

Aus dem Institut für Immunologie
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Stefan Bauer

Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen das Toll-like- Interleukin-Rezeptor-Familienmitglied TIR8/SIGIRR

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Edgar Djoko Kamdem aus Bafoussam

Marburg, 2019

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
16.09.2019

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. S. Bauer

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. M. Lohoff

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der
Philipps-Universität Marburg
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer
Creative Commons
Namensnennung
Keine kommerzielle Nutzung
Weitergabe unter gleichen Bedingungen
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Meinen Eltern Nicolas Djoko und Julienne Kondjouo Epse Djoko

„So wendet alle Mühe daran und erweist in eurem Glauben Tugend

und in der Tugend Erkenntnis

und in der Erkenntnis Mäßigkeit

und in der Mäßigkeit Geduld

und in der Geduld Frömmigkeit

und in der Frömmigkeit brüderliche Liebe

und in der brüderlichen Liebe die Liebe zu allen Menschen“

Lutherbibel 1984, 2. Petrus 1:5-7

Inhaltsverzeichnis

A	Abkürzungsverzeichnis.....	4
B	Abbildungsverzeichnis.....	6
C	Tabellenverzeichnis.....	8
1	Einleitung	9
1.1	Angeborene Immunantwort und Immunmodulation.....	9
1.2	Toll-interleukin 1 receptor 8/ Single Immunglobulin related IL-1 related receptor (TIR8/SIGIRR).....	14
1.3	Antikörpervermittelte Funktionen des adaptiven Immunsystems.....	18
1.4	Zielsetzung	27
2	Material.....	30
2.1	Geräte	30
2.2	Chemikalien.....	32
2.3	Medien-Zellkultur	34
2.4	Medien Bakterienkultur	35
2.5	Biochemikalien, Enzyme und Kits	35
2.6	Plasmide.....	35
2.7	Antikörper	36
2.8	Primer.....	36
2.9	Bakterienstamm.....	36
2.10	Mausstämme	36
2.11	Zelllinien	37
2.12	Verbrauchsmaterialien	37
2.13	Software.....	38

Inhaltsverzeichnis

3	Methoden	39
3.1	Allgemeine molekularbiologische und proteinbiochemische Methoden.....	39
3.2	Herstellung von monoklonalen Antikörpern	45
3.3	Konservierung und Charakterisierung von einzelnen Plasmazell-Klonen.....	55
4	Ergebnisse	71
4.1	Genotypisierung der Mäuse	71
4.2	GST- und GST-SIGIRR- Expression und Aufreinigung	72
4.3	Charakterisierung der Antikörper im ELISA	73
4.4	Charakterisierung der Antikörper im Western-Blot	82
4.5	Isotypbestimmung der monoklonalen Antikörper	86
5	Diskussion	88
5.1	Generierung monoklonaler Anti-mSIGIRR-Antikörper	88
5.2	GST- und GST-SIGIRR- Expression und Aufreinigung	92
5.3	Charakterisierung der generierten Antikörper gegen mSIGIRR.....	92
6	Literaturverzeichnis	100
7	Zusammenfassung	104
8	Summary.....	106
9	Verzeichnis der akademischen Lehrer	108
10	Danksagung.....	110

A) Abkürzungsverzeichnis

Abb.: Abbildung

AK: Antikörper

APC: antigen presenting cell

ATP: Adenosintriphosphat

CD: cluster of differentiation

cDC: konventionelle dendritische Zelle

DMSO: Dimethylsulfoxid

DNA: deoxyribonucleic acid

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

ERK: extracellular signal-regulated kinase

FCS: fetales Kalbserum

FPLC: fast protein liquid chromatography

GP IIb/IIIa: Glycoprotein IIb/IIIa

GST: glutathione S-transferase

GTP: guanosine 5'-triphosphate

HAT: Hypoxanthin-Aminopterin Thymidin

HFCS: hybridoma fusion and cloning supplement

HRP: horseradish peroxidase

hSIGIRR: human single immunoglobulin IL1-related receptor

IFN: Interferon

Ig: Immunglobulin

IL: Interleukin

IRAKM: Interleukin-1 receptor-associated kinase M

Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

IRF3: Interferon regulatory factor 3, Interferon regulatory factor 3,

IVIG: intravenöse Immunglobuline

JNK: c-jun N-terminal kinase

LPS: Lipopolysaccharid

MACS: magnetic-activated cell sorting

MAP: mitogen-activated protein

MHC: Major histocompatibility complex

mRNA: messenger RNA

mSIGIRR: murines SIGIRR

MyD88: Myeloid differentiation primary response 88

NF Kappa B: Nuclear Factor Kappa B

NOD: nucleotide-binding oligomerization domain

ODN: oligodeoxynucleotide

OPD: orthophenylene diamine

PAMP: Pathogen Associated Molecular Pattern

PCR: polymerase chain reaction

PRR: Pattern Recognition Receptor

RIG-I: Retinoic acid inducible gene I

RNA: ribonucleic acid

rpm: revolutions per minute

RT: Raumtemperatur

SIGIRR: single immunglobulin IL1-related receptor

SOCS1: suppressor of cytokine signalling-1

Tab.: Tabelle

Tc: zytotoxische T-Zelle

Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

TGF: transforming growth factor

Th: T-Helferzelle

TLR: Toll-like Receptor

TNF: Tumor necrosis factor

TNFR: tumor necrosis factor receptor

TRAF: TNFR-associated factor

Treg: Regulatorische T-Zellen

TRIF: TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β

TTP: thymidine triphosphate

VEGF: vascular endothelial growth factor

Z.B.: Zum Beispiel

B) Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 TLR-Rezeptoren der Säugetiere, deren Liganden und Adaptoren. (Modifiziert nach: University of Pittsburgh: <http://labs.mmg.pitt.edu/sarkar/Signaling.htm>; Zugriff in 03/2016) Seite 12

Abb. 2 TIR8/SIGIRRs inhibitorische Funktion in der ILR/TLR-Signalkaskade. (Modifiziert nach: Garlanda et al. 2013) Seite 16

Abb. 3 T-Zell-Aktivierung und Differenzierung. A. Die Antigenpräsentation stimuliert T-Zellen zur Differenzierung zu CD-4+ T-Helfer-/CD-8+ zytotoxischen Zellen. (Modifiziert nach: http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Antigen_presentation.jpg; Zugriff 04/2016) B. Th1/Th2-Modell. (Modifiziert nach: Haggström, Mikael. "Medical gallery of Mikael Haggström 2014". Wikiversity Journal of Medicine) Seite 20

Abb. 4 Fünf unterschiedliche Konfigurationen der konstanten Antikörperdomäne, fünf unterschiedliche Immunglobulin- bzw. Antikörperklassen. (Modifiziert nach: http://spot.pcc.edu/~jvolpe/b/bi234/lec/8_9defenses/9_outline.htm; Zugriff 04/2016) Seite 22

Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 5 Schematische Übersicht des pGEX-2TK-Expressionsvektors (Modifiziert nach: http://bieson.ub.uni-bielefeld.de/volltexte/2004/462/pdf/0040.pdf ; Zugriff 04/2016)	Seite 42
Abb. 6 Schematische Darstellung der Hybridom-Technik	Seite 50
Abb. 7 Das Prinzip des "Magnetic Activated Cell Sorting" (MACS). (Modifiziert nach http://www.miltenyibiotec.com/en/NN_736_MACS_Cell_Separation_the_principle_1.aspx ; Zugriff 04/2016)	Seite 52
Abb. 8 Prinzip des indirekten ELISAs zum Nachweis von Antikörpern	Seite 60
Abb. 9 Schichtung des Western Blots im Transferschritt	Seite 66
Abb. 10 Schema der Immundetektion im Western Blot (Modifiziert nach: http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/1503364 , Zugriff 04/2016)	Seite 67
Abb. 11 Ergebnisse der Maustypisierung. A. Knock-out-PCR. B. Wildtyp-PCR	Seite 71
Abb. 12 Elutionsprofil der Glutathion-Sepharose-Säule-FPLC mit GST-SIGIRR	Seite 72
Abb. 13 Coomassie Färbung des Kontrollgels nach GST-SIGIRR-Aufreinigung	Seite 73
Abb. 14 Nanodrop-Kurven der photometrischen Quantifizierung der aufgereinigten Proteine. A. GST. B. GST-SIGIRR	Seite 74
Abb. 15 Anti-GST- und -mSIGIRR-AK-Nachweis in Maus-Seren	Seite 75
Abb. 16 Blockpuffervergleich in GST-mSIGIRR-Erkennung per ELISA mit Überstand des Klones 2F9	Seite 77
Abb. 17 Rekrutierung von Klonen und Subklonen anhand ihrer Wachstumseigenschaften und der Spezifität ihrer monoklonalen Antikörper im ELISA. A. Generierte Klone. B. Generierte Anti-mSIGIRR-Subklone, Einteilung in 5 Klassen in Abhängigkeit von Wachstumseigenschaften und von der Antikörper-Spezifität. C. Klonierungsstatistik der generierten Anti-mSIGIRR-Klone und -Subklone	Seite 78 bis Seite 79
Abb. 18 A bis D Reaktivität der gesamten Klone und Subklone im Überblick	Seite 80
Abb. 19 Ratio GST-SIGIRR-/GST-Erkennung als Maß für die Spezifität der Antikörper einzelner Klone	Seite 82

Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 20	Testung des Serums der Maus 1 auf Anti-m-SIGIRR-AK im Western-Blot	Seite 83
Abb. 21	Anti-mSIGIRR-AK-Nachweis im Western-Blot	Seite 85
Abb. 22	Detektion eines Anti-mSIGIRR-AK aus der 1:10-Verdünnung des Hybridoma-Überstandes 2F9 im Western-Blot	Seite 86
Abb. 23	Isotypbestimmung der durch den Klon 2F9 bzw. die Subklone 3E3c und 4C1b sezernierten Antikörper	Seite 87

C) Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Kleiner Auszug in Deutschland zugelassener oder in klinischer Erprobung Phase III befindlicher therapeutischer monoklonaler Antikörper. (Modifiziert nach: https://de.wikipedia.org/wiki/Monoklonaler_Antikörper Zugriff 3.10.15)	Seite 26
Tab. 2:	Expansionsschema für einzelne Klone	Seite 56
Tab. 3:	Ansätze von Puffern und Proben für den ELISA	Seite 61
Tab. 4:	Gelzusammensetzung	Seite 63
Tab. 5:	Zusammensetzung der Elektrophorese-Puffer	Seite 64
Tab. 6:	Zusammensetzung der Detektions-Puffer	Seite 68

1 Einleitung

1.1 Angeborene Immunantwort und Immunmodulation

Zum Schutz ihrer Unversehrtheit benötigen höhere Lebewesen ein intaktes Immunsystem, das dem Balanceakt zwischen Abwehr und Toleranz gewachsen ist. Einerseits gilt es, mikrobielle Bestandteile sowie entartete körpereigene Zellen als bedrohlich zu erkennen und durch präzise Mechanismen auszuschalten. Andererseits sollten solche Immunreaktionen selektiv und selbstlimitierend ablaufen. Sowohl eine mangelhafte als auch eine übersteigerte Immunreaktion kann kritische Folgen für den Organismus mit sich ziehen. Auf der einen Seite drohen systemische Entzündungsreaktionen, auf der anderen Seite Allergien oder Autoimmunerkrankungen (Eberl G 2016, Danese et al 2010). An diesem Gleichgewicht zwischen Abwehr und Toleranz beteiligte Mechanismen werden entweder der angeborenen oder der adaptiven Komponente des Immunsystems zugeordnet. Jede dieser verzahnten Entitäten umfasst einen feinabgestimmten Komplex aus Molekülen, Zellen und Organen.

Trotz der hohen Komplexität der Interaktionen zwischen diesen Akteuren, gelingt es einem gesunden Immunsystem erstaunlich oft, die Balance zwischen Immunreaktion und Immunmodulation zu wahren. So kommt es durch die Fähigkeit des Immunsystems Angriffe und eigene Überreaktionen in Schach zu halten, verhältnismäßig selten zum Ausbruch einer systemischen Entzündungsreaktion, obwohl pathogene Angriffe permanent sind (Sánchez et al. 2014). Das liegt in erster Linie an der angeborenen Immunantwort, der ersten Verteidigungslinie des Körpers. Demgegenüber steht die adaptive Immunantwort, auf die im Abschnitt 1.1.3 eingegangen wird. Das angeborene Immunsystem schließt sowohl unspezifische physikalische und biochemische Barrieren als auch die genetisch programmierte Erkennung hochkonservierter Pathogen-Muster, sogenannter *pathogen associated molecular patterns* (PAMP) ein. Als hochkonserviert gelten sowohl die Rezeptoren als auch die erkannten Muster, da Letztere für die

Einleitung

Mikroorganismen überlebensnotwendig sind und daher in der Evolution kaum verändert werden können. (Rink et al. 2012)

Am Erkennungsprozess, der spezifischeren Immunreaktionen vorausgeht, sind unter anderem die *Toll-like receptors* (TLR) beteiligt, die zu den *Pattern Recognition Receptors* (PRR) gehören (Janeway C A Jr 1989). Als PRR werden verschiedene keimbahn-kodierte Molekülklassen bezeichnet, die PAMP erkennen: neben TLR u.a. *RIG-like-*, *NOD-like-*, C-Lektin- und *Scavenger*-Rezeptoren (N W Palm & Medzhitov 2009). Dieser Erkennungsprozess führt im Falle der TLR primär zu einer Zytokin-Produktion (Armant&Fenton 2002), die wiederum eine modulierende Rolle in der Einleitung der adaptiven T- und B-Zellantwort einnimmt (Jin et al. 2012). Demzufolge sind TLR ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität, und somit die TLR-Regulierung ein bedeutendes Puzzleteil in der Regulation der Immunantwort. (Akira et al. 2001)

Jüngste Studien identifizierten den Orphan-Rezeptor Toll-interleukin 1 receptor 8/ *single immunoglobulin IL-1R-related receptor* (TIR8 bzw. SIGIRR) als negativen TLR-Regulator (Thomassen et al. 1999, Riva et al. 2012). Aus der mit SIGIRR-defizienten Mäusen gewonnenen Evidenz geht eine Schlüsselrolle von SIGIRR in der Begrenzung der körpereigenen Bekämpfung von Entzündung und Karzinogenese hervor. So zeigten Sigirr-defiziente Mäuse eine drastisch erhöhte Vulnerabilität und Mortalität im Vergleich zum Wildtyp bei Verabreichung geringer Dosen von *Mycobacterium tuberculosis* (Garlanda et al. 2007). Der Zusammenhang zwischen Entzündung und Karzinogenese gilt bes. beim Colon-Karzinom als etabliert (Scarpa et al. 2014). Durch eine nähere Charakterisierung SIGIRRs und ein besseres Verständnis seiner Funktion in Entzündungsprozessen können neue Möglichkeiten zur Einflussnahme auf die Immun-Homöostase entstehen.

1.1.1 Die angeborene Immunantwort

Einleitung

Beim Kontakt des Organismus mit Pathogenen bilden Zellen und humorale Faktoren des angeborenen Immunsystems die erste Abwehrfront. Verglichen mit der hohen Häufigkeit des Eindringens von Erregern in den Organismus, kommt es in bemerkenswert seltenen Fällen zu einer Entzündungsreaktion, der Standardantwort des Immunsystems auf eine Gewebsschädigung (Rink et al. 2012). Ein Großteil der Aggressoren wird nämlich von physikalischen und biochemischen Faktoren ferngehalten: von den Defensinen in Körpersekreten, über Flimmerepithelien des respiratorischen Traktes, bis hin zur Darmperistaltik (Müller et al. 2005). Sind diese Barrieren überwunden, folgt der Gewebsschädigung eine lokale Entzündungsreaktion. Einige Manifestationen dieser sind:

- Aktivierung von Monozyten, Makrophagen, Thrombozyten;
- Freisetzung von Zytokinen und chemotaktischen Faktoren;
- Steigerung von Durchblutung und Kapillarpermeabilität;
- Leukozytenmigration.

Hauptakteure der angeborenen Immunantwort auf der zellulären Ebene sind:

- Phagozyten (neutrophile Granulozyten, Makrophagen)
- Degranulierende Zellen (eosinophile und basophile Granulozyten, Mastzellen)
- Antigenpräsentierende Zellen (Dendritische Zellen, B-Zellen).

Letztere interagieren mit Effektor-T-Zellen in der Peripherie und in Lymphknoten, was in der Aktivierung und Proliferation der T-Zellen resultiert. Somit wird eine Brücke zum adaptiven Immunsystem geschlagen (Rink et al. 2012).

Das genetisch fixierte angeborene Immunsystem verfügt neben den oben genannten, zumeist unspezifischen Akteuren, über spezialisierte Erkennungsmechanismen. Dazu gehören die Pattern-recognition receptors (PRR), die Pathogene anhand charakteristischer, hochkonservierter Muster erkennen, der pathogen *associated molecular patterns* (PAMP). PRR können in lösliche, oberflächenständige und intrazelluläre Rezeptoren unterteilt werden. Allesamt sind sie Keimbahn-kodiert, wodurch das Ligandenspektrum von vornherein streng festgelegt ist (Rink et al. 2012).

Einleitung

Sie tragen wesentlich zur Aktivierung der Immunzellen bei, indem sie eine Signalkaskade in Gang setzen, die zur Freisetzung immunstimulatorischer Moleküle führt. Beispielsweise löst das Plasmaprotein Mannose-bindendes Lektin, ein lösliches PRR, durch Bindung an bakterielle Membranoberflächen die Komplementkaskade aus. Infolgedessen unterstützt das Komplementsystem die Immunantwort sowohl direkt durch Lyse infizierter Zellen als auch indirekt durch die Opsonisierung der Keime und die Freisetzung weiterer immunstimulatorischer Substanzen. (Murphy et al. 2009)

1.1.2 Toll-Like-Rezeptoren

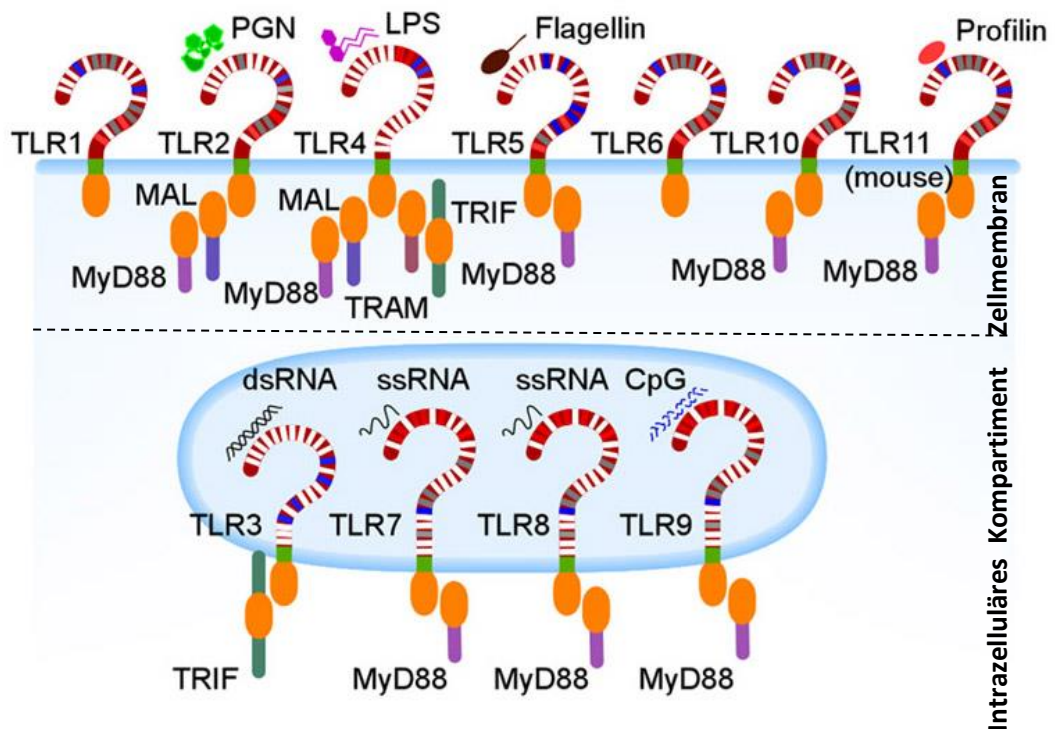


Abbildung 1: TLR-Rezeptoren der Säugetiere, deren Liganden und Adaptoren. Einteilung der TLR in zwei Gruppen: Plasmamembran-ständig sind TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5 und TLR 6. TLR-3, TLR-7, TLR-8 und TLR-9 vorwiegend auf intrazellulären Zellkompartimenten wie Endolysosomen. Nach Ligandenbindung (u.a. PAMP) wird durch Rekrutierung der Adaptorproteine MyD88 bzw. TRIF eine Signalkaskade eingeleitet.

(Modifiziert nach: Univ. of Pittsburgh: <http://labs.mmg.pitt.edu/sarkar/Signaling.htm>)

Einleitung

Toll-like-Rezeptoren (TLR) sind membranständige Mustererkennungsrezeptoren. Ihr breites Ligandenspektrum schließt hochkonservierte mikrobielle Strukturen und endogene Signale bei Gewebsschädigung ein (Iwasaki & Medzhitov 2004). TLR sind in Zellen sowohl des angeborenen (Makrophagen, Mastzellen, Neutrophile) als auch des adaptiven Immunsystems (T- und B-Zellen) exprimiert. Auch in epithelialen Zellen konnten sie nachgewiesen werden. Während zellmembranständige TLR bakterielle Komponenten wie LPS oder Flagellin erkennen, werden bakterielle und virale Nucleinsäuren durch endosomale TLR erfasst (**Abb.1**).

TLR sind Typ-I-transmembrane Proteine mit 3 Signaldomänen: eine extrazelluläre, eine transmembrane und eine intrazelluläre. Durch Ligandenstimulation wird eine Dimerisierung des TLR hervorgerufen, die wiederum zu einer Interaktion seiner intrazellulären TIR(Toll/II-1R)-Domäne mit der TIR-Domäne der Adaptorproteine MyD88 oder TRIF führt (Iwasaki & Medzhitov 2004). Die meisten TLR rekrutieren in diesem Schritt MyD88 direkt oder indirekt, mit der Folge einer kaskadenartigen Aktivierung von Kinasen und Faktoren. Diese führt letztendlich zur Freisetzung von Transkriptionsfaktoren, z.B. NFκB (*nuclear factor κB*), der die Interferon-Antwort einleitet, p38, MAP-Kinase (mitogen-activated Protein kinases), c-Jun-Kinase usw. Der Transkriptionsfaktor NFκB ist in vielen physiologischen Prozessen wie z.B. Angiogenese, Apoptose und Reparatur von Geweben involviert. (Akira et al. 2001)

1.1.3 Molekulare Regulation des Immunsystems

Aufgrund des hohen autoaggressiven Potenzials des Immunsystems sind in ihm mehrere Regulationssysteme eingebaut. Auf der Organebene übernehmen Blut-Gewebe-Schranken eine erste Barriere-Funktion zwischen empfindlichen Organen (z.B. Gehirn, Testes, Ovar) und Immunreaktionen im Rest des Körpers. Innerhalb des so isolierten Milieus sorgen spezielle Schutzmechanismen weiterhin für eine hohe Immuntoleranz,

Einleitung

sei es eine durch Verringerung der MHC-Expression, durch die häufige Induktion einer Leukozyten-Apoptose oder aber durch hohe Konzentrationen immunsuppressiver Zytokine. Auf zellulärer Ebene imponieren T-regulatorische Zellen (Treg), die Immunreaktionen antigenunspezifisch mittels Zytokine unterdrücken können, oder alternativ antigenspezifisch im Zusammenspiel mit Antigen-präsentierenden und Effektor-T-Zellen (Iwasaki & Medzhitov 2004). Schließlich gibt es auf molekularer Ebene eine Vielzahl an Faktoren, die das Zusammenwirken der Immunzellen regulieren. In diesem Zusammenhang können proinflammatorische (z.B. IL-1, IL-6, TNF α) und antiinflammatorische Zytokine (z.B. IL-10, IL-1Ra oder IL-13), sowie Chemokine und Adhäsionsmoleküle (Selektine, Integrine) genannt werden. Die Expression dieser Moleküle wird wiederum durch die TLR-abhängige Erkennung pathogener Antigene maßgeblich beeinflusst. Kurzum ist die Regulierung der TLR in der Immunmodulierung entscheidend, da sie Immunzellrekrutierung und humorale Immunantwort mitwirkend kontrolliert. Bisher ergründete, hemmende Einflüsse auf die TLR-Signalkaskaden werden u.a. von TIR8/SIGIRR, ST2, IRAKM, MyD88s, SOCS1 und Triad3A, ausgeübt. (Liew F Y et al. 2005)

1.2 Toll-interleukin 1 receptor 8/ Single Immunglobulin related IL-1 related receptor (TIR8/SIGIRR)

Jüngste Studien etablierten das Toll-interleukin 1 receptor (IL-1R) - (TIR) Familienmitglied TIR8/ *single immunoglobulin IL-1R-related receptor* (SIGIRR) Protein als TLR-Regulator und Immunmodulator. Weitere Mitglieder dieser Molekülklasse sind neben TLR die Rezeptoren der proinflammatorischen Zytokine Interleukin 1 (IL-1) und Interleukin 18 (IL-18). TIR8, TLR und den genannten Interleukin-Rezeptoren ist die konservierte intrazelluläre TIR-Domäne gemeinsam, die im Falle von TLR/IL-1R/IL-18R durch die Aktivierung einer Signalkaskade zur Einschaltung entzündungsfördernder Transkriptionsfaktoren (u.a. NF κ B, MAP-Kinasen, IRF3) führt. Interessanterweise hat die Aktivierung der TIR-Domäne des TIR8 den entgegengesetzten Effekt, nämlich Entzündungshemmung (Garlanda et al. 2013). In unterschiedlichen Experimenten

zeigten Zellen aus TIR8-defizienten Mäusen eine gesteigerte Antwort auf IL-1 und einige TLR-Liganden. (Wald et al. 2003)

1.2.1 Expression und Molekülstruktur des TIR8/SIGIRR

SIGIRR, auch TIR8 genannt, wurde initial durch Computer-gestützte Durchsuchung der Datenbanken menschlicher Gene auf TIR-Domäne-enthaltende Proteine identifiziert (Thomassen E et al. 1999). Später konnte eine homologe Sequenz bei der Maus identifiziert werden. Zwischen humaner und muriner Peptidsequenz des fortan als SIGIRR/TIR8 bezeichneten Moleküls besteht eine Übereinstimmungsquote von 82 %. Die Proteinlänge beträgt beim Menschen 410, bei der Maus 409 Aminosäuren. Trotz 25,9 %iger Übereinstimmung mit der Peptidsequenz des IL-1 Rezeptors wird die Peptidsequenz des hSIGIRR nicht in einem IL1-Familien-Cluster auf dem Chromosom 2, sondern auf dem p-Arm des Chromosoms 11 kodiert (Thomassen E et al. 1999). Die SIGIRR-mRNA-Expression erwies sich im Northern-Blot als weitverbreitet im menschlichen Organismus, im gesamten Gastrointestinaltrakt vom Oesophagus bis zum Colon, in Lunge, Uterus, Plazenta, Ovar, Prostata, Testes, Milz, Thymus, sowie Lymphozyten des peripheren Blutes. Seitens der SIGIRR-haltigen murinen Geweben werden Nieren-Epithelien, Dickdarm- und mit geringerer Ausprägung Milzgewebe genannt. Wie andere IL-1R-ähnliche Moleküle liegt TIR8/SIGIRR weitgehend glykolysiert vor. Das molekulare Gewicht des humanen SIGIRR-Glykoproteins beträgt Western-Blot-Analysen nach zwischen 50-80 kDa und konnte durch N-Glykosidase F-Behandlung bis auf 48 kDa reduziert werden (Chen et al. 2010).

