

Das Protein La/SS-B:
Vom Autoantigen zur Zielstruktur für die
Immuntherapie

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von

Dipl.-Biochem. Claudia Franke

geboren am 20.03.1981 in Saalfeld

Eingereicht am 25.11.2009

Die Dissertation wurde in der Zeit von Januar 2005 bis
November 2009 im Institut für Immunologie angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. K.-H. van Pée
2. Gutachter: Prof. Dr. M. Bachmann

Tag der Verteidigung: 12.03.2010

MEINER FAMILIE

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1. Einleitung	1
1.1. <i>Das Immunsystem des Menschen</i>	1
1.1.1. Ausgereifte dendritische Zellen induzieren die spezifische Immunantwort	2
1.1.2. B-Lymphozyten und Antikörper.....	3
1.1.3. Zytotoxische Effektorzellen und Apoptose.....	7
1.2. <i>Monoklonale Antikörper und rekombinante Antikörperfragmente</i>	8
1.3. <i>Tumorimmunologie</i>	9
1.4. <i>Systemischer Lupus erythematoses</i>	12
1.5. <i>Das humane Autoantigen La/SS-B</i>	13
1.5.1. Funktionen des La-Proteins	14
1.5.2. Die räumliche Struktur der einzelnen Proteindomänen.....	15
1.5.3. Lokalisationssignale und Regulationselemente des hLa-Proteins	16
1.5.4. Das hLa-Protein außerhalb des Zellkerns	18
1.6. <i>Zielstellung</i>	19
2. Materialien	21
2.1. <i>Chemikalien und Reagenzien</i>	21
2.2. <i>Puffer und Lösungen</i>	23
2.3. <i>Enzyme und Enzympuffer</i>	25
2.4. <i>Medien</i>	26
2.5. <i>Bakterienstämme</i>	26
2.6. <i>Adhärente Zellen und Zelllinien</i>	27
2.7. <i>Hybridomazellen</i>	27
2.8. <i>Antikörper</i>	28
2.9. <i>Plasmide</i>	29
2.10. <i>Molekulargewichtsmarker</i>	33
2.11. <i>Oligonukleotide</i>	33
2.12. <i>Testkitsysteme</i>	35
2.13. <i>Verbrauchsmaterialien</i>	36
2.14. <i>Geräte und Software</i>	36
3. Methoden	39
3.1. <i>Molekularbiologische Methoden</i>	39
3.1.1. Isolation von RNA aus Hybridomazellen.....	39
3.1.2. Polymerasekettenreaktion	39

3.1.2.1. Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente zur Klonierung.....	40
3.1.2.2. Reverse Transkription zur Synthese von cDNA	40
3.1.2.3. Amplifikation der variablen Regionen von Immunglobulinketten.....	41
3.1.2.4. Herstellung einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde	41
3.1.2.5. Erzeugung von Digoxigenin-markierter RNA.....	41
3.1.3. Klonierung von DNA	42
3.1.3.1. Restriktionsanalyse von DNA-Molekülen.....	42
3.1.3.1.1. Analytische Restriktionsanalyse von isolierten Plasmiden	42
3.1.3.1.2. Präparative Restriktionsanalyse.....	42
3.1.3.2. Dephosphorylierung linearisierter Plasmide.....	42
3.1.3.3. Ligation	43
3.1.3.3.1. Ungerichtete Klonierung von PCR-Fragmenten in den Vektor pGEM®-T Easy	43
3.1.3.3.2. Ligation zur gerichteten Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmide	43
3.1.4. Agarosegelelektrophorese	44
3.1.5. Elution von Gelfragmenten aus dem Agarosegel.....	44
3.1.6. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	44
3.1.6.1. Photometrische Konzentrationsbestimmung	44
3.1.6.2. Abschätzung der DNA-Konzentration mittels Agarosegelelektrophorese.....	45
3.1.7. DNA-Sequenzierung	45
3.1.8. Arbeiten mit Bakterien.....	45
3.1.8.1. Kultivierung von Bakterienkulturen	45
3.1.8.2. Anlegen von Glycerinkulturen.....	45
3.1.8.3. Bestimmung der OD ₆₀₀	45
3.1.8.4. Herstellung kompetenter Bakterien	46
3.1.8.5. Hitzeschocktransformation von kompetenten Bakterien.....	46
3.1.8.6. Blau-Weiß-Selektion positiver Klone.....	46
3.1.8.7. Plasmid-Mini-Präparation	47
3.1.8.7.1. Plasmidisolierung aus Mini-Kulturen durch Kochlyse.....	47
3.1.8.7.2. Spin-Minis	47
3.1.8.8. Plasmid-Maxi-Präparation	47
3.1.8.9. Prokaryonte Proteinproduktion	48
3.1.8.9.1. Miniexpression zur Selektion des besten Expressionsklons	48
3.1.8.9.2. Bakterielle Herstellung großer Proteinmengen	48
3.2. Zellbiologische Methoden.....	49
3.2.1. Kultivierung von adhärenenten Zelllinien	49
3.2.2. Kultivierung von Hybridomazellen	49
3.2.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen	49
3.2.4. Bestimmung der Zellzahl	49
3.2.5. Transfektion adhärenenter eukaryonter Zellen	50
3.2.5.1. Lipofektion zur transienten Transfektion.....	50

3.2.5.2. Transiente Transfektion mittels Polyethylenimid.....	50
3.2.6. Herstellung von Totalextrakten der Transfektanten	51
3.2.7. Transduktion zur Erzeugung stabiler Zelllinien.....	51
3.2.8. Intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung	52
3.2.9. Heterokaryons zur Untersuchung des Shuttlings von La.....	53
3.2.10. Oxidation lebender Zellen und fluoreszenzmikroskopische Analyse	54
3.2.11. UV-Bestrahlung von Zellen	54
3.2.11.1. Bestrahlung von HeLa-Zellen für die 7B6-Färbung.....	54
3.2.11.2. Apoptoseinduktion und Nachweis von hLa auf A9-Zellen.....	54
3.2.12. Bindung und Nachweis des rhLa-Proteins auf der Zelloberfläche.....	55
3.2.13. Durchflusszytometrie.....	55
3.2.14. Isolation peripherer mononukleärer Blutzellen	56
3.2.14.1. Gewinnung von PBMCs aus Frischblut	56
3.2.14.2. Isolation größerer Mengen an PBMCs aus <i>buffy coats</i>	56
3.2.15. Generierung aktivierter CD8 ⁺ T-Zellen <i>in vitro</i>	57
3.2.16. Isolation und Kultivierung von Natürlichen Killerzellen.....	57
3.2.17. Chromfreisetzungstest.....	58
3.3. <i>Proteinbiochemische Methoden</i>	59
3.3.1. Reinigung rekombinanter Proteine mittels Metallchelatchromatographie	59
3.3.1.1. Ni-NTA-Affinitätschromatographie zur Reinigung prokaryont hergestellter Proteine	59
3.3.1.2. Gewinnung eukaryont hergestellter Proteine aus dem Zellkulturüberstand	60
3.3.2. Isolierung von humanen anti-La-Antikörpern aus Patientenseren	60
3.3.3. Dialyse.....	61
3.3.4. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen	61
3.3.5. <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>	61
3.3.5.1. Analyse von Hybridomaüberständen	61
3.3.5.2. Untersuchung der redoxabhängigen Antikörperbindung	62
3.3.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	62
3.3.7. Coomassiefärbung von SDS-Gelen.....	63
3.3.8. Western Blotting und Immundetektion einzelner Proteine	63
3.3.9. North-Western Blot	64
3.3.10. South-Western Blot	64
3.3.11. Far-Western Blot.....	64
3.3.12. Immunpräzipitation	64
3.4. <i>Sequenzanalyse für die variablen Antikörperdomänen</i>	65
3.5. <i>Räumliche Darstellung der Proteindomänen</i>	66
4. Ergebnisse	67
4.1. <i>Untersuchung monoklonaler anti-La-Antikörper</i>	67
4.1.1. Sequenzanalyse der variablen Domänen der schweren und leichten Ketten.....	70

4.1.2. Prokaryonte Herstellung und Affinitätsreinigung des La-Antigens.....	78
4.1.3. Reaktivität der anti-La-Antikörper im Immunoblot, in der Immunpräzipitation und der Immunfluoreszenz.....	79
4.1.4. Identifizierung der von den Antikörpern erkannten Epitope.....	86
4.1.4.1. Der IgM 16C erkennt den C-terminalen Bereich des rhLa-Proteins.....	86
4.1.4.2. Eingrenzung des 5B9-Epitops auf ein lineares Peptid.....	87
4.1.4.3. Der Antikörper 7B6 erkennt ein Peptid in der C-terminalen Domäne von hLa	89
4.1.4.3.1. Post-translationale Modifikationen des hLa und mLa in der 7B6-Epitopregion	91
4.1.4.3.2. Untersuchung der DNA- und RNA-Bindung sowie Dimerisierung in der 7B6-Epitopregion	97
4.1.4.4. Einengung der Epitopregion für die Antikörper 22A und 24BG7.....	99
4.1.4.5. Epitopcharakterisierung für die Antikörper 312B, 27E, 2F9 und 32A.....	101
4.2. <i>Oxidativer Stress beeinflusst die Antigenität und Lokalisation des hLa-Proteins.....</i>	103
4.2.1. Anti-La-Antikörper können zwischen der oxidierten und reduzierten Form des Antigens unterscheiden.....	103
4.2.2. Nach Oxidation sowie oxidativem Zellstress wird das 7B6-Epitop für den Antikörper zugänglich.....	105
4.2.3. Zytoplasmatische Anreicherung des La-Proteins nach oxidativem Zellstress.....	107
4.3. <i>Untersuchung des Shuttlingverhaltens von hLa und mLa</i>	113
4.3.1. Prinzip der Heterokaryonexperimente	113
4.3.2. Etablierung der Shuttlingexperimente für GFP-hLa	114
4.3.3. Shuttlingstudien für GFP-mLa	116
4.3.4. Das NLS des hLa-Proteins vermittelt den Shuttlingprozess	117
4.3.5. Das La-Protein gelangt während des Shuttlingprozesses nicht an die Zelloberfläche	121
4.4. <i>Freisetzung des hLa-Proteins von apoptotischen Zellen und Bindung auf der Membran der Nachbarzellen.....</i>	122
4.5. <i>Entwicklung eines in vitro Bindungsassays</i>	124
4.5.1. Bindung von rhLa auf der Oberfläche verschiedener Zelllinien.....	124
4.5.2. Das rhLa-Protein bindet innerhalb der PBMCs selektiv auf Antigen-präsentierende Zellen	126
4.5.3. Die Oberflächenbindung des La-Proteins ist unter verschiedenen Bedingungen möglich	128
4.5.4. Nachweis des rhLa-Proteins auf 3T3-Zellen bis zu 24 h nach Dekoration	129
4.5.5. In Gegenwart von rhLa bindet DNA verstärkt auf der Zelloberfläche	132
4.6. <i>Pathophysiologische Folgen der La-Oberflächentranslokation für Autoimmunpatienten..</i>	133
4.6.1. Anti-La-Autoantikörper erkennen das rhLa-Protein auf der Zelloberfläche	134
4.6.2. Immunkomplexe aktivieren NK-Zellen gegen La-dekorierte Zielzellen	134
4.7. <i>Das La-Protein als universelle, induzierbare Zielstruktur für die Immuntherapie von Tumoren.....</i>	138

4.7.1. Identifizierung eines geeigneten anti-La-scFvs	139
4.7.2. Entwicklung des Diabodies CD3x7B6 scBsDb für die Immuntherapie.....	140
5. Diskussion	145
5.1. <i>Charakterisierung der monoklonalen anti-La-Antikörper</i>	145
5.1.1. Sequenzanalysen für die variablen Domänen der Antikörper.....	146
5.1.2. Unterschiedliche Antigenbindungseigenschaften der Antikörper	148
5.1.3. Epitopuntersuchungen	148
5.1.4. Besonderheiten des 7B6-Antikörpers und seiner Epitopregion	150
5.2. <i>Nukleozytoplasmatisches Shuttling des La-Proteins</i>	153
5.3. <i>Oxidativer Zellstress beeinflusst das La-Protein</i>	155
5.3.1. Die Antigenität des La-Proteins kann redoxabhängig sein	156
5.3.2. Translokation des La-Proteins unter oxidativen Bedingungen	157
5.4. <i>Bindung des rhLa-Proteins auf der Zelloberfläche - La als Alarmin?</i>	159
5.5. <i>Anti-La-Autoantikörper können ADCC-Reaktionen vermitteln</i>	161
5.6. <i>Entwicklung eines universellen bispezifischen Antikörperfragments für die kombinierte Radioimmuntherapie von Tumoren</i>	162
6. Zusammenfassung	165
7. Literaturverzeichnis.....	167
8. Anhang	177

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: B-Zelle mit Immunglobulinrezeptoren und Aufbau eines IgG-Antikörpers.	4
Abbildung 2: Aufbau einer V _H -Domäne aus V-, D- und J-Elementen.	5
Abbildung 3: Generierung rekombinanter Antikörperfragmente aus monoklonalen Antikörpern...	9
Abbildung 4: Verschiedene Strategien zur Immuntherapie von Tumorerkrankungen.	11
Abbildung 5: Schematischer Aufbau des hLa-Proteins.....	13
Abbildung 6: Räumliche Struktur der hLa-Domänen.	16
Abbildung 7: Verschiedene funktionelle Sequenzelemente im C-terminalen Bereich von hLa.....	18
Abbildung 8: Verschiedene Techniken zur Generierung der unterschiedlichen anti-La-mAks.....	67
Abbildung 9: Sequenzalignment für die La-Proteine aus Mensch (hLa) und Maus (mLa).	68
Abbildung 10: Nachweis des hLa-Transgens in einem Teil der Hybridomazellen.	69
Abbildung 11: Alignments für die Nukleinsäuresequenzen der variablen Domänen der mAks.	73
Abbildung 12: Alignments für die Aminosäuresequenzen der variablen Domänen der mAks.....	74
Abbildung 13: Gesamtzahl an Mutationen in den leichten und schweren Ketten.	77
Abbildung 14: Reinigung des prokaryont hergestellten rhLa-Proteins.	78
Abbildung 15: Reaktivität der verschiedenen mAks gegen humanes und murines La-Protein im Immunoblot.....	79
Abbildung 16: Immunpräzipitation (IP) von hLa und mLa mit den verschiedenen anti-La-mAks....	80
Abbildung 17: Immunfluoreszenzaufnahmen der mit anti-La-mAks angefärbten humanen HeLa-Zellen.	82
Abbildung 18: Färbeverhalten der monoklonalen anti-La-Antikörper bei Maus-3T3-Zellen.	83
Abbildung 19: Immunfluoreszenzfärbungen mit den IgM-Antikörpern 16C, 13C5B und 312G.....	84
Abbildung 20: Eingrenzung des 16C-Epitops auf den C-terminalen Bereich von rhLa.....	87
Abbildung 21: Eingrenzung eines linearen Peptidepitops für 5B9.	88
Abbildung 22: Eingrenzung des 7B6-Epitops auf das RRM2.....	90
Abbildung 23: Peptide zur Identifizierung des 7B6-Epitops.....	92
Abbildung 24: Punktmutanten des 7B6-Epitops fusioniert an GFP(-NLS).....	93
Abbildung 25: Immunfluoreszenz der 7B6-Epitop-Punktmutanten in HeLa-Zellen.....	95
Abbildung 26: Untersuchung der C-terminalen Domäne von La auf Bindung von 7B6, DNA und RNA sowie Dimerisierung mit rhLa.....	98
Abbildung 27: Untersuchung der Epitopregion für die mAks 22A und 24BG7.	100
Abbildung 28: Eingrenzung der Epitopregion für 2F9, 32A, 27E und 312B.....	102
Abbildung 29: Oxidationsempfindlichkeit des Epitops von 2F9, 312B, 27E und 32A.	104
Abbildung 30: Anti-La-Autoantikörper können bevorzugt die oxidierte oder reduzierte Form des Antigens binden.	105
Abbildung 31: Kernfärbungen mit 7B6 nach Oxidation oder UV-Bestrahlung von HeLa-Zellen.	106
Abbildung 32: Lokalisation des GFP-hLa vor und nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid.	108
Abbildung 33: Zytoplasmatische Lokalisation der GFP-La-Fragmente nach Oxidation.....	110
Abbildung 34: Analyse der NLS-Abspaltung von His-La-GFP und GFP-La-His durch H ₂ O ₂	112

Abbildung 35: Herstellung eines Heterokaryons und Detektion des Shuttlings von GFP-La.....	114
Abbildung 36: Shuttlingstudien für endogenes hLa und GFP-hLa.	115
Abbildung 37: Shuttling des GFP-mLa von HeLa- zu 3T3-Zellkernen und umgekehrt.	117
Abbildung 38: Schema und Western Blot der La-Fragmente, deren Shuttling untersucht wurde.	118
Abbildung 39: Shuttling der GFP-La-Fragmente von HeLa- zu 3T3-Zellkernen.....	119
Abbildung 40: Shuttlingstudien für die GFP-La-Fragmente in Gegenwart von LMB.	120
Abbildung 41: Heterokaryonexperiment für GFP-hLa in Gegenwart des mAks 5B9 im Medium.	121
Abbildung 42: Kokultur apoptotischer HeLa-Zellen mit Maus-A9-Zellen.	122
Abbildung 43: Nachweis des freigesetzten hLa-Proteins auf Maus-A9-Zellen.	123
Abbildung 44: Bindung von rhLa auf Maus-A9-Zellen.	125
Abbildung 45: Dekoration verschiedener Zelllinien mit rhLa-Protein.	126
Abbildung 46: La-Bindung auf einzelnen PBMC-Subpopulationen.....	127
Abbildung 47: Analyse der Oberflächenbindung unter verschiedenen Bedingungen.....	128
Abbildung 48: Nachweis des rhLa-Proteins auf 3T3-Zellen bis zu 24 h nach Dekoration.....	129
Abbildung 49: Stabilität des rhLa-Proteins auf 3T3-Zellen bis zu 24 h.....	130
Abbildung 50: Das rhLa-Protein vermittelt die Bindung von DIG-markierter DNA auf HEK 293T-Zellen.....	132
Abbildung 51: Aktivierung einer NK-Zelle nach Zellstress.	133
Abbildung 52: Nachweis des rhLa-Proteins auf der Zellmembran mittels Patientenserum.....	135
Abbildung 53: Aktivierung der NK-Zellen durch Immunkomplexe und ULBP2.....	136
Abbildung 54: Chromfreisetzungstest zum funktionellen Nachweis der NK-Zell-Aktivierung.	137
Abbildung 55: Kombinierte Strahlen- und Immuntherapie zur Behandlung von Tumoren.	138
Abbildung 56: Aufbau, eukaryote Produktion sowie Bindungsstudien für die anti-La-scFvs.	140
Abbildung 57: Klonierungsstrategie, Reinigung und Bindungsstudien des CD3x7B6 scBsDb.	142
Abbildung 58: T-Zell-vermittelte Zytotoxizität in Gegenwart von CD3x7B6.....	143
Abbildung 59: Die anti-La-mAks erkennen unterschiedliche Epitope innerhalb des Proteins.	149
Abbildung 60: In der Immunfluoreszenz ist das 7B6-Epitop nur unter bestimmten Bedingungen für den Antikörper zugänglich.....	151
Abbildung 61: Das hLa-NLS vermittelt den Shuttlingprozess.....	155
Abbildung 62: Zytoplasmatische Anreicherung des La-Proteins bei Sauerstoffstress.....	158
Abbildung 63: Modulares System zur TAA-abhängigen und La-vermittelten Tumorimmuntherapie.	163

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Lokalisation und Anzahl der Genabschnitte für die variablen Domänen der Antikörperketten.	5
Tabelle 2: Zusammensetzung der SDS-Gele.	62
Tabelle 3: Ermittelte V-J- bzw. V-D-J-Elemente für die leichten und schweren Ketten.	75
Tabelle 4: Analyse der Mutationsraten in den leichten Antikörperketten.	76
Tabelle 5: Anzahl der Mutationen in den variablen Bereichen der schweren Ketten.	76
Tabelle 6: Zusammenfassung der Spezifitäten der verschiedenen mAks im Immunoblot, in der Immunpräzipitation und der Immunfluoreszenz.	85
Tabelle 7: Auswahl an V_h -Genfamilien und Anzahl der zugehörigen Gene in C57BL/6-Mäusen. ...	147
Tabelle 8: Klonierungsstrategien für die in dieser Arbeit generierten Plasmide.	177

Abkürzungsverzeichnis

Alle Aminosäuren und Nukleotide wurden im Einbuchstabencode angegeben. Für die Maßeinheiten wurden die Dezimalvorsätze Piko (p, 10^{-12}), Nano (n, 10^{-9}), Mikro (μ , 10^{-6}), Milli (m, 10^{-3}), Zenti (c, 10^{-2}) und Kilo (k, 10^3) verwendet.

°C	Grad Celsius
5'TOP	5'-terminale oligo-Pyrimidinreste
⁵¹ Cr	Natriumchromat ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$)
ADCC	<i>antibody-dependent cell mediated cytotoxicity</i> , Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität
AID	<i>activation-induced cytidine deaminase</i> , aktivierungsinduzierte Cytidineaminase
AML	akute myeloische Leukämie
ANA	anti-nukleärer Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
b	Basen
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
BCR	<i>B cell receptor</i> , B-Zell-Rezeptor
BiP	<i>human immunoglobulin heavy chain-binding protein</i> , an der Proteinqualitätskontrolle im endoplasmatischen Retikulum beteiligtes Protein
BSA	Bovines Serumalbumin
C	<i>constant</i> -Genabschnitt der Immunglobulingene
CAR	chimärer Antigenrezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i> , Oberflächenantigene der Lymphozyten
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i> , komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDR	<i>complementarity determining region</i> , komplementaritätsbestimmende Region
C _H	konstante (<i>constant</i>) Domäne einer schweren (<i>heavy</i>) Antikörperkette
C _i	Curie
C _L	konstante (<i>constant</i>) Domäne einer leichten (<i>light</i>) Antikörperkette
cNLS	kryptisches (<i>cryptic</i>) nukleäres Lokalisationssignal
CP	Citrat-Phosphat
cpm	<i>counts per minute</i> , Ereignisse je Minute
Crm1	<i>chromosome region maintenance 1</i> , Kernexportrezeptor
C-terminal	carboxyterminal
CTLA-4	<i>cytotoxic T lymphocyte antigen-4</i> , negativ regulierender Rezeptor der CD28-Familie
Cy3	Indocarbocyanin
Cy5	Indodicarbocyanin
D _(h/l)	<i>diversity</i> -Genabschnitt der (schweren, <i>heavy</i> oder leichten, <i>light</i>) Immunglobulingene
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i> , Fruchtfliege

Abkürzungsverzeichnis

Da	Dalton
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i> , Zellschaden-assoziiertes molekulares Muster
DAPI	4',6-Diamidino-2'-phenylindol Dihydrochlorid
DC	<i>dendritic cell</i> , dendritische Zelle
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMF	N, N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	<i>double-stranded deoxyribonucleic acid</i> , doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	<i>double-stranded ribonucleic acid</i> , doppelsträngige Ribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> , verstärkte Chemilumineszenz
ECL-Substrat	ECL-Plus Western Blot Detektionsreaganz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> , Enzymimmunoassay
F	<i>forward</i> , vorwärts
Fab	Antigen-bindendes Fragment eines Antikörpers
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorter</i> , Durchflusszytometer
Fc	<i>fragment crystallizable</i> , kristallisierbares Fragment eines Antikörpers
FcR	Fc-Rezeptor
FCS	<i>fetal calf serum</i> , Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FWR	<i>framework region</i> , Gerüstregion
g	Gramm
GFP	grünes fluoreszierendes Protein
GTP	Guanintriphosphat
h	Stunde
hAk	humaner Antikörper bzw. anti-La-Autoantikörper
hCAP-18	<i>human cationic anti-microbial protein 18</i> , humanes kationisches anti-mikrobielles Protein 18
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin- N'-(2-ethansulfonsäure)
HF	<i>high fidelity</i> , hohe Genauigkeit
His ₆	Hexahistidinsequenz
hLa	humanes La-Protein
hLaTg	Transgen für humanes La-Protein

HMGB1	<i>high mobility group box 1</i> , ein Alarmin
HS	Humanserum
ic	<i>inner cassette</i> , innere Kasette
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
Igk	eukaryontes Sekretionssignal der leichten κ -Immunglobulinketten
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IRES	<i>internal ribosome entry site</i> , interne Ribosomenbindungsstelle
J	Joule
$J_{(h/l)}$	<i>joining</i> -Genabschnitt der (schweren, <i>heavy</i> oder leichten, <i>light</i>) Immunglobulingene
l	Liter
LaC	C-terminale Hälfte des La-Proteins
LaN	N-terminale Hälfte des La-Proteins
LARP	<i>La-related protein</i> , La-verwandtes Protein
LB	Luria Bertani
LMB	Leptomycin B
m	Meter
M	Molar
MACS	<i>magnetic-activated cell sorter</i> , magnetischer Zellseparator
mAk	monoklonaler Antikörper
MDM2	<i>murine double minute 2</i> , zelluläre Ubiquitinligase
MeOH	Methanol
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
MIC	<i>MHC class I chain-related protein</i> , MHC-ähnliches Protein
min	Minute
mLa	Maus-La-Protein
MMLV	Moloney Maus Leukämie Virus
MMLV-RT	Moloney Maus Leukämie Virus-Reverse Transkriptase
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> , US-amerikanisches Institut für Datenverarbeitung und -speicherung in der Biotechnologie
NES	nukleäres Exportsignal
Ni-NTA	<i>Nickel nitrilotriacetic acid</i> , Nickel-Nitrilotriessigsäure
NKG2D	aktivierender NK-Zell-Rezeptor der C-Typ-Lektinfamilie
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NLS	nukleäres Lokalisationssignal

NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernmagnetresonanz
NoLS	nukleoläres Lokalisationssignal
NP-40	Igepal® CA-630
nphLa	nicht phosphoryliertes humanes La-Protein
NRE	nukleäres Retentionselement
nRNP	nukleäres Ribonukleoprotein
NTA	Nitrilotriessigsäure
N-terminal	aminoterminal
NTP	Nukleosidtriphosphat
oc	<i>outer cassette</i> , äußere Kasette
OD _λ	Optische Dichte bei einer bestimmten Wellenlänge
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i> , Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i> , mononukleäre Zelle des peripheren Blutes
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Saline
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PDB	Proteindatenbank
PDCD-1	<i>programmed cell death-1</i> , negativ regulierender Rezeptor der CD28-Familie
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
phLa	phosphoryliertes humanes La-Protein
PKR	<i>protein kinase activated by RNA</i> , durch RNA aktivierte Proteinkinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Meerrettichperoxidase
PRR	<i>pattern recognition receptor</i> , Mustererkennungsrezeptor
PSCA	<i>prostate stem cell antigen</i> , Prostata-Stammzellantigen
PSGL-1	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R	<i>reverse</i> , rückwärts
RAGE	<i>receptor for advanced glycation end products</i> , ein Alarminrezeptor
rhLa	rekombinantes humanes La-Protein
rmLa	rekombinantes murines La-Protein
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen je Minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute-Medium</i>
RRM	<i>RNA recognition motif</i> , RNA-Erkennungsmotiv
rRNA	<i>ribosomal ribonucleic acid</i> , ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	<i>Svedberg</i>

s	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Bäckerhefe
<i>S. pombe</i>	<i>Saccharomyces pombe</i> , Spaltheefe
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i> , alkalische Shrimp-Phosphatase
SBM	<i>short basic motif</i> , kurzes basisches Motiv
scBsDb	<i>single-chain bispecific diabody</i> , spezielles Format eines bispezifischen Einzelkettenantikörpers
scBsTaFv	<i>single-chain bispecific tandem fragment variable</i> , spezielles Format eines bispezifischen Einzelkettenantikörpers
scFv	<i>single-chain fragment variable</i> , rekombinanter Einzelkettenantikörper
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
Slp1p	Hefe-La-Protein aus <i>Saccharomyces pombe</i>
slan	6-Sulfo-N-Acetyllactosamin (6-Sulfo-LacNAc)
SLE	systemischer Lupus erythematoses
Sm	Smith-Antigen
snRNA	<i>small nuclear ribonucleic acid</i> , kleine nukleäre Ribonukleinsäure
SS-A	Sjögren-Syndrom-Antigen A (Ro 60)
SS-B	Sjögren-Syndrom-Antigen B (La)
ssDNA	<i>single-stranded deoxyribonucleic acid</i> , einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
STAT1	<i>signal transducer and activator of transcription 1</i> , Transkriptionsfaktor
STET	Saccharose-Triton X-100-EDTA-Tris
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i> , kleine Ubiquitin-ähnliche Modifikation
<i>T. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TAE	<i>Tris-acetic acid-EDTA</i> , Tris-Essigsäure-EDTA
TBS-T	<i>Tris-buffered saline-Tween®20</i> , Tris-gepufferte Saline mit Tween®20
TCR	<i>T cell receptor</i> , T-Zell-Rezeptor
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFB	<i>transformation buffer</i> , Transformationspuffer
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i> , transformierender Wachstumsfaktor- β
TLR	<i>Toll-like receptor</i> , Toll-ähnlicher Rezeptor
T _m	Schmelztemperatur
TMB	3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i> , TNF-ähnlicher Apoptose-induzierender Ligand
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNAs	<i>transport ribonucleic acid</i> , Transport-Ribonukleinsäure
U	Unit
ULBP2	<i>UL16-binding protein 2</i> , UL16-bindendes Protein 2; UL16 ist ein Glykoprotein des humanen Zytomegalie-Virus
UTP	Uridintriphosphat

Abkürzungsverzeichnis

UV	ultraviolett
V	Volt
$V_{(h/l)}$	<i>variable</i> -Genabschnitt der (schweren, <i>heavy</i> oder leichten, <i>light</i>) Immunglobulingene
v/v	<i>volume/volume</i> , Volumenprozent
V_H	variable Domäne einer schweren (<i>heavy</i>) Antikörperkette
V_L	variable Domäne einer leichten (<i>light</i>) Antikörperkette
w/v	<i>weight/volume</i> , Gewichtsprozent
WAM	Walker A-Motiv
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis</i> , X-gekoppelter Apoptoseinhibitor

1. Einleitung

1.1. Das Immunsystem des Menschen

Durch das Immunsystem wird der menschliche Organismus vor schädlichen Angriffen von außen geschützt, d. h. vor Infektionen mit Viren, Bakterien, Pilzen, Protozoen oder Parasiten. Hingegen müssen Reaktionen gegen harmlose Stoffe aus der Umwelt, wie z. B. Pollen, unterdrückt werden. Des Weiteren werden geschädigte oder entartete Zellen des eigenen Körpers erkannt und eliminiert. Gleichzeitig dürfen gesunde Körperzellen bzw. Gewebe keinen Schaden nehmen. Dazu werden körpereigene von fremden sowie gefährliche von ungefährlichen Strukturen unterschieden [1]. Hierbei sind eine Vielzahl an Immunzellen und löslichen Faktoren beteiligt, die in einem angeborenen und einem adaptiven Immunsystem organisiert sind. Das angeborene Immunsystem ist durch stereotype Reaktionen gegen Pathogene sehr schnell einsatzfähig. In der Zwischenzeit passt sich das adaptive Immunsystem an die Qualität der Erreger an. Es entfaltet seine volle Aktivität zeitverzögert, reagiert dafür aber hochspezifisch und bildet ein immunologisches Gedächtnis aus.

Zu den Mediatoren des angeborenen Immunsystems zählt das Komplementsystem, das nach Ablauf einer Enzymkaskade zur Markierung (Opsonisierung) und schließlich Lyse des Pathogens führt. Hinzu kommen antimikrobielle Substanzen und Zytokine, wie Interferone (IFN) oder Interleukine (IL), die der Kommunikation, Anlockung und Aktivierung von Immunzellen dienen. Zum zellulären Sektor gehören Phagozyten (neutrophile Granulozyten, Gewebsmakrophagen), die Pathogene aufnehmen und durch intrazellulär produzierte reaktive Sauerstoffmetaboliten abtöten. Dendritische Zellen (*dendritic cells*, DCs) phagozytieren ebenfalls Antigene, aber ihre Hauptaufgabe besteht in der Induktion einer adaptiven Immunantwort, indem sie im Lymphknoten Antigen-spezifische T-Lymphozyten aktivieren. Weiterhin sind die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) zu nennen. Sie erkennen Veränderungen der Oberflächenmoleküle auf z. B. virusinfizierten Körperzellen oder Tumorzellen und können in diesen Zellen den programmierten Zelltod (Apoptose) veranlassen.

Die Einleitung einer spezifischen, adaptiven Immunantwort wird durch sogenannte Antigen-präsentierende Zellen (v. a. DCs, aber auch Makrophagen und B-Zellen) vermittelt. Sie nehmen das körperfremde Material auf, prozessieren es und präsentieren es auf ihrer Oberfläche. Die exponierten Peptide werden von CD4⁺ T-Lymphozyten mit den dazu passenden, hochspezifischen T-Zell-Rezeptoren (*T cell receptors*, TCRs) erkannt. Für die Antigen-spezifische Aktivierung der T-Zellen sind zusätzliche kostimulatorische Moleküle auf den DCs nötig, die durch virale oder bakterielle Faktoren induziert werden, um die von den Pathogenen ausgehende Gefahr zu vermitteln. Durch weitere Stimuli (Zytokine oder Oberflächenmoleküle) ermöglichen DCs die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen zu unterschiedlichen Effektorzellpopulationen: (i) Inflammatorische T-Helferzellen 1 aktivieren über IL-2, IFN- γ und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) Makrophagen, NK-Zellen sowie CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten. Deren Aufgabe besteht in der Bekämpfung intrazellulär wachsender Mikroben, indem die infizierten Zellen eliminiert

werden. (ii) T-Helferzellen 2 regen die B-Lymphozyten über IL-4 und IL-5 zur Proliferation und Produktion von Antigen-spezifischen Antikörpern an. Dieser als humorale Immunantwort bezeichnete Vorgang richtet sich vor allem gegen extrazelluläre Erreger. Dabei müssen sowohl B-Zellen als auch CD4⁺ T-Helferzellen die zum Antigen passenden Oberflächenrezeptoren besitzen. (iii) Regulatorische CD4⁺ T-Zellen erkennen überwiegend Autoantigene und können über IL-10 und *transforming growth factor-β* (TGF-β) T-Helferzellen und CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten hemmen.

Die Gene der B-Zell-Rezeptoren (*B cell receptors*, BCRs) bzw. TCRs werden durch zufällige Kombination verschiedener Genabschnitte erzeugt, um eine möglichst hohe Rezeptorvielfalt hervorzubringen. Nach diesen Rekombinationsereignissen werden die Zellen aus dem Organismus eliminiert, welche gegen körpereigene Strukturen gerichtet sind. Dieser Vorgang wird als Toleranzinduktion bezeichnet. Trotz verschiedener Kontrollmechanismen kommt es immer wieder zu Erkrankungen, die mit dem Immunsystem in Zusammenhang stehen. Bei Überempfindlichkeitsreaktionen wie Allergien werden Antikörper gegen eigentlich ungefährliche Stoffe (z. B. Pollen oder Tierhaare) produziert und bei erneutem Kontakt mit dem Allergen kommt es zur Überreaktion des Immunsystems. Im Falle von Autoimmunerkrankungen werden entweder Antikörper gegen körpereigene Strukturen gebildet (z. B. Sjögren-Syndrom oder systemischer Lupus erythematodes, SLE) oder Immunzellen aktiviert, die zur Zerstörung ganzer Organe führen können (z. B. Diabetes mellitus Typ I).

Der Flexibilität und Rezeptorvielfalt der Immunzellen wirken die hohen Mutationsraten der Pathogene, z. B. Influenzaviren, entgegen, die ständig ihre antigenen Strukturen verändern, um sich der Immunabwehr zu entziehen. Ähnlich verhält es sich bei Tumorerkrankungen. Normalerweise erkennen die Immunzellen durch Mutationen veränderte Körperzellen, da sich das Muster an präsentierten Peptiden auf der Zelloberfläche ändert bzw. durch die Mutation hervorgerufene neue Sequenzen als fremd erkannt werden. Dennoch sind Tumorerkrankungen die zweithäufigste Todesursache beim Menschen, weil es maligne transformierten Zellen immer wieder gelingt, die Kontrollmechanismen des Immunsystems zu unterlaufen.

1.1.1. Ausgereifte dendritische Zellen induzieren die spezifische Immunantwort

DCs nehmen eine Schlüsselrolle bei der Induktion und Kontrolle einer spezifischen Immunantwort ein. Naive DCs zirkulieren im Blut und werden von Chemokinen dazu veranlasst, ins Gewebe auszuwandern. Dort werden Antigene, die von Pathogenen, Tumorzellen und apoptotischen oder nekrotischen Zellen stammen können, durch Phagozytose aufgenommen. Sind die Antigene bereits durch Kollektine, Pentraxine oder Antikörper opsonisiert, so wird die Aufnahme durch die Kollektin-, Pentraxin- bzw. Fc-Rezeptoren (FcR) der DCs erleichtert.

Um Pathogene von körpereigenen Strukturen zu unterscheiden, besitzen DCs sogenannte *pattern recognition receptors* (PRRs). Sie binden konservierte Molekülstrukturen der Pathogene (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), die in den eigenen Körperzellen nicht vorkommen. Abhängig davon, ob es sich um eine intrazelluläre oder extrazelluläre Infektion handelt, wird durch die jeweiligen Rezeptoren die erforderliche adaptive Immunantwort eingeleitet [2]. Zu den PRRs gehören die *Toll-like*-Rezeptoren (TLRs), von denen es beim

Menschen mindestens zehn verschiedene gibt [3]. So erkennen beispielsweise TLR4 das Lipopolysaccharid Gram-negativer Bakterien und TLR3 virale doppelsträngige Ribonukleinsäuren (dsRNA). Die PRRs lösen die Präsentation von B7-Molekülen auf DCs aus, die für die Aktivierung naiver T-Lymphozyten über das CD28-Molekül benötigt werden. Ohne dieses zweite kostimulatorische Signal werden naive T-Zellen in die Apoptose oder Anergie überführt, wodurch Reaktionen gegen Autoantigene vermieden werden. Auf dem Weg zum Lymphknoten reifen die immaturren DCs zu professionellen Antigen-präsentierenden Zellen aus. Dort sezernieren sie Chemokine und Zytokine, um andere Immunzellen anzulocken und zu stimulieren [4].

Die aufgenommenen Antigene werden in den Endosomen der DCs proteolytisch gespalten und die resultierenden Peptide auf *major histocompatibility complex*- (MHC-) Klasse II-Molekülen den CD4⁺ T-Zellen präsentiert. Intrazelluläre Antigene, wie z. B. virale Proteine, werden im Proteasom zu Peptiden abgebaut, in das endoplasmatische Retikulum transportiert und dort von MHC-Klasse I-Molekülen gebunden. Diese Komplexe werden auf die Zelloberfläche transportiert, um zytotoxische CD8⁺ T-Zellen zu aktivieren [5]. Zusätzlich ist es durch die sogenannte Kreuzpräsentation möglich, den CD4⁺ T-Zellen intrazelluläre Antigenpeptide auf MHC-Klasse II-Molekülen darzubieten bzw. von außen aufgenommene Antigene den CD8⁺ T-Zellen auf MHC-Klasse I-Molekülen zu präsentieren. Entscheidend ist stets, dass die T-Lymphozyten einen TCR auf ihrer Oberfläche tragen, der das präsentierte Peptid spezifisch bindet. Über die CD4- bzw. CD8-Korezeptoren der T-Zellen werden die MHC-Klasse II- bzw. MHC-Klasse I-Moleküle auf den DCs unterschieden.

Im peripheren Blut gibt es verschiedene DC-Subpopulationen, die sich durch charakteristische Oberflächenmoleküle voneinander abgrenzen lassen und in myeloide sowie plasmazytoide DCs eingeteilt werden. Die stark proinflammatorischen slanDCs stellen im Blut die größte Gruppe der myeloiden DCs dar und sind in der Lage, NK-Zell- sowie T-Zellantworten zu stimulieren. Sie können von anderen DCs über eine 6-Sulfo-N-Acetyllactosamin- (6-Sulfo-LacNAc-, slan-) Modifikation des membranständigen P-Selektin-Glykoprotein-Liganden-1 (PSGL-1) unterschieden werden [6-9].

1.1.2. B-Lymphozyten und Antikörper

Die Antigenrezeptoren der B-Lymphozyten, die BCRs, sind membranständige Immunglobuline (Ig, siehe Abbildung 1A). Terminal differenzierte B-Lymphozyten, sogenannte Plasmazellen, sezernieren die Immunglobulinmoleküle als lösliche, glykosylierte Antikörper ins Blut. Diese Effektorproteine der humoralen adaptiven Immunantwort bestehen aus je zwei identischen schweren (*heavy*, H) und leichten (*light*, L) Ketten, welche über Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden sind (siehe Abbildung 1B). Die variablen Ig-Domänen der leichten (V_L) und schweren (V_H) Ketten vermitteln gemeinsam die Bindung an das Antigen. Die schweren Ketten bestimmen über ihre konstanten (*constant*, C_H) Ig-Domänen die Antikörperklasse (Isotyp) und damit dessen Effektorfunktionen. Durch die proteolytische Aktivität von Papain entstehen aus einem Immunglobulinmolekül zwei Antigen-bindende Fragmente (Fabs) und ein kristallisierbares Fragment (*fragment crystallizable*, Fc).

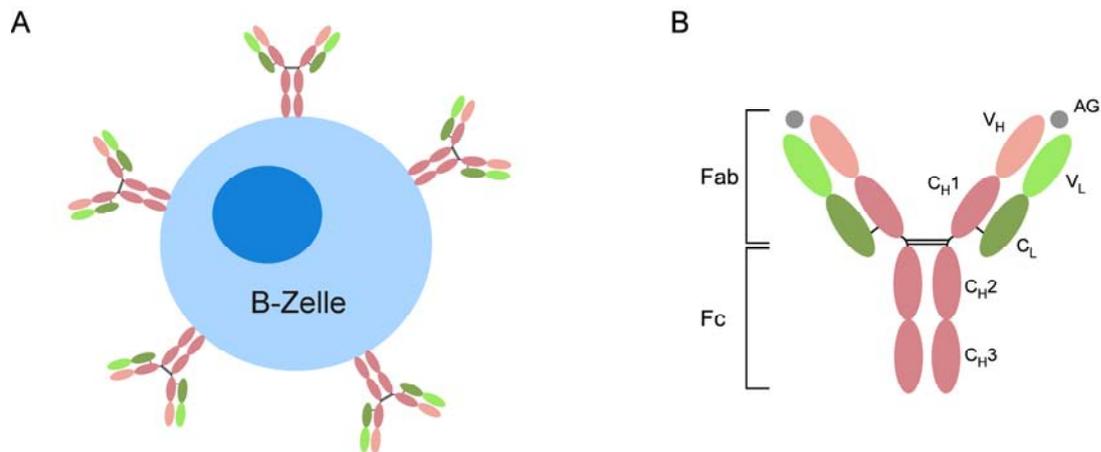


Abbildung 1: B-Zelle mit Immunglobulinrezeptoren und Aufbau eines IgG-Antikörpers.

A) B-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche membrangebundene Immunglobuline. Nach Aktivierung der B-Zellen werden diese als lösliche Moleküle sezerniert. **B)** Die schweren Antikörperketten bestehen aus einer variablen (V_H) und drei konstanten (C_H) Domänen. Die leichten Ketten sind aus je einer variablen (V_L) und einer konstanten (C_L) Domäne aufgebaut. Disulfidbrücken verbinden die Ketten des Immunglobulins miteinander. Die Antigen- (AG-) Erkennung erfolgt über die variablen Bereiche der schweren und leichten Ketten. Ein IgG-Molekül besitzt zwei identische AG-Bindungsstellen. Immunglobuline können durch Papain in zwei AG-bindende Fragmente (Fab) und ein kristallisierbares Fragment (Fc) gespalten werden.

Es gibt im Wesentlichen fünf verschiedene Antikörperklassen: IgM, IgD, IgG, IgA und IgE. Naive B-Zellen tragen sowohl IgM- als auch IgD-Immunglobuline auf ihrer Membran. Die frühen sezernierten Antikörper sind überwiegend vom IgM-Isotyp. Nach der B-Zell-Aktivierung erfolgt ein sogenannter Klassenwechsel, der die Produktion von IgG, IgA oder IgE ermöglicht. Lösliche IgM-Antikörper sind über eine zusätzliche Kette zu einem Pentamer verknüpft; IgA-Moleküle können als Dimere vorkommen [1]. Antikörper können z. B. an Oberflächenstrukturen extrazellulärer Pathogene binden und sie dadurch für die Immunzellen markieren. Für jeden Isotyp gibt es auf Lymphozyten passende FcR, die die C_H-Anteile der Antikörper binden und daraufhin immunologische Effektorreaktionen auslösen. Phagozyten nehmen über ihre Fcγ-Rezeptoren die mit IgG-Antikörpern opsonisierten Pathogene auf und bauen sie im Zellinneren ab. Natürliche Killerzellen können über FcγRIII (CD16) mit IgG-Antikörpern bedeckte Körperzellen erkennen und durch Apoptoseinduktion eliminieren. Dieser Mechanismus wird als Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (*antibody-dependent cell mediated cytotoxicity*, ADCC) bezeichnet. Dadurch werden z. B. virusinfizierte Zellen vernichtet, auf deren Oberfläche die Antikörper an Virus-spezifische Antigene gebunden haben.

Jede einzelne Ig-Domäne besteht aus zwei β-Faltblättern, die durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind und eine zylinderförmige Struktur bilden. In den N-terminalen variablen Domänen treten zwischen den einzelnen β-Strängen, die die weniger variablen Gerüstregionen (*framework regions*, FWRs) darstellen, drei hypervariable Sequenzen auf. Im gefalteten Molekül liegen die hypervariablen Bereiche räumlich dicht nebeneinander und sind für die Antigenbindung zuständig. Sie werden als komplementaritätsbestimmende Regionen (*complementarity determining regions*, CDRs) bezeichnet. Jeder Antikörper weist individuelle CDR-Sequenzen in den variablen Domänen auf.

Die Entwicklung der B-Lymphozyten beginnt im Knochenmark. In unreifen B-Zellen liegen die Keimbahngene für die schweren Antikörperketten in vier separaten Genabschnitten im H-Locus vor: die V- (*variable*), D- (*diversity*) und J- (*joining*) Genabschnitte codieren gemeinsam die variable Region und die C- (*constant*) Abschnitte bestimmen den konstanten Anteil der schweren Kette. Während der Reifung wird ein D-Genabschnitt mit einem J-Genabschnitt verknüpft und die dazwischen liegenden Desoxyribonukleinsäure- (DNA-) Abschnitte werden ausgeschnitten. Anschließend wird ein V-Genabschnitt mit dem D-J-Element fusioniert und nun kann eine V-D-J- C_{μ} -Boten-RNA (*messenger RNA*, mRNA) transkribiert werden, das für die schwere Kette eines membranständigen IgM-Antikörpers codiert. Dieser Prozess wird als somatische Rekombination bezeichnet. Während des Zusammenfügens der DNA-Abschnitte kann eine unterschiedliche Zahl an Nukleotiden zwischen den Schnittstellen eingefügt werden oder auch verloren gehen. Diese Modifikationen tragen zur Variabilität in der CDR3-Region des Antikörpers bei. Der lineare Aufbau einer rekombinierten V_H -Domäne mit ihren FWR- und CDR-Regionen ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

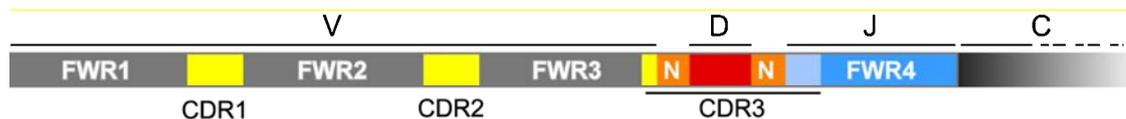


Abbildung 2: Aufbau einer V_H -Domäne aus V-, D- und J-Elementen.

Nach der V-D-J-Rekombination entsteht eine V_H -Domäne, die sich aus vier wenig variablen FWR-Regionen sowie drei hochvariablen CDR-Regionen zusammensetzt. Während des Zusammenfügens der V-, D- und J-Genabschnitte können zusätzliche Nukleotide (N) eingefügt werden. Die ersten beiden CDR-Regionen werden vom V-Genabschnitt codiert, die CDR3-Region entsteht durch V-D-J-Rekombination [10].

Die leichten Ketten werden im κ - bzw. im λ -Locus codiert. Ähnlich wie bei den schweren Ketten werden die V-Gene mit J-Genen kombiniert, allerdings gibt es keine D-Elemente. Jede B-Zelle exprimiert nur jeweils ein Gen für die schweren und leichten Ketten. Führen die ersten somatischen Rekombinationen im κ -Locus und im H-Locus zu nicht funktionellen Genen, so werden die Genabschnitte auf dem jeweils zweiten Chromosom miteinander rekombiniert. Wenn danach noch immer keine funktionelle leichte Kette entsteht, kann die V-J-Rekombination im λ -Locus erfolgen, die dort bisher unterdrückt wurde.

Die Anzahl vorhandener V-, D- und J-Gene, die für jede Antikörperkette beliebig miteinander rekombiniert werden können, ist für Mensch und Maus in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Lokalisation und Anzahl der Genabschnitte für die variablen Domänen der Antikörperketten.

Die Genabschnitte für die variablen Domänen der schweren (H-Locus) und leichten (κ - bzw. λ -Locus) Ketten sind auf getrennten Chromosomen zu finden. Für Mensch und Maus (Stamm BALB/c) ist außer dem Genort (Chr.) die Anzahl an funktionellen V-, D- und J-Elementen angegeben, die für jede Kette zur Verfügung stehen [10].

	H-Locus			κ -Locus			λ -Locus			
	Chr.	V	D	J	Chr.	V	J	Chr.	V	J
Mensch	14	37	27	6	2p11.2	35	5	22q11.2	35	4
Maus	12	>100	13	4	6	96	5	16	3	3

Durch somatische Rekombination können auch BCRs entstehen, die gegen körpereigene Strukturen gerichtet sind. Deshalb durchlaufen die immunkompetenten, noch nicht durch Antigen aktivierten (naiven) B-Lymphozyten einen negativen Selektionsprozess. Wenn sie über ihren BCR Autoantigene erkennen, werden sie sofort im Knochenmark eliminiert (zentrale Toleranzinduktion). Die verbleibenden B-Zellen wandern in die Lymphknoten. Im Primärfollikel präsentieren die folliculären DCs den B-Zellen Antigene. Gleichzeitig treffen im Paracortex des Lymphknotens ausgereifte DCs und CD4⁺ T-Lymphozyten zusammen. Die Antigen-spezifischen T-Lymphozyten werden von DCs über B7-CD28-Wechselwirkung aktiviert. Daraufhin können sie naiven B-Zellen, die dasselbe Antigen erkennen, das benötigte kostimulatorische Aktivierungssignal über die Wechselwirkung zwischen CD40-Ligand und CD40-Rezeptor zur Verfügung stellen.

Daraufhin beginnen die B-Zellen zu proliferieren, es kommt zum Klassenwechsel und zur Affinitätsreifung. In beide Prozesse ist das Enzym *activation-induced cytidine deaminase* (AID) involviert. Für den Klassenwechsel wird der V-D-J-Genabschnitt der schweren Ketten mit einem weiteren C-Genabschnitt rekombiniert, der flussabwärts des C_μ-Genabschnitts liegt. Bei der Affinitätsreifung handelt es sich um somatische Hypermutationen in den Genen der variablen Domänen, wodurch die Affinität des Antikörpers verbessert oder verschlechtert werden kann. Nur die B-Zellen erhalten weitere Proliferationssignale, die hochaffine Antikörper produzieren. Außer den Plasmazellen, welche für die Antikörperproduktion sorgen, entstehen Gedächtnis-B-Zellen, die sich bei erneuter Antigenexposition sofort vermehren und zu Plasmazellen differenzieren [11].

Die Eliminierung autoreaktiver B-Lymphozyten ist nicht so vollständig wie die Toleranzinduktion, die für autoreaktive T-Lymphozyten stattfindet. Darüber hinaus kann sich die Rezeptorspezifität durch die Hypermutationen nachträglich verändern. Im Serum gesunder Individuen sind durchaus IgM-Autoantikörper nachweisbar, die aber ungefährlich sind. Da IgM-Antikörper leicht mit Fremdanthigenen kreuzreagieren können, besitzen sie sogar einen protektiven Effekt gegen Infektionen mit neuen Pathogenen, gegen deren Antigenstrukturen bisher keine spezifische Immunabwehr aufgebaut wurde.

Der Mensch kann theoretisch bis zu 10¹¹ unterschiedliche Antikörpermoleküle hervorbringen [1]. Diese große Antikörpervielfalt wird durch zufällige Rekombination bestimmter Genabschnitte, die Kombination verschiedener schwerer und leichter Ketten miteinander sowie die Einführung somatischer Punktmutationen in den rekombinierten DNA-Bereichen erreicht.

1.1.3. Zytotoxische Effektorzellen und Apoptose

Eine der Hauptaufgaben des Immunsystems ist die Erkennung und Beseitigung infizierter oder maligne transformierter Zellen, um die Vermehrung intrazellulärer Pathogene bzw. die Entwicklung von Tumorerkrankungen zu verhindern. Dies wird vor allem durch NK-Zellen und $CD8^+$ zytotoxische T-Lymphozyten vermittelt.

NK-Zellen gehören dem angeborenen Immunsystem an und tragen eine Reihe von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Diese erkennen MHC-Klasse I-Moleküle und MHC-Klasse I-ähnliche Moleküle bzw. deren Veränderungen auf der Membran aller Körperzellen. Verringert sich z. B. die Anzahl an MHC-Klasse I-Molekülen auf der Oberfläche einer Virus-infizierten Zelle, so wird das von den NK-Zellen registriert und sie führen die infizierten Zellen in die Apoptose. Des Weiteren werden NK-Zellen über den Rezeptor NKG2D aktiviert, wenn Stress-induzierte Liganden wie z. B. *MHC class I chain-related protein A* (MICA) und MICB oder *UL16-binding protein 2* (ULBP2) auf den Körperzellen vorkommen [12]. Zusätzlich können Antikörper-dekorierte Zielzellen vom $Fc\gamma RIII$ (CD16) der NK-Zellen gebunden werden und eine ADCC-Reaktion auslösen.

Die $CD8^+$ T-Lymphozyten gehören dem adaptiven Immunsystem an. Ihr TCR, der Peptide auf MHC-Klasse I-Molekülen erkennt, ist ein Heterodimer aus einer α - und einer β -Kette (5% der T-Zellen besitzen γ - und δ -Ketten), die beide durch somatische Rekombination von V-, (D-) und J-Genabschnitten entstehen. Somit trägt jede T-Zelle nur TCRs einer Bindungsspezifität auf ihrer Oberfläche. Die Signaltransduktion zur Aktivierung der Effektorfunktionen erfolgt (wie auch bei den $CD4^+$ T-Zellen) über den assoziierten CD3-Korezeptorkomplex.

Die aktivierten NK-Zellen und $CD8^+$ T-Zellen induzieren in den Zielzellen Apoptose. Im Gegensatz zur Nekrose, bei der alles Material aus der sterbenden Zelle unkontrolliert freigesetzt wird und in der Umgebung zu einer Entzündung führt, laufen die apoptotischen Vorgänge kontrolliert ab. Zuerst löst sich der Zellkern (Nukleus) auf, dann sind eine Veränderung der Zellmorphologie und der Abbau der DNA zu beobachten. An der Zellmembran bilden sich Ausstülpungen (*apoptotic blebs*), in welche der Zellinhalt verpackt wird. Schließlich löst sich die Zelle durch Abschnürung von Vesikeln (*apoptotic bodies*) auf. Diese werden von Makrophagen aufgenommen und abgebaut. Dadurch gelangt kein intrazelluläres Material in die Umgebung und Entzündungen sowie die Schädigung benachbarter Zellen werden vermieden [13].

Zytotoxische Zellen speichern im Zytoplasma sogenannte lytische Granula, die nach Kontakt mit der Zielzelle ihren Inhalt durch Exozytose freisetzen. Das in den Granula enthaltene Perforin sorgt dafür, dass die ebenfalls abgegebenen Granzyme in das Zytosol der Zielzellen gelangen können [14]. Granzyme sind Proteasen, die in der Zelle durch Aktivierung von Nukleasen den DNA-Abbau einleiten. Eine weitere Möglichkeit der Apoptoseinduktion ist die Wechselwirkung des Fas-Liganden, der auf $CD8^+$ T-Zellen und NK-Zellen vorkommt, mit den Fas-Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen. Daraufhin wird in der Zielzelle eine Proteasekaskade ausgelöst, welche aus mehreren sogenannten Caspasen besteht und wiederum Nukleasen aktiviert, welche die DNA fragmentieren. Ein zusätzliches Molekülpaar, das wie Fas-Ligand und Fas ebenfalls der TNF/TNF-Rezeptorfamilie angehört, sind TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) und der TRAIL-

Rezeptor [12]. Darüber hinaus setzen die zytotoxischen Lymphozyten IFN- γ und TNF- α frei, die Makrophagen anlocken und aktivieren, die virale Replikation inhibieren und die MHC-Klasse I-Genexpression erhöhen.

Die beschriebenen Prozesse werden als extrinsischer Apoptoseweg bezeichnet. Alternativ gibt es den intrinsischen Weg, bei dem Cytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt wird, das über verschiedene Zwischenschritte ebenfalls zur Aktivierung der Caspasekaskade führt. Der programmierte Zelltod wird auch bei Zellen eingeleitet, die z. B. durch ultraviolette (UV-) Strahlung stark beschädigt wurden. Die Signalkaskaden werden dann sowohl von quervernetzten Oberflächenrezeptoren induziert als auch über den mitochondrialen Weg, der durch einen Überschuss an reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) in den Zellen ausgelöst wird [15].

1.2. Monoklonale Antikörper und rekombinante Antikörperfragmente

Die Verwendung von Antikörpern einer einzigen Spezifität hat für die Forschung, Diagnostik und Therapie große Bedeutung erlangt. Für deren Herstellung muss zuerst z. B. eine Maus wiederholt mit dem Antigen immunisiert werden, gegen das die Antikörper gerichtet sein sollen. Dann werden die B-Zellen aus der Milz der Maus isoliert und mit Myelomzellen fusioniert [16]. So entstehen Hybridomazellen, die sich wie Myelomzellen uneingeschränkt teilen können und wie B-Zellen Antikörper sezernieren. Durch wiederholtes Vereinzeln der Hybridomazellen werden Klone erhalten, die auf je eine einzelne B-Zelle zurückgeführt werden können. Deren Zellkulturüberstand enthält die sezernierten, sogenannten monoklonalen Antikörper (mAk) und kann entweder direkt für *in vitro* Experimente verwendet werden oder die Antikörper werden aus dem Medium mittels Protein A- oder -G-Sepharose gereinigt.

Für die Therapie werden oft chimere Antikörper erzeugt, d. h. die konstanten Domänen der murinen mAks werden durch die humanen Antikörper (hAk) ersetzt, um Immunreaktionen gegen die als fremd erkannten Mausantikörper zu vermeiden. Bei humanisierten Antikörpern werden nur die CDR-Regionen des murinen mAks auf einen hAk übertragen [17]. Antikörper vom IgG-Isotyp weisen aufgrund ihres Molekulargewichts von etwa 150 kDa eine relativ lange Serumhalbwertszeit auf und sind somit für die Tumorthherapie nur eingeschränkt nutzbar, da die Penetration in das Tumorgewebe erschwert ist. Deshalb wurden mit Hilfe gentechnischer Methoden sogenannte *single-chain fragment variable-* (scFv-) Derivate entwickelt [18], die nur die V_H- und V_L-Domänen des parentalen Antikörpers enthalten. Die beiden Domänen werden durch ein Polypeptid, das als Linker bezeichnet wird, miteinander verbunden. Der Linker besteht in der Regel aus repetitiven Glycin-Serin-Einheiten (G₄S), die flexibel genug sind, um eine korrekte Anordnung der variablen Domänen zu einem funktionellen scFv-Molekül zu erlauben. Darüber hinaus wird durch den Linker die Löslichkeit des Antikörperfragments erhöht.

Eine Weiterentwicklung der scFv-Moleküle stellen bispezifische Antikörperderivate dar. Für die Herstellung eines sogenannten Diabodies werden zwei scFvs, die von zwei unterschiedlichen mAks abstammen, miteinander kombiniert (Abbildung 3A). Abhängig von der Anordnung der variablen Domänen im Diabody-Molekül spricht man von einem *single-chain bispecific diabody* (scBsDb) oder einem *single-chain bispecific tandem fragment variable* (scBsTaFv) [19]. Die scBsDb-

Moleküle umfassen die variablen Domänen der ursprünglichen mAKs A und B in der Reihenfolge $V_{H A}-V_{L B}-V_{H B}-V_{L A}$. Stattdessen sind die scBsTaFv-Proteine durch die Domänenreihenfolge $V_{H A}-V_{L A}-V_{H B}-V_{L B}$ charakterisiert (Abbildung 3B). Diabodies werden v. a. in der Tumorthherapie eingesetzt, da sie immunologische Effektorzellen auf Tumorzellen immobilisieren können (Kapitel 1.3).

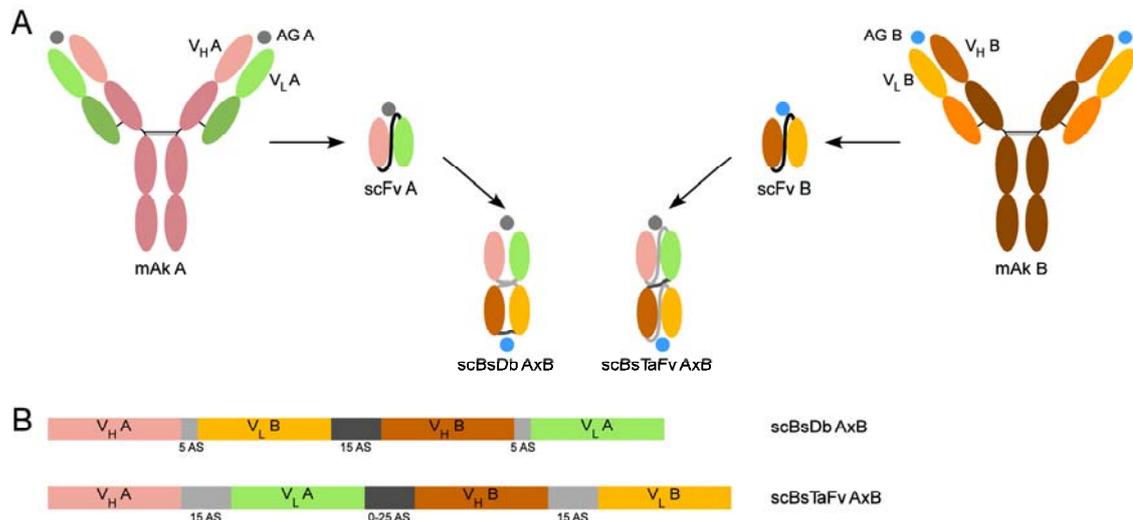


Abbildung 3: Generierung rekombinanter Antikörperfragmente aus monoklonalen Antikörpern.

A) Von den mAKs A und B, die die unterschiedlichen Antigene (AG) A und B erkennen, werden die variablen Domänen der schweren und leichten Ketten jeweils miteinander fusioniert, um die beiden Einzelkettenantikörper scFv A und scFv B zu erhalten. Diese können nun auf unterschiedliche Weise miteinander zu Diabodies kombiniert werden, die in der Lage sind, beide Antigene zu binden. **B)** Für das scBsDb-Format wird der scFv B mit der Domänenreihenfolge $V_{L B}-V_{H B}$ in den Linker zwischen $V_{H A}$ und $V_{L A}$ kloniert. Im Tandemformat (scBsTaFv) sind die beiden scFv-Moleküle über einen Linker mit variabler Länge direkt hintereinander fusioniert. Die Längen der Linker (hellgraue und dunkelgraue Bereiche) sind als Anzahl der enthaltenen Aminosäuren (AS) angegeben.

1.3. Tumormimmunologie

Krebserkrankungen zeichnen sich durch progressives Wachstum der Nachkommen einer einzigen transformierten Zelle aus. Zur Behandlung müssen möglichst alle Tumorzellen aus dem Körper eliminiert werden. Zusätzlich zu den konventionellen Methoden der chirurgischen Entfernung solider Tumore, der Strahlen- sowie Chemotherapie gibt es eine Vielzahl von Ansätzen, die versuchen, das Immunsystem für die Eliminierung von Tumorzellen umzuprogrammieren.

Für bestimmte Tumorarten konnten Proteine identifiziert werden, die selektiv in bzw. auf diesen Zellen vorkommen und deren Gene in anderen Körperzellen nicht oder kaum exprimiert werden. Die als Tumor-assoziierte Antigene (TAAs) bezeichneten Moleküle stellen ideale Zielstrukturen für die Immuntherapie dar. Es handelt sich entweder um Membranproteine, die für das Immunsystem frei zugänglich sind oder um intrazelluläre Proteine, deren Peptide auf den MHC-Klasse I-Molekülen der Tumorzellen präsentiert werden. So findet man beispielsweise auf Prostatakarzinomzellen das *prostate stem cell antigen* (PSCA), auf Mammakarzinomzellen den Wachstumsfaktor-Rezeptor Her2/neu oder auf Blasten der akuten myeloischen Leukämie (AML) den Oberflächenmarker CD33 [20-22]. Da es sich um körpereigene Proteine handelt, besteht

immunologische Toleranz gegenüber diesen Strukturen, die durch die Immuntherapie durchbrochen oder umgangen werden muss.

Eine Möglichkeit, um Immunreaktionen gegen TAAs zu induzieren, ist die Stimulation von DCs. Man geht davon aus, dass die Verabreichung von TAAs (in Form von DNA, RNA, Protein, Peptid oder als Tumorzelllysat) zur Aufnahme und Präsentation von TAA-Peptiden durch DCs führt, die daraufhin T-Zellen mit passendem TCR aktivieren [23]. Die aktivierten CD8⁺ T-Zellen können die Tumorzellen erkennen und zerstören, wenn auf den Tumorzellen die entsprechenden TAA-Peptide durch MHC-Klasse I-Moleküle präsentiert werden (siehe Abbildung 4 I). Für die Stimulation der DCs gibt es verschiedene Möglichkeiten. Sie können aus dem Blut isoliert und *ex vivo* mit Antigenen inkubiert werden. Durch Zusatz entsprechender Zytokine oder PAMPs kommt es zur Ausreifung. Anschließend werden die maturen DCs wieder in den Patienten injiziert. Alternativ wird versucht, DCs *in vivo* mit Antigenen zu beladen. Hierfür werden das TAA-Peptid, TAA-Protein oder die TAA-codierende DNA mit einem Antikörper fusioniert, der spezifische Oberflächenrezeptoren auf DCs erkennt und nach Bindung internalisiert wird [24]. Klinische Studien konnten zwar die Induktion Antigen-spezifischer T-Zellantworten *in vivo* demonstrieren, doch deutliche immuntherapeutische Effekte waren bei Tumorpatienten bisher selten zu beobachten [23, 25].

Eine Alternative zur Aktivierung von DCs stellen mAbs dar, die gegen TAAs gerichtet sind (Abbildung 4 II). Einige chimäre oder humanisierte Derivate werden bereits erfolgreich in der Tumorthherapie eingesetzt [26]. Die Antigen-Antikörper-Komplexe auf den Tumorzellen können einerseits zur Komplement-vermittelten Lyse führen und andererseits ADCC-Reaktionen der NK-Zellen hervorrufen [17].

Anti-TAA Antikörper oder davon abgeleitete scFv-Moleküle können auch mit verschiedenen Effektormolekülen wie Radionukliden (z. B. ⁹⁰Y, ¹³¹I), Zytokinen (z. B. IL-2), Chemotherapeutika sowie bakteriellen oder pflanzlichen Toxinen fusioniert werden, um die Zielzellen direkt zu schädigen (Abbildung 4 III und IV). Bei den Radionuklid-gekoppelten Antikörpern kommt es bei soliden Tumoren zum sogenannten „Bystander-Effekt“: Der an die Tumorzellen gebunden Antikörper hat eine Bestrahlung der umgebenden Zellen zur Folge. Dadurch können gleichzeitig Tumorzellen eliminiert werden, die versuchen, der Immuntherapie durch Herunterregulation der TAA-Genexpression zu entkommen. Zugleich können aber auch gesunde Gewebezellen in der Umgebung geschädigt werden [17].

Rekombinante, bispezifische Antikörperderivate stellen eine neue Generation von Medikamenten dar, die ihre Wirksamkeit bereits in klinischen Studien unter Beweis gestellt haben [27-29]. Diabodies (siehe Abbildung 4 V) vernetzen die Tumorzellen mit den zytotoxischen Effektorzellen des Immunsystems. Die Bindung richtet sich v. a. gegen FcγRIII (CD16) auf NK-Zellen sowie den CD3-Korezeptor der T-Zellen [19]. CD3-spezifische Diabodies können alle CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen unabhängig von ihrer TCR-Spezifität auf den Tumorzellen immobilisieren. Die monovalente Bindung allein kann die T-Zellen nicht aktivieren, sondern erst eine multivalente Bindung auf der Oberfläche der Zielzellen kann die Stimulation der T-Zellen bewirken [30].

Eine weitere Möglichkeit bieten chimäre Antigenrezeptoren (CARs), die aus einem anti-TAA scFv-Molekül bestehen, das z. B. mit den Signaltransduktionsdomänen eines TCR fusioniert ist.

Durch Gentransfer werden die T-Zellen mit einer neuen Antigen-spezifität ausgestattet und können nach Bindung an die Tumorzellen ihr zytotoxisches Potential entfalten [31]. Des Weiteren wurden Fusionsproteine aus scFv-Molekülen und NK-Zell-Rezeptorliganden entwickelt (siehe Abbildung 4 VI). Dadurch wird die Oberfläche der Tumorzellen mit z. B. ULBP2 dekoriert, welches NK-Zellen über NKG2D aktiviert und so die Zerstörung der Zielzellen einleitet [32].

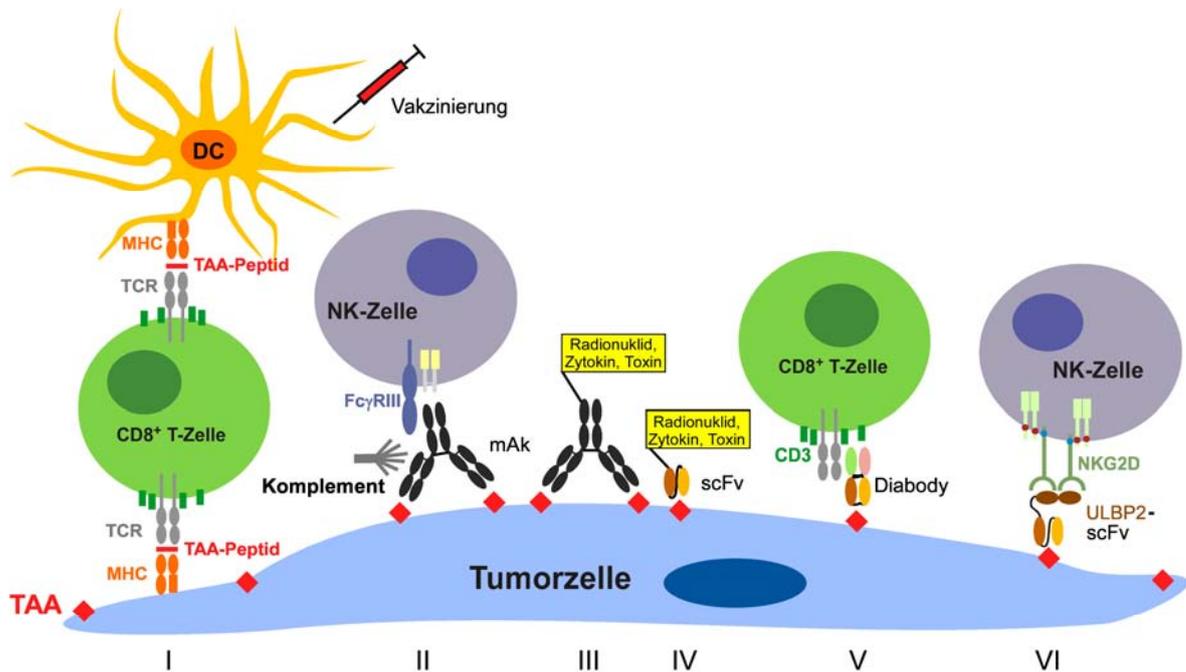


Abbildung 4: Verschiedene Strategien zur Immuntherapie von Tumorerkrankungen.

Tumorimmunologische Ansätze haben Immunreaktionen gegen TAAs zum Ziel. **(I)** Die Verabreichung von TAAs in Form von Protein, Peptiden, Tumorzelllysaten oder Nukleinsäuren soll zur Präsentation von TAA-abgeleiteten Peptiden auf DCs führen. Diese können von spezifischen T-Zellen erkannt werden, die daraufhin aktiviert werden und die Tumorzellen, welche ebenfalls TAA-Peptide auf ihren MHC-Molekülen präsentieren, eliminieren. **(II)** Anti-TAA-mAks können NK-Zellen oder das Komplementsystem aktivieren, um eine Lyse der Tumorzellen zu bewirken. **(III)** Die Fusion von anti-TAA-mAks mit Radionukliden, Zytokinen oder Toxinen soll zur direkten Zerstörung der Tumorzellen führen. Auf ähnliche Weise werden anti-TAA-scFv-Moleküle eingesetzt **(IV)**. **(V)** Bispezifische Antikörper (Diabodies) können die Tumorzellen z. B. mit CD8⁺ T-Effektorzellen vernetzen und so die T-Zellen gegen die Tumorzellen aktivieren. **(VI)** Alternativ werden bispezifische Proteine aus einem anti-TAA scFv und einem aktivierenden NK-Zell-Rezeptorliganden (ULBP2) eingesetzt, um NK-Zellen zu den Tumorzellen zu rekrutieren.

1.4. Systemischer Lupus erythematoses

SLE ist eine systemische Autoimmunerkrankung, die schubweise verläuft und sich auf nahezu alle Organsysteme auswirken kann [1, 33]. Frauen erkranken zehnmal häufiger als Männer. Das klinische Bild ist vielfältig. Zu Fieber und Abgeschlagenheit kommen Hauterscheinungen (z. B. Schmetterlingserythem, Lichtempfindlichkeit), Gelenkschmerzen (Arthritis), Nierenschäden (Glomerulonephritis) oder neurologische Symptome. Die Betroffenen produzieren große Mengen an Autoantikörpern, die gegen Zellkernkomponenten gerichtet sind. Die Antigene können doppelsträngige DNA (dsDNA), RNA oder nukleäre Proteine wie das Smith-Antigen (Sm), das nukleäre Ribonukleoprotein (nRNP), Ro 60 oder La sein. Die beiden letzt genannten Proteine wurden ursprünglich als SS-A bzw. SS-B bezeichnet, da Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom, einer progressiven Autoimmunerkrankung des exokrinen Drüsengewebes, ebenfalls Autoantikörper gegen diese beiden Proteine entwickeln.

Anfangs werden sowohl beim SLE als auch beim Sjögren-Syndrom Antikörper gegen eine Zellkernkomponente gebildet. Später weitet sich das Antikörperspektrum auf mehrere Epitope innerhalb eines Antigens und schließlich auf verschiedene Antigene aus (*epitope spreading*) [34]. Dies ist möglich, da die betroffenen Proteine zusammen mit kleinen RNA-Molekülen als Ribonukleoproteinkomplexe in der Zelle vorkommen. Neueste Studien machen eine konservierte RNA-Bindungsdomäne dieser Antigene für das *epitope spreading* verantwortlich [35].

Bei der Entwicklung eines SLE spielen Umweltfaktoren und genetische Determinanten eine Rolle. Während Virusinfektionen, der Einnahme bestimmter Medikamente oder einer UV-Exposition, die zu Sonnenbrand führt, kommt es zur Schädigung und infolgedessen zur Apoptose von Körperzellen. Der Zellinhalt wird in *apoptotic bodies* verpackt, die normalerweise von Phagozyten aufgenommen und abgebaut werden. Bei SLE-Patienten ist die Beseitigung des apoptotischen Materials oft gestört und es entstehen sekundäre Nekrosen [36, 37]. Dadurch kommt es zur Freisetzung modifizierter zytoplasmatischer und nukleärer Antigene, die autoreaktive B-Zellen in den Lymphknoten zur Proliferation und Antikörperproduktion anregen können. Im Serum von SLE-Patienten bilden sich vermehrt Antigen-Antikörper-Immunkomplexe, die sich im weiteren Verlauf der Erkrankung in den Geweben ablagern, wodurch Entzündungen und Gewebeschädigungen hervorgerufen werden. Die autoreaktiven Antikörper sind oft schon Jahre vor der klinischen Diagnose eines SLE nachweisbar [38]. Sie können nur deshalb in so großen Menge entstehen, weil bei diesen Patienten die Toleranzinduktion der B-Zellen gestört ist [39].

Der Ätiologie von SLE wurden verschiedene Gene zugeordnet [40]. Es wurden u. a. Defekte des C1q-Komplementfaktors und von Fc-Rezeptoren beobachtet, wodurch die verminderte Phagozytose und unzureichende Beseitigung von Immunkomplexen bedingt werden. Außerdem sind negativ regulierende Rezeptoren der CD28-Familie (*cytotoxic T lymphocyte antigen-4*, CTLA-4 und *programmed cell death-1*, PDCD-1) betroffen, was in einer unkontrollierten Aktivierung autoreaktiver T- und B-Lymphozyten resultiert. Infektionen mit Epstein-Barr-Virus, Hepatitis B-Virus oder Zytomegalie-Virus werden ebenfalls mit der Induktion eines SLE assoziiert [41]. Da die viralen Antigene körpereigenen Proteinen ähneln, können die antiviralen Antikörper mit Autoantigenen kreuzreagieren.

1.5. Das humane Autoantigen La/SS-B

Das humane La-Protein (hLa) wurde ursprünglich als Autoantigen in Patienten mit SLE [42] und Sjögren-Syndrom [43] beschrieben und trägt die alternative Bezeichnung SS-B. Für die Identifizierung und Charakterisierung wurden anfangs Patientenserum eingesetzt, welche außer dem antigenen La-Protein eine Reihe von kleinen RNA-Molekülen kopräzipitierten, mit denen das La-Protein sogenannte Ribonukleoproteinkomplexe bildet [44]. Die ersten Untersuchungen zum Molekulargewicht des Proteins ergaben recht unterschiedliche Werte von 30 kDa [42], 43 kDa [45] oder 68 kDa [46]. Nach Klonierung der komplementären DNA (*complementary DNA*, cDNA) wurde für das 408 Aminosäuren (AS) umfassende hLa-Protein ein theoretisches Molekulargewicht von 47 kDa berechnet [47]. Die Proteine mit kleineren Molekulargewichten wurden als Proteolyseprodukte identifiziert [48, 49]. Mit $2 \cdot 10^7$ Molekülen pro humaner Zelle handelt es sich um ein abundantes Protein [50], das in allen Geweben zu finden ist.

Die Primärstruktur des hLa-Proteins kann in drei Regionen unterteilt werden, die voneinander unabhängige räumliche Domänen bilden (siehe Abbildung 5). Das La-Motiv befindet sich N-terminal, gefolgt vom zentralen RNA-Erkennungsmotiv (*RNA recognition motif*, RRM), das auch als RRM1 bezeichnet wird. Diese beiden Domänen bilden die N-terminale Hälfte des Proteins und werden zusammen als LaN bezeichnet. Die zweite Hälfte, LaC, enthält das C-terminale RRM (RRM2) sowie ein sich anschließendes langes, flexibles Element von etwa 80 AS, das keine Sekundärstrukturmerkmale aufweist.



Abbildung 5: Schematischer Aufbau des hLa-Proteins.

Das 408 AS umfassende hLa-Protein wird in eine N-terminale (LaN) und eine C-terminale (LaC) Hälfte unterteilt. Das La-Motiv, die RRM1-Domäne sowie die RRM2-Domäne bilden voneinander getrennte räumliche Domänen.

Homologe La-Proteine wurden in vielen Eukaryonten von der Hefe, über *Xenopus laevis* und *Drosophila melanogaster*, bis hin zur Maus identifiziert [51-61], doch die Funktionen des Proteins scheinen vielfältig zu sein. Während die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* auch ohne La-Protein lebensfähig ist [56], spielt es bei der Entwicklung von *D. melanogaster* eine bedeutende Rolle [62]. In einem Knock-out-Mausmodell wurde deutlich, dass das La-Protein bei Säugern bereits im frühen Blastozystenstadium der Embryogenese essentiell ist [63]. Während die beiden N-terminalen Domänen hochkonserviert sind, variiert LaC in Größe und auch Sequenz. In *S. cerevisiae*, *Saccharomyces pombe* und *Trypanosoma brucei* fehlt das RRM2 vollständig [64].

Das La-Motiv tritt bei allen Eukaryonten auch in einer Reihe von La-verbunden Proteinen (*La-related proteins*, LARPs) auf, die sich allerdings durch ihre übrige Aminosäuresequenz sowie funktionell vom La-Protein unterscheiden [65]. La-Proteine sind *in vivo* phosphoryliert [66, 67]. Die modifizierten Aminosäurereste befinden sich vor allem im C-terminalen Bereich. In hLa wurden T302, S325, T362 sowie S366 als Phosphorylierungsstellen identifiziert [68]. Während

T302, S325 und T362 nur einen geringen Phosphoryierungsgrad aufweisen, liegt S366, ein Substrat der Casein-Kinase II, überwiegend in seiner phosphorylierten Form vor [69].

1.5.1. Funktionen des La-Proteins

Eukaryote Zellen sind in verschiedene Kompartimente unterteilt, die eine zusätzliche Regulationsfunktion für die Genexpression bewirken. So sind die DNA und die damit zusammenhängende Transkription der Gene zur Synthese von mRNA im Zellkern lokalisiert und vom Zytoplasma durch die Kernhülle abgetrennt. Im Zytoplasma findet hingegen die Translation der mRNA, also die Proteinbiosynthese, statt. Im Kern sind außerdem die Kernkörperchen (Nukleoli) als gesonderte Bereiche für die Synthese der ribosomalen RNA (rRNA) zu finden.

Das hLa-Protein ist überwiegend im Zellkern lokalisiert, wo es an neu synthetisierte RNA-Polymerase III-Transkripte bindet. Unter diesen La-Ribonukleoproteinkomplexen finden sich Komplexe mit Vorläufern der 5S rRNA, Transport-RNAs (tRNAs), U6 *small nuclear* RNA (snRNA) sowie Y RNAs [70-72]. Des Weiteren assoziiert La mit kleinen viralen RNAs des Adenovirus oder Epstein-Barr-Virus [73, 74]. Alle RNA-Polymerase III-Transkripte weisen 3'-oligo-Uridinsequenzen auf [75], die von La gebunden werden [76-78]. Während der RNA-Reifung und -Prozessierung werden diese Nukleotide entfernt und die Assoziation mit dem La-Protein wird aufgehoben. Ebenso wird U1 RNA, ein RNA-Polymerase II-Produkt, gebunden [79]. Das La-Antigen sorgt als Chaperon für eine korrekte Faltung der RNA-Moleküle, schützt sie vor RNasen und vermittelt die nukleäre Retention bis die RNA-Reifung abgeschlossen ist [64]. La kommt nicht nur im Nukleoplasma, sondern auch in den Nukleoli vor [80]. Hier ist es mit Nukleolin assoziiert und spielt vermutlich bei der ribosomalen Biogenese eine Rolle [81].

Weiterhin kann das La-Protein die Translation im Zytoplasma beeinflussen. Unter Stressbedingungen (z. B. Virusinfektion, UV-Strahlung oder Hitzeschock) oder während der Apoptose wird die klassische *Cap*-abhängige Translation heruntergefahren und nur bestimmte Proteine werden noch synthetisiert [82]. Verantwortlich für diese Art der Translation sind bestimmte RNA-Sequenzen, sogenannte *internal ribosome entry site* (IRES)-Elemente, welche das *Cap*-unabhängige Zusammenfügen der Ribosomen direkt innerhalb der mRNA-Sequenz vermitteln [83-85]. Viele zelluläre mRNAs, die IRES-Elemente enthalten, codieren für Proteine, die die Proliferation, Differenzierung oder Apoptose von Zellen beeinflussen. Einerseits kann das La-Protein selbst IRES-vermittelt translatiert werden [86], andererseits verstärkt es die Biosynthese von *X-linked inhibitor of apoptosis* (XIAP), *murine double minute 2* (MDM2) und *human immunoglobulin heavy chain-binding protein* (BiP) [87-89].

Im Zytoplasma assoziiert das La-Protein außerdem mit den *leader*-RNAs verschiedener minus-Strang-RNA-Viren [90-95] und scheint für die Virusreplikation von Bedeutung zu sein. Die Viren nutzen das La-Protein der Wirtszellen beispielsweise, um antivirale Abwehrmechanismen der Zellen zu umgehen [94] oder die viralen RNAs vor zellulären RNasen zu schützen [96]. Des Weiteren wird La für die IRES-abhängige Translation viraler Proteine benötigt [97-100]. Darüber hinaus ist das La-Protein in der Lage, einzelsträngige DNA-Moleküle (ssDNA) und dsDNA zu binden [55, 101]. In Gegenwart von Calmodulin, das mit La assoziieren kann, wird die DNA-Bindung verstärkt.

1.5.2. Die räumliche Struktur der einzelnen Proteindomänen

Für die Bestimmung der dreidimensionalen Proteinstruktur wurden die drei hLa-Domänen getrennt voneinander kloniert, rekombinant hergestellt, gereinigt und mittels *nuclear magnetic resonance* (NMR)-Spektroskopie untersucht [102, 103].

Alfano *et al.* bestimmten die räumlichen Strukturen des La-Motivs und des RRM1 [102], welche vorwiegend an der RNA-Bindung beteiligt sind. Das La-Motiv (AS 1-103, Abbildung 6A) weist eine Tertiärstruktur mit einer *winged helix*-Faltung auf [104]. Diese konservierte Struktur ist vor allem bei DNA-bindenden Proteindomänen zu finden, die wichtig für die Embryogenese, Entwicklung und Alterung sind. Die typischen *winged helix*-Proteindomänen bestehen aus drei α -Helices (α) und einem dreisträngigen β -Faltblatt (β) mit der Topologie $\alpha 1\text{-}\beta 1\text{-}\alpha 2\text{-}\alpha 3\text{-}\beta 2\text{-}\beta 3$. Das β -Faltblatt ist gegen die drei α -Helices gepackt und die „Flügel“ werden durch die Schleife zwischen $\beta 2$ und $\beta 3$ sowie das C-terminale Peptid geformt. Für das hLa-Protein sind die Helices $\alpha 1'$, $\alpha 2$ und $\alpha 4$ als Insertionen in die konservierte Sequenz $\alpha 1\text{-}\beta 1\text{-}\alpha 3\text{-}\alpha 5\text{-}\beta 2\text{-}\beta 3$ interpretiert worden. Unabhängig davon wurde die Kristallstruktur des *T. brucei* La-Motivs bestimmt [105]. In Übereinstimmung mit der NMR-Struktur von hLa zeigt auch dieses eine *winged helix*-Faltung. Das RRM1 (AS 105-202, siehe Abbildung 6B) nimmt die klassische RRM-Struktur ein, die ein viersträngiges antiparalleles β -Faltblatt mit zwei umgebenden α -Helices umfasst [106]. Zusätzlich gibt es eine kurze N-terminale $\alpha 0$ -Helix und eine C-terminale $\alpha 3$ -Helix (AS 185-194).

Kokristallisationsexperimente beider Domänen (AS 1-194) mit verschiedenen RNA-Oligomeren [107, 108] zeigten, dass sich die Grundstrukturen des La-Motivs und des RRM1 durch die RNA-Bindung nicht verändern. Das verbindende Peptid, das beide Domänen zueinander positioniert, nimmt zusätzlich eine α -helikale Konformation ein. Entgegen den Erwartungen sind nicht die sonst üblichen Strukturelemente beider Domänen an der Substratbindung beteiligt, sondern die Bindung der 3'-oligo-Uridin-RNA-Moleküle wird synergistisch von beiden Domänen vermittelt, indem sie miteinander eine RNA-Bindungstasche bilden.

Für das RRM2 (AS 225-334, Abbildung 6C) wurden ebenfalls NMR-spektroskopische Analysen durchgeführt [103]. Dabei wurde eine atypische RRM-Struktur mit einem fünfsträngigen antiparallelen β -Faltblatt bestimmt, das gegen zwei α -Helices gepackt ist. Zusätzlich wurde eine sehr lange C-terminale α -Helix ($\alpha 3$, AS 308-325) identifiziert. Das RRM2 allein kann keine RNA-Moleküle binden.

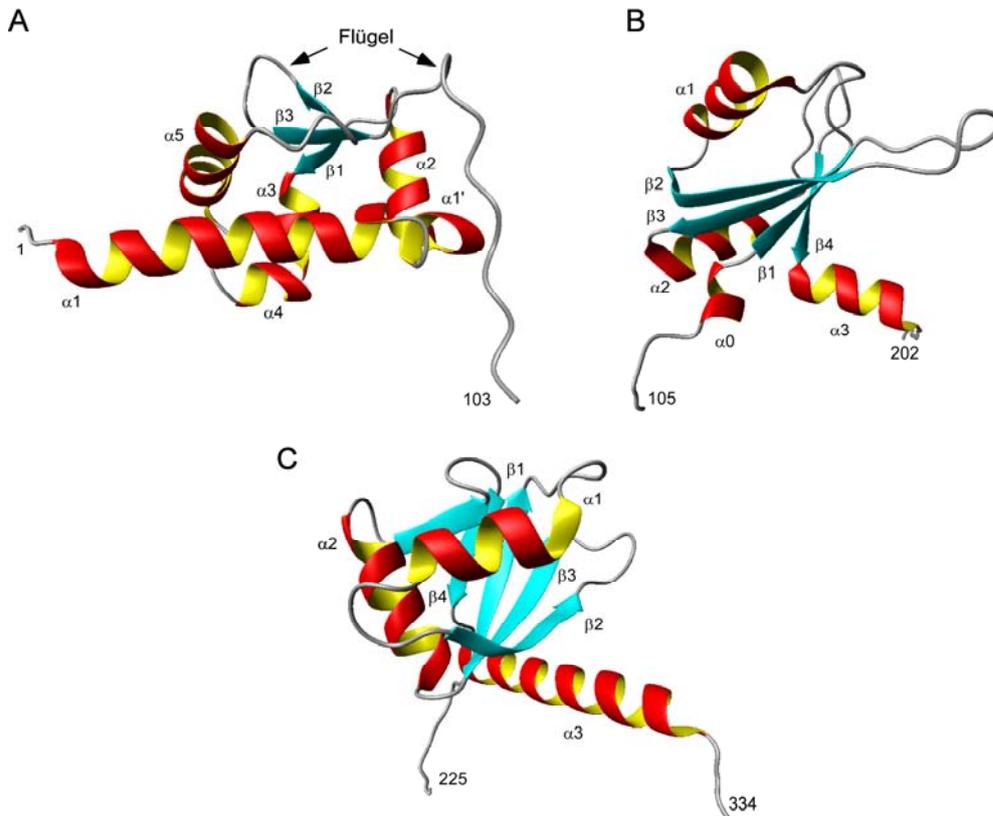


Abbildung 6: Räumliche Struktur der hLa-Domänen.

