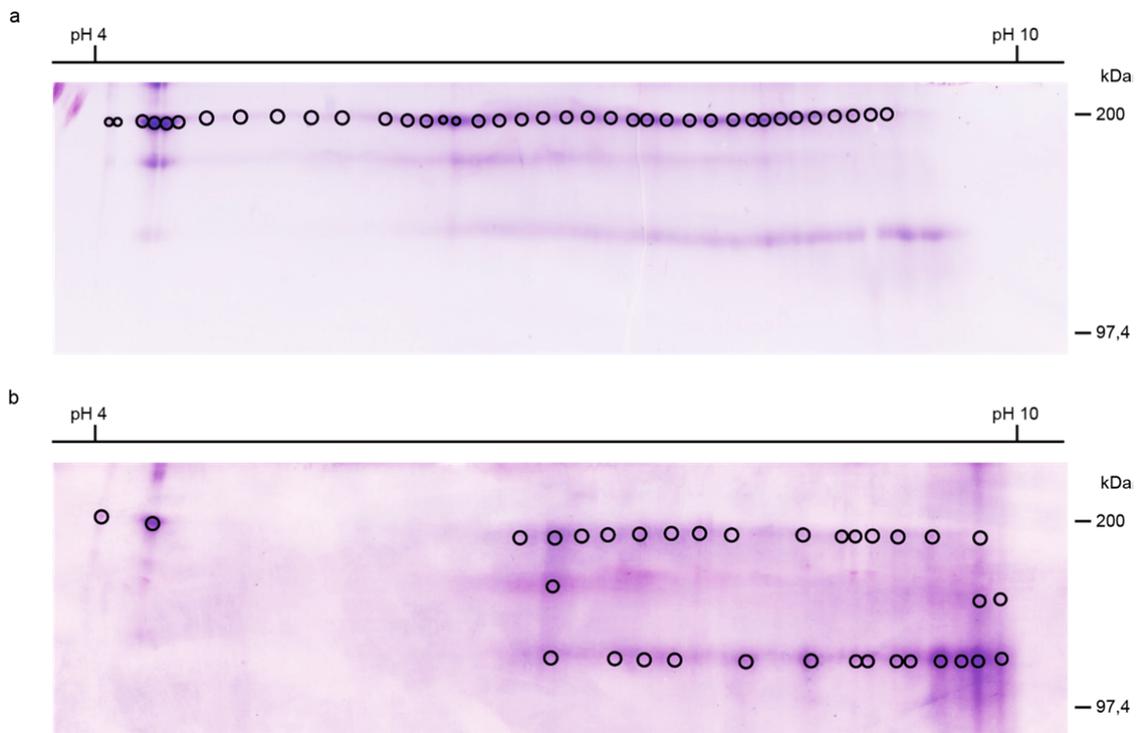


Abb. 3.2-2: 2D-Gelelektrophorese gereinigter Liquor-Antikörper der Patienten MS-4 und MS-B2A

Antikörper wurden mit Protein G-Affinitätschromatographie aus Liquor isoliert, deglykosyliert und über 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt: in der ersten Dimension durch IEF zwischen pH 3 und 10, in der zweiten Dimension über SDS-PAGE mit einem 9%-igen Polyacrylamidgel. Die Proteine wurden mit Coomassie-Blau gefärbt. Die markierten Antikörperspots wurden aus dem Gel isoliert, mit Trypsin verdaut und die Spaltpeptide im Anschluss mit Massenspektrometrie identifiziert.

(a) Patient MS-4 (b) Patient MS-B2A

Wie später in **Abschnitt 3.3** noch erläutert wird, war trotz nicht-reduzierender Bedingungen ein partielles Aufbrechen der Disulfidbrücken zwischen H- und L-Ketten zu beobachten. Dadurch entstanden drei distinkte Reihen unterschiedlicher Molekulargewichte: intakte Heterodimere bestehend aus zwei H- und zwei L-Ketten (H_2L_2) mit einem apparentem Molekulargewicht von circa 200 kDa, Komplexe aus zwei H-Ketten und einer L-Kette (H_2L) mit etwa 150 kDa sowie Homodimere aus zwei H-Ketten (H_2) bei ungefähr 125 kDa. Alle

apparenten Molekulargewichte waren jeweils um 25 bis 50 kDa nach oben verschoben, sodass beispielsweise die intakten Heterodimere auf einer Höhe von 200 kDa statt bei 150 kDa zu detektieren waren. Dies ist vermutlich darin begründet, dass die Proteine im Harnstoff der IEF und des Äquilibrationpuffers entfaltet werden und demzufolge ein anderes Laufverhalten zeigen als in ihrer kompakten Konformation.

Aus den 2D-Gelen wurden bevorzugt intakte H₂L₂-Heterodimere isoliert. Aufgrund der eingeschränkteren Heterogenität und etwas schwächeren Coomassie-Färbung bei Patient MS-B2A (**Abb. 3.2-2b**) im Vergleich zu Patient MS-4 (**Abb. 3.2-2a**) wurden aus dem 2D-Gel von Patient MS-B2A neben H₂L₂-Heterodimeren auch H₂L- sowie H₂-Komplexe ausgestanzt. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass in beiden Fällen eine ausreichende Menge an Antikörpern analysiert wurde. Die Antikörper wurden anschließend durch proteolytischen Verdau für die Massenspektrometrie vorbereitet. Insgesamt wurden für Patient MS-4 38 Spots und für Patient MS-B2A 34 Spots untersucht. Jeweils die Hälfte wurde mit MALDI-TOF analysiert, der Rest alternierend mit LC-ESI.

Die Auswertung der Massenspektrometrie-Daten erfolgte äquivalent zum ersten Projekt. Hierfür wurden die Patienten-spezifischen Ig-V(D)J-Transkriptdatenbanken aus **Abschnitt 3.2.1** mit allen Sequenzen aus Liquor und den verschiedenen Gehirnläsionen in das „Mascot“-Programm eingegeben. Übereinstimmende Peptide der H-Ketten sind für Patient MS-4 in **Abbildung 3.2.1** blau markiert, das Ergebnis der L-Ketten ist im **Anhang Teil III** in **Abbildung III-1** zu finden. Für Patient MS-B2A sind die entsprechenden Daten im **Anhang Teil III** in **Abbildung III-2** zusammengefasst. Unterstrichene Sequenzen konnten durch Tandem-Massenspektrometrie verifiziert werden. Die Auswertung ergab für beide Patienten zahlreiche Peptide, welche den Ig-V(D)J-Transkriptomen der unterschiedlichen Kompartimente zugeordnet werden konnten. Neben Keimbahn-codierten Sequenzen wurden auch etliche charakteristische Peptide identifiziert, welche SHM aufwiesen oder in der hypervariablen CDR3-Region lagen.

Um die Überlappung des IgG-Proteoms aus Liquor mit den Ig-V(D)J-Transkriptomen von Gehirn und Liquor zu quantifizieren, wurden ausschließlich charakteristische Peptide zur Auswertung herangezogen. Es wurden alle Transkripte gezählt, für die aus dem Liquor-Antikörperrepertoire mindestens ein charakteristisches Peptid identifiziert werden konnte. Aus der Gesamtzahl der analysierten Ig-Ketten konnte dann der jeweilige prozentuale Anteil, welcher vom IgG-Proteom aus Liquor abgedeckt wird, berechnet werden. Die Quantifizierung ist in **Abbildung 3.2-3** dargestellt.

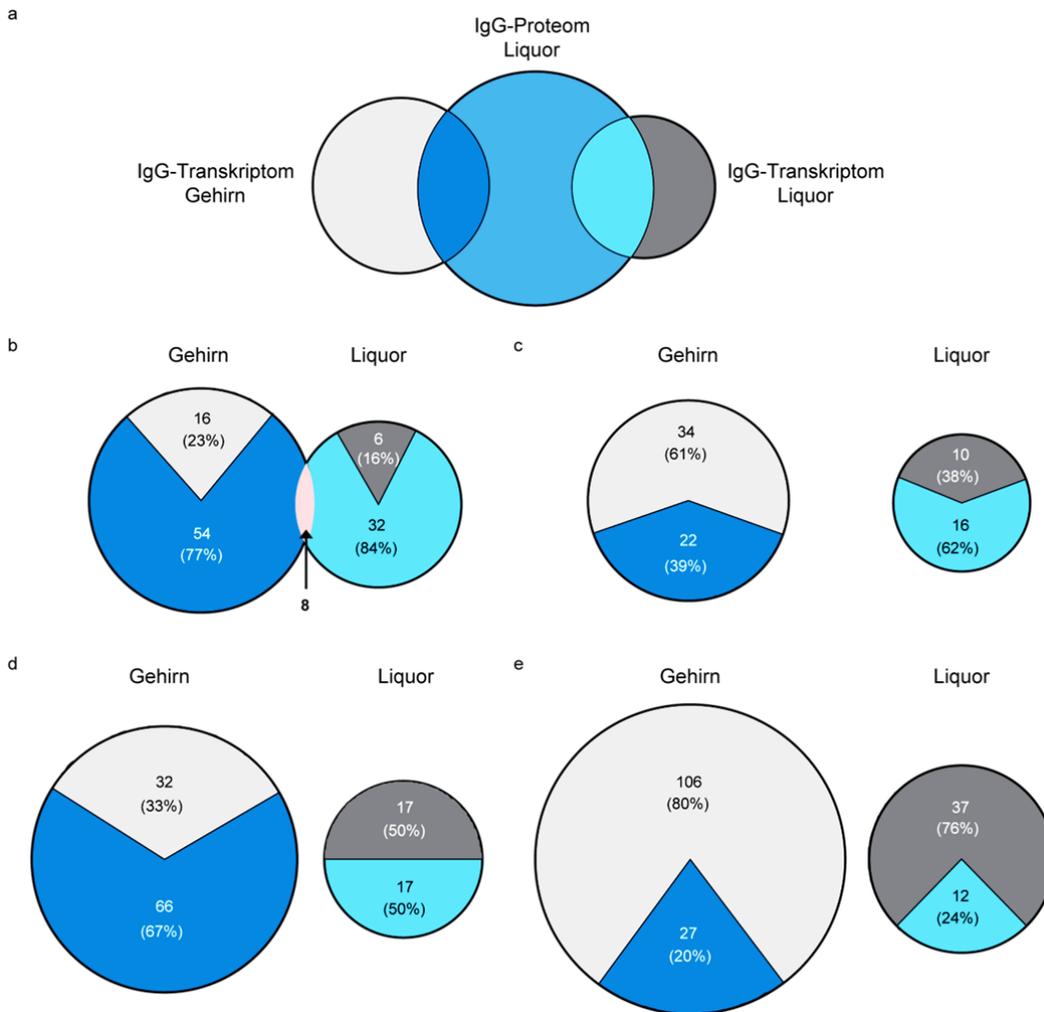


Abb. 3.2-3: Abdeckung der Ig-V(D)J-Transkriptome aus Gehirn und Liquor durch das Liquor-Proteom von Patient MS-4 und MS-B2A

(a) Prinzip der Analyse. IgG-Transkriptome aus verschiedenen Gehirnläsionen (hellgrauer Kreis) und Liquor (dunkelgrauer Kreis) wurden über cDNA-Klonierung erstellt (Rohdaten von Dr. Kevin C. O'Connor). Proteomdaten (blauer Kreis) stammten aus eigens durchgeführter massenspektrometrischer Analyse gereinigter IgG-Antikörper aus Liquor. Der Anteil der Überlappung der Repertoires ist in dunkelblau (Transkriptom aus Gehirn mit Proteom aus Liquor) beziehungsweise hellblau (Transkriptom aus Liquor mit Proteom aus Liquor) dargestellt. Für die Auswertung der Überlappung wurden ausschließlich charakteristische Peptide herangezogen, das heißt Peptide mit SHM oder Lokalisation in der hypervariablen CDR3-Region. Transkripte, für welche mindestens ein charakteristisches Peptid aus dem Liquor-Proteom identifiziert wurde, wurden in (b) bis (e) den überlappenden Populationen der Gehirnläsionen (dunkelblau) beziehungsweise Liquor (hellblau) zugeordnet. Transkripte, welche entweder durch kein Peptid oder ausschließlich von Keimbahncodierten Peptiden abgedeckt wurden, sind der nicht-überlappenden Population der Gehirnläsionen (hellgrau) beziehungsweise Liquor (dunkelgrau) zugewiesen. Die absoluten Zahlen der Transkripte sind gemeinsam mit den errechneten prozentualen Anteilen innerhalb der entsprechenden Kreise aufgeführt. (b) Analyse der H-Ketten von Patient MS-4. Die rosa Überlappung weist auf diejenigen acht Transkripte hin, welche mit drei identischen VDJ-Sequenzen sowohl im Liquor als auch in verschiedenen Plaques im Gehirn detektiert wurden (siehe Abb. 3.2-1). Alle drei Sequenzen wurden durch das Liquor-Proteom mit mindestens einem charakteristischen Peptid abgedeckt. (c) Analyse der L-Ketten von Patient MS-4. (d) Analyse der H-Ketten von Patient MS-B2A. (e) Analyse der L-Ketten von Patient MS-B2A.

Bei den H-Ketten des Patienten MS-4 deckten die Liquor-Antikörper 77% aller Transkripte aus Gehirnläsionen und 84% aller Transkripte aus Liquor ab (**Abb. 3.2-3b**). Für die übrigen Ig-H-Transkripte konnte entweder kein Peptid oder lediglich ein Peptid mit Keimbahn-codierter Sequenz bestimmt werden. Interessanterweise waren auch für die drei Transkripte von insgesamt acht Klonen, welche mit der gesamten VDJ-Sequenz sowohl im Liquor als auch in verschiedenen Plaques nachzuweisen waren, übereinstimmende charakteristische Peptide zu finden: VH1-02/b, VH2-05/b und VH3-48/c (in **Abb. 3.2-1** und **Abb. 3.2-3b** rosa markiert). Für die L-Ketten von Patient MS-4 ergaben sich Übereinstimmungen für 39% der Transkripte aus Gehirn und 62% der Transkripte aus Liquor (**Abb. 3.2-3c**). In **Abbildung III-1** im **Anhang Teil III** fällt auf, dass für Plaque 10 überwiegend nur der Keimbahn-codierte aminoternale Sequenzabschnitt identifiziert wurde. Ig- κ -Transkripte dieser Läsion werden demzufolge von Liquor-Antikörpern nicht abgedeckt.

Für Patient MS-B2A stellten sich insgesamt geringere aber dennoch signifikante Prozentsätze heraus. Im Fall der H-Ketten stimmte für 67% aller Transkripte aus Gehirn und 50% aus Liquor mindestens ein charakteristisches Peptid überein (**Abb. 3.2-3d**). Die L-Ketten wurden zu 20% für Gehirn und zu 24% für Liquor von Liquor-Antikörpern abgedeckt (**Abb. 3.2-3e**). Wie **Abbildung III-2b** im **Anhang Teil III** zu entnehmen ist, waren die meisten identifizierten Peptide Keimbahn-codiert und erfüllten damit nicht die Voraussetzung für eine charakteristische Überlappung.

Die Daten zeigten anhand zahlreicher charakteristischer überlappender Peptide, dass auch Zellen der B-Zelllinie, welche direkt aus den entzündlichen Plaques im Gehirn isoliert wurden, zum Antikörperrepertoire im Liquor beitragen.

3.2.3 Untersuchungen mit Formalin-fixiertem Hirngewebe

Von Patient L-296 stand nur eine Hirnbiopsie zur Verfügung, welche nach Entnahme mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet wurde. Erfahrungsgemäß ist die Konservierung der RNA in solchen Fällen unzureichend, um Transkripte von einer Länge über 100 Nukleotiden isolieren zu können. Die Ig-V(D)J-Region weist jedoch eine Länge von 350 bis 500 bp auf. Aus diesem Grund standen lediglich kurze charakteristische Sequenzabschnitte im variablen Teil im Fokus, welche mithilfe Klon-spezifischer Primer aus dem FFPE-Gewebe amplifiziert werden sollten.

3.2.3.1 Identifizierung klonal expandierter B-Zellen im Liquor

Zunächst wurde das Ig-V(D)J-Transkriptom von Zellen der B-Zelllinie aus Liquor erstellt. Nach RNA-Extraktion aus dem Zellsediment und cDNA-Synthese wurden die Ig-V(D)J-Transkripte mit PCR amplifiziert. Durch den Einsatz eines Primers spezifisch für den IgG2-Subtyp wurde das Repertoire der H-Ketten erweitert. Insgesamt wurden 383 Sequenzen ausgewertet. Wichtiger Bestandteil war neben der Identifizierung aller SHM die Detektion klonal expandierter B-Zellen. Es handelte sich um die IgG1-Ketten VH4-39/b (54x aus 106 analysierten Klonen), VH4-59/i (17 aus 106), die IgG2-Kette VH3-74/b (45 aus 96), die Kappa-Kette V κ I-O2/O12/b (102 aus 116) sowie die Lambda-Kette V λ 3-h/e (41 aus 65). Das gesamte Ig-V(D)J-Transkriptom des Patienten L-296 befindet sich im **Anhang Teil III, Abbildung III-3**.

3.2.3.2 Klon-spezifische PCR mit Formalin-fixiertem Hirngewebe

Aus Paraffinschnitten wurde Gesamt-RNA isoliert und diese unspezifisch mit *Random Hexamer* Primern in cDNA umgeschrieben. Für die anschließende PCR wurden Klon-spezifische Primer für die in **Abschnitt 3.2.3.1** identifizierten Ketten klonal expandierter B-Zellklone nach folgenden Kriterien entworfen: die Positionen der Primer wurden so gewählt, dass kurze Amplikons von 50 bis 100 bp generiert wurde. Damit das DNA-Fragment trotz der kurzen Sequenz charakteristisch war, musste das Amplikon SHM aufweisen oder die hypervariable CDR3-Region umfassen. Um die Spezifität der PCR zu erhöhen, endeten die Primer am 5'-Ende mit einem mutierten Nukleotid. Die Taq-Polymerase konnte dadurch die Elongation nur dann fortsetzen, wenn auch dieses Nukleotid mit dem komplementären DNA-Strang hybridisierte. Für jede der fünf Ig-Ketten, die man im Hirngewebe nachzuweisen versuchte, wurden je zwei charakteristische DNA-Sequenzen ausgewählt. Eine der beiden Sequenzen umfasste dabei immer auch die hypervariable CDR3-Region. Nach Trennung der PCR-Produkte in einem Agarosegel wurden die Banden aus dem Gel isoliert und sequenziert. Für zwei der fünf Ketten konnten die korrekten Sequenzen für beide unabhängig voneinander amplifizierten charakteristischen Bereiche nachgewiesen werden: VH4-59/i (**Abb. 3.2-4a**) und V κ I-O2/b (**Abb. 3.2-4b**). Für die anderen expandierten B-Zellklone (VH4-39/b, VH3-74/b, V λ 3-h/e) erhielt man entweder kein PCR-Produkt oder das Amplikon enthielt eine völlig andere Sequenz als im Liquor. Letztere Beobachtung wies darauf hin, dass weitere B-Zellen in der Läsion vorhanden waren, welche im Ig-V(D)J-Transkriptom des Liquors nicht enthalten oder nicht klonal expandiert waren.

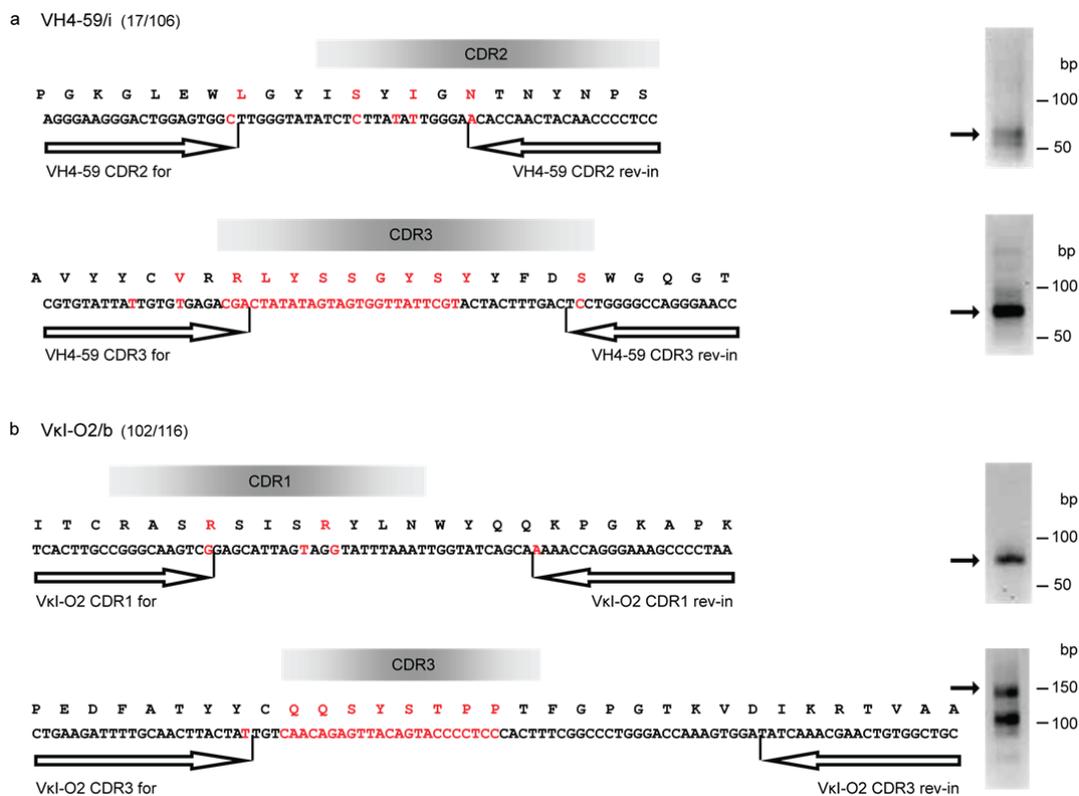


Abb. 3.2-4: Nachweis überlappender Ig-V(D)J-Transkripte in Liquor und Gehirn bei Patient L-296

Im ersten Schritt wurden expandierte B-Zellklone im Liquor identifiziert. Dann wurde mithilfe Klon-spezifischer PCR versucht, deren Ig-V(D)J-Transkripte in der Formalin-fixierten Hirnbiopsie nachzuweisen. Für zwei der fünf untersuchten Ig-Ketten konnten identische Sequenzen in der Läsion detektiert werden: VH4-59/i (a) und VκI-O2/b (b). Die klonale Expansion ist in Klammern angegeben. Die H-Kette VH4-59/a wurde im Liquor 17x aus 106 analysierten IgG1-Transkripten identifiziert, die κ-Kette VκI-O2/b 102x aus 116 analysierten κ-Ketten. Pfeile markieren die Positionen der inneren Primer der *Semi-Nested* PCR. Die Primer endeten, falls möglich, mit einem somatisch hypermutierten Nukleotid (rot). Für jede Kette wurden zwei unabhängige charakteristische Sequenzen amplifiziert, wovon eine die hypervariable CDR3-Region umfasste. PCR-Produkte wurden über ein 2,5%-iges Agarosegel getrennt (Bildausschnitt rechts), aus dem Gel extrahiert und sequenziert. In den mit Pfeilen markierten Banden des Agarosegels konnte jeweils eine zu 100% identische Nukleotidsequenz nachgewiesen werden.

Für die CDR3-Region von VκI-O2/b wurde im Agarosegel ein PCR-Produkt nachgewiesen, welches größer war als erwartet: knapp 150 bp statt der errechneten Größe von 97 bp (Abb. 3.2-4b). Die Sequenzierung zeigte, dass sich die Primersequenz von „VκI-O2 CDR3 for“ wiederholte, bevor die einwandfrei lesbare CDR3-Sequenz und die Sequenz des *reverse* Primers folgten. Die Sequenzierung der vier PCR-Produkte, welche aus dem Agarosegel isoliert wurden, ergaben in allen vier Fällen eine zu 100% identische Nukleotidsequenz inklusive aller SHM. Demzufolge konnte nach Patient MS-4 und MS-B2A auch bei Patient L-296 gezeigt werden, dass B-Zellen im Liquor und Gehirn verwandt sind.

3.3 Etablierung eines Protokolls für hochauflösende Antikörpertrennung

Das langfristige Ziel des Projekts ist die Identifizierung von Antigenen der oligoklonalen Antikörper. Um dies zu ermöglichen, war es notwendig ein neues Protokoll zu etablieren, das die Zuordnung gepaarter H- und L-Ketten eines einzelnen expandierten Antikörpers erlaubt. Im Verlauf des ersten Projekts (**Abschnitt 3.1**) wurde festgestellt, dass die bislang angewandte Methode zur Antikörpertrennung dafür nicht ausreicht. Lediglich in einem einzigen Fall konnte durch Anwendung einer semi-quantitativen Auswertung der Massenspektren bestimmte H- und L-Ketten zugeordnet und damit ein Antikörper rekonstruiert werden (**Abschnitt 3.4.2**). In diesem Kapitel sind diejenigen Experimente gezeigt, welche letztlich zur Etablierung eines allgemein anwendbaren Protokolls für hochauflösende Antikörpertrennung geführt haben.

3.3.1 Dissoziation von H- und L-Ketten trotz nicht-reduzierender Bedingungen

Bereits in der Diplomarbeit wurde die Beobachtung diskutiert, dass die IEF eines monoklonalen Antikörpers (mAk) zu mehreren distinkten Banden führte (**Abb. 3.3-1**). 10 µg des Klons „145-2C11“ wurden nach Firmenprotokoll auf einen IPG-Streifen geladen und für 24 Stunden mit dem „Multiphor II Electrophoresis System“ fokussiert.

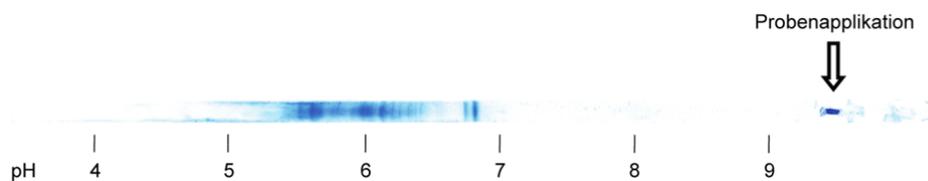


Abb. 3.3-1: IEF eines monoklonalen Antikörpers

10 µg des mAk „145-2C11“ wurden in IEF-Probenpuffer mithilfe eines Trogs am alkalischen Ende des IPG-Streifens (pH 3-10) geladen (siehe Pfeil) und für 24 Stunden mit der Multiphor-Apparatur fokussiert. Die Proteinfärbung erfolgte mit kolloidalem Coomassie-Blau.

Zunächst wurde angenommen, dass posttranslationale Modifikationen zum gezeigten Ergebnis führten. Sialinisierte Zuckerseitenketten beispielsweise beeinflussen die Nettoladung, was mehrere isoelektrische Punkte einer einzigen Antikörperspezies zur Folge hat. Um die einzelnen IEF-Banden genauer zu charakterisieren, wurden die Proteine zusätzlich nach Molekulargewicht getrennt. 25 µg des mAk wurden nach identischem Protokoll wie in **Abbildung 3.3-1** fokussiert. Als zweite Dimension der Proteintrennung folgte eine SDS-

PAGE. Die Prozedur wurde ausnahmslos unter nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt. **Abbildung 3.3-2** zeigt das Silber-gefärbte Gel.

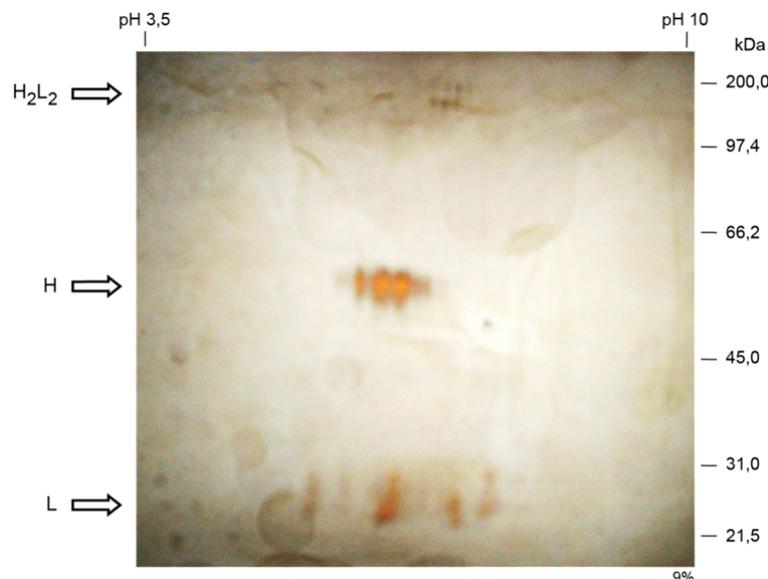


Abb. 3.3-2: 2D-Gelelektrophorese eines monoklonalen Antikörpers

25 µg des mAκ „145-2C11“ wurden nach identischem Protokoll wie in **Abbildung 3.3-1** zwischen pH 3 und pH 10 fokussiert. Die zweite Dimension der Trennung erfolgte nach Molekulargewicht mit einem 9%-igen Polyacrylamidgel. Proteine wurden mit Silber nach Heukeshoven gefärbt. Pfeile kennzeichnen Heterodimere aus zwei H- und zwei L-Ketten (150 kDa), freie H-Ketten (50 kDa) und freie L-Ketten (25 kDa).

Es zeigte sich, dass die angewandte Fokussierungsmethode zu einer ausgeprägten Dissoziation von H- und L-Ketten des Antikörpers führte. Obwohl keinerlei reduzierende Reagenzien eingesetzt wurden, kam es offensichtlich zu einer Reduktion intermolekularer Disulfidbrücken. Die Isolierung intakter Heterodimere war jedoch grundlegende Voraussetzung für die Zuordnung gepaarter H- und L-Ketten. Die partielle Reduktion musste demnach unbedingt verhindert werden.

3.3.2 Verschiedene Methoden der Probenapplikation

Der erste Teil der Protokolloptimierung beschäftigte sich mit verschiedenen Methoden, die Probe auf das IEF-Gel zu laden. Hierfür wurde der Ladetrog in unterschiedliche pH-Bereiche entlang des IPG-Streifens versetzt. Bislang erfolgte die Probenapplikation nach Firmenprotokoll bei pH 10. Wurde die Probe stattdessen bei pH 3 geladen, so kam es wie auch in **Abbildung 3.3-2** zu einer ausgeprägten Dissoziation der Antikörperketten. Die Probenapplikation bei pH 7 führte hingegen dazu, dass auf dem 2D-Gel kein Protein nachweisbar

war. Laut **Abbildung 3.3-2** liegen die isoelektrischen Punkte der Heterodimere des monoklonalen Antikörpers im neutralen pH-Bereich. Wurde demnach die Probe nahe des eigenen isoelektrischen Punkts geladen, so blieben die Proteine offensichtlich im Ladetrog in Lösung, da an dieser Stelle die Nettoladung Null beträgt. Ein Kompromiss bestand in der Probenapplikation bei schwach saurem pH zwischen 4,5 und 5 (**Abb. 3.3-3**).

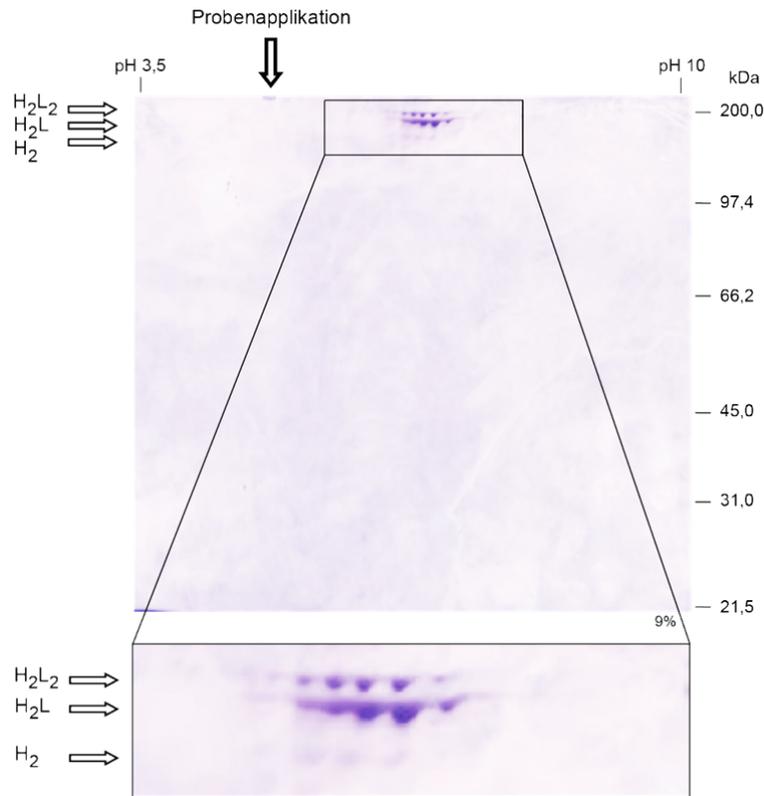


Abb. 3.3-3: 2D-Gelelektrophorese eines monoklonalen Antikörpers mit Probenapplikation bei schwach saurem pH

25 µg des mAk „145-2C11“ wurden nach identischem Protokoll wie in **Abbildung 3.3-1** zwischen pH 3 und pH 10 fokussiert. Der Ladetrog wurde jedoch zwischen pH 4,5 und 5 aufgesetzt (siehe Pfeil). Die zweite Dimension der Trennung erfolgte mit einem 9%-igen Polyacrylamidgel. Proteine wurden mit Coomassie-Blau gefärbt. Antikörper sind als H₂L₂-Heterodimere sowie nach partieller Abtrennung von L-Ketten als H₂L-Heterodimere und H₂-Homodimere gekennzeichnet (siehe auch vergrößerter Bildausschnitt unten).

Es stellte sich heraus, dass mit der Probenapplikation bei schwach saurem pH wenig Dissoziation zu beobachten war. Das Coomassie-gefärbte 2D-Gel zeigte keine freien Ketten bei 50 kDa beziehungsweise 25 kDa. Der mAk war ausschließlich am oberen Ende des Gels zu detektieren. Es konnten, wie bereits in **Abbildung 3.2-2** erwähnt, drei distinkte Reihen unterschiedlicher Molekulargewichte zwischen 100 und 200 kDa sichtbar gemacht werden. Zur Identifizierung wurden die Spots mit MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert. Neben intakten H₂L₂-Heterodimeren mit einem erwarteten Molekulargewicht von 150 kDa

waren auch H₂L-Heterodimere mit nur einer L-Kette (125 kDa) vorhanden. Zu einem weitaus geringeren Anteil wurden auch H₂-Homodimere ohne L-Ketten nachgewiesen (100 kDa). Alle apparenten Molekulargewichte waren jeweils um 25 bis 50 kDa nach oben verschoben, sodass beispielsweise H₂L₂-Heterodimere mit 200 kDa zu detektieren waren. Dies ist vermutlich damit zu erklären, dass in Harnstoff entfaltete Proteine weniger weit durch die poröse Gelmatrix wandern als in ihrer kompakten Konformation. Die beiden Disulfidbrücken zwischen den beiden H-Ketten blieben bei Anwendung dieser Methode erhalten. Freie L-Ketten befanden sich in unmittelbarer Nähe der Lauffront und waren nur über Silberfärbung nachzuweisen.

3.3.3 Deglykosylierung der Antikörper

IgG-Antikörper besitzen eine konservierte N-Glykosylierungsstelle im Fc-Teil der H-Kette. Wenn die Zuckerseitenketten sialinisiert sind, kann dies dazu führen, dass eine Antikörperspezies mehrere isoelektrische Punkte aufweist. Durch verbesserte Probenapplikation wurde der mAk von ursprünglich 13 IEF-Banden (**Abb. 3.3-1**) auf sechs Spots reduziert (**Abb. 3.3-3**), vorausgesetzt, es werden ausschließlich Spots entlang der pH-Achse gezählt und unterschiedliche Molekulargewichte außer Acht gelassen. Um die Spotanzahl möglicherweise weiter zu verringern, wurde die Deglykosylierung eingeführt.

Zunächst wurde die Effizienz des Enzyms N-Glycosidase F überprüft. Hierfür wurde der mAk „145-2C11“ vor und nach Deglykosylierung über eine reduzierende eindimensionale SDS-PAGE analysiert (hier nicht gezeigt). Das Molekulargewicht der H-Ketten konnte dadurch sichtbar reduziert werden. Laut Arnold *et al.* trägt die Glykosylierung bei Antikörpern zu 2 bis 3% des Molekulargewichts bei [5]. Die L-Kette war nicht glykosyliert. Sie war vor und nach der enzymatischen Behandlung mit 26 kDa nachzuweisen.

Dann wurde untersucht, ob die Deglykosylierung letztlich auch zu einer Abnahme der isoelektrischen Punkte auf einem 2D-Gel führt. 30 µg des mAk „145-2C11“ wurden deglykosyliert und unter nicht-reduzierenden Bedingungen zweidimensional aufgetrennt (**Abb. 3.3-4b**). Als Referenz dienten 30 µg des unbehandelten mAk (**Abb. 3.3-4a**). Auf der Molekulargewichtsachse zeigten sich bei beiden 2D-Gelen wiederum Spots auf drei definierten Höhen. Bezüglich der H₂L₂-Heterodimere waren auf der pH-Achse je vier Spots sichtbar. Im Fall der H₂L- und H₂-Komplexe konnte eine Reduktion der Spotzahl erzielt werden. Dies war insbesondere bei den H₂-Homodimeren deutlich und ist darin begründet, dass ausschließlich die H-Ketten, nicht aber die L-Ketten glykosyliert sind. Die Heterogenität der H₂-Homodimere konnte auf drei isoelektrische Punkte minimiert werden.