1.2.2 Funktion des TIR8/SIGIRR

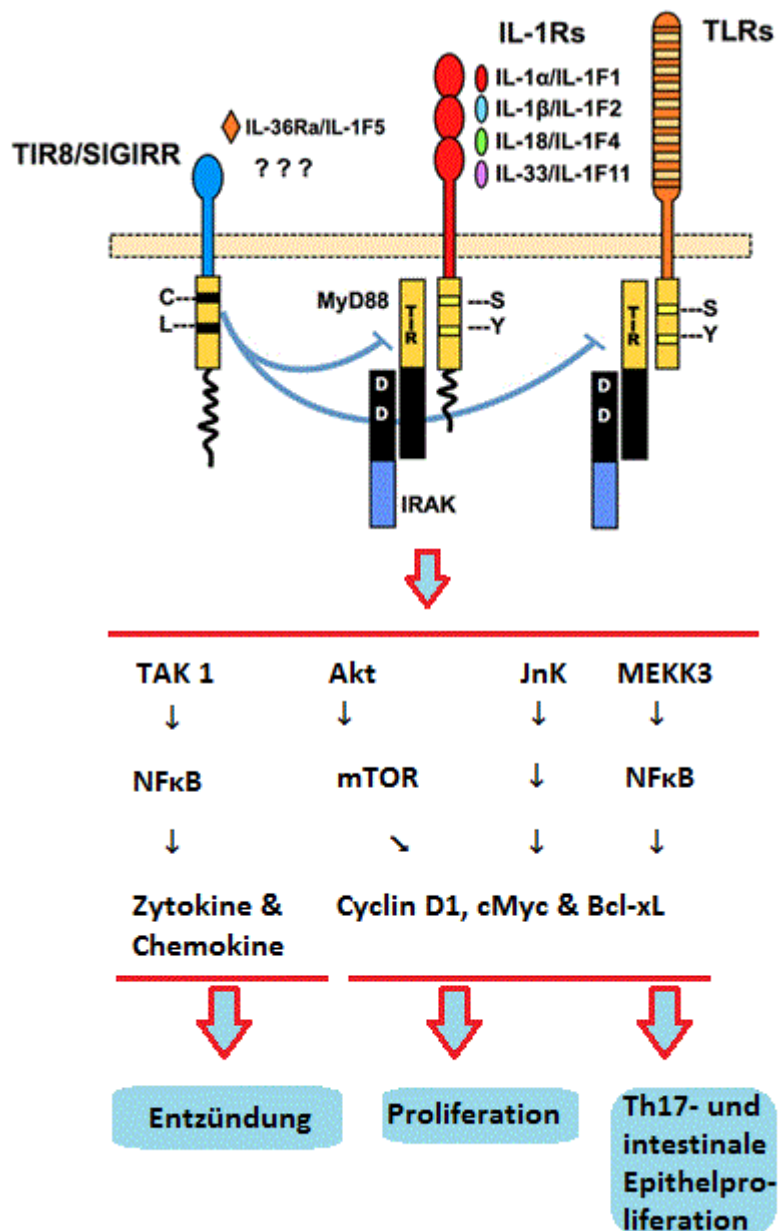


Abb. 2 TIR8/SIGIRRs inhibitorische Funktion in der ILR/TLR-Signalkaskade. TIR8 hemmt über die Regulation diverser Faktoren u.a. Entzündungsreaktionen und Proliferation. Dies resultiert letztlich in der Abschwächung diverser Infektionen und allergischer/autoimmuner Reaktionen (Modifiziert nach: Garlanda et al. 2013)

Einleitung

Ein gut reguliertes Zusammenspiel zwischen fördernden und hemmenden Einflüssen auf den TIR-Signalweg (Toll-IL-1 receptor) ist für eine gesunde Immunantwort wesentlich. Unkontrollierte Immunantworten stellten sich als in hohem Maße für die Entstehung chronisch-entzündlicher Erkrankungen verantwortlich heraus (Li X et al. 2005). TIR8/SIGIRR wird neben weiteren Molekülen, u.a. ST2, IRAKM, MyD88s, SOCS1 und Triad3A, eine inhibierende Wirkung auf den TIR-Signalweg zugeschrieben (Abb. 2). TIR-vermittelte Signalkaskaden führen größtenteils über die Aktivierung von NFκB und MAP-Kinasen zur Transkription von Zytokinen (Li X et al. 2005).

Zum einen hemmte in Studien eine übersteigerte SIGIRR-Expression TIR-Signalkaskaden in mehreren Zelllinien. Es wurde z.B. herausgefunden, dass Sigirr-transfizierte Zellen nach Behandlung mit IL-33 eine reduzierte IL-33-ST2-abhängige ERK-, JNK und IκB-Phosphorylierung aufwiesen (Li X et al. 2005). Zum anderen zeigten Sigirr-defiziente Milz-, Nieren- und Darmepithel-Zellen eine gesteigerte Reaktion auf IL-1- und Toll-Liganden-Stimulierung. So riefen LPS- und DNA-Erkennung bei Sigirr-defizienten dendritischen Zellen eine im Vergleich höhere Zytokin-Synthese hervor (Bulek K et al. 2009). In Th2-Zellen führte die Sigirr-Defizienz ebenfalls zu höheren Zytokin-Spiegeln und zu einer erhöhten IL33-abhängigen Immunantwort (Wald et al. 2003). Darüber hinaus war die Sigirr-Defizienz in Mäusen bei Präsentation von Lupus-Autoantigenen mit einer schwereren Lymphoproliferation, mit einer erhöhten Aktivität dendritischer Zellen und einer gesteigerten Expression multipler proinflammatorischer und antiapoptotischer Mediatoren vergesellschaftet (Lech M et al. 2008).

Abgesehen von den oben beschriebenen molekularen SIGIRR-Wirkungen wurde auch dessen Stellenwert in der Homöostase mehrerer Organsysteme eruiert. Ausgehend von den molekularen SIGIRR-Funktionen konnte die Hypothese einer SIGIRR-vermittelten Hemmung chronischer Entzündungen mehrfach verifiziert werden. So zeigten SIGIRR-defiziente Mäuse eine erhöhte entzündliche Aktivität nach IL-1-Stimulation, insbesondere in der Lunge und im Colon. Zudem waren die untersuchten Mäuse anfälliger für entzündliche Darmerkrankungen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Garlanda et al. 2004). In einem OVA-induziertem Asthma-Mausmodell wurde bei

Einleitung

SIGIRR-defizienten Mäusen eine erhöhte OVA-spezifische IgE-Synthese im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen, die für eine erhöhte Th2-vermittelte Aktivität des allergischen Asthmas sprach (Shibolet et Podolsky 2007). Das Fehlen eines funktionellen SIGIRR wurde bei der Maus als Prädispositionsfaktor für Autoimmunerkrankungen im Allgemeinen beschrieben, insbesondere für den systemischen Lupus erythematosus mit Affektion mehrerer Organsysteme, wie das respiratorische und das harnableitende System (Bulek K et al. 2009). Andererseits konnte in weiteren Mausversuchen eine Über-Expression des SIGIRR im Lungengewebe als schützender Faktor gegenüber einer LPS-induzierten akuten Lungenentzündung identifiziert werden (Lech et al. 2008). Bei menschlichen Rheumatoide-Arthritis-Synovia-Zellen führte eine SIGIRR-Über-Expression durch reduzierte Zytokinausschüttung zu einer verminderten Entzündungsaktivität (Chen et al. 2010). Somit wurde eine antiinflammatorische Wirkung SIGIRRs in der Pathogenese mehrerer entzündlichen Erkrankungen in vivo und in vitro belegt (Drexler S et al. 2010).

Der molekulare Mechanismus, durch den SIGIRR-Funktionen vermittelt werden, ist noch nicht genau bekannt. Fakt ist, dass SIGIRR nach IL1-Stimulierung einen Komplex mit dem IL-1-Rezeptor, IRAK und TRAF6 bildet (Wald D. et al 2003). Da letztere Moleküle maßgeblich am TIR-Signalweg beteiligt sind, ist anzunehmen, dass SIGIRR durch die direkte Interaktion mit dem TIR-Komplex wirken könnte. Außerdem wurde eine Komplexbildung des SIGIRR-Moleküls mit ST2 nach IL-33-Stimulierung in Zellkulturen beschrieben (Bulek K. et al. 2009).

1.3 Antikörpervermittelte Funktionen des adaptiven Immunsystems

Antikörper bzw. Immunglobuline sind wichtige Bestandteile der adaptiven humoralen Immunantwort. Hierbei intervenieren sie sowohl in einer frühen als auch in einer späten Phase. Es sind Glykoproteine, die auf der Oberfläche von B-Zellen als B-Zell-Rezeptoren unterschiedlicher Spezifität exprimiert werden. Nach Bindung eines Antigens und

Einleitung

Aktivierung des B-Lymphozyten, differenziert dieses zur Plasmazelle und sezerniert lösliche Immunglobuline gleicher Spezifität in großen Mengen, die an das Pathogen binden. Darauf folgen Effektor-Mechanismen, die vom jeweiligen Isotyp der synthetisierten Antikörper abhängen. Unter einem Funktionsweise-orientierten Blickwinkel werden Antikörper nach Isotypen unterteilt. In der biomedizinischen Forschung ist eine weitere Einteilung nach Ursprung (monoklonal gegenüber polyklonal) von Bedeutung. (Rink et al. 2012)

1.3.1 Die adaptive Immunantwort

Gelingen die angeborenen Abwehrmechanismen gegen pathogene Angriffe nicht suffizient, dann obliegt dem adaptiven Immunsystem die weitere Verteidigung der Unversehrtheit des Organismus. Durch die vom angeborenen Immunsystem initiierte Entzündungsreaktion, wird der Transport von entsprechenden Antigenen in das nächstgelegene periphere lymphatische Organ gefördert.

Neben der Entzündungsreaktion an sich wird dieser Transport-Prozess auch von gewebständigen dendritischen Zellen mitgetragen. Nach Aktivierung ihrer Toll-like Rezeptoren oder nach Wahrnehmung von Gewebeschäden/ Zytokinen, nehmen sie pathogene Antigene auf, prozessieren sie und transportieren sie in die peripheren lymphatischen Organe. Dort erfolgt die Präsentation an naive T-Zellen, die die adaptive Immunantwort einleitet. Für die Antigenpräsentation sind konventionelle dendritische Zellen (cDC) am stärksten verantwortlich, aber auch Makrophagen und B-Zellen. (Rink et al. 2012, Murphy et al. 2009)

Naive T-Zellen werden durch Wechselwirkungen von Integrinen und Chemokinen ins periphere lymphatische Gewebe gelockt und festgehalten, wo sie in der B-Zell-Zone auf reife antigenpräsentierende Zellen (APC), mehrheitlich cDC treffen. Die präsentierten Peptid-MHC II-Komplexe binden an den T-Zell-Rezeptor. Die T-Zelle erhält allerdings noch weitere Signale von der APC, die neben der Antigenbindung für die T-Zell-Aktivierung (Priming) erforderlich sind. Dies sind costimulierende Moleküle und Zytokine. Dem Priming-Prozess folgen eine klonale Expansion und Differenzierung der

Einleitung

aktivierten T-Zelle zu einem Klon eines festgelegten T-Zelleffektor-Typs.

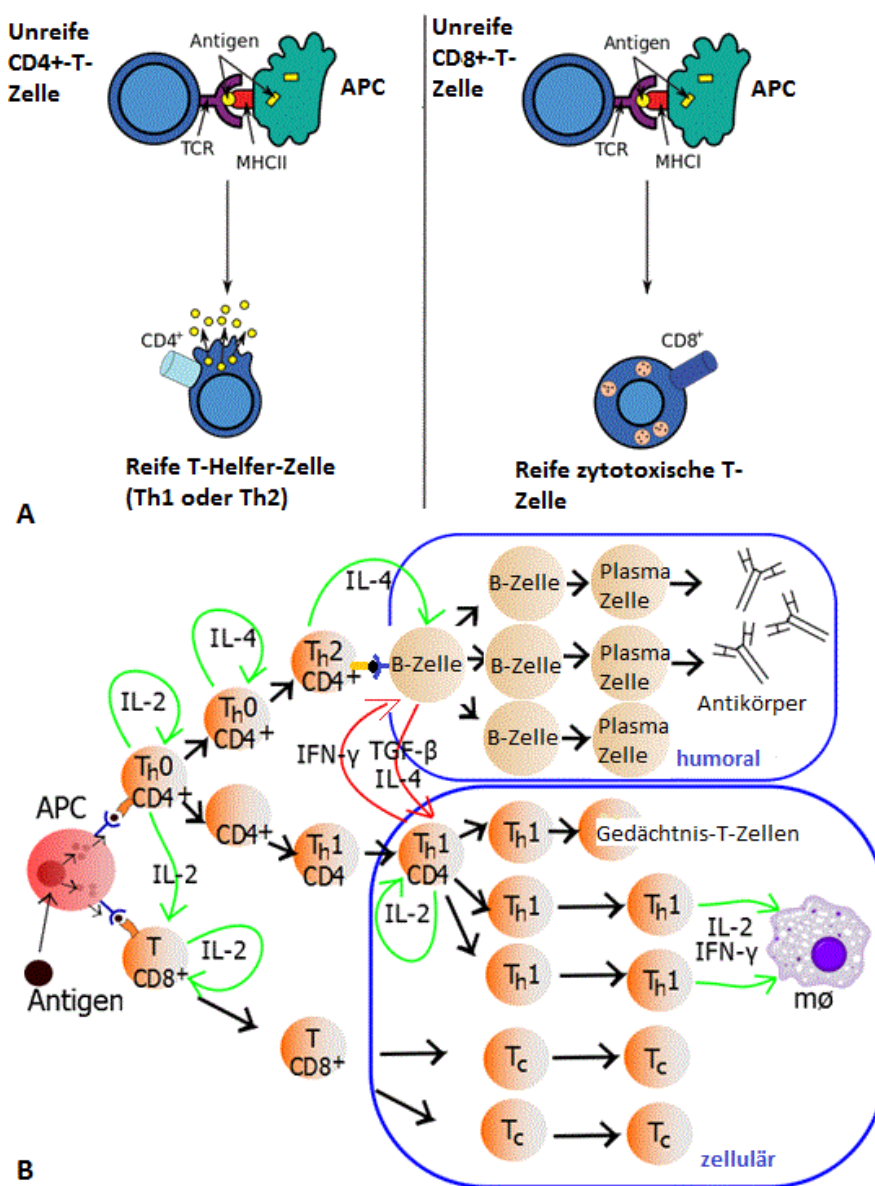


Abb. 3 T-Zell-Aktivierung und Differenzierung. **A.** Die Antigenpräsentation stimuliert T-Zellen zur Differenzierung zu CD-4+ T-Helfer-/CD-8+ zytotoxischen Zellen. (Modifiziert nach: http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Antigen_presentation.jpg) **B.** Th1/Th2-Modell. Fragmente eines Antigen werden durch die APC an T-Zellen präsentiert. Th0 sind T-Helferzellen, denen ein Fragment über MHC2 präsentiert wird und die anschließend entweder als Th1-Zellen die humorale oder als Th2-Zellen die zelluläre Abwehr stimulieren. Die zur zytotoxischen T-Zellen (Tc) herangereiften Zellen beteiligen sich an der zellulären Abwehr. Zelluläre und humorale Abwehr beeinflussen sich gegenseitig. APC, Antigen-präsentierende Zelle; IFN- γ , interferon γ ; TGF- β , transforming growth factor β ; m ϕ , Makrophage; IL-2, interleukin 2; IL-4, interleukin 4 (Modifiziert nach: Häggström, Mikael. "Medical gallery of Mikael Häggström 2014". Wikiversity Journal of Medicine).

So kann sich eine CD4⁺-T-Zelle zu einer von verschiedenen T-Helfer-Subpopulationen (wie z.B. T_H1, T_H2 oder T_H17) oder zu einer regulatorischen T-Zelle (T_{reg}) differenzieren. T_H1-Zellen sind in der Abwehr intrazellulärer Bakterien und in der Plasmazell-Stimulierung spezialisiert. Analog hierzu fördern T_H2-Zellen die Antikörper-Produktion und den Isotypenwechsel bei Plasmazellen (Rink et al. 2012). T_H17-Zellen verstärken die akute Entzündung durch Anlockung neutrophiler Zellen zur Infektionsstelle. Im Gegensatz hierzu sorgen T_{reg}-Zellen mittels inhibitorischer Zytokine für den Schutz des umgebenden Gewebes vor kollateraler Schädigung. Was CD8⁺-Zellen anbelangt, so reifen diese nach Priming zu zytotoxischen T-Zellen heran, die u.a. virusinfizierte körpereigene Zellen töten (**Abb. 3 A und B**). (Murphy et al. 2009)

1.3.2 Antikörper-Entstehung, -Struktur und -Funktionen

Entsprechend ihrer Beteiligung sowohl an der frühen als auch an der späten Phase der Immunantwort, können Antikörper wesentlich auf zwei Wegen entstehen. Voraussetzung ist stets die Stimulierung von B-Zellen durch Bindung eines Antigens an den B-Zell-Rezeptor. B-Zell-Rezeptoren entstehen während der Hämatopoese im Knochenmark und unterlaufen mit den zugehörigen unreifen B-Zellen einer positiven und einer negativen Selektion, die letztendlich zur zentralen Toleranz führen. Das heißt, dass die naive immunkompetente B-Zelle so geprägt ist, dass sie keine körpereigenen Moleküle erkennt (Rink et al. 2012). Im Fall von Pathogenen mit hochrepetitiven Antigenen und Mitogenen, reicht der Antigen-B-Zell-Rezeptor-Kontakt zur Synthese von IgM- und z.T. IgG-Antikörpern aus. Meistens benötigen B-Zellen aber im Vorfeld eine Aktivierung durch T-Helfer-Zellen gleicher Spezifität. Diese Aktivierung erfolgt in den peripheren lymphatischen Organen an der Grenze zwischen T-Zell-Zone und B-Zell-Zone und führt zur Proliferation der B-Zelle, sowie zu ihrer Umwandlung durch Hypermutation zur Antikörper-sezernierenden Plasmazelle. Zudem steuern die T-Helferzellen den Klassen-Wechsel, der zur Synthese von Antikörpern mit verschiedenen Isotypen führt. (Murphy et al. 2009)

Einleitung

Allen Antikörper-Klassen ist ein Y-förmiges Grundgerüst aus einem vierkettigen Glykoprotein gemeinsam. Den Stamm des Grundgerüsts bilden zwei identische schwere Ketten, während sich an den zwei Armen jeweils eine von zwei identischen leichten Ketten anlagert. Der Stamm des Antikörpers ist der konstante Teil oder Fc-Teil, der für die Effektormechanismen zuständig ist. Die Arme hingegen bestehen aus variablen Anteilen der schweren und leichten Ketten und enden mit zwei Antigenbindungsstellen, die das gleiche Epitop des Antigens binden (**Abb. 4**). (Murphy et al. 2009)

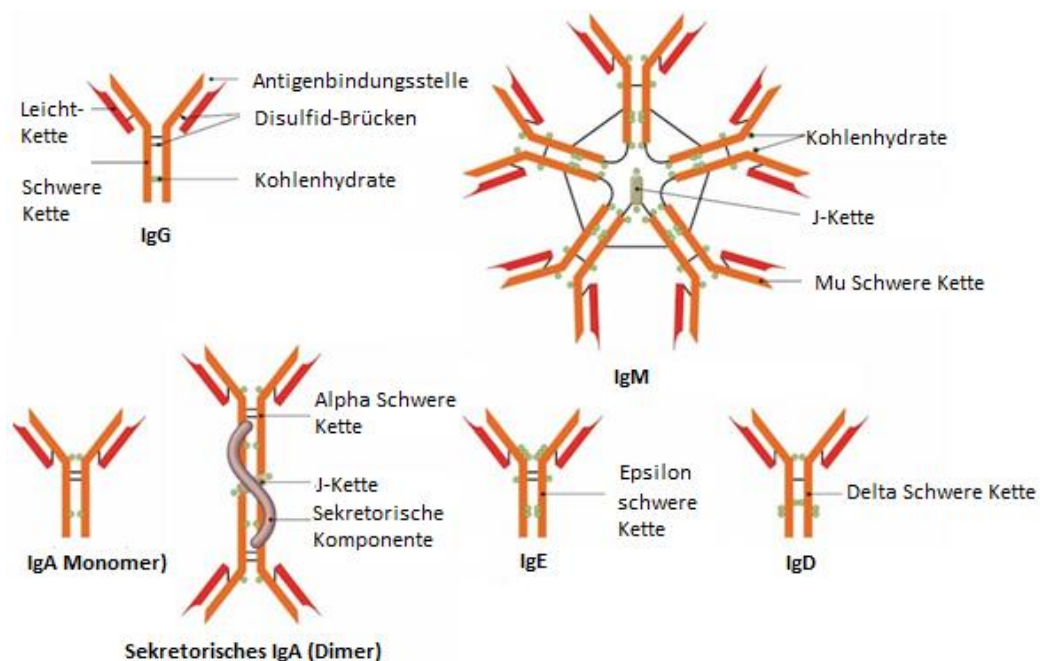


Abb. 4 Fünf unterschiedliche Konfigurationen der konstanten Antikörperdomäne, fünf unterschiedliche Immunglobulin- bzw. Antikörperklassen. IgG: Monomer; IgM: Pentamer; IgA: Monomer und Dimer; IgE: Monomer, Basophile. IgD: Monomer, B-Zell-Rezeptor. (Modifiziert nach: http://spot.pcc.edu/~jvolpe/b/bi234/lec/8_9defenses/9_outline.htm)

Einleitung

Es werden hauptsächlich drei Effektormechanismen nach Antigen-Antikörper-Bindung unterschieden: Neutralisierung, Opsonisierung und Aktivierung des Komplementsystems. Die Neutralisierung von Pathogenen besteht darin, dass Antikörper, die an Viren oder an intrazellulär lebenden Bakterien binden, diese Pathogene am Eindringen in körpereigenen Zellen hindern. Die Opsonisierung bezeichnet wiederum das Beschichten von Pathogen-Oberflächen –vorzugsweise von extrazellulär lebenden Bakterien oder Helminthen- durch Antikörper, wodurch die Pathogene für Immunzellen besser sichtbar werden. Antikörper sind schließlich je nach Isotyp zur Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen Weg fähig. Die Komplementkaskade führt entweder zur direkten Zerstörung der Pathogene durch Lyse oder zur Verstärkung der Immunantwort. (Rink et al. 2012)

Die Vielfalt dieser Effektormechanismen ist in der unterschiedlichen Zusammensetzung der Immunglobulinklassen oder Isotypen verankert. Diese werden abhängig vom konstanten Teil ihrer schweren Kette als IgM, IgD, IgG, IgE oder IgA bezeichnet. Neben ihrer Struktur lassen sich die Immunglobulinklassen anhand ihrer Funktion unterscheiden (Murphy et al. 2009).

IgM-Moleküle werden als Erstes bei einer primären Immunantwort gebildet. In ihrer sezernierten Form lagern sie sich zu einem Pentamer zusammen, das durch eine J(joining)-Kette stabilisiert wird. Dieses Pentamer stellt einen multivalenten Komplex dar (10 Bindungsstellen), der sich wiederholende Epitope mehrerer Erreger gleichzeitig binden kann. Daraus entstehen große Immunkomplexe mit besonderer Fähigkeit zur Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen Weg. Zudem spielen IgM-Moleküle eine wichtige Rolle bei Bluttransfusionen, da die Blutgruppen-assoziierten Antikörper zum IgM-Isotyp gehören. (Murphy et al. 2009)

IgD Moleküle kommen sowohl in B-Zell-Membran-ständiger als auch in sezernierter Form als Monomere vor, deren genaue Rolle unbekannt ist. (Rink et al. 2012)

Die IgG-Synthese kommt typischerweise erst in der Spätphase der Immunantwort zustande. Dann steht sie aber mit einem Anteil von ca. 75 % am Gesamt-Immunglobulin

Einleitung

im Serum im Vordergrund. IgG-Moleküle sind Monomere, die mit höherer Affinität aber geringerer Avidität als IgM ihre Antigene binden. Darüber hinaus verbünden sie sich auf der Oberfläche von Pathogenen zur Aktivierung des klassischen Komplementweges. Es existieren beim Menschen mehrere Subklassen oder Allotypen der IgG-Moleküle: IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 (Rink et al. 2012). IgG-Antikörper stehen in Zusammenhang mit abgelaufenen Infektionen, stattgefundenen Impfungen, Immunschutz für Neugeborene in den ersten Wochen, Rhesus-Inkompatibilität usw. (Murphy et al. 2009). IgE-Antikörper binden mit dem Fc-Teil an Fc-Rezeptoren der verschiedenen Zelltypen (Mastzellen, aktivierte eosinophile und basophile Granulozyten) und vermitteln Helminthen-Abwehrreaktionen und Allergien vom Soforttyp (Rink et al. 2012). Sezerniertes IgA kommt in geringer Menge als Monomer im Serum, aber vorwiegend als Dimer in Körpersekreten, wo es einen Schutz der Schleimhaut vor Erregern und deren Toxine bietet. (Rink et al. 2012)

In der biomedizinischen Anwendung ist neben dem Isotyp vorliegender Antikörper deren Ursprung von Bedeutung. Hierbei wird zwischen einem monoklonalen und einem polyklonalen Ursprung unterschieden, je nachdem ob die Antikörper von ein und demselben B-Zell-Klon oder von unterschiedlichen Klonen abstammen. Ein moloklonaler Ursprung steht demnach im Idealfall für monospezifische Antigenerkennung, d.h. auf einem einzigen Epitop des Antigens beschränkt. Dementsprechend stellen monoklonale Antikörper ein hoher Grad an methodischer Reproduzierbarkeit (Köhler G et Milstein C 1975). Polyklonale Antikörper weisen hingegen unterschiedliche Epitopspezifitäten bei gleicher Antigenspezifität auf. Dafür stoßen polyklonale Antiseren durch die hohe Anzahl an potenziellen Bindungsstellen pro Antigen möglicherweise später an die Nachweisgrenze eines Assays als ihre monoklonalen Korrelate. Monoklonale Antikörper werden biotechnisch anhand der Hybridoma-Technik synthetisiert. Grundlage hierfür sind durch Fusion mit Hybridom-Zellen immortalisierte Plasmazellen, die dauerhaft Antikörper einer predefinierten Spezifität sezernieren (Köhler G et Milstein C 1975).

1.3.3 Monoklonale Antikörper in der biomedizinischen Forschung, Diagnostik und Therapie

Zahlreiche gängige Assays sind auf zuverlässige Antikörper angewiesen, wobei monoklonale Antikörper sich häufig als weniger störanfällig erweisen. Quantitative Immunoassays, Western-Blot, Durchflusscytometrie und in situ-Immunlokalisationstechniken sind nur einige der auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion basierenden Methoden. Darüber hinaus werden zunehmend therapeutische Einsatzgebiete bekannt, in denen monoklonale Antikörper eine hohe Wirksamkeit bei relativ geringen Nebenwirkungen im Vergleich zu ihren polyklonalen Vorgängern oder gar zur Serumtherapie haben. Ihre Verträglichkeit wird durch Gentechnik gesteigert, indem chimäre, humanisierte oder rein humane Antikörper hergestellt werden, die keine anti-Antikörper induzieren. (Breedveld F C 2000)

Dem gezielten therapeutischen Einsatz monoklonaler Antikörper stehen weitere, breitere Bereiche der Immuntherapie mit Antikörper-Einsatz-Potential gegenüber: passive Immunisierung, Immunstimulierung, Immunsuppression, Immunglobulin-Substitutionstherapie. Bei Letzteren ist die Anwendung monoklonaler Antikörper zwar denkbar, aber nicht unumgänglich und nicht zwangsläufig effizienter (Breedveld F C 2000). Abgesehen vom größeren Aufwand durch den langen Selektionsprozess, droht in einigen Fällen zudem eine nachteilige Wirkung durch die komplette Ausschaltung des Ziel-Antigens. So werden bei der Immunglobulin-Substitutionstherapie intravenöse Immunglobuline (IVIG) zur Infektions- oder Rhesusprophylaxe angewendet, wobei ein Kollektivschutz auf den Empfänger übertragen wird, der durch ein monoklonales Antiserum nicht gewährleistet werden kann. Die therapeutische Immunsuppression mit den breitwirksamen Glukokortikoiden erreicht in vielen Fällen eine ausreichende Effizienz, dadurch dass sie an mehreren Stellen gleichzeitig eingreift, was durch monoklonale Antikörper weniger zu erwarten ist. Nichtsdestotrotz stellen sie in

Einleitung

zunehmenden Bereichen eine sinnvolle Alternative mit selteneren unspezifischen Nebenwirkungen (Breedveld F C 2000).

Der therapeutische Einsatz monoklonaler Antikörper wird von mehreren Autoren als einen der größten Durchbrüche der modernen Biotechnik aufgefasst (Rink et al 2012). Seitdem die Hybridoma-Technik in den 70 er Jahren verbreitet wurde, wurde diese schnell in der Entwicklung mehrerer therapeutischer monoklonaler Antikörper angewendet. Die Einsatzgebiete verfügbarer Produkte reichen von der Inhibierung alloimmuner und autoimmuner Reaktivität über antineoplastische und antikoagulatorische Wirkungen bis hin zur antiviralen Therapie. In Tab 1 werden zur Therapie zugelassene monoklonale Antikörper und deren grobe Einsatzgebiete zusammengefasst. Die Weiterentwicklung therapeutischer monoklonaler Antikörper sollte mit der kritischen Auseinandersetzung mit den bisher unbekanntem Langzeitfolgen, sowie mit einer vertieften Risiko-Nutzen-Analyse Hand in Hand gehen. (Breedveld F C 2000)

Tab. 1: Kleiner Auszug in Deutschland zugelassener oder in klinischer Erprobung Phase III befindlicher therapeutischer monoklonaler Antikörper. (Modifiziert nach: https://de.wikipedia.org/wiki/Monoklonaler_Antikörper am 13.10.15)

Name	Typ	Zielstruktur	Anwendungsgebiet
Alemtuzumab	humanisiert	CD52-Antigen auf Lymphozyten	Chronische lymphatische Leukämie, T-Zell-Lymphome, akute lymphatische Leukämie, Multiple Sklerose
Bevacizumab	humanisiert	VEGF (Vascular Endothelial Growth	Darmkrebs, Brustkrebs, nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom, feuchte altersbedingte Makula-

Einleitung

		Factor)	degeneration (Off-Label-Use)
Rituximab	chimär	CD20-Antigen auf B-Lymphozyten	Non-Hodgkin-Lymphome Rheumatoide Arthritis
Adalimumab	human	TNF- α (Tumor Necrosis Factor α)	Rheumatoide Arthritis, Psoriasis-Arthritis, Morbus Bechterew, Morbus Crohn
Natalizumab ³	humanisiert	CD49d (α 4-Integrin)	Multiple Sklerose
Abciximab	chimär, Fab-Fragment	GPIIb/IIIa auf Thrombozyten	Verhinderung eines Gefäßverschlusses nach PTCA (Perkutane Transluminale Koronarangioplastie)
Infliximab	chimär	TNF- α (Tumor Necrosis Factor α)	Psoriasis

1.4 Zielsetzung

TIR8/SIGIRR gilt als immunregulatorisch aktiver, orphaner Rezeptor, d.h. mit unbekanntem Liganden. Mehrere murine Studien deuteten bereits auf eine ausschlaggebende Funktion u.a. in der Colon-Homeostase, in Transplantationsreaktionen bei Nierentransplantationen, in der Limitierung ausufernder Tuberkulose-assoziiertes Entzündungsreaktionen (Garlanda et al. 2004). Die weitere Erkundung der

Einleitung

Lokalisation und Funktionsweise SIGIRRs erfordert möglichst sensitive und spezifische anti-SIGIRR-Antikörper. Langfristiges Ziel eines besseren Verständnisses der SIGIRR-Funktion ist z.B. die Entwicklung effizienterer kleinmolekularer Immunsuppressiva, die durch Einflussnahme in die SIGIRR-abhängige Immunmodulation wirken.

