

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR
INNERE MEDIZIN II
DIREKTOR: PROF. DR. GÜNTER RIEGGER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper
gegen humanes
Interleukin-3**

Inaugural–Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt
von
Sophia Anna Katharina Scharl
aus Amberg

2014

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR
INNERE MEDIZIN II
DIREKTOR: PROF. DR. GÜNTER RIEGGER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper
gegen humanes
Interleukin-3**

Inaugural–Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt
von
Sophia Anna Katharina Scharl
aus Amberg

2014

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Matthias Mack
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Frank Schweda
Tag der mündlichen Prüfung:	21.05.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	i
1 Einleitung	1
1.1 Interleukin 3	1
1.1.1 Struktur	1
1.1.2 Effekte des IL-3.....	1
1.1.3 IL-3-Rezeptor.....	3
1.1.4 Speziespezifität des Interleukin 3 Moleküls	5
1.2 Rheumatoide Arthritis	7
1.2.1 Definition und Epidemiologie.....	7
1.2.2 Klinik der Erkrankung.....	7
1.2.3 Genetik	7
1.2.4 Behandlung	8
1.2.5 Zytokine in der Rheumatoiden Arthritis	9
1.3 Antikörper	10
1.3.1 Antikörpereigenschaften	12
1.3.2 Methoden zur Herstellung monoklonaler Antikörper.....	13
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	16
2 Material und Methoden.....	17
2.1 Laborgeräte und –materialien	17
2.1.1 Geräte	17
2.1.2 Glas- und Plastikwaren	18
2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Puffer und Reaktionsmedien.....	19
2.1.4 Gebrauchsfertige Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze	19
2.1.5 gebrauchsfertige Kits	20
2.1.6 Zytokine, Antikörper und Enzyme	20
2.1.7 Medien, Lösungen, Puffer	21
2.1.8 Antikörper für die Durchflusszytometrie	23
2.1.9 Analyse- und Bearbeitungsprogramme.....	23
2.2 Methoden.....	24
2.2.1 Tiere und Tierhaltung.....	24
2.2.2 Herstellung von Aluminiumpräzipitat	24
2.2.3 Immunisierung der Mäuse	24
2.2.4 Herstellung von Feederlayern durch Peritoneal-Lavage.....	25

2.2.5	Gewinnung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) aus Vollblut.....	25
2.2.6	Kultivierung und Lagerung eukaryonter Zellen.....	26
2.2.7	Bestimmung der Zellzahlen	26
2.2.8	Herstellung von Hybridomzellen	27
2.2.9	Subklonierung der Hybridomzellen	27
2.2.10	Gewinnung der Klonüberstände.....	28
2.2.11	HRP-Labeling der aufgereinigten Antikörper.....	28
2.2.12	ELISA (Enzym linked immuno sorbent Assay)	28
2.2.13	MTT-Proliferationsassay	32
2.2.14	Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS- PAGE).....	32
2.2.15	Western Blot	33
2.2.16	Magnetische Zellseparation	33
2.2.17	Durchflusszytometrie	34
2.2.18	Extrazelluläre Färbung.....	35
2.2.19	Blockade der IL-3 Bindung an humane Zellen (Flurokin Kit R&D)	35
2.2.20	Zellkulturansätze.....	36
2.2.21	Bezeichnung der entstandenen Klone	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Herstellung monoklonaler Antikörper gegen humanes Interleukin-3.....	39
3.2	Charakterisierung der monoklonalen Antikörper	40
3.2.1	Isotypenbestimmung.....	40
3.2.2	IgG- Konzentrationsbestimmung in den Überständen	40
3.2.3	Kreuzreaktivitäten der Antikörper.....	41
3.2.4	Epitopbestimmung	44
3.2.5	Bestimmung der relativen Affinität der Antikörper	48
3.2.6	Blockade der biologischen IL-3-Aktivität durch die hergestellten Antikörper.....	50
3.2.7	Bestimmung der IL-3 Konzentration im humanen IL-3 von PeproTech Inc.....	55
3.2.8	Blockade der IL-3 Bindung an PBMCs.....	55
3.2.9	Stimulation humaner Basophiler durch IL-3 und andere Substanzen	61
3.2.10	Stimulation humaner PBMCs durch IL-3 und andere Substanzen.....	64
3.2.11	Blockade der Stimulation durch anti-IL-3 Antikörper	65
3.3	Herstellung eines ELISAs gegen humanes IL-3.....	67
4	Diskussion.....	69
4.1.1	Herstellung Monoklonaler Antikörper	69
4.1.2	Isotypen.....	70
4.1.3	Charakterisierung der Antikörperbindungsstelle.....	71
4.1.4	Kreuzreaktivität der Antikörper.....	75

4.1.5	Blockierung der TF-1-Zellproliferation	76
4.1.6	Blockade der IL-3 Bindung an PBMCs	77
4.1.7	Herstellung eines humanen IL-3 ELISAs	79
4.1.8	Stimulationsversuche humaner Basophiler und PBMCs	79
4.1.9	Blockade der Stimulation durch Anti-IL-3 Antikörper	81
4.1.10	IL-3 in Erkrankungen	82
5	Zusammenfassung.....	85
6	Literaturverzeichnis	88
7	Abbildungsverzeichnis.....	95
8	Tabellenverzeichnis.....	97
9	Anhang.....	97
10	Danksagung.....	98
11	Eidesstattliche Erklärung.....	99

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Amper
Ab/AK	Antikörper
Abb.	Abbildung
ABTS	Diammonium-2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure
AML	Akute Myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäure
Basophile	Basophile Granulozyten
B-CLL	B-Zell Chronische Myeloische Leukämie
BSA	Rinderserum-Albumin („bovine serum albumin“)
βc	β-Kette des IL-3-, IL-5- und GM-CSF-Rezeptors („Common Beta Chain“)
C	Celsius
ca.	circa
CCR	CC-Motiv-Chemokine-Rezeptor ("CC chemokine receptor")
CD	Oberflächenproteine von Zellen („cluster of differentiation“)
CHR	Homologie Region der Zytokine („cytokin homology region“)
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis („collagen induced arthritis“)
CML	Chronische Myeloische Leukämie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
C-terminal	Carboxy-terminal
Cy	Cyanin
Fab	Antigen-bindendes Fragment („fragment antigen binding“)
Facs	Durchflusszytometrie („fluorescence activated cell sorting“)
Fc fragment	kristallisierbares Fragment („crystallizable region“)
FCS	fetales Kälberserum („fetal calf serum“)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLS	Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten („fibroblast-like synoviocytes“)
FnIII	Tandem Fibronectin Typ III
FSC	Vorwärtsstreulicht im Durchflusszytometer („forward scatter“)
ELISA	enzymgebundener Immunabsorptionstest („enzyme-linked immunosorbent assay“)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GM-CSF	„granulozyte makrophage-colony stimulating factor“
h	Stunde
HAT-Medium	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin-Medium
HGPRT	Hypoxanthinphosphoribosyltransferase
HLA	humanes Lymphozyten Antigen („human lymphocyte antigen“)
hIL-3	rekombinantes humanes IL3
HRP	horse radish peroxidase, Meerrettich-Peroxidase
H-RS-Zellen	Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen
HT-Medium	Hypoxanthin-Thymidin- Medium
H ₂ O	Wasser
i.p.	intraperitoneal
Ig	Immunglobulin
IgA	Immunglobulin A
IgD	Immunglobulin D
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
M	molar
mA	Milli-Ampere
MACS	magnetische Zellsortierung („magnetic cell sorting“)
MC ₅₀	Mittlere Hemmkonzentration
mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
mIL-3	murines IL-3

min	Minute
mmol	millimolar
µg	Mikrogramm (=10 ⁻⁶ g)
µl	Mikroliter (=10 ⁻⁶ l)
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm (=10 ⁻⁹ g)
NK-Zellen	natürliche Killer Zellen
N-terminal	NH ₂ -terminal
OD	optische Dichte
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen ("peripheral blood mononuclear cells")
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ("phosphate buffered saline")
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
pDZ	Plasmazytoide Dendritische Zellen
RA	Rheumatoide Arthritis
Rα	Alpha- Untereinheit des IL-3 Rezeptors
rIL-3	Ratten IL-3
rpm	Umdrehungen pro Minute („revolutions per minute“)
Rh IL-3	Rhesusaffen IL-3
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulfate“)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SSC	Seitwärtsstreulicht im Durchflusszytometer ("sideward scatter")
Tab.	Tabelle
TLR	Toll- like- Rezeptoren
TNF	Tumor Nekrose Faktor ("tumor necrosis factor")
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Treg Zellen	regulatorische T- Zellen
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt

1 EINLEITUNG

Zur Abwehr von Krankheitserregern und dem Erhalt der Gesundheit entwickelten Säugetiere im Laufe der Evolution das Immunsystem, das sich in angeborene und erworbene Immunität gliedern lässt. Die Zellen dieser beiden Systeme sind eng verknüpft und kommunizieren miteinander über ein kompliziertes System aus Signalmolekülen, den Zytokinen. Diese regulieren beispielsweise die Inflammation auf lokaler oder systemischer Ebene durch Aktivierung und Differenzierung verschiedener Effektorzellen, die nicht zwingend dem Immunsystem angehören. Überschießende Immunantworten auf Fremdstoffe oder körpereigene Strukturen können zu pathologischen Hypersensitivitätsreaktionen oder Autoimmunerkrankungen führen. Auch bei diesen Prozessen sind Zytokine maßgeblich beteiligt. Daher wurden sie in den letzten Jahren zu einem Angriffspunkt bei der Entwicklung neuer Therapien bei diesen Erkrankungen.

1.1 INTERLEUKIN 3

1.1.1 STRUKTUR

Interleukin 3 (IL-3) ist ein 20–26 kDa umfassendes Zytokin, welches vorwiegend von aktivierten CD4⁺ T-Zellen (1), aber auch von Mastzellen und Basophilen Granulozyten (2; 3) produziert wird. Es besteht, wie GM-CSF und IL-5, aus 4 antiparallelen α -Helices, welche durch Loop-Sequenzen miteinander verbunden sind. (4) (siehe Abb.2).

1.1.2 EFFEKTE DES IL-3

Zu den Wirkungen von IL-3 zählen sowohl hämatopoetische als auch immunmodulatorische Effekte. Auf Grund der proliferationsfördernden Wirkung auf CD34⁺-Knochenmark-Vorläuferzellen aller hämatopoetischen Zellreihen wird es Multi-CSF genannt (1; 5). Auch Wachstum und Differenzierung vieler Blutzellen wird von IL-3 gefördert. Zu diesen Zellen gehören unter anderem Neutrophile, Eosinophile, Basophile, Megakaryozyten, Makrophagen, aber auch lymphoide und erythroide Zellen (6; 7).

1.1.2.1 Wirkung auf Monozyten/Makrophagen

Monozyten sind im Blut zirkulierende Zellen, die im Gewebe zu Makrophagen ausdifferenzieren können. Sie sind Effektorzellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Ihre Hauptaufgabe ist die Präsentation phagozytierter Proteine auf ihrer Zelloberfläche und die Zytokinproduktion, welche sie zur T-Zellen-Aktivierung befähigt (8).

Die Differenzierung von Monozyten und ihrer Vorläufer zu Zellen, die in Morphologie und Funktion Osteoklasten ähneln, wurde unter Einfluss von IL-3 beschrieben (9). In Kombination mit IL-4 und TGF β unterstützt IL-3 außerdem ihre Differenzierung zu Dendritischen Zellen (10; 11). Die Expression von Oberflächenmolekülen auf Makrophagen wird durch IL-3 verändert. So wird die Expression der Major-Histocompatibility-Complex-II (MHCII)- Moleküle auf Makrophagen, Monozyten sowie Basophilen hochreguliert (12; 13). Zudem verstärkt IL-3 die Lipopolysaccharid-induzierte Sekretion von IL-1 durch Makrophagen und Mastzellen (12; 14; 15).

1.1.2.2 Wirkung auf Lymphozyten (T- und B-Zellen)

Lymphozyten sind Effektorzellen der zellulären und humoralen Immunantwort und machen ca. 35% der im Blut befindlichen Leukozyten aus. Sie werden grob in B-, T- und NK-Zellen unterteilt. B-Zellen können zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen differenzieren. T-Zellen erkennen auf MHC- Molekülen präsentierte Antigene. Man unterscheidet CD8⁺ zytotoxische T-Zellen und CD4⁺ T-Helferzellen. Zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen eliminieren von Krankheitserregern befallene Zellen, T-Helferzellen aktivieren weitere Leukozyten. (8).

IL-3 wird vorwiegend von aktivierten CD4⁺ T-Zellen gebildet; von den Effekten auf Lymphozyten ist noch wenig bekannt. *In vitro* wirkt IL-3 chemotaktisch auf Lymphozyten (16) und fördert die Ausdifferenzierung der B-Vorläuferzellen zu reifen B-Zellen (17) sowie die Bildung regulatorischer T-Zellen, welche anti-inflammatorisch wirken (siehe 1.2.5) (18).

1.1.2.3 Wirkung auf Basophile Granulozyten (Basophile) und Mastzellen

Basophile und Mastzellen entstehen aus unterschiedlichen Zelllinien, besitzen jedoch auch einige Gemeinsamkeiten. Beide exprimieren den hochaffinen IgE-Rezeptor Fc ϵ RI-Rezeptor, produzieren TH₂-Zytokine und setzen Histamin frei (19).

Basophile Granulozyten sind mit einem Anteil von 0,1- 0,5% die seltensten Leukozyten im peripheren Blut. Im Gegensatz zu Basophilen kommen Mastzellen nur im Gewebe vor (8). Sie besitzen charakteristische Oberflächenmarker, durch die sie von anderen Zellpopulationen unterschieden werden können: CD123 ist die Alpha-Untereinheit des IL-3-Rezeptors.

CD203c ist ein Aktivitätsmarker humaner Basophiler und Mastzellen (20) und wird ausschließlich von diesen und deren Vorläufern exprimiert (21). Bei Aktivierung wird dieser Marker auf der Zelloberfläche hochreguliert (22; 20). MHC II wird von Basophilen nur in geringem Maße exprimiert, jedoch deutlich auf allen Antigen-präsentierenden Zellen.

IL-3 führt zu einer sensitiveren Reaktion Basophiler auf IgE. Zum anderen werden Basophile Granulozyten auch in die Lage versetzt, lösliche Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und über MHC-Klasse-II-Moleküle an CD4⁺-T-Zellen zu präsentieren (13)

Zwar scheint die basale Blutbildung durch Ausfall des IL-3-Gens nicht beeinflusst zu sein, jedoch verläuft die Abwehr parasitärer Infektionen in IL-3- Knock-out Mäusen langsamer, was mit einer signifikant geringeren Anzahl an Basophilen und Mastzellen zu erklären ist (23).

IL-3 ist als starker Aktivator und Überlebenssignal für murine und humane Basophile bekannt. Es führt zur vermehrten Expression anti-apoptotischer Mediatoren cIAP2, Mcl-1, und Bcl-X und unterbindet die Kaspase 3-abhängige Spaltung von Bcl-2 (24). Im Zuge der Aktivierung bilden murine Basophile IL4, IL-6, IL-13 und Histamin (25; 26; 27). Die Freisetzung von IL-4, IL-13 und Histamin nach Stimulation mit IL-3 ist für humane Basophile ebenfalls beschrieben, nicht jedoch die Freisetzung von IL-6 (28; 2; 29; 30).

1.1.3 IL-3-REZEPTOR

Der IL-3-Rezeptor gehört zur gp-140-Familie der Zytokinrezeptoren. Diese besitzen eine ca. 210 Aminosäuren lange extrazelluläre Domäne, welche durch Cystein- und Tryptophanreiche Motive an ihrem N-terminalen und eine Tryptophan- Serine-X-Tryptophan-Serine (TSXTS) Sequenz am C-terminalen Ende charakterisiert ist (4; 6). Des Weiteren befinden sich Fibronectin Typ III Moleküle in der extrazellulären Domäne, von denen jeweils zwei durch eine Gelenkregion verbunden sind und daher Tandem Fibronectin Typ III (FnIII) genannt werden. Die Gelenkregion besitzt ebenfalls ein TSXTS-Motiv und wird als Cytokin Homology Region (CHR) bezeichnet (6; 31).

Die Zytokinrezeptoren der gp-140-Familie, der neben dem IL3-Rezeptor auch die Rezeptoren von GM-CSF und IL-5 angehören, sind Heterodimere, bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit. Die 140 kDa schwere Beta-Untereinheit (β c) ist für alle Rezeptoren dieser Familie identisch, lediglich die α -Untereinheiten ($R\alpha$) unterscheiden sich. Die $R\alpha$ -Einheit des IL-3 Rezeptors ist 60 bis 70 kDa schwer und spezifisch für die Bindung von IL-3 (6). Sie besteht aus einer N-terminalen Immunglobulin-ähnlichen Domäne und einer Membran-proximalen CHR-Region. Die Bindung des IL-3 Moleküls erfolgt zunächst an die Bindungsstelle von $R\alpha$ mit einer Dissoziationskonstante (K_D) von ca. 20-100 nM; durch die anschließende Heterodimerisierung wird die Bindung des IL-3 Molekül mit einer K_D von ca. 100 pM hochaffin. Die Untereinheit β c vermittelt den größten Teil der Signaltransduktion und tritt als Homodimer mit jeweils 4 FnIII-Domänen auf (31; 32).

Die Domäne 1 einer β -Untereinheit ist mit der Domäne 3 der jeweils anderen über Disulfidbrücken verbunden. Vermutlich sind an der Ligandenbindung nur die Domänen 1 und 4 beteiligt (31; 32).

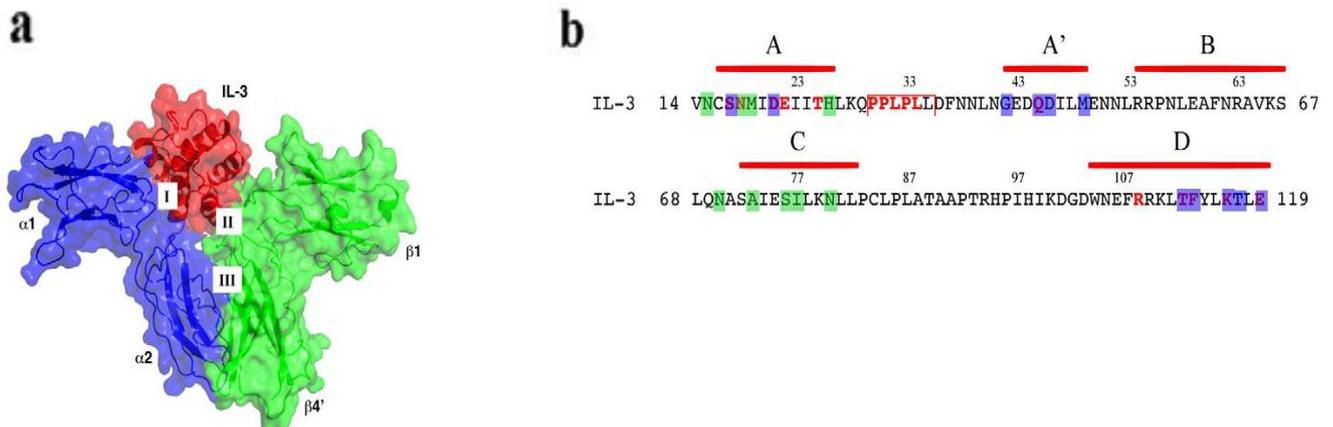


Abbildung 1: Modell der IL-3 Rezeptor-Interaktion.(A) Modell der IL-3 Rezeptor-Interaktion. Das IL-3-Molekül ist Rot dargestellt, α blau, β grün. Von dem β c Dimer sind nur die Domänen 1 und 4' abgebildet. (B) IL-3 Sequenz: IL-3 Sequenz: Helices sind durch einen roten Strich über der Sequenz dargestellt. AS, welche mit β c interagieren, sind grün hinterlegt, diejenigen, welche an α c binden, in blau. Mit roter Schrift sind AS gekennzeichnet, welche in Mutagenesestudien eine funktionelle Rolle zeigten. Modifiziert nach Dey et al, 2009 (33)

Als Rezeptorinteraktionsstellen auf Seiten des IL-3 Moleküls werden verschiedene Domänen beschrieben. Die Bindung an α erfolgt durch Domänen innerhalb der A, A' und D Helices (33); diejenige an β wird durch Aminosäuren in der A und C Helix vermittelt (33; 34; 35) (Abbildung 1).

Die intrazellulären Bereiche besitzen keine katalytischen Einheiten (6). Durch das Vorliegen der β c als Dimer und der Fähigkeit der AA' Loops des IL-3 untereinander Verbindungen zu formen, liegen die IL-3-Rezeptorkomplexe häufig als Multimere vor (33). Die Signaltransduktion am Rezeptor erfolgt über 3 verschiedene Wege: Janus-kinase (JAK)/STAT, MAP- Kinase und Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K), welche eine veränderte Genexpression hervorrufen (35).

In der Maus ist neben der gemeinsamen beta-Kette (β c) von IL-5, IL-3 und GM-CSF eine für IL-3 spezifische β -Einheit bekannt. Diese kann im Gegensatz zu β c auch in Abwesenheit der α -Untereinheit IL-3 binden. Die Signaltransduktion kommt jedoch nur durch Dimerisierung von α - und β -Einheit zustande (36; 31).

1.1.4 SPEZIESSPEZIFITÄT DES INTERLEUKIN-3-MOLEKÜLS

In dieser Arbeit wurde humanes, murines, Ratten-, Marmorsetaffen- und Rhesusaffen- IL-3 verwendet. Die IL-3-Sequenzen der genannten Spezies ähneln sich insofern, dass sie alle aus 5 Exonen und 4 Introns bestehen. Jedoch weisen die Moleküle in ihrer Aminosäure (AS)-Abfolge beträchtliche Unterschiede auf. IL-3 ist der hämatopoetische Faktor, der durch die Evolution am stärksten verändert wurde (37; 38).

Das IL-3-Molekül von Ratte und Maus unterscheidet sich in seiner Sequenz und Länge deutlich von dem des Menschen. Die Übereinstimmungen zwischen Nager- und humanem IL-3 beschränken sich auf 46,9 % (Maus-Mensch) bzw. 48,5% (Ratte-Mensch) auf DNA-Ebene und 27,7% bzw. 38,4% in der AS-Sequenz. Im Vergleich zur humanen IL-3-Sequenz besitzen die der Nager 3 Insertionen, 2 Deletionen sowie 7 zusätzliche AS am 5' und 3'-Ende.

Die Unterschiede zwischen humanem und Affen-IL-3 sind geringer. Sowohl Marmorset- (Ma-IL-3), als auch Rhesus IL-3 (Rh IL-3) ist ein aus 124 Aminosäuren bestehendes Protein. Rh IL-3 unterscheidet sich vom humanen durch ein Fehlen der 9 C-terminalen Aminosäuren und eine Substitution 23 weiterer Aminosäuren (82,5 % Homologie). Ma IL-3 zeichnet sich durch ein Fehlen der AS 11 und weiterer C-terminaler AS sowie einer Substitution von 42 AS (69,9 % Homologie) (37; 38) (Abbildung 2).

```

Hu MSRLPVLILLQLLVRPGLQAPMTQTTPFKTSW-VNCSNMIDEIITHLKQPPLPLLDFFNNLN
Ch .....S.....-.....
Rh .....H...S.....S.....-AK.....N.....SP.....
Ma ..H..I...-..S...AP...MP...TQ-.....LRE..V.L.N...ASSN.....
Mu MVLASSTI.IHTM...LM.FHL...SISGRDTHRLRTRL...SIVK...GK.P-----EPELKI
Ra MVLASSTI.I.CM..P.LM.FHQ...ISDRGSDAHLLRRLD.RTIAL...LVK.P-----VSGLN.

Hu GEDQDILMENNLRFPNLEAFNRAVKSL--QNASAIESILKNLLPCLPLATAAPTRHPPIHKD
Cu .....-.....R...
Rh E...T..V.K...S.....SK.....-.....P...M.....P...TN
Ma R...R...KP...K.....QK.....-.....A...N..D.PV...T..N.A.Q.....
Mu DDEGPS.RNKSF..V...SK.VESQGEVDPEDRYV.K.N.QK.NC...TSANDSALPGVF.R-
Ra SD.KAN.RNST...V..DE.TKSQEEFDSQDTTV.K.K.QK.KC.I.A.ASDSVLPGVYN.-

Hu GDWNEFRKRLTFY-----LKTLENAQAQQITLSLAIF#
Ch .....-.....
Rh ..R.D....K.....E...#
Ma ....D.QM..K.....IK.P.#
Mu -.LDD..K..R..MVHLND.E.VLTSRPP.PASGSVSPNRTVECF#
Ra -.LDD.KK..R..VIHLKD.QPVSVSRRPP.P.S.SDN.RPMTVECF#

```

Abbildung 2: Sequenzen des IL-3 Proteins. Die AS Sequenzen von menschlichem (Hu), Schimpansen- (Ch), Rhesusaffen- (Rh), Marmorset- (Ma), Maus- (Mu) und Ratten- IL-3 (Ra) sind dargestellt. Das Signalpeptid ist gelb hinterlegt; gleiche AS sind mit einem Punkt (.) gekennzeichnet, fehlende mit Bindestrich (-). Modifiziert nach Burger et al 1994 (37).

1.2 RHEUMATOIDE ARTHRITIS

1.2.1 DEFINITION UND EPIDEMIOLOGIE

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch-entzündliche Systemerkrankung, die mit destrukturierenden Veränderungen an Gelenken und fakultativem Organbefall einhergeht (39). Um eine schwerwiegende Beeinträchtigung der Patienten zu verhindern, ist die frühe Diagnose und Behandlung der RA unerlässlich (40). Mit einer Prävalenz von 0,5 - 1 % weltweit ist die RA die häufigste entzündliche Gelenkerkrankung, wobei Frauen dreimal häufiger als Männer betroffen sind (41). Der Altersgipfel bei Ersterkrankung liegt zwischen dem 25. und 40. Lebensjahr bzw. um das 60. Lebensjahr (42).

1.2.2 KLINIK DER ERKRANKUNG

Die Klinik der RA unterliegt starken individuellen Unterschieden. Meist (in ca. 50-65 %) zeigt die RA einen Wochen bis Monate andauernden schleichenden Beginn. In selteneren Fällen (5-10 %) ist ein akuter polyradikulärer Verlauf mit Fieber und Befall der großen Gelenke oder ein intermediärer Erkrankungsbeginn über Tage bis Wochen (ca. 20%) zu beobachten. Häufig geht dem Ausbruch der Erkrankung ein Tage bis Wochen dauerndes unspezifisches Prodromalstadium voraus.

Im Verlauf der Erkrankung bildet sich zumeist der typische symmetrische Befall der Fingergrundgelenke und der proximalen Interphalangealgelenke aus. Weiter häufig betroffen sind Hand- und Metatarsophalangealgelenke, wohingegen die distalen Interphalangealgelenke nur sehr selten in Mitleidenschaft gezogen werden. Große Gelenke werden im Allgemeinen erst nach den kleineren symptomatisch, generell kann jedoch jedes Gelenk von der RA betroffen sein.

Ein typisches Frühsymptom ist die Morgensteifigkeit und die langsam voranschreitende Atrophie der betroffenen Muskelgruppen. Ein geringer Gewichtsverlust tritt durch den Zytokinvermittelten Katabolismus und die RA-assoziierte Anorexie auf. Rheumaknoten bilden sich vorzugsweise im Ellenbogenbereich aus. Häufig ist die RA mit extraartikulären Symptomen in Lunge, Herz, Niere, Haut und Augen vergesellschaftet, deren Schweregrad mit Dauer und Schwere der Gelenkerkrankung korrelieren (43).

1.2.3 GENETIK

Eine genetische Disposition spielt, wie auch bei anderen Autoimmunerkrankungen, eine Rolle. Eine starke Assoziation von RA mit bestimmten HLA Halotypen (HLA-DR4) ist bekannt (44; 43). Verschiedene Zytokin- und Rezeptorpolymorphismen wurden mit einer Disposition für die RA korreliert, unter anderem für IL-3, TNF-alpha und IL-1 (45; 43; 46).

1.2.4 BEHANDLUNG

Die medikamentöse Therapie der RA umfasst symptomatisch wirksame Therapeutika wie Cortison und nicht-steroidale antiinflammatorische Medikamente (NSAR) sowie die erkrankungsmodulierende Therapie durch „Disease modifying anti-rheumatic drugs“ (DMARD) (47). Die Therapie sollte schon vor Diagnosesicherung beginnen. In dreimonatigen Abständen sollte das Ansprechen auf die Therapie kontrolliert und entsprechend dem Ergebnis eine Eskalationstherapie bzw. Deeskalationstherapie eingeleitet werden (48).

Die DMARDs stellen die sogenannten Basistherapeutika der Arthritisbehandlung dar. Diese sollen eine Gelenkzerstörung verzögern oder sogar verhindern. Zu dieser heterogenen Arzneimittelgruppe zählen die klassischen DMARDs und Biologica. In vielen Fällen führen die klassischen DMARDs wie Methotrexat oder Sulfasalazin nur zu einer unzureichenden Krankheitskontrolle.

Biologika sind eine Gruppe von Medikamenten, welche gezielt in die Vorgänge des Körpers eingreifen. Sie kommen zum Einsatz, wenn klassische DMARDs versagen (DGRh-Leitlinie, 2011). Die meisten für die RA zugelassenen Biologika sind gegen Zytokine gerichtet; einige weitere befinden sich noch in der Entwicklung (49) (Tabelle 1).

Die Rheumatoide Arthritis sollte inderdisziplinär behandelt werden. Dies umfasst Physiotherapie, psychologische Interventionen und Patientenschulungen. Zu den operativen Maßnahmen bei RA zählen Synovektomien und rekonstruktive Operationen (48).

Tabelle 1: Biologika mit Zulassung zur Therapie der RA.

Wirkstoff	Wirkprinzip	Hersteller
Abatacept	Fusionsprotein aus einem Immunglobulin und der extrazellulären Dömane des auf T-Zellen vorhandenen Rezeptors CTLA-4. Verhindert die Aktivierung von T-Zellen über B7 (Moreland L, 2006).	Bristol-Myers Squibb
Adalimumab	Humaner monoklonaler Antikörper gegen TNFalpha (N., 2003)	Abbott
Anakira	Interleukin -1 Rezeptorantagonist	Amgen GmbH
Certolizumab	Fab-Fragment eines humanisierten monoklonalen Antikörpers gegen TNF-alpha	UCB
Etanercept	Fusionsprotein aus TNF-Rezeptor 2 und des Fc-Anteils von humanem IgG	Pfizer
Golimumab	Humaner monoklonaler Antikörper gegen TNFalpha	Centocor Inc.
Rituximab	Chimärer monoklonaler anti CD20 Antikörper	Roche
Tocilizumab	Monoklonaler humanisierter Antikörper gegen den IL-6-Rezeptor	Hoffmann- La Roche

1.2.5 ZYTOKINE IN DER RHEUMATOIDEN ARTHRITIS

Die Ätiologie der RA ist noch nicht abschließend geklärt. Jedoch wurden verschiedene Zytokine als erkrankungsfördernd identifiziert. Die Blockade von IL-6, TNF α und IL-1 wird schon therapeutisch genutzt (Tabelle 1), die Rolle einiger weiterer (IL-15, IL-17, IL-18, IL-23, IL-21) wird derzeit untersucht (49).

Durch Versuche an Mäusen mit Kollagen-Induzierter Arthritis (CIA) wurde 2009 auch Interleukin-3 als wichtiger Faktor in der Entstehung der RA beschrieben.

Die Blockade von IL-3 beeinflusst den Krankheitsverlauf positiv. In der Frühphase der Arthritisentstehung führt eine intraperitoneale (IP) Applikation blockierender Antikörper zu einer deutlichen Verbesserung der Erkrankung. In den Gelenken der behandelten Mäuse fanden sich deutlich weniger Leukozyten, besonders Basophile, CD11⁺, Monozyten und IL-6. Histologisch konnten eine geringere Proliferation der Synovia und weniger Knochendestruktion festgestellt werden. Zudem waren die Anti-Kollagen-Antikörper im Plasma wie auch die Basophilen im peripheren Blut vermindert. Umgekehrt führte IP-Injektion von IL-3 in der Anfangsphase der RA zu einer Verschlechterung der Erkrankung, erhöhten Spiegeln von IL-6 und Basophilen im peripheren Blut. In der fortgeschrittenen RA scheint IL-3 keine Rolle zu spielen (26).

Im Zuge der Entzündung in der RA werden CD4⁺- Zellen der Milz bei Vorhandensein costimulatorischer Zellen zur Ausschüttung von IL-3 angeregt. IL-3 wirkt nicht nur auf Monozyten und Neutrophile, den überwiegenden Zellen in entzündeten Gelenken, sondern auch auf Basophile Granulozyten (26). Die Aktivierung dieser Zellpopulation durch IgE war in der CIA mit einer deutlichen Verschlechterung der Erkrankung verbunden (50). Als Reaktion auf eine Stimulation mit IL-3 schütten Basophile und Monozyten das arthritidfördernde IL-6 aus (26). Zudem fördern Basophile die Proliferation von B-Zellen sowie ihre Ausdifferenzierung zu Plasmazellen (51)

Es gibt jedoch auch widersprüchliche Publikationen. Yogesha et al. zeigten 2009 am Modell der Inflammatorischen Arthritis, dass hohe Mengen an IL-3 durch eine Inhibition von TNF α *in vitro* die Knochenerosion und *in vivo* die Inflammatorische Arthritis verhindern kann. Die von ihnen beschriebene Hemmung der Knochenerosionen und der durch TNF α , M-CSF und RANKL induzierten Osteoklastogenese durch IL-3 wurde auch in anderen Publikationen beschrieben (52; 53; 54; 55). Jedoch existieren auch Publikationen, welche gegenteilig eine vermehrte Osteoklastogenese aus Knochenmarkvorläuferzellen und Monozyten unter dem Einfluss von IL-3 beobachteten (56; 57).

Zudem soll IL-3 den Prozentsatz an regulatorischen T-Zellen (Treg-Zellen) dosisabhängig erhöhen. Diese Zellen haben einen dämpfenden Effekt auf die Immunantwort und unterdrücken die Vermehrung von Effektor-T-Zellen. Die Induktion von Treg-Zellen geschieht durch die Stimulation anderer T-Zellen zur IL-2-Produktion. Im CIA-Modell zeigt sich, dass IL-3-Injektionen den Schweregrad der Erkrankung vermindern, die Anzahl an Treg-Zellen erhöhen, die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-17A, TNF- α und IL-1 vermindern und die antiinflammatorischen Zytokine IFN- γ und IL-10 erhöhen (18) .