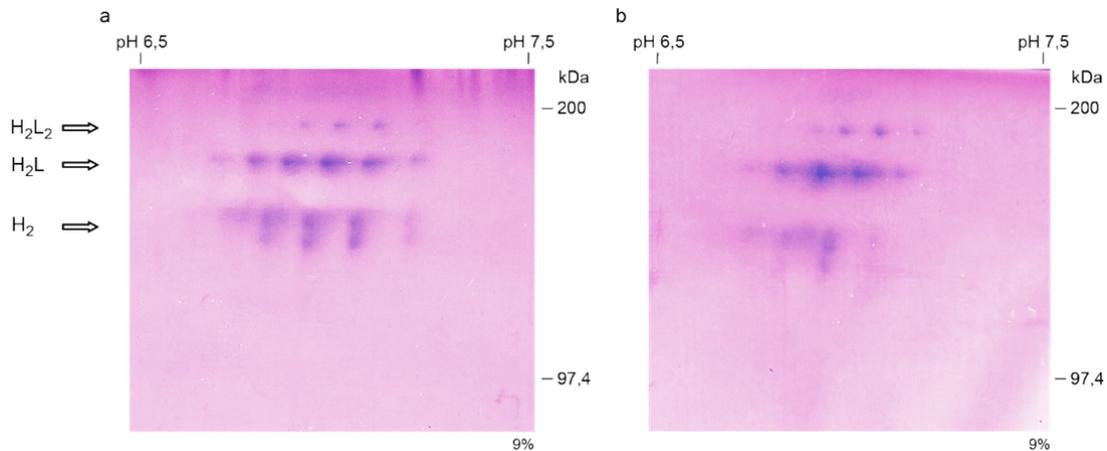


Abb. 3.3-4: Deglykosylierung eines monoklonalen Antikörpers

30 µg des mAk „145-2C11“ wurden **(a)** direkt oder **(b)** nach Deglykosylierung über 2D-Gelelektrophorese getrennt (IEF pH 3-10, 9% SDS-PAGE) und die Proteine mit Coomassie-Blau gefärbt. Es ist der interessante Bereich des Gels zwischen pH 6,5 und pH 7,5 sowie von 90 bis 200 kDa vergrößert dargestellt. Das Protokoll wurde unter nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Antikörper sind als H₂L₂-Heterodimere, H₂L-Heterodimere und H₂-Homodimere gekennzeichnet.

Es ist anzunehmen, dass weitere posttranslationale Modifikationen die Nettoladung des mAk beeinflussen, da dieser selbst nach erfolgreicher Deglykosylierung mehr als einen isoelektrischen Punkt aufweist. Eine detaillierte Analyse potentieller Modifikationen war jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgesehen.

3.3.4 IEF mit dem Agilent 3100 OFFGEL Fractionator

Bislang wurde die IEF am „Multiphor II Electrophoresis System“ durchgeführt. Im Verlauf der Arbeit wurde eine neue Apparatur gekauft, die bessere und reproduzierbarere Ergebnisse liefern sollte: „Agilent 3100 OFFGEL Fractionator“. Um dies zu testen, wurden in einem Experiment beide IEF-Systeme direkt miteinander verglichen. 30 µg des mAk „145-2C11“ wurden jeweils mit der Multiphor- und parallel mit der OFFGEL-Apparatur fokussiert. Die Proben wurden gemäß **Abschnitt 3.3.2** zwischen pH 4,5 und 5 auf den IPG-Streifen geladen. Nach anschließender SDS-PAGE wurden die Gele mit Coomassie-Blau gefärbt (**Abb. 3.3-5**). Der direkte Vergleich beider 2D-Gele machte deutlich, dass mit der OFFGEL-Apparatur durchaus eine effizientere Fokussierung erzielt werden konnte (**Abb. 3.3-5b**). Auf der pH-Achse waren die Antikörper gut voneinander getrennt und bildeten distinkte Spots. Mit der Multiphor-Apparatur hingegen waren die Spots schlechter aufgelöst, die Proteine waren demnach noch nicht an ihren isoelektrischen Punkten angelangt (**Abb. 3.3-5a**).

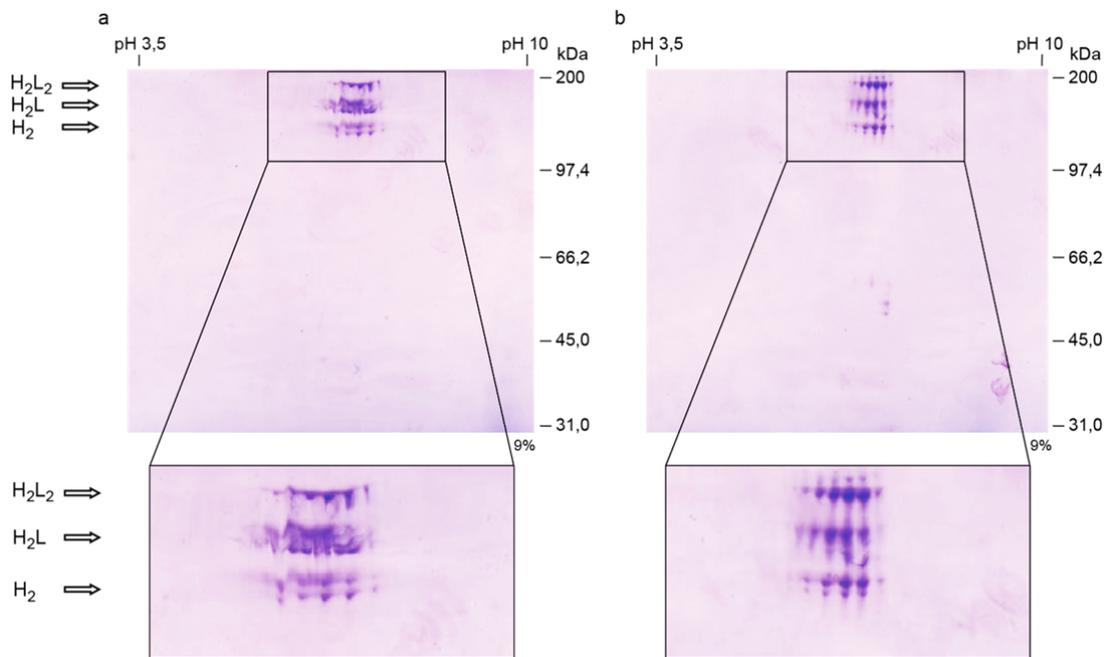


Abb. 3.3-5: Vergleich der IEF-Effizienz mit Multiphor- und OFFGEL-Apparatur

30 µg des mAκ „145-2C11“ wurden (a) mit der Multiphor- und (b) mit der OFFGEL-Apparatur isoelektrisch fokussiert (pH 3-10). Darauf folgte die Trennung nach Molekulargewicht mit einem 9%-igen Polyacrylamidgel unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Die Proteine wurden mit Coomassie-Blau sichtbar gemacht. Zum besseren Vergleich der Fokussierungseffizienz ist der interessante Bereich des Gels zusätzlich vergrößert dargestellt. Antikörper sind als H₂L₂-Heterodimere, H₂L-Heterodimere und H₂-Homodimere gekennzeichnet.

Wiederum kam es zu einer partiellen Reduktion der Disulfidbrücke zwischen H- und L-Kette und dadurch zu H₂L₂-, H₂L- sowie H₂-Komplexen. Die 2D-Gelelektrophorese erlaubt jedoch anhand der Unterscheidung ihrer Molekulargewichte, für die weitere Analyse gezielt intakte H₂L₂-Antikörper aus dem Gel zu isolieren. In Kombination mit der erzielten hochauflösenden Antikörpertrennung war es letztlich möglich, in Liquorproben von MS-Patienten H- und L-Ketten einzelner oligoklonaler Antikörper identifizieren zu können (**Abschnitt 3.4**).

3.4 Identifizierung gepaarter H- und L-Ketten einzelner OKB-Antikörper

Das Protokoll zur optimierten Trennung von Antikörpern unter nicht-reduzierenden Bedingungen (**Abschnitt 3.3**) ermöglichte die Identifizierung einzelner oligoklonaler Antikörper aus Liquor von MS-Patienten. Da die alleinige Analyse der Antikörper mit Massenspektrometrie allerdings praktisch nie komplette Proteinsequenzen liefert, wurden in einem parallelen molekularbiologischen Ansatz jeweils die Patienten-spezifischen Ig-V(D)J-Transkriptom von Zellen der B-Zelllinie aus Liquor erstellt, welche dann gemäß der in **Abschnitt 3.1** erarbeiteten Strategie als Datenbanken dienen.

Mithilfe dieses Protokolls konnten insgesamt vier einzelne OKB-Antikörper aus zwei verschiedenen MS-Patienten (HM-63 und 1039) identifiziert werden (**Abschnitt 3.4.1**). Bei Patient NS-52 führte eine semi-quantitative Analyse von Massenspektren zur Rekonstruktion eines fünften oligoklonalen Antikörpers (**Abschnitt 3.4.2**).

3.4.1 Identifizierung von OKB-Antikörpern der Patienten 1039 und HM-63

3.4.1.1 Trennung von Liquor-Antikörpern nach optimiertem Protokoll

IgG-Antikörper der Patienten 1039 und HM-63 wurden mit Protein G aus Liquor gereinigt und anschließend deglykosyliert. In der ersten Dimension der Gelelektrophorese wurde das Antikörpergemisch durch IEF nach Ladung und in der zweiten Dimension mit SDS-PAGE nach Größe getrennt. Die beiden resultierenden Coomassie-gefärbten 2D-Gele sind in **Abbildung 3.4-1** gezeigt.

Die Fokussierung der IgG-Antikörper in distinkte Spots war äußerst effizient. Sie repräsentierten offensichtlich expandierte Antikörper mit limitierter Heterogenität und spiegeln demzufolge OKB wider. Wie bereits mehrfach beobachtet, wurde trotz nicht-reduzierender Bedingungen ein Teil der L-Ketten abgetrennt. Dadurch entstanden neben dem intakten H₂L₂-Heterodimer mit einem apparenten Molekulargewicht von 200 kDa auch H₂L-Komplexe sowie H₂-Homodimere. Freie H-Ketten wurden nicht detektiert. Freie L-Ketten wanderten mit der Lauffront (hier nicht gezeigt).

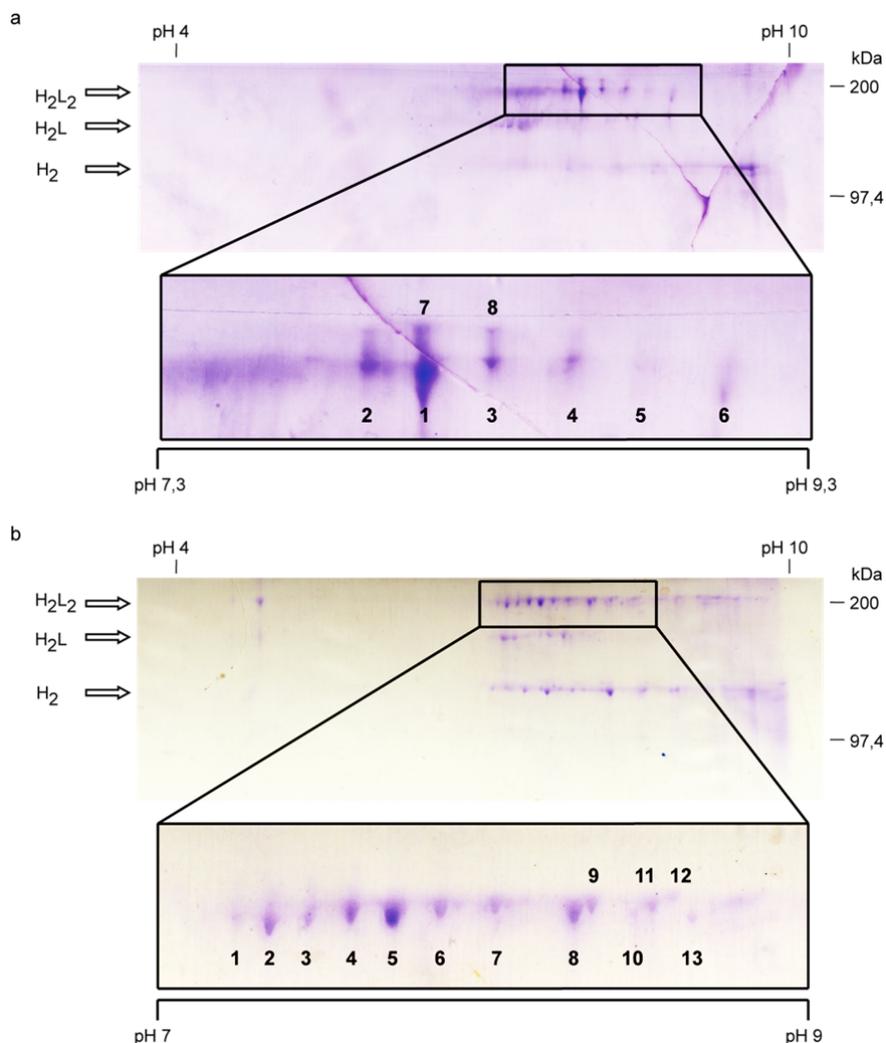


Abb. 3.4-1: 2D-Gelelektrophorese gereinigter Antikörper aus Liquor der Patienten 1039 und HM-63

(a) Patient 1039 (b) Patient HM-63. Liquores der Patienten wurden mit Dynabeads® Protein G inkubiert und die gereinigten IgG-Antikörper in SDS eluiert. Es folgte Deglykosylierung, IEF (pH 3-10) und SDS-PAGE (9% Polyacrylamidgel). Die Proteine wurden mit Coomassie-Blau sichtbar gemacht. Es ist jeweils zunächst der obere Ausschnitt des 2D-Gels zwischen 90 und 200 kDa beziehungsweise pH 4 bis 10 gezeigt. Sie zeigen H₂L₂-, H₂L-Heterodimere sowie H₂-Homodimere. Der hier interessierende Gelausschnitt, welcher die intakten H₂L₂-Antikörper enthielt, ist im jeweils unteren Bildausschnitt vergrößert dargestellt. Die darin enthaltenen Ziffern geben die Positionen der isolierten Proteinspots an.

3.4.1.2 MALDI-TOF Massenspektrometrie und deren Auswertung

Mit einer Pipettenspitze wurden H₂L₂-Heterodimere aus dem Gel ausgestanzt. Von Patient 1039 wurden acht Antikörperspots isoliert (Abb. 3.4-1a). Sie werden im Folgenden als „OKB-1039-s1“ bis „OKB-1039-s8“ bezeichnet. Bei Patient HM-63 wurden 13 Antikörperspots aus dem Gel isoliert („OKB-HM-63-s1“ bis „OKB-HM-63-s13“) (Abb. 3.4-1b). Die

Proteine wurden mit Trypsin verdaut und die Spaltpeptide mit MALDI-TOF Massenspektrometrie identifiziert.

Für die Auswertung der Massenspektren wurden sehr stringente Bedingungen gewählt. Signalintensitäten im Spektrum geben lediglich die relative und nicht die absolute Häufigkeit eines Peptids in der Probe wieder. Dies kommt insbesondere dadurch zustande, dass mit MALDI Peptide unterschiedlicher Größe nicht mit vergleichbarer Effizienz ionisiert werden. Vor allem Peptide mit einer Masse größer 4.000 Da sind zumeist unterrepräsentiert, wohingegen Peptide mit 1.500 bis 2.500 Da sehr gut ionisierbar sind und dadurch mit relativ hohen Signalen abgebildet werden. Aus diesem Grund wurden die Schwellenwerte für jeden Massenbereich individuell angepasst: bis 1.500 Da und zwischen 2.500 und 4.000 Da mussten die Signale um den Faktor 5 höher sein als das Hintergrundrauschen. Aufgrund der guten Ionisierbarkeit wurde die Stringenz bei Signalen von 1.500 bis 2.500 Da auf den Faktor 7 erhöht. Für Signale über 4.000 Da wurde als Schwellenwert Faktor 3 gewählt.

Zur Auswertung der Peptidmassen diente die jeweilige Patienten-spezifische Ig-V(D)J-Transkriptdatenbank aus Liquor-B-Zellen. Sie bestanden aus 383 Klonen bei Patient HM-63 (157x H, 152x κ , 74x λ) sowie 234 Klonen bei Patient 1039 (98x H, 117x κ , 19x λ). Die Transkriptombeider Patienten sind im **Anhang Teil IV** dargestellt. Aminosäuresequenzen übereinstimmender Peptide wurden, soweit möglich, über Tandem-Massenspektrometrie überprüft.

3.4.1.3 Eindeutige Zuordnungen gepaarter H- und L-Ketten

Spots, für welche letztlich eine Zuordnung von H- und L-Ketten getroffen werden konnte, waren OKB-1039-s1 von Patient 1039 (**Abb. 3.4-2**) und OKB-HM-63-s9 (**Abb. 3.4-3**), OKB-HM-63-s8 (**Abb. 3.4-4**) sowie OKB-HM-63-s2 (**Abb. 3.4-5**) von Patient HM-63.

Für die eindeutige Zuordnung waren zwei Kriterien limitierend. Erstens mussten mehrere Peptide mit nur einer bestimmten H-Kette sowie nur einer bestimmten L-Kette aus dem Ig-V(D)J-Transkriptom übereinstimmen. Diese Peptide sollten charakteristisch sein, das heißt SHM enthalten oder in der hypervariablen CDR3-Region liegen. Die gesamten Ig-V(D)J-Transkriptombeider Patienten HM-63 und 1039 inklusive der mittels Massenspektrometrie identifizierten Peptide sind im **Anhang Teil IV** aufgeführt. Zweitens wurde vorausgesetzt, dass die Signalintensitäten der Peptide aus der V-Region im Vergleich zu Peptiden der C-Region im jeweiligen gemäß **Abschnitt 3.4.1.2** definierten Massenbereich ähnlich hoch sind. Nur wenn beide Kriterien erfüllt waren, konnte gewährleistet werden, dass es sich sowohl um einen einzigen als auch um einen expandierten Antikörper handelte, der tatsächlich einen OKB-Antikörper repräsentierte.

3.4.1.3.1 Identifizierung eines OKB-Antikörpers von Patient 1039

Abbildung 3.4-2 zeigt die gelungene Zuordnung einer H- zu einer L-Kette in OKB-1039-s1 nach den oben genannten Kriterien.

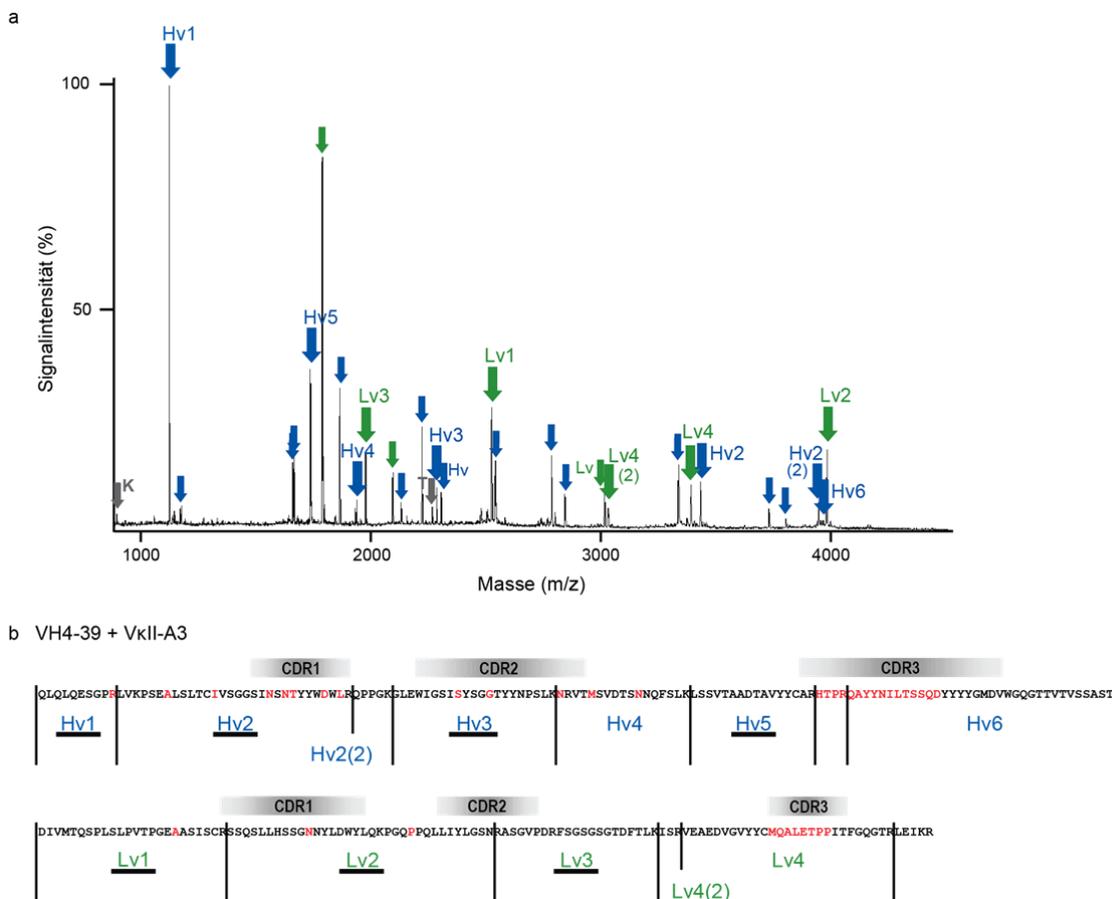


Abb. 3.4-2: Zuordnung von H- und L-Kette in Spot 1 von Patient 1039 (OKB-1039-s1)

(a) MALDI-TOF Massenspektrum von Spot 1 aus **Abbildung 3.4-1a**. Es ist die Signalintensität in Prozent gegen das Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) aufgetragen. Letzteres entspricht im MALDI-Spektrum der Masse in Da. Blaue Pfeile kennzeichnen Peptide der H-Kette, grüne Pfeile Peptide der L-Kette. Signale, welche als Peptide der V(D)J-Region identifiziert wurden, sind mit „Hv“ beziehungsweise „Lv“ und einer Ziffer benannt. Signale der C-Region sind mit Pfeilen ohne Bezeichnung versehen. Signale, welche nicht von Ig stammten, sind durch graue Pfeile markiert. Sie kamen von Keratin („K“) oder Trypsin („T“). (b) Aminosäuresequenzen der H-Kette VH4-39 und der L-Kette VκII-A3. Die Volllänge-V(D)J-Sequenzen wurden mittels cDNA-Klonierung aus Liquor-B-Zellen bestimmt. Aminosäureaustausche infolge von SHM sind rot. Graue Balken kennzeichnen die Positionen CDR-Regionen. Übereinstimmende Peptide aus (a) sind nummeriert und für die H-Kette in blau, für die L-Kette in grün unterlegt. Peptide, deren Sequenzen durch Tandem-Massenspektrometrie verifiziert wurden, sind unterstrichen.

Diese Abbildung befindet sich auch auf einer der Arbeit beigefügten Cd (siehe **Anhang Teil VI**).

Die identifizierten Peptide enthielten SHM und umfassten auch die hypervariable CDR3-Region beider Ketten. Außerdem konnte eine beachtliche Sequenzabdeckung von nahezu

100% erreicht werden. Von insgesamt zwölf Peptiden konnte für sieben die Aminosäuresequenz durch Tandem-Massenspektrometrie bestätigt werden. Jedes Signal im Massenspektrum konnte entweder der V(D)J-Region, dem C-Teil von Ig-Ketten oder gewöhnlichen Kontaminationen durch Keratin oder Trypsin zugeordnet werden. All das bestätigte, dass es sich in Spot 1 um einen Antikörper der OKB-Population handelte. Dieser war nicht nur in Spot 1, sondern auch in den Spots 2, 3, 4, 7 und 8 nachzuweisen, vermutlich aufgrund posttranslationaler Modifikationen. In Spot 5 und 6 konnte auf gleiche Weise eine H-Kette bestimmt werden, die zugehörige L-Kette fehlte jedoch im Ig-V(D)J-Transkriptom.

3.4.1.3.2 Identifizierung von OKB-Antikörpern des Patienten HM-63

In **Abbildung 3.4-3** ist die Zuordnung von H- und L-Kette in OKB-HM-63-s9 dargestellt.

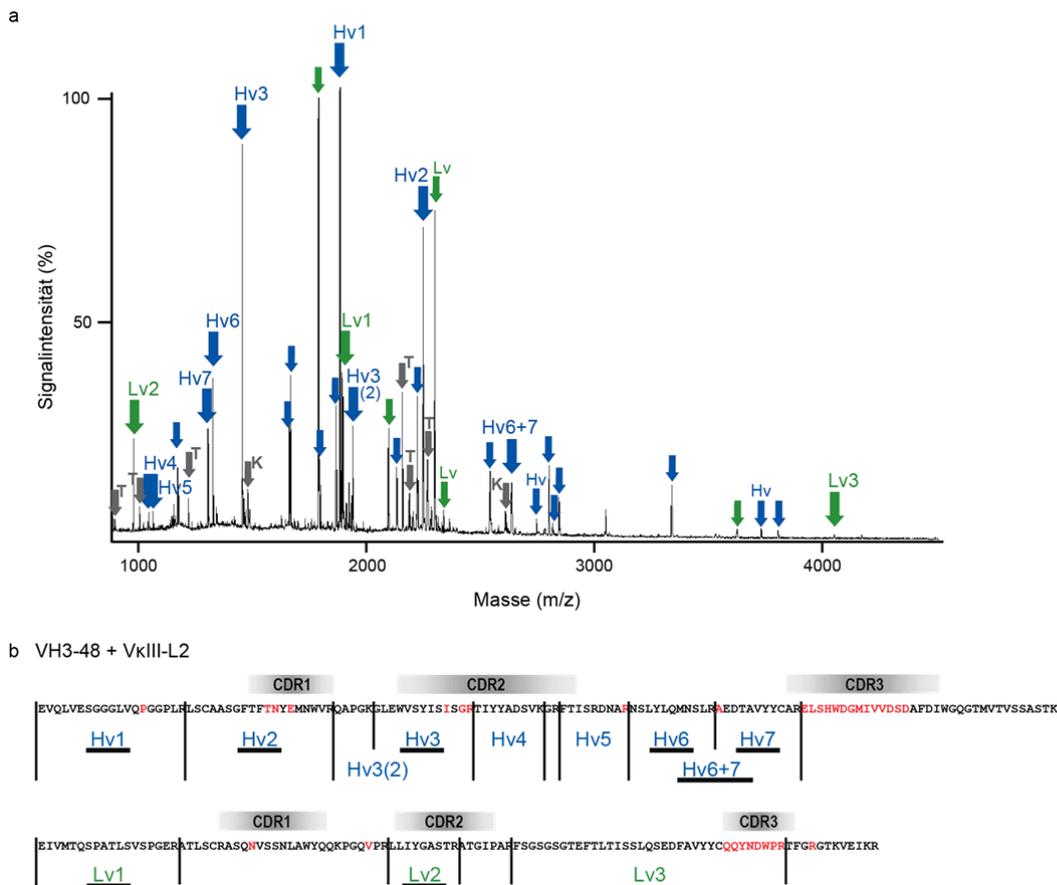


Abb. 3.4-3: Zuordnung von H- und L-Kette in Spot 9 von Patient HM-63 (OKB-HM-63-s9)

(a) MALDI-TOF Massenspektrum von Spot 9 aus **Abbildung 3.4-1b**. (b) Aminosäuresequenzen der H-Kette VH3-48 und L-Kette VκIII-L2 aus dem Ig-V(D)J-Transkriptom von Liquor-B-Zellen des Patienten HM-63. Weitere Details siehe Legende der **Abbildung 3.4-2**.

Diese Abbildung befindet sich auch auf einer der Arbeit beigefügten Cd (siehe **Anhang Teil VI**).

In Spot 8 führte die Auswertung des Massenspektrums zu einer sehr hohen Sequenzabdeckung für H-Kette VH3-07 und L-Kette V κ I-O2. Zahlreiche SHM machten die Übereinstimmung signifikant. Zudem waren in den identifizierten Peptiden für beide Ketten auch die hypervariablen CDR3-Regionen enthalten. Fehlsplaltungen beim tryptischen Verdau führten außerdem zu einigen überlappenden Peptiden innerhalb der H-Kette, welche unabhängig voneinander VH3-07 zugeordnet wurden. Auch hier waren die Signalintensitäten von Peptiden der V- und C-Region ähnlich hoch. Alle hohen Signale stammten von der V(D)J-Region der identifizierten H- und L-Kette, vom C-Teil der Ig sowie in zwei Fällen von Trypsin-Peptiden. Keines der Signale über dem Schwellenwert war unbekannter Herkunft. Insgesamt bestätigte dies die Identifizierung eines weiteren OKB-Antikörpers, welcher ebenso in Spot 11 detektiert wurde.

In Spot OKB-HM-63-s2 wurde ein weiterer Antikörper identifiziert (**Abb. 3.4-5**).

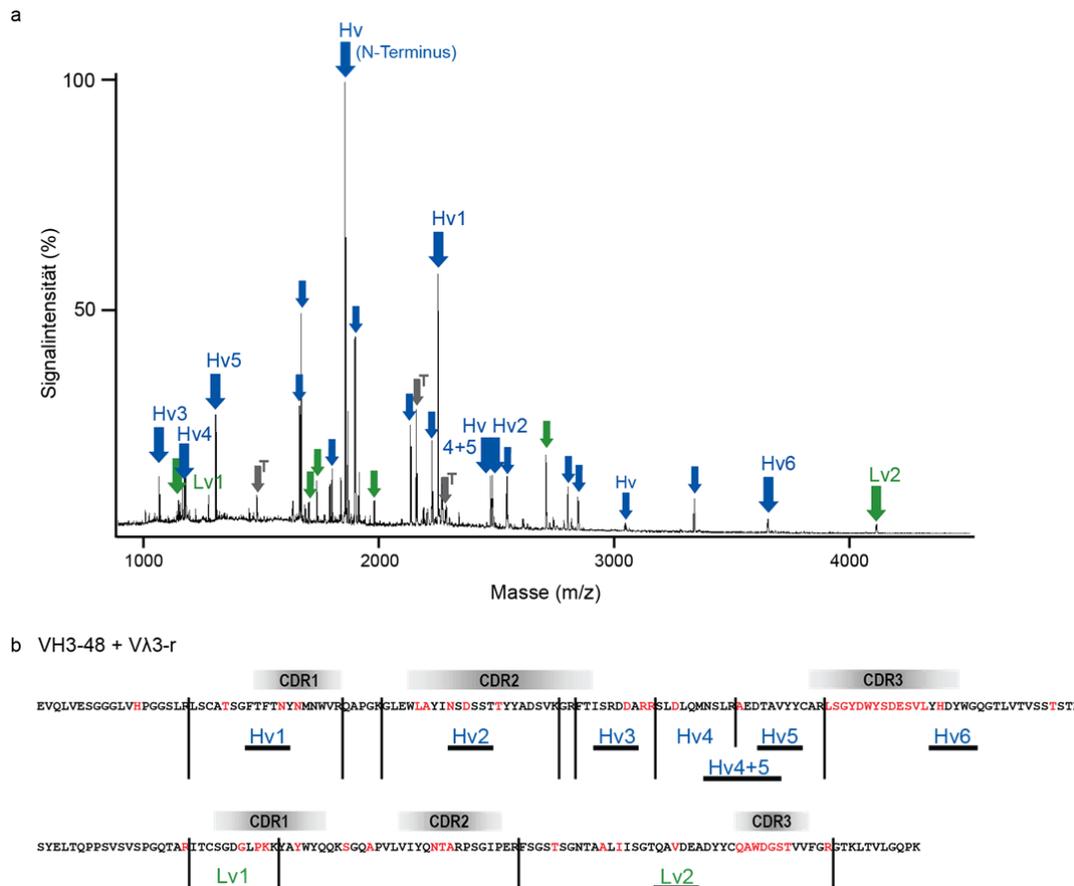


Abb. 3.4-5: Zuordnung von H- und L-Kette in Spot 2 von Patient HM-63 (OKB-HM-63-s2)

(a) MALDI-TOF Massenspektrum von Spot 2 aus **Abbildung 3.4-1b**. (b) Aminosäuresequenzen der H-Kette VH3-48 und L-Kette V λ 3-r aus dem Ig-V(D)J-Transkriptom von Liquor-B-Zellen des Patienten HM-63. Weitere Details siehe Legende der **Abbildung 3.4-2**.

Diese Abbildung befindet sich auch auf einer der Arbeit beigefügten Cd (siehe **Anhang Teil VI**).

Beim hier identifizierten Antikörper handelt es sich um eine Kombination aus einer H- mit einer λ - statt einer κ -Kette. Die Sequenzabdeckung für die λ -Kette war nicht sehr hoch. Drei Sachverhalte waren jedoch auffällig. Das VJ-Peptid inklusive der hypervariablen CDR3-Region hatte eine Masse von 4.100 Da. Die Detektion solch großer Peptide ist mit der MALDI-TOF-Technik selten. Insbesondere die für diesen Massenbereich verhältnismäßig hohe Signalintensität war außergewöhnlich. Dies sprach dafür, dass das Peptid mit hoher Wahrscheinlichkeit vom dominanten Antikörper im Spot stammte. Außerdem konnte die Sequenz über MALDI-TOF/TOF verifiziert werden. Dies war ebenso bemerkenswert, da bei Peptiden dieser Größe die effiziente Fragmentierung nur selten gelingt. Dass Signale aus dem C-Teil der κ -Ketten fehlten, stützte offensichtlich den Hinweis auf eine λ -Kette.

Als korrespondierende H-Kette wurde VH3-48 identifiziert. Hierfür sprach sowohl die hohe Sequenzabdeckung mit charakteristischen Peptiden als auch der Nachweis der hypervariablen CDR3-Sequenz, welche durch Tandem-Massenspektrometrie bestätigt wurde. Die Fragmentierung des Peptids mit der höchsten Signalintensität, „Hv (N-Terminus)“, ergab eine Sequenz, welche als N-Terminus einer anderen H-Kette identifiziert wurde. Hier war zu beachten, dass der innere *forward* Primer der *Nested* PCR im 5'-codierten N-Terminus liegt. Deshalb ist anzunehmen, dass dadurch die Sequenz mutagenisiert wurde und die Peptidmassen demzufolge nicht übereinstimmten. Da der N-Terminus allerdings nicht an der Antigenbindung beteiligt ist, spielte diese Tatsache für das weitere Vorgehen keine Rolle.

3.4.2 Identifizierung eines OKB-Antikörpers des Patienten NS-52

Bevor das Protokoll für eine hochauflösende Antikörpertrennung optimiert war, wurde eine semi-quantitative Auswertung angewendet, um H- und L-Ketten zuzuordnen. Grundlage war die Beobachtung, dass ein mAk mehrere isoelektrische Punkte aufweist (siehe **Abb. 3.3-1**). Wenn demnach H- und L-Ketten desselben Antikörpers in unterschiedlichen pH-Bereichen immer zusammen zu detektieren sind, lässt dies darauf schließen, dass sie von einem B-Zellklon produziert wurden.

Die zugrunde liegenden Transkriptom- und Proteomdaten von Patient NS-52 wurden in **Abschnitt 3.1.1** beschrieben. Zur Identifizierung gepaarter H- und L-Ketten wurde die Verteilung von Peptiden entlang des pH-Gradienten im 1D IEF-Gel analysiert. Hierfür wurden Quotienten aus Signalintensitäten charakteristischer V(D)J-Peptide mit einem Peptid der C-Region berechnet. Eine Zuordnung erfolgte dann, wenn Quotienten für V(D)J-Peptide einer H- und einer L-Kette eine vergleichbare Verteilung entlang des pH-Gradienten aufzeigten. Dies war beim Peptid „GLEWIGR“ von VH4-30.4/a und dem Peptid „YYSTPR“ von V κ I-A20/a der Fall (**Abb. 3.4-6**).

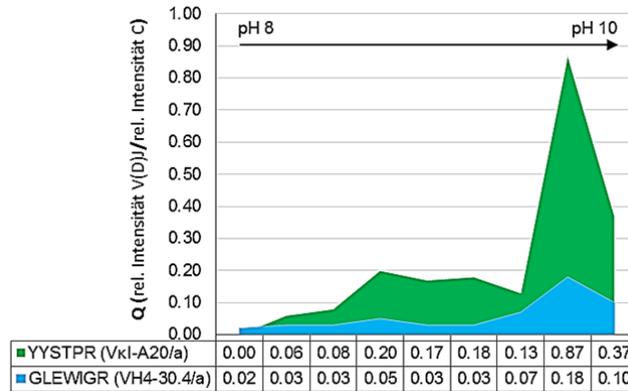


Abb. 3.4-6: Zuordnung von H- und L-Kette bei Patient NS-52 (semi-quantitative Auswertung)

Für den pH-Bereich zwischen 8 und 10 des IEF-Gels aus **Abbildung 3.1-2a** sind in der Tabelle die errechneten Quotienten (Q) der semi-quantitativen Auswertung angegeben und auf die y-Achse übertragen. Für die Berechnung der Quotienten wurde die relative Signalintensität der charakteristischen V(D)J-Peptide „YYSTPR“ und „GLEWIGR“ in jedem Massenspektrum durch die Signalintensität eines Peptids der L-Kette beziehungsweise der H-Kette aus dem C-Teil (C) geteilt. Für die beiden V(D)J-Peptide ergab sich dadurch eine vergleichbare Verteilung im pH-Gradienten. Dies führte letztlich zur Zuordnung der korrespondierenden Ig-Ketten VκI-A20/a und VH4-30.4/a aus dem Liquor-Ig-V(D)J-Transkriptom (siehe dazu **Abb. 3.1-2b,c**).

Zur Berechnung des Quotienten wurden als Peptide der C-Regionen das C_H-Peptid „EPQVYTLPPSRDELTK“ und das C_κ-Peptid „SGTASVVCLLNNFYPR“ gewählt. Diese beiden Peptide waren zuverlässig in allen Massenspektren zu detektieren und repräsentierten jeweils für H- und L-Kette das Signal mit der höchsten Intensität. Dadurch wurden die relativen Signalintensitäten von V(D)J-Peptiden auf die Intensitäten der C-Peptide normalisiert. Die auf diese Weise berechneten Werte zeigten bei den V(D)J-Peptiden „GLEWIGR“ und „YYSTPR“ entlang des pH-Gradienten zunächst einen langsamen Anstieg und dann eine Stagnation zwischen pH 8 und 9,5. Es folgte ein Maximum der Werte kurz vor pH 10, um dann am Ende des pH-Gradienten wieder abzufallen.