Ziel dieser Arbeit ist die Generierung und Charakterisierung eines monoklonalen Antikörpers gegen das humane TIR8/SIGIRR-Protein. Damit soll ein Beitrag geleistet werden zur weiteren Ergründung folgender offener Fragen:

- In welchen Zellkompartimenten übt das SIGIRR-Protein seine Funktion als Immunmodulator aus?
- Wie erfolgt sein intrazellulärer Transport und wovon ist dieser abhängig?
- Welche Auswirkungen für das Immunsystem hat die Neutralisierung des SIGIRR-Proteins *in vitro/ in vivo* durch monoklonale anti-SIGIRR-Antikörper?
- Lassen sich die mit polyklonalen Antikörpern erzielten Ergebnisse bezgl. der Funktion des SIGIRR-Proteins mit monoklonalen Antikörpern erhärten?

SIGIRR wurde anhand mehrerer Studien als potenzielles therapeutisches Ziel bei chronisch-entzündlichen, allergischen, neoplastischen und Autoimmun-Erkrankungen identifiziert (Rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn/Colitis ulcerosa, Asthma bronchiale, Colon-Karzinom, Systemischer Lupus Erythematosus usw.: Garlanda et al. 2004; Shibolet et Podolsky 2007; Bulek K et al. 2009; Lech et al. 2008; Chen et al. 2010; Drexler S et al. 2010).

Zur Generierung monoklonaler anti-SIGIRR-Antikörper werden im ersten Teil der Arbeit Sigirr-defiziente Mäuse durch Immunisierung zur Bildung SIGIRR-reaktiver Plasmazellen angeregt. Diese Plasmazellen werden anschließend geerntet und mittels Hybridoma-Technik zur fortwährenden Antikörpersekretion immortalisiert. Letztlich erfolgt eine progressive Selektion auf ihre SIGIRR-Spezifität; aus den ursprünglichen Plasmazellklonen werden Subklone herausgefiltert, unter denen die mit der höchsten SIGIRR-Spezifität zur weiteren Austestung ausgewählt werden. Dieser zweite Teil der

Einleitung

Arbeit erfordert den Einsatz verschiedener Testsysteme, wie ELISAs und Western Blots (Köhler G et Milstein C 1975).

2 Material

2.1 Geräte

Gerät	Firma, Firmensitz
Analysenwaage R160P-D1	Sartorius GmbH, Göttingen
Analysenwaage H51-D	Sartorius GmbH, Göttingen
Autoklav Provit 2200	Holzner GmbH, Nussloch
Blotter E19001-XCELL II Mini Cell	Novex, San Diego USA
Eismaschine AF 10	Scotsman Ice Systems, Ipswich, UK
Filmkassette 13x18 cm	Rego, Augsburg
FPLC System	Pharmacia LKB
Gefrierschränke	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
Gelkammer + Kämmе	OWL Weinheim
Gel UV-Imaging System Miltenyi	Fröbel Labor Technik
Heizblöcke TS-100 Thermoshaker	PeqLab, Erlangen
Inkubator (Zellkultur) HERA cell 240	Hereaus, Hanau
Inkubator (Bakterien) Cytoperm	Heraeus, Hanau
Innova 4200 Incubator Shaker	New Brunswick Scientific, Edison NJ , USA
Kühlschränke	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
Kühlschränke	Liebherr, Ochsenhausen
MACS Midi Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS Multi Stand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Magnetrührer MR 2002	Heidolph, Schwabach
Mehrkanalpipette Finepipetten 30-300 µL	Thermo Electron Corp
Microplate Reader Emax	Molecular Devices, Ismaning
Mikroliterpipetten	Eppendorf, Hamburg

Material

Mikroliterpipetten	Abimed, Langenfeld
Mikroplattenwaschgerät Skan-Washer 400	Molecular Devices, Ismaning
Mikroskop Diavert	Leitz, Bielefeld
Mikroskop Labovert	Leitz, Bielefeld
pH-Meter pH523	WTW, Weilheim
Photoentwickler Optimax 2010	PROTEC, Oberstenfeld
Pipettierhilfe Pipetboy	Hirschmann Laborgeräte
Plattenphotometer Emax	Molecular Devices, Ismaning
Präzisionswaage P1000	Mettler Toledo, Gießen
Rüttler VortexGenie 2	Scientific Industries, New York, USA
Rüttler Reax 2000	Heidolph, Schwalbach
Schwenkplatte Duomax 1030	Heidolph, Schwabach
Schüttler MTS4	IKA
Spannungsquelle E443	Consort Power
Spannungsquelle EC10	E-C Apparatus Corporation, Groton, CT, USA
Spannungsquelle StandardPowerPack P25	Biometra, Göttingen
Spektrometer NanoDrop-1000	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Stickstoff-Tank Chronos	Messner, Griesheim
Werkbank Hera safe	Heraeus, Hanau
Werkbank LaminAir HLB 2448	Heraeus, Hanau
Werkbank BIOHIT	Heraeus, Hanau
Thermocycler Master Cycle Gradient	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler Elite	Helena, Sunderland, UK
Thermocycler iCycler	Biorad, Hercules, USA
Tischzentrifuge Biofuge 15	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge Picofuge	Stratagene, Amsterdam, NL
Ultraschall-Gerät Transsonic Digital S	Elma

Material

Vakuumpumpe	BMFZ Werkstatt, Marburg
Wasserbad	Köttermann Labortechnik
Western Blot system	Biorad, Hercules USA
Western Blot system	Peqlab, Erlangen
Zählkammer Neubauer	W. Schreck, Hofheim
Zellzähler Casy-1 TT	Schärfe System, Reutlingen
Zentrifuge Multifuge 1L-R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Minifuge T	Heraeus, Hanau

2.2 Chemikalien

Chemikalien	Firma, Firmensitz
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose „UltraPure™“	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
ATP (Adenosintriphosphat)	Roth, Karlsruhe
BSA (Rinderserumalbumin)	Roth, Karlsruhe
Casein	Roth, Karlsruhe
Chloroform (CHCl ₃)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Citronensäure (C ₆ H ₈ O ₇ × H ₂ O)	Roth, Karlsruhe
Coomassie brilliant blue r-250	Biorad Hercules, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO), z.A. getrocknet	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O)	Merck, Darmstadt
DTT	Roth, Karlsruhe
Eosin G	Roth, Karlsruhe
Essigsäure (CH ₃ COOH)	Roth, Karlsruhe

Material

Ethanol (C ₂ H ₅ OH)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (10 mg/mL)	Roth, Karlsruhe
Formaldehydlösung 37%	Merck, Darmstadt
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycine	Roth, Karlsruhe
GST	AG Bauer, Marburg
Gst-SIGIRR	AG Bauer, Marburg
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe
Lysozym	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Saliter, Obergrünzburg
Magnesiumhydroxidkarbonat (4 MgCO ₃ Mg(OH) ₂ × 4 H ₂ O)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Roth, Karlsruhe
Methanol (CH ₃ OH)	Roth, Karlsruhe
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat-Trihydrat (CH ₃ COONa × 3 H ₂ O)	Roth, Karlsruhe
Natriumazid (NaN ₃)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxidplättchen (NaOH)	Roth, Karlsruhe
OPD (o-Phenylendiamin-Dihydrochlorid)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Pepton aus Casein	Roth, Karlsruhe
Propan-2-ol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteinase-Inhibitor complete mini	Roche, Mannheim
Rotiblock	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merck, Darmstadt

Material

SDS Pellets	Roth, Karlsruhe
Sterilium, Teralin [®] Liquid	Schülke + Mayr GmbH, Norderstedt
Sucrose	Roth, Karlsruhe
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Tricine	Roth, Karlsruhe
Tris-Base	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Tween [®] 20	Roth, Karlsruhe
Ultra Pure Wasser	Biochrom, Berlin
Wasserstoffperoxid 30% (H ₂ O ₂)	AppliChem, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Invitrogen, Karlsruhe

2.3 Medien-Zellkultur

Bestandteil	Firma, Firmensitz
RPMI 1640 (No. E15-041)	PAA, Cölbe
RPMI mit HAT (Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin)	PAA, Cölbe
FCS (fötales Kälberserum)	Biochrom AG, Berlin
AB-Serum	BMFZ-Werkstatt, Marburg
Penicillin/Streptomycin 100 ×	PAA, Cölbe
L-Glutamine 200 mM 100 ×	PAA, Cölbe
β-Mercaptoethanol	Gibco Invitrogen, UK
Trypsin-EDTA (10 ×; 5 mg/ml Trypsin; 2,2 mg/ml EDTA)	PAA, Cölbe
Dulbecco's PBS ^{def} 1 × (without Ca and Mg)	PAA, Cölbe
HFCS 50x (Hybridoma Fusion and Cloning)	Roche, Mannheim

Material

Supplement)

2.4 Medien Bakterienkultur

Kulturmedium oder Zusatz	Firma, Firmensitz
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
LB Medium	Roth, Karlsruhe
LB Agar	Roth, Karlsruhe
SOC Medium	New England Biolabs

2.5 Biochemikalien, Enzyme und Kits

Biochemikalie, Enzym oder Kit	Firma, Firmensitz
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford USA
Collagenase D	Roche, Mannheim
DNase	Roche, Mannheim
ECL Plus Western Blot detection System	GE Healthcare, München
Generuler 100bp DNA Ladder Plus	Fermentas, St. Leon Rot
Generuler 1kb DNA Ladder Plus	Fermentas, St. Leon Rot
Red Blood Cell Lysing solution	Sigma-Aldrich, München
Taq PCR Master Mix Kit	Qiagen, Hilden

2.6 Plasmide

Plasmid	Firma, Firmensitz
pGEX-2TK Vektor	Pharmacia bzw. GE Healthcare, München

Material

2.7 Antikörper

Antikörper	Firma, Firmensitz
AP-markierter goat anti-mouse IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 & IgM	Jackson ImmunoResearch
Biotinylated goat anti-mouse IgG	BD Pharmingen, Heidelberg
HRP-markierter goat anti-mouse IgG	Jackson ImmunoResearch

2.8 Primer

Primer, Sequenz von 5' – 3'	Firma, Firmensitz
pGEX 3', CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG	Metabion, Martinsried
pGEX 5', GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	Metabion, Martinsried

2.9 Bakterienstamm

Stamm	Firma, Firmensitz
NEB 10-beta competent E. coli	New England Biolabs Inc.

2.10 Mäusstämme

Material

Stamm	Herkunft, Referenz
C57/B6 Wildtyp Mäuse	Tierhaltung BMFZ, Marburg
TLR27BC (SIGIRR-ko)	Tierhaltung BMFZ, Marburg (Garlanda, Riva et al. 2004)

2.11 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
Ag 8 P3X (Myelom-Zelllinie)	ATCC® LGC Standards, Wesel

2.12 Verbrauchsmaterialien

Material	Firma, Firmensitz
Casy-Röhrchen	Schärfe System, Reutlingen
Eppendorf Tubes 0,5 mL; 1,5 mL; 2 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Falcon 15 mL; 50 mL	Greiner bio-one, Frickenhausen
Filterspitzen 10 µL; 100 µL; 1000 µL	Avant Guard, USA
Flachbodenplatte 96 Wells (Maxisorp, ELISA)	Nunc, Langenselbold
Flachbodenplatte 96 Wells (Zellkultur)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Handschuhe	NOBA, Wetter
Kanülen 24G (0,55 × 25 mm)	Becton Dickinson, Heidelberg
Kryoröhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
MACS LS Column	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Nitrocellulose-Membran	Millipore, Massachusetts
Nylon-Sieb „Cell Strainer 352350“ 70 µm	Becton Dickinson, Heidelberg
Pasteurpipetten	(Koobe, Marburg)
Petrischalen 10 cm (Zellkultur)	Becton Dickinson, Heidelberg

Material

Plastikpipetten 1 mL; 2 mL; 5 mL; 10 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Plastikpipetten 25 mL	Greiner bio-one, Frickenhausen
Reaction Tubes 0,2 ml (PCR)	BioStep GmbH, Jahnsdorf
Rundbodenplatte 96 Wells	Greiner bio-one, Frickenhausen
Spitzen 10 µL; 100 µL; 1000 µL	Greiner bio-one, Frickenhausen
Spritze „Norm-Jects“ 5 mL	Henke, Tuttlingen
Spritze „Omnifix“ 10 mL	Braun, Melsungen
Sterilfilter 0,45 µM	Sigma-Aldrich, München
Streifentubes weiß, 0,2 mL, durchsichtige Deckel (qPCR)	BioStep GmbH, Jahnsdorf
Well-Platten 6 Wells; 12 Wells; 18 Wells	Greiner bio-one, Frickenhausen
Whatman-Papier „GB003“ S	Schleicher + Schuell, Dassel
Zellkulturflaschen 25 cm ² ; 75 cm ² ; 175 cm ²	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturschaber	Greiner bio-one, Frickenhausen

2.13 Software

Programm	Firma, Firmensitz
SoftMaxPro v5	Molecular Devices, Ismaning

3 Methoden

3.1 Allgemeine molekularbiologische und proteinbiochemische Methoden

3.1.1 Genotypisierung von Mäusen

Um das Abschalten vom SIGIRR-Gen in den zu immunisierenden Mäusen zu überprüfen, war eine Genotypisierung erforderlich.

3.1.1.1 Vorbereitungen und PCR

Der erste Schritt bei der Typisierung von Mäusen war stets die Entnahme einer Gewebeprobe, entweder ein bis zu 0,5mm langes Schwanzstück oder ein max. 25 mm² großes Ohrstück. Zur Freisetzung der Nukleinsäure wurden die Proben anschließend im Proteinase-K-enthaltenden DNA-Lysis Puffer verdaut.

Arbeitsschritte:

Zugabe von 500µl DNA Lysis Puffer.

Zugabe von 5µl (10mg/ml) Proteinase K.

Inkubation bei 56°C und 350 rpm über Nacht.

15-minütige Zentrifugation bei RT und 15000 rpm.

Überführen des Überstandes zu ca. 450 µl ohne Lysatreste in ein neues tube.

DNA-Fällung mit 500 µl Iso-Propanol, Schütteln per Hand bis DNA-Faden zu sehen ist.

Aufwickeln des DNA-Fadens per sterilen Zahnstocher.

Überführung des Fadens in ein neues Tube mit 300 µl ultra-pure water.

Dreistündiges Schütteln des Tubes bei RT. Eventuell bei -20°C wegfrieren.

Methoden

Die Polymerase Chain Reaction (PCR) dient der Vervielfältigung eines genau definierten Teils eines DNA-Stranges. Zwei Primer legen auf den beiden Einzelsträngen der DNA jeweils den Startpunkt der Synthese und begrenzen damit den zu amplifizierenden Bereich beidseits. Der Prozess besteht aus 12-50 Zyklen, die in einem Thermocycler durchgeführt werden, wobei jeder Zyklus aus folgenden Schritten besteht:

- ◆ Denaturierung: Trennung der Einzelstränge durch Erhitzen auf 94°C.
- ◆ Primärhybridisierung: Anlagerung der Primer an homologe Sequenzen bei einer passend gewählten Temperatur (meist 55-65°C).
- ◆ Elongation: im Anschluss an den Primer wird durch die Polymerase ein DNA-Einzelstrang synthetisiert.

Pipettierschema für die PCR (insgesamt 30 µl):

15 µl Taq-MasterMix

11 µl dH₂O

1 µl Primer fp

1 µl Primer rp

2 µl DNA

3.1.1.2 Gelelektrophorese von DNA

Eine Elektrophorese von Nukleinsäuren im Agarosegel erlaubt deren Auftrennung und Visualisierung. Die Konzentration der Agarose im zu lösenden TAE-Puffer (1x) wird in Abhängigkeit von der Größe der zu bestimmenden DNA-Fragmente gewählt. Eine vollständige Lösung der Agarose wird durch Kochen des Agarose-TAE-Gemisches erreicht. Die abgekühlte Lösung wird in die Gelkammer gegossen, aushärten gelassen und mit DNA und Marker beladen. Die negativ geladenen DNA-Fragmente wandern in Abhängigkeit von ihrer Größe unterschiedlich schnell zum Pluspol. So entstehen DNA-Banden, die durch die Inkubation des Gels in einem Ethidiumbromid(EtBr)-Bad gefärbt werden. Zum Schluss erfolgt die Detektion der Banden unter UV-Licht, da EtBr ein interkalierender Farbstoff ist, der unter UV-Licht fluoresziert.

Methoden

In dieser Arbeit wurden PCR-Produkte zur Auftrennung auf ein 1,8%-iges Agarosegel aufgetragen. Die anschließende Elektrophorese erfolgte bei 97 V.

Ansatz von TAE-Puffer (Tris EDTA Actetat) pH-Wert: 8,0; Konzentrierung: 50-fach; Menge: 1l

Tris 242,2 g/l

EDTA 37,2 g/l

Herstellung: Substanzen einwiegen mit demin. Wasser auf 500 ml auffüllen, mit konzentrierter Essigsäure auf pH 8,0 einstellen, dann mit demin. Wasser bis auf 1000 ml auffüllen.

Anwendung: zum Gebrauch 1 Teil Puffer mit 49 Teilen demin. Wasser verdünnen.

Lauf- und Gelpuffer der Agarosegelelektrophorese.

EDTA hemmt Nukleasen.

Modifiziert nach: www.nugi-zentrum.de

3.1.2 Herstellung rekombinanter Proteine

3.1.2.1 Transformation von kompetenten Bakterien

Kompetente Bakterien können fremde DNA z.B. mittels eines Vektors aufnehmen, ins eigene Genom integrieren und exprimieren. Zur Expression von SIGIRR als GST-Fusionsprotein (Glutathion-S-Transferase) wurde in dieser Arbeit die Gensequenz für die extrazelluläre Ig-Domäne des SIGIRR-Proteins in einen bereits verfügbaren pGEX-Vektor kloniert (**Abb. 5**). Die Fremd-DNA sollte innerhalb des Multiple Cloning Site (MCS) eingebaut werden. Anschließend konnte dank des vorhandenen Lac-Promotors die Proteinexpression durch IPTG-Zugabe reguliert werden. Das Ampicillin-Resistenzgen sicherte die exklusive Expression vom GST-SIGIRR-Protein im Ampicillin-haltigen Medium. Durch den GST-Tag konnte das Fusionsprotein letztlich in der Affinitätschromatografie durch hochaffine Bindung an eine Glutathion-haltige Matrix aufgereinigt werden.

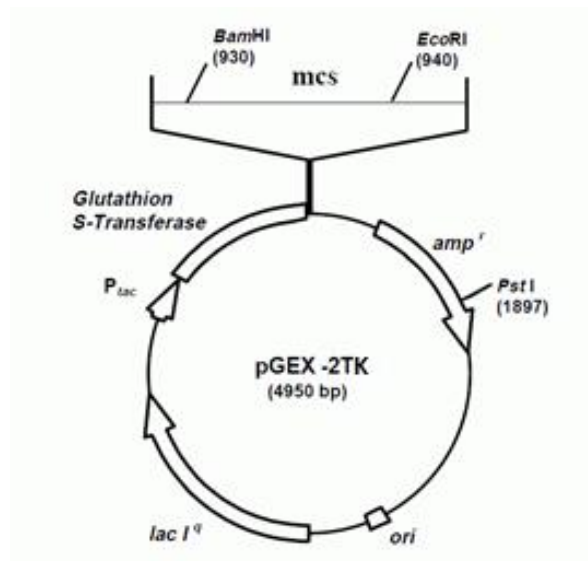


Abb. 5 Schematische Übersicht des pGEX-2TK-Expressionsvektors (im Vorfeld dieser Arbeit bereits vorliegend). (Modifiziert nach: <http://bieson.ub.uni-bielefeld.de/volltexte/2004/462/pdf/0040.pdf>)

Da bei den verwendeten E.coli-Bakterien keine natürliche Kompetenz zur Aufnahme fremder DNA besteht, wurde die Zellmembran vorbereitend auf die Transformation mit einem Hitzeschock permeabilisiert.

Arbeitsschritte:

Auftauen von E.-Coli- Bakterien aus 80°C auf Eis.

Mischen von 100 µl der Bakteriensuspension und 50 ng Vektor-DNA in ein Eppendorf-Gefäß.

30-minütige Inkubation auf Eis (zwischendurch vorsichtig schwenken).

Hitzeschock bei 42°C Wasserbad für 20 Sekunden.

Zugabe von 0,9 ml vorgeheiztem SOC-Medium.

Einstündige Inkubation bei 37°C und 225 rpm.

Ausplattieren der Zellen auf LB-Amp.-platten (jeweils 100 µl einer 1:1,

Methoden

1:10 und 1:100-Verdünnung).

Inkubation über Nacht bei 37°C.

3.1.2.2 Proteinsynthese, –aufschluss und -aufreinigung

◆ Vorkultur

Um eine größere Menge Nährmedium mit einer Bakterienkolonie anzukultivieren, wurde erstmal eine Vorkultur angesetzt. Mit einer Bakterienprobe oder einem einzelnen Klon aus der Agarplatte wurden 20 bis 50 ml LB-Medium angeimpft und schüttelnd bei 37°C über Nacht inkubiert.

◆ Induktion

Arbeitsschritte:

Expansion von 20 ml der Vorkultur in 1,5 l frisches LB-Medium (2 bis 4 Stunden bei 37°C).

Induktion durch IPTG-Zugabe (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid), 1:1000.

Mitführen einer positiven und einer negativen Induktionskontrolle.

4- bis 5-stündiges Schütteln bei 18°C im Wasserbad.

Überführung des Nährmediums in Zentrifugationsgefäße (Ernte).

10-minütige Zentrifugation bei 4°C, 8500 rpm.

Eventuelle Aufbewahrung des entstandenen Pellets über Nacht bei -20°C.

◆ Proteinaufschluss durch Lyse

Aufnahme der Pellets in 12 ml ultrafiltriertes PBS mit Protease-Inhibitor (1 Tablette in 10 ml PBS_{def.}).

Verteilen der Zellsuspension auf Eppendorf-Gefäße à 1,5 ml pro Gefäß. Von nun an alle Schritte auf Eis durchführen.

Methoden

Ultraschall-Behandlung: pro Gefäß 3 Zyklen à 15 Sekunden, Intensität 70%, Stufe 7.

Überführung der Lysate in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße.

10-minütige Zentrifugation bei 4°C, 18000 rpm.

Abnahme und Pooling der Überstände.

◆ Aufreinigung durch Affinitätschromatografie

Ultrafiltration benötigter Lösungen; Porengröße des Filters: 0,2 µm.

Einschalten von Pumpe und Schreiber, luftfreies Einbringen einer GST-Säule.

Equilibrierung der GST-Säule durch Durchspülung mit 10 ml PBS (Pumpeneinstellung: 2x10).

45-minütige Inkubation des Lysats mit 10 mM ATP (pH 7,5) und 10 mM MgSO₄ bzw. MgCl bei RT.

Auftragen des Lysates auf die Säule (Pumpeneinstellung: 2x1).

Waschen der Säule durch Durchspülung mit ca. 15 ml PBS (bis Baseline vom Schreiber erreicht).

Eluierung mit 20 mM TrisHCl (pH 8,5) + 50 mM Glutathion, Auffangen der durchfließenden Fraktion (Flußrate: 2x10).

Lagerung des Eluats bei 4°C.

Waschen der Säule mit PBS bis zur Baseline (ca. 15 ml, Flußrate: 2x10).

Spülen der Säule mit 20 % Ethanol (ca. 15 ml, Flußrate: 2x10).

Ausbau der Säule.

Dialyse mit SLIDE-A-LYZER®-Dialyse-Kassetten nach Hersteller-Anleitung.

Konzentrierung mit Amicon®-Röhrchen nach Hersteller-Anleitung.

3.1.3 Qualitativer und quantitativer Proteinnachweis

3.1.3.1 Coomassie-Färbung von Protein-Gelen

Coomassie-Brillant-Blau kann zum unspezifischen Anfärben von Proteinen verwendet werden, z.B. nach Auftrennung in einem Polyacrylamid-Gel. Dazu wird das Gel in einer Färbelösung inkubiert, die den Farbstoff in verdünnter Acetoacetat-/Ethanol-Lösung oder in der Fixierungslösung enthält. Überschüssige Farbe lässt sich in 10 % Methanol auswaschen, bis der Hintergrund klar ist. Die Zusammensetzung von Färbe- und Entfärbelösung wird im Abschnitt 3.3.2.2. erläutert.

3.1.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford (BCA)

Durch Komplexbildung mit Proteinen wird der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 in seiner anionischen Sulfonatform stabilisiert. Infolgedessen kann eine Absorptionzunahme gemessen werden. Diese dient als Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Der auf diesem Prinzip basierende BCA-Kit der Firma Pierce wurde nach Anleitung verwendet.

3.2 Herstellung von monoklonalen Antikörpern

3.2.1 Immunisierung

3.2.1.1 Antigenvorbereitung

Um Sigirr^{-/-}-Mäuse zur Antikörperbildung gegen das SIGIRR-Molekül zu stimulieren, wurden in dieser Arbeit Zellsuspensionen aus SIGIRR-exprimierenden Geweben von Balb/c-Mäusen (Wildtyp) verwendet. Letztere wurden durch zervikale Dislokation getötet, auf einem Präparationsbrett fixiert, und mit Ethanol (70%) desinfiziert. Das Präparationsbesteck wurde in Ethanol (70%) bereitgestellt. Medium (RPMI 1640 ohne Serumzusatz) und Proben kamen auf Eis und wurden steril behandelt. Die Bauchdecke der Maus wurde zur Entnahme beider Nieren und der Milz eröffnet. Diese SIGIRR-exprimierenden Gewebe wurden anschließend getrennt präpariert.

Methoden

◆ Präparation der Milz

Entfernung des anhängenden Fettes, anhängender Ligamente und Leitgefäße.

Aufnahme in 3 ml RPMI 1640 Medium in einer 10 ml Petrischale.

Vollständige Durchspülung mit Medium unter der Sterilbank (Stufe II) mit einer 26 G Injektionsnadel.

Zerreiben des Gewebes durch einen Cell Strainer (mechanische Homogenisierung).

Überführung der gewonnenen Zellsuspension in ein 15 ml-Röhrchen.

Zentrifugation bei 1300 rpm (265 g), 4°C, für 6 min.

Resuspendierung des entstandenen Pellets in 7 ml „Red Blood Cell Lysis Buffer“ zur Eliminierung von Erythrozyten.

10-minütige Inkubation bei RT.

Stoppen der Lyse durch Zugabe von 5 ml Medium.

Erneute Zentrifugation bei 1300 rpm (265 g), 4°C, für 6 min.

Aufnahme und Resuspendierung des Pellets in 0,2 ml Medium.

Zugabe von 10 µl CpG-ODN-Lösung (500 µM) als Adjuvans zur Verstärkung und Verlängerung der Immunantwort.

Kurze Lagerung auf Eis.

◆ Präparation der Nieren

Entfernung des anhängenden Fettes, anhängender Ligamente und Leitgefäße.

Aufnahme in 6 ml RPMI 1640 Medium in einer 10 ml Petrischale.

Zugabe von Collagenase D und DNase zur Zerstörung vom Bindegewebe.

Endkonzentrationen im Medium: 1 mg/ml Collagenase D, 50 µg/ml DNase.

Methoden

Vollständige Durchspülung mit Medium unter der Sterilbank (Stufe II) anhand einer 26 G Injektionsnadel.

Zerkleinern des Gewebes mit einem desinfizierten Skalpell.

15-minütige Inkubation bei 37°C im zur Einwirkung vom Collagenase D- und DNase-Cocktail.

Unterbrechung des Vorgangs durch Zugabe von EDTA in einer Endkonzentration von 10 mM.

Zerreiben der Nierenstücke durch einen Cell Strainer (mechanische Homogenisierung).

Überführung der gewonnenen Zellsuspension in ein 15 ml- Röhrchen.

Zentrifugation bei 1300 rpm (265 g), 4°C, für 6 min.

Resuspendierung des entstandenen Pellets in 7 ml „Red Blood Cell Lysis Buffer“ zur Eliminierung von Erythrozyten.

10-minütige Inkubation bei RT.