A) Das La-Motiv besteht aus sechs α -Helices und einem dreisträngigen antiparallelem β -Faltblatt in der Reihenfolge $\alpha 1$ - $\alpha 1'$ - $\alpha 2$ - $\beta 1$ - $\alpha 3$ - $\alpha 4$ - $\alpha 5$ - $\beta 2$ - $\beta 3$ [102]. Das C-terminale Peptid, das sich an den $\beta 3$ -Strang anschließt, faltet auf die Helix $\alpha 1$ zurück und stellt die Verbindung zum nachfolgenden RRM1 her. Die „Flügel“ der *winged helix*-Struktur werden durch die Schleife zwischen $\beta 2$ und $\beta 3$ bzw. das verbindende Peptid zwischen $\beta 3$ und RRM1 gebildet. **B)** Die RRM1-Domäne besteht aus den Elementen $\alpha 0$ - $\beta 1$ - $\alpha 1$ - $\beta 2$ - $\beta 3$ - $\alpha 2$ - $\beta 4$ - $\alpha 3$ [102]. **C)** Die RRM2-Domäne weist eine atypische RRM-Struktur mit der Topologie $\beta 1$ - $\alpha 1$ - $\beta 2$ - $\beta 3$ - $\alpha 2$ - $\beta 4'$ - $\beta 4$ - $\alpha 3$ auf [103]. Der N- bzw. C-Terminus jeder Domäne ist mit der Nummer der AS entsprechend seiner Lage innerhalb des hLa-Proteins gekennzeichnet.

1.5.3. Lokalisationssignale und Regulationselemente des hLa-Proteins

Für den Austausch von Molekülen zwischen Zytoplasma und Zellkern sorgt der Kernporenkomplex, der als Multiproteinkomplex die Kernhülle durchspannt, um einen Transportkanal zu bilden [109]. Während kleine Moleküle frei hindurch diffundieren können, wird die Passage von Proteinen und Ribonukleoproteinkomplexen von Rezeptoren vermittelt, die als Karyopherine bezeichnet werden. Menschlichen Zellen enthalten mindestens 20 verschiedene Mitglieder der Karyopherinfamilie [110]. Die zu transportierenden Proteine besitzen nukleäre Lokalisationssignale (NLSs) oder nukleäre Exportsignale (NESs), die von den Karyopherinen erkannt werden und den Transfer in das entsprechende Kompartiment bewirken. Das klassische NLS enthält ein bis zwei basische Aminosäurebereiche und wird von Karyopherin- α gebunden. Karyopherin- α assoziiert anschließend mit Karyopherin- β , das den Transport in den Zellkern ermöglicht. Dort sorgt die Guaninriphosphat- (GTP-) gebundene Form der GTPase Ran für die Dissoziation des Komplexes, sodass das transportierte Protein in das Nukleoplasma entlassen wird. Die beiden Karyopherine gelangen unabhängig voneinander zurück ins Zytoplasma.

Das häufigste NES, das in allen Eukaryonten verwendet wird, ist reich an Leucinen und wird vom Exportrezeptor *chromosome region maintenance 1* (Crm1) erkannt [111]. Durch Leptomycin B (LMB) lässt sich der Crm1-abhängige Export spezifisch hemmen [112]. Einige Proteine enthalten sowohl ein NLS als auch ein NES und sind deshalb in der Lage, sich ständig zwischen Kern und Zytoplasma hin und her zu bewegen. Dieser Vorgang wird als nukleo-zytoplasmatisches Shuttling bezeichnet. Bei Proteinen ohne NES geht man davon aus, dass der Export über nukleäre Retentionselemente (NREs) gesteuert wird. Über diese Sequenzen interagieren die Proteine mit nukleären Faktoren, die sie im Zellkern zurückhalten [113]. Wird die Wechselwirkung z. B. durch eine post-translationale Modifikation aufgehoben, so wird das Protein wieder in das Zytoplasma entlassen.

Nach der Proteinbiosynthese im Zytoplasma muss das La-Protein in den Zellkern gelangen. Dafür sorgt ein NLS (AS 383-400) im C-terminalen Bereich von hLa [114]. Obwohl es in seiner Sequenz etwas vom klassischen, zweigeteilten NLS abweicht, wird hLa dennoch von Karyopherin- α und Karyopherin- β in den Kern importiert [115]. Die nukleäre Retention wird durch ein NRE (AS 316-332) hervorgerufen [114, 116], das sich auf der langen C-terminalen α -Helix der RRM2-Domäne befindet (Abbildung 6C). Ohne funktionelles Retentionselement kann das La-Protein zwar in den Kern gelangen und tRNA-Vorläufermoleküle binden, doch der Komplex wird so schnell in das Zytoplasma exportiert, dass die tRNA-Prozessierung nicht vollständig ablaufen kann. Für die nukleäre Retention sind die AS K316 und K317 entscheidend [117]. Den Transport in die Nukleoli steuert ein zusätzliches nukleoläres Lokalisationssignal (NoLS, AS 323-354) [118]. Das verkürzte Protein La₁₋₃₆₃ weist ein kryptisches NLS (cNLS, AS 352-363) auf, das nur funktionell ist, wenn es sich unmittelbar am C-Terminus des verbleibenden Proteins befindet.

Der Phosphorylierungszustand des S366 beeinflusst sowohl die RNA-Bindung als auch die intrazelluläre Lokalisation von hLa. Während die vorherrschende phosphorylierte Proteinform mit RNA-Polymerase III-Transkripten im Nukleoplasma assoziiert, bindet die seltenere dephosphorylierte Form im Zytoplasma an 5'-terminal oligo-Pyrimidin- (5' TOP-) modifizierte mRNAs, welche für ribosomale Proteine und Translationsfaktoren codieren [119]. Außerdem wurde für unphosphoryliertes La-Protein eine Interaktion mit Nukleolin im Nukleolus festgestellt, die durch Phosphorylierung an S366 gestört wird [81]. S366 trennt einen N-terminal davon gelegenen Bereich mit überwiegend basischen Aminosäureseitenketten (*short basic motif*, SBM; AS 329-363) von einer C-terminal von S366 gelegenen Region mit saurem Charakter (AS 367-375) [69, 120, 121]. Die Identifizierung eines Walker A-Motivs (WAM, AS 333-339) [54] innerhalb des SBM war Grundlage für die Vermutung, dass hLa Adenosintriphosphat (ATP) binden kann und Helicaseaktivität besitzt. Tatsächlich war dem La-Protein bereits Helicaseaktivität zugesprochen worden, die allerdings kontrovers diskutiert wird [122-125]. Darüber hinaus unterstützt die SBM-Region die RNA-Bindung durch Wechselwirkung mit der 5'-Phosphatgruppe der RNA-Moleküle [126]. Dadurch werden die Vorläufer-tRNAs vor vorzeitiger Prozessierung an ihrem 5'-Terminus bewahrt. Durch Phosphorylierung an S366 wird dieser Schutz aufgehoben. Die Assoziation des 3'-Terminus der RNA-Moleküle mit LaN bleibt davon unbeeinflusst.

Während der Proteinreinigung wurden immer wieder Produkte mit höheren Molekulargewichten beobachtet und schließlich wurde für hLa eine Dimerisierungsdomäne

(AS 293-348) gefunden [127, 128]. Die Deletion dieser Domäne führte zur verminderten IRES-abhängigen Translation viraler RNAs. Dennoch ist die Dimerisierung umstritten, da sie nicht immer reproduziert werden konnte [103].

Die durch RNA aktivierte Proteinkinase (PKR) kann ebenso wie das La-Protein kleine virale RNA-Moleküle binden. Durch Homologievergleiche wurden zwei PKR-ähnliche Sequenzelemente (AS 249-271 und 338-363) identifiziert, die sich ebenfalls in der C-terminalen Hälfte des La-Proteins befinden [129]. Die beschriebenen funktionellen Bereiche des hLa-Proteins werden in Abbildung 7 zusammengefasst.

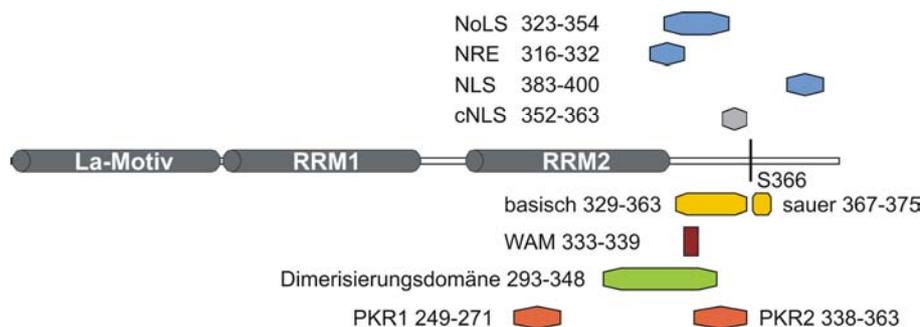


Abbildung 7: Verschiedene funktionelle Sequenzelemente im C-terminalen Bereich von hLa.

Das Schema zeigt die Lage der einzelnen Lokalisationssignale und funktionellen Elemente innerhalb der hLa-Sequenz. Für jeden Bereich sind die Positionen der ersten und letzten AS angegeben.

1.5.4. Das hLa-Protein außerhalb des Zellkerns

Viele Studien haben gezeigt, dass das hLa-Protein unter normalen Bedingungen vor allem im Nukleoplasma und in den Nukleoli beobachtet werden kann. Dennoch wurde ein Teil des Proteins immer wieder im Zytoplasma gefunden [130]. Sogar die erste Beschreibung des La-Antigens wies ihm eine zytoplasmatische Lokalisation zu [42]. Im Jahr 1987 wurde erstmals ein Shuttling des Proteins zwischen Zellkern und Zytoplasma nachgewiesen [131]. Dennoch wurde dieser Vorgang lange Zeit angezweifelt und damit erklärt, dass das Protein nur lose mit Komponenten des Zellkerns assoziiert ist und bei der Zellfraktionierung leicht in die zytoplasmatische Fraktion gelangt [64]. Später konnte der Shuttlingprozess des hLa-Proteins durch Heterokaryon-Experimente bestätigt werden [132].

Unter bestimmten Bedingungen wie viralen Infektionen, UV-Bestrahlung oder TNF- α -Behandlung kommt es zur zytoplasmatischen Anreicherung von hLa [133-136]. Folglich kann das La-Antigen nun die IRES-abhängige Translation beeinflussen, die unter diesen Bedingungen angeschaltet wird. Im weiteren Verlauf einer solchen Behandlung ist das Protein auch auf der Zelloberfläche nachweisbar [134, 136-140]. All diese Faktoren lösen Zellstress aus und können zur Apoptoseinduktion führen. Auf der Suche nach post-translationalen Modifikationen, die zur zytoplasmatischen Translokation von La führen könnten, wurde einerseits eine Dephosphorylierung von S366 beobachtet und andererseits nahm bei einem Teil des La-Proteins das Molekulargewicht ab [141]. Für bestimmte Proteasen, die während der Apoptose eine Rolle

spielen, wurden Schnittstellen innerhalb der La-Proteinsequenz gefunden. So spaltet Caspase 3 nach D374 [142], Granzym B nach D220 [143] und Granzym H nach F364 [144]. Für die Poliovirus Protease 3C wurde Q358 als Spaltstelle beschrieben [145]. Die meisten Proteasen schneiden das Protein im C-terminalen Bereich, wodurch das NLS vom übrigen Teil abgetrennt wird. Das verkürzte Protein kann nicht wieder in den Zellkern importiert werden, enthält aber noch alle funktionellen Domänen, die für die RNA-Bindung von Bedeutung sind.

1.6. Zielstellung

Das La-Protein ist ein abundantes Phosphoprotein, das überwiegend im Zellkern vorliegt und dort v. a. Aufgaben bei der Faltung und Reifung von RNA-Polymerase III-Transkripten wahrnimmt. Unter bestimmten Bedingungen, die zellulären Stress verursachen (UV-Exposition, Virusinfektion), ist La zunehmend im Zytoplasma lokalisiert. Hier beeinflusst es einerseits die IRES-abhängige Translation einiger Proteine, die an der Apoptoseregulation beteiligt sind, und ist andererseits an der Replikation mancher Viren beteiligt. Bei Zellen, in denen der Apoptoseprozess schon weit vorangeschritten ist, kann das La-Protein auf der Zellmembran nachgewiesen werden.

Patienten mit Autoimmunerkrankungen wie SLE oder Sjögren-Syndrom entwickeln Autoantikörper gegen das La-Protein und andere Kernkomponenten. Normalerweise besteht gegen körpereigene Proteine immunologische Toleranz, die jedoch bei Autoimmunpatienten durchbrochen wurde. Möglicherweise führen die oxidativen Bedingungen in gestressten bzw. apoptotischen Zellen zur Exposition von kryptischen Epitopen oder zu post-translationalen Veränderungen, die Neoepitope erzeugen. Gegen diese können T- und B-Lymphozyten mit passenden Antigenrezeptoren existieren. Wenn DCs das apoptotische Material aufnehmen, um Antigenpeptide zu präsentieren, und z. B. bei gleichzeitiger Virusinfektion kostimulierende Moleküle auf ihrer Oberfläche tragen, können autoreaktive T-Lymphozyten und mit deren Hilfe auch B-Lymphozyten aktiviert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten murine anti-La-mAks charakterisiert werden, die einerseits nach herkömmlicher Immunisierung und andererseits nach adoptivem T-Zelltransfer gewonnen wurden. Die Variabilität ihrer Sequenzen und Spezifitäten sowie die von ihnen erkannten Epitopregionen innerhalb des hLa-Proteins sollten Aufschluss über ihren Ursprung geben, d. h. ob es sich um polyreaktive, natürliche Antikörper oder um hochspezifische, gereifte Immunglobuline handelt. Darüber hinaus war die genaue Kenntnis der Antikörpereigenschaften für nachfolgende Experimente von Bedeutung.

Für das La-Protein wurde bereits nukleozytoplasmatisches Shuttling nachgewiesen. Dennoch ist nicht bekannt, welche Bereiche des La-Proteins dafür nötig sind. Deshalb sollten die verantwortlichen Proteinregionen identifiziert werden. Zusätzlich sollte untersucht werden, wie sich die intrazelluläre Lokalisation und somit auch das Shuttlingverhalten abhängig von oxidativem Zellstress verändern.

Da Virusinfektionen oder erhöhte UV-Exposition zu Krankheitsschüben bei SLE-Patienten führen, ist eine Korrelation zwischen der Oberflächenexposition der Autoantigene, der Bildung neuer Immunkomplexe und der auftretenden Symptome naheliegend. Bisher wurde das La-Protein nur auf der Membran apoptotischer Zellen nachgewiesen. Die Freisetzung des La-Proteins

in die Umgebung und die Bindung an lebende Nachbarzellen hätte schwerwiegende Folgen. Nach Bindung von anti-La-Autoantikörpern können die so entstandenen Immunkomplexe zur Komplement-vermittelten Lyse oder zu NK-Zell-vermittelten ADCC-Reaktionen führen. Deshalb sollten diese Prozesse *in vitro* untersucht werden.

Bisherige tumorimmunologische Ansätze sind auf TAAs angewiesen, deren Gene in Tumorzellen spezifisch überexprimiert werden. Somit müssen für jedes TAA spezifische Medikamente entwickelt werden. Eine universelle Zielstruktur, die normalerweise im Zellinneren vorliegt und unter bestimmten Bedingungen auf die Zelloberfläche gelangt, wäre für die Immuntherapie von großem Nutzen. Genau diese Eigenschaften weist das La-Protein auf, welches z. B. nach der Strahlentherapie auf den apoptotischen Tumorzellen erscheint. Falls diese das La-Protein in die Umgebung abgeben und es auf strahlungsresistenten Nachbarzellen binden kann, so sind diese für anti-La-Immuntherapeutika markiert. Deshalb waren die Entwicklung eines bispezifischen rekombinanten Antikörpermoleküls sowie *in vitro* Funktionalitätstests für dieses Immuntherapeutikum von großem Interesse.

2. Materialien

2.1. Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Bezugsquelle
10 × Maleinsäurepuffer (aus Digoxigenin- (DIG-) Wasch- und Blockierungspufferset)	Roche, Mannheim
1-Butanol	Merck, Darmstadt
2-Propanol (Isopropanol)	Merck, Darmstadt
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Roche, Mannheim
3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin- (TMB-) Tabletten	Sigma-Aldrich, Steinheim
4',6-Diamidino-2'-phenylindol Dihydrochlorid (DAPI)	Roche, Mannheim
5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP)	Gerbu Biochemicals, Gaiberg
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid (X-Gal)	Gerbu Biochemicals, Gaiberg
Agarose LE	Biozym, Hess. Oldendorf
aktivierte CH-Sepharose™ 4B	GE Healthcare, Freiburg
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin	Gerbu Biochemicals, Gaiberg
Bacto™ Agar	BD, Heidelberg
Bacto™ Hefeextrakt	BD, Heidelberg
Bacto™ Trypton	BD, Heidelberg
Biocoll-Trennlösung (Ficoll)	Biochrom, Berlin
Blockierungsreagenz	Roche, Mannheim
Bovines Serumalbumin (BSA) Fraktion V	Biomol, Hamburg
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)	Carl Roth, Karlsruhe
Citronensäure	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau G 250	Fluka, Neu-Ulm
Cycloheximid	Gerbu Biochemicals, Gaiberg
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Gerbu Biochemicals, Gaiberg
DMEM+GlumaMAX™ -I + 4,5 g/l Glucose + Pyruvat (DMEM ^{pur})	Invitrogen, Karlsruhe
ECL-Plus Western Blot Detektionsreagenz (ECL-Substrat)	GE Healthcare, Freiburg
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim

2. Materialien

Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i> , FCS)	Biochrom, Berlin
G-418 Sulfat (Geneticin)	PAA Laboratories, Pasching (A)
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerin	ICN Biochemicals, Eschwege
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Hexadimethrinbromid (Polybren)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Humanserum (HS)	CC pro, Neustadt
Igepal® CA-630 (NP-40)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Imidazol	Merck, Darmstadt
Interleukin-2 (IL-2)	Immunotools, Friesoythe
Interleukin-6 (IL-6)	Strathmann Biotec, Hamburg
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Gerbu Biochemicals, Gaiberg
Isotonische Kochsalzlösung, 0,9%	Serumwerk Bernburg, Bernburg
Kaliumchlorid (KCl)	Fluka, Neu-Ulm
Kanamycin-Sulfat	Gerbu Biochemicals, Gaiberg
L-Alanyl-L-Glutamin, 200 mM	Biochrom, Berlin
Leptomycin B (LMB), 5 µg/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe
Manganchlorid (MnCl ₂)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol (MeOH)	Merck, Darmstadt
N-(2-Hydroxyethyl)piperazin- N'-(2-ethansulfonsäure) (HEPES)	Biochrom, Berlin
N, N-Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumbutyrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumchromat (Na ₂ ⁵¹ CrO ₄ , ⁵¹ Cr)	PerkinElmer LAS, Rodgau-Juegesheim
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat, 100 mM	Biochrom, Berlin
Nicht essentielle Aminosäuren 100 x (v/v)	Biochrom, Berlin
Nickel-Nitrilotriessigsäure- (Ni-NTA-) Agarose	Qiagen, Hilden
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Gerbu Biochemicals, Gaiberg
OPTI-MEM®I	Invitrogen, Karlsruhe
OptiPhase SuperMix (Szintillationsflüssigkeit)	PerkinElmer LAS, Rodgau-Juegesheim
Orange G	Sigma-Aldrich, Steinheim

Paraformaldehyd (PFA, Trockensubstanz)	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin, 10000 µg/ml, 100 x	Biochrom, Berlin
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Carl Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth, Karlsruhe
Phosphat-gepufferte Saline (PBS, Trockensubstanz)	Biochrom, Berlin
Polyethylenglycol (PEG) 1500, 50% (w/v) in 75 mM HEPES, pH 8,0	Roche, Mannheim
Polyethylenimin (PEI)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ponceau-S	Sigma-Aldrich, Steinheim
Roti®-Blot A	Carl Roth, Karlsruhe
Roti®-Blot K	Carl Roth, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel A	Carl Roth, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel B	Carl Roth, Karlsruhe
RPMI 1640 + 2g/l NaHCO ₃ (RPMI ^{pur})	Biochrom, Berlin
Rubidiumchlorid (RbCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Saccharose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure, 37% rauchend (HCl)	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure, 95-97% (H ₂ SO ₄)	Riedel-de Haën, Seelze
Titriplex® III (Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz, EDTA)	Merck, Darmstadt
TriPure™ Isolierungsreagenz	Roche, Mannheim
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe
TrueBlot™ anti-Maus Ig IP Beads	eBioscience; NatuTec, Frankfurt
Trypanblau 0,5% (w/v) in physiologischer Kochsalzlösung	Biochrom, Berlin
Trypsin 0,5% (10 x) mit Na ₄ EDTA, flüssig, ohne Phenolrot	Invitrogen, Karlsruhe
Tween®20	Serva, Heidelberg
Wasserstoffperoxidlösung (H ₂ O ₂), 30%	Klinikapotheke des Universitäts- klinikums Dresden

2.2. Puffer und Lösungen

Für Puffer und Lösungen verwendetes Wasser wurde doppelt destilliert (ddH₂O).

Name	Zusammensetzung
0,5 M EDTA (pH 8,0)	0,5 M EDTA unter Zugabe von NaOH in ddH ₂ O lösen
10% APS	10% (w/v) APS in ddH ₂ O
2 × SDS-Probenpuffer	0,187 M Tris/HCl (pH 6,8), 6% (w/v) SDS, 30% (v/v) Glycerin, 10 mM DTT, 80 µg/ml Bromphenolblau
20% SDS	20% (w/v) SDS in ddH ₂ O
5% Essigsäure in PBS	5% (v/v) Eisessig in PBS
6 × Orange G-Probenpuffer	10 mM Tris/HCl (pH 7.5), 0,15% (w/v) Orange G, 60% (v/v) Glycerin
Alkalische Phosphatase- (AP-) Puffer	100 mM Tris/HCl (pH 9,5), 50 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl
Ampicillin	150 mg/ml in ddH ₂ O; Endkonzentration 150 µg/ml

2. Materialien

Anodenpuffer	10% (v/v) Roti [®] -Blot A, 20%(v/v) Methanol in ddH ₂ O
BCIP-Lösung	50 mg/ml in 100% DMF
Blockierungspuffer	5% (v/v) Blockierungsstammlösung in TBS-T
Blockierungsstammlösung	10% (w/v) Blockierungsreagenz in 1 × Maleinsäurepuffer durch Autoklavieren lösen
Citrat-Phosphat- (CP-) Puffer	24,3 ml 0,1 M Citronensäure, 25,7 ml 0,2 M Na ₂ HPO ₄ , 50 ml ddH ₂ O (pH 5,0)
Coomassie-Entfärbelösung	10% (v/v) Eisessig, 20% (v/v) Methanol in ddH ₂ O
Coomassie-Färbelösung	2,5g/l Coomassie Brillant Blau G 250 in Entfärbelösung
Cycloheximid	2% (w/v) in ddH ₂ O (200 x); zum Lösen bei 37 °C im Thermomixer unter Schütteln inkubiert; sterilfiltriert
DAPI-Lösung	10 mg/ml in ddH ₂ O; Lagerung bei -20 °C; lichtempfindlich
DEPC-H ₂ O	0,1% (v/v) DEPC-Lösung über Nacht in ddH ₂ O lösen; autoklavieren
<i>enzyme-linked immunosorbent assay-</i> (ELISA-) Beschichtungspuffer	0,1 M NaHCO ₃ , 0,1 M Na ₂ CO ₃ (pH 9,5)
ELISA-Blockierungslösung	5% (w/v) Magermilchpulver in PBS
ELISA-Stopplösung	0,5 M H ₂ SO ₄
ELISA-Substratlösung	1 TMB-Tablette in 10 ml CP-Puffer lösen, 3 µl 30% H ₂ O ₂ hinzufügen
ELISA-Waschpuffer	0,05% (v/v) Tween [®] 20 in PBS
Elutionspuffer (Ni-NTA)	350 mM Imidazol, 150 mM NaCl in PBS
Elutionspuffer 1 (Antikörperreinigung)	0,1 M Glycin/HCl (pH 3,0)
Elutionspuffer 2 (Antikörperreinigung)	0,1 M NaHCO ₃ , 1,7 M NaCl (pH 9,0)
Ethidiumbromidfärbelösung	5 µg/ml Ethidiumbromid in TAE-Puffer
Geneticin-Lösung	50 mg/ml in ddH ₂ O, sterilfiltriert; 500 µg/ml Endkonzentration
Glucose	2 M in ddH ₂ O, sterilfiltriert
Glycerin/PBS	50% Glycerin, 50% PBS
HEPES	1 M in ddH ₂ O, (pH 7,2 mit NaOH eingestellt), sterilfiltriert
Immunpräzipitations- (IP-) Lysepuffer	50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 1% (v/v) NP-40, (optional 2,5 µl/ml RNase-Lösung, 2,5 µl/ml DNase I, 1 mM PMSF)
IPTG	1 M in ddH ₂ O; Endkonzentration 1 mM
Kanamycin	50 mg/ml in ddH ₂ O; Endkonzentration 50 µg/ml
Kathodenpuffer	10% (v/v) Roti [®] -Blot K, 20% (v/v) Methanol in ddH ₂ O
KCl	1 M in ddH ₂ O, sterilfiltriert
Lysepuffer (<i>Escherichia coli</i> , <i>E. coli</i>)	10 mM Imidazol, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 100 µg/ml Lysozym in PBS
Lysozym-Lösung	10 mg/ml in 10 mM Tris/HCl (pH 8,0)
<i>magnetic-activated cell sorter-</i> (MACS-) Isolationspuffer	2 mM EDTA, 0,5% (v/v) FCS in PBS
MACS Laufpuffer	2 mM EDTA, 10% (v/v) FCS in PBS
MACS Reinigungspuffer	70% (v/v) Ethanol in ddH ₂ O
MACS Spülpuffer	2 mM EDTA in PBS
MeOH/EGTA	eine gesättigte Lösung aus MeOH und EGTA, bei -20 °C gelagert
MgCl ₂	1 M in ddH ₂ O, sterilfiltriert

MgSO ₄	1 M in ddH ₂ O, sterilfiltriert
Natriumbutyrat	500 µM in PBS, sterilfiltriert
NBT/BCIP-Substratlösung	50 µl NBT-Lösung, 37,6 µl BCIP-Lösung in 10 ml AP-Puffer
NBT-Lösung	77 mg/ml in 70% DMF
PBS	9,55 g PBS-Trockensubstanz in 1 l ddH ₂ O gelöst und autoklaviert
PBS-EDTA	1 mM EDTA in PBS, steril
PBS-Trypsin	10% (v/v) Trypsin (10 x) in PBS, steril
PEI-Lösung	1 mg/ml in PBS
PFA-Lösung	4% (w/v) PFA in PBS durch langsames Erhitzen lösen
PMSF	0,1 M PMSF in Isopropanol; Lagerung bei -20 °C; kurz vor Verwendung zu Lysepuffern geben
Polybren	800 µg/ml, sterilfiltriert
Polyvinylidendifluorid- (PVDF-) Transferpuffer	192 mM Glycin, 25 mM Tris, 20% (v/v) Methanol
Ponceau S-Färbelösung	0,1% (w/v) Ponceau S, 5% (v/v) Eisessig in ddH ₂ O
RNase-Lösung	2 mg/ml RNase A und 800 U/ml RNase T1 in 10 mM Tris/HCl, 15 mM NaCl (pH 7,5), kontaminierende DNasen 15 min bei 100°C hitzeinaktiviert
Saccharose-Triton X-100-EDTA-Tris-(STET-) Puffer	8% (w/v) Saccharose, 5% (v/v) Triton X-100; 50 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl (pH 8,0)
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl (pH 6,8), 0,5% (w/v) SDS
SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese- (PAGE-) Laufpuffer	192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1% (w/v) SDS
Transformationspuffer 1 (TFB 1)	30 mM MnCl ₂ , 100 mM RbCl, 10 mM CaCl ₂ , 15% (v/v) Glycerin in ddH ₂ O (pH 5,8); sterilfiltriert
Transformationspuffer 2 (TFB 2)	10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl ₂ , 15% (v/v) Glycerin in ddH ₂ O (pH 6,8); sterilfiltriert
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 0,5% (w/v) SDS
Tris-EDTA- (TE-) Puffer	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA (pH 7,5)
Tris-Essigsäure-EDTA- (TAE-) Puffer	40 mM Tris, 0,11% (v/v) Eisessig, 1 mM EDTA (pH 8,0)
Tris-gepufferte Saline-Tween®20 (TBS-T)	10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween®20
Triton X-100-Lösung	0,1% (v/v) Triton X-100 in PBS
Trypanblau in PBS	10% (v/v) Trypanblaulösung (0,5%) in PBS
Waschpuffer 1 (Ni-NTA)	10 mM Imidazol, 150 mM NaCl in PBS
Waschpuffer 2 (Ni-NTA)	20 mM Imidazol, 150 mM NaCl in PBS
X-Gal	20 mg/ml in DMF; Endkonzentration 40 µg/ml

2.3. Enzyme und Enzypuffer

Enzym	Bezugsquelle
Alkalische Shrimp-Phosphatase (SAP)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Apal</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>BamHI</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>BglII</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DNase I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

2. Materialien

<i>EcoRI</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>HindIII</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Kpn21</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Lysozym	Roche, Mannheim
<i>MluI</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>NcoI</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>NheI</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>NotI</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A	Roche, Mannheim
RNase T1	Roche, Mannheim
<i>SalI</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>SmaI</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>SpeI (BcuI)</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>XhoI</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

2.4. Medien

Medium	Zusammensetzung
2 x YT-Medium	10 g/l NaCl, 10 g/l Bacto TM Hefeextrakt, 12 g/l Bacto TM Trypton; nach dem Autoklavieren 20 mM MgSO ₄ , 10 mM KCl frisch zugeben
Luria Bertani-(LB-) Medium	5 g/l NaCl, 5 g/l Bacto TM Hefeextrakt, 10 g/l Bacto TM Trypton
LB-Platten	zur Herstellung von Agarplatten dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 1,5% (w/v) Bacto TM Agar hinzufügen; vor dem Gießen der Platten das abgekühlte Medium mit den gewünschten Antibiotika bzw. mit IPTG und X-Gal ergänzen
SOC-Medium	0,5 g/l NaCl, 5 g/l Bacto TM Hefeextrakt; 20 g/l Bacto TM Trypton; nach dem Autoklavieren 20 mM Glucose, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ hinzufügen
DMEM	DMEM ^{pur} , 10% (v/v) FCS, 20 mM HEPES, 1% (v/v) nicht essentielle Aminosäuren 100 x, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin
DMEM ^{-p/s}	DMEM ^{pur} , 10% (v/v) FCS, 20 mM HEPES, 1% (v/v) nicht essentielle Aminosäuren 100 x
Hybridoma-medium	RPMI ^{pur} , 10% (v/v) FCS, 20 mM HEPES, 1% (v/v) nicht essentielle Aminosäuren 100 x, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Alanyl-L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 300 U/ml IL-6
RPMI	RPMI ^{pur} , 10% (v/v) FCS, 20 mM HEPES, 1% (v/v) nicht essentielle Aminosäuren 100 x, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Alanyl-L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat
RPMI HS	RPMI ^{pur} , 10% (v/v) HS, 20 mM HEPES, 1% (v/v) nicht essentielle Aminosäuren 100 x, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Alanyl-L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat

2.5. Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdSB(r_B⁻, m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam ^R)	Stratagene, Heidelberg
<i>E. coli</i> TOP10F'	F' <i>lacI^q Tn10 (Tet^R) mcrAΔ (mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80 lacZΔM15ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7679 galU galK rpsL(Str^r) endA1 nupG</i>	Stratagene, Heidelberg

2.6. Adhärenzte Zellen und Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Bezugsquelle
3T3	murine Fibroblastenlinie, adhärenz	ATCC CRL 1658
3T3 LaG	3T3-Zellen, die das genomische hLa-Gen stabil exprimieren (Geneticin ^R)	Prof. M. Bachmann, Institut für Immunologie, TU Dresden
A9	murine Fibroblastenlinie, adhärenz	ATCC CRL 6319
A9 CD33	A9-Zellen, die nach Transduktion das CD33-Gen stabil exprimieren	Institut für Immunologie, TU Dresden
HEK 293T	humane embryonale Nierenzelllinie, stabile Expression des Simian Virus 40 (SV40) large T Antigen-Gens, adhärenz	ATCC CRL 11268
HEK 293T PSCA	humane embryonale Nierenzellen, stabile Expression des Simian Virus 40 (SV40) large T Antigen-Gens und des PSCA-Gens (Geneticin ^R), adhärenz	Institut für Immunologie, TU Dresden
HeLa	humane Cervixkarzinomlinie, adhärenz	DSMZ ACC 57
HUVEC	Nabelschnurendothelzellen, adhärenz	Institut für Physiologie, TU Dresden

2.7. Hybridomazellen

Klonname	Isotyp	Erzeugung	Herkunft
SW5	IgG2b	Immunisierung mit Kaninchen-La-Protein	[146]
7B6	IgG1	Immunisierung mit rhLa-Protein	Prof. M. Bachmann
5B9	IgG2a	Immunisierung mit rhLa ₁₋₁₉₂	Prof. M. Bachmann
24BG7	IgG1	transgen für humanes La-Protein (hLaTg), adoptiver T-Zell-Transfer	Prof. M. Bachmann
22A	IgG1	hLaTg, adoptiver T-Zell-Transfer	Prof. M. Bachmann
27E	IgG2b	hLaTg, adoptiver T-Zell-Transfer	Prof. M. Bachmann
312B	IgG1	hLaTg, adoptiver T-Zell-Transfer	Prof. M. Bachmann
2F9	IgG1	hLaTg, adoptiver T-Zell-Transfer	Prof. M. Bachmann
32A	IgG1	hLaTg, adoptiver T-Zell-Transfer	Prof. M. Bachmann
16C	IgM	hLaTg, adoptiver T-Zell-Transfer	Prof. M. Bachmann
13C5B	IgM	hLaTg, adoptiver T-Zell-Transfer	Prof. M. Bachmann
312G	IgM	hLaTg, adoptiver T-Zell-Transfer	Prof. M. Bachmann

2.8. Antikörper

Für die Antikörper sind die eingesetzten Verdünnungen im Western Blot (WB), in der Immunfluoreszenz (IF), im ELISA sowie in der Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorter*, FACS) angegeben. Die Abkürzungen für Enzyme, Proteine und Farbstoffe können dem Abkürzungsverzeichnis entnommen werden.

Antikörper	Ursprung	Verwendete Verdünnung	Bezugsquelle
<u>Primärantikörper</u>			
anti-GFP (Klone 7.1 und 13.1)	Maus	<u>WB</u> : 1:3000	Roche, Mannheim
Hybridomaüberstände (SW5, 7B6, 5B9, 24BG7, 22A, 27E, 312B, 2F9, 32A, 16C, 13C5B, 312G)	Maus	<u>IF, FACS, ELISA</u> : unverdünnt <u>WB</u> : 1:50 (2F9 1:10; 32A 1:5; 16C, 13C5B, 312G unverdünnt)	eigene Herstellung
Mausserum	Maus	<u>FACS</u> : 1:100 (zur Blockierung)	Institut für Immunologie, TU Dresden
OKT3 (anti-CD3)	Maus	T-Zell-Stimulation	eBioscience; NatuTec, Frankfurt
Patienten- (anti-La-positiv) und Normalseren (anti-La-negativ)	Mensch	<u>WB, FACS</u> : 1:5000 <u>IF, ELISA</u> : 1:1000	OMRF, Oklahoma (USA); Kooperation mit Prof. Bachmann
Penta-His (anti-His)	Maus	<u>WB</u> : 1:1000	Qiagen, Hilden
ULBP2-CD33	rekombinant	<u>FACS</u> : 2,5 µg unverdünnt	Institut für Immunologie, TU Dresden
<u>Sekundärantikörper</u>			
anti-DIG-AP Fab-Fragmente (anti-DIG-AP)	Schaf	<u>WB</u> : 1:1000	Roche, Mannheim
anti-DIG-FITC Fab-Fragmente (anti-DIG-FITC)	Schaf	<u>FACS</u> : 1:25	Roche, Mannheim
anti-human-IgG+IgM-AP	Ziege	<u>WB</u> : 1:2500	Jackson Immunoresearch; Dianova, Hamburg
anti-human-IgG-Alexa Fluor®488	Ziege	<u>IF, FACS</u> : 1:400	Invitrogen, Karlsruhe
anti-human-IgG-POD	Ziege	<u>ELISA</u> : 1:40000	Sigma-Aldrich, Steinheim
anti-Maus-Ig F(ab') ₂ -FITC	Kaninchen	<u>FACS</u> : 1:200	Dako, Hamburg
anti-Maus-IgG F(ab') ₂ -PE	Ziege	<u>FACS</u> : 1:400	Beckman Coulter, Krefeld
anti-Maus-Ig-AP	Ziege	<u>WB</u> : 1:100	Biosource; Invitrogen, Karlsruhe
anti-Maus-IgG-Alexa Fluor®488	Ziege	<u>IF, FACS</u> : 1:400	Invitrogen, Karlsruhe
anti-Maus-IgG-Alexa Fluor®568	Ziege	<u>IF</u> : 1:400	Invitrogen, Karlsruhe
anti-Maus-IgG-AP	Kaninchen	<u>WB</u> : 1:2500	Jackson Immunoresearch; Dianova, Hamburg
anti-Maus-IgG-Cy3	Ziege	<u>IF</u> : 1:400	Dianova, Hamburg

anti-Maus-IgG-POD	Kaninchen	<u>ELISA</u> : 1:40000	Sigma-Aldrich, Steinheim
anti-Maus-IgM-Alexa Fluor®568	Ziege	<u>IF</u> : 1:400	Invitrogen, Karlsruhe
anti-Maus-Ig-POD, polyklonal	Ziege	<u>ELISA</u> : 1:1 000	Dako, Hamburg
Maus IgG TrueBlot™-POD		<u>WB</u> : 1:1000	eBioscience; NatuTec, Frankfurt

Direkt markierte Antikörper

anti-(human)-CD14-PE	Maus	<u>FACS</u> : 2 µl unv.	BD Biosciences, Heidelberg
anti-(human)-CD19-PE	Maus	<u>FACS</u> : 2 µl unv.	BD Biosciences, Heidelberg
anti-(human)-CD25-PE	Maus	<u>FACS</u> : 1 µl unv.	BD Biosciences, Heidelberg
anti-(human)-CD314-PE (NKG2D)	Maus	<u>FACS</u> : 1 µl unv.	BD Biosciences, Heidelberg
anti-(human)-CD33-PE	Maus	<u>FACS</u> : 1 µl unv.	BD Biosciences, Heidelberg
anti-(human)-CD3-FITC	Maus	<u>FACS</u> : 1 µl unv.	BD Biosciences, Heidelberg
anti-(human)-CD3-PE-Cy5	Maus	<u>FACS</u> : 2 µl unv.	BD Biosciences, Heidelberg
anti-(human)-CD4-FITC	Maus	<u>FACS</u> : 1 µl unv.	Immunotools, Friesoythe
anti-(human)-CD4-PE-Cy5	Maus	<u>FACS</u> : 2 µl unv.	BD Biosciences, Heidelberg
anti-(human)-CD56-PE	Maus	<u>FACS</u> : 2 µl unv.	Immunotools, Friesoythe
anti-(human)-CD56-PE-Cy5	Maus	<u>FACS</u> : 3 µl unv.	BD Biosciences, Heidelberg
anti-(human)-CD8-PE	Maus	<u>FACS</u> : 2 µl unv.	BD Biosciences, Heidelberg
anti-(human)-CD8-PE-Cy5	Maus	<u>FACS</u> : 2 µl unv.	BD Biosciences, Heidelberg
anti-c-myc-FITC		<u>FACS</u> : 1 µl unv.	AbD Serotec; Morphosys AbD, Düsseldorf
anti-Slan (M-DC8)-PE	Maus	<u>FACS</u> : 2 µl unv.	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
IgG1-Isotyp-Kontroll-Antikörper- PE oder -FITC	Maus	<u>FACS</u> : 1 µl unv.	BD Biosciences, Heidelberg

2.9. Plasmide

Plasmid	Anwendung	Bezugsquelle
pET-28a-c	bakterieller Expressionsvektor	Novagen, Darmstadt
pSecTag2 B	eukaryonter Expressionsvektor	Invitrogen, Karlsruhe
pEGFP-C1/C2/C3	eukaryonte Transfektion	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
pCI	eukaryonter Expressionsvektor	Promega, Mannheim
pcz CFG5.1	Transfektor des retroviralen MMLV- Vektorsystems	Institut für Immunologie, TU Dresden
pHIT60	<i>Gag/Pol</i> -Vektor des retroviralen MMLV- Vektorsystems	Institut für Immunologie, TU Dresden

2. Materialien

pMD2G	<i>Env</i> -Vektor des retroviralen MMLV-Vektorsystems	Institut für Immunologie, TU Dresden
pET-28a-Ro 60	bakterieller Expressionsvektor für Ro 60	Institut für Immunologie, TU Dresden
pGEM®-T Easy-CAT	Matrize zur Synthese von DIG-RNA	Institut für Immunologie, TU Dresden
pSecTag2 B-7B6 scFv	eukaryonter Expressionsvektor für 7B6 scFv	Institut für Immunologie, TU Dresden
pSecTag2 B-5B9 scFv	eukaryonter Expressionsvektor für 5B9 scFv	Institut für Immunologie, TU Dresden
pSecTag2 B-7B6 scFv ic	Ursprungsvektor mit der 7B6 „inneren Kasette“ für die Klonierung des Diabodies CD3x7B6	Institut für Immunologie, TU Dresden
pSecTag2 B-CD3 scFv oc	Ursprungsvektor mit der CD3 „äußeren Kasette“ für die Klonierung des Diabodies CD3x7B6	Institut für Immunologie, TU Dresden
pSecTag2 B-CD3x7B6 scBsDb	eukaryonter Expressionsvektor für CD3x7B6 scBsDb	diese Arbeit
pcz CFG5.1-CD3x7B6 scBsDb	Transfervektor des retroviralen MMLV-Vektorsystems für die stabile Transduktion von HEK 203T mit CD3x7B6 scBsDb	diese Arbeit

Im Folgenden sind die Vektoren für die La-Fragmente aufgelistet, die von Prof. Bachmann zur Verfügung gestellt bzw. in dieser Arbeit neu erzeugt (*) wurden. Die Klonierungsschritte für die neuen Plasmide sind im Anhang (Kapitel 8) tabellarisch aufgeführt. Alle pET-Plasmide wurden für die bakterielle Proteinproduktion verwendet, die pCI- und pEGFP-Vektoren für die Transfektion eukaryonter Zellen. Einige Plasmide dienten als Ausgangsvektoren für weitere Klonierungen. Die pGEM®-T Easy-Vektoren mit den enthaltenen variablen Sequenzen der schweren und leichten Ketten jedes anti-La-mAks wurden nicht einzeln aufgeführt.

Plasmid

La-Fragment

pET-Plasmide für die prokaryonte Proteinherstellung

pET-3d-La8A	rhLa (La ₁₋₄₀₈)
pET-28b-Maus La*	rmLa
pET-28a-LaΔC3	La ₁₋₁₂₆
pET-28a-La9A*	La ₁₋₁₉₂ (LaN)
pET-28a-LaΔC6	La ₁₋₂₄₅
pET-28a-LaΔC9	La ₁₋₃₇₁
pET-28a-LaΔN4	La ₁₅₉₋₄₀₈
pET-28a-LaC	La ₁₉₄₋₄₀₈ (LaC)
pET-28a-LaΔN6	La ₂₃₉₋₄₀₈
pET-28a-LaΔN7	La ₂₇₈₋₄₀₈
pET-28a-LaΔN8 (polyPro)	La ₃₁₈₋₄₀₈
pET-28a-LaΔN8 (ohne polyPro)*	La ₃₁₈₋₄₀₈
pET-28a-LaΔN9-11AS	La ₃₆₉₋₃₉₇
pET-28a-LaΔN9 (neu, kurz)*	La ₃₆₉₋₄₀₈

pET-Plasmide für die Einengung des 7B6-Epitops

pET-28b-La 7B6-Epitop II	La ₃₀₉₋₃₂₃ (II)
pET-28b-La 7B6-Epitop III	La ₃₀₉₋₃₂₆ (III)
pET-28b-La 7B6-Epitop IV	La ₃₀₆₋₃₂₃ (IV)
pET-28b-La 7B6-Epitop V	La ₃₀₆₋₃₂₆ (V)
pET-28b-La 7B6-Epitop VI	La ₃₀₃₋₃₂₃ (VI)
pET-28b-La 7B6-Epitop VII	La ₃₀₃₋₃₂₆ (VII)
pET-28b-La 7B6-Epitop VIII	La ₃₀₃₋₃₃₁ (VIII)
pET-28b-La 7B6-Epitop IX	La ₃₀₉₋₃₃₃ (IX)
pET-28b-La 7B6-Epitop X	La ₃₀₃₋₃₃₃ (X)
pET-28b-La 7B6-Epitop XI	La ₃₀₃₋₃₃₈ (XI)
pET-28b-La 7B6-Epitop XII	La ₃₀₃₋₃₄₄ (XII)
pET-28b-La 7B6-Epitop XIV	La ₃₁₁₋₃₃₁ (XIV)
pET-28b-La 7B6-Epitop XV	La ₃₁₅₋₃₂₉ (XV)
pET-28b-La 7B6-Epitop XVI	La ₃₀₉₋₃₂₉ (XVI)
pET-28b-La 7B6-Epitop XVII	La ₃₀₆₋₃₂₉ (XVII)
pET-28b-La 7B6-Epitop XVIII	La ₃₁₁₋₃₂₈ (XVIII, 7B6-Epitop)
pET-28b-La 7B6-Epitop XIX	La ₃₁₁₋₃₂₇ (XIX)
pET-28b-La 7B6-Epitop XXI	La ₃₁₃₋₃₂₈ (XXI)

Eukaryonte Transfektionsvektoren

pHis-La-EGFP-N3	His-La-GFP
pCI-GFP-La-His	GFP-La-His
pEGFP-N3-La8A	La ₁₋₄₀₈
pEGFP-C3-Maus La*	mLa
pEGFP-C2-LaΔC2/C3 (<i>SacI</i>)*	La ₁₋₉₄
pEGFP-C2-La AA1-100 (rev3)*	La ₁₋₁₀₀
pEGFP-C2-La AA5-100*	La ₅₋₁₀₀
pEGFP-C2-La AA10-100*	La ₁₀₋₁₀₀
pEGFP-C2-La AA15-100*	La ₁₅₋₁₀₀
pEGFP-C2-La AA20-100*	La ₂₀₋₁₀₀
pEGFP-C2-La AA86-100 (F7)*	La ₈₆₋₁₀₀
pEGFP-C2-La AA1-104*	La ₁₋₁₀₄
pEGFP-C2-La AA90-104 (F1)*	La ₉₀₋₁₀₄
pEGFP-C2 La AA94-104 (5B9-Epitop, F5)*	La ₉₄₋₁₀₄ (5B9-Epitop)
pEGFP-C2-La AA1-112*	La ₁₋₁₁₂
pEGFP-C2-La AA82-112*	La ₈₂₋₁₁₂
pEGFP-C2-LaΔC3*	La ₁₋₁₂₆
pCI-La9A	La ₁₋₁₉₂ (LaN)
pEGFP-C1-La9A*	La ₁₋₁₉₂ (LaN)
pEGFP-C2-LaΔC6*	La ₁₋₂₄₅
pEGFP-C2-LaΔC7/C7Apo*	La ₁₋₃₁₀

2. Materialien

pEGFP-C2-La Δ C7Apo*	La ₁₋₃₄₄
pEGFP-C2-La AA107-200*	La ₁₀₇₋₂₀₀
pEGFP-C2-La AA120-245*	La ₁₂₀₋₂₄₅
pEGFP-C1-LaC*	La ₁₉₄₋₄₀₈ (LaC)
pEGFP-C2-La Δ N7*	La ₂₇₈₋₄₀₈
pEGFP-C3-La Δ N7/N8*	La ₂₉₅₋₄₀₈
pEGFP-C2-La Δ N8 (ohne polyPro)*	La ₃₁₈₋₄₀₈
pEGFP-C3-La Δ N8/N9*	La ₃₄₆₋₄₀₈
pEGFP-C2-La Δ N9-11AS*	La ₃₆₉₋₃₉₇
pEGFP-C2-La Δ N9*	La ₃₆₉₋₄₀₈
pEGFP-C2-La Δ N10*	La ₃₇₆₋₄₀₈

Punktmutanten des 7B6-Epitops

pCI-La 7B6-Epitop pEGFP-C2-(a)*	7B6-Epitop (IE)
pCI-La 7B6-Epitop MutT pEGFP-C2-(b)*	7B6-Epitop (TE)
pCI-La 7B6-Epitop MutD pEGFP-C2-(c)*	7B6-Epitop (ID)
pCI-La 7B6-Epitop MutTD pEGFP-C2 (d)*	7B6-Epitop (TD)
pCI-La 7B6-Epitop StoA pEGFP-C2-(e)*	7B6-Epitop S > A
pCI-La 7B6-Epitop StoD pEGFP-C2-(f)*	7B6-Epitop S > D
pCI-La 7B6-Epitop pEGFP-C2-La Δ N9 (1)*	7B6-Epitop (IE)-NLS
pCI-La 7B6-Epitop MutT pEGFP-C2-La Δ N9 (2)*	7B6-Epitop (TE)-NLS
pCI-La 7B6-Epitop MutD pEGFP-C2-La Δ N9 (3)*	7B6-Epitop (ID)-NLS
pCI-La 7B6-Epitop MutTD pEGFP-C2-La Δ N9 (4)*	7B6-Epitop (TD)-NLS
pCI-La 7B6-Epitop StoA pEGFP-C2-La Δ N9 (5)*	7B6-Epitop S > A-NLS
pCI-La 7B6-Epitop StoD pEGFP-C2-La Δ N9 (6)*	7B6-Epitop S > D-NLS

Punktmutanten des 5B9-Epitops

pEGFP-C2-La 5B9-Epitop minus S*	5B9-Epitop minus S
pEGFP-C2-La 5B9-Epitop StoA*	5B9-Epitop S > A
pEGFP-C2-La 5B9-Epitop StoE*	5B9-Epitop S > E
pEGFP-C2-La 5B9-Epitop KtoR; EtoG*	5B9-Epitop K > R, E99 > G
pEGFP-C2-La 5B9-Epitop minus Y*	5B9-Epitop minus Y
pEGFP-C2-La 5B9-Epitop YtoW*	5B9-Epitop Y > W
pEGFP-C2-La 5B9-Epitop YtoF*	5B9-Epitop Y > F
pEGFP-C2-La 5B9-Epitop minus 99-101; YtoW*	5B9-Epitop Δ 99-101, Y > W
pEGFP-C2-La 5B9-Epitop EtoV*	5B9-Epitop E103 > V
pEGFP-C2-La 5B9-Epitop minus 97-98; YtoF*	5B9-Epitop Δ 97-98, Y > F
pEGFP-C2-La 5B9-Epitop KtoR*	5B9-Epitop K > R

2.10. Molekulargewichtsmarker

Marker	Bezugsquelle
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
MassRuler™ DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

2.11. Oligonukleotide

Die verwendeten Primer wurden von Invitrogen bezogen. Die in lyophilisierter Form gelieferten Oligonukleotide wurden in sterilem H₂O oder TE-Puffer gelöst und auf 100 pmol/μl eingestellt. In den Sequenzen entsprechen A, G, T, C den Basen Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin. Für die degenerierten Primer wurde die Standardnomenklatur verwendet: Y (C+T), M (A+C), S (G+C), R (A+G), W (A+T), N (A+C+G+T). In fett sind die degenerierten Sequenzbereiche markiert, die in der FWR1 der leichten bzw. schweren Ketten binden. Die angefügten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Primer	Sequenz in 5'→3' Richtung
C7_C7Apo (<i>EcoRI</i>)-F1	<u>GAATTC</u> ATGGCTGAAAATGG
C7_C7Apo (<i>SalI</i>)-R2	GTCGACTTACACCTCTCCTTAGTA
DD2 <i>EcoRI</i> 1F	<u>GAATTC</u> TAGGGAGACCCAAGCTGGCT
DD2 <i>Kpn2I</i> 2R	<u>TCCGGA</u> AGGCACAGTCGAGGCTGATC
HCfor2	TTTTGGATCCS ARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG
IgG1rev	GGAAGATCTATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC
IgG2Arev	GGAAGATCTCTTGACCAGGCATCCTAGAGTCA
IgG2Brev	GGAAGATCTAGGGGCCAGTGGATAGACTGA
IgMrev	ATTGGGACTAGTTTCTGCGACAGCTGGATT
La (AA120) <i>EcoRI</i> 1F	AATGAATTCGATGACATAAAAGAATGG
La (Delta) N10 (<i>EcoRI</i>) 1F	<u>GAATTC</u> AATGGTCAACTGGACCTGTG
La (DeltaC6) (<i>NotI</i>) 2R	GAGTGCGGCCGCCTAACAGGTCTGATCATC
La 7B6-Epitop <i>SpeI</i> 18R	<u>ACTAGTCC</u> ATTTGTTTAGGGATTC
La 7B6-Epitop VII <i>SpeI</i> 16R	<u>ACTAGTTG</u> ACTTCCATTTGTTTAGG
La 7B6-Epitop <i>XhoI</i> 13F	<u>CTCGAGAA</u> AGAAGCACTGAAG
La AA10 (<i>BglII</i>) 1F	<u>AGATCT</u> CGATGGCTGCCCTGGAGGC
La AA107 (<i>EcoRI</i>) 1F	<u>GAATTC</u> GATGTAAAAACAGATCTG
La AA15 (<i>BglII</i>) 1F	<u>AGATCT</u> CGGCCAAAATCTGTCATCA
La AA20 (<i>BglII</i>) 1F	<u>AGATCT</u> ATCAAATTGAGTATTATTTTG
La AA200 (<i>BamHI</i>) 2R	<u>GGATCCT</u> TATTTATTTGTTTTCTTTCTTC
La AA5 (<i>BglII</i>) 1F	<u>AGATCT</u> CGGATAATGAAAAGATGGCTG
La AA82 <i>BglII</i> F1	<u>AGATCT</u> TAAATCAGTGAAGATAAACTAAAATC

2. Materialien

La AA86 <i>Bgl</i> II F7	<u>AGATCT</u> ATAAACTAAAATCAGAAGGTC
La AA90 <i>Bgl</i> II F1	<u>AGATCT</u> TCAGAAGGTCTCCAAGCAAACC
La AA94 <i>Bgl</i> II F5	<u>AGATCT</u> CAAGCAAACCCCTACCTGAAGT
La DeltaC2C3 (<i>Apa</i> I) 2R	<u>GGGCC</u> CTAGCTTGGAGACCTTCTGAT
La5B9 (EtoV) <i>Bgl</i> II 1F	<u>AGATCT</u> TAAGCAAACCCCTACCTGAAGTGACTGATGTGTATTCTA GATAACTGATCATAATCAG
La5B9 (KtoR) <i>Bgl</i> II 1F	<u>AGATCT</u> TAAGCCGACCCCTACCTGAAGTGACTGATGAGTATTCTA GATAACTGATCATAATCAG
La5B9 (KtoR, EtoG) <i>Bgl</i> II 1F	<u>AGATCT</u> TAAGCCGACCCCTACCTGGAGTGACTGATGAGTATTCTA GATAACTGATCATAATCAG
La5B9 (minus 97-98; YtoF) <i>Bgl</i> II 1F	<u>AGATCT</u> TAAGCAAACCCGAAGTGACTGATGAGTTCTCTA GATAACTGATCATAATCAG
La5B9 (minus 99-101; YtoW) <i>Bgl</i> II 1F	<u>AGATCT</u> TAAGCAAACCCCTACCTGATGAGTGGTCTA GATAACTGATCATAATCAG
La5B9 (minusS) <i>Bgl</i> II 1F	<u>AGATCT</u> TAAAACCCCTACCTGAAGTGACTGATGAGTATTCTA GATAACTGATCATAATCAG
La5B9 (minusY) <i>Bgl</i> II 1F	<u>AGATCT</u> TAAGCAAACCCCTACCTGAAGTGACTGATGAGTCTA GATAACTGATCATAATCAG
La5B9 (StoA) <i>Bgl</i> II 1F	<u>AGATCT</u> TAGCCAAACCCCTACCTGAAGTGACTGATGAGTATTCTA GATAACTGATCATAATCAG
La5B9 (StoE) <i>Bgl</i> II 1F	<u>AGATCT</u> TAGAGAAACCCCTACCTGAAGTGACTGATGAGTATTCTA GATAACTGATCATAATCAG
La5B9 (YtoF) <i>Bgl</i> II 1F	<u>AGATCT</u> TAAGCAAACCCCTACCTGAAGTGACTGATGAGTTCTCTA GATAACTGATCATAATCAG
La5B9 (YtoW) <i>Bgl</i> II 1F	<u>AGATCT</u> TAAGCAAACCCCTACCTGAAGTGACTGATGAGTGGTCTA GATAACTGATCATAATCAG
La7B6-EpitopX (<i>Spe</i> I) 10R	<u>ACTAGT</u> ACCTTTTGACTTCCATTTGTTTAGGGATTCTTGTTGGTCTTC
La7B6-EpitopXI (<i>Spe</i> I) 12R	<u>ACTAGT</u> TCCTTTAAATCTACGACCTTTTGACTTCCATTTGTTT AGGGATTCTTGTTGGTCTTC
La7B6-EpitopXII (<i>Spe</i> I) 14R	<u>ACTAGT</u> TTTTATTACCTTTTCCTTTTAAATCTACGACCTTTT GACTTCCATTTGTTTAGGGATTCTTGTTGGTCTTC
La-7B6 Primer <i>Spe</i> I 20R	<u>ACTAGT</u> TTTTGTTTAGGGATTCTTGTTG
La-7B6 Primer <i>Spe</i> I 22R	<u>ACTAGT</u> GTGTTTAGGGATTCTTGTTGG
La-7B6 Primer <i>Xho</i> I 17F	<u>CTCGAG</u> GCACTGAAGAAAATAATAG
LaDelta N9 (<i>Eco</i> RI) 1F	<u>GAATTC</u> GAACATGATGAACATGATG
La-Delta_C7-Apo-F (<i>Hind</i> III, <i>Eco</i> RI)	CTCAAGCTT <u>CGAATTC</u> ATGGC
La-Delta_C7-Apo-R (<i>Sal</i> I)	<u>CGTCGAC</u> CAGGCTGGGCAGCTTTATTA
La-Delta_N8-N9-F (<i>Eco</i> RI)	<u>GAATTC</u> ATGCCAGCCTGGGTCTGGTAAAGGAA
La-Delta_N8-N9-R (<i>Not</i> I, <i>Bgl</i> II)	<u>TGCGGCC</u> GCCTAAGATCTGG
LCfor	TTTTTGAATTCT GAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA
LCkrev	TTTTTGGGCCCGATACAGTTGGTGCAGCATC
MausLa (<i>Bam</i> HI) ORF 1F	<u>GGATCC</u> GATGGCTGAAAATGGAGATAATG
MausLa ORF 2R	CGAAGTGGCCTAATTCGCT

<i>Mlu</i> I Rev	<u>ATCAATGTATCTTAACGCGT</u>
N7-N8 (<i>Eco</i> RI/ATG)-F1	<u>GAATTCATGCAATTAAGGAACAAAGAAGT</u>
pEGFPfor	AGTGAACCGTCAGATCCGCT
pET28 (<i>Mlu</i> I) 3F	AATGATCAGCCCACTGACGC
pET28 7B6 <i>Spe</i> I 6R	<u>ACTAGTTAGGGATTCTGTTGATCTTCTATTATTTCTTCAGTG</u>
pET28 7B6 <i>Xho</i> I 7F	<u>CTCGAGGGAGAGGTGGAAAAAGAAGCACTG</u>
pET28 7B6 <i>Xho</i> I 9F	<u>CTCGAGTGGGAAGTACTAGAAGGAGAGGTGGAAAAAGAAGC</u>
pET28_7B6_ <i>Xho</i> I/ <i>Spe</i> I_5F	<u>CTCGAGGTGGAAAAAGAAGCACTGAAGAAAATAATAGAAGA</u> <u>CCAACAACTAGTCAACCACCACCACCACCACTGA</u>
pET28_ <i>Sma</i> I_4R	<u>CCCGGGAAAACAGCATTG</u>
pET28_ <i>Sma</i> I_4R	<u>CCCGGGAAAACAGCATTG</u>
Reverse 3 <i>Bam</i> HI	<u>GGATCCACTCACTTCAGGTAGGGGTTTGC</u>
Reverse MLU	<u>ACGCGTTAAGATACATTGAT</u>
Reverse2. <i>Bam</i> HI	<u>GGATCCACTATACTCATCAGTCACTTCAG</u>
XVIII MutStoD 1F (<i>Nhe</i> I)	<u>GCTAGCCATGGAGAAAGAAGCACTGAAGAAAATAATAGAAGACC</u> <u>AACAAGAAGACCTAAACAACTACCGGTCGCCACCATG</u>
XVIII_EGFP_N9 (<i>Nhe</i> I) 1F	<u>GCTAGCCATGGAGAAAGAAGCACTGAAGAAAATAATAGAAGACC</u> <u>AACAAGAATCCCTAAACAACTACCGGTCGCCACCATG</u>
XVIII_EGFP_N9 2R	CCTCTACAAATGTGGTATGGCTG
XVIII_MutStoA_N9 (<i>Nhe</i> I) 1F	<u>GCTAGCCATGGAGAAAGAAGCACTGAAGAAAATAATAGAAGACC</u> <u>AACAAGAAGCCCTAAACAACTACCGGTCGCCACCATG</u>
XVIII_N9 MutD(<i>Nhe</i> I) 5F	<u>GCTAGCCATGGAGAAAGAAGCACTGAAGAAAATAATAGACGACC</u> <u>AACAAGAATCCCTAAACAACTACCGGTCGCCACCATG</u>
XVIII_N9 MutT(<i>Nhe</i> I) 3F	<u>GCTAGCCATGGAGAAAGAAGCACTGAAGAAAATAACAGAAGACC</u> <u>AACAAGAATCCCTAAACAACTACCGGTCGCCACCATG</u>
XVIII_N9 MutTD(<i>Nhe</i> I) 7F	<u>GCTAGCCATGGAGAAAGAAGCACTGAAGAAAATAACAGACGACC</u> <u>AACAAGAATCCCTAAACAACTACCGGTCGCCACCATG</u>

2.12. Testkitsysteme

Name	Hersteller
Advantage RT-for-PCR Kit	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
Advantage™ HF2 PCR System	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
DIG RNA Labeling Kit	Roche, Mannheim
Invisorb Plasmid Maxi Kit	Invitek, Berlin
MACS NK-Zell-Isolationskit II, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
PCR DIG Labeling Mix	Roche, Mannheim
pGEM®-T Easy Kit	Promega, Mannheim
Quick Start Bradford Protein Assay Kit 3	Biorad, München
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research; HiSS Diagnostics, Freiburg
Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research; HiSS Diagnostics, Freiburg

2.13. Verbrauchsmaterialien

Produkt	Bezugsquelle
6-well-Platten, 12-well-Platten, 24-well-Platten, 96-well-Spitzbodenplatten, 10 cm-Kulturschalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
96U-well-Platten und 96F-well-Platten	TPP; Bichrom, Berlin
Deckgläschen ø 10 mm und Objektträger	Hecht-Assistent; Sondheim
Einweg-Plastikküvetten (1 cm)	Brand, Wertheim
ELISA-Platten Nunc MaxiSorp™	eBioscience; NatuTec, Frankfurt
FACS-Röhrchen, 5 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Gewebekulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Glaswolle	Supelco; Sigma-Aldrich, Steinheim
Greinerröhrchen (15 ml und 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Immersionsöl Immersol™ 518F	Carl Zeiss, Oberkochen
Kryoröhrchen	TPP; Bichrom, Berlin
Ni-NTA Spin Columns	Qiagen, Hilden
Nitrocellulosemembran Hybond™-C extra	GE Healthcare, Freiburg
OptiPlate-96 für Wallac 1465 MicroBeta® TriLux	PerkinElmer LAS, Rodgau-Juegesheim
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Biozym, Hess. Oldendorf
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen, gestopft	Biozym, Hess. Oldendorf
Plastikspritzen (5 ml und 10 ml)	B. Braun, Melsungen
PVDF-Membran Hybond™-P	GE Healthcare, Freiburg
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1 ml oder 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Spectra/Por® Dialysemembran (Ausschlussgröße 3500 Da)	Carl Roth, Karlsruhe
Stericup® & Steritop® 0,22 µm	Millipore, Schwalbach
Sterilfilter (0,2 µm und 0,45 µm)	Schleicher & Schüll, Dassel
Sterilpipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Whatmann 3MM Filterpapier	Whatman; VWR, Darmstadt

2.14. Geräte und Software

Produkt	Bezugsquelle
Auflichtmikroskop Olympus CK30	Olympus, Hamburg
AutoMACS	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
AxioVision Release 4.6.3	Carl Zeiss MicroImaging, Jena
Bakterienschüttler Infors HT	Infors, Bottmingen (CH)
Blotting Gerät Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Biorad, München
Branson Sonifier 250	G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Brutschrank HERA cell 240	Heraeus, Hanau
ChemiDoc XRS System	Biorad, München
Einfriergefäß Nalgene™ cryo 1°C Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, Wiesbaden

ELISA-Platten-Lesegerät anthos HT2	Anthos, Wals (A)
Eppendorf Reference® Pipettensatz	Eppendorf, Hamburg
FACScan® Becton Dickinson	BD Biosciences, Heidelberg
Feinwaage Sartorius BP 221 S	Sartorius, Goettingen
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss, Jena
Flüssig-Szintillationszähler Wallac 1465 MicroBeta® TriLux	PerkinElmer LAS, Rodgau-Juegesheim
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg
IgBlast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/)	[147]
Magnetrührer IKA® RH basic	IKA, Staufen
Minishaker MS2 (Vortexer)	IKA, Staufen
MOLMOL	[148]
Neubauerzählkammer	LO-Laboroptik, Friedrichsdorf
pH-Meter 763 Multi-Calimatic	Knick, Berlin
Pipettierhilfe Matrix Cell Mate II	Thermo Fisher Scientific, Wiesbaden
Reinstwasseranlage USF Elga	Elga Labwater, Celle
Rotator test-tube-rotator 34528	Snijders, Tilburg, NL
Spannungsgerät PowerPac™ universal	Biorad, München
Spektrophotometer SmartSpec™ 3000 mit Quartzküvette	Biorad, München
Sterilbank clean LAV VFRS 1206	Claus Damm, Humlebæk, DK
Sub-Cell® GT Agarosegelelektrophoresesystem	Biorad, München
Thermocycler UNO II	Biometra, Göttingen
Tischkühlzentrifuge Sigma 3K30	Sigma Laborzentrifugen, Osterode
UVC 500 Ultraviolet Crosslinker	Hoefer; GE Healthcare, Freiburg
UV-Transilluminator	Biostep, Jahnsdorf
Vakuumanlage Vacuubrand	Vacuubrand, Wertheim
Vector NTI 9.0	Invitrogen, Karlsruhe
Vertikale Gelelektrophoreseapparatur Mini-PROTEAN® III	Biorad, München
Waage Sartorius BP 2100 S	Sartorius, Goettingen
Wasserbad Assistent WTE var 3185	Hecht-Assistent; Sondheim
WinMDI 2.8	J. Trotter, La Jolla, USA
Wippschüttler GFL 3017	GFL, Burgwedel
Zentrifuge Eppendorf 5415 C	Eppendorf Zentrifugen, Leipzig
Zentrifuge Heraeus Biofuge primo R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Rotixa 120 RS mit Einsätzen und Zentrifugenbechern	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Zentrifuge Sorvall® RC-5B	Du Pont Instruments, Bad Homburg

3. Methoden

3.1. Molekularbiologische Methoden

3.1.1. Isolation von RNA aus Hybridomazellen

Für den Aufschluss eukaryonter Zellen kann das TriPure™ Isolierungsreagenz, bestehend aus Phenol und Guanidiniumthiocyanat, verwendet werden. Nach Chloroformzugabe und einem anschließenden Zentrifugationsschritt entsteht ein Flüssigphasensystem, aus dem bei Bedarf außer der RNA auch DNA und Proteine isoliert werden können [149].

Die Zellen wurden pelletiert (5 min, 360 x g, RT), um das Medium zu entfernen, und direkt in TriPure-Reagenz resuspendiert. Für $5 \cdot 10^6$ Zellen wurden 3 ml TriPure-Reagenz eingesetzt. Die Zellysate wurden für 5 min bei RT inkubiert und anschließend wurden 600 µl Chloroform hinzugefügt. Nach Schütteln für 15 s wurde das Gemisch für 15 min bei RT inkubiert. Zur Phasentrennung wurde 15 min bei 4 °C und 12000 x g zentrifugiert. Die obere, RNA-enhaltende wässrige Phase wurde in ein frisches 15 ml Greinerröhrchen überführt. Durch Zusatz von 1,5 ml Isopropanol, mehrmaliges Invertieren des Röhrchens und Inkubation für 5-10 min bei RT wurde die RNA präzipitiert. Nach erneuter Zentrifugation (15 min, 4 °C, 12000 x g) wurde das RNA-Pellet mit 3 ml 75% (v/v) Ethanol gewaschen.

Die präzipitierte RNA wurde zentrifugiert (4777 x g, 4 °C, 10 min im ausschwenkbaren Rotor), das Ethanol möglichst vollständig entfernt und das Pellet wurde luftgetrocknet (etwa 10 min). Abschließend wurden 150 µl DEPC-ddH₂O zum Pellet gegeben und die RNA wurde für etwa 10 min bei 60 °C gelöst. Die Konzentration an isolierter RNA wurde photometrisch aus einer 50-fachen Verdünnung bestimmt (Abschnitt 3.1.6). Die Lagerung erfolgte in Aliquots bei -80 °C.

3.1.2. Polymerasekettenreaktion

Die exponentielle Amplifikation bestimmter DNA-Fragmente wird als Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) bezeichnet [150]. Zuerst wird die Ausgangs-DNA (Matrize oder *template*) auf 95 °C erhitzt, um den Doppelstrang aufzuschmelzen. Nun werden bei niedrigeren Temperaturen sequenzspezifische kurze Oligonukleotide (sogenannte Primer) auf die Matrize hybridisiert. Dann wird eine DNA-Polymerase eingesetzt, die ausgehend vom Primer den komplementären DNA-Strang in 5'→3'-Richtung synthetisiert. Anschließend wird die dsDNA durch Erhitzen auf 95 °C in ihre beiden Einzelstränge aufgelöst. Nun kann eine neue Runde aus Primer-Anlagerung (*annealing*), DNA-Synthese und DNA-Denaturierung erfolgen. Nach jedem Zyklus nimmt die Zahl der Moleküle exponentiell zu. Voraussetzung ist die Verwendung hitzestabiler DNA-Polymerasen. Zur Klonierung von Genabschnitten wird oft die schnell arbeitende, aber mit einer hohen Fehlerrate ($2 \cdot 10^{-4}$ pro Base) behaftete *Taq*-Polymerase mit der *Pfu*-Polymerase kombiniert, welche 3'→5'-Exonukleaseaktivität (*proofreading*) aufweist. Eine weitere Besonderheit der *Taq*-Polymerase stellt das Anhängen von zusätzlichen Adeninresten an die

3'-Enden PCR-Produkte dar. Dieser Mechanismus wird für die ungerichtete TA-Klonierung (siehe Abschnitt 3.1.3.3) genutzt.

3.1.2.1. Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente zur Klonierung

Zur Erzeugung neuer La-Fragmente wurden die Ausgangsklone (siehe Anhang) als Matrize verwendet und mit entsprechend gewählten Primern verkürzt. Es kam das Advantage™ HF2 PCR System zum Einsatz. In einem Gesamtvolumen von 25 µl wurden 1 ng Matrizen-DNA, je 1,5 µl 10 µM Primer (*forward* und *reverse*), 2,5 µl 10 × Reaktionspuffer, 2,5 µl 10 × dNTPs, 0,5 µl *high fidelity*- (HF-) Polymerasegemisch und ein entsprechendes Volumen ddH₂O miteinander vermischt. Die Reaktion wurde mit 5 min bei 95 °C zum Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges begonnen. Anschließend folgten 35 Zyklen mit 30 s bei 95 °C zur Denaturierung, 30 s Inkubation bei einer Primer-abhängigen Hybridisierungstemperatur und schließlich die DNA-Synthese bei 68 °C. Für jedes zu synthetisierende 1 kb wurde 1 min Elongationszeit gewählt. Schließlich wurde die Doppelstrangsynthese für 10 min bei 68 °C vervollständigt.

Die Hybridisierungstemperatur wurde 3 °C unter der niedrigsten Schmelztemperatur der beiden verwendeten Primer gewählt. Die Schmelztemperatur (T_m) jedes Primers ergibt sich aus dessen Sequenz wie folgt:

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 4 \cdot (\text{G} + \text{C}) + 2 \cdot (\text{A} + \text{T}) \quad \text{Formel 1}$$

G, C, A und T geben die Anzahl der entsprechenden Nukleotide wieder. Der Erfolg der PCR-Reaktion wurde überprüft, indem 5 µl des Gemisches mit 1 µl 6 × Orange G-Probenpuffer vermischt und auf ein TAE-Agarosegel aufgetragen wurden (siehe Abschnitt 3.1.4). Wenn das Produkt der erwarteten Größe entsprach, wurde mit der Ligation in den Vektor pGEM®-T Easy fortgefahren (siehe Abschnitt 3.1.3.3).

3.1.2.2. Reverse Transkription zur Synthese von cDNA

Für eine Sequenzanalyse der V_H - und V_L -Gene müssen die mRNA-Moleküle nach der Isolation aus den Hybridomazellen (siehe 3.1.1) zunächst in stabilere cDNA überführt werden. Hierfür wird die polyA-Sequenz genutzt, die sich an jedem 3'-Ende eines reifen, prozessierten Transkripts befindet. Nach der Hybridisierung von oligo(dT)₁₈-Primern kann das Enzym Reverse Transkriptase den Komplementärstrang in 5'→3'-Richtung synthetisieren.

Für die cDNA-Synthese wurde das Advantage RT-for-PCR Kit entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt. Es verwendet die Moloney Maus Leukämie Virus-Reverse Transkriptase (MMLV-RT). Im ersten Schritt wurden 1 µg RNA und 1 µl 20 µM Oligo(dT)₁₈-Primer in einem Gesamtvolumen von 13,5 µl für 2 min auf 70 °C erhitzt, um die RNA-Sekundärstruktur aufzuschmelzen und durch anschließendes Abkühlen auf Eis konnten die Primer hybridisieren.

Nun wurden 4 µl 5 × Reaktionspuffer, 1 µl (jeweils 10 mM) dNTPs, 0,5 µl (20 U) RNase Inhibitor sowie 1 µl (200 U) MMLV-RT hinzugefügt und die Reaktion fand für 2 h bei 42 °C statt. Durch Erhitzen auf 95 °C für 5 min wurde die reverse Transkription beendet. Abschließend wurde die cDNA mit 80 µl ddH₂O verdünnt, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.1.2.3. Amplifikation der variablen Regionen von Immunglobulinketten

Ausgehend von der cDNA wurden die variablen Genabschnitte der leichten und schweren anti-La-Antikörperketten amplifiziert. Hierfür wurden degenerierte Primer herangezogen, welche relativ konservierte Sequenzen in den konstanten Regionen bzw. in der FWR1 binden und eine Amplifikation der dazwischen liegenden variablen Bereiche erlauben. Die Primersequenzen wurden der Literatur entnommen [151].

Für die PCR wurde das Advantage™ HF2 PCR Kit genutzt. In einem Gesamtvolumen von 25 µl wurden 2 µl cDNA, je 1,5 µl 10 µM Primer (*forward* und *reverse*), 2,5 µl 10 × Reaktionspuffer, 2,5 µl 10 × dNTPs, 0,5 µl HF-Polymerasegemisch und 14,5 µl ddH₂O zusammengegeben.

Die Primerpaare wurden folgendermaßen gewählt: für die leichten Ketten wurden LC*for* und LC*crev* verwendet, für die schweren Ketten wurde der Primer HC*for2* entsprechend des Antikörper-Isotyps mit IgG1*rev*, IgG2a*rev*, IgG2b*rev* oder IgM*rev* kombiniert.

Nach einem Denaturierungsschritt bei 94 °C für 3 min folgten 40 Zyklen aus DNA-Denaturierung (30 s, 94 °C), Primerhybridisierung (1 min, 58 °C) und DNA-Synthese (2 min, 68 °C). Abschließend wurde die DNA-Synthese durch Inkubation bei 68 °C für 10 min vervollständigt. Der Erfolg der PCR wurde anhand einer Agarosegelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.1.4) überprüft, indem das Gesamtvolumen aufgetragen wurde. Die DNA-Bande der erwarteten Größe wurde aus dem Gel ausgeschnitten, eluiert (siehe 3.1.5) und in den Vektor pGEM®-T Easy ligiert (siehe Abschnitt 3.1.3.3).

3.1.2.4. Herstellung einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde

Zur nicht-radioaktiven Markierung von DNA-Molekülen können einer PCR-Reaktion dUTP-Moleküle hinzugefügt werden, welche kovalent an DIG gekoppelt sind. Die entstandenen PCR-Produkte können später mit einem anti-DIG-Antikörper detektiert werden. Es wurde der PCR DIG Labeling Mix genutzt. Für die Markierungsansätze wurde die im Kit enthaltene Kontroll-DNA als Matrize mit den dazu passenden Primern eingesetzt. Das PCR-Programm wurde entsprechend der Herstellerangaben gewählt. Der Erfolg der Markierungsreaktion wurde auf einem 1,5%igem TAE-Agarosegel (3.1.6.2) überprüft. Die erhaltene DIG-DNA (etwa 25 ng/µl) wurde bei -20 °C gelagert.

3.1.2.5. Erzeugung von Digoxigenin-markierter RNA

Auf ähnliche Weise können DIG-markierte RNA-Moleküle in einem *in vitro* Transkriptionssystem gewonnen werden. Dazu wurde das Plasmid pGEM®-T Easy-CAT (10 µg) mit *Nco*I linearisiert. Die DNA wurde anschließend je einmal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert, mit Ethanol präzipitiert und in DEPC-H₂O auf eine Konzentration von 1 µg/µl resuspendiert. Zur DIG-RNA-Synthese wurde das DIG RNA Labeling Kit eingesetzt. In einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden 1 µg linearisierte DNA, 2 µl NTP-Mix (enthält DIG-UTP), 2 µl Reaktionspuffer, 1 µl RNase Inhibitor und 2 µl (40 U) SP6-RNA-Polymerase für 2 h bei 37 °C zur Reaktion gebracht. Anschließend wurde die Matrizen-DNA durch Zugabe von 2 µl RNase-freier DNase I während 15 min bei 37 °C abgebaut. Die Reaktion wurde mit 2 µl 200 mM EDTA (pH 8,0) beendet. Der Syntheserfolg wurde entsprechend der

Herstellerangaben überprüft und die DIG-RNA (etwa 500 ng/μl) wurde bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.1.3. Klonierung von DNA

3.1.3.1. Restriktionsanalyse von DNA-Molekülen

DNA-Endonukleasen (sog. Restriktionsenzyme) können zur Linearisierung von Plasmid-DNA oder zum Ausschneiden bestimmter DNA-Fragmente aus Plasmiden eingesetzt werden. Die Endonukleasen des Typs II schneiden DNA-Moleküle an definierten Erkennungssequenzen, welche meist aus Hexanukleotiden aufgebaut sind. Dabei können glatte Enden, 5'- oder auch 3'-Überhänge entstehen. Durch die Kombination unterschiedlicher Restriktionsenzyme, welche jeweils nur singuläre Schnittstellen in einem Plasmid besitzen, können bestimmte Teile des Plasmids entfernt oder durch andere ersetzt werden.

3.1.3.1.1. Analytische Restriktionsanalyse von isolierten Plasmiden

Die sich an die Plasmid-Mini-Präparation (Abschnitt 3.1.8.7.1) anschließende Analyse der verschiedenen Klone wurde in einem Reaktionsansatz von 20 μl Gesamtvolumen durchgeführt. Es wurden 6 μl (etwa 1 μg) der Plasmid-DNA, 0,4 μl (4 U) jedes Restriktionsenzym sowie 2 μl des entsprechenden 10 × Reaktionspuffers eingesetzt. Die Enzyme sowie die dazugehörigen Puffer wurden von der Firma MBI Fermentas bezogen und bei der Kombination unterschiedlicher Enzyme wurden die Puffer entsprechend der Empfehlungen des Herstellers angepasst. Die Reaktion fand gewöhnlich für 1 h bei 37 °C statt, außer wenn es für bestimmte Enzyme anders erforderlich war. Die Reaktionsansätze wurden mit 4 μl 6 × Orange G-Probenpuffer gemischt und mittels TAE-Agarosegelelektrophorese (Kapitel 3.1.4) analysiert.

3.1.3.1.2. Präparative Restriktionsanalyse

Für die gerichtete Klonierung von DNA-Fragmenten wurden 5 μg DNA mit 5 U jedes Restriktionsenzym vermischt. Der Reaktionspuffer und die Temperatur wurden abhängig von den verwendeten Enzymen entsprechend der Herstellerempfehlungen gewählt. Die Reaktion fand in einem Gesamtvolumen von 30 μl für 1,5 h statt. Im Anschluss wurden die Restriktionsenzyme hitzeinaktiviert (15 min, 65 °C). Bei linearisierter Vektor-DNA wurde zuerst dephosphoryliert und anschließend die Enzymaktivität durch Erhitzen zerstört. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden in einem TAE-Agarosegel aufgetrennt (3.1.4) und die gewünschten DNA-Banden wurden aus dem Gel isoliert (3.1.5).

3.1.3.2. Dephosphorylierung linearisierter Plasmide

Die linearisierten Plasmide können über kompatible Enden verfügen, deren freie 5'-Phosphat- bzw. 3'-Hydroxylgruppen während der Ligation (siehe 3.1.3.3) wieder kovalent miteinander verknüpft werden können (Religation), ohne dass das gewünschte DNA-Fragment mit in den Vektor eingebaut wird. Dies wurde durch Behandlung mit hitzeinaktivierbarer SAP, welche die 5'-Phosphatgruppen vom Molekül entfernt, vermieden. Pro 1 pmol geschnittener DNA (2 pmol

5'-Phosphatreste) wurden 2 U SAP im Anschluss direkt zum Restriktionsansatz gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Durch Erhitzen auf 65 °C für 15 min wurden die SAP und die Restriktionsenzyme inaktiviert. Die so behandelte DNA konnte je nach Bedarf auf einem Agarosegel analysiert und daraus isoliert, oder direkt zur Ligation eingesetzt werden.

3.1.3.3. Ligation

Das kovalente Verknüpfen von DNA-Fragmenten wird als Ligation bezeichnet [152]. Es wird die T4-Ligase aus dem Bakteriophagen T4 eingesetzt, welche neue Phosphodiesterbindungen zwischen zwei dsDNA-Molekülen synthetisieren kann. Bei dieser ATP-abhängigen Reaktion werden jeweils eine 5'-Phosphatgruppe des einen Moleküls und eine 3'-Hydroxylgruppe des zweiten Moleküls miteinander verbunden. Durch die zuvor durchgeführte Dephosphorylierung des Vektors kann dieser nicht allein rezirkularisiert werden, sondern die Ligase ist auf den Einbau des zusätzlichen DNA-Fragments angewiesen.

3.1.3.3.1. Ungerichtete Klonierung von PCR-Fragmenten in den Vektor pGEM[®]-T Easy

Der Einsatz des pGEM[®]-T Easy Kits erlaubt die ungerichtete Klonierung von PCR-Produkten in den Vektor pGEM[®]-T Easy, d. h. die Orientierung des DNA-Fragments ist nicht festgelegt. Dabei nutzt man die Eigenschaft der *Taq*-Polymerase aus, die in einer PCR-Reaktion jeweils am 3'-Ende des Produktes ein zusätzliches Adenosin anhängt und so einen Einzelstrang-A-Überhang erzeugt. Der bereits linearisierte Vektor weist an beiden 3'-Enden Einzelstrang-T-Überhänge auf, sodass die Enden von Vektor und PCR-Produkt kompatibel sind und von der Ligase miteinander verknüpft werden können. Diese Art der Klonierung wird als TA-Klonierung bezeichnet.

Für einen Ligationsansatz wurden 3 µl PCR-Produkt, 1 µl T4-Ligase, 2 µl T4-Puffer, 1 µl pGEM[®]-T Easy Vektor und 3 µl ddH₂O zusammen gegeben und 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Hälfte des Reaktionsansatzes in kompetente *E. coli* TOP10F' transformiert (siehe Abschnitt 3.1.8.5) und die Zellen wurden für die Blau-Weiß-Selektion (Abschnitt 3.1.8.6) auf LB-Platten ausgestrichen, die Ampicillin, IPTG und X-Gal enthielten.

3.1.3.3.2. Ligation zur gerichteten Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmide

Die in der PCR eingesetzten Primer enthalten an ihren 5'-Enden Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme, sodass jedes PCR-Produkt ebenfalls über diese Schnittstellen verfügt. Es kann deshalb mit diesen Endonukleasen aus dem pGEM[®]-T Easy Vektor herausgeschnitten und in einen ebenso behandelten Zielvektor eingesetzt werden. Durch die Verwendung von zwei unterschiedlichen Schnittstellen kann das DNA-Fragment nur in der festgelegten Richtung Ligasevermittelt in den Vektor integriert werden, da die DNA-Enden nur bei einer der beiden möglichen Orientierungen kompatibel sind.

Für die Ligationsansätze wurde das einzubauende DNA-Fragment immer im dreifachen molaren Überschuss zum Vektor eingesetzt. In einem Ansatz von 20 µl wurden insgesamt 200 ng DNA zusammen mit 2 µl T4-Ligasepuffer und 1 µl T4-Ligase verwendet. Die Ligation wurde über Nacht bei 14 °C durchgeführt. Danach wurden 10 µl des Ansatzes in kompetente *E. coli*

Top10F' transformiert (3.1.8.5) und auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen.

3.1.4. Agarosegelelektrophorese

Die negativ geladenen DNA-Moleküle können in einer Agarosematrix im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Nach dieser horizontalen Agarosegelelektrophorese kann die DNA durch Anfärbung mit dem Interkalator Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Die Agarose (0,8%-1,5% w/v) wurde in 1 × TAE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle geschmolzen und die Lösung wurde in eine horizontale Gelgießkammer (Sub-Cell® GT Agarosegelelektrophoresesystem) gegossen, die mit einem entsprechendem Kamm bestückt war. Nach dem Erstarren des Gels wurden die Proben (aus PCR oder Restriktionsansatz) mit dem 6 × Orange G-Probenpuffer 5:1 vermischt und direkt in die Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard wurde der GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 7 V/cm Elektrodenabstand, bis das Orange G in der Lauffront etwa 80% des Gels passiert hatte. Anschließend wurde das Gel für 10 min in Ethidiumbromid-Färbelösung inkubiert. Mit Hilfe eines Biostep UV-Transilluminators erfolgte die Detektion und Dokumentation der Banden.

3.1.5. Elution von Gelfragmenten aus dem Agarosegel

Nach der präparativen Restriktionsanalyse wurden die DNA-Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt, um z. B. das für die weitere Klonierung benötigte kleinere DNA-Fragment vom Vektor zu separieren, in den es bisher einkloniert war. Anschließend wurde die gewünschte DNA-Bande aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die weiteren Schritte erfolgten unter Verwendung des Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kits. Dabei wird die Agarose in entsprechendem Puffer geschmolzen und die erhaltene DNA-haltige Lösung wird auf eine Silica-Matrix in einer Spin-Säule gegeben, um die DNA daran zu binden. Nach Waschen mit Ethanol wurde die Elution mit 30 µl ddH₂O vorgenommen.

3.1.6. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

3.1.6.1. Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die aromatischen Basen der DNA und RNA weisen bei 260 nm ein Absorptionsmaximum auf und folglich wird die Nukleinsäurekonzentration bei dieser Wellenlänge bestimmt. Für die Mengenermittlung gibt es je nach Art der Nukleinsäure verschiedene Koeffizienten. So entspricht 1 OD₂₆₀ einer Konzentration von 50 µg dsDNA/ml, 37 µg ssDNA/ml oder 40 µg RNA/ml [153]. Man kann auch die Kontamination der Probe mit Proteinen durch die Messung der OD₂₈₀ bestimmen. Der Quotient aus OD₂₆₀ und OD₂₈₀ sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen. Für die Konzentrationsbestimmung wurde eine Quartzküvette verwendet und es wurde im linearen Messbereich des Photometers zwischen 0,1 und 1 gearbeitet. Die Proben wurden 1:10 mit TE-Puffer verdünnt und gegen den Puffer als Referenz gemessen.

3.1.6.2. Abschätzung der DNA-Konzentration mittels Agarosegelelektrophorese

Für eine Mengenabschätzung der DNA, welche für die Ligation verwendet werden sollte, wurde je ein Teil des linearisierten Vektors sowie der durch Gelelution gereinigten Insert-DNA erneut auf ein Agarosegel aufgetragen. Als Standard diente der MassRuler™ DNA Ladder, welcher genau definierte Mengen von jeder DNA-Bande aufweist. Nach Färbung des Gels mit Ethidiumbromid konnten so die gewonnenen DNA-Mengen evaluiert werden.

3.1.7. DNA-Sequenzierung

Die genaue Bestimmung der Nukleotidsequenz rekombinanter DNA-Fragmente wurde durch die DNA Sequenzierungseinrichtung des Max Planck Instituts CBG, Dresden durchgeführt. In jedem Sequenzieransatz wurden 50 ng/kb DNA (maximal 1 µg DNA) und in einem Gesamtvolumen von 5 µl eingesetzt. Die passenden Sequenzierprimer wurden von der Sequenzierungseinrichtung hinzugefügt.

3.1.8. Arbeiten mit Bakterien

3.1.8.1. Kultivierung von Bakterienkulturen

Flüssigkulturen von *E. coli* wurden in LB-Medium bei 37 °C im Schüttelinkubator bei 180 rpm gezogen. Dabei wurden 5 ml Kulturen aus Einzelkolonien angeimpft (Mini-Kulturen) und 100 ml (Maxi-Kulturen) wurden mit 100 µl einer Vorkultur angelegt und über Nacht bis zur gewünschten Zelldichte wachsen gelassen. Zur Erzeugung von Einzelkolonien wurden die Bakteriensuspensionen auf LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Selektion der gewünschten Klone erfolgte durch die Zugabe von Antibiotika. Hierfür wurden Ampicillin oder Kanamycin verwendet. Für die Blau-Weiß-Selektion von pGEM®-T Easy-Klonen wurden den LB-Agarplatten außer Ampicillin auch IPTG und X-Gal zugegeben.