Laut Ig-V(D)J-Transkriptomanalyse in **Abbildung 3.1-2b** war das Peptid „GLEWIGR“ zwar auch charakteristisch für VH4-30.4/b, es wurde jedoch ein weiteres charakteristisches Peptid von VH4-30.4/a, „LTSVTAADTAVYYCAR“, identifiziert, welches sich durch einen Aminosäureaustausch von VH4-30.4/b unterschied. Auch das Peptid der κ-Kette „YYSTPR“ war in weiteren L-Ketten vorhanden (VκI-A20/c bis VκI-A20/h, VκI-A20/m, siehe dazu **Abb. 3.1-2c**). Diese Ketten wiesen jedoch Mutationen außerhalb der CDR-Regionen auf und sind deshalb vermutlich irrelevant für die Antigenbindung. Demnach waren die Unterschiede zu vernachlässigen. Außerdem war VκI-A20/a klonal expandiert (24x aus 47 analysierten Klonen). Ausgehend von dieser Argumentation wurde angenommen, dass die Ketten VH4-30.4/a und VκI-A20/a einen weiteren OKB-Antikörper repräsentieren.

3.5 Expression und Charakterisierung von Fab-Fragmenten

In **Abschnitt 3.4** wurde erläutert, wie insgesamt fünf Antikörper identifiziert wurden, welche von einzelnen OKB aus Liquor von MS-Patienten abstammen. Die entsprechenden Sequenzen von H- und L-Ketten wurden in den pTT5-Vektor eingefügt (Vektorkarten siehe **Abb. II-3** und **Abb. I I-4** im **Anhang Teil II**). Anschließend wurden sie in Zellen der HEK293E-Linie als monovalente Fab-Fragmente exprimiert und dabei durchschnittlich eine Ausbeute von 1 bis 2 mg erzielt, ausgehend von insgesamt 5×10^8 Zellen. Vor ihrer Verwendung in Experimenten zur Antigensuche wurden alle rekombinanten Fab-Fragmente eingehend charakterisiert: mit SDS-Gelelektrophorese und Western Blot zur Detektion des His₍₆₎-Signalpeptids (**Abschnitt 3.5.1**), MALDI-TOF Massenspektrometrie (**Abschnitt 3.5.2**) sowie Circular dichroismus (**Abschnitt 3.5.3**). Zudem wurde mit dem nach äquivalentem Protokoll hergestellten MOG-spezifischen Fab-8-18C5 überprüft, ob die rekombinant exprimierten Fab-Fragmente prinzipiell Antigene binden können (**Abschnitt 3.5.4**).

3.5.1 Validierung des Molekulargewichts und der Reinheit der Präparation

Um zu überprüfen, ob die exprimierten Proteine das erwartete Molekulargewicht aufwiesen, wurden von den gereinigten, konzentrierten und dialysierten rFab-Fragmenten je 1 µg mit nicht-reduzierendem beziehungsweise reduzierendem Probenpuffer versetzt und über ein Gradientengel getrennt. Die Proteine wurden mit Coomassie-Blau gefärbt (**Abb. 3.5-1**).

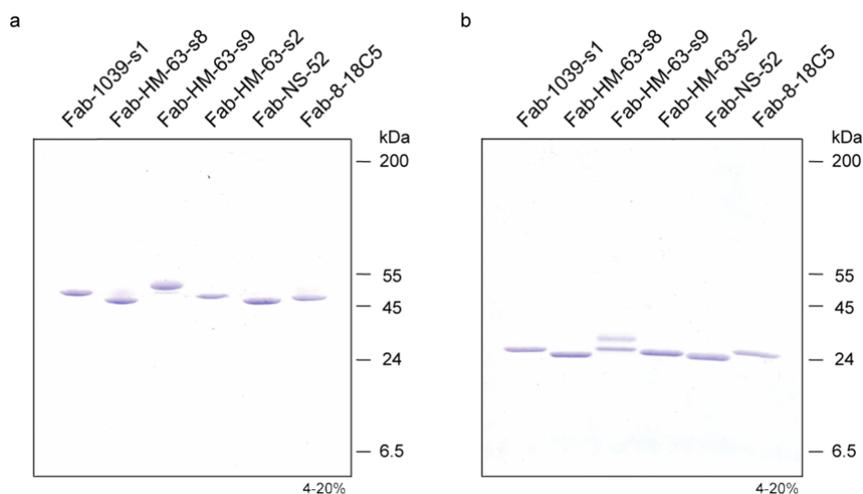


Abb. 3.5-1: SDS-PAGE der gereinigten rFab-Fragmente

Je 1 µg gereinigtes rFab-Fragment wurde unter **(a)** nicht-reduzierenden und **(b)** reduzierenden Bedingungen in einem Gradientengel (4-20%) nach Molekulargewicht getrennt. Die Proteine wurden mit Coomassie-Blau sichtbar gemacht.

Mittels SDS-PAGE konnte das erwartete Molekulargewicht des Heterodimers beziehungsweise der Einzelketten bestätigt werden. Für die L-Ketten wurde ein theoretisches Molekulargewicht zwischen 23,1 und 23,9 kDa errechnet. Die H-Ketten schwankten insbesondere aufgrund unterschiedlicher CDR3-Längen zwischen 24,9 und 26,6 kDa. Daraus ergab sich unter nicht-reduzierenden Bedingungen ein durchschnittliches Molekulargewicht von 49 kDa. Freien Ketten bei 25 kDa wurden nicht beobachtet. Demnach wurden in den HEK293E-Zellen quantitativ intakte Heterodimere gebildet. Während im reduzierten Ansatz bei fünf rFab-Fragmenten H- und L-Ketten in einer gemeinsamen Bande zu detektieren waren, liefen H- und L-Kette von Fab-HM-63-s9 getrennt im Gel (**Abb. 3.5-1b**). Zudem zeigte sich, dass bei allen Reinigungen im Ni-NTA-Säulenverfahren eine sehr reine Präparation erzielt werden konnte.

Für den Western Blot wurden äquivalent je 250 ng Protein über SDS-PAGE getrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und im Anschluss mit einem HRP-gekoppelten His₍₆₎-spezifischen Antikörper (Klon HIS-1) und Chemilumineszenz detektiert (**Abb. 3.5-2**).

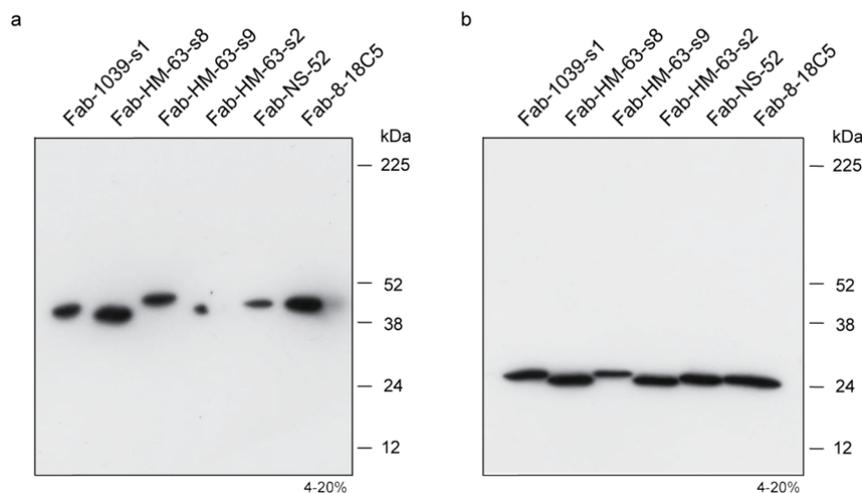


Abb. 3.5-2: Western Blot zur Detektion des His₍₆₎-Signalpeptids der rFab-Fragmente

Je 250 ng gereinigtes rFab-Fragment wurde unter **(a)** nicht-reduzierenden und **(b)** reduzierenden Bedingungen in einem Gradientengel (4-20%) nach Molekulargewicht getrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Die Detektion erfolgte über das C-terminale His₍₆₎-Signalpeptid der H-Kette mit einem HRP-gekoppelten His₍₆₎-spezifischen Antikörper und Chemilumineszenz. Die Expositionszeit betrug 3 Sekunden.

Die Molekulargewichte im Western Blot stimmten mit denen der SDS-PAGE gut überein. Es ist zu beachten, dass Banden im Western Blot unter reduzierenden Bedingungen ausschließlich den H-Ketten entsprechen, da nur diese am C-Terminus das His₍₆₎-Signalpeptid tragen (**Abb. 3.5-2b**). Kontaminationen wurden auch hier nicht nachgewiesen.

3.5.2 Bestätigung der Heterodimerität

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die Banden der **Abbildung 3.5-1a** tatsächlich intakte Heterodimere aus H- und L-Ketten repräsentierten. Hierfür wurden diese aus dem Polyacrylamidgel isoliert und mit MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert. Zur Identifizierung wurde eine Datenbank erstellt, welche die Aminosäuresequenzen aller rFab-Fragmente enthielt (siehe **Anhang Teil V**). Die Massenspektren und die Zuordnung der Peptide sind in **Abbildung 3.5-3** dargestellt.

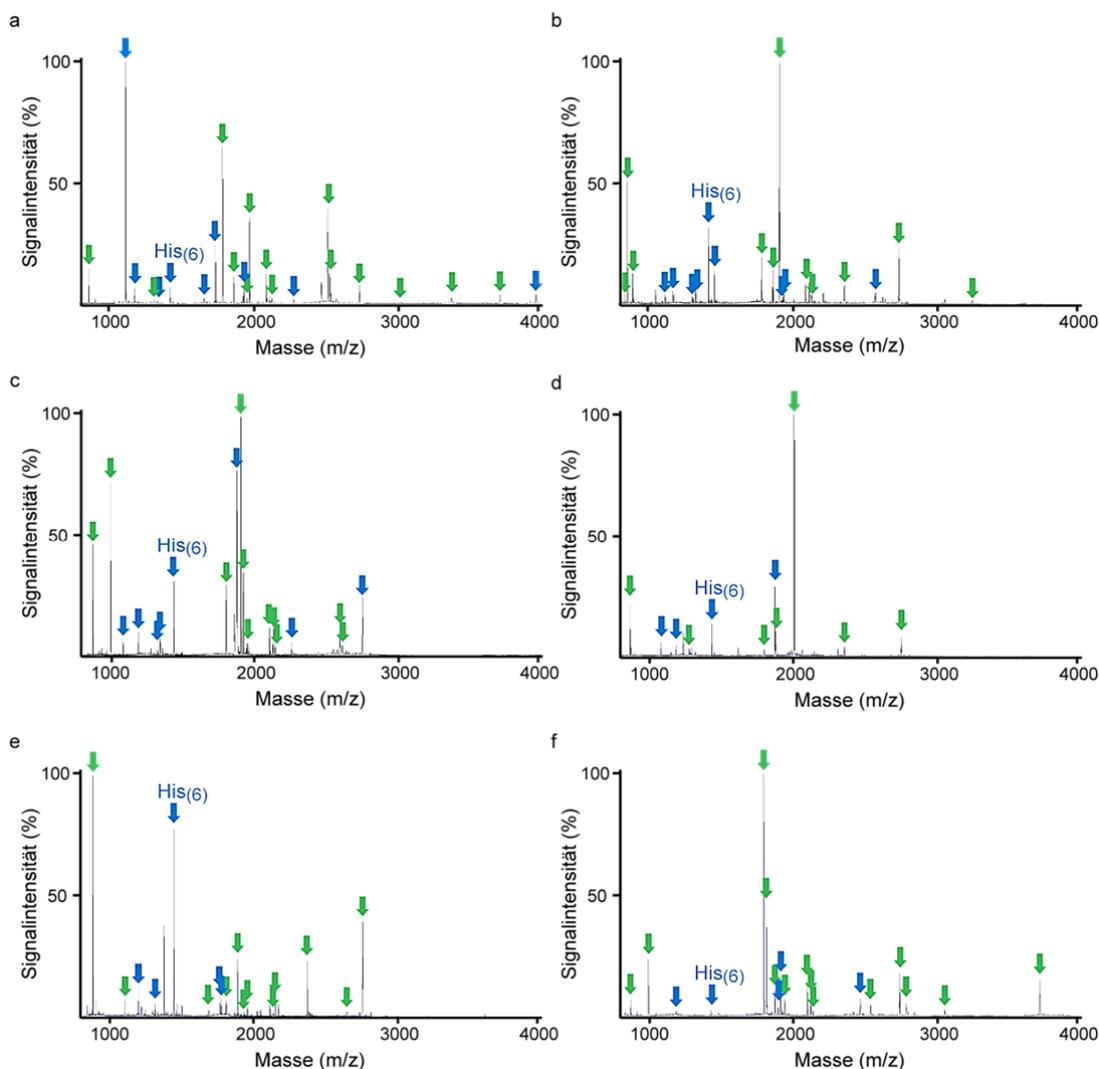


Abb. 3.5-3: MALDI-TOF Massenspektrometrie der gereinigten rFab-Fragmente

Gereinigte rFab-Fragmente wurden aus einem Polyacrylamidgel (**Abb. 3.5-1a**) isoliert, mit Trypsin verdaut und mit MALDI-TOF analysiert. Signale, welche mit einem blauen Pfeil markiert sind, kennzeichnen Peptide der H-Kette, grüne Pfeile Peptide der L-Kette. Das Signal „His₍₆₎“ repräsentiert die C-terminale Aminosäuresequenz SCDKTHHHHHH der H-Ketten. **(a)** Fab-1039-s1, **(b)** Fab-HM-63-s8, **(c)** Fab-HM-63-s9, **(d)** Fab-HM-63-s2, **(e)** Fab-NS-52, **(f)** Fab-8-18C5.

Alle relevanten Signale im Massenspektrum konnten jeweils der H- und L-Kette der rFab-Fragmente zugeordnet werden. Es wurden bei allen Fab-Präparationen nur wenige bis keine anderen Signale detektiert, die aus Kontaminationen stammen könnten. Dies bestätigte das Ergebnis aus **Abschnitt 3.5-1** einer sehr sauberen Präparation. Die Beobachtung, dass in allen Massenspektren Signale sowohl der H- als auch der L-Kette nachzuweisen waren und diese im Rahmen der üblichen Schwankungen ähnliche Intensitäten aufwiesen, zeigte, dass es sich bei den rFab-Fragmenten tatsächlich um Heterodimere handelte. Außerdem waren die Intensitäten derjenigen Signale, welche Peptiden der V-Region zugeordnet wurden, in allen Massenspektren vergleichbar mit Signalen von Peptiden der C-Region. Auch das Peptid mit der C-terminalen His₍₆₎-Sequenz (SCDKTHHHHHH, m/z = 1432,6) wurde identifiziert.

3.5.3 Überprüfung der Sekundärstruktur

Für die Ausbildung einer funktionellen Antigenbindungsstelle ist eine korrekte Faltung des Proteins Voraussetzung. Mit der CD-Spektroskopie stand eine Methode zur Verfügung, welche den Anteil verschiedener Sekundärstrukturen im Protein bestimmt. α -Helices, β -Faltblätter, Schleifen sowie Zufallskonformationen absorbieren circular polarisiertes Licht in Abhängigkeit von der Wellenlänge des eingestrahlten Lichts. Durch den Vergleich der Messdaten mit Referenzproteinen können im Anschluss die Anteile der Sekundärstrukturen berechnet werden. Mit dem Programm „Spectra Manager CDProAnalysis, Contin SMP56“, welches insgesamt 56 Proteine mit bekannter Struktur zum Vergleich heranzieht, ergaben sich für die rFab-Fragmente die in **Tabelle 3.5-1** angegebenen Werte.

	Fab-1039-s1	Fab-HM-63-s8	Fab-HM-63-s9	Fab-HM-63-s2	Fab-NS-52	Fab-8-18C5
β -Faltblatt	47,3%	45,6%	46,7%	44,4%	47,1%	49,7%
α -Helix	2,3%	2,7%	2,3%	2,6%	2,0%	1,7%
Schleifen	19,7%	20,6%	20,4%	21,3%	20,3%	20,1%
ungeordnet	30,6%	31,0%	30,6%	31,5%	30,5%	28,4%

Tab. 3.5-1: Anteile verschiedener Sekundärstrukturen in gefalteten rFab-Fragmenten

Mit dem Programm „Spectra Manager CDProAnalysis, Contin SMP56“ wurden die CD-Messdaten aller sechs rFab-Fragmente mit 56 Referenzproteinen verglichen und daraus die prozentualen Anteile verschiedener Sekundärstrukturen errechnet.

In allen sechs rFab-Fragmenten dominierten β -Faltblätter mit einem Gesamtanteil von knapp unter 50%. α -Helices waren mit weniger als 3% deutlich unterrepräsentiert. Zu 20% bestanden die rFab-Fragmente aus Schleifen. Die verbleibenden 30% bildeten Zufallskonformationen oder ungefaltete Polypeptidketten. Die Werte entsprachen den

Erwartungen [145]. Wie in der Einleitung im **Abschnitt 1.2.8** erläutert, besteht ein Großteil jeder Ig-Domäne aus stabilisierenden β -Faltblattstrukturen. Im V-Teil der H- und L-Kette sind jeweils die drei Schleifen der CDR-Regionen stark exponiert, welche gemeinsam die Antigenbindungsstelle bilden.

3.5.4 Funktionstest mit einem MOG-spezifischen rFab-Fragment

Alle bisherigen Charakterisierungen verifizierten die rFab-Fragmente als kontaminationsfreie Heterodimere mit intakter Sekundärstruktur. Ob sie auch in der Lage sind, Antigene zu binden, konnte im Vorfeld nicht getestet werden, da ihre Spezifitäten unbekannt waren. Ein Funktionstest war jedoch mit Fab-8-18C5 möglich. Dessen V(D)J-Sequenzen basieren auf dem „8-18C5“-Antikörper mit MOG als Zielantigen. Mit Durchflusszytometrie wurde untersucht, ob Fab-8-18C5 spezifisch MOG erkennt.

TE671-Zellen, welche MOG auf ihrer Oberfläche exprimieren wurden mit Fab-8-18C5 inkubiert. Die Detektion erfolgte über einen sekundären His₍₆₎-spezifischen Antikörper aus der Maus und einen FITC-markierten tertiären anti-Maus-Antikörper. Die resultierende Verschiebung der Fluoreszenzintensität wurde mit dem „8-18C5“-Antikörper verglichen. **Abbildung 3.5-4** zeigt das Ergebnis inklusive aller Isotyp- und Negativkontrollen.

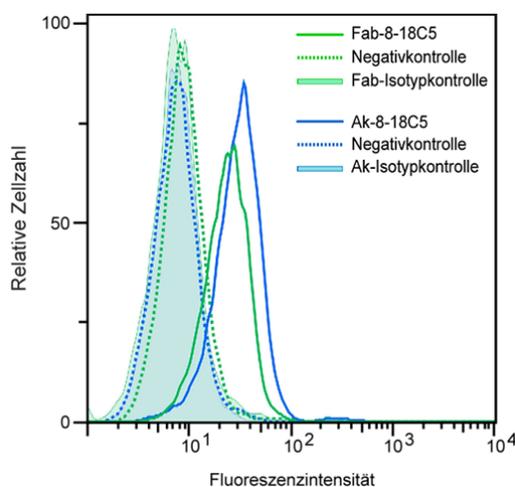


Abb. 3.5-4: Funktionstest von Fab-8-18C5 mit MOG-exprimierenden TE-Zellen (FACS)

MOG-exprimierende TE671-Zellen wurden mit Fab-8-18C5 (grüne Linie) und parallel mit dem Antikörper (Ak) „8-18C5“ (blaue Linie) inkubiert und die Bindung an MOG als Zielantigen mittels Durchflusszytometrie überprüft. Als Isotypkontrollen dienten Fab-1039-s1 (grün getönt) und Maus-IgG1 (blau getönt). Zur Überprüfung einer möglichen unspezifischen Hintergrundfärbung wurden der sekundäre His₍₆₎-spezifische Antikörper (grün gepunktet) sowie der FITC-markierte tertiäre Antikörper (blau gepunktet) als Negativkontrollen eingesetzt.

Die Verschiebung der Fluoreszenzintensität mit Fab-8-18C5 war vergleichbar mit dem „8-18C5“-Antikörper. Negativkontrollen sowie Isotypkontrollen zeigten erwartungsgemäß keinerlei Fluoreszenzsignal. Die rFab-Fragmente sind folglich eindeutig in der Lage, spezifisch Antigene zu binden, womit letztlich alle nötigen Nachweise erbracht wurden, um mit der Suche nach Antigenen der OKB-basierten rFab-Fragmente beginnen zu können.

3.6 Antigen suche

Nach der eingehenden Charakterisierung der rFab-Fragmente in **Abschnitt 3.5** wurde das Projekt mit der Antigen such e fortgeführt. Es wurden zahlreiche Kandidatenantigene getestet, welche für MS bereits in der Literatur beschrieben sind. Das erste Experiment bestand in der Färbung von humanem Hirngewebe (**Abschnitt 3.6.1**). Es folgte der Test auf verschiedene virale und bakterielle Antigene (**Abschnitt 3.6.2**) sowie intrazelluläre Proteine und Zellkernbestandteile (**Abschnitt 3.6.3**). Außerdem wurden Lipide als mögliche Antigene untersucht (**Abschnitt 3.6.4**).

3.6.1 Humanes Hirngewebe

Um zu überprüfen, ob die OKB-basierten rFab-Fragmente Bestandteile von humanem Hirngewebe erkennen, wurde eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit Gefrierschnitten durchgeführt. Das Ergebnis ist in **Abbildung 3.6-1** dargestellt.

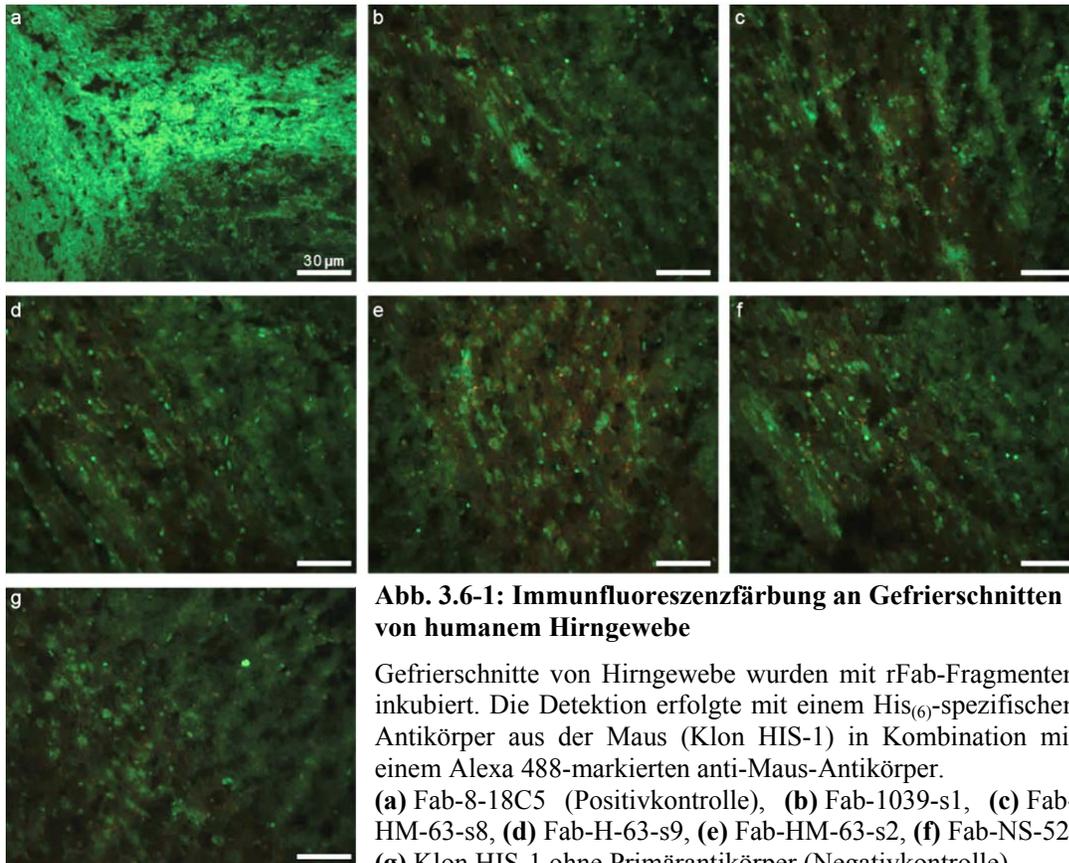


Abb. 3.6-1: Immunfluoreszenzfärbung an Gefrierschnitten von humanem Hirngewebe

Gefrierschnitte von Hirngewebe wurden mit rFab-Fragmenten inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem His₍₆₎-spezifischen Antikörper aus der Maus (Klon HIS-1) in Kombination mit einem Alexa 488-markierten anti-Maus-Antikörper.

(a) Fab-8-18C5 (Positivkontrolle), (b) Fab-1039-s1, (c) Fab-HM-63-s8, (d) Fab-H-63-s9, (e) Fab-HM-63-s2, (f) Fab-NS-52, (g) Klon HIS-1 ohne Primärantikörper (Negativkontrolle).

Die Gefrierschnitte wurden mit rFab-Fragmenten als primäre Antikörper inkubiert. Als sekundärer Antikörper diente ein Antikörper aus der Maus gegen das His₍₆₎-Signalpeptid der rFab-Fragmente. Die Detektion erfolgte mit einem Fluoreszenz-markierten anti-Maus-Antikörper. Als Positivkontrolle wurde das MOG-spezifische Fab-8-18C5 eingesetzt, als Negativkontrolle der Sekundärantikörper ohne Fab-Fragment.

Die Positivkontrolle mit Fab-8-18C5 zeigte in der weißen Gehirnschicht eine spezifische Färbung von MOG als Bestandteil der Myelinschicht der Axone (**Abb. 3.6-1a**). Am Übergang zur grauen Substanz, in der sich überwiegend die Zellkörper der Neuronen und weniger myelinisierte Axone befinden, ist die MOG-Färbung entsprechend schwächer bis nicht vorhanden (**Abb. 3.6-1a**). Die Negativkontrolle führte zu einer schwachen unspezifischen Hintergrundfärbung (**Abb. 3.6-1g**). Ein vergleichbares Muster war auch in allen fünf rFab-Fragmenten zu beobachten (**Abb. 3.6-1b-f**). Mit Immunfluoreszenz konnte demnach keine Spezifität der rFab-Fragmente für Bestandteile in Hirngewebe nachgewiesen werden.

3.6.2 Virale und bakterielle Kandidatenantigene

Einige virale und bakterielle Kandidatenantigene wurden mit für die klinische Routine standardisierten Immunfluoreszenztests der Firma Euroimmun untersucht. Nähere Informationen zu den verwendeten Zelllinien (humane und Affenzelllinien) werden von der Firma nicht preisgegeben, sie sind Betriebsgeheimnis. Als mögliche Antigene wurden folgende Viren getestet: Masern, Röteln, Varizella Zoster, Epstein-Barr und Herpes Simplex Typ 1 und 2. Als bakterieller Erreger wurde *Chlamydia pneumoniae* untersucht.

Die kommerziellen Tests der Firma enthielten für jeden viralen beziehungsweise bakteriellen Erreger eine spezifische Positivkontrolle und eine korrespondierende Negativkontrolle in Form von IgG-Antikörpern. Fab-Fragmente wurden als äquimolare Präkomplexe aus je zwei Molekülen rFab-Fragment pro Molekül His₍₆₎-spezifischem Sekundärantikörper eingesetzt. Letzterer besitzt zwei Antigenbindungsstellen für das C-terminale His₍₆₎-Signalpeptid der rFab-Fragmente. Durch die Präinkubation mit monovalenten Fab-Fragmenten werden von jedem His₍₆₎-spezifischem Antikörper im Vorfeld je zwei Fab-Fragmente gebunden, wodurch alle Antigenbindungsstellen des Sekundärantikörpers besetzt werden. Unspezifische Hintergrundfärbungen können dadurch reduziert werden, da Histidin-reiche Proteine in oder auf den zu färbenden Zellen nicht mehr von freien Bindestellen des Sekundärantikörpers gebunden werden. Als Fab-basierte Negativkontrolle wurde das MOG-spezifische Fab-8-18C5 eingesetzt. Eine Fab-basierte Positivkontrolle stand nicht zur Verfügung. Die

eingesetzte Menge an rFab-Fragmenten wurde so berechnet, dass theoretisch die gesamte Oberfläche der Testfelder auf dem Objektträger abgesättigt wurde.

3.6.2.1 *Chlamydia pneumoniae*

Das Ergebnis des Immunfluoreszenztests gegen den bakteriellen Erreger *Chlamydia pneumoniae* zeigt **Abbildung 3.6-2**.

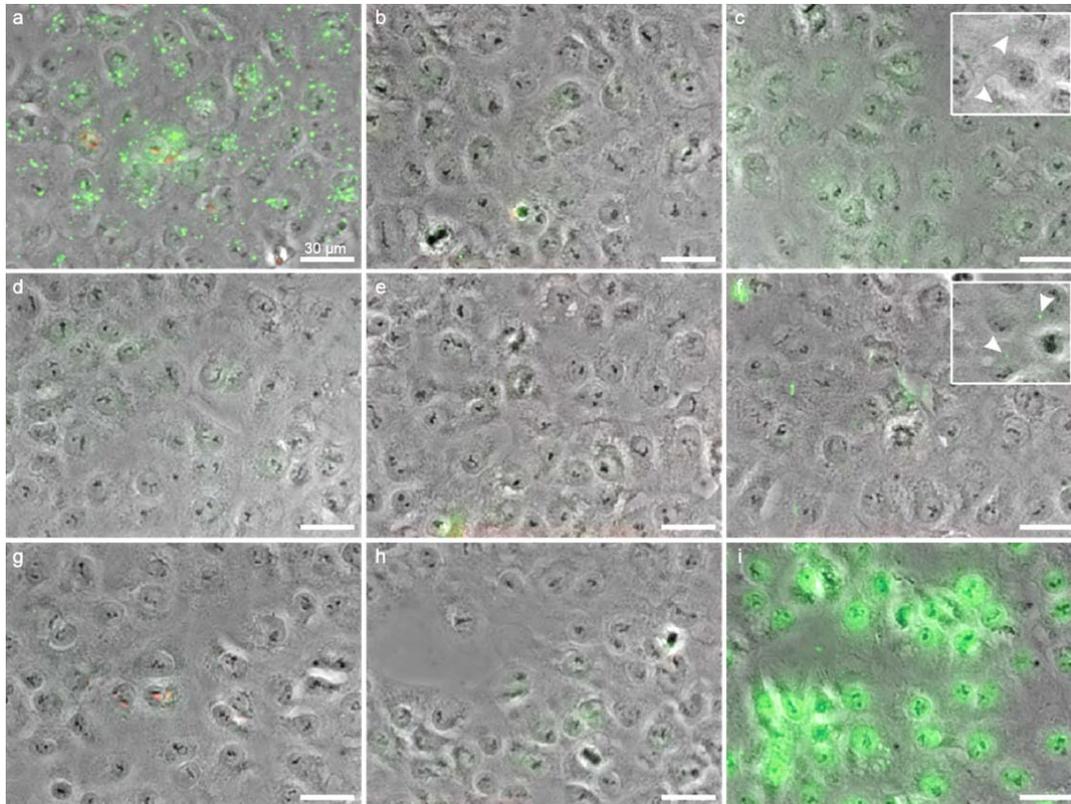


Abb. 3.6-2: Immunfluoreszenzfärbung von *Chlamydia pneumoniae*-infizierten Zellen

Kommerzielle Objektträger mit *Chlamydia pneumoniae*-infizierten Zellen (Bezeichnung der Firma „EU 40“) wurden mit Präkomplexen aus rFab-Fragmenten und His₍₆₎-spezifischem Antikörper aus der Maus (Klon HIS.H8) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem FITC-markierten anti-Maus-Antikörper. Positiv- und Negativkontrollen in Form von IgG-Antikörpern stammten von der Firma Euroimmun. (a) IgG-Positivkontrolle (Euroimmun), (b) Fab-1039-s1, (c) Fab-HM-63-s8, (d) Fab-HM-63-s9, (e) Fab-HM-63-s2, (f) Fab-NS-52, (g) IgG-Negativkontrolle (Euroimmun), (h) Fab-8-18C5 (Fab-basierte Negativkontrolle), (i) Klon HIS.H8 ohne Primärantikörper (Negativkontrolle). Der kleine Bildausschnitt in (c) und (f) zeigt die integrierte Negativkontrolle bestehend aus einem Testfeld mit nicht-infizierten Zellen. Eine Fab-basierte Positivkontrolle stand nicht zur Verfügung.

Die Positivkontrolle, humane IgG-Antikörper gegen *Chlamydia pneumoniae*, ergab, wie im Firmenprotokoll angegeben, eine grobgranuläre Fluoreszenz vorwiegend im Zytoplasma aller Zellen im Testfeld und zum Teil auch zwischen den Zellen (**Abb. 3.6-2a**). Färbungen in

anderen Ansätzen mussten diesem Muster entsprechen um als signifikant zu gelten. Mit der Negativkontrolle der Firma, ebenso humane IgG-Antikörper, wurde kein Signal beobachtet (**Abb. 3.6-2g**). Der His₍₆₎-spezifische Sekundäntikörper ohne Primäntikörper führte zu einer starken Färbung aller Zellen (**Abb. 3.6-2i**). Durch die freien Antigenbindungsstellen werden vom Sekundäntikörper folglich viele Histidin-reiche Proteine der Zellen erkannt. Wie die Kontrolle mit Fab-8-18C5 zeigte, konnte diese unspezifische Färbung durch die Präkomplexierung minimiert werden (**Abb. 3.6-2h**), da dadurch vor dem Auftrag auf die Objektträger freie Bindestellen durch das His₍₆₎-Signalpeptid der rFab-Fragmente abgesättigt wurden. Alle rFab-Fragmente waren als negativ zu interpretieren (**Abb. 3.6-2b-f**). Zwar konnten bei Fab-HM-63-s8 (**Abb. 3.6-2c**) und Fab-NS-52 (**Abb. 3.6-2f**) wenige punktförmige Fluoreszenzsignale detektiert werden, eine spezifische Färbung war aber aus zwei Gründen auszuschließen. Zum einen war der IgG-Positivkontrolle sowie dem Firmenprotokoll zu entnehmen, dass nahezu alle Zellen im Blickfeld infiziert waren und sich dadurch mit rFab-Fragmenten eine deutlich stärkere Färbung hätte ergeben müssen. Zum anderen enthielt der Objektträger zusätzlich jeweils ein Feld mit nicht-infizierten Zellen als interne Negativkontrolle. Auch hier waren vereinzelt punktförmige Signale nachweisbar (siehe Bildausschnitt in **Abb. 3.6-2c** und **f**). Von potentiellen freien Antigenbindungsstellen des Sekundäntikörpers konnten die Signale nicht stammen, da **Abbildung 3.6-2i** ein andersartiges Färbemuster zeigt. Färbungen beider rFab-Fragmente waren demnach unspezifisch.

3.6.2.2 Masern-Viren

Als Beispiel für eine Immunfluoreszenzfärbung gegen Viren ist in **Abbildung 3.6-3** das Ergebnis für Masern gezeigt.

Die Positivkontrolle, humane IgG-Antikörper gegen Masern-Viren, zeigte eine spezifische körnchenförmige Fluoreszenz im Zytoplasma infizierter Zellen (**Abb. 3.6-3a**). Laut Firmenangaben sind circa 30% aller Zellen im Blickfeld infiziert. Demnach wird vorausgesetzt, dass bei einem Virus-spezifischen Nachweis etwa 60% der Zellen nicht gefärbt sind. Im Fall von Fab-HM-63-s8 (**Abb. 3.6-3c**) und Fab-NS-52 (**Abb. 3.6-3f**) erscheinen jedoch alle Zellen grün. Die Färbung ist folglich nicht Virus-spezifisch. Sowohl die IgG-Negativkontrolle (**Abb. 3.6-3g**) als auch Fab-8-18C5 (**Abb. 3.6-3h**) zeigten erwartungsgemäß kein spezifisches Signal. Hier war lediglich eine schwache Hintergrundfärbung zu beobachten. Wie bereits im Test gegen *Chlamydia pneumoniae* wurden mit dem His₍₆₎-spezifischen Sekundäntikörper ohne Primäntikörper alle Zellen im Blickfeld stark gefärbt (**Abb. 3.6-3i**). Durch die Präkomplexierung mit rFab-Fragmenten konnte dieses Phänomen stark reduziert werden, wie in der Fab-basierten Negativkontrolle mit Fab-8-18C5 deutlich wurde (**Abb. 3.6-3h**). Da

damit auch die Ansätze mit Fab-1039-s1 (**Abb. 3.6-3b**), Fab-HM-63-s9 (**Abb. 3.6-3d**) und Fab-HM-63-s2 (**Abb. 3.6-3e**) vergleichbar waren, wurden diese als negativ für Masern-Viren interpretiert.