Stoppen der Lyse durch Zugabe von 5 ml Medium.

Erneute Zentrifugation bei 1300 rpm (265 g), 4°C, für 6 min.

Aufnahme und Resuspendierung des Pellets in 0,6 ml Medium.

Zugabe von 30 µl CpG-ODN-Lösung (500 µM) als Adjuvans zur Verstärkung und Verlängerung der Immunantwort.

Kurze Lagerung auf Eis.

3.2.1.2 Blutentnahme und –Konservierung

Zum Nachweis der Immunantwort bei den Mäusen und zum Vergleich der Antikörpertiter wurde jeder zu immunisierender Maus an drei Zeitpunkten Blut entnommen.

Kurz vor der Immunisierung wurden die Mäuse einzeln in einen Käfig gesetzt, der gleichzeitig freien Zugang zum Schwanz und Bewegungseinschränkung der Maus gewährleistete. Nach Rotlichtexposition und unter Vermeidung unnötigen Stresses, wurde

Methoden

ein oberflächlicher Schnitt in den Schwanz gesetzt. Es tropften aus jeder Maus ca. 5 Tropfen Blut im freien Fall in vorbereitete Eppendorf-Röhrchen.

Weitere Behandlung:

Zentrifugation bei 10000 rpm (14000 g), RT, für 15 min.

Überführung des Plasmas in neue Eppendorf-Röhrchen.

Lagerung bei -20 °C.

Eine erneute Blutentnahme nach demselben Schema erfolgte eine Woche nach der Zweitimmunisierung.

Eine letzte Blutentnahme wurde während der Präparation der immunisierten Mäuse durch einen Herzschnitt nach Eröffnung der thorakalen Kavität durchgeführt.

3.2.1.3 Antigen-Applikation

Um eine ausreichend starke Immunantwort zu gewährleisten, erfolgte die Immunisierung der Sigirr^{-/-}-Mäuse in drei Etappen: Primärimmunisierung, Zweitimmunisierung und finale Immunisierung.

◆ Primärimmunisierung

Sinn und Zweck dieses ersten Immunisierungsschrittes war das Hervorrufen einer starken Immunantwort gegen das fremde SIGIRR-Molekül mit Generierung von Antikörpern und Memory-Zellen im Hinblick auf eine noch stärkere Immunantwort beim erneuten Kontakt mit dem Antigen.

Zwei SIGIRR^{-/-}-Mäuse wurden mit den hergestellten antigenhaltigen Suspensionen aus Nieren- oder Milzzellen inokuliert.

Arbeitsschritte:

Blutentnahme aus dem Schwanz.

Methoden

Aufziehen von 200 μ l bzw. 300 μ l antigenhaltiger Milz- bzw. Nierenzellsuspension in einer 1 ml-Spritze mit 26 G-Kanüle.

Festhalten der zugeordneten Maus an der Rückenhaut.

Subkutane Injektion der antigenhaltigen Lösung unter die Bauchhaut.

◆ Zweitimmunisierung

Die Zweitinjektion folgte dem Ziel, den Titer und die Affinität der gebildeten Antikörper zu erhöhen. Sie erfolgte drei Wochen nach der Primärimmunisierung. Die antigenhaltigen Lösungen wurden erneut aus einer Balb/c-Maus (Wildtyp) zubereitet und den bereits immunisierten Mäusen nach demselben Schema appliziert.

Eine Woche nach dieser Zweitimmunisierung erfolgte eine zweite Blutentnahme.

◆ Finale Immunisierung

Diese letzte Immunisierung folgte dem Prinzip einer Zweitinjektion. Das Arbeitsschema wurde jedoch folgendermaßen verändert:

- Der zuvor mit der Milzzellsuspension immunisierten Maus wurden 300 μ l neu hergestellter antigenhaltiger Nierenzellsuspension mit Zugabe von 10 μ l 1668 CpG-ODN (500 μ M) appliziert.
- Die zweite Maus wurde weiterhin mit Nierenzellsuspension immunisiert, diesmal jedoch ohne CpG-ODN.

Diese Änderungen ergaben sich aus dem ELISA-Nachweis einer stärkeren Immunantwort in der letzteren Maus und im Hinblick auf die bevorstehende B-Zell-Isolierung.

3.2.2 Hybridoma-Technik

Methoden

Die von Cesar Milstein und Georges Köhler entwickelte Hybridom-Technik zur Herstellung monoklonaler Antikörper beruht auf der Fusion von Plasma- und neoplastischen Myeloma-Zellen (**Abb. 6**). Produkte dieser Fusion sind die Hybridomazellen, die in sich die Fähigkeit einer Plasmazelle zur Produktion eines spezifischen Antikörpers und die Immortalität einer Tumorzelle vereinigen.

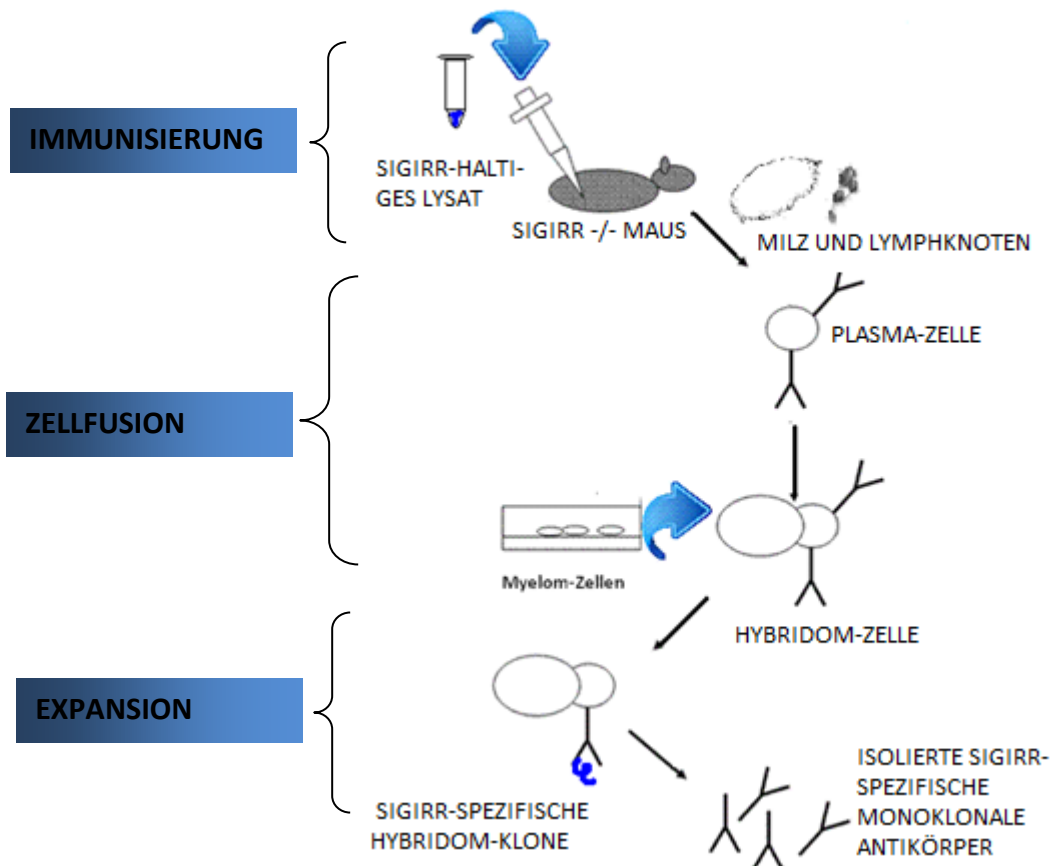


Abb. 6 Schematische Darstellung der Hybridom-Technik: Nach Immunisierung der Mäuse wurden Plasma-Zellen aus Milz und Lymphknoten isoliert und dann mit Myelom-Zellen fusioniert. Es entstanden langlebige Hybridoma-Zellklone, die dann auf die Spezifität der sezernierten Antikörper getestet wurden.

3.2.2.1 Plasmazellisolierung

Zur Isolierung von Plasmazellen aus der zuvor mit Sigirr +/-Nierenzellen immunisierten Maus, wurde letztere durch zervikale Dislokation getötet. Diese wurde ausgewählt, weil im Gegensatz zur zweiten Maus in einem ELISA aus ihrem Serum mSIGIRR-Antikörper nachgewiesen werden konnten. Ihre Milz und mesenteriale Lymphknoten wurden entnommen und präpariert. Die entstandene Zellsuspension musste letztlich von T-Zellen gereinigt werden.

◆ Präparation von Milz und Lymphknoten

Entfernung des anhängenden Fettes, anhängender Ligamente und Leitgefäße.

Aufnahme in 3 ml RPMI 1640 Medium in einer 10 ml Petrischale.

Vollständige Durchspülung mit Medium unter der Sterilbank (Stufe II) mit einer 26 G Injektionsnadel.

Zerreiben des Gewebes durch einen Cell Strainer (mechanische Homogenisierung).

Überführung der gewonnenen Zellsuspension in ein 15 ml- Röhrchen.

Zentrifugation bei 1300 rpm (265 g), 4°C, für 6 min.

Resuspendierung des entstandenen Pellets in 4 ml „Red Blood Cell Lysis Buffer“ zur Eliminierung von Erythrozyten.

10-minütige Inkubation bei RT.

Beenden der Lyse durch Zugabe von 5 ml Medium.

Erneute Zentrifugation bei 1300 rpm (265 g), 4°C, für 6 min.

Aufnahme und Resuspendierung des Pellets in MACS-Puffer (2 mM EDTA + 3% FCS in PBS ohne Ca^{2+} / Mg^{2+}).

Zweimaliges Waschen mit MACS-Puffer (in 15 ml und Zentrifugation bei 1300 rpm bzw. 265 g, 4°C, für 6 min. Dekantieren des Überstands).

Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Kammer.

Teilweises Einfrieren der Zellsuspension im Stickstoff (Einfriermedium = 10% DMSO + 90% FCS).

Methoden

Aufnahme von 50×10^6 Zellen in 450 μl MACS-Puffer + 100 μl anti Thy1.2 Beads zur Separation von T-Zellen.

Lagerung auf Eis für 30-60 Sekunden.

◆ Magnetische T-Zellseparation (MACS)

Die *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS) beruht auf dem Prinzip, dass mit antikörperbedeckten Eisenpartikeln eine bestimmte Zellfraktion beim Durchfluss einer Zellsuspension in einem Magnetfeld zurückgehalten werden kann (**Abb. 7**).



Abb. 7 Das Prinzip des "Magnetic Activated Cell Sorting" (MACS). (Modifiziert nach http://www.miltenyibiotec.com/en/NN_736_MACS_Cell_Separation_the_principle_1.aspx)

Arbeitsschritte:

Vorkühlung der Zellen und der benötigten Lösungen auf Eis zur Vermeidung unspezifischer Bindungen von den verwendeten Antikörpern.

Präfiltrierung der Zellsuspension zu einer Einzelzellsuspension durch ein mit Puffer vorgewaschtes Pre-Separations-Filter mit einer Porengröße von 30 μm .

Zellzählung in der Neubauer-Kammer.

Methoden

Zentrifugation bei 300 g, 4°C, für 10 min. Absaugen des Überstands.

Resuspendierung des Pellets in 90 µl MACS-Puffer je 10×10^6 Zellen.

Zugabe von 20 µl Thy1.2 Microbeads je 10×10^6 Zellen.

Mischen und 10-minütige Inkubation im Kühlschrank (bei 2-8 °C).

Waschen der Zellen in 1-2 ml Puffer je 10×10^6 Zellen, Zentrifugation bei 300 g für 10 min, Verwerfen des Überstandes.

Resuspension von bis zu 100×10^6 Zellen in 500 µl Puffer.

Installation einer LD-Säule im magnetischen Feld eines MACS-Separators.

Vorbereitendes Spülen der Säule mit 2 ml MACS-Puffer.

Zugabe der Zellsuspension in die Säule.

Sammeln der durchfließenden Suspension (Negativfraktion) aus nichtmarkierten Zellen (überwiegend B-Zellen) und zweimaliges Waschen mit 1 ml MACS-Puffer.

Zellzahlbestimmung.

Sammeln der Positivfraktion (T-Zellen) nach Magnetfeldabschaltung durch Spülen der Säule.

3.2.2.2 Fusion von Plasma- und Myeloma-Zellen

- ◆ Aufarbeitung der Myeloma-Zellen

Parallel zur Milzpräparation, Ernte von Ag 8 P3X-Zellen (Myelom-Zellen) aus den Kulturflaschen unter der Sterilbank.

Zentrifugation bei 1300 rpm (265 g), 4°C, für 5 min.

Resuspension und 3 Waschgänge durch Zentrifugation bei 1300 rpm (265 g), 4°C, für 5 min (in RPMI 1640, serumfrei).

Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Kammer.

Methoden

◆ Eigentliche Fusion

Mischen von Myeloma- und Plasma-Zellen im Verhältnis 2:1 im Glasröhrchen unter der Sterilbank: 22×10^6 Myeloma-Zellen für 11×10^6 B-Zellen.

Zentrifugation bei 1300 rpm (265 g), 4°C, 5 min.

Entfernen des Mediums.

Inkubation auf 37°C, auch von PEG und RPMI-Medium.

Eine Minute lang tropfenweise 1 ml PEG zugeben, dabei das Röhrchen ständig drehen.

1-minütiges Drehen.

Zugabe von 2 ml RPMI in 1 Minute. Röhrchen ständig drehen, auch bei den nächsten Schritten.

4 ml RPMI in 1 Minute zugeben.

8 ml RPMI in 1 Minute zugeben.

Zentrifugation bei 1400 rpm (307 g), RT, 10 min.

Vorsichtige Resuspension des Pellets in 40 ml RPMI mit HAT, 10% FCS, ME, Glutamin.

Vorsichtiges Tropfen von je ca. 100 µl (2 Tropfen) Zellsuspension pro Well einer 96-Well-Flachbodenplatte zur Vereinzelung der fusionierten Zellen.

Auf diese Art und Weise wurden die Fusionsprodukte durch „limiting dilution“ subkloniert, das heißt so vereinzelt, dass ein Well der Flachbodenplatte statistisch gesehen weniger als eine Zelle enthielt. Diese einzelnen Zellen unterlagen einem durch das Kulturmedium bedingten Selektionsprozess.

3.2.2.3 Selektion von Hybridoma-Zellen

Die Selektion von Hybridoma-Zellen aus dem Gemisch aus Plasmazell/Myeloma-, Plasmazell/Plasmazell-, Myeloma/Myeloma-Hybriden und nicht fusionierten Zellen erfolgte

durch den im Kulturmedium enthaltenen HAT-Zusatz (Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin). In letzterem können nur Hybridoma-Zellen überleben, da diese sowohl das von Plasmazellen stammende Enzym HGPRT, als auch die Eigenschaften „Kultivierbarkeit“ und „Unsterblichkeit“ von den Tumorzellen aufweisen. Das Enzym HGPRT ist für die notwendige GTP-Synthese aus dem zugesetzten Hypoxanthin über einen alternativen Syntheseweg erforderlich, da die normale de-novo- GTP/TTP-Synthese durch das Aminopterin inhibiert ist. TTP wird aus dem zugesetzten Thymidin synthetisiert.

3.3 Konservierung und Charakterisierung von einzelnen Plasmazell-Klonen

3.3.1 Konservierung

3.3.1.1 Zellkulturbedingungen

Die nach der Fusion vereinzelt, überlebensfähigen Zellen wuchsen zu Klonen unter folgenden Kulturbedingungen heran:

Kulturmedium: RPMI mit HAT + 10 % FCS + 0,1% ME + 1 % Glutamin + 1 % P/S + 0,5 % HFCS.

Inkubation für mehrere Tage bei 37°C, 7,5% CO₂.

Das dem Medium zugesetzte HFCS (*Hybridoma Fusion and Cloning Supplement*) diente der Erhöhung der Klonierungseffizienz durch diverse enthaltene Faktoren.

Die Wachstumskontrolle erfolgte erstens makroskopisch über den Farbumschlag vom Medium (Anzeichen für starkes Wachstum, Signal für einen erforderlichen Mediumwechsel) und zweitens unter mikroskopischer Beobachtung.

Methoden

Die Überstände von den mikroskopisch detektierten, gut wachsenden Klone wurden für eine anschließende Testung im ELISA aufbewahrt (jeweils ca. 100 µL bei -20°C). Diese Klone wurden unter mikroskopischer Beobachtung nach folgendem Schema expandiert:

Tab. 2: Expansionsschema für einzelne Klone.

	Kulturbehälter	Wachstumsfläche in cm ²	Mediumvolumen in ml
1. Stufe	96-Wellplatte	0,32	0,1
2. Stufe	24-Wellplatte	1,9	1
3. Stufe	6-Wellplatte oder kleine Kulturflasche	9,6/25	5
4. Stufe	10 cm Petrischale	78,5	10
5. Stufe	Große Kulturflasche	175	20

Nachdem die getesteten Klone die 3. Stufe der Expansion erreicht hatten, erfolgte die erste Kryokonservierung. Parallel dazu wurden zwei aufgrund besonders guter mSIGIRR-Sensitivität und Spezifität im ELISA ausgewählte Klone erneut über das „limiting dilution“-Prinzip subkloniert. Die entstandenen Subklone wurden ebenfalls getestet und expandiert.

Auf der dritten Expansionsstufe erfolgte auch die Entwöhnung vom HFCS-Zusatz. Dazu wurde bei der Erneuerung des Mediums nach Farbumschlag der Zusatz weggelassen. Aufgrund der dadurch bedingten vorübergehend erhöhten Sterberate der Zellen, musste der Mediumwechsel häufiger geschehen.

Nach der Entwöhnung vom HFCS-Zusatz wurden die weiterhin im ELISA mSIGIRR-sensitive und spezifische Klone und Subklone weiter expandiert (4. Stufe) und fortwährend kryokonserviert.

3.3.1.2 Kryokonservierung der Hybridomazell-Klonen

Da sich die Antikörper-Spezifität von den Hybridomazellklonen, während der Wachstumsphasen, verändern oder driften kann, wurden die Zelllinien so früh wie möglich eingefroren. In flüssigem Stickstoff (ca. -180°C) können Zellen über Jahre gelagert werden, lassen sich aber immer wieder kultivieren. Ein spezielles Einfriermedium (90% FCS, 10% DMSO) verhindert die Zerstörung der Zellen durch Eiskristallbildung.

Zellen aus einem konfluenten Zellrasen ergaben bei einer kleinen KF ca. 1, bei einer 10 cm-Petrischale ca. 2, bei einer mittleren KF ca. 4 Kryoröhrchen à 1 ml Einfriermedium.

Arbeitsschritte:

Vorkühlung auf Eis : Einfriermedium und (beschriftete) Kryoröhrchen.

Vorsichtiges Resuspendieren der Zellsuspension mit 10 ml-Pipette bis zur Generierung einer Einzelzellsuspension.

Einfüllen in 15 ml/50 ml Röhrchen.

Zentrifugation bei 1300 rpm (265 g), 4°C , für 3 min

Aufnahme des Zellpellets in 1 ml Einfriermedium / Anzahl der Kryoröhrchen

Schnelle Resuspendierung im Einfriermedium und schnelles Einfüllen der Kryoröhrchen, da DMSO bei steigenden Temperaturen toxisch für die Zellen ist!

Kryoröhrchen sofort wieder auf Eis und in einem Isopropanol-Container bei -80°C mindestens 16 – 24 h einfrieren, um sie dann in flüssigem Stickstoff einzulagern (Sicherheitshinweise beachten).

Um gelagerte Zellen aus dem flüssigen Stickstoff wieder aufzutauen, wurden die Kryoröhrchen den Tanks entnommen, und schnell bei 37°C (Wasserbad) angetaut, in 10 ml Medium gewaschen (Zentrifugation bei 1300 rpm bzw. 265 g, 4°C , für 6 min) und in 10 ml

Methoden

Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in eine $\varnothing 10$ cm-Petrischale ausgesät und wie oben beschrieben kultiviert.

3.3.1.3 Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Kammer

Deckglas in die Mitte der Neubauer-Kammer platzieren, so dass „Newton’sche Ringe“ erscheinen (anhauchen).

Zellen in Einzelzellsuspension bringen.

Ca. 50 μ L Zellen 1:2 mit Eosin-Lösung verdünnen.

Ca. 10 μ L der Mischung durch Kapillarsog unter das Deckglas ziehen lassen.

Zählkammer sofort unter das Mikroskop legen (10 \times Objektiv; 100 \times Gesamtvergrößerung) legen, und die lebenden Zellen der äußeren 4 Eckquadrate (grau) zählen. Tote Zellen erscheinen durch Eosin (eindiffundiert) rosa.

3.3.1.4 Konservierung der Überstände

Die Antikörperhaltigen Zellkultur-Überstände wurden bei jedem Farbumschlag mit der Pipette fast vollständig abgesaugt und in Plastikröhrchen bei 4 °C getrennt aufbewahrt. Bei der Austestung im ELISA und im Western-Blot wurde jedes Reservoir steril behandelt.

Zur langfristigen Konservierung der gewonnenen Überstände, wurden sie mit 0,1 % Natriumazid versetzt. Eine solche Behandlung verhindert mikrobielles Wachstum in Proteinlösungen. Eine vorsichtige Handhabung ist erforderlich, da Natriumazid stark ätzend ist.

3.3.2 Charakterisierung monoklonaler Antikörper

3.3.2.1 Anwendung der Antikörper im Enzyme-linked Immunosorbent-Assay (ELISA)

Das Prinzip des ELISAs basiert auf der Antigen-Antikörper-Reaktion und auf der Marker-Funktion eines geeigneten Enzyms. Wie der Name besagt, eine Komponente – Antigen oder Antikörper – ist nach dem ersten Schritt an einer festen Phase adsorbiert (Coating). Hiernach erfolgt die spezifische Antigen-Antikörperbindung (Capture), wobei der Antikörper mit seinem Paratop das entsprechende Epitop des Antigens erkennt. Dann wird ein Enzym-markierter Detektions-Antikörper hinzugegeben, der ein anderes Epitop als der Capture-Antikörper erkennt. Das Marker-Enzym setzt schließlich ein zugegebenes Substrat um und ruft so einen Farbumschlag hervor (**Abb. 8**).

Arbeitsschritte:

Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurde immer ein maschineller Waschschrift mit Hilfe des Waschpuffers und des ELISA-Washers durchgeführt.

„**Coating**“: Verdünnung von den Gst (Kontrolle) und Gst-SIGIRR-Stocklösungen in PBS^{def.} zu einer Endkonzentration von 1 µg/mL ^{(1)-> Seite 52}.

Pipettieren von 50 µL pro Well in eine 96-Wellplatte (NUNC MaxiSorb).

Inkubation über Nacht bei 4°C ^{(2)-> Seite 52}.

„**Blocken**“: Ausklopfen der nicht-adsorbierten Anteile aus den Wells.

Pipetieren von 250 µL Blockpuffer pro Well.

Einstündige Inkubation bei RT.

Inkubation mit der Probe: Zugabe von 50 µL pro Well vom 1:1000 – verdünnten Antiserum bzw. vom unverdünnten Hybridoma-Überstand, jeweils in Doppelbestimmung.

Methoden

Einstündige Inkubation bei RT.

„**Detection**“: HRP-conjugated goat anti-mouse IgG 1: 5000 in Blockpuffer verdünnen.

Einstündige Inkubation bei RT.

Farbreaktion: 1 OPD-Tablette 20 mg in 20 mL Substratpuffer verdünnen, 20 μL H_2O_2 zugeben.

50 μL Substratlösung pro Well pipettieren.

Inkubation bei RT, im Dunkeln bis zum Farbumschlag. Höchstens 30 min.

Stoppen: 25 μL 2N H_2SO_4 pro Well hinzupipettieren.

Messung im Plattenphotometer bei 490 nm.

Auswertung der Daten mit SoftMax V5

Graphische Darstellung mit Powerpoint/Excel

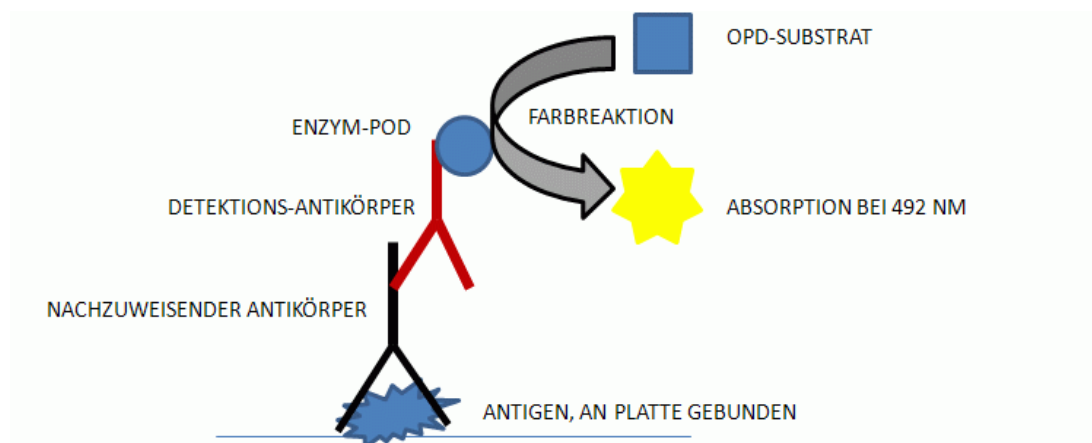


Abb. 8 Prinzip des indirekten ELISAs zum Nachweis von Antikörpern

(1) Im Rahmen der Austestung von Antisera wurde ausnahmsweise eine Gst-SIGIRR-Konzentration von 200 ng/mL angewendet.

(2) Die Inkubation über Nacht erfolgte in einem Kühlraum; die NUNC-MaxiSorb-Platten wurden übereinander gestapelt, die oberste Platte war mit einer Plastikfolie bedeckt.

Methoden

Tab. 3: Ansätze von Puffern und Proben für den ELISA.

Arbeitsschritt	Puffer und Proben	Lösungsmittel
Coating	Gst (Kontrolle) 1 µg/mL	PBS ^{def.}
Coating	Gst-Sigirr(Antigen) 1 µg/mL	PBS ^{def.}
Waschen	0,05% Tween 20 (Waschpuffer)	PBS ^{def.}
Blocken	8 Blockpuffer im Vergleich:	
	1% BSA in PBST	0,05% Tween 20 in PBS ^{def.}
	1:10 Rotiblock in H ₂ O	H ₂ O
	10% AB-Serum in PBST	0,05% Tween 20 in PBS ^{def.}
	8% Pepton aus Casein in PBST	0,05% Tween 20 in PBS ^{def.}
	5% Milchpulver in PBST	0,05% Tween 20 in PBS ^{def.}
	1% Milchpulver in PBST	0,05% Tween 20 in PBS ^{def.}
	1% Lysozym in PBST	0,05% Tween 20 in PBS ^{def.}
Komplexierung	5% Sucrose 0,2% Casein in PBST	0,05% Tween 20 in PBS ^{def.}
	Abwechselnd:	
	1:1000 Antiserum oder Unverdünnte Hybridoma-ÜS	PBS ^{def.} -
Detection	Wahlweise:	
	Biotinylated goat anti-mouse-AK ⁽¹⁾ , 1:50000	0,05% Tween 20 in PBS ^{def.}
	HRP-conjugated goat anti-mouse-AK, 1:5000	0,05% Tween 20 in PBS ^{def.}
Farbreaktion	20 mg OPD + 20 µl H ₂ O ₂ 30% Lösung	20 mL Substratpuffer
Farbreaktion	Substratpuffer [7,3g Zitronensäure x H ₂ O (C ₆ H ₈ O ₇), 11,87 g Di-Natriumhy-	ad 1 L H ₂ O

Methoden

drogenphosphat x 2 H₂O (Na₂HPO₄)

pH 5,0

(1) Bei Verwendung des biotinylierten Detektionsantikörpers kam ein weiterer Schritt zum oben beschriebenen Arbeitsschema hinzu: die Zugabe von 1:5000, in PBST verdünntem Streptavidin-Peroxidase-Komplex, gefolgt von einer 30-minütiger Inkubation bei RT.

3.3.2.2 Anwendung der Antikörper im Western-Blot

Der Western-Blot dient dem qualitativen und/oder quantitativen Nachweis eines spezifischen Proteins innerhalb eines Proteingemisches. Wie aus dem englischen Wort „blot“ hervorgeht, wird die verwendete Probe nach elektrophoretischer Auftrennung auf einer Membran fixiert, meistens elektrophoretisch. Anschließend erfolgt die Detektion des Zielproteins mittels spezifischer Antikörper. Die Visualisierung kann dann direkt (Radioaktivität oder Fluoreszenz) oder indirekt (Enzymmarkierung) erfolgen.

Die Western-Blot-Techniken lassen sich folgendermaßen unterteilen:

- Nach der Auftrennungsmethode vom Proteingemisch. Bei der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese werden die Proben denaturiert und durch den Sammeleffekt vom oberen Gel fokussiert. Bei der nativen Gelelektrophorese ist hingegen eine isoelektrische Fokussierung erforderlich.
- Nach der Transfertechnik unterscheidet man den Dry-Blot von den elektrophoretischen Semi-Dry- und Wet-Blots.

Im Allgemeinen besteht ein Western-Blot-Experiment aus drei Teilen:

- Auftrennung eines Proteingemisches mittels Gelelektrophorese.
- Transfer der Proteine auf eine Membran (eigentlicher Blot).
- Proteindetektion.