3.1.8.2. Anlegen von Glycerinkulturen

Zur Langzeitlagerung von *E. coli*-Kulturen oder -stämmen wurden 800 µl der entsprechenden Flüssigkultur mit 200 µl Glycerin versetzt und die Zellen wurden bei -80 °C gelagert. Aus diesen Glycerinkulturen konnten bei Bedarf neue Flüssigkulturen angeimpft werden.

3.1.8.3. Bestimmung der OD₆₀₀

Das Wachstum von *E. coli* lässt sich durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) verfolgen. Durch die anfangs exponentielle Zunahme der Bakterienzahl (Generationszeit etwa 20 min bei 37 °C) nimmt die Streuung in der Flüssigkultur zu, was sich in steigenden OD₆₀₀-Werten widerspiegelt. Wenn die OD₆₀₀ einen Wert von 1 annimmt, enthält die Kultur etwa $5 \cdot 10^8$ Bakterien pro ml. Nach Erreichen der stationären Phase bleibt auch die optische Dichte konstant. Es wurden 800 µl der Flüssigkultur in Einweg-Plastikküvetten gegeben und die OD₆₀₀ wurde gegen LB-Medium als Referenz bestimmt.

3.1.8.4. Herstellung kompetenter Bakterien

Bei der Kompetenz von *E. coli* handelt es sich um die Fähigkeit, Plasmid-DNA aus dem Medium in die Zelle aufzunehmen. Die Bakterien werden in der frühen exponentiellen Wachstumsphase geerntet, auf Eis abgekühlt, mit Calciumchlorid und weiteren Salzen vorbehandelt [154] und durch einen späteren Hitzeschock wird die Aufnahme der DNA bewirkt.

Es wurde ein Ausstrich der entsprechenden *E. coli*-Glycerinkultur auf einer LB-Platte gemacht und diese über Nacht bei 37 °C kultiviert. Mit einer Einzelkolonie wurden 2 ml 2 × YT-Medium angeimpft und wiederum über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Von dieser Übernachtskultur wurden 100 µl zum Inokulieren einer 10 ml Vorkultur in 2 × YT-Medium verwendet. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von etwa 0,5 wurden 100 ml 2 × YT-Medium mit 5 ml der Vorkultur angeimpft. Nachdem die Kultur erneut einen OD₆₀₀-Wert von 0,5 erreicht hatte, wurde sie rasch für 5-10 min auf Eis abgekühlt. Die Kultur wurde auf zwei 50 ml Greinerröhrchen verteilt und dann wurden die Zellen in der Kühlzentrifuge pelletiert (5 min, 2000 × g, 4 °C). Jedes Pellet wurde in 10 ml kaltem TFB 1 aufgenommen, 10 min auf Eis inkubiert und erneut abzentrifugiert. Nun wurden die Zellen in je 2 ml kaltem TFB 2 resuspendiert und Aliquots von je 100 µl wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.1.8.5. Hitzeschocktransformation von kompetenten Bakterien

Ein kurzer Hitzeschock bei 42 °C bewirkt die Aufnahme von Plasmid-DNA durch kompetente Bakterien (Transformation). Dazu wurden die bei -80 °C gelagerten Zellen auf Eis aufgetaut und die DNA wurde zugegeben (die Hälfte eines Ligationsansatzes oder 100 ng Plasmid-DNA). Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde das Reaktionsgefäß mit den Zellen für 45 s in ein 42 °C warmes Wasserbad eingetaucht und anschließend wieder auf Eis abgekühlt (5 min). Nun wurden 900 µl SOC-Medium zugegeben und die Zellen wurden für 1 h bei 37 °C unter Schütteln (180 rpm) inkubiert, damit sich die durch das Plasmid vermittelte Antibiotikaresistenz ausbilden konnte. Nun wurden etwa 150 µl der Zellen auf eine LB-Platte mit entsprechendem Antibiotikum zur Selektion der transformierten Zellen ausgestrichen. Die Platte wurde bei 37 °C über Nacht inkubiert und die erhaltenen Einzelklone wurden zum Animpfen von Mini-Kulturen eingesetzt.

3.1.8.6. Blau-Weiß-Selektion positiver Klone

Die ungerichtete Klonierung von PCR-Produkten in den Vektor pGEM[®]-T Easy (siehe 3.1.3.3) erlaubt eine Vorselektion der Klone durch die Verwendung von LB-Platten, die Ampicillin, IPTG und X-Gal enthalten. Durch die Transformation wird außer der Ampicillinresistenz auch die Fähigkeit vermittelt, funktionelle β-Galaktosidase herzustellen. Der Induktor IPTG steuert die Enzymaktivität, die durch den Abbau des Substrates X-Gal zu einem blauen Farbstoff nachgewiesen werden kann. Durch erfolgreiche Insertion des PCR-Produkts in den Vektor wird der Leserahmen des α-Peptids der β-Galaktosidase (meist) zerstört und es werden weiße Kolonien erhalten. Von diesen wurden je Klonierung mindestens sechs Klone ausgewählt, um damit je 5 ml LB-Medium mit Ampicillin für eine spätere Plasmid-Mini-Präparation anzupflanzen.

3.1.8.7. Plasmid-Mini-Präparation

3.1.8.7.1. Plasmidisolierung aus Mini-Kulturen durch Kochlyse

Nach der Ligation müssen die erhaltenen Klone auf eine erfolgreiche Insertion des gewünschten DNA-Fragments in den Vektor überprüft werden. Dazu werden aus den Einzelklonen Flüssigkulturen gezogen, die Zellen durch Kochen aufgeschlossen und die Plasmide isoliert [155].

Von 6-10 Kolonien wurden jeweils 5 ml LB-Kultur unter Verwendung des entsprechenden Antibiotikums angelegt. Die Bakterien wurden bei 37 °C und 180 rpm über Nacht wachsen gelassen. Von jeder dieser Mini-Kulturen wurden 2 ml in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 13000 × g für 30 s pelletiert und das Medium wurde mittels Vakuumpumpe abgesaugt. Die Zellen wurden in 200 µl STET-Puffer resuspendiert und es wurden 20 µl Lysozym-Lösung und 2 µl RNase-Lösung zugegeben. Nun wurden die Zellen für 40 s im kochenden Wasserbad aufgeschlossen und anschließend zentrifugiert (10 min, 13000 × g, 4 °C oder RT). Das Präzipitat aus genomischer DNA und denaturierten Proteinen (inklusive DNasen) am Boden des Gefäßes wurde anschließend mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers entfernt. Die verbleibende Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 200 µl 2-Propanol gefällt (10 min Inkubation bei RT) und anschließend pelletiert (5 min, 13000 × g, RT). Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet wurde mit 200 µl -20 °C kaltem 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 13000 × g, RT) und Absaugen des Ethanols wurde das Pellet getrocknet. Dazu wurden die offenen Reaktionsgefäße etwa 10 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Abschließend wurde das Pellet in 30 µl TE-Puffer gelöst und die DNA wurde der Restriktionsanalyse unterzogen (siehe Abschnitt 3.1.3.1).

3.1.8.7.2. Spin-Minis

Zur Gewinnung geringer Mengen möglichst reiner DNA, um sie z. B. für die Sequenzierung einzusetzen, wurde das Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit verwendet. Es wurde entsprechend der Anleitung vorgegangen und die DNA wurde mit 30 µl Elutionspuffer von der Säule eluiert.

3.1.8.8. Plasmid-Maxi-Präparation

Nach erfolgreicher Klonierung wurden von verschiedenen Plasmiden größere DNA-Mengen benötigt, um sie entweder für weitere Klonierungsschritte zu verwenden oder für die Transfektion einzusetzen. Dafür wurden 100 ml LB-Medium mit etwa 100 µl der jeweiligen Mini-Kultur angeimpft und in Gegenwart des entsprechenden Antibiotikums über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Kultur wurde auf zwei 50 ml Greinerröhrchen verteilt und die Zellen wurden pelletiert (15 min, 4 °C, 4000 × g). Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des Invisorb Plasmid Maxi Kits unter Verwendung der enthaltenen Puffer und Materialien nach Vorschrift isoliert. Die DNA wurde durch 600 µl Elutionspuffer von der Säule eluiert und nach der Konzentrationsbestimmung bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

3.1.8.9. Prokaryonte Proteinproduktion

Für die prokaryonte Herstellung rekombinanter Proteine wurden der Bakterienstamm *E. coli* BL21(DE3)pLysS und das pET-Vektorsystem verwendet. Nach dem Inokulieren einer Bakterienkultur, die das Expressionsplasmid trägt, sollen sich die Zellen zuerst bis zum Erreichen einer ausreichend hohen Zellzahl (OD_{600} bei etwa 0,6) vermehren. Dabei wäre die vermehrte Produktion des Zielproteins hinderlich. Deshalb wird die Transkription des Zielgens solange durch den *lac*-Repressor verhindert, bis schließlich durch IPTG-Zugabe die Expression induziert wird.

Die pET-Vektoren codieren für Hexahistidinsequenzen, die durch die Klonierung an das rekombinante Protein fusioniert werden. Dieser so genannte His₆-Tag erleichtert später die Anreicherung des Zielproteins mittels Nickel-NTA-Affinitätschromatographie.

3.1.8.9.1. Miniexpression zur Selektion des besten Expressionsklons

Nach der Transformation von *E. coli* BL21(DE3)pLysS mit dem entsprechenden Expressionsplasmid wurden aus fünf Einzelkolonien jeweils 5 ml LB-Medium, das mit dem erforderlichen Antibiotikum versetzt war, angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (180 rpm) inkubiert. Von jeder Vorkultur wurden zweimal 100 µl für das Animpfen von zwei 10 ml Miniexpressionskulturen (mit entsprechendem Antibiotikum) eingesetzt. Diese wurden bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. Sobald die OD_{600} einen Wert von etwa 0,6 aufwies, wurde die Genexpression in jeweils einer der beiden Kulturen mit 1 mM IPTG induziert. Nach 3-4 h wurden von jeder Zellsuspension 5×10^8 Bakterien in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und nach Zentrifugation ($13000 \times g$, 1 min) wurde das Zellpellet in 200 µl $2 \times$ SDS-Probenpuffer aufgenommen. Durch Erhitzen der Proben bei 95 °C für 5 min wurden die Zellen denaturiert und 10 µl jedes Totalextraktes wurden mittels SDS-PAGE (siehe 3.3.6) und Western Blot (Kapitel 3.3.8, Entwicklung mit anti-His und anti-Maus-IgG-AP) untersucht, um den besten Expressionsklon zu ermitteln. Dabei wurde von jedem Klon die induzierte Probe mit der entsprechenden uninduzierten Kultur verglichen. Von den Klonen mit der stärksten Proteinproduktion wurden Glycerinkulturen angelegt.

3.1.8.9.2. Bakterielle Herstellung großer Proteinmengen

Nachdem ein geeigneter Klon für die Expression des jeweiligen Zielgens durch Miniexpression ermittelt worden war, wurde eine 10 ml LB-Kultur (mit entsprechendem Antibiotikum) mit Hilfe der Glycerinkultur inokuliert und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln wachsen gelassen. Von dieser frischen Vorkultur wurden 8 ml zum Animpfen von 800 ml LB-Medium (mit zugesetztem Antibiotikum) verwendet. Das Wachstum der Zellen wurde durch stündliche Kontrolle der OD_{600} überwacht. Nachdem ein Wert von 0,5-0,7 erreicht worden war (nach circa 2 h), wurde die Genexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach weiteren 4 h wurden die Zellen pelletiert (20 min, $4000 \times g$, 4 °C), einmal mit 20 ml PBS gewaschen und dabei in ein 50 ml Greinerröhrchen überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Bakterienpellets bei -20 °C gelagert.

3.2. Zellbiologische Methoden

3.2.1. Kultivierung von *adhärenten Zelllinien*

Alle Zellen wurden in einem Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ in DMEM kultiviert. Für 3T3 LaG und HEK 293T PSCA wurde das Medium durch Genitacin (500 µg/ml) als Selektionsmarker ergänzt. Hatten die Zellen in ihren entsprechenden Kulturflaschen Konfluenz erreicht, wurde das Medium abgenommen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und solange mit PBS-Trypsin behandelt, bis sie vom Boden der Kulturflasche abgelöst waren. Dann wurden sie in Kulturmedium resuspendiert und durch Zentrifugation (5 min, 360 x g, RT) pelletiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml DMEM aufgenommen und 1 ml der Zellen wurde in eine neue Kulturflasche überführt und mit der erforderlichen Menge an frischem DMEM versetzt. Sollten die Zellen nach dem Ablösen von der Kulturflasche für weitere Oberflächenfärbungen (FACS, Immunfluoreszenz) verwendet werden, wurde statt PBS-Trypsin eine PBS-EDTA-Lösung eingesetzt, um die Membranproteine nicht zu zerstören.

3.2.2. Kultivierung von *Hybridomazellen*

Die Suspensionszellen wurden in Hybridomamedium bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert und die Antikörperproduktion wurde durch IL-6 stimuliert. Die Zellen wurden nach jeweils 3-4 Tagen mit dem Medium in ein 50 ml Greinerröhrchen überführt, durch Zentrifugation (5 min, 360 x g, RT) pelletiert und der Überstand mit den Antikörpern wurde abgenommen und bis zur Testung bei 4 °C gelagert. Die Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und davon wurde ein Zehntel zum Anlegen der neuen Kulturflasche zusammen mit der entsprechenden Menge an Hybridomamedium eingesetzt.

3.2.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für die Langzeitlagerung von Zellen wurden Zellpellets in 1 ml 10% (v/v) DMSO in FCS aufgenommen, in ein Kryoröhrchen überführt und mit Hilfe eines Einfriergefäßes, das mit Isopropanol gefüllt war, zuerst auf -80 °C gekühlt und später in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die Röhrchen mit den gefrorenen Zellen möglichst schnell auf RT gebracht. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml Medium gewaschen, um das DMSO zu entfernen. Dann wurden sie in frisches Medium überführt und bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert.

3.2.4. Bestimmung der Zellzahl

Ein Teil der Zellsuspension wurde mit dem gleichen Volumen an Trypanblau in PBS versetzt und die Zahl lebender Zellen wurde mikroskopisch mit Hilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt. Dabei färbt Trypanblau nur die toten Zellen an, welche nicht mitgezählt werden. Aus dem Mittelwert der Zellzahlen, die für die einzelnen Quadranten bestimmt wurden, dem Verdünnungsfaktor sowie dem Faktor $\times 10^4$ wurde die Zellzahl je 1 ml Zellsuspension berechnet. Sollte die Zellzahl von frisch isolierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*peripheral*

blood mononuclear cells, PBMCs) bestimmt werden (siehe 3.2.14), so wurde mit 5% (v/v) Essigsäure in PBS anstatt Trypanblau verdünnt.

3.2.5. Transfektion adhärenter eukaryonter Zellen

Das Einbringen von fremder DNA in eukaryontische Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Dazu gibt es verschiedene Techniken wie Calcium-Phosphat-Präzipitation, Lipofektion oder Elektroporation. Man unterscheidet zwischen transienter und stabiler Transfektion. Bei der transienten wird das Plasmid vorübergehend in die Zelle eingebracht. Bei der stabilen Transfektion muss die Plasmid-DNA dauerhaft in das Genom der Wirtszelle integrieren. Das wird durch die Verwendung von linearisierter DNA erreicht, die außerdem ein Gen für einen Selektionsmarker (Antibiotikumresistenz, z. B. Geneticin^R) enthält.

3.2.5.1. Lipofektion zur transienten Transfektion

Eine Methode zur Transfektion ist die Beladung kationischer Lipidvesikel mit DNA. Anschließend werden diese Liposomen zu den Zellen gegeben, um durch Fusion mit der Membran die DNA in die Zellen einzuschleusen [156]. Sollten die Zellen nach der Transfektion in der Immunfluoreszenz untersucht werden, wurden stark adhärenente HeLa-, 3T3- oder A9-Zellen genutzt. Für die Gewinnung möglichst großer Proteinmengen für den Western Blot wurden HEK 293T-Zellen verwendet.

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in DMEM^{P/S} so dicht ausgesät, dass sie bis zur Transfektion eine Konfluenz von 70-80% aufwiesen. Für eine 6-well-Platte wurden $4 \cdot 10^5$ (bei HEK 293T $7 \cdot 10^5$) Zellen je Vertiefung eingesetzt. Pro Vertiefung wurden 4 µg Plasmid-DNA und 10 µl LipofectamineTM 2000 in jeweils 250 µl OPTI-MEM[®]I verdünnt und 5 min bei RT inkubiert. Dann wurden beide Gemische miteinander vereinigt, durch Vortexen gut vermischt, für 20 min bei RT inkubiert und schließlich tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach 4-6 h wurde das Medium durch frisches DMEM ersetzt. Für Proben, die später in der Immunfluoreszenz untersucht werden sollten, wurden entsprechend weniger Zellen in 24-well-Platten ausgesät und die Mengen an Medium, OPTI-MEM[®]I, DNA und LipofectamineTM 2000 wurden entsprechend angepasst.

3.2.5.2. Transiente Transfektion mittels Polyethylenimid

Für die eukaryonte Herstellung rekombinanter Antikörperfragmente war die Transfektion großer Zellzahlen erforderlich, um die gewünschten Proteinmengen zu erhalten. Hierfür wurde das positiv geladene Polymer Polyethylenimin (PEI) verwendet, welches die negativ geladene DNA auf die Zelloberfläche bringt und zur Einschleusung in die Zelle führt [157]. Durch Klonierung der gewünschten Antikörperdomänen in den Expressionsvektor pSecTag2 B wird auf DNA-Ebene eine Fusion mit dem Igk-Sekretionssignal erzielt. Dieses sorgt für die Freisetzung der rekombinanten Proteine aus den Zellen in das Medium.

Je 75 cm²-Kulturflasche wurden $2 \cdot 10^6$ HEK 293T-Zellen in 12 ml DMEM^{P/S} ausgesät. Nach 48 h wurde das Medium durch 7 ml frisches DMEM^{P/S} ersetzt. In einem 15 ml Greinerröhrchen wurden 24 µg DNA mit 1,5 ml DMEM^{pur} und in einem zweiten Röhrchen 65 µl PEI-Lösung mit 1,5 ml DMEM^{pur} durch Vortexen gut gemischt. Nach 5 min wurden die beiden Ansätze

miteinander vereinigt, gut vermischt und für weitere 20 min bei RT inkubiert. Das DNA-PEI-Gemisch wurde schließlich tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach 18 h wurde das Medium durch 25 ml frisches DMEM ersetzt. Nach weiteren 96 h wurde das Medium von den Zellen abgenommen und bis zur Reinigung der rekombinanten Antikörpermoleküle bei 4 °C gelagert.

3.2.6. Herstellung von Totalextrakten der Transfektanten

Zur Analyse der Proteinproduktion mittels Western Blot wurden die adhären Zellen 16-20 h nach der Lipofektion einmal mit PBS gewaschen, anschließend direkt mit 2 x SDS-Probenpuffer versetzt (etwa 200 µl für $1 \cdot 10^6$ Zellen), resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Erhitzen für 5-10 min bei 95 °C wurden die Proben für die SDS-PAGE eingesetzt.

3.2.7. Transduktion zur Erzeugung stabiler Zelllinien

Alternativ zur Transfektion kann ein retroviraler Gentransfer (Transduktion) durchgeführt werden. Durch die stabile Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom produzieren die Zielzellen dauerhaft das gewünschte Protein (z. B. ein rekombinantes Antikörperfragment). Das verwendete retrovirale Vektorsystem geht auf den Moloney Maus Leukämie Virus (MMLV) zurück und besteht aus drei Vektoren [158]. Durch die Verteilung aller benötigten Gene auf drei getrennte Vektoren können keine replikationskompetenten Viruspartikel entstehen. In den Transfervektor pcz CFG5.1 wird das zu exprimierende DNA-Fragment (hier CD3x7B6 scBsDb) unterhalb des Verpackungssignals ψ kloniert. Diese beiden Elemente werden von *long terminal repeats* flankiert, welche für die stabile Integration der viralen DNA in das Genom der Wirtszelle benötigt werden. Zur Erzeugung infektiöser Viruspartikel werden zusätzlich die viralen Gene *gag*, *pol* und *env* benötigt, die auf zwei Helferplasmiden codiert werden. Der Verpackungsvektor pHIT60 enthält *gag* und *pol*, das Plasmid pMD2G das *env*-Gen.

Zuerst wurden alle drei Vektoren in eine Verpackungszelllinie kotransfiziert, um replikationsinkompetente Viruspartikel zu erhalten. Hierfür wurden $4 \cdot 10^6$ HEK 293T-Zellen in eine 10 cm-Kulturschale ausgesät, welche über 6 ml DMEM^{p/s} verfügte. Am Folgetag wurde das Medium durch 4 ml frisches DMEM^{p/s} ersetzt. Für die Transfektion wurden 45 µl PEI-Lösung in 1 ml DMEM^{pur} verdünnt und parallel wurden 15 µg DNA (5 µg jedes Vektors) in 1 ml DMEM^{pur} aufgenommen. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden die beiden Gemische miteinander vereinigt, gut gemischt und für weitere 20 min bei RT inkubiert. Dann wurde das PEI-DNA-Gemisch tropfenweise auf den Zellen verteilt. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und durch 5 ml DMEM ersetzt, das 10 mM Natriumbutyrat enthielt. Die transfizierten Plasmide tragen alle einen Zytomegalie-Virus-Promotor, der die Expression der Vektor-codierten Gene kontrolliert. Das Natriumbutyrat verstärkt die Promotoraktivität. Nach 8 h wurde das Medium nochmals erneuert. Am Folgetag wurde das Medium mit den Viruspartikeln abgenommen und wiederum durch frisches DMEM ersetzt. Der abgenommene Überstand wurde zentrifugiert (5 min, 360 x g, RT) und durch einen 0,45 µm-Sterilfilter gegeben. Von diesem Virusüberstand, der nun frei von Zelltrümmern war, wurden 2 ml mit 8 µg/ml Polybren versetzt und auf die Zielzellen gegeben.

Als Zielzellen wurden HEK 293T-Zellen eingesetzt. Am Vortag der Transduktion waren je Vertiefung einer 6-*well*-Platte $1 \cdot 10^5$ Zielzellen in 3 ml DMEM ausgesät worden. Der Transduktionsansatz wurde für 2 h bei 30 °C und 3492 x g zentrifugiert und anschließend über Nacht im Brutschrank inkubiert. Bei Bedarf wurde der Virusüberstand am nächsten Tag nochmals von den Verpackungszellen abgenommen und auf gleiche Weise zu den bereits transduzierten Zellen gegeben, um die Transduktionseffizienz zu erhöhen.

3.2.8. Intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung

Die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen lässt sich mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie untersuchen. Zur Detektion endogener Proteine werden spezifische Primärantikörper gegen das gesuchte Protein herangezogen, die entweder direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind oder mit einem markierten Sekundärantikörper gefärbt werden. Wird das zu untersuchende Protein nach Transfektion in den Zellen überproduziert, hat man zusätzliche Nachweismöglichkeiten. Durch Klonierung des entsprechenden Gens in einen pEGFP-Vektor erhält man Fusionsproteine mit dem grünen fluoreszierenden Protein (GFP), welche direkt im Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden können. Außerdem kann das Protein mit einer bestimmten Peptidsequenz (His₆-Tag oder c-myc-Tag) fusioniert werden, gegen die es kommerzielle Antikörper gibt.

Es wurden etwa $1 \cdot 10^5$ HeLa-, A9- oder 3T3-Zellen je Vertiefung einer 24-*well*-Platte ausgesät, die bei Bedarf mit Deckgläschen bestückt worden war. Am Folgetag wurden die Zellen entweder mit einem pEGFP-Plasmid transfiziert und nach weiteren 18 h fixiert, oder die Zellen wurden sofort der Immunfluoreszenzfärbung unterzogen.

Für die Fixierung von lebenden adhärenenten Zellen wurden zwei verschiedene Methoden verwendet, da manche Antikörper nur nach bestimmten Fixierungsverfahren in der Immunfluoreszenz funktionierten. Die Zellen wurden zuerst gründlich mit PBS gewaschen. Bei der Methanol-/EGTA- (MeOH/EGTA) Fixierung wurden sie anschließend mit -20 °C kaltem Methanol überschichtet, welches mit EGTA gesättigt war. Die Zellen wurden für mindestens 10 min bei -20 °C fixiert. Danach wurde das Methanol durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zellen wurden 10 min durch Überschichten mit PBS bei RT rehydriert. Sollten die Zellen vor der 7B6-Färbung oxidiert werden, wurden dem PBS für die Rehydrierung 0,5%-0,8% (v/v) H₂O₂ zugesetzt, welches anschließend durch mehrfaches Waschen mit PBS wieder entfernt wurde.

Bei der alternativen PFA-Fixierung wurden die Zellen für 10 min mit PFA-Lösung bei RT inkubiert, mit PBS mehrmals gewaschen und durch 10-minütige Behandlung mit Triton X-100-Lösung bei RT permeabilisiert. Es wurde nochmals mit PBS gewaschen.

Die anschließende Färbung mit Primärantikörpern (unverdünnte Hybridomaüberstände) erfolgte unabhängig von der verwendeten Fixierungsmethode für eine Stunde bei RT. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS erfolgte die Zugabe des in PBS verdünnten, mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Sekundärantikörpers. Er wurde für 1 h im Dunkeln mit den Zellen inkubiert. Danach wurde wieder mit PBS gewaschen und die DNA der Kerne wurde mit DAPI (DAPI-Lösung 1:10000 in PBS, 10 min bei RT) angefärbt. Waren die Zellen auf Deckgläschen gewachsen, wurden diese den 24-*well*-Platten entnommen und mit 1 µl Glycerin/PBS auf einem

Objektträger angeheftet. Für diese Proben wurde mit Immersionsöl mikroskopiert. Die Untersuchung der angefertigten Präparate erfolgte mit einem Axiovert 200M-Fluoreszenzmikroskop der Firma Carl Zeiss und zur Datenanalyse wurde das Programm AxioVision Release 4.6.3 genutzt.

In dieser Arbeit kamen überwiegend Sekundärantikörper zum Einsatz, welche mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff Alexa Fluor®568 oder dem grünen Alexa Fluor®488 gekoppelt waren. Diese beiden Fluorophore zeichnen sich durch eine besonders hohe Stabilität gegenüber UV-Licht aus und vermieden so das „Ausbleichen“ der Proben während des Mikroskopierens.

3.2.9. Heterokaryons zur Untersuchung des Shuttlings von La

Um das Shuttling von Proteinen zwischen dem Nukleus und dem Zytoplasma zu untersuchen, werden humane und murine Zellen miteinander zu Heterokaryons fusioniert und dann z. B. humane Proteine in murinen Kernen detektiert. Dabei macht man sich zunutze, dass murine Zellkerne nach DAPI-Färbung von humanen Zellkernen leicht unterschieden werden können [159]. Gleichzeitig wird die *de novo* Proteinbiosynthese durch Cycloheximid gehemmt. Das Prinzip der Heterokaryonexperimente wird in Abschnitt 4.3.1 ausführlich dargestellt.

Für die Untersuchung der GFP-La-Fusionsproteine wurden zuerst HeLa-Zellen mit den entsprechenden Vektoren transfiziert. Dafür wurden $5 \cdot 10^4$ Zellen je Vertiefung einer 24-Well-Platte ausgesät und am nächsten Tag mittels Lipofektion (siehe 3.2.5.1) transfiziert. Nach 4-6 h wurde frisches DMEM^{-P/S} zu den Zellen gegeben und die Produktion der GFP-Fusionsproteine konnte über Nacht fortschreiten. Am nächsten Tag wurden etwa $1 \cdot 10^5$ 3T3-Zellen zu den transfizierten HeLa-Zellen gegeben. Als diese nach 3 h adhären waren, wurde dem Medium für 30 min 100 µg/ml Cycloheximid hinzugefügt, um die Proteinbiosynthese zu inhibieren. Anschließend wurden die Zellen gründlich mit PBS gewaschen, welches schließlich abgesaugt wurde. Für jede Vertiefung der Platte wurden tropfenweise etwa 50 µl PEG auf die Zellen gegeben und nach 2 min durch dreimaliges Waschen mit PBS wieder entfernt. Nun wurden die Zellen wieder in DMEM^{-P/S} mit 100 µg/ml Cycloheximid inkubiert und nach genau 4 h mit PFA-Lösung fixiert und mit Triton X 100-Lösung permeabilisiert. Die Kerne wurden mit DAPI-Lösung angefärbt. Das Shuttling der GFP-Fusionsproteine wurde fluoreszenzmikroskopisch mit Hilfe des Axiovert 200M-Fluoreszenzmikroskops und der Axiovision-Software beurteilt.

Für die Detektion des endogenen hLa-Proteins wurden untransfizierte HeLa- und 3T3-Zellen miteinander fusioniert. Nach 4 h wurde mit PFA-Lösung fixiert, Triton X-100-Lösung permeabilisiert und mit SW5-Hybridomaüberstand inkubiert. Die Detektion erfolgte mit anti-Maus-IgG-Alexa Fluor®568. Abschließend wurden die Zellkerne mit DAPI-Lösung sichtbar gemacht. Nach MeOH/EGTA-Fixierung war SW5 nicht sensitiv genug, um die geringen Mengen an hLa-Protein in den Mausekernen zu detektieren.

Bei Bedarf wurden zusammen mit dem Cycloheximid auch 30 ng/ml LMB hinzugefügt. Wurde nach der Fusion 5B9-Hybridomaüberstand zum Medium gegeben, so wurde dieser zweifach in DMEM verdünnt.

3.2.10. Oxidation lebender Zellen und fluoreszenzmikroskopische Analyse

Es wurden $1 \cdot 10^5$ HeLa-Zellen je Vertiefung einer 24-well-Platte ausgesät und am Folgetag wurden die Plasmide, die für GFP-La-Fusionsproteine codierten, mittels Lipofektion (siehe 3.2.5.1) in die Zellen eingebracht. Nach 4-6 h wurde das Medium gewechselt und nach 18 h wurden die Zellen dem oxidativen Zellstress ausgesetzt. Dafür wurden sie 20 min im Inkubator mit 2% (v/v) H_2O_2 in DMEM^{pur} behandelt. Parallele Ansätze wurden nur mit DMEM^{pur} kultiviert. Anschließend wurden alle Proben mit PFA-Lösung fixiert, mit Triton X-100-Lösung permeabilisiert und schließlich mit DAPI-Lösung inkubiert. Die Lokalisation der GFP-Fusionsproteine wurde mit Hilfe des Axiovert 200M-Fluoreszenzmikroskops und der Axiovision-Software analysiert. Des Weiteren wurden direkt nach der Oxidation Totalextrakte der Zellen hergestellt (siehe 3.2.6), welche mittels SDS-PAGE (3.3.6) und Western Blot (3.3.8) untersucht wurden.

3.2.11. UV-Bestrahlung von Zellen

Im gesunden Organismus werden stark geschädigte Zellen dem programmierten Zelltod zugeführt. Dieser als Apoptose bezeichnete Vorgang unterliegt einer strengen Regulation. Er wird durch verschiedene Signalwege eingeleitet, die aber immer bei der Aktivierung von DNasen enden, welche die DNA zwischen den Nucleosomen spalten und so zu Bruchstücken von etwa 180 bp und Vielfachen davon führen. Eine Ursache für irreversible Zellschäden sind hohe Dosen an UV-Strahlung, die intrazellulären Stress erzeugt (ROS-Moleküle) und massive DNA-Schäden hervorruft. Im Labor können mit Hilfe eines UV-Crosslinkers definierte UV-Strahlungsdosen verabreicht und deren Auswirkungen untersucht werden.

3.2.11.1. Bestrahlung von HeLa-Zellen für die 7B6-Färbung

In mehreren 24-well-Platten wurden je Vertiefung $1 \cdot 10^5$ HeLa-Zellen auf Deckgläschen ausgesät. Am Folgetag wurde das Medium abgenommen, einmal mit PBS gewaschen und je Vertiefung wurden 200 μ l PBS auf die Zellen gegeben. Die Platten wurden ohne Deckel im UV-Crosslinker platziert und mit 200, 250 oder 300 mJ/m^2 bestrahlt. Anschließend wurde das PBS durch 1 ml DMEM ersetzt und die Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO_2 kultiviert. Nach 1 h, 1,5 h und 2 h wurden jeder Platte einzelne Deckgläschen entnommen, einmal mit PBS gewaschen und mit MeOH/EGTA fixiert. Dann wurden die Deckgläschen alle gemeinsam rehydriert und mit 7B6-Hybridomaüberstand und anti-Maus-IgG-Alexa Fluor®568 gefärbt. Zusätzlich wurde für 10 min mit DAPI-Lösung inkubiert. Parallel wurden unbestrahlte Zellen und solche, die während der Rehydrierung mit 0,5% (v/v) H_2O_2 behandelt wurden, in der Immunfluoreszenz untersucht.

3.2.11.2. Apoptoseinduktion und Nachweis von hLa auf A9-Zellen

In einer 24-well-Platte wurden je Vertiefung $1 \cdot 10^5$ HeLa-Zellen ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt, die Zellen wurden einmal mit 1 ml PBS gewaschen und schließlich mit 200 μ l PBS überschichtet. Für die UV-Bestrahlung bei 254 nm wurde der Deckel der Platte abgenommen und die Zellen wurden im UV-Crosslinker einer Strahlung von 1000 mJ/m^2 ausgesetzt. Nach der Bestrahlung wurde das PBS durch 1 ml frisches Medium ersetzt. Nun wurden

sofort $4 \cdot 10^4$ A9-Zellen je Vertiefung zu den bestrahlten Zellen hinzugefügt und die Proben wurden im Brutschrank kultiviert. Außerdem wurde eine zweite Platte mitgeführt, die keiner UV-Strahlung ausgesetzt worden war. Nach 48 h wurden von den unbehandelten und den bestrahlten Zellen Phasenkontrastaufnahmen gemacht. Danach wurden die Zelltrümmer mit PBS entfernt und die lebenden Zellen wurden mit 7B6- und SW5-Hybridomaüberstand für 1 h auf Eis gefärbt. Die Detektion erfolgte mit dem Sekundärantikörper anti-Maus-IgG-Alexa Fluor®488. Danach wurden die Zellen nacheinander für jeweils 10 min bei RT mit PFA-, Triton X-100- und DAPI-Lösung inkubiert. Die Immunfluoreszenzaufnahmen wurden am Axiovert 200M-Fluoreszenzmikroskop gemacht und mit der Axiovision-Software analysiert.

3.2.12. Bindung und Nachweis des rhLa-Proteins auf der Zelloberfläche

Für die Oberflächenbindungsstudien des La-Proteins wurden verschiedene Zelllinien sowie PBMCs untersucht. Die adhären Zellen wurden in 12-*well*-Platten ausgesät und am Folgetag mit 2-10 μM rhLa-Protein in PBS oder DMEM inkubiert. Die einstündige La-Bindung fand entweder auf Eis oder bei 37 °C statt. Anschließend wurden die Zellen auf Eis mit den anti-La-mAKs und einem entsprechenden Sekundärantikörper gefärbt, um das La-Protein auf der Zelloberfläche nachzuweisen. Danach wurden die Zellen mit PFA-, Triton X-100- und DAPI-Lösung behandelt, bevor Immunfluoreszenzaufnahmen gemacht wurden. Für die quantitativen Bindungsstudien wurden die gefärbten, unfixierten Zellen mit PBS-EDTA abgelöst und durchflusszytometrisch (3.2.13) untersucht. Alternativ wurden für die Durchflusszytometrie die adhären Zellen zuerst mit PBS-EDTA abgelöst und dann in einer 96-*well*-Spitzbodenplatte mit La und den Antikörpern inkubiert. Die genauen Angaben sind für jedes einzelne Experiment im Ergebnisteil aufgeführt.

3.2.13. Durchflusszytometrie

Mit Hilfe eines Durchflusszytometers (FACS-Gerätes) können die Zellen einer Suspension auf ihre Größe, Granularität und Fluoreszenz hin untersucht werden. Dafür werden sie nach hydrodynamischer Fokussierung einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Die detektierte Vorwärts-Lichtstreuung korreliert mit der Größe der Zellen, die Seitwärts-Lichtstreuung mit deren Granularität bzw. Zytoplasma/Kern-Verhältnis. Als weiterer Parameter wird die Fluoreszenz der Zellen gemessen. Wurden bestimmte Oberflächenmoleküle der Zellen (auf Lymphozyten als CD- (*cluster of differentiation*) Moleküle bezeichnet) zuvor mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern angefärbt, so korreliert die gemessene Fluoreszenz mit der Antigendichte auf der Zelloberfläche. Es können auch mehrere Antigene gleichzeitig nachgewiesen werden, indem die jeweiligen monoklonalen Antikörper an unterschiedliche Farbstoffe gekoppelt sind. Hier kommen vor allem Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) zum Einsatz.

Die Zellsuspension wurde entsprechend der Probenanzahl in einer 96-*well*-Spitzbodenplatte verteilt (etwa $2 \cdot 10^5$ Zellen/Vertiefung) und die Zellen wurden pelletiert (5 min, 360 x g, 4 °C). Nun wurden die Antikörper zugegeben. Die Färbung fand für 30-60 min bei 4 °C im Dunkeln statt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 100 μl PBS gewaschen. Wurde ein unmarkierter Antikörper verwendet, schloss sich die Färbung mit Fluoreszenzfarbstoff-markiertem Sekundärantikörper in gleicher Weise an. Abschließend wurden die Zellen in 200 μl PBS

aufgenommen und in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Proben wurden am FACScan®-Gerät gemessen.

Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit dem Programm WinMDI 2.8. Das Streubild erlaubte die Ausgrenzung toter Zellen und bei PBMCs die getrennte Analyse der unterschiedlichen Zellpopulationen (Lymphozyten und Monozyten). Die gemessene Fluoreszenz (z. B. des FITC-Kanals) wurde als Histogramm dargestellt, um sowohl den Anteil an gefärbten Zellen (%) als auch deren mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) evaluieren zu können. Die ungefärbten Zellen oder nur mit Sekundärantikörper behandelten Proben wurden als Überlagerung mit in die Histogramme aufgenommen und als solche gekennzeichnet. Bei der gleichzeitigen Verwendung von zwei unterschiedlich markierten Antikörpern wurde die Zwei-Parameter-Darstellung (*dot plot*) gewählt, um zwischen negativen, einfach positiven oder doppelt positiven Zellen differenzieren zu können.

3.2.14. Isolation peripherer mononukleärer Blutzellen

Voraussetzung für die Untersuchung von PBMCs, denen T-, B-, NK-Zellen sowie Monozyten und DCs angehören, ist deren Abtrennung von den übrigen Blutbestandteilen. Dies gelingt durch eine Dichtegradientenzentrifugation. Eine Ficoll-Lösung, die eine höhere Dichte als die PBMCs besitzt, wird mit dem verdünnten Blut überschichtet. Nach der Zentrifugation reichern sich die PBMCs an der Phasengrenze zwischen Ficoll und Serum an. Die schwereren Erythrocyten und Granulozyten bilden am Boden des Röhrchens ein Pellet.

3.2.14.1. Gewinnung von PBMCs aus Frischblut

Die 10 ml Blut einer EDTA-Monovette wurden mit isotonischer NaCl-Lösung auf 20 ml aufgefüllt. In einem 50 ml Greinerröhrchen wurden 15 ml Ficoll-Lösung vorgelegt und diese mit dem verdünnten Blut langsam überschichtet. Nach der Zentrifugation (980 x g, 20 min, 20 °C; Beschleunigen und Bremsen auf kleinster Stufe) wurden die Zellen der Interphase mit einer Sterilpipette abgesaugt und in ein weiteres 50 ml Röhrchen überführt. Die PBMCs wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend pelletiert (360 x g, 10 min, 4 °C). Schließlich wurden sie in 1 ml RPMI aufgenommen, gezählt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

3.2.14.2. Isolation größerer Mengen an PBMCs aus *buffy coats*

Für die Isolation von NK-Zellen wurden größere Mengen an PBMCs benötigt. Hierfür wurde aufkonzentriertes Spenderblut (*buffy coat*) vom Institut für Transfusionsmedizin (Universitätsklinikum, TU Dresden) bezogen. Die Zellsuspension wurde in eine Glasflasche überführt und mit isotonischer NaCl-Lösung auf ein Endvolumen von 200 ml gebracht. Je 75 ml Ficoll-Lösung, die sich in einem sterilen Zentrifugenbecher befanden, wurde mit 100 ml verdünntem Blut überschichtet. Die sich anschließenden Zentrifugations- und Waschschriffe entsprachen denen in Abschnitt 3.2.14.1.

3.2.15. Generierung aktivierter CD8⁺ T-Zellen in vitro

Durch Stimulation von frisch isolierten PBMCs mit einem anti-CD3-Antikörper (OKT3) sowie dem proliferationsfördernden Zytokin IL-2 kann eine CD8⁺ T-Effektorzellpopulation *in vitro* angereichert werden. Das folgende Protokoll wurde am Institut für Immunologie entwickelt und die resultierenden CD8⁺ T-Zellen wurden ausführlich charakterisiert.

Je Vertiefung einer 24-*well*-Platte wurden $5 \cdot 10^5$ frisch isolierte PBMCs in 1 ml RPMI mit 25 U/ml IL-2 und 50 ng/ml OKT3 für 5 Tage stimuliert. Dann erfolgte ein Mediumwechsel, indem die Zellen resuspendiert und in ein 15 ml Greinerröhrchen überführt wurden. Nach Zentrifugation (360 x g, 5 min, 20 °C) wurden die Zellen wiederum in RPMI mit 25 U/ml IL-2 aufgenommen und weitere 2 Tage kultiviert, bevor sie für den Zytotoxizitätstest eingesetzt wurden. Die Aktivierung der Zellen wurde nach Färbung mit einer Kombination aus anti-CD3-PE-Cy5, anti-CD4-FITC und anti-CD8-PE oder anti-CD8-PE-Cy5, anti-CD4-FITC und anti-CD25-PE im Durchflusszytometer kontrolliert.

3.2.16. Isolation und Kultivierung von Natürlichen Killerzellen

Die Isolation der NK-Zellen wurde mit Hilfe des Isolationskits für humane NK-Zellen und des AutoMACS der Firma Miltenyi Biotec vorgenommen. Das Verfahren beruht auf der sogenannten Negativdepletion der CD56⁺ NK-Zellen. Alle übrigen Zellen, die in den PBMCs enthalten sind, werden durch spezifische, biotinylierte Antikörper markiert. Nach Zugabe von anti-Biotin-Antikörpern, die an magnetischen Mikropartikeln (*microbeads*) immobilisiert sind, werden die markierten Zellen in einem Magnetfeld abgetrennt, während die unmarkierten CD56⁺ NK-Zellen gewonnen werden können.

Die gewünschte Anzahl an PBMCs wurde pelletiert (360 x g, 10 min, 4 °C), in 40 µl Isolationspuffer und 10 µl Antikörper-Cocktail je $1 \cdot 10^7$ Zellen resuspendiert und für 10 min bei 4 °C unter gelegentlichem Mischen inkubiert. Danach wurden je $1 \cdot 10^7$ Zellen 30 µl Isolationspuffer und 20 µl der NK-Zell-*microbeads* hinzugefügt und mit den Zellen für 15 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden in kaltem PBS gewaschen, pelletiert (360 x g, 10 min, 4 °C) und in 1 ml 2 mM EDTA in PBS resuspendiert. Die Isolation der Zellen wurde unter automatischer Verwendung von Lauf-, Spül- und Reinigungs-Puffer im AutoMACS vorgenommen. Die isolierten Zellen wurden erneut pelletiert (360 x g, 10 min, 4 °C), in RPMI HS aufgenommen und die Zellzahl wurde bestimmt. Zur Überprüfung der Reinheit wurden $1 \cdot 10^5$ NK-Zellen mit 3 µl anti-CD56-PE-Cy5 und 1 µl anti-CD314-PE gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Es wurden immer Reinheiten über 95% erzielt. In einer 12-*well*-Platte für Suspensionszellen wurden je Vertiefung zu 2 ml RPMI HS $5 \cdot 10^6$ NK-Zellen gegeben. Sie wurden über Nacht mit 100 U/ml IL-2 aktiviert.

3.2.17. Chromfreisetzungstest

Für die Untersuchung von zytotoxischen Effektormechanismen der CD8⁺ T-Zellen oder NK-Zellen können Chromfreisetzungstests verwendet werden [160]. Hierfür werden die zu untersuchenden Zielzellen mit radioaktivem Natriumchromat (Na₂⁵¹CrO₄, im Folgenden ⁵¹Cr) kultiviert. Das wird von lebenden Zellen spontan in das Zellinnere aufgenommen, aber nicht wieder abgegeben. Danach werden die markierten Zellen mit den zytotoxischen Effektorzellen und den zu untersuchenden Faktoren kokultiviert. Wird in den Zielzellen Apoptose ausgelöst, so wird das ⁵¹Cr in das Zellkulturmedium freigesetzt, wo es detektiert werden kann.

Die adhärennten Zielzellen wurden mit PBS-EDTA abgelöst, pelletiert (360 x g, 5 min, 20 °C) und in RPMI resuspendiert. Je 1·10⁶ Zielzellen wurde 1 ml RPMI mit 20 µl ⁵¹Cr (etwa 100 µCi) versetzt und für 1 h im Inkubator kultiviert. Anschließend wurde das überschüssige ⁵¹Cr durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Nun wurden die Zellen gezählt und aufgeteilt. Ein Teil wurde nur in RPMI gehalten, die übrigen Zellen wurden in einem Gesamtvolumen von 700 µl (24-well-Platte) mit rhLa-Protein versetzt. Nach 1 h wurde wiederum gewaschen und die Zellzahlen wurden bestimmt.

In der Zwischenzeit wurden die Effektorzellen (CD8⁺ T-Zellen aus 3.2.15 und NK-Zellen aus 3.2.16) vorbereitet. Sie wurden durch Resuspendieren aus den Zellkulturplatten entnommen, pelletiert, in frischem RPMI-Medium aufgenommen und gezählt.

Die Ziel- und Effektorzellen wurden in 96-well-Flachbodenplatten in einem Gesamtvolumen von 200 µl RPMI kokultiviert. Von jedem Ansatz wurde eine Dreifachbestimmung gemacht. Außerdem gab es Proben, in denen nur die Zielzellen in RPMI enthalten waren, um die spontane Chromfreisetzung zu ermitteln. Die maximale Chromfreisetzung wurde bestimmt, indem die Zielzellen in Gegenwart von 2,5% (v/v) Triton X-100 inkubiert wurden.

Für die T-Zell-Experimente wurden 5000 Zielzellen mit 1·10⁵ T-Zellen in An- und Abwesenheit von CD3x7B6 scBsDb für 18 h kokultiviert. Die NK-Zell-Ansätze beinhalteten jeweils 1·10⁴ Zielzellen, 1·10⁵ NK-Zellen und die zu untersuchenden Proteine (hAk oder ULBP2-CD33). Hierfür wurde die Chromfreisetzung bereits nach 4 h gemessen. Die verwendeten Zielzelllinien und Proteinkonzentrationen sind im Ergebnisteil aufgeführt.

Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurde die Platte zentrifugiert (360 x g, 5 min, 20 °C) und 25 µl jedes Überstandes wurden in einer OptiPlate-96-Platte mit 150 µl Szintillationsflüssigkeit vermischt. Nach Inkubation der Proben für 5 min unter Schütteln wurden die *counts per minute* (cpm) mit Hilfe eines Flüssig-Szintillationszählers bestimmt.

Für jede Probe wurde die spezifische Lyse wie folgt berechnet:

$$\text{spezifische Lyse [\%]} = 100 \cdot \frac{\text{cpm experimentelle Freisetzung} - \text{cpm spontane Freisetzung}}{\text{cpm maximale Freisetzung} - \text{cpm spontane Freisetzung}} \quad \text{Formel 2}$$

Durch die Dreifachbestimmungen wurde für jeden Ansatz ein Mittelwert mit seiner Standardabweichung (SD) berechnet. Die statistische Signifikanz wurde mit einem Student'schen t-Test untersucht (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

3.3. Proteinbiochemische Methoden

3.3.1. Reinigung rekombinanter Proteine mittels Metallchelatchromatographie

Durch die Fusion der rekombinanten Proteine mit einer Hexahistidinsequenz (His₆-Tag) können die prokaryont bzw. eukaryont hergestellten Proteine durch nur einen Affinitätschromatographieschritt von den meisten bakteriellen Proteinen bzw. dem Zellkulturmedium separiert, d. h. gereinigt werden [161]. Der Bindungspartner für His₆-Tags ist der Komplexbildner Nitrilotriessigsäure (NTA), der zweiwertige Metallionen mit hoher Affinität binden kann. Für die Affinitätschromatographie ist NTA an Agarosepartikel gekoppelt und mit Nickelionen beladen (Ni-NTA). Wird nun die Ni-NTA-Agarose mit dem bakteriellen Totalextrakt oder dem Zellkulturüberstand inkubiert, werden die Proteine mit dem His₆-Tag spezifisch gebunden und die übrigen Proteine können durch Waschen mit Puffer entfernt werden. Die Bindung ist reversibel und kann durch Zugabe von Imidazol, welches strukturell dem aromatischen Ring der AS Histidin entspricht, aufgehoben werden.

3.3.1.1. Ni-NTA-Affinitätschromatographie zur Reinigung prokaryont hergestellter Proteine

Die Reinigung der bakteriell produzierten Proteine wurde unter nativen Bedingungen (Puffer auf PBS-Basis) durchgeführt. Zur Vermeidung von Proteindegradation wurden alle verwendeten Puffer auf 4 °C vorgekühlt und der Totalextrakt sowie die Eluate wurden auf Eis aufbewahrt. Der Lysepuffer wurde mit dem Proteaseinhibitor PMSF versetzt. Die unspezifische Bindung von Proteinen an die Ni-NTA-Agarose sollte verhindert werden, indem allen Puffern zusätzlich 150 mM NaCl zugesetzt wurde. Weiterhin wurde schon die Beladung der Säule in Gegenwart von 10 mM Imidazol durchgeführt.

Das tiefgefrorene Bakterienpellet der 800 ml Expressionskultur (Abschnitt 3.1.8.9), das sich in einem 50 ml Greinerröhrchen befand, wurde auf Eis aufgetaut und vollständig in 20 ml *E. coli*-Lysepuffer resuspendiert. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit Ultraschall aufgeschlossen (Branson Sonifier 250; 40% Duty Cycle, Output Control 4, viermal 2 min). Anschließend wurden die nicht löslichen Zellbestandteile abzentrifugiert (20 min, 10000 × g, 4 °C) und der klare Überstand wurde in ein neues 50 ml Greinerröhrchen überführt.

Für die Affinitätssäule wurde der Boden einer 5 ml Plastikspritze mit einer Schicht Glaswolle bedeckt und der Auslauf verschlossen. Die Spritze wurde senkrecht befestigt und auf die Glaswolle wurde 1 ml der Ni-NTA-Suspension gegeben. Nachdem sich das Säulenmaterial gesetzt hatte, wurde es vorsichtig mit PBS überschichtet und der Verschluss der Spritze wurde entfernt. Die Säule wurde mit 10 ml *E. coli* Lysepuffer äquillibriert.

Nun wurde das Bakterienlysat aufgetragen und der Durchlauf wurde gesammelt. Anschließend wurde mit 10 ml Waschpuffer 1 gewaschen, um alle nicht gebundenen Proteine von der Säule zu entfernen. Während der folgenden drei Waschschrte mit je 1 ml Waschpuffer 2 wurden Fraktionen von 1 ml gesammelt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit viermal 1 ml des Elutionspuffers. Die Eluate wurde ebenfalls in 1 ml Fraktionen gesammelt und

zusammen mit dem Durchlauf und den Waschfraktionen auf Eis aufbewahrt. Von jeder dieser Proben wurden 15 µl mit 15 µl 2× SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 60 °C inkubiert. Nach der SDS-PAGE (3.3.6) wurde die Proteine im Gel mit Coomassie (3.3.7) gefärbt, um die gewonnene Proteinmenge beurteilen zu können. Die Eluate, welche das gewünschte Protein in reiner Form enthielten, wurden miteinander vereinigt und gegen PBS dialysiert. Danach wurde das Protein in 100 µl Aliquots bei -20 °C gelagert.

3.3.1.2. Gewinnung eukaryont hergestellter Proteine aus dem Zellkulturüberstand

Durch die Fusion der rekombinanten Antikörpermoleküle mit dem Igκ-Signalpeptid werden die Proteine in das Zellkulturmedium sezerniert und können daraus gewonnen werden. Durch die 10% (v/v) FCS im Medium enthält dieses vor allem BSA, das ein ähnliches Molekulargewicht (60 kDa) wie die scBsDb-Proteine aufweist. Deshalb war es erforderlich, in den eluierten Proteinen das Vorhandensein des His₆- oder c-myc-Tags mittels Western Blot zu bestätigen.

Die verbleibenden Zellen sowie Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 10000 × g und 4 °C aus dem Überstand entfernt. Eine Ni-NTA Spin Column wurde mit 2 ml PBS äquilibriert und anschließend wurden etwa 100 ml Überstand mit Hilfe von Vakuum auf die Säule aufgetragen. Die Waschschritte (je einmal 0,5 ml Waschpuffer 1 und 2) sowie die Elution (dreimal je 0,5 ml Elutionspuffer) erfolgten durch Zentrifugation (3 min, 2000 × g, 4 °C). Dabei befand sich die Säule in 2 ml Eppendorfgefäßen, in denen die Fraktionen aufgefangen wurden. Von jeder Probe wurden 15 µl mit 15 µl 2× SDS-Probenpuffer vermischt und für 10 min auf 60 °C erhitzt. Nach der SDS-PAGE und dem Western Blot wurde die Nitrocellulosemembran mit Ponceau-S-Lösung gefärbt. Wurde in den Elutionsfraktionen eine Proteinbande detektiert, so wurden diese Proben gegen PBS dialysiert. Nach Blockierung der Membran über Nacht wurde mit anti-His und anti-Maus-AP das rekombinante Protein spezifisch nachgewiesen. Die gereinigten rekombinanten Antikörper wurden bei 4 °C gelagert.

3.3.2. Isolierung von humanen anti-La-Antikörpern aus Patientenseren

SLE-Patienten entwickeln oft nicht nur Autoantikörper gegen das La-Protein, sondern auch gegen weitere nukleäre Antigene. Deshalb wurden die monospezifischen anti-La-hAk mit Hilfe einer La-Sepharose 4B-Säule aus dem SLE-Patientenserum gereinigt.

Hierfür wurden 5 g aktivierte CH-SepharoseTM 4B mit 1 mM HCl zum Quellen gebracht und anschließend mit insgesamt 1 l 1 mM HCl gewaschen. Danach wurden 18 mg rhLa-Protein in 9 ml 0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl (pH 8,0) hinzugegeben. Die Suspension wurde 4 h bei RT unter Rühren inkubiert. Das überschüssige Protein wurde mit 0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl (pH 8,0) gewaschen. Während der sich anschließenden mehrtägigen Inkubation in 100 mM Tris/HCl (pH 8,0) bei 4 °C wurden die ungesättigten CH-Bindestellen blockiert.

Zur Herstellung einer Säule wurde eine 10 ml Plastikspritze senkrecht befestigt, der Boden mit Glaswolle bedeckt und es wurde soviel La-Sepharose 4B-Suspension hinzugefügt, dass ein dicht gepacktes Säulenvolumen von 2 ml entstand. Die Säule wurde mit 30 ml PBS äquilibriert. Das Patientenserum wurde zentrifugiert (15 min, 10000 × g, 4 °C) und 2 ml vom Überstand wurden auf die Säule aufgetragen. Nach gründlichem Waschen mit insgesamt 50 ml PBS wurde

zuerst mit 2 ml 0,1 M Glycin/HCl (pH 3,0) (Elutionspuffer 1) eluiert und anschließend mit 2 ml 0,1 M NaHCO₃, 1,7 M NaCl (pH 9,0) (Elutionspuffer 2). Beide Eluate wurden über Nacht gegen PBS dialysiert. Danach wurde die Reaktivität gegen rhLa-Protein im Western Blot überprüft. Die gereinigten hAK wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

3.3.3. Dialyse

Nach der Reinigung mussten die Proteine in PBS überführt werden, um eine bessere Proteinstabilität zu erzielen und die Zellexperimente nicht durch den entsprechenden Elutionspuffer zu beeinflussen. Deshalb wurden die Eluate in eine Dialysemembran überführt und über Nacht gegen 5 l PBS bei 4 °C dialysiert.

3.3.4. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Messung der Proteinkonzentration wurde das PBS nach der Dialyse als Referenz eingesetzt und die Proben wurden gegebenenfalls auch in PBS verdünnt. Es wurde die optische Dichte im linearen Messbereich des Photometers (0,1-1) bei 280 nm mit Hilfe einer Quartzküvette gemessen, da die aromatischen AS Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan bei dieser Wellenlänge Absorptionsmaxima aufweisen. Die Extinktionskoeffizienten der rekombinanten Proteine wurden dem Programm Vector NTI entnommen. Für die Antikörper wurde die Konzentration mit dem Quick Start Bradford Protein Assay Kit 3 entsprechend der Herstellerangaben gegen bovine Gammaglobuline als Referenzstandard bestimmt. Des Weiteren wurden für alle gereinigten Proteine Coomassie-gefärbte SDS-Polyacrylamidgele angefertigt, um die Reinheit zu überprüfen und die gemessene Proteinkonzentration im Vergleich zu einem BSA-Standard zu verifizieren.

3.3.5. Enzyme-linked immunosorbent assay

Mit dieser quantitativen analytischen Methode können Hybridomaüberstände und Patientenseren auf enthaltene anti-La-Antikörper untersucht werden. Im ersten Schritt des ELISAs wird das Antigen an eine Mikrotiterplatte gebunden. Nach Inkubation mit den Hybridomaüberständen oder Patientenseren können die an die Platte gebundenen Antikörper mit einem enzymmarkierten Sekundärantikörper nachgewiesen werden [162, 163]. Die verwendete Meerrettichperoxidase (POD) setzt die Substratlösung in ein quantifizierbares Farbprodukt um.

3.3.5.1. Analyse von Hybridomaüberständen

Rekombinantes His₆-hLa-Protein wurde in Beschichtungspuffer verdünnt (1-5 µg/ml). Davon wurden 100 µl in jede Vertiefung der ELISA-Platte gegeben und über Nacht bei 4 °C oder 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen der Platte mit 200 µl ELISA-Waschpuffer je Vertiefung und Waschschrift wurden die übrigen Bindungsstellen mit je 200 µl ELISA-Blockierungslösung für 1 h bei 37 °C abgesättigt. Nach erneutem Waschen wurden 100 µl Hybridomaüberstand in jede Vertiefung der Platte gegeben. Die Bindung erfolgte für 1 h bei 37 °C. Anschließend wurden die ungebundenen Antikörper durch fünfmaliges Waschen entfernt und vom verdünnten Sekundärantikörper anti-Maus-IgG-POD (1:40000 in PBS) wurden 100 µl je Vertiefung aufgetragen. Nach 1 h bei 37 °C wurden die überschüssigen Antikörper wiederum durch Waschen

entfernt. In jede Vertiefung wurden 100 µl der Substratlösung pipettiert und die Platte wurde im Dunkeln inkubiert. Nachdem eine deutliche Farbentwicklung erkennbar war, wurde die Reaktion mit 50 µl Stopplösung je Vertiefung beendet. Die Quantifizierung erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 450 nm (Referenzfilter 620 nm) mit Hilfe eines ELISA-Platten-Leseegerätes.

3.3.5.2. Untersuchung der redoxabhängigen Antikörperbindung

Die ELISA-Platte wurde mit 10 µg/ml rhLa über Nacht bei 4 °C beschichtet. Dem schloss sich die Oxidation (3% (v/v) H₂O₂ in PBS, 30 min, RT) oder Reduktion (2% (v/v) β-Mercaptoethanol in PBS, 30 min, RT) für einen Teil der Vertiefungen an. Nach Blockierung der gesamten Platte wurde mit Hybridomaüberständen oder Patientenseren inkubiert. Die Detektion erfolgte mit anti-Maus-IgG-POD bzw. anti-human-IgG-POD. Die Inkubationszeiten, Waschschrte und die Detektion entsprechen der Beschreibung unter 3.3.5.1.

3.3.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die diskontinuierliche SDS-PAGE [164] dient der Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts im elektrischen Feld. Die Eigenladungen des Proteins werden durch das im Probenpuffer enthaltene anionische Detergens SDS überdeckt, das an alle Proteine im Überschuss bindet. So wird ein konstantes Masse/Ladungs-Verhältnis erzielt. Zusätzlich werden Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine durch Erhitzen und Reduktionsmittel wie DTT zerstört, um das Laufverhalten nicht zu beeinflussen. Die Proben durchlaufen zuerst das Sammelgel, das durch eine niedrige Polyacrylamidkonzentration und einen pH-Wert von 6,8 das Entstehen scharfer Proteinbanden begünstigt. Die eigentliche Separation erfolgt im Trenngel mit höherer Polyacrylamidkonzentration und einem pH-Wert von 8,8.

Abhängig vom Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins wurden Trenngele mit einer Polyacrylamidkonzentration von 10-15% verwendet. Dafür wurden Acrylamid (Rotiphorese® Gel A) und N,N-Methylenbisacrylamid (Rotiphorese® Gel B) in entsprechenden Mengen gemischt und die Polymerisation wurde durch Zugabe von APS und TEMED eingeleitet. Auf das Trenngel wurde ein Sammelgel polymerisiert, das mit einem entsprechenden Kamm versehen wurde. Die Zusammensetzung der Gele kann Tabelle 2 entnommen werden.

Tabelle 2: Zusammensetzung der SDS-Gele.

Komponenten	Sammelgel	Trenngel		
		10%	12%	15%
ddH ₂ O	1,3 ml	2,5 ml	1,6 ml	0,2 ml
Rotiphorese® Gel A	0,38 ml	3,3 ml	3,9 ml	4,9 ml
Rotiphorese® Gel B	0,15 ml	1,3 ml	1,6 ml	2 ml
Sammelgelpuffer	0,5 ml	---	---	---
Trenngelpuffer	---	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml
10% (w/v) APS	25 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	2,5 µl	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl

Die Proben wurden mit dem gleichen Volumen an 2 × SDS-Probenpuffer versetzt, für 5-10 min auf 95 °C erhitzt (Imidazol-haltige Proben nur auf 60 °C) und auf das Gel aufgetragen. Zur Kontrolle des Laufverhaltens und zur Größenbestimmung wurde ein vorgefärbter Molekulargewichtsstandard für jedes Gel verwendet. Als Puffersystem diente ein Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffer und es wurden Mini-PROTEAN III-Gelkammern genutzt. Die SDS-PAGE wurde bei einer angelegten Spannung von 100 V durchgeführt.

3.3.7. Coomassiefärbung von SDS-Gelen

Für die Detektion der Proteinbanden wurden die Gele nach der SDS-PAGE für 1 h in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Die Entfärbung wurde unter mehrmaligem Wechseln der Entfärbelösung vorgenommen, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren.

3.3.8. Western Blotting und Immundetektion einzelner Proteine

Nach der SDS-PAGE können die entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennten Proteine vom Polyacrylamidgel elektrophoretisch auf eine Membran übertragen werden (*Western Blotting*). Auf dieser können dann bestimmte Proteinbanden durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Zur Detektion gibt es zwei verschiedene Verfahren. Der Sekundärantikörper kann entweder an das Enzym AP gekoppelt sein, welches die Substrate NBT und BCIP zu einem violetten Farbkomplex umsetzt [165] oder er ist mit dem Enzym POD fusioniert, welche mit entsprechendem Substrat Chemilumineszenz erzeugt.

Für den elektrophoretischen Transfer wurde das *Semi-dry* Blottingverfahren [166] unter Verwendung einer Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell genutzt. Es wurden vier Lagen Whatmann-Filterpapier entsprechend der Gelgröße in Anodenpuffer getränkt und auf die Anode des Gerätes gelegt. Darauf wurde eine entsprechend große Nitrocellulosemembran gelegt. Es folgte das Gel, das nach der SDS-PAGE zur Entfernung des Laufpuffers kurz in ddH₂O gespült worden war. Den Abschluss des „Sandwichs“ bildeten vier Lagen Filterpapier, die mit Kathodenpuffer befeuchtet waren. Der Transfer erfolgte für 65 min bei 18 V. Bei Bedarf wurden die auf der Membran immobilisierten Proteinbanden anschließend durch eine zweiminütige Inkubation mit Ponceau S-Färbelösung und kurzes Waschen mit ddH₂O sichtbar gemacht. Dadurch wurde auch das ggf. notwendige Schneiden der Membran in mehrere Streifen erleichtert. Alternativ wurde eine PVDF-Membran eingesetzt. Diese wurde vor Verwendung kurz in MeOH inkubiert und anschließend für 10 min in PVDF-Transferpuffer äquilibriert. Die Whatman-Filterpapiere wurden im selben Puffer getränkt. Der Transfer erfolgte für 2 h bei 50 mA/Gel.

Die noch freien Proteinbindungsstellen der Membranen wurden über Nacht bei 4 °C oder 1 h bei RT mit Blockierungspuffer abgesättigt. Alle primären Antikörper wurden in Blockierungspuffer verdünnt und 1 h bei RT zur Membran gegeben. Anschließend wurde die Membran dreimal 5 min mit TBS-T gewaschen, bevor der sekundäre Antikörper, der ebenfalls in Blockierungspuffer verdünnt wurde, für 1 h bei RT an den Primärantikörper binden konnte. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T erfolgte die Detektion abhängig vom Enzym, das an den sekundären Antikörper gekoppelt war. Für AP wurde die Membran für 2 min in AP-Puffer inkubiert, um einen optimalen pH-Wert für das Enzym zu gewährleisten. Dann wurde die

NBT/BCIP-Substratlösung auf die Membran gegeben und nach Erscheinen violetter Farbpräzipitate wurde die Reaktion durch Waschen mit ddH₂O gestoppt.

War der Sekundärantikörper mit POD markiert, so wurde die Membran für 5 min mit dem ECL-Substrat nach Angaben des Herstellers inkubiert und die überschüssige Feuchtigkeit wurde anschließend durch Trocknen auf einem Zellstofftuch entfernt. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte mit dem ChemiDoc XRS System.

3.3.9. North-Western Blot

Mit einem North-Western-Blot können die RNA-Bindungseigenschaften der auf der Membran immobilisierten Proteine untersucht werden. Auf das SDS-Gel wurden 2-8 µg bakteriell hergestelltes und über Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigtes La-Protein aufgetragen. Nach der SDS-PAGE und dem Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte die übliche Inkubation mit Blockierungspuffer. Die DIG-RNA (aus 3.1.2.5) wurde 1:1000 in Blockierungspuffer verdünnt und für 1 h bei RT mit der Membran geschüttelt. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde die gebundene RNA mit anti-DIG-AP (analog zu 3.3.8) detektiert.

3.3.10. South-Western Blot

Der South-Western Blot erlaubt es, die DNA-Bindung an Proteine zu evaluieren, welche nach dem Western Blot auf einer Membran immobilisiert sind. Von jedem rekombinanten Protein wurden 0,5-3 µg auf das SDS-Gel aufgetragen. Nach dem elektrophoretischen Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurde diese zuerst blockiert. Dann wurde die in Blockierungspuffer verdünnte DIG-DNA (Verdünnung 1:1000; DIG-DNA aus 3.1.2.4) für 1 h bei RT zur Membran gegeben. Anschließend wurde mit TBS-T gewaschen und mit anti-DIG-AP entsprechend der Vorgehensweise in Abschnitt 3.3.8 entwickelt.

3.3.11. Far-Western Blot

Das Dimerisierungsverhalten von Proteinen lässt sich auf einem Far-Western Blot [167] untersuchen. Es wurden die N-terminal deletierten La-Proteine (etwa 1-5 µg rekombinantes Protein/Gelspur) durch Western Blotting auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Nach der Blockierung (siehe 3.1.2.4) wurde die Membran für 1 h bei RT mit 5 µg/ml rhLa-Protein in Blockierungspuffer behandelt. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T erfolgten Detektion und Entwicklung entsprechend Abschnitt 3.3.8 mit SW5-Hybridomaüberstand und anti-Maus-IgG-AP.

3.3.12. Immunpräzipitation

Für die IP werden üblicherweise die Eigenschaften von Protein A (aus *Staphylococcus aureus*) und Protein G (aus *Streptococcus*) genutzt, die beide an Fc-Regionen von Antikörpern binden können. Zuerst werden Totalextrakte von Zellen oder Geweben mit Antikörpern versetzt, welche ihr spezifisches Antigen binden können. Die Isolation des Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgt durch Zugabe von Protein A (oder G), das an Sepharosepartikel (*beads*) gekoppelt ist. Durch Zentrifugation können diese Partikel sedimentiert und die übrigen Komponenten des

Totalextraktes gewaschen werden. Anschließend kann das gesuchte Antigen nach SDS-PAGE im Western Blot nachgewiesen werden. Durch die Zugabe von SDS-Probenpuffer werden allerdings auch die schweren und leichten Ketten des Antikörpers von den Partikeln abgelöst. Sie können bei der Detektion im Western Blot erscheinen, wenn der Primärantikörper für den Blot und der Antikörper für die Präzipitation aus der gleichen Spezies stammen. Liegt das Molekulargewicht des Antigens im Bereich der schweren und leichten Ketten (55 kDa bzw. 23 kDa), wird die Detektion erschwert bzw. unmöglich.

Dieses Problem wird durch das TrueBlot™-System gelöst, welches nach der Präzipitation einen Überschuss an DTT einsetzt, um die Disulfidbrücken der Antikörper vollständig zu reduzieren. Für die Detektion im Western Blot wurde ein Sekundärantikörper generiert, der spezifisch die oxidierte Form der Primärantikörper erkennt und somit die schweren und leichten Ketten auf dem Blot nicht mehr erscheinen. Für die Präzipitation werden Ziege-anti-Maus-Ig-*beads* verwendet anstatt Protein A/G.

Für die Herstellung von Totalextrakten wurden 300 µl IP-Lysepuffer zu etwa $1 \cdot 10^6$ Zellen gegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Nach gründlichem Resuspendieren wurde das Lysat in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die unlöslichen Zellreste wurden durch Zentrifugation (10 min, 4 °C, 10000 x g) abgetrennt. Der Überstand (Zelllysat) wurde zu 50 µl der TrueBlot™ anti-Maus Ig IP Beads-Suspension gegeben, die sich in einem weiteren 1,5 ml Reaktionsgefäß befand und zuvor mit 1 ml Lysepuffer gewaschen worden war. Nun wurde das Gemisch aus Lysat und *beads* für 30 min bei 4 °C rotierend inkubiert, um vor der eigentlichen Immunpräzipitation unspezifisch bindende Proteine aus dem Extrakt zu entfernen. Die *beads* wurden durch Zentrifugation (3 min, 4 °C, 10000 x g) abgetrennt und der Überstand wurde in einem weiteren 1,5 ml Reaktionsgefäß mit dem Primärantikörper (200 µl anti-La-Hybridomaüberstand) versetzt. Das Gemisch wurde für 1 h bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Danach wurden 50 µl TrueBlot™ anti-Maus Ig IP Beads zugegeben, die zuvor mit 1 ml Lysepuffer gewaschen worden waren. Es wurde wiederum für 1 h bei 4 °C rotierend inkubiert. Danach wurden die *beads* pelletiert (3 min, 4 °C, 10000 x g) und noch zweimal mit je 500 µl Lysepuffer gewaschen.

Zur Elution wurden 50 µl 50 mM DTT in 2 x SDS-Probenpuffer zu den *beads* gegeben. Nach kurzem Vortexen und Erhitzen für 5-10 min auf 95 °C wurden die *beads* schließlich durch Zentrifugation (3 min, 10000 x g) abgetrennt. Der Überstand wurde für die SDS-PAGE eingesetzt. Zur Detektion des Western Blots wurde der Sekundärantikörper Maus IgG TrueBlot™-POD verwendet.

3.4. Sequenzanalyse für die variablen Antikörperdomänen

Jede Sequenz der V_H - und V_L -Gene wurde mit denen in der *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)-Datenbank verglichen. Hierfür wurde das IgBlast-Verfahren mit seinen Standardparametern eingesetzt. Ausgegeben wurden mehrere verwandte V-, D- und J-Elemente mit der jeweiligen Sequenzidentität. Meist wurde für die Identifizierung der Hypermutationen das Element mit höchster Sequenzidentität verwendet. In einigen Fällen (7B6 HC, 5B9 HC, 24BG7 HC und 27E HC) basierten die V_H -Gensegmente eindeutig auf anderen Elementen, die durch häufigere Hypermutationen nur die zweit- oder dritthöchste

Sequenzidentität aufwiesen. Für diese Antikörper wurden die entsprechenden V_h -Elemente für die Berechnungen herangezogen.

Das IgBlast-Verfahren gibt die Positionen auf Nukleinsäure- und Proteinebene aus, an denen sich die Antikörpersequenz von der Keimbahnsequenz unterscheidet. Außerdem werden die FWR- und CDR-Regionen entsprechend des Kabat-Systems [168] angezeigt. Dieses basiert auf Vergleichen vieler unterschiedlicher Antikörpersequenzen, um daraus allgemeine Regeln für die Positionen der CDR-Regionen abzuleiten. Für die Alignments wurde das AlignX-Modul des Programms Vector NTI verwendet.

3.5. Räumliche Darstellung der Proteindomänen

Die Strukturen des La-Motivs, des RRM1 und RRM2 wurden mit Hilfe des Programms MOLMOL dargestellt. Die Grundlage bildeten die Koordinaten aus den jeweiligen NMR-Strukturen [102, 103], die in der Proteindatenbank (PDB) hinterlegt sind (1S7A La-Motiv, 1S9A RRM1 bzw. 1OWX RRM2). Es wurden die α -helikalen Bereiche sowie die β -Faltblätter gekennzeichnet. Für die Epitopcharakterisierungen der Antikörper in Kapitel 4.1.4 wurden bestimmte AS in der Kugel-Stab-Darstellung hervorgehoben.

4. Ergebnisse

4.1. Untersuchung monoklonaler anti-La-Antikörper

Für die Erzeugung von mAks werden üblicherweise Mäuse mehrfach mit einem bestimmten Antigen immunisiert, gegen das die Antikörper generiert werden sollen. Anschließend werden die Milzzellen der Mäuse isoliert und mit Myelomzellen fusioniert [16]. Die resultierenden Hybridomazellen können Antikörper sezernieren und sind in der Lage, sich uneingeschränkt zu teilen. Nach mehrmaligem Vereinzeln der Hybridomazellen erhält man Klone, die auf eine Ursprungszelle zurückgeführt werden können. In ihrem Zellkulturmedium finden sich die sogenannten mAks.

Die im Folgenden untersuchten anti-La-mAks wurden alle in der Arbeitsgruppe von Prof. Bachmann entwickelt. Einerseits wurde eine Vielzahl an Mäusen mit prokaryont hergestelltem, rekombinantem humanem La-Protein (rhLa) bzw. LaN (rhLa₁₋₁₉₂) immunisiert. Nach den Fusionen konnten die Hybridome 7B6 bzw. 5B9 isoliert werden (siehe Abbildung 8A). Andererseits wurden T-Zellen der immunisierten Mäuse auf hLa-transgene (hLaTg) Mäuse übertragen, um in diesen eine Immunantwort gegen das Transgen zu induzieren. Aus einer einzigen Fusion wurden die mAks 22A, 24BG7, 27E, 312B, 32A, 2F9, 16C sowie 13C5B erhalten (Abbildung 8B). Die beiden letzt genannten Antikörper sind vom Isotyp IgM, alle anderen sind IgG-Antikörper. Außerdem wurde der IgM 312G isoliert, der gegen das Ro 60-Antigen gerichtet ist.

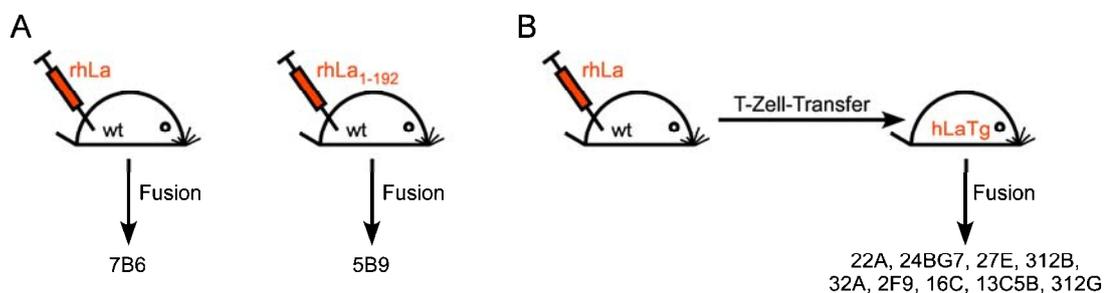


Abbildung 8: Verschiedene Techniken zur Generierung der unterschiedlichen anti-La-mAks.

A) Die mAks 7B6 und 5B9 wurden aus Wildtyp (wt)-Mäusen erhalten, die entweder mit rhLa oder mit dem rhLa₁₋₁₉₂-Antigen immunisiert worden waren. **B)** Die übrigen mAks stammen aus einer einzigen Maus. Diese war transgen für hLa (hLaTg) und erhielt T-Zellen von einer wt-Maus, die zuvor mit rhLa immunisiert worden war.

In dieser Arbeit kam außerdem der international verwendete und anerkannte anti-La-mAk SW5 zum Einsatz [146]. In den Kapiteln 4.1.1 und 4.1.3 wurde er als Kontrolle mitgeführt. SW5 wurde aus Mäusen erhalten, die mit gereinigtem La-Protein aus Kaninchenthyminus immunisiert worden waren. Der mAk wurde als IgG2b-Antikörper beschrieben, der hLa und Maus-La (mLa) erkennt [146]. In einer späteren Arbeit konnte die Reaktivität mit mLa nicht mehr nachgewiesen werden [169]. Der Antikörper ist in der Lage, hLa aus Zellextrakten zu präzipitieren. Die Epitopcharakterisierung hob die AS 112-138 und 171-183 als besonders wichtig für die SW5-Bindung hervor.

4. Ergebnisse

Das La-Protein ist ein konserviertes Protein, das zwischen Mensch und Maus zu 76,7% identisch ist [54]. Darüber hinaus finden sich unter den unterschiedlichen AS viele konservative Austausche. Ein Alignment der beiden Proteinsequenzen ist in Abbildung 9 dargestellt. Während sich die N-terminalen Hälften der Proteine kaum voneinander unterscheiden, sind die C-terminalen Bereiche weniger homolog und beide Proteine weisen unterschiedliche Insertionssequenzen auf.

hLa	MAENGDNEKMAALEAKICHQIEYYFGDFNLPRDKFLKEQIKLDEGWVPLEIMIKFNRLNR	60
mLa	MAENGDNEKMTALEAKICHQIEYYFGDFNLPRDKFLKEQIKLDEGWVPLETMIKFNRLNR	60
hLa	LTTFDNVIVEALSLSKAELMEISEDKTKIRRSPLPEVTDEYKNDVKNRSVYIKGFPT	120
mLa	LTTFDNVIVQALSLSKAKLMEVSADKTKIRRSPLPEVTDEYKNDVKNRSVYIKGFPT	120
hLa	DATLDDIKEWLEDKGQVLNIQMRRTLHKAFKGSIFVVFDSIESAKKFVETPGQKYKETDL	180
mLa	DATLDDIKEWLDDKGQILNIQMRRTLHKTFKGSIFAVFDSIQSAKKFVEIPGQKYKDTNL	180
hLa	LILFKDDYFAKKNEERKQNKVEAKLRAKQEQAQKLEEDAEMKSLEEKIGCLLKFSGDL	240
mLa	LILFKEDYFAKKNEERKQSKVEAKLAKQHEGRHKPGS-TETRALEGKMGCLLKFSGDL	239
hLa	DDQTCREDLHILFSNHGEIKWIDFVRGAKEGIILFKEKAKEALGKAKDANNGNLQLRNKE	300
mLa	DDQTCREDLHFLFSNHGEIKWVDFARGAKEGIILFKEKAKEALEKARNANNGNLLLRNKK	299
hLa	VTWEVLEGEVEKEALKKIIEDQQESLNKWKSKG-----RRFKGKGGKGNK	344
mLa	VTWKVLEGHAEKEALKKITDDQQESLNKWKSKGGHAGGRFKGSHVFTAARRFKGKGGKGNR	359
hLa	AAQPGSGKGVQFQGKTKFASDDEHDEHDENGATGPVKRAREETDKEEPASKQQKTENG	404
mLa	PGYAGAPKGRGQFHGRRTRFDDDDR-----RGPMKRGRDGRDREEPASKHKRENG	411
hLa	AGDQ	408
mLa	ARDK	415

Abbildung 9: Sequenzalignment für die La-Proteine aus Mensch (hLa) und Maus (mLa).

Die Proteinsequenzen wurden mit dem AlignX-Modul des Programms Vector NTI miteinander verglichen. Identische Reste sind in rot und ähnliche in grün hervorgehoben.

In gesunden Individuen finden keine Immunreaktionen gegen körpereigene Proteine statt, da autoreaktive T- und B-Zellen während ihrer Entwicklung eliminiert werden. Diese Toleranz und die Homologie zwischen hLa und mLa können die Ursache dafür sein, dass die Mäuse nach der konventionellen Immunisierung kaum Antikörper gegen rhLa-Protein entwickelten. Somit konnten nach einer Vielzahl von Fusionen nur die beiden mAks 5B9 und 7B6 erhalten werden. Stattdessen wurde durch den adoptiven T-Zell-Transfer eine starke B-Zell-Antwort gegen das hLa-Antigen induziert und aus einer Maus konnten somit mehrere mAks gewonnen werden.

Es wurde zunächst überprüft, ob die erhaltenen Hybridome aus B-Zellen der wt-Maus oder der hLaTg-Maus hervorgegangen waren. Von den Hybridomazellen wurden Totalextrakte hergestellt, um im Western Blot das hLa-Transgen in den Klonen nachzuweisen, welche nach adoptiven T-Zell-Transfer erhalten worden waren. Die La-Proteine der beiden Spezies können durch SDS-PAGE voneinander getrennt werden, da sie sich in ihrem Laufverhalten unterscheiden.

Obwohl das mLa-Protein aus 415 AS besteht, läuft es im SDS-Gel schneller als das 408 AS umfassende hLa-Protein. Die Detektion beider Proteine wurde mit dem mAk 5B9 vorgenommen (siehe Kapitel 4.1.3). Während die Hybridome SW5, 7B6 und 5B9 erwartungsgemäß nur das endogene mLa-Protein enthielten, verfügten alle anderen Klone über das hLa-Transgen. Deshalb müssen alle Antikörper aus der hLaTg-Maus von deren eigenen B-Zellen stammen. Durch den Transfer der aktivierten CD4⁺ T-Zellen auf die transgene Maus wurde deren Toleranz durchbrochen und es wurden anti-La-Antikörper entwickelt.

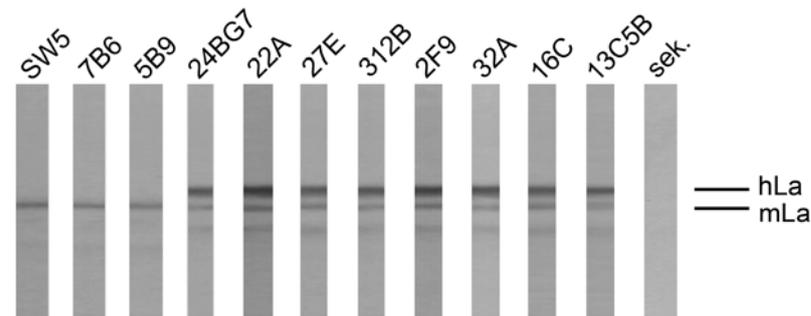


Abbildung 10: Nachweis des hLa-Transgens in einem Teil der Hybridomazellen.

Von den verschiedenen Hybridomazellen wurden Totalextrakte hergestellt und auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese und dem Western Blot auf eine PVDF-Membran wurden die hLa- und mLa-Proteine durch anti-La-5B9 und anti-Maus-IgG-AP detektiert. Der Sekundärantikörper (sek.) allein zeigte keine Proteinbande.

Im Folgenden wurden die DNA-Sequenzen der variablen Antikörperdomänen analysiert. Dabei wurden die zugrunde liegenden V-, D- und J-Genelemente identifiziert und auf Hypermutationen überprüft. Weiterhin wurde untersucht, ob die mit hLa-Protein immunisierten bzw. die einem adoptiven T-Zell-Transfer unterzogenen Mäuse nur Antikörper gegen das Fremdprotein produziert haben oder ob die Antikörper auch das endogene mLa-Protein binden können. Die genaue Kenntnis der Antikörperspezifitäten gibt darüber Auskunft, ob es zum Durchbrechen der B-Zell-Toleranz in der hLaTg-Maus gekommen ist. Dieses Wissen ist auch Grundvoraussetzung für die spätere Nutzung der Antikörper. Darüber hinaus wurden die Epitope identifiziert, welche von den Antikörpern erkannt werden.

4.1.1. Sequenzanalyse der variablen Domänen der schweren und leichten Ketten

Die Spezifität von Antikörpern wird durch die unterschiedliche Verwendung der V-, D- und J-Gensegmente während der somatischen Rekombination in den B-Zellen festgelegt. Nach dem ersten Antigenkontakt kommt es zur Affinitätsreifung, welche mit somatischen Hypermutationen einhergeht. Davon sind vor allem die CDR-Regionen in den variablen Domänen der schweren und leichten Ketten betroffen, da sie die Bindung des Antigens vermitteln. Jeder individuelle anti-La-mAk sollte deshalb eine unterschiedliche DNA-Sequenz in seinen variablen Genabschnitten aufweisen. Aus den Hybridomazellen wurde die mRNA isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Mit Hilfe von degenerierten Primern [151] wurden die variablen DNA-Bereiche durch PCR amplifiziert. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden in den Vektor pGEM®-T Easy ligiert, der wiederum in kompetente *E. coli* Top10F' transformiert wurde. Aus den erhaltenen Einzelklonen wurde die DNA isoliert und sequenziert. Alignments der Nukleinsäuresequenzen für die leichten Ketten sind in Abbildung 11A und für die schweren Ketten in Abbildung 11B dargestellt. Die zugehörigen Aminosäuresequenzen sind in Abbildung 12 gezeigt. Die FWR- und CDR-Bereiche wurden entsprechend des Kabat-Systems eingetragen [168]. Es ist deutlich erkennbar, dass sich jeder mAk in seiner Sequenz von den anderen unterscheidet. Dies bestätigt, dass aus der hLaTg-Maus tatsächlich individuelle Antikörper gewonnen wurden.

Die ersten Antikörper, die eine B-Zelle produziert, sind vom IgM-Isotyp. Erst während der Affinitätsreifung (somatische Hypermutationen in den variablen Bereichen) kommt es auch zum Klassenwechsel nach z. B. IgG. Entsprechend sollten die Sequenzen der anti-La-IgM-Antikörper weniger Punktmutationen im Vergleich zu den Keimbahngenen aufweisen als die der IgG-Antikörper. Um dies zu überprüfen, mussten die jedem Antikörper zugrunde liegenden V-, D- und J-Elemente bestimmt werden. Hierfür wurden die Sequenzen mit Hilfe des IgBLAST-Verfahrens [147] mit den Keimbahnsequenzen in der NCBI-Datenbank verglichen. Die ermittelten V- und J-Elemente der leichten Kette bzw. V-, D- und J-Elemente der schweren Kette werden in Tabelle 3 zusammengefasst. Für einige Antikörper kamen, abhängig von den jeweiligen Hypermutationen, mehrere V-Gensegmente in Frage, die eine vergleichbare Ähnlichkeit aufwiesen. Hier wurden die V-Elemente für die weiteren Analysen ausgewählt, welche weniger Deletionenbereiche aufwiesen. Manchmal wurden verschieden benannte D-Elemente mit identischer Sequenz ausgegeben, welche parallel in Tabelle 3 aufgenommen wurden.

Sowohl in den Alignments als auch in der tabellarischen Zusammenfassung wird deutlich, dass sich einige Antikörper derselben V-, D- oder J-Elemente bedienen haben, aber durch die unterschiedliche Kombination mit den übrigen Gensegmenten wurden schließlich verschiedene Antikörper erhalten. Auffällig ist außerdem, dass für die V_h -Gene sehr oft ein V_h J558-Element verwendet wurde.

Ferner wurden in jeder Antikörpersequenz die Positionen im Alignment markiert (grüne Bereiche in Abbildung 11), an denen Unterschiede zur Keimbahn auftraten. In den V_L -Genen gab es deutlich weniger Hypermutationen als in den V_H -Genen. Die Mutationen der V_L -Gene wurden entsprechend ihrer Lokalisation in den FWR- oder CDR-Regionen in Tabelle 4 aufgelistet. In ähnlicher Weise sind die Mutationen der V_H -Gene in Tabelle 5 zusammengestellt worden.

Während der V- (D-) J-Rekombination können zwischen den einzelnen Genabschnitten zusätzliche Nukleotide eingebaut oder auch einzelne Nukleotide deletiert werden. Hiervon sind die CDR3-Regionen betroffen, welche hauptsächlich für die Antigenbindung verantwortlich sind. Dadurch kann sich einerseits das Leseraster für die entsprechende Aminosäuresequenz ändern oder die Proteinsequenz erhält zusätzliche AS. In den untersuchten Antikörpersequenzen wurden sowohl Nukleotidinsertionen als auch –deletionsbereiche (in Abbildung 11 orange bzw. gelb hinterlegt) beobachtet. In den Genen der leichten Ketten treten diese vor den J-Elementen und in den Genen der schweren Ketten vor und nach dem D-Element auf, da hier zweimal rekombiniert wird. Wenn die Gensegmente in ihren Sequenzen partiell überlappen, so kann es durch die homologe Rekombination zum Ausschneiden der doppelt auftretenden Nukleotide kommen und es entstehen Deletionsbereiche. Die Insertionen und Deletionen wurden ebenfalls für jeden Antikörper in Tabelle 4 und Tabelle 5 aufgenommen.

Aufgrund der Degeneration des genetischen Codes hat nicht jede Mutation auf Nukleinsäureebene auch einen Aminosäureaustausch zur Folge. Die Hypermutationen auf Proteinebene wurden für die leichten und schweren Ketten in das AS-Alignment (Abbildung 12) eingetragen. Ihre genaue Lokalisation innerhalb der verschiedenen CDR- und FWR-Regionen wurde in Tabelle 4 bzw. Tabelle 5 nochmals zusammengefasst. Entsprechend der Mutationsraten auf DNA-Ebene treten auf Proteinebene in den leichten Ketten weniger Hypermutationen auf als in den schweren Ketten. Bei den schweren Ketten ist gut zu erkennen, dass in den CDR1- und CDR2-Regionen der überwiegende Teil der Mutationen auch einen Aminosäureaustausch bewirkt. Nur so kann die Antigenbindung während der Affinitätsreifung beeinflusst werden. In der CDR3-Region wird die Variabilität weniger durch Mutationen als vielmehr durch zusätzliche oder und fehlende Nukleotide hervorgerufen.