1.3 ANTIKÖRPER

Antikörper sind Y-förmige Moleküle, welche von Plasmazellen gebildet werden und der humoralen Immunantwort angehören (Abbildung 3). Sie bestehen aus zwei identischen leichten und zwei identischen schweren Ketten, welche über Disulfidbrücke verbunden sind. Sowohl die leichten als auch die schweren Ketten besitzen sogenannte Ig-Domänen. Als Ig-Domänen werden zwei antiparallele β -Faltblätter bezeichnet, von der sich in der leichten Kette zwei (eine konstante und eine variable Domäne), in den schweren Ketten vier bis fünf (drei bis vier konstante und eine variable Domäne) befinden. Die leichten Ketten sind ca. 24 kDa, die schweren 55-70 kDa schwer. Des Weiteren können Antikörper in einen konstanten Anteil (Fc) und zwei antikörperbindende Fragmente (Fab) unterteilt werden, welche durch eine Gelenkregion verbunden sind. Der Fc-Anteil besteht aus den beiden schweren Ketten. Er bindet keine Antigene, jedoch an Antikörperrezeptoren der Zellen und vermittelt ihre Aktivierung. Auch die Komplementaktivierung wird durch den Fc-Teil vermittelt. An den Fab-Fragmenten, die von je einer leichten und einer schweren Kette gebildet werden, befindet sich N-terminal eine variable Region mit Antigenbindungsstelle, über die Antigene mit hoher Spezifität und Affinität im Schlüssel-Schloss-Prinzip gebunden werden. Die Antigenbindungsstelle eines Antikörpers wird Epitop genannt. Durch hypervariable Regionen im Genom, welche für diesen Antikörperanteil kodieren, kommen theoretisch über 10^9 verschiedene Antigenbindungsstellen zustande. Jeder Plasmazellklon produziert jedoch nur einen bestimmten Antikörpertyp mit einer ganz bestimmten variablen Region (58; 59; 8).

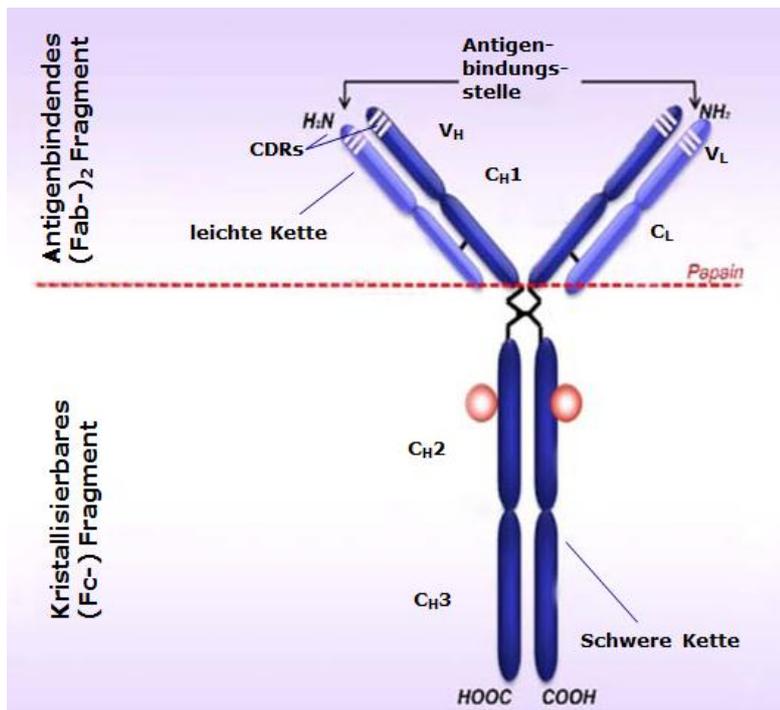


Abbildung 3: Aufbau eines Antikörpers. Modifiziert nach Sesarman et al, 2010 (60).

Antikörper kommen im Körper frei oder membrangebunden vor. Im letzteren Fall interagiert der Fc-Anteil mit der Plasmamembran eines B-Lymphozyten. Die Fc-Teile der Antikörper unterscheiden sich je nach Antikörperklasse, die von der Klasse der schweren Kette abhängig ist. In Mensch und Maus gibt es 5 verschiedene Klassen bzw. Isotypen: IgM, IgG, IgA, IgD, IgE. Im Menschen existieren Unterklassen des IgA- (IgA₁, IgA₂) und IgG-Isotyps (IgG₁, IgG₂, IgG₃ und IgG₄), wohingegen in der Maus lediglich IgG-Unterklassen unterschieden werden (IgG₁, IgG_{2α}, IgG_{2β}, IgG₃) (8).

Die Antikörperklassen unterscheiden sich sowohl in der Funktion als auch in der Struktur.

IgM-Antikörper sind Pentamere, welche über ein cystinreiches „Joining“- Peptid verbunden sind. Ihre konstante Region besitzt vier Ig-Domänen. Sie werden beim Erstkontakt mit einem bestimmten Antigen gebildet, kommen jedoch auch auf naiven B-Zellen als Antigenrezeptor vor. IgM ist der stärkste Komplementaktivator unter den Antikörpern. IgG kommt im Organismus als Monomer vor. Mit einer Konzentration um die 13,5 mg/ml ist es die im Serum häufigste Antikörperklasse. Wie die konstante Region der Isotypen IgA und IgD besteht ihre konstante Region aus drei Ig-Domänen. Die Antikörper werden verzögert gebildet, bleiben mit einer Serum-Halbwertszeit von 23 Tagen jedoch auch am längsten erhalten. Zudem können sie die Plazentaschranke passieren. Das Immunglobulin IgA vermittelt den Schutz auf Schleimhäuten und außerdem durch die Muttermilch die Immunität des Neugeborenen. Sezerniert wird IgA in Form eines Dimers, deren Anteile durch ein Joining Peptid verbunden sind. Im Serum ist IgA nur in sehr geringen Mengen vorhanden (0,5 mg/ml) und wird mit einer Halbwertszeit von 2 Tagen sehr schnell abgebaut. IgD kommt als B-Zell-Rezeptor auf reifen, naiven B-Zellen vor. (61; 62; 8)

Es stimuliert die Vermehrung und Differenzierung der B-Zellen bei Antigenkontakt. IgE ist ein Monomer mit 4 Ig-Domänen und dient der Parasitenabwehr. Sein Fc-Teil kann von Mastzellen gebunden werden. Bei wiederholtem Antigenkontakt werden die Antikörper durch Antigene quervernetzt und führen zur Ausschüttung von Histamin durch die Mastzellen. Durch diese Eigenschaft spielt es auch in der Allergie eine wichtige Rolle. (61; 62; 8)

Auch bei den leichten Ketten können zwei Klassen unterschieden werden. 60% der Antikörper im menschlichen Organismus haben leichte Ketten des kappa-Isotyps, 40% des lambda-Isotyps. In der Maus ist die Verteilung von kappa zu lambda ungefähr 10:1. Im Gegensatz zu den Isotypen der schweren Ketten sind zwischen kappa- und lambda-Ketten keine funktionellen Unterschiede bekannt (8).

1.3.1 ANTIKÖRPEREIGENSCHAFTEN

1.3.1.1 Antigenpezifität

Die Bindung eines Antikörpers an lediglich ein bestimmtes Antigen wird Antigenpezifität genannt. Schon geringe Strukturänderungen wie beispielsweise die Substitution einer einzigen Aminosäure können die Bindung von Antikörpern an ein bestimmtes Antigen deutlich vermindern. In einigen Fällen binden Antikörper jedoch auch an strukturell ähnliche Antigene, was als Kreuzreaktivität bezeichnet wird (8).

1.3.1.2 Antigenaffinität

Die Affinität eines Antikörpers bezeichnet die Stärke der Bindung zwischen einem Antigenepitop und einer Antigenbindungsstelle des Antikörpers. Sie wird durch eine Reihe nicht-kovalenter Anziehungskräfte vermittelt, wie elektrostatische Anziehung, Wasserstoff-Brückenbindungen, Van-der-Waals- und hydrophobe Kräfte. Die Affinität eines Antikörpers wird über die Dissoziationskonstante K_D beschrieben. Diese gibt an, ob Antigen und Antikörper in einem stabilen Gleichgewicht eher dissoziiert oder als Komplex vorliegen. Die Affinität eines Antikörpers hängt in erster Linie von der Aminosäuresequenz seiner Antikörperbindungsstelle ab. Bei einer normalen humoralen Immunantwort werden Antikörper mit K_D von $10^{-7}M$ bis $10^{-11}M$ produziert (8).

Da sowohl Antikörper als auch Antigene mehrere Bindungsstellen besitzen können, erfolgt die tatsächliche Bindung eines Antikörpers an Antigene meist stärker als seine Affinität vermuten ließe. Diese Bindungsstärke wird als Avidität bezeichnet. Durch eine hohe Avidität kann eine geringe Affinität der einzelnen Antikörperbindungsstellen kompensiert werden. Dies geschieht beispielsweise bei der primären Immunantwort, die durch hoch-avide, meist niedrig affine pentamere IgM-Antikörper vermittelt wird (8).

Die Affinität der Antikörper verändert sich während einer Immunantwort durch die so genannte Affinitätsreifung. In antigenstimulierten B-Zellen finden somatische Mutationen statt, welche zu Veränderungen in der variablen Region führen. Einige dieser Mutationen führen zu einer höheren Affinität, andere zu einer niedrigeren. Starke Bindungen des Antigens an membranständige Antikörper führen zu einem Überlebenssignal an die jeweiligen B-Zellen. So wird sichergestellt, dass nur Zellen mit hochaffinen Antikörpern überleben. Dadurch verändern sich die K_D -Werte der Antikörper im Serum von 10^{-7} bis 10^{-9} bei Erstkontakt zu 10^{-11} bei erneutem Antigenkontakt (8).

1.3.1.3 Monoklonale Antikörper

Der Ausdruck monoklonal bezeichnet Antikörper, die nur von einem Klon produziert werden und daher alle die gleichen biologischen Eigenschaften besitzen und spezifisch gegen das gleiche Epitop des Antigens gerichtet sind.

1.3.2 METHODEN ZUR HERSTELLUNG MONOKLONALER ANTIKÖRPER

1.3.2.1 Hybridomtechnik nach Köhler und Milstein

Die am weitesten verbreitete Methode zur Herstellung monoklonaler Antikörper ist die Hybridomtechnik nach George Köhler und César Milstein (63). Diese Technik beruht auf der Fusion Antikörper-produzierender B-Zellen mit unsterblichen Myelomzellen und anschließender Selektion derjenigen Zelle, welche den gewünschten Antikörper produziert.

Um Antikörper einer bestimmten Spezifität zu erhalten, werden zunächst Mäuse oder Ratten mit einem Antigen immunisiert. Die Milzzellen dieses Tiers werden mit Myelomzellen fusioniert. Dies kann unter anderem durch Polyethylenglykol oder wie bei Köhler 1976 durch den aktivierten Sendai-Virus erfolgen (8).

Um zu gewährleisten, dass ausschließlich Hybridomzellen überleben, werden die Zellen in dem Selektionsmedium HAT kultiviert (64). Diesem Medium ist Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin zugesetzt. Aminopterin, ein Folsäureanalogon, hemmt das Enzym Dihydrofolatreduktase, welches für die Herstellung der Nukleotidvorläufer nötig ist. Dadurch sind in diesem Medium nur Zellen zur DNA-Synthese fähig, die in der Lage sind, diese Stoffe über den Salvage Pathway unter Zusatz von Hypoxanthin und Thymidin zu synthetisieren. Salvage Pathway bezeichnet die Synthese von Purinen aus Hypoxanthin über das Enzym Hypoxanthin- Guanin Phosphoribosyltransferase (HGPRT) und Thymidin Monophosphat aus Thymidin durch das Enzym Thymidinkinase (TK). *In vitro* nicht teilungsfähige Milzzellen sind hierzu in der Lage. Da die verwendeten Myelomzelllinien keine HGPRT oder TK besitzen, können Myelomzellen in diesem Medium nicht überleben (8).

Somit können in HAT-Medium nur Zellen überleben, die sowohl die DNA der Myelomzellen als auch diejenige der Milzzellen besitzen (Abbildung 3) (8).

Anschließend werden die Hybridomzellen soweit vereinzelt, dass alle in einem Well wachsenden Klone von einer Zelle abstammen. Somit sind alle Antigenbindungsstellen der Antikörper gegen das gleiche Epitop gerichtet und der Antikörper ist monoklonal (8). Durch Testung der Zellüberstände werden diejenigen Hybridoma aufgespürt und kultiviert, welche die gewünschten Antikörper bilden.

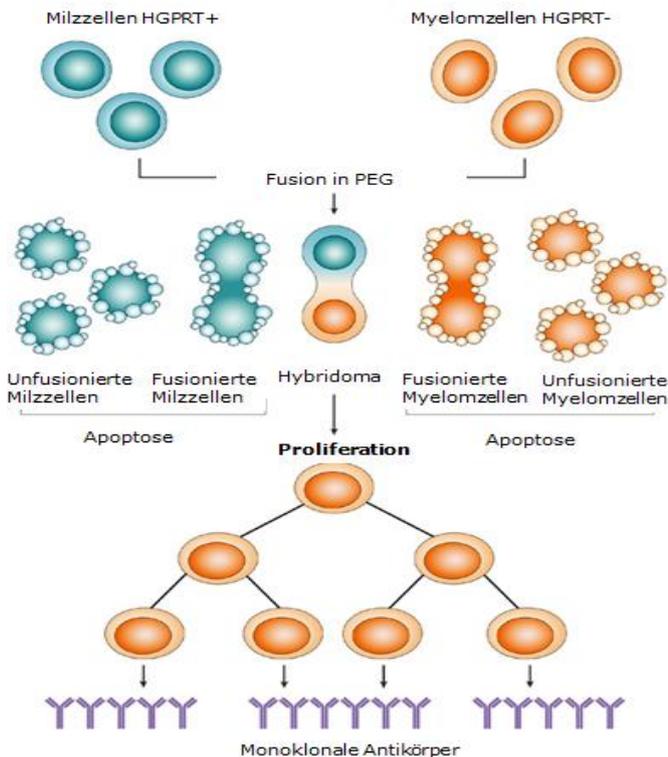


Abbildung 4: Hybridomtechnik zur Herstellung monoklonaler Antikörper. Modifiziert nach Alkan, S 2004 (65)

1.3.2.2 EBV-induzierte Immortalisierung von B-Zellen

Eine weitere Möglichkeit B-Zelllinien zu immortalisieren ist die Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus. Die DNA des EB-Virus integriert sich in das Genom der Gedächtnis-B-Zellen und führt zu einer Proliferation dieser Zellen (66). Die vormals geringe Effizienz dieses Transformationsvorganges konnte durch TLR-Agonisten deutlich verbessert werden (67). Um Antikörper gegen einen bestimmten Keim zu erhalten, wurden gegen diesen gerichtete IgG⁺ Memory B-Zellen aus dem Blut infizierter Patienten isoliert, anschließend durch EBV und einen TLR-Agonisten immortalisiert und kultiviert. Die Konzentration der monoklonalen Antikörper im Überstand bewegte sich zwischen 3 und 20 µg/ml (68) (Abbildung 5).

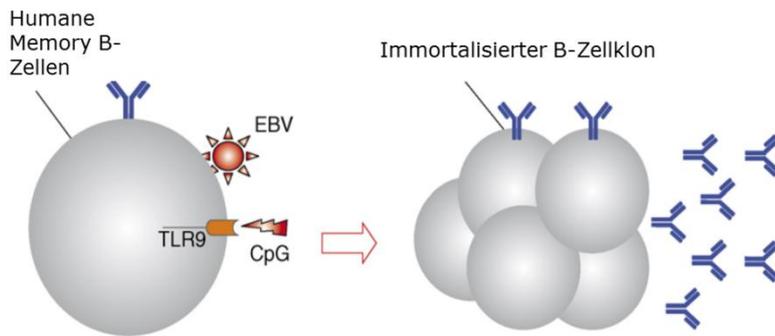


Abbildung 5: Schema der EBV-induzierten B-Zellimmortalisierung. B-Zelle wird durch den Epstein-Barr-Virus und einen Ligand am Toll-like-Rezeptor 9 immortalisiert. Modifiziert nach Lanzavecchia A. et al 2007 (67).

1.3.2.3 Klonierung von leichten und schweren Ketten

Tiller et al publizierten 2008 eine weitere Methode zur Herstellung monoklonaler Antikörper. Die Autoren isolierten B-Zellen aus humanem Blut und Knochenmark.

Aus der gewonnenen B-Zell-Population wurden per RT-PCR die variablen Regionen der leichten und schweren Antikörperketten amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in eukaryontischen Expressionsvektoren kloniert, welche die konstanten Regionen des humanen IgG1, Ig kappa oder Ig lambda enthalten. Aus den Vektor-enthaltenden Bakterienkolonien wurden gleiche Mengen an IgG und Ig λ Vektoren in Human embryonic kidney Zellen transfiziert. 85% der Transfizierten Klone produzierten monoklonale Antikörper in Konzentrationen zwischen 1 $\mu\text{g/ml}$ bis 20 $\mu\text{g/ml}$ (Durchschnitt 5 $\mu\text{g/ml}$) (69). 2009 führten Tiller, Busse und Wardemann mit einer vergleichbaren Technik die Produktion von Antikörpern aus murinen B-Zellen durch (70). Bei dieser Technik ist wie auch bei der EBV-Immortalisierung keine Subklonierung nötig, da die gewonnenen Kulturen monoklonale Antikörper produzieren.

1.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

In der Frühphase der Rheumatoiden Arthritis wird Interleukin-3 ein erkrankungsfördernder Effekt zugesprochen. Im Tiermodell führte eine Blockade des IL-3 durch monoklonale Antikörper zu einer deutlichen Verbesserung der Erkrankung. Ziel der Arbeit war es, Antikörper gegen Interleukin-3 herzustellen und diese zu charakterisieren. Idealerweise sollten die entstandenen Antikörper den Isotyp IgG aufweisen, gegen ein lineares Epitop gerichtet sein, die biologischen Eigenschaften des IL-3 blockieren und in einem Tiermodell zu testen sein, was eine Kreuzreaktivität gegenüber dieser Spezies voraussetzt.

Hierfür wurden die Isotypen, die Kreuzreaktivitäten gegenüber IL-5, GM-CSF, Rhesusaffen-, Ratte- und Maus-IL-3 und die jeweiligen Affinitäten der Antikörper bestimmt. Zur Bestimmung der Epitope erfolgte zunächst ein Western Blot. Die Bindungsstellen der gegen lineare Epitope gerichteten Antikörper wurden anhand von Peptiden, welche die Sequenz des IL-3 beinhalten, genauer ermittelt.

Um die blockierenden Eigenschaften der Antikörper zu testen, wurden mehrere Versuche durchgeführt. Zunächst wurde geprüft, ob die Proliferation von IL-3-abhängigen Zellen durch Zugabe der Antikörper unterbunden werden kann. In einem weiteren Versuch wurde durchflusszytometrisch getestet, ob die Bindung des IL-3 an mononukleäre Zellen des Blutes durch die Antikörper verringert wird. Zum Abschluss wurde untersucht, ob die Antikörper die Freisetzung von Zytokinen durch Basophile unterbinden, da diese für die Wirkung des IL-3 in der RA verantwortlich gemacht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 LABORGERÄTE UND –MATERIALIEN

2.1.1 GERÄTE

Tabelle 2: Geräte

Laborgeräte	Bezugsquellen
Analysewaage	Sartorius, Göttingen
Brutschränke BBD 6220	Thermo Scientific, Hanau
Chirurgische Instrumente	Fine Science Tools, Heidelberg
Digitalkamera Nikon D70	Nikon, Düsseldorf
Durchflusszytometer FACSCalibur, Durchflusszytometer FACSCantoll	BD Biosciences, Heidelberg
Durchlichtmikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Jena
EMax® precision microplate reader	MWG Biotech, Ebersberg
Entwickler „Curix 60“	Agfa, Mortsel, Belgien
„Thermomixer“ Eppendorf-Cup-Rüttler	Eppendorf, Hamburg
Kryobox	Nalgene, Rochester, USA
Magnet Octo-, QuadroMACS Separator, Multi-Stand	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Pipetten (P10, P20, P100, P200, P1000)	Gilson, Bad Camberg
Pipetten (Mehrkanalpipette)	Brand, Wertheim
Pipetten (Multipette plus)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetboy acu	ISB Integra Biosciences, Chur, Schweiz
Schüttler für Western Blot Membranen	IKA Labortechnik, Staufen
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-System	BioRad, München
Spannungsquelle „Standard Power Pack 25“	Biometra, Göttingen
„Vortex Genie“ Kleinschüttler	Scientific Industries, San Diego, USA
Western-Transferkammer	Peq Lab, Erlangen
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Eschborn
Wasserbad	GFL, München
X-Ray Cassette	REGO, Augsburg
Zentrifuge (Centrifuge 5417 R)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge (Megafuge 16 R)	Thermo Scientific, Hanau

2.1.2 GLAS- UND PLASTIKWAREN

Tabelle 3: Glas- und Plastikwaren

Glas- und Plastikwaren	Bezugsquellen
Einmalskalpell (No. 10; No. 11)	Pfm, Köln
Einmalspritzen (1 ml, 2 ml, 10 ml, 20 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
ELISA-Platte Maxisorb S96	Nunc, Roskilde, Dänemark
Kanülen BD Microlance 3 (27Gx3/4“, 26Gx1/2“)	BD Biosciences, Heidelberg
Kanülen (Butterfly)	Sarstedt, Nümbrecht
Kryovials	Nalgene, Rochester, USA
Neubauer Zell-Zählkammer	Brand, Wertheim
Nylonsiebe (Cell Strainer 70 µm)	BD Falcon, Le Pont de Claix, Frankreich
Petrischalen (35 x 10, 60 x 15, 100 x 20 mm)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (300 µl)	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen (Combitips)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (mit Filter 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Plasmaröhrchen (9ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Polystyrolröhrchen für Durchflusszytometer	BD Falcon, Le Pont de Claix, Frankreich
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilme	GE Healthcare, Wien
Separationssäulen (LS Columns)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Serumröhrchen (7,5ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten Flachboden 24-Well/48-Well, Zellkulturplatten Flach-/Rundboden 96-Well	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	BD Falcon, Le Pont de Claix, Frankreich

2.1.3 CHEMIKALIEN, REAGENZIEN, PUFFER UND REAKTIONSMEDIEN

Tabelle 4: Chemikalien, Reagenzien Puffer und Reaktionsmedien

Chemikalien	Bezugsquellen
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
2,2'-Azino-di-(3-Ethylbenzthiazolin)-6-Sulfon-ABTS-Puffer 10x, (Säurepuffer) ABTS-Tabletten	Roche, Mannheim
Acrylamid Stammlösung	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Bovines Serumalbumin (BSA) (Fraktion V)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Counting beads für die Durchflusszytometrie	Caltag/Invitrogen, Karlsruhe
Developer	Agfa, Mortsel, Belgien
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roche Diagnostics, Mannheim
Ethanol reinst (75 Vol.-%)	J.T. Baker, Griesheim
FACSLysing Solution, FACSClean, FACSTFlow, FACSRinse	BD Biosciences, Heidelberg
Ficoll 400	Serva, Heidelberg
Horse radish peroxidase gekoppeltes Streptavidin (HRP-Streptavidin)	BD Biosciences, Heidelberg
IgG1 Kappa from murine myeloma	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Laurylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchloridlösung (NaCl-Lösung), Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Polyethylene Glycol 1500 (PEG 1500)	Roche Diagnostics, Mannheim
Rapid Fixer	Agfa, Mortsel, Belgien
Tris-HCL	Amersham Biosciences, München
Tryptanblaulösung	USB, Cleveland, USA
Türkische Lösung, Tween 20	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄), Wasserstoff-peroxid (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt

2.1.4 GEBRAUCHSFERTIGE ZELLKULTURMEDIEN UND ZELLKULTURZUSÄTZE

Tabelle 5: Gebrauchsfertige Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze

Zellkulturmedien und -zusätze	Bezugsquellen
Aqua dest.	BBraun Melsungen Ag, Melsungen
β-Mercaptoethanol 14,3 M	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Fetales Kälberserum (FKS Gold, hitzeinaktiviert 1 h, 56 °C)	PAA, Cölbe
Natriumpyruvat, Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA), Penicillin, Streptomycin, RPMI 1640 Medium (Roswell Park Memorial Institute) mit L-Glutamin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin (50x) (HAT), Hypoxanthin, Thymidin (50x) OPI Media Supplement (50x), OPI Media Supplement (50x)	Sigma Aldrich, Taufkirchen

2.1.5 GEBRAUCHSFERTIGE KITS

Tabelle 6: Gebrauchsfertige Kits

Kits	Bezugsquelle
Basophilen Isolation Kit II human	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Duo Set ELISA (Human)	R&D Systems, Abington, UK
Fluorokine® Biotinylated Human IL-3	R&D Systems, Abington, UK
IL-13 Human Ultrasensitive ELISA Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Lightening Link HRP Conjugation Kit	Innova Biosciences, Babraham, UK
MTT Cell Proliferationsassay	ATCC LGC Standards, Wesel

2.1.6 ZYTOKINE, ANTIKÖRPER, ENZYME

Tabelle 7: Zytokine, Antikörper und Enzyme

Zytokin/Antikörper	Bezugsquelle
Anti-Mouse IgG (whole molecule)–Peroxidase antibody produced in rabbit	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Anti- PE Beads	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Biotin Rat Anti-Mouse IgG1 (Klon A85-1)	BD Biosciences, San Jose, USA
Goat IgG purified Immunglobulin reagent grade	R&D Systems, Abington UK
human IL-3 Antibody (monoclonal purified Mouse IgG) Klon 4806	R&D Systems, Abington UK
Human IL-3 Affinity Purified Polyclonal Ab, Goat IgG	R&D Systems, Abington UK
IgG1 Kappa from murine myeloma, Klon MOPC21	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Purified mouse IgG1 kappa Isotype Control, Klon MOPC21/P3	eBioscience, San Diego, USA
Purified Rat Anti-Mouse IgG1 (Klon A85-3)	BD Biosciences, San Jose, USA
Recombinant Human Complement component C5a/CF	R&D Systems, Abington UK
Rekombinante Human GM-CSF/IL-5/IL-3	PeptoTech Inc., Rocky Hill, USA
Recombinant Rat IL-3	BD Biosciences, San Jose, USA
Recombinant murine IL-3	PeptoTech Inc., Rocky Hill, USA
IL-3-Peptid 1 APMTQTTPLKTSWVNCNMIDEIITHL	EZBiolab, Carmel, USA
IL-3-Peptid 2: EIITHLQPPPLLLDFNNLNGEDQDIL	EZBiolab, Carmel, USA
IL-3-Peptid 3: EDQDILMENNLRPNLEAFNRAVKSQ	EZBiolab, Carmel, USA
IL-3-Peptid 4: AVKSLQNASAIESILKNLLPCLPLA-TA	EZBiolab, Carmel, USA
IL-3-Peptid 5: LPLATAAPTRHPIHIKGDWNEFRRKL	EZBiolab, Carmel, USA
IL-3-Peptid 6: EFRRKLTFFYLKTLNAQAQQTTLAIF	EZBiolab, Carmel, USA
IL3-Pepid 1A APMTQTTPLKTSWAKCSNMIDEII	EZBiolab, Carmel, USA
IL3- Peptid 1B: APMTQTTSLKTSWVNCNMIDEII	EZBiolab, Carmel, USA
IL3- Peptid 1Ma: AAPTQTMPLKTTQVNCNLREEIVTL	EZBiolab, Carmel, USA

2.1.7 MEDIEN, LÖSUNGEN, PUFFER

2.1.7.1 Western Blot

Tabelle 8: Medien, Lösungen, Puffer für den Westernblot

Trenngel - Trispuffer pH 8.8	90.83g/500ml H ₂ O(1.5M) Tris-HCl , pH 8.8
Sammelgel - Trispuffer pH 6.8	30g/500ml H ₂ O (0.5M) Tris-HCl pH 6.8
Laemmli- SDS Probenpuffer (2x)	10ml/50ml (20%)Glyzerin, 5ml/50ml 125mM Trispuffer pH6.8, 2g/50ml (4%) SDS, 10mg/50ml (0.02%), Bromphenolblau, 5ml/50ml (10%)2-Mercaptoethanol
Elektrodenpuffer (5x):	10g/2l (40mM)Tris base, 144g/2l (0.95M) Glyzin, 10g/2l (0.5%)SDS
Sammelgel	0.85 ml Acrylamid-Stammlsg. 30%ig, 1.25 ml Trispuffer pH 6.8, 2.8 ml Aqua bidest, 50µl SDS-Lsg. 10%ig, 50µl APS 10%ig, 10µl TEMED
Trenngel 12 %ig	4.00 ml Acrylamid-Stammlsg. 30%ig, 2.5ml Trispuffer pH 8.8, 3.3ml Aqua bidest., 100µl SDS-Lsg. 10%ig, 100µl APS 10%ig, 5µl TEMED
Transfer Puffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,02% SDS, 20% Methanol
Blocklösung	5% Magermilchpulver, 0,5% Tween 20, 1x PBS
Waschlösung	1x PBS

2.1.7.1 ELISA

Tabelle 9: Medien, Lösungen, Puffer für ELISA

ELISA (nicht kommerziell)	
Coating- Puffer	1x PBS
Blocklösung/Verdünnungsmedium	2% BSA/PBS
Entwicklungslösung	ABTS- Tablette in 50ml ABTS-Puffer
Waschpuffer	0.05% Tween in PBS
ELISA (Duo Set)	
Coating- Puffer	1x PBS
Blocklösung/Verdünnungsmedium	1% BSA/PBS
Entwicklungslösung	10ml Citrat- Phosphat- Puffer (pH 5.0) TBS-Tablette, 2µl H ₂ O ₂
Stopplösung	12.5% Schwefelsäure
Waschpuffer	0.05% Tween in PBS
ELISA (Invitrogen)	
Verdünnungsmedium	Standard Diluent Buffer (0.1% Sodium azide); im Kit vorhanden
Entwicklungslösung	Tetramethylbenzidin; im Kit vorhanden
Stopplösung	im Kit vorhanden
Waschpuffer	im Kit vorhanden

2.1.7.3 Zellisolation

Tabelle 10: Medien, Lösungen, Puffer für die Zellisolation

MACS Puffer	2 mM EDTA; 0,5 Gew.-% BSA in 1x PBS
10x PBS	1,8 mM KH ₂ PO ₄ ; 10,3 mM Na ₂ HPO ₄ 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl ₂ in Aqua dest.

2.1.7.4 Zellkulturmedien

Tabelle 11: Medien, Lösungen, Puffer für die Zellkultur

Kulturmedium für TF-1- und X63Ag8-Zellen	500 ml RPMI 1640, 10% FCS
HAT- Medium	500 ml RPMI 1640, 62.5 ml FCS, 10 ml HAT-Stammlösung, 5 ml Penicillin/Streptomycin-Stammlösung, 5ml L-Glutamin
HT- Medium	500 ml RPMI 1640, 62.5 ml FCS, 10 ml HT-Stammlösung, 5 ml Penicillin/Streptomycin-Stammlösung, 5ml L-Glutamin
OPI- Medium	500 ml RPMI 1640, 62.5 ml FCS, 5 ml OPI-Stammlösung, 5 ml Penicillin/Streptomycin-Stammlösung, 5ml L-Glutamin
115- Medium	500 ml RPMI 1640, 62.5 ml FCS, 5 ml OPI-Stammlösung, 5 ml Penicillin/Streptomycin-Stammlösung, 5ml L-Glutamin, 5ml Na-Pyruvat, 5ml Non-essentielle Aminosäuren, 1.8 µl β-Mercaptoethanol
Wachstumsmedium für TF-1 Zellen	500 ml RPMI 1640, 50 ml FCS, 5 ml Penicillin/Streptomycin- Stammlösung, 5ml L-Glutamin, 5ng/ml IL-3/ GM-CSF
Einfriermedium	Kulturmedium, 5% DMSO
Standardmedium	500ml RPMI 1640, 50 ml FCS, 5 ml Penicillin/Streptomycin- Stammlösung, 5ml L-Glutamin

2.1.7.5 Zelllinien

Tabelle 12: Zelllinien

TF1- Zellen	Wachstumsfaktor-abhängige, hämatopoetische Zelllinie
X63Ag8- Zellen	Myelomzelllinie der Maus

2.1.8 ANTIKÖRPER FÜR DIE DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Tabelle 13: Antikörper für die Durchflusszytometrie

Spezifität	Konjugat	Klon	Bezugsquelle
CD63	PE	H5C6	BD Biosciences, San Jose, USA
CD123	PE-Cy5	9F5	BD Biosciences, San Jose, USA
CD203c	PE	97A6	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich
HLA-DRII	APC	L243	BD Biosciences, San Jose, USA

2.1.9 ANALYSE- UND BEARBEITUNGSPROGRAMME

Tabelle 14: Analyse- und Bearbeitungsprogramme

Programm	Bezugsquelle
CellQuestPro 3.1	BD Bioscience, Heidelberg
Facs Diva v6.1.3	BD Bioscience, Heidelberg
Microsoft Exel	Microsoft , Redmont, USA
SoftMax 2.31	MDS Analytical Technologies, Ismaning

2.2 METHODEN

2.2.1 TIERE UND TIERHALTUNG

Bei den Untersuchungen wurden weibliche BALB/c- Mäuse verwendet, welche im 12h/12h- Hell-Dunkel-Rhythmus bei konstanter Rt ($21\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$) in den Tierställen des Universitätsklinikums Regensburg gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz gehalten wurden. Autoklaviertes Wasser und handelsübliches Futter wurde ad libidum verabreicht.

2.2.2 HERSTELLUNG VON ALUMINIUMPRÄZIPITAT

1ml humanes Interleukin-3(hIL-3; $100\text{ }\mu\text{g/ml}$) wurde unter sterilen Bedingungen mit 4 ml 10% Kalium-Aluminium-Sulfat-Lösung gemischt. Mit 1 molarem Kalium-Hydroxid wurde pH 7 eingestellt. Anschließend wurde das Gemisch 3-mal gewaschen (1500 U/Min , 5 Min. in PBS) und auf eine IL-3-Konzentration von $25\text{ }\mu\text{g/ml}$ eingestellt.