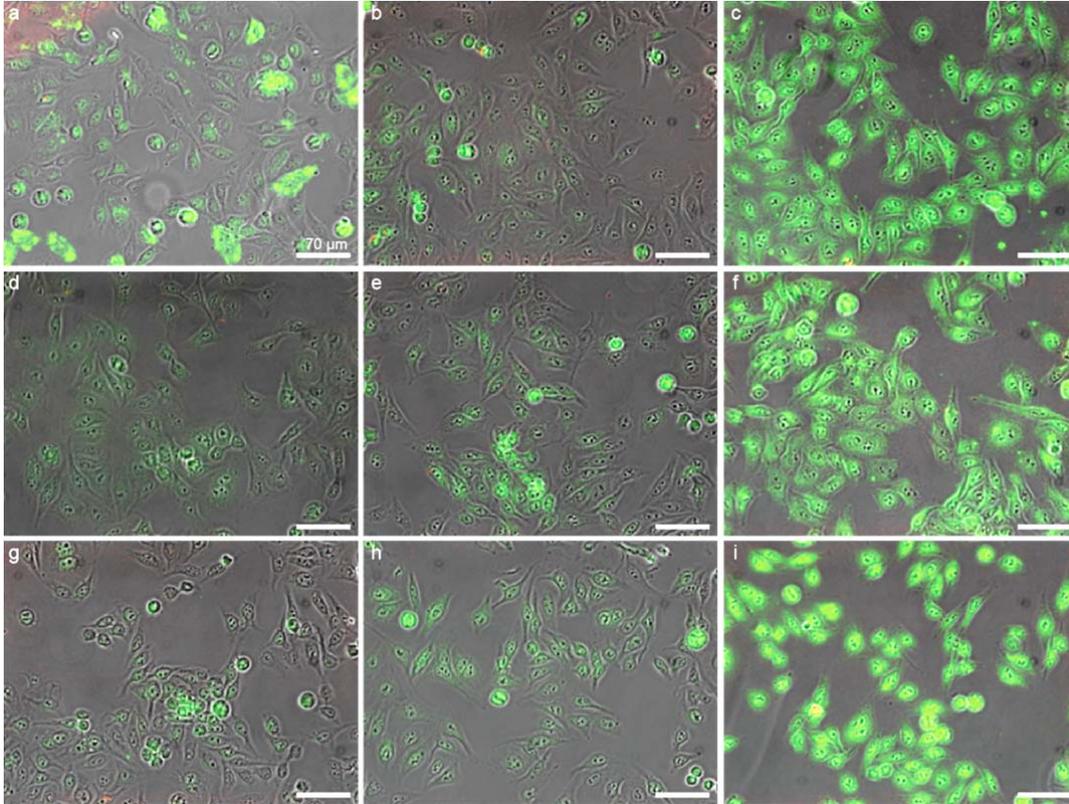


Abb. 3.6-3: Immunfluoreszenzfärbung von Masern-Viren-infizierten Zellen

Kommerzielle Objektträger mit Masern-Viren-infizierten Zellen (Bezeichnung der Firma „EU 38“) wurden mit Präkomplexen aus rFab-Fragmenten und His₍₆₎-spezifischem Antikörper aus der Maus (Klon HIS.H8) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem FITC-markierten anti-Maus-Antikörper. Positiv- und Negativkontrollen in Form von IgG-Antikörpern stammten von der Firma Euroimmun. **(a)** IgG-Positivkontrolle (Euroimmun), **(b)** Fab-1039-s1, **(c)** Fab-HM-63-s8, **(d)** Fab-HM-63-s9, **(e)** Fab-HM-63-s2, **(f)** Fab-NS-52, **(g)** IgG-Negativkontrolle (Euroimmun) **(h)** Fab-8-18C5 (Fab-basierte Negativkontrolle), **(i)** Klon HIS.H8 ohne Primärantikörper (Negativkontrolle). Eine Fab-basierte Positivkontrolle stand nicht zur Verfügung.

Interessanterweise wurde bei anderen Immunfluoreszenztests der Firma Euroimmun für Fab-HM-63-s8 und Fab-NS-52 dasselbe Phänomen beobachtet. Beide rFab-Fragmente färbten auf vergleichbare Weise Zellen des Tests gegen HSV 1 und 2, Röteln, in etwas abgeschwächter Form gegen EBV und für Fab-HM-63-s8 auch Varizella Zoster (hier nicht gezeigt). Dies deutete darauf hin, dass die beiden genannten rFab-Fragmente möglicherweise ubiquitäre intrazelluläre Antigene erkennen.

3.6.3 Intrazelluläre Antigene

Als intrazelluläre Antigene wurden Proteine und Zellkernbestandteile getestet. Dabei wurden unterschiedliche Methoden angewendet: indirekte Immunfluoreszenz, Immunoblot mit denaturierten Proteinen sowie Affinitätschromatographie mit Proteinen im nativen Zustand.

3.6.3.1 Indirekte Immunfluoreszenz gegen Zellkernbestandteile

Zum Nachweis der Reaktivität gegen Bestandteile des Zellkerns wurde ein kommerzieller und für die klinische Routine standardisierter Immunfluoreszenztest der Firma Euroimmun verwendet, bei dem humane Epithelzellen auf Objektträger fixiert sind. Bei Antigenen des Zellkerns handelt es sich beispielsweise um DNA, RNA, Histone oder Proteine des Zentromers. Die Durchführung entsprach **Abschnitt 3.6.2** und führte letztlich auch zum gleichen Ergebnis. Während IgG-Positiv- und Negativkontrollen sowie die Fab-basierte Negativkontrolle Fab-8-18C5 das erwartete Ergebnis zeigten, wurde beim His₍₆₎-spezifischen Sekundärantikörper ohne Primärantikörper eine starke unspezifische Hintergrundfärbung beobachtet. Eine schwache Reaktivität der Präkomplexe aus rFab-Fragmenten und Sekundärantikörper war zum wiederholten Male sichtbar mit Fab-HM-63-s8 und Fab-NS-52 und war negativ mit Fab-1039-s1, Fab-HM-63-s9 und Fab-HM-63-s2. Die Fluoreszenz von Fab-HM-63-s8 und Fab-NS-52 war vergleichbar mit **Abbildung 3.6-3c,f** und über die gesamte Zelle, das heißt Zellkern und Zytoplasma, verteilt. Eine spezifische Färbung von Bestandteilen des Zellkerns war demnach auch hier auszuschließen.

3.6.3.2 Immunoblots mit Zelllysats

Um intrazelluläre Proteine im entfalteten denaturierten Zustand als Antigene zu untersuchen, wurde von der Zelllinie „Fe-EBV“ ein Zelllysats hergestellt. Die Proteine wurden über ein 2D-Gel getrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen, mit rFab-Fragmenten inkubiert und mit einem HRP-gekoppelten His₍₆₎-spezifischen Antikörper (Klon HIS-1) mittels Chemilumineszenz detektiert. Die Negativkontrolle Fab-8-18C5 ergab kein Signal. Eine Fab-basierte Positivkontrolle stand nicht zur Verfügung. Bei keinem der fünf rFab-Fragmente war eine Reaktivität gegen Proteine des Zelllysats nachzuweisen. Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob diese vorläufigen Ergebnisse tatsächlich negativ sind, müsste das Experiment unter weniger stringenten Bedingungen wiederholt werden, mehr Ausgangsmaterial eingesetzt werden oder die Sensitivität durch beispielsweise höhere Antikörperkonzentrationen erhöht werden. Die Optimierung des Protokolls ist derzeit in Arbeit.

3.6.3.3 Affinitätschromatographie mit Zelllysat

Ob die rFab-Fragmente intrazelluläre Proteine in nativer gefalteter Form erkennen, wurde mit Affinitätschromatographie getestet. Hierfür wurden Jurkat-Zellen lysiert. Die fünf rFab-Fragmente wurden an je eine Ni-NTA-Säule gebunden und anschließend mit Zelllysat beladen. Als Negativkontrolle diente rekombinant exprimiertes NF-155, welches unter gleichen Bedingungen in HEK293E-Zellen hergestellt wurde, über ein C-terminales His₍₆₎-Signalpeptid verfügt, jedoch keine Antigenbindungsstelle besitzt. Die rFab-Fragmente beziehungsweise NF-155 wurden anschließend zusammen mit den gegebenenfalls daran gebundenen Antigenen eluiert und über SDS-PAGE analysiert (**Abb. 3.6-4**).

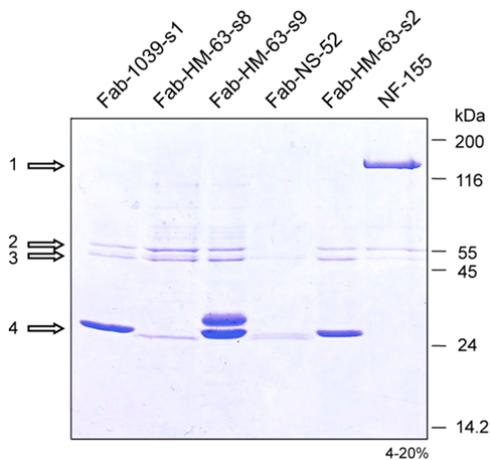


Abb. 3.6-4: SDS-PAGE der eluierten Proteine aus Affinitätschromatographie mit Zelllysat

Mit rFab-Fragmenten sowie NF-155 beladene Ni-NTA-Säulen wurden mit Jurkat-Zelllysat inkubiert, gewaschen und gebundene Proteine eluiert. Diese wurden unter reduzierenden Bedingungen über ein Gradientengel (4-20%) getrennt und die Proteine mit Coomassie-Blau detektiert. Stark gefärbte Banden (nummeriert von 1 bis 4) wurden aus dem Gel isoliert und einer Analyse mit MALDI-TOF unterzogen. **(1)** Bande bei circa 150 kDa in der Spur von NF-155, **(2)** und **(3)** Doppelbanden zwischen 45 und 55 kDa, **(4)** Banden mit 25 kDa beziehungsweise Doppelbande in Spur von Fab-HM-63-s9.

In allen Spuren waren Banden bei circa 25 kDa sowie zwischen 45 und 55 kDa nachzuweisen. Bei Fab-NS-52 war vermutlich aufgrund einer geringeren Proteinmenge die Bande mit 55 kDa nur schwach zu erkennen. Bei NF-155 fehlte die Bande bei 25 kDa, stattdessen war eine Bande bei circa 150 kDa zu detektieren. Pro Spur wurden die genannten Banden aus dem Gel isoliert und die Proteine mit MALDI-TOF Massenspektrometrie identifiziert.

In allen Fällen handelte es sich erwartungsgemäß bei den 25 kDa-Banden um die H- und L-Ketten der rFab-Fragmente (siehe auch **Abb. 3.5-1**). In Bande 1 wurde das Kontrollprotein NF-155 nachgewiesen. Die beiden unbekannt Proteine wurden in allen Spuren als Enolase (Bande 3) und DERP12 (Bande 2) identifiziert. Bei Enolase, einem Enzym des Glukosestoffwechsels, handelt es sich um ein Metall-bindendes Protein. DERP12 (*dermal papilla derived protein 12*) ist eine Oxidoreduktase. Da diese beiden Proteine auch in der Negativkontrolle nachgewiesen wurden, war zu vermuten, dass Enolase und DERP12 direkt an die Ni²⁺-Säule gebunden hatten und im Elutionsschritt mit Imidazol mit den His₍₆₎-Proteinen von der Säule verdrängt wurden. Ein spezifisch an eines der rFab-Fragmente gebundenes Protein konnte mit diesem Experiment folglich nicht detektiert werden.

3.6.4 Lipidantigene

Um Lipide als mögliche Antigene der oligoklonalen Antikörper zu untersuchen, wurde ein kombinatorischer *Glycolipidarray* durchgeführt. Lipide wurden sowohl einzeln als auch in einer 1:1 Mischung mit jedem anderen Lipid auf eine PVDF-Membran immobilisiert. Nach der Inkubation mit rFab-Fragmenten folgte die Detektion mit einem Peroxidase-gekoppelten His₍₆₎-spezifischen Antikörper (Klon HIS-1). Die Expositionszeiten betragen zwischen einer Sekunde und 16 Stunden. Neben der internen Negativkontrolle, bei der sich auf der Membran in einer Diagonale lediglich Methanol befand, diente als Fab-basierte Negativkontrolle wie in den meisten vorherigen Experimenten Fab-8-18C5. Eine potentielle unspezifische Hintergrundfärbung wurde durch alleinige Inkubation der Membran mit dem Sekundärantikörper überprüft. Da kein rFab-Fragment mit bekannter Reaktivität gegen Lipide zur Verfügung stand, wurde als Positivkontrolle Serum eines GBS-Patienten eingesetzt. **Abbildung 3.6-5** zeigt das Ergebnis der Positivkontrolle.

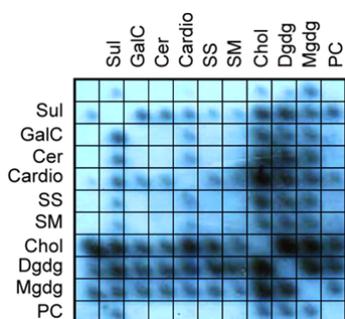


Abb. 3.6-5: *Glycolipidarray* mit Serum eines GBS-Patienten

Die Lipide Sulfatid (Sul), Galactosylcerebrosid (GalC), Ceramid (Cer), Cardiolipin (Cardio), Sphingosin (SS), Sphingomyelin (SM), Cholesterin (Chol), Digalactosyldiglycerid (Dgdg), Monogalactosyldiglycerid (Mgdg) und Phosphatidylcholin (PC) wurden einzeln und in Kombinationen in Duplikaten auf einer Membran immobilisiert und mit Serum eines GBS-Patienten inkubiert. Gebundene Antikörper wurden mit einem anti-human-IgG-Antikörper und Chemilumineszenz detektiert. Die Expositionszeit betrug 10 Minuten. In der Diagonale von links oben nach rechts unten befand sich die Negativkontrolle mit Methanol.

Alle Signale, welche mit Serum eines GBS-Patienten detektiert wurden, waren aufgrund des Musters symmetrisch zur Hauptdiagonale signifikant. Diese integrierte Doppelbestimmung erlaubt die klare Abgrenzung von falsch positiven Signalen, da jedes Signal nur dann als spezifisch eingestuft wird, wenn auch das jeweilige Duplikat auf der Membran erkannt wird. Falsch positive Signale wurden hier nicht detektiert. Mit GBS-Serum wurden überwiegend Komplexe aus Cholesterin, Digalactosyldiglycerid und Monogalactosyldiglycerid erkannt. Auch Sulfatide und Sulfatidkomplexe sowie Cardiolipin und Cardiolipinkomplexe wurden von Serum-Antikörpern gebunden. Die Diagonale mit Methanol ohne Lipid als Kontrolle war erwartungsgemäß negativ.

Der *Glycolipidarray* mit rFab-Fragmenten wurde insgesamt fünfmal wiederholt, um eine statistische Signifikanz zu gewährleisten. Dabei stellten sich Fab-HM-63-s9 und Fab-NS-52 als reproduzierbar positiv heraus. Das Ergebnis dieser beiden Lipid-reaktiven rFab-Fragmente ist gemeinsam mit der Negativkontrolle Fab-8-18C5 in **Abbildung 3.6-6** zusammengefasst.

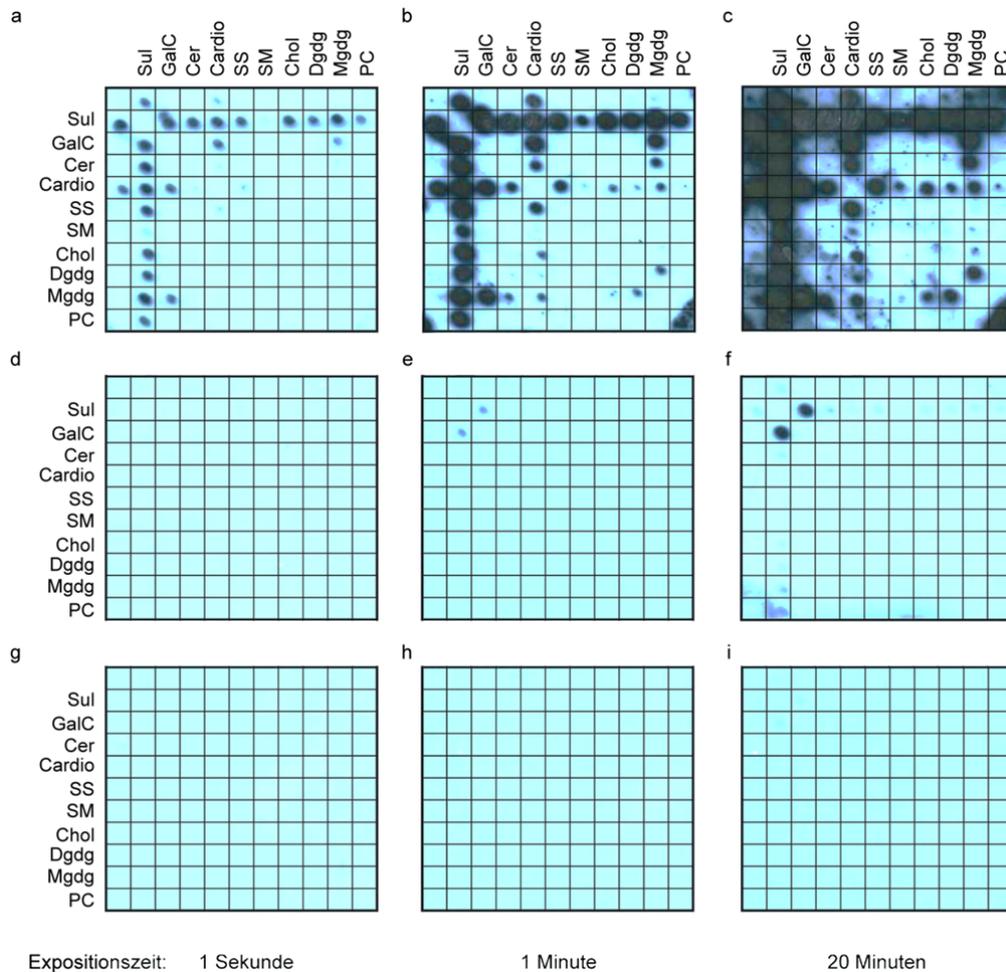


Abb. 3.6-6: Glycolipidarray mit Fab-HM-63-s9, Fab-NS-52 und Fab-8-18C5

Auf einer Membran immobilisierte Lipide wurden mit rFab-Fragmenten inkubiert. Die Detektion erfolgte durch Chemilumineszenz mit einem HRP-gekoppelten His₍₆₎-spezifischen Antikörper (Klon HIS-1). Weitere Details siehe Legende der **Abbildung 3.6-5**. Es sind die Ergebnisse für Fab-HM-63-s9 (**a-c**), Fab-NS-52 (**d-e**) sowie Fab-8-18C5 als Negativkontrolle (**f-h**) zu unterschiedlichen Expositionszeiten (1 Sekunde, 1 Minute, 20 Minuten) gezeigt.

In allen fünf Experimenten zeigte Fab-HM-63-s9 eine starke Reaktivität gegen Lipide (**Abb. 3.6-6a-c**). Bereits nach einer Sekunde Expositionszeit wurden Sulfatide detektiert, sowohl einzeln als auch in allen Kombinationen. Der Komplex aus Sulfatid und Sphingomyelin wurde von Fab-HM-63-s9 mit deutlich geringerer Affinität gebunden. Zudem wurden Cardiolipin, Mischungen aus Cardiolipin und Galactosylcerebrosid sowie aus Galactosylcerebrosid und Monogalactosyldiglycerid identifiziert. Nach einer Minute kamen weitere schwächere Signale hinzu, unter anderem verschiedene Kombinationen mit Cardiolipin und Monogalactosylcerebrosid. Die Signale waren signifikant, da sie in Duplikaten symmetrisch zur Hauptdiagonale nachzuweisen waren. Auch die integrierte Negativkontrolle mit Methanol ohne Lipid fiel erwartungsgemäß aus. In **Abbildung 3.6-6c**

wurde die Negativkontrolle nahe der Sulfatiderkennung durch die hohe Signalstärke und der daraus resultierenden Überbelichtung überdeckt.

In vier von fünf Experimenten war Fab-NS-52 positiv für Komplexe aus Sulfatid und Galactosylcerebrosid (**Abb. 3.6-6d-f**). Nach einer Sekunde Expositionszeit war noch keine Reaktivität erkennbar, nach einer Minute war das Signal noch schwach und nach 20 Minuten schließlich deutlich zu sehen. Auch Sulfatid und verschiedene Kombinationen daraus waren nach 20 Minuten schwach zu erkennen. Der Komplex aus Sulfatid und Sphingomyelin wurde als einzige Kombination nicht erkannt und bestätigte tendenziell die Beobachtung mit Fab-HM-63-s9, welches den genannten Komplex mit deutlich geringerer Affinität gebunden hatte. Da die Signale in jedem der fünf unabhängig durchgeführten Experimente jeweils symmetrisch in Duplikaten auftraten, war die Reaktivität signifikant. Dies wurde insbesondere durch den Vergleich mit der Negativkontrolle Fab-8-18C5 unterstützt, mit welchem nach gleichen Expositionszeiten kein Signal zu detektieren war (**Abb. 3.6-6g-i**). Die interne Kontrolle mit Methanol ohne Lipid war wie erwartet negativ.

Fab-HM-63-s2 und Fab-HM-63-s8 reagierten in zwei von fünf Experimenten mit Sulfatid und Sulfatidkomplexen (hier nicht gezeigt). Diese waren zwar gemäß der integrierten Doppelbestimmung in Duplikaten nachzuweisen, das Ergebnis war jedoch offensichtlich nicht reproduzierbar. Außerdem waren die Signale nur nach Expositionen über Nacht zu beobachten. Fab-1039-s1 führte in keinem der durchgeführten Experimente zu einem signifikanten Signal (hier nicht gezeigt).

4. Diskussion

OKB im Liquor von Patienten sind ein entscheidendes Kriterium bei der Diagnose von MS. Vor mehr als 50 Jahren wurden sie erstmals mithilfe elektrophoretischer Techniken sichtbar gemacht [82].

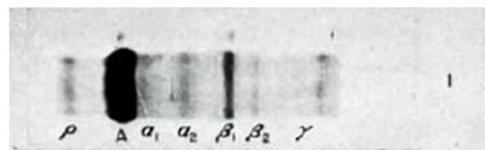


Abb. 4-1: Erster Nachweis oligoklonaler Banden im Liquor von MS-Patienten im Jahre 1960

Das Bild stammt aus Abbildung 1-1 der Originalveröffentlichung von Lowenthal *et al.* (1960) und zeigt erstmals OKB im Liquor eines MS-Patienten [82]. Die Kathode, an der die Probe aufgetragen wurde, befindet sich rechts, die Anode links. Folgende Fraktionen wurden unterschieden: P Präalbumin, A Albumin, α_1 alpha-1-Globulin, α_2 alpha-2-Globulin, β_1 beta-1-Globulin, β_2 beta-2-Globulin, γ gamma-Globulin.

Die damals angewandte Methode entsprach noch keiner IEF, sondern beruhte auf der relativen Beweglichkeit von Proteinen im elektrischen Feld. Im Bereich der Kathode aufgetragen wandern Präalbumin und Albumin am schnellsten, dann folgen α - und β -Globuline. Am langsamsten wandern γ -Globuline. Sie repräsentieren größtenteils Antikörper und konnten mit der Agargelelektrophorese zum damaligen Zeitpunkt noch nicht gut aufgetrennt werden. Erst mit Einführung der IEF im Jahre 1974 [66] gelang eine hochauflösende Trennung der γ -Globulinfraction in OKB, wie sie heute dem Standard in der MS-Diagnostik entspricht (siehe auch **Abb. 1-5** der Einleitung).

Obwohl diese markante Antikörperpopulation erstmals in den 40er Jahren des 20. Jahrhunderts von Elvin Kabat beschrieben wurde [57, 58] und seit Lowenthal *et al.* als OKB bekannt ist [82], gelang es bis zum heutigen Zeitpunkt nicht, deren Rolle in der Immunpathogenese aufzuklären. Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich deshalb eingehend mit der Charakterisierung der OKB mit dem langfristigen Ziel, deren Antigene zu identifizieren.

Im ersten Teilprojekt wurde eine Technologie erarbeitet, die es erlaubt, reife Antikörper ihren ursprünglichen B-Zellen zuzuordnen. Dadurch konnte bei Liquorproben von vier MS-Patienten gezeigt werden, dass Zellen der B-Zelllinie im Liquor an der Produktion der OKB-

Antikörper beteiligt sind. Auch B-Zellen in den entzündlichen Herden im MS-Gehirn steuern nach den Ergebnissen des zweiten Teilprojekts offensichtlich Antikörper im Liquor bei. Diese Beobachtung stellt ein wichtiges Bindeglied zwischen den beiden Kompartimenten dar, welches die Relevanz der Antigensuche mit Liquor-Antikörpern unterstützt.

Des Weiteren konnten erstmals mit einem eigens etablierten Protokoll einzelne Antikörper aus definierten OKB rekonstruiert werden. Dies erlaubt eine sehr spezifische Antigensuche mit monoklonalen Antikörpern, unabhängig von der polyklonalen irrelevanten Antikörperpopulation im Liquor. Zwei von fünf OKB-basierten rFab-Fragmenten reagierten mit Sulfatid, einem Lipid, welches in der Myelinschicht angereichert ist.

4.1 OKB-Antikörper stammen von B-Zellen im Liquor ab

Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde das Projekt der Diplomarbeit abgeschlossen und mit der etablierten Technologie die Grundlage für alle weiteren Untersuchungen rund um B-Zellen und oligoklonale Antikörper geschaffen. Die zugrunde liegende Strategie nutzt die charakteristischen Aminosäureaustausche in den Ig-Ketten reifer Antikörper, welche während der B-Zellreifung durch SHM im Ig-Locus zustande kommen. Anhand der Analysen von Liquorproben vier verschiedener MS-Patienten konnte gezeigt werden, dass sich das OKB-Repertoire zum Großteil mit dem Ig-Transkriptrepertoire der Liquor-B-Zellen deckt. Kontrollexperimente bestätigten die Signifikanz der Überlappung. Liquor-B-Zellen haben demnach Anteil an der Produktion der oligoklonalen Antikörper.

Die entwickelte Strategie könnte auch bei anderen entzündlichen Erkrankungen angewendet werden, um den Zusammenhang zwischen B-Zellpopulationen und Antikörperproduktion zu untersuchen. Bei rheumatoider Arthritis beispielsweise sind in der entzündeten Gelenkinnenhaut Plasmazellen nachzuweisen [163]. Serum-Autoantikörper gegen Peptide, welche Citrullin, posttranslational modifiziertes Arginin, tragen, sind zudem wichtiger Bestandteil in der RA-Diagnose [128]. Ob die Plasmazellen im entzündeten Gewebe für die Produktion dieser anti-Citrullin-Antikörper verantwortlich sind, könnte mithilfe der etablierten Methode überprüft werden.

4.1.1 Liquor-B-Zellen resultieren aus einer Antigen-induzierten Immunantwort

Die detaillierte Analyse der Ig-V(D)J-Transkripte von Liquor-B-Zellen wies bei allen vier Patienten auf eine gereifte B-Zellpopulation nach Antigenkontakt hin. Dies wurde deutlich

anhand von Merkmalen wie SHM, klonale Expansion und Dominanz des IgG1-Subtyps. Insbesondere durch die Anhäufung von Punktmutationen in den CDR-Regionen entstehen Patienten-spezifische Ig-V(D)J-Transkriptome, welche bereits in früheren Studien für B-Zellen im Liquor von MS-Patienten beobachtet wurden [24, 103, 117, 125]. Theoretisch ist dadurch eine unendlich hohe Vielfalt an Ig-Sequenzen möglich. Die Heterogenität der Ig-V(D)J-Transkripte war jedoch bei allen vier Patienten stark eingeschränkt. Dies bestätigt die klonale Expansion selektionierter B-Zellpopulationen [92, 103, 117, 125]. Zum einen wurden einige Ketten mehrfach detektiert, zum anderen war die Vielfalt der CDR3-Regionen stark limitiert. Ketten mit gleicher Aminosäuresequenz in diesem hypervariablen Abschnitt stammen offensichtlich von einem gemeinsamen B-Zellklon ab, von dem aus bei intraklonalen Teilungen weitere SHM eingeführt wurden [24, 92]. Beim Vergleich der CDR3-Sequenzen zwischen den untersuchten Patienten waren jedoch keine gemeinsamen Sequenzmotive detektierbar.

Auffällig war, dass bei allen vier Patienten die VH3- und VH4-Subfamilie überrepräsentiert war. Eine vergleichbare Tendenz konnte bei RA-Patienten im Blut [68] und im entzündeten Gewebe [155] nachgewiesen werden. Später folgten Studien, die diese Beobachtung für MS bestätigen konnten. Dies war für B-Zellklone sowohl im Gehirn [8, 105] als auch im Liquor der Fall [106, 117, 125]. Bei CIS (*clinically isolated syndrome*), einer zum Zeitpunkt des ersten Schubs MS-verwandten Erkrankung, folgte der zweite Schub und damit die Entwicklung einer echten MS früher, wenn Patienten eine derartige VH4-Tendenz in ihrem Liquor-B-Zellrepertoire aufwiesen [13]. Patienten ohne Dominanz der VH4-Subfamilie zeigten in der genannten Studie innerhalb von zwei Jahren keinen weiteren Schub. Es ist denkbar, dass Epitope von Autoantigenen bevorzugt an BZR binden, deren Antigenbindungsstelle von CDR-Schleifen des VH4-Segments gebildet wird. Dadurch käme es zu einer chronischen Stimulierung dieser B-Zellen und zu einer selektiven klonalen Expansion.

4.1.2 Das OKB-Antikörperrepertoire ist Komplement-aktivierend

Bereits bei der Analyse der Ig-V(D)J-Transkriptome aus Liquor-B-Zellen war auffällig, dass bei allen vier untersuchten Patientenproben IgG1 als Subtyp dominierte. In der Diplomarbeit wurde dazu ein Kontrollexperiment mit B-Zellen aus Blut eines gesunden Probanden durchgeführt. Hier wurde eine deutlich heterogenere Verteilung mit größtenteils IgG2 und lediglich 17% IgG1 nachgewiesen. Diese Beobachtung deckte sich mit den Daten der IgG-Proteomanalyse. OKB-Antikörper wurden überwiegend als IgG1 exprimiert, wohingegen im Serum hauptsächlich IgG2-Peptide identifiziert wurden (siehe **Abschnitt 3.1.2**). Dies ist ebenfalls konsistent mit früheren Untersuchungen [62, 149]. IgG1 ist Komplement-

aktivierend. Laut einer Studie von Sjelleberg *et al.* korrelieren erhöhte Konzentrationen an TCC (*terminal complement complex*), einem Bestandteil des Komplementsystems, im Liquor von MS-Patienten mit einer ausgeprägteren Demyelinisierung im Gehirn und dadurch mit dem Schweregrad neurologischer Symptomatik [133]. Gestützt wird dieser mögliche Zusammenhang von der Beobachtung, dass im Bereich aktiver Hirnläsionen Abbauprodukte der Myelinschicht gemeinsam mit Ig-Molekülen und Komplement im Zytoplasma von Makrophagen nachweisbar sind. Dies wurde sowohl im Tiermodell EAE [139] als auch in *postmortem* Hirngewebe von MS-Patienten [83] gezeigt. Das demyelinisierende Potential solcher anti-Myelin-Antikörper, insbesondere für MOG, konnte *in vitro* [63] und *in vivo* [76] demonstriert werden. Diese Studien untermauern die Relevanz einer humoralen Immunantwort in der Pathogenese von MS.

In keinem der vier Patientenliquores wurden Peptide von λ -Ketten identifiziert. Während laut Link und Zettervall im Blut und Liquor sowohl gesunder Probanden als auch von Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen wie beispielsweise Neurosyphilis oder GBS das Verhältnis von κ - zu λ -Ketten bei etwa 1:1 liegt, zeigen MS-Patienten im Liquor, nicht aber im korrespondierenden Blut, überwiegend IgG mit κ als L-Kette [77]. Da dieses Phänomen charakteristisch für MS ist, ist die Bestimmung des κ/λ -Verhältnisses im Liquor von diagnostischem Wert. Es erlaubt die Abgrenzung von anderen neurologischen Erkrankungen, bei welchen ebenso OKB im Liquor nachzuweisen sind [54]. Ähnlich der bereits diskutierten VH4-Dominanz könnten IgG(κ)-Antikörper aus einer positiven Selektion einiger weniger B-Zellen stammen, welche über die CDR-Schleifen der κ -Ketten bevorzugt bestimmte Epitope von Autoantigenen erkennen.

Der Nachweis, dass OKB-Antikörper von Liquor-B-Zellen produziert werden, war ein wichtiger Schritt in der Charakterisierung dieser diagnostisch bedeutsamen Antikörperpopulation. Ob sie auch unmittelbar an der Immunpathogenese beteiligt sind, kann nur dann beantwortet werden, wenn deren Antigene identifiziert werden und ein Zusammenhang mit den entzündlichen Prozessen im Gehirn hergestellt werden kann. Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich im weiteren Verlauf mit beiden Aspekten. Diese Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert.

4.2 Liquor und Gehirn weisen überlappende Ig-Repertoires auf

Es wurde gezeigt, dass Zellen der B-Zelllinie im Liquor großen Anteil an der Produktion des OKB-Antikörperrepertoires haben. Doch auch am Ort der Autoimmunantwort, das heißt in den entzündlichen Läsionen im MS-Gehirn, sind B-Zellen und Antikörper lokalisiert. Um den Ursprung der Liquor-B-Zellen und -Antikörper weiter zu untersuchen, wurden vergleichende Analysen der Repertoires von Liquor und Gehirn durchgeführt. Für diese Studie stand Material von nur drei MS-Patienten zur Verfügung, da Liquor und Hirngewebe desselben Patienten nur äußerst selten parallel vorliegen. Biopsien von Hirngewebe werden aus ethischen Gründen kaum durchgeführt, weil dies aus klinischer Sicht fast nie notwendig ist. Bei Autopsien von MS-Patienten wird zwar häufig Läsionsgewebe entfernt, die Entnahme von Liquor ist jedoch meist nicht vorgesehen.

4.2.1 Ektopische Keimzentren erlauben eine intrathekale B-Zellreifung

B-Zellen müssen zunächst aus der Peripherie in das ZNS einwandern. Dies ist auf drei verschiedene Wege möglich: über den Plexus choroideus in den Liquor (Blut-Liquor-Schranke), über den perivaskulären Raum in den Subarachnoidalraum und damit ebenso in den Liquor sowie direkt ins Gehirnparenchym über die Blut-Hirn-Schranke [120]. Vermutlich werden B-Zellen im peripheren Lymphgewebe aktiviert, um von dort über einen der erläuterten Wege in das ZNS zu gelangen [44]. Um im Anschluss zu Antikörperproduzierenden Plasmazellen differenzieren zu können, muss im ZNS eine Umgebung geschaffen werden, welche in Anwesenheit des Antigens mit Unterstützung von T-Helferzellen diesen Entwicklungsschritt forciert [67]. Serafini *et al.* wiesen Strukturen in den Meningen im MS-Hirn nach, welche den Keimzentren sekundärer lymphatischer Organe in der Peripherie ähneln [130]. Dort sind alle notwendigen Komponenten für eine klassische Keimzentrumsreaktion nachzuweisen: folliculäre dendritische Zellen, T-Zellen sowie B-Zellen vor und nach der Differenzierung zu Plasmazellen [130]. Viele der dort befindlichen B-Zellen führen SHM durch (AID⁺), ein Teil der B-Zellen proliferiert stark (Ki67⁺), der andere Teil wird aufgrund niedriger Affinitäten durch Apoptose eliminiert (Caspase-3⁺) [129]. Diese Art ektopischer Keimzentren ist auch aus anderen Autoimmunerkrankungen im entzündeten Gewebe bekannt, beispielsweise in der Gelenkkapsel bei RA [141] oder in der Schilddrüse bei Hashimoto-Thyreoiditis [135]. Die dort gebildeten Antikörper richten sich bei letzterem tatsächlich gegen Schilddrüsen-spezifische Autoantigene wie Thyroglobulin und Thyroperoxidase und sind dadurch mit hoher Wahrscheinlichkeit pathogen [4].

Erst kürzlich konnte anhand einer Repertoirestudie an MS-Hirnen gezeigt werden, dass verwandte B-Zellklone in den Meningen und im Gehirnparenchym nachzuweisen sind [81]. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass B-Zellen nach ihrer Affinitätsreifung in den ektopischen Follikeln das Gehirnparenchym besiedeln. Von dort gelangt ein Teil der B-Zellen weiter in den Liquor, was aus dem zweiten Projekt der vorliegenden Arbeit hervorgeht.

4.2.2 B-Zellen im Liquor und Gehirn bilden ein Netzwerk verwandter Klone

Um zu überprüfen, ob B-Zellen im Liquor und Gehirn möglicherweise von gemeinsamen B-Zellklonen abstammen, wurden Ig-V(D)J-Transkripte beider Kompartimente miteinander verglichen. Die analysierten B-Zellen aus Gehirn hatten dabei ihren Ursprung direkt in den entzündlichen Herden im ZNS-Parenchym. Die detaillierte Charakterisierung der Ig-V(D)J-Transkripte brachte in beiden Kompartimenten eine Vielzahl von SHM als Zeichen gereifter B-Zellen nach Antigenkontakt hervor. Dies wurde bereits im ersten Projekt für B-Zellen aus Liquor beobachtet (siehe **Abschnitt 3.1.1**) und war konsistent mit früheren Studien [24, 103, 117, 125]. Für Läsionen waren derartige B-Zellpopulationen ebenso bekannt [8, 105]. In der vorliegenden Arbeit wurden Ig-V(D)J-Repertoires aus beiden Kompartimenten zum ersten Mal gegenübergestellt. Tatsächlich konnten B-Zellklone identifiziert werden, welche sehr ähnliche und teilweise sogar identische V(D)J-Sequenzen in unterschiedlichen Kompartimenten aufwiesen. Es ist anzunehmen, dass B-Zellen mit übereinstimmender hypervariabler CDR3-Region von einem gemeinsamen B-Zellklon abstammen. Dieser führte vermutlich während intraklonaler Teilungen neue SHM ein [92]. Klonale Varianten konnten sowohl in voneinander entfernten Läsionen als auch in Gehirn und Liquor nachgewiesen werden. Verwandte B-Zellklone mit gleicher Antigenspezifität könnten direkt an der Bildung mehrerer Plaques an verschiedenen Stellen im Gehirn beteiligt sein.

Ein Teil der B-Zellen könnte über die Zirkulation des Liquors aus dem Parenchym ausgeschwemmt werden. Liquor wird im Verlauf eines Tages etwa dreimal komplett erneuert. Dies könnte der Grund dafür sein, dass die Mehrheit der analysierten B-Zellklone einzigartig für Gehirn oder Liquor war. Insbesondere die Tatsache, dass das hier untersuchte Patientenmaterial in zwei Fällen aus Autopsien stammte, könnte die Vermutung dahingehend unterstützen, dass das B-Zellrepertoire aus einer Momentaufnahme resultiert. B-Zellen aus Gehirn würden bei einer fortlaufenden Zirkulation quantitativ in Liquor ausgeschwemmt werden und möglicherweise die B-Zellpopulation signifikanter abbilden als hier beobachtet.