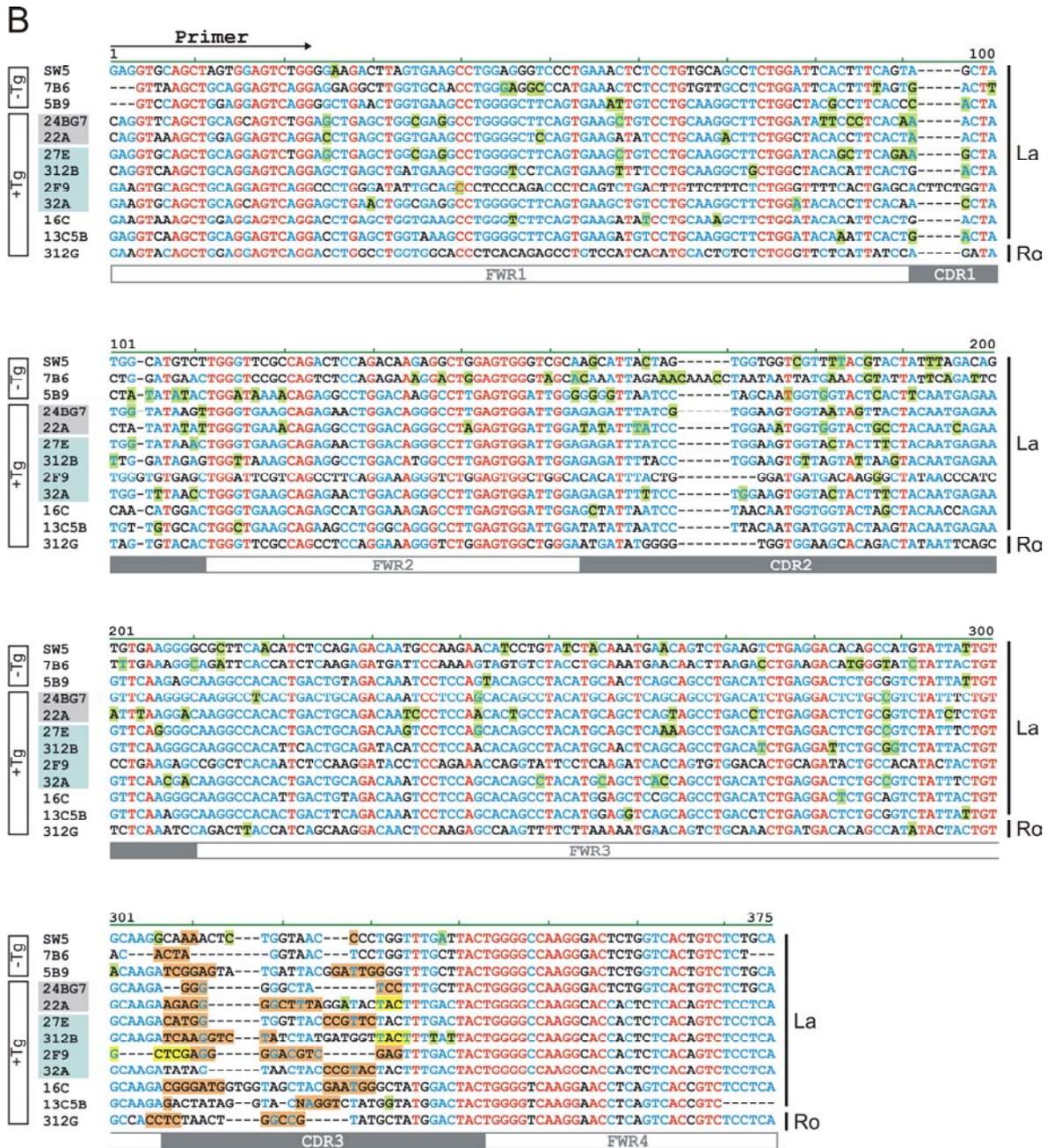


Abbildung 11: Alignments für die Nukleinsäuresequenzen der variablen Domänen der mAbs.

Die DNA-Sequenzen der variablen Domänen der A) leichten und B) schweren Ketten wurden mit dem AlignX-Modul des Programms VectorNTI gegeneinander verglichen. Identische Nucleotide sind in rot und in hohem Maße ausgetauschte in schwarz dargestellt. Positionen, an denen in geringem Maß Austausch stattfanden, wurden blau gekennzeichnet. Die CDR-Regionen wurden entsprechend des Kabat-Systems grau markiert. Mutationen wurden grün, Nucleotidinsertionen orange und Nucleotid-Deletionsbereiche (entstehen durch Überlappung von zwei Gensegmenten bei der Rekombination) gelb hinterlegt. Die ersten 24 bzw. 23 Nucleotide wurden außer Acht gelassen, da diese Sequenzunterschiede durch die degenerierten Primer verursacht wurden. Die Namen der Antikörper mit gemeinsamen Epitopbereichen (siehe später in Kapitel 4.1.4) wurden mit einem grauen bzw. hellblauen Kasten markiert. Weiterhin wurde für die Hybridome das Vorhandensein des hLa-Transgens (+Tg, -Tg) angegeben und am rechten Rand der Sequenzen wurden die erkannten Antigene (La oder Ro 60) eingetragen.

4. Ergebnisse

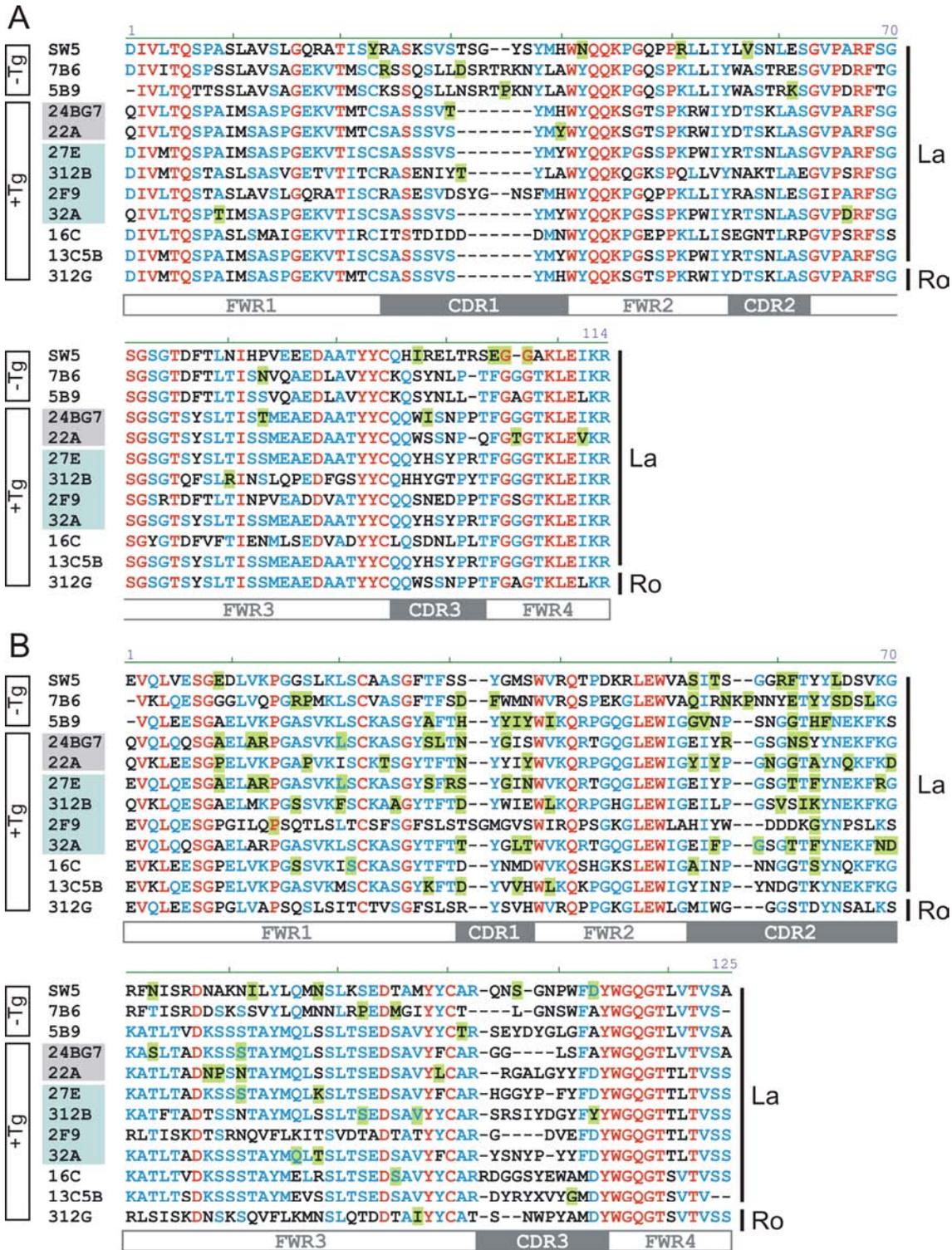


Abbildung 12: Alignments für die Aminosäuresequenzen der variablen Domänen der mAbs.

Es wurden jeweils die Aminosäuresequenzen der A) leichten und B) schweren Ketten mit dem AlignX-Modul des Programms VectorNTI miteinander verglichen. Die AS wurden im Einbuchstabencode abgekürzt. Identische AS sind in rot gekennzeichnet, unähnliche in schwarz dargestellt. Positionen, an denen in geringem Maß Austausch stattfanden, wurden blau markiert. Die eingezeichneten FWR- und CDR-Regionen entsprechen dem Kabat-System. Positionen, die durch somatische Hypermutationen einen Aminosäureaustausch erfahren hatten, wurden grün hinterlegt. Die acht N-terminalen AS wurden nicht in die Berechnungen einbezogen, da die Sequenzvarianz durch die degenerierten Primer verursacht wurde, die für die Amplifikation der DNA-Sequenzen eingesetzt wurden. Die Namen der Antikörper mit gemeinsamen Epitobereichen wurden grau bzw. hellblau gekennzeichnet (siehe Abschnitt 4.1.4). Außerdem sind die Sequenzen je nach Vorhandensein des hLa-Transgens (+Tg, -Tg) im Hybridom miteinander gruppiert worden. Am rechten Bildrand wurden die jeweiligen Antigene (La oder Ro 60) eingetragen.

Tabelle 3: Ermittelte V-J- bzw. V-D-J-Elemente für die leichten und schweren Ketten.

Die DNA-Sequenzen der variablen Domänen wurden mit Hilfe des Programms IgBlast mit der NCBI-Datenbank verglichen. Dadurch konnten die den Antikörpern zugrunde liegenden Genabschnitte ermittelt werden. Für jedes V-, D- oder J-Element (E) der leichten (l) und schweren (h) Kette wurde der Name der Datenbank-Sequenz angegeben, welche für die Berechnung der Mutationsraten herangezogen wurde. Außerdem ist die dazugehörige prozentuale Identität (%ID) aufgeführt. Des Weiteren wurde für jeden Antikörper der Isotyp aufgelistet.

mAk	Isotyp	V _l		J _l		V _h		D _h		J _h	
		E	%ID	E	%ID	E	%ID	E	%ID	E	%ID
SW5	IgG2b	21-12	98%	JK1	86%	VH7183.a7.10	94%	DSP2.7 DSP2.5	91%	JH3	98%
7B6	IgG1	8-21	98%	JK1	100%	VHJ606.a6.127	88%	DSP2.8 DSP2.7 DSP2.5	100%	JH3	100%
5B9	IgG2a	8-21	98%	JK5	100%	J558.33	91%	DSP2.2	100%	JH3	100%
24BG7	IgG1	kk4	99%	JK2	100%	J558.22	94%	DST4.3 DST4.2	100%	JH3	100%
22A	IgG1	kk4	99%	JK5	94%	J558.80.186	89%	DSP2.9	89%	JH2	100%
27E	IgG2b	aa4	97%	JK1	100%	J558.22	93%	DSP2.3	100%	JH2	100%
312B	IgG1	12-44	98%	JK2	100%	J558.6.96	94%	DSP2.9	100%	JH2	96%
2F9	IgG1	21-5	99%	JK4	100%	3609.21.174	96%	DST4.3 DST4.2	100%	JH2	100%
32A	IgG1	aa4	99%	JK1	100%	J558.84.190	93%	DSP2.x	100%	JH2	100%
16C	IgM	bt20	99%	JK2	100%	J558.16.106	96%	DFL16.3	100%	JH4	100%
13C5B	IgM	aa4	98%	JK1	100%	J558.47	97%	DSP2.11 DSP2.10	100%	JH4	98%
312G	IgM	kk4	98%	JK5	100%	VHQ52.a19.61	98%	DFL16.3	100%	JH4	100%

4. Ergebnisse

Tabelle 4: Analyse der Mutationsraten in den leichten Antikörperketten.

Für die V_L-Domänen wurden die Sequenzen mit den in Tabelle 3 aufgeführten DNA-Segmenten verglichen und die Zahl der Mutationen wurde auf Nukleotid- (N) und Aminosäureebene (A) bestimmt. Die ersten 24 Nukleotide, die durch die degenerierten Primer festgelegt worden sind, wurden nicht in die Analyse einbezogen. Außerdem ist die Anzahl an zusätzlichen (+) oder fehlenden (-) Nukleotiden vor dem J_L-Element angegeben.

mAk	Anzahl an Mutationen												Nukleotid- insertionen vor J _L		
	FWR1		CDR1		FWR2		CDR2		FWR3		CDR3			FWR4	
	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A		N	A
SW5	1	1			2	2	1	1			1	1	4	3	+3
7B6			2	2					1	1					+2
5B9			1	1			1	1							+1
24BG7			1	1					1	1	1	1			-1
22A			2	1					1				2	2	+1
27E	2														
312B			1	1					1	1	1				+1
2F9									1						+1
32A	1	1							1	1					
16C															+2
13C5B															
312G															-1

Tabelle 5: Anzahl der Mutationen in den variablen Bereichen der schweren Ketten.

Die V_H-Sequenzen wurden mit den in Tabelle 3 aufgelisteten V_H-, D_H- und J_H-Elementen verglichen und die Mutationsraten wurden auf Nukleotid- (N) und Aminosäureebene (A) ermittelt. Die Primer-abhängigen ersten 23 Nukleotide wurden vernachlässigt. Ferner wurden die zusätzlichen (+) oder fehlenden (-) Nukleotide vor und nach dem D_H-Element analysiert.

mAk	Anzahl an Mutationen												Nukleotidinsertionen	
	FWR1		CDR1		FWR2		CDR2		FWR3		CDR3		vor D _H	nach D _H
	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A		
SW5	1	1					8	5	8	3	2	2	+2	+1
7B6	5	2	2	2	5		13	8	6	2			+4	
5B9	3	1	6	4	4	1	6	5	3	1			+6	+6
24BG7	9	6	3	2			3	3	3	2			+3	+3
22A	3	3	3	2	2		12	7	8	4	1		+12	-3
27E	8	6	4	3			3	3	5	2			+5	+6
312B	3	3	2	1	1	1	3	3	4	2	2	1	+10	-4
2F9	1	1					1	1					-5	+13
32A	2		3	3			6	6	5	2				+6
16C	3	2					2	2	1	1			+7	+6
13C5B	1	1	3	2	1	1			2		1	1	+1	+5
312G									2	1			+4	+5

Um einen direkten Vergleich zwischen den auftretenden Mutationen auf DNA- und Proteinebene zu haben, wurde die Gesamtzahl an Mutationen je Antikörper graphisch dargestellt (Abbildung 13). Die häufigsten Nukleotidaustausche fanden für die Antikörper SW5, 7B6 und 22A statt und sie riefen auch die meisten Mutationen auf Aminosäureebene hervor. Die drei IgM-Antikörper 16C, 13C5B und 312G (anti-Ro 60) wiesen erwartungsgemäß geringere Mutationsraten auf. Ihre leichten Ketten entsprachen komplett den Keimbahnsequenzen. Auffallend war der 2F9-Antikörper. Trotz der seltenen Hypermutationen, deren Anzahl im Bereich der IgM-Antikörper oder sogar darunter liegt, konnte bereits ein Klassenwechsel zu IgG stattfinden.

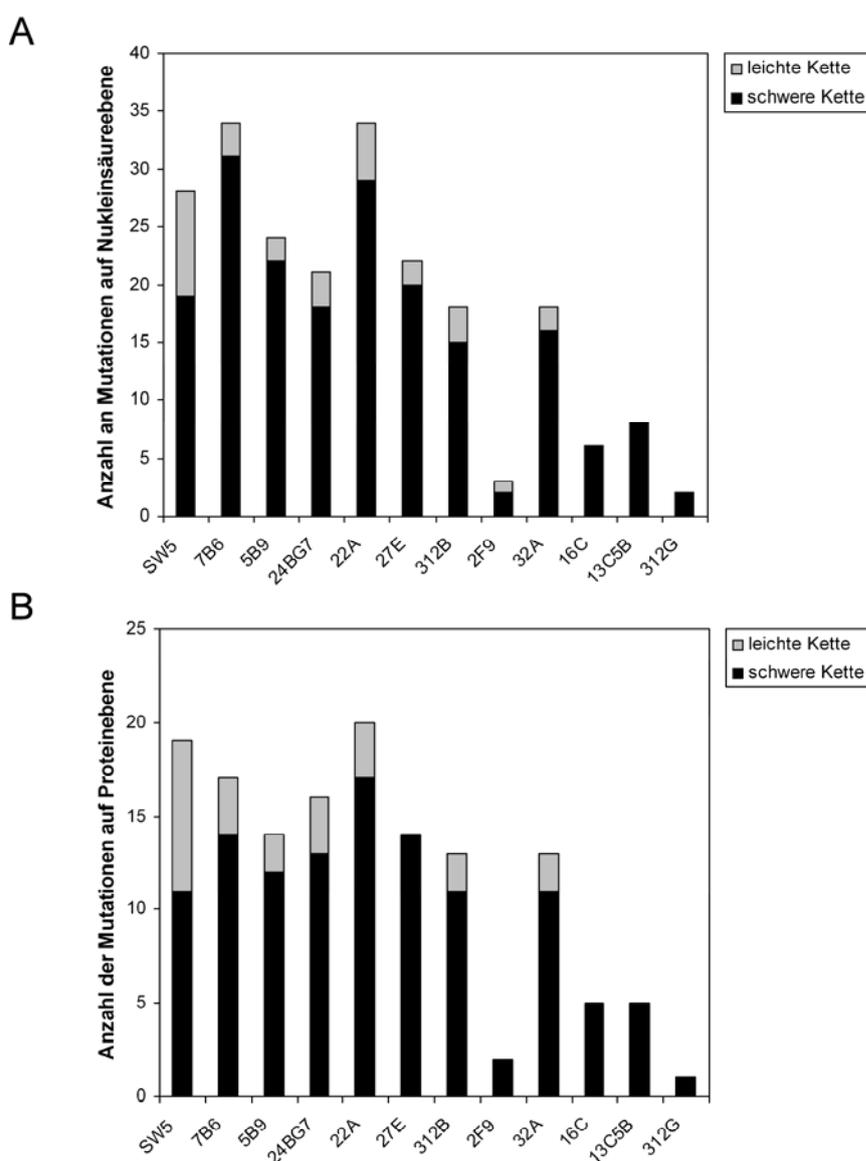


Abbildung 13: Gesamtzahl an Mutationen in den leichten und schweren Ketten.

Für jeden Antikörper wurde die Summe aller Mutationen aufgetragen, die in den leichten (grau) und schweren (schwarz) Ketten auf **A**) Nukleinsäureebene und **B**) Proteinebene identifiziert wurden. Die Sequenzunterschiede im Bereich der degenerierten Primer wurden nicht berücksichtigt.

4.1.2. Prokaryonte Herstellung und Affinitätsreinigung des La-Antigens

Für eine Vielzahl von Experimenten wurden rekombinante Proteine (La-Volllängeprotein und La-Fragmente) in großen Mengen benötigt. Deshalb wurde ein bakterielles Expressionssystem gewählt. Nach Transformation des entsprechenden pET-Plasmids in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3)pLysS und Induktion der Suspensionskultur mit 1 mM IPTG wurden die rekombinanten Proteine prokaryont produziert. Die Zellen wurden anschließend aufgeschlossen und die Totalextrakte wurden auf eine Ni-NTA-Affinitätssäule aufgetragen. Durch den enthaltenen Hexahistidintag im rekombinanten Protein wurde die Bindung an die Säulenmatrix vermittelt, während bakterielle Proteine die Säule weitgehend ungehindert passierten (Durchlauf). Durch leichte Erhöhung der Imidazolkonzentration im Waschpuffer wurden unspezifisch gebundene Proteine entfernt, bevor das gewünschte Protein mit 350 mM Imidazol eluiert werden konnte. Stellvertretend ist in Abbildung 14 ein mit Coomassie Brilliant Blau gefärbtes SDS-Gel dargestellt, das die Reinigung des rhLa-Proteins verdeutlicht. Es ist ersichtlich, dass die bakteriellen Proteine nicht an die Säule binden konnten, während das rhLa-Protein in den Elutionsfraktionen angereichert wurde. Die starken Banden im Coomassiegel wiesen das erwartete Molekulargewicht von 50 kDa auf. Die schwachen Banden mit geringeren Molekulargewichten repräsentieren die typischen Abbaufragmente, die bei rhLa stets auftreten [49, 170]. Der Bereich zwischen LaN und LaC scheint besonders proteolyseempfindlich zu sein, wodurch sich die Banden bei etwa 25 kDa erklären lassen.

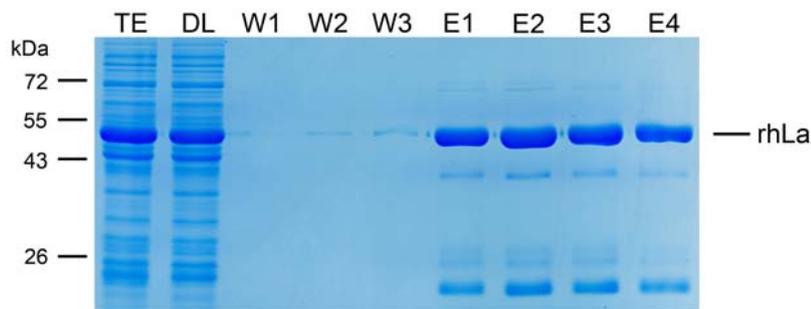


Abbildung 14: Reinigung des prokaryont hergestellten rhLa-Proteins.

Das Bakterienzell-Pellet wurde in Lysepuffer aufgenommen. Nach Ultraschallbehandlung und anschließender Zentrifugation wurde der erhaltene Überstand (Totaler Extrakt TE) auf eine Ni-NTA-Säule aufgetragen. Der Durchlauf (DL) wurde gesammelt. Nach dreimaligem Waschen mit je 1 ml 20 mM Imidazol (Waschschritte W1-W3) wurde das rhLa-Protein mit 350 mM Imidazol in 1 ml Fraktionen eluiert (Elate E1-E4). Aliquots aller Reinigungsschritte wurden auf ein 12%iges Polyacrylamidgel aufgetragen und nach erfolgter SDS-PAGE wurden die Proteine im Gel mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt.

4.1.3. Reaktivität der anti-La-Antikörper im Immunoblot, in der Immunpräzipitation und der Immunfluoreszenz

Alle verwendeten Hybridomazellen konnten identifiziert werden, weil die von ihnen produzierten Antikörper rhLa-Protein (bzw. Ro 60) im ELISA erkannten. Nun wurde die Bindung an das La-Antigen mit weiteren immunologischen Techniken überprüft. Die Reaktivität der Antikörper im Western Blot war die Voraussetzung für spätere Epitopuntersuchungen in Kapitel 4.1.4. Zusätzlich zu der quantitativen Aussage über die erfolgte oder nicht erfolgte Bindung an das Antigen erhält man aus dem Western Blot Informationen über das Molekulargewicht des erkannten Proteins. So kann die Spezifität des mAKs überprüft werden und eventuelle Kreuzreaktionen mit weiteren Antigenen werden ersichtlich. Abbildung 15 zeigt die Reaktivität aller IgG-Antikörper gegen prokaryont hergestelltes rhLa und rekombinantes murines La-Protein (rmLa) sowie eukaryontes hLa und mL_a, die in HeLa- bzw. 3T3-Zellen vorkommen. Alle Antikörper erkannten rhLa und eukaryontes hLa-Protein. Die mAKs 22A und 32A zeigten überhaupt keine Reaktivität gegenüber rmLa und mL_a, während 5B9, 24BG7, 2F9, 27E und 312B sowohl hLa als auch mL_a erkennen konnten. Bei 7B6 und SW5 trat die Besonderheit auf, dass sie zwar bakteriell produziertes rmLa, nicht aber eukaryontes mL_a im Immunoblot färben konnten. Ursache könnte eine post-translationale Modifikation des Proteins in den jeweiligen Epitopregionen sein, welche in 3T3-Zellen, aber nicht in Bakterien vorkommt.

Von den IgM-Antikörpern konnte nur 16C sein Antigen im Western Blot detektieren. Voraussetzung war das Auftragen einer entsprechend großen Antigenmenge auf das SDS-Gel (siehe Epitopeingrenzung in Kapitel 4.1.4.1).

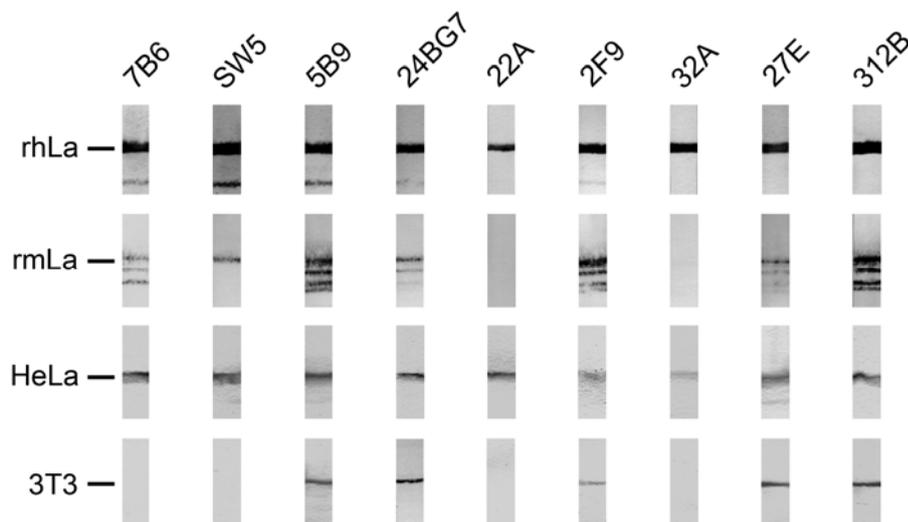


Abbildung 15: Reaktivität der verschiedenen mAKs gegen humanes und murines La-Protein im Immunoblot.

Auf vier getrennten 12%igen Polyacrylamidgelen wurden bakteriell hergestelltes, rekombinantes humanes bzw. murines La-Protein (rhLa bzw. rmLa) sowie Totalextrakte von humanen HeLa-Zellen bzw. von murinen 3T3-Zellen aufgetragen. Nach dem Western Blot wurde jede Membran in Streifen geschnitten, welche mit den verschiedenen Hybridomaüberständen inkubiert wurden. Die Detektion erfolgte mit anti-Maus-IgG-AP.

4. Ergebnisse

Die Erkennung und stabile Bindung des nativen Antigens lässt sich durch Immunpräzipitation nachweisen. Die La-anti-La-Immunkomplexe können durch TrueBlot™ anti-Maus Ig IP Beads isoliert werden und anschließend kann das La-Antigen auf einem Immunoblot detektiert werden. Als Testsystem wurde ein Totalextrakt einer Maus-Zelllinie verwendet, die stabil mit hLa transfiziert war (3T3 LaG). Dadurch konnte die Bindung an beide Proteine zeitgleich untersucht werden. Zusätzlich wurde der Totalextrakt dieser Zellen auf ein weiteres SDS-Gel aufgetragen, um parallel die Reaktivität der Hybridomaüberstände gegen beide Proteine im Immunoblot zu überprüfen (siehe Abbildung 16). Die Ergebnisse bezüglich der Totalextrakte waren identisch mit denen in Abbildung 15, wo die Reaktivitäten gegen hLa und mLa getrennt voneinander untersucht worden waren. Das Vermögen, hLa und mLa immunpräzipitieren zu können, variierte beträchtlich zwischen den verschiedenen Antikörpern. Die mAks 7B6, 5B9, 2F9 und 32A konnten La nicht präzipitieren, obwohl die Antigene im parallelen Immunoblot erkannt wurden. Für 24BG7 war eine schwache Anreicherung von überwiegend hLa zu sehen. Die Antikörper SW5 und 22A konnten vor allem hLa präzipitieren, die mLa-Bande hingegen war deutlich schwächer. Für 27E und 312B schien es keine Unterschiede zwischen hLa und mLa zu geben; beide Antigene wurden in gleichen Mengen präzipitiert. Insgesamt war die Proteinmenge bei 312B höher als bei 27E. Dieser Antikörper ist für einen Einsatz in Koimmunpräzipitationsexperimenten von humanen oder murinen Totalextrakten am besten geeignet.

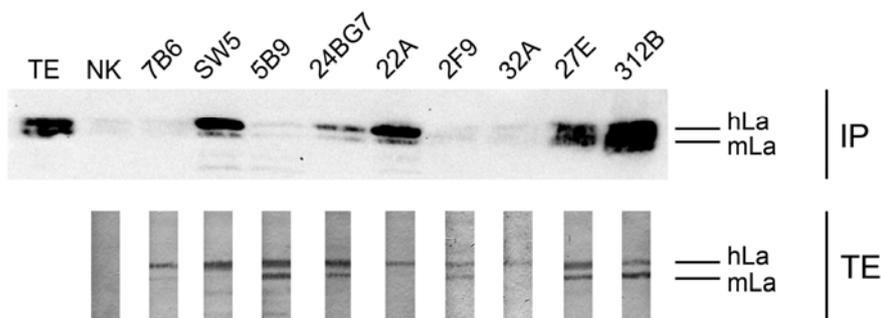


Abbildung 16: Immunpräzipitation (IP) von hLa und mLa mit den verschiedenen anti-La-mAks.

Nach Präzipitation der Immunkomplexe durch TrueBlot™ anti-Maus Ig IP Beads und Zugabe von SDS-Probenpuffer wurden die Proben auf ein 12%iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Der SDS-PAGE folgte ein elektrophoretischer Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran. Nach dem Blockieren der Membran wurden die La-Proteine mit 5B9 Hybridomaüberstand und Maus IgG TrueBlot™-POD detektiert. Als Positivkontrolle diente der 3T3 LaG-Totalextrakt (TE). Das unterschiedliche Laufverhalten von hLa und mLa ist als Doppelbande erkennbar. Für die Negativkontrolle (NK) wurde kein anti-La-mAk zugegeben, um den durch die beads erhaltenen Hintergrund zu evaluieren. Parallel wurde für alle mAks einzeln die Reaktivität gegen 3T3 LaG-Totalextrakt auf dem Immunoblot überprüft. Die Detektion erfolgte mit anti-Maus-IgG-AP.

Immunfluoreszenzaufnahmen von eukaryonten Zellen veranschaulichen die intrazelluläre Lokalisation der Antigene. Hierbei wird der primäre anti-La-mAk durch einen Sekundärantikörper nachgewiesen, welcher an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Abhängig vom Filtersystem des Fluoreszenzmikroskops können verschiedene Fluorophore bei unterschiedlichen Wellenlängen angeregt bzw. detektiert werden. Voraussetzungen für eine intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung sind die Fixierung der Zellen und die Permeabilisierung der Zellmembran. Hierfür wurden unterschiedlichste Verfahren entwickelt. Es stellte sich heraus, dass das Färbeverhalten eines mAks von der Fixationsmethode abhängig sein kann. Aus diesem Grund wurden im Folgenden zwei verschiedene Protokolle angewendet. Einerseits wurden die Zellen für 10 min bei RT mit PFA-Lösung fixiert und die Membranen für 10 min mit Triton X-100-Lösung permeabilisiert. Andererseits wurden die Zellen mit einer gesättigten EGTA/MeOH-Lösung bei -20°C fixiert und anschließend in PBS rehydriert. Nach La-Färbung mit den verschiedenen mAks und Zugabe eines anti-Maus-IgG-Alexa Fluor®568-Antikörpers wurden die DNA-haltigen Zellkerne mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI visualisiert.

In Abbildung 17 sind Färbungen von humanen HeLa-Zellen mit allen verfügbaren IgG-Antikörpern dargestellt. Die Zellen wurden entweder mit PFA oder mit MeOH/EGTA fixiert. Abbildung 18 zeigt entsprechende Experimente mit murinen 3T3-Zellen. Es ist erkennbar, dass die DAPI-Färbung zwischen humanen und murinen Zellen deutliche Unterschiede aufweist [159]. HeLa-Zellen zeigen eine homogene Kernfärbung. Bei 3T3-Zellen treten hingegen viele charakteristische helle Punkte in den Kernen auf. Dieses Phänomen wird später für die Shuttling-Untersuchungen von Bedeutung sein.

Für die einzelnen mAks konnten Unterschiede im Färbeverhalten beobachtet werden. Der Antikörper SW5 erkannte unabhängig von der Fixierungsmethode hLa im Zellkern und kein mL. In weiteren Experimenten (Kapitel 4.3.2) wurde eine höhere Sensitivität des SW5 gegenüber hLa nach PFA-Fixierung im Vergleich zur MeOH/EGTA-Fixierung festgestellt. Mit 7B6 konnten für HeLa-Zellen nur schwache Hintergrundfärbungen, die sich über die gesamte Zelle erstreckten, erzeugt werden. Bei 3T3-Zellen war keine 7B6-Bindung detektierbar. Nach PFA-Fixierung zeigte der mAk 5B9 für HeLa-Zellen Kernfärbungen mit einem zusätzlichen zytoplasmatischen Hintergrund und keine Reaktivität gegen mL in 3T3-Zellen. Im Gegensatz dazu färbte 5B9 die Zellkerne beider Zelllinien nach MeOH/EGTA-Fixierung stark an.

Für die Antikörper 22A und 24BG7 konnten Kernfärbungen nach PFA-Fixierung, nicht aber nach MeOH/EGTA-Behandlung erzielt werden. Beide mAks erkannten hLa, doch nur 24BG7 färbte auch das mL der 3T3-Zellen. Diese Spezifitäten entsprechen dem schon im Immunoblot gefundenem Verhalten (Abbildung 15). Unabhängig von der Art der Fixierung können die mAks 312B und 27E für Immunfluoreszenzfärbungen von HeLa-Zellen eingesetzt werden. Bei 3T3-Zellen empfiehlt sich die PFA-Fixierung, da die erzielten Färbemuster nach MeOH/EGTA-Behandlung wesentlich schwächer sind.

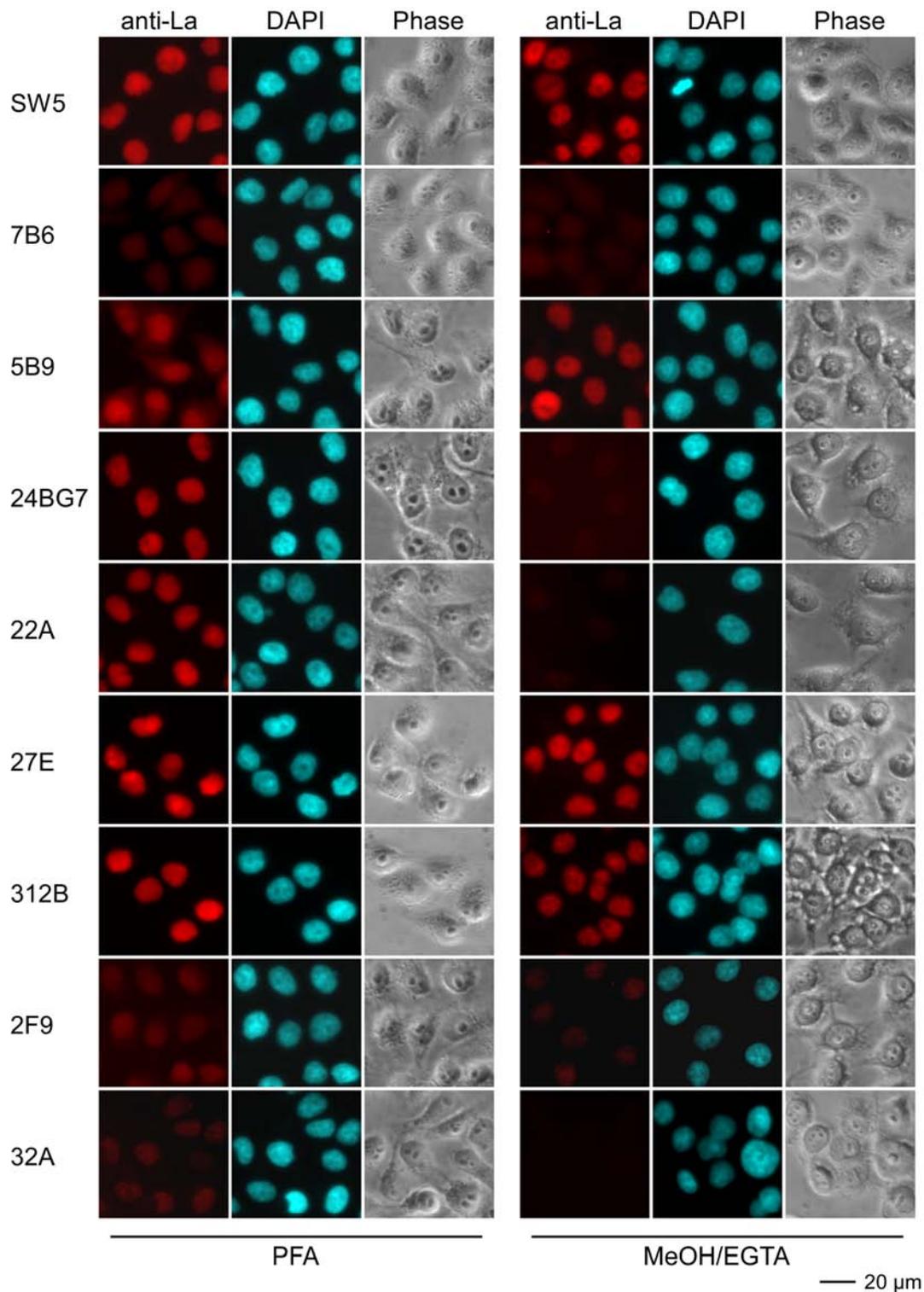


Abbildung 17: Immunfluoreszenzaufnahmen der mit anti-La-mAks angefärbten humanen HeLa-Zellen. Vor der Färbung mit den anti-La-IgG-Antikörpern wurden die Zellen entweder mit PFA oder mit MeOH/EGTA fixiert. Die Detektion der primären mAks erfolgte mit anti-Maus-IgG-Alexa Fluor[®]568 und die DNA der Zellkerne wurde mit DAPI sichtbar gemacht. Des Weiteren ist eine Phasenkontrastaufnahme der Zellen gezeigt.

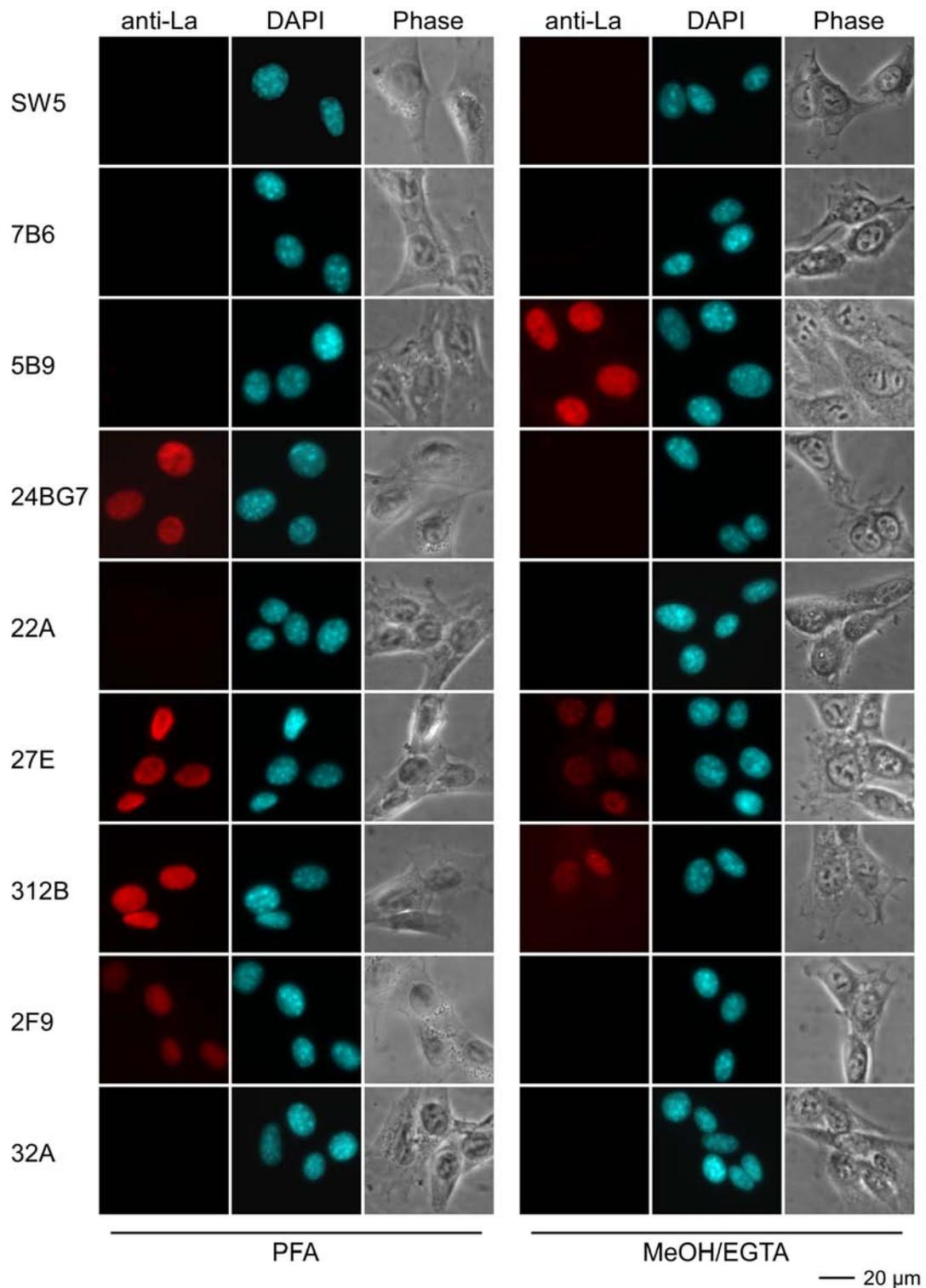


Abbildung 18: Färbeverhalten der monoklonalen anti-La-Antikörper bei Maus-3T3-Zellen.

Die Zellen wurden entweder mit PFA oder mit MeOH/EGTA fixiert, bevor sie mit den anti-La-IgGs gefärbt wurden. Nach Detektion mit anti-Maus-IgG-Alexa Fluor[®]568 wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Außerdem wurden Phasenkontrastaufnahmen der Zellen angefertigt.

4. Ergebnisse

Mit den Hybridomaüberständen von 32A und 2F9 wurden nur sehr schwache Färbungen erzielt. Dies steht in Einklang mit den schwachen Reaktivitäten auf den Immunoblots (siehe Abbildung 15) und deutet entweder auf eine geringere Antikörperkonzentration im Zellkulturüberstand oder auf eine geringere Affinität im Vergleich zu den anderen mAks hin. Der mAk 2F9 färbte hLa nach beiden Fixierungsverfahren und mLα nur nach PFA-Behandlung. Für 32A konnte lediglich bei HeLa-Zellen nach PFA-Fixierung eine schwache Kernfärbung detektiert werden. Abbildung 19 zeigt die mit den IgM-Antikörpern erzielten Immunfluoreszenzfärbungen.

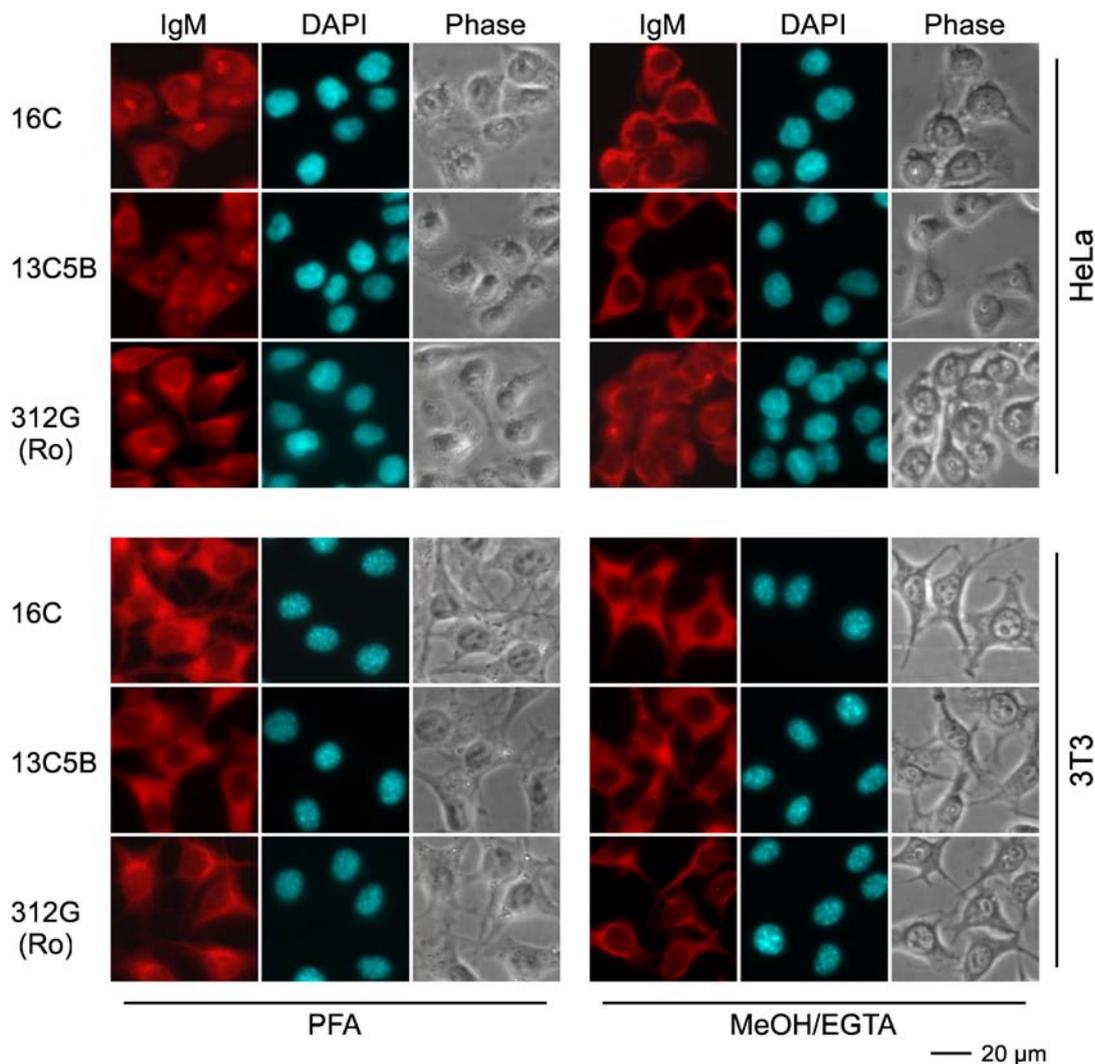


Abbildung 19: Immunfluoreszenzfärbungen mit den IgM-Antikörpern 16C, 13C5B und 312G.

Humane HeLa- und murine 3T3-Zellen wurden mit 4% PFA fixiert, mit 0,1% Triton X-100 permeabilisiert und anschließend mit den IgM-Antikörpern inkubiert. Alternativ erfolgte eine MeOH/EGTA-Fixierung. Die Detektion erfolgte mit anti-Maus-IgM-Alexa Fluor[®] 568. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Zusätzlich wurden von den Zellen auch Phasenkontrastaufnahmen gemacht.

Die beiden anti-La-IgM-Antikörper 16C und 13C5B zeigten vergleichbare Färbemuster. Für HeLa- als auch 3T3-Zellen war das Zytoplasma relativ homogen angefärbt. Nach der PFA-Fixierung wurden im überwiegenden Teil der HeLa-Zellen zusätzlich die Nukleoli gefärbt. Der IgM 312G konnte im ELISA als anti-Ro 60 IgM-Antikörper identifiziert werden. In der Immunfluoreszenz war ein zytoplasmatisches Färbemuster zu beobachten. Dieses war allerdings nicht so homogen wie für 16C und 13C5B, sondern es handelte sich eher um langgestreckte Fasern, die um den Zellkern herum kondensiert waren. Die Ergebnisse des Kapitels 4.1.3 wurden zur Übersicht in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Zusammenfassung der Spezifitäten der verschiedenen mAks im Immunoblot, in der Immunpräzipitation und der Immunfluoreszenz.

Die Beurteilung der Bindungsstärken erfolgte nach folgender Skala: - negativ, +++ sehr stark positiv, ++ positiv, + schwach positiv, (+) sehr schwach positiv. Die mit * gekennzeichneten Reaktivitäten der IgM-Antikörper konnten nicht ermittelt werden. Die IgM-Antikörper zeigten in der Immunfluoreszenz zytoplasmatische Färbemuster (Z).

mAk	Reaktivität im Immunoblot gegen				Reaktivität gegen 3T3 LaG im Immunoblot		Immunpräzipitation aus 3T3 LaG Totalextrakt		Immunfluoreszenz PFA-Fixierung		Immunfluoreszenz MeOH-Fixierung	
	rhLa	rmLa	HeLa	3T3	hLa	mLa	hLa	mLa	HeLa	3T3	HeLa	3T3
SW5	+++	++	+++	-	+++	-	++	-	+++	-	++	-
7B6	+++	++	+++	-	++	-	-	-	(+)	-	(+)	-
5B9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	++	-	+++	+++
24BG7	+++	+	+++	+	++	+	+	-	++	++	-	-
22A	+++	-	+++	-	+	-	++	-	++	-	-	-
27E	+++	+	+++	+++	++	++	+	+	+++	+++	+++	+
312B	+++	+++	+++	+++	+	++	+++	+++	+++	+++	++	+
2F9	+++	+++	++	++	+	+	-	-	+	+	(+)	-
32A	+++	-	++	-	(+)	-	-	-	(+)	-	-	-
16C	+	*	*	*	*	*	*	*	Z	Z	Z	Z
13C5B	+	*	*	*	*	*	*	*	Z	Z	Z	Z
312G	-	*	*	*	*	*	*	*	Z	Z	Z	Z

4.1.4. Identifizierung der von den Antikörpern erkannten Epitope

Mit Hilfe von La-Fragmenten, denen entweder ein Stück vom N-Terminus oder vom C-Terminus fehlt, wurden die Regionen im La-Protein identifiziert, welche für die Bindung der jeweiligen mAk verantwortlich sind. Durch sukzessive Einengung dieser Bereiche wurden schließlich La-Fragmente erhalten, die nicht mehr erkannt werden konnten. Im Idealfall war dadurch eine Eingrenzung der Epitope bis auf wenige AS möglich. Zuerst wurde mit den bereits vorhandenen prokaryont hergestellten und gereinigten Proteinen gearbeitet, um den ungefähren Epitopbereich abzuschätzen. Für die genauere Charakterisierung wurden meist GFP-La-Fragmente generiert. Diese wurden nach Transfektion der entsprechenden Plasmide in HEK 293T-Zellen hergestellt und nach 18 h wurden Totalextrakte der transfizierten Zellen im Immunoblot analysiert. Dadurch konnten viele Proteine schnell, einfach und parallel untersucht werden, ohne große Mengen herzustellen und zu reinigen. Die Klonierungsschritte für die La-Fragmente werden im Anhang (Tabelle 8) zusammengefasst.

Für die Beurteilung der Antikörperreaktivität wurden Immunoblots hergestellt. Diese wurden zur Kontrolle mit anti-GFP entwickelt, um die erfolgreiche Transfektion und das Molekulargewicht jedes Konstrukts zu überprüfen. Die parallel dazu hergestellten Immunoblots wurden mit den unterschiedlichen Hybridomaüberständen inkubiert. Auch wenn die Fragmente nicht alle von den mAks erkannt wurden, diente das in den HEK 293T-Zellen endogen vorhandene La-Protein als interne Kontrolle für jeden Extrakt. Für die prokaryont hergestellten und gereinigten Proteine wurde der anti-His-Antikörper als Referenz eingesetzt.

4.1.4.1. Der IgM 16C erkennt den C-terminalen Bereich des rhLa-Proteins

Der 16C-Antikörper zeigt sowohl im ELISA als auch im Western Blot eine schwache Reaktivität gegen rhLa-Protein. Deswegen mussten relativ große Antigenmengen (im Bereich von 10 µg/Gelspur) auf das SDS-Gel aufgetragen werden, um Proteinbanden mit diesem IgM-Antikörper im Immunoblot detektieren zu können (siehe Abbildung 20A). Die N-terminale Hälfte des La-Proteins (La₁₋₁₉₂) wurde im Gegensatz zum C-terminalen Bereich (La₁₉₄₋₄₀₈) nicht von 16C erkannt. Die Epitopregion konnte auf La₂₇₈₋₄₀₈ eingengt werden. Das nächst kürzere Fragment La₃₁₈₋₄₀₈ blieb auf dem Western Blot negativ, obwohl mit anti-His eine deutliche Proteinbande nachweisbar war. In Abbildung 20B sind die verwendeten La-Fragmente sowie die Reaktivität des mAk 16C gegen diese Proteine schematisch dargestellt.

Eine weitere Eingrenzung der Epitopregion war weder mit N- noch mit C-terminalen La-Fragmenten möglich. Die C-terminal deletierten Proteine ließen sich nur in geringeren Mengen bakteriell herstellen und nativ reinigen. Die erreichten Proteinkonzentrationen waren nicht hoch genug, um auf dem Western Blot mit 16C noch Proteinbanden detektieren zu können.

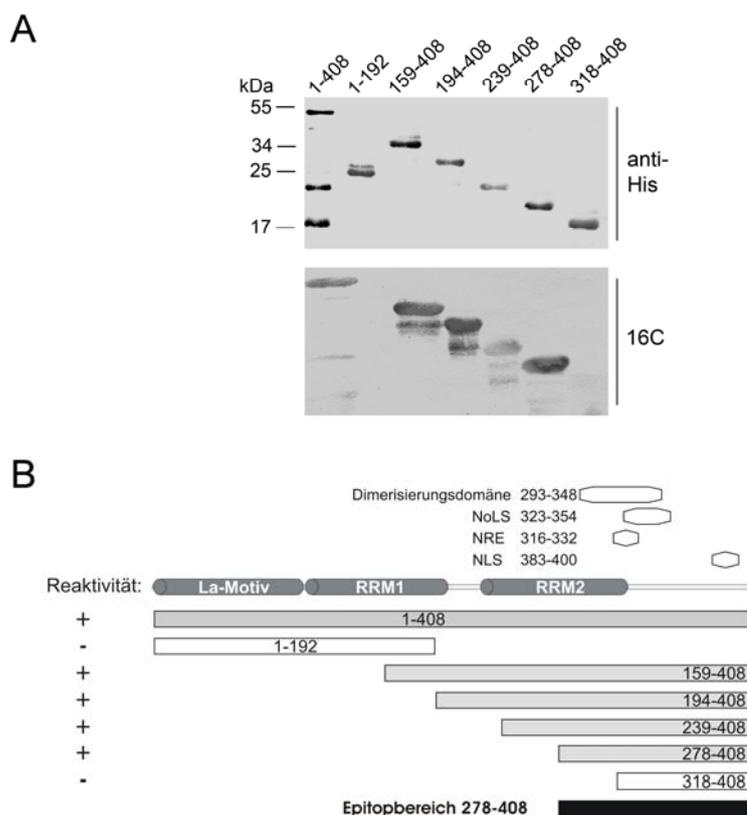


Abbildung 20: Eingrenzung des 16C-Epitops auf den C-terminalen Bereich von rhLa.

A) Es wurden zwei 15%ige SDS-Gele mit den bakteriell produzierten und über Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigten Proteinen beladen. Auf das erste Gel wurde etwa 1 µg von jedem Protein aufgetragen. Der anschließende Western Blot wurde mit anti-His entwickelt, um alle eingesetzten Proteine nachzuweisen. Für den zweiten Immunoblot, der mit 16C entwickelt wurde, wurde die zehnfache Menge an Antigen verwendet. Als Sekundärantikörper wurde anti-Maus-Ig-AP eingesetzt. **B)** Schema der verwendeten La-Fragmente. Die von 16C erkannten Peptide sind grau markiert. Außerdem sind die funktionellen Domänen des La-Proteins eingezeichnet, welche im C-terminalen Bereich lokalisiert sind.

4.1.4.2. Eingrenzung des 5B9-Epitops auf ein lineares Peptid

Die für die Epitopcharakterisierung verwendeten La-Fragmente erstrecken sich über das La-Motiv und den N-Terminus der RRM1-Domäne (Abbildung 21A und B). Alle GFP-La-Fragmente wurden nach Transfektion mit entsprechenden Plasmiden produziert und vom anti-GFP-Antikörper im Western Blot erkannt. Außerdem traten schwächere Degradationsbanden auf, die durch Proteolyse innerhalb des GFP-Proteins entstanden sein mussten, da sie für alle La-Fragmente zu beobachten waren (siehe auch in den folgenden Kapiteln). Das kürzeste La-Peptid, das von 5B9 gebunden wurde, war La₉₄₋₁₀₄. Eine C-terminale Deletion von weiteren 4 AS verhinderte die Erkennung durch den Antikörper.

Das 5B9-Epitop befindet sich im flexiblen Verbindungsbereich zwischen La-Motiv und RRM1-Domäne. Abbildung 21C zeigt diesen Bereich anhand der NMR-Struktur des La-Motivs [102], allerdings fehlt in dieser Struktur die letzte AS (Y104) des Epitops. Zur weiteren Eingrenzung des Peptidepitops wurden sowohl S94 als auch Y104 deletiert oder substituiert (Abbildung 21D und E). Da der Antikörper auch ohne S94 noch binden konnte, hatten Austausche des Serins zu Alanin oder Glutamat keinen Einfluss. Ohne Y104 konnte 5B9 das Epitop nicht mehr erkennen, aber die Substitution des Tyrosins mit den aromatischen AS Tryptophan oder Phenylalanin konnte die Reaktivität des mAKs wieder herstellen.

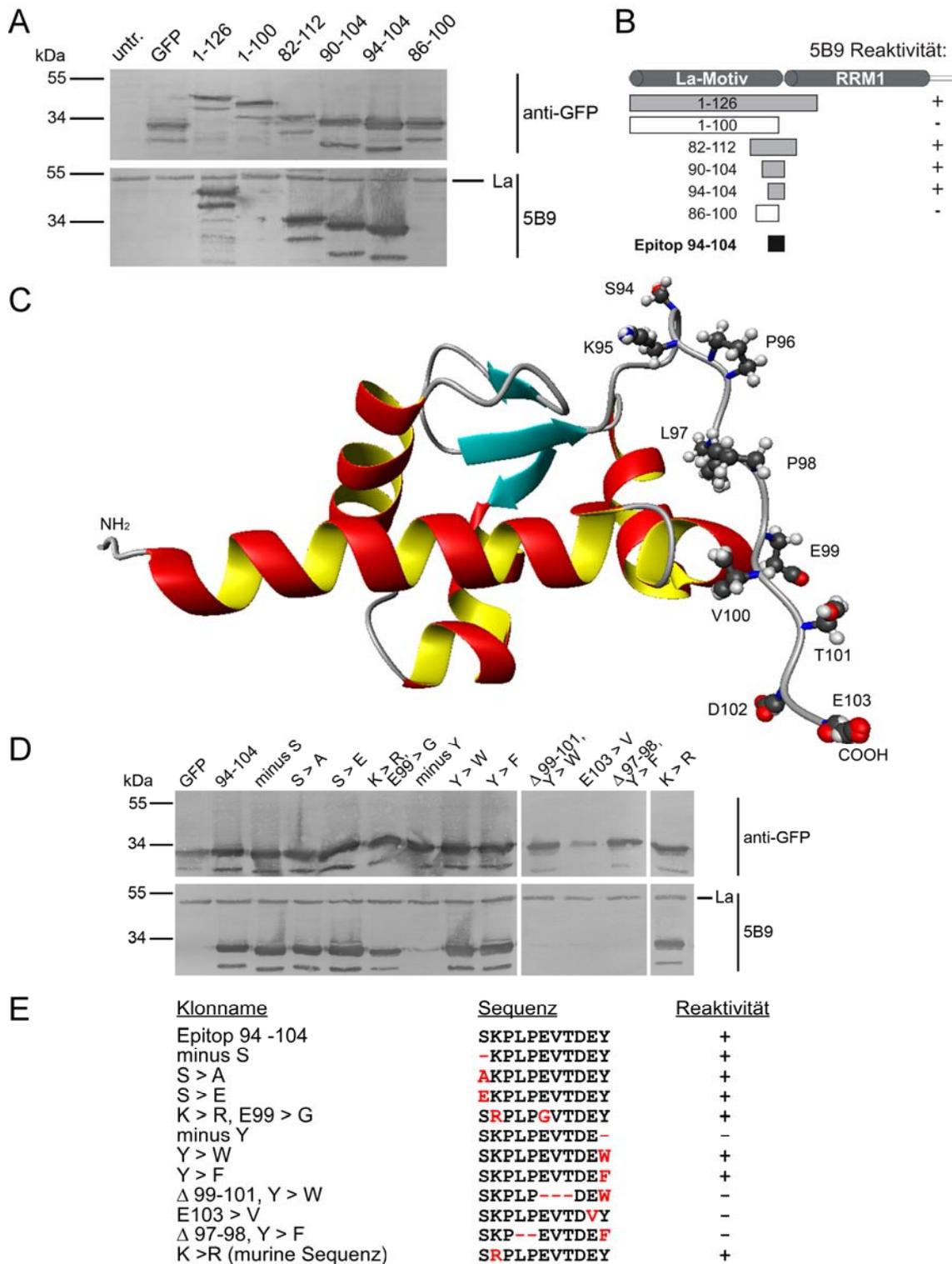


Abbildung 21: Eingrenzung eines linearen Peptidepitops für 5B9.

A) Verschieden lange GFP-La-Fragmente wurden in HEK 293T-Zellen hergestellt und die Totalextrakte der Zellen wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Untransfizierte und nur mit pEGFP-Leervektor transfizierte Zellen wurden zur Kontrolle verwendet. Die Detektion erfolgte mit anti-GFP bzw. 5B9 und anti-Maus-IgG-AP. **B)** Schematische Darstellung der La-Fragmente im Bereich des La-Motivs und des RRM1.

C) Die durch NMR-Spektroskopie ermittelte räumliche Struktur des La-Motivs [102]. Die AS 94-103 sind durch Ball-Stab-Darstellung hervorgehoben. Die AS Y104 war bei der für die Strukturbestimmung verwendeten Domäne nicht enthalten. **D)** Zur weiteren Charakterisierung des 5B9-Epitops wurden die für die Punktmutanten codierenden Plasmide in HEK 293T-Zellen transfiziert. Die entsprechenden Proteine wurden im Immunoblot mit anti-GFP oder 5B9 und anti-Maus-IgG-AP detektiert. **E)** Zusammenstellung der verschiedenen Punktmutanten und Beurteilung der 5B9-Reaktivität (+ positiv, - negativ).

Außerdem wurde K95 durch Arginin ersetzt, welches in der murinen Proteinsequenz vorkommt. Da 5B9 sowohl hLa als auch mLa erkennen kann (siehe Kapitel 4.1.3), hatte diese Substitution wie erwartet keinen Einfluss auf die Bindung des Antikörpers an sein Epitop. Des Weiteren sind einige Mutationen innerhalb der Epitopregion erzeugt worden. Die Deletionen L97-98 sowie E99-T101 verhinderten die Antikörperbindung. Die Mutation E99 > G hatte keine Auswirkung, während E103 > V der Bindung des 5B9 entgegenwirkte.

Insgesamt kann das identifizierte 5B9-Epitop aus N-terminaler Richtung mindestens um S94 verkürzt werden. C-terminal muss an Position 104 eine aromatische AS vorhanden sein und E103 scheint ebenfalls eine Rolle für die Antikörperbindung zu spielen. Damit ist das Epitop La₉₅₋₁₀₄, das der mAk 5B9 erkennt, sehr kurz und eignet sich beispielsweise für die Verwendung als Proteintag.

4.1.4.3. Der Antikörper 7B6 erkennt ein Peptid in der C-terminalen Domäne von hLa

Für die Epitopuntersuchung des 7B6-Antikörpers wurden GFP-La-Fusionsproteine eingesetzt, da dieser sowohl hLa als auch GFP-hLa auf dem Immunoblot detektieren kann (siehe Abbildung 22A). Die 7B6-Epitopregion konnte zunächst auf den C-terminalen Bereich eingegrenzt werden (siehe Abbildung 22B). Von den C-terminal verkürzten GFP-La-Proteinen konnte La₁₋₃₄₄ von 7B6 noch gebunden werden, hingegen war La₁₋₃₁₀ zu kurz. Das N-terminal verkürzte Protein La₂₉₅₋₄₀₈ rief eine positive Reaktion mit 7B6 hervor, allerdings das nächst kleinere Protein La₃₁₈₋₄₀₈ nicht mehr.

Eine Besonderheit, die aber nur für das Protein GFP-La₂₉₅₋₄₀₈ auftrat, war die Detektion einer zusätzlichen (Doppel-)Bande mit 7B6, die in der SDS-PAGE oberhalb des endogenen La-Proteins läuft. Die genaue Identität dieser Banden kann z. Z. nicht vollständig erklärt werden. Möglicherweise handelt es sich um ein Oligomer oder um Konjugate mit z. B. Ubiquitin oder mit einem *small ubiquitin-like modifier*- (SUMO)-Protein. Dass keine Reaktion mit anti-GFP auftritt, liegt wahrscheinlich an der zu geringen Sensitivität des anti-GFP-Antikörpers. Die oberen Banden erscheinen mit 7B6 sehr viel schwächer als die unteren und wenn man diese Intensitätsunterschiede auf den anti-GFP-Immunoblot überträgt, wurden sie wahrscheinlich von anti-GFP nicht mehr erkannt.

Wie bereits in Abschnitt 4.1.3 gezeigt wurde, bindet der mAk 7B6 humanes La-Protein im Western Blot, allerdings färbt er kein endogenes hLa von HeLa-Zellen in der Immunfluoreszenz. Werden HeLa-Zellen jedoch mit Plasmiden transfiziert, die für hLa oder GFP-hLa codieren, zeigt 7B6 eine positive Reaktion gegen das zusätzlich vorhandene La-Protein (siehe Abbildung 22C, erste und zweite Zeile). Zur Kontrolle wurden die im Immunoblot verwendeten GFP-La-Fragmente parallel in der Immunfluoreszenz untersucht. Die beobachtete Reaktivität mit 7B6 stimmt mit der im Western Blot überein (Abbildung 22B und C). Die rekombinanten Proteine GFP-La₁₋₃₄₄ und GFP-La₂₉₅₋₄₀₈ wurden ebenso von 7B6 in der Immunfluoreszenz erkannt wie das GFP-hLa- (La₁₋₄₀₈) Protein. Es wurde außerdem deutlich, dass die C-terminal verkürzten Proteine ohne NLS im Zytoplasma lokalisiert waren, während die N-terminal deletierten Proteine das NLS noch enthielten und deshalb im Zellkern und in den Nukleoli angereichert wurden. Auffällig war die besonders starke GFP-Fluoreszenz in den Kernkörperchen, die in der 7B6-Färbung für La₁₋₄₀₈ und La₂₉₅₋₄₀₈ nicht hervortraten. Hier war die Färbung homogen im ganzen Kern verteilt.

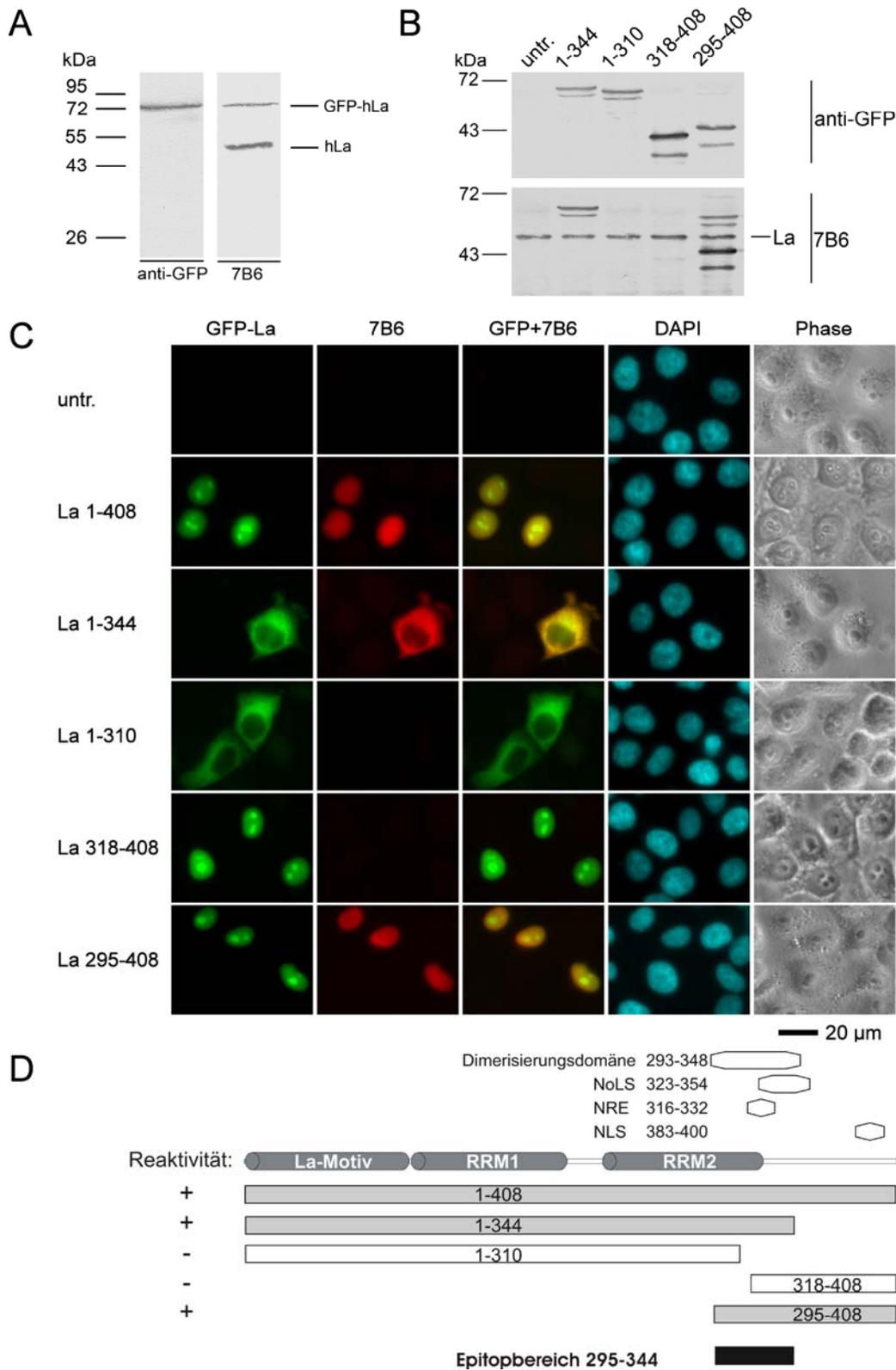


Abbildung 22: Eingrenzung des 7B6-Epitops auf das RRM2.

A) GFP-La-Volllängeprotein und **B)** GFP-La-Fragmente wurden nach Transfektion der entsprechenden Plasmide in HEK 293T-Zellen hergestellt und die Zellextrakte wurden im Immunoblot gegen anti-GFP und 7B6 getestet. Die Detektion erfolgte mit anti-Maus-IgG-AP. **C)** Nach Transfektion der Konstrukte in HeLa-Zellen, PFA-Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen mit 7B6 und anti-Maus-IgG-Alexa Fluor®568 inkubiert. Anschließend wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt. Zusätzlich ist der Phasenkontrast dargestellt. **D)** Schema der verwendeten La-Fragmente und der funktionellen Domänen.

Mit den vorhandenen Proteinen konnte das 7B6-Epitop auf den Bereich von AS 295-344 eingeeignet werden (Abbildung 22D). Dieser Bereich überlappt (partiell) mit mehreren in der Literatur beschriebenen funktionellen Domänen: der Dimerisierungsdomäne, dem nukleolären Lokalisationssignal sowie dem nukleären Retentionselement. Intrazelluläre Interaktionspartner könnten dafür verantwortlich sein, dass das 7B6-Epitop unter normalen Bedingungen im Zellkern verdeckt ist. Erst bei Überexpression des La-Gens sind die Interaktionspartner (z. B. bindende Proteine oder Nukleinsäuren) limitiert und ein Teil der La-Proteine kann dann vom 7B6-Antikörper gebunden werden.

Zur weiteren Eingrenzung des Epitops wurden ausgehend vom Peptid La₃₀₃₋₃₄₄ eine Reihe verkürzter Peptide kloniert und bakteriell hergestellt. Im Immunoblot wurde die Reaktivität des 7B6 gegen diese Peptide untersucht. Die Sequenzen und Ergebnisse sind in Abbildung 23A zusammengefasst. Das kleinste erkannte Peptid, das auch für alle weiteren Konstrukte als Peptidepitop verwendet wurde, erstreckt sich von E311 bis K328. Unter Verwendung der NMR-Struktur, die für das RRM2 bestimmt wurde [103], ist die Lokalisation des 7B6-Epitops innerhalb dieser Domäne in Abbildung 23B zu sehen. Das Epitop befindet sich auf der C-terminalen α -Helix. Es handelt sich um den äußersten C-terminalen Bereich des La-Proteins, für den eine definierte Sekundärstruktur bestimmt worden ist. Die sich anschließenden 80 AS wurden als langes, flexibles, unstrukturiertes Peptid beschrieben [103]. Weiterhin umfasst das Epitop den Großteil des nukleären Retentionselements, das die AS 316-332 einschließt [116]. Es wird angenommen, dass die C-terminale α -Helix mit einem bisher unbekanntem nukleären Protein wechselwirkt und dadurch die nukleäre Retention vermittelt wird [103].

4.1.4.3.1. Post-translationale Modifikationen des hLa und mL_a in der 7B6-Epitopregion

Das identifizierte 7B6-Peptidpitop, das bisher nur bakteriell produziert worden war, wurde im Folgenden an GFP fusioniert, um zu überprüfen, ob sich das Epitop auch als Peptidtag für eukaryont hergestellte Proteine eignet. Zusätzliche Konstrukte enthielten das NLS des La-Proteins (Fusion mit La₃₆₉₋₄₀₈), um die Zugänglichkeit des Peptids sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern zu analysieren (siehe Schema in Abbildung 24A). Außerdem wurden die Sequenzen von hLa und mL_a im Epitopbereich miteinander verglichen. Wie in Abbildung 15 gezeigt wurde, erkennt 7B6 zusätzlich zum hLa auch mL_a im Immunoblot, aber kein eukaryontes mL_a. Deshalb ist eine post-translationale Modifikation im Epitopbereich des mL_a wahrscheinlich, welche die Bindung des Antikörpers sowohl in der Immunfluoreszenz als auch im Immunoblot verhindert. Zur genaueren Untersuchung wurden die beiden AS, in denen sich die Sequenzen unterscheiden (I319>T, E320>D), einzeln und doppelt mutiert. Für hLa ist im Epitopbereich außerdem eine Phosphorylierung an S325 beschrieben worden [68]. Eventuell hat auch der Phosphorylierungszustand des hLa Einfluss auf die 7B6-Bindung. Um dies genauer zu evaluieren, wurde das Serin einerseits zu Alanin mutiert, um die nicht-phosphorylierte Form zu imitieren (nphLa, S>A). Andererseits wurde ein Aspartat an dieser Position eingebaut, um eine dauerhafte Phosphorylierung zu simulieren (phLa, S>D).

A	<u>La-Peptid</u>	<u>Aminosäuresequenz</u>	<u>Reaktivität</u>
	hLa	aa303-WEVLEGEVEKEALKKIIEDQQESLNKWKSKGRRFGKGGKGNK	+
	La 303-344 (XII)	WEVLEGEVEKEALKKIIEDQQESLNKWKSKGRRFGKGGKGNK	+
	La 303-338 (XI)	WEVLEGEVEKEALKKIIEDQQESLNKWKSKGRRFGK	+
	La 303-333 (X)	WEVLEGEVEKEALKKIIEDQQESLNKWKSKG	+
	La 303-331 (VIII)	WEVLEGEVEKEALKKIIEDQQESLNKWKSK	+
	La 306-329 (XVII)	LEGEVEKEALKKIIEDQQESLNKW	+
	La 309-333 (IX)	EVEKEALKKIIEDQQESLNKWKSKG	+
	La 309-329 (XVI)	EVEKEALKKIIEDQQESLNKW	+
	La 303-326 (VII)	WEVLEGEVEKEALKKIIEDQQESL	-
	La 303-323 (VI)	WEVLEGEVEKEALKKIIEDQQ	-
	La 311-331 (XIV)	EKEALKKIIEDQQESLNKWKSK	+
	La 311-328 (XVIII)	EKEALKKIIEDQQESLNK	+
	La 311-327 (XIX)	EKEALKKIIEDQQESLN	(+)
	La 313-328 (XXI)	EALKKIIEDQQESLNK	-

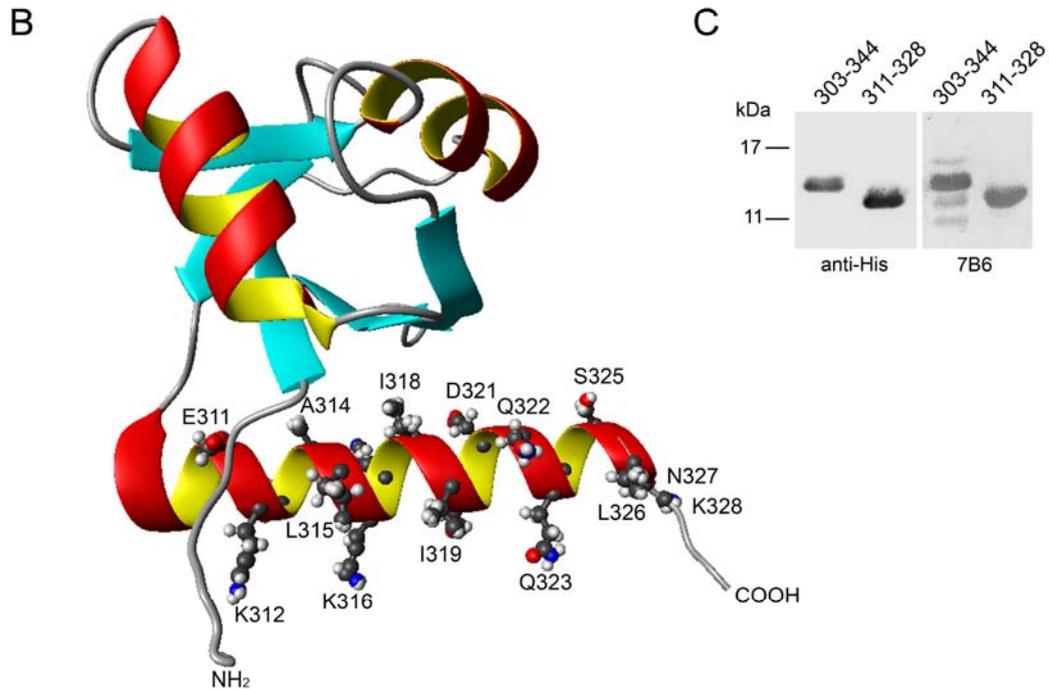


Abbildung 23: Peptide zur Identifizierung des 7B6-Epitops.

A) Zusammenstellung der generierten und verwendeten Peptide aus dem C-terminalen Bereich des hLa-Proteins. Alle Peptide wurden bakteriell produziert und gereinigt, um danach die Reaktivität des 7B6 (+ positiv, - negativ, (+) schwach positiv) im Western Blot zu evaluieren. **B)** Räumliche Struktur der RRM2-Domäne [103]. Die Seitenketten der AS 311-328 sind als Ball-Stab-Modell hervorgehoben, um die Lage des 7B6-Epitops auf der C-terminalen α -Helix zu verdeutlichen. **C)** Immunoblot des längsten (La 303-344) und des kürzesten (La 311-328) von 7B6 erkannten Peptids. Eine Hälfte des Blots wurde mit anti-His und die andere mit 7B6 entwickelt. Die Detektion erfolgte mit anti-Maus-IgG-AP.

Zur Analyse der Mutanten wurden Immunoblots von transfizierten HEK 293T-Zellen hergestellt (siehe Abbildung 24B) und Immunfluoreszenzaufnahmen von transfizierten HeLa-Zellen gemacht (Abbildung 25). Das GFP-Protein und die 7B6-Epitop-GFP-Fusionsproteine ohne La-NLS (siehe Abbildung 25A) waren sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern der transfizierten Zellen lokalisiert. Die nukleäre Lokalisation des GFP und der NLS-freien GFP-Fusionsproteine dürfte auf ein schwaches NLS-Motiv, welches im GFP-Protein enthalten ist, zurückzuführen sein. Nach Fusion mit dem hLa-NLS konnten die GFP-Fusionsproteine vollständig im Zellkern detektiert werden (Abbildung 25B). Für den Immunoblot und die Immunfluoreszenzstudien wurden identische Ergebnisse bezüglich der 7B6-Bindung erzielt. Im Western Blot konnte der anti-GFP-Antikörper in allen Proben die GFP-enthaltenden Proteine detektieren. Der mAk 7B6 erkannte in den nur mit GFP bzw. GFP-NLS transfizierten Proben lediglich das endogene hLa. Die Proteine mit der humanen Epitopsequenz (IE) wurden mit und ohne angefügtes NLS von 7B6 gebunden. Bei dem Fusionsprotein mit NLS trat, wie schon bei GFP-La₂₉₅₋₄₀₈, die Besonderheit auf, dass eine zusätzliche schwache Bande oberhalb des erwarteten Molekulargewichts erschien. Sie konnte diesmal mit beiden Antikörpern nachgewiesen werden, da auf dem anti-GFP-Immunoblot eine entsprechend hohe Antigenmenge vorlag.

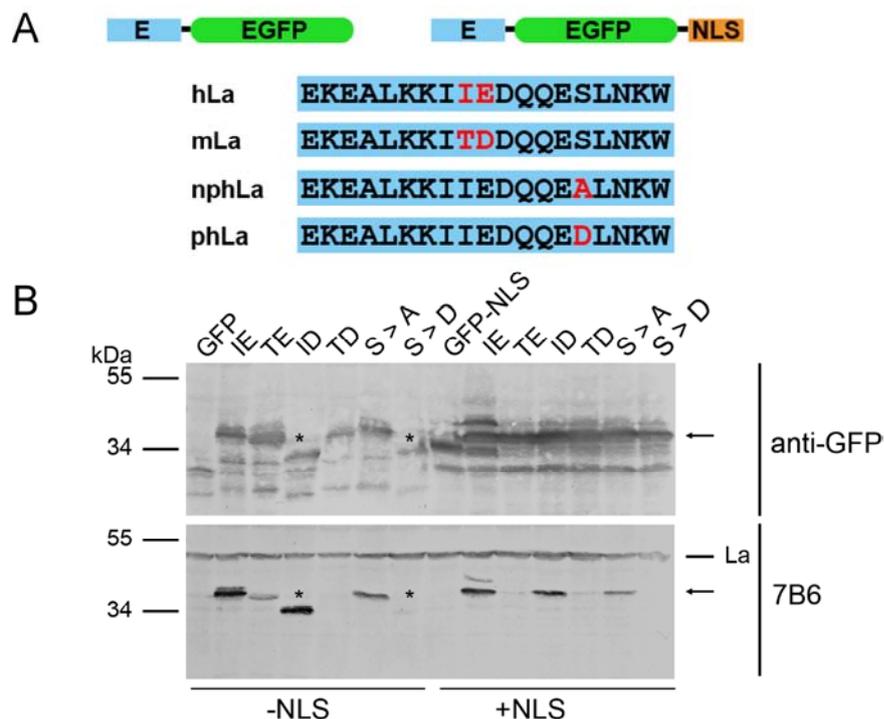
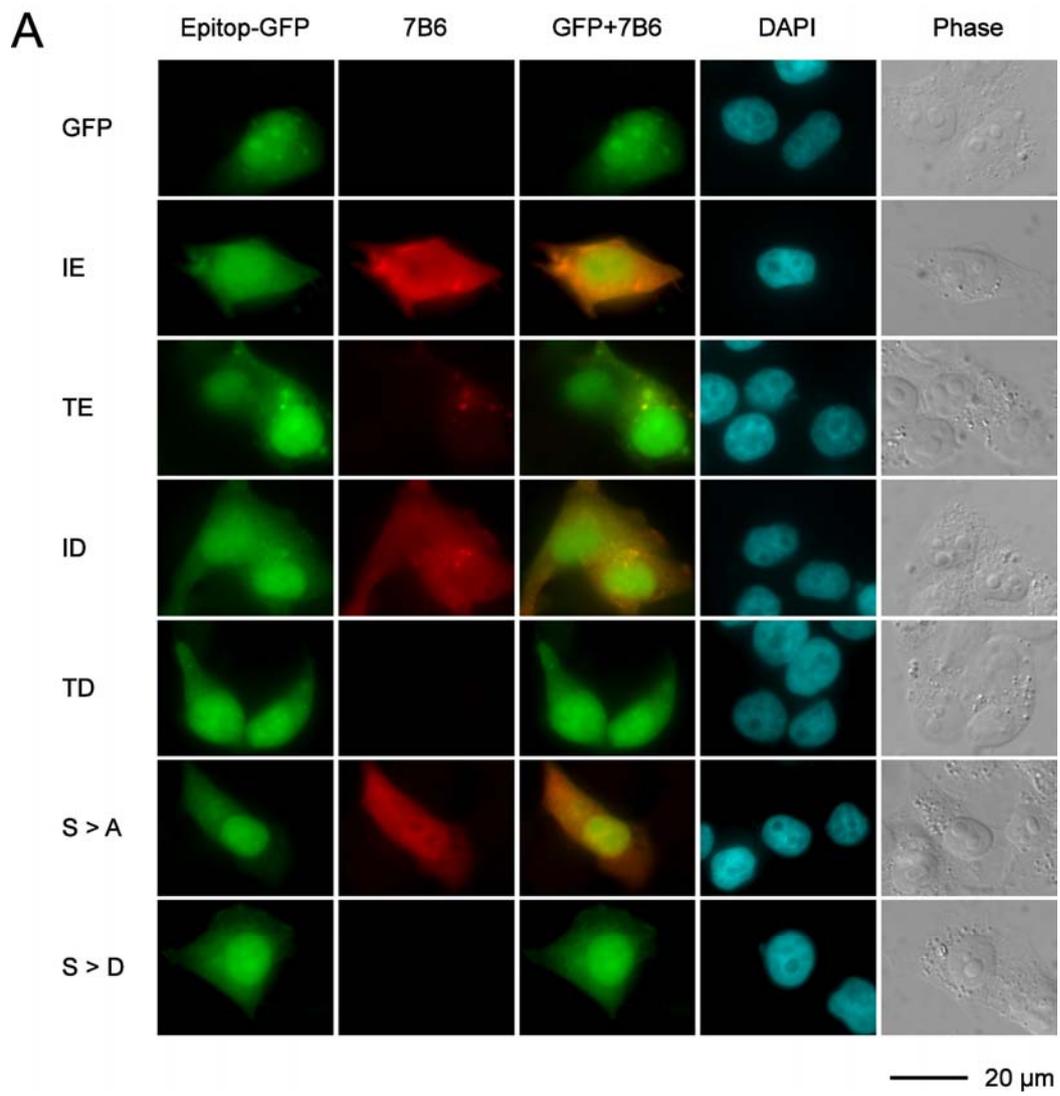


Abbildung 24: Punktmutanten des 7B6-Epitops fusioniert an GFP(-NLS).

A) Schema der erzeugten Fusionsproteine. Das 7B6-Epitop (E) wurde entweder nur an GFP fusioniert oder es wurden zusätzlich die AS 369-408 von hLa als NLS angehängt. Für beide Proteinformaten wurden nun Punktmutationen eingeführt, um einerseits die Sequenz des mLa zu analysieren und andererseits den Einfluss einer Phosphorylierung an S325 zu evaluieren. **B)** HEK 293T-Zellen wurden mit den verschiedenen Plasmiden transfiziert, welche für die unterschiedlichen Punktmutanten codierten. Nach 18 h wurden Totalextrakte von den Zellen hergestellt und parallel auf zwei 12%ige SDS-Gele aufgetragen. Nach elektrophoretischem Transfer wurden die Membranen mit anti-GFP oder 7B6 und mit anti-Maus-IgG-AP entwickelt. Die Pfeile markieren bei beiden Membranen die Hauptbande des rekombinanten Proteins. Zwei Fusionsproteine (* auf der jeweiligen Spur) zeigten klonierungsbedingt ein kleineres Molekulargewicht. Die DNA-Bereiche zwischen Ende des 7B6-Epitops und Stopp-Codon waren hier im Vergleich zu den übrigen Konstrukten unterschiedlich lang.



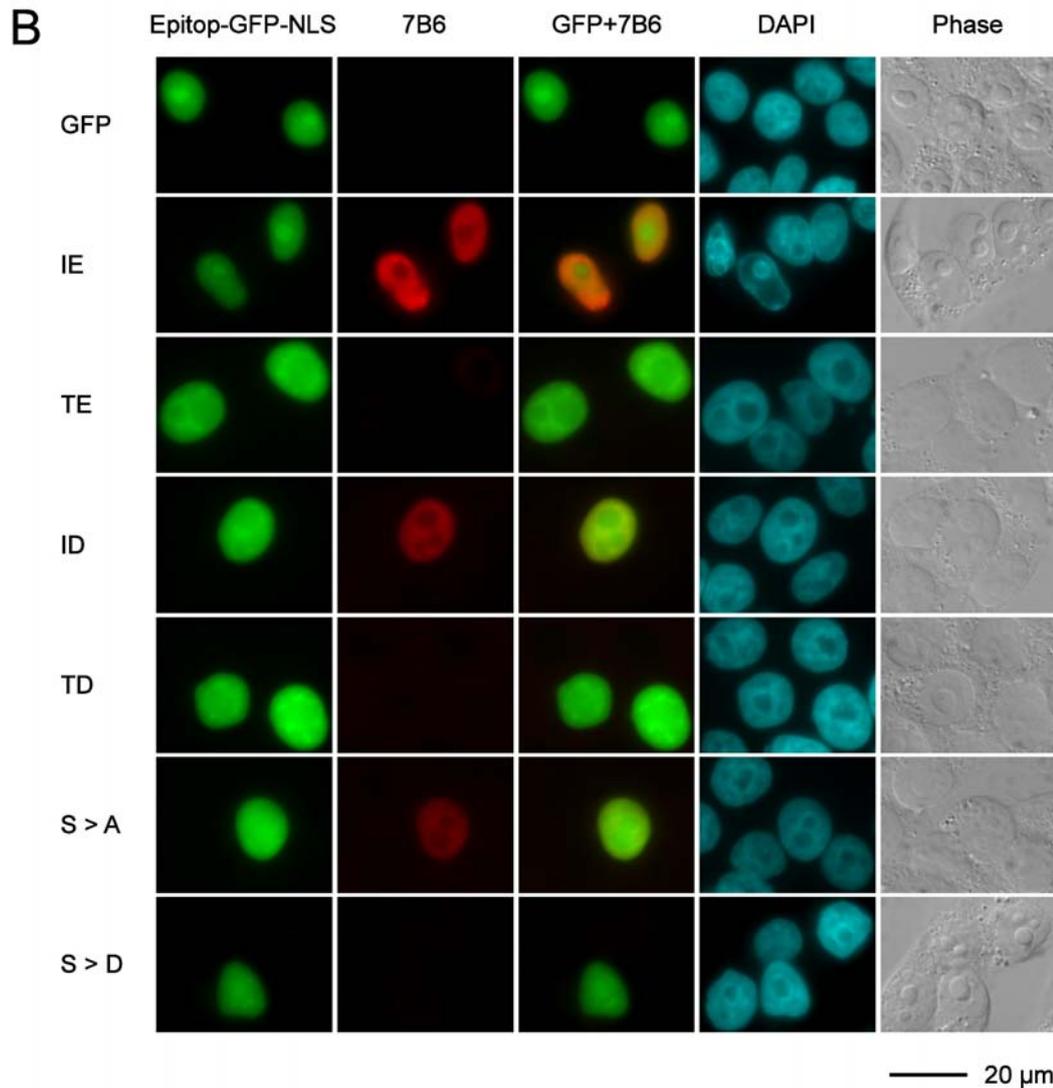


Abbildung 25: Immunfluoreszenz der 7B6-Epitop-Punktmutanten in HeLa-Zellen.