2.2.3 IMMUNISIERUNG DER MÄUSE

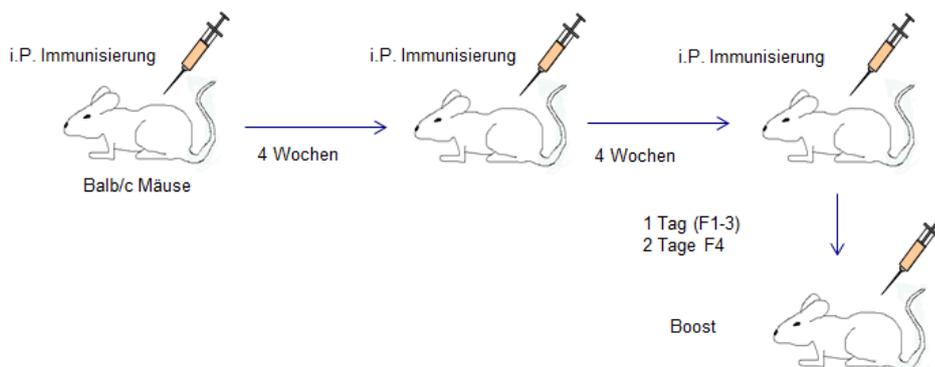


Abbildung 6: Schema der Immunisierung. Modifiziert nach Renner 2010 (71).

6-12 Wochen alte Balb/c Mäuse wurden nach 0, 4 und 8 Wochen mit $5\text{ }\mu\text{g}$ bzw. $10\text{ }\mu\text{g}$ hIL-3 in Aluminiumpräzipitat durch intraperitoneale Injektion immunisiert. Die letzte Immunisierung erfolgte am Vortag der Fusion mit $10\text{ }\mu\text{g}$ bzw. $20\text{ }\mu\text{g}$ hIL3 gelöst in $100\text{ }\mu\text{l}$ sterilem PBS (Abbildung 6).

2.2.4 HERSTELLUNG VON FEEDERLAYERN DURCH PERITONEAL-LAVAGE

Zur Gewinnung der Peritonealmakrophagen für zwei bis drei 96-Well-Platten wurde eine weibliche BALB/c Maus benötigt. Nach Tötung und Desinfektion der Maus wurde die Bauchhaut abpräpariert und 10 ml HT-Medium in die Peritonealhöhle injiziert. Der Bauch der Maus wurde leicht massiert, um Zellen zu lösen. Anschließend wurde das Medium mittels einer Spritze wieder abgesaugt. Die so gewonnene Makrophagensuspension wurde in ein 15 ml Falcon überführt und gewaschen (1200 U/min; 5 Minuten). Nach Absaugen des Überstandes, wurde das Pellet in HT-Medium resuspendiert und in 100µl pro Well auf 96-Well-Platten ausplattiert und 24h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, bevor die Hybridomzellen hinzugegeben wurden.

2.2.5 GEWINNUNG MONONUKLEÄRER ZELLEN DES PERIPHEREN BLUTES (PBMCs) AUS VOLLBLUT

Als PBMCs werden Blut-Zellen bezeichnet, welche einen runden Kern besitzen. Zu ihnen werden Lymphozyten, Monozyten, Basophile Granulozyten, Natural Killer Zellen (NK-Zellen) und Dendritische Zellen gezählt (8).

Das humane EDTA-Blut wurde zunächst 1:2 mit sterilem PBS verdünnt. In einem 50 ml-Falcon wurden 15ml Ficoll mit je 30 ml Probe überschichtet. Die Falcons wurden für 20 Minuten bei 1500 rpm und Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Die Mononukleären Zellen, die sich in Interphase des Ficoll sammelten (Abbildung 7), wurden abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Anschließend wurden die PBMCs zweimal in PBS gewaschen. Die Zentrifugation zwischen den Waschschritten erfolgte bei 1200 U/min für 10 Minuten.

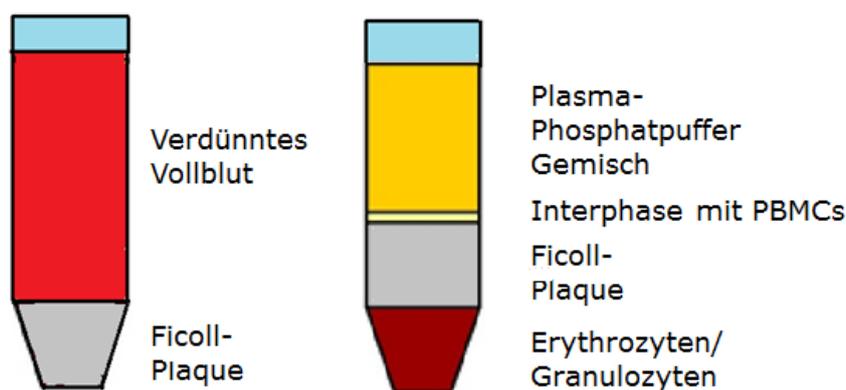


Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Ficoll. Links vor Zentrifugation; rechts nach Zentrifugation. Aufgrund der unterschiedlichen Dichten verschiedener Zelltypen führt die Zentrifugation zur Bildung von Schichten. Erythrozyten, Granulozyten und abgestorbene Zellen sammeln sich am Boden des Falcons. Die PBMCs befinden sich oberhalb des Ficoll-Plaques.

2.2.6 KULTIVIERUNG UND LAGERUNG EUKARYONTER ZELLEN

In Tabelle 11 und Tabelle 12 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und Kulturmedien zusammengefasst. Die Kultur erfolgte im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂. Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank durchgeführt.

- Passagieren der Zellen: Überführen eines Aliquots in eine neue Kulturflasche und Befüllen mit frischem Kulturmedium.
- Auftauen von Zellen: Um eine Kultur einer Zelllinie anzulegen wurden die gewünschten Zellen aus flüssigem Stickstoff entnommen und im Wasserbad bei 37 ° aufgetaut. Der Inhalt des Kryoröhrchens wurde in ein 15 ml- Falcon überführt, mit RPMI-Medium aufgefüllt und bei 1600 U/min fünf Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in ca. 15 ml Medium resuspendiert und in eine 25cm² Zellkulturflasche überführt. Diese wurde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.
- Einfrieren der Zellen: Sie wurden 5 Minuten lang mit 1600 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen im Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen pipettiert. Um die Bildung großer Eiskristalle während des Einfrierens zu verhindern, wurden die Zellen in einer Kryobox mit einer Abkühlrate von 1°C/h auf -80°C gebracht. Nach 24 Stunden wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.7 BESTIMMUNG DER ZELLZAHLEN

Zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen in einer Zellsuspension wurde Trypanblau verwendet, das tote Zellen auf Grund ihrer gestörten Membranintegrität blau färbt. Da lebende Zellen nicht angefärbt werden, können diese im Lichtmikroskop unterschieden werden. Je nach Zelldichte wurde die Zellsuspension zunächst verdünnt, bevor 10 µl der Suspension mit 10 µl einer 0,1%igen Trypanblaulösung gemischt wurden. Die lebenden Zellen wurden unter Zuhilfenahme der Neubauer-Zählkammer unter dem Phasenkontrast-Mikroskop ausgezählt. Um die tatsächliche Zellkonzentration in der Ausgangssuspension zu errechnen, wurde die gezählte Zellzahl pro Großquadrat mit den sich aus der Verdünnung durch die Trypanblaulösung und die Zellsuspension ergebenden Verdünnungsfaktoren und dem Kammerfaktor 10⁴ multipliziert. Dies entspricht der Zellzahl pro ml Ausgangssuspension.

2.2.8 HERSTELLUNG VON HYBRIDOMZELLEN

Die Hybridomzellen wurden durch Fusion von antikörperproduzierenden Zellen mit Tumorzellen hergestellt (siehe 1.3.2.1). Wir nutzten die Myelomzelllinie X63Ag8 und B-Zellen aus der Milz der hIL-3 immunisierter Mäuse.

Die X63Ag8-Zellen wurden am Vortag der Fusion 1:2 verdünnt (gesplittet). Zur Gewinnung der Milz über einen Flankenschnitt wurde eine immunisierte Maus getötet und desinfiziert. Um eine Einzellsuspension zu erhalten wurde die Milz in einer Petrischale mit 10 ml RPMI-Medium zerkleinert und durch ein Sieb mit 70 µm Porengröße gedrückt. Die Zellen wurden zweimal in RPMI-Medium gewaschen (1200 U/min, 5 Minuten, bei 20 °C). Parallel dazu wurden die X63Ag 8-Zellen in der gleichen Weise zweimal gewaschen und ihre Anzahl bestimmt. Anschließend wurden 20 Millionen der X63Ag8-Zellen mit den Splenozyten einer Milz bei 1200 U/min für 5 Minuten in einem 50 ml Falcon zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet gelockert.

Die Fusion der X63Ag8-Zellen mit den B- Lymphozyten aus der Milz wurde durch Zugabe von Polyethylenglycol (PEG) ausgelöst. Zunächst wurde zu Milz- und X63Ag8-Zellen unter Schwenken im Wasserbad bei 37 °C tropfenweise 1 ml PEG über einer Minute hinzugegeben und für 90 Sekunden inkubiert. Dann wurden 3ml RPMI- Medium während 3 Minuten tropfenweise hinzugefügt; anschließend 12ml RPMI Medium über 5 Minuten. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation bei 1200 U/min für 5 Minuten bei 20 °C. Es erfolgte eine Resuspendierung in HAT-Medium und eine Ausplattierung der Zellen auf zehn 96-Well-Flachboden-Platten in 100µl pro Well. Daraufhin wurden sie im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 3 Tagen erfolgte eine Zugabe von 100µl HAT-Medium pro Well, anschließend wurde das Medium alle 3 Tage gewechselt. An Tag 10 bis 12 erfolgte die Testung auf spezifische Antikörperproduktion.

2.2.9 SUBKLONIERUNG DER HYBRIDOMZELLEN

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper wurden die Zellen in den positiv gescreenten Wells 1:25000, 1:125000: 1:625000 und 1:3125000 in HT-Medium verdünnt. Von diesen Verdünnungen wurden je 100 µl pro Well auf einer halben 96- Loch-Platte ausplattiert, welche am Vortag mit Peritonelamakrophagen besetzt worden war. Die Makrophagen dienen den vereinzelt Klonen als Lieferanten von Wachstumsfaktoren. Die Verdünnungen wurden in HT-Medium durchgeführt. Um die Wahrscheinlichkeit für den Erhalt eines monoklonalen Antikörpers zu erhöhen, wurde die Subklonierung zweimal durchgeführt.

2.2.10 *GEWINNUNG DER KLONÜBERSTÄNDE*

Zur Gewinnung der Klonüberstände aus einer Zellkulturflasche wurde das Kulturmedium unter sterilen Bedingungen in ein Falcon-Röhrchen überführt und bei 1200 U/min für 10 Minuten abgefugt. Der Überstand wurde steril in ein neues Röhrchen überführt und bei -4 ° C gelagert. Befanden sich die Hybridomzellen in einer 96- Well-Platte, wurde der Überstand unter einer sterilen Werkbank abpipettiert, abgefugt und für den jeweiligen Versuch verwendet.

2.2.11 *HRP-LABELING DER AUFGEREINIGTEN ANTIKÖRPER*

Beim HRP-Labeling, wird an den Antikörper das Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) gebunden, so dass dieser Antikörper anschließend als Detektion-Antikörper im ELISA verwendet werden kann (siehe 2.2.12.1). Das Enzym HRP katalysiert die Chromogenumwandlung eines Substrats im ELISA, erkennbar durch einen Farbumschlag. Nach Herstellerangaben wurden 100µl der Antikörper in der Konzentration 1mg/ml mit 10 µl LL-Modifier-reagent durchmischt, auf den Lightning-Link-Mix gegeben und für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10 µl LL-Quencher hinzugegeben und für weitere 30 Minuten inkubiert. Nach dieser Zeit konnten die Antikörper aliquotiert werden und bei -20 °C gelagert werden.

2.2.12 *ELISA (ENZYM LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY)*

Der ELISA dient der quantitativen und qualitativen Bestimmung von Proteinen oder Antikörpern in Flüssigkeiten. In dieser Arbeit wurden Indirekte und Double-Bond ELISA-Techniken verwendet. Wenn nicht anders bezeichnet, erfolgten die Schritte bei Raumtemperatur.

2.2.12.1 Indirekter ELISA

Indirekter Elisa



Abbildung 8: Schematische Darstellung eines indirekten ELISAs. Modifiziert nach Jeffrey M. Vinocur

Mit dieser ELISA-Technik wurden qualitativ die Bindungseigenschaften der hergestellten Antikörper bestimmt. 96-Well-Platten wurden mit Antigen beschichtet und mit Hybridomüberstand befüllt. Enthielt dieser Überstand Antikörper, die gegen das Antigen gerichtet waren, banden sie als Primärantikörper an dieses. Nach einer Inkubationszeit und mehrmaligem Waschen wurde ein Sekundärantikörper hinzugegeben, welcher gegen den Fc-Anteil des Primärantikörpers gerichtet war. An den sekundären Antikörper war das Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) gebunden (Abbildung 8), das einen Farbumschlag katalysiert (siehe 2.2.11). Die mehrmaligen Waschvorgänge zwischen den Inkubationsschritten lösen nicht gebundene Substanzen von der Platte.

Hierfür wurden 96-Well-Platten über Nacht bei 4 °C mit 1 µg pro Well des Antigens beschichtet, gegen die eine Antikörperbindung stattfinden soll. Um unspezifische Bindungen der Antikörper auszuschließen, wurde jeweils eine PBS-gecoatete Negativkontrolle mitgeführt

- Beim Screening der Hybridomüberstände auf anti-IL-3-Produktion und der Isotypbestimmung der Antikörper erfolgte das Coaten mit IL-3.
- Bei der Testung der Antikörper auf Kreuzreaktivität mit Ratten-IL3 und Maus-IL3 wurde je eine Spalte der 96-Well-Platte mit humanem-IL3, eine mit Ratten-IL3 und eine mit Maus-IL3 beschichtet.
- Bei der Testung der Antikörper auf Kreuzreaktivität mit IL5 und GM-CSF wurde je eine Spalte der 96-Well-Platte mit humanem-IL3, eine mit GM-CSF und eine mit rekombinantem IL5 gecoatet.
- Bei der Testung der Antikörperbindung an die Peptide 1 bis 6, 1A, 1B und 1Ma (siehe Tabelle 7) wurde mit diesen beschichtet.
- Bei der Testung der Kreuzreaktivität mit Rh IL-3 wurde je eine Spalte mit hIL3 und eine mit RhIL3 gecoatet.

Die Inkubationsschritte erfolgten jeweils nach dreimaligem Waschen. Nach dem Blockieren der freien Bindungsstellen mit 100 µl Blockierlösung (2% BSA/PBS) für 2h wurden die Platten für 1 Stunde mit 100 µl der hergestellten Antikörper inkubiert. War eine Verdünnung der Überstände notwendig, erfolgte diese in der Blocklösung. Bei der Isotypbestimmung erfolgte anschließend die Inkubation mit dem Sekundärantikörper anti-mouse Igk, Igl, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgE, IgM, IgA und als Negativkontrolle ohne Sekundärantikörper. Als sekundärer Antikörper bzw. Tertiärantikörper diente ein gegen Maus-IgG gerichteter HRP-gekoppelter Antikörper (Verdünnung 1:2000). Mit diesem wurden die Platten eine weitere Stunde im Dunkeln inkubiert. Als Chromogenlösung wurde 2,2'-Azino-di-(3-Ethyl-benzthiazolin)-6-Sulfon-Säure (ABTS) genutzt. Nach 20-minütiger Inkubation unter Lichtausschluss wurde die Extinktion bei 405 nm und der Referenzwellenlänge 490nm abgelesen.

2.2.12.2 Direkter ELISA (Sandwich-ELISA)

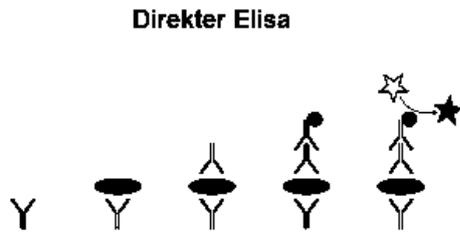


Abbildung 9: Schematische Darstellung eines Sandwich-ELISAs. Modifiziert nach Jeffrey M. Vinocur

Beim Sandwich-ELISA bindet ein an die Platte fixierter Capture-Antikörper das zu bestimmende Antigen. Anschließend wird das Antigen an einem anderen Epitop durch den Detektion-Antikörper gebunden. Entweder der Detektion-Antikörper selbst ist an HRP gekoppelt oder ein HRP-gekoppelter Sekundärantikörper bindet diesen am Fc-Teil. In dieser Arbeit sollte in einigen Fällen nicht das Protein, sondern der Detektion-Antikörper detektiert werden. Die Konzentration des gesuchten Antigens ist direkt proportional zur HRP-katalysierten Färbung (Abbildung 9).

Sandwich ELISA ohne Sekundärantikörper

Am Vorabend wurden die 96-Well-ELISA-Platten mit dem in PBS verdünnten Primärantikörper mit 100 µl pro Well beschichtet. Folgende Antikörper wurden zum Beschichten eingesetzt:

- purified rat anti-mouse IgG1 in der Konzentration 5 µg/ml zur Bestimmung der IgG1-Konzentration in den Klonüberständen
- bei den kommerziellen R&D „Duo Set Kit“-ELISAs um einen gegen das gesuchte Interleukin gerichteten Capture-Antikörper der Konzentration 2 µg/ml
- zur Herstellung eines eigenen Interleukin ELISA wurde analog dem Kit von R&D Systems mit 2 µg/ml der zuvor ausgewählten aufgereinigten Antikörper 8.36.38 (AK8), 11.14.6 (AK11), 13.4.4 (AK13) und dem Capture-Antikörper aus dem R&D „Duo Set Kit“ gecoatet.

Die folgenden Inkubationsschritte erfolgten jeweils nach dreimaligem Waschen.

Nach Absättigung der freien Bindungsstellen am Plattenboden mit Blocklösung für 2h wurden die Platten für 2h mit 100µl der Proben und der zugehörigen Standardverdünnungsreihe inkubiert. Um eine verlässliche Aussage über die Konzentration der gesuchten Proteine in der Probe machen zu können, mussten die Proben vor dem Auftragen soweit im Blockpuffer verdünnt werden, dass die zu erwartende Optische Dichte (OD) im linearen Bereich der OD der Standardkurve lag. Anschließend wurden 100µl der Detection-Antikörper in die Wells pipettiert und für eine Stunde inkubiert.

Als Detection-Antikörper dienten

- bei der IgG1-Bestimmung: ein biotinylierter, gegen murines IgG1 gerichteter Antikörper.
- bei den „Duo Set Kit“-ELISAs: der im Kit enthaltene Detection-Antikörper
- bei der Herstellung eines eigenen IL-3 ELISAs: HRP-gelabelte Antikörper AK 11, AK 8, AK 13 und der Detektion-Antikörper von R&D. Die Antikörper wurden in allen möglichen Kombinationen von Capture und Detektion verwendet.

Als nächster Schritt erfolgte bei den „Duo Set Kit“-ELISAs (20 Minuten) und der IgG1-Bestimmung (1 Stunde) die Inkubation mit Streptavidin-HRP. Dies ist nötig, da die verwendeten Antikörper nicht an HRP, sondern Biotin gebunden waren, das keinen Farbumschlag verursacht, jedoch an Streptavidin bindet. Abschließend wurde 100 µl Substrat Solution zugegeben um eine Farbreaktion hervorzurufen.

Die Substrat Solution des RD Kits enthielt Tetramethylbenzidin (TMB). Der Farbumschlag wurde nach 20 Minuten abgedunkelter Inkubationszeit mit 12,5 % Schwefelsäure gestoppt und die Optische Dichte mittels eines ELISA-Readers bei 450 nm gemessen. Bei der IgG1-Konzentrationsbestimmung wurde ABTS als Substrat Solution genutzt (siehe oben).

Sandwich ELISA mit Sekundärantikörper

Auch zur Bestimmung der relativen Affinität der anti-IL-3-Antikörper in den Klonüberständen wurde ein Sandwich ELISA verwendet. Hierfür wurden 96-Well-Platten über Nacht bei 4°C mit polyklonalem Goat IgG anti-human IL-3 der Konzentration 1 µg/ml gecoatet und am nächsten Tag für 24 h mit humanem IL-3 der Konzentration 250 ng/ml in 100 µl pro Well inkubiert. Da die Affinität einiger der getesteten Antikörper sehr hoch war, wurde in einem weiteren Versuch mit polyklonalem Goat IgG anti-human IL-3 in verschiedenen Konzentrationen (2 µg/ml; 0,66 µg/ml bzw. 0,22 µg/ml) gecoatet. Durch einen Isotyp wurde die Menge an Goat IgG konstant gehalten. Die anti-humanen IL-3 Antikörper dienten lediglich dazu, eine Denaturierung des IL-3 durch direkte Bindung an den Plattenboden zu verhindern. Aus Sensitivitätsgründen ist eine möglichst vollständige Beladung der anti-hIL-3-Antikörper erwünscht, was durch die lange Inkubationszeit mit hIL-3 gewährleistet werden soll. Im Anschluss erfolgt die Inkubation mit 100 µl der Klonüberstände und des monoklonalen anti-hIL-3 von RD für 2h, danach mit Streptavidin-HRP gebundenem anti-mouse IgG für eine weitere Stunde. Als Chromogenlösung wurde wiederum ABTS verwendet. Alle Inkubationszeiten erfolgten nach 3-maligem Waschen mit Waschlösung.

2.2.13 *MTT-PROLIFERATIONSASSAY*

Der MTT-Assay wird verwendet um die Anzahl lebender Zellen semiquantitativ zu bestimmen. Dies gelingt durch die Reduktion von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu Formazan durch NADH, NADPH und Succinat mit Hilfe von Enzymen des Endoplasmatischen Retikulums und der Atmungskette. Sichtbar wird diese Reaktion durch einen Farbumschlag von gelb auf blau. Da die mitochondrialen Enzyme zur Katalyse der Reaktion intakt sein müssen, ist die Farbreaktion proportional zur Anzahl der lebenden Zellen in der Probe.

Nach vorsichtiger Abnahme von 100µl Überstand pro Well wurden 10 µl MTT-Reagent zugegeben und für 4 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 4 Stunden wurden die Zellmembranen durch Zugabe von 100µl MTT-Solvent pro Well lysiert, so dass sich die entstandene Farbreaktion gleichmäßig in dem Well verteilte. Am folgenden Tag wurden die Extinktion bei 540 nm und der Referenzwellenlänge 650 nm abgelesen.

2.2.14 *SODIUM DODECYL SULFAT POLYACRYLAMID GEL ELEKTROPHORESE (SDS- PAGE)*

Bei der SDS-PAGE werden Proteine nach Denaturierung ihrer Größe nach entsprechend in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

Als Vorbereitung wurden 0,2 µg des gewünschten Proteins in PBS verdünnt, so dass das Endvolumen 10 µl entsprach. Anschließend wurden 10 µl Lämmli-Probenpuffer hinzugegeben. Durch das im Probenpuffer enthaltene SDS werden die Proteine denaturiert und negativ geladen. Um sicher zu gehen, dass wirklich alle Proteine denaturiert wurden, wurden die Proben für 3 Minuten auf 90° erhitzt. Das Sammelgel wurde über das Trenngel geschichtet, nachdem das Wasser über dem Trenngel abgossen war und mit einem zehnfächrigen Gelkamm versehen, um Taschen für die Proben freizuhalten. Anschließend wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine mit Laufpuffer gefüllte Gelkammer überführt. Die Proben und der Standard wurden in die dafür vorgesehenen Taschen pipettiert und bei 22 Amper (A) für ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur aufgetrennt. Für die Zusammensetzung der Gele siehe Tabelle 8. Nach dem SDS- Page wurde das Sammelgel verworfen und das Trenngel für 30 Sekunden in den Transferpuffer eingelegt. Die der Größe des Trenngels angepasste PVDF-Membran wurde zunächst für 5 Sekunden in Methanol eingelegt, anschließend 30 Sekunden in den Transferpuffer. Die Whatman-Papiere, welche ebenfalls auf die Größe des Gels zugeschnitten waren, wurden eine Minute in eine Schale mit Transferpuffer eingelegt.

2.2.15 WESTERN BLOT

Der Western Blot beruht auf der elektrophoretischen Übertragung der Proteine aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran. In dieser Arbeit wurde das Verfahren des Semidry-Blots mit Gelen der Größe 8cm x 4cm x 0,75cm verwendet.

Hierfür wurden auf die Anoden-Platte drei Lagen Whatman-Papier platziert, darüber die PVDF-Membran, darauf das Trenngel und wiederum drei Lagen Whatman-Papier. Daraufhin wurde die Kathoden-Platte aufgelegt. Der Transfer erfolgte bei 24 Volt (V) für 30 Minuten bei Raumtemperatur.

Nach dem Transfer wurde die Membran bei 4° über Nacht auf dem Schüttler in 5% Milchpulver-Blocklösung eingelegt, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, sodass die Nachweisreaktion möglichst nicht beeinträchtigt wurde. Am Folgetag wurde die Membran dreimal gewaschen und zerteilt, so dass auf jedem Teilstück der Membran sowohl ein Teil des Standards zu sehen war als auch das zu untersuchende Protein. Die Membranstücke wurden für 2 Stunden mit 5 µg/ml bzw. einer 1:10 Verdünnung der Primärantikörper in 1% Milchpulver-Lösung inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ein gegen murines IgG gerichteter Antikörper in der Verdünnung 1:1000 verwendet, welcher an das Enzym Merettich-Peroxidase gebunden war. Zur Detektion einer Antikörper-Bindung an das Protein wurde die Membran mit einer Mischung aus Western-Blot-Reagenz A und B (je 7,5 ml, so dass die Membran vollständig von der Flüssigkeit bedeckt war) für 1 Minute inkubiert. Zwischen den Inkubationen erfolgte jeweils 4-maliges Waschen für 5 Minuten mit PBS.

Anschließend wurde die Membran in einer Klarsichthülle in eine Filmkassette gegeben und die Luftblasen zwischen Klarsichthülle und Membran entfernt. Dann wurde in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm der Membran aufgelegt.

Nach der Expositionszeit (zwischen 5 Sekunden und 40 Minuten) wurde der Film in den Entwickler gegeben.

2.2.16 MAGNETISCHE ZELLSEPARATION

Die magnetische Zellseparation (MACS) ermöglicht es, bestimmte Zellpopulationen aus Zellsuspensionen zu isolieren. Die Matrix der MACS-Säulen besteht aus magnetischen Kugeln, welche beim Einsetzen in ein Permanent-Magnetsystem mit diesem in Wechselwirkung treten und so einen Feldgradienten in ihrem Inneren erzeugen.

Die Zellsuspension wird mit Antikörpern inkubiert, welche gegen spezifische Oberflächenantigene der gewünschten Zellpopulation gerichtet sind. An die Antikörper gebundene magnetische Microbeads sorgen für eine Bindung der Antikörper-beladenen Zellen an die Säulenmatrix.

Unbeladene Zellen hingegen durchlaufen die Trennsäule. Die Isolationen wurden gemäß den Herstellerprotokollen (Miltenyi Biotec, Deutschland) durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden LS⁺-Säulen (Kapazität: 10⁷ magnetisch markierte Zellen) verwendet.

Humane Basophile wurden mittels Basophil Isolation Kit II von Miltenyi über MACS-Säulen aufgereinigt. Hierbei werden alle in PBMCs enthaltenen Zellen mit Ausnahme der Basophilen an MicroBeads gebunden und aus der Zellsuspension depletiert. Nach Herstellerangaben wurden durch Ficoll Plaque-Aufreinigung zunächst PBMCs aus humanem Vollblut isoliert, zweimal gewaschen und gezählt. Die folgenden Volumenangaben beziehen sich jeweils auf 10⁷ Zellen. Bei einer höheren Ausbeute an PBMCs wurde ein entsprechend größeres Volumen der Reagenzien gewählt. Die Zellen wurden in 30 µl MACS-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von je 10µl FcR Blocking Reagent und Basophil Biotin-Antibody Cocktail wurden die Zellen gut durchmischt und für 10 Minuten bei 4° C inkubiert. Anschließend wurden wiederum 30 µl Macs Puffer und 20 µl Anti-Biotin MicroBeads hinzugegeben und bei 4°C für 15 Minuten inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen mit 2ml MACS-Puffer und Zentrifugation für 10 Minuten bei 1600rpm wurden bis zu 10⁸ Zellen in je 500µl Macs Puffer resuspendiert.

Die Säulen wurden mit 3ml MACS-Puffer gespült. Anschließend wurde die Zellsuspension auf die Säulen gegeben und der Durchfluss aufgefangen. Die Säulen wurden dreimal mit 3ml MACS-Puffer gespült. Der Durchfluss wurde ebenfalls aufgefangen. Abschließend wurden die Basophilen gezählt und die Reinheit der Basophilensuspension durchflusszytometrisch geprüft (2.2.18, 2.2.17).

2.2.17 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Die Durchflusszytometrie basiert auf der Messung von Streulichteigenschaften. Die Zellen passieren hierfür einzeln einen Laserstrahl und erzeugen so charakteristische Streu- und Fluoreszenzsignale. Durch Photodetektoren werden diese Signale registriert und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Der Forward Scatter (FSC) liefert Informationen über die Größe der Zellen, der Side Scatter (SSC) über ihre Granularität.

Durch Färbung der Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern kann eine Aussage über die auf den Zellen repräsentierten Oberflächenantigene gemacht werden, die Rückschlüsse auf den Zelltyp zulassen. Die Fluorochrome werden durch den Laser angeregt und emittieren je nach Fluorochrom Licht einer bestimmten Wellenlänge. Die Lichtintensität ist zur Anzahl der markierten Antigene proportional. Die Analyse erfolgte mit den Programmen CellQuest oder Diva.

2.2.18 *EXTRAZELLULÄRE FÄRBUNG*

Die Oberflächenmarker der Zellen wurden mit Zytochrom gekoppelten Antikörpern gefärbt um sie im Durchflusszytometer unterscheiden zu können. Für humane PBMCs und humane Basophile wurde folgende Farben in der Verdünnungen 1:50 verwendet: CD123 Phycoerythrin- Cyanin 5.5 (PE-Cy5.5); HLA II Allophycocyanin (APC); CD203c Phycoerythrin (PE) .

Vor der Färbung wurden unspezifische Bindungsstellen (Fc-Rezeptoren) auf den Zellen durch Inkubation mit einem unmarkierten mouse-IgG in PBS bei Raumtemperatur für 15 min blockiert. Danach wurden die Zytochrom-gekoppelten Antikörper hinzu gegeben und im Dunkeln bei 4°C für 20 min inkubiert. Zwischen den einzelnen Schritten erfolgte jeweils ein dreifacher Waschvorgang mit PBS (1600U/min, 5 min).

2.2.19 *BLOCKADE DER IL-3 BINDUNG AN HUMANE ZELLEN (FLUROKIN KIT R&D)*

In diesem Versuch wurde geprüft, ob die Bindung von IL-3 an PBMCs durch die Zugabe der hergestellten Antikörper AK8, AK11, AK13 und des Antikörper Klon 4608 von R&D (AK R&D) verhindert werden kann. Dies wurde durchflusszytometrisch an Hand von FITC-markiertem IL-3 bestimmt.

Nach Herstellerangaben erfolgte die Inkubation von je 10µl der verschiedenen IL-3 Antikörper mit 10µl der biotinylierten IL-3-Lösung (1,25 µg/ml) bzw. Negative Control-Lösung für 30 min bei Raumtemperatur. Die Antikörper wurden in einer höchsten Konzentration von 100µg/ml eingesetzt und in einer 1/3 Verdünnungsreihe bis zu einer Konzentration von 0,3 µg/ml herunterverdünnt. Anschließend wurden 200.000 PBMCs in 20µl Zellsuspension hinzugegeben und 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Nach 2-maligem Waschvorgang in PBS erfolgte nun eine Färbung mit Fluorochrom-gekoppeltem Streptavidin für 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln. Für den folgenden 2-maligen Waschvorgang (1600 U/min; 5 min) wurde der im Kit beigefügte Waschpuffer genutzt und die Proben im Anschluss durchflusszytometrisch untersucht.

2.2.20 ZELLKULTURANSÄTZE

2.2.20.1 Zeitkinetik der Stimulation von TF 1 Zellen mit verschiedenen Zytokinen

Bei TF1-Zellen handelt es sich um eine erythroleukämische Zelllinie, welche bei der Zugabe von GM-CSF und IL-3 proliferiert (72). Vor dem Versuchsansatz wurden die Zellen zunächst eine Woche in Wachstumsmedium bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Da der Vorrat an Rh IL-3 sehr gering war, erfolgte vor dem Proliferationsversuch keine Kultivierung der Zellen in diesem Zytokin. Das letzte Splitten der Zellen erfolgte am Vortag des Versuchs.

Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in ein 50ml Falcon überführt, bei 1600 U/min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1ml Standardmedium resuspendiert und gezählt. Anschließend wurden in verschiedenen Ansätzen 5.000, 10.000 oder 20.000 Zellen in 100µl Medium pro Well ausplattiert.

Die Stimulation der Zellen erfolgte mit unterschiedlichen Zytokinkonzentrationen:

- GM-CSF- bzw. IL3-Konzentration: 10ng/ml; 5ng/ml; 2,5 ng/ml; 1,25 ng/ml; 0,625ng/ml; 0,3125 ng/ml; 0,1563 ng/ml
- Rh IL-3 und h IL-3 wurden mit je 5 ng/ml in ihrer Wirkung verglichen.

Bei allen Versuchsansätzen erfolgten Kontrollen (1. kein Zytokin, 2. nur Medium). Alle Werte wurden in Triplikaten geführt. Nach 2, 3, 4 und 5 Tagen wurde je eine Platte mittels MTT-Assay ausgewertet.