Methoden

◆ Gelelektrophorese

In dieser Arbeit wurde die Auftrennung der zuvor denaturierten GST- und GST-SIGIRR-Proben mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Bei dieser Technik werden die Proteine nach Molekulargewicht aufgetrennt, indem sie in einem elektrischen Feld durch die Maschen eines dreidimensionalen Netzwerks aus Polyacrylamid wandern. Im oberen Gelanteil, dem Sammelgel, werden die Proteine zu einer scharfen Bande fokussiert, bevor sie in das eigentliche Trenngel einwandern.

Gießen des SDS-Gels:

Im Voraus wurde ein 12%iger Trenngel vorbereitet, und zwischen zwei Glasplatten in einen Plattenhalter bis zu 1 cm unterhalb des vorgesehenen Geltaschengrundes gegossen. Nach Festigung des Trenngels wurde ein ebenfalls 3%iger Sammelgel darauf gegossen. Ein oben eingeführter Plastikkamm hielt pro Gel 12 Geltaschen frei. Nach Festigung des Sammelgels wurde der Plastikkamm rausgezogen, und das Gel wurde in seiner Glashalterung in einer Gellaufkammer befestigt.

Die Gele wurden nach folgendem Rezept zubereitet:

Tab. 4: Gelzusammensetzung.

	H₂O	Puffer	Acrylamid	20%Persulfat⁽¹⁾	TEMED
Trenngel	1490 µL	1076 µL	1760 µL	7,7 µL	3 µL
	(lower gel buffer)				
Sammelgel	1350 µL	790 µL	326 µL	5,6 µL	2,3 µL
	(upper gel buffer)				

(1) Ammoniumpersulfat und TEMED werden erst kurz vor dem Gießen hinzugegeben, sie starten die Polymerisation.

Methoden

Tab. 5: Zusammensetzung der Elektrophorese-Puffer.

Puffer	Herstellung
2x Probenpuffer (SDS-Gel)	1,25 ml 1M Tris-HCl (pH 6,8), 2 ml Glyzerol, 4,6 ml 10%-iges SDS, ca. 500 µl gesättigte wässrige Bromphenollösung → ad 10 ml dd H ₂ O → vor Gebrauch 10 ml 2x PP + 1 Tbl. Proteaseinhibitor + 800 µl 2-Mercaptoethanol.
10x PBS	2 g KCl, 2 g KH ₂ PO ₄ , 80 g NaCl, 11,5 g Na ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O → ad 1 l dd H ₂ O.
Färbelösung	455 ml EtOH, 90 ml Essigsäure, 455 ml H ₂ O, 2,5 g Coomassie.
Entfärbelösung	455 ml EtOH, 90 ml Essigsäure, 455 ml H ₂ O.
Lower gel buffer (für SDS-Trenngel)	12 g Tris-Base, ca. 150 ml ddH ₂ O, 10-12 ml HCl (32%) → pH 6,8 einstellen, dann 8 ml 8%-iges SDS → ad 200 ml ddH ₂ O.
Upper gel buffer (für SDS-Sammelgel)	72,8 g Tris-Base, ca. 350 ml ddH ₂ O, 12-13 ml HCl (32%) → pH 8,8 einstellen, dann 8 ml 10%-iges SDS → ad 400 ml ddH ₂ O.
Gellaufpuffer	3,04 g Tris-Base, 14,42 g Glycin, 10 ml 10%-ige SDS-Lösung → ad 1 l ddH ₂ O.
Blotting buffer	6 g Tris, 28,67 g Glycin → ad 1600 ml ddH ₂ O → kurz vor Gebrauch + 400 ml Methanol.

Weitere Arbeitsschritte:

Auftragen von 5 µL Marker Dual Color bzw. 20 µL fertige Probe/Kontrolle pro Geltasche.

Befüllen der Gelkammer mit Laufpuffer.

Methoden

Anschluss an ein Spannungsgerät (Stromintensität bei ca. 20 mA).

Auftrennung für ca. 2 h, bis unterste Bande 0,5 cm vom unteren Gelrand liegt.

Auf das fertige Gel wurden 15 µL Probe und 5 µL Protein Marker Dual Color

aufgetragen, die Gelkammer mit Laufpuffer befüllt, an ein Spannungsgerät

angeschlossen und die Proben bei 120 Volt für 1 h 30 min aufgetrennt.

- ◆ Transfer der Proteine auf eine Membran (eigentlicher Blot).

In dieser Arbeit kam das Semi-Dry-Blot-Verfahren zur Anwendung. Letzteres folgt demselben Prinzip wie das schonendere Wet-Blot-Verfahren, benötigt jedoch weniger Puffer und gelingt schneller.

Mit Hilfe des Semi-Dry-Blots wurden im Gel enthaltene Proteinbanden elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran übertragen.

Prozedere:

Einweichen von Schwämmen und Whatman-Filter in einer mit Transferpuffer gefüllten Schüssel.

Durchtränken der zurechtgeschnittenen PVDF-Membran mit Methanol. (15sec.)

Anschließend ebenfalls im Transferpuffer einweichen.

Vorsichtiges Rausnehmen des Gels aus der Halterung. Im Transferpuffer nass halten.

Aufbau des Blot-Sandwichs vom Xcell II Blot Module (auf Luftblasenfreiheit achten und Austrocknung der Lagen verhindern): Von der Anode auf die Kathode zu, werden folgende Elemente gestapelt: 3 feuchte Schwämme → 1 Whatman → Gel (auf Ausrichtung achten) → Membran → 1 Whatman → 2 Schwämme (**Abb. 9**).

Einführung des unter Spannung gehaltenen Sandwiches in die Transferkammer, mit zwei Keilen befestigen.

Gießen des Transferpuffers zwischen den Elektroden bis leicht über den oberen Rand des Sandwiches.

Methoden

Transferkammer an das Novex-Spannungsgerät anschließen (bei 30 mA, für 1 h 30 min).

Spannungsgerät ausschalten, Blot auseinanderbauen.

Kurzes Durchtränken der Membran mit Transferpuffer, dann 15 Sekunden mit Methanol.

Lufttrocknen der Membran auf Whatman-Filter.

Zur Kontrolle eines möglichst vollständigen Transfers färbten wir das Gel im Nachhinein mit Coomassie Brilliantblau.

◆ Proteindetektion

Zur Detektion der gewünschten Proteine auf der Membran waren drei Arbeitsschritte erforderlich:

- Die Absättigung der Membran (Blocken).
- Die Applikation geeigneter Antikörper (**Abb. 10**).
- Die Visualisierung durch Filmentwicklung.

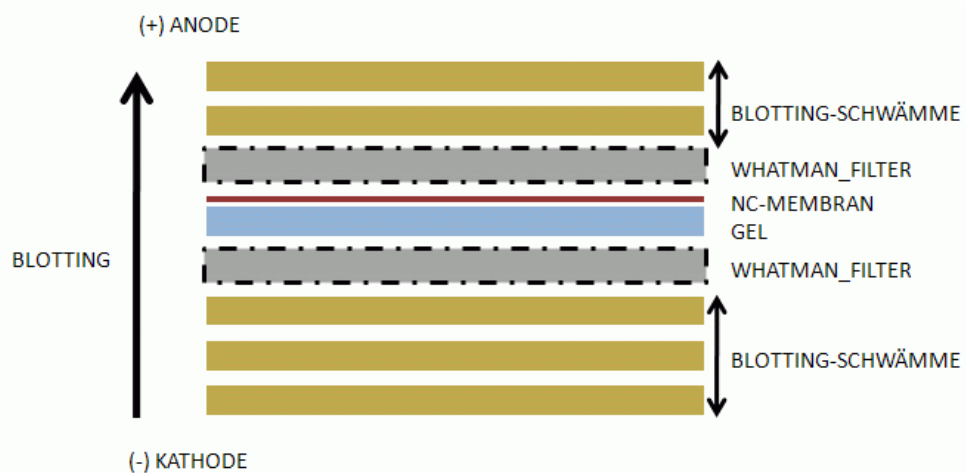


Abb. 9 Schichtung des Western Blots im Transferschritt.

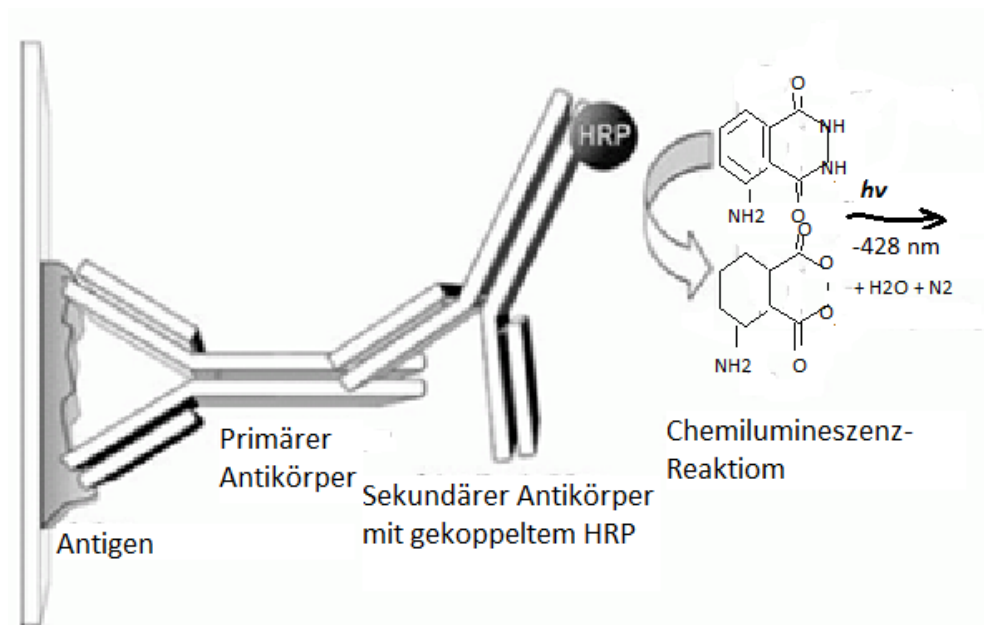


Abb. 10 Schema der Immundetektion im Western Blot. (Modifiziert nach: <http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/1503364>)

Dazu wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

Blocken der Membran über Nacht in einer zugedeckten, mit PBS+ 5% Milchpulver gefüllten Schale bei 4°C (Proteinseite nach oben).

Einstündige Inkubation bei RT in einer feuchten Kammer. Membran liegt auf einer mit Antiserumverdünnung (1:1000 im PBS+ 5% Milchpulver) bzw. mit unverdünntem Hybridoma-Überstand benetzten Glasplatte (Proteinseite nach unten).

Zweimaliges Waschen mit jeweils 10 mL TBST-Puffer in einer Schale auf dem Schüttler (10min).

Einstündige Inkubation auf dem Schüttler, bei RT, in im Milchpuffer verdünnten Detektionsantikörperlösungen.

Methoden

Variante 1: 1:50000 verdünnter „biotinylated goat anti-mouse-antibody“ (Typ IgG).

Variante 2: 1:5000 verdünnter „HRP-conjugated goat anti-mouse antibody“ (Typ IgG).

Zweimaliges Waschen wie zuvor.

Nur bei Variante 1: 30minütige Inkubation auf dem Schüttler, bei RT, in 1:5000 im Milchpuffer verdünntem Streptavidin-Peroxidase-Komplex.

Dreimaliges Waschen mit jeweils 10 mL TBST-Puffer in einer Schale auf dem Schüttler (15min).

Waschschritt wie zuvor, diesmal mit PBS mit Mg^{2+} und Ca^{2+} .

Durchtränken mit „Amersham Western blotting detection System“-Lösung nach Anleitung in einer zweiblättrigen Plastikfolie.

5minütige Inkubation im Dunkeln. Dann Flüssigkeit vorsichtig abtropfen.

Einkleben der Membran innerhalb einer durchsichtigen Plastikfolie in einer Filmkassette. Schnelles Arbeiten wegen Lichtempfindlichkeit erforderlich.

Auflegen eines Films in die Kassette für kurze Zeit (15sec bis 2min) im Entwicklerraum (Arbeit im Dunkeln).

Film in der Entwicklermaschine entwickeln. Anpassung der Kontaktzeit zwischen dem nächsten Film und der Membran je nach Ergebnis.

Tab. 6: Zusammensetzung der Detektions-Puffer.

Arbeitsschritt	Bezeichnung	Lösungsmittel
Waschen	TBST-Puffer (0,05% Tween 20)	TBS
Blocken, Lösen	Milchpulver 5%	TBST-Puffer

Methoden

3.3.2.3 Isotyp-Bestimmung der Antikörper

In diesem Experiment wurden die Immunglobulinklassen der hergestellten Antikörper mittels ELISA bestimmt. Zu diesem Zweck wurde das Antigen, Gst-SIGIRR, wie oben beschrieben in NUNC-MaxiSorb-Elisaplatten adsorbiert, um erst durch antigenspezifische Antikörper und dann durch Immunglobulinklassenspezifische Antikörper markiert zu werden. So konnte anhand der anschließenden enzymatischen Farbreaktion, auf die Klassen der Antikörper Rückschluss gezogen werden.

Arbeitsschritte:

„Coating“: Verdünnung von der Gst-SIGIRR-Stocklösung in PBSdef. zu einer Endkonzentration von 1 µg/mL.

Pipettieren von 50 µL pro Well in eine 96-Wellplatte (NUNC MaxiSorb).

Inkubation über Nacht bei 4°C.

„Blocken“: Ausklopfen der nicht-adsorbierten Anteile aus den Wells.

Pipettieren von 250 µL Blockpuffer (8% Pepton aus Casein; alternativ Sucrose-Casein-Puffer) pro Well.

Einstündige Inkubation bei RT.

Inkubation mit der Probe: Zugabe von 50 µL pro Well vom unverdünnten Hybridoma-Überstand, jeweils in Doppelbestimmung.

Einstündige Inkubation bei RT.

„Detection“: Zugabe von 50 µL pro Well vom 1:1000 im Blockpuffer verdünntem AP-markiertem Anti-mouse IgA, -IgG1, -IgG2a, -IgG2b, -IgG3 und -IgM, jeweils in Doppelbestimmung.

Einstündige Inkubation bei RT.

Farbreaktion: 1 AP-Substrat-Tablette in 5 mL Substratpuffer (citrat-haltig) verdünnen.

50 µL Substratlösung pro Well pipettieren.

Inkubation bei RT, im Dunkeln bis zum Farbumschlag. Höchstens 30 min.

Stoppen: kein Stoppen.

Methoden

Messung im Plattenphotometer bei 490 nm.

Auswertung der Daten mit SoftMax V5

Graphische Darstellung mit Powerpoint/Excel.

4 Ergebnisse

4.1 Genotypisierung der Mäuse

Die Genotypisierung der immunisierten Mäuse (Maus 1: Immunisierung mit Nierenzelllysat; Maus 2: Immunisierung mit Milzzelllysat) diente dazu, die SIGIRR-Defizienz nachzuweisen. Sie erfolgte erst nach der Immunisierung mithilfe einer Typisierungs-PCR mit anschließender Elektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung. Es wurden für jede Maus jeweils eine Wildtyp- und eine Knockout-PCR mit jeweiliger Wildtyp-Kontrolle und Kontrollen mit bekannten DNA-Proben durchgeführt.

Die nach der Genotypisierungs-PCR generierten Bilder zeigen bei der Knock-out Maus 1 das erwartete Knock-out- (**Abb. 11A**, roter Kasten) und kein Wildtyp-Signal (**Abb. 11B**, blauer Kasten). Bei der Maus 2 findet sich allerdings keine eindeutige Knock-out-Bande, jedoch auch kein Wildtyp-Signal. Dieses Ergebnis bestätigt, dass die Maus 1 homozygot SIGIRR-defizient war und lässt keine Aussage auf den Genotyp von Maus 2 zu.

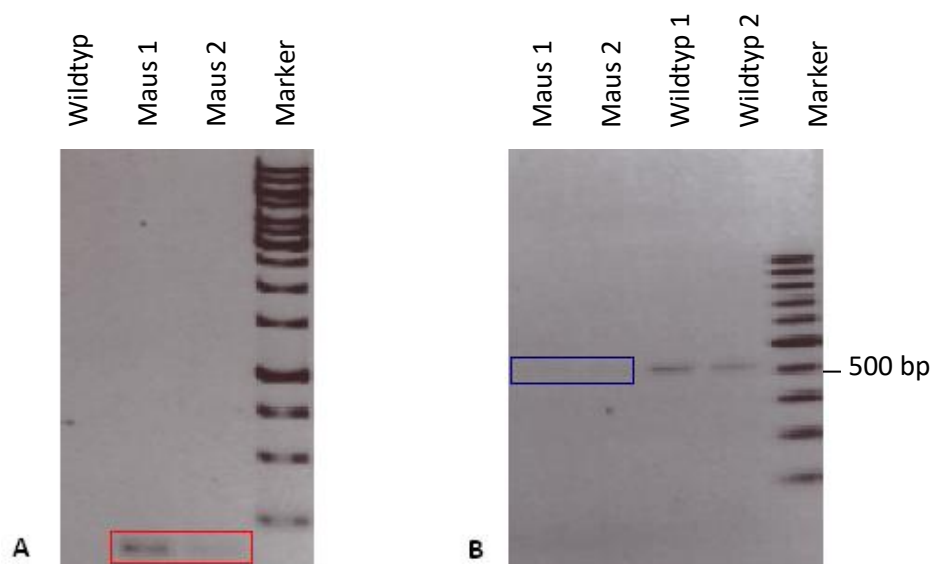


Abb. 11 Ergebnisse der Maustypisierung. A - Knock-out-PCR B - Wildtyp-PCR. Maus 1: homozygot SIGIRR-defizient. Maus 2: unbestimmter Genotyp.

4.2 GST- und GST-SIGIRR- Expression und Aufreinigung

Zwecks einer Anwendung im Western-Blot und im ELISA zur Testung von Antikörpern, wurde mSIGIRR als rekombinantes GST-Fusionsprotein hergestellt. In einem analogen Verfahren wurde ebenfalls das GST-Protein gewonnen, das als Negativkontrolle in den Anti-mSIGIRR-Antikörper-Testmethoden dienen sollte. Nach getrennter Expressierung in *E. coli* mithilfe des vor den Versuchen bereits vorliegenden pGEX-Vektors wurden GST und GST-SIGIRR affinitätschromatographisch in einem Glutathion-Sepharose-Säulen-FPLC-Verfahren aufgereinigt.

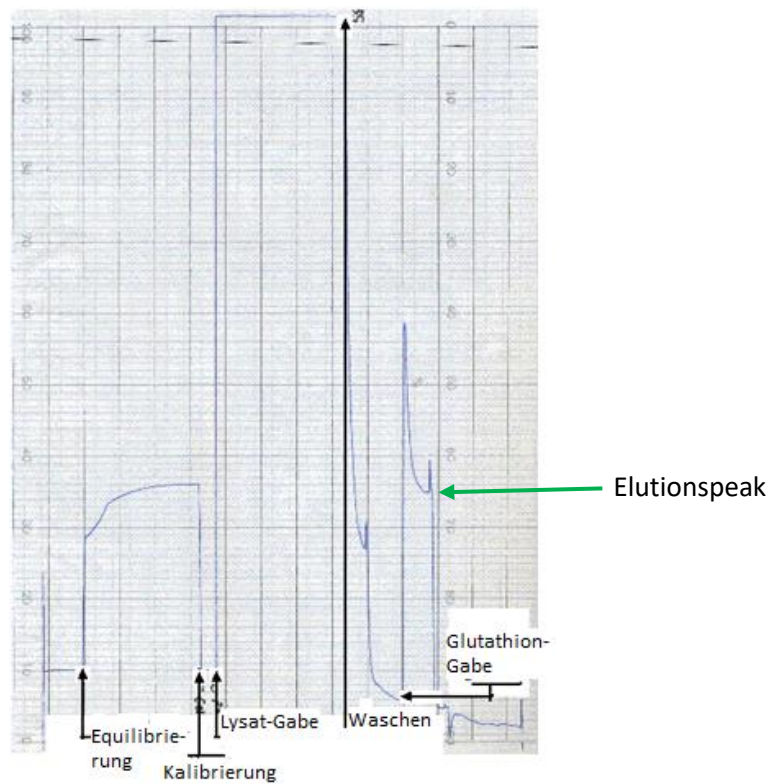


Abb. 12 Elutionsprofil der Glutathion-Sepharose-Säule-FPLC mit GST-SIGIRR.

Parallel zur GST-SIGIRR-Aufreinigung wurde ein Elutionsprofil aufgezeichnet (**Abb. 12**). Hier wird die Anreicherung vom Fusionsprotein durch den Elutionspeak (grüner Pfeil) verdeutlicht. In weiteren Versuchen wurden die gereinigten Proteine qualitativ (Coomassie-Färbung) und quantitativ (BCA-Versuch) nachgewiesen.

4.2.1 Coomassie-Färbung

Die nach Proteinaufreinigung durchgeführte Coomassie-Färbung des jeweiligen Kontrollgels zeigte deutliche GST- (**Abb. 13A**, blauer Kasten) und GST-SIGIRR-Banden bei der erwarteten Größe von 25 bzw. 37 kD (**Abb. 13B**, roter Kasten). Desweiteren war aus den ebenfalls im Gel aufgetragenen Proben von einzelnen Aufreinigungsschritten eine deutliche Anreicherung der jeweiligen Proteine zu erkennen.

Die GST-Endlösung hatte im Vergleich zur GST-SIGIRR-Lösung weniger Nebenbanden.

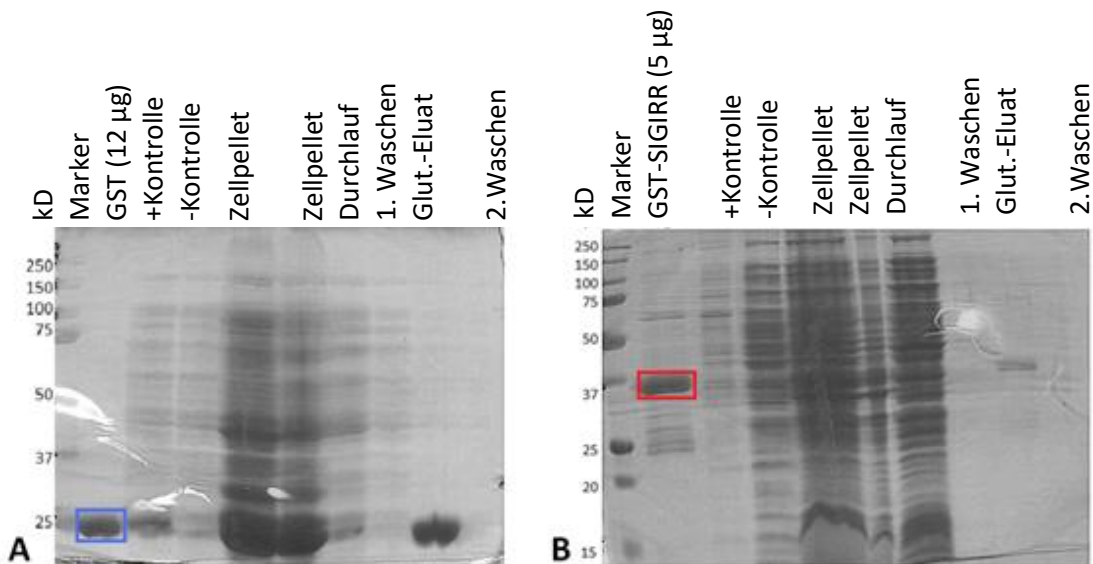


Abb. 13 Coomassie Färbung des Kontrollgels nach GST- (A) bzw. GST-SIGIRR-Aufreinigung (B). Im Gel wurden Proben der einzelnen Aufreinigungsschritte des FPLC-Verfahrens und Kontrollen aufgetragen. Glut.-Eluat= Glutathion-Eluat.

4.2.2 Quantitativer Proteinnachweis

Die Quantifizierung der hergestellten Proteine erfolgte sowohl photometrisch am Nanodrop als auch im BCA-Assay (Bicinchoninsäure). Die photometrische Messung erfolgte bei einem Absorptionsmaximum von 280 nm (**Abb. 14**) und die Ergebnisse stimmten mit der kolorimetrischen BCA-Messung überein (nicht dargestellt). Die Konzentration der GST-

Ergebnisse

Suspension betrug $12,2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ bei einer Gesamtmenge von $8,8 \text{ mg}$, während die GST-SIGIRR-Konzentration $2,9 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ bei einer Gesamtmenge von $0,73 \text{ mg}$ betrug.

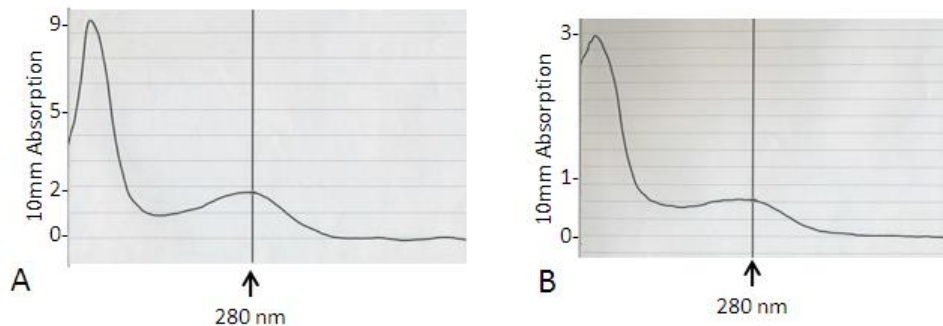


Abb. 14 Nanodrop-Kurven der photometrischen Quantifizierung der aufgereinigten Proteine. A: GST. B: GST-SIGIRR. Die gemessene Absorption bezieht sich jeweils auf $1 \mu\text{l}$ einer 1:10-Verdünnung der aufgereinigten Endlösung. Die Proteinmenge entspricht jeweils der Absorption bei 280 nm .

4.3 Charakterisierung der Antikörper im ELISA

Die Seren der SIGIRR-immunisierten Mäuse stellten in dieser Versuchsreihe die erste Antikörper(AK)-Quelle dar. Im Vorfeld der Generierung monoklonaler Antikörper, galt es zunächst, Anti-mSIGIRR-AK in den Seren per ELISA nachzuweisen.

4.3.1 ELISA-Testung der Maus-Seren

Die mit Nierenzellsuspension immunisierte Maus 1 (Serum 1) wies einen signifikanten mSIGIRR-Antikörper-Titer auf (**Abb. 15**), während die Antikörper-Detektion im Serum 2, d.h. der mit Milzzellsuspension (S-Serum) immunisierten Maus, nicht stärker war als der unspezifische Signalhintergrund. Es zeigten sich also bei der Maus 1 mSIGIRR-spezifische, und nachgewiesenermaßen durch die Immunisierung hervorgerufene Antikörper.

Ergebnisse

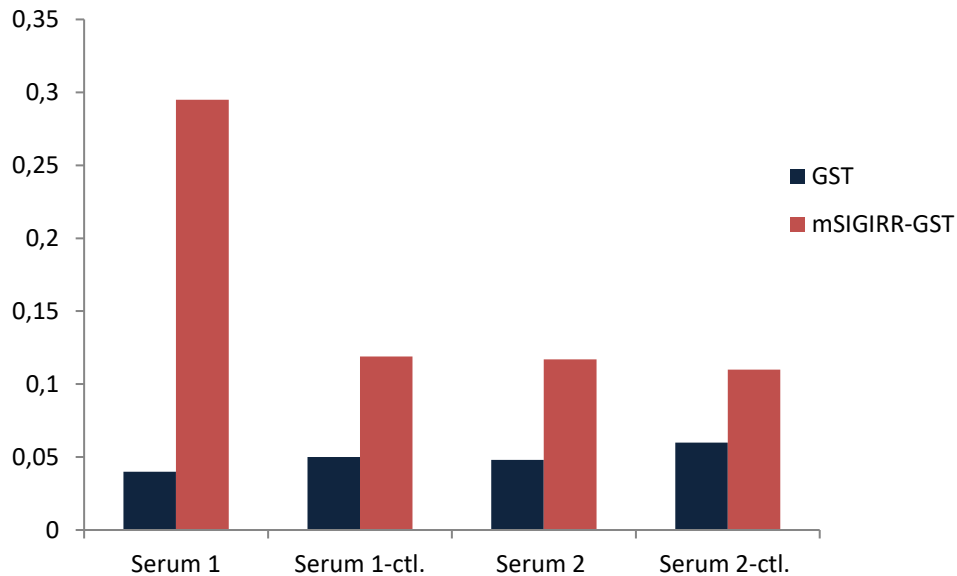


Abb. 15 Anti-GST- und -mSIGIRR-AK-Nachweis per ELISA in Maus-Seren. Serum 1 und 2: Serum der mit Nierenzellsuspension bzw. mit Milzextrakt immunisierten Maus nach der Immunisierung. Serum 1/2-ctl: Serumkontrolle der jeweiligen Maus vor der ersten Immunisierung.