HeLa-Zellen wurden mit den verschiedenen Plasmiden transfiziert und nach 18 h mit PFA fixiert und permeabilisiert. Die Färbung erfolgte mit 7B6-Hybridomaüberstand und anti-Maus-IgG-Cy3. Zusätzlich wurde die DNA der Zellkerne mit DAPI angefärbt. Außer den drei verschiedenen Fluoreszenzkanälen wurde auch der Phasenkontrast aufgenommen. Die Bezeichnung der Proben am linken Bildrand bezieht sich auf das Schema in Abbildung 24A und auf die Erklärungen im Text. **A)** Übersicht für alle 7B6-Epitop-GFP-Fusionsproteine. **B)** Alle Konstrukte mit zusätzlichem NLS.

Für die I319 > T-Konstrukte (TE) war eine schwache Bande im Immunoblot vorhanden, wenn die NLS-Sequenz fehlte. In der Immunfluoreszenz war der überwiegende Teil der transfizierten Zellen negativ. Wenige Zellen waren 7B6-positiv und oft schienen sie Proteinaggregate zu enthalten, welche angefärbt waren. Die Mutation E320 > D (ID) verändert den Aminosäurecharakter nicht und erwartungsgemäß waren die ID-enhaltenden Epitope unabhängig vom angefügten NLS mit 7B6 gefärbt. Der Austausch beider AS (I319 > T, E320 > D (TD)), um die vollständige murine Sequenz zu generieren, hat die 7B6-Bindung sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern komplett verhindert.

In den Proteinen, in denen S325 durch Alanin substituiert worden war (S > A), konnte der mAk sein Antigen erkennen. Alle transfizierten Zellen waren gefärbt, allerdings nicht so stark wie bei den IE-Proben. Die schwächeren Immunfluoreszenzen korrelierten auch mit den schwächeren Banden im Immunoblot. Im Falle des Aspartats an Position 325 (S > D) konnte der Antikörper nicht mehr an das Peptidepitop binden.

Insgesamt war es möglich, mit dem Antikörper eukaryont hergestellte 7B6-Epitope sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern zu detektieren. Die Ergebnisse deuten auf eine post-translationale Modifikation an T318 (entspricht T319 in hLa) des murinen La-Proteins hin, welche die Erkennung des eukaryonten mLa durch 7B6 verhindert. Dieser Effekt ist unabhängig von der intrazellulären Lokalisation des Proteins, da er gleichermaßen im Zytoplasma wie im Zellkern auftritt. Für die Wechselwirkung des Antikörpers mit hLa-Protein ist auch S325 von Bedeutung. Die Mutation dieser AS zu Alanin schwächte die Bindung des mAks. Die simulierte Phosphorylierung durch einen Austausch zu Aspartat verhinderte die Antikörperbindung komplett.

Zusätzlich können in Abbildung 25 unterschiedliche Fluoreszenzmuster zwischen GFP und 7B6-Färbung beobachtet werden. Dies wird durch die Überlagerung der beiden Farbkanäle (GFP+7B6) besonders deutlich. Die zytoplasmatischen Epitop-GFP-Proteine (Abbildung 25A) sind trotz des fehlenden NLS im Zellkern angereichert. Der 7B6-Antikörper färbt allerdings die zytoplasmatischen Bereiche der Zellen wesentlich stärker als den Zellkern (für das IE-Konstrukt deutlich erkennbar). Möglicherweise ist auch hier ein Teil des nukleären Proteinanteils von Interaktionspartnern abgedeckt (NRE ist im Epitop größtenteils enthalten) oder post-translational modifiziert, z. B. phosphoryliert. Hinzu kommen die Kernfärbungen in Abbildung 25B. Die Epitop-GFP-NLS-Proteine sind im grünen Fluoreszenzkanal auch in den Nukleoli zu sehen, doch 7B6 färbt die Nukleoli überhaupt nicht. Auch für dieses Kompartiment kommen entweder Wechselwirkungen mit anderen Proteinen oder Nukleinsäuren oder mögliche post-translationale Modifikationen in Frage.

4.1.4.3.2. Untersuchung der DNA- und RNA-Bindung sowie Dimerisierung in der 7B6-Epitopregion

Eine der Hauptfunktionen, die bisher für das hLa-Protein beschrieben worden sind, ist die Bindung von RNA-Molekülen. Dafür verantwortlich sind vor allem das La-Motiv und das RRM1. Das RRM2 allein kann keine RNA binden, dennoch wird eine Interaktion zwischen der SBM-Region (AS 328-363) und den 5'-Phosphatgruppen der RNA-Moleküle beobachtet [126]. Darüber hinaus kann das La-Protein auch ssDNA- und dsDNA-Moleküle binden [101]. Die beschriebene Dimerisierungsdomäne [127] ist ebenfalls in der C-terminalen Region des Proteins zu finden (AS 293-348) und beinhaltet das 7B6-Epitop (AS 311-328).

Im Folgenden wurden die DNA- und RNA-Bindungseigenschaften sowie das Dimerisierungsverhalten der prokaryont hergestellten und über Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigten La-Fragmente genauer analysiert. Von besonderem Interesse waren das verlängerte (La₃₀₃₋₃₄₄) und das kurze (La₃₁₁₋₃₂₈) 7B6-Peptid epitop. Zum Vergleich wurden das La-Volllänge protein (La₁₋₄₀₈), LaN (La₁₋₁₉₂) bzw. LaC (La₁₉₄₋₄₀₈) sowie verschiedene kürzere Fragmente des C-terminalen Bereichs eingesetzt (siehe Abbildung 26).

Die Proteine wurden auf mehreren separaten SDS-Gelen entsprechend ihren Molekulargewichten aufgetrennt und elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Das Vorhandensein aller Proteine in etwa vergleichbaren Konzentrationen wurde durch Detektion mit einem Antikörper gegen den Hexahistidintag (anti-His in Abbildung 26A) bestätigt. Auf der zweiten Membran wurde für die verwendeten Proteine das 7B6-Epitop nachgewiesen. Dies war erwartungsgemäß bei allen Proteinen erfolgreich, die die AS 311-328 enthielten. Die N-terminale Hälfte des hLa (La₁₋₁₉₂) und das La-Fragment La₃₁₈₋₄₀₈ blieben entsprechend negativ.

Zusätzlich zu diesen klassischen Western Blots wurde die Bindung von DNA (South-Western Blot) und RNA (North-Western Blot) für die La-Fragmente untersucht. Dazu wurden DIG-markierte Sonden eingesetzt, welche danach mit einem anti-DIG-AP-Antikörper nachgewiesen werden konnten. Alle La-Fragmente, die den kompletten C-terminalen Bereich bis zur AS 408 enthielten, waren in der Lage, DIG-markierte DNA zu binden (DNA in Abbildung 26A). Für La₁₋₁₉₂ und La₃₀₃₋₃₄₄ wurden schwache bis sehr schwache Banden detektiert, das kurze 7B6-Epitop La₃₁₁₋₃₂₈ zeigte keine DNA-Bindung. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die DNA-Bindungsdomäne C-terminal vom 7B6-Epitop liegen muss.

Die RNA-Bindung wurde vornehmlich für die Proteine detektiert, welche noch möglichst viel vom N-Terminus enthielten (RNA in Abbildung 26A). Erwartungsgemäß banden La₁₋₄₀₈ und La₁₋₁₉₂ DIG-markierte RNA, da sie beide das La-Motiv und die RRM1-Domäne aufweisen. Doch auch La₁₅₉₋₄₀₈, La₁₉₄₋₄₀₈ und La₂₃₉₋₄₀₈ waren in der Lage, mit der RNA zu assoziieren. Die weiteren Proteine La₂₇₈₋₄₀₈, La₃₁₈₋₄₀₈ und La₃₀₃₋₃₄₄ riefen nur ganz schwache Banden auf dem North-Western Blot hervor und das kurze 7B6-Peptid epitop La₃₁₁₋₃₂₈ blieb komplett negativ. Mit den vorhandenen La-Fragmenten konnte bestätigt werden, dass v. a. die N-terminalen Bereiche des Proteins für die RNA-Bindung verantwortlich sind und die 7B6-Epitopregion auf keinen Fall dafür ausreichend ist.

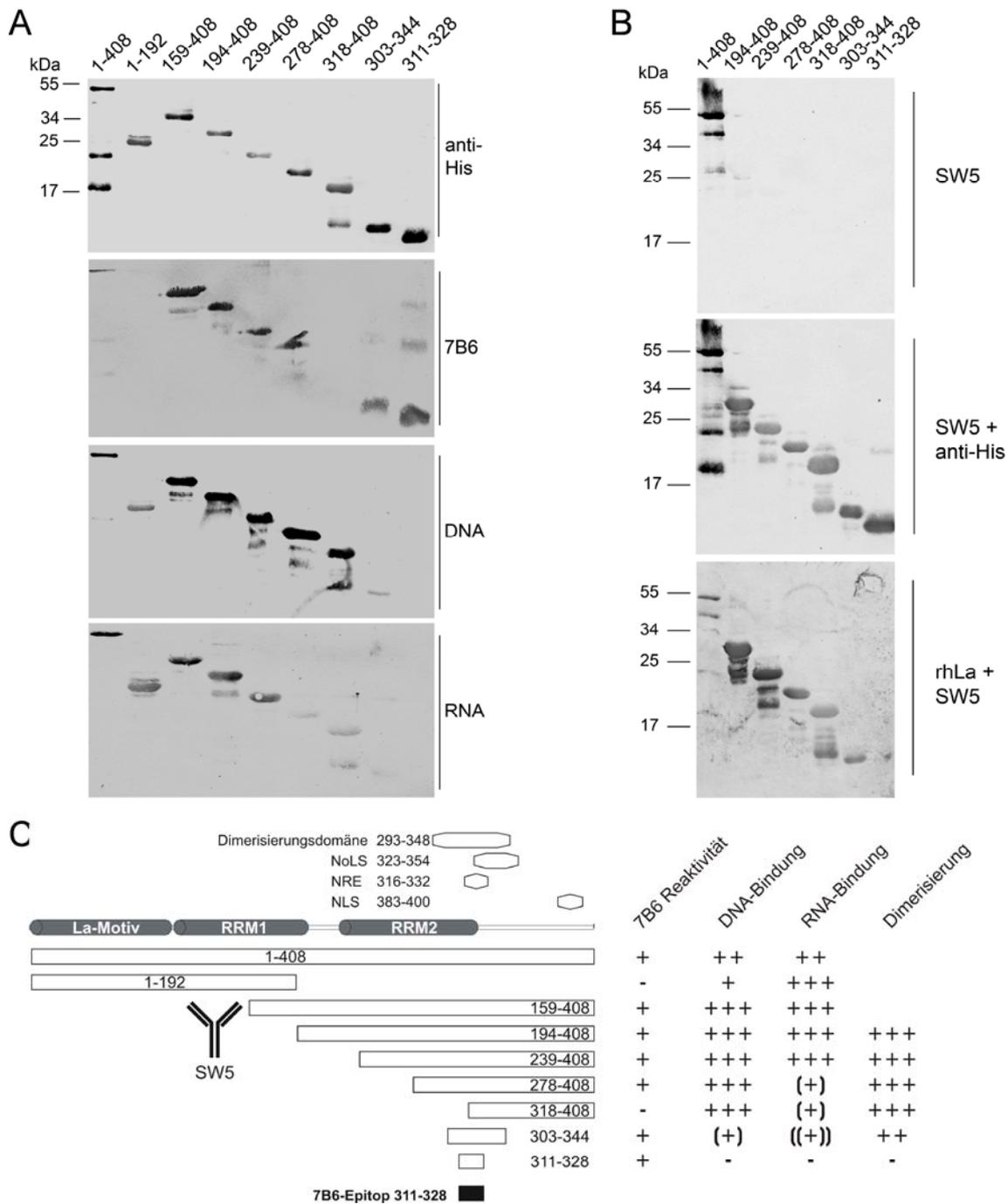


Abbildung 26: Untersuchung der C-terminalen Domäne von La auf Bindung von 7B6, DNA und RNA sowie Dimerisierung mit rhLa.

A) Prokaryont hergestellte La-Fragmente wurden auf vier separaten 15%igen SDS-Gelen aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Nach der Blockierung wurden die Proteine mit anti-His oder 7B6 und anti-Maus-IgG-AP im Western Blot detektiert. Alternativ wurden die Membranen mit DIG-markierter DNA oder RNA behandelt und mit anti-DIG-AP wurde die Bindung der Nucleinsäuren untersucht. **B)** Die La-Fragmente wurden doppelt auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen und nach dem Western Blot wurde die Membran in der Mitte halbiert. Die linke Hälfte wurde zuerst mit SW5 und anti-Maus-IgG-AP entwickelt. Danach wurden die übrigen Proteine mit anti-His und anti-Maus-IgG-AP nachgewiesen. Die rechte Hälfte der Membran wurde mit rhLa inkubiert und anschließend wurde die Dimerisierung mit SW5 und anti-Maus-IgG-AP detektiert. **C)** Schema der verwendeten La-Fragmente und der funktionellen Domänen. Rechts daneben sind die Ergebnisse aus A) und B) zusammengefasst (- negativ, +++ sehr stark positiv, ++ positiv, + schwach positiv, (+) sehr schwach positiv, ((+)) kaum detektierbar). Das SW5-Epitop liegt bei AS 112-183.

In Abbildung 26B ist ein Far-Western Blot [167] dargestellt, in dem die Dimerisierung des rhLa-Volllängeproteins mit den La-Fragmenten auf der Membran untersucht wurde. Zur Kontrolle wurde die eine Hälfte der Membran zuerst mit SW5 und anti-Maus-IgG-AP entwickelt (siehe Abbildung 26B oben). Nur das La-Volllängeprotein konnte vom Antikörper erkannt werden. Anschließend wurde die Membran erneut blockiert. Mit anti-His und anti-Maus-IgG-AP wurden auf derselben Membran die La-Fragmente nachgewiesen, die das SW5-Epitop nicht enthielten (Abbildung 26B Mitte und Schema in Abbildung 26C, in dem das SW5-Epitop angedeutet ist). Die zweite Hälfte der Membran, auf der die Proben in identischer Reihenfolge und Menge enthalten waren, wurde mit rhLa inkubiert. Dieses konnte nun an die La-Fragmente auf der Membran binden, sofern sie die Dimerisierungsdomäne besaßen. Die entsprechenden Banden waren nun auch mit SW5 detektierbar (Abbildung 26B unten). Alle längeren Proteine, die die beschriebene Dimerisierungsdomäne (AS 293-348) enthielten, waren in der Lage, mit rhLa zu interagieren. Sogar das Fragment La₃₁₈₋₄₀₈, bei dem die Dimerisierungsdomäne N-terminal um 25 AS verkürzt ist, konnte rhLa binden. Das verlängerte 7B6-Peptid epitop La₃₀₃₋₃₄₄ besaß ebenfalls die Fähigkeit zur Dimerisierung, doch das kürzere La₃₁₁₋₃₂₈ war dazu nicht mehr in der Lage. Die für die rhLa-Bindung besonders wichtigen Bereiche des Proteins scheinen C-terminal von La₃₁₁₋₃₂₈ zu liegen.

Alle Ergebnisse der Bindungsstudien, die in diesem Kapitel durchgeführt wurden, sind in Abbildung 26C nochmals zusammengefasst. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das 7B6-Epitop (AS 311-328) weder direkt an der DNA-Bindung noch an der RNA-Bindung oder Dimerisierung beteiligt ist. Deshalb sollten diese Faktoren nicht die Ursache dafür sein, warum das Epitop in HeLa-Zellen für den Antikörper unzugänglich ist.

4.1.4.4. Einengung der Epitopregion für die Antikörper 22A und 24BG7

Die beiden mAks 22A und 24BG7 zeigten ein sehr ähnliches Verhalten bei der Epitopuntersuchung und werden deshalb in diesem Abschnitt gemeinsam charakterisiert. Das relativ lange Protein GFP-La₁₋₂₄₅ wurde im Immunoblot gut erkannt, doch die im Folgenden untersuchten La-Fragmente GFP-La₁₋₁₉₂ und GFP-La₁₉₄₋₄₀₈ zeigten beide keine Reaktivität mit den Antikörpern (siehe Abbildung 27A und B). Dies führte zu der Vermutung, dass das Epitop in der Region der Schnittstelle liegt und auf beiden Proteinen nur partiell enthalten war. Das überlappende Protein La₁₂₀₋₂₄₅ wurde allerdings auch nicht von den Antikörpern gebunden. Erst durch eine Verlängerung in Richtung N-Terminus bis zur Position 107 konnte die Reaktivität wieder hergestellt werden. Diese Ergebnisse weisen für beide Antikörper auf Konformationsepitope hin. Das kleinste La-Fragment, das positiv getestet wurde, erstreckt sich von D107 bis K200. Die nächst kürzeren Varianten, welche eine N-terminale Deletion bis zu T120 oder eine C-terminale Deletion bis K192 besaßen, führten zum Verlust der Reaktivität.

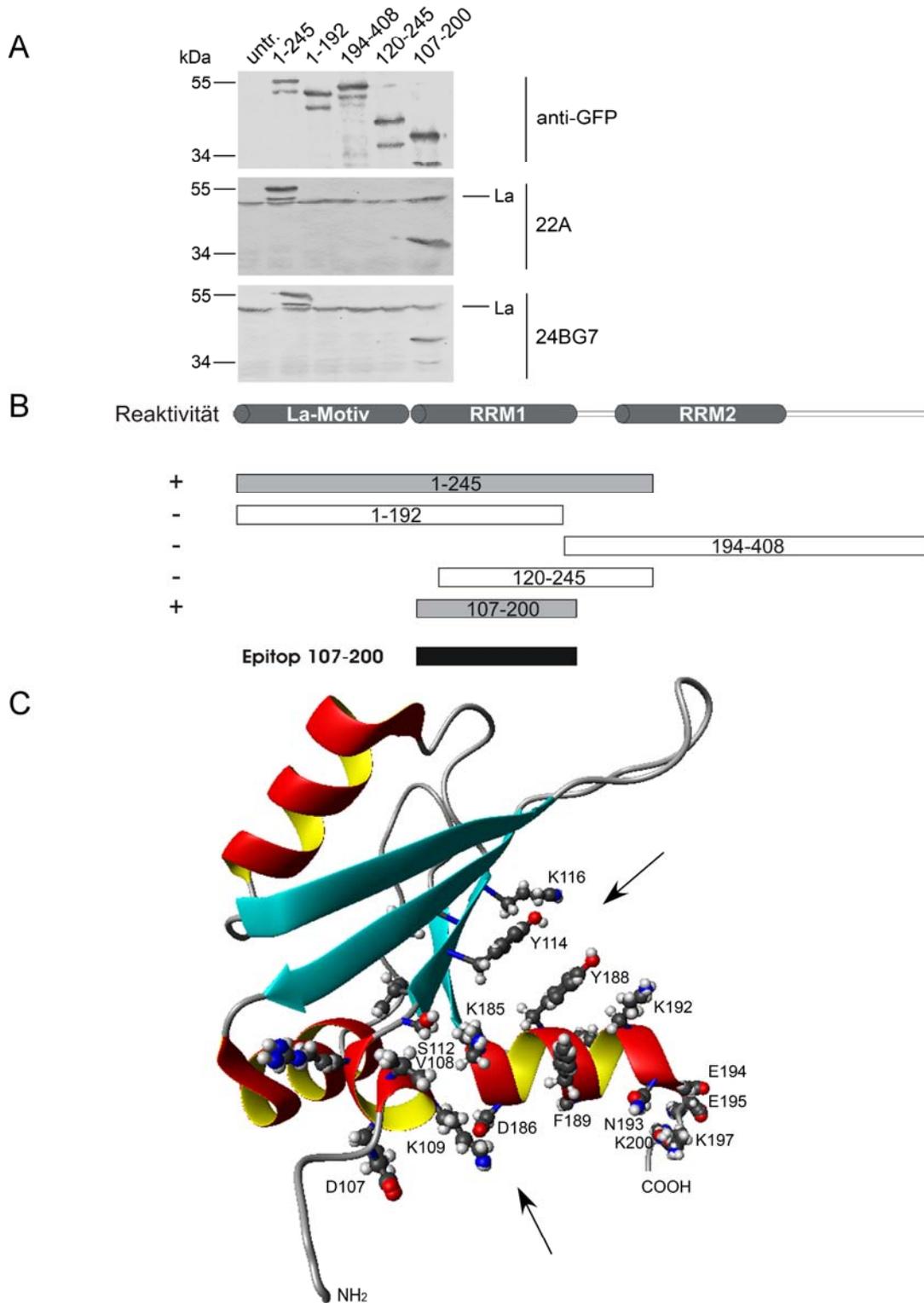


Abbildung 27: Untersuchung der Epitopregion für die mAbs 22A und 24BG7.

A) Auf die drei parallel beladenen SDS-Gele wurden Totalextrakte von HEK 293T-Zellen aufgetragen, die die rekombinanten GFP-La-Fragmente enthielten. Zur Kontrolle wurde eine Probe von untransfizierten Zellen eingesetzt. Nach dem Western Blot wurde je eine Membran mit anti-GFP, eine mit 22A und eine mit 24BG7 entwickelt. Die Detektion erfolgte mit anti-Maus-IgG-AP. **B)** Schematische Darstellung des La-Volllänge-proteins mit seinen drei charakteristischen Domänen und der La-Fragmente [102]. Die Epitopregion der beiden Antikörper ist schwarz gekennzeichnet und die erkannten La-Fragmente sind grau dargestellt. **C)** Räumliche Struktur des RRM1, die AS-Seitenketten D107-K116 und K185-K200 sind durch Ball-Stab-Darstellung hervorgehoben und beschriftet. Die Pfeile markieren zwei mögliche Bereiche, wo die Antikörper binden könnten.

Unter Einbeziehung der NMR-Struktur für das RRM1 [102] wurde überprüft, ob diese in der Sequenz weit auseinander liegenden kritischen Bereiche durch die Proteinfaltung in räumliche Nachbarschaft gelangen können (siehe Abbildung 27C). Dazu wurden die Seitenketten der AS 107-116 und 185-200 durch eine Ball-Stab-Darstellung hervorgehoben. Die Epitopregion befindet sich einerseits im N-terminalen und andererseits im C-terminalen Bereich der Domäne. Es kann allerdings mit den vorhandenen Daten nicht genau eingegrenzt werden, welche AS-Reste für die Antikörpererkennung eine Rolle spielen. Durch die beiden Pfeile in der Abbildung sollen zwei Möglichkeiten aufgezeigt werden. Zum einen kommen Y114 und K116 in die Nähe von Y188 und K192 und könnten zusammen vom Paratop gebunden werden. Des Weiteren liegen V108, K109 und S112 in Nachbarschaft zu K185, D186, F189 und N193 und könnten ein gemeinsames Konformationsepitop bilden.

4.1.4.5. Epitopcharakterisierung für die Antikörper 312B, 27E, 2F9 und 32A

Die vier mAKs 312B, 27E, 2F9 und 32A besitzen ebenfalls eine gemeinsame Epitopregion. Die Reaktivität richtet sich gegen das La-Motiv und die C-terminale Begrenzung des Epitops konnte durch zwei eng beieinander liegende La-Fragmente identifiziert werden. Während das längere Protein La₁₋₁₀₀ von allen mAKs erkannt wurde, reagierten sie mit La₁₋₉₄ nicht mehr (Abbildung 28A und B). Anschließend wurde von La₁₋₁₀₀ ausgehend der N-Terminus in Schritten von 5 AS sukzessive verkürzt. Dadurch wurden das positive La-Fragment La₁₀₋₁₀₀ und das nicht mehr erkannte Protein La₁₅₋₁₀₀ identifiziert.

Für diese relativ lange Epitopregion sollte wiederum überprüft werden, ob sie ein Konformationsepitop bilden könnte. Die AS 10-20 und 94-100 wurden in der räumlichen Struktur des La-Motivs [102] hervorgehoben (siehe Abbildung 28C). Es ist ersichtlich, dass die N-terminalen 20 AS eine α -Helix ausbilden. Die C-terminalen Reste liegen alle auf einem Linker, der die Verbindung zum RRM1 herstellt. Durch dessen Flexibilität ist es ohne weiteres möglich, die C-terminalen AS in die räumliche Nähe der AS 10-20 zu bringen.

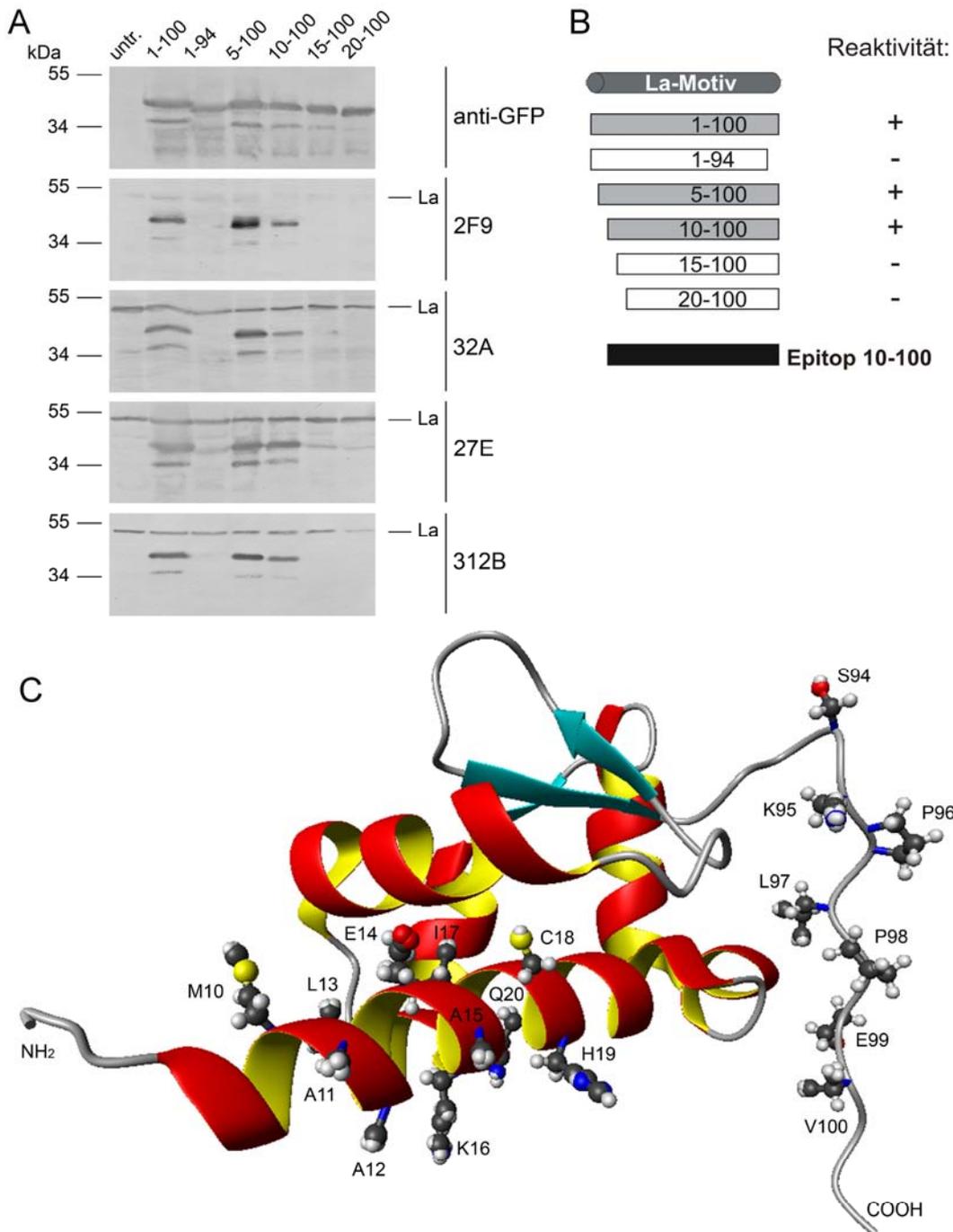


Abbildung 28: Eingrenzung der Epitopregion für 2F9, 32A, 27E und 312B.

A) Auf fünf SDS-Gele wurden parallel Totalextrakte von mit GFP-La-Fragmenten transfizierten HEK 293T-Zellen aufgetragen. Ein Lysat von untransfizierten Zellen wurde als Kontrolle verwendet. Dem Western Blot folgte die Detektion der GFP-La-Fragmente mit anti-GFP, 2F9, 32A, 27E und 312B auf jeweils einer Nitrocellulosemembran. Der Bindungsnachweise wurde mit anti-Maus-IgG-AP durchgeführt. **B)** Schema des N-terminalen La-Motivs und der verwendeten La-Fragmente. Die von allen Antikörpern erkannten Proteine sind grau gefärbt und das gemeinsame Epitop ist schwarz dargestellt. **C)** Räumliche Struktur des La-Motivs [102]. Die AS-Seitenketten M10-Q20 und S94-V100 sind durch Ball-Stab-Darstellung verdeutlicht und beschriftet.

4.2. Oxidativer Stress beeinflusst die Antigenität und Lokalisation des hLa-Proteins

Das La-Antigen wurde ursprünglich als nukleäres Protein beschrieben und ihm wurden entsprechende Funktionen im Bereich der RNA-Faltung und -Prozessierung zugewiesen [64]. Dennoch wurde es auch im Zytoplasma und auf der Zelloberfläche beobachtet, z. B. nach Virusinfektion oder UV-Bestrahlung von Zellen [133-136] und im Verlauf der Apoptose [171, 172]. All diese zellulären Stressbedingungen haben eine erhöhte Konzentration an Sauerstoffradikalen (ROS) in der Zelle gemein. Das oxidative Milieu führt einerseits zur Translokation des Proteins auf die Zelloberfläche, wo es für das Immunsystem zugänglich wird. Andererseits kann die Oxidation strukturelle Umlagerungen oder post-translationale Modifikationen des Proteins hervorrufen. So werden mögliche Neoepitope erzeugt, gegen welche unter Umständen keine Toleranz besteht. Die Folge wäre die Auslösung einer Autoimmunantwort gegen die reduzierte bzw. oxidierte Proteinform.

4.2.1. Anti-La-Antikörper können zwischen der oxidierten und reduzierten Form des Antigens unterscheiden

Erste Hinweise auf redoxabhängige Veränderungen des La-Antigens ergaben sich für den mAk 2F9 im Western Blot (Abbildung 29A). Der Antikörper konnte das Antigen im Immunoblot erkennen, wenn es in reduzierendem SDS-Probenpuffer aufgenommen worden war. Ohne vorherige Reduktion des rhLa-Proteins konnte der mAk 2F9 nicht an sein Epitop binden. Die erforderliche Reduktion konnte auch noch nach dem elektrophoretischen Transfer durchgeführt werden, indem eine Hälfte der Membran abgetrennt und mit β -Mercaptoethanol behandelt wurde. Das nachträglich reduzierte La-Protein wurde nun vom Antikörper erkannt. Es trat eine zusätzliche Bande höheren Molekulargewichts auf, welche ein Dimer des Proteins repräsentiert. La-Oligomere treten immer auf SDS-Gelen mit nicht-reduzierten Proben auf. Durch die Trennung der Membran in der Mitte einer Gelspur wird der Unterschied zwischen der nicht-reduzierten Probe und der nachträglichen Reduktion besonders deutlich.

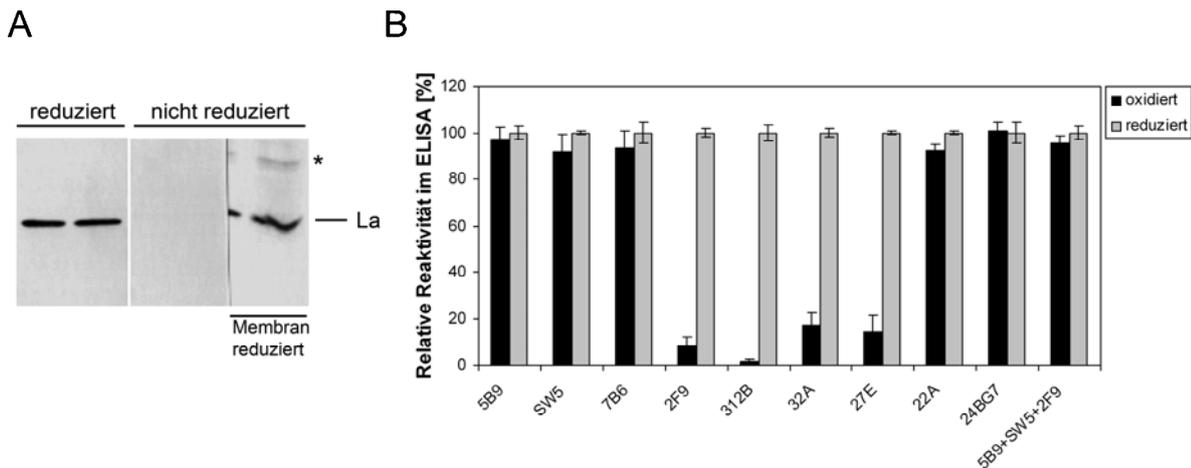


Abbildung 29: Oxidationsempfindlichkeit des Epitops von 2F9, 312B, 27E und 32A.

A) Das rhLa-Protein wurde in SDS-Probenpuffer mit DTT (reduziert) oder ohne DTT (nicht reduziert) aufgenommen und mit diesen Proben wurden jeweils mehrere Spuren eines SDS-Gels beladen. Nach elektrophoretischem Transfer auf eine PVDF-Membran wurde der rechte Teil der Membran abgetrennt und nachträglich mit 2% (v/v) β -Mercaptoethanol inkubiert. Anschließend wurde mit 2F9-Hybridomaüberstand sowie anti-Maus-IgG-AP detektiert. (*) kennzeichnet das Dimer des Proteins. **B)** Eine mit rhLa beschichtete ELISA-Platte wurde zur Hälfte mit 3% (v/v) H_2O_2 und zur anderen Hälfte mit 2% (v/v) β -Mercaptoethanol behandelt. Danach wurde die Bindung der anti-La-mAks an das oxidierte Protein (schwarze Balken) mit der Bindung an die reduzierten Proben (graue Balken) verglichen. Die Detektion erfolgte mit anti-Maus-IgG-POD. Außerdem wurden in einem Ansatz die Überstände von 5B9, SW5 und 2F9 im Verhältnis 1:1:1 gemischt, bevor sie auf die ELISA-Patte aufgetragen wurden.

Die Oxidationsempfindlichkeit der 2F9-Epitopregion (AS 10-100) konnte auch im ELISA festgestellt werden: Während eine Wasserstoffperoxidbehandlung des La-Proteins bei den anderen mAks keine Beeinträchtigung der Bindung hervorrief, waren die mAks 312B, 27E, 2F9 und 32A nicht mehr in der Lage, das oxidierte Protein zu binden (Abbildung 29B). Folglich gibt es Antikörper, die nur die reduzierte Proteinform erkennen.

In einem Antikörperringemisch aus 5B9, SW5 und 2F9 (die ersten beiden waren unempfindlich gegenüber Oxidation) wurde die Oxidationsempfindlichkeit des 2F9-Antikörpers durch die starke Bindung von 5B9 und SW5 überlagert und war nicht mehr nachweisbar.

Patientenseren, die anti-La-Autoantikörper enthielten, wurden ebenfalls auf ihre Redoxsensitivität getestet. Es konnte eine Gruppe von Seren identifiziert werden (Nr. 9-14 in Abbildung 30), welche ähnlich wie der 2F9-Antikörper (Nr. 5-8) bevorzugt an die reduzierte Form des La-Proteins binden konnten. Andererseits gab es auch mehrere Seren, die die oxidierte Antigenvariante erkannten (Nr. 15-20). Darüber hinaus waren für die Seren 21-28 keine Unterschiede zwischen der oxidierten und reduzierten Proteinform feststellbar. Eine mögliche Ursache dafür kann das Vorhandensein verschiedener anti-La-Autoantikörper sein, sodass die Effekte der einzelnen Antikörper ähnlich wie bei dem Gemisch an mAks nicht mehr deutlich genug hervortreten. Dennoch gibt es in einigen Autoimmunpatienten Antikörper, die nur die reduzierte oder nur die oxidierte Form des Antigens detektieren können.

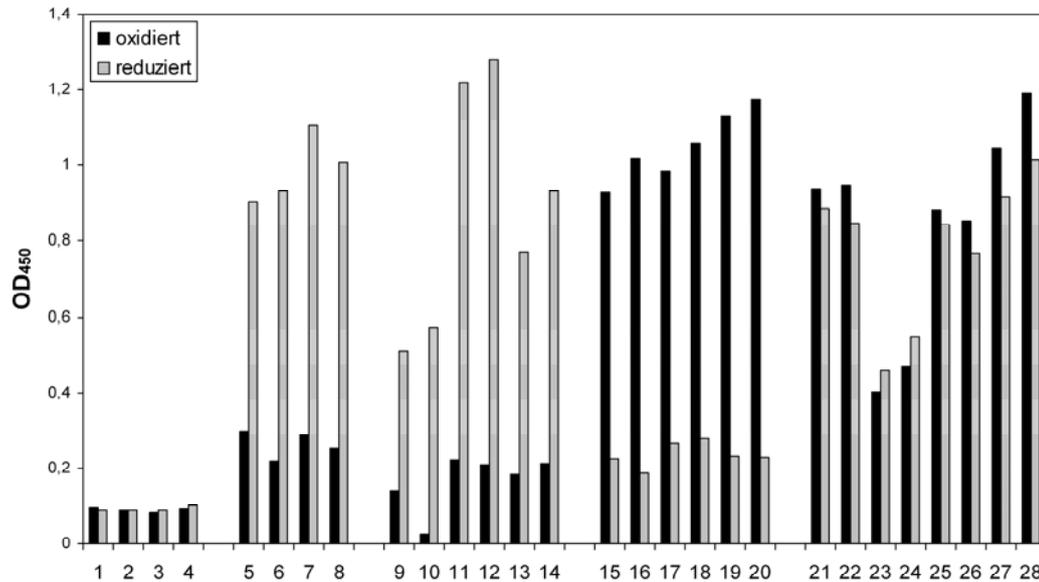


Abbildung 30: Anti-La-Autoantikörper können bevorzugt die oxidierte oder reduzierte Form des Antigens binden.

Mehrere ELISA-Patten wurden mit rhLa-Protein beschichtet, welches einerseits mit 3% (v/v) H₂O₂ (schwarze Balken) und andererseits mit 2% (v/v) β-Mercaptoethanol (graue Balken) inkubiert wurde. Proben 1-4 entsprechen einem Gemisch der verwendeten Sekundärantikörper anti-Maus-IgG-POD und anti-human-IgG-POD auf den einzelnen Platten. In 5-8 wurde der mAk 2F9 als interner Standard für jede ELISA-Platte verwendet. Die Patientenserum 9-14 erkennen bevorzugt die reduzierte Proteinform, die Seren 15-20 die oxidierte. Für die Seren 21-28 konnte kein Unterschied zwischen oxidiertem und reduziertem Antigen festgestellt werden.

4.2.2. Nach Oxidation sowie oxidativem Zellstress wird das 7B6-Epitop für den Antikörper zugänglich

Die Verwendung diverser humaner Zelllinien sowie verschiedener Fixierungsprotokolle und Waschlösungen konnte keine Kernfärbungen mit 7B6 hervorrufen (siehe Abbildung 17 und Abbildung 31a), obwohl das eukaryote hLa-Protein im Immunoblot erkannt wurde (siehe Abbildung 15). Aufbauend auf der Epitopcharakterisierung im Bereich des nukleären Retentionselements, der DNA-Bindungs- sowie Dimerisierungsdomäne (4.1.4.3) sollte der Einfluss von Redoxbedingungen auf die Immunfluoreszenzfärbung des 7B6-Antikörpers untersucht werden. Wenn oxidativer Zellstress zur Translokation des Proteins führt, so müssen dabei auch die Interaktionen mit dem nukleären Retentionspartner und/oder mit der DNA gelöst werden. Tatsächlich konnten mit dem Antikörper Kernfärbungen auf HeLa-Zellen erzielt werden. Dazu bedurfte es einer 10-minütigen Behandlung mit Wasserstoffperoxid nach der MeOH/EGTA-Fixierung. Nach gründlichem Waschen mit PBS, um das übrige H₂O₂ zu entfernen, wurden die fixierten Zellen mit 7B6-Hybridomaüberstand und dem geeigneten Sekundärantikörper gefärbt. Die deutlichen Kernfärbungen nach der Oxidation sind in Abbildung 31e zu sehen. Durch die Sauerstoffradikale scheint sich das La-Protein auch noch nach MeOH-Fixierung von seinem nukleären Bindepartner (Protein oder DNA) zu lösen, wodurch das 7B6-Epitop zugänglich wird.

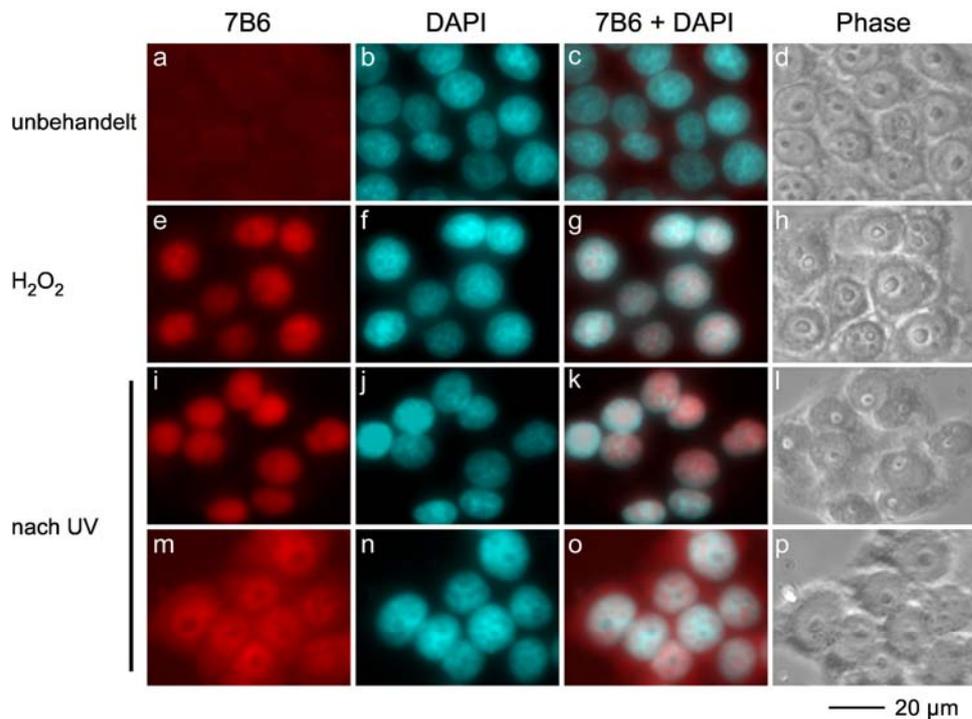


Abbildung 31: Kernfärbungen mit 7B6 nach Oxidation oder UV-Bestrahlung von HeLa-Zellen.

HeLa-Zellen wurden UVC-Strahlung zwischen 200-300 mJ/m² ausgesetzt. Nach 1 h, 1,5 h und 2 h wurden die Zellen jeweils mit MeOH/EGTA fixiert. Parallel wurden unbestrahlte Kontrollen mitgeführt und solche, die nach der Fixierung für 10 min mit 0,5% (v/v) H₂O₂ in PBS inkubiert wurden. Abschließend wurden alle Proben parallel mit 7B6 und anti-Maus-IgG-Alexa Fluor[®]568 sowie DAPI gefärbt. Der Phasenkontrast wurde ebenfalls aufgenommen. Die oberen Aufnahmen der UV-behandelten Zellen wurden 90 min nach Bestrahlung mit 300 mJ/m² gemacht. Die Fotos in der unteren Reihe entstammen einem zweiten, unabhängigen Experiment und wurden 1 h nach Bestrahlung mit 250 mJ/m² aufgenommen.

Oxidative Bedingungen können auch *in vivo* erzeugt werden, indem Sauerstoffradikale (ROS) ausgenutzt werden, die z. B. nach UV-Bestrahlung intrazellulär entstehen. Deshalb wurden für das folgende Experiment HeLa-Zellen mit Hilfe eines UV-Crosslinkers verschiedenen UV-Dosen ausgesetzt. Nach der Bestrahlung wurden den Kulturschalen im Abstand von 30 min einzelne Deckgläschen entnommen und fixiert. Abschließend wurden alle Proben parallel mit 7B6 gefärbt und die Färbemuster in der Immunfluoreszenz analysiert. Für jedes Experiment gab es eine Strahlungsdosis und einen Zeitpunkt, zu dem die Kernfärbung mit 7B6 am deutlichsten war. In mehreren unabhängigen Experimenten konnten die besten nukleären Färbungen 60-90 min nach Bestrahlung mit einer Dosis von 250-300 mJ/m² erzielt werden. In Abbildung 31 (i, m) sind die entsprechenden Immunfluoreszenzaufnahmen dargestellt. In manchen Regionen des Deckgläschens war auch das Zytoplasma leicht mit 7B6 gefärbt. Hier hatte bereits eine Translokation des La-Proteins in das Zytoplasma stattgefunden.

Das 7B6-Epitop wird *in vivo* von Interaktionspartnern im Zellkern abgedeckt, kann aber durch Sauerstoffradikale freigesetzt werden. Dies ist sowohl durch *in vitro* Oxidation nach der MeOH/EGTA-Fixierung möglich als auch *in vivo* durch UV-Bestrahlung lebender Zellen. Durch das Lösen der Bindungspartner im Zellkern ist die Translokation des Proteins in das Zytoplasma möglich, wie es in Abbildung 31 (m) bereits erkennbar ist.

4.2.3. Zytoplasmatische Anreicherung des La-Proteins nach oxidativem Zellstress

Nach Apoptoseinduktion oder während einer Virusinfektion ist das La-Protein im Zytoplasma lokalisiert. Hier ist es z. B. an der IRES-abhängigen Translation von mRNAs beteiligt. In der Literatur werden für die Translokation verschiedene Proteasen verantwortlich gemacht, für die Schnittstellen im C-terminalen Bereich von hLa identifiziert wurden (siehe Schema in Abbildung 33A). So spaltet Granzym B nach F364 [144] und Caspase 3 nach D374 [141, 142]. Die Poliovirus Protease C schneidet das Protein nach Q358 [97, 145]. Dadurch wird das NLS vom übrigen Protein abgetrennt und der größere N-terminale Teil des Proteins kann in das Zytoplasma entlassen werden. Dennoch bleibt die NLS-Abspaltung widersprüchlich. Obwohl das La-Protein überwiegend im Zytoplasma lokalisiert ist, kann im Immunoblot nur ein Bruchteil des Proteins mit kleineren Molekulargewicht detektiert werden und der Rest liegt als Volllängeprotein vor [141, 145]. Aus diesem Grund wurde eine Methode etabliert, um in lebenden Zellen oxidativen Stress zu vermitteln. Es wurde untersucht, ob das La-Protein unter diesen Bedingungen in das Zytoplasma gelangt und ob es dabei proteolytisch gespalten wird.

Transfizierte HeLa-Zellen, die GFP-La-Fusionsproteine enthielten, wurden für 20 min mit 2% (v/v) H₂O₂ behandelt und anschließend fixiert. Ein Teil des GFP-hLa-Proteins war nach der Oxidation im Zytoplasma detektierbar, während in den unbehandelten Zellen nur der Zellkern und die Nukleoli das Fusionsprotein enthielten (siehe Abbildung 32). Die Präparate wurden nach der Fixierung mit verschiedenen anti-La-mAks gefärbt. Die Daten für 312B, 5B9, 24BG7 und 7B6 sind in Abbildung 32 dargestellt. Das zytoplasmatische GFP-Fusionsprotein konnte mit allen Antikörpern detektiert werden. Entsprechend musste der N-Terminus mindestens ab AS 10 enthalten sein (siehe Epitopcharakterisierung für 312B in 4.1.4.5) und C-terminal war mindestens das 7B6-Epitop bis AS 328 vorhanden.

Alle Antikörper färbten unabhängig von der Behandlung mit Wasserstoffperoxid verstärkt die transfizierten Zellen, da in ihnen das jeweilige Epitop im Überschuss vorlag. Deshalb war die Lokalisation des endogenen hLa-Proteins nur als Hintergrundfärbung erkennbar. Doch auch für dieses sind nach der Oxidation zusätzliche zytoplasmatische Färbungen vorhanden (z. B. für 5B9 nach Oxidation in Abbildung 32).

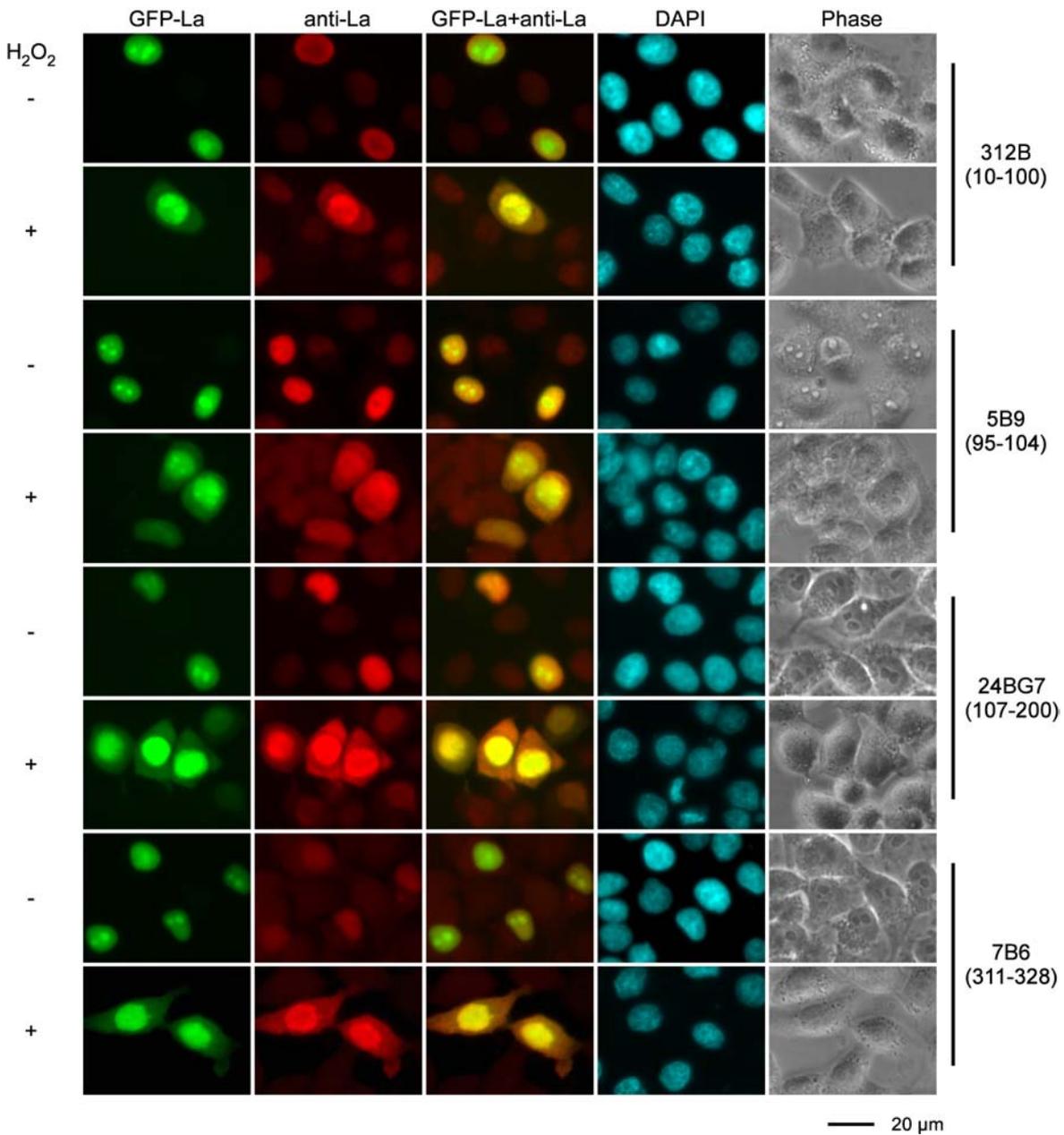


Abbildung 32: Lokalisation des GFP-hLa vor und nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid.

HeLa-Zellen wurden mit einem Plasmid transfiziert, das für GFP-hLa codiert. Am Folgetag wurde ein Teil der Zellen für 20 min mit 2% (v/v) H₂O₂ in DMEM^{pur} behandelt, die anderen Zellen blieben nur in DMEM^{pur}. Anschließend wurden alle Zellen mit PFA fixiert, permeabilisiert und mit 312B, 24BG7 oder 7B6 gefärbt. Um eine Bindung des oxidationsempfindlichen 312B-Antikörpers zu gewährleisten, wurde das entsprechende Präparat nach der Fixierung mit 2% (v/v) β-Mercaptoethanol in PBS behandelt. Für die 5B9-Färbung wurde zuvor mit MeOH/EGTA fixiert. Die Detektion erfolgte mit anti-Maus-IgG-Alexa Fluor[®]568. Die Zellkerne wurden mit DAPI visualisiert. Die Fluoreszenzkanäle sowie der Phasenkontrast wurden einzeln aufgenommen. Des Weiteren ist eine Überlagerung des roten und grünen Fluoreszenzkanals zu sehen. Für die Antikörper sind die jeweiligen Epitopregionen in Klammern angegeben.

Als Ursache für die Relokalisation des La-Proteins nach Wasserstoffperoxidbehandlung ist ebenfalls eine Abspaltung des NLS denkbar. Deshalb war der Bereich C-terminal des 7B6-Epitops von Interesse. Mit den vorhandenen GFP-La-Fragmenten wurden HeLa-Zellen transfiziert und diese der Oxidation mit 2% (v/v) H_2O_2 unterzogen. Abbildung 33A zeigt ein Schema der verwendeten Proteine und in Abbildung 33B sind die Fluoreszenzaufnahmen der unbehandelten und oxidierten Proben dargestellt. Wurden die Zellen nur in Medium gehalten, so zeigten die GFP-Fusionsproteine die typischen Kernlokalisationen. Das Protein GFP-La₃₁₈₋₄₀₈ war besonders stark in den Nukleoli vertreten, wo es auch nach Oxidation gehäuft zu beobachten war. Zusätzlich war ein Teil aller GFP-Fusionsproteine nach der Wasserstoffperoxidbehandlung im Zytoplasma zu sehen. Es war kein Unterschied zwischen den verschiedenen langen La-Fragmenten feststellbar, d. h. La₃₆₉₋₄₀₈ fusioniert an GFP ist für die Relokalisation ins Zytoplasma nach oxidativem Zellstress ausreichend. Die eventuelle Proteaseschnittstelle muss in diesem Protein noch enthalten sein, also C-terminal von AS 369 liegen, damit das N-terminale GFP abgespalten und in das Zytoplasma entlassen werden kann.

Des Weiteren wurden von allen Proben Totalextrakte hergestellt. Diese wurden im Western Blot mit anti-GFP auf ihr Molekulargewicht und eventuell auftretende Degradationsbanden untersucht (siehe Abbildung 33C). Alle Proteine konnten mit ihren erwarteten Molekulargewichten nachgewiesen werden, auch wenn durch die unterschiedlichen Transfektionseffizienzen verschieden starke Banden im Immunoblot resultierten. Bei den höher konzentrierten Proteinen waren auch schwache Abbaubanden vorhanden, deren Intensitäten aber nach der Oxidation nicht zunahmen.

Die paarweisen Proteinbanden ohne und mit H_2O_2 -Behandlung wiesen ein unterschiedliches Laufverhalten auf. Durch das 12%ige SDS-Gel wurde für GFP-La₁₉₄₋₄₀₈ im Bereich von 55-60 kDa eine besonders deutliche Auftrennung erzielt. Erstaunlicherweise wird die Hauptbande (+ H_2O_2) nicht kleiner, wie bei einer NLS-Abspaltung erwartet, sondern läuft über der Bande der unbehandelten Zellen (- H_2O_2). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das Protein durch die Oxidation quantitativ post-translational verändert wird und sich dadurch das Laufverhalten in der SDS-PAGE verändert. Möglich wäre eine Dephosphorylierung, wie sie bereits für hLa beschrieben worden ist [141].

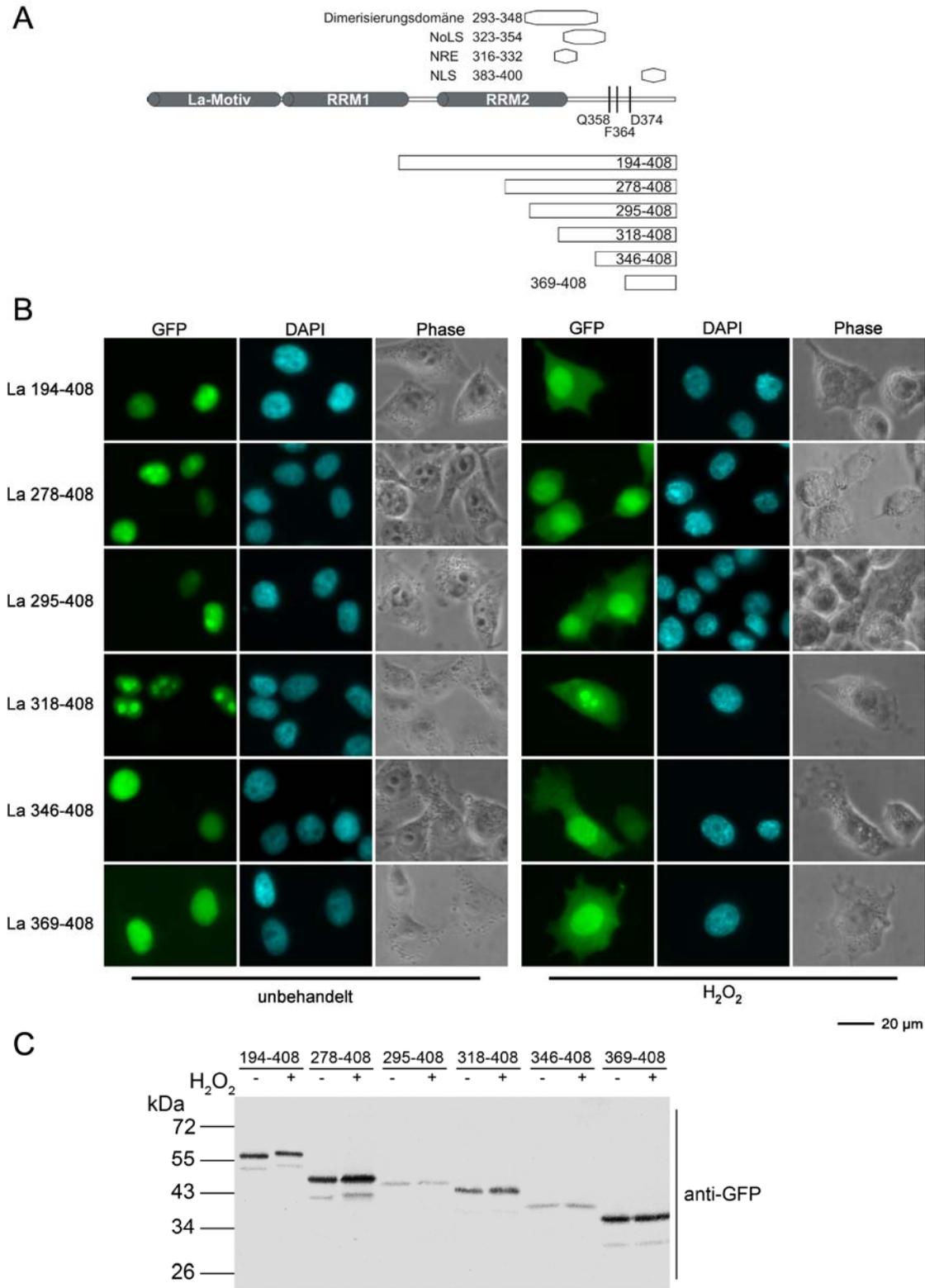


Abbildung 33: Zytoplasmatische Lokalisation der GFP-La-Fragmente nach Oxidation.

A) Schema der verwendeten N-terminal deletierten GFP-La-Fusionsproteine. Außerdem sind die funktionellen Domänen des Proteins und die beschriebenen Proteaseschnittstellen gekennzeichnet. **B)** Die GFP-La-Fragmente wurden in HeLa-Zellen transfiziert und am nächsten Tag für 20 min 2% (v/v) H₂O₂ in DMEM^{pur} ausgesetzt. Die Kontrollen blieben unbehandelt. Nach PFA-Fixierung und DAPI-Färbung wurde die intrazelluläre Lokalisation der GFP-Fusionsproteine mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. **C)** Nach Auftrag der Totalextrakte auf ein 12%iges SDS-Gel wurden das Molekulargewicht der Proteine und eventuelle Degradationsbanden im Westen Blot mit anti-GFP und anti-Maus-IgG-AP untersucht.

Da nach der Oxidation nur ein Teil des GFP-Fusionsproteins im Zytoplasma vorlag und die größere Menge immer noch im Kern zu sein schien (Vergleich der GFP-Intensitäten in den Abbildungen 32 und 33), konnten die erwarteten Degradationsbanden eventuell nicht im Western Blot (Abbildung 33C) detektiert werden, weil die Mengen zu gering waren. Deshalb wurde das hLa-Volllängeprotein zur weiteren Analyse mit einem Hexahistidintag und mit GFP versehen, die abwechselnd am N- oder C-Terminus fusioniert waren (siehe Schema in Abbildung 34B). Beide Proteine waren nach Transfektion im Zellkern von HeLa-Zellen zu finden (siehe a und g in Abbildung 34A). Nach der Wasserstoffperoxidbehandlung lag das GFP-Fusionsprotein in beiden Fällen auch im Zytoplasma vor (d bzw. j). Dies ist für His-La-GFP nur möglich, wenn das ungespaltene La-Protein in das Zytoplasma relokalisiert wird. Bei Abspaltung des NLS würde NLS-GFP im Zellkern verbleiben.

Im Immunoblot wiesen beide Proteine das erwartete Molekulargewicht von etwa 80 kDa auf (Abbildung 34C). Nach Oxidation war diese gesamte Bande wiederum in Richtung eines höheren Molekulargewichtes verschoben. Das endogene hLa-Protein der HeLa-Zellen bei etwa 50 kDa wies das gleiche Laufverhalten auf. Zusätzlich konnten mit SW5 und anti-GFP verstärkt Banden von kleineren Proteinen nachgewiesen werden. Für die beiden Konstrukte wurden Degradationsbanden unterschiedlicher Molekulargewichte erwartet, wenn das NLS nach Oxidation vom übrigen La-Protein abgespalten werden würde.

Für His-La-GFP wurde nach Entfernung des NLS-GFPs ein mit SW5 detektierbares Protein erwartet, das kleiner als das endogene La-Protein ist. Stattdessen trat nach H₂O₂-Behandlung für His-La-GFP eine zusätzliche Bande bei etwa 60 kDa im Immunoblot auf. Im zweiten Konstrukt GFP-La-His würde nach der Oxidation zusammen mit dem NLS nur der kurze Hexahistidintag abgespalten. Dies würde in einer deutlichen Zunahme der Bande bei etwa 75 kDa resultieren, welche mit beiden Antikörpern detektiert werden könnte. Dies war auch der Fall, jedoch blieb das endogene La-Protein unverändert, obwohl das NLS hier ebenso abgespalten werden sollte wie im GFP-Fusionsprotein.

Diese mit beiden Proteinformaten erzielten Ergebnisse weisen eher auf eine Proteolyse innerhalb des GFP-Proteins hin. Ähnliche Degradationsbanden wurden bereits für die GFP-La-Fragmente in den vorangegangenen Kapiteln beobachtet. Wird das GFP-Protein nahe seines N-Terminus gespalten (siehe ▼ im Schema der Abbildung 34B), so entsteht für His-La-GFP eine Degradationsbande (etwa 60 kDa), welche größer als das endogene La-Protein ist. Für GFP-La-His resultiert eine Doppelbande bei etwa 75 kDa. Dennoch muss die beobachtete zytoplasmatische GFP-Fluoreszenz auf die Translokation des La-Proteins zurückzuführen sein und kann nicht allein von proteolytisch gespaltenem GFP-Protein verursacht werden. Selbst wenn das größere Bruchstück des GFP-Proteins noch in der Lage wäre, zu fluoreszieren und ins Zytoplasma zu diffundieren, so würde das verkürzte GFP-La-His mit dem enthaltenden NLS nur im Zellkern lokalisiert sein. Der Hexahistidintag konnte nicht für die Detektion herangezogen werden, da die Reaktivität des anti-His-Antikörpers nach Wasserstoffperoxidbehandlung der Zellen verloren gegangen war.

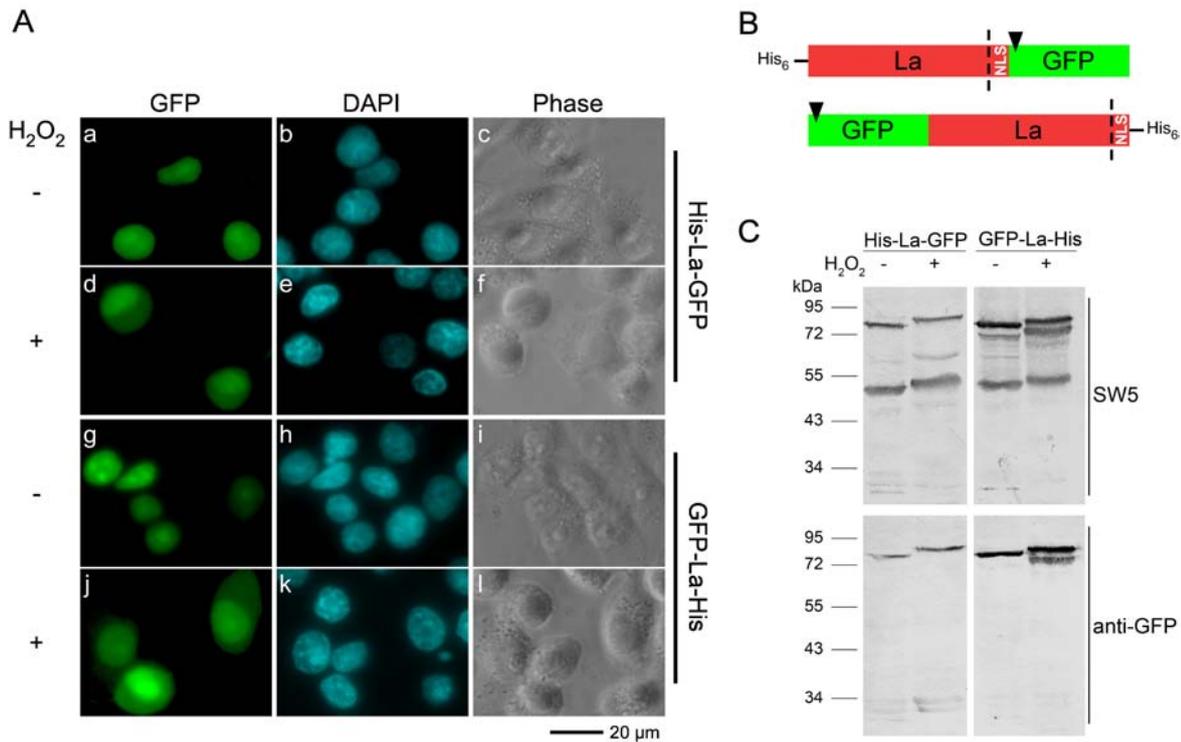


Abbildung 34: Analyse der NLS-Abspaltung von His-La-GFP und GFP-La-His durch H₂O₂.

A) Fluoreszenzaufnahmen von HeLa-Zellen zur intrazellulären Lokalisation der beiden Proteine vor und nach Oxidation. **B)** Schema der beiden verwendeten Proteine. His-La-GFP enthält N-terminal einen Hexahistidintag und C-terminal GFP. Bei GFP-La-His ist es genau umgekehrt. Würde nun durch die Oxidation das NLS abgespalten (siehe ----), so würden unterschiedlich große Bruchstücke entstehen, die mit anti-GFP und SW5 im Western Blot nachgewiesen werden könnten. ▼ markiert die vermutete Proteolysestelle innerhalb des GFP-Proteins. **C)** Analyse der Totalextrakte im Immunoblot mit SW5 oder anti-GFP. Die Detektion wurde mit anti-Maus-IgG-AP vorgenommen.

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass sich nach 20-minütiger Wasserstoffperoxidbehandlung ein Teil des GFP-La-Proteins im Zytoplasma der Zellen befindet. Dieser Effekt tritt auch bei den N-terminal deletierten Proteinen bis hin zu GFP-La₃₆₉₋₄₀₈ auf. Durch die Analyse der unterschiedlichen Proteinfraktionen in der Immunfluoreszenz und im Western Blot konnte geschlossen werden, dass es sich bei den zytoplasmatischen Proteinen um Volllängeproteine handeln muss. Das NLS wird nach Wasserstoffperoxidbehandlung wider Erwarten nicht vom La-Protein abgespalten. Darüber hinaus wird das gesamte Protein post-translational (de-)modifiziert, denn das Laufverhalten der Proteinbanden im Western Blot wird hin zu höheren Molekulargewichten verändert.

4.3. Untersuchung des Shuttlingverhaltens von hLa und mLa

Das La-Protein verlässt den Zellkern nicht nur unter zellulären Stressbedingungen, sondern pendelt auch unter normalen physiologischen Bedingungen zwischen Kern und Zytoplasma der Zellen. Dieser Vorgang wird als Shuttlingprozess bezeichnet. Die Verweildauer des Proteins im Zytoplasma ist zu kurz, um es dort detektieren zu können. Deshalb werden zum Nachweis des Shuttlings sogenannte Heterokaryons hergestellt [173].

Mit dieser Technik wurde das Shuttling von endogenem hLa in der Literatur bereits gezeigt und als unabhängig vom klassischen nukleären Exporter Crm1 beschrieben [132]. Crm1 wird von LMB spezifisch gehemmt und hLa konnte in Anwesenheit und Abwesenheit des LMB zwischen den Kernen pendeln. Im Gegensatz dazu wurde für hLa, dem das NRE fehlte, ein Crm1-abhängiger Kernexport in Hefezellen beobachtet [116]. Im Folgenden wurden Heterokaryonexperimente für GFP-hLa und die La-Fragmente etabliert, um den Einfluss von LMB erneut zu überprüfen sowie die Proteindomänen einzugrenzen, welche für den Shuttlingprozess von Bedeutung sind.

4.3.1. Prinzip der Heterokaryonexperimente

Humane HeLa-Zellen wurden dünn ausgesät und mit Plasmiden transfiziert, die für GFP-La oder GFP-La-Fragmente codierten. Am Folgetag wurden Maus-3T3-Zellen hinzugefügt, welche in wenigen Stunden adhärirten. Anschließend wurden die Zellmembranen der HeLa-Zellen und 3T3-Zellen durch PEG miteinander fusioniert und es entstanden sogenannte Heterokaryons. Zur Blockierung der *de novo* Proteinbiosynthese wurde dem Kulturmedium bereits 30 min vor der Fusion Cycloheximid hinzugefügt. Vier Stunden später wurden die Zellen fixiert und zur Unterscheidung der Kerne wurden diese mit DAPI gefärbt (siehe Schema in Abbildung 35).

Wenn das GFP-La-Protein zwischen Kern und Zytoplasma pendelt („shuttelt“), so verlässt es den humanen Zellkern und wird anschließend entweder in den ursprünglichen Kern zurücktransportiert oder es gelangt in einen daneben gelegenen humanen oder murinen Kern innerhalb des Heterokaryons. Dies kann durch Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. In den Nachbarkernen ist GFP-La meist in geringeren Mengen vorhanden als in dem Kern der ursprünglich transfizierten Zelle. Ist dieser weniger GFP-La-enthaltende Kern ein Mauskerne, so muss das GFP-La aus dem Kern einer transfizierten humanen Zelle in diesen Mauskerne „geschuttelt“ sein. Die Mauskerne werden durch eine hell gepunktete DAPI-Färbung von den homogen gefärbten humanen Kernen unterschieden [159]. Durch Zugabe von Cycloheximid wird die Produktion neuer GFP-La-Moleküle verhindert, welche sofort nach der Translation direkt in die murinen Zellkerne gelangen und so die Ergebnisse verfälschen könnten.

Die entstandenen Heterokaryons können je nach Zelldichte in der Kulturschale entweder nur zwei Zellkerne enthalten, oder es entstehen Riesenzellen mit vielen Kernen. Das Verhältnis zwischen humanen und murinen Kernen ist von der Anzahl der jeweils ausgesäten Zellen abhängig. Alternativ kann auf eine Transfektion verzichtet werden und in der Immunfluoreszenz wird nach der Fixierung das endogene hLa-Protein, welches in die Mauskerne „geschuttelt“ ist, spezifisch mit z. B. dem anti-hLa mAk SW5 angefärbt.

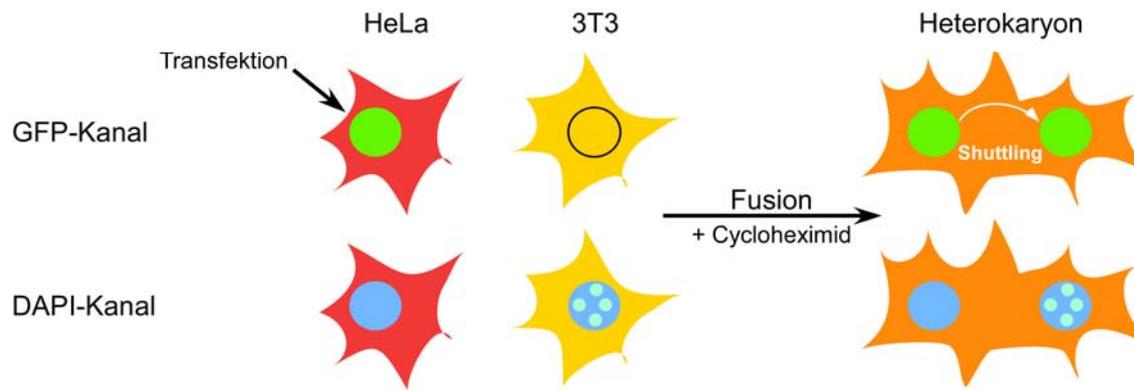


Abbildung 35: Herstellung eines Heterokaryons und Detektion des Shuttlings von GFP-La.

Humane HeLa-Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die für GFP-La (-Fragmente) codieren und danach mit Maus-3T3-Zellen fusioniert. Die entstandenen Heterokaryons enthielten humane und murine Zellkerne, welche durch DAPI-Färbung voneinander unterschieden werden konnten. Wenn die Mauszellkerne auch GFP-La enthielten, so war das Protein aus dem humanen Zellkern in das Zytoplasma und dann zufällig in den Mauskern anstatt in den Ursprungskern „geschuttelt“. Durch Zugabe von Cycloheximid wurde die *de novo* Proteinbiosynthese inhibiert.

4.3.2. Etablierung der Shuttlingexperimente für GFP-hLa

Zuerst wurde, dem publizierten Protokoll folgend [132], das Shuttling von endogenem hLa-Protein in einem Gemisch aus HeLa-Zellen und 3T3-Zellen nachgewiesen. Vier Stunden nach der Fusion wurden die Heterokaryons mit PFA fixiert und mit Triton X-100 permeabilisiert. Anschließend wurde das hLa mit SW5 und anti-Maus-IgG-Alexa Fluor®568 nachgewiesen. Die Fixierung mit PFA war von entscheidender Bedeutung, da nach der MeOH/EGTA-Fixierung die SW5-Färbung nicht sensitiv genug war, um die geringeren Mengen des hLa-Proteins in den Mauskernen zu detektieren. Zuletzt wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt. In Abbildung 36A ist ein Beispiel dargestellt. Es wurden zwei humane Zellen mit zwei Mauszellen fusioniert. Die Mauskerne zeigen das typische DAPI-Muster mit hellen Punkten (b). Entsprechend sind die humanen Kerne sehr stark mit SW5 angefärbt und mussten etwas stärker belichtet werden, damit auch die geringere Menge an hLa-Protein, welche in die Mauskerne gewandert war, detektiert werden konnte (c).

In einem weiteren Experiment wurden die HeLa-Zellen wie in 4.3.1 beschrieben mit GFP-hLa transfiziert und am Folgetag mit 3T3-Zellen fusioniert. Im oberen Beispiel der Abbildung 36B (a-c) bestand der Heterokaryon aus zwei humanen Kernen und einem Mauskern. Die beiden humanen Kerne enthielten beide GFP-hLa und könnten eventuell durch Teilung einer transfizierten Zelle entstanden sein. Ein Teil des GFP-hLa war im Mauskern zu sehen (c). Ein weiterer Mauskern in der Nachbarschaft (links unten in a und b) blieb unfusioniert und enthielt deshalb auch kein GFP-hLa.

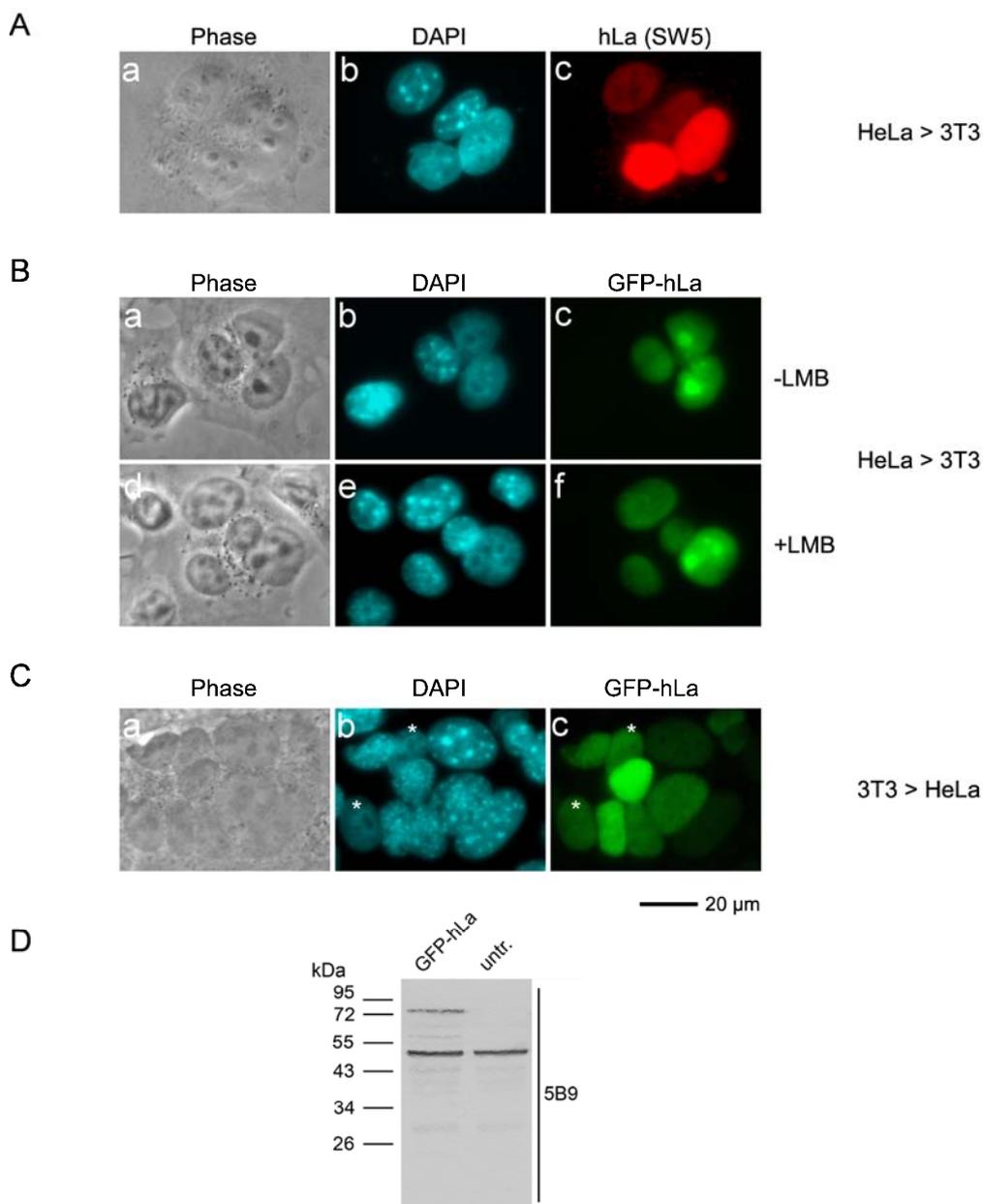


Abbildung 36: Shuttlingstudien für endogenes hLa und GFP-hLa.

A) HeLa- und 3T3-Zellen wurden in Gegenwart von PEG miteinander fusioniert und in Cycloheximid-haltiges Medium überführt. Vier Stunden nach der Fusion wurden die Zellen mit PFA-Lösung fixiert, permeabilisiert und mit SW5 gefärbt. Die Detektion erfolgte mit anti-Maus-IgG-Alexa Fluor[®]568. Nach der DAPI-Färbung wurden Immunfluoreszenzaufnahmen angefertigt. **B)** HeLa-Zellen wurden mit GFP-hLa transfiziert und am nächsten Tag mit 3T3-Zellen fusioniert. Das Shuttling fand für 4 h in Anwesenheit von 100 μ g/ml Cycloheximid statt. Durch Zugabe von 30 ng/ml LMB (in d-f) wurde der Kernexporter Crm1 blockiert. Nach PFA-Fixierung und Permeabilisierung mit Triton X-100-Lösung wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt. **C)** 3T3-Zellen wurden mit einem Plasmid transfiziert, das für GFP-hLa codiert und am nächsten Tag in Anwesenheit von 100 μ g/ml Cycloheximid mit HeLa-Zellen fusioniert. Nach 4 h wurden die Präparate fixiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Die humanen Kerne sind mit (*) markiert. **D)** Zur Kontrolle des GFP-hLa-Konstrukts wurde ein Western Blot mit Totalextrakten untransfizierter und mit GFP-hLa-transfizierter Zellen mit 5B9 und anti-Maus-IgG-AP entwickelt.

Parallel wurden den Zellen zusammen mit dem Cycloheximid 30 ng/ml LMB hinzugefügt, um den nukleären Exportweg über Crm1 zu blockieren. Das Shuttlingverhalten von GFP-hLa wurde dadurch nicht beeinflusst (Abbildung 36B d-f). Im dargestellten Beispiel wurde eine transfizierte humane Zelle mit drei Mauszellen fusioniert und auch diese drei Kerne enthielten GFP-hLa. Der Bildausschnitt zeigt außerdem drei weitere Zellen (d und e), welche nicht dem Heterokaryon angehörten und deshalb auch kein GFP-hLa aufwiesen.

Zusätzlich wurde das Shuttling in umgekehrter Richtung analysiert. Maus-3T3-Zellen wurden mit GFP-hLa transfiziert und nach Fusion mit HeLa-Zellen konnte das GFP-hLa in den untransfizierten humanen Zellkernen beobachtet werden. In Abbildung 36C ist ein Beispiel zu sehen. Die humanen Zellkerne (*) enthielten deutliche Mengen an GFP-hLa. Zur Überprüfung des GFP-hLa-Fusionsproteins wurde außerdem ein Western Blot mit Totalextrakten der transfizierten Zellen hergestellt. Der mAk 5B9 zeigte eine Proteinbande mit den erwarteten etwa 80 kDa (Abbildung 36D). Außerdem wurde das endogene hLa-Protein bei etwa 50 kDa detektiert.

4.3.3. Shuttlingstudien für GFP-mLa

Da das hLa-Protein zwischen humanen und murinen Zellkernen pendeln kann und es keine Rolle spielt, ob die HeLa- oder 3T3-Zellen mit GFP-hLa transfiziert worden waren, wurden die gleichen Bedingungen auch für GFP-mLa untersucht. Entsprechend wurden HeLa- bzw. 3T3-Zellen mit einem Plasmid transfiziert, das für GFP-mLa codiert und danach wurden Fusionen mit den jeweils anderen Zellen in Gegenwart von Cycloheximid vorgenommen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 37A gezeigt. Auffällig war die Lokalisation des GFP-mLa, das in den humanen Kernen besonders stark in den Nukleoli angereichert wurde (c und g). Das Shuttling des GFP-mLa war wie erwartet in beide Richtungen möglich. Parallel wurde das endogene hLa-Protein mit SW5 detektiert (d und h). Auch dieses wanderte in die murinen Nachbarkerne. Das Molekulargewicht des GFP-mLa-Fusionsproteins wurde im Western Blot kontrolliert. Es konnte erfolgreich mit 5B9 bei etwa 80 kDa nachgewiesen werden (siehe Abbildung 37B).

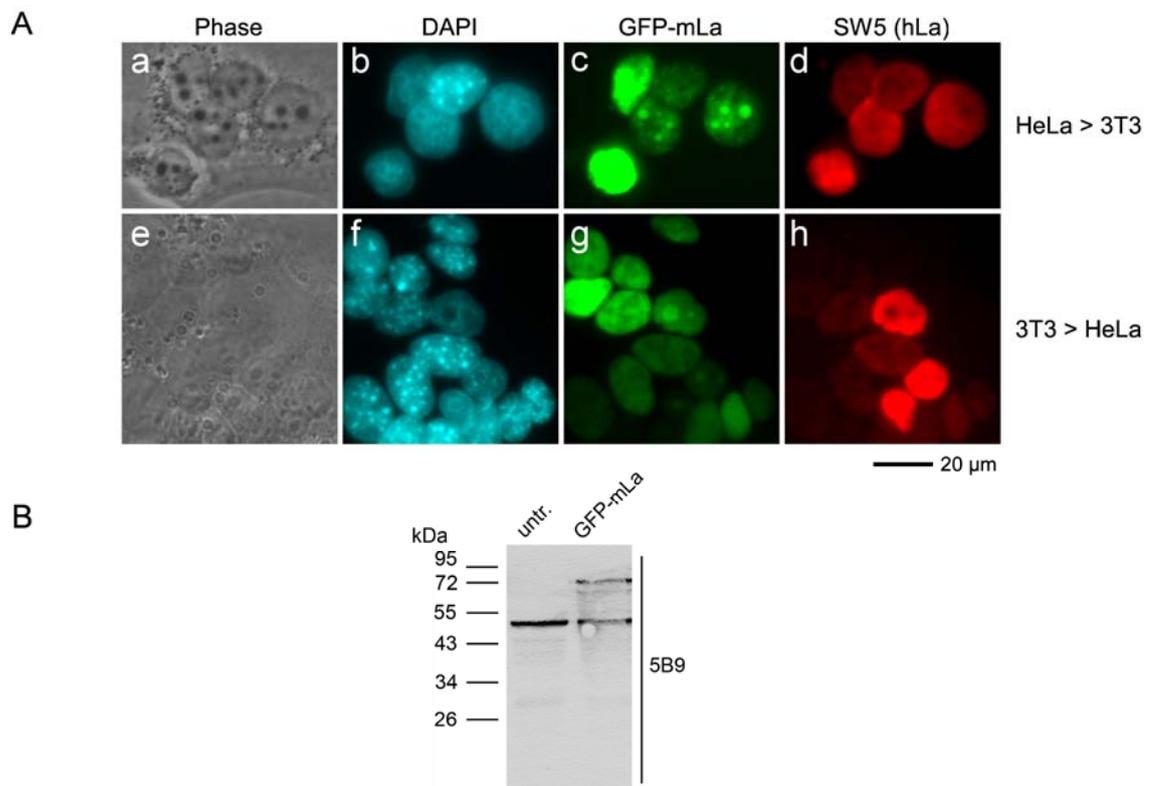


Abbildung 37: Shuttling des GFP-mLa von HeLa- zu 3T3-Zellkernen und umgekehrt.

A) Einerseits wurden HeLa-Zellen mit GFP-mLa transfiziert und in Gegenwart von 100 µg/ml Cycloheximid mit 3T3-Zellen fusioniert (a-d HeLa > 3T3). Andererseits wurden 3T3-Zellen mit mLa transfiziert und mit HeLa-Zellen fusioniert (e-h 3T3 > HeLa). Nach 4 h wurden die Zellen PFA-fixiert und permeabilisiert. Zusätzlich wurde das hLa mit SW5 und anti-Maus-IgG-Alexa Fluor[®]568 nachgewiesen. Die Kerne wurden mit DAPI gefärbt. **B)** Immunoblot mit Totalextrakten von untransfizierten und mit GFP-mLa-transfizierten HeLa-Zellen, der mit 5B9 und anti-Maus-IgG-AP entwickelt wurde.

4.3.4. Das NLS des hLa-Proteins vermittelt den Shuttlingprozess

Im Folgenden wurden die Domänen des La-Proteins eingegrenzt, die den Shuttlingprozess zwischen HeLa- zu 3T3-Zellkernen vermitteln. Es wurden die N-terminal deletierten GFP-hLa-Fragmente eingesetzt, welche das komplette C-terminal gelegene NLS enthielten, das für die Kernlokalisierung verantwortlich ist (siehe Schema in Abbildung 38A). Außerdem wurde das La₁₋₁₉₂-Protein untersucht, welches kein NLS enthält, und das La₃₆₉₋₃₉₇-Protein, welches ein unvollständiges NLS aufweist. Für alle Proteine wurden Totalextrakte der transfizierten Zellen im Western Blot mit anti-GFP inkubiert, um die Molekulargewichte der GFP-Fusionsproteine zu überprüfen (siehe Abbildung 38B). Die sukzessive kürzer werdenden Proteine zeigten erwartungsgemäß ein entsprechend schnelleres Laufverhalten in der SDS-PAGE.