2.2.20.2 Testung der Antikörper auf Blockade der biologischen Zytokin-Wirkung

TF1- Zellen wurden verwendet um zu testen, ob durch die Antikörper auch die biologische Wirkung der Zytokine unterbunden wird. Durch Zugabe der gegen humanes IL-3 gerichteten Antikörper soll die Bindung der Zytokine an die TF-1 Zellen verhindert werden, wodurch diese in ihrer Proliferation gehemmt werden. Dies wurde mittels MTT-Assay gemessen.

Die hergestellten Antikörper und AK R&D wurden mit verschiedenen Konzentrationen des zu blockierenden Zytokins in 100 µl pro Well auf 96-Well-Platten verteilt und für eine Stunde präinkubiert. Die höchste Konzentration der Antikörper betrug abhängig von den Antikörpern 27 µg/ml (bei schwach blockierenden) bzw. 3 µg/ml (bei stark blockierenden). Diese wurde in acht 1:3-Schritten verdünnt.

- Endkonzentrationen IL-3: 10 ng/ml; 5 ng/ml; 2,5 ng/ml; 1,25 ng/ml; 0,6125 ng/ml 0,3125ng/ml und 0 ng/ml.
- GM-CSF: 5ng/ml, 2,5 ng/ml, 1,25 ng/ml, 0,625 ng/ml, 0,3125 ng/ml und 0 ng/ml
- IL-3 und GM-CSF: 0 bzw. 2,5 ng/ml GM-CSF und 0 bzw. 2,5 ng/ml IL-3 in allen Kombinationen.

Bei allen Versuchsansätzen wurden Kontrollen mitgeführt:

- kein Zytokin
- höchste Zytokinkonzentration ohne Antikörper
- Isotypenkontrollen (Mouse IgG 1 kappa mit höchster Konzentration IL-3 bzw. GM-CSF)
- nur Medium.

Es wurden jeweils 4-fach-Werte verwendet. Der Ansatz wurde für 5 Tage bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert. Nach 5 Tagen wurde die Proliferation mit dem MTT-Proliferationsassay ausgewertet.

2.2.20.3 Stimulation von humanen Basophilen und PBMCs

200.000 Zellen wurden in Rundbodenplatten in 220µl/Well je nach Zellausbeute für 5 Stunden und 24 Stunden unter folgenden Bedingungen inkubiert.

Versuchsansätze (jeweils Doppelwerte)

- 10ng/ml humanes IL-3
- 1µg/ml humanes anti-IgE
- 10ng/ml humanes C5a
- 10ng/ml humanes IL-3+ 1µg/ml humanes anti-IgE
- 10ng/ml humanes IL-3+ Zugabe von 10ng/ml humanem C5a nach 15 Minuten
- ohne Zusätze.

Im Anschluss an die Stimulation wurden Platten bei 2400 U/min abgefugt, um die Überstände abzunehmen. Die Überstände wurden bei -80°C eingefroren um anschließend im ELISA auf IL-13, IL-6 und IL-4 untersucht zu werden. Nach 3-fachem Waschen der verbleibenden Zellen wurden diese, wie in 2.2.18 beschrieben, gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.20.4 Blockade der Basophilen Aktivierung durch anti-IL-3 Antikörper

200.000 Zellen wurden in Rundbodenplatten in 220µl/Well für 24 Stunden unter folgenden Bedingungen inkubiert (jeweils Doppelwerte):

- 10ng/ml humanes IL-3
- 10ng/ml humanes IL-3+ 25µg/ml AK 11
- 10ng/ml humanes IL-3+ 25µg/ml AK 13
- 10ng/ml humanes IL-3+ 25µg/ml AK 8
- 10ng/ml humanes IL-3+ 25µg/ml AK R&D
- ohne Zusätze.

Im Anschluss an die Stimulation wurden Platten bei 2400 U/min abgefugt, um die Überstände abzunehmen. Die Überstände wurden bei -80°C eingefroren um anschließend im ELISA auf IL-13, IL-6 und IL-4 untersucht zu werden. Nach 3-fachem Waschen der verbleibenden Zellen wurden diese wie in 2.2.18 beschrieben gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.21 *BEZEICHNUNG DER ENTSTANDENEN KLONE*

Zur Bezeichnung der Klone wurde folgende Nomenklatur gewählt:

Da die Klone fusionsübergreifend durchnummeriert wurden, entspricht die erste Zahl der Nummer des Klons. Die zweite Nummer bezieht sich auf den Subklon aus der ersten Klonierung, die dritte auf den Subklon der zweiten Klonierung.

zB.: 11.18.1

Klon Nr. 11

Klon Nr. 18 aus der 1. Subklonierung

Klon Nr. 1 aus der 2. Subklonierung.

3 ERGEBNISSE

3.1 HERSTELLUNG MONOKLONALER ANTIKÖRPER GEGEN HUMANES INTERLEUKIN-3

Bei Fusion und Screening wurde wie in Abschnitt 2.2.8 und 2.2.12.1 verfahren. Als Beispiel sei ELISA-Platte 1 aus Fusion 1 dargestellt:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,841	0,092	0,067	0,097	0,081	0,073	0,079	0,093	0,072	0,141	0,35	0,107
B	0,087	0,067	0,059	0,072	0,06	0,083	0,066	0,072	0,087	0,191	0,186	0,061
C	0,078	0,073	0,063	0,072	0,073	0,085	0,077	0,121	0,071	0,057	0,175	0,094
D	0,083	0,093	0,064	0,1	0,084	0,077	0,088	0,079	0,065	0,056	0,499	0,058
E	0,079	0,079	0,348	0,114	0,079	0,078	0,072	0,111	0,084	0,068	0,303	0,071
F	0,084	0,08	0,076	0,099	0,079	0,077	0,098	0,107	0,061	0,075	1,105	0,056
G	0,108	0,092	0,085	0,112	0,103	0,099	0,065	0,103	0,093	0,081	0,197	0,09
H	1,501	0,107	0,071	0,114	0,114	0,073	0,113	0,141	0,083	0,153	0,264	0,141

Abbildung 10: Screening auf positive Klone mittels ELISA. Beispielhaft ist Fusion 1, Platte 1 dargestellt. Grün: Positivkontrolle (Klon 3.47.20); blau: Negativkontrolle (Medium); grau: unbeladene Wells, gelb: positiv getestete Wells

In vier Fusionen wurden insgesamt 9 unterschiedliche monoklonale anti-IL-3-produzierende Klone hergestellt, von denen jeweils mehrere Subklone eingefroren wurden (Tabelle 15).

Tabelle 15: Überblick über die entstandenen Klone

Klon	Subklone nach Reklonierung
36	36.26.10
38	38.18.5
41	41.28.1 41.28.4
42	42.47. 42.47.38
43	43.14.28 43.14.24
44	44.16.4 44.16.5 44.16.16
45	45.14.27
46	46.21.1 46.21.4
47	47.28.15 47.28.18

3.2 CHARAKTERISIERUNG DER MONOKLONALEN ANTIKÖRPER

Neben den selbst hergestellten wurden auch die zuvor in der Arbeitsgruppe hergestellten Antikörper 2.28.11 (AK 2), 3.47.20 (AK 3), 5.3.2 (AK 5), 7.42.45 (AK 7), 8.36.38 (AK 8), 10.12.4 (AK 10), 11.14.6 (AK 11) und 13.4.4 (AK 13) charakterisiert. Da die Antikörper als Medikament verwendet werden sollen, war es nötig, dass sie dem Isotyp IgG angehören und das humane IL-3-Protein linear binden.

3.2.1 ISOTYPENBESTIMMUNG

Mittels ELISA wurde eine Isotypbestimmung der monoklonalen Antikörper durchgeführt. Die Antikörper AK 3, AK 8, AK 10, AK 11, AK 13, 36.26.10 (AK 36), 41.28.4 (AK 41), 42.47.28 (AK 42), 43.14.28 (AK 43), 44.16.16 (AK 44), 45.14.27 (AK 45), 47.28.15 (AK 47) gehören dem Isootyp IgG κ an. Der Klon 38.18.5 (AK 38) besitzt ebenfalls eine schwere Kette des Typs IgG1, die leichte Kette ist vom λ -Typ. Die Antikörper AK 2, AK 5 und AK 7 gehören dem Isotyp IgM κ an. Da lediglich die Klone des Isotyps IgG für uns interessant waren, wurden nur IgG κ und IgG λ weitercharakterisiert.

3.2.2 IGG- KONZENTRATIONSBESTIMMUNG IN DEN ÜBERSTÄNDEN

Die Mastermixe (Mix aller Überstände eines Klons) der monoklonalen Antikörper bzw. der aufgereinigten Antikörper wurden mittels ELISAs auf ihre IgG1 Konzentration bestimmt.

Die Konzentrationen in den Überständen schwankten zwischen 1,1 $\mu\text{g/ml}$ und 76,5 $\mu\text{g/ml}$: Die Klone 3.47.20 (23 $\mu\text{g/ml}$), 10.12.4 (13 $\mu\text{g/ml}$), 38.18.5 (1,1 $\mu\text{g/ml}$), 41.28.4 (12,8 $\mu\text{g/ml}$) und 45.14.27 (8,8 $\mu\text{g/ml}$) produzierten geringe Mengen Antikörper. Die Klone 8.36.38 (63 $\mu\text{g/ml}$), 11.14.6 (55 $\mu\text{g/ml}$), 13.4.4 (45 $\mu\text{g/ml}$), 36.26.10 (58,3 $\mu\text{g/ml}$), 42.47.28 (69,3 $\mu\text{g/ml}$), 43.14.28 (58,3 $\mu\text{g/ml}$), 44.16.16 (76,4 $\mu\text{g/ml}$), 47.28.15 (60,5 $\mu\text{g/ml}$) erreichten deutlich höhere Konzentrationen zwischen 58,3 $\mu\text{g/ml}$ und 76,4 $\mu\text{g/ml}$. Um höhere Konzentrationen der Antikörper zu erhalten, wurden die Klone 13.4.4, 11.14.6 und 8.36.38 extern aufgereinigt. Die Konzentration dieser Antikörper wurde auf 1,5 mg/ml (Klon 13.4.4), 1,85 mg/ml (Klon 11.14.6) und 2,2 $\mu\text{g/ml}$ (Klon 8.36.38) bestimmt.

Von diesen Konzentrationen wurde in den weiteren Experimenten ausgegangen.

3.2.3 KREUZREAKTIVITÄTEN DER ANTIKÖRPER

3.2.3.1 Kreuzreaktivität der Antikörper mit humanem IL-5 und GMCSF

Da IL-3, IL-5 und GM-CSF strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen (siehe 1.1.1), wurde die Kreuzreaktivität der selbst generierten Antikörper sowie des erworbenen Antikörpers Klon 4806 von R&D (AK R&D) mit den genannten Molekülen bestimmt. Die Testung erfolgte mittels ELISA.

AK10 zeigte eine leichte Kreuzreaktivität mit GM-CSF, welche dreifach geringer war als die Bindung an hIL-3, jedoch keine mit hIL-5. AK8 und AK 38 reagierten in sehr geringem Umfang mit hIL-5 (Antikörper 8: vierfach geringer; Antikörper 38: fünffach geringer), aber nicht mit GM-CSF. Die Antikörper AK 3, AK 11, AK 13, AK 36, AK 41, AK 42, AK 43, AK 44, AK 45, AK 46, AK 47, AK R&D zeigten keine Kreuzreaktivität mit IL-5 oder GM-CSF (Abbildung 11).

3.2.3.2 Kreuzreaktivität mit murinem IL-3 und Ratten IL-3

Da es hilfreich wäre, die Wirksamkeit und Unschädlichkeit der Antikörper in einem Tiermodell zu testen, wurde die Kreuzreaktivität der Antikörper mit Rhesusaffen- (Rh IL-3), Ratten- (rIL-3) und murinem IL-3 (mIL-3) mittels ELISA getestet. Keiner der getesteten Antikörper zeigt eine Kreuzreaktivität mit murinem oder Ratten IL-3 (Abbildung 11).

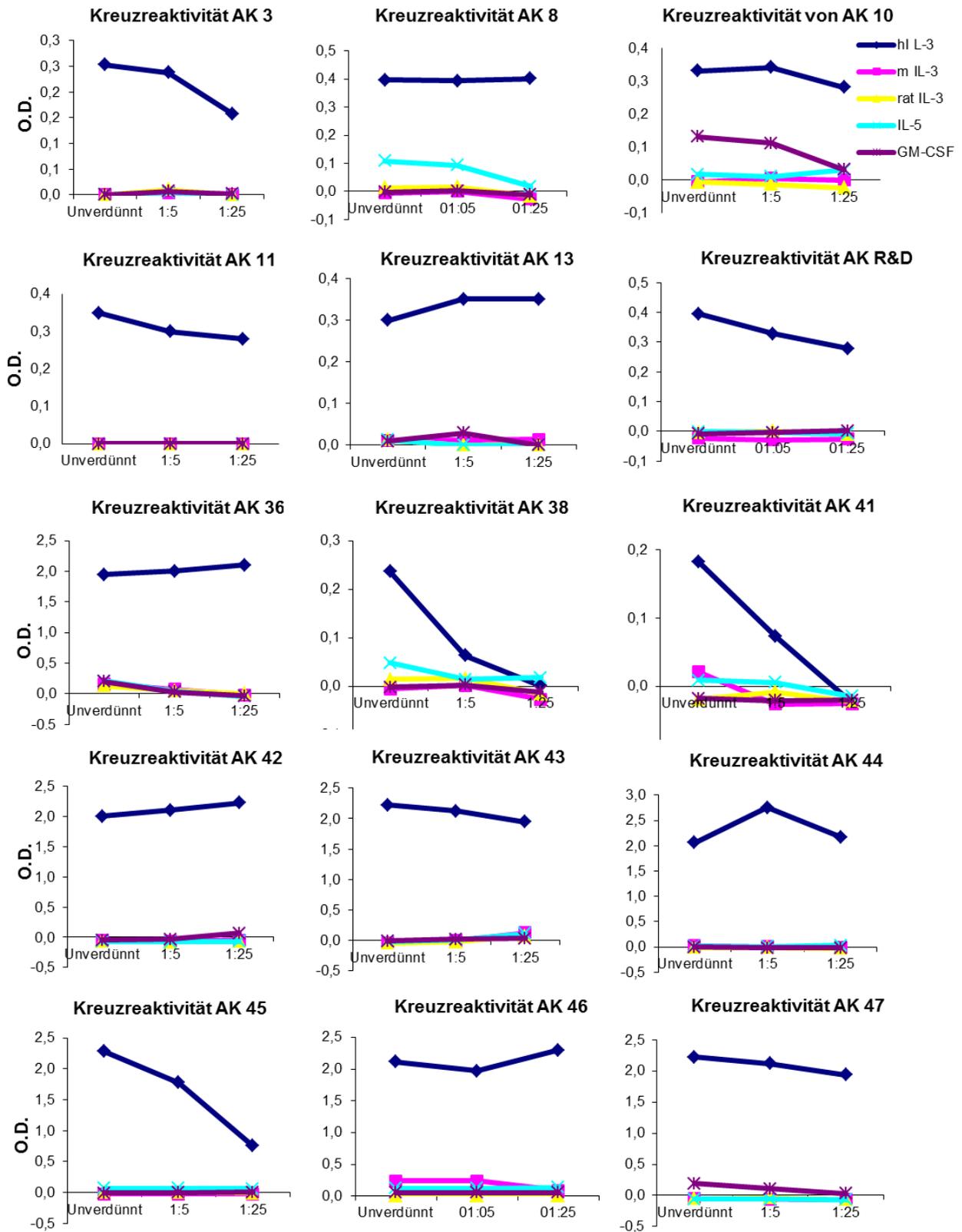


Abbildung 11: Testung der Kreuzreaktivität der Antikörper mit mL-3, rIL-3, GM-CSF und IL-5 mittels ELISA. Das Coating erfolgte mit 1µg/ml des zu untersuchenden IL-3-Poteins. Als Primäntikörper wurden die Klonüberstände in 3 Verdünnungen verwendet. An der X-Achse sind die im ELISA gemessenen optischen Dichten (OD) für die Bindung der Antikörper an die verschiedenen IL-3-Arten aufgetragen, an der Y-Achse die Verdünnungen des Klonüberstands.

3.2.3.3 Testung der Kreuzreaktivität mit Rhesus IL-3

Testung der Kreuzreaktivität mit Rhesusaffen IL-3 mittels ELISA

Die Testung auf Kreuzreaktivität mit Rhesusaffen IL-3 (Rh IL-3) fand auf Grund der begrenzten Verfügbarkeit nicht für alle Klone statt. Lediglich AK R&D erkannte die Struktur von Rh IL-3. Die Antikörper AK 8, AK 11, AK 13, AK 36, AK 38, AK 41, AK 42, AK 43, AK 44, AK 45, AK 46, AK 47 zeigten keine Kreuzreaktivität (Abbildung 12).

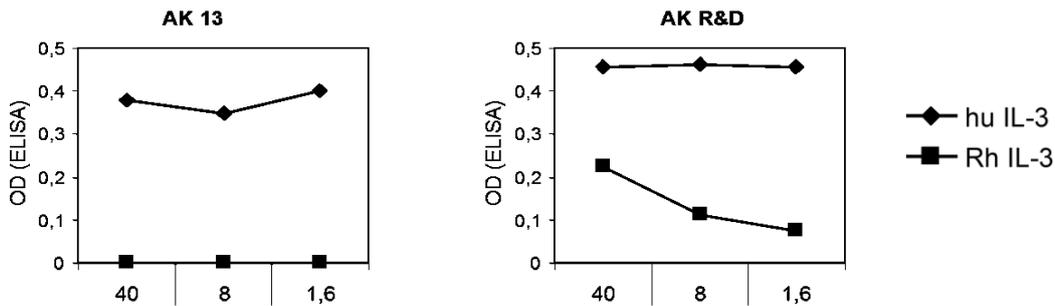


Abbildung 12: Kreuzreaktivität der Antikörper mit Rhesusaffen IL-3. Die Testung erfolgte mittels ELISA. Das Coating erfolgte mit 1µg/ml des zu untersuchenden IL-3-Poteins. Als Primärantikörper wurden 3 Verdünnungen der Antikörper verwendet. An der X-Achse sind die im ELISA gemessenen optischen Dichten (OD) für die Bindung der Antikörper an die verschiedenen IL-3-Arten aufgetragen, an der Y-Achse die Konzentration des Antikörpers.

Test auf Kreuzreaktivität zu Rhesusaffen IL-3 mittels Western Blot

Um auszuschließen, dass die Kreuzreaktivität der Antikörper mit Rh IL-3 durch die Sekundär- und Tertiärstruktur verhindert wird, wurde diese im Western Blot erneut getestet. Die Antikörper 8 und 11 zeigten keine Kreuzreaktivität mit linearem Rhesusaffen IL-3. Auch bei AK R&D zeigte sich nach 30 min Belichtung keine Bande bei RhIL-3 (Abbildung 13).

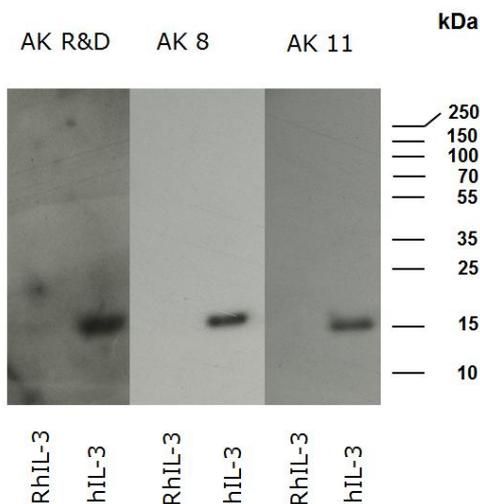


Abbildung 13: Western Blot zur Testung auf Kreuzreaktivität mit linearem RhIL-3. 0,2 µg IL-3/ Lane wurden auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Expositionszeit betrug 5 Sekunden für die hier dargestellten Banden der Antikörper AK 11 und AK8 und 30 min für die hier dargestellte Bande des AK R&D.

3.2.4 EPITOPBESTIMMUNG

3.2.4.1 Testung der linearen Bindung

Um zu testen, ob die Antikörper ein lineares Epitop des humanen IL-3-Proteins erkennen, wurde der Western Blot verwendet. In der Probenvorbereitung des Western Blots wurden Sekundär- und Tertiärstruktur des hIL-3 Proteins zerstört, so dass nur noch das lineare Protein auf der Membran vorhanden ist. Erfolgt eine Bindung der Antikörper an IL-3 im Western Blot, handelt es sich demnach bei dem vom Antikörper erkannten Epitop um eine lineare Sequenz.

Die Antikörper AK 8, AK 11, AK 13, AK 36, AK 42, AK 43, AK 44, AK 45, AK 46 erkannten hIL-3 im Western Blot und binden somit an ein lineares Epitop. AK 2, AK 3, AK 5, AK 6, AK 7, AK 10, AK 28, AK 41, AK 47 binden nicht an lineares IL-3 (Abbildung 14).

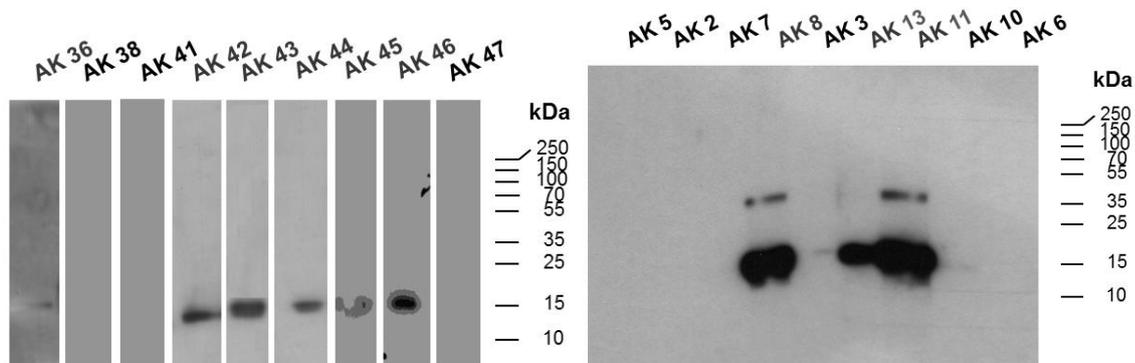


Abbildung 14: Western Blot zur Testung der linearen Bindung der Antikörper. 1 µg IL-3/ Lane wurden auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der jeweilige Klonüberstand (1:10 in 1% Milchpulver verdünnt) fand als Primäantikörper Verwendung. Die Expositionszeit betrug 5 Sekunden.

3.2.4.2 Epitopbestimmung der linearen Antikörper

Um die Epitope der linearbindenden Antikörper näher zu bestimmen wurde die Bindung der Antikörper an überlappende Peptidfragmente des humanen IL-3 im ELISA getestet (Abbildung 15). Die Bindungsstelle der gegen Peptid 1 gerichteten Antikörper wurde noch genauer bestimmt. Da humanes IL-3 sich im Peptid 1 nur an zwei Stellen von Rhesus IL-3 unterscheidet, wurden zwei Peptid 1-Varianten gewählt, in denen jeweils eine Stelle der Rhesusaffensequenz entspricht, die andere der humanen (Peptid 1A, 1B). Zudem wurde die Bindung an Peptid 1 des Mamorset-IL-3 getestet (Peptid 1Ma) (Abbildung 16).

Peptid 1: APMTQTTPLKTSWVNCNMIDEITHL

Peptid 2: EIITHLKQPPLPLLDNFNNLNGEDQDIL

Peptid 3: EDQDILMENNLRPNLEAFNRAVKSLQ

Peptid 4: AVKSLQNASAIESILKNLLPCLPLATA

Peptid 5: LPLATAAPTRHPIHIKGDWNEFRRKL

Peptid 6: EFRRKLTfYlKtLENAQAQQTTLsLAIF

Abbildung 15: Aminosäuresequenzen der Peptide 1-6. Überlappende Sequenzen sind in grau dargestellt.

Peptid 1A: APMTQTTPLKTSWAKCSNMIDEII

Peptid 1B: APMTQTTSLKTSWVNCNMIDEII

Peptid Ma: AAPTQTMPLKTTQVNCNLREEIVTL

Abbildung 16: AS-Sequenzen der Peptide 1A,1B,1Ma. Unterschiede sind grau dargestellt

Die Antikörper AK 11, AK 43, AK 44, AK 45, AK 46 und AK R&D binden an die Peptide 1 und 1B und erkennen somit ein Epitop innerhalb dieser Peptide. Die Bindung des Antikörpers R&D an Peptid 1 ist deutlich geringer als an hIL-3 ($OD_{\text{unverdünnt}} \text{ ca } 1:2$), wohingegen die Antikörper 11, 43, 44, 45 und 46 mit gleicher OD an Peptid 1 binden. AK 42 bindet an Peptid 1, Peptid 1A und 1B. AK 8 bindet an Peptid 6. AK 36 bindet an Peptid 3 und in dreifach geringerem Maße an Peptid 6. Die Antikörper 13, 38, 41 und 47 binden an keines der verwendeten Peptide (Abbildung 19).

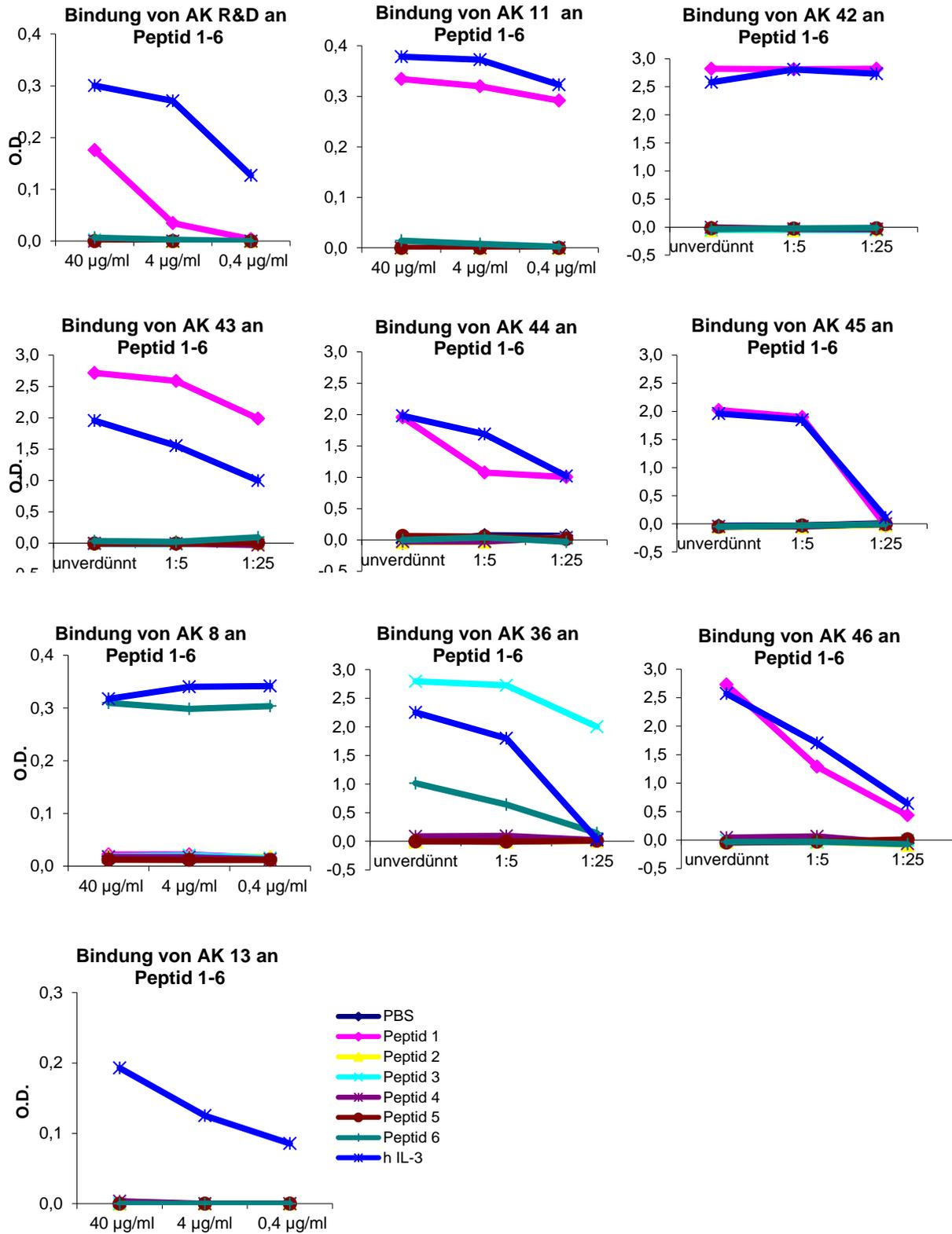


Abbildung 17: Bindung der Antikörper an die Peptide 1 bis 6. An der X-Achse sind die unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen bzw. Verdünnungen angegeben, an der Y-Achse die optische Dichte (OD).

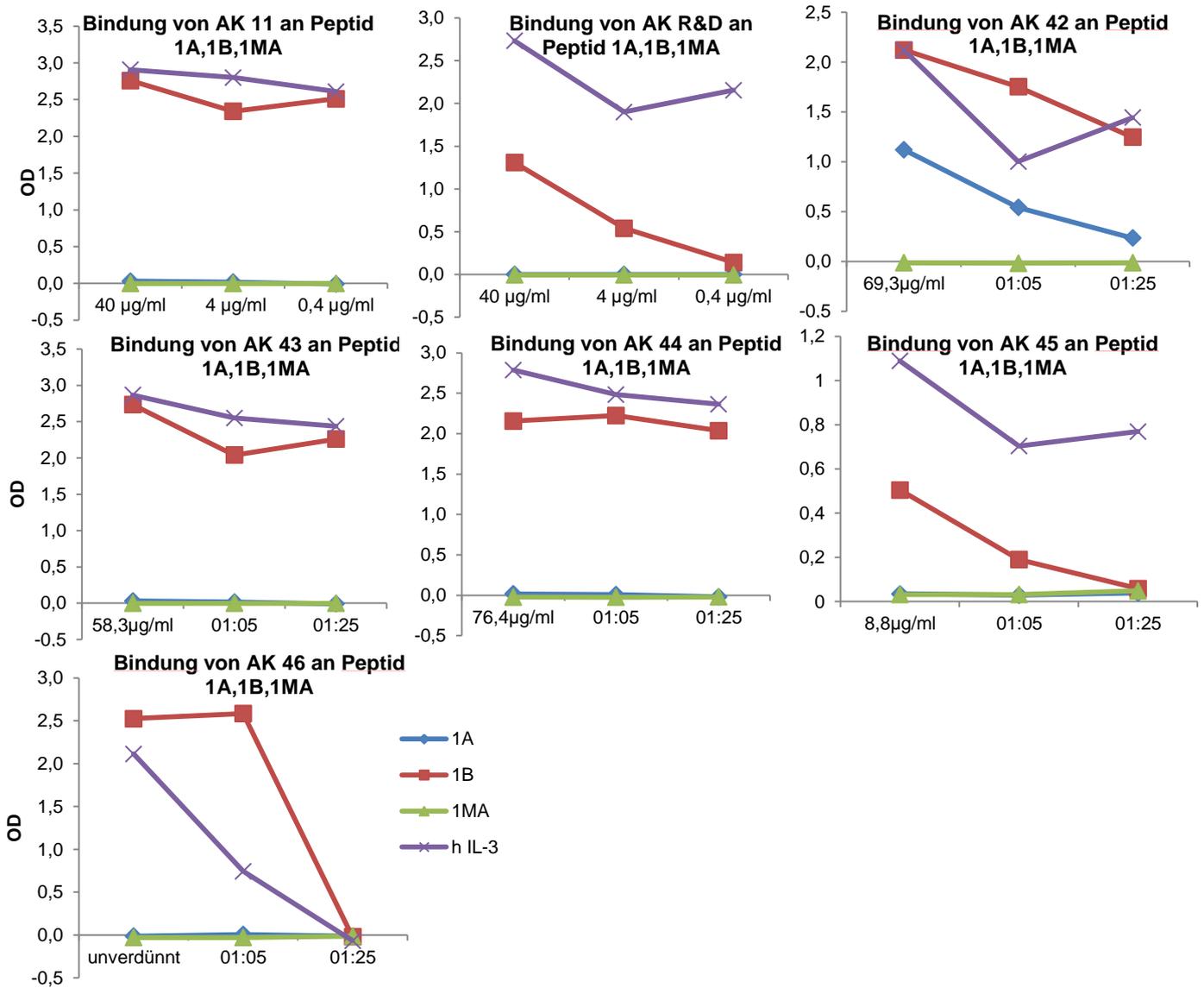


Abbildung 18: Bindung der Antikörper an die Peptide 1A,1B, Ma. An der X-Achse sind die unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen bzw. Verdünnungen angegeben, an der Y-Achse die optische Dichte (OD).

3.2.5 BESTIMMUNG DER RELATIVEN AFFINITÄT DER ANTIKÖRPER

Zur Bestimmung der Affinität wurde die Halbmaximale-Bindung der Antikörper im ELISA ermittelt, da diese mit der Dissoziationskonstante (K_D) übereinstimmt. Diese beträgt 0,5 μ g/ml für AK 3, 0,5 μ g/ml für AK 10, 2,5 μ g/ml für AK 13 und 0,2 μ g/ml für AK R&D (Abbildung 19). Die Affinitäten der Antikörper AK 8 und AK 11 waren zu hoch um in diesem Versuch bestimmt zu werden.

Da bei den Antikörpern AK 38, AK 36, AK 41, AK 42, AK 43, AK 44, AK 45 die Sättigungskonzentration nicht erreicht wurde, konnten keine Werte für die relative Affinität ermittelt werden.

Abbildung 19 kann man die Affinitäten dieser Antikörper im Vergleich zueinander entnehmen. Daraus ergibt sich, dass die Affinität der Antikörper in der folgenden Reihenfolge abnimmt AK 36> AK 47> AK 42> AK 44> AK 41> AK 43> AK 45> AK 38> AK 11> AK 8> AK 3> AK 10> AK 13> AK R&D.