Die Analyse des dritten Patienten mit Biopsiematerial erlaubte aufgrund unzureichender RNA-Konservierung in FFPE-Gewebe keine ausgedehnte Ig-V(D)J-Transkriptomanalyse des

Gehirns. Nichtsdestotrotz konnte auch hier anhand zweier überlappender B-Zellklone aus Liquor und Gehirn bestätigt werden, dass die beiden Kompartimente verwandte B-Zellen enthalten. Eine vergleichbare Verteilung einzelner sowie verwandter Klone im MS-Gehirn wurde bereits vor Jahren für T-Zellen beschrieben [56]. Dies deutet darauf hin, dass beide Vertreter des adaptiven Immunsystems, T- und B-Lymphozyten, im entzündeten Gehirn in ähnlicher Art und Weise organisiert sind und möglicherweise in ständiger Wechselwirkung stehen.

4.2.3 Liquor-Antikörper spiegeln Ig-Transkripte parenchymaler B-Zellen wider

Durch massenspektrometrische Analyse konnte untersucht werden, ob Antikörper im Liquor ursprünglich von B-Zellen im Gehirn stammen. Zahlreiche Peptide der Liquor-Antikörper stimmten dabei nicht nur wie erwartet mit dem Liquor-Ig-V(D)J-Transkriptom überein, sondern auch mit Transkripten aus Gehirn. Anhand der individuellen Signatur durch V(D)J-Rekombination und SHM ist die Überlappung spezifisch. Das bedeutet, dass das IgG-Proteom im Liquor das Ig-V(D)J-Transkriptom des entzündeten ZNS-Gewebes in großem Umfang widerspiegelt.

Es ist anzunehmen, dass in den entzündeten Plaques eine lokale Antikörperproduktion gegen Autoantigene des ZNS stattfindet. Antikörper und Antigen bilden in den Läsionen Immunkomplexe und bleiben solange im Gewebe, bis sie über Fc-Rezeptor-vermittelte Kaskaden abgebaut werden. Gestützt wird diese Hypothese von Studien, in denen Immunkomplexe mit Myelindebris im ZNS gemeinsam mit Komplement im Zytoplasma von Makrophagen nachweisbar waren [83, 138]. Antikörper mit der Spezifität für MOG konnten beispielsweise direkt aus Läsionsgewebe isoliert werden [35, 99]. Auch MBP-spezifische Antikörper wurden im MS-Gehirn nachgewiesen [157]. Ein gewisser Anteil der lokal produzierten Antikörper könnte in den Liquor ausgeschwemmt werden, möglicherweise aufgrund einer überschüssigen Antikörperproduktion. Um diese Annahme zu überprüfen, müsste auch das IgG-Proteom von Gehirnläsionen untersucht werden. Könnten in diesem Fall überlappende Antikörperpopulationen in beiden Kompartimenten nachgewiesen werden, würde dies die Hypothese stützen. Leider war dieser Teil der Analyse aufgrund der limitierten Verfügbarkeit von Läsionsgewebe nicht möglich. Massenspektrometrie ist weitaus weniger sensitiv als die Methoden der oben genannten Studien (Immunoassays mit Gold-, Fluoreszenz- oder radioaktiv markierten Detektionsantikörpern). Für ein aussagekräftiges Ergebnis wären demnach sehr viel größere Antikörpermengen nötig.

Zusammenfassend können bislang bekannte Hinweise aus der Literatur um die Ergebnisse des zweiten Projekts zu folgendem Bild ergänzt werden (**Abb. 4-2**).

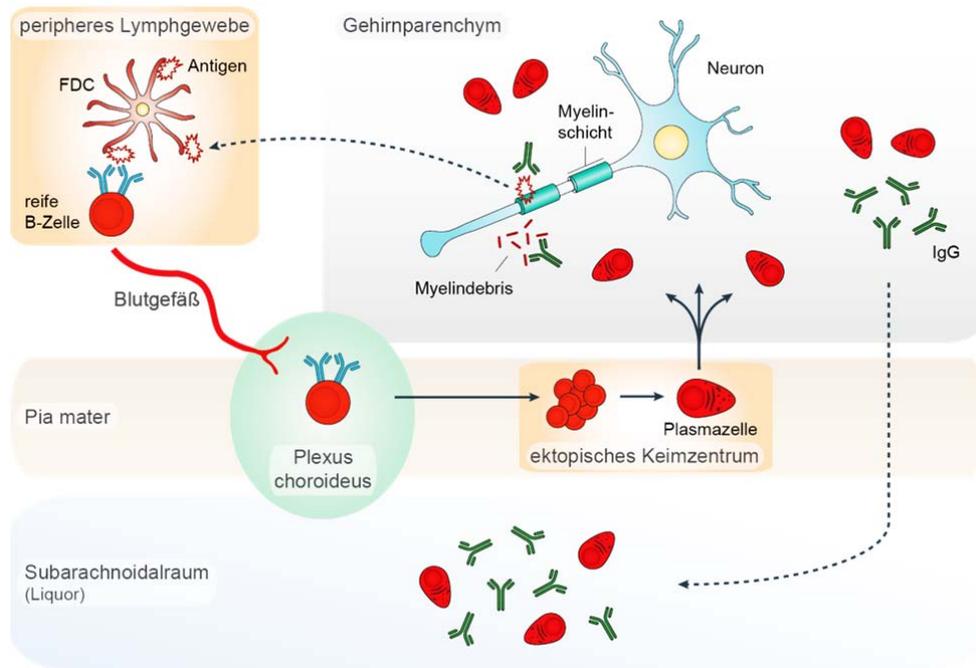


Abb. 4-2: Hypothese zur Reifung und Zirkulation von B-Zellen bei MS

B-Zellen treffen in peripherem Lymphgewebe über folliculäre dendritische Zellen (FDC) auf ein ZNS-Autoantigen. Dessen Transport aus dem Gehirnparenchym ist bislang noch nicht verstanden. Möglicherweise handelt es sich auch um Fremdantigene, welche zufälligerweise ZNS-Autoantigenen ähneln („molekulare Mimikry“, hier nicht gezeigt). Aktivierte reife B-Zellen wandern aus der Peripherie beispielsweise über den Plexus choroideus in das ZNS ein. In ektopischen Keimzentren der Pia mater durchlaufen sie dann eine Antigen-spezifische und T-Zellabhängige Affinitätsreifung mit klonaler Expansion. Als Plasmazellen besiedeln sie anschließend das Gehirnparenchym. Deren hochaffine IgG-Antikörper erkennen Antigene der Myelinschicht von Neuronen und sind dadurch möglicherweise direkt an der Demyelinisierung beteiligt. Ebenso ist denkbar, dass Myelindebris und nicht die intakte Myelinschicht gebunden werden. Ein Teil der Plasmazellen als auch überschüssige IgG-Antikörper werden von dort letztlich über die Liquorzirkulation in den Subarachnoidalraum ausgeschwemmt. Im Rahmen der MS-Diagnose wird Liquor mittels Lumbalpunktion entnommen und die IgG-Antikörper können im Anschluss nach IEF und Immunfixierung als OKB abgebildet werden (siehe dazu **Abb. 1.5**)

4.3 Strategien zur Identifizierung von Antigenen der OKB

In den ersten beiden Projekten wurde die Herkunft der Antikörper im Liquor bestimmt. Demnach tragen sowohl Liquor-B-Zellen als auch B-Zellen im entzündeten Gehirnparenchym zum Liquor-Antikörperrepertoire bei. Liquor-Antikörper stammen aufgrund zahlreicher SHM von einer Antigen-induzierten Immunantwort im ZNS ab. Insbesondere Antikörper der OKB sind von Interesse, da sie stark expandiert sind und als Komplement-aktivierender IgG1-Subtyp exprimiert werden. In zahlreichen Studien wurden verschiedene Antigene aus unterschiedlichen experimentellen Ansätzen diskutiert. In der vorliegenden Arbeit wurde eine völlig neue Strategie entwickelt. Im Folgenden sollen die bisherigen Methoden kurz erläutert und der eigenen gegenübergestellt werden.

4.3.1 Bisherige Studien

Bislang wurden für die Antigensuche zwei grundlegend unterschiedliche Strategien angewendet. Entweder führte man die Experimente mit dem zellfreien Überstand von Liquor durch, oder man rekonstruierte monoklonale Antikörper aus einzelnen Liquor-B-Zellen.

Im ersten Fall werden Liquorproben mit potentiellen Antigenen inkubiert und daran gebundene IgG-Antikörper mithilfe eines sekundären Antikörpers detektiert. Weit verbreitet ist die Antigensuche mittels ELISA [28, 52, 123] oder Immunoblot [20, 69, 80]. Die genannten Ansätze haben allerdings den entscheidenden Nachteil, dass Liquor nicht nur expandierte intrathekal synthetisierte Antikörper enthält, sondern auch eine polyklonale Population, welche ständig an der Blut-Liquor-Schranke aus der Peripherie infiltriert wird. Demnach kann bei Verwendung von Liquorproben nicht unterschieden werden, ob Signale von relevanten OKB-Antikörpern oder von irrelevanten Antikörpern der Hintergrundpopulation stammen.

Die zweite Strategie basiert auf einem molekularbiologischen Ansatz. Einzelne B-Zellen werden mithilfe von Durchflusszytometrie üblicherweise über den Oberflächenmarker CD138 aus Liquor sortiert. CD138 charakterisiert das Stadium Antikörper-produzierender Plasmablasten und Plasmazellen. Einzelzell-PCR erlaubt im Anschluss die Identifizierung gepaarter H- und L-Ketten. Daraus werden rekombinante Antikörper hergestellt und deren Spezifitäten untersucht [164]. Zwar gelingt es mit dieser Methode, die polyklonale Antikörperpopulation auszuklammern, es kann jedoch kein Beweis erbracht werden, ob die gewählte B-Zelle einen relevanten Antikörper produziert. Eine Alternative ist die Expression von Antikörpern klonal expandierter Plasmazellen [72, 104, 154]. Im Prinzip legitimieren die Erkenntnisse des ersten Projekts der vorliegenden Arbeit den molekularbiologischen Ansatz,

da nachweislich ein beträchtlicher Teil der Liquor-B-Zellen Liquor-Antikörper produziert (siehe **Abschnitt 3.1**). Zudem konnte das Ergebnis der eigenen Arbeit bereits in einer unabhängigen Studie verifiziert werden [153]. Nichtsdestotrotz bleibt ungewiss, ob der untersuchte Antikörper nicht vielleicht doch der unbeteiligten Population angehört.

4.3.2 Das neue Protokoll erlaubt die Rekonstruktion einzelner OKB-Antikörper

In der vorliegenden Arbeit wurde eine völlig neue Methode zur Antigensuche entwickelt. Im Prinzip vereint sie die oben genannten Strategien, vermeidet jedoch deren Nachteile. Zunächst werden in der Liquorprobe eines MS-Patienten die oligoklonalen Antikörper über Elektrophorese und Proteinfärbung detektiert. Sie werden einzeln aus dem Gel isoliert und massenspektrometrisch analysiert. Da Massenspektrometrie praktisch nie eine Sequenzabdeckung von 100% liefert, werden die Peptidmassen den Ig-V(D)J-Transkriptdatenbanken aus Liquor-B-Zellen desselben Patienten zugeordnet. Dadurch können ebenfalls rekombinante Antikörper oder, wie hier, Fab-Fragmente hergestellt werden. Diese Strategie garantiert, dass in der nachfolgenden Antigensuche ausschließlich echte OKB-Antikörper untersucht werden.

4.3.2.1 Hochauflösende Antikörpertrennung

Der erste entscheidende Schritt im neu entwickelten Protokoll ist die Deglykosylierung der IgG-Antikörper nach deren Isolierung aus einer Liquorprobe mit Protein G. Dadurch konnte, wie anhand eines monoklonalen Antikörpers gezeigt, die Heterogenität der Antikörperpopulation und damit die Anzahl der Banden reduziert werden (siehe **Abb. 3.3-4**). Darauf folgt eine äußerst effiziente Trennung der Antikörper mittels 2D-Gelelektrophorese. Trotz nicht-reduzierender Bedingungen kommt es bei der IEF zu einer partiellen Abtrennung der L-Ketten. Der zugrunde liegende elektrochemische Mechanismus ist noch nicht verstanden. Möglicherweise kann folgende Überlegung das Phänomen erklären.

Die IEF wird in Harnstoff durchgeführt. Harnstoff bewirkt die Auffaltung der Proteine, indem Wasserstoffbrücken aufgebrochen werden. Die Disulfidbrücken bleiben unter diesen Bedingungen durch den Verzicht auf reduzierende Reagenzien wie DTT erhalten. Intermolekular besitzen IgG1-Antikörper zwei Disulfidbrücken zwischen den beiden H-Ketten und nur je eine Disulfidbrücke zwischen H- und L-Kette. Während der IEF entsteht bei Spannungen bis zu 8000 V und insbesondere bei extremen pH-Werten ein starkes elektrisches Feld, welches möglicherweise reduzierendes Potential besitzt. Dabei scheint die Bindung zwischen H- und L-Kette aufgrund der einzigen Disulfidbrücke labiler zu sein als

die Bindung zwischen den H-Ketten, welche durch eine zweite Disulfidbrücke stabilisiert wird. Da anzunehmen ist, dass sich aufgrund verschiedener Aminosäuresequenzen die isoelektrischen Punkte der H- und L-Ketten unterscheiden, werden diese, je nach momentaner Position im pH-Gradienten, in unterschiedliche Richtungen gezogen. Wenn nun nach obiger Annahme das starke elektrische Feld dazu in der Lage ist, Disulfidbrücken zu reduzieren, werden die Ketten nach ihrer Trennung an unterschiedlichen isoelektrischen Punkten fokussiert. **Abbildung 3.3-2** zeigt, dass Antikörper, wenn sie bei extremen pH-Werten auf das IEF-Gel geladen werden, vollständig reduziert werden. Wird der Antikörper hingegen im schwach sauren pH-Bereich appliziert, so kommt es lediglich zu einer partiellen Reduktion der einzigen Disulfidbrücke zwischen H- und L-Kette (siehe **Abb. 3.3-3**). Dass in diesem Fall die H-Ketten zusammengehalten werden, hat möglicherweise zwei Gründe: erstens wird die Bindung zwischen den H-Ketten durch zwei Disulfidbrücken gefestigt, zweitens haben beide H-Ketten identische isoelektrische Punkte und werden dadurch zusätzlich stabilisiert.

Erst die Trennung nach Molekulargewicht durch SDS-PAGE in der zweiten Dimension macht es möglich, intakte H₂L₂-Heterodimere nachzuweisen. Einzelne OKB-Antikörper können daraufhin gezielt aus dem Gel isoliert werden.

4.3.2.2 Semi-quantitative Auswertung von Massenspektren

Antikörper werden im ersten Schritt des Protokolls aus Liquor über Protein G-Affinitätschromatographie gereinigt. Dadurch befindet sich auch das polyklonale Antikörperrepertoire in der Probe, da mit Protein G alle IgG-Moleküle isoliert werden. Die gesamte Antikörperpopulation wird deglykosyliert und über 2D-Gelelektrophorese getrennt. Je nach IgG-Quotient können nach Coomassie-Färbung die expandierten OKB-Antikörper mehr oder weniger gut von den polyklonalen Antikörpern unterschieden werden. Je höher IgG^Q, desto weniger Antikörper stammen aus Serum und desto höher ist der Anteil der OKB am IgG-Gesamtgehalt im Liquor. Stark gefärbte distinkte Spots werden anschließend aus dem Gel isoliert. In einem Spot befinden sich aber nicht nur der expandierte OKB-Antikörper, sondern unvermeidbar zu einem gewissen Anteil auch polyklonale Antikörper, deren Peptide im Massenspektrum nachweisbar sind. Deshalb wird im neuen Protokoll eine sehr stringente Auswertung der MALDI-TOF-Daten mit erhöhten Schwellenwerten angewendet. Nur so kann gewährleistet werden, dass Peptide mit hoher Signalintensität von expandierten OKB-Antikörpern stammen.

Bei den zugeordneten H- und L-Ketten ergaben sich bemerkenswerte Sequenzabdeckungen von teilweise nahezu 100% und eine beachtliche Ausbeute an verifizierten Aminosäuresequenzen durch Tandem-Massenspektrometrie von mehr als 50%. Zudem

konnten in allen Massenspektren annähernd alle dominanten Signale einer Antikörperspezies zugeordnet werden, was bestätigt, dass es sich um Antikörper der OKB handelte.

Bei vielen Spots konnten keine gepaarten H- und L-Ketten identifiziert werden, obwohl sie im 2D-Gel deutlich gefärbt und distinkt waren. Dafür sind folgende Gründe anzuführen: entweder stammten die identifizierten Peptide von verschiedenen Ketten aus dem Ig-V(D)J-Transkriptom oder es handelte sich um nicht charakteristische Keimbahn-codierte Sequenzen. Außerdem wurden Spots verworfen, in denen die Signalintensitäten der V-Regionen im Vergleich zur C-Region sehr klein waren. In anderen Fällen scheiterte die Zuordnung an unvollständigen Ig-V(D)J-Transkriptdatenbanken.

Die wichtigsten Schritte des etablierten Protokolls sind in **Abbildung 4-3** anhand eines Fließschemas veranschaulicht, beginnend mit einer Probe einer sehr heterogenen und komplexen Körperflüssigkeit, in diesem Fall Liquor eines MS-Patienten, bis hin zur Identifizierung einer einzigen H- und L-Kette eines einzelnen OKB-Antikörpers.

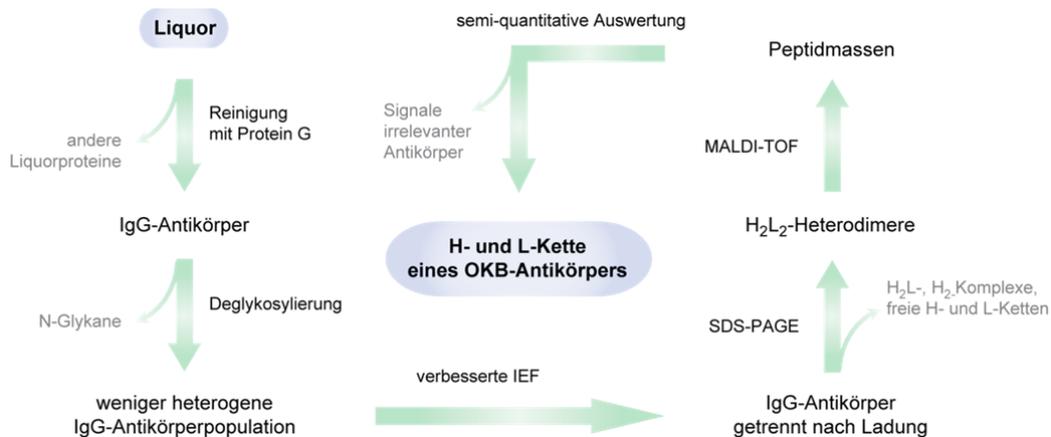


Abb. 4-3: Fließschema des etablierten Protokolls zur Identifizierung einzelner OKB-Antikörper aus Liquor

Aus einer Liquorprobe eines MS-Patienten werden zunächst alle IgG-Antikörper mittels Protein G-Affinitätschromatographie isoliert und dabei alle anderen Liquorproteine wie beispielsweise Albumin abgetrennt. Die gereinigten IgG-Antikörper werden anschließend deglykosyliert, um die Heterogenität des Antikörpergemischs zu reduzieren. Dabei werden alle N-Glykane abgespalten, welche aufgrund ihrer möglichen Sialinisierung die Nettoladung der Antikörper beeinflussen. Die verbesserte IEF, bestehend aus der OFFGEL-Apparatur, einer angepassten Probenapplikation sowie einem Fokussierungsprotokoll mit insgesamt 120 kVh, führt zu einer äußerst effizienten Trennung der Antikörper nach Ladung. Die weitere Proteintrennung mit SDS-PAGE ermöglicht die Detektion von Heterodimeren aus zwei H- und zwei L-Ketten. Deren Peptidmassen werden über MALDI-TOF Massenspektrometrie bestimmt. Um Signale irrelevanter Antikörper, welche von der polyklonalen IgG-Hintergrundpopulation stammen, von Signalen expandierter OKB-Antikörper zu unterscheiden, wird eine stringente semi-quantitative Auswertung angewendet. Sie erlaubt letztlich die eindeutige Zuordnung einer H- zu einer L-Kette eines OKB-Antikörpers.

4.4 Test der OKB-basierten Fab-Fragmente auf Kandidatenantigene

Anhand des neu entwickelten Protokolls konnten im Verlauf der Arbeit fünf OKB-Antikörper aus drei verschiedenen MS-Patienten identifiziert werden. Als rekombinant exprimierte Fab-Fragmente wurden sie im Anschluss in verschiedenen Experimenten zur Antigensuche eingesetzt. Zunächst wurden Kandidatenantigene getestet, welche bereits in der Literatur für MS beschrieben sind, es bislang jedoch nicht gelang, diese eindeutig den OKB-Antikörpern zuzuordnen.

4.4.1 Hirngewebe sowie virale und bakterielle Erreger

Da bei MS offensichtlich die Myelinschicht der Nervenzellen im ZNS geschädigt wird, bestand das erste Experiment aus der Färbung von Hirngewebe. Mit Fab-8-18C5 konnte innerhalb der weißen Gehirnssubstanz MOG gefärbt werden (siehe **Abb. 3.6-1a**). Das Färbemuster entsprach den Erwartungen [166] und bestätigte die Funktionalität der gewählten Versuchsbedingungen. Punktförmige Signale bei allen OKB-basierten rFab-Fragmenten waren als unspezifisch zu interpretieren, da auch die Negativkontrolle, der sekundäre His₍₆₎-spezifische Antikörper ohne Primärantikörper, ein identisches Muster zeigte (siehe **Abb. 3.6-1b-g**). Sicherlich befinden sich im Hirngewebe viele Histidin-reiche Proteine, welche direkt vom Sekundärantikörper gebunden werden. Üblicherweise werden bei Immunfluoreszenzfärbungen Antikörper statt Fab-Fragmente eingesetzt. Die Entscheidung, OKB-Antikörper als Fab-Fragmente zu exprimieren, war darin begründet, dass im zu untersuchenden Gewebe Fc-Rezeptoren vorhanden sind, welche Antikörper, nicht aber Fab-Fragmente binden können. Darauf beruhende unspezifische Signale können dadurch im Vorfeld reduziert werden. Die Verwendung von Antikörpern hätte hingegen den Vorteil, dass direkt mit anti-IgG gegen die Spezies des Primärantikörpers detektiert werden könnte. Da Fab-Fragmente über keinen Fc-Teil verfügen, ist diese Art der Detektion hier nicht möglich und erfolgte deshalb über das His₍₆₎-Signalpeptid. Eine Alternative wäre ein Detektionsantikörper gegen den C-Teil der κ -Ketten, da alle rFab-Fragmente die Volllänge-Sequenz der C κ -Region besitzen. Anwendbar ist dies allerdings nur bei gesundem Hirngewebe, nicht bei Hirngewebe eines MS-Patienten, da für letzteres Ig-Ablagerungen bekannt sind [10, 35, 99, 157].

Hintergrundfärbungen des His₍₆₎-spezifischen Antikörpers waren auch bei den Immunfluoreszenztests gegen virale und bakterielle Antigene zu beobachten. Unter anderem wurden Masern-, Röteln- und Varizella Zoster-Viren getestet, da die sogenannte MRZ-Reaktion im Liquor mit einer Häufigkeit von 89% eine Art Biomarker von MS darstellt [123].

Interessanterweise zeigen die wenigen MS-Patienten ohne OKB auch keine MRZ-Reaktion [123]. Diese Tatsache ließe vermuten, dass die MRZ-Reaktion unmittelbar mit OKB-Antikörpern in Zusammenhang stehe. Eine spezifische Reaktivität gegen eines der Viren war jedoch mit keinem der OKB-basierten rFab-Fragmente nachzuweisen. Um die starke Hintergrundfärbung des Sekundärantikörpers zu reduzieren, wurden Präkomplexe aus rFab-Fragment und His₍₆₎-spezifischem Antikörper eingesetzt. Dadurch sollten alle freien Antigenbindungsstellen des Sekundärantikörpers im Vorfeld abgesättigt werden. Tatsächlich konnte die unspezifische Hintergrundfärbung dadurch stark reduziert werden. Mit Fab-HM-63-s8 und Fab-NS-52 ergaben sich jedoch nach wie vor in allen Experimenten Färbungen aller Zellen im Testfeld. Aus diesem Grund lag die Vermutung nahe, dass nicht die viralen Erreger, sondern bislang unbekannt ubiquitäre Antigene erkannt werden.

4.4.2 Ubiquitäre intrazelluläre Antigene

Eine Studie von Williamson und Kollegen zeigte anhand zweier rekombinant exprimierter Antikörper aus Liquor-B-Zellen eines MS-Patienten, dass diese doppelsträngige DNA binden [158]. Dieses Phänomen wurde ursprünglich für die Autoimmunerkrankung SLE beschrieben und trifft dort mit sehr hoher Frequenz von bis zu 95% aller Patienten zu [143]. Wie bereits im **Abschnitt 4.3.1** erläutert, kann mit einem Einzelzell-PCR-Ansatz jedoch nicht gewährleistet werden, dass der untersuchte Antikörper der OKB-Population angehört. Intrazelluläre Proteine aus gewöhnlichen Stoffwechselprozessen wurden ebenso als mögliche Antigene von Liquor-Antikörpern nachgewiesen. Beispielsweise konnten Triosephosphat Isomerase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase [69] oder Transketolase [80] als Antigene detektiert werden, wenn Gehirnextrakte elektrophoretisch aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine Membran mit Liquor von MS-Patienten inkubiert wurden. Ob die Signale von expandierten OKB-Antikörpern stammen oder von polyklonalen irrelevanten Antikörpern, kann mit diesem Ansatz jedoch nicht bestimmt werden. Zwar werden Einschränkungen beider angewandter Methoden mit dem hier etablierten Protokoll umgangen, ubiquitäre Antigene konnten allerdings auch mit individuellen OKB-Antikörpern nicht identifiziert werden. Sowohl die indirekte Immunfluoreszenz gegen nukleäre Antigene als auch der Test auf intrazelluläre Proteine im nativen sowie denaturierten Zustand waren negativ.

Um eine Aussage treffen zu können, ob die rFab-Fragmente tatsächlich keine intrazellulären Antigene erkennen, müssten die Experimente langfristig unter optimierten Versuchsbedingungen wiederholt werden. Darauf wird im Folgenden sowie im **Abschnitt 4.6** nochmals kurz eingegangen.

4.4.3 Avidität und Affinität als limitierende Faktoren

Die Affinität der verwendeten OKB-basierten rFab-Fragmente sollte aufgrund ausgeprägter SHM infolge der Affinitätsreifung sehr hoch sein. Möglicherweise spielt jedoch die Avidität hier eine limitierende Rolle. IgG-Antikörper besitzen im Gegensatz zu monovalenten Fab-Fragmenten zwei Antigenbindungsstellen. Ist beispielsweise auf einer Blotmembran eine genügend hohe Dichte an Antigenmolekülen gegeben, so ist die Avidität hoch, da die IgG-Antikörper gleichzeitig zwei Antigene binden, Fab-Fragmente jedoch nur eines. Antikörper und Antigen befinden sich ständig in einem Gleichgewicht zwischen Bindung und Dissoziation. Dieses Gleichgewicht wird in Richtung Immunkomplex verschoben, je höher die Affinität des Antikörpers zum Antigen ist. Eine niedrige Affinität kann durch eine hohe Avidität kompensiert werden und umgekehrt. Bei gleicher Affinität ist mit einem bivalenten IgG-Antikörper die Wahrscheinlichkeit, dass mindestens eine von zwei Antigenbindungsstellen besetzt ist, daher höher, als bei monovalenten Fab-Fragmenten. Die ausgebildeten Immunkomplexe mit IgG-Antikörpern sind folglich beispielsweise während der Waschschriffe beim Immunoblot sehr stabil. Im Fall von Fab-8-18C5 war die Affinität zu MOG im Hirngewebe offensichtlich genügend hoch, um die geringe Avidität auszugleichen. Reicht die Affinität der Fab-Fragmente jedoch nicht aus, so werden diese relativ leicht von einer Blotmembran oder einem Objektträger gewaschen. Hilfreich könnten höhere Antigenkonzentrationen im Ausgangsmaterial sein. Im Gegensatz zu Immunfluoreszenzfärbungen von Zellen oder Geweben wäre dies bei Experimenten mit Zelllysate (Immunoblot, Affinitätschromatographie, Immunpräzipitation) umsetzbar. Alternativ ist eine Präkomplexierung der monovalenten Fab-Fragmente über einen Sekundärantikörper gegen C κ denkbar, um die Avidität zu erhöhen. His₍₆₎-spezifische Antikörper sind aufgrund unspezifischer Hintergrundfärbungen zukünftig zu vermeiden.

4.5 Zwei OKB-basierte rFab-Fragmente reagieren mit Sulfatid

Alle bislang untersuchten Antigene viraler und bakterieller Erreger, Hirngewebe sowie intrazelluläre Antigene wie Zellkerne oder Proteine aus Zelllysate konnten mit den angewandten Methoden nicht als Antigene der OKB-Antikörper identifiziert werden. Erst der Test auf Lipide deckte die Spezifität von zwei der fünf OKB-basierten rFab-Fragmente auf.

4.5.1 Die Myelinschicht im ZNS ist zu 80% aus Lipiden aufgebaut

Bei MS stellt die Myelinschicht im ZNS das Zielgewebe der Autoimmunreaktion dar. Eine zusammenfassende Darstellung des Aufbaus von Myelin zeigt **Abbildung 4-4**.

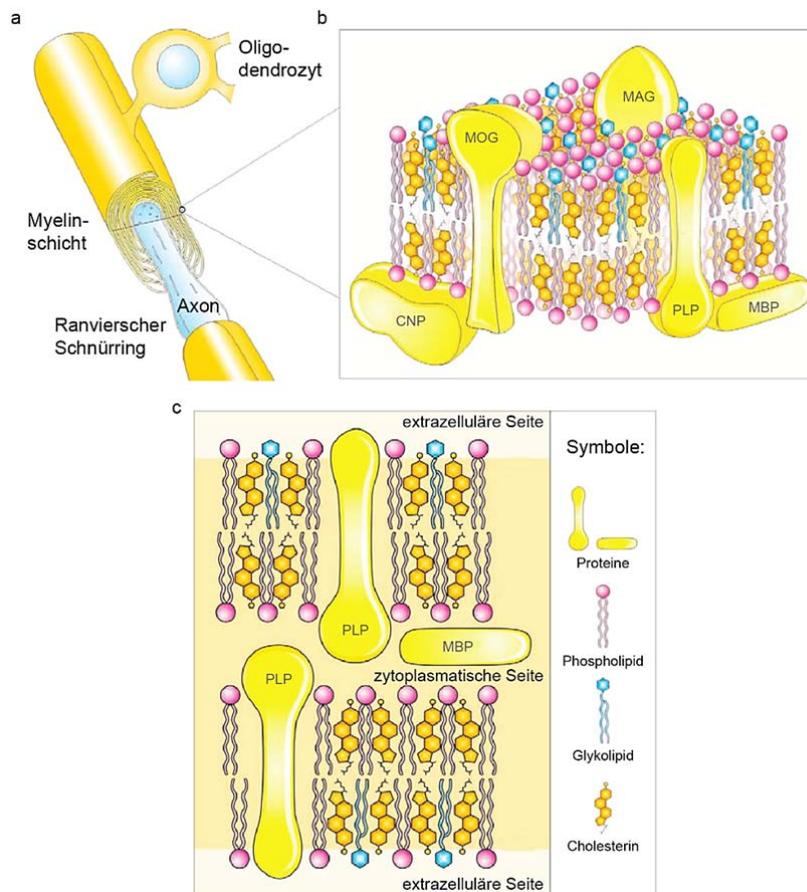


Abb. 4-4: Aufbau der Myelinschicht im ZNS

(a) Oligodendrozyten umwickeln die Axone der Nervenzellen mit etlichen Myelinschichten. An den Ranvierschen Schnürringen ist die Myelinschicht für die saltatorische Signalweiterleitung unterbrochen. **(b)** Molekularer Aufbau. Myelin besteht aus einer Lipiddoppelschicht mit 80% Lipid (Phospholipid, Glykolipid, Cholesterin) und 20% Protein (PLP Proteolipid Protein, MBP Basisches Myelinprotein, MOG Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein, MAG Myelin-assoziiertes Glykoprotein, CNP zyklische Nukleotid Phosphodiesterase). **(c)** Verteilung unterschiedlicher Lipidklassen und der häufigsten Proteine. Kopfgruppen der Glykolipide zeigen im Gegensatz zu Phospholipiden ausschließlich auf die extrazelluläre Seite. (modifiziert nach [109])

Myelin besteht nur zu 20% aus Proteinen. Dabei sind das integrale PLP und das extrinsische MBP am häufigsten vertreten. Zu einem geringeren Anteil ist MOG in die Myelinschicht integriert. Immunantworten gegen Myelinproteine, sowohl T-Zell- als auch Antikörpervermittelt, sind für MS mehrfach beschrieben [1, 35, 55, 64, 71, 99, 102, 119, 140, 157].

80% der Myelinschicht werden von Lipiden gebildet. Es werden drei Hauptgruppen unterschieden: Phospholipide, Glykolipide und Cholesterin. Während Glykolipide mit ihrer hydrophilen Kopfgruppe ausschließlich in den Extrazellulärraum ragen, sind die Kopfgruppen der Phospholipide sowohl auf der extrazellulären als auch auf der zytoplasmatischen Seite exponiert. Es ist anzunehmen, dass speziell die hydrophilen Kopfgruppen im Extrazellulärraum demnach für Antikörper zugänglich sind.

4.5.2 Anti-Lipid-Antikörper haben in EAE und MS pathogenes Potential

Zwei von fünf OKB-basierten rFab-Fragmenten zeigten im *Glycolipidarray* eine signifikante Reaktivität gegen Sulfatid und Komplexe aus Sulfatid und GalC. GalC ist das häufigste Glykolipid in der Myelinschicht, ein Fünftel des Glykolipidanteils machen Sulfatide aus [109]. Der einzige Unterschied besteht im negativ geladenen Sulfat am 3'-OH der Galactose. Antikörper gegen GalC induzieren *in vitro* und *in vivo* eine Demyelinisierung [91, 127].

Im Blut von knapp der Hälfte aller MS-Patienten sind anti-Lipid-Antikörper nachzuweisen [85]. Sulfatid-spezifische Antikörper im Liquor wurden bereits in früheren Studien identifiziert, entweder über einen ELISA-basierten Ansatz [52] oder mit einem der vorliegenden Arbeit vergleichbaren *Glycolipidarray* [61]. Arbeiten im Tiermodell wie auch klinische Studien liefern in Ergänzung dazu Hinweise auf eine immunpathophysiologische Bedeutung dieser Lipid-reaktiven Antikörper. Implantiert man Empfängerratten Hybridomzellen, welche den Sulfatid-spezifischen Antikörper „O4“ produzieren [136], in das Rückenmark, so setzt eine lokale Demyelinisierung ein [126]. Sobald die Hybridomzellen zu degenerieren beginnen und keine anti-Sulfatid-Antikörper mehr gebildet werden, kommt es zur Remyelinisierung der Nervenzellen [126]. Sowohl der Transfer von Sulfatid-spezifischen Antikörpern als auch die Coimmunisierung von PLP mit Sulfatid löst bei EAE-Mäusen einen dramatischeren Krankheitsverlauf aus [61]. Interessanterweise korrelieren auch bei MS-Patienten hohe Antikörpertiter gegen Lipide im Liquor mit einer höheren Schubrate und schwerwiegenderen neurologischen Defiziten [152]. Vieles spricht demnach dafür, dass Lipid-reaktive Antikörper pathogen sind. Bislang war es jedoch nicht möglich, diese Antikörper den OKB zuzuordnen. Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit, dass auch zwei der insgesamt fünf getesteten OKB-basierten rFab-Fragmente mit Lipiden reagieren, schließt diese Lücke.

4.5.3 Induziert molekulare Mimikry die Reaktivität gegen Myelinlipide?

Während die meisten der eben genannten Studien Lipid-spezifische Antikörper ausschließlich als Antikörper der Klasse IgM identifizierten [85, 126, 136, 152], handelt es sich bei den hier untersuchten rFab-Fragmenten ausnahmslos um IgG. Gemäß den Eigenschaften von OKB-Antikörpern zeichnen sie sich durch zahlreiche SHM aus. Dies zeigt, dass die korrespondierenden B-Zellen ihrem Antigen ausgesetzt waren. In einer Keimzentrumsreaktion haben sie die Affinität ihrer Antikörper erhöht und den Klassenwechsel von IgM zu IgG vollzogen. Dieser Prozess ist abhängig von CD4⁺ T-Helferzellen. Da diese ausschließlich Peptide erkennen, stellt sich die Frage, wie es prinzipiell zu einer Affinitätsreifung für Lipidantigene kommen kann. Lipide werden statt über MHC- über CD1-Proteine präsentiert [112]. Interessant ist CD1d, welches NK T-Zellen aktiviert [40]. CD1d wird bevorzugt mit Glykolipiden wie Sulfatid beladen [53]. B-Zellen können über ihren BZR Glykolipide internalisieren, in Endosomen CD1d-Moleküle damit beladen und auf ihrer Zelloberfläche den NK T-Zellen präsentieren [73]. Diese Wechselwirkung führt dazu, dass B-Zellen proliferieren und Glykolipid-spezifische IgM-Antikörper sezernieren [11]. Ob NK T-Zellen auch im Keimzentrum mit B-Zellen interagieren und dadurch eine Affinitätsreifung ablaufen kann, ist nicht bekannt [74].