4.3.2 ELISA-Testung der Anti-mSIGIRR-Klone und Subklone

Zwecks einer anschließenden Selektion wurden die durch die Hybridoma-Technik gewonnenen Zellklone je nach Wachstumsverhalten progressiv expandiert. Die Testung antikörperhaltiger Zellklon-Überstände auf Sensitivität und Spezifität erfolgte im Anti-mSIGIRR-ELISA in mehreren Durchgängen parallel zur Expansion. In ausreichender Menge verfügbare Überstände wurden mehrfach getestet. Damit wurde bezweckt, dass lediglich spezifische Antikörper mit hoher Eigenstabilität für weitere Versuche rekrutiert werden konnten.

Aus den ersten ELISA-Ergebnissen für die entwickelten Klone ging hervor, dass das Testverfahren unter Verwendung des herkömmlichen BSA-Blockpuffers die Spezifität der entsprechenden Antikörper nicht klar erkennen ließ. Der Hintergrund -gemessen am

Ergebnisse

Verhältnis zwischen Bindungsfähigkeit zu GST-SIGIRR und zur PBS-Kontrolle- war unter Verwendung des herkömmlichen BSA-Blockpuffers durchschnittlich sehr hoch. Im darauf folgenden Blockpuffer-Vergleich wurden 8 unterschiedlich zusammengestellte Blockpuffer gegenübergestellt. Die für nachfolgende Experimente entscheidende Relation zwischen Stärke des eigentlichen Antikörper-Signales und Stärke des Hintergrundsignales war bei Sucrose/Casein-, Pepton-, und AB-Serum-haltigen Lösungen am günstigsten (**Abb. 16**). Die Wiederholung des Ansatzes mit GST als Leerkontrolle bestätigte dieses Ergebnis (Daten werden nicht gezeigt).

Die gewonnenen Zellklone wiesen eine große Bandbreite von Wachstumseigenschaften, sowie Affinität, Spezifität und Eigenstabilität der entsprechenden Antikörper auf. **Abb. 17A** zeigt exemplarisch das Verhältnis von verwertbaren Klonen zum ursprünglich generierten Bestand:

- Lediglich ca. 10% aller überlebenden Klone waren reaktiv auf GST-SIGIRR.
 - o Hiervon wiesen wiederum ca. 5% eine adäquate Spezifität für GST-SIGIRR in der Gegenüberstellung mit isoliertem GST auf.
 - o Von allen reaktiven Klonen war eine gute Expansion bei ca. 5% zu beobachten.

- Aus der Stichprobe mit besonders günstigem Reaktivitäts- und Spezifitätsprofil wurden zwei Klone (3E3 und 4C1) für eine Subklonierung rekrutiert.
 - o Unter den hervorgegangenen Subklonen fand sich ein Anteil von ca. 15% an adäquat reaktiven, hierunter einen Anteil von 20% im Hinblick auf eine gute Spezifität, und letztlich eine Expansions-Erfolgs-Quote von 20 %. Somit besserten sich alle Qualitäten (Affinität, Spezifität und Eigenstabilität) bei den Subklonen im Vergleich zu den primären Klonen deutlich. (**Abb. 17B und Abb. 17C**).

Ergebnisse

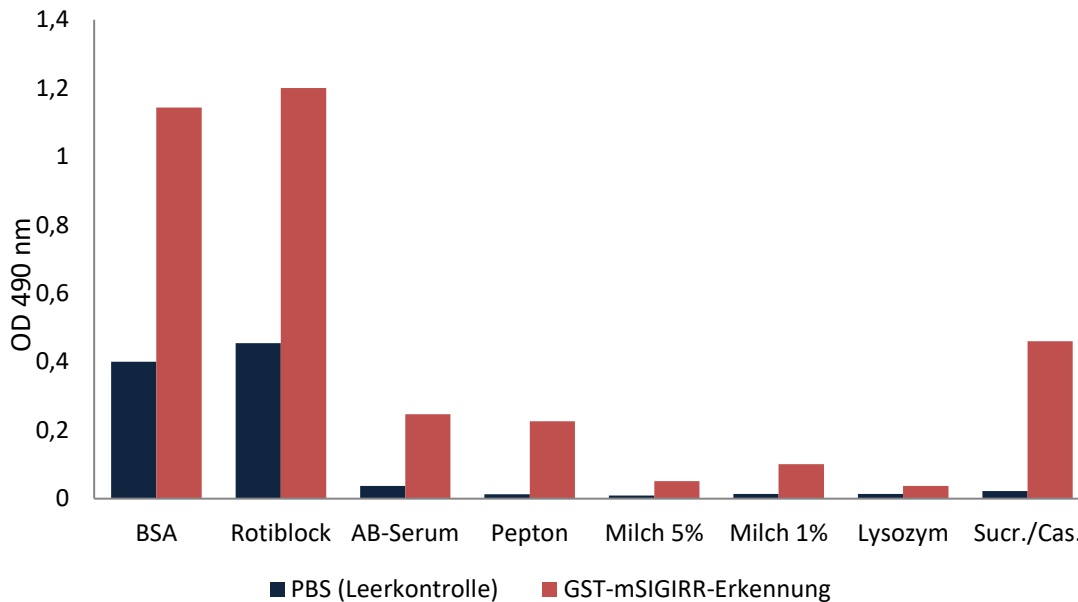


Abb. 16 Blockpuffervergleich in GST-mSIGIRR-Erkennung per ELISA mit Überstand des Klones 2F9. **Zusammensetzung der Blockpuffer:** BSA 1% in PBS+Tween; Rotiblock 1:10 in Wasser; AB-Serum 10% in PBS+Tween; Pepton 8% in PBS+Tween; Milchpulver 5% bzw. 1% in PBS+Tween; Lysozym 1% in PBS+Tween; Sucrose 5%+Casein 0,2% in PBS+Tween.

Ein ELISA-Direktvergleich der Überstände aller generierter Klone und Subklone wird in **Abb. 18A bis D** dargestellt.

Was die Spezifität einzelner primärer Klone anbelangt, so war der Quotient zwischen Anti-GST-SIGIRR- und Anti-GST-assoziiierter Absorption im ELISA am stärksten bei 4C1 (8,9-fach) und am schwächsten 2D5 (1-fach). Bei den Subklonen bilden 3E3c (7,3-fach) und 4C1k (1,3-fach) die Extreme (**Abb. 19**).

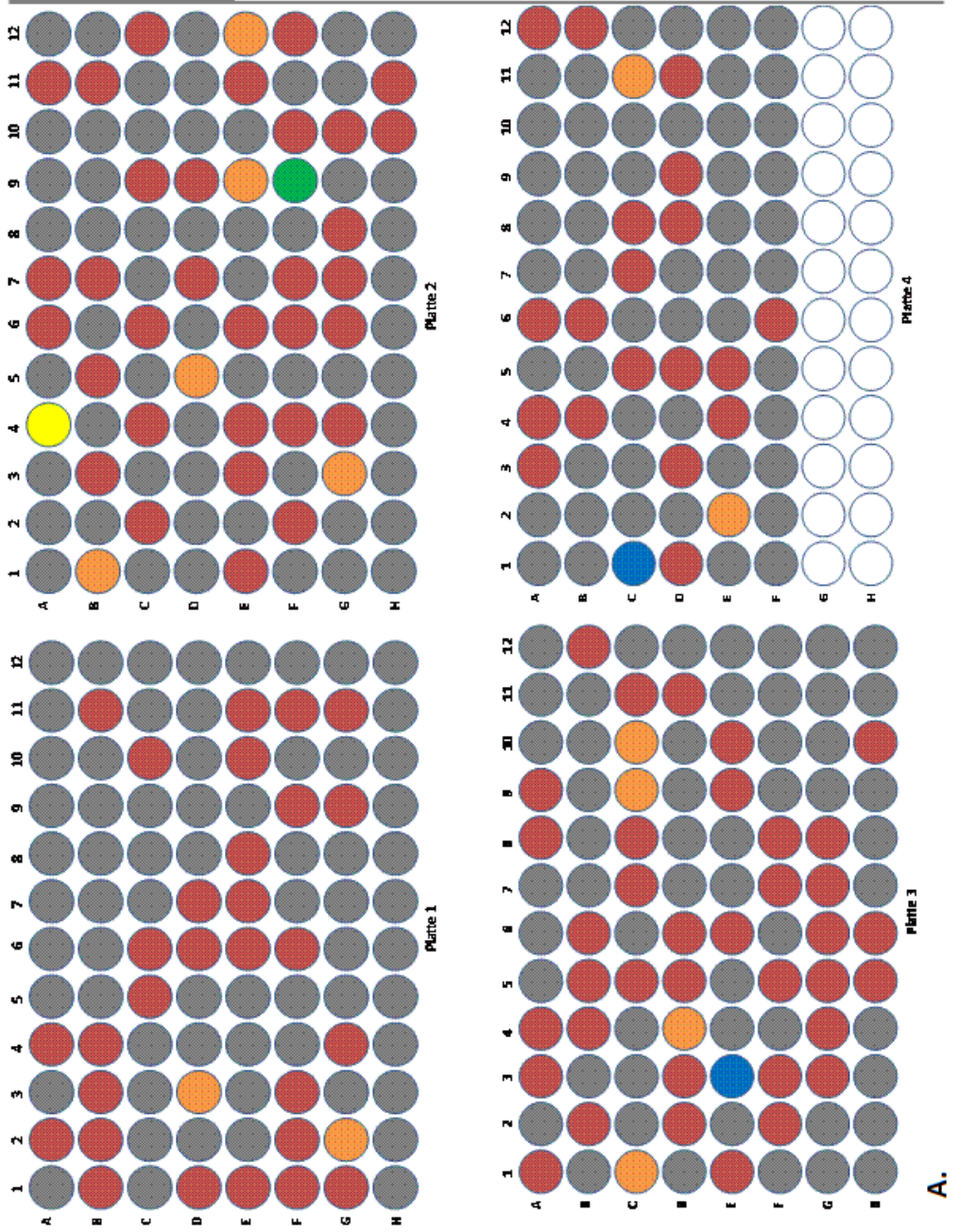
Für die nachfolgenden Versuche (Western-Blot, Isotypbestimmung) wurden unter den Klonen mit der höchsten Antikörper-Spezifität folgende ausgewählt: 2F9, 3E3c und 4C1 – Ratio GST-SIGIRR-/GST-Erkennung jeweils 3,6-, 7,3- und 8,9-fach.

Abb. 17

Rekrutierung von Klonen und Subklonen anhand ihrer Wachstums-eigenschaften und der Spezifität ihrer monoklonalen Antikörper im ELISA.

A. Generierte Klone

Die durch „limiting dilution“ in 96-Well-Platten generierten Hybridomazellklone werden hier anhand der makro- und mikroskopischer Bewertung ihres Wachstums, sowie der Reaktivität und Spezifität ihrer Antikörper im Anti-mSIIgRR-ELISA klassifiziert.



Ergebnisse

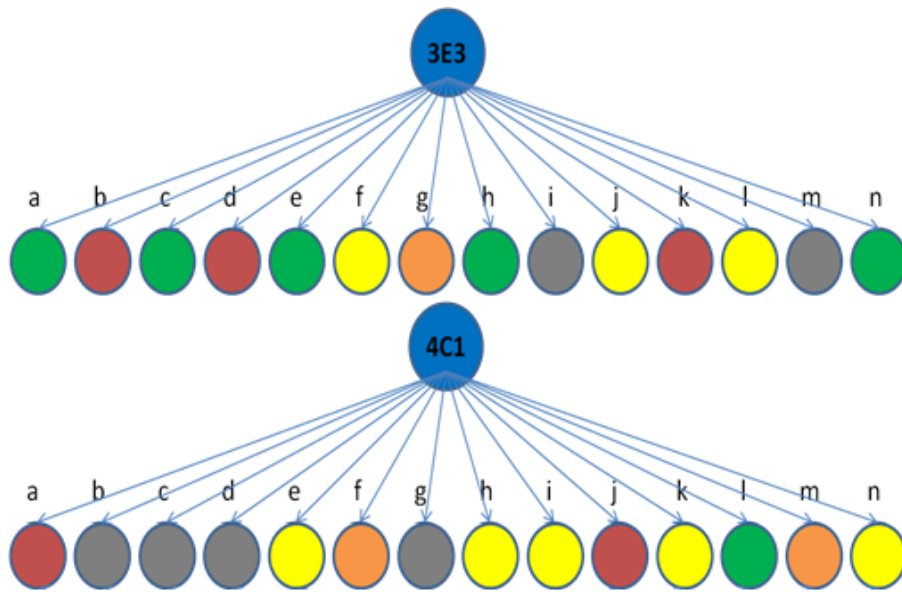


Abb. 17 B Generierte Anti-mSIGIRR-Subklone; Einteilung in 5 Klassen in Abhängigkeit von Wachstumseigenschaften und von der Antikörper-Spezifität. Die Subklone entsanden aus den maternalen Klonen 3E3 und 4C1 per limiting dilution-Verfahren. Farbkodierung in Abb. 17A erläutert.

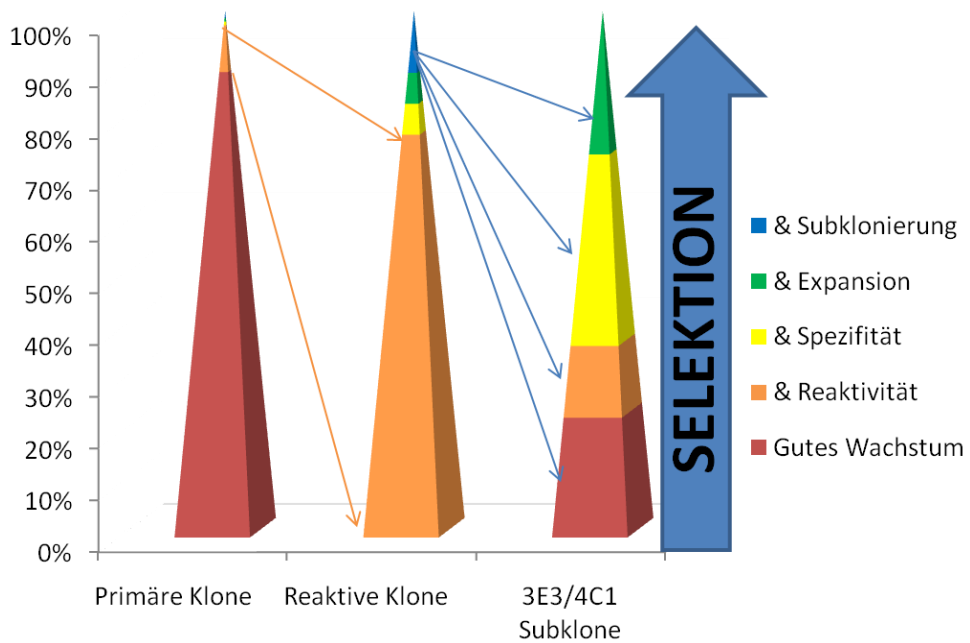


Abb. 17C Klonierungsstatistik der generierten Anti-mSIGIRR-sezernierenden Klone und Subklone. Vereinfachte Darstellung des Selektionsprozesses von gut wachsenden Zellklonen zu den spezifischen und gut expandierten Subklonen.

Ergebnisse

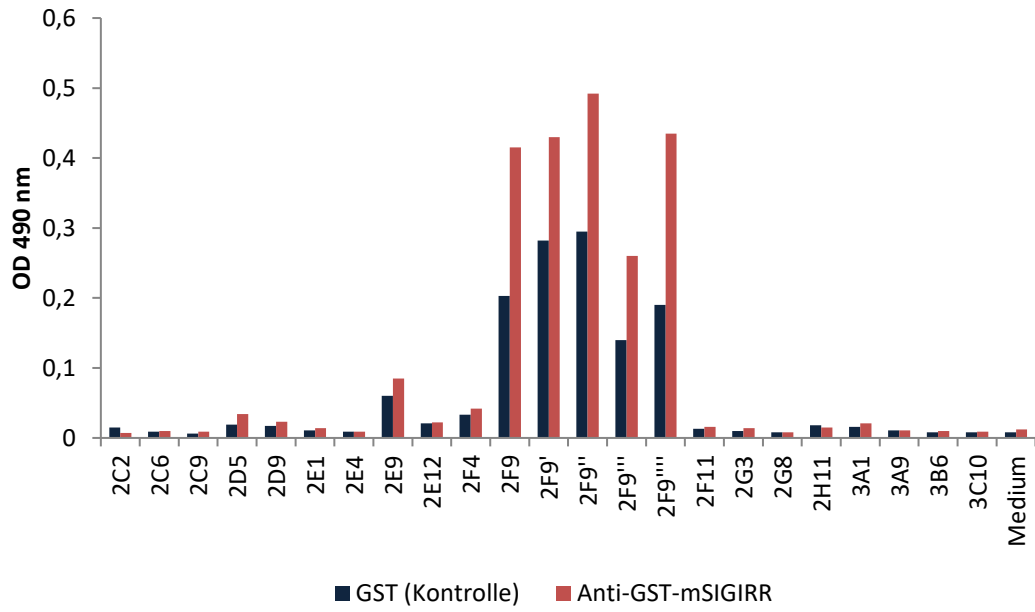


Abb. 18A

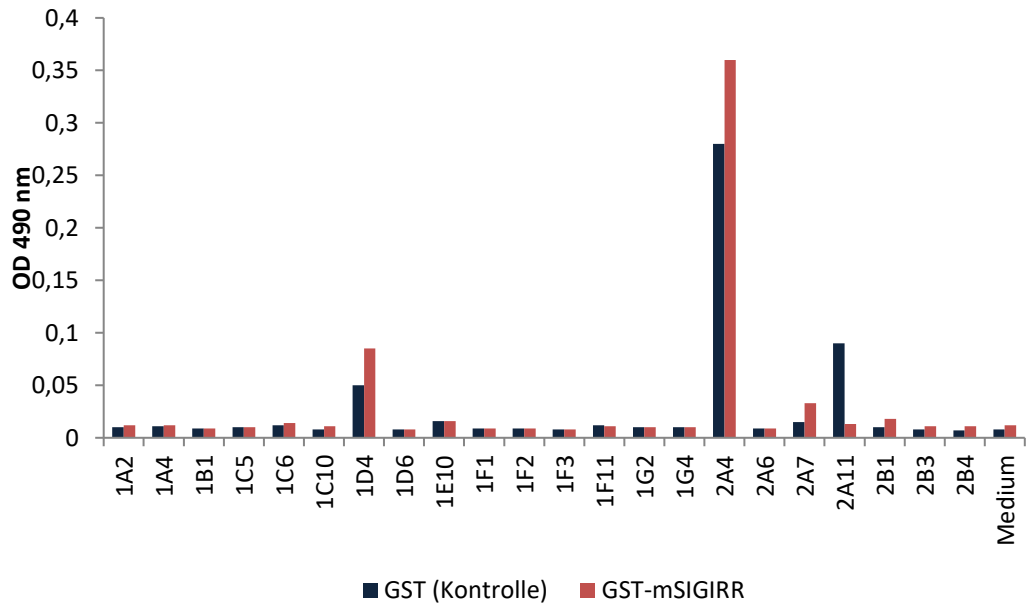


Abb. 18B

Ergebnisse

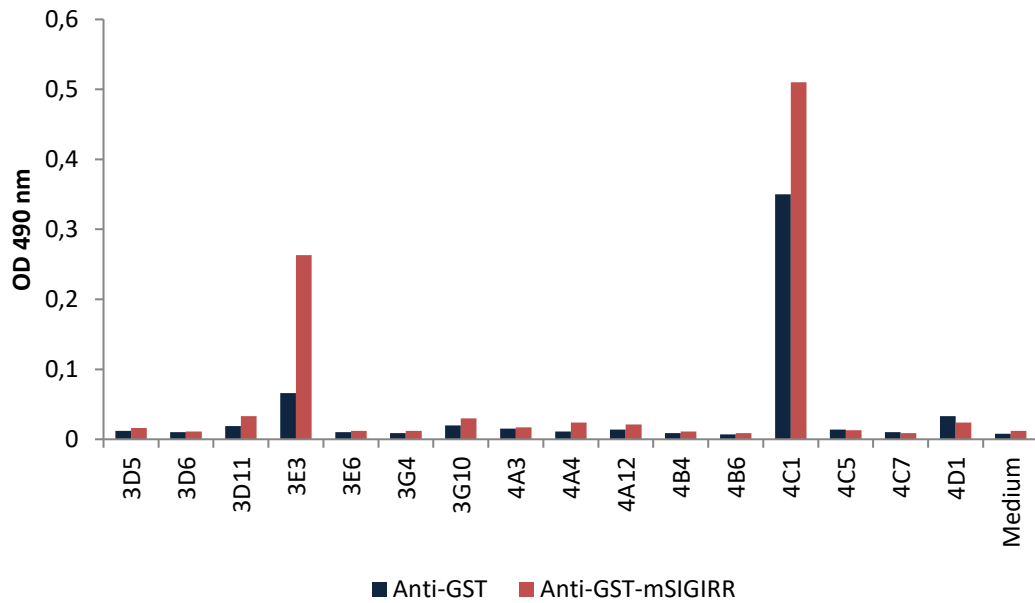


Abb. 18C

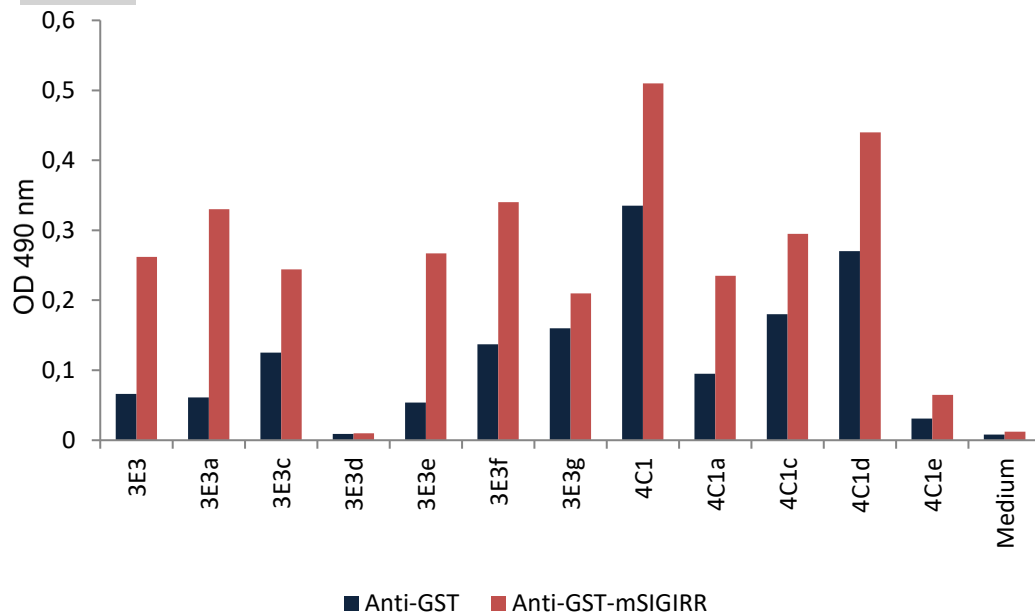


Abb. 18D

Abb. 18A bis D: Reaktivität der gesamten Klone und Subklone im Überblick. In 18B wird durch Darstellung der zu verschiedenen Zeitpunkten untersuchten Überstände des gleichen Klones 2 F9 (jeweils als 2F9' bis 2F9'''' bezeichnet) die zeitliche Schwankung der Antikörper-Qualitäten exemplarisch dargestellt.

Ergebnisse

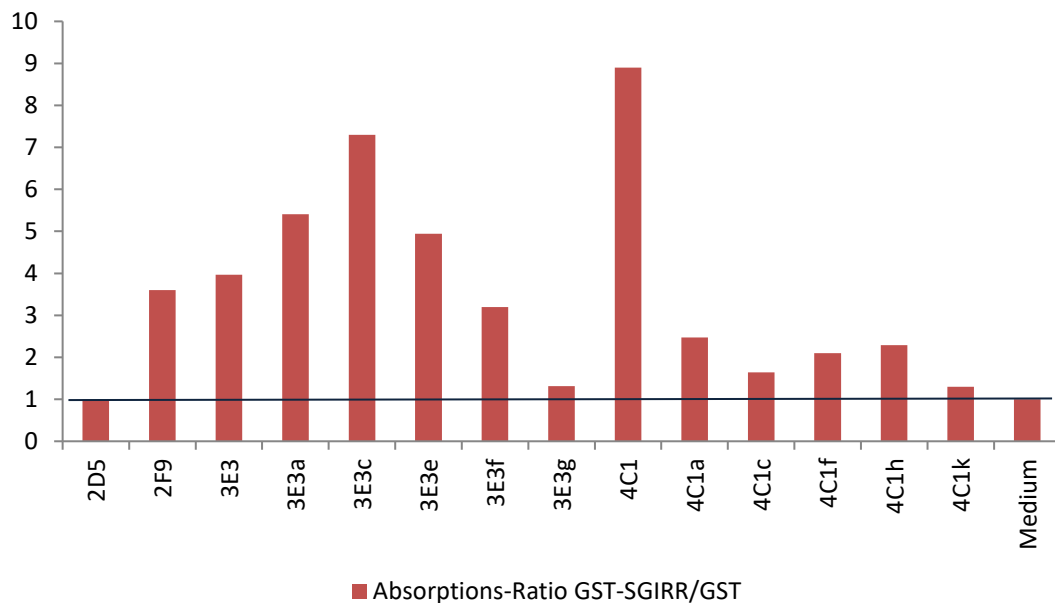


Abb. 19: Ratio GST-SIGIRR-/GST-Erkennung als Maß für die Spezifität der Antikörper einzelner Klone.

4.4 Charakterisierung der Antikörper im Western-Blot

Zur Ergänzung des ELISA-Nachweises über Funktionalität und Spezifität der hergestellten Antikörper, wurde eine Auswahl auch im Western-Blot getestet. Gelelektrophoretisch aufgetrennte und auf einer PVDF-Membran übertragene GST- bzw. GST-SIGIRR-Proben wurden mit Maus-Seren und Hybridoma-Überständen inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion der Primär-Antikörper (die generierten) mittels HRP-markiertem Sekundäntikörper in einer Chemilumineszenz-Reaktion.

4.4.1 Western-Blot-Testung der Maus-Seren

Ergebnisse

In einem ersten Western-Blot-Versuch wurde überprüft, ob die in den Mausseren enthaltene Antikörper das im Nierengewebe enthaltene SIGIRR in vitro detektieren konnten. Dazu wurden Nierenzell-Lysate von homozygoter Wildtyp-, homozygoter Knock-out und heterozygoter Maus aufgetrennt und anschließend auf PVDF-Membranen transferiert. Nach Inkubation mit verdünntem Mausserum und Detektion der enthaltenen Antikörper konnte deren Avidität zu mSIGIRR bewertet werden. In dieser Versuchsreihe wurde nur das Serum der Maus 1 getestet, da die Maus 2 bereits im vorangehenden ELISA keine mSIGIRR-Antikörperproduktion aufwies.

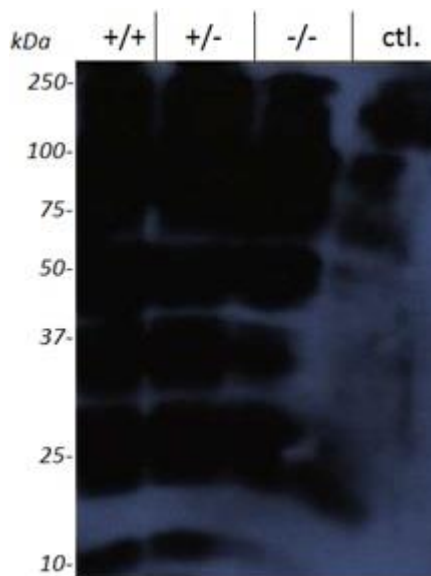


Abb. 20 Testung des Serums der Maus 1 auf Anti-mSIGIRR-Antikörper im Western-Blot. Für diesen Test wurde eine 1:1000-Verdünnung des Serums der mit Nierenextrakt immunisierten Maus eingesetzt. Kein sichtbarer Unterschied in der SIGIRR-Erkennung zwischen dem Wildtyp- (+/+), heterozygotem (+/-) und defizientem (-/-) Lysat.

Im Western-Blot-Film zeigt sich eine Reihe von Banden von einem Molekulargewicht zwischen 150 und ca. 5 kD (**Abb. 20**). Es gibt jedoch keine Bande entsprechender Größe, die auf eine spezifische mSIGIRR-Erkennung durch das Serum schließen lässt. Durch das nahezu identische Bandenmuster bei Wildtyp-, homozygotem und heterozygotem Zelllysate in dem Bereich 37-80 kD (Größe des mSIGIRR-Proteins in nicht-glykosylierter bzw. glykosylierter Form), ist ein Vorhandensein von reaktiven Anti-mSIGIRR-Antikörpern im Maus-Serum zwar möglich, jedoch kann deren Spezifität hier nicht belegt werden.

4.4.2 Western-Blot-Testung der monoklonalen anti-mSIGIRR-Klone und -Subklone

Nach dem Nachweis der Reaktivität der generierten monoklonalen Antikörper im ELISA, wurde ein Western-Blot-Versuch als zweites Testsystem durchgeführt. Zusätzlich zu dem oben geschilderten Wildtyp- und SIGIRR-/- Mausgewebe, das im Serum-Western-Blot zur Detektion angeboten wurde, wurde hier jeweils rekombinantes GST- und GST-SIGIRR-Protein aufgetrennt und auf die PVDF-Membran transferiert. Durch Inkubation mit Kulturüberständen ausgewählter Hybridoma-Zellklone, konnten enthaltene monoklonale Antikörper nach ihrer Reaktivität und Spezifität für mSIGIRR beurteilt werden. Frisches Kulturmedium diente als negative Kontrolle und konnte erwartungsgemäß nicht detektiert werden.