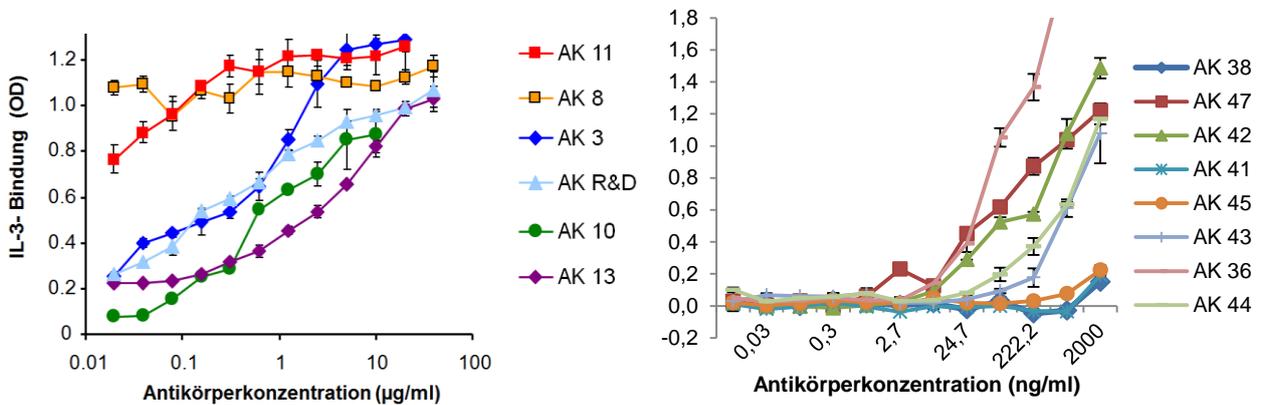


Abbildung 19: Vergleich der Antikörperaffinitäten. Auf der X-Achse ist die optische Dichte für die Bindung der Antikörper an IL-3 angegeben, an der Y-Achse die Antikörperkonzentration. Um sicher zu stellen, dass das IL-3 nicht durch Bindung an die ELISA-Platte denaturiert, wurde mit 2 μ g/ml eines polyklonalen goat anti hIL-3 Antikörper gecoatet, anschließend hIL-3 im Überschuss hinzu gegeben. Als Detektion-Antikörper wurden die eigenen Antikörper sowie AK R&D in verschiedenen Konzentrationen verwendet.

Um die Affinitäten der Klone 8 und 11 zu bestimmen wurden im nächsten Versuch verschiedene Konzentrationen an polyklonalem Goat IgG anti-h IL-3 (goat anti-IL-3) verwendet. In den Proben mit geringerer goat anti-IL-3-Konzentration ist die Anzahl an Bindungsstellen für IL-3 vermindert und die Distanz zwischen den gebundenen IL-3-Molekülen vergrößert. So sollte verhindert werden, dass die Detektionsantikörper (AK11 und AK8) an mehr als eine Bindungsstelle binden und somit die Avidität statt der Affinität gemessen wird. Da zwischen den verschiedenen Konzentrationen goat anti-IL-3 kein sprunghafter Anstieg der relativen Affinität zu verzeichnen ist, handelt es sich bei dem gemessenen Wert um die Affinität. Die K_D des Antikörpers 11 beträgt ca. 30ng/ml; die des Antikörpers 8 ca. 7ng/ml. Somit besitzen beide Antikörper eine deutlich höhere Affinität als der AK von R&D.

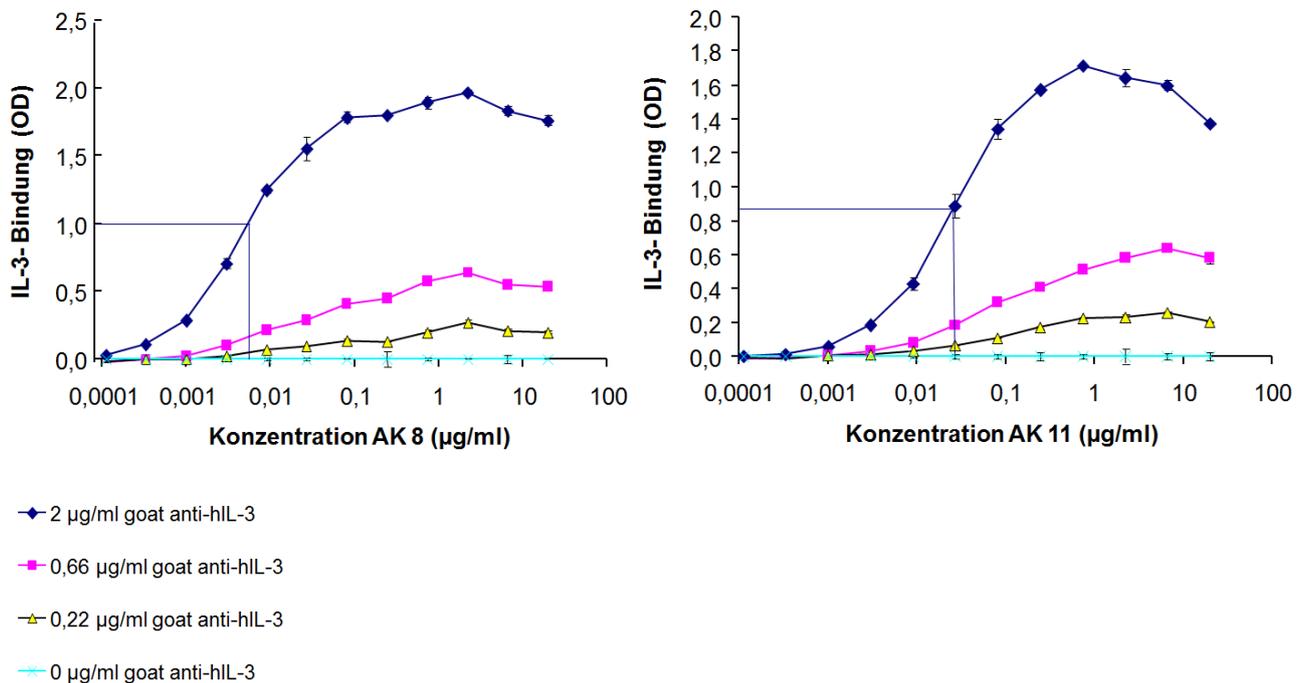


Abbildung 20: Testung der relativen Affinität der Antikörper 8 und 11 mit verschiedenen Konzentrationen an Bindungsprotein. Gecoatet wurde mit verschiedenen Konzentrationen eines polyklonalen goat anti hIL-3 Antikörper (2 µg/ml, 0,66 µg/ml, 0,22 µg/ml), anschließend wurde hIL-3 im Überschuss hinzu gegeben, sodass alle Bindungsstellen des goat anti-hIL-3 Antikörpers besetzt waren. Als Detektion-Antikörper wurden AK 8 und AK11 verwendet. Auf der Y-Achse ist die optische Dichte für die Bindung der Antikörper an IL-3 angegeben, an der X-Achse die Antikörperkonzentration. Die Halbmaximale-Bindung bei einer goat anti-hIL-3-Konzentration von 2µg/ml ist mit einem schwarzen Strich gekennzeichnet.

3.2.6 BLOCKADE DER BIOLOGISCHEN IL-3-AKTIVITÄT DURCH DIE HERGESTELLTEN ANTIKÖRPER

Um die proinflammatorischen Effekte von IL-3 zu verhindern, muss ein therapeutisch wirkender Antikörper die biologische Aktivität von IL-3 unterbinden. Um zu untersuchen, ob dies bei den hergestellten Antikörpern der Fall ist, verwendeten wir TF1- Zellen, eine erythroleukämische Zelllinie, welche für Wachstum und Überleben auf Zytokine wie IL-3 und GM-CSF angewiesen ist.

3.2.6.1 Bestimmung der Wachstumskurven von TF1- Zellen in Abhängigkeit verschiedener Wachstumsfaktoren

Zunächst wurde die Proliferation der TF1 Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration von IL-3 und GMCSF untersucht um die optimale Konzentration der Wachstumsfaktoren und der TF-1-Zellen/Well zu bestimmen (siehe 2.2.20.1). Die TF-1 Zellen proliferierten bis zu einer IL-3 Konzentration von 1,25ng/ml dosisabhängig. In höheren Konzentrationen stieg die Proliferation nur geringfügig an. Das beste Ansprechen wurde bei einer TF-1-Anzahl von 10.000 Zellen/Well erzielt (Abbildung 21).

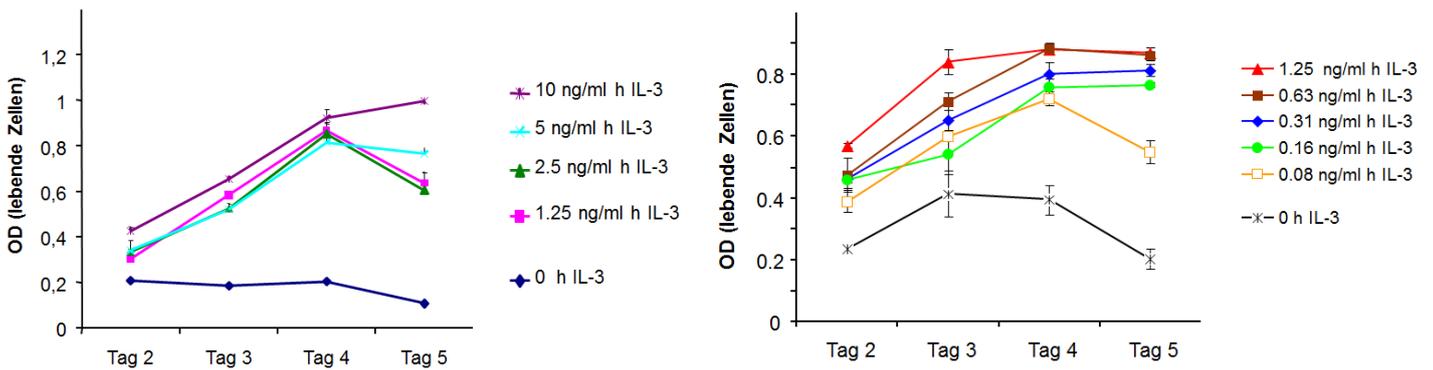


Abbildung 21: Proliferationsversuch mit hIL-3. 10.000 TF-1 Zellen wurden für 2,3,4 und 5 Tage mit verschiedenen Konzentrationen hIL-3 inkubiert. Mittels MTT-Assay wurde die Anzahl an lebenden Zellen semiquantitativ bestimmt.

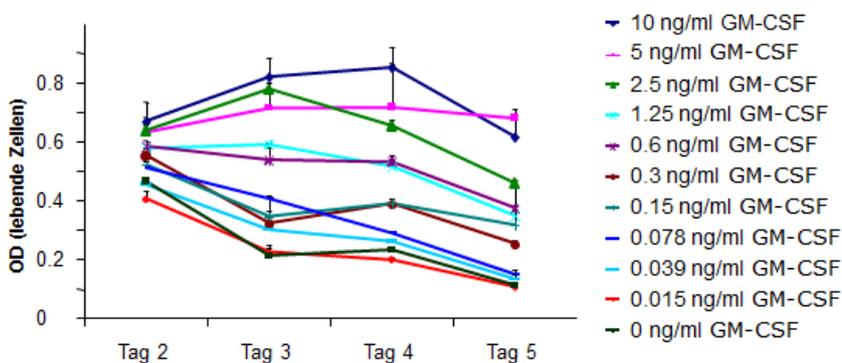


Abbildung 22: Proliferationsversuch mit h GM-CSF. 10.000 TF-1 Zellen wurden für 2,3,4 und 5 Tage mit verschiedenen Konzentrationen hGM-CSF inkubiert. Mittels MTT-Assay wurde die Anzahl an lebenden Zellen semiquantitativ bestimmt.

Die zur Proliferation benötigte Dosis von GM-CSF lag deutlich über der benötigten IL-3-Menge. 1,25 ng/ml IL-3 brachte die TF-1 Zellen zu einer Proliferation von ca. 0,8 OD. Die gleiche Menge an GM-CSF führte zu einer OD von 0,4 an Tag 5. Vergleicht man jedoch TF-1 Zellen, die mit 0,15 ng/ml kultiviert wurden, mit TF-1 Zellen ohne Zugabe von GM-CSF, so lässt sich ein proliferationsfördernder Effekt bis zu dieser geringen Konzentration feststellen. Geringere Konzentrationen als 0,15 ng/ml führten zu keiner Proliferation.

Auf Grund dieses Vorversuchs entschieden wir uns für eine Konzentration von 10.000 TF-1 Zellen/Well und eine Testung der Blockadefähigkeit der Antikörper bei 10 ng/ml, 5 ng/ml; 2,5 ng/ml; 1,25 ng/ml; 0,655 ng/ml und 0,3125 ng/ml IL-3 bzw. 5 ng/ml; 2,5 ng/ml; 1,25 ng/ml; 0,655 ng/ml und 0,3125 ng/ml GM-CSF .

Zudem wurde getestet, ob Rh IL-3 eine Wirkung auf humane Zellen entfaltet und wie stark diese im Vergleich zu hIL-3 ist. Hierfür wurde die Proliferation der TF-1 Zellen durch Zugabe von Rh IL-3 und hIL-3 untersucht (siehe 2.2.20.1). Sowohl rh IL-3 (5 ng/ml) als auch hIL-3 (5 ng/ml) verbesserten das Zellüberleben im Vergleich zu Medium. TF-1 Zellen, welche in hIL-3 kultiviert wurden, proliferierten stärker als jene, die in rh IL-3 kultiviert wurden (ca. 2:1) (Abbildung 23).

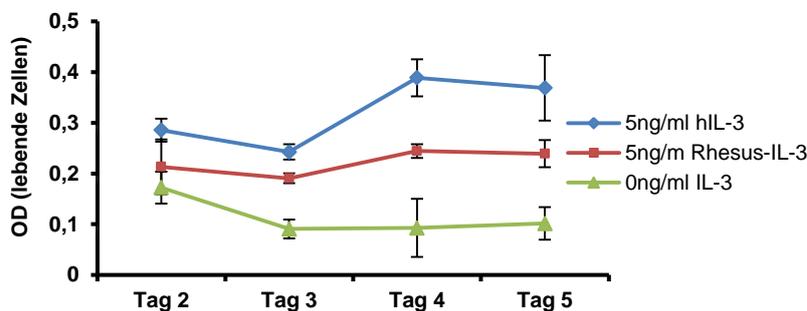


Abbildung 23: Vergleich der TF-1 Proliferation mit hIL-3 bzw Rhesus-IL-3. 10.000 TF-1 Zellen wurden für 2,3,4 und 5 Tage mit 5 ng/ml hIL-3 bzw. 5 ng/ml RhIL-3 inkubiert. Mittels MTT-Assay wurde die Anzahl an lebenden Zellen semi-quantitativ bestimmt.

3.2.6.2 Blockierung des IL-3-abhängigen Wachstums von TF1- Zellen

Um zu testen, ob die IL-3 abhängige Proliferation der TF-1 Zellen durch Zugabe der Antikörper verhindert werden kann, wurde hIL-3 eine Stunde mit verschiedenen Konzentrationen der Antikörper präinkubiert. Um sicherzustellen, dass es sich bei den gemessenen Effekten um eine spezifische Wirkung der anti-IL-3-Antikörper handelt und nicht durch einen antigenunabhängigen Effekt der Antikörperzugabe handelt, wurde als Kontrolle ein nicht gegen IL-3 gerichteter IgG-Antikörper in der höchsten Antikörperkonzentration (Isotypkontrolle) verwendet. Anschließend wurden 10.000 TF-1 Zellen pro Well hinzugegeben (siehe 2.2.20.2).

Die Antikörper AK 3, AK 10, AK 36, AK 38, AK 41, AK 45, AK 47 führten zu keiner Verringerung in der TF-1 Proliferation im Vergleich zum Isotyp und der Kontrolle ohne Antikörper. AK 11 blockiert die Proliferation mit einer mittleren Hemmkonzentration (IC_{50}) von 10 ng/ml am effektivsten. Auch AK R&D ($IC_{50}=33$ ng/ml) und AK 13 ($IC_{50}=200$ ng/ml) führten zu einer deutlichen Proliferationsverminderung. Die IC_{50} von AK 44 liegt bei 6 μ g/ml. Bei AK 8, AK 42 und AK 43 verminderte sich die Proliferation ebenfalls leicht. Die mittlere Hemmkonzentration konnte jedoch nicht bestimmt werden, da die maximale Hemmung nicht erreicht wurde. Die IC_{50} des Klons 8 liegt über 3 μ g/ml, die des Klons 42 über 9 μ g/ml und die des Klons 43 über 27 μ g/ml (Abbildung 24).

Zudem wurde die Fähigkeit der Antikörper zur Blockade von GM-CSF getestet (siehe 2.2.20.2). Keiner der getesteten Antikörper (AK 3, AK 8, AK 10, AK 11, AK 13 oder AK R&D) führte zu einer Blockade der GM-CSF-Wirkung. Somit blockieren die Antikörper spezifisch die Wirkung von IL-3 an den TF-1-Zellen.

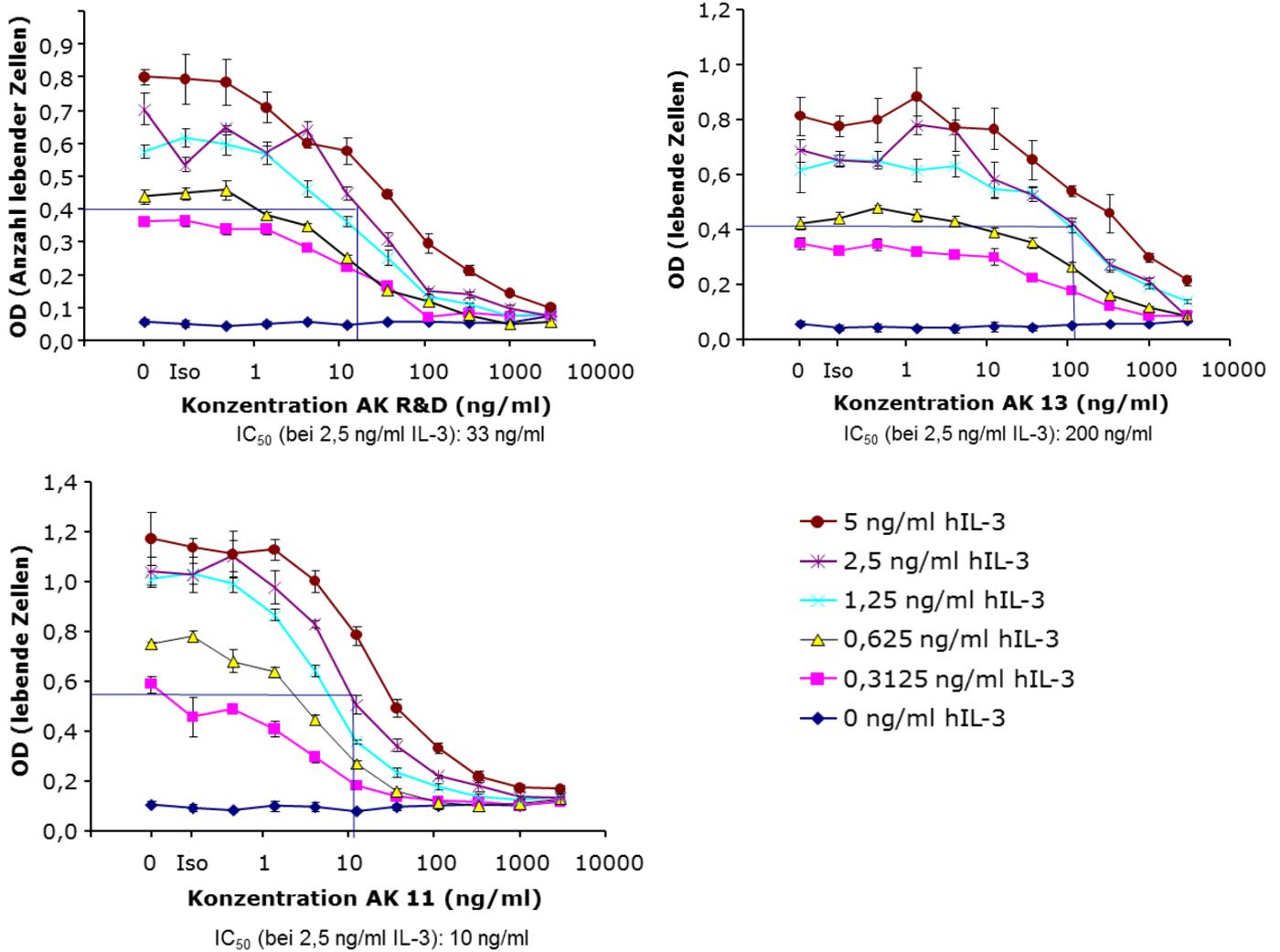


Abbildung 24: Blockierung des IL-3- abhängigen Wachstums von TF1- Zellen. Es sind lediglich AK11, AK13 und AK R&D dargestellt. In der Abbildung ist die TF-1 Proliferation in Abhängigkeit von der Konzentration der zu untersuchenden Antikörper dargestellt. Die IC_{50} der Antikörper ist ebenfalls angegeben. 10.000 TF-1 Zellen pro Well wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an hIL-3 sowie verschiedenen Konzentrationen der Anti-IL-3 Antikörper kultiviert. Nach 5 Tagen wurde ihre Proliferation mittels MTT-Assay bestimmt

3.2.6.3 Blockade der Wirkung von GM-CSF durch Zugabe von IL-3 und IL-3-Antikörpern

Wie in 2.2.20.2 beschrieben, wurde untersucht, inwiefern die Zugabe von IL-3 und anti-IL-3-Antikörpern die von GM-CSF vermittelte Proliferation verändert. Die zusätzliche Gabe von 2,5 ng/ml IL-3 führte nicht zu einer vermehrten Proliferation im Vergleich zur alleinigen Gabe von 2,5 ng/ml GM-CSF. Auch die Blockade des IL-3 durch AK 8, AK 11, AK 13 oder AK R&D ergab keine Veränderung der TF-1-Proliferation. Die Blockade von IL-3 ohne GM-CSF führte zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Proliferation bei den blockierenden Antikörpern AK 11, AK 13, AK R&D. Dies stimmt mit den Ergebnissen aus 3.2.6.2 überein (Abbildung 25). Somit interferieren weder die anti-IL-3-Antikörper noch die Komplexe aus IL-3 und Antikörper mit der Wirkung von GM-CSF auf die TF-1-Zellen.

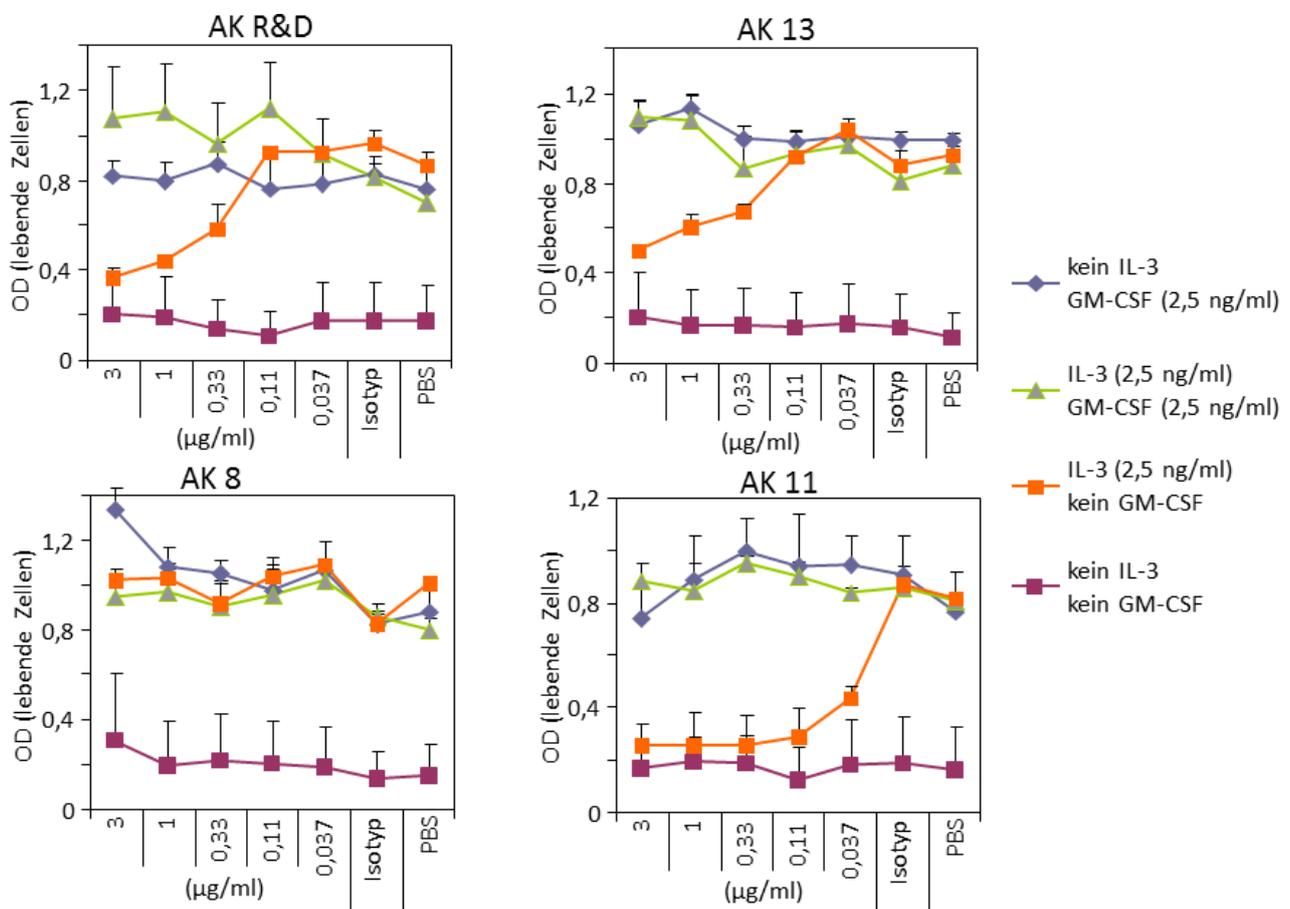


Abbildung 25: Blockade der Wirkung von GM-CSF durch Zugabe von IL-3 und IL-3-Antikörpern. Verschiedene Antikörperkonzentrationen von AK 8, AK 11, AK 13, AK R&D wurden ohne Zytokine, mit 2,5 ng/ml GM-CSF; 2,5 ng/ml IL-3; 2,5 ng/ml IL-3 und 2,5 ng/ml GM-CSF inkubiert. Am Tag 5 wurde die Proliferation der Zellen bestimmt.

3.2.7 *BESTIMMUNG DER IL-3 KONZENTRATION IM HUMANEN IL-3 VON PEPROTECH INC.*

Da es vorkommt, dass die vom Hersteller angegebenen Konzentrationen nicht mit der tatsächlich in der Probe vorhandenen Konzentration übereinstimmt, wurde mittels ELISA die Konzentration im hIL-3 von PeproTech Inc. überprüft. Es stellte sich heraus, dass pro angegebenem 1 µg 2,5 µg enthalten waren. In den folgenden Experimenten wurde von der angegebenen Konzentration an hIL-3 ausgegangen, die tatsächliche Konzentration lag somit 2,5-fach höher.

3.2.8 *BLOCKADE DER IL-3 BINDUNG AN PBMCs*

Nachdem die Antikörper AK 13, AK 11 und AK R&D die Wirkung von IL-3 an der leukämischen Zelllinie TF-1 blockieren, sollte untersucht werden, ob sie auch in der Lage sind die Bindung von IL-3 an normale Leukozyten des Bluts zu verhindern. Dies wurde mit Hilfe des IL-3-Blocking-Assays von R&D untersucht. Zu diesem Zweck wurde biotinyliertes IL-3 mit verschiedenen Konzentrationen anti-IL-3-Antikörper inkubiert, anschließend wurden die mononukleären Zellen (PBMCs) hinzugegeben. Das an die Zellen gebundene IL-3 wurde mit FITC angefärbt. Somit war der Mean der FITC-Intensität proportional zur Anzahl an die Zellen gebundener IL-3-Moleküle. Zur Unterscheidung der Zellpopulationen im FACS wurden zudem CD123, die α -Kette des IL-3-Rezeptors (PE- Cy5.5) und HLA-DRII (APC) angefärbt (Abbildung 26).

Die Antikörper AK 13, AK 11 und AK R&D blockierten die Bindung von IL-3 deutlich bei allen untersuchten Zellarten. AK 8 hatte einen deutlich geringen blockierenden Effekt. Der im „IL-3-Blocking Assay“ enthaltene polyklonale Anti-IL-3-Antikörper (Blocking Antibody) führte zu einer stärkeren IL-3-Blockade als alle getesteten monoklonalen Antikörper. Da der gemessene FITC-Mean mit „Blocking Antibody“ dem der Negativkontrollen entspricht, kann davon ausgegangen werden, dass durch diesen praktisch alle IL-3-Moleküle abgefangen werden (Abbildung 27, Abbildung 28, Abbildung 29, Abbildung 30).

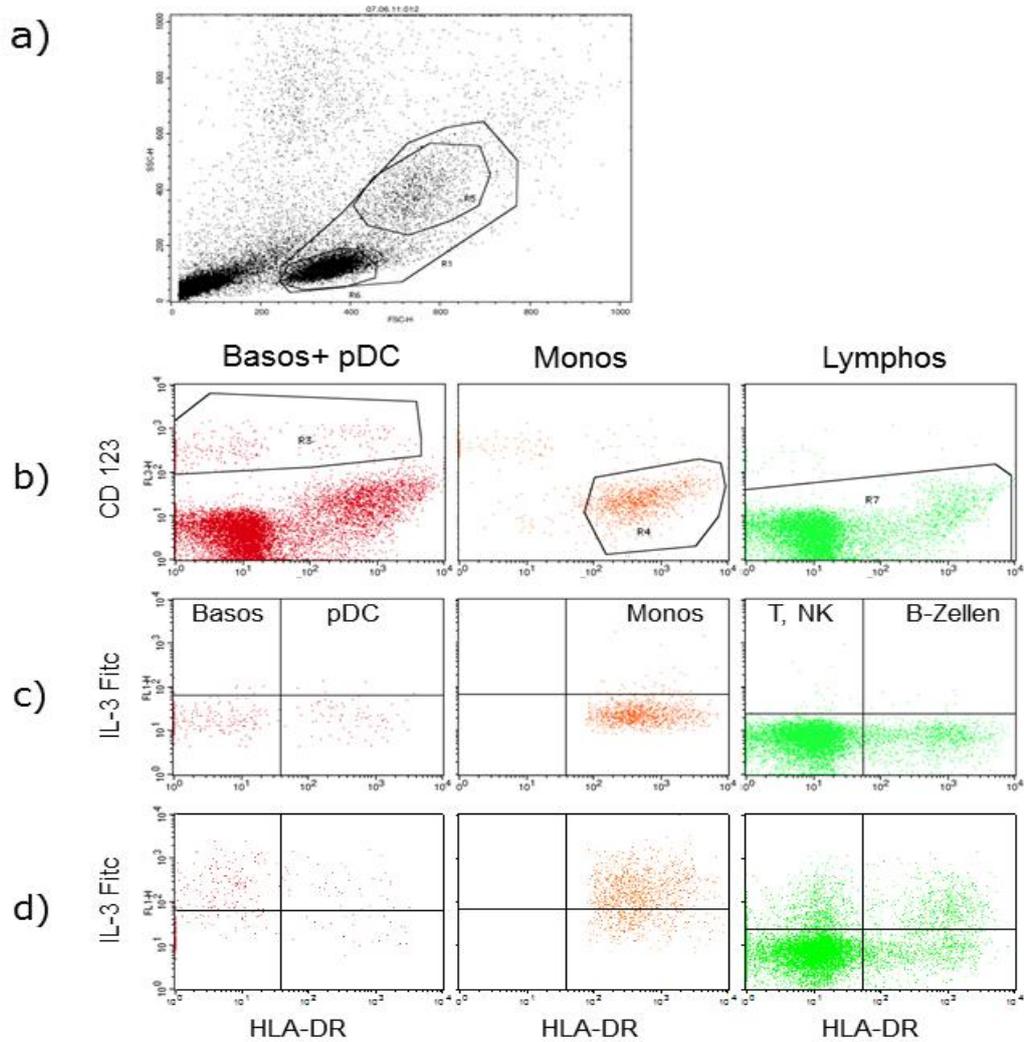


Abbildung 26: Gatingschema für PBMCs. Zur Unterscheidung der Zellpopulationen wurden CD123 (PE- Cy5.5) und HLA-DR11 (APC) gefärbt. CD123 ist - wo angegeben - an der Y-Achse aufgetragen, HLA-DR an der X-Achse. a) im Forward-Sideward-Scatter werden die Zellen nach Granularität und Größe aufgetrennt. Hier liegen die Monozyten über und rechts des Lymphozytengates. b) Gates für die einzelnen Zellpopulationen: Basophile (Basos) und plasmazytoide Dendritische Zellen (pDC) sind CD123 positiv, Monozyten und Lymphozyten CD123 negativ. Monozyten, pDC und B-Zellen exprimieren HLA-DR; Basophile, T- und NK-Zellen nicht. c) Negativkontrolle ohne biotinyliertes IL-3. d) Positivkontrolle mit biotinyliertem IL-3.

3.2.8.1 Blockierung der IL-3-Bindung an Basophile

Der FITC-Mean-Wert in der Isotyp-Kontrolle für Basophile lag bei 88,3. In der höchsten Antikörperkonzentration führte AK 13 zu einer Verminderung dieses Wertes auf 18,4, AK R&D auf 18,7, AK 11 auf 38,2 und AK 8 auf 72,0. Somit verringerten AK 13 und AK R&D die IL-3-Bindung an Basophile auf ca. 21%, AK 11 auf ca. 43%, AK 8 auf ca. 82% des Ausgangswertes. In geringen Konzentrationen (0,3µg/ml; 1µg/ml) zeigten alle Antikörper zunächst eine geringe Zunahme der IL-3-Bindung. Zwischen 3µg/ml und 11 µg/ml lag bei AK 11, AK 13 und AK R&D der stärkste Abfall in der IL-3 Bindung (Abbildung 27).