Die Immunfluoreszenzaufnahmen für die einzelnen GFP-La-Fragmente sind in Abbildung 39 zu sehen. Ohne das NLS des hLa-Proteins war GFP-La₁₋₁₉₂ sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert (c). Die intrazelluläre Verteilung entspricht der des reinen GFP-Proteins, welches durch sein eigenes NLS auch partiell im Zellkern vorliegt. Durch die zytoplasmatische Lokalisation des Proteins wird die Größe des Heterokaryons gut verdeutlicht.

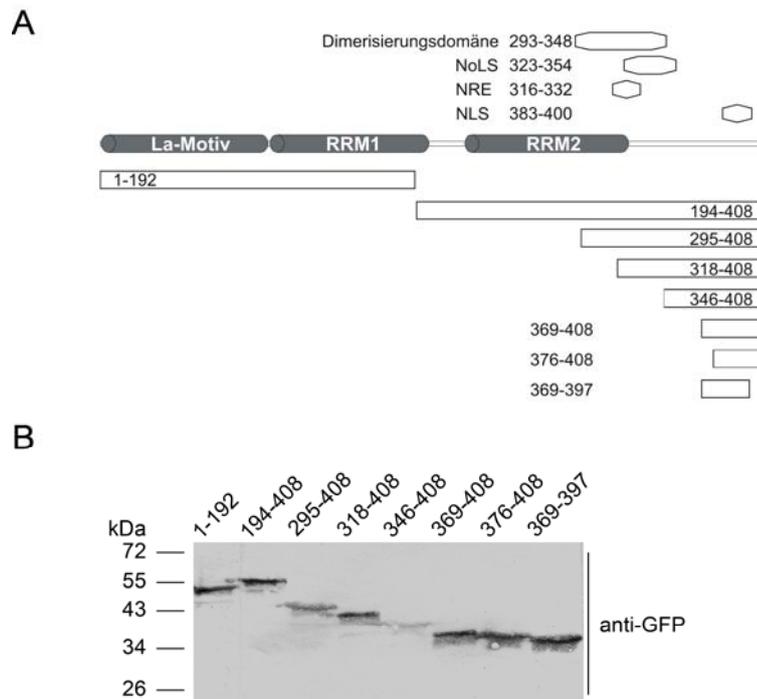


Abbildung 38: Schema und Western Blot der La-Fragmente, deren Shuttling untersucht wurde.

A) Schema der verwendeten La-Fragmente und der funktionellen Domänen des Proteins. **B)** Die Totalextrakte der transfizierten Zellen wurden außerdem einem Western Blot unterzogen, um die Molekulargewichte der rekombinanten Proteine zu überprüfen. Die Detektion erfolgte mit anti-GFP und anti-Maus-IgG-AP.

Im Gegensatz dazu befand sich die C-terminale Hälfte des hLa-Proteins (La₁₉₄₋₄₀₈) komplett im Nukleus. Nach Deletion des La-Motivs und der RRM1-Domäne konnte dieses Protein ebenso zu den im Heterokaryon befindlichen Mausekernen wandern (e und f) wie es das Volllängeprotein vermag (siehe Abbildung 36). Auch das nächst kürzere Fragment GFP-La₂₉₅₋₄₀₈, dem ein Großteil der RRM2-Domäne fehlt, war in den fusionierten Mausekernen zu beobachten (h und i). Für die Proteine GFP-La₁₉₄₋₄₀₈ und GFP-La₂₉₅₋₄₀₈, das GFP-hLa als auch das GFP-mLa (Abbildung 37) war ein deutlicher Gradient in der GFP-Fluoreszenz zwischen den ursprünglich transfizierten Zellkernen und den Kernen, die das Protein durch den Shuttlingprozess erlangt hatten, erkennbar. Letztere waren im GFP-Kanal wesentlich schwieriger zu detektieren und dokumentieren.

Anders verhielt es sich ab dem Protein GFP-La₃₁₈₋₄₀₈ und allen kürzeren Fragmenten. Sobald das NRE (AS 316-332) nicht mehr komplett enthalten war, schien dieser typische GFP-La-Gradient zu verschwinden und die GFP-La-Deletionsproteine waren nahezu homogen in allen Kernen des Heterokaryons verteilt (siehe l, o, r, u). Dazu kam die verstärkte Ansammlung der GFP-Fusionsproteine La₂₉₅₋₄₀₈ sowie La₃₁₈₋₄₀₈ in den Nukleoli. Durch die starke Fluoreszenz der Kernkörperchen (l) war die homogene Verteilung im Nukleoplasma aller Kerne nur schwer darstellbar.

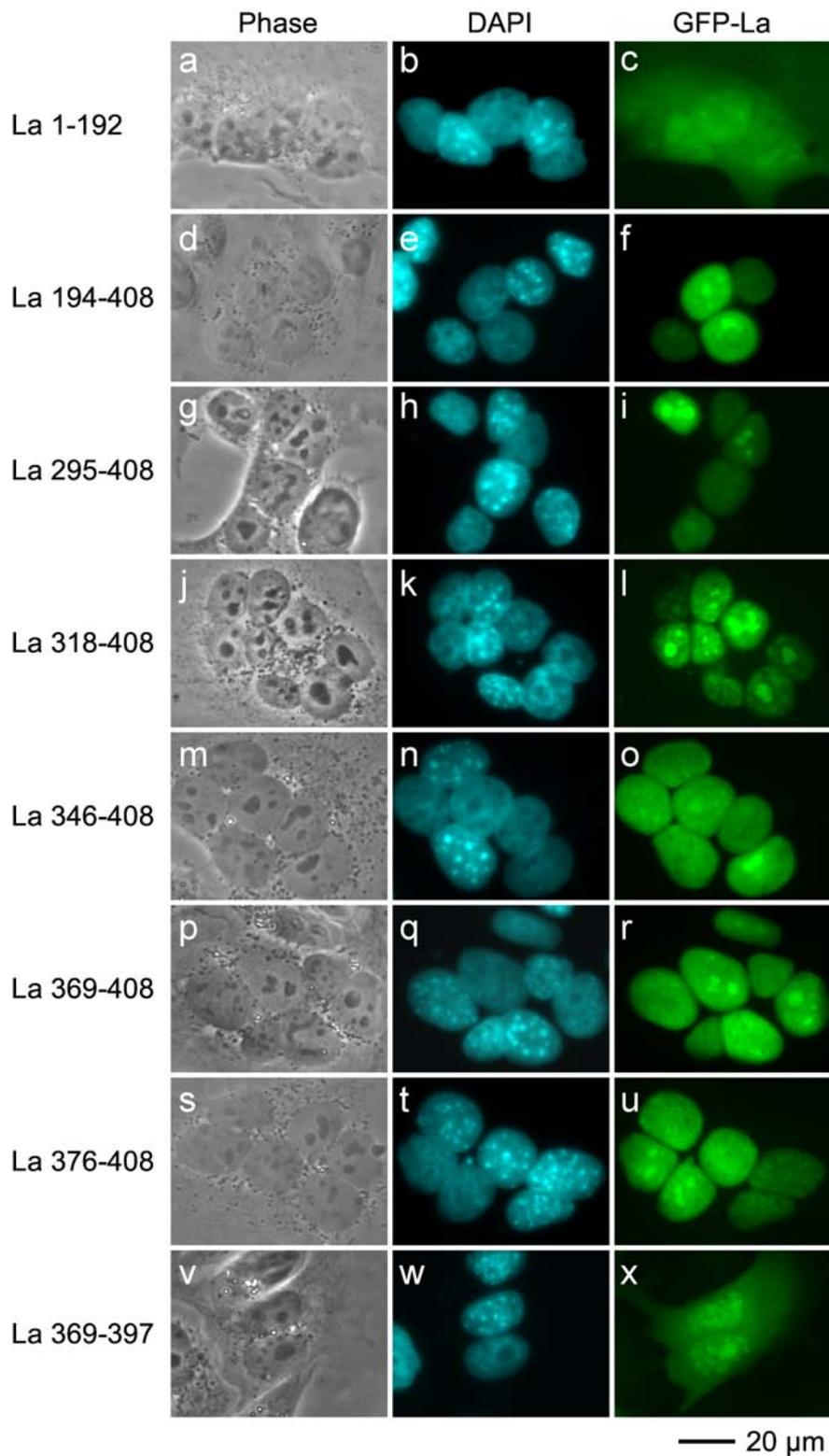


Abbildung 39: Shuttling der GFP-La-Fragmente von HeLa- zu 3T3-Zellkernen.

HeLa-Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, welche für die verschiedenen GFP-La-Fragmente codierten. Nach 18 h wurden Maus-3T3-Zellen zugegeben, die nach weiteren 3 h adhären waren. Die Zellen wurden miteinander fusioniert und es wurde 100 µg/ml Cycloheximid hinzugefügt. Nach 4 h wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit DAPI inkubiert.

4. Ergebnisse

Nichtsdestotrotz konnte selbst das kürzeste Fragment GFP-La₃₇₆₋₄₀₈, das fast nur aus dem NLS besteht, in die Nachbarkerne gelangen. So konnte mit Hilfe der GFP-La-Fragmente gezeigt werden, dass das NLS des hLa-Proteins ausreichend ist, um den Shuttlingprozess des GFP-Fusionsproteins in die benachbarten Mauskerne zu vermitteln. Es handelt sich dabei um keinen reinen Diffusionsprozess durch die Kernmembran, der für Proteine dieser Molekulargewichte (30-40 kDa) ungehindert möglich wäre [174], da die Proteine ausschließlich im Zellkern lokalisiert sind. Bei einer Diffusion wären die GFP-Fusionsproteine homogen im gesamten Heterokaryon verteilt. Dies ist anhand des unvollständigen NLS des Proteins GFP-La₃₆₉₋₃₉₇ zu sehen. Das GFP-Fusionsprotein wird unvollständig in den Zellkern importiert und ist gleichermaßen im Zytoplasma lokalisiert (x).

Zusätzlich sind die Shuttlingstudien für einige GFP-La-Fragmente in Gegenwart von LMB durchgeführt worden (Abbildung 40). Auch unabhängig vom Kernexporter Crm1 wurden die GFP-Fusionsproteine in die untransfizierten benachbarten Zellkerne transportiert. Entsprechend sind die Proteine mit enthaltenem NRE (c und f) weniger homogen im Heterokaryon verteilt als die GFP-Fusionsproteine ohne NRE (i und l). Es konnte kein Einfluss von LMB auf das Shuttlingverhalten der verwendeten GFP-La-Fragmente beobachtet werden.

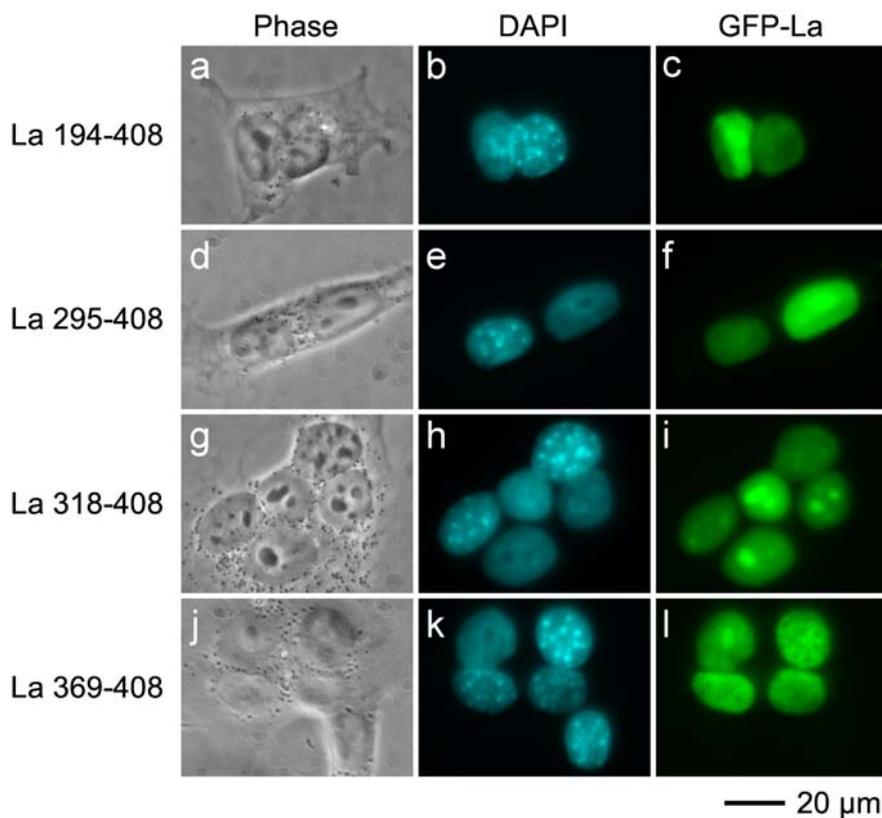


Abbildung 40: Shuttlingstudien für die GFP-La-Fragmente in Gegenwart von LMB.

Transfizierte HeLa-Zellen, die die GFP-La-Fusionsproteine produzierten, wurden mit 3T3-Zellen fusioniert und das Shuttling konnte für 4 h in Gegenwart von 100 µg/ml Cycloheximid und 30 ng/ml LMB stattfinden. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die Zellkerne mit DAPI angefärbt.

4.3.5. Das La-Protein gelangt während des Shuttlingprozesses nicht an die Zelloberfläche

Frühere Daten der Arbeitsgruppe zeigten das Shuttling des La-Proteins ins Zytoplasma und bis auf die Zellmembran [135], doch die bisherigen Heterokaryonexperimente konnten die GFP-Fusionsproteine nur im Zellkern detektieren. Die Aufenthaltsdauer außerhalb des Zellkerns scheint zu kurz zu sein, um ausreichende Proteinmengen beobachten zu können. Durch die Zugabe des anti-La-Antikörpers 5B9 in das Zellkulturmedium wurde überprüft, ob das Protein während seines Shuttlings auch die Zellmembran passiert und durch den Antikörper auf der Zelloberfläche angereichert werden kann. So wurden die Zellen 4 h nach der Fusion lebend auf Eis mit einem Sekundärantikörper gefärbt, der den eventuell auf der Zelloberfläche gebundenen mAk 5B9 detektieren sollte. Weder in den Kontrollen ohne 5B9 noch bei den Zellen, welchen der mAk hinzugefügt worden war, wurde der Antikörper auf der Zelloberfläche gebunden. Auch das GFP-hLa-Protein war im GFP-Kanal ausschließlich in den Zellkernen zu beobachten. Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass das La-Protein unter normalen Bedingungen zwischen Zellkern und Zytoplasma pendelt, wobei die Verweildauer im Zytoplasma sehr kurz ist. Das Protein gelangt nicht zur Zelloberfläche, auf der es sonst mit einem anti-La-Antikörper detektiert worden wäre (siehe nächstes Kapitel).

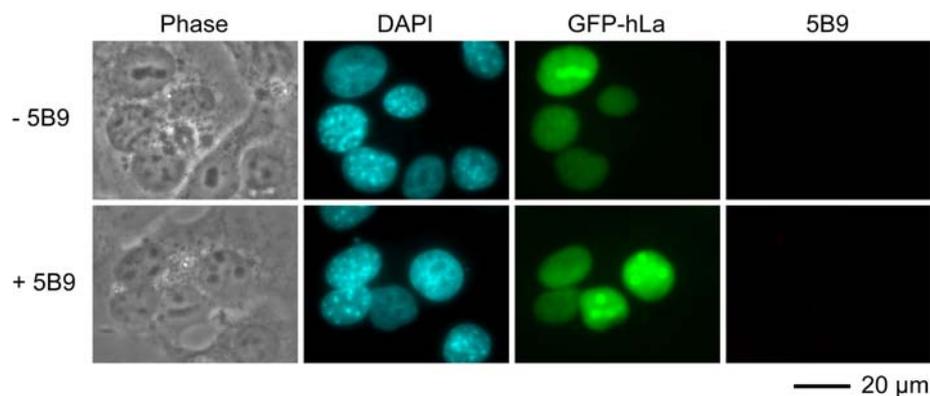


Abbildung 41: Heterokaryonexperiment für GFP-hLa in Gegenwart des mAks 5B9 im Medium.

HeLa-Zellen wurden transfiziert, um GFP-hLa zu produzieren. Am Folgetag wurden sie mit 3T3-Zellen fusioniert. Das Shuttling erfolgte für 4 h in Gegenwart von 100 µg/ml Cycloheximid und 5B9-Hybridomaüberstand. Anschließend wurden die Zellen lebend auf Eis mit anti-Maus-IgG-Alexa Fluor[®]568 behandelt, bevor sie mit PFA fixiert, mit Triton X-100 permeabilisiert und mit DAPI gefärbt wurden. Zur Kontrolle wurden Zellen ohne 5B9-Antikörper im Medium inkubiert.

4.4. Freisetzung des hLa-Proteins von apoptotischen Zellen und Bindung auf der Membran der Nachbarzellen

Bisher wurde das La-Protein zwar auf der Membran apoptotischer Zellen oder in „apoptotischen Blebs“ nachgewiesen, doch es wurde nie untersucht, ob es auch in die Umgebung abgegeben wird und auf der Oberfläche von Nachbarzellen bindet. Dies geschah im folgenden Experiment (siehe Schema in Abbildung 42A). In adhärennten humanen HeLa-Zellen wurde durch UV-Bestrahlung Apoptose induziert. Anschließend wurden zu diesen Zellen unbestrahlte Maus-A9-Zellen hinzugefügt. Nach 48 h Kokultur konnte im Mikroskop folgendes beobachtet werden: Auf den adhärennten murinen A9-Zellen (typische Morphologie mit „Füßchen“) lagen viele apoptotische HeLa-Zelltrümmer (siehe Abbildung 42B). Hingegen waren bei den unbestrahlten Kontrollen die Kulturschalen komplett dicht bewachsen und nur einzelne mitotische Zellen lagen auf dem Zellrasen bestehend aus HeLa- und A9-Zellen.

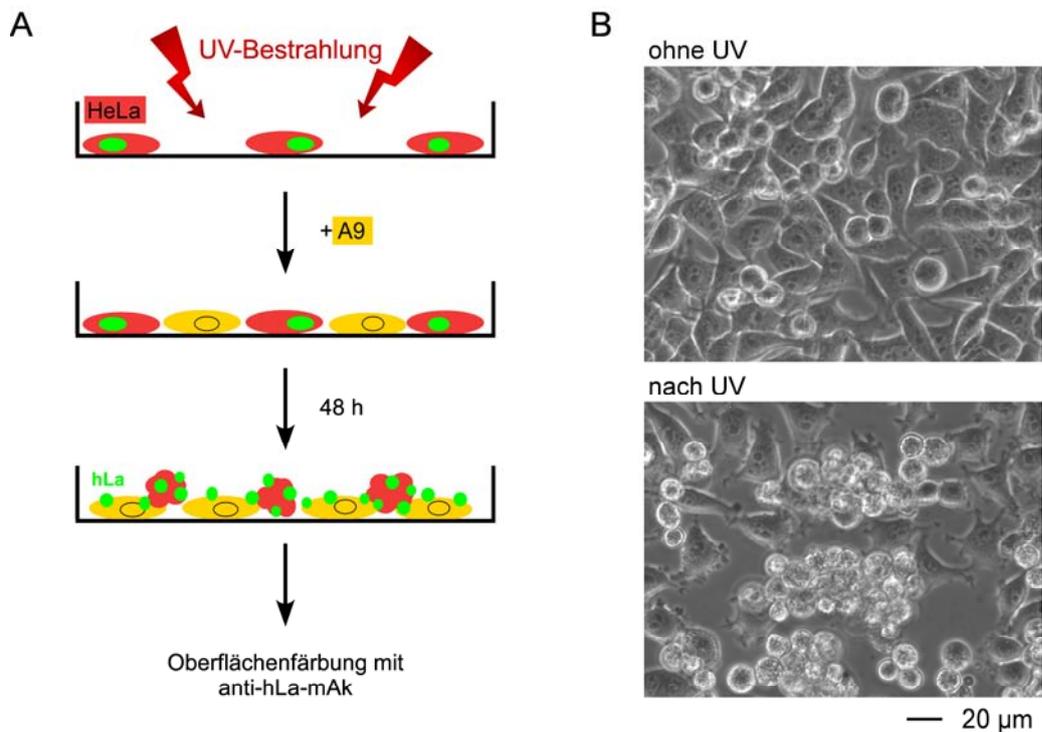


Abbildung 42: Kokultur apoptotischer HeLa-Zellen mit Maus-A9-Zellen.

A) Schema zum Ablauf des Experiments. Nach UV-Bestrahlung (1000 mJ/m^2) humaner HeLa-Zellen wurden Maus-A9-Zellen Kulturschalen hinzugefügt. Nach 48 h waren adhärennte Maus-A9-Zellen zu beobachten, auf denen sich Zelltrümmer der apoptotischen HeLa-Zellen befanden. Auf der Zellmembran der A9-Zellen sollte das hLa-Protein nachgewiesen werden. **B)** Phasenkontrastaufnahmen der kokultivierten Zellen vor der Immunfluoreszenzfärbung. Ohne UV-Bestrahlung waren beide Zelllinien adhärennt gewachsen und es waren keine toten Zellen sichtbar. Die bestrahlten HeLa-Zellen lagen als Zelltrümmer auf den Maus-A9-Zellen.

Die Freisetzung des hLa-Proteins aus HeLa-Zellen wurde durch Oberflächenfärbungen der unfixierten Zellen untersucht. Durch die verschiedenen Waschschrirte während der Immunfluoreszenzfärbung wurden auch die apoptotischen, abgelösten Zelltrümmer entfernt und nur die lebenden, adhärennten Zellen verblieben in der Kulturschale. Nach der Membranfärbung

wurden die Zellen mit PFA fixiert, permeabilisiert und die Zellkerne mit DAPI angefärbt. Dies diente, wie bereits in Kapitel 4.3 eingeführt, der Unterscheidung zwischen humanen und murinen Zellen. Abbildung 43 zeigt Immunfluoreszenzaufnahmen mit SW5 und 7B6. Beide Antikörper waren tatsächlich in der Lage, das hLa-Protein auf den Maus-Zellen zu detektieren. Der Sekundärantikörper allein erzeugte keine Färbung. Durch die DAPI-Färbungen wurde bestätigt, dass es sich um Maus-Zellen handelte. Da beide mAks kein mL_a erkennen können (siehe Kapitel 4.1.3), muss es sich um hLa-Protein handeln, das von den apoptotischen HeLa-Zellen abgegeben wurde und auf den Membranen der A9-Zellen gebunden hat.

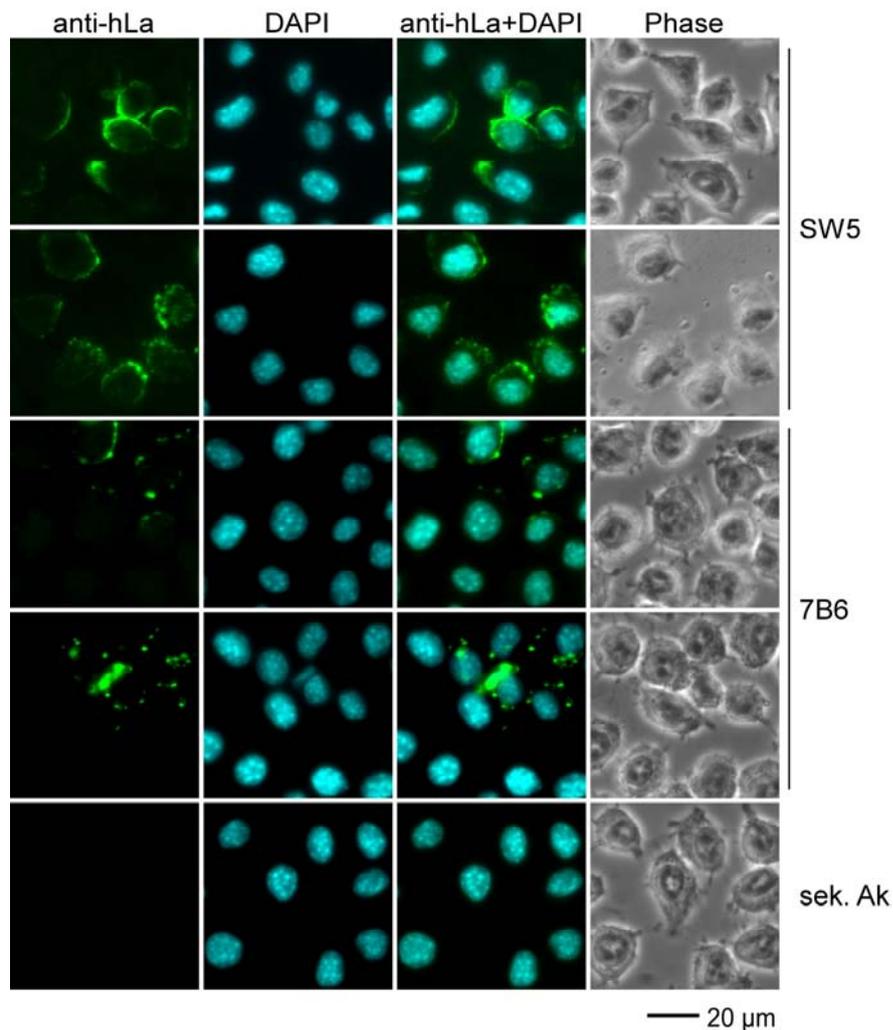


Abbildung 43: Nachweis des freigesetzten hLa-Proteins auf Maus-A9-Zellen.

Nach 48 h Kokultivierung wurden die schwimmenden (apoptotischen) Zelltrümmer durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt. Anschließend wurden die adhärennten Zellen lebend mit anti-hLa SW5 oder 7B6 gefärbt und es wurde mit anti-Maus-IgG-Alexa Fluor[®]488 detektiert (sek. AK). Zur Unterscheidung der Zellen wurden die Kerne nach der PFA-Fixierung und Permeabilisierung mit DAPI angefärbt. Dargestellt sind die Aufnahmen der beiden einzelnen Fluoreszenzkanäle sowie deren Überlagerung und der Phasenkontrast.

4.5. Entwicklung eines *in vitro* Bindungsassays

Die in Kapitel 4.4 festgestellte Freisetzung des La-Proteins aus apoptotischen Zellen hat weitreichende Konsequenzen. Einerseits könnte das La-Protein auf nicht-apoptotischen Zellen zur Bindung von anti-La-Antikörpern in Autoimmunpatienten führen. Immunkomplexe haben die Zerstörung der markierten Zellen durch Komplement-vermittelte Lyse oder NK-Zellen zur Folge. Dieser mögliche Pathomechanismus wird in Kapitel 4.6 genauer untersucht. Andererseits erlaubt die obige Beobachtung den Einsatz des La-Proteins als induzierbare Zielstruktur für die Tumorthherapie (siehe Kapitel 4.7). Grundvoraussetzung für die weiteren Untersuchungen war die Entwicklung eines *in vitro* Modell-Systems, das mit intakten, ungestressten Zellen arbeitet. Aus diesem Grund wurde versucht, die Zelloberfläche mit rhLa-Protein zu dekorieren.

4.5.1. Bindung von rhLa auf der Oberfläche verschiedener Zelllinien

Aufbauend auf der Bindung des eukaryonten hLa-Proteins auf der Oberfläche von A9-Zellen wurde nun mit prokaryont hergestelltem und gereinigtem La-Protein die Bindung an die Zellmembran analysiert. Der Nachweis erfolgte wiederum mit den beiden hLa-spezifischen mAbs SW5 und 7B6. Von den Färbungen wurden sowohl Immunfluoreszenzaufnahmen (Abbildung 44A) als auch quantitative FACS-Analysen (Abbildung 44B) durchgeführt. In der Immunfluoreszenz konnten starke Oberflächenfärbungen mit beiden Antikörpern beobachtet werden, wenn die Zellen zuvor mit rhLa-Protein inkubiert worden waren. Ohne diese Vorbehandlung konnte keiner der beiden mAbs auf die Zellmembran binden und es konnte keine grüne Fluoreszenz für diese Präparate detektiert werden. In Abbildung 44B sind Histogramme der Durchflusszytometrie dargestellt, die die Zahl der gefärbten Zellen als auch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) wiedergeben. So konnte bestätigt werden, dass 100% der Zellen nach Vorbehandlung mit rhLa-Protein mit beiden Antikörpern stark positiv auf ihrer Oberfläche angefärbt werden konnten.

Das rhLa-Protein konnte auch auf einer Vielzahl weiterer Zelllinien binden. In Abbildung 45 sind FACS-Analysen für eine andere murine Fibroblastenzelllinie (3T3), eine humane embryonale Nierenzelllinie (HEK 293T), eine humane Cervixcarcinomlinie (HeLa) sowie für humane Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC) gezeigt. Das Protein konnte, unabhängig davon, ob die Zellen humanen oder murinen Ursprungs waren oder ob es sich um Endothel- oder Epithelzellen handelte, an die Zelloberfläche binden. Die Bindung an Endothelzellen kann von pathophysiologischer Relevanz bei Autoimmunpatienten mit anti-La-Autoantikörpern sein, welche oft Gefäßschädigungen aufweisen (siehe Kapitel 4.6).

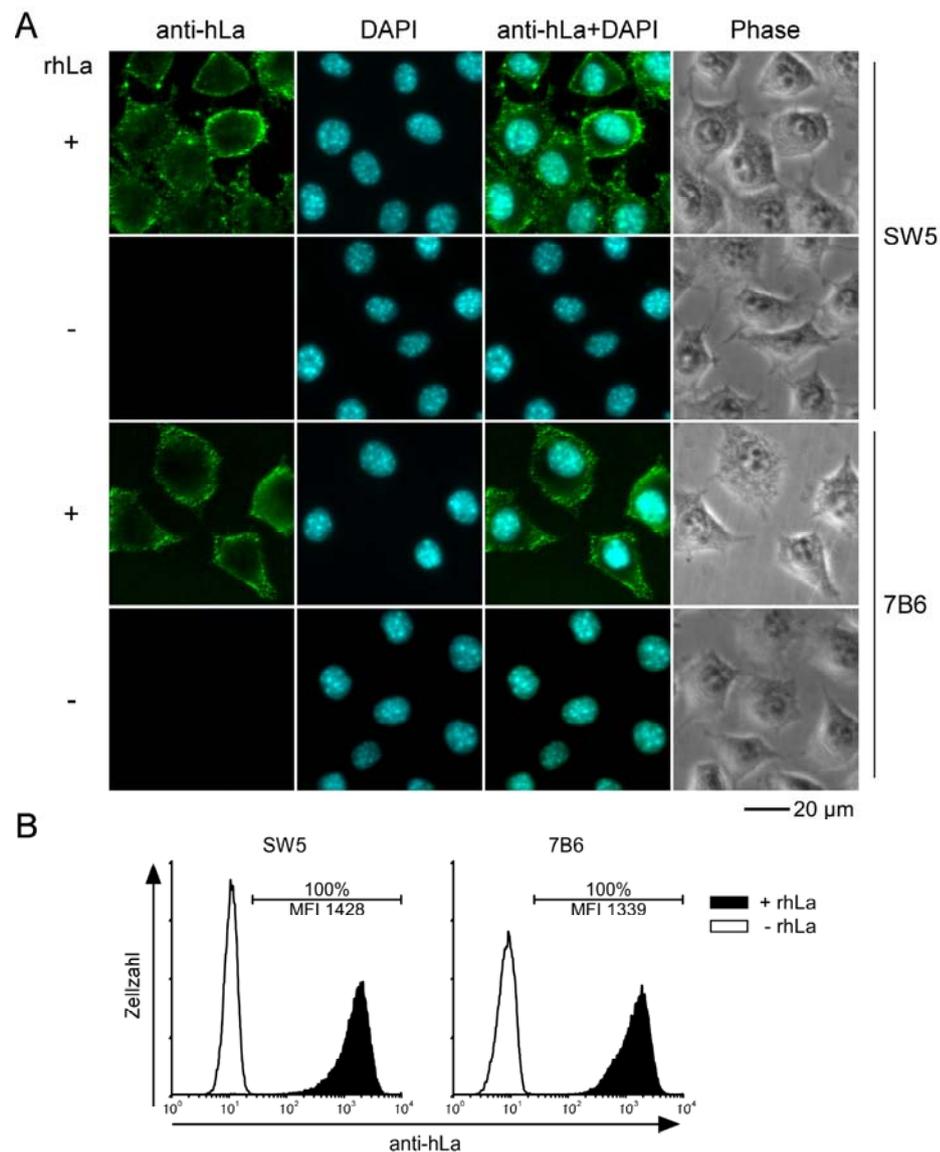


Abbildung 44: Bindung von rhLa auf Maus-A9-Zellen.

Adhärenente A9-Zellen wurden mit 3 µM rhLa in DMEM für 1 h auf Eis inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Hybridomaüberständen und anti-Maus-IgG-Alexa Fluor®488 für je 1 h gefärbt. Parallel wurden Zellen ohne La-Zugabe mitgeführt, um die Spezifität der Antikörper zu überprüfen. **A)** Immunfluoreszenzanalyse der Präparate nach PFA-Fixierung, Permeabilisierung und DAPI-Färbung der Zellkerne. **B)** Die zweite Hälfte der gefärbten Zellen wurde mit PBS-EDTA von den Kulturschalen abgelöst und durchflusszytometrisch analysiert. Für jeden Antikörper wurden die beiden Histogramme, welche jeweils mit und ohne vorherige La-Dekoration erhalten wurden, dargestellt.

Experimentell war es sowohl möglich, die adhärenente Zellen erst zu dekorieren und zu färben und dann mit PBS-EDTA abzulösen als auch umgekehrt. Entscheidend war die Durchführung aller Färbeschritte auf Eis, da die Zellen zuvor nicht fixiert wurden. Durch die niedrige Temperatur kommen alle zellulären Prozesse zum Erliegen. So sollte verhindert werden, dass die Zellen das Protein unspezifisch „fressen“. Außerdem sollte kein Zellstress durch Inkubation außerhalb des Brutschanks ausgelöst werden, welcher zur Translokation des endogenen La-Proteins führen könnte.

4. Ergebnisse

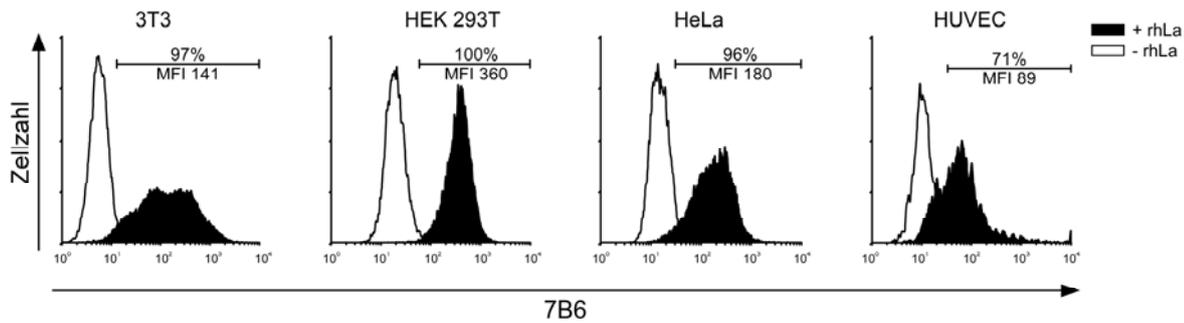


Abbildung 45: Dekoration verschiedener Zelllinien mit rhLa-Protein.

Verschiedene adhärenente Zelllinien wurden mit PBS-EDTA von den Kulturgefäßen abgelöst und in eine Spitzbodenplatte überführt. Hier erfolgte die Inkubation mit rhLa-Protein für 1 h auf Eis. Parallel wurden Kontrollen ohne La-Beladung mitgeführt. Anschließend wurde mit 7B6-Hybridomaüberstand und anti-Maus-IgG-Alexa Fluor[®]488 detektiert. Die Abbildungen entstammen voneinander unabhängigen Experimenten, weshalb die MFI-Werte nicht direkt miteinander verglichen werden können.

4.5.2. Das rhLa-Protein bindet innerhalb der PBMCs selektiv auf Antigen-präsentierende Zellen

PBMCs können aus peripherem Blut gewonnen werden und umfassen T- und B-Lymphozyten, NK-Zellen, Monozyten sowie DCs. Dabei stellen slanDCs eine Subpopulation von humanen DCs dar, die den größten Anteil an DCs im Blut ausmachen und seit vielen Jahren intensiv im Institut für Immunologie untersucht und charakterisiert werden [6-9, 175-177]. Jede dieser Zellpopulationen trägt charakteristische Oberflächenantigene (CD-Moleküle), welche durch Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper spezifisch im Durchflusszytometer nachgewiesen werden können. Deshalb sind PBMCs ein ideales Testsystem, um zu analysieren, ob das rhLa-Protein unspezifisch an alle Zellmembranen adsorbiert oder ob es selektiv nur auf bestimmten Zellen bindet.

Durch die Verwendung von zwei unterschiedlichen Fluorophoren können die Zellen mit Antikörpern gegen die CD-Moleküle (z. B. im PE-Kanal) und gleichzeitig gegen das La-Protein angefärbt werden (FITC-Kanal). Die Analyse erfolgt in Form einer Zwei-Parameter-Darstellung (*dot plot*, siehe Abbildung 46). Diese kann in einzelne Quadranten unterteilt werden. Unten links befinden sich die negativen Zellen. Oben links die z. B. CD19⁺ B-Zellen. Verschiebt sich nach Zugabe des rhLa-Proteins diese Population in Richtung des oberen rechten Quadranten, so sind die Zellen doppelt positiv gefärbt, da zusätzlich der mAk SW5 und ein FITC-gekoppelter Sekundärantikörper auf der Zellpopulation binden konnte. In Abbildung 46 wird deutlich, dass das rhLa-Protein auf CD19⁺ B-Zellen, CD14⁺ Monozyten sowie M-DC8⁺ slanDCs nachgewiesen werden konnte. Allen diesen Zellen ist ihre Funktion gemein, den CD4⁺ T-Zellen Antigene auf MHC-Klasse II-Molekülen präsentieren zu können. Sie werden als sogenannte Antigen-präsentierende Zellen bezeichnet.

Von den CD4⁺ T-Zellen wurde nur ein geringer Teil nach La-Inkubation schwach mit SW5 angefärbt. Die CD8⁺ T-Zellen sowie CD56⁺ NK-Zellen konnten gar kein rhLa-Protein auf ihrer Oberfläche binden.

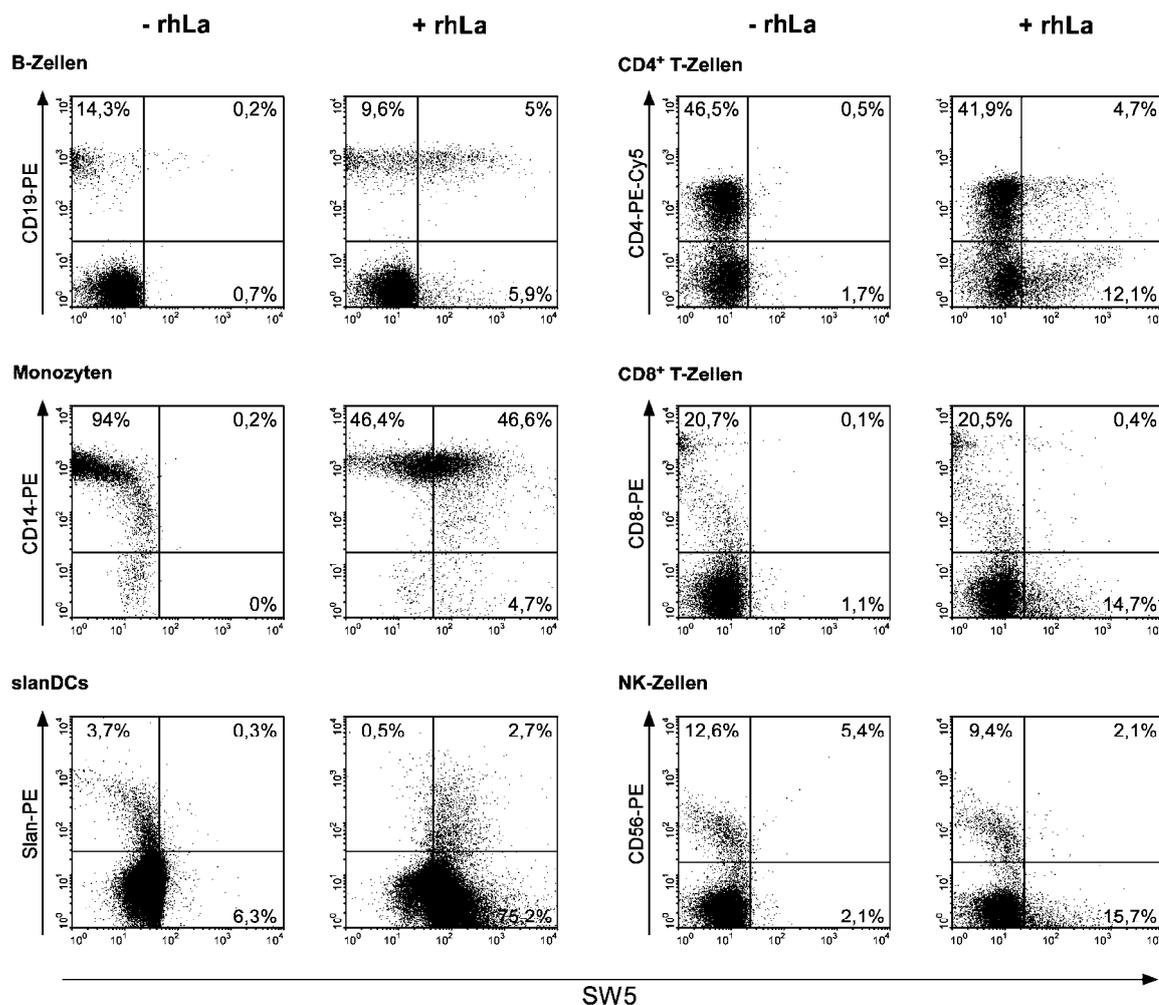


Abbildung 46: La-Bindung auf einzelnen PBMC-Subpopulationen.

Für jeden Färbeansatz wurden $1 \cdot 10^6$ PBMCs mit $10 \mu\text{M}$ rhLa-Protein in 1% (w/v) BSA in PBS für 1 h auf Eis inkubiert. Parallel wurden unbehandelte Zellen mitgeführt. Das La-Protein wurde mit SW5 (1:5 in 1% (w/v) BSA in PBS) und anti-Maus-Ig F(ab')₂-FITC (1:200 in 1% (w/v) BSA in PBS) detektiert. Danach wurden die freien Arme des Sekundärantikörpers mit Mausserum (1:100 in 1% (w/v) BSA in PBS) blockiert, bevor die Subpopulationen mit anti-CD19-PE, anti-CD14-PE, anti-Slan-PE, anti-CD4-PE-Cy5, anti-CD8-PE oder anti-CD56-PE nachgewiesen wurden. Für T-, B- und NK-Zellen wurden nur die Zellen der Lymphozytenregion des Streubildes dargestellt. Entsprechend wurden für Monozyten und slanDCs die Zellen der Monozytenregion abgebildet.

4.5.3. Die Oberflächenbindung des La-Proteins ist unter verschiedenen Bedingungen möglich

In den bisherigen Versuchen wurde die Beladung der Zellen mit rhLa-Protein auf Eis durchgeführt. Für die später folgenden Chromfreisetzungstests sollten die La-dekorierten Zellen anschließend allerdings nicht fixiert, sondern weiterhin im Brutschrank kultiviert werden. Deshalb sollte die La-Dekoration möglichst auch bei 37 °C und in Zellkulturmedium mit 10% (v/v) FCS erfolgen. Die Bindung des Proteins an die Zellmembran wurde unter verschiedenen Bedingungen evaluiert: bei 37 °C im Inkubator oder auf Eis sowie in Gegenwart von DMEM-Medium oder von PBS. Die anschließenden Färbeschritte mit anti-La-7B6 und dem Sekundärantikörper erfolgten alle parallel auf Eis, um nur die unterschiedlichen Parameter während der La-Beladung zu bewerten.

In Abbildung 47 sind die Ergebnisse der Färbungen zusammengestellt. Das Protein konnte unter allen getesteten Bedingungen auf nahezu 100% der Zellen binden. Wurde das rhLa-Protein in DMEM-Medium verdünnt, so sind die MFI-Werte sogar leicht erhöht im Vergleich zu den in PBS behandelten Proben. Der höchste MFI-Wert wurde bei 37 °C in DMEM-Medium erzielt. Diese Parameter sind für die Chromfreisetzungstests mit La-dekorierten Zellen ideal. Dass die La-Bindung an die Zellmembran auch in Gegenwart von 10% (v/v) FCS (enthält vor allem BSA) im Kulturmedium stattfindet, spricht wiederum für die Spezifität der Bindung.

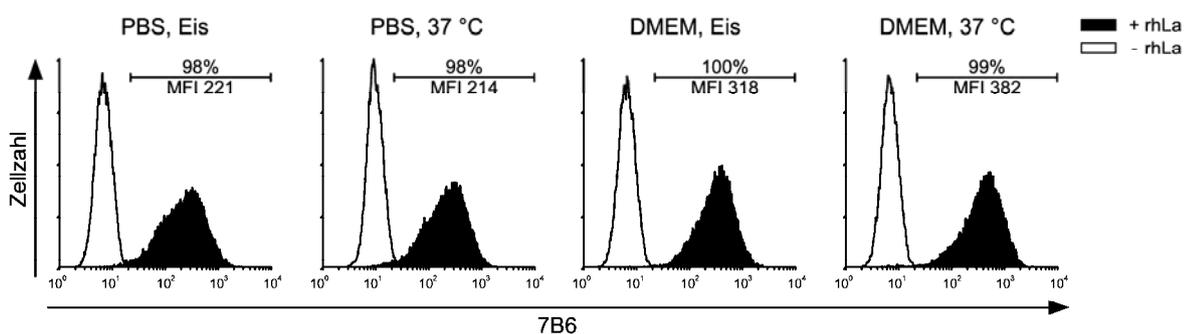


Abbildung 47: Analyse der Oberflächenbindung unter verschiedenen Bedingungen.

Adhärente HeLa-Zellen wurden mit 2,7 µM rhLa-Protein inkubiert, das entweder in PBS oder in DMEM verdünnt worden war. Die einstündige Beladung erfolgte einerseits auf Eis und andererseits im Brutschrank bei 37 °C. Anschließend wurde das ungebundene Protein gewaschen. Das gebundene rhLa wurde mit mAk 7B6 und anti-Maus-IgG-Alexa Fluor® 488 detektiert. Die Färbeschritte mit den Antikörpern wurden für alle Proben parallel auf Eis durchgeführt. Abschließend wurden die Zellen mit PBS-EDTA abgelöst und im Durchflusszytometer analysiert. Die Negativkontrollen waren nicht mit rhLa-Protein markiert worden.

4.5.4. Nachweis des rhLa-Proteins auf 3T3-Zellen bis zu 24 h nach Dekoration

Im Folgenden wurde überprüft, wie lange nach Dekoration das La-Protein noch auf den Zellen detektiert werden kann und ob es eventuell proteolytisch gespalten wird und nur noch partiell auf der Zelloberfläche vorliegt. Hierfür wurden Maus-3T3-Zellen für 1 h mit rhLa in DMEM bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte ein Mediumwechsel. Die Zellen wurden entweder sofort untersucht oder für weitere 3 h bzw. 24 h kultiviert. Zu jedem Zeitpunkt wurden Zellen auf Eis mit den verschiedenen anti-La-mAks 27E, 5B9, SW5, 22A und 7B6 sowie anti-His und einem entsprechenden Sekundärantikörper gefärbt. Ein Teil der Zellen wurde anschließend mit PBS-EDTA von den Kulturgefäßen abgelöst und im Durchflusszytometer analysiert (Abbildung 48). Die übrigen Zellen wurden fixiert und mit DAPI gefärbt. Anschließend wurden die Immunfluoreszenzen dokumentiert (siehe Abbildung 49A). Außerdem wurden Totalextrakte der mit La-beladenen Zellen und Kontrollzellen ohne La-Protein hergestellt. Im Western Blot wurde mit den verschiedenen Antikörpern detektiert (siehe Abbildung 49B).

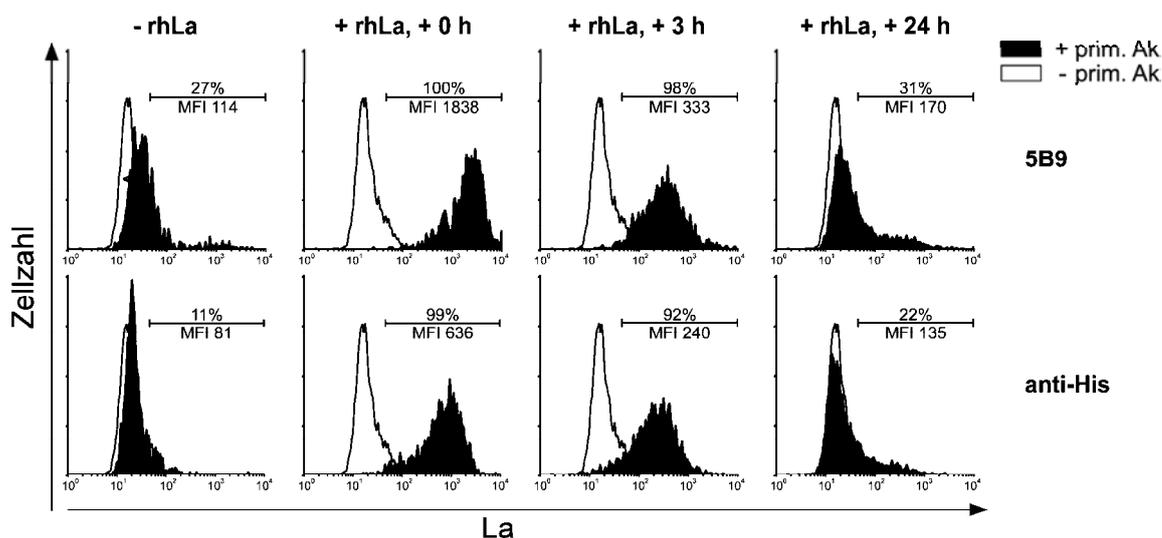


Abbildung 48: Nachweis des rhLa-Proteins auf 3T3-Zellen bis zu 24 h nach Dekoration.

Maus-3T3-Zellen wurden am Vortag in mehrere 24-well-Platten ausgesät. Alle Zellen wurden parallel für 1 h mit 1,7 μ M rhLa-Protein in DMEM bei 37 °C inkubiert und danach wurde das ungebundene Material gewaschen. Zur Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt. Nun wurden die Zellen entweder sofort auf Eis mit 5B9 oder anti-His (prim. Ak) und dem anti-Maus-IgG-Alexa Fluor[®] 488-Antikörper gefärbt, oder sie wurden in Medium überführt und für weitere 3 h bzw. 24 h im Brutschrank kultiviert, bevor sie ebenfalls gefärbt wurden. Nach der Färbung wurden die Zellen mit PBS-EDTA abgelöst und im Durchflusszytometer analysiert. Die länger kultivierten Zellen wurden entsprechend später gefärbt und gemessen.

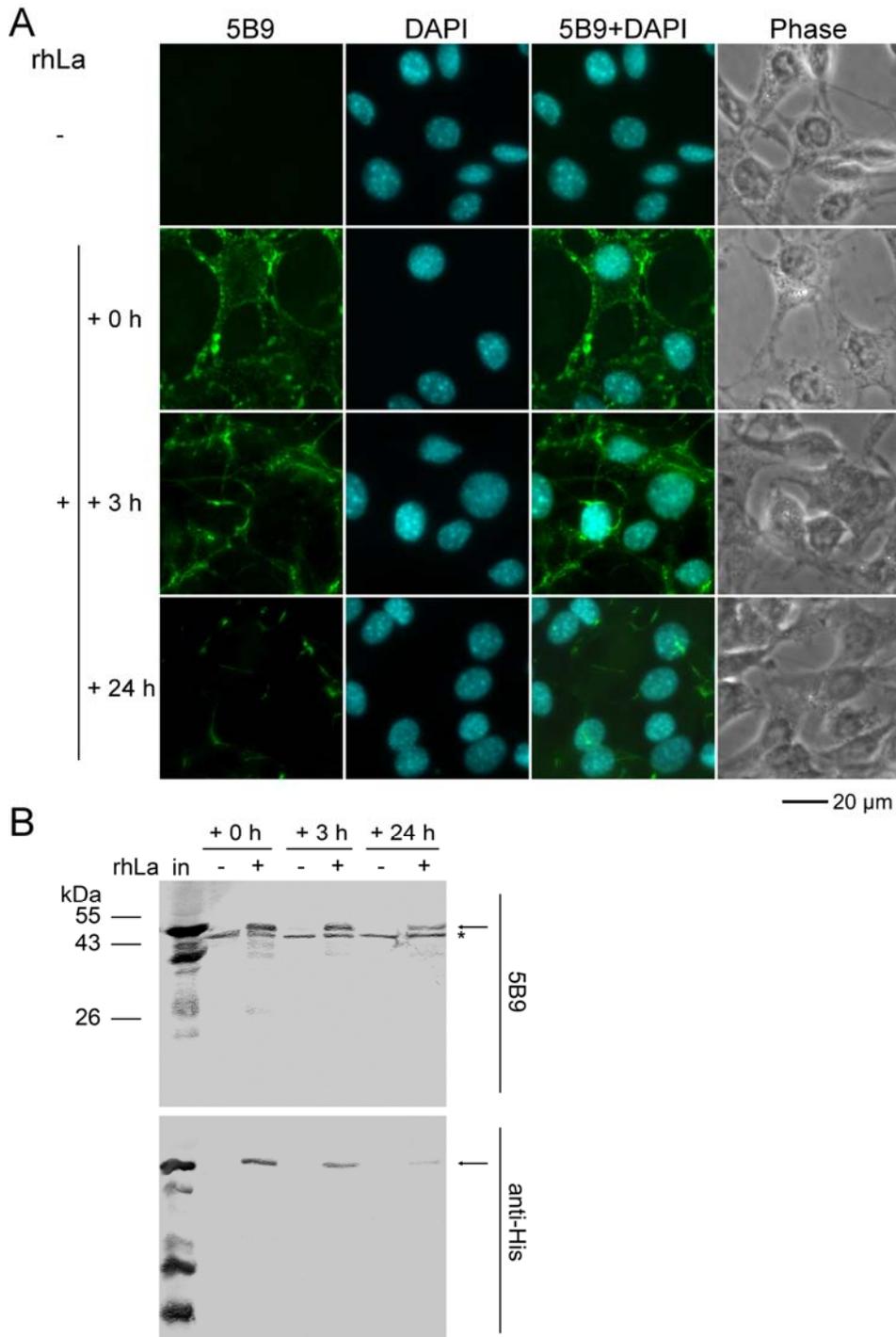


Abbildung 49: Stabilität des rhLa-Proteins auf 3T3-Zellen bis zu 24 h.

A) Die mit rhLa-Protein dekorierten Zellen wurden sofort, nach 3 h oder nach 24 h mit 5B9 und anti-Maus-IgG-Alexa Fluor®488 gefärbt. Anschließend wurde mit PFA-Lösung fixiert, mit Triton X-100-Lösung permeabilisiert und die DNA der Zellkerne wurde mit DAPI sichtbar gemacht. Es sind die anti-La-Färbung im grünen Fluoreszenzkanal, die DAPI-Färbung im blauen Kanal sowie deren Überlagerung dargestellt. Des Weiteren wurde der Phasenkontrast aufgenommen. **B)** Western Blot der Totalextrakte, welche sofort nach La-Dekoration, nach 3 h bzw. 24 h hergestellt worden waren. Parallel wurden Proben von Zellen ohne La-Beladung mitgeführt. In der ersten Spur des Gels wurde die Menge an rhLa-Protein aufgetragen, welche auch auf die Zellen gegeben worden war („in“). Die Western Blots wurden mit 5B9 und anti-His sowie anti-Maus-IgG-AP entwickelt. Der Pfeil markiert die Bande des rhLa-Proteins, welches mit 5B9 und anti-His detektiert werden konnte. (*) kennzeichnet das endogene mLa-Protein, welches ebenfalls von 5B9 erkannt wurde.

Die Ergebnisse aller drei Methoden wurden exemplarisch für den mAk 5B9 gezeigt, welcher die AS 95-104 der N-terminalen Domäne erkennt (siehe 4.1.4.2). Da sich der Hexahistidintag am C-Terminus befindet, wurden die Daten der Durchflusszytometrie sowie der Western Blot auch für den anti-His Antikörper aufgeführt, um möglichst zwei weit voneinander entfernte Epitope auf dem Volllängeprotein nachzuweisen.

Alle verwendeten Antikörper konnten das rhLa-Protein auf den Zellen detektieren, d. h. durch die Membranbindung wurde auch nicht ein bestimmtes Epitop komplett verdeckt. Mittels Durchflusszytometrie wurde quantitativ bestätigt, dass die Fluoreszenz bei sofortiger Detektion (+0 h) am stärksten war und nach 3 h nicht mehr die komplette Proteinmenge auf der Zelloberfläche vorlag. Dennoch konnten nahezu alle Zellen mit dem jeweiligen Antikörper angefärbt werden. Nach 24 h war das rhLa-Protein auf einem kleinen Teil der Zellen immer noch detektierbar.

Die Immunfluoreszenzaufnahmen in Abbildung 49A verdeutlichen diese Daten. Die starke anfängliche Färbung mit 5B9 war nach zusätzlicher Kultivierung der Zellen für 3 h etwas schwächer geworden. Nach 24 h war das noch verbleibende La-Protein vor allem auf der extrazellulären Matrix zu beobachten. Auch zu diesem Zeitpunkt konnte es durch alle verwendeten Antikörper noch nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass es sich immer noch um das Volllängeprotein handelt und nicht bestimmte Domänen proteolytisch abgespalten und in das Medium freigesetzt oder aber in die Zelle aufgenommen werden.

Zur weiteren Analyse wurde ein Immunoblot der Totalextrakte hergestellt. Der mAk 5B9 konnte in allen Extrakten das endogene mL_a detektieren. Diese Bande kann als interner Standard für die auf das Gel geladenen Proteinmengen angesehen werden. Darüber befindet sich in den Extrakten der Zellen, welche zuvor mit rhLa beladen worden waren, eine Bande für das rhLa-Protein. Deren Intensität nimmt mit der Zeit ab, doch das Molekulargewicht bleibt unverändert. Der anti-His-Antikörper detektierte erwartungsgemäß nur das rhLa-Protein, welches ebenfalls weniger wurde, aber dessen Molekulargewicht ebenfalls gleich blieb. Die für die Beladung der Zellen eingesetzte Proteinmenge wurde als „Input“ (in) ebenfalls auf das Gel aufgetragen. Es ist deutlich erkennbar, dass diese Menge anschließend nicht auf den Zellen nachgewiesen werden konnte, sondern dass nur ein Teil des Proteins auf die Zellmembran gebunden hatte. Das ungebundene Material wurde vor der Herstellung der Totalextrakte gewaschen. Durch die relativ große Proteinmenge, die als „Input“ auf das Gel aufgetragen worden war, wurden auch die vorhandenen Degradationsfragmente auf dem Immunoblot sichtbar. Sie lassen sich, abhängig von den enthaltenen Epitopen, mit mindestens einem der beiden Antikörper nachweisen.

Insgesamt konnte das rhLa-Protein bis zu 24 h nach Dekoration auf den Zellen nachgewiesen werden. Dafür wurden verschiedene Detektionsmethoden eingesetzt. Alle verwendeten Antikörper waren in der Lage, das Protein auf der Zelloberfläche zu binden. Keines der Epitope war durch die Wechselwirkung mit einem eventuellen Rezeptor auf der Membran unzugänglich geworden.

4.5.5. In Gegenwart von rhLa bindet DNA verstärkt auf der Zelloberfläche

Wie bereits durch den South-Western Blot bestätigt wurde (Abbildung 26), kann das La-Protein DNA bzw. DIG-markierte DNA binden. Bei SLE-Patienten werden apoptotische und nekrotische Zelltrümmer nur unzureichend von Phagozyten beseitigt, weshalb die DNA-Konzentration im Serum erhöht ist [37]. Durch das ebenfalls freigesetzte La-Protein könnten La-DNA-Komplexe entstehen und La könnte die körpereigene DNA auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen immobilisieren. Bei Durchbrechung der Toleranz kann es nach Aufnahme der Komplexe zur Induktion von anti-dsDNA-Autoantikörpern kommen.

HEK 293T-Zellen wurden mit rhLa-Protein vorbehandelt und anschließend wurde überprüft, ob dadurch DIG-markierte DNA verstärkt auf der Zellmembran nachweisbar war. Die Ergebnisse sind in Abbildung 50 zusammengefasst. Mit dem anti-La-mAk SW5 konnten etwa 90% der Zellen angefärbt werden, sofern sie eine Inkubation mit rhLa-Protein erfahren hatten. Die DIG-DNA allein konnte mit zunehmender Konzentration zu einem geringen Teil auf den Zellen binden (8,9% versus 28,6% bei 1-fach bzw. 10-fach eingesetzter DNA-Menge). Wurden die Zellen aber zuerst mit rhLa-Protein dekoriert und danach mit DIG-DNA versetzt, so konnte deutlich mehr DNA auf den Zellen detektiert werden (60,5% bzw. 87% bei 1-facher bzw. 10-facher DNA-Menge). Das La-Protein kann also eine verstärkte Bindung von DNA-Molekülen auf der Zellmembran vermitteln.

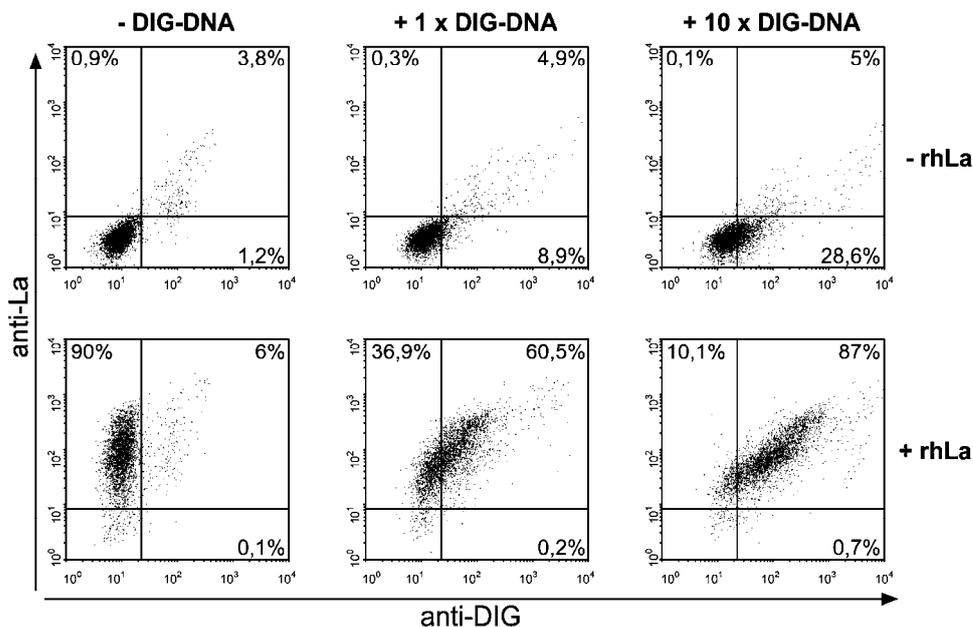


Abbildung 50: Das rhLa-Protein vermittelt die Bindung von DIG-markierter DNA auf HEK 293T-Zellen.

HEK 293T-Zellen wurden mit PBS/EDTA von den Kulturflaschen abgelöst und in einer Spitzbodenplatte wurden jeweils $1,5 \cdot 10^5$ Zellen mit $10 \mu\text{M}$ rhLa für 1 h bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen wurde die DIG-markierte DNA (5 ng oder 50 ng in einem Gesamtvolumen von $10 \mu\text{l}$ PBS) zu den Zellen gegeben (1 h, 4°C). Die Detektion erfolgte mit SW5 und anti-Maus-Ig F(ab')₂-PE sowie anti-DIG-FITC. Parallel wurden Kontrollen ohne La-Beladung bzw. ohne DIG-DNA mitgeführt. Die Proben wurden im Durchflusszytometer analysiert.

4.6. Pathophysiologische Folgen der La-Oberflächentranslokation für Autoimmunpatienten

Bei SLE-Patienten treten Krankheitsschübe oft in Zusammenhang mit UV-Licht-Exposition, Virusinfektionen oder mit der Einnahme bestimmter Medikamente auf. Diese Faktoren lösen in den Körperzellen Stressreaktionen aus. Wie in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt werden konnte, findet dabei eine Translokation des La-Proteins auf die Zelloberfläche statt. Es kann außerdem in die Umgebung abgegeben werden und auf die Membranen der Nachbarzellen binden. Dadurch kommt das ursprünglich nukleäre Antigen in Kontakt mit den anti-La-Autoantikörpern des Patienten. Die resultierenden Immunkomplexe werden üblicherweise von Komponenten des Immunsystems erkannt und die so markierten Körperzellen werden eliminiert. Dabei kann einerseits das Komplementsystem involviert sein oder es werden NK-Zellen über ihre Fc γ RIII-Rezeptoren (CD16) aktiviert. Durch die Bindung mehrerer Immunkomplexe auf der Oberfläche der NK-Zellen findet eine Quervernetzung der CD16-Rezeptoren statt. Dadurch wird eine ADCC-Reaktion ausgelöst, d. h. in den Zielzellen wird Apoptose induziert. Darüber hinaus erkennen NK-Zellen stressinduzierte Moleküle auf den Körperzellen. In Gegenwart des ULBP2-Proteins erfolgt die NK-Zell-Aktivierung über den NKG2D-Rezeptor [178]. Beide Mechanismen sind in Abbildung 51 schematisch dargestellt.

Im Folgenden wurden verschiedene Patientenserien daraufhin analysiert, ob die darin enthaltenen Autoantikörper das rhLa-Protein auf der Membran von Zellen detektieren können. Danach wurde ein *in vitro*-Modellsystem entwickelt, um zu überprüfen, ob die Immunkomplexe eine ADCC-Reaktion verursachen können und ob das Protein ULBP2 darauf Einfluss nimmt.

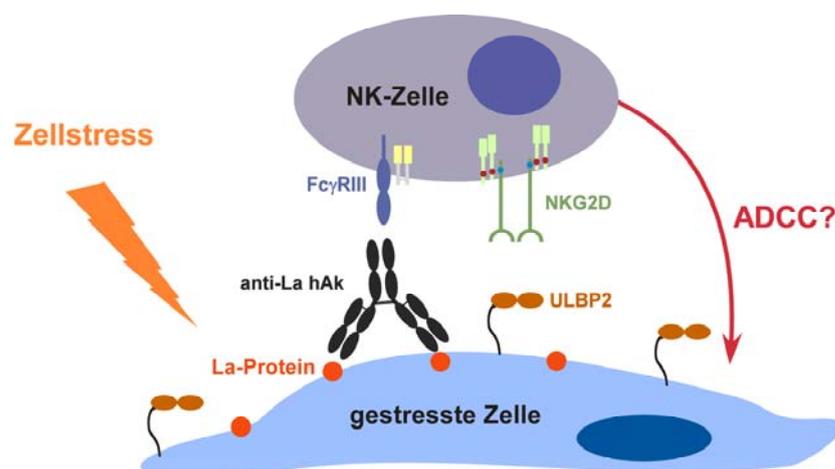


Abbildung 51: Aktivierung einer NK-Zelle nach Zellstress.

Durch Zellstress wie z. B. UV-Strahlung gelangen sowohl das La-Protein als auch ULBP2 auf die Zelloberfläche. Durch die Bindung von anti-La-Autoantikörpern (hAk) an das La-Protein kommt es zur Häufung von Immunkomplexen auf den Körperzellen. Diese können von Fc γ RIII-Rezeptoren der NK-Zellen erkannt werden und führen zur NK-Zell-Aktivierung. Die Zielzellen werden daraufhin lysiert (ADCC). Außerdem wechselwirkt der Stress-induzierte Ligand ULBP2 mit dem aktivierenden NK-Zell-Rezeptor NKG2D. Daraus resultiert ebenfalls die Aktivierung des zytolytischen NK-Zell-Potentials.

4.6.1. Anti-La-Autoantikörper erkennen das rhLa-Protein auf der Zelloberfläche

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden exemplarisch drei Patientenseren ausgewählt, welche im ELISA als positiv für anti-La/SS-B Autoantikörper getestet worden waren. Sie alle konnten das La-Protein auf den Zellen detektieren, die Kontrollzellen ohne La-Dekoration blieben hingegen ungefärbt (siehe Abbildung 52A). Die Färbemuster entsprachen denen, die mit dem mAk 7B6 erzielt wurden. Somit ist die Bindung der Autoantikörper auf die Zelloberfläche vom Vorhandensein des La-Proteins abhängig. Die getesteten Seren zeigten keine unspezifischen Hintergrundfärbungen. Für den quantitativen Nachweis wurden die Proben im Durchflusszytometer analysiert. In Abbildung 52B ist wiederum der mAk 7B6 als Positivkontrolle mitgeführt worden. Das Patientenserum zeigte eine ebenso deutliche Färbung auf La-dekorierten Zellen wie der mAk. Hingegen blieben die mit Normalserum (anti-La-negativ) behandelten Proben unabhängig von der Gegenwart des rhLa-Proteins negativ.

4.6.2. Immunkomplexe aktivieren NK-Zellen gegen La-dekorierte Zielzellen

Die Aktivierung von NK-Zellen gegen entsprechende Zielzellen lässt sich durch einen Chromfreisetzungstest nachweisen. Die Zielzellen werden mit ^{51}Cr beladen, das ins Zellinnere aufgenommen wird. Danach werden sie zusammen mit NK-Zellen in An- oder Abwesenheit der zu untersuchenden Faktoren kultiviert. Bei erfolgreicher Lyse der Zielzellen wird das ^{51}Cr in den Zellkulturüberstand freigesetzt und kann dort detektiert werden [160]. Für den Chromfreisetzungstest wurden intakte Zellen verwendet, die keinem zusätzlichen Zellstress ausgesetzt worden waren. Aus diesem Grund mussten beide zu untersuchende Proteine von außen auf die Zelloberfläche gebracht werden. Dadurch besteht auch die Möglichkeit, beide Signale getrennt voneinander zu untersuchen. Einerseits wurden die Zellen nach der Chrombeladung mit rhLa-Protein inkubiert. Andererseits wurde das im Institut für Immunologie entwickelte und für den Chromfreisetzungstest etablierte Protein ULBP2-CD33 eingesetzt. Es handelt sich um ein rekombinantes, eukaryont produziertes Fusionsprotein. Der NKG2D-Ligand ULBP2 ist mit einem rekombinanten Antikörperfragment verknüpft, welches das CD33 Oberflächenantigen erkennt (CD33 scFv, siehe Schema in Abbildung 53A). Aus diesem Grund wurden als Zielzellen A9-Zellen verwendet, welche zusätzlich das CD33-Gen stabil exprimieren. Dadurch wird eine Oberflächendekoration der Zielzellen mit ULBP2 erreicht.

Zur Untersuchung der ADCC-Mechanismen wurden gereinigte humane anti-La-Antikörper (hAk) eingesetzt, um eventuelle Einflüsse von Komplementfaktoren oder Zytokinen aus dem Serum zu vermeiden. Für die affinitätschromatographische Reinigung der hAk wurde aktivierte CH-Sepharose mit rhLa-Protein beladen, durch welches die La-spezifischen Antikörper von den übrigen Serumkomponenten abgetrennt wurden (siehe 3.3.2). Für die eluierten hAk wurde die Bindung an das La-Antigen mittels Western Blot bestätigt (Abbildung 53B). Außerdem konnten die gereinigten hAk ebenso wie der mAk 7B6 auf der Zelloberfläche von A9 CD33-Zellen nachgewiesen werden, sofern die Zellen zuvor eine Inkubation mit rhLa-Protein erfahren hatten (Abbildung 53C).

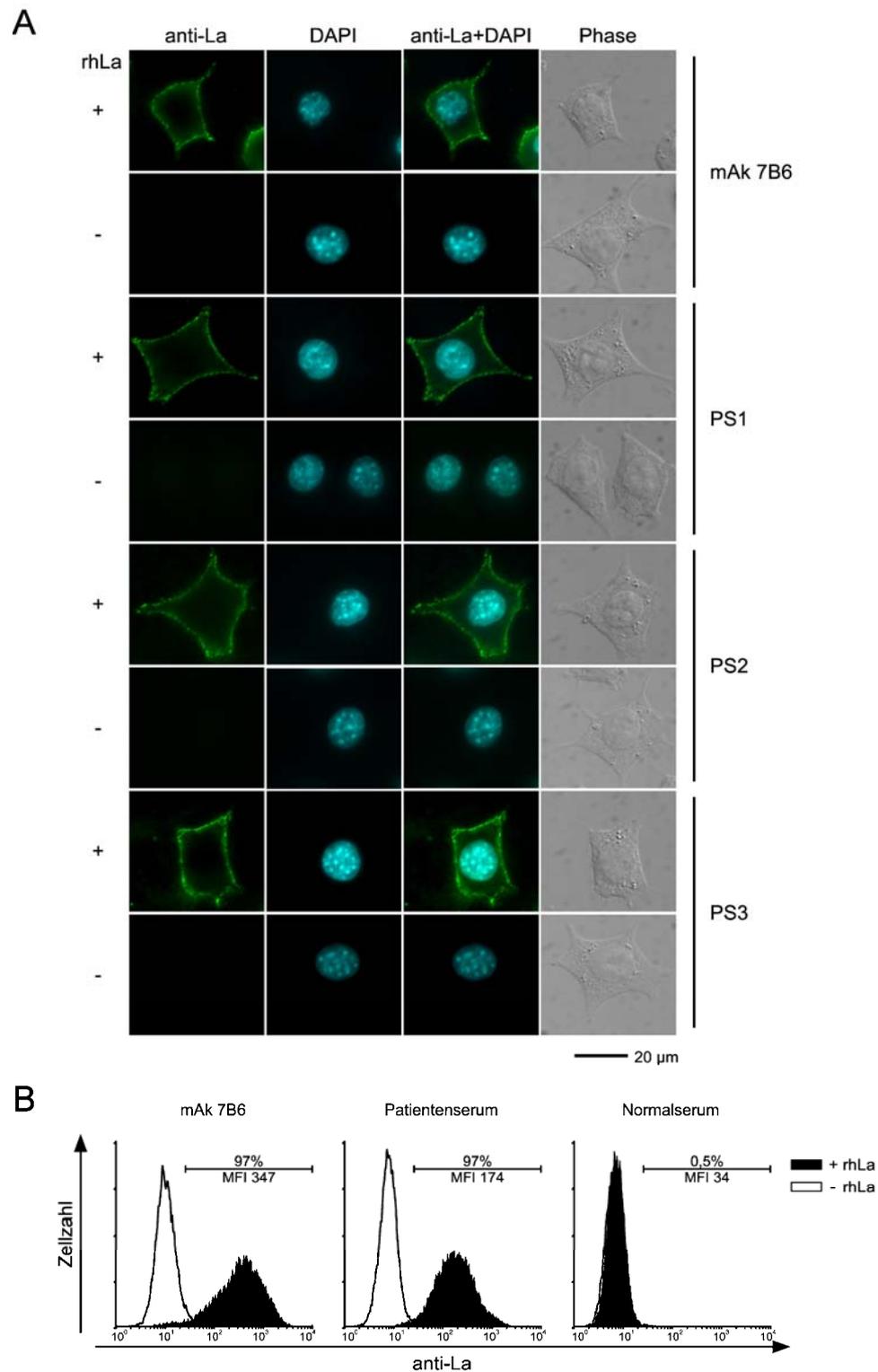


Abbildung 52: Nachweis des rhLa-Proteins auf der Zellmembran mittels Patientenseren.

A) Immunfluoreszenzaufnahmen von adhärennten A9-Zellen, welche für 1 h auf Eis mit 8 μ M rhLa-Protein oder nur in Medium inkubiert wurden. Anschließend wurden die lebenden Zellen mit mAk 7B6 oder Patientenseren (PS1-PS3) angefärbt. Die Detektion erfolgte mit anti-Maus-IgG-Alexa Fluor[®]488 bzw. anti-human-IgG-Alexa Fluor[®]488 Antikörpern. Abschließend wurden die Zellen mit PFA fixiert und die Zellkerne mit DAPI angefärbt. **B)** Für die FACS-Analyse wurden die Zellen zuerst mit PBS-EDTA abgelöst und anschließend wie unter A) mit La-Protein beladen und mit mAk 7B6 bzw. mit Seren inkubiert. Dargestellt sind ein Patientenserum und ein Normalserum, das keine anti-La-Antikörper enthält.

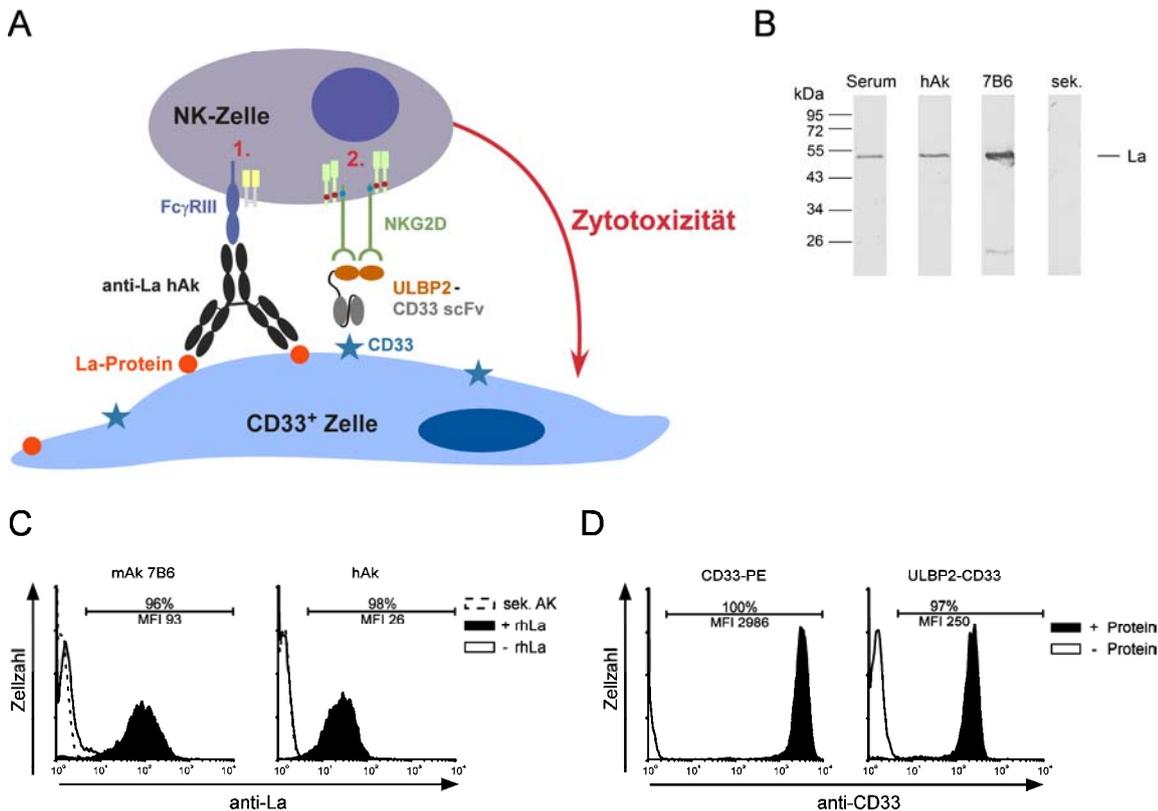


Abbildung 53: Aktivierung der NK-Zellen durch Immunkomplexe und ULBP2.

A) Für das *in vitro*-Modell werden A9 CD33-Zellen mit rhLa-Protein inkubiert. Dadurch können anti-La-hAk binden und über den FcγRIII die ADCC-Reaktion in den NK-Zellen auslösen (1.). Als zusätzliches Signal wird das Protein ULBP2-CD33 eingesetzt. Es assoziiert über das anti-CD33 scFv-Molekül mit der Zelloberfläche, welche dadurch mit ULBP2 bedeckt wird. Dieses führt über NKG2D ebenfalls zur Aktivierung der NK-Zellen (2). **B)** Das anti-La-Patientenserum (vor dem Auftrag auf die Säule) sowie die daraus gereinigten polyklonalen hAk wurden im Western Blot gegen das La-Antigen eingesetzt (Verdünnung 1:5000). Als Positivkontrolle wurde der mAk 7B6 herangezogen. Als Negativkontrolle wurde ein Streifen der Membran nur mit den Sekundärantikörpern (sek.) anti-Maus-IgG-AP und anti-human-IgG-AP behandelt. **C)** FACS-Analyse zur Bindung des mAk 7B6 und der gereinigten hAk (50 µl 1:100 in PBS) an mit 8 µM rhLa-Protein dekorierte A9 CD33-Zellen. Die Kontrollen ohne rhLa-Protein sind transparent dargestellt, die Histogramme der Sekundärantikörper (sek. AK, anti-Maus-IgG-Alexa Fluor[®]488 und anti-human-IgG-Alexa Fluor[®]488) als gestrichelte Linien. **D)** Durchflusszytometrischer Nachweis des Oberflächenmarkers CD33 mit anti-CD33-PE im Vergleich zur IgG1-Isotypkontrolle. Das Protein ULBP2-CD33 wurde mit anti-c-myc-FITC auf den CD33⁺ A9-Zellen detektiert, nachdem die Zellen mit 2,5 µg ULBP2-CD33 (+ Protein) gefärbt worden waren oder unbehandelt blieben (- Protein).

Das Vorhandensein des CD33-Proteins auf den A9-Zellen wurde mit einem direkt gekoppelten anti-CD33-PE-Antikörper überprüft (Abbildung 53D). Die Bindung des Fusionsproteins ULBP2-CD33 an A9 CD33-Zellen wurde ebenfalls mittels FACS-Analyse bestätigt, indem der im Fusionsprotein enthaltene c-myc-Tag detektiert wurde. Die Interaktion des ULBP2-Liganden mit seinem Rezeptor ist durch diese Methode allerdings nicht nachweisbar, da ULBP2 erst nach Oligomerisation an NKG2D binden kann [178]. Diese wird durch die dichte Beladung der Zelloberfläche mit ULBP2-CD33 erreicht.

Für den Chromfreisetzungstest wurden die A9 CD33-Zellen zuerst mit ⁵¹Cr markiert und danach mit rhLa-Protein inkubiert. Anschließend wurden die Zielzellen in Gegenwart der hAk oder des Proteins ULBP2-CD33 mit NK-Zellen kokultiviert. Abbildung 54 zeigt die erreichten spezifischen Lysen. Unabhängig von der La-Dekoration wurden die Zielzellen nur zu 2,6-2,8% von den NK-Zellen lysiert, wenn keine weiteren Stimuli vorhanden waren. In Gegenwart der

gereinigten humanen Autoantikörper erhöhte sich die spezifische Lyse auf 11,8% ($p=0,034$). Das Protein ULBP2-CD33 konnte eine signifikante Steigerung der Lyse auf 38,3% bewirken ($p=0,0002$). In Kombination riefen beide Komponenten eine Lyse von 60,2% ($p=0,009$) hervor, d. h. der Effekt war synergistisch. Durch die zusätzlichen ULBP2-Moleküle auf der Zelloberfläche, wie sie auch bei Zellstress *in vivo* vorhanden sind, wurde die von den Immunkomplexen bewirkte ADCC-Reaktion der NK-Zellen vervielfacht. Für die Experimente war eine Voraktivierung der NK-Zellen mit dem Zytokin IL-2 nötig. Dieses wird z. B. während Infektionen von T-Lymphozyten gebildet und wirkt auto- sowie parakrin, um die T-Zell-Proliferation während der adaptiven Immunantwort zu induzieren.

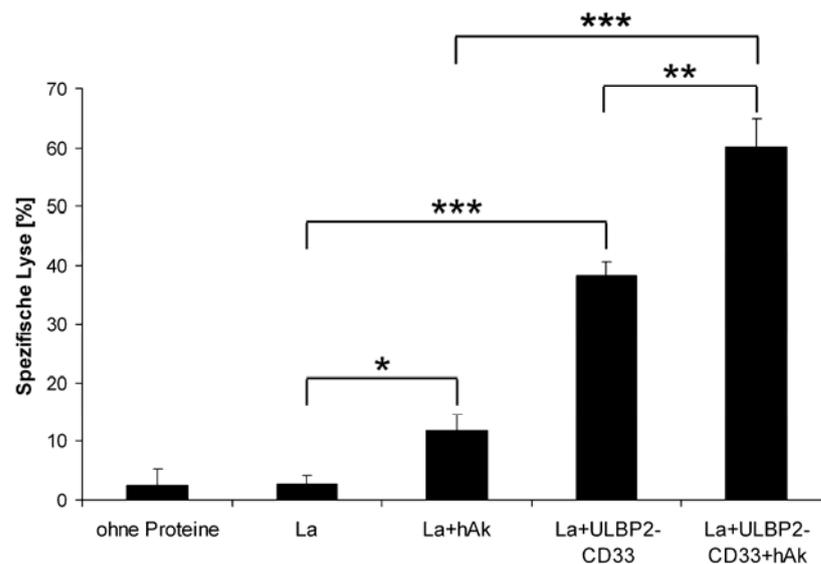


Abbildung 54: Chromfreisetzungstest zum funktionellen Nachweis der NK-Zell-Aktivierung.

Die Zielzellen A9 CD33 wurden mit ^{51}Cr beladen und anschließend wurde ein Teil von ihnen mit $10\ \mu\text{M}$ rhLa-Protein inkubiert. Danach wurden sie im Verhältnis 1:10 mit IL-2 aktivierten NK-Zellen kokultiviert. Zusätzlich wurden den Zellen $2,5\ \mu\text{g/ml}$ hAk oder $2,5\ \mu\text{g/ml}$ ULBP2-CD33 scFv oder beide Proteine zugegeben. Nach 4 h erfolgte die Bestimmung der Chromfreisetzung. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung und deren Standardabweichungen. Die statistische Signifikanz wurde mit einem Student'schen t-Test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.7. Das La-Protein als universelle, induzierbare Zielstruktur für die Immuntherapie von Tumoren

Am Institut für Immunologie wurde in den vergangenen Jahren eine Vielzahl von rekombinanten Antikörperfragmenten entwickelt. Diese können sowohl bestimmte TAAs auf den Tumorzellen erkennen (z. B. CD33 als Zielstruktur bei AML oder PSCA auf Prostata Tumoren) als auch NK-Zellen oder zytotoxische T-Lymphozyten zu den Zielzellen rekrutieren. Durch den modularen Aufbau der Antikörperfragmente ist es ohne weiteres möglich, die aktivierenden Moleküle für die Immunzellen gegeneinander auszutauschen. Ebenso können die TAA-bindenden Domänen jederzeit durch andere ersetzt werden, um zusätzliche Antigene nutzen zu können. Jedoch mussten bisher für jede Tumorentität spezifische Zielstrukturen identifiziert werden, gegen welche sich die Immuntherapie richtete. Deshalb wäre ein universelles, induzierbares Antigen auf den Tumorzellen von Vorteil. Diese Eigenschaften bringt das La-Protein durch seine Oberflächentranslokation mit sich.

Die Strahlentherapie ist eine gängige Methode zur Behandlung von soliden Tumoren. Gleichzeitig wird das La-Protein der bestrahlten, apoptotischen Zellen vom Nukleus auf die Zelloberfläche transportiert. Von dort kann es auch in die Umgebung abgegeben werden und lokal an benachbarte Zellen binden (siehe Kapitel 4.4 und Schema in Abbildung 55). Das können strahlungsresistente Tumorzellen, Stroma- oder Endothelzellen sein, deren Fortbestehen das Überleben des Tumors sichern würde. Zur spezifischen Eliminierung dieser Zellen wurde eine immuntherapeutische Strategie entwickelt: Durch ein CD3xLa scBsDb-Molekül können CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten über ihren CD3-Korezeptor auf allen Zellen immobilisiert werden, die La-Protein auf der Oberfläche gebunden haben. Dadurch werden die T-Lymphozyten aktiviert und induzieren in den Zielzellen Apoptose.

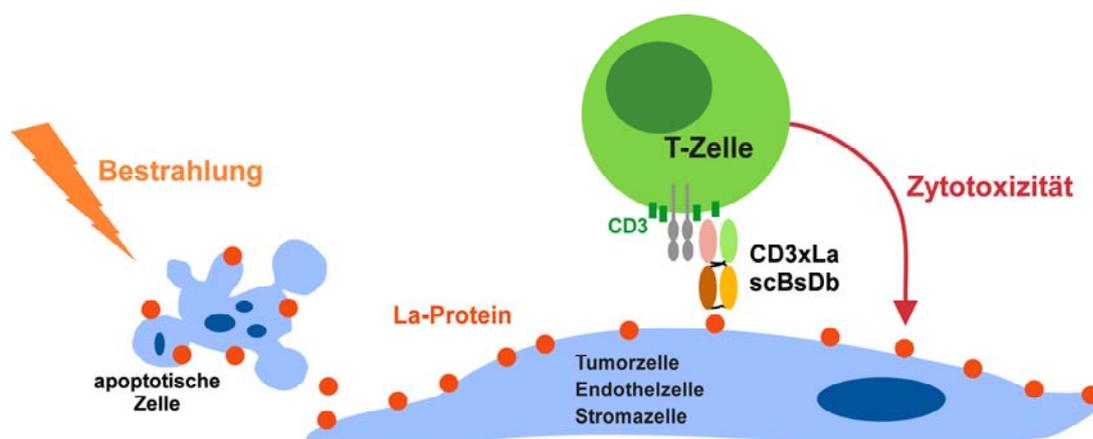


Abbildung 55: Kombinierte Strahlen- und Immuntherapie zur Behandlung von Tumoren.

Durch die Bestrahlung solider Tumore sollen möglichst alle Tumorzellen beseitigt werden. Gleichzeitig wird auf den bestrahlten Zellen das La-Protein angereichert und kann auch in die Umgebung freigesetzt werden. So bindet es an die Oberfläche strahlungsresistenter Tumorzellen, Endothelzellen oder Stromazellen. Durch den Einsatz eines bispezifischen Antikörpers CD3xLa scBsDb kann das La-Protein auf der Zelloberfläche erkannt werden und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen werden über ihren CD3-Korezeptor zu den Zielzellen rekrutiert. Sie lösen in den Zielzellen die Apoptose aus.