Es zeigte sich, dass sowohl die maternalen Klone 2D5, 2F9 und 4C1 als auch das Subklon 3E3c in der Lage waren, GST-SIGIRR (37 kD) zu erkennen (jeweils **Abb. 21A, -B und -D bzw. 21C**). Zudem wurde von allen vier Antikörpern eine größere Nebenbande (ca. 50 kD) erkannt (N.B. Auf dem Papier übertragen, ist diese Nebenbande bei 3E3c nicht mehr erkennbar, auf dem Original-Film aber eindeutig vorhanden).

Bei 2D5 und 4C1 (**Abb. 21A und 21D**) findet sich auch eine leichtere Nebenbande mit einem Molekulargewicht von etwa 25 kD, die zu einem Spaltprodukt passt. Zudem ist bei jedem Antikörper eine GST-Bande zu sehen. In einem neuen Versuch mit einer 1:10-Verdünnung des 2F9-Überstandes, verschwindet die GST-Bande, während die SIGIRR-Bande allein erhalten bleibt (**Abb. 22**). Dafür taucht eine 75 kD große Kontaminations-Bande in der GST-Spalte auf. Seitens der Maus-Lysate ist keine spezifische SIGIRR-Erkennung feststellbar.

Ergebnisse

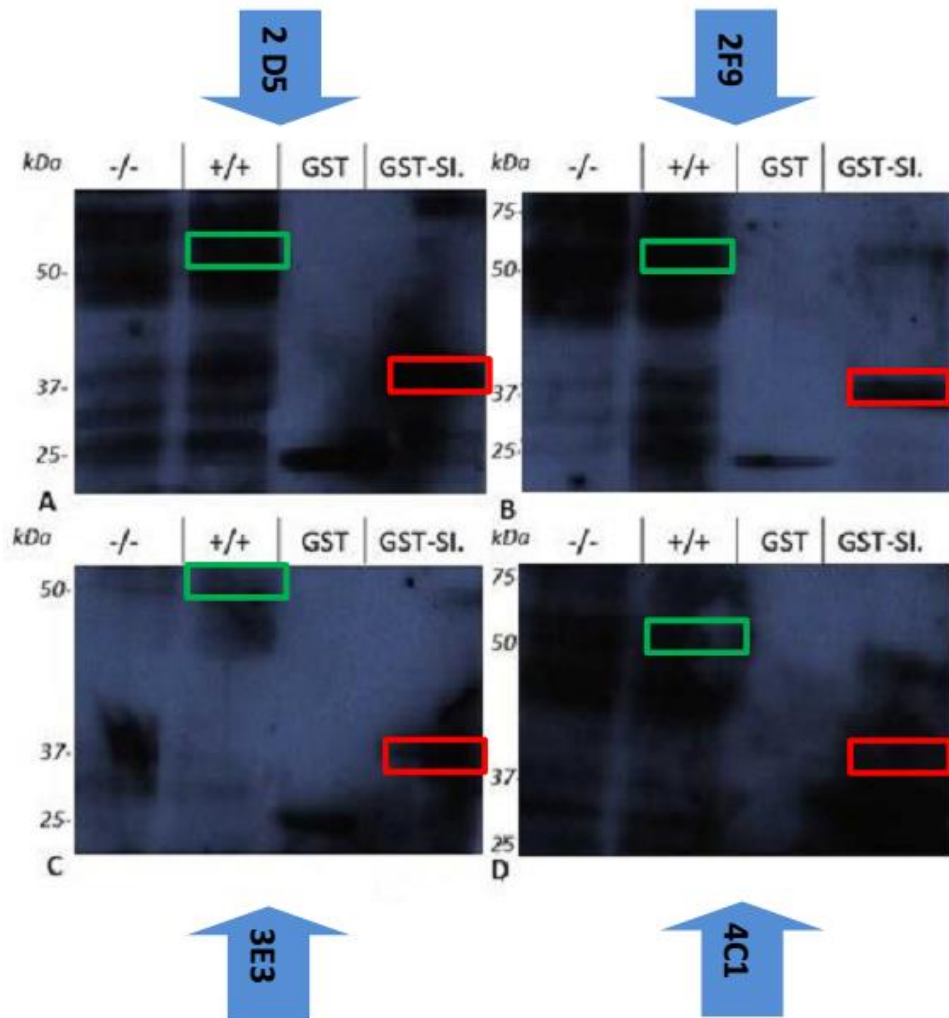


Abb. 21 Anti-mSIGIRR-Antikörpernachweis im Western-Blot. Die detektierten Antikörper stammten von Kulturüberständen folgender Hybridoma-Zellklone: **A= 2 D5**; **B= 2 F9**; **C= 3 E3** und **D= 4 C1**. An der Membran waren mSIGIRR-Knock-out- und mSIGIRR-Wildtyp- Lysat sowie GST und mSIGIRR gebunden.

Ergebnisse

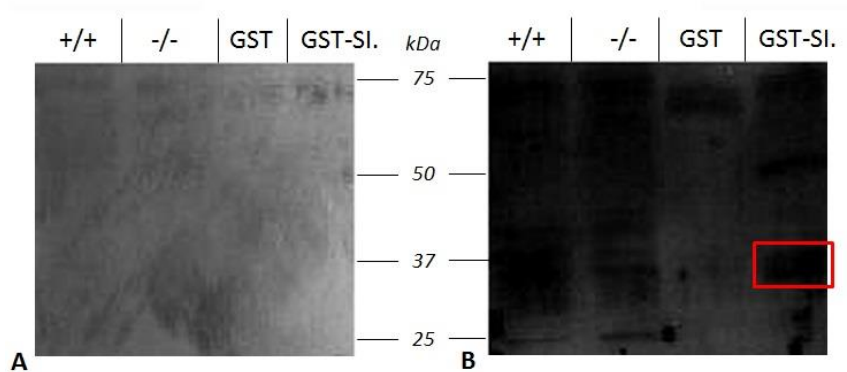


Abb. 22 Detektion eines Anti-mSIGIRR-Antikörpers aus einer 1:10-Verdünnung des Hybridoma-Überstandes 2 F9 im Western-Blot. **A:** Leerkontrolle mit frischem Kulturmedium als „1. AK“; **B:** 2F9-Überstand als 1.AK.

4.5 Isotypbestimmung der monoklonalen Antikörper

Die Einteilung ausgewählter monoklonaler Antikörper nach Immunglobulinklassen erfolgte u.a. in einem ELISA-Versuch. 96-Wellplatten wurden dafür mit dem GST-SIGIRR-Fusionsprotein beschichtet, mit den antikörperhaltigen Überständen inkubiert und schließlich einer Detektion durch jeweils einen von 6 Ig-Klassen-spezifischen Antikörpern ausgesetzt.

Zwei Subklone (3E3c und 4C1b) sowie der maternale Klon 2F9 wurden ausgetestet und zeigten durch eine Farbreaktion ihre Zugehörigkeit zu folgenden Ig-Klassen (Abb. 23):

- 2F9: vorwiegend IgM, zusätzlich in Spuren IgG1 und IgG2b. Bei der Detektion vom 2F9-Antikörper durch Anti-IgM ist eine vielfach stärkere Farbreaktion sichtbar als bei der Detektion durch die Kontrolle, sowie durch die Anti-Ig-Antikörper anderer Klassenspezifität. Allerdings heben sich auch die IgG1 und IgG2b-Klasse leicht von den anderen und vom Leerwert.

Ergebnisse

- 3E3c: vorwiegend IgG2a; auch Spuren von IgG2b und IgM. Der Anti-IgG2a-Antikörper weist eine besonders hohe Affinität zum 3E3c-Antikörper im Vergleich sowohl zu den anderen Klassen- als auch zu den anderen Anti-mSIGIRR-Antikörpern.
- 4C1b: IgG2a als dominanter Isotyp, IgM auch im Ansatz vorhanden. Das Ergebnis bei diesem Subklon fällt ähnlich zu dem bei 3E3c aus.

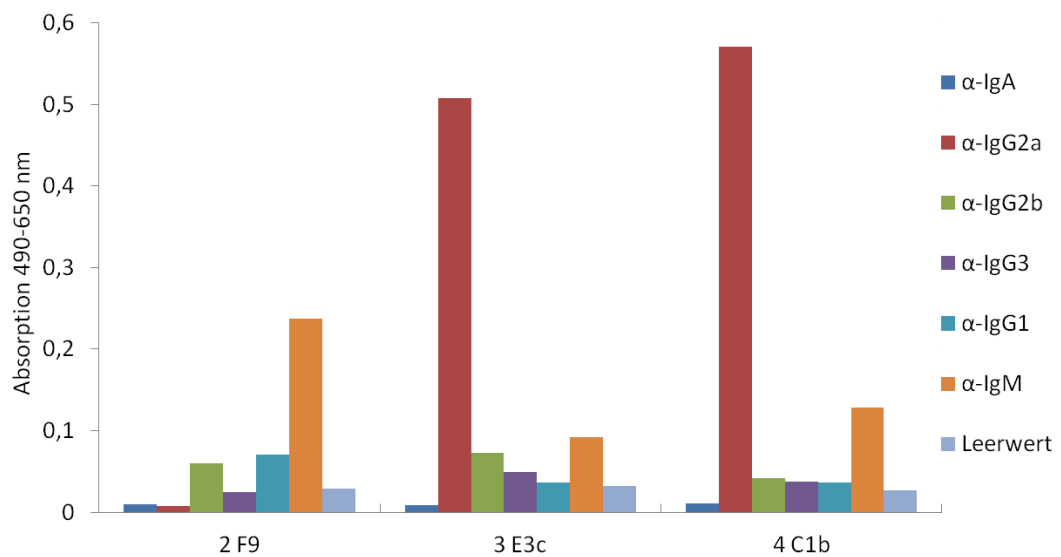


Abb. 23 Isotypbestimmung der durch den Klon 2 F9 bzw. die Subklone 3 E3c und 4 C1b sezernierten Antikörper. Medium ctl.: Mediumkontrolle.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Generierung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen das TLR-Familienmitglied TIR8/SIGIRR. Dieser orphan Rezeptor wurde in mehreren Studien als negativer Regulator der Immunantwort bei Mensch und Maus identifiziert. (Garlanda et al. 2004) Jedoch sind bisher Transportmechanismus und genaue Signaltransduktion unklar (Li et al. 2005). Die Erforschung dieser und anderer Charakteristika -im Hinblick auf eine diagnostische und therapeutische Anwendung der Erkenntnisse- wird erheblich von der Verfügbarkeit adäquater monoklonaler Antikörper profitieren.

5.1 Generierung monoklonaler Anti-mSIGIRR-Antikörper

Monoklonale Antikörper sind wesentliche Instrumente der immunologischen Forschung. Durch die spezifische Erkennung von Zielmolekülen spielen sie eine wichtige Rolle in Lokalisationsstudien, Funktionsanalysen, klinischen Laboruntersuchungen und in der Immuntherapie (Nelson et al. 2000). Ein Hauptanwendungsgebiet monoklonaler Antikörper ist die Identifizierung und Charakterisierung von Zellmembran-Molekülen. Das hohe Potenzial für den wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn verstärkt weiterhin Kollaborationen zwischen Arbeitsgruppen und führt in einigen Fällen zu einer Kommerzialisierung, deren Gewinne wiederum in die Forschung einfließen können (Patridge et al. 1994).

Die zur Generierung monoklonaler Antikörper verwendete Hybridom-Technik wurde 1975 von C. Milstein und G. Köhler entwickelt. Durch Fusion von antikörperproduzierenden B-Zellen mit quasi-unsterblichen Myelomzellen entstehen in großen Mengen Antikörper einer vorbestimmten Spezifität (Köhler, Milstein 1975). Diese Methode gilt als äußerst effektiv, erfordert jedoch im Gegensatz zu neueren in-vitro-Systemen Tieropfer, die B-Zellen für die

Diskussion

anschließende Immortalisierung durch Fusion mit Myelom-Zellen liefern. Summa summarum sprechen die Größenverhältnisse und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse derzeit noch für die Hybridom-Technik (Breedveld 2000).

Die einzelnen Schritte der Hybridomtechnik wurden in dieser Arbeit nach einem klassischen Schema durchgeführt: Immunisierung, Fusion, Selektion und Klonierung. Zunächst wurden zwei SIGIRR-defizienten Mäusen separat Milz- und Nierenzell-Suspensionen einer C57B6 Wildtyp-Maus gespritzt. Die immunisierten Mäuse waren ca. 5 Monate alt, was eine Überschreitung des in einem Teil der Literatur empfohlenen Alters von 7 Wochen bis 2 Monaten darstellt (Partridge 1994). Die Relevanz des Alters für den Immunisierungserfolg bleibt jedoch in den eingesehenen Publikationen unklar. Der verwendete Mausstamm weicht ebenfalls vom klassischerweise bevorzugten Balb/c. Allerdings scheint sich dieser aufgrund einer besseren Eignung zur Aszites-Technik etabliert zu haben, die für unser Vorhaben von Rechts wegen ausgeschlossen war (Nakazawa et al. 2010).

Eine gelungene Generierung monoklonaler Antikörper erfordert unter anderem die korrekte Applikation geeigneter Antigenlösungen. Die Expression von mSIGIRR in Nierengewebe und hSiGIRR im Milzgewebe auf mRNA-Ebene wurde in EST-Datenbanken-Studien bestätigt (Thomassen et al. 1999). Die intraperitoneale Injektion von ganzen Zellen gilt als hochimmunogen und wird in der Regel mit dem Freundschens Adjuvans verstärkt. In dieser Arbeit wurde statt letzterem CpG-DNA verwendet, die selbständig eine Immunantwort hervorruft, oder in diesem Fall in Kombination mit mSIGIRR-Antigenen die Immunantwort potenziert (Bauer et al. 2008). Eine Verifizierung der SIGIRR-Defizienz bei den immunisierten Mäusen erfolgte mit der üblichen PCR-Typisierung, mit eindeutig positivem Ergebnis bei der Maus 1 und nicht auswertbarem Ergebnis bei der Maus 2. Die Zweitimmunisierung wurde 3 Wochen nach der ersten durchgeführt, was den empfohlenen Mindest-Abstand von 2 Wochen nicht unterschreitet. Einer versehentlichen Nutzung von FCS bei der Antigenvorbereitung folgten 3 Waschschriffe mit PBS, die die Antigenlösung von Kalb-Antigenen befreien sollten. Inwiefern dies gelungen ist und ob die Mäuse auch gegen Kalb-Antigenen immunisiert wurden ist unklar, kann aber unspezifische Reaktionen in den Antikörper-Tests zum Teil erklären. Für die letztendlich gewonnenen monoklonalen

Diskussion

Antikörper, die per definitionem ein einziges Epitop erkennen, wäre dies jedoch höchstens im Sinne einer Kreuzreaktivität relevant.

Für den folgenden Fusionschritt wurde die mit Nierenzellsuspension immunisierte Maus (Maus 1) ausgewählt, da sie einen gut zweifach höheren Antikörper-Titer in der ELISA-Serum-Testung nach der Zweitimmunisierung aufwies (Abb. 15). Dies könnte an einer höheren Expression vom SIGIRR im Nierengewebe liegen (Li et al. 2005), an der individuellen Konditionierung der betroffenen Immunsysteme (Partridge 1994) oder aber am Genotyp der Maus 2, die in der Typisierung kein eindeutiges Knockout-Signal zeigte (Abb. 11). Die Antikörper-Nachweismethode per indirekten ELISA-Test ist etabliert. Jedoch wurde rekombinantes SIGIRR-Protein nachgewiesen, das sich als bakteriell exprimiertes Protein durch fehlende Glykosylierung vom mSIGIRR in vivo unterscheidet. Da das Immuneserum bei einer 1:1000 Verdünnung mSIGIRR 5-fach stärker als die GST-Kontrolle erkannte, wurde der als hinweisend für einen Immunisierungserfolg bei der Maus 1 gedeutet, im Gegensatz zur Maus 2. Im Hinblick auf die bevorstehende Plasmazell-Gewinnung aus der Maus 1, wurde bei der finalen Immunisierung auf Adjuvantien verzichtet und somit die Gefahr einer anaphylaktischen Reaktion reduziert (Partridge 1994). Die für die Fusion vorbereitete Ag 8 P3X-Myelomzelllinie ist etabliert. Die klassische Größenordnung von $2 \cdot 10^7$ Milzzellen wurde eingehalten, das Verhältnis zu den damit zu fusionierenden Myelomzellen wurde der Qualität letzterer angepasst und betrug 1:2. Zellen in einem guten Zustand werden üblicherweise ein Verhältnis 1:1 bis 10:1 gemischt (B- zu Myelomzellen; Partridge 1994). Die Fusionsmethode wurde hier durch die Verwendung isolierter B-Zellen, anstatt eines Lymphozyten-Gemisches, verfeinert.

Die eigentliche Fusion von Plasma- und Myelomzellen mittels PEG erfolgte steril und die Fusionsprodukte wurden anschließend im HAT-Medium inkubiert. In insgesamt 360 Wells waren die hervorgegangenen Zellen statistisch isoliert. Das HAT-Medium gewährleistete die Selektion von erfolgreich fusionierten Hybridomzellen. Aus dieser Hybridom-Aussaat wurden überlebensfähige Klone (zwei von 5 Zellen bildeten solche Klone) rekrutiert und auf mSIGIRR-Erkennung im ELISA getestet. 16 von allen überlebenden Klonen waren nach wiederholter Testung reaktiv. Mikroskopische Kontrollen erfolgten täglich, dicht wachsende Klone wurden geerntet und expandiert. Die Subjektivität der Wachstumseigenschaften

Diskussion

wurde durch unabhängige Kontrollen zweier Untersucher reduziert, aber nicht eliminiert. Die hohe Sterblichkeit der Hybridomzellen in den ersten Tagen erforderte einen regelmäßigen Mediumwechsel. Es wurde sogar HFCS zur Optimierung des Wachstums eingesetzt, was bei Entwöhnung nach der zweiten Woche wieder zu erhöhter Sterblichkeit führte. Von welchen Faktoren, die Überlebensfähigkeit von Klonen nach HFCS-Entzug abhängig war, sowie welches Ergebnis die Verwendung von „Feeder cells“ stattdessen erbracht hätte, ist unklar.

Reaktive Klone mit guter mSIGIRR-Spezifität wurden je nach Wachstumsverhalten expandiert: 2F9, 3E3 und 4C1. Abschließend erfolgte die exemplarische Subklonierung von 3E3 und 4C1 durch verdünnungsbedingte statistische Isolierung. Hervorgegangene Subklone wurden ebenfalls im ELISA getestet und expandiert. Einige Klone und Subklone zeigten im ELISA-Test einen Reaktivitäts- oder Spezifitätsverlust. Der Klon 2A4 hatte zum Beispiel anfangs eine gute Spezifität und konnte aliquotiert werden. Jedoch überlebte er in Kultur nicht und ließ sich auch nicht wieder als antikörperproduzierender Klon erfolgreich auftauen und kultivieren. Dieses Verhalten einzelner – nicht repräsentativer- Klone steht im Widerspruch zur in der Literatur beschriebenen Kulturstabilität monoklonaler Antikörper (Nelson et al. 2000).

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit drei anti-mSIGIRR-Klone mit hoher Spezifität im ELISA und guten Wachstumseigenschaften generiert werden: 2F9, 3E3, 4C1. Die Klone 3E3 und 4C1 wurden subkloniert. In der etablierten Hybridoma-Technik wurden notwendige Anpassungen zur Sicherung der Kulturstabilität der zum Teil – hinsichtlich des Wachstums und der Antikörperproduktion- labilen Klone vorgenommen. Das Prinzip der Methode wurde jedoch vollständig beibehalten. Hinsichtlich der Einstellung der Antikörperproduktion durch vereinzelt Klone handelt es sich um ein verbreitetes Phänomen (Nelson et al. 2000). Der Ersatz des Freundschens Adjuvans durch die ebenfalls immunogene CpG-DNA hat den Immunisierungserfolg erwartungsgemäß nicht verhindert. Auch der versehentliche Einsatz von FCS in der Immunisierung hat dem Antikörpertiter zumindest bei Maus 1 nicht geschadet. Die Spezifität, Kulturstabilität und die gewonnenen Mengen von den Antikörpern 2F9, 3E3 und 4C1, sowie deren Subklone, erfüllen weitgehend die an monoklonalen Antikörpern gestellten Erwartungen.

5.2 GST- und GST-SIGIRR- Expression und Aufreinigung

Zwecks einer Anwendung im Western-Blot und im ELISA zur Testung von Antikörpern, wurde erstens mSIGIRR als rekombinantes GST-Fusionsprotein, zweitens GST als Negativkontrolle hergestellt. Um eine natürliche Faltung und eine bessere Löslichkeit der Proteine zu erzielen wurde das pGEX-System verwendet, das Polypeptide mit dem 26 kDa großen GST fusioniert. (Schmidt et al. 1988; Schmidt et al. 1994)

In einem Elutionsprofil wurde die Anreicherung des Fusionsproteins bzw. GST durch den Elutionspeak verdeutlicht. In einem weiteren Versuch wurden die hergestellten Proteine qualitativ (Coomassie-Färbung) und quantitativ (BCA-Versuch) nachgewiesen. Nach Aufreinigung des synthetisierten GST-mSIGIRR zeigten sich in der Coomassie-Färbung einige Nebenbanden, die am ehesten als Nebenprodukte der Synthese zu deuten sind, die im Rahmen der FPLC-Aufreinigung auch an Glutathion banden. Aus der GST-Expression ging im Vergleich eine 10fach größere und reinere Proteinmenge ohne Nebenbanden. Die höhere Effektivität der GST-Expression lässt durch die schnellere Expression bei geringerer Proteinlänge erklären. Während die Menge des Fusionsproteins keine negativen Auswirkungen auf die nachfolgenden Versuche hatte, führten die Nebenbanden im Western Blot zu unspezifischen Signalen. Eine bessere Reinheit könnte in weiterführenden Versuchen durch Zusatz von Triton X-100 und Verkürzung der Ultraschall-Behandlungsdauer angestrebt werden (Schmidt et al. 1988).

5.3 Charakterisierung der generierten Antikörper gegen mSIGIRR

Weiterführende Analysen eines potenziellen monoklonalen Antikörpers geben in erster Linie Aufschluss über dessen Reaktivität, Kreuzreaktivität und Spezifität. Für diesen Zweck wurden in dieser Arbeit Kulturüberstände der durch Fusion von Plasma- und Myelomzellen entstandenen Hybridoma-Zellklone im ELISA und Western-Blot angewendet. Eine genauere Charakterisierung wird durch Subklonierung ermöglicht, da hervorgehende Subklone effektiver isoliert sind. Desweiteren erlaubt eine Isotypbestimmung einerseits eine Aussage über Immunglobulinklasse des Antikörpers und andererseits die Bestätigung, dass ein einheitlicher Isotyp bei jedem Klon vorliegt (Nelson et al. 2000).

5.3.1 Anwendung im ELISA

Im indirekten ELISA wiesen 17 von insgesamt 146 generierten Klonen eine spezifische Anti-mSIGIRR-Reaktivität auf. Maß für die Spezifität der getesteten Antikörper war hierbei das Verhältnis zwischen GST-mSIGIRR- und GST-Protein-Erkennung. Nach Expansion und Konservierung blieben lediglich 4 von den 17 einfach positiv getesteten Klonen dauerhaft positiv: 2A4, 2F9, 3E3 und 4C1. Bei diesen vier Klonen betrug der Quotient zwischen GST- und GST-SIGIRR-Erkennung jeweils 1,8, 3,6, 7,3 und 8,9. Während der Klon 2A4 den weiteren Kulturprozess nicht überlebte, wurden die Klone 3E3 und 4C1 exemplarisch subkloniert. Von 23 hervorgegangenen Subklonen waren 18 spezifisch anti-mSIGIRR-reaktiv. 5 Subklone zeigten eine auf Dauer stabile anti-mSIGIRR-Spezifität (**Abb. 17A, B und C**).

Der Anteil von Klonen, die den gewünschten Antikörper sezernieren, wird in der Hybridoma-Technik durch viele Faktoren beeinflusst: die Reinheit des im Immunisierungsschritt angewandten Impferserums, die Exposition der geimpften Mäuse anderen Antigenen gegenüber, der Selektionserfolg zu fusionierender Plasmazellen usw. In dieser Doktorarbeit bestand das Impferserum aus Nieren- und Milzzell-Lysaten einer Wildtyp-Maus. Möglicherweise können weitere Bestandteile des Impferserums, z.B. das versehentlich hinzugegebene Kälberserum eine eigenständige Antikörperreaktion verursacht haben. Um

Diskussion

dem entgegenzuwirken, wurde das Impfserum noch vor der Verabreichung mehrfach mit PBS gewaschen. Neben der Zusammensetzung des Impfserums kann die Umgebung der immunisierten Mäuse ebenfalls eine Rolle spielen. Letztlich ist es auch denkbar, dass der Anteil antikörperproduzierender Klone durch eine unvollständige Aussortierung von T-Zellen vor der Fusion mit Myelomzellen reduziert wurde. Nach MACS-Aufreinigung verbliebene T-Zellen, können nämlich zur Ausbildung von T-Zell-Myelomzell-Hybridomen führen, die nicht zur Antikörperproduktion fähig sind (Luttmann et al. 2006).

Einige bei dem ersten ELISA-Test reaktive Klone verloren im Laufe der Zeit ihre Reaktivität bzw. ihre Spezifität (im Abschnitt „Ergebnisse“ nicht dargestellt). Dies könnte eine Folge der laufenden Optimierung des Testsystems und/oder ein Zeichen für die Instabilität einiger Hybridomkulturen sein. Die parallel zur Selektion und Expansion der Klone erfolgte ELISA-Testung wurde mehrmals angepasst, um eine möglichst hohe Sensitivität und Spezifität zu erreichen. So wurden zum Beispiel die Hybridoma-Überstände unverdünnt und mit 1:10, 1:50 und 1:100-Verdünnungen eingesetzt (im Abschnitt „Ergebnisse“ nicht dargestellt). Während die exemplarische 1:10 Verdünnung einiger Klon-Überstände keine deutliche Veränderung des Testergebnisses einbrachte, schwächte eine 1:100-Verdünnung im Allgemeinen das Signal und brachte keine Verbesserung der Antikörperspezifität. Ein anderer Hebel zur Optimierung des ELISA-Testes war die Art und der Isotyp des Detektionsantikörpers. Letzterer war wahlweise ein Biotin-markierter „goat anti-mouse-AK“ (1:50000) oder ein HRP-konjugierter „goat anti-mouse-AK“ (1:5000), jeweils vom Typ IgG. Die Ergebnisse mit beiden Antikörpern waren im Einklang, wobei der Biotin-markierte beim Serumtest und der HRP-konjugierte beim Überstand-Test das eindeutigste Ergebnis erzielte. Fortgesetzt wurde der ELISA-Test für Überstände daher mit dem HRP-markierten Antikörper. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Isotyp des Detektionsantikörpers nicht variiert (IgG), was wahrscheinlich zur schlechteren Detektion monoklonaler anti-mSIGIRR-AK anderer Klassen führte. Dies trifft z.B. auf das Klon 2F9 zu, bei dem im Nachhinein der Isotyp IgM vorwiegend vorlag.

Zur Optimierung des Testsystems gehörte auch der Blockpuffervergleich, nachdem bei Verwendung des herkömmlichen BSA-Blockpuffers zu hohe Signalhintergründe beobachtet

Diskussion

wurden. In einem ELISA-Ansatz wurden 8 unterschiedlich zusammengesetzte Blockpuffer in der Testung von drei ausgewählten Antikörpern (2F9, 3E3c und 4C1) auf ihren Einfluss auf die Spezifität des Testes hin geprüft. Es stellte sich heraus, dass die niedrigsten Hintergründe (unspezifische Bindung des AK an den Blockpuffer) bei Verwendung des Sucrose/Casein-, des AB-Serums, Pepton- und Lysozym-Puffers zu sehen waren (**Abb. 16**). Der Sucrose- und Casein-haltige Blockpuffer wurde für die Fortsetzung der ELISA-Tests ausgewählt, unter anderem weil es bei vergleichbarer Effektivität deutlich kostengünstiger ist als ein Puffer mit AB-Serum oder Lysozym. Die anfangs mit dem BSA-Blockpuffer erzielten Ergebnisse wurden unter Verwendung des Sucrose-Casein-Blockpuffers nur teilweise bestätigt. Allerdings wurden dabei keine spezifischen Antikörper von zusätzlichen Klonen entdeckt, sondern vielmehr waren einige Klone bei dem Wiederholungstest mit dem neuen Puffer nicht mehr spezifisch SIGIRR-reaktiv. Dennoch ist dies nicht zwangsläufig auf Puffer-Eigenschaften zurückzuführen, da auch die Tendenz zur Instabilität mehrerer Klone unabhängig von den Puffern deutlich wurde.