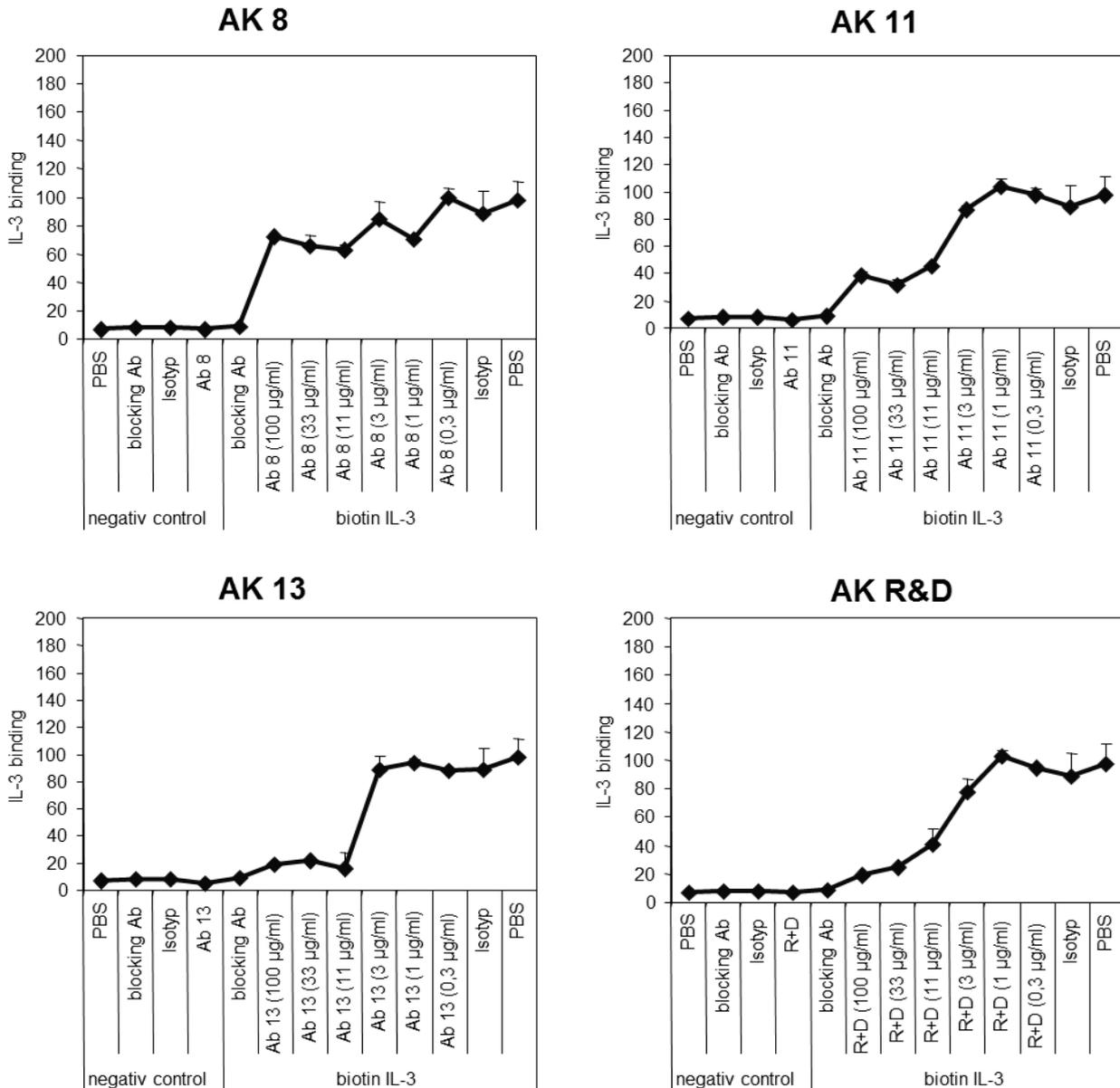


Abbildung 27: Blockade der IL-3-Bindung an Basophile Granulozyten durch AK 8, AK 11, AK 13 und AK R&D.

Auf der Y-Achse ist der FITC-Mean als Maß für die IL-3-Bindung der Zellen dargestellt; auf der X-Achse die Negativkontrollen (ohne biotin IL-3) auf der linken Seite sowie die Positivkontrollen (mit biotin IL-3) auf der rechten Seite der jeweiligen Grafik. Die Antikörper wurden für die Positivkontrollen in einer 1:3-Verdünnungsreihe in Konzentrationen zwischen 100µg/ml bis 0,3 µg/ml eingesetzt. Bei dem blocking Ab handelt es sich um einen polyklonalen im „IL-3 Blocking Assay“ enthaltenen anti-IL-3 Antikörper.

3.2.8.2 Blockade der IL-3-Bindung an Plasmazytoide Dendritische Zellen (pDZ)

In der Isotyp-Kontrolle lag der FITC-Mean bei 118,0. Die höchsten Antikörperkonzentrationen führten zu einer Verminderung dieses Wertes auf 18,7 durch AK 13, auf 23,5 durch AK R&D; 30,7 durch AK 11 und 70,1 durch AK 8. Dies entspricht einer Abnahme der IL-3-Bindung an die pDz durch Zugabe von AK 13 auf ca. 16% im Vergleich zur Isotypkontrolle, ca. 20% durch AK R&D, ca. 26% durch AK 11 und ca. 59% durch AK 8. AK 11, AK 13 und AK R&D führten zu einer weitgehend linearen Abnahme der IL-3-Bindung bei erhöhter Antikörperkonzentration. Die Blockade durch Antikörper 8 erreichte bei 11µg/ml ein Plateau. Auf Grund der geringen Anzahl an pDZs in PBMCs zeigte sich eine hohe Standardabweichung, wodurch die gemessenen Werte in den Antikörperkonzentrationen unter 3 µg/ml eine geringe Signifikanz besitzen (Abbildung 28).

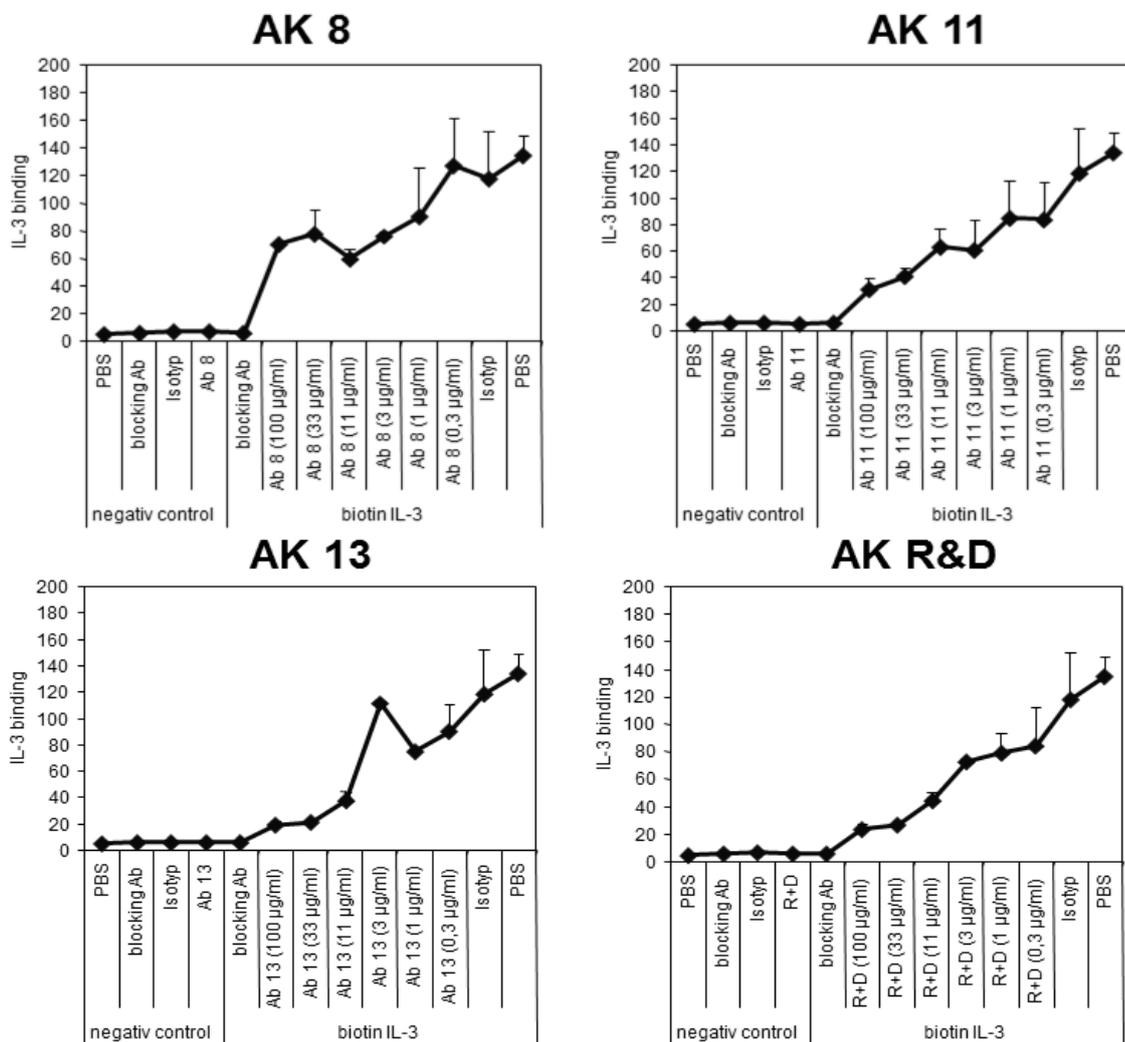


Abbildung 28: Blockade der IL-3-Bindung an pDZs durch die Antikörper 8, 11, 13, R&D. Auf der Y-Achse ist der FITC-Mean als Maß für die IL-3-Bindung der Zellen dargestellt; auf der X-Achse die Negativkontrollen (ohne biotin IL-3) auf der linken Seite sowie die Positivkontrollen (mit biotin IL-3) auf der rechten Seite der jeweiligen Grafik. Die Antikörper wurden für die Positivkontrollen in einer 1:3-Verdünnungsreihe in Konzentrationen zwischen 100µg/ml bis 0,3 µg/ml eingesetzt. Bei dem blocking Ab handelt es sich um einen polyklonalen im „IL-3 Blocking Assay“ enthaltenen anti-IL-3 Antikörper.

3.2.8.3 Blockade der IL-3-Bindung an B-Lymphozyten (B-Zellen)

In der Isotypenkontrolle betrug der FITC-Mean 48,9. Durch Zugabe der Antikörper in ihrer höchsten Konzentration (100µg/ml) konnte dieser durch AK 13 auf 7,0 gesenkt werden (dies entspricht einer Hemmung der IL-3-Bindung auf ca. 14% der Isotypkontrolle), bei AK R&D auf 7,6 (ca. 15%), bei AK 11 auf 20,3 (ca. 42%) und durch AK 8 auf 24,4 (ca. 50%). In geringen Konzentrationen (0,3 µg/ml und 1µg/ml) führen AK 8 und AK 11 zu einer vermehrten Bindung des IL-3 an B-Lymphozyten. In höheren Konzentrationen führt AK 11 zu einer linearen Abnahme der IL-3-Bindung. Klon 8 zeigte ein Plateau bei 3 µg/ml. Die Zugabe des Antikörpers R&D führt zu einer linearen Abnahme der IL-3-Bindung. Bei Klon 13 ist der stärkste Abfall der IL-3-Bindung zwischen 3 und 11 µg/ml zu verzeichnen (Abbildung 29).

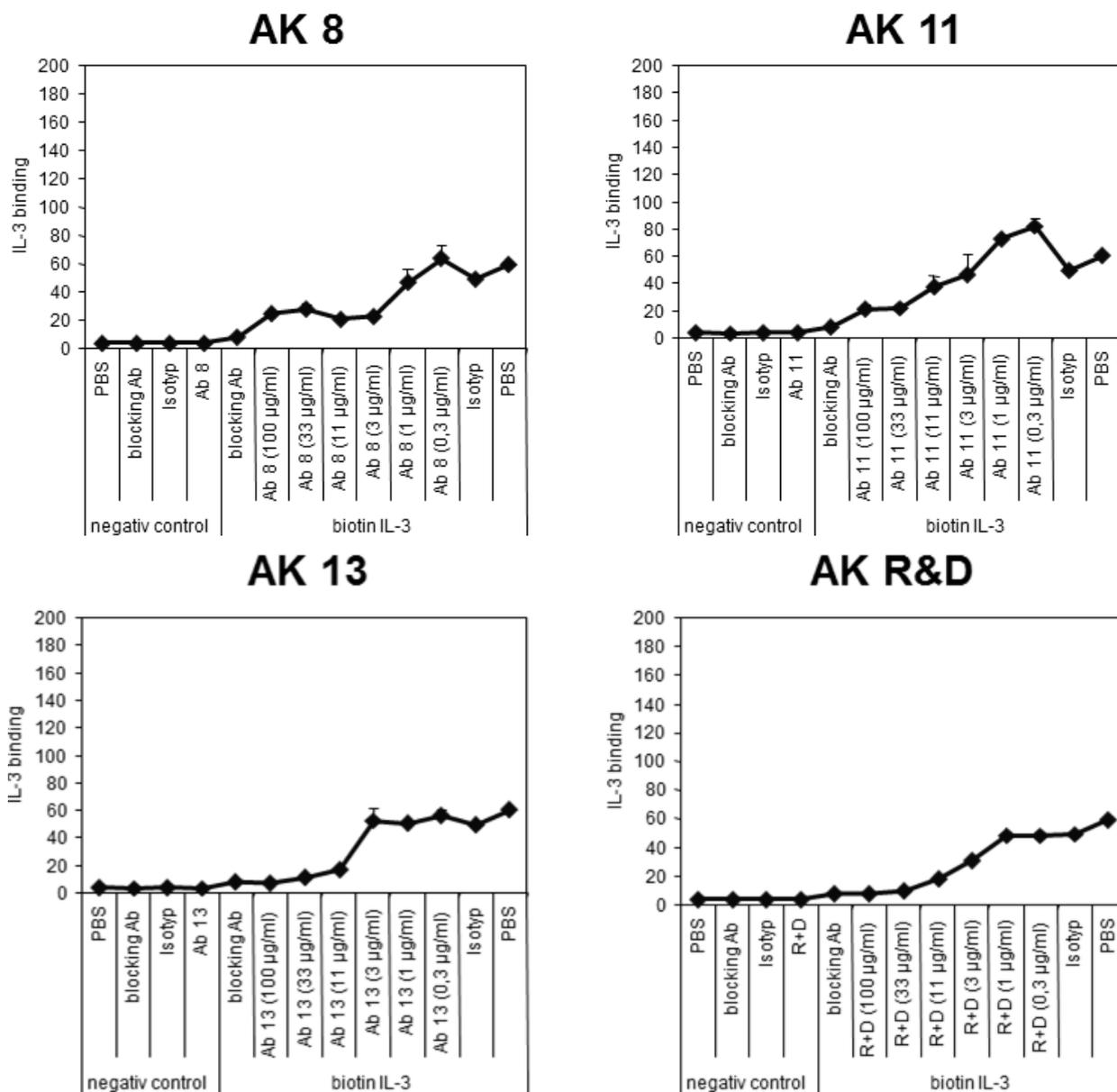


Abbildung 29: Blockade der IL-3 Bindung an B-Zellen durch die Antikörper 8, 11, 13, R&D. Beschriftung siehe Abb.27.

3.2.8.4 Blockade der IL-3-Bindung an Monozyten

Durch Zugabe der Antikörper kommt es zu einer Verminderung der IL-3-Bindung an Monozyten und damit des FITC-Means von 135,9 (Isotypenkontrolle). 100 µg/ml AK 13 führen zu einem FITC-Mean von 26,2. Der Mean bei Zugabe der gleichen Menge Antikörper R&D liegt mit 26,8 nur knapp darunter (beides ca. 19% der Isotypkontrolle); für AK 11 lag er bei 49,2 (ca.36%). 100 µg/ml AK 8 hatten kaum blockierende Wirkung; der Mean lag bei 93,8 (ca. 69%) (Abbildung 30).

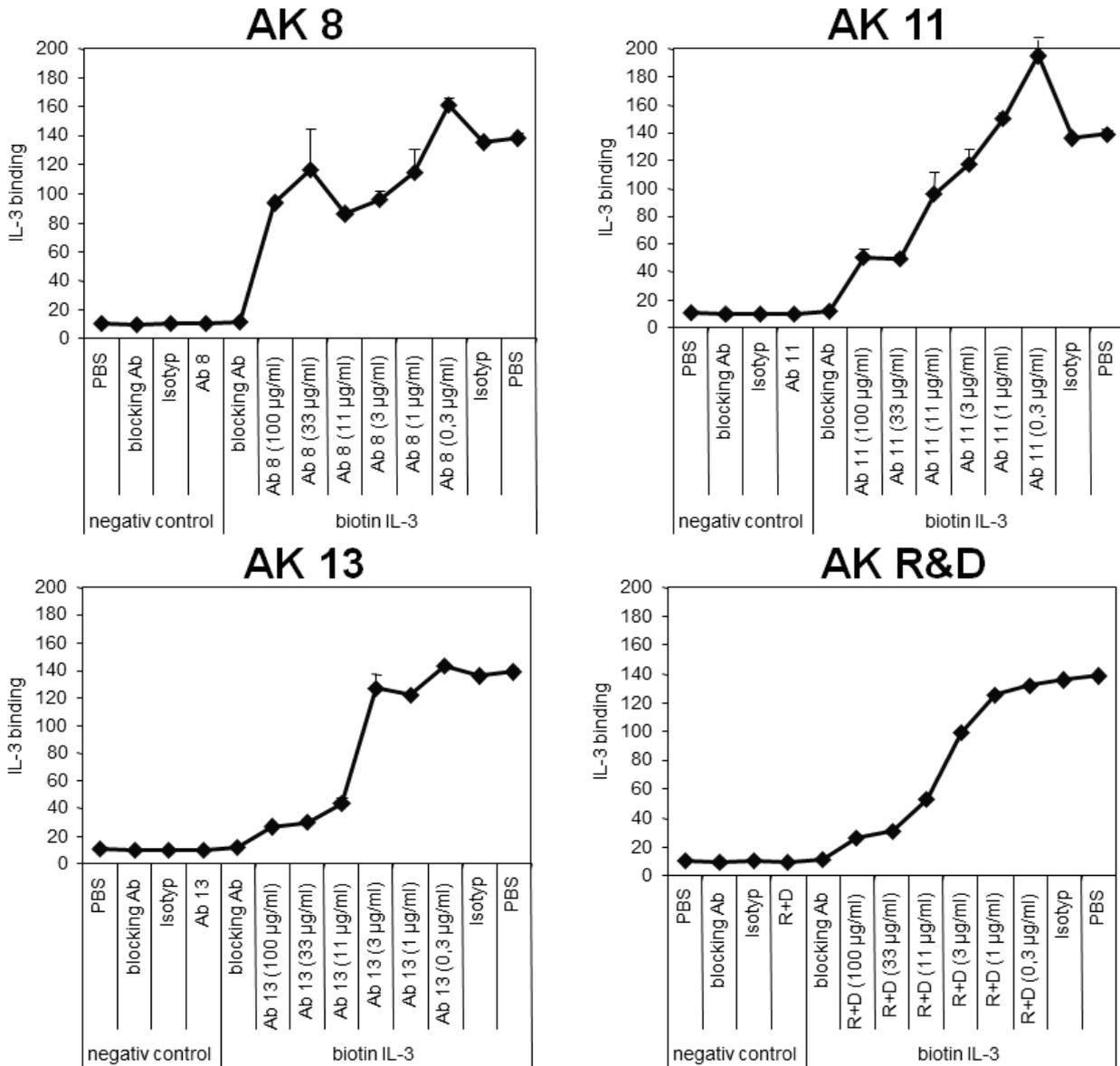


Abbildung 30: Blockade der IL-3 Bindung an Monozyten durch die Antikörper 8, 11, 13, R&D. Beschriftung der Grafiken siehe Abb. 27.

3.2.9 *STIMULATION HUMANER BASOPHILER DURCH IL-3 UND ANDERE SUBSTANZEN*

Um zu testen, ob die Funktionen humaner Basophiler durch die Antikörper unterbunden werden, sollte zunächst untersucht werden, welche Effekte durch ihre Stimulation ausgelöst werden. Die Aktivierung der Basophilen wurde im FACS durch den Median des Aktivitätsmarker CD203c bestimmt.

Da von murinen Basophilen die Freisetzung von IL-4, IL-6 und IL-13 und von humanen Basophilen die Freisetzung von IL-4 und IL-13 bekannt ist, sollten diese 3 Zytokine im Überstand stimulierter Basophilenkulturen detektiert werden. Hierfür wurden aus humanem Vollblut isolierte Basophile Granulozyten in Rundbodenplatten mit verschiedenen Stimuli kultiviert.

Es wurde durch folgende Bedingungen stimuliert:

10 ng/ml humanes IL-3, 1 µg/ml humanes anti- IgE, 10 ng/ml humanes C5a, 10 ng/ml humanes IL-3+ 1 µg/ml humanes anti- IgE, 10 ng/ml humanes IL-3+ Zugabe von 10 ng/ml humanem C5a nach 15 Minuten, ohne Zusätze.

Die Inkubation erfolgte für 5 bzw. 24 Stunden.

3.2.9.1 5-stündige Inkubation

Nach 5-stündiger Stimulation ergaben sich folgende Werte:

In den Proben ohne Zusätze war der Mittelwert des CD203c Means 895,5. Bei IL-3-Stimulation erhöhte sich der CD203c Mean auf 3525,5, durch anti-IgE-Zugabe auf 3001,5; durch Stimulation sowohl mit IL-3 als auch anti-IgE auf 5990. Die Stimulation mit humanem C5a führte zu einem CD203c Mean-Wert von 7175,5, die Kombination von C5a und IL-3 zu 7594.

Die IL-4-Konzentration in dem Überstand ohne Stimulation betrug 0pg/ml; durch alleinige Zugabe von IL-3 erhöhte sich diese geringfügig auf 0,53 pg/ml, durch anti-IgE alleine auf 22,64. IL-3 und anti-IgE in Kombination führten zu einer IL-4 Konzentration von 63,73 pg/ml. C5a alleine führte zu einer Konzentration von 44,03 pg/ml, mit IL-3 hingegen nur von 5,09 pg/ml.

Der Mittelwert der IL-13-Konzentration im unstimulierten Überstand entsprach 0,15 pg/ml. Durch Stimulation mit IL-3 erhielt man eine IL-13 Konzentration von 6,12 pg/ml, mit anti-IgE 36 pg/ml. Die Stimulation mit anti-IgE und IL-3 führte zu einer Konzentration von 37,75 pg/ml. Durch C5a Zugabe ergab sich eine IL-4 Konzentration von 14,55 pg/ml, zusammen mit IL-3 von 26,74 pg/ml.

Die hIL-6 Konzentration lag unter allen Bedingungen bei 0pg/ml.

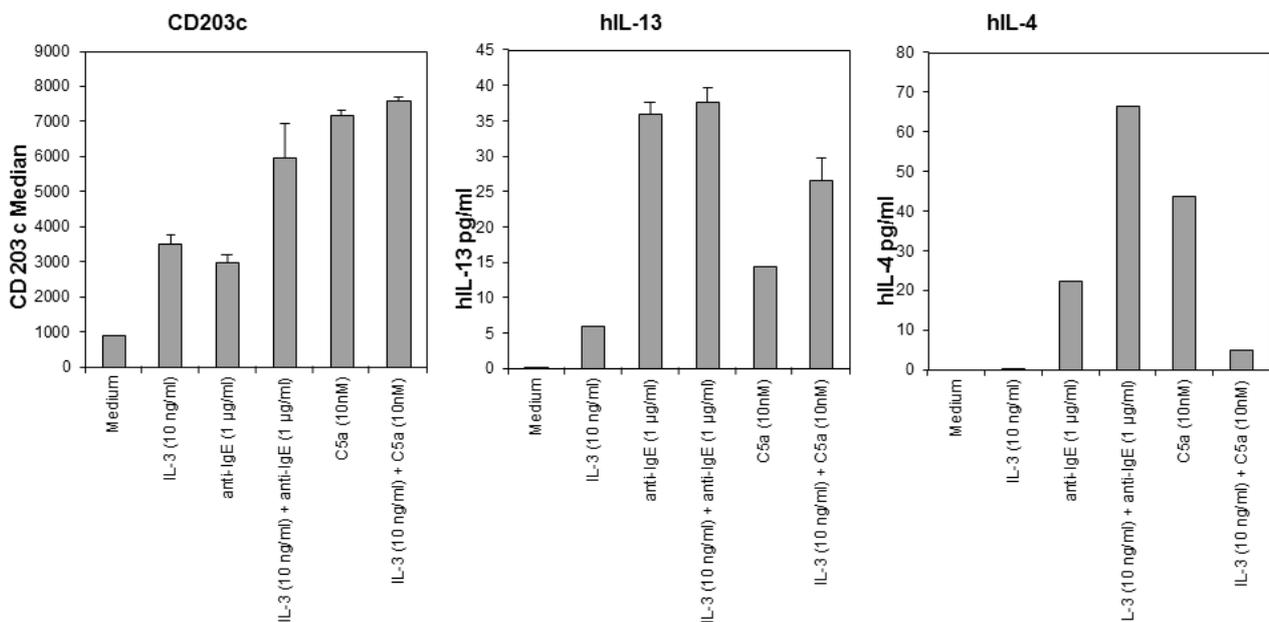


Abbildung 31: Analyse der von Basophilen ausgeschütteten Zytokine unter verschiedenen Stimulationsbedingungen. Die Stimulationszeit betrug 5 Stunden.

3.2.9.2 24-stündige Inkubation

Nach 24-stündiger Inkubation war der Mittelwert des CD203c Mean in Medium 992,5; unter IL-3 Zugabe lag er bei 5304, unter anti-IgE-Zugabe bei 1727, bei Stimulation mit anti-IgE und IL-3 bei 3809,5. Die Stimulation mit humanem C5a erbrachte einen Mean Mittelwert von 879,5, zusammen mit IL-3 von 4693.

Die IL-4 Konzentration im unstimulierten Überstand entsprach 0 pg/ml. Die Zugabe von IL-3 führte zu Werten von 2,54 pg/ml, die von anti-IgE zu 95,05 pg/ml. Die Stimulation mit anti-IgE und IL-3 führte zu einer Konzentration von 142 pg/ml. Durch C5a Stimulation ergab sich eine IL-4 Konzentration von 1,21 pg/ml, zusammen mit IL-3 von 7,09 pg/ml.

Als Mittelwert der IL-13-Konzentration ergab sich 0 pg/ml in dem Überstand ohne Zusätze. Bei IL-3-Stimulation betrug dieser 54,45 pg/ml; bei alleiniger anti-IgE-Aktivierung 41,56 pg/ml. IL-3 und anti-IgE in Kombination führten zu einer IL-13-Konzentration von 66,68 pg/ml. Die Zugabe von humanem C5a alleine ergab eine Konzentration von 1,46 pg/ml, mit IL-3 von 58,87 pg/ml. Die IL-6-Konzentration in den Überständen wich weder bei 5-stündiger noch bei 24-stündiger Inkubation unter keiner Bedingung von 0 pg/ml ab.

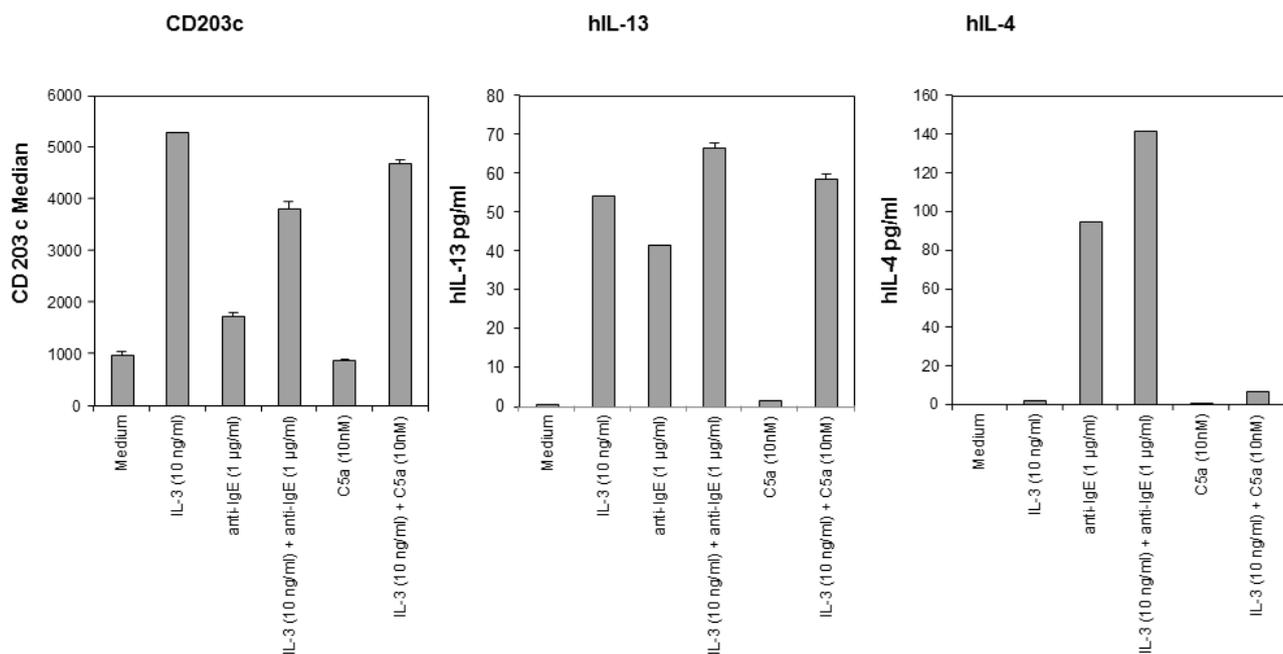


Abbildung 32: Analyse der von Basophilen ausgeschütteten Zytokine unter verschiedenen Stimulationsbedingungen. Die Stimulationszeit betrug 24 Stunden.

3.2.10 STIMULATION HUMANER PBMCs DURCH IL-3 UND ANDERE SUBSTANZEN

Die untersuchten Bedingungen entsprachen denen des Basophilenstimulationsversuchs (siehe 3.2.9).

Die Mittelwerte der IL-6-Konzentration in den Überständen betragen ohne Stimulation 11,21 pg/ml, nach Zugabe von IL-3 43,73 pg/ml, nach Anti-IgE Stimulation 38,34 pg/ml. In Kombination führten anti-IgE und IL-3 zu einer IL-6-Konzentration von 140,15 pg/ml. Die Stimulation mit C5a ergab eine IL-6-Konzentration von 95,29 pg/ml, in Kombination mit IL-3 von 170,4 pg/ml.

Ohne Aktivierung lag der Mittelwert der IL-13-Konzentration bei 2,47 pg/ml, nach Stimulation mit IL-3 bei 5,04 pg/ml, mit anti-IgE bei 7,59 pg/ml. IL-3 und anti-IgE in Kombination führten zu einem Mittelwert von 8,05 pg/ml, IL-3 kombiniert mit C5a zu 4,45 pg/ml im Überstand. Unter alleiniger C5a Stimulation betrug die IL-13-Konzentration 1,48 pg/ml.

Die Mittelwerte der IL-4-Konzentration in den Überständen betragen ohne Zusätze im Medium 0,04 pg/ml, nach Stimulation mit IL-3 1,07 pg/ml, mit Anti-IgE 9,72 pg/ml. Durch Stimulation mit anti-IgE und IL-3 ergab sich eine IL-4 Konzentration von 24,24 pg/ml. C5a führte zu einer IL-6 Konzentration von 0 pg/ml, zusammen mit IL-3 von 8,32 pg/ml.

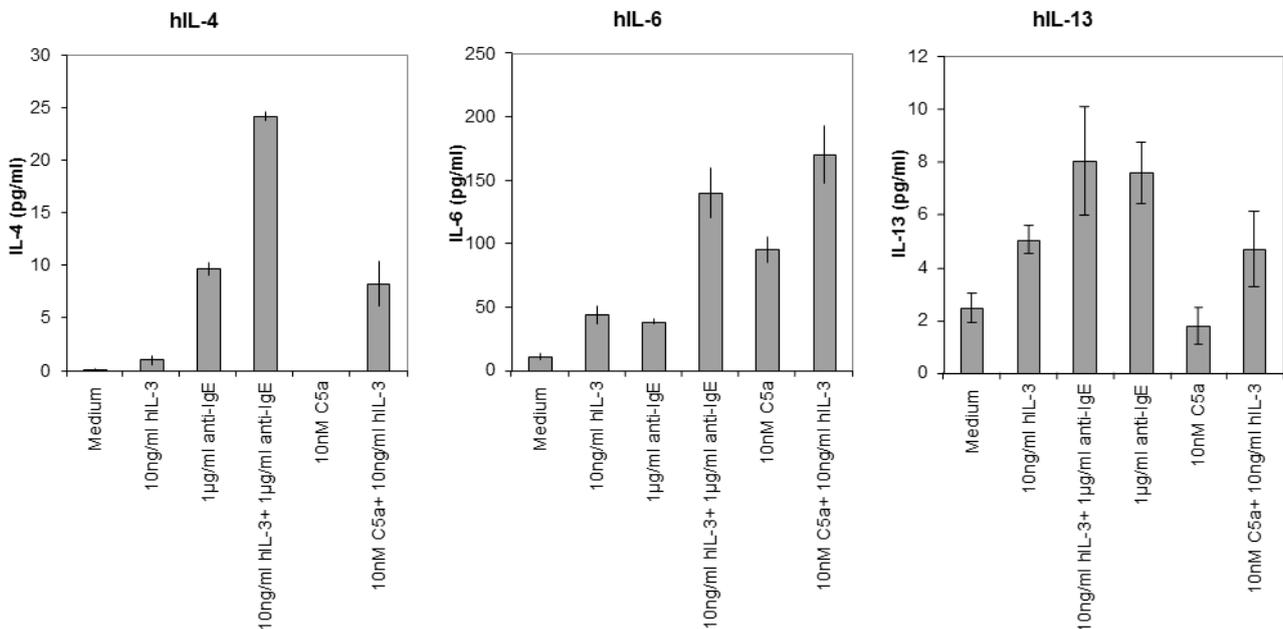


Abbildung 33: Stimulation humaner PBMCs über 24h mit verschiedenen Substanzen. Mit den Überständen der Zellkultur wurde ein IL-4, IL-6 und IL-13 ELISA durchgeführt.