4.7.1. Identifizierung eines geeigneten anti-La-scFvs

Für die Entwicklung der anti-La-scFv-Moleküle wurden die mAks 5B9 und 7B6 herangezogen, da sie jeweils ein lineares Peptidepitop erkennen. Alle anderen charakterisierten mAks binden an Konformationsepitope, welche während der Apoptoseinduktion und Oberflächentranslokation des Proteins leicht verloren gehen können. Ausgehend von den Sequenzen der V_H - und V_L -Gene, die in pGEM[®]-T Easy kloniert waren, wurden die scFv-Derivate für beide mAks in den Vektor pSecTag2 B kloniert. Die Plasmide pSecTag2 B-7B6 scFv sowie pSecTag2 B-5B9 scFv wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Bachmann erzeugt und zur Verfügung gestellt. Die entsprechenden rekombinanten Proteine verfügen über eine N-terminale Igk-Signalsequenz, welche die Sekretion der scFv-Moleküle in das Zellkulturmedium vermittelt und dabei proteolytisch abgespalten wird. Daran schließen sich die V_H - und V_L -Domänen an, die über einen flexiblen Glycin-Serin-Linker ((G₄S)₃) miteinander verbunden sind. C-terminal sind den Proteinen ein c-myc-Tag sowie ein Hexahistidintag angefügt, um die spezifische Detektion bzw. die Reinigung über Ni-NTA-Affinitätschromatographie zu ermöglichen (siehe Abbildung 56A). Diese eukaryonten Expressionsvektoren wurden in HEK 293T-Zellen transfiziert. Die Totalextrakte der Zellen sowie die Zellkulturüberstände wurden im Immunoblot auf enthaltene anti-La-scFv-Moleküle analysiert (siehe Abbildung 56B). Für 5B9 scFv wurde mit anti-His eine positive Reaktion für die Zellpellets erzielt, d. h. die Transfektion hatte erfolgreich stattgefunden und das Protein war synthetisiert worden. Allerdings konnte es nicht in das Zellkulturmedium sezerniert werden und wurde, wie Immunfluoreszenzanalysen bestätigten, im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten. Im Gegensatz dazu wurde für den 7B6 scFv sowohl eine Proteinbande im Zellpellet als auch eine deutliche Bande im Zellkulturüberstand detektiert. Diese bestätigte die erfolgreiche Produktion des 7B6 scFv in HEK 293T-Zellen und dessen anschließende Sekretion. Das 7B6 scFv-Protein wurde über Ni-NTA-Affinitätschromatographie aus dem Zellkulturmedium gereinigt. Die einzelnen Fraktionen wurden im Western Blot, der mit anti-His entwickelt wurde, auf Vorhandensein des rekombinanten Proteins untersucht (siehe Abbildung 56C). Durch FACS-Analysen wurde die Bindung an mit rhLa-dekorierte Zellen untersucht. Das La-Protein wurde sowohl vom mAk 7B6 als auch vom 7B6 scFv spezifisch gebunden. Die Kontrollzellen, welche nicht mit rhLa-Protein vorbehandelt worden waren, wurden in beiden Fällen nicht angefärbt (siehe Abbildung 56D).

4. Ergebnisse

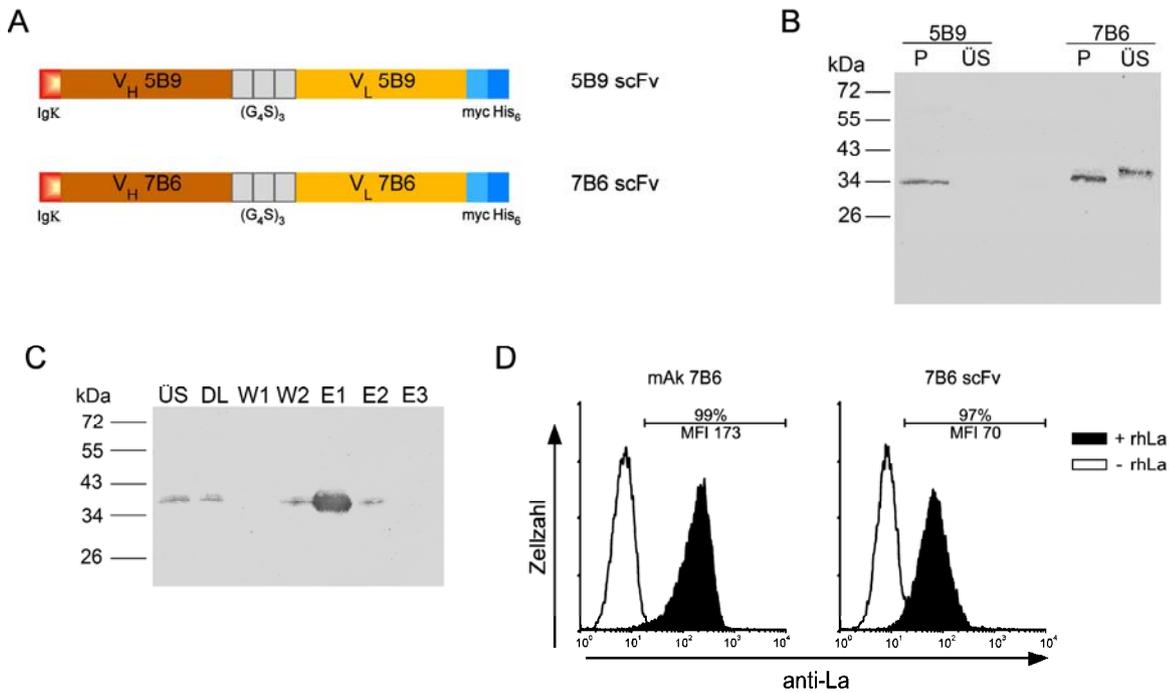


Abbildung 56: Aufbau, eukaryote Produktion sowie Bindungsstudien für die anti-La-scFvs.

A) In den anti-La-scFv-Molekülen sind die variablen Domänen der mAks 5B9 bzw. 7B6 in der Reihenfolge V_H-V_L über einen flexiblen Glycin-Serin-Linker ((G₄S)₃) miteinander verknüpft. Die vom Vektor pSecTag2 B codierte IgK-Signalsequenz ermöglicht die Sekretion der Proteine in das Medium. C-terminal sind ein c-myc- und ein Hexahistidin-(His₆-) Tag angefügt. **B**) Die in den Vektor pSecTag2 B klonierten scFv-Moleküle wurden in HEK 293T-Zellen transfiziert und nach 72 h wurden Totalextrakte der Zellen (P) sowie das Zellkulturmedium (ÜS) im Western Blot auf enthaltene anti-La-scFv-Proteine untersucht. Der Immunoblot wurde mit anti-His und anti-Maus-IgG-AP inkubiert. **C**) Reinigung des 7B6 scFv aus Zellkulturüberstand mit Hilfe einer Ni-NTA Spin Column. Aliquots des Überstandes (ÜS), Durchlaufs (DL), der Waschfraktionen (W1, W2) und Elutionsfraktionen (E1-E3) wurden im Western Blot mit anti-His und anti-Maus-IgG-AP auf vorhandenes 7B6 scFv-Protein analysiert. **D**) Nach der Reinigung des 7B6 scFv aus dem Zellkulturüberstand wurde die Bindung des Proteins (10 µg) auf La-dekorierten Tumorzellen untersucht. Die Detektion erfolgte mit anti-c-myc-FITC. Parallel wurden Zellen mit mAk 7B6 und anti-Maus-IgG-Alexa Fluor[®] 488 angefärbt. Außerdem wurden jeweils Zellen ohne vorherige La-Beladung (-rhLa) mit den Antikörpern inkubiert.

4.7.2. Entwicklung des Diabodies CD3x7B6 scBsDb für die Immuntherapie

Nachdem der 7B6 scFv-Diabody das rhLa-Protein auf der Zelloberfläche binden konnte, wurde er für die Generierung eines CD3x7B6 scBsDb-Proteins verwendet. Der CD3 scFv war ebenfalls in der Arbeitsgruppe etabliert und genau charakterisiert worden. Er wurde bereits mit verschiedenen anti-TAA scFvs kombiniert, um scBsDb-Moleküle gegen verschiedene Tumorarten zu erhalten. Diese Proteine sind in der Lage, CD3⁺ CD8⁺ (zytotoxische) T-Lymphozyten mit TAA-tragenden Tumorzellen zusammen zu bringen. Für das scBsDb-Format wurden in der Arbeitsgruppe spezielle Module entwickelt, die als innere Kassetten (*inner cassettes*, ic) und äußere Kassetten (*outer cassettes*, oc) bezeichnet werden. Sie können einfach gegeneinander ausgetauscht oder um bestimmte Module erweitert werden.

Das Plasmid pSecTag2 B-CD3 scFv oc wurde zur Verfügung gestellt. Darin sind die variablen Domänen in der Reihenfolge V_H CD3-V_L CD3 organisiert und durch einen flexiblen Glycin-Serin-Linker miteinander verbunden. Für die zweite Antigen-spezifität des Diabodies musste in diese äußere Kasette das ebenfalls in der Arbeitsgruppe erzeugte 7B6 scFv ic-Gen mit der Domänenfolge V_L 7B6-(G₄S)₅-V_H 7B6-G₄S eingefügt werden. Durch Behandlung mit dem Restriktionsenzym

*Bam*HI wurde der Vektor pSecTag2 B-CD3 scFv oc zwischen V_H CD3 und V_L CD3 linearisiert und das parallel durch *Bam*HI erzeugte DNA-Fragment der 7B6 scFv ic konnte durch Ligation eingesetzt werden (Abbildung 57A). Die erhaltenen Klone wurden durch Sequenzierung überprüft. Anschließend wurde das resultierende Plasmid pSecTag2 B-CD3x7B6 scBsDb transient in HEK 293T-Zellen transfiziert, um die Produktion und Sekretion des CD3x7B6-Diabodies zu analysieren. Durch den verwendeten Vektor verfügt der Diabody wiederum über eine N-terminale Igk-Signalsequenz und C-terminal folgen dem Protein ein c-myc-Tag und ein Hexahistidintag (siehe Abbildung 57B).

Um für weitere Experimente ausreichende Proteinmengen zur Verfügung zu haben, wurde eine stabile Zelllinie durch Transduktion etabliert, die kontinuierlich CD3x7B6-Protein sezernierte. Hierfür war eine Amplifikation der CD3x7B6-DNA-Sequenz über PCR nötig, um N-terminal eine *Eco*RI- und C-terminal eine *Kpn*2I-Schnittstelle anzufügen. Über diese beiden Restriktionsenzyme erfolgte schließlich die Klonierung in den retroviralen Expressionsvektor pczCFG5.1. Für die Transduktion wurden ebenfalls HEK 293T-Zellen als Zielzellen verwendet.

Sowohl die transient transfizierten als auch die stabil transduzierten HEK 293T-Zellen waren in der Lage, das CD3x7B6 scBsDb-Protein herzustellen und dieses in das Zellkulturmedium abzugeben. Aus diesem konnte es über Ni-NTA-Affinitätschromatographie gewonnen werden (siehe Abbildung 57C). Die Bindung des Proteins an $CD3^+$ T-Lymphozyten wurde auf humanen PBMCs untersucht (siehe Abbildung 57D). Das Protein konnte ebenso wie der als Positivkontrolle verwendete Antikörper anti-CD3-FITC auf 74% der Lymphozyten nachgewiesen werden. Damit wurde die Funktionalität des CD3-Arms des Diabodies unter Beweis gestellt.

Des Weiteren wurde die Bindung des CD3x7B6-Moleküls an rhLa auf der Zelloberfläche analysiert. Die 7B6-Seite des Diabodies konnte 98% der Zellen erkennen. Dies entsprach nahezu den 100% des mAks 7B6, der durch seine bivalente Bindung erwartungsgemäß eine stärkere Verschiebung der gesamten Zellpopulation im grünen Fluoreszenzkanal hervorrief (siehe Abbildung 57E).

Da das CD3x7B6-Protein sowohl auf La-dekorierten Tumorzellen als auch auf $CD3^+$ T-Zellen nachgewiesen werden konnte, sollte es bei der Kokultur beider Zellpopulationen eine Quervernetzung zwischen Tumorzellen und T-Effektorzellen bewirken. Dadurch werden die zytotoxischen T-Zellen aktiviert und induzieren in den Zielzellen Apoptose (siehe Schema in Abbildung 55). Um diese Effektormechanismen zu verdeutlichen, wurde ein Chromfreisetzungstest durchgeführt. Die Tumorzellen wurden nach der Chrombeladung mit unterschiedlichen Mengen an rhLa-Protein inkubiert. Anschließend wurden sie für 18 h mit voraktivierten T-Zellen kokultiviert. Bei diesen T-Zellen handelte es sich um überwiegend $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen, die durch Inkubation von PBMCs mit IL-2 und anti-CD3 (OKT3) gewonnen wurden. Dieses Protokoll wurde am Institut für Immunologie entwickelt und die erhaltenen T-Zellen sind ausführlich charakterisiert worden. Die Ergebnisse des Chromfreisetzungstests sind in Abbildung 58 gezeigt.

4. Ergebnisse

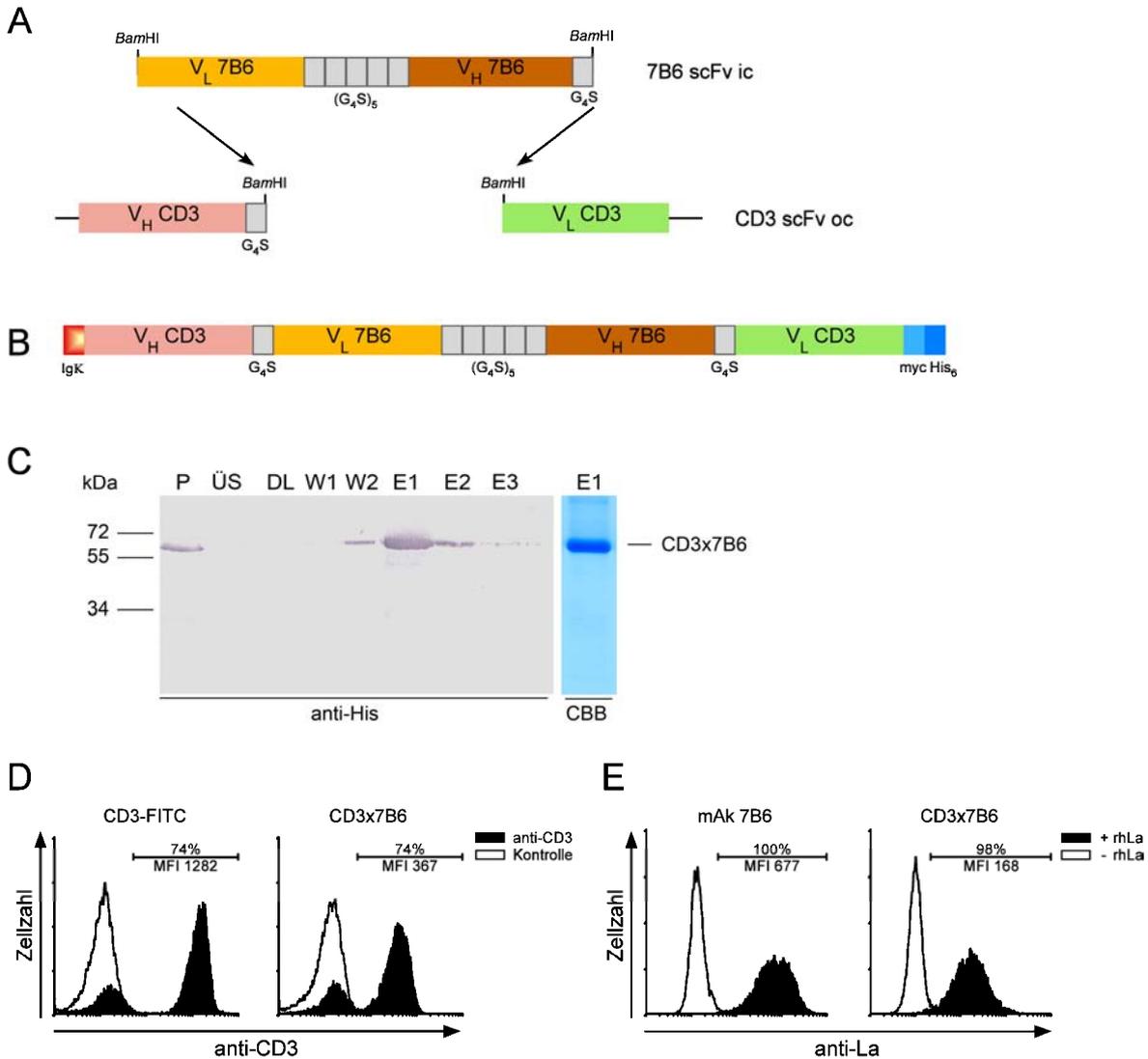


Abbildung 57: Klonierungsstrategie, Reinigung und Bindungsstudien des CD3x7B6 scBsDb.

A) Die DNA-Sequenz der 7B6 scFv ic wurde über *Bam*HI-Schnittstellen in den Vektor pSecTag2 B-CD3 scFv oc kloniert, um das Plasmid pSecTag2 B-CD3x7B6 scBsDb zu erhalten. **B)** Das erwartete Protein CD3x7B6 besitzt ein N-terminales Igk-Signalpeptid, welches die Sekretion in das Zellkulturmedium vermittelt. C-terminal sind dem Diabody ein c-myc- sowie ein Hexahistidin- (His₆-) Tag angefügt, um die Detektion des Proteins bzw. die Reinigung über Ni-NTA-Agarose zu gestatten. **C)** Reinigung des eukaryont hergestellten CD3x7B6 scBsDb. Von transduzierten HEK 293T CD3x7B6 scBsDb-Zellen wurde der Überstand (ÜS) abgenommen und auf eine Ni-NTA Spin Column aufgetragen. Der Durchlauf (DL) wurde gesammelt. Anschließend wurde mit 10 mM Imidazol (W1) und 20 mM Imidazol (W2) gewaschen. Die Elution des Diabodies erfolgte mit 350 mM Imidazol (E1-E3). Ein Teil der Zellen wurde in 2 x SDS-Probenpuffer aufgenommen (Pellet, P) und zusammen mit Aliquots aller Fraktionen auf ein 12%iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach dem Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran wurde CD3x7B6 scBsDb mit anti-His und anti-Maus-IgG-AP detektiert. Von Elution 1 wurden außerdem 10 µl auf ein zweites Gel aufgetragen, welches mit Coomassie Brilliant Blau (CBB) gefärbt wurde. **D)** Bindungsanalyse auf CD3⁺ T-Lymphozyten. Als Positivkontrolle ist der Antikörper anti-CD3-FITC (schwarz) im Vergleich zu seiner Isotypkontrolle dargestellt. Parallel wurden die PBMCs mit 10 µg CD3x7B6 inkubiert, das mit anti-c-myc-FITC nachgewiesen wurde (schwarz). Als Kontrolle wurde anti-c-myc-FITC allein eingesetzt. **E)** FACS-Analyse auf HEK 293T PSCA-Zellen, welche mit 9 µM rhLa-Protein (+rhLa) oder ohne dieses (-rhLa) vorbehandelt worden waren. Die Detektion des La-Proteins erfolgte entweder mit mAk 7B6 und anti-Maus-IgG-Alexa Fluor[®] 488 oder mit 10 µg CD3x7B6 und anti-c-myc-FITC.

Wurden die Zielzellen nicht mit rhLa-Protein vorbehandelt, so unterscheiden sich die Werte der spezifischen Lyse in Abwesenheit oder Gegenwart des Diabodies CD3x7B6 kaum (6% *versus* 8%). Fand eine Beladung der Zellen in Gegenwart von 1 μM rhLa statt, so konnte das Protein CD3x7B6 die spezifische Lyse signifikant von 2% auf 16% erhöhen ($p=0,0003$). Mit zunehmender Antigenkonzentration nahm auch die Anzahl an Zielzellen zu, die von den T-Zellen zerstört wurden. Bei 10 μM La-Protein wurden unter Zugabe von CD3x7B6 52% der Zielzellen lysiert ($p=0,0002$). Wurde die Menge an rhLa-Protein zur Beladung der Tumorzellen nochmals verdreifacht, so stieg die spezifische Lyse in Gegenwart des Diabodies auf 56% an ($p=0,0002$).

Es konnte somit ein funktioneller CD3xanti-La-Diobody generiert werden, der in der Lage ist, das La-Protein auf Tumorzellen spezifisch zu detektieren. Durch seinen zweiten Bindungsarm werden CD3⁺ T-Lymphozyten zu den Zielzellen rekrutiert und durch die Quervernetzung gegen diese aktiviert. Somit eignet sich das neue Protein CD3x7B6 scBsDb für den Einsatz in einer kombinierten Strahlen- und Immuntherapie.

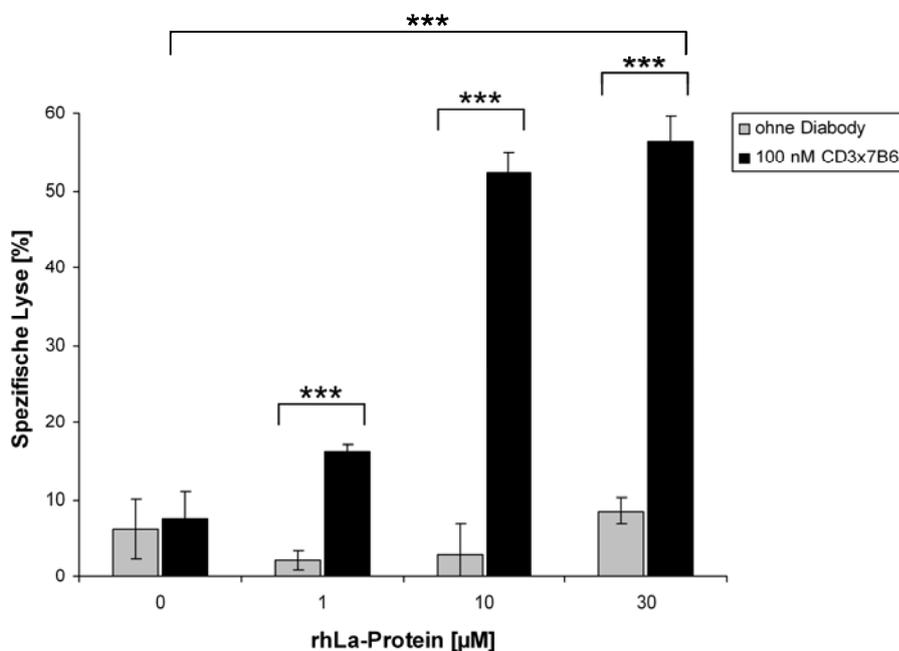


Abbildung 58: T-Zell-vermittelte Zytotoxizität in Gegenwart von CD3x7B6.

Für den Zytotoxizitätstest wurden die Zielzellen HEK 293T PSCA mit ^{51}Cr beladen. Danach wurde je ein Viertel der Zellen ohne La-Protein bzw. mit 1 μM , 10 μM oder 30 μM rhLa-Protein inkubiert. Anschließend wurden die Zielzellen im Verhältnis 1:20 mit voraktivierten T-Zellen kokultiviert. Des Weiteren wurde zu einem Teil der Ansätze 100 nM CD3x7B6-Protein hinzugegeben. Nach 18 h wurde die Chromfreisetzung gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung und deren Standardabweichungen. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test bestimmt (** $p < 0,001$). Von drei untersuchten ist ein repräsentativer Spender gezeigt.

5. Diskussion

5.1. Charakterisierung der monoklonalen anti-La-Antikörper

In gesunden Individuen findet keine spezifische Immunantwort gegen körpereigene Strukturen statt. Durch die zufälligen Rekombinationsereignisse entstehen zwar viele Oberflächenrezeptoren auf B- und T-Zellen, die Autoantigene erkennen können, doch diese Zellen werden möglichst schnell aus dem Körper eliminiert. Die verbleibenden toleranten T- und B-Lymphozyten gelangen in die Peripherie, um den Organismus vor Pathogenen zu schützen oder maligne transformierte Körperzellen zu bekämpfen. Für T-Lymphozyten ist die negative Selektion weitaus strenger als für B-Zellen [179], da Aktivierung, Affinitätsreifung sowie Klassenwechsel der B-Lymphozyten von der T-Zell-Hilfe abhängig sind. Defekte Kontrollmechanismen führen jedoch immer wieder zu Autoimmunerkrankungen. Die IgG-Autoantikörper, die beispielsweise bei SLE-Patienten in hoher Konzentration im Serum vorkommen, sind überwiegend spezifische, hypermutierte Immunglobuline, d. h. an ihrer Entstehung müssen T-Zellen beteiligt gewesen sein.

Mäuse, die ein hLa-Transgen tragen, sind tolerant gegen das hLa-Antigen und entwickeln keinen SLE-Phänotyp. Werden diesen Tieren aber hLa-spezifische CD4⁺ T-Zellen aus einem wt-Tier übertragen, findet eine T-Zell-vermittelte Induktion von anti-hLa-Antikörpern statt [180]. Es existieren also autoreaktive naive B-Zellen in den hLaTg-Mäusen, die durch den T-Zell-Transfer zur Produktion von anti-hLa-Immunglobulinen stimuliert werden können. Die Milzzellen einer derart behandelten hLaTg-Maus wurden mit Myelomzellen fusioniert. Es wurden mehrere monoklonale IgG- und IgM-Antikörper erhalten, die rhLa-Protein im ELISA erkannten. Ein weiterer IgM-Antikörper (312G) war spezifisch für das nukleäre Antigen Ro 60. Anti-Ro 60-Antikörper entstehen durch intermolekulares *epitope spreading* und treten auch bei SLE-Patienten oft zusammen mit anti-La-Autoantikörpern auf. Alternativ wurden anti-La-mAks aus Mäusen gewonnen, die zuvor mehrfache Immunisierungen mit dem hLa-Antigen erfahren hatten. Hierfür wurde eine Vielzahl von Fusionen durchgeführt, bis schließlich die beiden anti-hLa-mAks 5B9 und 7B6 isoliert werden konnten.

Zunächst wurde überprüft, ob die Hybridomazellen, die aus der hLaTg-Maus generiert worden waren, tatsächlich auf hLa-transgene B-Zellen zurückzuführen sind. Für alle diese Klone konnte das hLa-Protein zusätzlich zum mLa-Protein im Immunoblot nachgewiesen werden (Abbildung 10). Stattdessen enthielten die Hybridomazellen, die nach mehrfacher Immunisierung von wt-Mäusen erhalten worden waren, nur mLa. Da die Immunisierung von wt-Mäusen nur wenige anti-hLa-mAks hervorbrachte, war die Zahl an gewonnenen Hybridomen nach dem T-Zell-Transfer überraschend groß. Es lag die Vermutung nahe, dass es sich vielleicht nicht um individuelle Antikörper handelte, sondern um verwandte Klone, die während der Affinitätsreifung im Sekundärfollikel der Lymphknoten aus einer ursprünglichen B-Zelle hervorgegangen waren. Deshalb war die Untersuchung der unterschiedlich hergestellten mAks hinsichtlich ihrer V_H- und V_L-Sequenzen, ihrer Antigenspezifität (im Immunoblot, in der Immunpräzipitation und Immunfluoreszenz) sowie der von ihnen erkannten Epitope ein wesentliches Ziel dieser Arbeit.

5.1.1. Sequenzanalysen für die variablen Domänen der Antikörper

Für alle Hybridomazellklone wurden die DNA-Sequenzen ermittelt, die für die variablen Domänen der schweren und leichten Antikörperketten codieren (Abbildung 11). Durch Vergleich mit der NCBI-Datenbank konnte für jedes einzelne V-, D- und J-Element das zugrunde liegende Keimbahngensegment identifiziert werden (Tabelle 3). Die Antikörper sind voneinander unabhängig entstanden, da sie individuelle V- (D-) J-Rekombinationen zur Generierung ihrer V_H- und V_L-Gene vollzogen haben. Die V_L-Gene einiger Antikörper bestehen aus identischen V_I- und J_I-Elementen. So nutzten die Hybridome 22A und 312G gleichermaßen V_I kk4 und J_I JK5, doch durch die Assoziation der leichten Ketten mit völlig unterschiedlichen schweren Ketten entstanden sogar unterschiedliche Antigenspezifitäten (22A anti-La, 312G anti-Ro 60).

Die V_L-Gene der anti-La-mAks 27E, 32A und 13C5B bestehen aus V_I aa4 und J_I JK1. Ihre V_H-Domänen werden von Genabschnitten der Familien V_H J558 und D_H DSP2 codiert. Darüber hinaus verfügen die beiden IgG-Antikörper 27E und 32A über ein J_H JH2-Element. Die verwandten V-, D- und J-Genabschnitte, die beide Antikörper ausmachen, geben Grund zu der Vermutung, dass sie auch deren gemeinsame Epitopregion innerhalb des hLa-Proteins (AS 10-100, siehe Kapitel 4.1.4.5) bedingen. Neueste Studien belegen, dass die CDR2- und CDR3-Regionen von anti-nukleären Antikörpern (ANAs) bereits durch die Auswahl bestimmter Keimbahnsequenzen festgelegt werden und die Spezifität danach durch zusätzliche Hypermutationen verbessert werden kann [181]. Ebenso wie 27E und 32A erkennen zwei weitere Antikörper diese Epitopregion: mAk 312B und mAk 2F9. Der mAk 312B enthält ebenfalls eine verwandte schwere Kette, nutzt aber eine andere leichte Kette. Der mAk 2F9 hingegen nutzt komplett unterschiedliche V_I-, J_I-, V_H- sowie D_H-Genabschnitte. Dadurch wird deutlich, dass auch weitere Varianten der V-D-J-Rekombination die gleiche Antikörperspezifität erzeugen können. Zusätzlich scheint das La-Motiv ein besonders immunogenes diskontinuierliches Epitop (AS 12-28 und 82-99) zu enthalten, gegen das auch bei Autoimmunpatienten verstärkt Antikörper gebildet werden [182]. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass Autoantikörper oft Konformationsepitope in konservierten, funktionellen Domänen der Antigene erkennen [183].

Auffällig ist das Auftreten des V_H J558-Elements in acht der insgesamt zwölf untersuchten mAks. Es ist bekannt, dass die J558-Gene die größte V_H-Genfamilie darstellen und entsprechend oft in den Antikörper-codierenden Genen präsent sind [184, 185]. Dementsprechend entstammen die in den anderen anti-La-mAks enthaltenen V_H-Genabschnitte auch anderen, recht häufig vorkommenden Genfamilien (siehe Tabelle 7). Die Nutzung einer bestimmten V_H-Genfamilie für die V-D-J-Rekombination kann zwar von Maus zu Maus variieren [186], doch es ist auffällig, dass die hLaTg-Maus für sieben der acht anti-La-mAks ein V_H-Gen der J558-Familie gewählt hat. Analysen von anti-dsDNA- und anti-ssDNA-Autoantikörpern aus SLE-Mausmodellen zeigten ebenfalls eine gehäufte Verwendung des V_H J558-Elements [187, 188]. Zwar unterscheidet sich das generelle B-Zell-Repertoire von wt- und SLE-Mäusen nicht bezüglich der Nutzung von V_H J558-Genabschnitten, d. h. SLE führt nicht automatisch zu einer bevorzugten Verwendung dieser Genabschnitte, doch macht ein Vergleich von ANAs und nicht-ANAs in diesen SLE-Mäusen deutlich, dass die V_H J558-Elemente unter den ANAs überdurchschnittlich oft auftreten [181, 186,

189]. Da die Keimbahnsequenzen der V_H J558-Regionen bereits für AS codieren, die für die Wechselwirkung mit ssDNA und dsDNA wichtig sind, kann es unter den ANAs zur Anreicherung dieser V_H -Familie kommen [190].

Tabelle 7: Auswahl an V_H -Genfamilien und Anzahl der zugehörigen Gene in C57BL/6-Mäusen.

Von den insgesamt 110 funktionellen V_H -Genen gehören 84 den aufgeführten Familien an, die auch während der Rekombination für die anti-La-mAks genutzt wurden [185].

V_H -Genfamilie	Zahl der Gene
J558	52
VH7183	10
VHQ52	9
3609	8
VHJ606	5

Für die Bestimmung der somatischen Hypermutationen wurde jede Antikörpersequenz mit der ermittelten Keimbahnsequenz verglichen. Die abweichenden Nukleotide wurden in den DNA-Sequenzen der leichten und schweren Ketten gekennzeichnet (Abbildung 11). Jede Antikörpersequenz hat individuelle Nukleotidaustausche erfahren, wodurch wiederum bestätigt wird, dass es sich um voneinander unabhängige Hybridomazellklone handelt. In den V_L -Genen treten kaum Mutationereignisse auf und die IgM-Antikörper entsprechen sogar der Keimbahnsequenz (Tabelle 4). Für die V_H -Gene wurden deutlich mehr Nukleotidaustausche detektiert, die vor allem in den CDR1- und CDR2-Regionen vorkommen (Tabelle 5). Die hohe Variabilität der hauptsächlich für die Antigenerkennung verantwortlichen CDR3-Regionen wurde durch homologe Rekombination der V- (D-) und J-Gene erzielt. Dabei wurden gelegentlich zusätzliche Nukleotide in die DNA-Sequenz eingebaut oder es gingen aufgrund von Homologien zwischen den einzelnen DNA-Segmenten überlappende Nukleotidbereiche verloren (Abbildung 11, Tabellen 4 und 5). Da der genetische Code degeneriert ist, führt nicht jede Nukleotidveränderung auch zu einem AS-Austausch auf Proteinebene. Für die Affinitätsreifung sind allerdings nur die veränderten AS von Bedeutung, da sie die Antigenbindung verbessern oder verschlechtern können. In Übereinstimmung mit den wenigen Mutationen auf DNA-Ebene haben in den leichten Ketten der Antikörper nur sehr wenige AS-Austausche stattgefunden (Tabelle 5, Abbildungen 12 und 13). Im Gegensatz dazu haben die somatischen Hypermutationen vor allem bei den IgG-Antikörpern zu veränderten AS-Sequenzen der schweren Ketten geführt. So weist der mAk 22A im Vergleich zu seiner Keimbahnsequenz 17 mutierte AS in der schweren Kette auf. Bei den IgM-Antikörpern hat die Affinitätsreifung erst begonnen. Die V_H -Gene unterscheiden sich von der Keimbahn, aber die Affinität der entsprechenden B-Zell-Rezeptoren scheint noch nicht hoch genug gewesen zu sein, um einen Klassenwechsel nach IgG zuzulassen. Eine Sonderstellung nimmt der mAk 2F9 ein. Trotz weniger somatischer Hypermutationen hat er bereits einen Klassenwechsel von IgM nach IgG1 vollzogen.

5.1.2. Unterschiedliche Antigenbindungseigenschaften der Antikörper

Die einzelnen IgG-Antikörper besitzen nicht nur individuelle AS-Sequenzen, sondern variieren auch in der Antigenerkennung (Kapitel 4.1.3 bzw. Tabelle 6). Alle IgG-Antikörper sind in der Lage, prokaryont hergestelltes bzw. eukaryontes hLa-Protein im Immunoblot zu erkennen. Die Antikörper 22A und 32A können das verwandte mLa-Protein überhaupt nicht binden. Zwei weitere mAks (SW5 und 7B6) unterscheiden zwischen prokaryont und eukaryont produzierten mLa-Proteinen und erkennen nur die bakterielle, wahrscheinlich nicht post-translational modifizierte Variante (Abbildung 15). Die Bindung der nativen Antigene (hLa und mLa) wurde mit einem Totalextrakt von 3T3-Mauszellen, die zusätzlich das hLa-Gen stabil exprimieren, untersucht und mittels Immunpräzipitation nachgewiesen. Nur die mAks SW5, 22A, 27E und 312B waren in der Lage, deutliche Mengen an hLa-Protein zu binden. Für die Präzipitation des mLa-Proteins eignete sich 312B am besten (Abbildung 16).

Bei den Immunfluoreszenzfärbungen humaner HeLa-Zellen und Maus-3T3-Zellen traten deutliche Unterschiede zwischen den IgG- und den IgM-Antikörpern auf. Mit Ausnahme des mAks 7B6, dessen Besonderheiten später genauer betrachtet werden (Abschnitt 5.1.4), wurden für alle anderen IgG-Hybridomaüberstände spezifisch gefärbte humane Zellkerne beobachtet (siehe Abbildung 17). Bei einigen Antikörpern waren die Färbungen von der Fixierungsmethode abhängig. So konnten z. B. 24BG7 und 22A ihr Antigen nur nach PFA-Fixierung detektieren, die MeOH/EGTA-Behandlung der Zellen verhinderte die Bindung beider Antikörper. Hingegen färbte der mAk 5B9 nach MeOH/EGTA-Fixierung die Zellkerne deutlich an und bei PFA-fixierten Zellen trat eine zusätzliche zytoplasmatische Hintergrundfärbung auf. Wiederum abhängig vom angewendeten Fixierungsverfahren entsprach die Reaktivität gegen das mLa-Protein (siehe Abbildung 18) derjenigen in den Immunoblots. Für die IgM-Antikörper wurden auf beiden Zelllinien unabhängig von der Art der Fixierung zytoplasmatische Färbemuster erzielt (siehe Abbildung 19). Die beiden anti-La-mAks 13C5B und 16C färbten das Zytoplasma homogen an und nach PFA-Behandlung wurden in einigen HeLa-Zellen zusätzlich die Nukleoli detektiert. Für den anti-Ro 60-Antikörper wurden langgestreckte Fasern beobachtet, die an einer Stelle nahe des Zellkerns besonders kondensiert waren. Diese Kreuzreaktion mit Intermediärfilamenten wurde bereits für andere anti-Ro 60 IgM-Antikörper beschrieben [191].

5.1.3. Epitopuntersuchungen

Für die verschiedenen IgG-Antikörper konnten sowohl lineare Peptidepitope als auch diskontinuierliche Konformationsepitope identifiziert werden (Kapitel 4.1.4 sowie Abbildung 59). Die vom 5B9-Antikörper erkannte AS-Sequenz (AS 95-104, Abbildung 21) befindet sich im Verbindungsbereich zwischen La-Motiv und RRM1-Domäne. Durch die kooperative RNA-Bindung beider Domänen nimmt die Epitopregion eine α -helikale Konformation ein [107, 108]. Zwischen Mensch und Maus unterscheidet sich diese Sequenz an nur einer Position. Da es sich jeweils um eine basische AS handelt (Lysin bzw. Arginin), wird die Antikörperbindung nicht beeinflusst.

Das zweite Peptidepitop (AS 311-328 des hLa-Proteins) liegt auf der C-terminalen Helix der RRM2-Domäne [103] und wird von 7B6 erkannt (Abbildung 23). Es überlappt (partiell) mit der

beschriebenen Dimerisierungsdomäne, dem NRE und dem NoLS [114, 116, 118, 127]. Einerseits verhindert die Phosphorylierung an S325 [68] die Bindung des Antikörpers, andererseits muss das mLa-Protein eine störende post-translationale Modifikation an T318 aufweisen, denn der Antikörper erkennt eukaryontes hLa-Protein und bakteriell hergestelltes mLa, aber nicht eukaryont produziertes mLa (Abbildung 24).

Der IgM 16C assoziiert ebenfalls mit der C-terminalen Epitopregion. Es ist der einzige IgM-Antikörper, der bei ausreichend aufgetragenen Proteinmengen sein bakteriell produziertes Antigen im Western Blot detektieren kann. Durch seine geringe Affinität war die Epitopeingrenzung schwierig. Das kürzeste Protein, das vom mAk 16C erkannt wurde, ist La₂₇₈₋₄₀₈ (Abbildung 20).

Alle IgG-Antikörper aus der hLaTg-Maus binden an Konformationsepitope und können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die mAks 22A und 24BG7 verhielten sich nicht nur bei den Immunfluoreszenzfärbungen bzgl. der Fixierungsmethode sehr ähnlich, sondern erkennen auch beide die N-terminalen und C-terminalen Bereiche der RRM1-Domäne (Abbildung 27). Der zweite diskontinuierliche Epitopbereich, den die mAks 312B, 27E, 2F9 sowie 32A binden, wird von den N- und C-terminalen AS des La-Motivs gebildet (Abbildung 28). Diese Region ist auch bei Patienten mit Sjögren-Syndrom besonders immunogen und induziert viele Autoantikörper [182]. Des Weiteren scheint C18 eine Rolle bei der Antikörperbindung zu spielen, denn alle vier mAks können das oxidierte Antigen nicht mehr erkennen (Abbildung 29). Eine Übersicht aller für die mAks eingegrenzten Epitopregionen ist in Abbildung 59 zu finden.

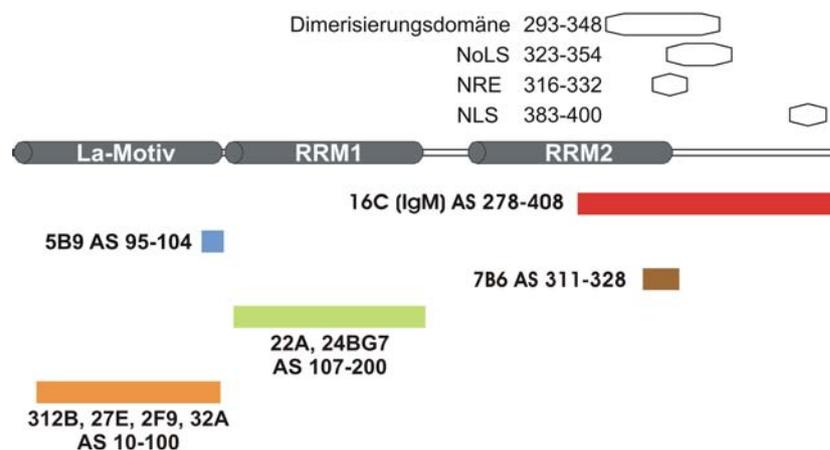


Abbildung 59: Die anti-La-mAks erkennen unterschiedliche Epitope innerhalb des Proteins.

Schematische Darstellung des hLa-Proteins mit seinen drei Domänen und den funktionellen Bereichen. Die verschiedenen Epitopregionen sind farblich dargestellt und geben den Namen der mAks an, die die entsprechenden AS-Bereiche binden.

5.1.4. Besonderheiten des 7B6-Antikörpers und seiner Epitopregion

Bei der Verwendung des 7B6-Antikörpers für Immunfluoreszenzuntersuchungen traten einige Unterschiede im Vergleich zur Antigenbindung auf dem Immunoblot auf. Das hLa-Protein aus HeLa-Zellen wurde im Western Blot detektiert, doch der Antikörper konnte auch nach verschiedenen Fixierungsverfahren keine spezifischen Kernfärbungen in der Immunfluoreszenz erzeugen. Möglicherweise wird sein Epitop von einem nukleären Interaktionspartner (ein Protein, DNA oder RNA) verdeckt (siehe Schema in Abbildung 60A). Deshalb wurden für den C-terminalen Bereich des La-Proteins funktionelle Studien zur RNA-Bindung, DNA-Bindung und Dimerisierung vorgenommen (Abbildung 26). Wie erwartet, sind das La-Motiv und die RRM1-Domäne vor allem für die RNA-Bindung zuständig [103, 105, 107]. Das La₃₁₈₋₄₀₈-Fragment war sowohl in der Lage, DNA zu binden als auch mit dem rhLa-Protein zu dimerisieren, doch das 7B6-Epitop (AS 311-328) war für beide Interaktionen nicht ausreichend. Das längere Peptid La₃₀₃₋₃₄₄ konnte schwach DNA binden und war recht gut in der Lage, das rhLa-Protein in einem Far-Western Blot auf der Membran zu immobilisieren. Aufgrund dieser Ergebnisse werden die DNA-Bindungsdomäne und Dimerisierungsdomäne C-terminal vom 7B6-Epitop vermutet, zumal der Epitopbereich für die nukleäre Retention benötigt wird. Deshalb ist ein Protein des Zellkerns, das die nukleäre Retention vermittelt, wahrscheinlich der Grund für die Unzugänglichkeit des 7B6-Epitops in HeLa-Zellen. Eine Phosphorylierung des S325 als Ursache dafür, dass das 7B6-Epitop im Nukleoplasma nicht vom Antikörper erkannt wird, kann ausgeschlossen werden, weil das Protein dann auch im Western Blot quantitativ phosphoryliert wäre und analog zu den 7B6-Epitop-Punktmutanten (Abbildungen 24 und 25) nicht vom mAk 7B6 gebunden werden könnte.

Wurden die HeLa-Zellen jedoch mit Plasmiden transfiziert, die für das GFP-hLa-Fusionsprotein codieren, so konnte 7B6 die Zellkerne der transfizierten Zellen anfärben. Die Ursache kann eine Limitierung des nukleären Bindepartners sein, der die im Überschuss vorliegenden Epitope nicht mehr vollständig abdecken kann (Abbildung 60B). Trotzdem ist das (GFP-) La-Protein im Zellkern lokalisiert, wofür allein das NLS sorgt (siehe Shuttlingsstudien in Kapitel 4.3 sowie 5.2).

Durch Überlagerung der roten und grünen Fluoreszenzkanäle wird besonders deutlich, dass sich die intrazelluläre GFP-hLa-Verteilung und die erzielte 7B6-Färbung voneinander unterscheiden. Bei den GFP-hLa-Fusionsproteinen, die alle das C-terminale NLS enthalten, heben sich die Nukleoli im grünen Fluoreszenzkanal verstärkt vom ebenfalls GFP-enthaltenden Nukleoplasma ab (Abbildungen 22C und 25B). Hingegen färbt der mAk 7B6 entweder die kompletten Kerne homogen an oder spart im Falle des kurzen Peptidepitops die Nukleoli sogar aus. Da das 7B6-Epitop auch einen Teil des NLS ausmacht, verhindert wahrscheinlich das als Interaktionspartner beschriebene Nukleolin die Antikörperbindung in den Nukleoli [81, 118].

Die GFP-7B6-Peptidepitop-Fusionsproteine ohne NLS liegen ebenso wie das GFP-Kontrollprotein sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern vor. Die grüne Fluoreszenz ist im Bereich der Zellkerne sogar etwas stärker (Abbildung 25A). Stattdessen färbt der mAk 7B6 die zytoplasmatischen Bereiche wesentlich besser als die Zellkerne. Wahrscheinlich wird die Bindung des Antikörpers an sein Epitop auch hier von dem nukleären Bindepartner vermindert.

Schließlich konnte das endogene hLa-Protein untransfizierter HeLa-Zellen vom mAk 7B6 gebunden werden, wenn die Zellen nach der Fixierung mit einer Wasserstoffperoxid-PBS-Lösung behandelt wurden (Abbildung 31). Ähnliche Ergebnisse ließen sich erzielen, indem die lebenden Zellen einer UV-Bestrahlung ausgesetzt und später fixiert und mit 7B6 gefärbt wurden. Durch beide Methoden wurde das Peptidepitop ROS-vermittelt für den Antikörper zugänglich gemacht, d. h. die Wechselwirkung mit dem vermuteten Protein, das die nukleäre Retention vermittelt, wird unter zellulären Stressbedingungen aufgehoben (siehe Abbildung 60C). Folglich wird das Protein verstärkt aus dem Kern exportiert und reichert sich im Zytoplasma an.

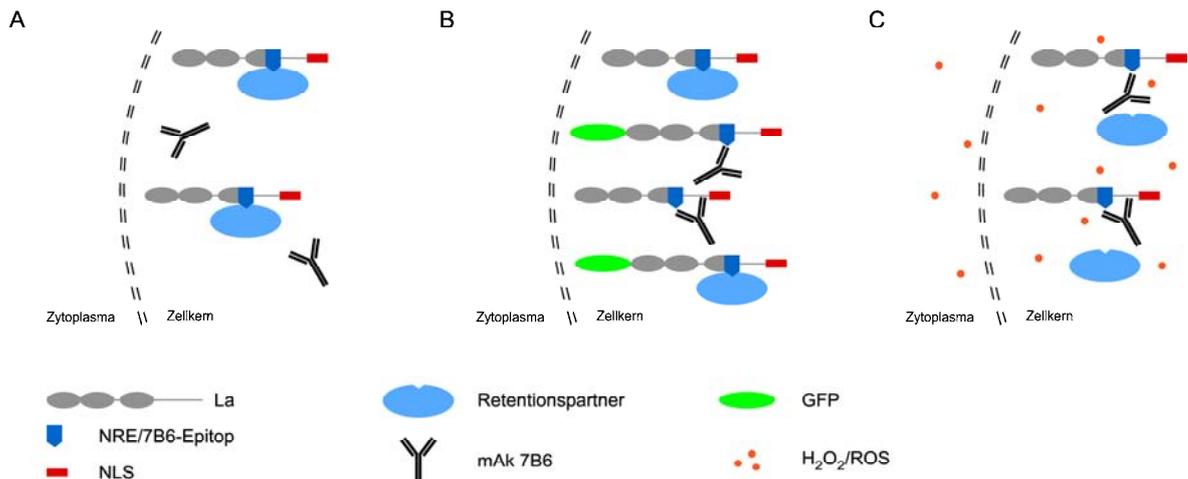


Abbildung 60: In der Immunfluoreszenz ist das 7B6-Epitop nur unter bestimmten Bedingungen für den Antikörper zugänglich.

A) In HeLa-Zellen wird das 7B6-Epitop, das zugleich die nukleäre Retention vermittelt, von einem Interaktionspartner abgedeckt und ist für den mAk 7B6 unzugänglich. **B)** Nach Transfektion von GFP-hLa-codierenden Plasmiden liegen die (GFP-)La-Proteine im Überschuss vor, sodass nur ein Teil der 7B6-Epitope vom Retentionspartner gebunden wird und der andere Teil kann vom 7B6-Antikörper erkannt werden. Die nukleäre Lokalisation wird allein durch das NLS vermittelt. **C)** Unter oxidativen Bedingungen wird die Assoziation zum nukleären Retentionspartner aufgehoben und das 7B6-Epitop ist für den Antikörper zugänglich.

Für alle mAks konnten individuelle DNA- bzw. Proteinsequenzen ermittelt und unterschiedliche Antigenbindungseigenschaften festgestellt werden. Dennoch weisen einige Antikörper gemeinsame Epitopregionen innerhalb des hLa-Proteins auf. Auffallend ist, dass nach herkömmlicher Immunisierung, die auf mehrfacher Verabreichung des rekombinanten hLa-Proteins im Abstand mehrerer Wochen basierte, wenige hochaffine Antikörper resultierten, die ein Peptidepitop erkennen (5B9 und 7B6). Im Gegensatz dazu hatte die hLaTg-Maus nur einmal gegen hLa-aktivierte CD4⁺ T-Zellen aus einer anderen Maus übertragen bekommen. Die Fusion ihrer Milzzellen mit Myelomzellen fand zwei Wochen nach dem T-Zell-Transfer statt. Aus diesem Tier konnten mehrere La-spezifische IgG- und IgM-Antikörper gewonnen werden. Alle IgG-Antikörper erkennen eines von zwei diskontinuierlichen Konformationsepitopen. Vorausgesetzt es liegen in jeder Maus etwa gleich viele naive B-Lymphozyten vor, die das hLa-Protein binden können, so war vermutlich nach mehrfachem Immunisieren die Affinitätsreifung so weit fortgeschritten, dass auf hochaffine Antikörper mit Spezifität für ein Peptidepitop selektiert

worden war. Nach dem einmaligen T-Zell-Transfer war die Antikörperoptimierung hingegen noch nicht abgeschlossen, weshalb mehrere Hybridome aus der einen Maus erhalten werden konnten, die La-spezifische mAbs sezernieren. Die mAbs aus der hLaTg-Maus spiegeln somit das theoretische anti-La-Antikörperrepertoire wider, über das jedes Tier verfügt und das durch den adoptiven T-Zell-Transfer sichtbar gemacht werden konnte. Die Antikörper sind mit Autoantikörpern vergleichbar, für die bekannt ist, dass sie Konformationsepitope in konservierten, funktionellen Regionen der Antigene erkennen [183]. Hingegen werden durch Immunisierung mit dem La-Antigen die autoreaktiven B-Zellen eliminiert und nur wenige anti-hLa-spezifische B-Zellen aktiviert. Der 5B9-Antikörper entspricht insofern einem Autoantikörper, da er gegen hLa und mLa gerichtet ist.

Zwar entstammen die mAbs 7B6 und 5B9 Mäusen des Stammes BALB/c und die hLaTg-Maus war auf einem A/J-Hintergrund erzeugt worden, doch haben diese Unterschiede keinen Einfluss auf die erhaltenen mAbs. Aus einer Vielzahl von wt-A/J-Mäusen und hLaTg-A/J-Mäusen, die parallel zum adoptiven T-Zell-Transfer konventionell mit rhLa immunisiert wurden, konnten überhaupt keine La-spezifischen mAbs erhalten werden.

Alle IgG-Antikörper haben, unabhängig von ihrer Generierung, somatische Hypermutationen erfahren, die durchschnittlich 14 Aminosäureaustausche je mAb verursacht haben. Die IgG-Antikörper waren außerdem in der Lage, das La-Antigen im Immunoblot zu detektieren und spezifische Kernfärbungen in den Immunfluoreszenzanalysen zu erzeugen (mit der oben erläuterten Ausnahme des mAb 7B6). Die drei IgM-Antikörper enthielten im Schnitt 3,7 veränderte AS im Vergleich zur Keimbahn. Sie riefen in der Immunfluoreszenz unspezifische zytoplasmatische Färbungen hervor und nur der anti-La-IgM 16C konnte überhaupt La-Protein im Immunoblot detektieren. Voraussetzung hierfür war aber, dass die etwa 100-fache Antigenmenge im Vergleich zu den IgG-Antikörpern eingesetzt wurde. Der mAb 2F9 besitzt zwar nur zwei ausgetauschte AS in seinen schweren Ketten, doch durch die bereits in der Keimbahn festgelegte Fähigkeit, das La-Protein hochspezifisch zu binden, konnte auch der Klassenwechsel zu IgG vollzogen werden. Bei den polyreaktiven IgM-Antikörpern bleibt diese Veränderung aufgrund mangelnder Antigenspezifität aus.

Der adoptive T-Zell-Transfer stellt eine gute Alternative zur herkömmlichen Immunisierung von Mäusen dar, um viele mAbs gegen ein humanes Autoantigen zu erhalten. Diese Antikörper sind hochspezifisch und für Immunoblots, Immunpräzipitationen sowie Immunfluoreszenzfärbungen nutzbar, erkennen aber Konformationsepitope. Diese können nicht wie die kurzen linearen Epitope als Peptid-Tags genutzt werden. Hingegen findet das 5B9-Epitop in der Arbeitsgruppe von Prof. Bachmann bereits vielfältige Anwendung, z. B. als Bestandteil chimärer T-Zell-Rezeptoren. Das 7B6-Epitop und das 7B6 scFv-Molekül werden als Komponenten eines modularen Immunotargetingsystems genutzt (siehe 5.6).

5.2. Nukleozytoplasmatisches Shuttling des La-Proteins

Viele zelluläre Prozesse werden durch Austausch von Faktoren zwischen den subzellulären Kompartimenten reguliert. Einige Proteine pendeln ständig zwischen Zellkern und Zytoplasma, um Informationen oder andere Moleküle zu befördern. Dazu gehören die Transportrezeptoren und Adapterproteine, sowie Steroidhomonrezeptoren, Transkriptionsfaktoren, Zellzyklusregulatoren und viele RNA-bindende Proteine [111, 192].

Für seine vielfältigen Aufgaben innerhalb der Zelle muss das La-Protein ebenfalls ein nukleozytoplasmatisches Shuttling durchführen. Bereits im Jahr 1987 wurde in CV-1-Zellen (Nierenzelllinie aus der afrikanischen Grünen Meerkatze) ein Pendeln des La-Proteins zwischen Zellkern und Zytoplasma beobachtet [131, 193]. Durch Heterokaryonexperimente mit humanen HEK 293- und murinen NIH3T3-Zellen wurde das Shuttling des endogenen hLa-Proteins bestätigt und als Crm1-unabhängig beschrieben, da LMB keinen Einfluss auf diesen Prozess hatte [132].

In der Hefe *S. pombe* trat jedoch ein verstärkter, Crm1-vermittelter Export des hLa-Proteins und des homologen Hefe-La-Proteins Sla1p aus dem Zellkern auf, wenn das NRE (AS 316-332) deletiert war [116] oder die Doppelmutation K316A/K317A vorlag [117]. Durch die gestörte Retention akkumulierten unvollständig prozessierte tRNA-Vorläufermoleküle in der Zelle. Es wurde ein NES vermutet, das bei fehlendem NRE den Export ins Zytoplasma bewirkt. Das hLa-Protein enthält zwar keine Konsensus-NES-Sequenz für Crm1, doch durch Deletion der RRM1-Domäne, oder die Mutationen E132A/D133A bzw. F150A konnte der Kernexport verhindert werden und es entstanden wieder korrekt prozessierten tRNA-Moleküle [117].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Heterokaryons aus humanen HeLa-Zellen und Maus-3T3-Zellen erzeugt, um das Shuttlingverhalten von GFP-La-Fusionsproteinen zu analysieren und den Einfluss von LMB erneut zu überprüfen (siehe Kapitel 4.3). Das GFP-Protein wird seit 1994 zunehmend als biologischer Marker für die Genexpression und Proteinlokalisierung in verschiedenen Organismen verwendet [194-196]. Es wurde als kleines, 328 AS umfassendes Protein beschrieben, das in der Zelle inert ist und die untersuchten biologischen Prozesse nicht stört. Somit sollte das Shuttling der GFP-La-Fusionsproteine dem Verhalten der La-Proteine ohne GFP entsprechen. Bisher gibt es so gut wie keine Hinweise darauf, dass das GFP-Protein das Shuttlingverhalten der eigentlich zu analysierenden Proteine beeinflusst. Lediglich für die unphosphorylierte Form des Transkriptionsfaktors STAT1 (*signal transducer and activator of transcription 1*) wurde ein etwa um den Faktor zwei verlangsamtes Shuttling durch die Fusion mit GFP festgestellt [197].

Aufgrund der kurzen Verweildauer im Zytoplasma wurden die Fusionsproteine und auch das endogene La-Protein quantitativ im Zellkern beobachtet. Dennoch konnten 4 h nach der Fusion auch in den Kernen der untransfizierten Zellen GFP-La-Proteine detektiert werden, sofern sie einem Heterokaryon angehörten, das mindestens eine transfizierte GFP-La-produzierende Zelle enthielt. Für die La-Volllängeproteine fand während der 4 h keine homogene Verteilung auf alle im Heterokaryon befindlichen Zellkerne statt (Intensitätsunterschiede in Abbildung 36 und Abbildung 37), sondern nur ein Teil des Proteins hatte den Ursprungszellkern verlassen, um dann zufällig aus dem Zytoplasma in den untransfizierten Nachbarkernen importiert zu werden. Es konnte

nachgewiesen werden, dass GFP-hLa und GFP-mLa sowohl von humanen zu murinen Zellkernen als auch umgekehrt pendeln können. Ebenso konnte das endogene hLa-Protein mit dem anti-hLa-mAk SW5 in Mauszellkernen detektiert werden. Das Shuttling fand in An- und Abwesenheit von LMB statt, sodass der Crm1-unabhängige Kernexport des La-Volllängeproteins bestätigt wurde. Unter diesen Bedingungen gelangten die Proteine nie auf die Zelloberfläche (Abbildung 41).

Auch die kürzeren GFP-La-Fragmente, die alle über das C-terminale NLS (AS 383-400) verfügten, konnten nach der Fusion aus den humanen Kernen in die Mauskerne gelangen (Abbildung 39). Das Protein GFP-La₂₉₅₋₄₀₈ enthält die Dimerisierungsdomäne, das NRE, das NoLS und das NLS. Den Volllängeproteinen entsprechend war auch hier ein GFP-Gradient zwischen den Kernen der ursprünglich transfizierten und untransfizierten Zellen zu beobachten. Dem nächst kürzeren Fragment GFP-La₃₁₈₋₄₀₈ fehlen im NRE die entscheidenden AS K316 und K317 [117]. Die Retention war deutlich gestört, denn das GFP-Fusionsprotein war nahezu homogen in allen Kernen des Heterokaryons verteilt. Bei den kleineren Proteinen ohne NRE (GFP-La₃₄₆₋₄₀₈, GFP-La₃₆₉₋₄₀₈ und GFP-La₃₇₆₋₄₀₈) war die grüne Fluoreszenz in allen Kernen mit gleicher Intensität detektierbar. Das NoLS (AS 323-354) bewirkte bei den Proteinen GFP-La₂₉₅₋₄₀₈ und GFP-La₃₁₈₋₄₀₈ eine Häufung in den Kernkörperchen der humanen Zellkerne. Möglicherweise konnten Interaktionspartner im Nukleolus besonders gut oder im Nukleoplasma schlechter binden und riefen deshalb eine Anreicherung der GFP-Fusionsproteine in den Nukleoli hervor. Das Shuttling verlief auch für die GFP-La-Fragmente unabhängig vom Kernexporter Crm1 (Abbildung 40).

Bei fehlendem C-terminalen NLS (GFP-La₁₋₁₉₂) bzw. unvollständigem NLS (GFP-La₃₆₉₋₃₉₇) waren die GFP-La-Fragmente sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma lokalisiert. Im Bereich der Kerne war die grüne GFP-Fluoreszenz etwas stärker. Die intrazelluläre Verteilung entsprach der des reinen GFP-Proteins (siehe Abbildung 25A). Für GFP-La₁₋₁₉₂ war kein verstärkter Kernexport zu beobachten, wie es für hLa ohne NRE in Abhängigkeit von der RRM1-Domäne in Hefezellen beobachtet worden war [117].

Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass das hLa-NLS einen sehr effektiven Import in den Zellkern über Karyopherin- α und $-\beta$ vermittelt. Alle Proteine, die das vollständige NLS enthalten, werden nahezu quantitativ im Zellkern angereichert. Dennoch konnte durch die Heterokaryonexperimente bestätigt werden, dass ein Teil des hLa-Proteins zwischen Zellkern und Zytoplasma pendelt. Das hLa-NLS-vermittelte Shuttling zwischen HeLa- und 3T3-Zellkernen verläuft LMB-unabhängig und kommt ohne die RRM1-Domäne des hLa-Proteins aus, die in Hefezellen den Crm1-abhängigen Export bei fehlendem NRE vermittelt [117]. Vielmehr spielt die nukleäre Retention die entscheidende Rolle. Bei vorhandenem NRE verlässt nur ein geringer Teil des endogenen hLa-Proteins oder auch der GFP-La-Fusionsproteine und -fragmente den Zellkern und kann in den Nachbarkernen nachgewiesen werden. Bei fehlendem NRE gelangen mehr GFP-La-Fragmente in die benachbarten Zellkerne, d. h. über die Wechselwirkung mit nukleären Retentionspartnern wird die Menge an Protein kontrolliert, die in das Zytoplasma und folglich in die Nachbarkerne gelangt. Da aufgrund des sofortigen NLS-vermittelten Imports in den Zellkern die Verweildauer im Zytoplasma sehr kurz ist, scheint das La-Protein quantitativ im Zellkern lokalisiert zu sein. Momentan kann keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, ob die La-Proteine durch andere Kernexporter als Crm1 aktiv in das Zytoplasma transferiert werden,

sobald die nukleäre Retention aufgehoben ist, oder ob es sich um einen reinen Diffusionsprozess handelt, der bei Proteinen bis zu einer Größe von etwa 60 kDa möglich ist [174]. Die aus den Heterokaryonexperimenten gewonnenen Erkenntnisse sind in Abbildung 61 schematisch zusammengefasst.

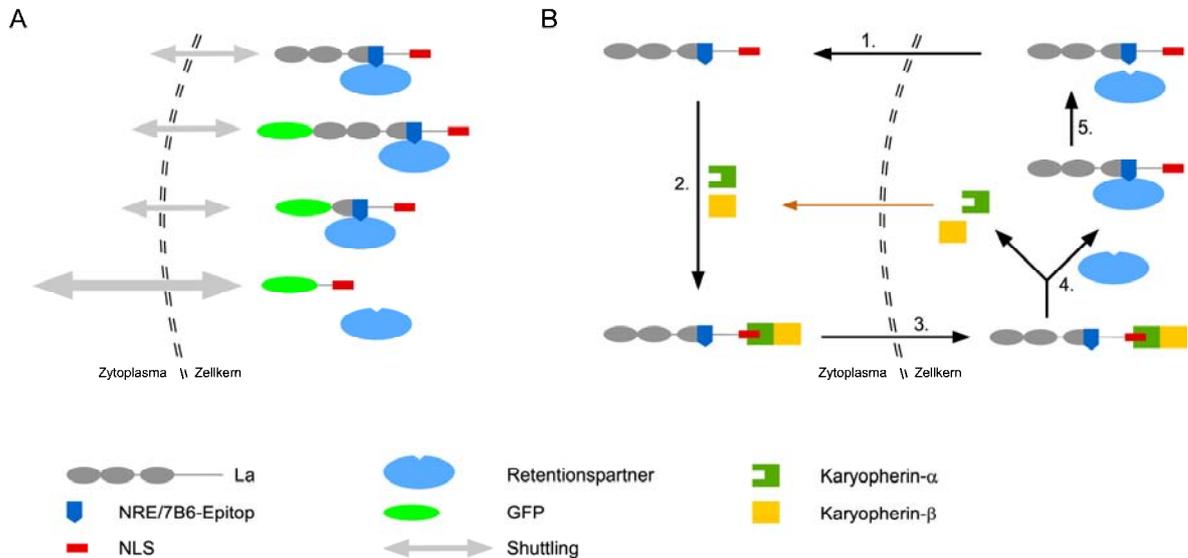


Abbildung 61: Das hLa-NLS vermittelt den Shuttlingprozess.

A) Bei Vorhandensein des NLS wird das Pendeln der Proteine zwischen Zellkern und Zytoplasma ermöglicht, unabhängig davon, ob es sich um hLa, GFP-hLa oder GFP-hLa-Fragmente handelt. Über die Wechselwirkung des NREs mit dem nukleären Retentionspartner wird die Menge der exportierten Proteine reguliert. Sobald das NRE fehlt, können mehr GFP-Fusionsproteine den Zellkern verlassen. Dennoch scheinen die Proteine quantitativ im Zellkern lokalisiert zu sein, da das NLS einen sehr effektiven Kernimport veranlasst. Die Limitierung des nukleären Retentionspartners in Gegenwart von zusätzlichen GFP-La-Fusionsproteinen wurde in diesem Schema nicht berücksichtigt. **B)** Sobald die Interaktion zwischen La-Protein und nukleärem Retentionspartner aufgehoben wird, erfolgt der Export des La-Proteins aus dem Zellkern (1.). Im Zytoplasma bindet sofort Karyopherin-α an das NLS und nach Assoziation des Karyopherin-β (2.) wird der Komplex in den Zellkern transportiert (3.). Dort dissoziiert das Heterotrimer und die Karyopherine gelangen wieder in das Zytoplasma. Das La-Protein wird über das NRE im Zellkern festgehalten (4.). Erst wenn sich die Bindung zum Retentionspartner erneut löst (5.), wiederholt sich der Kernexport.

5.3. Oxidativer Zellstress beeinflusst das La-Protein

Reaktive Sauerstoffspezies sind hochreaktive, Sauerstoff-basierte Moleküle wie Superoxidanionen, Hydroxylradikale und Wasserstoffperoxid, die auf unterschiedlichen Wegen in der Zelle generiert werden können [198]. Durch die Oxidation zugänglicher Cysteinreste von Proteinen können Signaltransduktionswege in den Zellen beeinflusst werden, die sich auf das Wachstum sowie die Adhäsion, Differenzierung, Seneszenz oder Apoptose der Zellen auswirken. Die Menge an intrazellulären ROS-Molekülen wird durch enzymatische und nicht-enzymatische Schutzmechanismen kontrolliert. Werden Zellen z. B. UV-Strahlung ausgesetzt, so entsteht ein ROS-Überschuss, der oxidativen Zellstress auslöst. Zellmembranen, Nucleinsäuren und Proteine können nun von den freien Radikalen modifiziert werden. Dadurch entstehen Neoepitope, die stark immunogen sein können, weil gegen sie keine Toleranz aufgebaut wurde [199]. Zugleich werden die SLE-typischen nukleären Antigene zuerst im Zytoplasma und später auf der Zelloberfläche bzw. in apoptotischen Körperchen beobachtet [135, 136, 139, 171, 200, 201]. Die

verstärkte Präsentation der möglicherweise durch ROS modifizierten Zellkernkomponenten auf apoptotischen Zellen wird als Ursache für die Induktion einer Autoimmunantwort vermutet.

5.3.1. Die Antigenität des La-Proteins kann redoxabhängig sein

Zunächst wurde der Einfluss von oxidierenden und reduzierenden Bedingungen auf die Bindung der anti-La-mAks an ihr Antigen evaluiert. Die mAks 312B, 27E, 2F9 und 32A, welche ein gemeinsames Konformationsepitop innerhalb des La-Motivs erkennen, können den reduzierten vom oxidierten Zustand des hLa-Proteins unterscheiden. Im ELISA binden sie nur die reduzierte Proteinform, während die Bindung der anderen anti-La-IgG-Antikörper nicht beeinflusst wird (Abbildung 29). Darüber hinaus kann die Reaktivität des 2F9-Antikörpers im Western Blot wieder hergestellt werden, wenn das Antigen auf der Nitrocellulosemembran nachträglich reduziert wird. Wahrscheinlich bedingt C18 im N-terminalen Bereich des Konformationsepitops diese Redoxsensitivität (siehe Abbildung 28C). Insgesamt besitzt hLa drei Cysteinreste, die unter Normalbedingungen keine Disulfidbrücken auszubilden scheinen und deshalb für andere Reaktionen zur Verfügung stehen. Die Oxidationsempfindlichkeit des La-Proteins wird durch seine Verwendung als Proteinsensor für alkylierende oder oxidierende Wirkstoffe in Hochdurchsatz-Screeningverfahren unterstrichen [202, 203]. Dabei kommt La₁₀₀₋₃₂₄ zum Einsatz, das die zwei weiteren Cysteine C232 und C245 enthält, deren Thiolgruppen sehr leicht durch elektrophile Substanzen modifiziert werden können.

Mit Hilfe der mAks konnte gezeigt werden, dass das La-Protein unter oxidierenden Bedingungen v. a. im Bereich des La-Motivs verändert wird. Da die mAks gegen das native, reduzierte Protein gerichtet sind, wurde ihr Epitop durch Oxidation zerstört oder unzugänglich und sie konnten nicht mehr binden. In SLE-Patientenseren konnten ebenfalls Autoantikörper gegen das reduzierte Antigen mittels ELISA nachgewiesen werden (Abbildung 30). Darüber hinaus gab es aber auch Seren, die nur die oxidierte Proteinform erkannten. Ihre Entstehung ist auf ROS-vermittelte Modifikationen des La-Proteins während zellulärer Stresssituationen (Apoptose) zurückzuführen. Da die Seren viele verschiedene (polyreaktive) Autoantikörper enthalten können, war die Unterscheidung mittels ELISA nicht mehr möglich, sobald die Seren sowohl Antikörper gegen das oxidierte als auch gegen das reduzierte Antigen oder redoxunabhängige Antikörper enthielten. Dieser Effekt konnte durch Mischung des redoxsensitiven 2F9-Antikörpers mit den unempfindlichen mAks SW5 und 5B9 simuliert werden.

Hingegen wird das 7B6-Epitop nicht durch Oxidation zerstört und der Antikörper konnte im ELISA beide Proteinformen gleich gut binden. Dadurch wird bestätigt, dass die nach Wasserstoffperoxidbehandlung oder UV-Bestrahlung lebender HeLa-Zellen (Abbildung 31) erzielte Immunfluoreszenzfärbung mit 7B6 tatsächlich auf die Zugänglichkeit des Epitops zurückzuführen ist. Durch die Sauerstoffradikale wird die Bindung zum nukleären Retentionspartner gelöst und der Antikörper kann zu seinem Epitop gelangen.

5.3.2. Translokation des La-Proteins unter oxidativen Bedingungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung von Sauerstoffstress auf die subzelluläre Lokalisation von GFP-hLa evaluiert. Des Weiteren wurde die Abspaltung des NLS vom übrigen La-Protein unter diesen Bedingungen untersucht. Durch Wasserstoffperoxidbehandlung von lebenden HeLa-Zellen wurde das Gleichgewicht zwischen nukleärem und zytoplasmatischem La-Protein stärker auf die zytoplasmatische Seite verschoben (siehe Schema in Abbildung 62A). Mit GFP-hLa und NLS-enthaltenden GFP-hLa-Fragmenten konnte gezeigt werden, dass sich ein Teil des jeweiligen Proteins innerhalb von 20 min im Zytoplasma der Zellen anreichert (Abbildungen 32 und 33). Alle vorhandenen anti-La-mAbs konnten die unterschiedlichen Epitopregionen des (GFP-)hLa-Proteins im Zytoplasma detektieren (Abbildung 32). Unter den verwendeten Bedingungen wurde die Translokation bewirkt, ohne dass das NLS abgespalten wurde (Abbildung 34). Es muss daher einen weiteren Weg geben, um das Protein im Zytoplasma zurückzuhalten oder verstärkt aus dem Zellkern zu exportieren. Dadurch lassen sich auch die früheren Beobachtungen nach viraler Infektion oder während der Apoptose erklären, bei denen das Protein nahezu vollständig im Zytoplasma vorlag, aber im Immunoblot nur ein Bruchteil davon, wie bei einer NLS-Abspaltung zu erwarten gewesen wäre, ein geringeres Molekulargewicht aufwies [141, 145].

Wie bereits erwähnt, wird die Assoziation mit dem nukleären Retentionspartner unter der Einwirkung von Sauerstoffradikalen aufgehoben, sodass das 7B6-Epitop zugänglich wird. Würden dadurch auch die für die Retention wichtigen Reste K316 und K317 [117] modifiziert, sodass die Retention nicht wieder hergestellt werden kann, so könnte nun, wie für Hefezellen beschrieben, das NES in der RRM1-Domäne für den verstärkten nukleären Export sorgen. Zwar kann die Modifikation der Lysinreste nicht ausgeschlossen werden, doch ein RRM1-vermittelter Export kann nicht die Ursache für die zytoplasmatische Anreicherung der GFP-Fusionsproteine sein, denn anhand der GFP-Fluoreszenz wurde eine vergleichbare intrazelluläre Verteilung für das La-Volllängeprotein und die La-Fragmente ohne RRM1-Domäne beobachtet. Der Anteil an zytoplasmatischem Protein war auch unabhängig vom Vorhandensein des NREs. Stattdessen funktioniert der verstärkte Export unter oxidativen Bedingungen ebenso wie das nukleozytoplasmatische Shuttling auch für GFP-La₃₆₉₋₄₀₈ (Abbildung 33). Folglich muss unter Stressbedingungen der Import der Proteine in den Zellkern über Karyopherin- α und - β gestört sein. Dafür könnten einerseits post-translationale (De-)Modifikation innerhalb des NLS verantwortlich sein, da sich durch die Oxidation das Laufverhalten der Proteine in der SDS-PAGE hin zu größeren Molekulargewichten verschiebt. Andererseits ist ein genereller verminderter Kernimport unter Stressbedingungen wie UV-Strahlung, Sauerstoffstress oder Hitzeschock beschrieben worden [204]. Dabei kommt es zur Anreicherung von Karyopherin- α im Nukleoplasma, wodurch es im Zytoplasma fehlt, um den klassischen Import zu vermitteln (siehe Schema in Abbildung 62B).

Der Proteintransport in den Zellkern ist unter oxidativen Bedingungen aber nicht generell blockiert. Für Ro 60 wurde kürzlich die Translokation vom Zytoplasma in den Kern beschrieben [205], die vermutlich über die Assoziation mit Y RNAs reguliert wird. Bei Sauerstoffstress

dissoziieren die Komplexe und es wird angenommen, dass es dabei zur Exposition eines Kernimportsignals des Ro 60-Proteins kommt.

Sowohl das Leptomycin-unabhängige Shuttling des La-Proteins als auch die ROS-vermittelte Translokation stehen in Widerspruch zu dem beschriebenen Kernexport, der nach Modifikation oder Deletion des NREs beobachtet wurde [117]. Wahrscheinlich resultieren die unterschiedlichen Daten aus den verschiedenen eukaryonten Zellsystemen, die für die Untersuchungen verwendet wurden. Bayfield *et al.* setzten *S. pombe* ein und in dieser Arbeit wurden humane HeLa- bzw. Maus-3T3-Zellen untersucht. Da sich *S. cerevisiae* schon einem anderen Karyopherin für den Kernimport des Hefe-La-Proteins bedient als *S. pombe* und alle höheren Eukaryonten [115], ist es durchaus möglich, dass die La-Proteine in den verschiedenen Organismen auch unterschiedliche Kernexportwege nutzen.

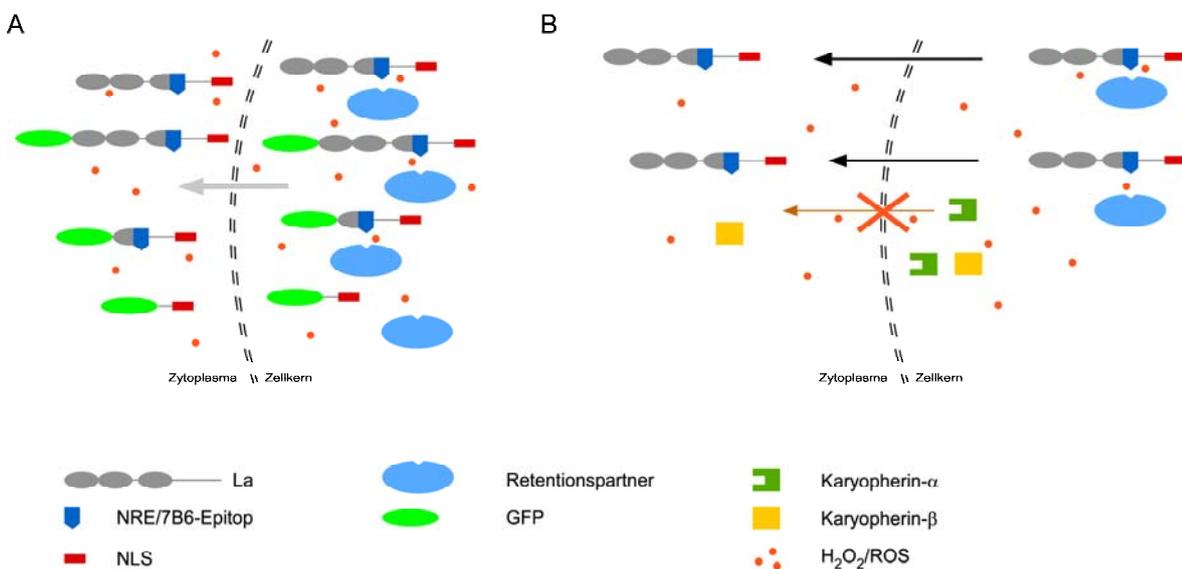


Abbildung 62: Zytoplasmatische Anreicherung des La-Proteins bei Sauerstoffstress.

A) Nach Wasserstoffperoxidbehandlung reichern sich das endogene La-Protein, GFP-La sowie die GFP-La-Fragmente im Zytoplasma an. **B)** Wie die Bindungsstudien für den mAk 7B6 gezeigt haben, wird die Assoziation des La-Proteins mit dem nukleären Retentionspartner unter oxidativen Bedingungen aufgehoben. Daraufhin erfolgt der Export des La-Proteins ins Zytoplasma. Das NLS wird nicht abgespalten und könnte weiterhin den Reimport in den Zellkern vermitteln, doch das dafür benötigte Karyopherin- α reichert sich bei Zellstress im Nucleus an und steht im Zytoplasma nicht länger zur Verfügung.

Im weiteren Verlauf der Apoptose werden die nukleären Antigene nicht nur im Zytoplasma beobachtet, sondern auch in „apoptotischen Blebs“ oder auf der Zellmembran gefunden. Bisher wurde noch nie untersucht, ob das membrangebundene La-Protein aus dem Zellinneren der jeweiligen Zellen kommt oder ob es von apoptotischen Nachbarzellen freigesetzt wird und von außen auf die Zelloberfläche bindet. Mit Hilfe der ausführlich charakterisierten anti-La-mAks und der DAPI-Färbung zur Unterscheidung zwischen humanen und murinen Zellen konnte diese Fragestellung beantwortet werden (siehe Kapitel 4.4). In humanen HeLa-Zellen wurde durch UV-Bestrahlung die Apoptose induziert und anschließend wurden die Zellen mit Maus-A9-Zellen kokultiviert. Nach 48 h konnte das hLa-Protein mit anti-hLa-mAks auf den Mauszellen nachgewiesen werden. Für die Detektion wurden der gegen LaN-gerichtete mAk SW5 sowie der

LaC-bindende mAk 7B6 eingesetzt (Abbildung 43). Das hLa-Protein war nicht homogen auf der Membran aller Mauszellen verteilt, sondern der Effekt trat lokal auf. Das freigesetzte Protein scheint unmittelbar auf die Oberfläche von intakten Nachbarzellen zu binden, wodurch bei SLE-Patienten zusammen mit anti-La-Autoantikörpern Immunkomplexe entstehen können.

5.4. Bindung des rhLa-Proteins auf der Zelloberfläche - La als Alarmin?

In den letzten Jahren haben viele Studien gezeigt, dass Immunantworten nicht nur durch Pathogene über ihre PAMPs ausgelöst werden, sondern dass auch intrazelluläre Proteine, die bei Zellstress, Entzündungen oder Verletzungen aus den Zellen freigesetzt werden und deshalb als *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) oder Alarmine benannt wurden, dieselben Rezeptoren (PRRs) auf den Immunzellen aktivieren können [206-208]. Alarmine werden entweder aktiv sezerniert oder passiv während der Nekrose in die Umgebung abgegeben. Der klassische Vertreter der Alarmine ist das *high mobility group box 1*-Protein (HMGB1) [209]. Es kommt im Zellkern aller Eukaryonten als DNA-bindendes Protein vor und ist an der Regulation der Transkription beteiligt. Seine nukleäre Lokalisation sowie die Affinität zu DNA werden durch Phosphorylierung und Acetylierung reguliert. Nahezu alle nekrotischen Zellen setzen HMGB1 in die Umgebung frei, um den Nachbarzellen die Beschädigung der Zelle zu signalisieren. Während der Apoptose verbleibt das unacetylierte HMGB1 allerdings im Zellkern. Darüber hinaus kann das Protein von Monozyten, Makrophagen und DCs aktiv sezerniert werden, wenn diese durch PAMPs oder zelluläre Zytokine (z. B. TNF- α) stimuliert werden. Auf den Zielzellen bindet HMGB1 entweder an den *receptor for advanced glycation end products* (RAGE) oder an TLR2, TLR4 oder TLR9. Die über TLR9 aktivierten Signalkaskaden werden durch Bindung von HMGB1-DNA-Komplexen ausgelöst. Es werden diverse proinflammatorischen Antworten wie die Ausreifung von Immunzellen, deren Migration zum Ort der Entzündung und die Freisetzung von Zytokinen induziert. Zusätzlich kann HMGB1 die Regeneration von Gewebe vermitteln.

Das angeborene Immunsystem verfügt über diverse antimikrobielle Peptide, die ebenfalls als Alarmine wirken können [210]. Das Peptid LL-37 wird bei bakteriellen Infektionen, Entzündungsreaktionen oder Gewebeschäden aus dem inaktiven Vorläuferprotein hCAP-18 (*human cationic anti-microbial protein 18*) proteolytisch ausgeschnitten. Es assoziiert mit bakteriellen Lipopolysacchariden und schützt Ratten vor bakteriell verursachter Sepsis [211]. LL-37 kann aber auch mit körpereigener DNA oder RNA Komplexe bilden und daraufhin bei Psoriasis-Patienten DCs über TLR7/8 bzw. TLR9 aktivieren [212, 213].

Nachdem die Freisetzung des endogenen hLa-Proteins aus apoptotischen HeLa-Zellen nachgewiesen worden war, wurde zuerst die Oberflächenbindung mit rhLa-Protein genauer charakterisiert (Kapitel 4.5). Es konnten Färbungen auf humanen und murinen Zellen sowie auf Endothel- und Epithelzellen erzielt werden, die in der Immunfluoreszenz und auch quantitativ im Durchflusszytometer detektiert wurden. Das rhLa-Protein konnte in Gegenwart von PBS oder 10% (v/v) FCS in Zellkulturmedium an die Membran lebender Zellen binden. Dies geschah sowohl bei 37 °C als auch bei 4 °C. Dadurch kann ein reiner Endozytoseprozess ausgeschlossen werden. In Gegenwart von rhLa konnte außerdem die Bindung von dsDNA auf die Zelloberfläche vermittelt werden (siehe Abbildung 50).

Ein Teil des Proteins war bis zu 24 h nach Dekoration auf Maus-3T3-Zellen nachweisbar. Es handelte sich stets um das rhLa-Volllängeprotein und es traten keine zusätzlichen Proteolyseprodukte auf. Trotz der Membranbindung waren alle Epitope der anti-La-mAks zugänglich und auch der C-terminale Hexahistidintag konnte stets detektiert werden. Entweder assoziiert das rhLa-Protein mit der Membran bzw. einem Rezeptor über eine Domäne, die nicht von den mAks erkannt wird, oder es binden La-Dimere auf der Zelloberfläche. Die Antikörperbindung könnte dann von dem jeweils zweiten Molekül vermittelt werden, welches nicht an der Wechselwirkung mit der Membran bzw. dem Rezeptor beteiligt ist.

Die Alarmine binden bevorzugt auf Antigen-präsentierenden Zellen, die über entsprechende PRRs auf ihrer Oberfläche verfügen. Deshalb wurde das rhLa-Protein in einem weiteren Experiment zu PBMCs gegeben, wo es auf slanDCs, Monozyten und B-Zellen, die alle zu den Antigen-präsentierenden Zellen gehören, nachgewiesen worden ist. In deren Gegenwart fand keine Bindung auf T-Lymphozyten und NK-Zellen statt. Die Daten demonstrieren, dass es sich um eine selektive Bindung handelt anstatt um eine unspezifische Adsorption an beliebige Zellmembranen. Möglicherweise tragen die Antigen-präsentierenden Zellen einen spezifischen Rezeptor auf ihrer Oberfläche, der das freigesetzte La-Protein erkennt. Durch seine DNA- und RNA-Bindungseigenschaften könnte das La-Protein ähnlich wie HMGB1 und LL-37 bakterielle oder virale Nukleinsäuren zur Oberfläche der Antigen-präsentierenden Zellen bringen, um die Immunantwort gegen die Pathogene auszulösen oder zu verstärken. Bei fehlerhafter Regulation dieser Mechanismen könnte auf diesem Weg Autoimmunität gegen körpereigene Nukleinsäuren induziert werden, wie sie bei SLE-Patienten vorkommt.

Möglicherweise sorgen Chemokinrezeptoren für die Membranassoziation des La-Proteins. Für La-ssDNA-Komplexe konnte eine chemotaktische Wirkung auf immature DCs gezeigt werden. Hingegen konnten La oder ssDNA allein diese Funktion nicht vermitteln [214]. Für die hervorgerufene Chemotaxis wird ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor verantwortlich gemacht, da sie durch Pertussistoxin inhibiert werden konnte. Zur dieser Rezeptorfamilie gehören auch die Chemokinrezeptoren. Für eine Reihe von Autoantigenen wurde eine chemotaktische Wirkung auf mononukleäre Zellen, insbesondere auf immature DCs, nachgewiesen [214]. Man nimmt an, dass die nach Gewebeschädigung freigesetzten intrazellulären Proteine die Immunzellen anlocken, damit diese eventuelle Pathogene eliminieren, zerstörtes Gewebe abbauen und den Heilungsprozess voranbringen. Bei einer gleichzeitigen Fehlregulation des Immunsystems kann es dabei zur Induktion von Autoimmunantworten kommen. Es wurden beispielsweise die Chemokinrezeptoren CCR5 und CCR3 als Interaktionspartner für die Myositis-assoziierten Autoantigene Histidyl-tRNA-Synthetase und AsparaginyI-tRNA-Synthetase identifiziert.

5.5. Anti-La-Autoantikörper können ADCC-Reaktionen vermitteln

In Seren von SLE-Patienten finden sich vermehrt Autoantikörper, deren nukleären Antigene jedoch in ungestressten Zellen nicht für sie zugänglich sind. Erst durch oxidativen Zellstress gelangen viele Zellkernkomponenten auf die Zelloberfläche [135, 136, 139, 171, 200, 201]. Da diese Zellen bereits apoptotischen Prozessen unterliegen, sollte die Bindung von Autoantikörpern auf ihrer Membran keine pathophysiologische Relevanz haben. Vielmehr rufen die entstehenden Immunkomplexe, die in kleinen Blutgefäßen abgelagert werden, Entzündungen und schwere Schädigungen in den Geweben hervor (z. B. Glomerulonephritis). Für die charakteristische Photosensitivität der SLE-Patienten, die zu den typischen Hauterscheinungen führt, werden allerdings ADCC-Reaktionen verantwortlich gemacht. Dass Autoantikörper prinzipiell ADCC-Reaktionen vermitteln können, wenn die Zielzellen auf ihrer Oberfläche mit Kernextrakten beladen wurden, konnte bereits für anti-DNA-, anti-Sm-, anti-Ro/SS-A- sowie anti-nRNP-positive Patientenserum nachgewiesen werden [215-217]. Außerdem wurde die Bindung von anti-La-, anti-Ro-, anti-Sm- und anti-nRNP-Antikörpern auf UV-bestrahlten Keratinozyten mit monospezifischen Seren gezeigt [136, 139, 171, 200, 218]. Alternativ können die nukleären Antigene auch nach viralen Infektionen auf den Zellmembranen detektiert werden [134, 138]. Für La-Immunkomplexe wurden bisher keine ADCC-Reaktionen nachgewiesen und anti-La-Autoantikörper sollen sogar protektiv sein [219].

Wie in dieser Arbeit gezeigt, wird das La-Protein von sterbenden Zellen abgegeben und kann auf unbeschädigten Nachbarzellen binden. Wenn daraufhin mit anti-La-hAk Immunkomplexe auf den Zellmembranen entstehen, können diese Komplement- oder ADCC-vermittelt die Zerstörung der Zellen hervorrufen und somit von pathophysiologischer Relevanz sein. Aus diesem Grund wurde mit definierten Komponenten (gereinigte rekombinante Proteine sowie isolierte anti-La-hAk) ein *in vitro* Modell entwickelt, um zu untersuchen, ob anti-La-Autoantikörper bei NK-Zellen ADCC-Reaktionen hervorrufen können.

Zuerst wurde gezeigt, dass das rhLa-Protein auf der Zelloberfläche auch mit verschiedenen SLE-Patientenserum detektiert werden kann, während Seren von gesunden Spendern keine Färbungen erzeugten. Mit gereinigten anti-La-hAk wurde überprüft, ob La-dekorierte Zielzellen in der Gegenwart von IL-2-aktivierten NK-Zellen zerstört werden. Im Chromfreisetzungstest konnten die Antikörper die spezifische Lyse der Zielzellen um lediglich 8% erhöhen. Die Wirkung wurde jedoch signifikant erhöht, wenn gleichzeitig das Stressmolekül ULBP2 auf den Zielzellen vorhanden war (Abbildung 54). Nach Zellstress (UV-Exposition oder Virusinfektion) treten beide Faktoren immer gemeinsam auf: Die Zellen regulieren die ULBP2-Genexpression hoch, sodass der NKG2D-Ligand verstärkt auf der Zellmembran erscheint und gleichzeitig kommt es zur La-Freisetzung aus geschädigten Zellen, welches an die überlebenden Nachbarzellen binden kann. Nach Assoziation von anti-La-Autoantikörpern, die im Patientenserum im Überschuss vorliegen, können NK-Zellen nun über ihren NKG2D-Rezeptor und den FcγRIII simultan aktiviert werden. Für die Experimente mussten die NK-Zellen mit IL-2 vorbehandelt werden, um ADCC-Reaktionen beobachten zu können. Dieser Aktivierungszustand ist *in vivo* z. B. im Rahmen einer viralen Infektion gegeben. Für die Induktion einer adaptiven T-Zell-vermittelten Immunantwort wird

verstärkt IL-2 gebildet, das außer den T-Lymphozyten auch die NK-Zellen stimulieren kann. Die Ergebnisse zeigen, dass anti-La-Autoantikörper zusätzliche NK-Zell-vermittelte Gewebeschäden bewirken können, wenn inflammatorische Bedingungen im Körper vorherrschen, die die Aktivierung von NK-Zellen über IL-2, die Präsentation von ULBP2 auf den Zellen sowie die Freisetzung von La-Protein aus sterbenden Zellen verursachen.