Auch Glykolipide bakterieller Herkunft werden über CD1d präsentiert [65, 88, 160]. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass molekulare Mimikry dazu führen könnte, nach einer Infektion die Toleranz von B-Zellen gegenüber körpereigenen Myelinlipiden zu brechen. Bekannt ist dieses Phänomen von GBS, einer Entzündung peripherer Nerven mit Lähmungserscheinungen in Armen und Beinen. Der Verlauf ist im Gegensatz zu MS akut und monophasisch [3]. Der Heilungsprozess kann durch Plasmapherese beschleunigt werden [147], was auf eine Antikörper- und Komplement-vermittelte Immunpathogenese hinweist [159]. Ein Großteil der GBS-Patienten berichtet von einer Infektion, meist mit dem bakteriellen Erreger *Campylobacter jejuni*, bevor erste neurologische Symptome auftreten [51]. Bei der Infektion werden zunächst Antikörper gegen Lipooligosaccharid (LOS) gebildet, dessen Kohlenhydrate von der bakteriellen Zellwand nach außen ragen. Diese Antikörper schädigen später das Myelin peripherer Nerven, da das erkannte LOS-Epitop der Kopfgruppe eines Myelinlipids, dem Gangliosid GM1, ähnelt [3]. Das pathogene Potential dieser anti-Gangliosid-Antikörper ist mittlerweile unbestritten [108]. Am Ort der Entzündung findet man vergleichbar mit Läsionen bei MS T-Zellen, B-Zellen, Ig- und Komplementablagerungen sowie Makrophagen [49].

4.5.4 Die Antigenbindungsstelle von Antikörpern bietet Platz für Polyspezifität

Im Fall von Fab-HM-63-s9 fiel auf, dass nicht nur Sulfatide erkannt wurden, sondern auch einige andere Lipide wie Cardiolipin und Monogalactosyldiglycerid. Eine derartige Polyspezifität von Antikörpern gegen Lipide ist auch für GBS bekannt. Werden Serum-Antikörper von GBS-Patienten getestet, so ergibt sich ein ähnliches Bild wie für Fab-HM-63-s9. Es werden sowohl einzelne Lipide als auch Komplexe erkannt (siehe auch **Abb. 3.6-5**). Eine Mischung aus zwei Lipiden kann zu neuartigen Epitopen führen, welche möglicherweise mit veränderter Affinität erkannt werden [60, 70]. Auch die Avidität kann einen Einfluss haben. Bindet ein Antikörper mit seiner Antigenbindungsstelle gleichzeitig an zwei Lipide, ist die Avidität höher als mit nur einem gebundenen Lipid (siehe auch **Abschnitt 4.4.3**). **Abbildung 4-5** macht deutlich, wie es aus rein räumlichen Gründen zur Polyspezifität kommen kann.

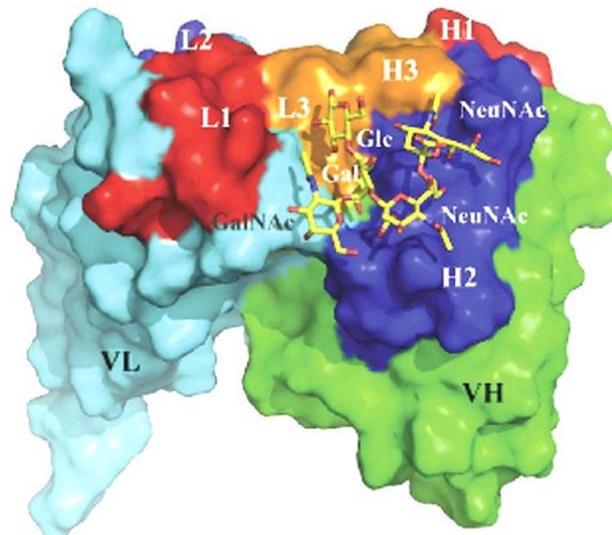


Abb. 4-5: NMR-Struktur eines Fv-Fragments mit gebundener Kopfgruppe eines Gangliosids

Das Fv-Fragment ist als molekulare Oberfläche dargestellt. Die V-Regionen sind für die H-Kette in grün (VH) und für die L-Kette in hellblau (VL) gezeigt. Weiterhin ist die Antigenbindungsstelle, welche aus den insgesamt sechs CDR-Regionen gebildet wird, gesondert markiert: die CDR1-Regionen der H- (H1) beziehungsweise der L-Kette (L1) in rot, CDR2 in dunkelblau (H2 und L2) sowie CDR3 in orange (H3 und L3). Vom Ligand GD2, einem Gangliosid, ist die Kopfgruppe im Stäbchenmodell eingezeichnet (Kohlenstoff in gelb, Stickstoff in blau und Sauerstoff in rot). Es fällt auf, dass der Ligand lediglich die Oberfläche von H2 und L3 beansprucht. L1, L2, H1 und H3 sind unbesetzt. [146]

Die Größenverhältnisse von Antigenbindungsstelle zu einem Lipidantigen zeigen, dass bei gebundener Kopfgruppe nach wie vor ausreichend Oberfläche zur Verfügung steht, weitere Lipide oder auch Proteine und Nukleinsäuren zu binden. Man spricht in diesem Fall auch von

polyreaktiven Antikörpern [97]. Eine derartige Polyreaktivität wurde bereits mit Autoantikörpern aus Patienten mit Neuromyelitis optica beobachtet ([16], in Revision). Sie binden sowohl das Membranprotein Aquaporin-4 als auch Lipide. Ähnliches gilt für Antikörper gegen Masern-Viren von Patienten mit subakuter sklerotischer Panenzephalitis, welche nicht nur mit viralen Proteinen, sondern auch mit Glykolipiden reagieren ([16], in Revision). Dieses Phänomen könnte erklären, warum OKB-Antikörper trotz ihrer Reaktivität gegen Lipide eine von $CD4^+$ T-Zellen abhängige Affinitätsreifung durchlaufen haben. Die korrespondierenden B-Zellen führen im Keimzentrum SHM durch, welche zunächst von einem Proteinantigen induziert wird. Die resultierenden hochaffinen IgG-Antikörper könnten anschließend im ZNS spezifisch mit Proteinen möglicherweise der Myelinschicht reagieren und dabei zufällig auch damit assoziierte Myelinlipide binden.

4.6 Weiterführende Experimente

Um die eben genannte Hypothese einer Polyreaktivität der oligoklonalen Antikörper näher zu untersuchen und zudem die noch ausstehende Spezifität der drei verbleibenden rFab-Fragmente zu bestimmen, ist es erforderlich, weitere Antigene zu testen. Hierbei kommen sowohl Proteine und andere Lipidklassen als auch Nukleinsäuren in Frage (**Abschnitt 4.6.1**). Im Anschluss wären weiterführende Experimente notwendig, um Kandidaten zu verifizieren, die Spezifität der Bindung näher zu charakterisieren und möglicherweise die Krankheitsrelevanz zu prüfen (**Abschnitt 4.6.2**). Längerfristig ist es außerdem notwendig, mithilfe des etablierten Protokolls (siehe **Abb. 4-3**) weitere OKB-Antikörper anderer Patienten zu identifizieren, um eine höhere statistische Signifikanz zu gewährleisten als es momentan mit insgesamt fünf rFab-Fragmenten der Fall ist.

4.6.1 Experimente zur Identifizierung weiterer Antigene

In Bezug auf die Antigen suche mit Proteinen waren bislang alle durchgeführten Experimente mit Zelllysate sowie verschiedene Immunfluoreszenzfärbungen negativ. Sicherlich wäre es sinnvoll, die Experimente unter optimierten Versuchsbedingungen zu wiederholen. Hierbei kommen bei Western Blots oder Fluoreszenzfärbungen Präkomplexierungen der rFab-Fragmente mit Sekundärantikörpern spezifisch für die C-Region der κ -Kette in Frage, um dadurch möglicherweise eine unzureichende Affinität durch eine erhöhte Avidität auszugleichen (siehe **Abschnitt 4.4.3**). Detektionsantikörper gegen das C-terminale His₍₆₎-

Peptid der H-Kette sind aus Gründen hoher unspezifischer Hintergrundfärbungen künftig zu vermeiden. Um Proteine, im Gegensatz zu denaturierten Ansätzen mit Western Blot, in ihrer nativen Konformation zu untersuchen, ist neben der hier durchgeführten Affinitätschromatographie auch eine Immunpräzipitation möglich. Die rFab-Fragmente werden dabei immobilisiert, beispielsweise über Sepharosekügelchen. Antigene werden im Anschluss aus jedem beliebigen Ausgangsmaterial über rFab-Fragmente gebunden und dadurch isoliert. Neben diversen Zell- und Gewebelysaten ist das wohl wertvollste Ausgangsmaterial Hirngewebe eines MS-Patienten. Vielversprechend wäre des Weiteren eine groß angelegte Rasterung mit vielen verschiedenen Proteinen anhand eines Chips. Eine derartige Anwendung wird von der Firma Invitrogen angeboten. Der *ProtoArray*® erlaubt den gleichzeitigen Test von knapp 10.000 humanen Proteinen in ihrer nativen Konformation.

Auch Lipide sind weiter zu untersuchen. Bisher wurden mithilfe des *Glycolipidarrays* nur zehn verschiedene Lipide und deren Kombinationen getestet. Viele weitere Lipide, sowohl einzeln als auch in höherer Komplexität, könnten die Spezifität der ausbleibenden drei rFab-Fragmente identifizieren. Eine kostengünstige Alternative zum *Glycolipidarray* bietet der „Far Eastern Blot“, bei welchem Lipide zunächst über Dünnschichtchromatographie getrennt, auf eine Membran transferiert und äquivalent zu einem Immunoblot weiter prozessiert werden [142]. Neben anderen Lipidklassen sind auch chemisch modifizierte Lipide interessant. Insbesondere oxidierte Lipide sind vielversprechend, da zum einen bereits Antikörper gegen oxidierte Phospholipide im Liquor von MS-Patienten nachgewiesen wurden [116] und zum anderen gezeigt werden konnte, dass in MS-Läsionen eine ausgeprägte Peroxidation von Lipiden stattfindet [148].

Darüber hinaus sind Nukleinsäuren als Antigene der OKB-Antikörper in Betracht zu ziehen. Eine elegante Methode besteht im *Electrophoretic Mobility Shift Assay* [79]. DNA oder RNA wird mit Antikörpern beziehungsweise rFab-Fragmenten inkubiert und eine potentielle Interaktion über Gelelektrophorese analysiert. Dabei bewegen sich Komplexe aus Antikörper und Nukleinsäure langsamer fort als ihre jeweiligen freien Komponenten. Eine Alternative bietet die sogenannte „Filterbindung“ [79]. Sie beruht darauf, dass Proteine und daran gebundene Nukleinsäuren an einer Nitrocellulose-Membran hängen bleiben, während freie doppelsträngige DNA die Membran ungehindert passiert. Mittels radioaktiver Markierung der DNA kann letztlich unterschieden werden, ob sie vom rFab-Fragment gebunden wurde oder nicht.

4.6.2 Validierung und Charakterisierung der Antikörper-Antigen-Bindung

Identifizierte Kandidaten aus **Abschnitt 4.6.1** müssen zur weiteren Validierung im Anschluss rekombinant exprimiert werden, beispielsweise in *E.coli*, oder können möglicherweise kommerziell erworben werden. Das gereinigte Antigen wird dann dazu benutzt, die Bindung von Antikörper und Antigen genauer zu charakterisieren.

Da die Antigenbindungsstelle aus den insgesamt sechs Schleifen der CDR-Regionen besteht, ist anzunehmen, dass deren Mutagenisierung einen Einfluss auf die Interaktion zwischen Antikörper und Antigen hat. Eine Rückmutation der Austausch in den CDR-Regionen zur Keimbahn-codierten Sequenz muss zu einer deutlich geringeren Affinität führen oder sogar die Antigenbindung verhindern, sofern der Antikörper spezifisch für das identifizierte Antigen ist. Denn SHM wurden, zumindest bei einer Proteinantigen-induzierten Affinitätsreifung, eingeführt, um die Affinität zum Antigen zu erhöhen. Auch der vollständige Austausch der hypervariablen CDR3-Region der H-Kette ist zu diesem Zweck sinnvoll, da diese zumeist den größten Anteil an der Antigenbindung hat. Weiterhin ist die Permutation von H- und L-Ketten verschiedener Fab-Fragmente möglich, um zu bestimmen, welche Kette wieviel Einfluss auf die Bindung des Antigens hat.

Veränderungen in der Affinität können mithilfe der *BIAcore*-Technik ermittelt werden. Dabei wird das rFab-Fragment auf einem Chip immobilisiert und das Antigen darüber gespült. Der Brechungsindex über die Zeit mit verschiedenen Antigenkonzentrationen gibt Aufschluss über die Dissoziationskonstante K_d . Je kleiner K_d , desto höher ist die Affinität, da das Gleichgewicht der Reaktion in Richtung ausgebildeter Immunkomplexe liegt.

Lipide und Nukleinsäuren können, zumindest nach heutigem Wissensstand, keine Affinitätsreifung induzieren, da eine entsprechende Wechselwirkung mit T-Zellen im Keimzentrum ausbleibt. Ob Rückmutationen in den CDR-Regionen demnach Auswirkungen auf die Bindung von Lipid- oder Nukleinsäureantigenen haben, ist ungewiss. Möglicherweise binden diese in potentiellen Bindungstaschen abseits der eigentlichen Antigenbindungsstelle.

In Bezug auf die Lipidreaktivität von OKB-Antikörpern ist zu untersuchen, ob sie demyelinisierendes Potential besitzen und demzufolge direkt an der Autoimmunantwort bei MS beteiligt sein könnten. Erste vorläufige Ergebnisse in Kooperation mit Dr. Alexandra Hirschberg (AG Meinel, MPI für Neurobiologie) zeigten, dass keines der OKB-basierten rFab-Fragmente die intakte Myelinschicht von Oligodendrozyten bindet. Dies deutet darauf hin, dass die hier untersuchten Lipid-reaktiven OKB-Antikörper *per se* keine Demyelinisierung induzieren können, im Gegensatz zum gut charakterisierten IgM-Antikörper „O4“ [126, 136] (**siehe Abschnitt 4.5.2**).

4.7 Hypothese zur Funktion der OKB-Antikörper

Möglicherweise spielt die humorale Immunantwort keine pathogene Rolle bei MS, sondern greift vielmehr in den Abtransport von Myelin- und Zelltrümmern nach der initialen Schädigung ein. Beim autoimmunen Angriff auf die Myelinschicht fallen freigesetzte Lipidkomplexe und Myelindebris an, welche von Makrophagen phagozytiert und abgebaut werden [19]. Glykolipid-reaktive Antikörper könnten diesen Prozess unterstützen, indem sie Myelinbestandteile opsonisieren und die Fc-vermittelte Phagozytose durch Makrophagen erleichtern [150]. Ob diese Antikörper primär Myelinproteine binden und dabei zufällig Lipide assoziiert sind, ist spekulativ, würde aber durch die in **Abschnitt 4.5.4** erläuterte Polyreaktivität gestützt werden. Die einhergehende Axondegeneration ist mit Mechanismen der Apoptose vergleichbar [23]. Es werden intrazelluläre Bestandteile freigesetzt, welche ebenso von Makrophagen beseitigt werden müssen. Antikörper könnten auch hier unterstützend eingreifen. Dies würde erklären, warum in der Literatur Antikörper gegen DNA und Stoffwechsellzyme beschrieben sind, obwohl sie prinzipiell nur extrazelluläre Antigene binden können. Bei Demyelinisierungen im peripheren Nervensystem ist eine Beseitigungsfunktion für Antikörper bereits beschrieben [151]. Sie tragen dadurch zu einer schnellen Remyelinisierung und Axonregeneration bei.

Diese Effektorfunktion von Antikörpern könnte womöglich das offensichtliche Paradoxon der OKB in MS näher beleuchten. OKB-Antikörper sind oligoklonal, demnach Antigen-spezifisch selektiert statt zufällig als polyklonales Repertoire akkumuliert. OKB-Antikörper sind Komplement-aktivierend, werden in großen Mengen produziert und persistieren über Jahre, unabhängig davon, ob der Patient momentan an einem Schub leidet oder frei von Symptomen ist. Wären diese Antikörper tatsächlich unmittelbar an der Demyelinisierung und Axondegeneration beteiligt, so wäre kein chronischer schubförmig-remittierender Verlauf möglich, sondern eher ein fulminanter akuter Verlauf, vermutlich mit Todesfolge. Stattdessen könnten die OKB-produzierenden B-Zellen nach der initialen Schädigung ins ZNS rekrutiert werden, um Makrophagen bei der Beseitigung der Gewebs- und Zelltrümmer zu unterstützen. Dabei würden die Antikörper in so großen Mengen produziert werden, dass alle überschüssigen Antikörper durch die Liquorzirkulation ausgeschwemmt werden und dort als OKB nachweisbar wären. Deren Persistenz könnte darin begründet sein, dass im MS-Hirngewebe ständig, auch abseits eines akuten Schubs, Myelin- und Zelldebris anfallen, die B-Zellen demnach ständig ihrem Antigen ausgesetzt sind und dadurch zu einer anhaltenden Antikörperproduktion stimuliert werden.

Literaturverzeichnis

1. Allegretta M, Nicklas JA, Sriram S, Albertini RJ (1990) T cells responsive to myelin basic protein in patients with multiple sclerosis. *Science* 247:718-721
2. Andersson M, Alvarez-Cermeño JC, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J, Fredrikson S, Gallo P, Grimaldi LME, Grønning M, Keir G, Lamers K, Link H, Magalhaes A, Massaro A, Öhman S, Reiber H, Rönnbäck L, Schlupe M, Schuller E, Sindic CJM, Thompson EJ, Trojano M, Wurster U (1994) Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: A consensus report. *J Neurol Neurosurg Psych* 57:897-902
3. Ang CW, Jacobs BC, Laman JD (2004) The Guillain-Barré syndrome: a true case of molecular mimicry. *Trends Immunol* 25:61-66
4. Armengol MP, Juan M, Lucas-Martin A, Fernandez-Figueras MT, Jaraquemada D, Gallart T, Pujol-Borrell R (2001) Thyroid autoimmune disease: Demonstration of thyroid antigen-specific B cells and recombination-activating gene expression in chemokine-containing active intrathyroidal germinal centers. *Am J Pathol* 159:861-873
5. Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA (2007) The impact of glycosylation on biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu Rev Immunol* 25:21-50
6. Awad A, Hemmer B, Hartung H-P, Kieseier B, Bennett JL, Stüve O (2010) Analyses of cerebrospinal fluid in the diagnosis and monitoring of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 219:1-7
7. Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, Friese M, Schröder R, Deckert M, Schmidt S, Ravid R, Rajewsky K (2000) Clonal expansion of CD8⁺ T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 192:393-404
8. Baranzini SE, Jeong MC, Butunoi C, Murray RS, Bernard CCA, Oksenberg JR (1999) B cell repertoire diversity and clonal expansion in multiple sclerosis brain lesions. *J Immunol* 163:5133-5144
9. Barcellos LF, Sawcer S, Ramsay PP, Barao I, Thomson G, Briggs F, Cree BAC, Begovitch AB, Villoslada P, Montalbán C, Uccelli A, Savettieri G, Lind EF, DeLoa C, Haines KA, Pericak-Vance MA, Compston A, Hauser T, Oksman F (2006) Heterogeneity at the HLA-DRB1 locus and risk for multiple sclerosis. *Hum Mol Genet* 15:2813-2824
10. Barnett MH, Parratt JDE, Cho E-S, Prineas JW (2009) Immunoglobulins and complement in postmortem multiple sclerosis tissue. *Ann Neurol* 65:32-46
11. Barral P, Eckl-Dorna J, Harwood NE, De Santo C, Salio M, Illarionov P, Besra GS, Cerundolo V, Batista FD (2008) B cell receptor-mediated uptake of CD1d-restricted antigen augments antibody responses by recruiting invariant NKT cells help *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:8345-8350
12. Ben-Nun A, Wekerle H, Cohen IR (1981) The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 11:195-199

13. Bennett JL, Haubold K, Ritchie AM, Edwards SJ, Burgoon M, Shearer AJ, Gilden DH, Owens GP (2008) CSF IgG H-chain bias in patients at the time of a clinically isolated syndrome. *J Neuroimmunol* 199:126-132
14. Bosca I, Villar LM, Coret F, Magraner MJ, Simó-Castelló M, Alvarez-Cermeño JC, Casanova B (2010) Response to interferon in multiple sclerosis is related to lipid-specific oligoclonal IgM bands. *Mult Scler* 16:810-815
15. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr J-P (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: Polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7297-7301
16. Brennan KM, Obermeier B, Galban-Horcajo F, Mentele R, Rinaldi S, O'Leary CP, Goodyear CS, Kalna G, Arthur A, Elliot C, Barnett S, Kümpfel T, Khademi M, Olsson T, Linington C, Lottspeich F, Wekerle H, Bennett JL, Hohlfeld R, Owens GP, Willison HJ, Dornmair K (2011) Lipid reactivity of individual oligoclonal band antibodies in multiple sclerosis. *Brain*
17. Brochet X, Lefranc M-P, Giudicelli V (2008) IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Res* 36:W503-W508
18. Brodbelt A, Stoodley M (2007) CSF pathways: a review. *B J Neurosurg* 21:520
19. Brück W, Porada P, Poser S, Rieckmann P, Hanefeld F, Kretschmar HA, Lassmann H (1995) Monocyte/Macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 38:788-796
20. Cepok S, Zhou D, Srivastava S, Nessler S, Stei S, Büssow K, Sommer N, Hemmer B (2005) Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 115:1352-1360
21. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159
22. Claflin JL, Berry J (1988) Genetics of the phosphorylcholine specific antibody response to *Streptococcus pneumoniae*. Germline but not mutated T15 antibodies are dominantly selected. *J Immunol* 141:4012-4019
23. Coleman MP, Perry VH (2002) Axon pathology in neurological disease: a neglected therapeutic target. *Trends Neurosci* 25:532-537
24. Colombo M, Dono M, Gazzola P, Roncella S, Valetto A, Chiorazzi N, Mancardi GL, Ferrarini M (2000) Accumulation of clonally related B lymphocytes in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Immunol* 164:2782-2789
25. Compston A, Coles A (2002) Multiple sclerosis. *Lancet* 359:1221-1231
26. Compston A, Coles A (2008) Multiple sclerosis. *Lancet* 372:1502-1517
27. Compston A, Confavreux C, Lassmann H, McDonald I, Miller D, Noseworthy J, Smith K, Wekerle H (2006) *McAlpine's Multiple Sclerosis*. Churchill Livingstone Elsevier,
28. Derfuss T, Gürkov R, Then Bergh F, Goebels N, Hartmann M, Barz C, Wilske B, Autenrieth I, Wick M, Hohlfeld R, Meinl E (2001) Intrathecal antibody production against *Chlamydia pneumoniae* in multiple sclerosis is part of a polyspecific immune response. *Brain* 124:1325-1335

29. Diamond B, Katz JB, Paul E, Aranow C, Lustgarten D, Scharff MD (1992) The role of somatic mutation in the pathogenic anti-DNA response. *Annu Rev Immunol* 10:731-757
30. Durocher Y, Perret S, Kamen A (2002) High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res* 30:e9 1-e9 9
31. Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD (2004) Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 3:104-110
32. Ebers GC (2008) Environmental factors and multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 7:268-277
33. Felgenhauer K (1974) Protein size and cerebrospinal fluid composition. *Klin Wochenschr* 52:1158-1164
34. Firestein GS (2003) Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423:356-361
35. Genain CP, Cannella B, Hauser SL, Raine CS (1999) Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nature Med* 5:170-175
36. Gharahdaghi F, Weinberg CR, Meagher DA, Imai BS, Mische SH (1999) Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: A method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophor* 20:601-605
37. Gildeen DH (2005) Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 4:195-202
38. Gill SC, von Hippel PH (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* 182:319-326
39. Godbey WT, Wu KK, Mikos AG (1999) Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. *J Control Release* 60:149-160
40. Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L (2004) NKT cells: What's in a name? *Nature Rev Immunol* 4:231-237
41. Gorman CM, Gies D, McCray G, Huang M (1989) The human cytomegalovirus major immediate promoter can be trans-activated by adenovirus early proteins. *Virology* 171:377-385
42. Goverman J (2009) Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nature Rev Immunol* 9:393-407
43. Hafler DA, Slavik JM, Anderson DE, O'Connor KC, De Jager P, Baecher-Allan C (2005) Multiple sclerosis. *Immunol Rev* 204:208-231
44. Harling-Berg C, Knopf PM, Merriam J, Cserr HF (1989) Role of cervical lymph nodes in the systemic humoral immune response to human serum albumin microinfused into rat cerebrospinal fluid. *J Neuroimmunol* 25:185-194
45. Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, Bar-Or A, Panzara M, Sankar N, Agarwal S, Langer-Gould A, Smith CH, The HERMES Trial Group (2008) B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med* 358:676-688
46. Heidemann R, Zhang C, Qi H, Rule JL, Rozales C, Park S, Chuppa S, Ray M, Michaels J, Konstantinov K, Naveh D (2000) The use of peptones as medium additives for the production of a recombinant therapeutic in high density perfusion cultures of mammalian cells. *Cytotechnol* 32:157-167

47. Hennessey K, Heller M, van Santen V, Kieff E (1983) Simple repeat array in Epstein-Barr virus DNA encodes part of the Epstein-Barr virus nuclear antigen. *Science* 220:1396-1398
48. Heukeshoven J, Dernick R (1988) Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophor* 9:28-32
49. Ho TW, McKhann GM, Griffin JW (1998) Human autoimmune neuropathies. *Annu Rev Neurosci* 21:187-226
50. Holmøy T, Kvale EO, Vartdal F (2004) Cerebrospinal fluid CD4+ T cells from a multiple sclerosis patient cross-recognize Epstein-Barr virus and myelin basic protein. *J Neurovirol* 10:278-283
51. Hughes RAC, Hadden RDM, Smith GJK (1999) Pathogenesis of Guillain-Barré syndrome. *J Neuroimmunol* 100:74-97
52. Ilyas AA, Chen Z-W, Cook SD (2003) Antibodies to sulfatide in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 139:76-80
53. Jahng A, Maricic I, Aguilera C, Cardell S, Halder RC, Kumar V (2004) Prevention of autoimmunity by targeting a distinct, noninvariant CD1d reactive T cell population reactive to sulfatide. *J Exp Med* 199:947-957
54. Jenkins MA, Cheng L, Ratnaik S (2001) Multiple sclerosis: use of light-chain typing to assist diagnosis. *Ann Clin Biochem* 38:235-241
55. Johnson D, Hafler DA, Fallis RJ, Leas MB, Brady RO, Quarles RH, Weiner HL (1986) Cell-mediated immunity to myelin-associated glycoprotein, proteolipid protein, and myelin basic protein in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 13:99-108
56. Junker A, Ivanidze J, Malotka J, Eiglmeier I, Lassmann H, Wekerle H, Meinl E, Hohlfeld R, Dornmair K (2007) Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. *Brain* 130:2789-2799
57. Kabat EA, Glusman M, Knaub V (1948) Quantitative estimation of the albumin and gamma globulin in normal and pathologic cerebrospinal fluid by immunochemical methods. *Am J Med* 4:653-662
58. Kabat EA, Moore DH, Landow H (1942) An electrophoretic study of the protein components in cerebrospinal fluid and their relationship to the serum proteins. *J Clin Invest* 21:571-577
59. Kabat EA, Wu TT (1991) Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites. *J Immunol* 147:1709-1719
60. Kaida K, Kusunoki S (2010) Antibodies to gangliosides and ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome and Fisher syndrome: Mini-review. *J Neuroimmunol* 223:5-12
61. Kanter JL, Narayana S, Ho PP, Catz I, Warren KG, Sobel RA, Steinman L, Robinson WH (2006) Lipid microarrays identify key mediators of autoimmune brain inflammation. *Nature Med* 12:138-143
62. Kaschka WP, Theilkaes L, Eickhoff K, Skvaril F (1979) Disproportionate elevation of the immunoglobulin G1 concentration in cerebrospinal fluids of patients with multiple sclerosis. *Infect Immun* 26:933-941

63. Kerlero de Rosbo N, Honegger P, Lassmann H, Matthieu J-M (1990) Demyelination induced in aggregating brain cell cultures by a monoclonal antibody against myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *J Neurochem* 55:583-587
64. Kerlero de Rosbo N, Milo R, Lees MB, Burger D, Bernard CCA, Ben-Nun A (1993) Reactivity to myelin antigens in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 92:2602-2608
65. Kinjo Y, Wu D, Kim G, Xing G-W, Poles MA, Ho DD, Tsuji M, Kawahara K, Wong C-H, Kronenberg M (2005) Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature* 434:520-525
66. Kjellin KG, Vesterberg O (1974) Isoelectric focusing of CSF proteins in neurological disease. *J Neurol Science* 23:199-213
67. Knopf PM, Harling-Berg CJ, Cserr HF, Basu D, Sirulnik EJ, Nolan GP, Park JT, Keir G, Thompson EJ, Hickey WF (1998) Antigen-dependent intrathecal antibody synthesis in the normal rat brain: Tissue entry and local retention of antigen-specific B cells. *J Immunol* 161:692-701
68. Kohsaka H, Carson DA, Rassenti L, Ollier WER, Chen PP, Kipps TJ, Miyasaka N (1996) The human immunoglobulin V_H gene repertoire is genetically controlled and unaltered by chronic autoimmune stimulation. *J Clin Invest* 98:2794-2800
69. Kolln J, Ren H-M, Da R-R, Zhang J, Spillner E, Olek M, Hermanowicz N, Hilgenberg LG, Smith MA, Van den Noort S, Qin Y (2006) Triosephosphat-Isomerase and Glyceraldehyd-3-Phosphate Dehydrogenase-reactive antibodies in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 177:5652-5658
70. Kusunoki S, Kaida K, Ueda M (2007) Antibodies against gangliosides and ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome: new aspects of research. *Biochim Biophys Acta* 1780:441-444
71. Lalive PH, Menge T, Delarasse C, Della Gaspera B, Pham-Dinh D, Villoslada P, von Büdingen H-C, Genain CP (2006) Antibodies to native myelin oligodendrocyte glycoprotein are serologic markers of early inflammation in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:2280-2285
72. Lambracht-Washington D, O'Connor KC, Cameron EM, Jowdry A, Ward SA, Frohman E, Racke MK, Monson NL (2007) Antigen specificity of clonally expanded and receptor edited cerebrospinal fluid B cells from patients with relapsing remitting MS. *J Neuroimmunol* 186:164-176
73. Lang GA, Illarionov PA, Glatman-Freedman A, Besra GS, Lang ML (2005) BCR targeting of biotin- α -galactosylceramide leads to enhanced presentation on CD1d and requires transport of BCR to CD1d-containing endocytic compartments. *Int Immunol* 17:899-908
74. Lang ML (2009) How do natural killer T cells help B cells? *Expert Rev Vaccines* 8:1109-1121
75. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C (2001) Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* 7:115-121
76. Linington C, Bradl M, Lassmann H, Brunner C, Vass K (1988) Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Am J Pathol* 130:443-454

77. Link H, Zettervall O (1970) Multiple sclerosis: disturbed kappa:lambda chain ratio of immunoglobulin G in cerebrospinal fluid. *Clin Exp Immunol* 6:435-438
78. Litzenburger T, Fässler R, Bauer J, Lassmann H, Linington C, Wekerle H, Iglesias A (1998) B lymphocytes producing demyelinating autoantibodies: Development and function in gene-targeted transgenic mice. *J Exp Med* 188:169-180
79. Lottspeich F, Zorbas H, Beck-Sickingher AG, Eckerskorn C, Engelhardt H, Feick R, icner R, ischer L, örg A, aberhausen G, ermentin P, olak TA, ucho F, urk M, alkbrenner F, ellermann J, ellner R, Kessler C, Kolanus W, Korn B, Kreße G-B, Kühn H, Lichter P, Linke R, Mäntele W, Meese E, Mühlhahn P, Plück A, Schäffner J, Schirra HJ, Schubert D, Schultz G, Schwarz E, Schwer C, Toldo SS, Steipe B, Tsetlin VI, Voit R, Westermeier R, Wirkner U, Wittmann-Liebold B, Zimmermann (1998) *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin
80. Lovato L, Cianti R, Gini B, Marconi S, Bianchi L, Armini A, Anghileri E, Locatelli F, Paoletti F, Franciotta D, Bini L, Bonetti B (2008) Transketolase and 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase type I isoforms are specifically recognized by IgG autoantibodies in multiple sclerosis patients. *Mol Cell Proteomics* 7:2337-2349
81. Lovato L, Willis SN, Rodig SJ, Caron T, Almendinger S, Howell O, Reynolds R, O'Connor KC, Hafler DA (2011) Related B cell clones populate the meninges and parenchyma of patients with multiple sclerosis. *Brain* 134:534-541
82. Lowenthal A, Vansande M, Karcher D (1960) The differential diagnosis of neurological diseases by fractionating electrophoretically the CSF gamma-globulins. *J Neurochem* 6:51-56
83. Lucchinetti CF, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: Implications for the pathogenesis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 47:707-717
84. Lundkvist M, Greiner E, Hillert J, Fodgell-Hahn A (2010) Multiple sclerosis patients lacking oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid are less likely to develop neutralizing antibodies against interferon beta. *Mult Scler* 16:796-800
85. Marconi S, Acler M, Lovato L, De Toni L, Tedeschi E, Anghileri E, Romito S, Cordioli C, Bonetti B (2006) Anti-GD2-like IgM autoreactivity in multiple sclerosis patients. *MS* 12:302-308
86. Markovic-Plese S, Hemmer B, Zhao YD, Simon R, Pinilla C, Martin R (2005) High level of cross-reactivity in influenza virus hemagglutinin-specific CD4⁺ T-cell response: Implications for the initiation of autoimmune response in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 169:31-38
87. Martin JR (1981) Herpes simplex virus types 1 and 2 and multiple sclerosis. *Lancet* 10:777-781
88. Mattner J, Lebord KL, Ismail N, Goff RD, Cantu C, Zhou DP, Saint-Mezard P, Wang V, Gao Y, Yin N, Hoebe K, Schneewind O, Walker D, Beutler B, Teyton L, Savage PB, Bendelac A (2005) Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature* 434:525-529
89. McFarlin DE, McFarland HF (1982) Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 307:1183-1188;-1246-1251

90. Meinl E, Krumbholz M, Hohlfeld R (2006) B lineage cells in the inflammatory CNS environment: Migration, maintenance, local antibody production and therapeutic modulation. *Ann Neurol* 59:880-892
91. Menon KK, Piddlesden SJ, Bernard CCA (1997) Demyelinating antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein and galactocerebroside induce degradation of myelin basic protein in isolated human myelin. *J Neurochem* 69:214-222
92. Monson NL, Brezinschek H-P, Brezinschek R, Mobley A, Vaughan GK, Frohman EM, Racke MK, Lipsky PE (2005) Receptor revision and atypical mutational characteristics in clonally expanded B cells from the cerebrospinal fluid of recently diagnosed multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 158:170-181
93. Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T (2000) Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102:553-563
94. Murphy KM, Travers P., Walport M (2008) *Janeway's Immunobiology*. Garland Science, Taylor & Francis Group,
95. Nohra R, Beyeen AD, Guo JP, Khademi M, Sundqvist E, Hedreul MT, Sellebjerg F, Smestad C, Oturai AB, Harbo HF, Wallström E, Hillert J, Alfredsson L, Kockum I, Jagodic M, Lorentzen J, Olsson T (2010) RGMA and IL21R show association with experimental inflammation and multiple sclerosis. *Nature Genes Immun* 11:279-293
96. Noseworthy JH, Lucchinetti CF, Rodriguez M, Weinshenker BG (2000) Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343:938-952
97. Notkins AL (2004) Polyreactivity of antibody molecules. *Trends Immunol* 25:174-179
98. Nuck R, Zimmermann M, Sauvageot D, Josic D, Reutter W (1990) Optimized deglycosylation of Glycoproteins by peptide-N⁴-(N-acetyl-β-glucosaminyl)-asparagine Amidase from *Flavobacterium meningosepticum*. *Glycoconjugate J* 7:279-286
99. O'Connor KC, Appel H, Bregoli L, Call ME, Catz I, Chan JA, Moore NH, Warren KG, Wong SJ, Hafler DA, Wucherpfennig KW (2005) Antibodies from inflamed central nervous system tissue recognize myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Immunol* 175:1974-1982
100. Odegard VH, Schatz DG (2006) Targeting of somatic hypermutation. *Nature Rev Immunol* 6:573-583
101. Oldstone MBA (1987) Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* 50:819-820
102. Olsson T, Zhi WW, Höjeberg B, Kostulas V, Yu-Ping J, Anderson G, Ekre H-P, Link H (1990) Autoreactive T lymphocytes in multiple sclerosis determined by antigen-induced secretion of interferon-γ. *J Clin Invest* 86:981-985
103. Owens GC, Ritchie AM, Burgoon MP, Williamson RA, Corboy JR, Gildea DH (2003) Single-cell repertoire analysis demonstrates that clonal expansion is a prominent feature of the B cell response in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *J Immunol* 171:2725-2733
104. Owens GP, Bennett JL, Lassmann H, O'Connor KC, Ritchie AM, Shearer A, Lam C, Yu XL, Birlea M, DuPree C, Williamson RA, Hafler DA, Burgoon MP, Gildea D (2009) Antibodies produced by clonally expanded plasma cells in multiple sclerosis CSF. *Ann Neurol* 65:639-649