3.2.11 *BLOCKADE DER STIMULATION DURCH ANTI-IL-3 ANTIKÖRPER*

In diesem Versuch sollte evaluiert werden, ob die biologische Wirkung von IL-3 auf Basophile durch die hergestellten Antikörper unterbunden werden kann. Hierfür wurde IL-3 zunächst mit 25 µg/ml der Antikörpern AK 11, AK 13, AK R&D und einem Isotyp inkubiert, anschließend wurden 200.000 Basophile hinzugegeben. Als Kontrolle wurden 200.000 Basophile pro Well nur mit IL-3 bzw. ohne Zusätze kultiviert. Die Endkonzentration des IL-3 betrug 10ng/ml, die der Antikörper 25 µg/ml; die Kultivierung erfolgte über 24 h (siehe 2.2.20.4).

Die Mittelwerte der CD203c-Mean betragen für unstimulierte Zellen 2093,5, unter IL-3-Zugabe 11630,5. Bei zusätzlicher Gabe eines IgG-Isotyps blieb der Mean Wert mit 11640,5 auf einem ähnlichen Niveau. Durch Zugabe von AK 11 konnte der CD203c-Mean auf 1877 abgesenkt werden. Die Zugabe des Antikörpers R&D erreichte eine Verminderung des CD203c-Means auf 2108,5. Durch AK 13 konnte der CD203c-Mean auf 6102,5 abgesenkt werden. Für AK 11 und R&D bedeutet dies eine vollkommene Blockade der IL-3-aktivierten CD203c-Expression. AK 13 verminderte den CD203c-Mean um ungefähr die Hälfte gegenüber dem Isotyp. Dies entspricht ungefähr dem Dreifachen gegenüber den unstimulierten Zellen (Abbildung 34).

Die Mittelwerte der IL-13-Konzentrationen betragen im Medium ohne Zusätze 0,17 pg/ml, 42,07 pg/ml nach IL-3-Stimulation und 50,4 pg/ml bei zusätzlicher IgG Isotyp-Gabe. Somit liegt die IL-13-Ausschüttung bei Zugabe eines Isotyps um 19,8% höher als mit IL-3 alleine. Durch Vorinkubation mit AK 11 verringert sich die IL-13-Ausschüttung auf 1,22 pg/ml, mit AK 13 auf 9,81 pg/ml und mit AK R&D auf 0,47 pg/ml. Dies entspricht einer Verminderung auf 1,1% des Wertes ohne Antikörper durch Zugabe von 25 µg/ml AK R&D, auf 2,9% durch 25µg/ml AK11 und 23,3% durch AK 13 (Abbildung 34).

Die Mittelwerte der IL-4-Konzentrationen im Überstand ohne Stimulation betragen 0,04 pg/ml, mit 10 ng/ml IL-3 2,54 pg/ml, mit 10 ng/ml IL-3 und 25 µg/ml IgG-Isotyp 2,42 pg/ml. Die IL-4-Konzentration wurde durch AK 11 auf 0,21 pg/ml vermindert. AK R&D verursachte eine Verringerung der IL-4-Konzentration auf 0,46 pg/ml. Unter Zugabe von AK 13 betrug die IL-4 Konzentration 2,94 pg/ml (Abbildung 34).

Keine der aufgeführten Bedingungen hatte die Ausschüttung von IL-6 zur Folge.

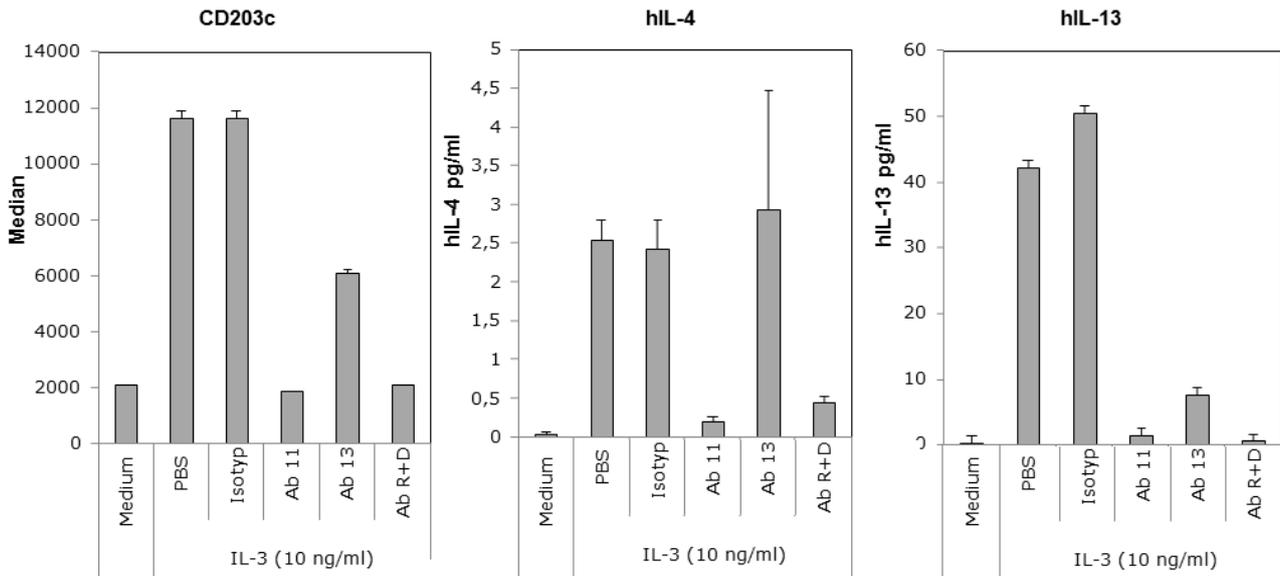


Abbildung 34: Blockade der IL-3 induzierten Basophilenstimulation durch anti-IL-3 Antikörper. 25 µg/ml der Antikörper wurden mit 10 ng/ml IL-3 vorinkubiert. Anschließend wurden 200.000 Basophile/ Well hinzugegeben und für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

3.3 HERSTELLUNG EINES ELISAS GEGEN HUMANES IL-3

In Zeitkinetikversuchen stellte sich heraus, dass das kommerziell erhältliche humane IL-3 ELISA-Kit der Firma R&D in Serum und Plasma keine verlässlichen Werte liefert. Aus diesem Grund sollte versucht werden mit den vorhandenen Antikörpern gegen humanes IL-3 einen sensitiven ELISA herzustellen. Zu diesem Zweck wurden die vorausgewählten Antikörper 11,13 und 8 mit HRP-gelabelt. Diese Antikörper wurden in verschiedenen Kombinationen als Detektion- und Capture-Antikörper verwendet. Detektiert werden sollte eine IL-3-Verdünnungsreihe bekannter Konzentration in Serum, Plasma und PBS. AK 8 eignete sich nicht als Capture-Antikörper; als Detektion-Antikörper lieferte er in Kombination mit Antikörper 11 oder 13 nur mäßige Ergebnisse. Die Kombination der Antikörper 11 als Detektion-Antikörper und 13 als Capture-Antikörper erwies sich als die sensitivste (Abbildung 35).

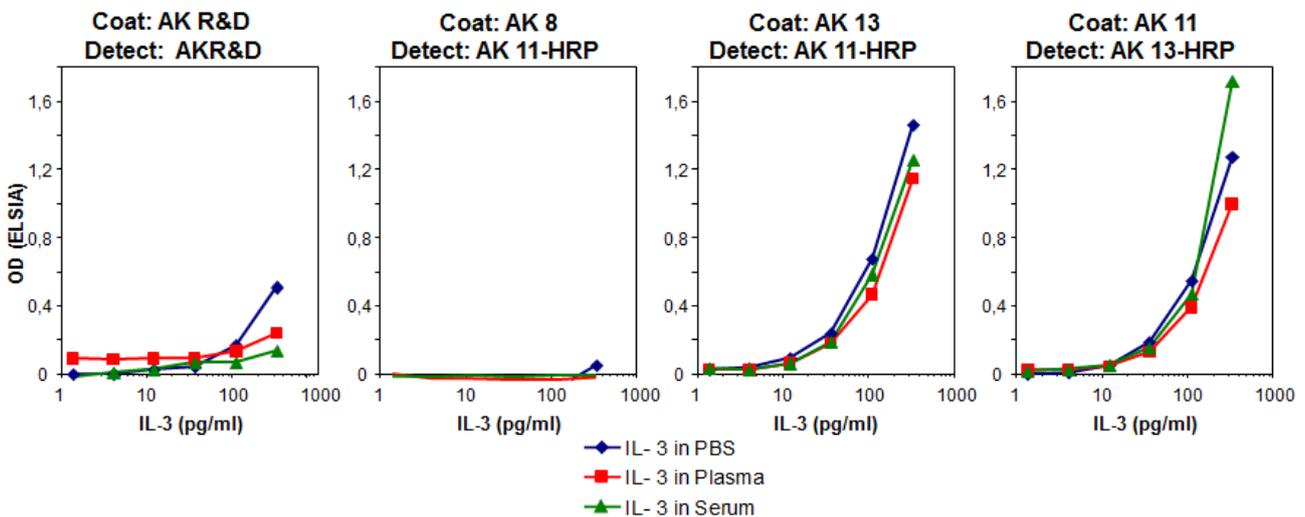


Abbildung 35: Sensitivitäten der verschiedenen Antikörperkombinationen als IL-3-ELISA.

Der Sandwich-ELISA aus AK 13 und AK 11 ist hoch sensitiv. IL-3 ließ sich bis zu einer Konzentration von 3 pg/ml verlässlich quantifizieren. Bis zu 1000 pg/ml IL-3 war kein Plateau der Bindungskurve zu erkennen. Somit besitzt der selbst generierte ELISA einen Sensitivitätsbereich von 3 pg/ml bis mindestens 1000 pg/ml. Im Gegensatz dazu lieferte der ELISA von R&D nur im Bereich zwischen 50 pg/ml und 1000pg/ml verlässliche Werte in PBS.

Die Detektion von IL-3 in Plasma und Serum gelingt mit dem R&D Kit nur sehr unzureichend: bei identischer IL-3-Konzentration variieren die ODs zwischen Plasma, Serum und PBS deutlich. Ab einer Konzentration von 50pg/ml flacht in Serum und Plasma die Konzentrations/OD-Kurve ab, sodass bei niedrigeren Konzentrationen als 50pg/ml fälschlich zu hohe Werte gemessen werden. Im Gegensatz dazu variieren die mit Hilfe des ELISA aus AK 13 und AK 11 gemessenen IL-3 zwischen Plasma, Serum und PBS kaum. Erst ab einer Konzentration von 6 pg/ml beginnen sich Werte in Serum, Plasma und PBS zu unterscheiden. Somit lässt sich IL-3 in Serum und Plasma mit dem selbst hergestellten ELISA bis zu einer ca. 8-fach geringeren Konzentration verlässlich nachweisen als mit dem kommerziell erhältlichen ELISA-Kit von R&D (Abbildung 36).

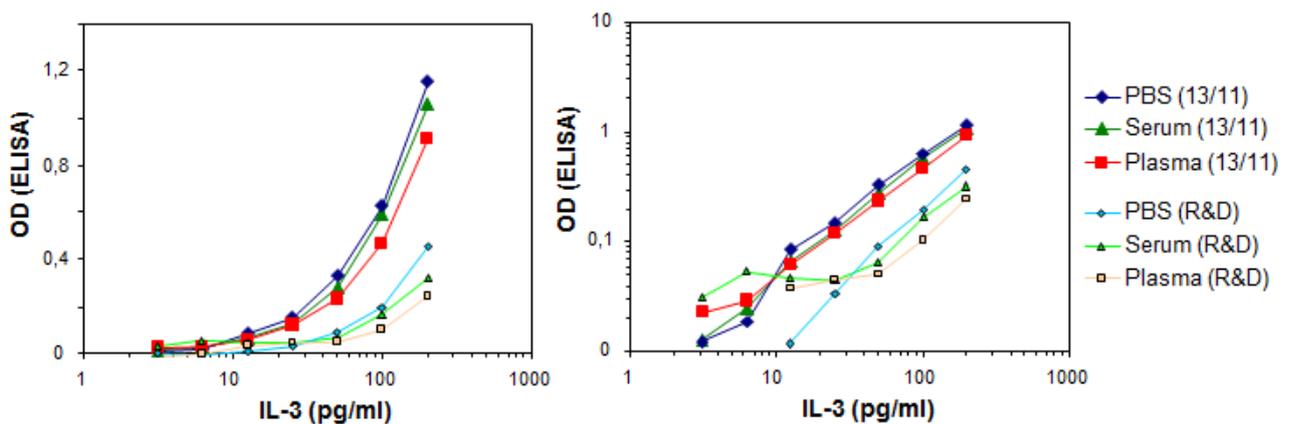


Abbildung 36: Vergleich des selbst hergestellten IL-3-ELISAs mit dem ELISA der Firma R&D in Serum, Plasma und PBS.

4 DISKUSSION

4.1.1 HERSTELLUNG MONOKLONALER ANTIKÖRPER

4.1.1.1 Vergleich mit der historischen Hybridomatechnik nach Köhler/Milstein

Die verbreitetste Methode zur Herstellung monoklonaler Antikörper ist noch immer die 1984 mit dem Nobelpreis ausgezeichnete Hybridoma-Methode. Seit der ersten Publikation dieser Technik stellten sich einige Veränderungen als hilfreich heraus, welche auch in dieser Arbeit Verwendung fanden.

Im Gegensatz zu P3-X67Ag8, der von Köhler und Milstein zunächst verwendeten Myelomzelllinie, besitzt die in dieser Arbeit verwendete Zelllinie keine Fähigkeit zur Antikörperproduktion, jedoch ebenfalls eine Defizienz des Enzyms Hypoxanthinphosphoribosyltransferase (HGPRT). Aus diesem Grund konnte wie auch in der ursprünglichen Publikation HAT-Medium als Selektionsmedium verwendet werden (64).

Köhler et al. verwendeten einen Sendai-Virus zur Fusionierung der Zellen. Als Nachteil des Virus stellte sich heraus, dass dieser im Gegensatz zu Polyethylenglykol (PEG) vermehrt zur Entstehung IgM-produzierender Hybridoma führt (73). Da das Ziel dieser Arbeit, war einen blockierenden IgG-Antikörper herzustellen, erschien eine Verwendung von PEG sinnvoller. Zudem wurde die Arbeit mit dem Sendai- Virus auf Grund der Infektionsgefahr stärker reglementiert.

Im Gegensatz zur klassischen Methode nach Köhler wurden die Zellen vor der Fusion bei Raumtemperatur gehalten, was eine verbesserte Ausbeute der Fusion gegenüber einem Handling bei 4°C oder auf Eis zur Folge hatte (73).

Die Überführung der fusionierten Zellen in HAT-Selektionsmedium in dieser Arbeit unterschied sich ebenfalls von der Köhler und Milsteins. Diese setzten die Kultur der fusionierten Zellen zunächst nicht in HAT-Medium an, sondern tauschten das verwendete DMM (+20 % Horse serum) erst einen Tag nach der Fusion aus (64). Da die Myelomzellen in DMM-Medium proliferieren, bedeutet dies einen Nachteil für die langsamer wachsenden Hybridoma (73). Daher wurde die Hybridomakultur in dieser Arbeit sofort in HAT-Medium angesetzt.

4.1.1.2 Vergleich mit weiteren Methoden zur monoklonalen Antikörperherstellung

Wie schon erwähnt, ist die Hybridomatechnik die etablierteste Methode zur Herstellung monoklonaler Antikörper, jedoch wurden in den letzten Jahren einige weitere entwickelt.

Die Antikörperherstellung durch Epstein-Barr-Virus (EBV)-induzierte Immortalisierung von humanen B-Zellen (68) birgt den Vorteil, sofort humane Antikörper zu erhalten, welche nicht in einem aufwendigen Verfahren humanisiert werden müssen. Jedoch ist dieses Verfahren nur für körperfremde Antigene geeignet, da gegen körpereigene Antigene wie das hIL-3-Molekül im Normalfall keine Antikörper gebildet werden.

Im Zuge der von Tiller et al. entwickelten Methode der Klonierung leichter und schwerer Ketten können alle variablen Regionen an konstante IgG-Regionen gekoppelt werden (70). So werden auch die Antikörperbindungsstellen von IgM-, IgA- und IgE-Antikörpern verwertbar. Beide Methoden haben den Vorteil, dass keine Subklonierung von Zellen notwendig ist, da diese durchflusszytometrisch vereinzelt werden. Andererseits ist dieses Verfahren aufwändiger und weniger etabliert. Tiller et al verwendeten es zudem nicht zur Herstellung spezifischer Antikörper, sondern zur Charakterisierung des Antikörperrepertoirs. Die Antikörperkonzentrationen pro Well lagen mit einer Höchstkonzentration von 20 µg/ml deutlich unter der mit der Hybridomtechnik erzielten Konzentration (70).

4.1.2 ISOTYPEN

Alle aus Fusion 4 hervorgegangenen Antikörper gehörten der IgG1-Klasse an, welcher der im Serum häufigste Isotyp ist. IgG-Antikörper entstehen durch den sogenannten Isotype Switch, welcher nach wiederholtem Antigenkontakt zustande kommt (8). Somit kann man davon ausgehen, dass die Immunisierung mehrfach funktionierte. Sieben der acht charakterisierten Antikörper gehören dem κ-Typ an, einer exprimiert λ-Leichtketten. Dies entspricht ungefähr der natürlichen Häufigkeitsverteilung κ:λ= 10:1 in der Maus (8).

4.1.3 CHARAKTERISIERUNG DER ANTIKÖRPERBINDUNGSSTELLE

Um die Bindungsstellen der Antikörper, deren Funktionsfähigkeit mittels Westernblot getestet worden war, näher zu charakterisieren, wurden hIL-3 Fragmente im ELISA verwendet. Es handelt sich um 6 überlappende Fragmente des IL-3-Moleküls (Abbildung 15). Die Bindungsstelle der gegen Peptid 1 gerichteten Antikörper wurde zudem durch drei Varianten dieses Peptids genauer identifiziert. Peptid 1A und 1 B unterscheiden sich an zwei Stellen, an welchen die humane Sequenz durch die des Rhesusaffen ersetzt wurde. Peptid 1Ma entspricht der Mamorset Sequenz (Abbildung 16).

4.1.3.1 Antikörper 8

Dieser Antikörper ist gegen ein lineares Epitop im Peptid 6 gerichtet und kreuzreagiert nicht mit Rh IL-3. Das Peptid 6 besteht zum Teil aus der alpha Helix D. Da es recht unwahrscheinlich ist, dass sich ein lineares Epitop innerhalb einer alpha-Helix befindet, liegt das Epitop vermutlich außerhalb der Helix, sowie auf Grund der fehlenden Kreuzreaktivität mit Rh IL-3 an einer Stelle, an der sich die Sequenzen von RhIL-3 und hIL-3 unterscheiden. Dies trifft auf die C-terminalen AS distal der Helix D zu (Abbildung 37).

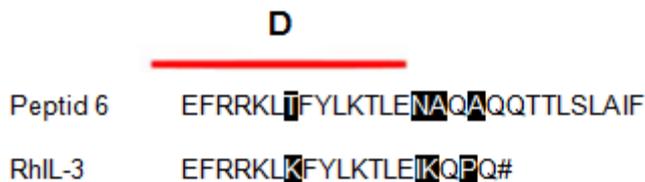


Abbildung 37: AS-Sequenz des Peptids 6, sowie der entsprechenden RhIL-3 Sequenz. Unterschiede sind schwarz hinterlegt. Die Helix ist durch einen roten Balken über der Sequenz gekennzeichnet. Das Ende des RhIL-3 Moleküls ist durch eine Raute gekennzeichnet. (Modifiziert nach Dey,R 2009)

4.1.3.2 Antikörper 11, 43, 44, 45, 46

Für diese Antikörper konnte eine Bindung an IL-3 im Western Blot sowie an Peptid 1 als auch an die Variante 1B, nicht jedoch an 1A oder 1Ma im ELISA verzeichnet werden. Aus diesen Versuchen mit den Peptiden kann geschlossen werden, dass die Antikörper gegen die Sequenz SWVN (Ser-Trp-Val-Asn) des IL-3 Moleküls gerichtet sind. Zudem bindet keiner der Antikörper an Rhesusaffen IL-3. Die einzigen differierenden Aminosäuren zwischen den Peptiden 1A und 1B sind die Aminosäuren Valin und Asparagin (VN), welche 1A wie beim Rhesus Affen durch Alanin-Lysin (AK) ersetzt sind. Da auch keine Kreuzreaktion mit Mamorset-IL-3 stattfindet, müssen die angrenzenden AS einen Unterschied zwischen Mamorset-IL-3 und humanem IL-3 aufweisen. Beide Bedingungen werden nur durch die Sequenz SWVN erfüllt (Abbildung 38). Somit ist festzustellen, dass ein Großteil der getesteten Antikörper gegen diese Sequenz gerichtet ist. Dies lässt vermuten, dass sie in der 3-dimensionalen Struktur besonders exponiert ist.

Peptid 1B: APMTQTTSLKTSWVNCSNMIDEII

Rh IL-3: APMTQTTSLKTSWAKCSNMIDEII

Peptid 1Ma: AAPTQTMPLKTTQVNCSNLREEIV

Abbildung 38: Bindungsepitop der Antikörper 11, 43, 44, 45, 46. Unterschiede zwischen den Sequenzen von Peptid 1B und Rh-IL-3 sind grau hinterlegt, zwischen den angrenzenden Sequenzen der Peptide 1Ma und 1B schwarz.

4.1.3.3 Antikörper 13

Obwohl dieser im Western Blot eine Bindung an IL-3 aufweist, konnte keine Bindung an die Peptide verzeichnet werden. Auch die Bindung dieses Antikörpers im Western Blot fiel sehr gering aus: bei einer Proteinkonzentration von 0,5 µg/Bahn und einer Antikörperkonzentration von 5µg/ml konnte eine Bindung erst nach 15 Minuten erkannt werden, wohingegen die Bindung des Antikörpers 8 bei gleichen Konzentrationen schon nach 3 Sekunden Belichtungszeit zu erkennen war. Dies lässt sich zum Teil durch die geringere relative Affinität dieses Antikörpers von 2,5 µg/ml (vgl. rel. Affinität Antikörper 8: 7ng/ml) erklären. Zudem ist zu vermuten, dass das erkannte Epitop nur zu einem geringen Teil linear ist, wodurch eine weitere Verminderung der Bindungsstärke zustande kommt. Dieser Antikörper vermindert die Bindung von IL-3 an PBMCs deutlich (3.2.8), daher ist das von ihm erkannte Epitop an einer für die IL-3- Bindung verantwortlichen Stelle des Rezeptors zu suchen. Im Vergleich zu den Antikörpern 8 und 11 wird die IL-3 Bindung durch Antikörper 13 relativ stärker unterbunden als die IL-3 abhängige Proliferation (3.2.6.2, 3.2.8). Somit verhindert er vermutlich die Bindung des IL-3 an die Untereinheit Ra, welche für die IL-3-Bindung verantwortlich ist, jedoch nicht an der Signalübertragung beteiligt ist. Hierfür kommen Epitope innerhalb der Helices A, A` und D in Frage (35). Da aus den Antikörpern 13 und 11 ein sehr sensitiver Sandwich-ELISA hergestellt werden kann (3.3), ist eine Antikörper 13-Bindung an die Helix A, in deren Nähe sich das Epitop des Antikörpers 11 befindet, unwahrscheinlich.

4.1.3.4 AK R&D

Der Antikörper von R&D bindet ebenfalls mit geringer Affinität an Peptid 1 und 1B, nicht an Peptid 1A oder 1Ma, jedoch weist er ebenfalls eine Kreuzreaktivität mit Rh IL-3 auf. Durch diese Erkenntnisse ist es nicht möglich die genaue Bindungsstelle anzugeben, da die einzige Sequenz, die in Peptid 1 und 1 B übereinstimmt, jedoch nicht in Peptid 1A vorkommt (VN), auch nicht im Rh IL-3 vorhanden ist (Abbildung 39). Im ELISA bindet der Antikörper im Gegensatz zu den anderen linear bindenden Antikörpern deutlich stärker an IL-3 als an Peptid 1 ($OD_{IL-3}: OD_{Peptid1}=2:1$) und in noch geringerem Maße an Peptid 1B ($OD_{IL-3}: OD_{Peptid1B}=3:1$) (siehe 3.2.4.2).

Dies lässt darauf schließen, dass ein Teil des erkannten Epitops nicht im linearen Bereich liegt; zumal die Bindung an denaturiertes IL-3 im Western Blot geringer ausfällt, als man mit Hinblick auf die relative Affinität vermuten würde. Zudem bindet der Antikörper an RhIL-3 nur in seiner 3-dimensionalen Form, nicht in der linearen (Abbildung 13, Abbildung 12).

Peptid 1: APMTQTT**P**LKTSW**VN**CSNMIDEIITHL
Peptid 1B: APMTQTT**S**LKTSW**VN**CSNMIDEII
Rh IL-3: APMTQTT**S**LKTSW**A**KCSNMIDEII
Peptid 1A : APMTQTT**P**LKTSW**A**KCSNMIDEII

Abbildung 39: Epitopbestimmung Antikörper R&D. Unterschiede in den Sequenzen sind Schwarz bzw. grau hinterlegt.

4.1.3.5 Antikörper 36

Bei diesem Antikörper konnte sowohl eine Bindung an das Peptid 3 sowie in geringerem Maße an Peptid 6 verzeichnet werden, wobei die Bindung an Peptid 3 ca. 3 mal so stark ist wie diejenige an Peptid 6 ($OD_{\text{Peptid3}}: OD_{\text{Peptid6}} = 2,7:1$). Diese Kreuzreaktivität kommt wahrscheinlich durch überlappende bzw. ähnliche Sequenzen innerhalb der verschiedenen Peptide zustande.

Eine alternative Erklärung wäre eine fehlende Monoklonalität des Antikörpers. Diese kann durch die zweifache Subklonierung ausgeschlossen werden. Des Weiteren besteht die sehr geringe Wahrscheinlichkeit einer strukturellen Nähe zwischen Peptid 6 und einer Sequenz im Peptid 3 in der dreidimensionalen Struktur, wodurch an eine Ausdehnung des Epitops über beide Bereiche zu denken wäre. Die Größe dieses theoretischen Epitops macht diese jedoch äußerst unwahrscheinlich.

Im Western Blot zeichnet sich dieser Antikörper durch einen starken Hintergrund aus, was für eine geringe Spezifität des Antikörpers spricht (siehe Abbildung 14).

Die Aminosäuresequenzen der Peptide 3 und 6 ähneln sich an 3 Stellen (Abbildung 40).

Peptid 3: EDQDI**M**EN**N**LRR**P**N**L**EAFNRAVK**S**LQ
Peptid 6: EFRR**K**LTFYL**K**T**L**EN**A**QAQQT**L**S**L**AIF

Abbildung 40: Sequenzen der Peptide 3 und 6. Ähnliche Abschnitte sind mit denselben Farbtönen hinterlegt.

Peptid 3: EDQDILMENLRRPNLEAFNRVAVKSLQ
Rh IL-3 Peptid 3: EDQTILVEKNLRRSNLEAFSKAVKSLQ

Abbildung 41: Sequenzen des Peptid 3 und des Rhesus-IL-3 in Peptid 3. Unterschiede sind grau hinterlegt.

Da dieser Antikörper mit keiner der getesteten Spezies kreuzreagiert, ist die Sequenz LMEN (Leu-Met-Glu-Asn) vermutlich die Bindungsstelle des Antikörpers. Diese ist die einzige der oben angegebenen, in welcher sich Rhesus- und humanes IL-3 unterscheiden (Abbildung 41). Auch Ratten IL-3 und murines IL-3 weisen an dieser Stelle eine andere Sequenz auf als humanes IL-3 (siehe 1.1.4). Zudem enthält Peptid 5 die Sequenz EFRRK, da es sich hierbei um die Überlappungssequenz handelt, sodass diese ausgeschlossen werden kann.

Obwohl die Aminosäure Methionin laut Dey et al. in der Sequenz LMEN an der Bindung an die Alpha-Untereinheit des IL-3 Rezeptors mitbeteiligt ist, bewirkt dieser Antikörper im TF-1-Versuch keinerlei Verminderung der Aktivität des IL-3. Vermutlich trägt diese Aminosäure nur zu geringen Anteilen an der Rezeptorbindung bei, sodass trotz ihrer Blockade eine Bindung an die alpha-Untereinheit stattfindet.

Der IL-3 -Rezeptor der TF-1-Zellen besteht zwar wie auch der auf hämatopoetischen Zellen aus 2 verschiedenen Anteilen ($R\alpha$, βc) mit einer molekularen Masse von 135kDa bzw. 70 kDa (74). Jedoch ist es möglich, dass TF-1 Zellen als Tumorzelle einen mutierten IL-3-Rezeptor besitzen, welcher zur Interaktion nicht mehr auf das Methionin angewiesen ist.

4.1.3.6 Antikörper 38, 41 und 47

Diese Antikörper zeigten weder im Western Blot eine Bindung an IL-3 noch im ELISA eine Bindung an die Peptide. Daher kann davon ausgegangen werden, dass sie ein dreidimensionales Epitop erkennen.

4.1.3.7 Antikörper 42

Der Antikörper 42 bindet an die Peptide 1A und 1B, wobei die Affinität zu 1B ca. doppelt so hoch ausfällt wie zu 1A ($OD_{\text{Peptid1A}} : OD_{\text{Peptid1B}} = 1:2$). Eine Bindung an das Mammoset-IL-3 konnte nicht verzeichnet werden, ebenso wenig an Rhesus-IL-3.

Da die einzigen Unterschiede zwischen Rhesus-IL-3 und humanem IL-3 denen an Peptid 1A und 1B entsprechen, ist die einzige Erklärung für die fehlende Bindung an Rhesus-IL-3, dass die Sekundär- oder Tertiärstruktur eine Bindung verhindert (Abbildung 42).

Peptid 1A: APMTQTT**PLKTSWAK**CSNMIDEII
Peptid 1B: APMTQTT**SLKTSWVN**CSNMIDEII
Rhesus IL-3: APMTQTT**SLKTSWAK**CSNMIDEII
Peptid 1Ma: **AAPTQT****MP****LK****TQ****VN****CSN****LRE****E****VT****L**

Abbildung 42: Sequenzen der Peptide 1A,1B,1Ma, Rh IL-3 (Peptid 1). Abweichungen sind grau bzw. schwarz hinterlegt.

Da das Peptid 1 Ma von dem Antikörper nicht erkannt wird und die Bindung an Peptid 1B stärker erfolgt als an 1A, kommen die Sequenzen (T)SWV(N) (Thr-Ser-Trp-Val-Asn) in Frage. Ihre Übereinstimmung mit Peptid 1 Ma beträgt je nach Größe des Epitops eine bzw. keine AS, wodurch es nicht zu einer Bindung kommen kann. Außerdem kann durch den Austausch der Aminosäuren VN zu AK in Peptid 1A die geringere Erkennung dieses Peptids im Vergleich zu Peptid 1B erklärt werden (Abbildung 42).

4.1.4 KREUZREAKTIVITÄT DER ANTIKÖRPER

4.1.4.1 Kreuzreaktivität mit Ratten- (rIL-3), murinem (mIL-3), Rhesusaffen- (RhIL-3) und Mamorset-IL-3

Keiner der Antikörper kreuzreagiert mit murinem oder Ratten-IL-3 (3.2.3.2). Dies ist durch die nur sehr geringe Übereinstimmung der IL-3-AS-Sequenzen von humanem und rIL-3 bzw. mIL-3 bedingt (27,7% bzw. 38,4% Übereinstimmung) (37). Zudem hat mIL-3 keinerlei Effekt auf humane Zellen (75). Rh IL-3 und hIL-3 hingegen stimmen auf Proteinebene zu 82,5% überein. Trotzdem zeigt nur Antikörper R&D eine Kreuzreaktivität mit Rh IL-3. Dies liegt zum einen daran, dass ein Großteil der Antikörper gegen die gleiche Sequenz gerichtet ist, zum anderen scheint die Tertiärstruktur des Rh IL-3s einige AS, welche ebenfalls im humanen IL-3 existieren, unzugänglich zu machen. Antikörper 42 bindet zwar an AS im Peptid 1, welche ebenfalls in der Sequenz des Rh IL-3s vorhanden sind, bindet jedoch nicht an das gefaltete Rh IL-3. Einige der AS, die an der Rezeptorbindung beteiligt sind, ebenso wie das von AK 11, AK 43, AK 44, AK 45 und AK 46 erkannte Epitop, sind im Rh IL-3 ausgetauscht. Dies erklärt die Tatsache, dass Rh IL-3 an humanen Zellen nur partiell aktiv ist (3.2.6.1), ebenso hIL-3 an Zellen des Rhesusaffen (76). Somit findet zwar eine Bindung von Rh IL-3 an den humanen IL-3 Rezeptor statt, jedoch vermutlich mit geringerer Affinität, woraus eine partielle Signaltransduktion resultiert. Die AS-Sequenz des Mamorsetaffen stimmt zu 69,9% mit der humanen überein (37). Die Kreuzreaktivität mit dieser Spezies wurde nur für Sequenz 1 bestimmt, wobei keine Kreuzreaktivität festzustellen war (3.2.4.2). Dies liegt ebenfalls daran, dass die meisten Antikörper gegen eine im Mamorset-IL-3 nicht vorkommende Sequenz gerichtet sind.

4.1.4.2 Kreuzreaktivität mit GM-CSF und IL-5

IL-5 und GM-CSF bestehen wie IL-3 aus vier antiparallelen alpha-Helices, binden an die gemeinsame β -Untereinheit des IL-3-Rezeptors und vermitteln ähnliche Effekte (33) (35). Von den getesteten Antikörpern besitzt lediglich Antikörper 10 eine sehr geringe Kreuzreaktivität mit GM-CSF, Antikörper 8 und 38 eine geringe zu IL-5 (3.2.3.1). Aufgrund der Bindung an dieselbe Rezeptoruntereinheit ist anzunehmen, dass eine gewisse Ähnlichkeit in den Sequenzen der Zytokine besteht. Da die Bindung an die β -Untereinheit jedoch nur nach vorangegangener Bindung der α -Untereinheit stattfinden kann, scheint die Affinität der einzelnen Zytokine zur β c niedrig zu sein. Dies spricht dafür, dass die Sequenzhomologie der Zytokine untereinander eher gering ist. Dies kann damit in Einklang gebracht werden, dass nur wenige Antikörper eine Kreuzreaktivität mit IL-5 oder GM-SCF ausbilden und diese nur eine sehr geringe Affinität besitzt. Da die β -Untereinheit diejenige ist, welche die Signaltransduktion vermittelt, scheinen die unterschiedlichen Effekte der Zytokine vorwiegend mit der Expression der jeweiligen α -Untereinheiten auf verschiedenen Zelltypen zusammen zu hängen.