5.6. Entwicklung eines universellen bispezifischen Antikörperfragments für die kombinierte Radioimmuntherapie von Tumoren

Tumorerkrankungen sind die zweithäufigste Todesursache weltweit und an ihren Folgen sterben jährlich etwa 8 Millionen Menschen. Die konventionellen Behandlungsmethoden (Chemotherapie, Radiotherapie sowie die chirurgische Entfernung solider Tumore) werden zunehmend durch Immuntherapeutika unterstützt. Diese sollen v. a. für die Vernichtung der behandlungsresistenten bzw. im Körper verbleibenden Tumorzellen sorgen, um das erneute Tumorwachstum sowie die Bildung von Metastasen zu verhindern. Bis es zur klinischen Erscheinung einer Tumorerkrankung kommt, müssen die maligne transformierten Zellen bereits diverse Strategien entwickelt haben, um die Kontrollmechanismen des Immunsystems zu unterlaufen. Dazu gehören die Sekretion immunsuppressiver Zytokine, die Herunterregulation antigener Oberflächenmoleküle, die Rekrutierung immunregulatorischer myeloider oder lymphoider Zellen sowie Funktionsstörungen von DCs [220, 221].

Das Absterben der bestrahlten Tumorzellen wurde lange Zeit auf die verursachten Mutationen und irreversiblen Schäden in den Zellen zurückgeführt. Inzwischen gibt es aber vermehrt Hinweise darauf, dass auch die Immuneffektorzellen nach der Radiotherapie aktiviert werden und an der Eliminierung des Tumors beteiligt sind [222]. Durch die Bestrahlung verändert sich das immunsuppressive Milieu im Tumorgewebe. Die Freisetzung von Alarminen (z. B. HMGB1, La?), Zytokinen und Chemokinen sorgt für die Einwanderung von Immunzellen. Nach der Antigenaufnahme können aktivierte DCs im Lymphknoten spezifische T-Lymphozyten stimulieren. Die überlebenden Tumorzellen tragen verstärkt Adhäsionsmoleküle, den Fas-Rezeptor sowie TAA-Peptid-präsentierende MHC-Klasse I-Moleküle auf ihrer Oberfläche, die den aktivierten zytotoxischen T-Lymphozyten die Erkennung und Apoptoseinduktion ermöglichen. Aufgrund dieser Beobachtungen wird versucht, die Strahlentherapie mit einer Immuntherapie zu kombinieren, um die Immunzellen noch stärker gegen die Tumorzellen zu aktivieren. Bisher sind Immuntherapeutika auf bestimmte TAAs angewiesen, um ihre Wirkung spezifisch gegen die Tumorzellen zu entfalten. Deshalb müssen für jedes Oberflächenantigen individuelle Antikörper bzw. Antikörperderivate entwickelt werden. Diese Problematik könnte durch die Verwendung des La-Proteins als universelle, induzierbare Zielstruktur gelöst werden. Nach Bestrahlung von Tumorzellen wird das La-Protein von apoptotischen Zellen freigesetzt und bindet auf die Oberfläche von strahlungsresistenten Nachbarzellen (Abbildung 43). Der Effekt ist lokal begrenzt und kann deshalb nicht zu systemischen Gewebeschädigungen führen, sobald ein La-spezifisches Immuntherapeutikum appliziert wird. Des Weiteren bleibt das La-Protein für einige Stunden stabil

auf der Zelloberfläche gebunden und wird nicht proteolytisch gespalten, sondern ist für N-terminal und C-terminal bindende Antikörper zugänglich (Abbildungen 43 und 48).

Für die Erzeugung eines funktionellen anti-La-scFv-Derivats wurden die beiden mAbs 5B9 und 7B6 ausgewählt, da sie lineare, redoxunempfindliche Epitope innerhalb des La-Proteins binden. Es konnte jedoch nur das 7B6 scFv-Fragment in Zellkulturüberstand von HEK 293T-Zellen detektiert werden. Der 5B9 scFv-Antikörper wurde nicht in das Medium sezerniert (Abbildung 56). Aus diesem Grund wurde bei der Entwicklung des bispezifischen Antikörperfragments mit dem 7B6 scFv fortgefahren. Das resultierende CD3x7B6 scBsDb-Molekül konnte aus dem Zellkulturmedium über Ni-NTA-Affinitätschromatographie gewonnen werden. Es war sowohl auf CD3⁺ T-Lymphozyten als auch auf mit rhLa-Protein vorinkubierten Tumorzellen spezifisch nachweisbar (Abbildung 57). Die Aktivierung von CD3⁺ CD8⁺ T-Effektorzellen gegen Tumorzellen, deren Oberfläche zuvor mit rhLa-Protein beladen worden war, wurde im Chromfreisetzungstest gezeigt. Mit steigender Konzentration an eingesetztem rhLa-Protein wurde in Gegenwart des CD3x7B6 scBsDb-Moleküls eine zunehmende T-Zell-vermittelte Lyse der Zielzellen erreicht.

Für zukünftige Anwendungen ist nicht nur die Kombination des CD3x7B6-Diabodies mit vorangegangener Strahlentherapie denkbar, sondern auch eine Verwendung zusammen mit TAA-spezifischen Antikörperfragmenten. Solche Moleküle wurden bereits in der Arbeitsgruppe von Prof. Bachmann entwickelt. Zwei anti-TAA-spezifische scFv-Moleküle sind im Tandemformat angeordnet und über einen Linker miteinander verbunden, der das 7B6-Epitop beinhaltet (siehe Schema in Abbildung 63). In Kombination mit CD3x7B6 können so zytotoxische Effektorzellen auf den TAA-tragenden Tumorzellen immobilisiert werden. Gleichzeitig wird von apoptotischen Zellen endogenes La-Protein freigesetzt und auf der Membran der Nachbarzellen angereichert. Nun kann die CD3x7B6-Komponente des modularen Systems die anti-Tumorwirkung auch TAA-unabhängig verstärken.

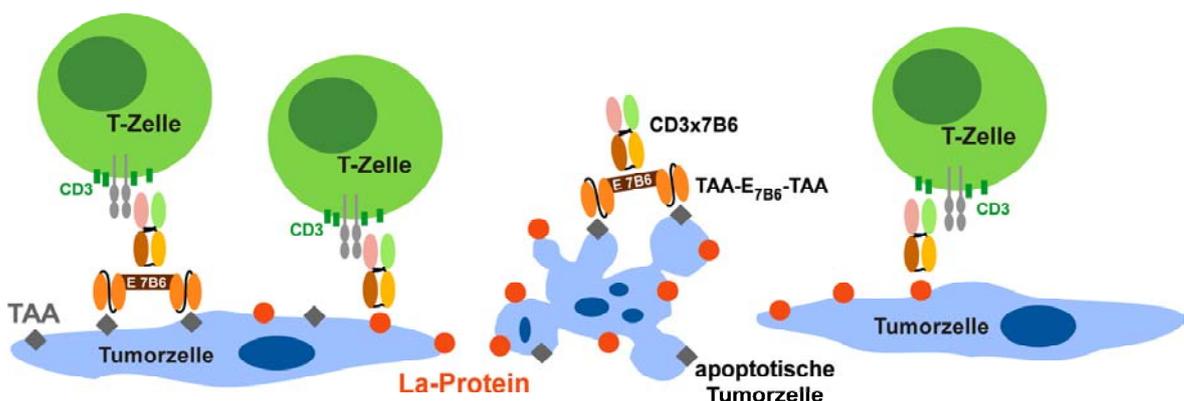


Abbildung 63: Modulares System zur TAA-abhängigen und La-vermittelten Tumorimmuntherapie.

Die TAA-Moleküle auf der Oberfläche von Tumorzellen werden von anti-TAA-spezifischen Antikörperderivaten erkannt. In diesem Fall sind zwei anti-TAA scFv-Moleküle im Tandemformat angeordnet und werden durch ein 7B6-Peptidepitop (E_{7B6}) miteinander verbunden. In Gegenwart des Diabodies CD3x7B6 können zytotoxische T-Zellen zu den Tumorzellen rekrutiert werden, um die Tumorzellen zu eliminieren. Die apoptotischen Zellen setzen La-Protein frei, das auf der Membran der umliegenden Zellen bindet. So kann auch das CD3x7B6-Antikörperfragment allein für die Immobilisierung der T-Zellen auf den Tumorzellen sorgen. Dieser Mechanismus ist besonders für die Bekämpfung der Tumorzellen wichtig, die durch Herunterregulation der TAA-Genexpression versuchen, der Immuntherapie zu entkommen.

6. Zusammenfassung

Das La-Protein wurde als Autoantigen bei Autoimmunpatienten, die an SLE oder Sjögren-Syndrom erkrankt sind, entdeckt. Es kommt in phosphorylierter Form im Zellkern aller Eukaryonten vor und nimmt Aufgaben bei der Faltung, Prozessierung und nukleären Retention von RNA-Polymerase III-Transkripten wahr. Unter normalen zellulären Bedingungen ist das La-Protein außerdem in der Lage, zwischen Zellkern und Zytoplasma zu pendeln. Bei Zellstress, der nach UV-Exposition oder während einer viralen Infektion entsteht, wird das Protein verstärkt im Zytoplasma beobachtet, wo es an der *Cap*-unabhängigen Translation zellulärer und ggf. viraler Proteine beteiligt ist. Wird in der Zelle daraufhin Apoptose induziert, so ist das La-Protein auf der Zellmembran bzw. in apoptotischen Körperchen nachweisbar.

Ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit war die Untersuchung verschiedener monoklonaler anti-La-Antikörper. Einige wenige konnten durch wiederholte Immunisierung von Mäusen mit rhLa-Protein generiert werden. Im Gegensatz dazu resultierte die einmalige Übertragung von gegen das hLa-Protein aktivierten CD4⁺ T-Zellen auf eine hLaTg-Maus in der Gewinnung mehrerer La-spezifischer Antikörper. Die Sequenzanalyse der Gene, die für die variablen Antikörperdomänen codieren, bestätigte, dass es sich um individuell rekombinierte und hypermutierte Immunglobuline handelt. Die Antikörper zeichneten sich außerdem durch unterschiedliche Eigenschaften bei der Bindung von humanem und murinem La-Protein in der Immunfluoreszenz, im Immunoblot oder während der Immunpräzipitation aus. Für die IgG-Antikörper konnten die Epitopbereiche innerhalb des La-Proteins eingegrenzt werden. Auffällig waren die kurzen linearen Peptidepitope, die von den auf konventionelle Art erzeugten Antikörpern gebunden wurden. Hingegen erkannten alle Antikörper, die aus dem adoptiven T-Zell-Transfer hervorgegangen waren, Konformationsepitope. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass einige mAks aber auch anti-La-Patientenserum die reduzierte von der oxidierten Form des La-Proteins unterscheiden können. Unerwartet ist die Erkenntnis, dass sich offensichtlich zahlreiche B-Zellen mit anti-La-Spezifität von wenigen variablen Ketten ableiten und dass diese bei einer herkömmlichen Immunisierung entweder nicht aktiviert werden (und deshalb nicht in der Milz zu finden sind) oder sogar eliminiert werden.

Der Import des La-Proteins in den Zellkern wird durch die klassischen Transportmoleküle Karyopherin- α und Karyopherin- β vermittelt. Für den Shuttlingprozess muss das Protein auch wieder aus dem Kern exportiert werden. Da es kontroverse Daten bezüglich eines Crm1-abhängigen Kernexports gab, wurde das Shuttlingverhalten von GFP-La-Fusionsproteinen in dieser Arbeit genauer analysiert. Mit Hilfe von Heterokaryonexperimenten konnte bestätigt werden, dass sowohl das hLa- als auch das mL-La-Protein zwischen humanen und murinen Zellkernen pendeln kann und dass der Export unabhängig von Crm1 stattfindet. Aufgrund der kurzen Verweildauer im Zytoplasma schienen die Proteine quantitativ im Zellkern vorzuliegen, doch ein Teil konnte stets in den im Heterokaryon enthaltenen Nachbarzellkernen detektiert werden. Die Verwendung von N-terminal deletierten La-Fragmenten, die alle über das C-terminale NLS verfügten, gab Aufschluss über die Regulation des Shuttlings. Es zeigte sich, dass die Menge des

exportierten Proteins von einem nukleären Retentionspartner festgelegt wird, der das La-Protein bindet und dadurch im Zellkern festhält. Wird diese Assoziation aufgehoben, gelangt das La-Protein in das Zytoplasma. Dort ist es allerdings nicht detektierbar, da das NLS einen umgehenden Import zurück in den Zellkern hervorruft. Zusätzlich wurde die Auswirkung von zellulärem Stress (z. B. durch ROS) auf die intrazelluläre Lokalisation des Proteins untersucht. Unter oxidativen zellulären Bedingungen wird einerseits die Wechselwirkung mit dem nukleären Retentionspartner aufgehoben und andererseits findet kein Kernimport über Karyopherin- α mehr statt. Aus diesem Grund reichert sich das La-Protein nun verstärkt im Zytoplasma an.

Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass das La-Protein von apoptotischen Zellen freigesetzt wird und daraufhin auf die Membran von Nachbarzellen binden kann. Die Bindungseigenschaften wurden mit rhLa-Protein genauer untersucht. Das La-Protein war auf Endothel- und Epithelzellen nachweisbar und die Bindung fand sowohl bei Inkubation auf Eis als auch bei 37 °C statt. Da das La-Protein auch über DNA-Bindungseigenschaften verfügt, war es in der Lage, DNA auf der Zelloberfläche zu immobilisieren. Innerhalb von PBMCs wurde es selektiv auf Antigen-präsentierenden Zellen nachgewiesen. Diese Eigenschaften lassen eine Beteiligung des Proteins bei der Induktion von anti-dsDNA-Antikörpern in Autoimmunpatienten vermuten.

Es ist bekannt, dass die Bedingungen (Virusinfektion, UV-Exposition), die zur Translokation des La-Proteins auf die Zelloberfläche führen, bei SLE-Patienten Krankheitsschübe auslösen können. Bisher wurden anti-La-Autoantikörper aber eher nicht als pathophysiologisch erachtet, da sie bei der Bindung an bereits apoptotische Zellen keine weiteren Schäden verursachen können. Jedoch wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass das La-Protein apoptotischer Zellen auf der Oberfläche von lebenden Zellen in der Umgebung nachgewiesen werden kann. Daran könnten anti-La-Autoantikörper binden und eine Komplement- oder NK-Zell-vermittelte Zerstörung der Nachbarzellen hervorrufen. Dadurch entstehen zusätzliche Gewebeschäden. Im Chromfreisetzungstest waren NK-Zellen tatsächlich in der Lage, La-dekorierte Zielzellen Antikörper-abhängig zu lysieren, sofern zusätzliche *in vitro* Stimuli präsent waren, die z. B. eine virale Infektion simulierten.

Die Immuntherapie von Tumoren ist auf bestimmte Zielstrukturen auf den Tumorzellen angewiesen, über welche die Wirkstoffe spezifisch zu den maligne transformierten Zellen gebracht werden. Die Therapeutika, die sich oft von mAKs gegen diese Zielstrukturen ableiten, müssen für verschiedene Tumorarten individuell entwickelt werden. Da das La-Protein von apoptotischen Zellen freigesetzt wird und auf die Membran benachbarter (bestrahlungsresistenter) Zellen binden kann, ist es in Kombination mit einer vorangegangenen Bestrahlung als universelle Zielstruktur für die Immuntherapie nutzbar. Aus diesem Grund wurde unter Verwendung eines ausführlich in dieser Arbeit charakterisierten anti-La-Antikörpers ein rekombinantes bispezifisches Antikörperderivat entwickelt. Es ist in der Lage, das La-Protein auf der Oberfläche von Tumorzellen zu binden und auf diesen zytotoxische T-Lymphozyten zu immobilisieren. Durch die Quervernetzung werden die T-Lymphozyten aktiviert und induzieren in den Zielzellen Apoptose. Das neue Antikörperderivat verspricht eine vielseitige Anwendung in Kombination mit Strahlentherapie oder auch mit rekombinanten Antikörpermolekülen, die gegen spezifische Zielstrukturen auf den Tumorzellen gerichtet sind.

7. Literaturverzeichnis

1. Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., Shlomichik, M. (2002) Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH; Heidelberg, Berlin
2. Palm, N. W., Medzhitov, R. (2009) Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol Rev*; 227(1): 221-33.
3. Takeda, K., Kaisho, T., Akira, S. (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*; 21: 335-76.
4. Ueno, H., Klechevsky, E., Morita, R., Aspor, C., Cao, T., Matsui, T., Di Pucchio, T., Connolly, J., Fay, J. W., Pascual, V., Palucka, A. K., Banchereau, J. (2007) Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev*; 219: 118-42.
5. Savina, A., Amigorena, S. (2007) Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev*; 219: 143-56.
6. Schäkel, K., Kannagi, R., Kniep, B., Goto, Y., Mitsuoka, C., Zwirner, J., Soruri, A., von Kietzell, M., Rieber, E. (2002) 6-Sulfo LacNAC, a novel carbohydrate modification of PSGL-1, defines an inflammatory type of human dendritic cells. *Immunity*; 17(3): 289-301.
7. Schäkel, K., von Kietzell, M., Hansel, A., Ebling, A., Schulze, L., Haase, M., Semmler, C., Sarfati, M., Barclay, A. N., Randolph, G. J., Meurer, M., Rieber, E. P. (2006) Human 6-sulfo LacNAC-expressing dendritic cells are principal producers of early interleukin-12 and are controlled by erythrocytes. *Immunity*; 24(6): 767-77.
8. Schmitz, M., Zhao, S., Deuse, Y., Schakel, K., Wehner, R., Wohner, H., Holig, K., Wienforth, F., Kiessling, A., Bornhauser, M., Temme, A., Rieger, M. A., Weigle, B., Bachmann, M., Rieber, E. P. (2005) Tumoricidal potential of native blood dendritic cells: Direct tumor cell killing and activation of NK cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol*; 174(7): 4127-34.
9. Schäkel, K., Mayer, E., Federle, C., Schmitz, M., Riethmüller, G., Rieber, E. P. (1998) A novel dendritic cell population in human blood: One-step immunomagnetic isolation by a specific mab (M-DC8) and *in vitro* priming of cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol*; 28(12): 4084-93.
10. Schroeder, H. W. (2006) Similarity and divergence in the development and expression of the mouse and human antibody repertoires. *Developmental & Comparative Immunology*; 30(1-2): 119-35.
11. McHeyzer-Williams, L. J., McHeyzer-Williams, M. G. (2005) Antigen-specific memory B cell development. *Annu Rev Immunol*; 23: 487-513.
12. Chavez-Galan, L., Arenas-Del Angel, M. C., Zenteno, E., Chavez, R., Lascrain, R. (2009) Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol*; 6(1): 15-25.
13. Krysko, D. V., Vanden Berghe, T., D'Herde, K., Vandenabeele, P. (2008) Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*; 44(3): 205-21.
14. Cullen, S. P., Martin, S. J. (2007) Mechanisms of granule-dependent killing. *15(2)*: 251-62.
15. Guzman, E., Langowski, J. L., Owen-Schaub, L. (2004) Mad dogs, Englishmen and apoptosis: The role of cell death in UV-induced skin cancer. *Apoptosis*; 8(4): 315-25.
16. Köhler, G., Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*; 256(5517): 495-7.
17. Carter, P. (2001) Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer*; 1(2): 118-29.
18. Bird, R. E., Hardman, K. D., Jacobson, J. W., Johnson, S., Kaufman, B. M., Lee, S. M., Lee, T., Pope, S. H., Riordan, G. S., Whitlow, M. (1988) Single-chain antigen-binding proteins. *Science*; 242(4877): 423-6.
19. Kontermann, R. E. (2005) Recombinant bispecific antibodies for cancer therapy. *Acta Pharmacol Sin*; 26(1): 1-9.
20. Reiter, R. E., Gu, Z., Watabe, T., Thomas, G., Szigeti, K., Davis, E., Wahl, M., Nisitani, S., Yamashiro, J., Le Beau, M. M., Loda, M., Witte, O. N. (1998) Prostate stem cell antigen: A cell surface marker overexpressed in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 95(4): 1735-40.
21. Dinndorf, P., Andrews, R., Benjamin, D., Ridgway, D., Wolff, L., Bernstein, I. (1986) Expression of normal myeloid-associated antigens by acute leukemia cells. *Blood*; 67(4): 1048-53.
22. Slamon, D., Clark, G., Wong, S., Levin, W., Ullrich, A., McGuire, W. (1987) Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*; 235(4785): 177-82.

23. Nencioni, A., Grunebach, F., Schmidt, S. M., Muller, M. R., Boy, D., Patrone, F., Ballestrero, A., Brossart, P. (2008) The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Crit Rev Oncol Hematol*; 65(3): 191-99.
24. Tacke, P. J., de Vries, I. J., Torensma, R., Figdor, C. G. (2007) Dendritic-cell immunotherapy: From *ex vivo* loading to *in vivo* targeting. *Nat Rev Immunol*; 7(10): 790-802.
25. Melief, C. J. M. (2008) Cancer immunotherapy by dendritic cells. *Immunity*; 29(3): 372-83.
26. Weiner, L. M., Dhodapkar, M. V., Ferrone, S. (2009) Monoclonal antibodies for cancer immunotherapy. *The Lancet*; 373(9668): 1033-40.
27. Bargou, R., Leo, E., Zugmaier, G., Klinger, M., Goebeler, M., Knop, S., Noppeney, R., Viardot, A., Hess, G., Schuler, M., Einsele, H., Brandl, C., Wolf, A., Kirchinger, P., Klappers, P., Schmidt, M., Riethmuller, G., Reinhardt, C., Baeuerle, P. A., Kufer, P. (2008) Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science*; 321(5891): 974-7.
28. Burges, A., Wimberger, P., Kumper, C., Gorbounova, V., Sommer, H., Schmalfeldt, B., Pfisterer, J., Lichinitser, M., Makhson, A., Moiseyenko, V., Lahr, A., Schulze, E., Jager, M., Strohle, M. A., Heiss, M. M., Gottwald, T., Lindhofer, H., Kimmig, R. (2007) Effective relief of malignant ascites in patients with advanced ovarian cancer by a trifunctional anti-EpCAM x anti-CD3 antibody: A phase I/II study. *Clin Cancer Res*; 13(13): 3899-905.
29. Kiewe, P., Hasmuller, S., Kahlert, S., Heinrigs, M., Rack, B., Marme, A., Korfel, A., Jager, M., Lindhofer, H., Sommer, H., Thiel, E., Untch, M. (2006) Phase I trial of the trifunctional anti-HER2 x anti-CD3 antibody ertumaxomab in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*; 12(10): 3085-91.
30. Baeuerle, P. A., Reinhardt, C. (2009) Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy. *Cancer Res*; 69(12): 4941-44.
31. Sadelain, M., Brentjens, R., Riviere, I. (2009) The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors. *Curr Opin Immunol*; 21(2): 215-23.
32. Pogge von Strandmann, E., Hansen, H. P., Reiners, K. S., Schnell, R., Borchmann, P., Merkert, S., Simhadri, V. R., Draube, A., Reiser, M., Purr, I., Hallek, M., Engert, A. (2006) A novel bispecific protein (ULBP2-BB4) targeting the NKG2D receptor on natural killer (NK) cells and CD138 activates NK cells and has potent antitumor activity against human multiple myeloma *in vitro* and *in vivo*. *Blood*; 107(5): 1955-62.
33. Burmester, G.-R., Pezzutto, A. (1998) Taschenatlas der Immunologie: Grundlagen, Labor, Klinik. Thieme; Stuttgart, New York
34. Monneaux, F., Muller, S. (2002) Epitope spreading in systemic lupus erythematosus: Identification of triggering peptide sequences. *Arthritis Rheum*; 46(6): 1430-8.
35. Routsias, J. G., Kyriakidis, N., Latreille, M., Tzioufas, A. G. (2009) RNA recognition motif (RRM) of La/SSB: The bridge for inter-particle spreading of autoimmune response to RNP. *Mol Med*: Epub ahead of print.
36. Schulze, C., Munoz, L. E., Franz, S., Sarter, K., Chaurio, R. A., Gaip, U. S., Herrmann, M. (2008) Clearance deficiency--A potential link between infections and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*; 8(1): 5-8.
37. Janko, C., Schorn, C., Grossmayer, G. E., Frey, B., Herrmann, M., Gaip, U. S., Munoz, L. E. (2008) Inflammatory clearance of apoptotic remnants in systemic lupus erythematosus (SLE). *Autoimmun Rev*; 8(1): 9-12.
38. Arbuckle, M. R., McClain, M. T., Rubertone, M. V., Scofield, R. H., Dennis, G. J., James, J. A., Harley, J. B. (2003) Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*; 349(16): 1526-33.
39. Yurasov, S., Wardemann, H., Hammersen, J., Tsuiji, M., Meffre, E., Pascual, V., Nussenzweig, M. C. (2005) Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J Exp Med*; 201(5): 703-11.
40. Castro, J., Balada, E., Ordi-Ros, J., Vilardell-Tarrés, M. (2008) The complex immunogenetic basis of systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity Reviews*; 7(5): 345-51.
41. Barzilai, O., Ram, M., Shoenfeld, Y. (2007) Viral infection can induce the production of autoantibodies. *Curr Opin Rheumatol*; 19(6): 636-43.
42. Mattioli, M., Reichlin, M. (1974) Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus. Description of a cytoplasmic nonribosomal antigen. *Arthritis & Rheumatism*; 17(4): 421-29.
43. Alsbaugh, M. A., Tan, E. M. (1975) Antibodies to cellular antigens in Sjogren's syndrome. *J Clin Invest*; 55(5): 1067-73.

44. Lerner, M. R., Steitz, J. A. (1979) Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 76(11): 5495-9.
45. Akizuki, M., Boehm-Truitt, M. J., Kassan, S. S., Steinberg, A. D., Chused, T. M. (1977) Purification of an acidic nuclear protein antigen and demonstration of its antibodies in subsets of patients with sicca syndrome. *J Immunol*; 119(3): 932-8.
46. Teppo, A. M., Gripenberg, M., Kurki, P., Baklien, K., Helve, T., Wegelius, O. (1982) Purification and characterization of a nuclear SS-B antigen. *Scand J Immunol*; 15(1): 1-7.
47. Chambers, J. C., Kenan, D., Martin, B. J., Keene, J. D. (1988) Genomic structure and amino acid sequence domains of the human La autoantigen. *J Biol Chem*; 263(34): 18043-51.
48. Habets, W. J., den Brok, J. H., Boerbooms, A. M., van de Putte, L. B., van Venrooij, W. J. (1983) Characterization of the SS-B (La) antigen in adenovirus-infected and uninfected HeLa cells. *EMBO J*; 2(10): 1625-31.
49. Venables, P. J., Smith, P. R., Maini, R. N. (1983) Purification and characterization of the Sjogren's syndrome A and B antigens. *Clin Exp Immunol*; 54(3): 731-8.
50. Gottlieb, E., Steitz, J. A. (1989) The RNA binding protein La influences both the accuracy and the efficiency of RNA polymerase III transcription *in vitro*. *EMBO J*; 8(3): 841-50.
51. Francoeur, A. M., Gritzmacher, C. A., Peebles, C. L., Reese, R. T., Tan, E. M. (1985) Synthesis of small nuclear ribonucleoprotein particles by the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 82(11): 3635-39.
52. Semsei, I., Troster, H., Bartsch, H., Schwemmle, M., Igloi, G. L., Bachmann, M. (1993) Isolation of rat cDNA clones coding for the autoantigen SS-B/La: Detection of species-specific variations. *Gene*; 126(2): 265-68.
53. Scherly, D., Stutz, F., Lin-Marq, N., Clarkson, S. G. (1993) La proteins from *Xenopus laevis*. cDNA cloning and developmental expression. *J Mol Biol*; 231(2): 196-204.
54. Topfer, F., Gordon, T., McCluskey, J. (1993) Characterization of the mouse autoantigen La (SS-B). Identification of conserved RNA-binding motifs, a putative ATP binding site and reactivity of recombinant protein with poly(U) and human autoantibodies. *J Immunol*; 150(7): 3091-100.
55. Bai, C., Li, Z., Tolia, P. P. (1994) Developmental characterization of a *Drosophila* RNA-binding protein homologous to the human systemic lupus erythematosus-associated La/SS-B autoantigen. *Mol Cell Biol*; 14(8): 5123-29.
56. Yoo, C. J., Wolin, S. L. (1994) La proteins from *Drosophila melanogaster* and *Saccharomyces cerevisiae*: A yeast homolog of the La autoantigen is dispensable for growth. *Mol Cell Biol*; 14(8): 5412-24.
57. Lin-Marq, N., Clarkson, S. G. (1998) Efficient synthesis, termination and release of RNA polymerase III transcripts in *Xenopus* extracts depleted of La protein. *EMBO J*; 17(7): 2033-41.
58. Van Horn, D. J., Yoo, C. J., Xue, D., Shi, H., Wolin, S. L. (1997) The La protein in *Schizosaccharomyces pombe*: A conserved yet dispensable phosphoprotein that functions in tRNA maturation. *RNA*; 3(12): 1434-43.
59. Westermann, S., Weber, K. (2000) Cloning and recombinant expression of the La RNA-binding protein from *Trypanosoma brucei*. *Biochim Biophys Acta*; 1492(2-3): 483-7.
60. Marchetti, M. A., Tschudi, C., Kwon, H., Wolin, S. L., Ullu, E. (2000) Import of proteins into the trypanosome nucleus and their distribution at karyokinesis. *J Cell Sci*; 113 (Pt 5): 899-906.
61. Chan, E. K. L., Sullivan, K. F., Tan, E. M. (1989) Ribonucleoprotein SS-B/La belongs to a protein family with consensus sequences for RNA-binding. *Nucl Acids Res*; 17(6): 2233-44.
62. Bai, C., Tolia, P. P. (2000) Genetic analysis of a La homolog in *Drosophila melanogaster*. *Nucl Acids Res*; 28(5): 1078-84.
63. Park, J.-M., Kohn, M. J., Bruinsma, M. W., Vech, C., Intine, R. V., Fuhrmann, S., Grinberg, A., Mukherjee, I., Love, P. E., Ko, M. S., DePamphilis, M. L., Maraia, R. J. (2006) The multifunctional RNA-binding protein La is required for mouse development and for the establishment of embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*; 26(4): 1445-51.
64. Wolin, S. L., Cedervall, T. (2002) The La protein. *Annu Rev Biochem*; 71: 375-403.
65. Bousquet-Antonelli, C., Deragon, J. M. (2009) A comprehensive analysis of the La-motif protein superfamily. *RNA*; 15(5): 750-64.
66. Francoeur, A. M., Chan, E. K., Garrels, J. I., Mathews, M. B. (1985) Characterization and purification of lupus antigen La, an RNA-binding protein. *Mol Cell Biol*; 5(3): 586-90.
67. Pizer, L. I., Deng, J. S., Stenberg, R. M., Tan, E. M. (1983) Characterization of a phosphoprotein associated with the SS-B/La nuclear antigen in adenovirus-infected and uninfected KB cells. *Mol Cell Biol*; 3(7): 1235-45.

68. Broekhuis, C. H. D., Neubauer, G., Heijden, A. v. d., Mann, M., Proud, C. G., Venrooij, W. J. v., Pruijn, G. J. M. (2000) Detailed analysis of the phosphorylation of the human La (SS-B) autoantigen. (De)phosphorylation does not affect its subcellular distribution. *Biochemistry*; 39(11): 3023 - 33.
69. Fan, H., Sakulich, A. L., Goodier, J. L., Zhang, X., Qin, J., Maraia, R. J. (1997) Phosphorylation of the human La antigen on serine 366 can regulate recycling of RNA polymerase III transcription complexes. *Cell*; 88(5): 707-15.
70. Rinke, J., Steitz, J. A. (1982) Precursor molecules of both human 5S ribosomal RNA and transfer RNAs are bound by a cellular protein reactive with anti-La lupus antibodies. *Cell*; 29(1): 149-59.
71. Rinke, J., Steitz, J. A. (1985) Association of the lupus antigen La with a subset of U6 snRNA molecules. *Nucleic Acids Res*; 13(7): 2617-29.
72. Hendrick, J. P., Wolin, S. L., Rinke, J., Lerner, M. R., Steitz, J. A. (1981) Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins are a subclass of La ribonucleoproteins: Further characterization of the Ro and La small ribonucleoproteins from uninfected mammalian cells. *Mol Cell Biol*; 1(12): 1138-49.
73. Lerner, M. R., Andrews, N. C., Miller, G., Steitz, J. A. (1981) Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and complexed with protein are precipitated by antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 78(2): 805-9.
74. Lerner, M. R., Boyle, J. A., Hardin, J. A., Steitz, J. A. (1981) Two novel classes of small ribonucleoproteins detected by antibodies associated with lupus erythematosus. *Science*; 211(4480): 400-2.
75. Bogenhagen, D. F., Brown, D. D. (1981) Nucleotide sequences in Xenopus 5S DNA required for transcription termination. *Cell*; 24(1): 261-70.
76. Mathews, M. B., Francoeur, A. M. (1984) La antigen recognizes and binds to the 3'-oligouridylate tail of a small RNA. *Mol Cell Biol*; 4(6): 1134-40.
77. Stefano, J. E. (1984) Purified lupus antigen La recognizes an oligouridylate stretch common to the 3' termini of RNA polymerase III transcripts. *Cell*; 36(1): 145-54.
78. Francoeur, A. M., Mathews, M. B. (1982) Interaction between VA RNA and the lupus antigen La: Formation of a ribonucleoprotein particle *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 79(22): 6772-6.
79. Madore, S. J., Wieben, E. D., Pederson, T. (1984) Eukaryotic small ribonucleoproteins. Anti-La human autoantibodies react with U1 RNA-protein complexes. *J Biol Chem*; 259(3): 1929-33.
80. Deng, J. S., Takasaki, Y., Tan, E. M. (1981) Nonhistone nuclear antigens reactive with autoantibodies. Immunofluorescence studies on distribution in synchronized cells. *J Cell Biol*; 91(3 Pt 1): 654-60.
81. Intine, R. V., Dundr, M., Vassilev, A., Schwartz, E., Zhao, Y., Depamphilis, M. L., Maraia, R. J. (2004) Nonphosphorylated human La antigen interacts with nucleolin at nucleolar sites involved in rRNA biogenesis. *Mol Cell Biol*; 24(24): 10894-904.
82. Holcik, M., Sonenberg, N. (2005) Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 6(4): 318-27.
83. Jang, S. K., Krausslich, H. G., Nicklin, M. J., Duke, G. M., Palmenberg, A. C., Wimmer, E. (1988) A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during *in vitro* translation. *J Virol*; 62(8): 2636-43.
84. Pelletier, J., Sonenberg, N. (1988) Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature*; 334(6180): 320-5.
85. Hellen, C. U., Sarnow, P. (2001) Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev*; 15(13): 1593-612.
86. Carter, M. S., Sarnow, P. (2000) Distinct mRNAs that encode La autoantigen are differentially expressed and contain internal ribosome entry sites. *J Biol Chem*; 275(36): 28301-07.
87. Holcik, M., Korneluk, R. G. (2000) Functional characterization of the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) internal ribosome entry site element: Role of La autoantigen in XIAP translation. *Mol Cell Biol*; 20(13): 4648-57.
88. Trotta, R., Vignudelli, T., Candini, O., Intine, R. V., Pecorari, L., Guerzoni, C., Santilli, G., Byrom, M. W., Goldoni, S., Ford, L. P., Caligiuri, M. A., Maraia, R. J., Perrotti, D., Calabretta, B. (2003) BCR/ABL activates mdm2 mRNA translation via the La antigen. *Cancer Cell*; 3(2): 145-60.
89. Kim, Y. K., Back, S. H., Rho, J., Lee, S. H., Jang, S. K. (2001) La autoantigen enhances translation of BiP mRNA. *Nucleic Acids Res*; 29(24): 5009-16.
90. Wilusz, J., Kurilla, M. G., Keene, J. D. (1983) A host protein (La) binds to a unique species of minus-sense leader RNA during replication of vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 80(19): 5827-31.

91. Kurilla, M. G., Keene, J. D. (1983) The leader RNA of vesicular stomatitis virus is bound by a cellular protein reactive with anti-La lupus antibodies. *Cell*; 34(3): 837-45.
92. Kurilla, M. G., Cabradilla, C. D., Holloway, B. P., Keene, J. D. (1984) Nucleotide sequence and host La protein interactions of rabies virus leader RNA. *J Virol*; 50(3): 773-8.
93. Wilusz, J., Keene, J. D. (1984) Interactions of plus and minus strand leader RNAs of the New Jersey serotype of vesicular stomatitis virus with the cellular La protein. *Virology*; 135(1): 65-73.
94. Bitko, V., Musiyenko, A., Bayfield, M. A., Maraia, R. J., Barik, S. (2008) Cellular La protein shields nonsegmented negative-strand RNA viral leader RNA from RIG-I and enhances virus growth by diverse mechanisms. *J Virol*; 82(16): 7977-87.
95. Raha, T., Pudi, R., Das, S., Shaila, M. S. (2004) Leader RNA of rinderpest virus binds specifically with cellular La protein: A possible role in virus replication. *Virus Res*; 104(2): 101-09.
96. Spangberg, K., Wiklund, L., Schwartz, S. (2001) Binding of the La autoantigen to the hepatitis C virus 3' untranslated region protects the RNA from rapid degradation *in vitro*. *J Gen Virol*; 82(Pt 1): 113-20.
97. Meerovitch, K., Svitkin, Y. V., Lee, H. S., Lejbkowitz, F., Kenan, D. J., Chan, E. K., Agol, V. I., Keene, J. D., Sonenberg, N. (1993) La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of poliovirus RNA in reticulocyte lysate. *J Virol*; 67(7): 3798-807.
98. Ali, N., Siddiqui, A. (1997) The La antigen binds 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 94(6): 2249-54.
99. Ray, P. S., Das, S. (2002) La autoantigen is required for the internal ribosome entry site-mediated translation of coxsackievirus B3 RNA. *Nucl Acids Res*; 30(20): 4500-08.
100. Costa-Mattioli, M., Svitkin, Y., Sonenberg, N. (2004) La autoantigen is necessary for optimal function of the poliovirus and hepatitis C virus internal ribosome entry site *in vivo* and *in vitro*. *Mol Cell Biol*; 24(15): 6861-70.
101. Castro, A., Faura, M., Agell, N., Renau-Piqueras, J., Bachs, O. (1996) The autoantigen La/SSB is a calmodulin-binding protein. *Cell Calcium*; 20(6): 493-500.
102. Alfano, C., Sanfelice, D., Babon, J., Kelly, G., Jacks, A., Curry, S., Conte, M. R. (2004) Structural analysis of cooperative RNA binding by the La motif and central RRM domain of human La protein. *Nat Struct Mol Biol*; 11(4): 323-9.
103. Jacks, A., Babon, J., Kelly, G., Manolaridis, I., Cary, P. D., Curry, S., Conte, M. R. (2003) Structure of the C-terminal domain of human La protein reveals a novel RNA recognition motif coupled to a helical nuclear retention element. *Structure (Camb)*; 11(7): 833-43.
104. Gajiwala, K. S., Burley, S. K. (2000) Winged helix proteins. *Curr Opin Struct Biol*; 10(1): 110-16.
105. Dong, G., Chakshusmathi, G., Wolin, S. L., Reinisch, K. M. (2004) Structure of the La motif: A winged helix domain mediates RNA binding via a conserved aromatic patch. *EMBO J*; 23(5): 1000-07.
106. Maris, C., Dominguez, C., Allain, F. H.-T. (2005) The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *FEBS Journal*; 272(9): 2118-31.
107. Teplova, M., Yuan, Y.-R., Phan, A. T., Malinina, L., Ilin, S., Teplov, A., Patel, D. J. (2006) Structural basis for recognition and sequestration of UUUOH 3' termini of nascent RNA polymerase III transcripts by La, a rheumatic disease autoantigen. *Mol Cell*; 21(1): 75-85.
108. Kotik-Kogan, O., Valentine, E. R., Sanfelice, D., Conte, M. R., Curry, S. (2008) Structural analysis reveals conformational plasticity in the recognition of RNA 3' ends by the human La protein. *Structure*; 16(6): 852-62.
109. Elad, N., Maimon, T., Frenkiel-Krispin, D., Lim, R. Y., Medalia, O. (2009) Structural analysis of the nuclear pore complex by integrated approaches. *Curr Opin Struct Biol*; 19(2): 226-32.
110. Pemberton, L. F., Paschal, B. M. (2005) Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic*; 6(3): 187-98.
111. Xu, L., Massague, J. (2004) Nucleocytoplasmic shuttling of signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 5(3): 209-19.
112. Kudo, N., Wolff, B., Sekimoto, T., Schreiner, E. P., Yoneda, Y., Yanagida, M., Horinouchi, S., Yoshida, M. (1998) Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to Crm1. *Exp Cell Res*; 242(2): 540-7.
113. Sorokin, A. V., Kim, E. R., Ovchinnikov, L. P. (2007) Nucleocytoplasmic transport of proteins. *Biochemistry (Mosc)*; 72(13): 1439-57.
114. Simons, F. H. M., Broers, F. J. M., van Venrooij, W. J., Pruijn, G. J. M. (1996) Characterization of *cis*-acting signals for nuclear import and retention of the La (SS-B) autoantigen. *Exp Cell Res*; 224(2): 224-36.

115. Rosenblum, J. S., Pemberton, L. F., Bonifaci, N., Blobel, G. (1998) Nuclear import and the evolution of a multifunctional RNA-binding protein. *J Cell Biol*; 143(4): 887-99.
116. Intine, R. V., Dundr, M., Misteli, T., Maraia, R. J. (2002) Aberrant nuclear trafficking of La protein leads to disordered processing of associated precursor tRNAs. *Mol Cell*; 9(5): 1113-23.
117. Bayfield, M. A., Kaiser, T. E., Intine, R. V., Maraia, R. J. (2007) Conservation of a masked nuclear export activity of La proteins and its effects on tRNA maturation. *Mol Cell Biol*; 27(9): 3303-12.
118. Horke, S., Reumann, K., Schweizer, M., Will, H., Heise, T. (2004) Nuclear trafficking of La protein depends on a newly identified nucleolar localization signal and the ability to bind RNA. *J Biol Chem*; 279(25): 26563-70.
119. Intine, R. V., Tenenbaum, S. A., Sakulich, A. L., Keene, J. D., Maraia, R. J. (2003) Differential phosphorylation and subcellular localization of La RNPs associated with precursor tRNAs and translation-related mRNAs. *Mol Cell*; 12(5): 1301-7.
120. Maraia, R. J., Intine, R. V. (2001) Recognition of nascent RNA by the human La antigen: Conserved and divergent features of structure and function. *Mol Cell Biol*; 21(2): 367-79.
121. Goodier, J. L., Fan, H., Maraia, R. J. (1997) A carboxy-terminal basic region controls RNA polymerase III transcription factor activity of human La protein. *Mol Cell Biol*; 17(10): 5823-32.
122. Bachmann, M., Pfeifer, K., Schröder, H. C., Müller, W. E. G. (1990) Characterization of the autoantigen La as a nucleic acid-dependent ATPase/dATPase with melting properties. *Cell*; 60(1): 85-93.
123. Huhn, P., Pruijn, G., van Venrooij, W., Bachmann, M. (1997) Characterization of the autoantigen La (SS-B) as a dsRNA unwinding enzyme. *Nucl Acids Res*; 25(2): 410-16.
124. Xiao, Q., Sharp, T. V., Jeffrey, I. W., James, M. C., Pruijn, G. J., van Venrooij, W. J., Clemens, M. J. (1994) The La antigen inhibits the activation of the interferon-inducible protein kinase PKR by sequestering and unwinding double-stranded RNA. *Nucleic Acids Res*; 22(13): 2512-8.
125. James, M. C., Jeffrey, I. W., Pruijn, G. J., Thijssen, J. P., Clemens, M. J. (1999) Translational control by the La antigen. Structure requirements for rescue of the double-stranded RNA-mediated inhibition of protein synthesis. *Eur J Biochem*; 266(1): 151-62.
126. Fan, H., Goodier, J. L., Chamberlain, J. R., Engelke, D. R., Maraia, R. J. (1998) 5' processing of tRNA precursors can be modulated by the human La antigen phosphoprotein. *Mol Cell Biol*; 18(6): 3201-11.
127. Craig, A. W., Svitkin, Y. V., Lee, H. S., Belsham, G. J., Sonenberg, N. (1997) The La autoantigen contains a dimerization domain that is essential for enhancing translation. *Mol Cell Biol*; 17(1): 163-9.
128. Horke, S., Reumann, K., Rang, A., Heise, T. (2002) Molecular characterization of the human La protein-hepatitis B virus RNA.B interaction *in vitro*. *J Biol Chem*; 277(38): 34949-58.
129. Clemens, M. J. (1993) The small RNAs of Epstein-Barr virus. *Mol Biol Rep*; 17(2): 81-92.
130. Alspaugh, M. A., Maddison, P. (1979) Resolution of the identity of certain antigen-antibody systems in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome: An interlaboratory collaboration. *Arthritis Rheum*; 22(7): 796-8.
131. Bachmann, M., Pfeifer, K., Schröder, H. C., Müller, W. E. G. (1987) The nucleocytoplasmic shuttling of the La antigen in CV-1 cells. *Molecular Biology Reports*; 12(3): 239-40.
132. Fok, V., Friend, K., Steitz, J. A. (2006) Epstein-Barr virus noncoding RNAs are confined to the nucleus, whereas their partner, the human La protein, undergoes nucleocytoplasmic shuttling. *J Cell Biol*; 173(3): 319-25.
133. Bachmann, M., Falke, D., Schroder, H. C., Muller, W. E. G. (1989) Intracellular distribution of the La antigen in CV-1 cells after herpes simplex virus type 1 infection compared with the localization of U small nuclear ribonucleoprotein particles. *J Gen Virol*; 70(4): 881-91.
134. Baboonian, C., Venables, P. J., Booth, J., Williams, D. G., Roffe, L. M., Maini, R. N. (1989) Virus infection induces redistribution and membrane localization of the nuclear antigen La (SS-B): A possible mechanism for autoimmunity. *Clin Exp Immunol*; 78(3): 454-9.
135. Bachmann, M., Chang, S., Slor, H., Kukulies, J., Muller, W. E. (1990) Shuttling of the autoantigen La between nucleus and cell surface after uv irradiation of human keratinocytes. *Exp Cell Res*; 191(2): 171-80.
136. Furukawa, F., Kashihara-Sawami, M., Lyons, M. B., Norris, D. A. (1990) Binding of antibodies to the extractable nuclear antigens SS-A/Ro and SS-B/La is induced on the surface of human keratinocytes by ultraviolet light (UVL): Implications for the pathogenesis of photosensitive cutaneous lupus. *J Invest Dermatol*; 94(1): 77-85.

137. Furukawa, F., Lyons, M., Lee, L., Coulter, S., Norris, D. (1988) Estradiol enhances binding to cultured human keratinocytes of antibodies specific for SS-A/Ro and SS-B/La. Another possible mechanism for estradiol influence of lupus erythematosus. *J Immunol*; 141(5): 1480-88.
138. Bachmann, M., Althoff, H., Troster, H., Selenka, C., Falke, D., Muller, W. E. (1992) Translocation of the nuclear autoantigen La to the cell surface of herpes simplex virus type 1 infected cells. *Autoimmunity*; 12(1): 37-45.
139. Golan, T. D., Elkon, K. B., Gharavi, A. E., Krueger, J. G. (1992) Enhanced membrane binding of autoantibodies to cultured keratinocytes of systemic lupus erythematosus patients after ultraviolet B/ultraviolet A irradiation. *J Clin Invest*; 90(3): 1067-76.
140. Dorner, T., Hucko, M., Mayet, W. J., Trefzer, U., Burmester, G. R., Hiepe, F. (1995) Enhanced membrane expression of the 52 kDa Ro(SS-A) and La(SS-B) antigens by human keratinocytes induced by TNF α . *Ann Rheum Dis*; 54(11): 904-09.
141. Rutjes, S. A., Utz, P. J., Heijden, A. v. d., Broekhuis, C., Venrooij, W. J. v., Pruijn, G. J. (1999) The La (SS-B) autoantigen, a key protein in RNA biogenesis, is dephosphorylated and cleaved early during apoptosis. *Cell Death and Differentiation*; 6: 976-86.
142. Ayukawa, K., Taniguchi, S. i., Masumoto, J., Hashimoto, S., Sarvotham, H., Hara, A., Aoyama, T., Sagara, J. (2000) La autoantigen is cleaved in the COOH terminus and loses the nuclear localization signal during apoptosis. *J Biol Chem*; 275(44): 34465-70.
143. Casciola-Rosen, L. A., Andrade, F., Ulanet, D., Wong, W. B., Rosen, A. (1999) Cleavage by granzyme B is strongly predictive of autoantigen status: Implications for initiation of autoimmunity. *J Exp Med*; 190(6): 815-26.
144. Romero, V., Fellows, E., Jenne, D. E., Andrade, F. (2008) Cleavage of La protein by granzyme H induces cytoplasmic translocation and interferes with La-mediated HCV-IRES translational activity. *J Biol Chem*; 283(2): 340-48.
145. Shiroki, K., Isoyama, T., Kuge, S., Ishii, T., Ohmi, S., Hata, S., Suzuki, K., Takasaki, Y., Nomoto, A. (1999) Intracellular redistribution of truncated La protein produced by poliovirus 3C^{pro}-mediated cleavage. *J Virol*; 73(3): 2193-200.
146. Smith, P. R., Williams, D. G., Venables, P. J., Maini, R. N. (1985) Monoclonal antibodies to the Sjogren's syndrome associated antigen SS-B (La). *J Immunol Methods*; 77(1): 63-76.
147. Altschul, S., Madden, T., Schaffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucl Acids Res*; 25(17): 3389-402.
148. Koradi, R., Billeter, M., Wüthrich, K. (1996) MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures. *Journal of Molecular Graphics*; 14(1): 51-55.
149. Chomczynski, P. (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques*; 15(3): 532-4, 36-7.
150. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*; 51 Pt 1: 263-73.
151. Wang, Z., Raifu, M., Howard, M., Smith, L., Hansen, D., Goldsby, R., Ratner, D. (2000) Universal PCR amplification of mouse immunoglobulin gene variable regions: The design of degenerate primers and an assessment of the effect of DNA polymerase 3' to 5' exonuclease activity. *J Immunol Methods*; 233(1-2): 167-77.
152. Lobban, P. E., Kaiser, A. D. (1973) Enzymatic end-to end joining of DNA molecules. *J Mol Biol*; 78(3): 453-71.
153. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press;
154. Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*; 166(4): 557-80.
155. Holmes, D. S., Quigley, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem*; 114(1): 193-7.
156. Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., Danielsen, M. (1987) Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 84(21): 7413-7.
157. Bousif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M., Mergny, M., Scherman, D., Demeneix, B., Behr, J. (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: Polyethylenimine. *PNAS*; 92(16): 7297-301.

158. Soneoka, Y., Cannon, P. M., Ramsdale, E. E., Griffiths, J. C., Romano, G., Kingsman, S. M., Kingsman, A. J. (1995) A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res*; 23(4): 628-33.
159. Moser, F., Dorman, B., Ruddle, F. (1975) Mouse-human heterokaryon analysis with a 33258 Hoechst-Giemsa technique. *J Cell Biol*; 66(3): 676-80.
160. Brunner, K. T., Mauel, J., Cerottini, J. C., Chapuis, B. (1968) Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ⁵¹Cr-labelled allogeneic target cells *in vitro*; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology*; 14(2): 181-96.
161. Hochuli, E., Bannwarth, W., Döbeli, H., Gentz, R., Stüber, D. (1988) Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Bio/Technology*; 6: 1321-25.
162. Engvall, E., Perlmann, P. (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin g. *Immunochemistry*; 8(9): 871-4.
163. Van Weemen, B. K., Schuurs, A. H. (1971) Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett*; 15(3): 232-36.
164. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227(5259): 680-5.
165. Blake, M. S., Johnston, K. H., Russell-Jones, G. J., Gotschlich, E. C. (1984) A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal Biochem*; 136(1): 175-9.
166. Kyhse-Andersen, J. (1984) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*; 10(3-4): 203-9.
167. Blanas, M. A., Rutter, W. J. (1992) Interaction cloning: Identification of a helix-loop-helix zipper protein that interacts with c-Fos. *Science*; 256(5059): 1014-8.
168. Wu, T. T., Kabat, E. A. (1970) An analysis of the sequences of the variable regions of bence jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med*; 132(2): 211-50.
169. Pruijn, G. J., Thijssen, J. P., Smith, P. R., Williams, D. G., Van Venrooij, W. J. (1995) Anti-La monoclonal antibodies recognizing epitopes within the RNA-binding domain of the La protein show differential capacities to immunoprecipitate RNA-associated La protein. *Eur J Biochem*; 232(2): 611-9.
170. Elkon, K. B., Jankowski, P. W. (1985) Fine specificities of autoantibodies directed against the Ro, La, Sm, RNP, and Jo-1 proteins defined by two-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting. *J Immunol*; 134(6): 3819-24.
171. Casciola-Rosen, L. A., Anhalt, G., Rosen, A. (1994) Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med*; 179(4): 1317-30.
172. Ohlsson, M., Jonsson, R., Brokstad, K. A. (2002) Subcellular redistribution and surface exposure of the Ro52, Ro60 and La48 autoantigens during apoptosis in human ductal epithelial cells: A possible mechanism in the pathogenesis of sjögren's syndrome. *Scand J Immunol*; 56(5): 456-69.
173. Borer, R. A., Lehner, C. F., Eppenberger, H. M., Nigg, E. A. (1989) Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell*; 56(3): 379-90.
174. Quimby, B. B., Corbett, A. H. (2001) Nuclear transport mechanisms. *Cell Mol Life Sci*; 58(12-13): 1766-73.
175. Schäkel, K., Poppe, C., Mayer, E., Federle, C., Riethmüller, G., Rieber, E. P. (1999) M-DC8+ leukocytes--a novel human dendritic cell population. *Pathobiology*; 67(5-6): 287-90.
176. Schmitz, M., Zhao, S., Schakel, K., Bornhauser, M., Ockert, D., Rieber, E. P. (2002) Native human blood dendritic cells as potent effectors in antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Blood*; 100(4): 1502-4.
177. Wehner, R., Lobel, B., Bornhauser, M., Schakel, K., Cartellieri, M., Bachmann, M., Rieber, E. P., Schmitz, M. (2009) Reciprocal activating interaction between 6-sulfo LacNAc⁺ dendritic cells and NK cells. *Int J Cancer*; 124(2): 358-66.
178. Cosman, D., Mullberg, J., Sutherland, C. L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M., Chalupny, N. J. (2001) ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity*; 14(2): 123-33.
179. Nakken, B., Davis, K. E., Pan, Z. J., Bachmann, M., Farris, A. D. (2003) T-helper cell tolerance to ubiquitous nuclear antigens. *Scand J Immunol*; 58(5): 478-92.

180. Keech, C. L., Farris, A. D., Beroukas, D., Gordon, T. P., McCluskey, J. (2001) Cognate T cell help is sufficient to trigger anti-nuclear autoantibodies in naive mice. *J Immunol*; 166(9): 5826-34.
181. Chang, S., Yang, L., Moon, Y. M., Cho, Y. G., Min, S. Y., Kim, T. J., Kim, Y. J., Patrick, W., Kim, H. Y., Mohan, C. (2009) Anti-nuclear antibody reactivity in lupus may be partly hard-wired into the primary B-cell repertoire. *Mol Immunol*; 46(16): 3420-6.
182. McNeilage, L. J., Umapathysivam, K., Macmillan, E., Guidolin, A., Whittingham, S., Gordon, T. (1992) Definition of a discontinuous immunodominant epitope at the NH₂ terminus of the La/SS-B ribonucleoprotein autoantigen. *J Clin Invest*; 89(5): 1652-6.
183. Tan, E. M. (1996) Pathophysiology of antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus and related diseases. *Adv Dent Res*; 10(1): 44-6.
184. Trepicchio, W., Jr., Barrett, K. J. (1987) Eleven MRL-*Ipr/Ipr* anti-DNA autoantibodies are encoded by genes from four V_H gene families: A potentially biased usage of V_H genes. *J Immunol*; 138(7): 2323-31.
185. Johnston, C. M., Wood, A. L., Bolland, D. J., Corcoran, A. E. (2006) Complete sequence assembly and characterization of the C57BL/6 mouse Ig heavy chain V region. *J Immunol*; 176(7): 4221-34.
186. Komisar, J. L., Leung, K. Y., Crawley, R. R., Talal, N., Teale, J. M. (1989) Ig V_H gene family repertoire of plasma cells derived from lupus-prone MRL/*Ipr* and MRL/++ mice. *J Immunol*; 143(1): 340-7.
187. Ash-Lerner, A., Ginsberg-Strauss, M., Pewzner-Jung, Y., Desai, D. D., Marion, T. N., Eilat, D. (1997) Expression of an anti-DNA-associated V_H gene in immunized and autoimmune mice. *J Immunol*; 159(3): 1508-19.
188. Foster, M. H., MacDonald, M., Barrett, K. J., Madaio, M. P. (1991) V_H gene analysis of spontaneously activated B cells in adult MRL-*Ipr/Ipr* mice. J558 bias is not limited to classic lupus autoantibodies. *J Immunol*; 147(5): 1504-11.
189. Liang, Z., Chang, S., Youn, M. S., Mohan, C. (2009) Molecular hallmarks of anti-chromatin antibodies associated with the lupus susceptibility locus, *Sle1*. *Mol Immunol*; 46(13): 2671-81.
190. Chen, L., Chang, S., Mohan, C. (2002) Molecular signatures of antinuclear antibodies-contributions of heavy chain CDR residues. *Mol Immunol*; 39(5-6): 333-47.
191. Bachmann, M., Mayet, W. J., Schroder, H. C., Pfeifer, K., Meyer zum Buschenfelde, K. H., Muller, W. E. (1986) Association of La and Ro antigens with intracellular structures in HEp-2 carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 83(20): 7770-4.
192. Gama-Carvalho, M., Carmo-Fonseca, M. (2001) The rules and roles of nucleocytoplasmic shuttling proteins. *FEBS Lett*; 498(2-3): 157-63.
193. Bachmann, M., Pfeifer, K., Schroder, H. C., Muller, W. E. (1989) The La antigen shuttles between the nucleus and the cytoplasm in CV-1 cells. *Mol Cell Biochem*; 85(2): 103-14.
194. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., Prasher, D. C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*; 263(5148): 802-5.
195. Chalfie, M. (2009) GFP: Lighting up life. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 106(25): 10073-80.
196. Wang, S., Hazelrigg, T. (1994) Implications for *bcd* mRNA localization from spatial distribution of *exu* protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature*; 369(6479): 400-03.
197. Meyer, T., Begitt, A., Vinkemeier, U. (2007) Green fluorescent protein-tagging reduces the nucleocytoplasmic shuttling specifically of unphosphorylated STAT1. *FEBS Journal*; 274(3): 815-26.
198. Chiarugi, P., Buricchi, F. (2007) Protein tyrosine phosphorylation and reversible oxidation: Two cross-talking posttranslation modifications. *Antioxid Redox Signal*; 9(1): 1-24.
199. Kurien, B. T., Scofield, R. H. (2008) Autoimmunity and oxidatively modified autoantigens. *Autoimmun Rev*; 7(7): 567-73.
200. LeFeber, W. P., Norris, D. A., Ryan, S. R., Huff, J. C., Lee, L. A., Kubo, M., Boyce, S. T., Kotzin, B. L., Weston, W. L. (1984) Ultraviolet light induces binding of antibodies to selected nuclear antigens on cultured human keratinocytes. *J Clin Invest*; 74(4): 1545-51.
201. Lawley, W., Doherty, A., Denniss, S., Chauhan, D., Puijn, G., van Venrooij, W. J., Lunec, J., Herbert, K. (2000) Rapid lupus autoantigen relocalization and reactive oxygen species accumulation following ultraviolet irradiation of human keratinocytes. *Rheumatology*; 39(3): 253-61.
202. Huth, J. R., Mendoza, R., Olejniczak, E. T., Johnson, R. W., Cothron, D. A., Liu, Y., Lerner, C. G., Chen, J., Hajduk, P. J. (2005) ALARM NMR: A rapid and robust experimental method to detect reactive false positives in biochemical screens. *J Am Chem Soc*; 127(1): 217-24.

203. Huth, J. R., Song, D., Mendoza, R. R., Black-Schaefer, C. L., Mack, J. C., Dorwin, S. A., Ladrör, U. S., Severin, J. M., Walter, K. A., Bartley, D. M., Hajduk, P. J. (2007) Toxicological evaluation of thiol-reactive compounds identified using a La assay to detect reactive molecules by nuclear magnetic resonance. *Chem Res Toxicol*; 20(12): 1752-9.
204. Miyamoto, Y., Saiwaki, T., Yamashita, J., Yasuda, Y., Kotera, I., Shibata, S., Shigeta, M., Hiraoka, Y., Haraguchi, T., Yoneda, Y. (2004) Cellular stresses induce the nuclear accumulation of importin alpha and cause a conventional nuclear import block. *J Cell Biol*; 165(5): 617-23.
205. Sim, S., Weinberg, D. E., Fuchs, G., Choi, K., Chung, J., Wolin, S. L. (2009) The subcellular distribution of an RNA quality control protein, the Ro autoantigen, is regulated by noncoding Y RNA binding. *Mol Biol Cell*; 20(5): 1555-64.
206. Lotze, M. T., Zeh, H. J., Rubartelli, A., Sparvero, L. J., Amoscato, A. A., Washburn, N. R., DeVera, M. E., Liang, X., Tor, M., Billiar, T. (2007) The grateful dead: Damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunological Reviews*; 220(1): 60-81.
207. Yang, D., Oppenheim, J. J. (2004) Antimicrobial proteins act as "alarmins" in joint immune defense. *Arthritis Rheum*; 50(11): 3401-3.
208. Oppenheim, J. J., Yang, D. (2005) Alarmins: Chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol*; 17(4): 359-65.
209. Klune, J. R., Dhupar, R., Cardinal, J., Billiar, T. R., Tsung, A. (2008) HMGB1: Endogenous danger signaling. *Mol Med*; 14(7-8): 476-84.
210. Coffelt, S. B., Scandurro, A. B. (2008) Tumors sound the alarmin(s). *Cancer Res*; 68(16): 6482-85.
211. Cirioni, O., Giacometti, A., Ghiselli, R., Bergnach, C., Orlando, F., Silvestri, C., Mocchegiani, F., Licci, A., Skerlavaj, B., Rocchi, M., Saba, V., Zanetti, M., Scalise, G. (2006) LL-37 protects rats against lethal sepsis caused by gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*; 50(5): 1672-9.
212. Lande, R., Gregorio, J., Facchinetti, V., Chatterjee, B., Wang, Y. H., Homey, B., Cao, W., Su, B., Nestle, F. O., Zal, T., Mellman, I., Schroder, J. M., Liu, Y. J., Gilliet, M. (2007) Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*; 449(7162): 564-9.
213. Ganguly, D., Chamilos, G., Lande, R., Gregorio, J., Meller, S., Facchinetti, V., Homey, B., Barrat, F. J., Zal, T., Gilliet, M. (2009) Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J Exp Med*; 206(9): 1983-94.
214. Oppenheim, J. J., Dong, H. F., Plotz, P., Caspi, R. R., Dykstra, M., Pierce, S., Martin, R., Carlos, C., Finn, O., Koul, O., Howard, O. M. Z. (2005) Autoantigens act as tissue-specific chemoattractants. *J Leukoc Biol*; 77(6): 854-61.
215. Gershwin, M. E., Glinski, W., Chused, T., Steinberg, A. D. (1977) Lymphocyte-dependent antibody-mediated cytolysis of DNA-anti-DNA-coated target cells using human and murine SLE effector populations. *Clin Immunol Immunopathol*; 8(2): 280-91.
216. Norris, D. A., Ryan, S. R., Fritz, K. A., Kubo, M., Tan, E. M., Deng, J. S., Weston, W. L. (1984) The role of RNP, Sm, and SS-A/Ro-specific antisera from patients with lupus erythematosus in inducing antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) of targets coated with nonhistone nuclear antigens. *Clin Immunol Immunopathol*; 31(3): 311-20.
217. Norris, D. A., Lee, L. A. (1985) Antibody-dependent cellular cytotoxicity and skin disease. *J Invest Dermatol*; 85(1 Suppl): 165s-75s.
218. Jones, S. K. (1992) Ultraviolet radiation (UVR) induces cell-surface Ro/SSA antigen expression by human keratinocytes *in vitro*: A possible mechanism for the UVR induction of cutaneous lupus lesions. *Br J Dermatol*; 126(6): 546-53.
219. Malik, S., Bruner, G. R., Williams-Weese, C., Feo, L., Hal Scofield, R., Reichlin, M., Harley, J. B., Sawalha, A. H. (2007) Presence of anti-La autoantibody is associated with a lower risk of nephritis and seizures in lupus patients. *Lupus*; 16(11): 863-66.
220. Smyth, M. J., Godfrey, D. I., Trapani, J. A. (2001) A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol*; 2(4): 293-9.
221. Gajewski, T. F., Meng, Y., Blank, C., Brown, I., Kacha, A., Kline, J., Harlin, H. (2006) Immune resistance orchestrated by the tumor microenvironment. *Immunol Rev*; 213: 131-45.
222. Formenti, S. C., Demaria, S. (2009) Systemic effects of local radiotherapy. *Lancet Oncol*; 10(7): 718-26.

8. Anhang

In Tabelle 8 sind die in dieser Arbeit hergestellten Plasmide aufgelistet. Für jede Klonierung sind die Ausgangs- und Zielvektoren sowie die verwendeten Restriktionsenzyme angegeben. Wurde ein pGEM[®]-T Easy-Vektor eingesetzt, so entstammte das *insert*-DNA-Fragment einer PCR-Reaktion. Die hierfür verwendeten *forward*- (F) und *reverse*- (R) Primer sowie die *template*-DNA sind in der rechten Spalte angegeben.

Tabelle 8: Klonierungsstrategien für die in dieser Arbeit generierten Plasmide.

Erzeugtes Plasmid	Ausgangs- und Zielvektoren	PCR-Komponenten
pSecTag2 B-CD3x7B6 scBsDb	pSecTag2 B-7B6 scFv ic pSecTag2 B-CD3 scFv oc (<i>Bam</i> HI)	
pcz CFG5.1-CD3x7B6 scBsDb	pGEM [®] -T Easy- CD3x7B6 scBsDb pcz CFG5.1 (<i>Eco</i> RI, <i>Kpn</i> 21)	DD2 <i>Eco</i> RI 1F DD2 <i>Kpn</i> 21 2R pSecTag2 B-CD3x7B6 scBsDb
<u>pET-Plasmide für die prokaryonte Proteinproduktion</u>		
pET-28b-Maus La	pGEM [®] -T Easy MausLa ORF pET-28b (<i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III)	MausLa (<i>Bam</i> HI) ORF 1F MausLa ORF 2R Maus cDNA aus Milz
pET-28a-La9A	pCI-La9A pET-28a (<i>Bam</i> HI, <i>Not</i> I)	
pET-28a-LaΔN8 (ohne polyPro)	pET-28a-LaΔN4 pET-28a-LaΔN8 (polyPro) (<i>Bam</i> HI)	
pET-28a-LaΔN9 (neu, kurz)	pGEM [®] -T Easy-LaΔN9 (kurz) pET-28a (<i>Eco</i> RI, <i>Not</i> I)	LaDelta N9 (<i>Eco</i> RI) 1F La-Delta_N8-N9-R (<i>Not</i> I, <i>Bgl</i> II) pET-28a-LaΔN8 (ohne polyPro)
<u>pET-Plasmide für die Einengung des 7B6-Epitops</u>		
pET-28b-La 7B6-Epitop II	pGEM [®] -T Easy-La 7B6-E. II pET-28b (<i>Sma</i> I, <i>Xho</i> I)	pET28_7B6_7B6/ <i>Xho</i> I/ <i>Spe</i> I_5F pET28_7B6_7B6/ <i>Sma</i> I_4R pET-28b
pET-28b-La 7B6-Epitop III	pGEM [®] -T Easy-La 7B6-E. III pET-28b-La 7B6-Epitop II (<i>Mlu</i> I, <i>Spe</i> I)	pET28 (<i>Mlu</i> I) 3F pET28 7B6 <i>Spe</i> I 6R pET-28b
pET-28b-La 7B6-Epitop IV	pGEM [®] -T Easy-La 7B6-E. IV pET-28b (<i>Sma</i> I, <i>Xho</i> I)	pET28 7B6 <i>Xho</i> I 7F pET28_7B6_7B6/ <i>Sma</i> I_4R pET-28b-La 7B6-Epitop II
pET-28b-La 7B6-Epitop V	pGEM [®] -T Easy-La 7B6-E. V pET-28b (<i>Sma</i> I, <i>Xho</i> I)	pET28 7B6 <i>Xho</i> I 7F pET28_7B6_7B6/ <i>Sma</i> I_4R pET-28b-La 7B6-Epitop III
pET-28b-La 7B6-Epitop VI	pGEM [®] -T Easy- La 7B6-E. VI pET-28b (<i>Sma</i> I, <i>Xho</i> I)	pET28 7B6 <i>Xho</i> I 9F pET28_7B6_7B6/ <i>Sma</i> I_4R pET-28b-La 7B6-Epitop II
pET-28b-La 7B6-Epitop VII	pGEM [®] -T Easy-La 7B6-E. VII pET-28b-La 7B6-Epitop II (<i>Mlu</i> I, <i>Spe</i> I)	pET28 (<i>Mlu</i> I) 3F pET28 7B6 <i>Spe</i> I 6R pET-28b-La 7B6-Epitop VI
pET-28b-La 7B6-Epitop VIII	pGEM [®] -T Easy-La 7B6-E. VIII pET-28b-La 7B6-Epitop II (<i>Mlu</i> I, <i>Spe</i> I)	pET28 (<i>Mlu</i> I) 3F La 7B6-Epitop VII <i>Spe</i> I 16R pET-28b-La 7B6-Epitop X

Erzeugtes Plasmid	Ausgangs- und Zielvektoren	PCR-Komponenten
pET-28b-La 7B6-Epitop IX	pGEM [®] -T Easy-La 7B6-E. IX pET-28b-La 7B6-Epitop II (<i>Mlu</i> I, <i>Spe</i> I)	pET28 (<i>Mlu</i> I) 3F La7B6-EpitopX (<i>Spe</i> I) 10R pET-28a-La 7B6-Epitop III
pET-28b-La 7B6-Epitop X	pGEM [®] -T Easy-La 7B6-E. X pET-28b-La 7B6-Epitop II (<i>Mlu</i> I, <i>Spe</i> I)	pET28 (<i>Mlu</i> I) 3F La7B6-EpitopX (<i>Spe</i> I) 10R pET-28a-La 7B6-Epitop VII
pET-28b-La 7B6-Epitop XI	pGEM [®] -T Easy-La 7B6-E. XI pET-28b-La 7B6-Epitop II (<i>Mlu</i> I, <i>Spe</i> I)	pET28 (<i>Mlu</i> I) 3F La7B6-EpitopXI (<i>Spe</i> I) 12R pET-28a-La 7B6-Epitop VII
pET-28b-La 7B6-Epitop XII	pGEM [®] -T Easy-La 7B6-E. XII pET-28b-La 7B6-Epitop II (<i>Mlu</i> I, <i>Spe</i> I)	pET28 (<i>Mlu</i> I) 3F La7B6-EpitopXII (<i>Spe</i> I) 14R pET-28a-La 7B6-Epitop VII
pET-28b-La 7B6-Epitop XIV	pGEM [®] -T Easy-La 7B6-E. XIV pET-28b-La 7B6-Epitop II (<i>Sma</i> I, <i>Xho</i> I)	La 7B6-Epitop <i>Xho</i> I 13F pET28_ <i>Sma</i> I_4R pET-28b-La 7B6-Epitop VIII
pET-28b-La 7B6-Epitop XV	pGEM [®] -T Easy-La 7B6-E. XV pET-28b-La 7B6-Epitop II (<i>Mlu</i> I, <i>Spe</i> I)	pET28 (<i>Mlu</i> I) 3F La 7B6-Epitop <i>Spe</i> I 18R pET-28b-La 7B6-Epitop VIII
pET-28b-La 7B6-Epitop XVI	pGEM [®] -T Easy-La 7B6-E. XVI (<i>Mlu</i> I/ <i>Spe</i> I) pET-28b-La 7B6-Epitop II (<i>Mlu</i> I/ <i>Spe</i> I)	pET28 (<i>Mlu</i> I) 3F La 7B6-Epitop <i>Spe</i> I 18R pET-28b-La 7B6-Epitop IX
pET-28b-La 7B6-Epitop XVII	pGEM [®] -T Easy-La 7B6-E. XVII pET-28b-La 7B6-Epitop II (<i>Mlu</i> I, <i>Spe</i> I)	pET28 (<i>Mlu</i> I) 3F La 7B6-Epitop <i>Spe</i> I 18R pET-28b-La 7B6-Epitop V
pET-28b-La 7B6-Epitop XVIII	pGEM [®] -T Easy-La 7B6-E. XVIII pET-28b-La 7B6-Epitop II (<i>Mlu</i> I, <i>Spe</i> I)	pET28 (<i>Mlu</i> I) 3F La-7B6 Primer <i>Spe</i> I 20R pET-28b-La 7B6-Epitop XIV
pET-28b-La 7B6-Epitop XIX	pGEM [®] -T Easy-La 7B6-E. XIX pET-28b-La 7B6-Epitop II (<i>Mlu</i> I, <i>Spe</i> I)	pET28 (<i>Mlu</i> I) 3F La-7B6 Primer <i>Spe</i> I 22R pET-28b-La 7B6-Epitop XIV
pET-28b-La 7B6-Epitop XXI	pGEM [®] -T Easy-La 7B6-E. XXI pET-28b-La 7B6-Epitop II (<i>Sma</i> I, <i>Xho</i> I)	La-7B6 Primer <i>Xho</i> I 17F pET28_ <i>Sma</i> I_4R pET-28b-La 7B6-Epitop XVIII
<u>Eukaryonte Transfektionsvektoren</u>		
pEGFP-C3-Maus La	pGEM [®] -T Easy MausLa ORF pEGFP-C3 (<i>Bam</i> HI_ <i>Bgl</i> II, <i>Hind</i> III)	
pEGFP-C2-LaΔC2/C3 (<i>Sac</i> I)	pGEM [®] -T Easy-LaΔC2/C3 pEGFP-C2 (<i>Nhe</i> I, <i>Apa</i> I)	pEGFPfor La DeltaC2C3 (<i>Apa</i> I) 2R pEGFP-C2-LaΔC7Apo
pEGFP-C2-La AA1-100 (rev3)	pGEM [®] -T Easy-La AA1-100 pEGFP-C2 (<i>Nhe</i> I, <i>Bam</i> HI)	pEGFPfor Reverse 3 <i>Bam</i> HI pEGFP-C2-La AA1-112
pEGFP-C2-La AA5-100	pGEM [®] -T Easy-La AA5-100 pEGFP-C2 (<i>Bgl</i> II, <i>Mlu</i> I)	La AA5 (<i>Bgl</i> II) 1F <i>Mlu</i> I Rev pEGFP-C2-La AA1-100
pEGFP-C2-La AA10-100	pGEM [®] -T Easy-La AA10-100 pEGFP-C2 (<i>Bgl</i> II, <i>Mlu</i> I)	La AA10 (<i>Bgl</i> II) 1F <i>Mlu</i> I Rev pEGFP-C2-La AA1-100
pEGFP-C2-La AA15-100	pGEM [®] -T Easy-La AA15-100 pEGFP-C2 (<i>Bgl</i> II, <i>Mlu</i> I)	La AA15 (<i>Bgl</i> II) 1F <i>Mlu</i> I Rev pEGFP-C2-La AA1-100
pEGFP-C2-La AA20-100	pGEM [®] -T Easy-La AA20-100 pEGFP-C2 (<i>Bgl</i> II, <i>Mlu</i> I)	La AA20 (<i>Bgl</i> II) 1F <i>Mlu</i> I Rev pEGFP-C2-La AA1-100

Erzeugtes Plasmid	Ausgangs- und Zielvektoren	PCR-Komponenten
pEGFP-C2-La AA86-100 (F7)	pGEM [®] -T Easy-La AA86-100 pEGFP-C2 (<i>Bgl</i> II, <i>Mlu</i> I)	La AA86 <i>Bgl</i> II F7 Reverse MLU pEGFP-C2-La AA1-100
pEGFP-C2-La AA1-104	pGEM [®] -T Easy-La AA1-104 pEGFP-C2 (<i>Nhe</i> I, <i>Bam</i> HI)	pEGFPfor Reverse2. <i>Bam</i> HI pEGFP-C2-La AA1-112
pEGFP-C2-La AA90-104 (F1)	pGEM [®] -T Easy-La AA90-104 pEGFP-C2 (<i>Bgl</i> II, <i>Mlu</i> I)	La AA90 <i>Bgl</i> II F1 Reverse MLU pEGFP-C2-La AA1-104
pEGFP-C2 La AA94-104 (5B9-Epitop, F5)	pGEM [®] -T Easy-La AA94-104 pEGFP-C2 (<i>Bgl</i> II, <i>Mlu</i> I)	La AA94 <i>Bgl</i> II F5 Reverse MLU pEGFP-C2-La AA1-104
pEGFP-C2-La AA1-112	pEGFP-C2-LaΔC3 (<i>Bam</i> HI, <i>Bgl</i> II und Religation)	
pEGFP-C2-La AA82-112	pGEM [®] -T Easy-La AA82-112 pEGFP-C2 (<i>Bgl</i> II, <i>Mlu</i> I)	La AA82 <i>Bgl</i> II F1 Reverse MLU pEGFP-C2-La AA1-112
pEGFP-C2-LaΔC3	pET-28a-LaΔC3 pEGFP-C2 (<i>Eco</i> RI, <i>Xho</i> I_ <i>Sal</i> I)	
pEGFP-C1-La9A	pCI-La9A pEGFP-C1 (<i>Bam</i> HI_ <i>Bgl</i> II, <i>Sal</i> I)	
pEGFP-C2-LaΔC6	pET-28a-LaΔC6 pEGFP-C2 (<i>Eco</i> RI, <i>Xho</i> I_ <i>Sal</i> I)	
pEGFP-C2-LaΔC7/C7Apo	pGEM [®] -T Easy-LaΔC7/C7Apo pEGFP-C2 (<i>Eco</i> RI, <i>Sal</i> I)	C7_C7Apo (<i>Eco</i> RI)-F1 C7_C7Apo (<i>Sal</i> I)-R2 pET-28a- LaΔC7Apo
pEGFP-C2-LaΔC7Apo	pGEM [®] -T Easy-LaΔC7Apo pEGFP-C2 (<i>Eco</i> RI, <i>Sal</i> I)	La-Delta_C7-Apo-F (<i>Hind</i> III, <i>Eco</i> RI) La-Delta_C7-Apo-R (<i>Sal</i> I) pET-28a-LaΔC9
pEGFP-C2-La AA107-200	pGEM [®] -T Easy-La AA107-200 pEGFP-C2 (<i>Eco</i> RI, <i>Bam</i> HI)	La AA107 (<i>Eco</i> RI) 1F La AA200 (<i>Bam</i> HI) 2R pEGFP-C2-LaΔC6
pEGFP-C2-La AA120-245	pGEM [®] -T Easy-La AA120-245 pEGFP-C2 (<i>Eco</i> RI, <i>Not</i> I)	La (AA120) <i>Eco</i> RI 1F La (DeltaC6) (<i>Not</i> I) 2R pEGFP-C2-LaΔC6
pEGFP-C1-LaC	pET-28a-LaC pEGFP-C1 (<i>Eco</i> RI, <i>Bam</i> HI_ <i>Bgl</i> II)	
pEGFP-C2-LaΔN7	pET-28a-LaΔN7 (<i>Eco</i> RI, <i>Xho</i> I) pEGFP-C2 (<i>Eco</i> RI, <i>Xho</i> I_ <i>Sal</i> I)	
pEGFP-C3-LaΔN7/N8	pGEM [®] -T Easy-LaΔN7/N8 pEGFP-C3 (<i>Eco</i> RI, <i>Bam</i> HI)	N7-N8 (<i>Eco</i> RI/ATG)-F1 La-Delta_N8-N9-R (<i>Not</i> I, <i>Bgl</i> II) pET-28a-LaΔN7
pEGFP-C2-LaΔN8 (ohne polyPro)	pET-28a-LaΔN8 (ohne polyPro) pEGFP-C2 (<i>Eco</i> RI, <i>Xho</i> I_ <i>Sal</i> I)	
pEGFP-C3-LaΔN8/N9	pGEM [®] -T Easy-LaΔN8/N9 pEGFP-C3 (<i>Eco</i> RI/ <i>Not</i> I)	La-Delta_N8-N9-F (<i>Eco</i> RI) La-Delta_N8-N9-R (<i>Not</i> I, <i>Bgl</i> II) pET-28a-LaΔN7

Erzeugtes Plasmid	Ausgangs- und Zielvektoren	PCR-Komponenten
pEGFP-C2-LaΔN9-11AS	pET-28a-LaΔN9-11AS pEGFP-C2 (<i>EcoRI</i> , <i>XhoI</i> , <i>SalI</i>)	
pEGFP-C2-LaΔN9 (neu)	pET-28a-LaΔN9 (neu, kurz) pEGFP-C2 (<i>EcoRI</i> , <i>XhoI</i> , <i>SalI</i>)	
pEGFP-C2-LaΔN10	pGEM [®] -T Easy-LaΔN10 pEGFP-C2 (<i>EcoRI</i> , <i>SmaI</i>)	La (Delta) N10 (<i>EcoRI</i>) 1F pET28_ <i>SmaI</i> _4R pET-28a-LaΔN9
<u>Punktmutanten des 7B6-Epitops</u>		
pCI-La 7B6-Epitop pEGFP-C2-LaΔN9 (1)	pGEM [®] -T Easy-La 7B6-Epitop pEGFP-C2-LaΔN9 (1) pCI (<i>NheI</i> / <i>SalI</i>)	XVIII_EGFP_N9 (<i>NheI</i>) 1F XVIII_EGFP_N9 2R pEGFP-C2-LaΔN9 (neu)
pCI-La 7B6-Epitop MutT pEGFP-C2-LaΔN9 (2)	pCI-La 7B6-Epitop MutT pEGFP-C2-(b) pCI-La 7B6-Epitop pEGFP-C2-LaΔN9 (1) (<i>NheI</i> , <i>XhoI</i>)	
pCI-La 7B6-Epitop MutD pEGFP-C2-LaΔN9 (3)	pGEM [®] -T Easy-La 7B6-Epitop MutD pEGFP-C2-LaΔN9 (3) pCI (<i>NheI</i> / <i>NotI</i>)	XVIII_N9 MutD(<i>NheI</i>) 5F XVIII_EGFP_N9 2R pEGFP-C2-LaΔN9 (neu)
pCI-La 7B6-Epitop MutTD pEGFP-C2-LaΔN9 (4)	pGEM [®] -T Easy-La 7B6-Epitop MutTD pEGFP-C2-LaΔN9 (4) pCI (<i>NheI</i> / <i>NotI</i>)	XVIII_N9 MutTD(<i>NheI</i>) 7F XVIII_EGFP_N9 2R pEGFP-C2-LaΔN9 (neu)
pCI-La 7B6-Epitop StoA pEGFP-C2-LaΔN9 (5)	pCI-La 7B6-Epitop StoA pEGFP-C2-(e) pCI-La 7B6-Epitop pEGFP-C2-LaΔN9 (1) (<i>NheI</i> , <i>XhoI</i>)	
pCI-La 7B6-Epitop StoD pEGFP-C2-LaΔN9 (6)	pCI-La 7B6-Epitop StoD pEGFP-C2-(f) pCI-La 7B6-Epitop pEGFP-C2-LaΔN9 (1) (<i>NheI</i> , <i>XhoI</i>)	
pCI-La 7B6-Epitop pEGFP-C2-(a)	pGEM [®] -T Easy-La 7B6-Epitop pEGFP-C2-(a) pCI (<i>NheI</i> / <i>SalI</i>)	XVIII_EGFP_N9 (<i>NheI</i>) 1F XVIII_EGFP_N9 2R pEGFP-C2
pCI-La 7B6-Epitop MutT pEGFP-C2-(b)	pGEM [®] -T Easy-La 7B6-Epitop MutT pEGFP-C2-(b) pCI (<i>NheI</i> / <i>SalI</i>)	XVIII_N9 MutT(<i>NheI</i>) 3F XVIII_EGFP_N9 2R pEGFP-C2
pCI-La 7B6-Epitop MutD pEGFP-C2-(c)	pGEM [®] -T Easy-La 7B6-Epitop MutD pEGFP-C2-(c) pCI (<i>NheI</i> / <i>NotI</i>)	XVIII_N9 MutD(<i>NheI</i>) 5F XVIII_EGFP_N9 2R pEGFP-C2
pCI-La 7B6-Epitop MutTD pEGFP-C2 (d)	pGEM [®] -T Easy-La 7B6-Epitop MutTD pEGFP-C2-(d) pCI (<i>NheI</i> / <i>SalI</i>)	XVIII_N9 MutTD(<i>NheI</i>) 7F XVIII_EGFP_N9 2R pEGFP-C2
pCI-La 7B6-Epitop StoA pEGFP-C2-(e)	pGEM [®] -T Easy-La 7B6-Epitop StoA pEGFP-C2-(e) pCI (<i>NheI</i> / <i>SalI</i>)	XVIII_MutStoA_N9 (<i>NheI</i>) 1F XVIII_EGFP_N9 2R pEGFP-C2

Erzeugtes Plasmid	Ausgangs- und Zielvektoren	PCR-Komponenten
pCl-La 7B6-Epitop StoD pEGFP-C2-(f)	pGEM [®] -T Easy-La 7B6-Epitop StoD pEGFP-C2-(f) pCl (<i>NheI/NotI</i>)	XVIII MutStoD 1F (<i>NheI</i>) XVIII_EGFP_N9 2R pEGFP-C2
<u>Punktmutanten des 5B9-Epitops</u>		
pEGFP-C2-La 5B9-Epitop minus S	pGEM [®] -T Easy-La 5B9-Epitop minus S pEGFP-C2 (<i>BglII, MluI</i>)	La5B9 (minusS) <i>BglII</i> 1F <i>MluI</i> Rev pEGFP-C2 La AA94-104
pEGFP-C2-La 5B9-Epitop StoA	pGEM [®] -T Easy-La 5B9-Epitop StoA pEGFP-C2 (<i>BglII, MluI</i>)	La5B9 (StoA) <i>BglII</i> 1F <i>MluI</i> Rev pEGFP-C2 La AA94-104
pEGFP-C2-La 5B9-Epitop StoE	pGEM [®] -T Easy-La 5B9-Epitop StoE pEGFP-C2 (<i>BglII, MluI</i>)	La5B9 (StoE) <i>BglII</i> 1F <i>MluI</i> Rev pEGFP-C2 La AA94-104
pEGFP-C2-La 5B9-Epitop KtoR; EtoG	pGEM [®] -T Easy-La 5B9-Epitop KtoR; EtoG pEGFP-C2 (<i>BglII, MluI</i>)	La5B9 (KtoR, EtoG) <i>BglII</i> 1F <i>MluI</i> Rev pEGFP-C2 La AA94-104
pEGFP-C2-La 5B9-Epitop minus Y	pGEM [®] -T Easy-La 5B9-Epitop minus Y pEGFP-C2 (<i>BglII, MluI</i>)	La5B9 (minusY) <i>BglII</i> 1F <i>MluI</i> Rev pEGFP-C2 La AA94-104
pEGFP-C2-La 5B9-Epitop YtoW	pGEM [®] -T Easy-La 5B9-Epitop YtoW pEGFP-C2 (<i>BglII, MluI</i>)	La5B9 (YtoW) <i>BglII</i> 1F <i>MluI</i> Rev pEGFP-C2 La AA94-104
pEGFP-C2-La 5B9-Epitop YtoF	pGEM [®] -T Easy-La 5B9-Epitop YtoF pEGFP-C2 (<i>BglII, MluI</i>)	La5B9 (YtoF) <i>BglII</i> 1F <i>MluI</i> Rev pEGFP-C2 La AA94-104
pEGFP-C2-La 5B9-Epitop minus 99-101; YtoW	pGEM [®] -T Easy-La 5B9-Epitop minus 99-101; YtoW pEGFP-C2 (<i>BglII, MluI</i>)	La5B9 (minus 99-101; YtoW) <i>BglII</i> 1F <i>MluI</i> Rev pEGFP-C2 La AA94-104
pEGFP-C2-La 5B9-Epitop EtoV	pGEM [®] -T Easy-La 5B9-Epitop EtoV pEGFP-C2 (<i>BglII, MluI</i>)	La5B9 (EtoV) <i>BglII</i> 1F <i>MluI</i> Rev pEGFP-C2 La AA94-104
pEGFP-C2-La 5B9-Epitop minus 97-98; YtoF	pGEM [®] -T Easy-La 5B9-Epitop minus 97-98; YtoF pEGFP-C2 (<i>BglII, MluI</i>)	La5B9 (minus 97-98; YtoF) <i>BglII</i> 1F <i>MluI</i> Rev pEGFP-C2 La AA94-104
pEGFP-C2-La 5B9-Epitop KtoR	pGEM [®] -T Easy-La 5B9-Epitop KtoR pEGFP-C2 (<i>BglII, MluI</i>)	La5B9 (KtoR) <i>BglII</i> 1F <i>MluI</i> Rev pEGFP-C2 La AA94-104

Danksagung

Für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Überlassung dieses interessanten und vielseitigen Themas bedanke ich mich bei Prof. Dr. M. Bachmann. Seine exzellente wissenschaftliche Betreuung und Diskussionsbereitschaft verbunden mit seiner stets offenen Tür für alle kleinen und großen La-Fragen waren für mich sehr wertvoll. Danke für das entgegengebrachte Vertrauen, den anhaltenden Optimismus und die stetige Ermutigung.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. K.-H. van Pée für die Mitbetreuung der Arbeit und die Erstellung des Erstgutachtens vielmals danken.

Bei allen derzeitigen und ehemaligen Kollegen des Instituts für Immunologie möchte ich mich ganz herzlich für die freundliche Atmosphäre, gute Zusammenarbeit und unermüdliche Hilfsbereitschaft bedanken. Ich durfte in den letzten Jahren sehr viel von ihnen lernen. Besonders Anja F., Anna, Barbara, Christine, Heidi, Holger, Livia, Marc C., Marc S., Martina, Michael H., Rebekka, Slava und Zhao haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihre Verbundenheit und Unterstützung sowie Geduld beim Warten auf Anrufe oder Besuche.

Ein herzlicher Dank geht an Christian für seine Liebe, Geduld, Motivation, Hilfe und Fürsorge.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Diese Arbeit wurde am Institut für Immunologie der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden unter wissenschaftlicher Betreuung von Prof. Dr. M. Bachmann sowie von Prof. Dr. K.-H. van Pée angefertigt.

Dresden, den 25.11.2009

(Claudia Franke)