105. Owens GP, Kraus H, Burgoon MP, Smith-Jensen T, Devlin ME, Gilden DH (1998) Restricted use of V_H4 germline segments in an acute multiple sclerosis brain. *Ann Neurol* 43:236-243
106. Owens GP, Wings KM, Ritchie AM, Edwards S, Burgoon MP, Lehnhoff L, Nielsen K, Corboy J, Gilden DH, Bennett JL (2007) VH4 gene segments dominate the intrathecal humoral immune response in multiple sclerosis. *J Immunol* 179:6343-6351
107. Pham PL, Perret S, Doan HC, Cass B, St-Laurent G, Kamen A, Durocher Y (2003) Large-Scale transient transfection of serum-free suspension-growing HEK293 EBNA1 cells: peptone additives improve cell growth and transfection efficiency. *Biotechnol Bioeng* 84:332-342
108. Plomp JJ, Willison HJ (2009) Pathophysiological actions of neuropathy-related anti-ganglioside antibodies at the neuromuscular junction. *J Physiol* 587:3979-3999
109. Podbielska M, Hogan EL (2009) Molecular and immunogenic features of myelin lipids: incitants or modulators of multiple sclerosis? *MS* 15:1011-1029
110. Pohl D (2009) Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *J Neurol Science* 286:62-64
111. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung H-P, Kappos L, Lubin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Connor PW, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Weinshenker BG, Wolinsky JS (2005) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 Revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 58:840-846
112. Porcelli SA, Modlin RL (1999) The CD1 system: Antigen-presenting molecules for T-cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu Rev Immunol* 17:297-329
113. Prineas JW, Wright RG (1978) Macrophages, lymphocytes and plasma cells in the perivascular compartment in chronic multiple sclerosis. *Lab Invest* 38:409-421
114. Prinz JC (2003) The role of T cells in psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 17:257-270
115. Provencher SW, Glöckner J (1981) Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* 20:33-37
116. Qin J, Goswami R, Balabanov R, Dawson G (2007) Oxidized phosphatidylcholine is a marker for neuroinflammation in multiple sclerosis brain. *J Neurosci Res* 85:977-984
117. Qin Y, Duquette P, Zhang Y, Poole R, Antel JP (1998) Clonal expansion and somatic hypermutation of V_H genes of B cells from cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 102:1045-1050
118. Rabilloud T, Carpentier G, Tarroux P (1988) Improvement and simplification of low-background silver-staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophor* 9:288-291
119. Raine CS, Cannella B, Hauser SL, Genain CP (1999) Demyelination in primate autoimmune encephalomyelitis and acute multiple sclerosis lesions: A case for antigen specific antibody mediation. *Ann Neurol* 46:144-160
120. Ransohoff RM, Kivisäkk P, Kidd G (2003) Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nature Rev Immunol* 3:569-581
121. Redzic ZB, Segal MB (2004) The structure of the choroid plexus and the physiology of the plexus choroideus epithelium. *Adv Drug Deliv Rev* 56:1695-1716

122. Reiber H (2006) *Liquordiagnostik. Klinische Neurologie*. Peter Berlit, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, pp 136-170
123. Reiber H, Ungefehr S, Jacobi C (1998) The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis. *Mult Scler* 4:111-117
124. Rinaldi S, Brennan KM, Goodyear CS, O'Leary C, Schiavo G, Crocker PR, Willison HJ (2009) Analysis of lectin binding to glycolipid complexes using combinatorial glycoarrays. *Glycobiology* 19:789-796
125. Ritchie AM, Gilden DH, Williamson AR, Burgoon MP, Yu XL, Helm K, Corboy JR, Owens GP (2004) Comparative analysis of the CD19⁺ and CD138⁺ cell antibody repertoires in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Immunol* 173:649-656
126. Rosenbluth J, Schiff R, Liang WL, Dou WK (2003) Antibody-mediated CNS demyelination II. Focal spinal cord lesions induced by implantation of an IgM antisulfatide-secreting hybridoma. *J Neurocytol* 32:265-276
127. Saida K, Saida T, Brown MJ, Silberberg DH (1979) In vivo demyelination induced by intraneural injection of anti-galactocerebroside serum. A morphological study. *Am J Pathol* 95:99-116
128. Schellekens GA, Visser H, De Jong BAW, Van den Hoogen FHJ, Hazes JMW, Breedveld FC, Van Venrooij WJ (2000) The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 43:155-163
129. Serafini B, Rosicarelli B, Franciotta D, Magliozzi R, Reynolds R, Cinque P, Andreoni L, Trivedi P, Salvetti M, Faggioni A, Aloisi F (2007) Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 204:2899-2912
130. Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Aloisi F (2004) Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol* 14:164-144
131. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamid gels. *Anal Chem* 68:850-858
132. Sidhu SS, Fellouse F.A. (2006) Synthetic therapeutic antibodies. *Nature Chem Biol* 2:682-688
133. Sjelleberg F, Jaliashvili I, Christiansen M, Garred P (1998) Intrathecal activation of the complement system and disability in multiple sclerosis. *J Neurol Science* 157:168-174
134. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto MK, Goetze NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85
135. Söderström N, Biörklund A (1974) Organization of the invading lymphoid tissue in human lymphoid thyroiditis. *Scand J Immunol* 3:295-301
136. Sommer I, Schachner M (1981) Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surface: An immunocytological study in the nervous system. *Dev Biol* 83:311
137. Steinman L, Zamvil S (2003) Transcriptional analysis of targets in multiple sclerosis. *Nature Rev Immunol* 3:483-492

138. Storch MK, Piddlesden S, Haltia M, Iivanainen M, Morgan P, Lassmann H (1998) Multiple sclerosis: In situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination. *Ann Neurol* 43:465-471
139. Storch MK, Stefferl A, Brehm U, Weissert R, Wallström E, Kerschensteiner M, Olsson T, Linington C, Lassmann H (1998) Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol* 8:681-694
140. Sun J, Link H, Olsson H, Xiao B, Andersson G, Ekre H-P, Linington C, Diener P (1991) T and B cell responses to myelin-oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. *J Immunol* 146:1490-1495
141. Takemura S, Braun A, Crowson C, Kurtin PJ, Cofield RH, O'Fallon WM, Goronzy JJ, Weyand CM (2001) Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis. *J Immunol* 167:1072-1080
142. Taki T, Handa S, Ishikawa (1994) Blotting of glycolipids and phospholipids from a high-performance thin-layer chromatogram to a polyvinylidene difluoride membrane. *Anal Biochem* 221:312-316
143. Tan EM, Cohen AS, Fries JF (1982) The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25:1271-1275
144. Tejada-Simon MV, Zang YCQ, Hong J, Rivera VM, Zhang JZ (2003) Cross-reactivity with myelin basic protein and human herpesvirus-6 in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 53:189-197
145. Tetin SY, Prendergast FG, Venyaminov SU (2003) Accuracy of protein secondary structure determination from circular dichroism spectra based on immunoglobulin examples. *Anal Biochem* 321:183-187
146. Tong WY, Gagnon M, Sprules T, Gilbert M, Chowdhury S, Meerovitch K, Hansford K, Purisima EO, Blankenship JW, Cheung NKV, Gehring K, Lubell WD, Saragovi HU (2010) Small-molecule ligands of GD2 ganglioside, designed from NMR studies, exhibit induced-fit binding and bioactivity. *Chemistry & Biology* 17:183-194
147. van der Meché FGA, Schmitz PIM, Dutch Guillain-Barré Study Group (1992) A randomized trial comparing intravenous immune globulin and plasma exchange in Guillain-Barré syndrome. *N Engl J Med* 326:1123-1129
148. Van Horssen J, Schreibelt G, Drexhage J, Hazes T, Dijkstra CD, Van der Valk P, De Vries HE (2008) Severe oxidative damage in multiple sclerosis lesions coincides with enhanced antioxidant enzyme expression. *Free Radic Biol Med* 45:1729-1737
149. Vandvik B, Natvig JB, Wiger D (1976) IgG1 subclass restriction of oligoclonal IgG from cerebrospinal fluids and brain extracts in patients with multiple sclerosis and subacute encephalitides. *Scand J Immunol* 5:427-436
150. Vargas ME, Barres BA (2007) Why is Wallerian degeneration in the CNS so slow? *Annu Rev Neurosci* 30:153-179
151. Vargas ME, Watanabe J, Singh SJ, Robinson WH, Barres BA (2010) Endogenous antibodies promote rapid myelin clearance and effective axon regeneration after nerve injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:11993-11998

152. Villar LM, Sádaba MC, Roldán E, Masjuan J, González-Porqué P, Villarubia N, Espiña M, García-Trujillo JA, Bootello A, Álvarez-Cermeño JC (2005) Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *J Clin Invest* 115:187-194
153. von Büdingen H-C, Gulati M, Kuenzle S, Fischer K, Rupprecht TA, Goebels N (2010) Clonally expanded plasma cells in the cerebrospinal fluid of patients with central nervous system autoimmune demyelination produce "oligoclonal bands". *J Neuroimmunol* 218:134-139
154. von Büdingen H-C, Harrer MD, Kuenzle S, Meier M, Goebels N (2008) Clonally expanded plasma cells in the cerebrospinal fluid of MS patients produce myelin-specific antibodies. *Eur J Immunol* 38:2014-2023
155. Voswinkel J, Trümper L, Carbon G, Hopf T, Freundsuh M, Gause A (1996) Evidence for a selected humoral immune response encoded by V_H4 gene families in the synovial membrane of a patient with rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol* 106:5-12
156. Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E, Nussenzweig MC (2003) Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* 301:1374-1377
157. Warren KG, Catz I, Steinman L (1995) Fine specificity of the antibody-response to myelin basic protein in the central nervous system in multiple sclerosis: The minimal B-cell epitope and a model of its features. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:11061-11065
158. Williamson RA, Burgoon MP, Owens GP, Ghausl O, Leclerc E, Firme L, Carlson S, Corboy J, Parren PW, Sanna PP, Gilden DH, Burton DR (2000) Anti-DNA antibodies are a major component of the intrathecal B cell response in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:1793-1798
159. Willison HJ, Halstead SK, Beveridge E, Zitman FMP, Greenshields KN, Morgan BP, Plomp JJ (2008) The role of complement and complement regulators in mediating motor nerve injury in murine models of Guillain-Barré syndrome. *J Neuroimmunol* 201-202:172-182
160. Wu D, Xing G-W, Poles MA, Horowitz A, Kinjo Y, Sullivan B, Bodmer-Narkevitch V, Plettenburg O, Kronenberg M, Tsuji M, Ho DD, Wong C-H (2004) Bacterial glycolipids and analogs as antigens for CD1d-restricted NKT cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:1351-1356
161. Wucherpfennig KW, Newcombe J, Li H, Keddy C, Cuzner ML, Hafler DA (1992) $\gamma\delta$ T cell receptor repertoire in acute multiple sclerosis lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4588-4592
162. Wucherpfennig KW, Strominger JL (1995) Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: Viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 80:695-705
163. Yanni G, Whelan A, Feighery C, Bresnihan B (1992) Analysis of cell populations in rheumatoid arthritis synovial tissues. *Semin Arthritis Rheum* 21:393-399
164. Yu XL, Gilden DH, Ritchie AM, Burgoon MP, Keays KM, Owens GP (2006) Specificity of recombinant antibodies generated from multiple sclerosis cerebrospinal fluid probed with a random peptide library. *J Neuroimmunol* 172:121-131
165. Zhang J, MacKenzie R, Durocher Y (2009) Production of chimeric heavy-chain antibodies. In: Dimitrov AS (ed) *Therapeutic antibodies: Methods and Protocols*. pp 323-336

166. Zhou D, Srivastava R, Nessler S, Grummel V, Sommer N, Brück W, Hartung H-P, Stadelmann C, Hemmer B (2006) Identification of a pathogenic antibody response to native myelin oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:19057-19062

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abb. 1-1 Überblick über die verschiedenen Stadien der B-Zellreifung
- Abb. 1-2 Schemazeichnung eines IgG-Moleküls
- Abb. 1-3 Faltung eines IgG-Moleküls
- Abb. 1-4 Liquorraum
- Abb. 1-5 Nachweis oligoklonaler Banden in der MS-Diagnostik
- Tab. 2-1 Liquordiagnostische Daten der Patienten
- Abb. 2-1 Prinzip der *Nested* PCR
- Abb. 2-2 Prinzip der *Semi-Nested* PCR
- Abb. 2-3 Klonierungsstrategie
- Abb. 2-4 Kombinatorik *Glycolipidarray*
- Abb. 3.1-1 Überlappung von Ig-V(D)J-Transkriptom und -Proteom im Liquor des MS-Patienten HM-03
- Abb. 3.1-2 Überlappung von Ig-V(D)J-Transkriptom und -Proteom im Liquor des MS-Patienten NS-52
- Abb. 3.1-3 Überlappung von Ig-V(D)J-Transkriptom und -Proteom im Liquor des MS-Patienten JN-02
- Abb. 3.1-4 Überlappung von Ig-V(D)J-Transkriptom und -Proteom im Liquor des MS-Patienten NS-16
- Tab. 3.1-1 Spezifitätstest
- Abb. 3.2-1 Überlappung des Liquor-Proteoms mit Ig-V(D)J-Transkriptomen aus Liquor und drei verschiedenen Plaques von Patient MS-4
- Abb. 3.2-2 2D-Gelelektrophorese gereinigter Liquor-Antikörper der Patienten MS-2 und MS-B2A
- Abb. 3.2-3 Abdeckung der Ig-V(D)J-Transkriptome aus Gehirn und Liquor durch das Liquor-Proteom von Patient MS-4 und MS-B2A
- Abb. 3.2-4 Nachweis überlappender Ig-V(D)J-Transkripte in Liquor und Gehirn bei Patient L-296
- Abb. 3.3-1 IEF eines monoklonalen Antikörpers
- Abb. 3.3-2 2D-Gelelektrophorese eines monoklonalen Antikörpers
- Abb. 3.3-3 2D-Gelelektrophorese eines monoklonalen Antikörpers mit Probenapplikation bei schwach saurem pH
- Abb. 3.3-4 Deglykosylierung eines monoklonalen Antikörpers
- Abb. 3.3-5 Vergleich der IEF-Effizienz mit Multiphor- und OFFGEL-Apparatur
- Abb. 3.4-1 2D-Gelelektrophorese gereinigter Antikörper aus Liquor der Patienten 1039 und HM-63
- Abb. 3.4-2 Zuordnung von H- und L-Kette in Spot 1 von Patient 1039 (OKB-1039-s1)
- Abb. 3.4-3 Zuordnung von H- und L-Kette in Spot 9 von Patient HM-63 (OKB-HM-63-s9)

- Abb. 3.4-4 Zuordnung von H- und L-Kette in Spot 8 von Patient HM-63 (OKB-HM-63-s8)
- Abb. 3.4-5 Zuordnung von H- und L-Kette in Spot 2 von Patient HM-63 (OKB-HM-63-s2)
- Abb. 3.4-6 Zuordnung von H- und L-Kette bei Patient NS-52 (semi-quantitative Auswertung)
- Abb. 3.5-1 SDS-PAGE der gereinigten rFab-Fragmente
- Abb. 3.5-2 Western Blot zur Detektion des His₍₆₎-Signalpeptids der rFab-Fragmente
- Abb. 3.5-3 MALDI-TOF Massenspektrometrie der gereinigten rFab-Fragmente
- Tab. 3.5-1 Anteile verschiedener Sekundärstrukturen in gefalteten rFab-Fragmenten
- Abb. 3.5-4 Funktionstest von Fab-8-18C5 mit MOG-exprimierenden TE-Zellen
- Abb. 3.6-1 Immunfluoreszenzfärbung an Gefrierschnitten von humanem Hirngewebe
- Abb. 3.6-2 Immunfluoreszenzfärbung mit *Chlamydia pneumoniae*-infizierten Zellen
- Abb. 3.6-3 Immunfluoreszenzfärbung mit Masern-Viren-infizierten Zellen
- Abb. 3.6-4 SDS-PAGE der eluierten Proteine aus Affinitätschromatographie mit Zellysats
- Abb. 3.6-5 *Glycolipidarray* mit Serum eines GBS-Patienten
- Abb. 3.6-6 *Glycolipidarray* mit Fab-HM-63-s9, Fab-NS-52 und Fab-8-18C5
- Abb. 4-1 Erster Nachweis oligoklonaler Banden im Liquor von MS-Patienten im Jahre 1960
- Abb. 4-2 Hypothese zur Reifung und Zirkulation von B-Zellen bei MS
- Abb. 4-3 Fließschema des etablierten Protokolls zur Identifizierung einzelner OKB-Antikörper aus Liquor
- Abb. 4-4 Aufbau der Myelinschicht im ZNS
- Abb. 4-5 NMR-Struktur eines Fv-Fragments mit gebundener Kopfgruppe eines Gangliosids
- Abb. II-1 Vektorkarte des pCR®2.1-TOPO-Vektors
- Abb. II-2 Vektorkarte des pTT5-Vektors
- Abb. II-3 Vektorkarten der erstellten Kassettenvektoren „pTT5-H“ und „pTT5-L“
- Abb. II-4 Vektorkarten der pTT5-Vektorkonstrukte am Beispiel von Fab-1039-s1
- Abb. III-1 Überlappung des Liquor-Proteoms mit Ig-V(D)J-Transkriptomen aus Liquor und drei verschiedenen Plaques von Patient MS-4
- Abb. III-2 Überlappung des Liquor-Proteoms mit Ig-V(D)J-Transkriptomen aus Liquor und sechs verschiedenen Plaques von Patient MS-B2A
- Abb. III-3 Ig-V(D)J-Transkriptom aus Liquor-B-Zellen des Patienten L-296
- Abb. IV-1 Ig-V(D)J-Transkriptom aus Liquor-B-Zellen des Patienten HM-63 mit identifizierten Peptiden der OKB-Spots 2, 8 und 9
- Abb. IV-2 Ig-V(D)J-Transkriptom aus Liquor-B-Zellen des Patienten 1039 mit identifizierten Peptiden des OKB-Spots 1

Abkürzungsverzeichnis

Formelgrößen wurden mit den international gebräuchlichen SI-Einheiten und Aminosäuren entsprechend ihres Einbuchstabencodes abgekürzt.

A	<u>A</u> denosin	EAE	<u>E</u> xperimentelle <u>A</u> utoimmune <u>E</u> nzephalomyelitis
Abb.	<u>A</u> bbildung	EBNA	<u>E</u> pstein- <u>B</u> arr <u>n</u> ukleäres <u>A</u> ntigen
AG	<u>A</u> rbeitsgruppe	EBV	<u>E</u> pstein- <u>B</u> arr- <u>V</u> irus
AID	<u>A</u> ktivierungs- <u>i</u> nduzierte <u>D</u> eaminase	ECL	<u>e</u> nhanced <u>c</u> hemiluminescence
Amp	<u>A</u> mpicillin	<i>E.coli</i>	<u>E</u> scherichia <u>c</u> oli
APS	<u>A</u> mmoniumpersulfat	EDTA	<u>E</u> thylendiamintetraacetat
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat	ELISA	<u>e</u> nzyme- <u>l</u> inked <u>i</u> mmunosorbent <u>a</u> ssay
BCA	<u>b</u> icin <u>h</u> oninic <u>a</u> cid	ESI	<u>e</u> lectrospray <u>i</u> onisation
bp	<u>B</u> asenpaar	FACS	<u>f</u> luorescence <u>a</u> ctivated <u>c</u> ell <u>s</u> orting
BSA	<u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin	FDC	<u>f</u> ollicular <u>d</u> endritic <u>c</u> ell
BZR	<u>B</u> - <u>Z</u> ell <u>r</u> ezeptor	FFPE	<u>F</u> ormalin- <u>f</u> ixiert und in <u>P</u> araffin <u>e</u> ingebettet
C	<u>C</u> ytosin	FITC	<u>F</u> luorescein <u>i</u> s <u>o</u> thiocyanat
Cardio	<u>C</u> ardiolipin	for	<u>f</u> orward
CD	<u>C</u> ircular <u>d</u> ichroismus	FPLC	<u>f</u> ast <u>p</u> rotein <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography
CD4	<u>c</u> luster of <u>d</u> ifferentiation 4	G	<u>G</u> uanin
cDNA	<u>c</u> omplementary <u>D</u> NA	GalC	<u>G</u> alactosyl <u>c</u> erebrosid
CDR	<u>c</u> omplementarity <u>d</u> etermining <u>r</u> egion	GBS	<u>G</u> uillain- <u>B</u> arré- <u>S</u> yndrom
Cer	<u>C</u> eramid	HEK293E	<u>h</u> uman <u>e</u> mbrionic <u>k</u> idney 293 <u>E</u> BNA-1
CHAPS	<u>C</u> holamidopropyl-dimethyl- <u>a</u> mmonio-propan-sulfonat	H-Kette	<u>h</u> eavy <u>c</u> hain
Chol	<u>C</u> holesterin	HLA	<u>h</u> umanes <u>L</u> eukozyten <u>A</u> ntigen
CIS	<u>c</u> linically <u>i</u> solated <u>s</u> yndrome	HRP	<u>h</u> orseradish <u>p</u> eroxidase
CMV	<u>C</u> ytomegalovirus	HSV	<u>H</u> erpes <u>S</u> implex- <u>V</u> irus
CNP	<u>c</u> yclic <u>n</u> ucleotide <u>p</u> hosphodiesterase	ID	<u>I</u> dentifikation
C-Region	<u>c</u> onstant <u>r</u> egion	IEF	<u>i</u> soelektrische <u>F</u> okussierung
C-terminal	<u>c</u> arboxyterminal	Ig	<u>I</u> mmunglobulin
Dgdg	<u>D</u> igalactosyl <u>d</u> iglycerid	IgG ^q	<u>I</u> gG- <u>Q</u> uotient
DMF	<u>D</u> imethylformamid	IPG	<u>i</u> mmobilisierter <u>p</u> H- <u>G</u> radient
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid	J-Region	<u>j</u> oining <u>r</u> egion
DNA	<u>d</u> eoxy <u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid	k.A.	<u>k</u> eine <u>A</u> ngabe
dNTP	<u>d</u> esoxy- <u>N</u> ukleosid- <u>T</u> riphosphat	kb	<u>K</u> ilobasenpaar
D-Region	<u>d</u> iversity <u>r</u> egion		
DTT	<u>D</u> ithiothreitol		

LB	<u>L</u> uria- <u>B</u> ertani	PEI	<u>P</u> oly <u>e</u> thylen <u>i</u> min
LC	<i>l</i> iquid <i>c</i> hromatography	PFA	<u>P</u> ara <u>f</u> ormal <u>d</u> ehyd
L-Kette	<i>l</i> ight <i>c</i> hain	PMSF	<u>P</u> henyl <u>m</u> ethyl <u>s</u> ulfonyl <u>f</u> luorid
LOS	<u>L</u> ipo <u>o</u> ligo <u>s</u> accharid	PLP	<u>P</u> roteo <u>l</u> ipid <u>P</u> rotein
MAG	<u>M</u> yelin-assoziertes <u>G</u> lykoprotein	PVDF	<u>P</u> oly <u>v</u> inylid <u>e</u> nfluorid
mAk	<u>m</u> onoklonaler <u>A</u> ntikörper	RA	<u>r</u> heumatoide <u>A</u> rthritis
MALDI	<i>m</i> atrix <i>a</i> ssisted <i>l</i> aser <i>d</i> esorption/ <i>i</i> onization	rFab	<u>r</u> ekombinant exprimierte Fab- Fragmente
MBP	<i>m</i> yelin <i>b</i> asic <i>p</i> rotein	rev	<i>r</i> ev <u>e</u> rse
MEGA	<u>M</u> ethyl <u>g</u> lucamid	RNA	<i>r</i> ibonucleic <i>a</i> cid
Mgdg	<u>M</u> onogalactosyl <u>d</u> iglycerid	rpm	<i>r</i> ounds <i>p</i> er <i>m</i> inute
MHC	<i>m</i> ajor <i>h</i> istocompatibility <i>c</i> omplex	RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
MOG	<u>M</u> yelin <u>O</u> ligodendrozyten <u>G</u> lykoprotein	SDS	<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate
MPI	<u>M</u> ax- <u>P</u> lanck- <u>I</u> nstitut	SHM	<u>s</u> omatische <u>H</u> yper <u>m</u> utation
MRZ-Reaktion	Reaktivität gegen <u>M</u> asern-, <u>R</u> öteln-, <u>V</u> arizella <u>Z</u> oster-Viren	SLE	<u>s</u> ystemischer <u>L</u> upus <u>e</u> rythematodes
MS	<u>M</u> ultiple <u>S</u> klerose	SM	<u>S</u> phingomyelin
MWCO	<i>m</i> olecular <i>w</i> eight <i>c</i> ut- <i>o</i> ff	SS	<u>S</u> phingos <u>i</u> n
NCBI	<i>N</i> ational <i>C</i> enter for <i>B</i> iotechnology <i>I</i> nformation	Sul	<u>S</u> ulfatid
NF-155	<u>N</u> eurofascin-155 (155 kDa)	T	<u>T</u> hymine
NK-Zellen	<u>N</u> atürliche <u>K</u> illerzellen	TBE	<u>T</u> ris- <u>B</u> orat- <u>E</u> DTA-Puffer
NMR	<i>n</i> uclear <i>m</i> agnetic <i>r</i> esonance	TCC	<i>t</i> erminal <i>c</i> omplement <i>c</i> omplex
NTA	<u>N</u> itri <u>l</u> o <u>a</u> ccetat	TEMED	<u>T</u> etra <u>m</u> ethylethylendiamin
N-terminal	aminoterminal	TOF	<i>t</i> ime <i>o</i> f <i>f</i> light
OKB	<u>o</u> ligo <u>k</u> lonale <u>B</u> anden	u	<i>u</i> nit
P	<u>P</u> assage	U	<u>U</u> racil
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamid- gelelektrophorese	UV	<u>u</u> ltraviolette <u>s</u> Licht
PBS	<i>p</i> hosphate <i>b</i> uffered <i>s</i> aline	UZ	<u>U</u> ltra <u>z</u> entrifuge
PC	<u>P</u> hosphatidyl <u>g</u> holin	V-Region	<i>v</i> ariable <i>r</i> egion
PCR	<i>p</i> olymerase <i>c</i> hain <i>r</i> eaction	v/v	<i>v</i> olume <i>p</i> er <i>v</i> olume
		w/v	<i>w</i> eight <i>p</i> er <i>v</i> olume
		X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl- β - D-galactopyranosid
		ZNS	<u>Z</u> entralnervensystem

Anhang

I. Primersequenzen

Im Folgenden sind die Sequenzen aller Oligonukleotide aufgelistet. Nach Bezeichnung und Nukleotidsequenz ist angegeben, in welcher Region der Ig-Ketten beziehungsweise in welchem Vektor die Primer hybridisierten. Die Bezeichnung „out“ kennzeichnet Primer, welche in der *Nested* PCR und *Semi-Nested* PCR für die Voramplifikation in der ersten Reaktion eingesetzt wurden, „in“ entsprechend die Primer der zweiten Reaktion. Die Verwendung von Wobble-Nukleotiden erfolgte gemäß der IUPAC-Nomenklatur: R (A oder G), Y (C oder T), K (G oder T), S (G oder C), W (A oder T), B (G oder T oder C).

► RT-Reaktion (siehe **Abschnitt 2.4.3.1**)

Bezeichnung	Sequenz	Hybridisierungsstelle
HG-RT-1	5' -GGGAAGGTGTGCACG	C-Region H-Kette (IgG)

► Kolonie-PCR (siehe **Abschnitt 2.4.3.2.1**) und Sequenzierung (siehe **Abschnitt 2.3.4.7**)

Bezeichnung	Sequenz	Hybridisierungsstelle
M13 Forward (-20)	5' -GTAAAACGACGGCGTC	pCR@2.1-TOPO-Vektor
M13 Reverse	5' -GAGGAACAGCTATGAC	pCR@2.1-TOPO-Vektor
pTT5-for seq	5' -CTTTCTCTCCACAGGTGTC	pTT5-Vektor
pTT5-rev seq	5' -CCTTCGAGTGAGAGACAC	pTT5-Vektor

► *Nested* PCR – Voramplifikation (1. PCR) (siehe **Abschnitt 2.4.3.2.2**)

Bezeichnung	Sequenz	Hybridisierungsstelle
V-Heavy1-for-out	5' -ACAGGTGCCCACTCCAGGTGCAG	Leader-Sequenz H-Kette
V-Heavy3-for-out	5' -AAGGTGTCCAGTGTGARGTGCAG	-“-
V-Heavy4/6-for-out	5' -CCAGATGGGTCTGTCCAGGTGCAG	-“-
V-Heavy5-for out	5' -CAAGGAGTCTGTTCCGAGGTGCAG	-“-
V-Kappa1/2-for-out	5' -ATGAGGSTCCCYGCTCAGCTGCTGG	Leader-Sequenz κ-Kette
V-Kappa3-for-out	5' -CCTTCCTCTGCTACTCTGGCTCCCAG	-“-
V-Kappa4-for-out	5' -ATTTCTGTGTGCTCTGGATCTCTG	-“-
V-Lambda1-for-out	5' -GGTCCTGGGCCAGTCTGTGCTG	Leader-Sequenz λ-Kette
V-Lambda2-for-out	5' -GGTCCTGGGCCAGTCTGCCCTG	-“-
V-Lambda3-for-out	5' -GCTCTGTGACCTCCTATGAGCTG	-“-
V-Lambda4/5-for-out	5' -GGTCTCTCTCSCAGCYTGTGCTG	-“-
V-Lambda6-for-out	5' -GTTCTTGGGCCAATTTATGCTG	-“-
V-Lambda7-for-out	5' -GGTCCAATTCYAGGCTGTGGTG	-“-
V-Lambda8-for-out	5' -GAGTGGATTCTCAGACTGTGGTG	-“-

Bezeichnung	Sequenz	Hybridisierungsstelle
HG-CH1-aa35-43-rev-out-2	5'-AGTTCACGACACCGTCAC	C-Region H-Kette (IgG)
C-Kap-aa17-23-rev-out	5'-CACACAACAGAGGCAGTTCC	C-Region κ -Kette
C-Lam-aa16-22-rev out	5'-CACCAGTGTGGCCTTGTGGC	C-Region λ -Kette

► *Nested* PCR – spezifische Amplifikation (2. PCR) (siehe **Abschnitt 2.4.3.2.2**)

Bezeichnung	Sequenz	Hybridisierungsstelle
V-Heavy1/5-for-in	5'-CTGCAACCGGTGTACATTCCGAGGTGCAGCTGGTG CAG	Leader-Sequenz/V-Region H-Kette
V-Heavy1-for-in	5'-CTGCAACCGGTGTACATTCCAGGTGCAGCTGGTG CAG	--
V-Heavy3-for-in	5'-CTGCAACCGGTGTACATTCTGAGGTGCAGCTGGTG GAG	--
V-Heavy5-for-in	5'-CTGCAACCGGTGTACATTCCAGGTGCAGCTGCAG GAG	--
V-Kappa-pan-for-in	5'-ATGACCCAGWCTCCABYCWCCCTG	Leader-Sequenz/V-Region κ -Kette
V-Lambda1-for-in	5'-CTGCTACCGGTTCTGGGCCAGTCTGTGCTGACK CAG	--
V-Lambda2-for-in	5'-CTGCTACCGGTTCTGGGCCAGTCTGCCCTGACT CAG	--
V-Lambda3-for-in	5'-CTGCTACCGGTTCTGTGACCTCCTATGAGCTGACW CAG	Leader-Sequenz/V-Region λ -Kette
V-Lambda4/5-for-in	5'-CTGCCGGTTCTCTCTCSCAGCYTGTGCTGACTCA	--
V-Lambda6-for-in	5'-CTGCTACCGGTTCTTGGCCAATTTTATGCTGACT CAG	--
V-Lambda7/8-for-in	5'-CTGCTACCGGTTCCAATTCYAGRCTGTGGTGACY CAG	--
HG-CH1-aa22-29-rev-in	5'-GAAGTAGTCTTGACCAGGC	C-Region H-Kette (IgG)
C-Kap-aa1-7-rev-in	5'-GAAGATGAAGACAGATGGTGC	C-Region κ -Kette
C-Lam-aa10-16-rev-in1	5'-GCTTGGAGCTCCTCAGAGG	C-Region λ -Kette

► *Semi-Nested* PCR (siehe **Abschnitt 2.4.3.2.3**)

Bezeichnung	Sequenz	Hybridisierungsstelle
VH4-39 CDR2 for	5'-GCTGGAGTGGATTGGGAGTG	CDR2 VH4-39/b
VH4-39 CDR2 rev-out	5'-TCTACGGATATGGTGACTCG	--
VH4-39 CDR2 rev-in	5'-CGACTCTTGAGGGACGGGC	--
VH4-39 CDR3 for	5'-GTGTATTACTGTGCGAGACAT	CDR3 VH4-39/b
VH4-39 CDR3 rev-out	5'-AGGCTGAGGAGACGGTGAC	--
VH4-39 CDR3 rev-in	5'-GGTTCCTGGCCCCAGTA	--
VH4-59 CDR2 for	5'-AGGGAAGGGACTGGAGTGGC	CDR2 VH4-59/i
VH4-59 CDR2 rev-out	5'-TGATATGGTGACTCGACTCTC	--
VH4-59 CDR2 rev-in	5'-GGAGGGTTGTAGTTGGTGT	--
VH4-59 CDR3 for	5'-CGTGTATTATTGTGTGAGACGA	CDR3 VH4-59/i
VH4-59 CDR3 rev-out	5'-AGGCTGAGGAGACGGTGAC	--
VH4-59 CDR3 rev-in	5'-GGTTCCTGGCCCCAGGA	--
VH3-74 CDR1 for	5'-CCTCTGGATTACCTTCAGTAA	CDR1 VH3-74/b
VH3-74 CDR1 rev-out	5'-CATTCGTACGTGAGACGCACT	--
VH3-74 CDR1 rev-in	5'-TCCAGCCCTTCCCTGGAAG	--
VH3-74 CDR3 for	5'-GTGTATTACTGTGCAAGGGGA	CDR3 VH3-74/b
VH3-74 CDR3 rev-out	5'-AGGCTGAGGAGACGGTGAC	--
VH3-74 CDR3 rev-in	5'-GAGGAGACGGTGACCTGGA	--
V κ 1-O2 CDR1 for	5'-TCACTTGCCGGGCAAGTCG	CDR1 V κ I-O12/b
V κ 1-O2 CDR1 rev-out	5'-ATGCACCATAGATCAGGAGC	--
V κ 1-O2 CDR1 rev-in	5'-TTAGGGGCTTCCCTGGTTTT	--
V κ 1-O2 CDR3 for	5'-CTGAAGATTTGCAACTTACTAT	CDR3 V κ I-O12/b

Bezeichnung	Sequenz	Hybridisierungsstelle
VκI-O2 CDR3 rev-out	5' -AGATGGTGCAGCCACAGTTC	CDR3 VκI-O12/b
VκI-O2 CDR3 rev-in	5' -GCAGCCACAGTTCGTTTGATA	-“-
Vλ3-h CDR1 for	5' -ATTACTGTGGGGAAACAC	CDR1 Vλ3-h/e
Vλ3-h CDR1 rev-out	5' -GCCGGTCACTATCATAAGAG	-“-
Vλ3-h CDR1 rev-in	5' -CACTATCATAAGAGATGACCAA	-“-
Vλ3-h CDR3 for	5' -TATTACTGTGAGGTGTGGGAT	CDR3 Vλ3-h/e
Vλ3-h CDR3 rev-out	5' -ACCTAGGACGGTCAGCTTG	-“-
Vλ3-h CDR3 rev-in	5' -CTTGGTCCCTCCGCCGAAA	-“-

► Mutagenese-PCR (siehe **Abschnitt 2.4.3.2.4**)

Oligonukleotide der Mutagenese-PCR sind mit einem Farbcode hinterlegt, welcher die Erkennungssequenzen der jeweiligen Restriktionsenzyme kennzeichnet. Unterstrichene Sequenzbereiche hybridisierten mit der Matrize. Durch nicht unterstrichene Bereiche wurden Sequenzen angehängt. Kleinbuchstaben markieren Stellen, an denen zur Einführung von Schnittstellen eine stille Mutagenese notwendig war. In orange sind Start- (ATG) und Stoppcodon (TGA bzw. TAA), in rot die Kozak-Sequenz (CACC) angegeben.