Eine erneute ELISA-Testung der Hybridoma-Überstände 3E3c, 4C1 und 2F9 im Rahmen der Bachelorarbeit von Lydia Dyck bestätigte bei allen eine mSIGIRR-Reaktivität (Dyck 2010). Die Spezifität für SIGIRR gegenüber GST war dabei gering, obwohl dasselbe ELISA-Protokoll angewendet wurde. Diese erneute Testung erfolgte jedoch Monate später, wobei das Auftauen von zu unterschiedlichen Zeitpunkten eingefrorenen Zellportionen erforderlich war. Eine Überwucherung der getesteten Portionen durch Klone mit geringer mSIGIRR-Spezifität ist als Ursache für die abnehmende Spezifität denkbar. Ein Konzentrationsunterschied zwischen den verwendeten Überständen könnte auch für das anders ausfallende Ergebnis verantwortlich sein. Letztere Hypothese lässt sich jedoch schwierig überprüfen, da weder in der Arbeit von Lydia Dyck noch in dieser, die Antikörperkonzentration in den Kulturüberständen gemessen wurde. Durch eine weitere Subklonierung konnte die erste Annahme (Überwucherung durch weniger spezifische Klone) gestärkt werden, da einige Subklone eine wesentlich stärkere GST-mSIGIRR-Spezifität aufwiesen. Es ist davon auszugehen, dass letztere durch die erneute Subklonierung nach dem „limiting dilution“-Prinzip besser isoliert wurden (Dyck 2010).

Diskussion

Gründe für die schwierig reproduzierbaren Ergebnisse zur Spezifität der Antikörper im ELISA wurden auch mittels eines Stabilitätstests gesucht. Dieser ergab eine hohe Stabilität der Antikörper 3E3c und 4C1I gegenüber der Temperatur (Raumtemperatur um 37 °C) und eine hohe Empfindlichkeit gegen sauren pH (keine signifikante SIGIRR-Erkennung nach Inkubation bei pH 3,7; Dyck 2010). Daher könnten schwankende pH-Werte die Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse im anti-mSIGIRR-Elisa sein.

Genauere Aussagen über die mSIGIRR-Spezifität der Antikörper im ELISA lieferten weitere Untersuchungen im Rahmen der Bachelorarbeit von Lydia Dyck. Nach Protein-A-Säulenaufreinigung der Antikörper 3E3c und 4C1I in 50% der Fälle im Vergleich zu den Überständen eine wesentlich höhere Spezifität. Eine Erklärung dafür wäre, dass Bestandteile der Hybridoma-Überstände zu unspezifischen Signalen führen oder sogar die Antigen-Antikörper-Bindung schwächen. (Dyck 2010)

Alles in allem zeigten sich die AK der maternalen Klone 2F9 und 4C1 sowie des Subklones 3E3c im ELISA spezifisch für mSIGIRR. Dennoch erwies sich der Antikörper 3E3c exemplarisch in Anschlussuntersuchungen (Bachelorarbeit Dyck 2010) als empfindlich gegen saure pH-Werte und zeigte schon in unserer Arbeit hohe unspezifische Signale bei Verwendung von BSA- oder Rotiblock-haltigen Blockpuffern. Eine weitere Subklonierung von 3E3c und 4C1I führte zu Antikörpern mit noch höherer Spezifität im ELISA, vermutlich durch eine bessere Isolierung von Klonen. Schließlich zog eine Aufreinigung der Hybridoma-Überstände in einer anderen Arbeit eine bessere mSIGIRR-Spezifität nach sich, annahmeweise durch die Eliminierung von Störelementen der Antigen-Antikörper-Bindung.

5.3.2 Anwendung im Western-Blot

Nach Feststellung von Reaktivität und Spezifität der generierten Antikörper im anti-mSIGIRR-ELISA stellte sich die Frage, ob diese Antikörper auch in anderen Testsystemen

Diskussion

zuverlässig Anwendung finden können. Der Western Blot besaß einen besonderen Stellenwert, da die Testung der Antikörper sowohl am rekombinanten GST-mSIGIRR-Protein als auch SIGIRR-transfizierten Zelllysaten praktikabel war.

Der erste Western-Blot-Versuch diente dazu, anti-mSIGIRR-Antikörper in den Seren der immunisierten Mäuse nachzuweisen. Ein spezifisches mSIGIRR-Signal konnte in einem gebloteten Wildtypmaus-Zelllysate nicht nachgewiesen werden. Stattdessen wurde eine Reihe von Banden von einem Molekulargewicht zwischen 150 und <10 kD sowohl bei dem Wildtyp- als auch im heterozygoten und SIGIRR-defizienten Lysat detektiert. Das Ausbleiben eines spezifischen Signals könnte an einer unzureichenden Konzentration spezifischer Antikörper im Serum, an einer zu geringen Menge des zu detektierenden SIGIRR oder an den Wechselwirkungen mit anderen Serum-Bestandteilen liegen. Eine Optimierung des Testsystems durch Verwendung eines anderen Sekundär-Antikörpers (Biotin-markierter Anti-mouse-Ig) sowie anderer Blockpuffern (FCS-, Sucrose/Casein-, Lysozym- bzw. AB-Serum- haltig) brachte keine Verbesserung des Testergebnisses (Ergebnis nicht dargestellt). Im Verlauf der Klonierung und Expansion generierter Hybridoma-Zellklone erfolgte eine Western-Blot-Testung von im ELISA anti-mSIGIRR-spezifischen Antikörpern. Getestet wurden die Antikörper 2D5, 2F9, 3E3 und 4C1 (N.B. Im Verlauf stellte der Klon 2D5 die Produktion spezifischer mSIGIRR-AK ein). Alle waren in der Lage GST-mSIGIRR auf der Blot-Membran zu erkennen, allerdings zeigten sich auch deutliche Neben- sowie GST-Banden. Während die niedermolekularen Banden vermutlich auf die Erkennung von mSIGIRR-Spaltprodukten zurückzuführen sind, zeigten die GST-Banden die geringe Spezifität der Antikörper für GST-SIGIRR im Vergleich zu GST im Western Blot. Eine bessere Spezifität zeigte der Klon 2F9 beispielhaft, als sein Überstand 1:10 im Kulturmedium verdünnt eingesetzt wurde. Im letzteren Ansatz war nur noch die erwartete SIGIRR-Bande detektierbar.

In einem neuen Western-Blot-Versuch im Rahmen der Bachelorarbeit von Lydia Dyck wurde die GST-mSIGIRR-Reaktivität vom aufgereinigten Antikörper 3E3c gezeigt. Desweiteren wurde durch Subklonierung von 4C1 ein Subklon 4C1L-D4 generiert, dessen GST-mSIGIRR-Reaktivität im Western-Blot ebenfalls deutlich wurde (Dyck 2010). Vergleichbare Ergebnisse

wurden bei den maternalen Klonen 2F9 und 4C1 erzielt, was eine höhere Reproduzierbarkeit der Western-Blot-Ergebnisse im Vergleich zum ELISA vermuten lässt. Allerdings waren die aufgereinigten Antikörper 3E3c und 4C1l-D4 in den Versuchen von Lydia Dyck nicht in der Lage, mSIGIRR in transfizierten HEK-Zellen zu detektieren. Die exklusive Erkennung vom rekombinanten, bakteriell exprimierten GST-mSIGIRR im Gegensatz zum transfizierten mSIGIRR könnte auf unterschiedliche posttranslationale Modifikationen des Proteins, bzw. eine Sedimentierung mit den Membranrümmern zurückzuführen sein (Thomassen et al. 1999). Analysen dieser Fehlerquellen könnten durch Proteinexpression in anderen Systemen (z.B. Fliege), Durchführung einer Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen und Auftragen des Pellets nach Denaturierung der HEK-Zellen, erfolgen. (Thomassen et al. 1999)

5.3.3 Isotypbestimmung und weitere Analysen

Aufgrund ihrer Spezifität wurden der maternale Klon 2F9 und die Subklone 3E3c und 4C1b einer Isotypbestimmung mittels ELISA unterzogen. Während die Subklone 3E3c und 4C1b vorwiegend Antikörper der Klasse IgG2a sezernierten, fanden sich im 2F9-Überstand am häufigsten IgM-Antikörper. Hinsichtlich der Immunglobulinklasse werden sich die IgG2a-Antikörper eher für weitere Entwicklungsschritte eignen, da sich IgG-Antikörper im Allgemeinen als stabiler und therapeutisch nützlicher erwiesen haben (Nelson et al. 2000). Die Kenntnis der Immunglobulinklassen der jeweiligen monoklonalen Antikörper dürfte ihre Erkennbarkeit sowohl im Elisa als auch im Western-Blot steigern, weil sie eine gezielte Auswahl von Detektionsantikörpern derselben Klasse ermöglicht.

Weitere Entwicklungsschritte, die im begrenzten zeitlichen Rahmen dieser Doktorarbeit nicht durchgeführt werden konnten, sind unter anderem:

- Aufreinigung der Antikörper und Verifizierung deren Spezifität

Diskussion

- Erstellung eines Reaktivitätsprofils und „epitope mapping“: dieser Schritt wäre insofern wichtig, als die geringe und fluktuierende Spezifität der meisten generierten Antikörper möglicherweise durch Kreuzreaktionen, duale Spezifität oder aber durch Testsystem-bedingte eingeschränkte Sichtbarkeit der erkannten Epitope zustandekommt. Durch das „epitope mapping“ kann die für die Antigenerkennung entscheidende Aminosäuren-Sequenz präzise bestimmt werden (Breedveld 2000).
- Affinitätsmessungen der Antigen-Antikörperbindung mittels „surface plasmon resonance“
- Struktur-/Funktions-Analysen des Zielmoleküls SIGIRR möglicherweise mithilfe der hergestellten monoklonalen Antikörper.

6 Literaturverzeichnis

Akira S, Takeda K, Kaiso T (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature immunology* volume 2 no 8: 675-680

Armant AM, Fenton MJ (2002) Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. *Genome Biol.* 2002; 3(8)

Bauer S, Pigisch S, Hangel D, Kaufmann A, Hamm S (2008) Recognition of nucleic acid and nucleic acid analogs by Toll-like receptors 7, 8 and 9. *Immunobiology* 213(3-4):315-28. Epub 2007 Nov 28.

Breedveld F c (2000) Therapeutical monoclonal antibodies. *Lancet* 355: 735-40

Bulek K, Swaidanai S, Jinzhong Q, Lu Y, Gulen M, Herjan T, Booki M, Kastelein R, Arpnica M, Kosz-Vnenchak, Li X (2009) The Essential Role of Single Ig IL-1 Receptor-Related Molecule/Toll IL-1R8 in Regulation of Th2 immune Response. *The Journal of Immunology* 182: 2601-2609

Chen X, Zhao F, Wu X, Qian G (2010) Enhanced expression of Single Immunglobulin IL-1 Receptor related molecule ameliorates Lipopolysacchaide-induced acute lung injury in mice. *The Shock Society*, Publish Ahead of Print

Drexler S, Kong P, Inglis J, Williams R, Garlanda C, Mantovani A, Yazdi A, Brennan F, Feldmann M, Foxwell B (2010) SIGIRR/TIR-8 is an inhinitor of Toll-like Receptor signaling in primary human cells and regulates inflammation in models of rheumatoid arthritis. *ARTHRITIS & RHEUMATISM* 62: 2249-2261

Danese S, Mantovani A (2010) Inflammatory bowel diseaseand intestinal cancer: a paradigm of the Ying-Yang interplay between inflammation and cancer. *Oncogene* 29: 3313-3323

Drexler S, Kong P, Inglis J, Williams R, Garlanda C, Mantovani A, Yazdi A, Brennan F, Feldmann M, Foxwell B (2010) SIGIRR/TIR-8 is an inhinitor of Toll-like Receptor signaling in

Literaturverzeichnis

primary human cells and regulates inflammation in models of rheumatoid arthritis. ARTHRITIS & RHEUMATISM 62: 2249-2261

Dyck L (2010) Testen von monoklonalen Antikörpern gegen den TLR-Inhibitor SIGIRR und Charakterisierung von SIGIRR-Liganden. Bachelorarbeit, dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt

Eberl G (2016) Immunity by equilibrium. Nat Rev Immunol. doi: 10.1038/nri.2016.75. [Epub ahead of print]

Garlanda C, Riva F, Polentarutti N, Buracchi C, Sironi M, De Bortoli M, Muzio M, Bergottini R, Scanziani E, Vecchi A, Hirsch E, Mantovani A (2004) Intestinal Inflammation in mice deficient in Tir8, an inhibitory member of the IL-1 receptor family. Proc Natl Acad Sci USA 101: 3522-3526

Garlanda C, Di Liberto D, Vecchi A, La Manna M, Buracchi C, Caccamo N, Salerno A, Dieli F, Mantovani A (2007) Damping excessive Inflammation and Tissue Damage in Mycobacterium tuberculosis Infection by Toll IL-1 Receptor 8/Single Ig IL-1-Related Receptor, a Negative Regulator of IL-1/TLR Signaling. J Immunol 2007; 179; 3119-3125

Garlanda C, Riva F, Bonavita E, Gentile S and Mantovani A (2013) Decoys and regulatory “receptors” of the IL-1/Toll-like receptor superfamily. Front. Immunol. 4:180. doi: 10.3389/fimmu.2013.00180

Iwasaki A & Medzhitov R (2004) Toll-like receptor control of the adaptive immune responses Review. Nature immunology volume 5 number 10: 987-995

Janeway C A, Jr (1989) Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 54:1–13

Jin Bo, Sun Tao, Yu Xiao-Hong, Yang Ying-Xiang, Yeo Anthony E T (2012) The Effects of TLR Activation on T-Cell Development and Differentiation. Clin Dev Immunol. 2012; 2012: 836485.

Literaturverzeichnis

- Köhler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-97
- Kubo 2003 Suppressors of cytokine signaling and immunity
- Lech M, Kulkarni O, Pfeiffer S, Savarese E, Krug A, Garlanda C, Mantovani A, Anders H (2008) Tir8/Sigirr prevents murine lupus by suppressing the immunostimulatory effect of lupus autoantigens. *J. Exp. Med.* Vol 205 No. 8 1879-1888
- Li X, Qin J (2005) Modulation of Toll-interleukin 1 receptor mediated signaling. *J Mol Med* 83: 258-266
- Liew F Y, Xu D, Brint E K and O'Neill L A.J. (2005) Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. *Nature reviews Immunology* volume 5: 446-458
- Luttmann W, Bratke K, Küpper M und Myrtek D (2006) *Der Experimentator Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2. Auflage
- Martinelli 2005 C, Reichhart JM: „Evolution and integration of innate immune systems from fruit flies to man: lessons and questions.“ *J Endotoxin Res.* 2005; 11(4): S. 243-248
Abstract
- Müller C, Autenrieth I, Peschel A (2005) Innate defenses of the intestinal epithelial barrier. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 1297-307
- Murphy K, Travers P and Walport M (2009) *Janeway Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 7. Auflage
- Nakazawa M, Mukumoto M, Miyatake K (2010)
Production and purification of monoclonal antibodies. *Methods Mol Biol.* 2010;657:75-91.
doi: 10.1007/978-1-60761-783-9_6.
- Nelson P N, Reynolds G M, Waldro E E, Ward E, Giannopoulos K and Murray P G (2000)
Demystified ...: Monoclonal antibodies. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2000;53: 111-117

Literaturverzeichnis

- Palm NW, Medzhitov R (2009) Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol Rev.* 2009 Jan;227(1):221-33
- Partridge LJ (1994) The production of monoclonal antibodies to membrane proteins. *Methods Mol Biol.* 27: 65-86
- Rink L, Kruse A, Haase H (2012) *Immunologie für Einsteiger.* Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg
- Riva F, Bonavita E, Barbati E, Muzio M, Mantovani A, Garlanda C (2012) TIR8/SIGIRR is an Interleukin-1 Receptor/Toll Like Receptor Family Member with Regulatory Functions in Inflammation and Immunity. *Front Immunol.* 2012; 3: 322
- Sánchez de Medina F1, Romero-Calvo I, Mascaraque C, Martínez-Augustin O (2014) Intestinal inflammation and mucosal barrier function. *Inflamm Bowel Dis.* 20(12):2394-404
- Scarpa M, Castagliuolo I, Castoro C, Pozza A, Scarpa M, Kotsafti A, Angriman I. (2014) Inflammatory colonic carcinogenesis: A review on pathogenesis and immunosurveillance mechanisms in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol.* 2014 Jun 14;20(22):6774-6785.
- Shibolet O, Podolsky D (2007) LLRs in the Gut. IV. Negative regulation of Toll-like receptors and intestinal homeostasis: addition by subtraction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292: G1469-G1473
- Schmidt D B and Corcoran L M (1994) Expression and Purification of Glutathione-S-Transferase Fusion Proteins. *Current Protocols in Molecular Biology* 16.7.1-16.7.7
- Schmidt D B and Johnson K S (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione-S-transferase. *Gene*, 67: 31-40
- Thomassen E, Renshaw BR, Sims JE (1999) Identification and characterization of SIGIRR, a molecule representing a subtype of the IL-1R superfamily. *Cytokine* 11: 389-3
- Wald D, Qin J, Zhao Z, Qian Y, Namura M, Tian L, Towne J, Sims JE, Stark GR, Li X (2003) SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol* 4: 920-927

7 Zusammenfassung

Wesentliche Fortschritte in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen wurden in den letzten Jahren anhand monoklonaler Antikörper erzielt. Passende Zielstrukturen zu identifizieren stellt oft die erste wichtige Herausforderung in der Herstellung solcher Antikörper. Für diese Arbeit lag das Augenmerk auf dem Toll-Interleukin-Rezeptor-Familienmitglied TIR8/ SIGIRR, dem seit 1998 eine entscheidende Rolle in der negativen Regulierung der Immunantwort zugeschrieben wird. Sein Einfluss konnte u.a. in der Colon-Homöostase, Nierentransplantations-Reaktionen und der Immunantwort auf Tuberkulose festgestellt werden. Dennoch konnten weder TIR8-Liganden identifiziert, noch seine Lokalisierung und sein intrazellulärer Transport geklärt werden. Da zu Beginn dieser Arbeit keine monoklonalen Antikörper zu diesem Zweck zur Verfügung standen, wurde die Herstellung, Selektion und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen TIR8 angestrebt. Die Antikörper wurden primär zur Anwendung in ELISA- und Western-Blot-Versuchen hergestellt.

SIGIRR-/ TIR8-defiziente Mäuse wurden in einem ersten Schritt jeweils mit Wildtyp-Nieren- (Maus 1) bzw. -Milz-Lysat (Maus 2) zur Produktion von Anti-TIR8-Antikörpern angeregt. Daraufhin wurde im ELISA-Versuch bei Maus 1 im Gegensatz zu Maus 2, ein signifikanter Antikörpertiter festgestellt. Dementsprechend wurde Maus 1 für die weiteren Versuche ausgewählt. Dann erfolgte die Ernte von Plasmazellen aus der Milz. Gemäß der Hybridoma-Technik von Milstein/ Köhler erfolgte die Fusion der geernteten Plasmazellen mit bereitgestellten Myelomzellen. Daraus entstanden die zur endlosen Proliferation und Antikörper-Produktion befähigten Hybridom-Zellen. Durch Verdünnung konnten die Hybridom-Zellen in Wells einer Platte statistisch isoliert und durch Kultur in einem Hybridom-Zellen-selektiven Medium zur klonalen Expansion anregt werden. Jeder Hybridom-Überstand der insgesamt mehr als 300 Klone wurde kontinuierlich auf Reaktivität und Spezifität im ELISA sowie Western-Blot getestet.

Zusammenfassung

Im indirekten ELISA wiesen 17 von insgesamt 146 generierten Klonen eine spezifische GST-mSIGIRR-Reaktivität auf. Als Baseline diente die Stärke der GST-Reaktivität. Nach Expansion und Konservierung blieben lediglich 4 von 17 einfach positiv getesteten Klonen dauerhaft positiv: 2A4, 2F9, 3E3 und 4C1. Zur Verbesserung der Antikörpereigenschaften wurden die Klone 3E3 und 4C1 exemplarisch subkloniert.

Im Verlauf erfolgte eine zusätzliche Western-Blot-Testung selektierter Antikörper: 2F9, 3E3, 4C1 und 3E3c. Alle waren in der Lage GST-mSIGIRR auf der Blot-Membran zu erkennen, allerdings zeigten sich auch deutliche Hintergrund-Signale. Die Optimierung des Versuchsaufbaus bestand in Änderungen der Blockpuffer-Zusammensetzung, des Detektions-Antikörpers und der Hybridoma-Überstands-Konzentration. Letztlich zeigte 2F9 beispielhaft eine deutliche Spezifität für mSIGIRR in einer 1:10-Verdünnung. In Folge-Studien -die nicht Teil dieser Arbeit sind, konnte eine deutliche Spezifität ausgewählter Klone nach Aufreinigung (3E3c) bzw. nach weiterer Subklonierung (4C1) erzielt werden. Die Reaktivität der Antikörper auf SIGIRR in transfizierten Zellen muss noch in weiteren Experimenten geklärt werden.

Schließlich wurden ausgewählte (weil im ELISA spezifische) Antikörper einer Isotypbestimmung mittels ELISA unterzogen. Während die Subklone 3E3c und 4C1b vorwiegend Antikörper der Klasse IgG2a sezernierten, fanden sich im 2F9-Überstand vor allem IgM-Antikörper. Hinsichtlich der Immunglobulinklasse werden sich die IgG2a-Antikörper eher für weitere Entwicklungsschritte eignen, da sich IgG-Antikörper im Allgemeinen als stabiler und therapeutisch nützlicher erwiesen haben. Die Kenntnis der Immunglobulinklassen der jeweiligen monoklonalen Antikörper dürfte ihre Reaktivität sowohl im Elisa als auch im Western-Blot steigern, weil sie eine gezielte Auswahl von Detektionsantikörpern der passenden Klasse ermöglicht. Weitere Entwicklungsschritte, die die Einsetzbarkeit der generierten Antikörper verbessern können, sind u.a.: eine Lokalisierung detektierter Aminosequenzen durch „epitope mapping“, Aufreinigungen der Antikörper-Überstände und Affinitätsmessungen der Antigen-Antikörperbindung z.B. mittels „surface plasmon resonance“.

8 Summary

In recent years, monoclonal antibodies catalysed significant advances in the treatment of autoimmune diseases. Finding the right target represents often the first major challenge in the production of such antibodies. For this work, the focus was on Toll interleukin receptor family member TIR8 / SIGIRR, which is acknowledged since 1998 to inhibit inflammatory responses in many mammalian tissues. For instance, its impact on the regulation of colon homeostasis, kidney transplantation reaction and immune response to tuberculosis has been shown in diverse mouse studies. However, TIR8 is still considered as orphan receptor, since the ligand(s) couldn't be identified yet. Furthermore, TIR8's localisation and intracellular transport still need further investigation. Since monoclonal antibodies for this purpose weren't available at the beginning of this work, we aimed to generate, select and characterize monoclonal antibodies against TIR8 that would be suitable for ELISA and western blot assays.

In order to stimulate SIGIRR-deficient mice to produce antibodies against TIR8, we proceeded in the first step by vaccinating two of them respectively with an extract from the kidney (mouse 1) or from the spleen (mouse 2) of a wild type mouse. In the following ELISA from the mouse serum, we noticed a strong immune response in serum 1, but no significant anti-SIGIRR-antibody titer in serum 2. Therefore, we collected the plasma cells from mouse 1's spleen. Following Milstein/ Köhler's method, we fused them with myeloma cells to obtain hybridoma cells, which could endlessly survive proliferation in vivo and produce antibodies. Through limiting dilution, we isolated hybridoma cells in well plates, let them proliferate in a medium in which non-hybridoma cells wouldn't survive, thus generating hybridoma clones. Then the antibody containing secretions of each of more than 300 clones were continuously submitted to ELISA and western blots, so that their reactivity and specificity could be analysed and the test conditions could be optimized.

In repeated indirect ELISA studies, it was shown that 17 within 146 overall generated clones produced a specific anti-GST-mSIGIRR-reactive antibody, judged by the relation to their

Summary

GST-reactivity as baseline. After expansion and conservation there were only 4 clones left - out of the 17 clones - which remained specifically reactive against mSIGIRR: 2A4, 2F9, 3E3 and 4C1. The clones 3E3 and 4C1 were submitted once again to a limiting dilution in order to get even more specific ones, like 3E3c. Optimizing the test conditions of our indirect GST-mSIGIRR-ELISA consisted in varying the concentrations of the antibody containing soluble and varying the blotting buffers compositions.

The western blot assays designed to determine whether the generated monoclonal antibodies would show a specific mSIGIRR-recognition were performed in many variations. Since all four selected monoclonal antibodies (2F9, 3E3, 4C1, 3E3c) showed a high rate of background signals in mSIGIRR-detection, we proceeded by repeatedly changing the buffer composition, the detecting („second“) antibody and the concentration of the antibody suspension. At last, a 1:10 diluted suspension from the 2F9 antibody could specifically detect mSIGIRR in a western blot assay. In a follow-up study (not belonging to this work) the results improved either after purification of the antibody suspension (3E3c) or after de novo cloning (4C1). Further studies will be needed to investigate, whether the antibodies can also detect SIGIRR in transfected cells.

Finally, the isotypes of the generated monoclonal were identified in the ELISA. Most 2F9 antibodies are from the IgM-type, whereas most of 3E3c and 4C1b ones belong to the IgG2a type. IgG antibodies are known to be more stable and therapeutically useful than IgM ones. The knowledge of the antibody types will furthermore help to improve the testing conditions in the upcoming ELISA as well as western blot assays, since selecting a detection antibody suitable with the respective immunoglobulin class should make the results more accurate. Further possible improvements of the testing conditions include localizing the detected amino-acid sequence through epitope mapping, purifying the antibody containing suspension and measuring the affinity of the antigen-antibody link e.g. through surface Plasmon resonance.

9 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren, Damen/Herren in Marburg
(alphabetisch):

Prof. Dr. Aumüller

Prof. Dr. Barth

Prof. Dr. Bauer

Prof. Dr. Brehm

Prof. Dr. Cetin

Prof. Dr. Czubayko

Prof. Dr. Daut

Prof. Dr. Koolman

Prof. Dr. Lill

Prof. Dr. Lohoff

PD Dr Löffler

Prof. Dr. Maier

Prof. Dr. Oertel

PD Dr. Preisig-Müller

Prof. Dr. Renz

Prof. Dr. Röhm

Prof. Dr. Röper

Prof. Dr. Rothmund

Prof. Dr. Seitz

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Prof. Dr. Sekundo

Prof. Dr. Steiniger

Prof. Dr. Vogelmeier

Prof. Dr. Wagner

Prof. Dr. Werner

PD Dr Westermann

10 Danksagung

Ein großes Dankeschön möchte ich aussprechen an...

... Prof. Dr. Stefan Bauer: für die einmalige Gelegenheit am Institut für Immunologie an zwei sehr spannenden Fragestellungen zu forschen. Besonders positiv hervorheben möchte ich die persönliche Anleitung bei kritischen Experimenten, die großartige Visualisierung der zu erreichenden Ziele und die persönliche Unterstützung in der Verarbeitung eines persönlichen Schicksalschlages.

...Dr. Andreas Kaufmann für die geduldige Anleitung bei der Laborarbeit und beim Verfassen dieser Dissertation. Seine sachliche, freundliche Art schafft stets Klarheit und bietet Geborgenheit in dem für mich neuen Feld der Grundlagenforschung. Außerdem vermittelte er mir eine präzise und dennoch unverkrampfte Herangehensweise.

... Dr. Marianne Nain, die von Anfang an, an meiner Aufnahme in dieses freundliche Team und an meiner Einarbeitung, maßgeblich beteiligt war. Sie hat immer auch einen hervorragenden Blick für die Stärken Ihrer DoktorandInnen und motiviert sie über sich hinaus zu wachsen.

...Dr. Philipp Yu für konstruktive Anregungen und eine Vorbildfunktion, was seine Hingabe an Forschungsprojekte angeht.

...Gundi Ehm, die mir vorlebte, wie gründliches Arbeiten und ebenso gründliches Dokumentieren sich, unabhängig von den Ergebnissen im Endeffekt, immer lohnen. Sie versteht es, dies stets mit einem Lächeln auf den Lippen zu bewerkstelligen und für alle hilfsbereit zu sein.

...Elfriede Klein die, wie viele zu sagen pflegten, „die gute Seele“ der Abteilung war und nun nicht mehr unter uns weilt. Die Erinnerungen an ihr sorgsam geschliffenes Können, an ihr herzhaftes Lachen, an ihre herzliche Art und unerschütterliche Nächstenliebe werden nie verblassen.

... Meine freundlichen Weggefährten in der AG Prof. Bauer, Tina von Thülen, Gernold Nees, Iris Eberhardt, Heike Schreiner, Antje Kessler, Jenny Großmann, Cornelius Menze und Wolger Lübben für den bereichernden wissenschaftlichen Austausch und für das warmherzige, witzige Miteinander.

... Zuletzt meine Eltern, die mir auf den Weg das Streben nach Erkenntnis, Erhabenheit und Ehrlichkeit mitgegeben haben. Meine Schwester Marlyse ist eins meiner größten Helden und Vorbilder; zur Kühnheit meines Bruders Bertrand blicke ich auf. Meine Familie und Freunde, insbesondere Linda und Andras, tragen mich, durch den Glauben an mich, durch dick und dünn. Zutiefst bin ich überzeugt, dass diese Menschen, diese wertvollen Erfahrungen und auch die harten Prüfungen Teil Gottes liebevollen Masterplans ist, für den ich Ihm danke und preise.