Bezeichnung	Sequenz	zur Klonierung der
Heavy-Lead4 Link for	5' - <u>AATTC</u> <u>CACC</u> <u>ATGA</u> AGCACCTGTGGTCTTCTCCTCT GCTGGTGGCGGCT <u>CCGCGGA</u>	Leader-Sequenz VH4-04
Heavy-Lead4 Link rev	5' - <u>AGCTT</u> <u>CCGCGG</u> AGCCGCCACCAGCAGGAGGAAGAA CCACAGGTGCTT <u>CATGGTGG</u>	-“-
KappaLead1 <u>EcoRI</u> for	5' -ATATGAATTC <u>CACC</u> <u>ATG</u> GACATGAGGGTCCCCGCT CAG	Leader-Sequenz VκI-O12
KappaLead1 <u>HindBss</u> rev	5' -GGAGAAGCTTg <u>cGCg</u> CCTCGGAGCCAGAGTAG	-“-
CKappa <u>HindKas</u> for	5' -CTCTAAGCTTg <u>GCg</u> CCATCTGTCTTCATCTTC	Volllänge C-Region Cκ
CKappa <u>BamHI</u> rev	5' -AGGAGGATCC <u>TCA</u> ACACTCTCCCCTGTTGA	-“-
CHeavy <u>Hind Sal</u> for	5' -AACGAAGCTT <u>Gtcg</u> ACCCTCGGGGCACAGC	C-Region C _{H1}
Hinge <u>His Bam</u> rev	5' -GTGTGGATCC <u>TTA</u> ATGGTGATGGTGATGGTGAGTT TTGTCACAAGATTTG	C-Region C _{H1} mit His ₍₆₎ - Sequenz
VHeavy3-07 <u>SacII</u> for	5' -GTTT <u>CCGCGG</u> TGGGTCTGTCCCAGGTGCAGCTGG TGCAGTCTG	H-Ketten OKB-HM-63-s2, OKB-HM-63-s8, OKB- HM-63-s9
VHeavy4-39 <u>SacII</u> for	5' -GTTT <u>CCGCGG</u> TGGGTCTGTCCCAGGTGCAGCTGC AGGAGT	H-Ketten OKB-1039-s1, OKB-NS-52
Kappa-VK1 <u>BssHII</u> for	5' -CACAGGcGCgCGATGTGACATCCAGATGACCCAGt CTCCAGTCACC	L-Ketten OKB-HM-63-s8, OKB-NS-52
Kappa-VK2 <u>BssHII</u> for	5' -CACAGGcGCgCGATGTGATATTTGTGATGACTCAGT CTCCAC	L-Ketten OKB-1039-s1
Kappa-VK3L2 <u>BssH</u> for	5' -CACAGGcGCgCGATGTGAAATAGTGATGACGCAGT CTCCAGCC	L-Kette OKB-HM-63-s9
Lambda-VL3 <u>BssH</u> for	5' -CACAGGcGCgCGATGTTCCTATGAGCTGACTCA GCC	L-Kette OKB-HM-63-s2
CHeavy <u>SalI</u> rev	5' -GTGCCCCCAGAGGT <u>cga</u> CTTGG	H-Ketten OKB-1039-s1, OKB-HM-63-s2, OKB- HM-63-s8, OKB-HM-63- s9, OKB-NS-52
Kappa-V,C <u>KasI</u> rev	5' -AGACAGATGGcGCcGCCACAG	L-Ketten OKB-1039-s1, OKB-HM-63-s8, OKB- HM-63-s9, OKB-NS-52
Lambda V,C <u>KasI</u> rev	5' -AGATGGcGCcGCCACAGTTCGGAGGACGGTCAGCT TGGTC	L-Kette OKB-HM-63-s2

II. Vektorkarten

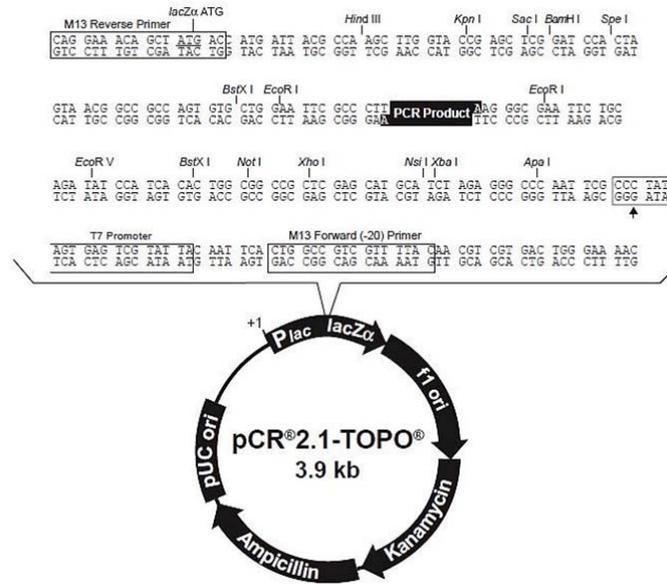


Abb. II-1: Vektorkarte des pCR®2.1-TOPO-Vektors

Plac = Promotor für *lacZ*-Gen, *lacZα* = Gen codierend für β -Galactosidase (α -Fragment), *fl ori* = Replikationsursprung des Phagen *fl*, Kanamycin- und Ampicillin-Resistenzgen, *pUC ori* = bakterieller Replikationsursprung (*E. coli*); Bildquelle: Handbuch „TOPO-TA Cloning®“ (Invitrogen)

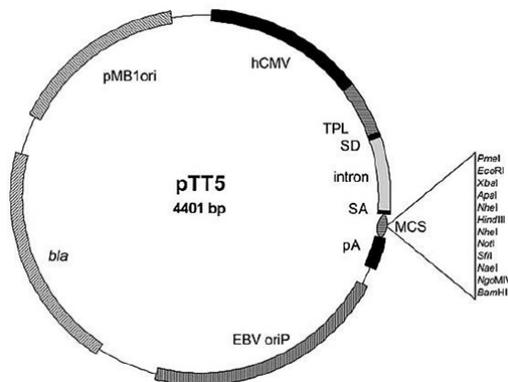


Abb. II-2: Vektorkarte des pTT5-Vektors

hCMV = Promotor des humanen Cytomegalovirus, *TPL* = *Tripartite leader*-Sequenz des Adenovirus, *SD* = Spleiß-Donor, *SA* = Spleiß-Akzeptor, *MCS* = multiple Klonierungsstelle, *pA* = Polyadenylierungsstelle des β -Globingens (Hase), *EBV oriP* = Replikationsursprung des Epstein-Barr-Virus, *pMB1 ori* = bakterieller Replikationsursprung (*E. coli*), *bla* = Gen codierend für β -Lactamase (Ampicillin-Resistenz); [165]

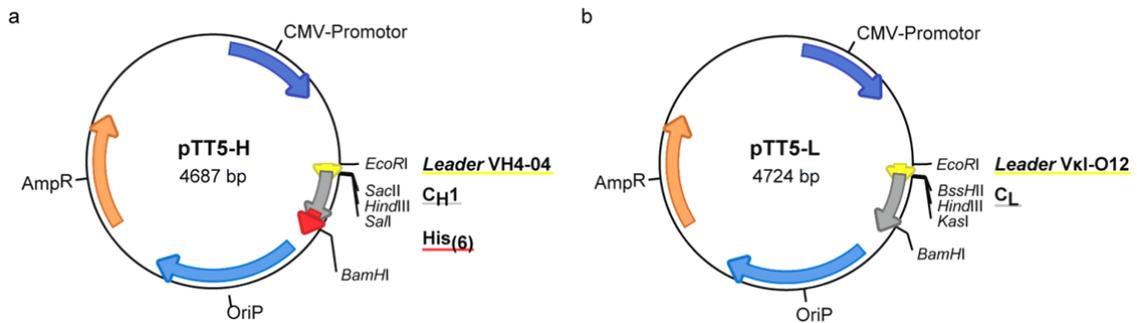


Abb. II-3: Vektorkarten der erstellten Kassettenvektoren „pTT5-H“ und „pTT5-L“

Der pTT5-Vektor bringt einen EBV-spezifischen Replikationsursprung (OriP, hellblau), ein Ampicillin-Resistenzgen (Amp^R , orange) sowie einen Promotor des Cytomegalovirus (CMV-Promotor, dunkelblau) mit (siehe auch **Abb. II-2**). Es sind alle für die Klonierung relevanten Restriktionsschnittstellen angegeben. **(a)** „pTT5-H“ mit einer Größe von 4687 bp. Der Kassettenvektor für die H-Kette trägt die *Leader*-Sequenz VH4-04 (gelb), die C_{H1} -Domäne des konstanten Teils (grau) und eine Sequenz codierend für das C-terminale $His_{(6)}$ -Peptid (rot). **(b)** „pTT5-L“ mit einer Größe von 4724 bp. Der Kassettenvektor für die L-Kette trägt die *Leader*-Sequenz Vkl-O12 (gelb) und die C_L -Domäne in voller Länge (grau).

Zur Erstellung der Vektorkarten wurde das frei zugängliche Programm „ApE – A Plasmid Editor“ in der Version 1.17 verwendet (Urheber: M. Wayne Davis).

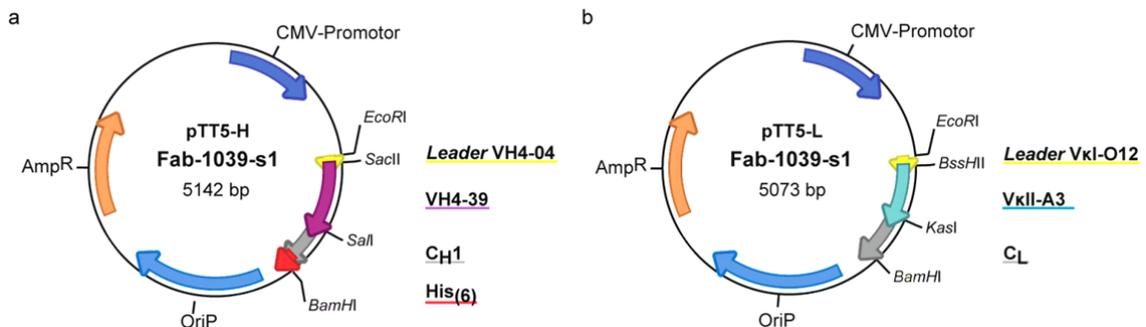


Abb. II-4: Vektorkarten der pTT5-Vektorkonstrukte am Beispiel von Fab-1039-s1

In die Kassettenvektoren „pTT5-H“ und „pTT5-L“ aus **Abbildung II-3** wurden die V(D)J-Sequenzen eingefügt, welche in **Abschnitt 3.4** aus einzelnen OKB-Antikörpern identifiziert wurden. **(a)** „pTT5-H“ mit integrierter VDJ-Sequenz der H-Kette VH4-39 (lila) von OKB-1039-s1 (siehe **Abb. 3.4-2b**) mit einer Größe von 5142 bp. Zur Klonierung dienten die durch Mutagenese-PCR eingefügten Schnittstellen *SacII* und *SalI*. **(b)** „pTT5-L“ mit integrierter VJ-Sequenz der L-Kette VklII-A3 (grün) von OKB-1039-s1 (siehe **Abb. 3.4-2b**) mit einer Größe von 5073 bp. Zur Klonierung dienten die durch Mutagenese-PCR eingefügten Schnittstellen *BssHII* und *KasI*.

Zur Erstellung der Vektorkarten wurde das frei zugängliche Programm „ApE – A Plasmid Editor“ in der Version 1.17 verwendet (Urheber: M. Wayne Davis).

a (2)

Plaque Nr.	Liquor	Ig-V(D)J-Transkriptom												
		V-H Familie	CDR1	CDR2	CDR3									
2	x	3-11/a	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFFPSD	YYMWRQAPGKGF	EWLSTVST	TETRIYADSVKGR	FTISDNKNSL	LQMNLR	AEADTA	TYCAR	VELDLRQWTFH	QMDVWQQTIVVSSASTK
3	x	3-23/a	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFSN	YAMWVQAPGKGL	EWVVAIT	NGLTIYADSVKGR	FTISDNKNSL	YLNMSLR	EDTAVYCAR	WQVWVFLGLGASD	WTLLEWQQTIVVSSASTK
4	x	3-23/b	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFSN	YAMWVQAPGKGL	EWVVAIT	SGRTIYADSVKGR	FTISDNKNSL	YLNMSLR	EDTAVYCAR	WQVWVFLGLGASD	WTLLEWQQTIVVSSASTK
5	x	3-23/c	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFSN	YAMWVQAPGKGL	EWVVAIT	SGRTIYADSVKGR	FTISDNKNSL	YLNMSLR	EDTAVYCAR	WQVWVFLGLGASD	WTLLEWQQTIVVSSASTK
6	x	3-23/d	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFSN	YAMWVQAPGKGL	EWVVAIT	SGRTIYADSVKGR	FTISDNKNSL	YLNMSLR	EDTAVYCAR	WQVWVFLGLGASD	WTLLEWQQTIVVSSASTK
7	x	3-23/e	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFSN	YAMWVQAPGKGL	EWVVAIT	SGRTIYADSVKGR	FTISDNKNSL	YLNMSLR	EDTAVYCAR	WQVWVFLGLGASD	WTLLEWQQTIVVSSASTK
8	x	3-23/f	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFSN	YAMWVQAPGKGL	EWVVAIT	SGRTIYADSVKGR	FTISDNKNSL	YLNMSLR	EDTAVYCAR	WQVWVFLGLGASD	WTLLEWQQTIVVSSASTK

Abb. III-2: Überlappung des Liquor-Proteoms mit Ig-V(D)J-Transkriptomen aus Liquor und sechs verschiedenen Plaques von Patient MS-B2A

(a, Teil 2) Legende entspricht Abbildung III-1a (Teil 1).

b (1)

Plaque Nr.	Liquor	V-k Familie	Ig-V(D)J-Transkriptom						
			CDR1	CDR2	CDR3				
2	x	x	DIQMTQFASLSASVGRVITTRASQGIS	YLNWYQKPKGAPKLLIYASL	LGQVPSRFSGSGGTDFTLISLQPEDFATYK	QOQSYTF	YFPGQTKVEIK
3	x	x	DIQMTQFASLSASVGRVITTRASQGIS	YLNWYQKPKGAPKLLIYASL	LGQVPSRFSGSGGTDFTLISLQPEDFATYK	QOQSYTF	YFPGQTKVEIK
4	x	x	DIQMTQFASLSASVGRVITTRASQGIS	YLNWYQKPKGAPKLLIYASL	LGQVPSRFSGSGGTDFTLISLQPEDFATYK	QOQSYTF	YFPGQTKVEIK
5	x	x	DIQMTQFASLSASVGRVITTRASQGIS	YLNWYQKPKGAPKLLIYASL	LGQVPSRFSGSGGTDFTLISLQPEDFATYK	QOQSYTF	YFPGQTKVEIK
6	x	x	DIQMTQFASLSASVGRVITTRASQGIS	YLNWYQKPKGAPKLLIYASL	LGQVPSRFSGSGGTDFTLISLQPEDFATYK	QOQSYTF	YFPGQTKVEIK
7	x	x	DIQMTQFASLSASVGRVITTRASQGIS	YLNWYQKPKGAPKLLIYASL	LGQVPSRFSGSGGTDFTLISLQPEDFATYK	QOQSYTF	YFPGQTKVEIK
8	x	x	DIQMTQFASLSASVGRVITTRASQGIS	YLNWYQKPKGAPKLLIYASL	LGQVPSRFSGSGGTDFTLISLQPEDFATYK	QOQSYTF	YFPGQTKVEIK

Abb. III-2: Überlappung des Liquor-Proteoms mit Ig-V(D)J-Transkriptomen aus Liquor und sechs verschiedenen Plaques von Patient MS-B2A

(b, Teil 1) Analyse der κ-Ketten. Legende entspricht Abbildung 3.2-1. Insgesamt wurden 164 Ig-κ-Transkripte aus Liquor und sechs Gehirnplaques untersucht.

C

Ig-W(D)J-Transkriptom		V-A	CDR1	CDR2	CDR3	
Plaque Nr.	Liquor	Familie				
2	3	5	1	6	7	11
x						
A1-c/a	x	QSVLTQ.PFVSVSGTGGQRTVITISGGSSNIGGN...FVNWYQQLPQTAPKLLIYDNRQPSGVDFRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC.AFWDDTLDG...VVFSGGTLTLVL				
A1-e/a	x	QSVLTQ.PFVSVSGAPQRTVITISGGSSNIGAGF...DVHWYQQVPGTAPKLLIYGNRNRPSGVDFRFSGSKSGTSASLAITGLQAEADYYC.QYDMSLSGS...VVFSGGTLTLVL				
A1-e/a	x	QSVLTQ.PFVSVSGTGGQRTVITISGGSSNIGGN...FVNWYQQVPGTAPKLLIYDNRQPSGVDFRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC.AAWDDSLDG...VVFSGGTLTLVL				
A1-e/b	x	QSVLTQ.PFVSVSGTGGQRTVITISGGSSNIGGN...FVNWYQQVPGTAPKLLIYDNRQPSGVDFRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC.AAWDDSLDG...VVFSGGTLTLVL				
A1-c/c	x	QSVLTQ.PFVSVSGTGGQRTVITISGGSSNIGGN...FVNWYQQVPGTAPKLLIYDNRQPSGVDFRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC.SAWDDNLSG...VVFSGGTLTLVL				
A1-c/d	x	QSVLTQ.PFVSVSGTGGQRTVITISGGSSNIGGN...FVNWYQQVPGTAPKLLIYDNRQPSGVDFRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC.ATWDDSLNG...VVFSGGTLTLVL				
A1-e/e	x	QSVLTQ.PFVSVSGTGGQRTVITISGGSSNIGGN...FVNWYQLPQTAPKLLIYDNRQPSGVDFRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC.ASWDDSLNG...VVFSGGTLTLVL				
A1-e/f	x	QSVLTQ.PFVSVSGTGGQRTVITISGGSSNIGGN...FVNWYQQVPGTAPKLLIYDNRQPSGVDFRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC.AAWDDTLDG...VVFSGGTLTLVL				
A1-e/g	x	QSVLTQ.PFVSVSGTGGQRTVITISGGSSNIGGN...FVNWYQQVPGTAPKLLIYDNRQPSGVDFRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC.AAWDDTLDG...VVFSGGTLTLVL				
A1-g/a	x	QSVLTQ.PFVSVSGTGGQRTVITISGGSSNIGGN...FVNWYQQVPGTAPKLLIYDNRQPSGVDFRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC.AAWDDSLDG...VVFSGGTLTLVL				
A1-g/a	x	QSVLTQ.PFVSVSGTGGQRTVITISGGSSNIGGN...FVNWYQQVPGTAPKLLIYDNRQPSGVDFRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC.AAWDDSLDG...VVFSGGTLTLVL				
A1-g/a	x	QSVLTQ.PFVSVSGTGGQRTVITISGGSSNIGGN...FVNWYQQVPGTAPKLLIYDNRQPSGVDFRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC.AAWDDSLDG...VVFSGGTLTLVL				
A2-a/a	x	QSVLTQ.PFVSVSGTGGQRTVITISGGSSNIGGN...FVNWYQQVPGTAPKLLIYDNRQPSGVDFRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC.AAWDDSLDG...VVFSGGTLTLVL				
A2-a/a	x	QSVLTQ.PFVSVSGTGGQRTVITISGGSSNIGGN...FVNWYQQVPGTAPKLLIYDNRQPSGVDFRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC.AAWDDSLDG...VVFSGGTLTLVL				
A2-b/a	x	QSVLTQ.PFVSVSGTGGQRTVITISGGSSNIGGN...FVNWYQQVPGTAPKLLIYDNRQPSGVDFRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC.AAWDDSLDG...VVFSGGTLTLVL				
A2-b/a	x	QSVLTQ.PFVSVSGTGGQRTVITISGGSSNIGGN...FVNWYQQVPGTAPKLLIYDNRQPSGVDFRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC.AAWDDSLDG...VVFSGGTLTLVL				
A2-b/a	x	QSVLTQ.PFVSVSGTGGQRTVITISGGSSNIGGN...FVNWYQQVPGTAPKLLIYDNRQPSGVDFRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC.AAWDDSLDG...VVFSGGTLTLVL				
A3-a/a	x	QSVLTQ.PFVSVSGTGGQRTVITISGGSSNIGGN...FVNWYQQVPGTAPKLLIYDNRQPSGVDFRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC.AAWDDSLDG...VVFSGGTLTLVL				
A3-a/a	x	QSVLTQ.PFVSVSGTGGQRTVITISGGSSNIGGN...FVNWYQQVPGTAPKLLIYDNRQPSGVDFRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC.AAWDDSLDG...VVFSGGTLTLVL				
A3-m/a	x	QSVLTQ.PFVSVSGTGGQRTVITISGGSSNIGGN...FVNWYQQVPGTAPKLLIYDNRQPSGVDFRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC.AAWDDSLDG...VVFSGGTLTLVL				
A10-a/a	x	QAGLTQ.PFVSVSKGLQQTATLISCTGNSNIVGNE...GAAMLQQVGHPPKLLSFRSHNRPSGISDRFSASRSGNTASLTIISGLRPEDEADYYC.AAWNDSLGV...VVFSGGTLTLVL				

Abb. III-2: Überlappung des Liquor-Proteoms mit Ig-V(D)J-Transkriptomen aus Liquor und sechs verschiedenen Plaques von Patient MS-B2A

(c) Analyse der λ-Ketten. Legende entspricht **Abbildung 3.2-1**. Insgesamt wurden 18 Ig-λ-Transkripte aus Liquor und sechs Gehirnplaques untersucht.

c	Klon-anzahl	V-A Familie	CDR1	CDR2	CDR3
1	1-e/a		QSVLTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGTAPRLIISGN....NNRPSGVDRFSGSKSG..TSASLAITGLQAEDEAHYYC.QSYDILSDTR.VVFGGKTLTVQ		
1	1-e/b		QSVLTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGTAPRLIISGN....NNRPSGVDRFSGSKSG..TSASLAITGLQAEDEAHYYC.QSDSSQR...GLFGTGKTVTL		
3	1-e/c		QSVLTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYHN....NNRPSGVDRFSGSKSG..TSASLAITGLQAEDEAHYYC.QSDSSQR...GLFGTGKTVTL		
1	1-e/d		QSVLTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYHN....NNRPSGVDRFSGSKSG..TSASLAITGLQAEDEAHYYC.ATWDDSLNG..VFGGKTLTVL		
2	1-e/a		QSVLTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYGD....NQRPGVDRFSGSKSG..TSASLAISGLQSEDEADYYC.TWDDSLNG..VFGGKTLTVL		
1	1-e/b		QSVLTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYGD....NQRPGVDRFSGSKSG..TSASLAISGLQSEDEADYYC.TWDDSLNG..VFGGKTLTVL		
1	1-e/c		QSVLTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYGD....NQRPGVDRFSGSKSG..TSASLAISGLQSEDEADYYC.TWDDSLNG..VFGGKTLTVL		
1	1-e/d		QSVLTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYGD....NQRPGVDRFSGSKSG..TSASLAISGLQSEDEADYYC.ATWDDSLNG..VFGGKTLTVL		
1	1-e/e		QSVLTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYGD....NQRPGVDRFSGSKSG..TSASLAITGLQAEDEAHYYC.ATWDDSLNG..VFGGKTLTVL		
1	1-e/f		QSVLTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYGD....NQRPGVDRFSGSKSG..TSASLAISGLQSEDEADYYC.TWDDSLNG..VFGGKTLTVL		
1	1-e/g		QSVLTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYGD....NQRPGVDRFSGSKSG..TSASLAISGLQSEDEADYYC.AWDDSLNG..VFGGKTLTVL		
1	1-g/a		QSVLTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYFN....NQRPGVDRFSGSKSG..TSASLAISGLRSEDEADYYC.VWDDSLNG..VFGGKTLTVL		
1	1-g/b		QSVLTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYFN....NQRPGVDRFSGSKSG..TSASLAISGLRSEDEADYYC.ATWDDSLNG..VFGGKTLTVL		
1	1-g/c		QSVLTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYFN....NQRPGVDRFSGSKSG..TSASLAISGLQSEDEADYYC.ATWDDSLNG..VFGGKTLTVL		
1	1-g/d		QSVLTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYFN....NQRPGVDRFSGSKSG..TSASLAITGLQAEDEAHYYC.QSYDSSLSA..VFGGKTLTVL		
1	1-g/e		QSVLTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYRS....NQRPGVDRFSGSKSG..TSASLAISGLRSEDEADYYC.SWDDSLSA..VFGGKTVL		
1	1-g/f		QSVLTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYRS....NQRPGVDRFSGSKSG..TSASLAISGLRSEDEADYYC.SWDDSLSA..VFGGKTVL		
1	1-b/a		QSVLTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGTAPKVIYDN....NKRPSGIDRFSGVSG..TSATLIGITGLQAEDEADYYC.GTWDDSLNT..VFGGKTVL		
2	2-a/2/a		QSVLTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYDV....SDRPSGVDRFSGSKSG..NTASLITGLQAEDEADYYC.TSYAAINTL..VFGGKTLTVL		
1	2-a/2/b		QSVLTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYDV....SDRPSGVDRFSGSKSG..NTASLITGLQAEDEADYYC.SSYTVTST...LVFGGKTLTVL		
1	2-a/2/c		QSVLTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYDV....SDRPSGVDRFSGSKSG..NTASLITGLQAEDEADYYC.SSYTVTST...LVFGGKTLTVL		
1	2-a/2/d		QSVLTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYDV....SDRPSGVDRFSGSKSG..NTASLITGLQAEDEADYYC.SSYTVTST...LVFGGKTLTVL		
1	2-a/2/e		QSVLTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYDV....SDRPSGVDRFSGSKSG..NTASLITGLQAEDEADYYC.SSYTVTST...LVFGGKTLTVL		
1	2-a/2/f		QSVLTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYDV....SDRPSGVDRFSGSKSG..NTASLITGLQAEDEADYYC.SSYTVTST...LVFGGKTLTVL		
1	2-a/2/g		QSVLTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYDV....SDRPSGVDRFSGSKSG..NTASLITGLQAEDEADYYC.SSYTVTST...LVFGGKTLTVL		
1	2-a/2/h		QSVLTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYDV....SDRPSGVDRFSGSKSG..NTASLITGLQAEDEADYYC.SSYTVTST...LVFGGKTLTVL		
1	2-a/2/i		QSVLTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYDV....SDRPSGVDRFSGSKSG..NTASLITGLQAEDEADYYC.SSYTVTST...LVFGGKTLTVL		
1	2-a/2/k		QSVLTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYDV....SDRPSGVDRFSGSKSG..NTASLITGLQAEDEADYYC.SSYTVTST...LVFGGKTLTVL		
2	2-a/2/l		QSVLTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYDV....SDRPSGVDRFSGSKSG..NTASLITGLQAEDEADYYC.SSYTVTST...LVFGGKTLTVL		
2	3-a/a		SYELTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYDQ....SKRPSGIDRFSGVSG..NTAALLISGTQAEDEADYYC.QAWDGSST...VFGGKTLTVL		
1	3-b/b		SYELTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYDQ....SKRPSGIDRFSGVSG..NTAALLISGTQAEDEADYYC.QAWDGSST...VFGGKTLTVL		
6	3-b/c		SYELTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYDQ....SKRPSGIDRFSGVSG..NTAALLISGTQAEDEADYYC.QAWDGSST...VFGGKTLTVL		
1	3-b/d		SYELTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYDQ....SKRPSGIDRFSGVSG..NTAALLISGTQAEDEADYYC.QAWDGSST...VFGGKTLTVL		
1	3-b/e		SYELTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYDQ....SKRPSGIDRFSGVSG..NTAALLISGTQAEDEADYYC.QAWDGSST...VFGGKTLTVL		
1	3-b/f		SYELTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYDQ....SKRPSGIDRFSGVSG..NTAALLISGTQAEDEADYYC.QAWDGSST...VFGGKTLTVL		
1	3-b/g		SYELTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYDQ....SKRPSGIDRFSGVSG..NTAALLISGTQAEDEADYYC.QAWDGSST...VFGGKTLTVL		
1	3-b/h		SYELTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYDQ....SKRPSGIDRFSGVSG..NTAALLISGTQAEDEADYYC.QAWDGSST...VFGGKTLTVL		
1	3-b/i		SYELTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYDQ....SKRPSGIDRFSGVSG..NTAALLISGTQAEDEADYYC.QAWDGSST...VFGGKTLTVL		
1	3-b/k		SYELTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYDQ....SKRPSGIDRFSGVSG..NTAALLISGTQAEDEADYYC.QAWDGSST...VFGGKTLTVL		
5	3-b/l		SYELTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYDQ....SKRPSGIDRFSGVSG..NTAALLISGTQAEDEADYYC.QAWDGSST...VFGGKTLTVL		
1	3-b/m		SYELTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYDQ....SKRPSGIDRFSGVSG..NTAALLISGTQAEDEADYYC.QAWDGSST...VFGGKTLTVL		
1	3-m/a		SYELTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYDQ....SKRPSGIDRFSGVSG..NTAALLISGTQAEDEADYYC.QAWDGSST...VFGGKTLTVL		
1	6-a/a		NFMLTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYDQ....NQRPSGVDRFSGSKSG..TSASLAITGLQAEDEAHYYC.SSYTVTST...LVFGGKTLTVL		
7	7-b/a		QAVVTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYDQ....NQRPSGVDRFSGSKSG..TSASLAITGLQAEDEAHYYC.SSYTVTST...LVFGGKTLTVL		
1	7-b/b		QAVVTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYDQ....NQRPSGVDRFSGSKSG..TSASLAITGLQAEDEAHYYC.SSYTVTST...LVFGGKTLTVL		
1	7-b/c		QAVVTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYDQ....NQRPSGVDRFSGSKSG..TSASLAITGLQAEDEAHYYC.SSYTVTST...LVFGGKTLTVL		
1	8-a/a		QVVTQPPSASGAPGQRTVTSCTGSSNIGADYDVHWYQLPGIAPKLLIYST....STRSSGVDRFSGSKSG..NKAALITGLQAEDEADYYC.VLYMGSST...VFGGKTLTVL		

Abb. IV-1: Ig-V(D)J-Transkriptom aus Liquor-B-Zellen des Patienten HM-63 mit identifizierten Peptiden der OKB-Spots 2, 8 und 9

(c) Analyse der λ-Ketten. Legende entspricht Abbildung IV-1a. Insgesamt wurden 74 Ig-λ-Transkripte untersucht. λ-Kette 3-r/b gehört zu OKB-HM-63-s2.

V. Aminosäuresequenzen der rFab-Fragmente

Fab-1039-s1 H-Kette

QVQLQESGPRLVKPSEALSLTCLVSGGSINSNTYYWDWLRQPPGKGLEWIGSISYSGGTYYNPSLKNRVTMSVDTSNQFSLKLSVTAADTAV
YYCARHTPRQAYYNILTSSQDYIYGMVDVWGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFP
AVLQSSGLYSLSVTVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHHHHHH

Fab-1039-s1 L-Kette

DIVMTQSPSLPVTTPGEAASISCRSSQSLHSSGNNYLDWYLQKPGQPPQLLIYLGNSNRASGVPDRFSGSGSDTFTLTKISRVEAEDVGVYYCM
QALETPPIITFGQGTRELEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLS
KADYKHKHVVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Fab-HM-63-s2 H-Kette

QVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCATSGFTFNSYNMNVWRQAPGKGLEWLAYINSDSSTYYADSVKGRFTISRDDARRSLDLQMNSLRAEDTAVY
YCARLSGYDWYSDSVLYHDIYWGQGLTVTVSSSTTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFFPAVLQSSGL
YSLSSVTVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHHHHHH

Fab-HM-63-s2 L-Kette

SYELTQPPSVSVSPGGTARITCSGDGLPKKYAYWYQQKSGQAPVLIYQNTARPSGIPERFSGSTSGNTAALIISGTQAVDEADYICQAWDGGST
VVFGRGKTLTVLRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYKHK
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Fab-HM-63-s8 H-Kette

QVQLVQSGGGLVQPGESVRLSCAVSGFSTTYWMSWVRQAPGKGLEWVANINQDGRQEYYVDSVKGRFTISRDNENSLYLQMNSLRAEDTAVY
YCARRTYDFWSSSLAFDVGQGTMTVIVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFFPAVLQSSGLYS
LSSVTVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHHHHHH

Fab-HM-63-s8 L-Kette

DIQMTQSPVTLTASVGDVITICRASQSVSSYLNWYQQKPGEAPKLLIYAASRLHSGVPSRFSGSGSHTFTLTVTSLLPEDFATYICQQYSYN
PTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYKHK
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Fab-HM-63-s9 H-Kette

QVQLVQSGGGLVQPGGLRLSCAASGFTFTNYEMNVWRQAPGKGLEWVSYISISGRTIYYADSVKGRFTISRDNARNSLYLQMNSLRAEDTAVY
YCARELSHWDMIVVDSDAFDIWGQGTMTVIVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFFPAVLQSSGL
LYSLSSVTVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHHHHHH

Fab-HM-63-s9 L-Kette

EIVMTQSPATLTVSPGERATLSCRASQNVSSNLAWYQQKPGQVPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYICQQYNDW
PRTEFRGKTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYKHK
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Fab-NS-52 H-Kette

QVQLQESGPGLVKPSQTLTSLTCTVSGGSITSGSYYSWVWRQAPGKGLEWIGRISATGSTNYNPSLWSRVTISVDTSKNQFSLKLTSTVTAADTAV
YYCARHSSYSDSSYLPYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFFPAVLQSSGLYSLS
SVTVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHHHHHH

Fab-NS-52 L-Kette

DIQMTQSPVTLTASVGDVITICRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASLTKSGVPSRFSGSGSDTFTLTIITSLQPEDVATYICQKYYSN
PRTEFRGKTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYKHK
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Fab-8-18C5 H-Kette

QVQLQQSGAELMKPGASVEISCKATGYTFSSFWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGRGRNTYNEKFKGKATFTAETSSNTAYMQLSLSLTSSEDSAVY
YCATGNTMVMNMPYWGQGLTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFFPAVLQSSGLYSLSVTV
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHHHHHH

Fab-8-18C5 L-Kette

DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRESGVPDRFTGSGSGDTFTLTISSVQAEADLAVYYC
QNDHSYPLTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLS
KADYKHKHVVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

VI. Cd

Der Arbeit ist eine Cd beigelegt, auf der sich sämtliche Abbildungen, in denen Ig-V(D)J-Transkriptomte beziehungsweise relevante Teile davon enthalten sind, befinden. Dies soll eine genauere Betrachtung der einzelnen Aminosäuresequenzen ermöglichen, da eine größere Darstellung in der Druckversion der Arbeit nicht möglich war.

Es handelt sich um folgende Abbildungen:

Abb. 3.1-1 Überlappung von Ig-V(D)J-Transkriptom und -Proteom im Liquor des MS-Patienten HM-03

Abb. 3.1-2 Überlappung von Ig-V(D)J-Transkriptom und -Proteom im Liquor des MS-Patienten NS-52

Abb. 3.1-3 Überlappung von Ig-V(D)J-Transkriptom und -Proteom im Liquor des MS-Patienten JN-02

Abb. 3.1-4 Überlappung von Ig-V(D)J-Transkriptom und -Proteom im Liquor des MS-Patienten NS-16

Abb. 3.2-1 Überlappung des Liquor-Proteoms mit Ig-V(D)J-Transkriptomen aus Liquor und drei verschiedenen Plaques von Patient MS-4

Abb. 3.4-2 Zuordnung von H- und L-Kette in Spot 1 von Patient 1039 (OKB-1039-s1)

Abb. 3.4-3 Zuordnung von H- und L-Kette in Spot 9 von Patient HM-63 (OKB-HM-63-s9)

Abb. 3.4-4 Zuordnung von H- und L-Kette in Spot 8 von Patient HM-63 (OKB-HM-63-s8)

Abb. 3.4-5 Zuordnung von H- und L-Kette in Spot 2 von Patient HM-63 (OKB-HM-63-s2)

Abb. III-1 Überlappung des Liquor-Proteoms mit Ig-V(D)J-Transkriptomen aus Liquor und drei verschiedenen Plaques von Patient MS-4

Abb. III-2 Überlappung des Liquor-Proteoms mit Ig-V(D)J-Transkriptomen aus Liquor und sechs verschiedenen Plaques von Patient MS-B2A

Abb. III-3 Ig-V(D)J-Transkriptom aus Liquor-B-Zellen des Patienten L-296

Abb. IV-1 Ig-V(D)J-Transkriptom aus Liquor-B-Zellen des Patienten HM-63 mit identifizierten Peptiden der OKB-Spots 2, 8 und 9

Abb. IV-2 Ig-V(D)J-Transkriptom aus Liquor-B-Zellen des Patienten 1039 mit identifizierten Peptiden des OKB-Spots 1

Ehrenwörtliche Erklärung

gemäß der Promotionsordnung für Biologie der LMU München

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die erlaubten Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Sämtliche Experimente wurden von mir selbst durchgeführt, sofern nicht explizit auf Dritte verwiesen wird.

Ich habe weder anderweitig versucht, eine Dissertation oder Teile einer Dissertation einzureichen, noch eine Doktorprüfung durchzuführen.

München, den 15.03.2011

Birgit Obermeier

Curriculum Vitae

Name Birgit Obermeier
Geburtsdatum 25. Februar 1982
Geburtsort Landshut
Nationalität deutsch

AUSBILDUNG

seit 04/2007 Promotion in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Klaus Dornmair; Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried, Abteilung Neuroimmunologie und Institut für Klinische Neuroimmunologie des Klinikums der Universität München

03/2007 Diplom der Biologie (Note: 1,0)

07/2006 – 03/2007 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried, Abteilung Neuroimmunologie, Arbeitsgruppe PD Dr. Klaus Dornmair

12/2005 – 07/2006 Studentische Hilfskraft am Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried, Abteilung Molekulare Neurobiologie

10/2003 – 03/2007 Hauptstudium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München; Anthropologie und Humangenetik (Hauptfach), Neurobiologie und Biochemie (Nebenfächer)

10/2003 Vordiplom der Biologie (Note: 1,7)

10/2001 – 10/2003 Grundstudium der Biologie an der Universität Regensburg

06/2001 Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,9)

09/1992 – 06/2001 Gymnasium Dingolfing

09/1988 – 07/1992 Grundschule St. Josef, Dingolfing

LEHRE

01/2011 – 04/2011 Betreuung eines 3-monatigen Praktikums eines Postdoktoranden des University Hospitals La Fe, Valencia, Spanien

09/2010 – 10/2010 Betreuung eines 6-wöchigen Forschungspraktikums einer Studentin der Fakultät für Chemie und Pharmazie der LMU München

06/2009 – 07/2009 Betreuung eines 8-wöchigen Forschungspraktikums eines Studenten der Harvard University, Boston, MA, USA

AUSZEICHNUNG

Hans Heinrich Georg Queckenstedt-Preis 2009; verliehen vom Bundesverband Mecklenburg-Vorpommern der Deutschen Multiple Sklerose Gesellschaft (DMSG)

PUBLIKATIONEN

Obermeier B., Mentele R., Malotka J., Kellermann J., Kümpfel T., Wekerle H., Lottspeich F., Hohlfeld R., Dornmair K.: Matching of oligoclonal Ig transcriptomes and proteomes of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Nat.Med.* 14, 688-693 (2008); Originalarbeit

Obermeier B., Mentele R., Malotka J., Dornmair K.: Analysis of patient-specific immunoglobulin proteomes and transcriptomes by PCR cloning and mass spectrometry. *Nat.Protoc.* published online, doi:10.1038/nprot.2008.87 (2008); Protokoll

Obermeier B., Lovato L., Mentele R., Brück W., Forne I., Imhof A., Lottspeich F., Turk K.W., Willis S.N., Wekerle H., Hohlfeld R., Hafler D. A., O'Connor K. C., Dornmair K.: Related B cell clones that populate the CSF and CNS of patients with multiple sclerosis produce CSF immunoglobulin. *J.Neuroimmunol.*; doi:10.1016/j.jneuroim.2011.01.010 (2011)

Brennan K.M.*, **Obermeier B.***, Galban-Horcajo F., Mentele R., Kümpfel T., Olsson T., Khademi M., Linington C., Lottspeich F., Rinaldi S., O'Leary C.P., Goodyear C.S., Kalna G., Arthur A., Elliot C., Barnett S., Bennett J.L., Owens G.P., Wekerle H., Hohlfeld R., Willison H.J.*, Dornmair K.*: Lipid reactivity of individual oligoclonal band antibodies in multiple sclerosis. *Brain*; in Revision

*Diese Autoren trugen gleichermaßen zur Arbeit bei.

Bruder J., Siewert K., **Obermeier B.**, Malotka J., Scheinert P., Kellermann J., Ueda T., Hohlfeld R., Dornmair K.: Target specificity of an autoreactive human $\gamma\delta$ -T cell receptor in myositis. Manuskript eingereicht

KONGRESSE

- | | |
|---------|---|
| 08/2010 | Vortrag und Poster-Präsentation: „14 th International Congress of Immunology“, Kobe, Japan |
| 08/2010 | Poster-Präsentation: „B cells and autoimmunity“, Nara, Japan |
| 09/2009 | Reisestipendium: „9 th ESNI course“, Istanbul, Türkei |
| 03/2009 | Vortrag und Poster-Präsentation: „France-German Meeting on multiple sclerosis“, Paris, Frankreich |