4.1.5 BLOCKIERUNG DER TF-1-ZELLPROLIFERATION

TF-1 Zellen sind eine leukämische Zelllinie, welche zur Proliferation Zytokine wie IL-3 und GM-CSF benötigt (72).

Das IL-3-abhängige Wachstum der TF-1-Zellen wurde durch die Antikörper 11 und R&D effektiv blockiert. Die Antikörper 8, 13, 42, 43 und 44 blockieren in deutlich geringerem Ausmaß; Antikörper 43 zeigt lediglich eine Tendenz zur Blockade. Die Antikörper 11, 43, 44 und 45 sind alle gegen das gleiche Epitop SWVN (Ser-Trp-Val-Asn) gerichtet. Innerhalb dieses Epitops bzw. bis vier AS entfernt liegen Interaktionsstellen sowohl mit der α - als auch der β -Untereinheit des IL-3-Rezeptors (35). Obwohl Antikörper 45 an das gleiche Epitop bindet, führt er zu keiner Blockade der TF-1-Proliferation. Die Unterschiede in der Blockadefähigkeit dieser Antikörper hängen vermutlich mit ihrer Affinität gegenüber dem IL-3 Molekül zusammen. Der Antikörper 11 hat eine deutlich höhere Affinität als Antikörper 44 und 43. Der nicht blockierende Antikörper 45 hat die geringste Affinität (3.2.5). Der Antikörper R&D ist gegen ein zum Teil dreidimensionales Epitop gerichtet, das in direkter Nähe der Aminosäuren SWVN und damit der Bindungsstellen des IL-3-Rezeptors liegt. Zudem besitzt er eine hohe Affinität. Somit bewirkt auch dieser eine starke Blockade der TF-1-Proliferation. Der Antikörper 42 bindet ebenfalls an Peptid 1, jedoch an ein anderes Epitop als Antikörper 11 und 44. Daher ist trotz der höheren relativen Affinität im Vergleich zu Antikörpern 44 die blockierende Wirkung geringer. Das Epitop, an welches Antikörper 13 bindet, konnte nicht ermittelt werden, da es sich um eine dreidimensionale Struktur handelt.

Die Wirkung von GM-CSF auf die TF-1-Zellen wurde durch Zugabe der Antikörper nicht verändert. Dieses Ergebnis ist mit der Tatsache zu vereinbaren, dass von den getesteten Antikörpern nur Antikörper 10 eine sehr geringe Kreuzreaktivität mit GM-CSF aufwies.

Die zusätzliche Gabe von 2,5 ng/ml IL-3 führte nicht zu einer vermehrten Proliferation im Vergleich zur alleinigen Gabe von 2,5 ng/ml GM-CSF. Da eine Steigerung der GM-CSF-Konzentration über 2,5 ng/ml hinaus eine deutliche Proliferationssteigerung zur Folge hat (siehe 3.2.6.1), wäre zu erwarten, dass die Zugabe von IL-3 ebenfalls zu einer vermehrten TF-1 Proliferation führt. Dass dies nicht der Fall ist, könnte auf eine kompetitive Inhibition der GM-CSF-Bindung an die TF-1 Zellen durch IL-3 hindeuten, wie es bei der Akute Myeloische Leukämie (AML)- Zelllinie KG-1 der Fall ist (77).

Auch die Zugabe von IL-3 und blockierenden IL-3-Antikörpern veränderte die GM-CSF-abhängige Proliferation nicht. Somit kann man davon ausgehen, dass weder die Antikörper noch Antikörper-IL-3-Komplexe einen Einfluss auf die GM-CSF-Wirkung auf TF-1-Zellen haben.

4.1.6 BLOCKADE DER IL-3 BINDUNG AN PBMCS

Wie in 2.2.19 beschrieben, wurden die Antikörper AK 8, AK 11, AK 13 und AK R&D in diesem Versuch mit biotyniliertem IL-3 präinkubiert, anschließend PBMCS hinzugegeben. Durchflusszytometrisch wurde die Verminderung der IL-3 Bindung an die verschiedenen Zellpopulationen durch die verschiedenen Antikörper bestimmt.

Die Antikörper AK 11, AK 13 und AK R&D verminderten die IL-3-Bindung an Lymphozyten, Basophile, Plasmazytoide Dendritische Zellen und Monozyten in höheren Antikörperkonzentrationen deutlich. AK 8 führte kaum zu einer Blockade der IL-3-Bindung. Der Oberflächenmarker CD123 entspricht der alpha- Kette des IL-3-Rezeptors. Sie wird unter anderem von plasmazytoiden Dendritischen Zellen, Monozyten und Basophilen exprimiert.

Als Bindungsstelle für AK 11 und AK R&D wurde die AS-Sequenz SWVN identifiziert, welche in direkter Nähe zu Helix A des IL-3 Moleküls liegt. In dieser Helix gelegene Aminosäuren interagieren laut Dey et al. sowohl mit der alpha-Kette als auch der beta-Kette des IL-3-Rezeptors. Zudem ergab sich für einige Aminosäuren in Epitopnähe eine funktionelle Rolle für die Wirkung des IL-3s (33). Durch die Bindung der Antikörper an die Sequenz SWVN wird die Bindung an alpha- und beta-Kette des IL-3-Rezeptors sterisch behindert. Somit kommt es zu einer Verminderung des FITC-Mean-Wertes nach Antikörperzugabe bei allen CD123-positiven Zellpopulationen.

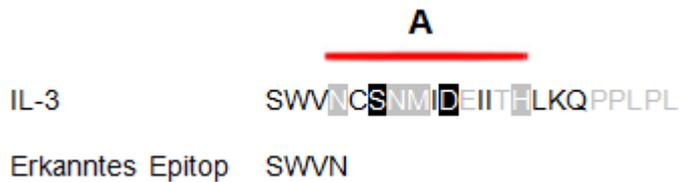


Abbildung 43: Rezeptorinteraktion des von Antikörper 11 erkannten Epitops. Die A-Helix ist durch einen roten Strich über der Sequenz dargestellt. AS, welche mit β c interagieren, sind grau hinterlegt, diejenigen, welche an $R\alpha$ binden, schwarz. Mit grauer Schrift sind AS gekennzeichnet, welche in Mutagenesestudien eine funktionelle Rolle zeigten.

Das Epitop, welches von Antikörper 13 erkannt wird, ist nicht bekannt. Es ist jedoch zu vermuten, dass es sich ebenfalls an für die Bindung des IL-3-Rezeptors notwendigen Aminosäuren befindet, da die IL-3-Bindung durch diesen Antikörper trotz seiner geringen Affinität am effektivsten blockiert wird.

Antikörper 8 führt lediglich zu einer geringen Blockade der IL-3-Bindung. Sein Epitop liegt in Peptid 6. In Sequenz 6 liegen einige Aminosäuren, welche mit $R\alpha$ interagieren. Da dieser Antikörper nur eine geringe Blockade der IL-3-Bindung hervorruft, ist es wahrscheinlich, dass seine Bindungsstelle in einigem Abstand zu diesen Aminosäuren am C-terminalen Ende des Peptids liegt (Abbildung 44). Dies steht im Einklang mit der Linearität des Epitops und der fehlenden Kreuzreaktivität mit RhIL-3 (siehe 4.1.3).



Abbildung 44: Rezeptorinteraktionen des Peptid 6. Die D-Helix ist durch einen roten Strich über der Sequenz dargestellt. AS, welche mit $R\alpha$ interagieren, sind schwarz hinterlegt. Mit grauer Schrift sind AS gekennzeichnet, welche in Mutagenesestudien eine funktionelle Rolle zeigten.

Lymphozyten und Monozyten sind CD123 negativ, besitzen somit nur wenige alpha-Ketten des IL-3-Rezeptors, welche für die Bindung des IL-3 an den IL-3-Rezeptor essentiell sind, da die Bindung an die β -Untereinheit nur nach vorangegangener Bindung der α -Untereinheit erfolgen kann (siehe 1.1.3). Die IL-3-Bindung an B-Lymphozyten erfolgte in deutlich geringerem Ausmaß als an die anderen Zelltypen, was mit einer geringeren Anzahl an IL-3-Rezeptoren an ihrer Oberfläche in Einklang gebracht werden kann. Monozyten standen den CD123⁺-Zelltypen in ihrer IL-3-Bindungsfähigkeit jedoch nicht nach. Dies könnte darauf hinweisen, dass neben dem bekannten IL-3-Rezeptor weitere Bindungsmechanismen existieren. Über einen funktionellen Charakter dieser Bindung kann keine Aussage getroffen werden. Jedoch zeigt sich, dass die vorhandenen Antikörper auch die Bindung an B-Lymphozyten und Monozyten verhindern.

4.1.7 HERSTELLUNG EINES HUMANEN IL-3 ELISAS

Aus Zeitkinetikversuchen war bekannt, dass der kommerziell erhältliche ELISA von R&D in Plasma und Serum nicht sehr sensitiv ist. Dies kommt vermutlich durch die in Serum und Plasma enthaltenen Proteine zustande.

Es stellte sich heraus, dass die Kombination der Antikörper 11 (Detektion) und 13 (Capture) einen äußerst sensitiven Sandwich-ELISA darstellt. Somit kann man davon ausgehen, dass diese Antikörper sich nicht sterisch behindern und nicht in direkter räumlicher Nähe des hIL-3-Moleküls binden. Obwohl Antikörper 8 die höchste Affinität aufweist, erbringt er als Detektion-Antikörper in Kombination mit den beiden oben genannten keinen Vorteil. Dies ist möglicherweise auf eine Nähe seines Bindungsortes zu den Bindungsstellen der beiden anderen Antikörper zurückzuführen. Da bekannt ist, dass Antikörper 11 an Peptid 1 bindet und Antikörper 8 an Peptid 6, würde das bedeuten, dass die beiden Enden im gefalteten IL-3 Molekül nahe beieinander liegen.

Als Capture Antikörper ist Antikörper 8 gänzlich unbrauchbar, vor allem in Serum und Plasma. Dies kann durch eine Besetzung des erkannten Epitops durch Plasmaproteine bedingt sein.

4.1.8 STIMULATIONSVERSUCHE HUMANER BASOPHILER UND PBMCs

Bei den in 3.2.9 und 3.2.10 beschriebenen Versuchen stellte sich heraus, dass humane Basophile von IL-3, IgE, C5a und Kombinationen dieser Substanzen aktiviert werden können, was anhand des Aktivierungsmarkers CD203c bestimmt wurde. Im Überstand der Zellkulturen wurden die Zytokine IL-4, IL-6 und IL-13 gemessen.

Von murinen Basophilen ist bekannt, dass sie nach Aktivierung mit IL-3 IL-4, IL-6 und IL-13 freisetzen (2; 78; 27; 26), bei humanen Basophilen ist jedoch nur die Sekretion von IL-4 und IL-13 bekannt (28; 2; 29). Nach Stimulation muriner Basophiler mit 10 ng/ml IL-3 in der Zellkultur wurden nach 24 Stunden IL-6-Werte von > 700 pg/ml und IL-4-Werte von > 200 pg/ml gemessen (26).

4.1.8.1 IL-6 und IL-4

Die IL-6-Konzentration lag unter Stimulation mit den oben genannten Substanzen unter der Nachweisgrenze (3.2.9), obwohl nachweislich eine Aktivierung mit Erhöhung des Aktivitätsmarkers CD203c stattfand. Auch die IL-4-Produktion blieb deutlich hinter den Werten muriner Basophiler zurück. Durch alleinige hIL-3-Stimulation waren nach 24 Stunden lediglich 2,54 pg/ml nachzuweisen, durch IgE 95,05 pg/ml und in Kombination 142 pg/ml, also ebenfalls deutlich geringer als bei murinen Basophilen. Bei den Stimulationsversuchen mit humanen PBMCs zeigte sich, dass diese im Gegensatz zu Basophilen IL-6 in messbaren Konzentrationen ausschütten. Diese betrug sowohl bei alleiniger Stimulation mit IL-3 oder anti-IgE ca. 40 pg/ml, in Kombination 140 pg/ml. Somit liegen die Konzentrationen immer noch deutlich unter der IL-6-Freisetzung muriner Basophiler.

Es zeigt jedoch, dass eine oder mehrere Zellpopulationen innerhalb der humanen PBMCs existieren, welche durch Stimulation mit IL-3 und anti-IgE zur IL-6-Ausschüttung angeregt werden können. Da die verantwortliche Zellpopulation vermutlich nur ein Teil der PBMCs ausmacht, würde eine Aufreinigung dieser Zellen auch zu höheren IL-6-Konzentrationen bei Stimulation führen.

Die Ausschüttung von IL-4 durch die PBMCs nach Stimulation mit IL-3 war sehr gering, wie auch schon bei der Stimulation von Basophilen. Durch Kombination mit anti-IgE wurden 24 pg/ml IL-4 im Vergleich zu 140 pg/ml bei Basophilenstimulation ausgeschüttet. Dass Basophile weniger als 1% der PBMCs ausmachen, die IL-4-Freisetzung durch PBMCs jedoch mehr als 1/6 des IL-4-Wertes bei Basophilen ausmacht, lässt vermuten, dass die IL-4-Ausschüttung durch PBMCs nicht allein von Basophilen abhängt. Insgesamt war die IL-4-Sekretion durch Stimulation mit anti-IgE deutlich höher als durch IL-3.

4.1.8.2 IL-13

IL-13 wurde von Basophilen nach Stimulation mit IL-3, Anti-IgE, C5a allein und in Kombination freigesetzt. Auch im PBMC Überstand konnte unter den oben genannten Bedingungen IL-13 nachgewiesen werden, jedoch in deutlich geringerer Konzentration. Wie auch schon bei IL-4 ist der Anteil der Basophilen an PBMCs zu gering, um allein für die Zytokinbildung verantwortlich zu sein.

Diese Unterschiede in der Zytokinfreisetzung deuten darauf hin, dass sich humane Basophile in ihrer Wirkung deutlich von murinen Basophilen unterscheiden und ihre Bedeutung im Humansystem anders bewertet werden muss. Hierzu passt, dass murine Basophile, die über Oberflächenmarker als Basophile identifiziert wurden, deutliche morphologische Unterschiede zu denen anderer Spezies aufweisen (79; 80). Wie die IL-6-Sekretion durch PBMCs zeigt, werden die im murinen Organismus von Basophilen ausgeführten Aufgaben möglicherweise im humanen Organismus durch eine andere Zellpopulation übernommen.

4.1.8.3 Kinetik der Stimulation

Sowohl Anti-IgE als auch C5a führen zu einer schnellen Stimulation der Basophilen. Nach 5-stündiger Inkubation mit anti-IgE lag der Aktivitätsmarker CD203c bei einem Mean von 3000 (im Vergleich zu 2000 nach 24 Stunden), nach 5-stündiger Inkubation mit C5a bei 7000 (nach 24 Stunden bei 1000). Auch die Ausschüttung von Zytokinen verlief bei Stimulation mit diesen Substanzen schneller als mit IL-3. Nach 5-stündiger Inkubation mit anti-IgE betrug die IL-13 Konzentration im Überstand 35 pg/ml (40 pg/ml nach 24 Stunden), die IL4-Konzentration 20 pg/ml (90 pg/ml nach 24 Stunden). Die Inkubation mit C5a erbrachte nach 5 Stunden eine IL-13-Konzentration von 15 pg/ml und IL-4-Konzentration von 45 pg/ml. Nach 24 Stunden waren die Konzentrationen dieser Zytokine nicht mehr zu detektieren.

Dies spricht dafür, dass die mit C5a stimulierten Basophilen nach 5 Stunden kaum noch Zytokine freisetzen und die vorhandenen auf Grund ihrer geringen Halbwertszeit zerfielen. Die Stimulation mit IL-3 erreichte ihr Wirkungsmaximum erst später: Sowohl die Werte für CD203c als auch die Zytokinkonzentrationen waren nach 24 Stunden deutlich höher als nach 5 Stunden. Somit erfolgt die schnellste Stimulation durch C5a; am längsten dauert die Stimulation mit IL-3. Dies deutet daraufhin, dass C5a eher für akute Entzündungsprozesse verantwortlich ist, wohingegen IL-3 an chronischen beteiligt ist.

4.1.9 *BLOCKADE DER STIMULATION DURCH ANTI-IL-3 ANTIKÖRPER*

Nachdem eine Stimulation von humanen Basophilen nachgewiesen war und die zu erwartenden Zytokinkonzentrationen bestimmt waren, wurde versucht diese Stimulation durch anti-IL-3-Antikörper zu blockieren. Hierfür wurden die aufgereinigten Antikörper AK 11, AK 13, AK R&D und ein passender Isotyp verwendet.

Eine IL-13-Sekretion konnte wie auch eine Erhöhung der CD 203c-Expression durch die Antikörper AK 11 und AK R&D effektiv verhindert werden. AK 13 war in dieser Hinsicht partiell wirksam, wohingegen der Isotyp nur einen vernachlässigbaren Unterschied zur reinen IL-3-Stimulation zeigt.

Da die Antikörper AK 11 und AK R&D an ähnliche Epitope binden, ist es nicht verwunderlich, dass der Effekt ihrer Wirkung sich ebenfalls wenig unterscheidet. AK R&D hat eine geringfügig bessere Blockade der IL-13-Ausschüttung zur Folge. Jedoch ist die in diesem Versuch verwendete Antikörperkonzentration mit 25 µg/ml recht hoch. Da AK 11 eine höhere relative Affinität aufweist als Antikörper AK R&D, ist zu erwarten, dass dieser Antikörper in niedrigeren Konzentrationen auf Grund der stärkeren IL-3-Rezeptorbindung einen stärkeren blockierenden Effekt hat als AK R&D. In weiteren Versuchen mit geringeren Konzentrationen wäre es möglich die Wirkungsprofile genauer zu untersuchen.

Zudem gelingt die Detektion mit dem R&D IL-3 ELISA Kit, in welchem der hier verwendete R&D-Antikörper als Detektion-Antikörper fungiert, im Gegensatz zu einem aus Antikörper 11 und 13 konzipierten ELISA Serum und Plasma nur unzureichend. Daher ist es möglich, dass der Antikörper R&D in vivo durch Plasmaproteininteraktionen schlechtere Ergebnisse zeigt. Dass AK 13 nur partiellen Effekt hat, kann in Einklang gebracht werden mit seinem geringeren Effekt auf die Blockade des TF-1-Zellwachstums, sowie der geringeren Affinität des Antikörpers im Vergleich zu den andern beiden. Somit führt dieser Antikörper trotz der stärksten Blockade der IL-3-Bindung (siehe 3.2.8) zur geringeren Verminderung der Zytokinfreisetzung.

4.1.10 *IL-3 IN ERKRANKUNGEN*

4.1.10.1 Rheumatoide Arthritis (RA)

In einem Mausmodell der RA, der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA), ließ sich im frühen Krankheitsstadium der Verlauf der Erkrankung durch IL-3-Blockade abschwächen. Injektionen von IL-3 in die Gelenke führten zu Beginn der CIA zu einer deutlichen Verschlechterung der klinischen Situation (26). Dieser Effekt entsteht vermutlich in Folge der IL-3-Wirkung auf murine Basophile. IL-3 führt zu einer deutlichen Vermehrung der Basophilen im peripheren Blut. Zudem schütten diese nach Aktivierung mit IL-3 IL-6 und IL-4 aus (26) und fördern die Proliferation von B-Zellen, das Überleben der Plasmazellen (81) sowie deren Differenzierung zu Memory B-Zellen (82). IL-6 hat eine pro-inflammatorische Wirkung, deren Blockade in der RA schon therapeutisch genutzt wird (83; 84). Erhöhte Level an IL-4 und die Plasmazelldifferenzierung könnten als Erklärung für die erhöhten anti-Kollagen-Antikörper Level durch IL-3-Administration dienen (26). Eine ältere Studie detektierte jedoch kein IL-3 im Synovium von RA-Patienten (85).

Unsere Versuche zeigten, dass sowohl die Bindung des hIL-3 an Basophile als auch dessen stimulatorischer Effekt durch AK11 und partiell AK 13 unterbunden werden kann. Jedoch unterscheiden sich humane Basophile von murinen Basophilen in Bezug auf ihre Zytokinausschüttung nach Stimulation. Eine IL-6-Ausschüttung konnte weder nach Kultivierung mit IL-3, anti-IgE oder C5a noch mit Kombinationen dieser Stoffe beobachtet werden. Eine IL-4-Freisetzung fand kaum durch IL-3 alleine statt, jedoch in Kombination mit anti-IgE. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Basophile im humanen Organismus eine andere Rolle spielen als im murinen. Somit hätte eine effektive Blockade der IL-3-Wirkung auf Basophilen nicht den gleichen Effekt auf die Rheumatoide Arthritis beim Menschen wie auf die CIA im Mausmodell. Es ist jedoch vorstellbar, dass ein anderer Zelltyp im Menschen in dieser Hinsicht den murinen Basophilen entspricht. Da Antikörper AK 11 und AK 13 zu einer Blockade der IL-3-Bindung auf allen untersuchten Zelltypen führten, ist es äußerst wahrscheinlich, dass die Bindung an diesen Zelltyp ebenfalls unterbunden werden würde. Falls die Effektorfunktionen der murinen Basophilen ein Äquivalent im Menschen haben, ist ein positiver Effekt der AK 11- oder AK 13-Administration in der frühen RA denkbar.

Die am stärksten verbreiteten Leukozyten in den CIA befallenen Gelenke sind T- Zellen, Makrophagen/Monozyten und Plasmazellen.

Die IL-3-Blockade durch die Antikörper AK 11 und AK 13 führt ebenfalls zu einer verminderten Bindung des IL-3 an B-Lymphozyten, die Vorläuferzellen der Plasmazellen. IL-3 führt zu einer vermehrten Bildung von B-Zellvorläufern im Knochenmark (6) und fördert ihre Differenzierung zu reifen B-Zellen (17). Zudem führt IL-3 im Mausmodell über die Aktivierung von Basophilen indirekt zur Proliferation von B-Zellen, vermehrter Antikörperproduktion und zur Differenzierung zu Memory B-Zellen (82).

Zudem konnten wir zeigen, dass die IL-3-Bindung an Monozyten durch AK 11 und AK 13 unterbunden werden kann. Makrophagen bzw. ihre Vorläufer Monozyten werden durch IL-3 zur vermehrten Expression von MHCII-Molekülen angeregt, was eine verstärkte Antigenpräsentation zur Folge hat. Über diesen Mechanismus können B- und T-Lymphozyten aktiviert werden und eine Inflammation ausgelöst werden. Zudem unterstützt IL-3 bei beiden Zelltypen die IL-1-Sekretion (12), welches ebenfalls ein proarthritogenes Zytokin ist, dessen Blockade therapeutisch genutzt wird (86).

Abweichend von der oben beschriebenen Rolle von IL-3 in der CIA beschrieben andere Arbeitsgruppen eine erkrankungslindernde Wirkung von sehr hohen IL-3-Konzentrationen in der inflammatorischen Arthritis und der CIA (52; 18). Dieser Effekt entsteht zum einen durch die oben beschriebene umstrittene Wirkung auf die Osteoklastogenese, zum anderen soll IL-3 indirekt die Entwicklung von Foxp3⁺ Treg-Zellen bewirken, welche die Entzündungsreaktion regulieren. Zudem beschrieben Srivastava et al. eine deutliche Abnahme der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-17A, TNF- α , IL-1 und eine Zunahme der Anti-inflammatorischen Zytokine IFN- γ und IL-10 bei IL-3 behandelten Mäusen. Dies steht im Gegensatz zu der Veröffentlichung von Brühl et al. 2009, welche von einer Zunahme des IL-6 bei IL-3-Administration spricht. Im Gegensatz zu Brühl et al. verwendeten Yogesha et al. und Srivastava et al. deutlich höhere IL-3 Konzentrationen von 1,5-2 $\mu\text{g/ml}$ (100ng/ml Brühl). Hiermit sind die unterschiedlichen Ergebnisse möglicherweise zu begründen. Es ist unwahrscheinlich, dass solch hohe Konzentrationen an IL-3 in vivo tatsächlich vorkommen. Sollte IL-3 jedoch im humanen System eine Arthritis verhindernde Wirkung besitzen, sind die hergestellten Antikörper zur Behandlung der Erkrankung natürlich nicht wirksam.

4.1.10.2 Myeloproliferative Erkrankungen

IL-3 wird auf Grund seiner hämatopoetischen Eigenschaften als Multi-Colony Stimulating Faktor bezeichnet. Es wirkt proliferationsfördernd auf CD34⁺-Vorläuferzellen aller Zelllinien des Knochenmarks (Metcalf, 1989). Dementsprechend ist es nicht verwunderlich, dass IL-3 als Faktor in verschiedenen Myeloproliferativen Erkrankungen gehandelt wird.

Akute Myeloische Leukämie (AML), B-Zell Akute Lymphatische Leukämie (B-ALL)

45% der AML-Zellen und 40 % der B-ALL-Zellen tragen vermehrt IL-3-Rezeptoren, welche möglicherweise zur Pathogenese der Erkrankung beitragen. Diese AML-Zellen zeigen im Vergleich zu CD123⁻ AML-Zellen eine höhere Proliferationsrate sowie eine ausgeprägtere Apoptose-Resistenz und vermehrte Stat5-Phosphorylierung. AML-Patienten mit vermehrter IL-3-alpha-Expression zeigten seltener komplette Remissionen, ein geringeres Over-all-Survival und höhere Rezidivraten als Patienten mit verminderter/normaler IL-3-alpha-Expression. Andere Mechanismen der Stat5-Phosphorylierung sind Auslöser für Myeloische Leukämien und sind mit einer schlechteren Prognose verknüpft (87). Eine Blockade der Stat5-Aktivierung führt in der Chronischen Myeloischen Leukämie zu einer Verminderung der Tumorzellproliferation (88). Dies lässt vermuten, dass sich eine IL-3-Blockade über eine Verminderung der Stat5-Aktivierung und Apoptose-Resistenz positiv auf die AML auswirken würden.

Hodgkin Lymphom

Im Normalfall exprimieren 90% der malignen Zellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms IL-3 α . IL-3 führt zur Proliferation von Hodgkin- und Reed-Sternberg Zellen (H-RS Zellen) und unterdrückt teilweise ihre Apoptose. Zudem vermitteln H-RS Zellen die Produktion von IL-3 durch aktivierte T-Zellen (89).

Auf Grund der hohen Expression von IL-3 α durch H-RS-Zellen und bestimmten aggressiven Untergruppen der AML ist davon auszugehen, dass seine antiapoptotische und proliferationsfördernde Wirkung über eine Blockade dieses Rezeptors vermittelt werden kann. Die Bindung des IL-3 an alle untersuchten Zelltypen mit diesem Rezeptor wurde durch AK 11 und AK 13 deutlich vermindert. Zudem wurde seine Wirkung auf Basophile und TF-1-Zellen, bei denen es sich um eine hämatoleukämische Zelllinie mit vermehrter Stat5-Phosphorylierung handelt (72) durch diese Antikörper unterdrückt. Daher ist davon auszugehen, dass auch die AML und das Hodgkin-Lymphom positiv durch diese Antikörper beeinflusst werden können.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Zuge dieser Arbeit wurden neun gegen IL-3 gerichtete Antikörper durch Fusion muriner Milzzellen mit der Myelomzelllinie X63Ag8 hergestellt. Diese und fünf weitere wurden auf ihre Affinität, Kreuzreaktionen und Epitope charakterisiert. Sieben Antikörper waren gegen dreidimensionale Epitope gerichtet, sieben Antikörper gegen lineare Epitope. Davon erkennen vier Antikörper die N-terminale AS-Sequenz SWVN, ein weiterer ist gegen eine andere N-terminale Sequenz gerichtet, einer gegen eine C-terminale und ein weiterer gegen eine Sequenz in Peptid 3. Die Antikörper binden humanes IL-3 sehr spezifisch: Keiner der Antikörper zeigte eine Kreuzreaktivität gegenüber Ratten-, Maus- oder Rhesusaffen IL-3. Nur Antikörper 8 und 38 zeigten eine minimale Kreuzreaktivität gegenüber dem strukturverwandten IL-5, Antikörper 10 eine geringe gegenüber GM-CSF. Die Affinitäten von zwei Antikörpern befanden sich im picomolaren, von neun im nanomolaren sowie die zweier weiterer im mikromolaren Bereich (Tabelle 16).

Tabelle 16: Überblick über Epitope, Affinitäten und Kreuzreaktivitäten der Antikörper.

Klon	Kreuzreaktion IL-5	Kreuzreaktion GM-CSF	Kreuzreaktion r-/m-/Rh-IL3	Affinität	Western Blot	Epitope
Klon 3	-	-	-	nanomol	-	3D-Epitope
Klon 8	(+)	-	-	picomol	+	C-terminal
Klon 10	-	(+)	-	nanomol	-	3D-Epitope
Klon 11	-	-	-	picomol	+	N-terminal (SWVN)
Klon 13	-	-	-	nanomol	(+)	3D-Epitope
Klon 36	-	-	-	nanomol	-	Peptid 3
Klon 38	(+)	-	-	mikromol	-	3D-Epitope
Klon 41	-	-	-	mikromol	-	3D-Epitope
Klon 42	-	-	-	nanomol	+	N-terminal
Klon 43	-	-	-	nanomol	+	N-terminal (SWVN)
Klon 44	-	-	-	nanomol	+	N-terminal (SWVN)
Klon 45	-	-	-	mikromol	-	3D-Epitope
Klon 46	-	-	-	n.d.	+	N-terminal (SWVN)
Klon 47	-	-	-	nanomol	-	3D-Epitope

Es zeigte sich, dass IL-3 eine entzündungsunterhaltende Eigenschaft bei der Rheumatoiden Arthritis und möglicherweise weiteren Autoimmunerkrankungen zuzuschreiben ist. Diese entwickelt sich im Mausmodell unter anderem durch eine Aktivierung Basophiler Granulozyten, welche daraufhin IL-4 und IL-6 ausschütten. Ziel dieser Arbeit war es, einen blockierenden Antikörper gegen IL-3 herzustellen, welcher die Bindung des IL-3 an Zellen des Immunsystems und vor allem die Aktivierung Basophiler Granulozyten unterbindet.

Die blockierende Wirkung der Antikörper wurde anhand einer IL-3-abhängigen Zelllinie untersucht. Es stellte sich heraus, dass drei der getesteten Antikörper die Proliferation dieser Zellen unterbindet. Zwei weitere zeigten eine Tendenz zur Proliferationsverminderung in hohen Konzentrationen.

Weiterhin wurde untersucht, ob die Antikörper eine Bindung des IL-3 an humane PBMCs verhindern. AK11 und AK 13 zeigten eine deutliche Blockade der IL-3 Bindung an Monozyten, Plasmazytoiden Dendritischen Zellen, Basophilen und B-Zellen, AK 8 nur eine geringe.

Zudem wurde untersucht, ob die Zytokinproduktion von Basophilen durch Zugabe der Antikörper vermindert werden kann. Im Vorversuch stellte sich heraus, dass humane Basophile im Gegensatz zu murinen nach IL-3-Stimulation kein IL-6, wenig IL-4 und IL-13 produzieren. Humane PBMCs produzierten nach IL-3-Stimulation geringe Mengen an IL-6. Die Freisetzung von IL-13 durch humane Basophile wurde durch den Antikörper 11 beinahe komplett unterbunden, durch Antikörper 13 verminderte sich die Freisetzung von IL-13 auf 23% des Ausgangswertes. Dies zeigt, dass Antikörper 11 die Wirkung des IL-3 auf humane Zellen effektiv blockiert, da er sowohl die Proliferation der Tumorzelllinie TF-1, die Bindung an PBMCs sowie die Freisetzung von Zytokinen durch Basophile verhindert.

Da das im Handel erhältliche IL-3-ELISA Kit von R&D in Vorversuchen nur eine unzureichende Sensitivität im Plasma und Serum zeigte, versuchten wir aus den hergestellten Antikörpern einen Sandwich-ELISA zu konzipieren. Es zeigte sich, dass die Kombination aus Antikörper 13 als Capture-Antikörper und Antikörper 11 als Detektion-Antikörper im Bereich von 3 pg/ml bis mindestens 1000 pg/ml IL-3 verlässliche Werte in Plasma, Serum und PBS liefern. Dies ermöglicht die zuverlässige Bestimmung von IL-3 in Patientenproben (Tabelle 17).

Tabelle 17: Überblick über die blockierenden Eigenschaften der hergestellten Antikörper und ihrer Verwendbarkeit im ELISA. n.d. = nicht untersucht.

Klon	ELISA- tauglich in Serum und Plasma	Blockade der IL-3 TF-1- Prolif.	Blockade der IL-3 Bindung	Blockade der IL-3 Basophilenaktivierung
Klon 3	n.d	-	-	n.d
Klon 8	-	(+)	(+)	n.d
Klon 10	n.d	-	-	n.d
Klon 11	+++	+++	++	+++
Klon 13	+++	+	+++	+
Klon 36	n.d	-	n.d	n.d
Klon 38	n.d	-	n.d	n.d
Klon 41	n.d	-	n.d	n.d
Klon 42	n.d	(+)	n.d	n.d
Klon 43	n.d	-	n.d	n.d
Klon 44	n.d	(+)	n.d	n.d
Klon 45	n.d	-	n.d	n.d
Klon 46	n.d	-	n.d	n.d
Klon 47	n.d	-	n.d	n.d

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Ihle JN, Keller J, Oroszlan S, Henderson LE, Copeland TD, Fitch.** Biologic properties of homogeneous interleukin 3. I. Demonstration of WEHI-3 growth factor activity, mast cell growth factor activity, p cell-stimulating factor activity, colony-stimulating factor activity, and histamine-producing cell-stimulating factor. *J Immunol.* 1983, S. 131:282–7.
2. **Schneider E, Thieblemont N, De Moraes ML, Dy M.** Basophils: new players in the cytokine network. *Eur Cytokine Netw.* . Sep 2010, S. 21(3):142-53.
3. **Wodnar-Filipowicz A, Heusser CH, Moroni C.** Production of the haemopoietic growth factors GM-CSF and interleukin-3 by mast cells in response to IgE receptor-mediated activation. *Nature.* May 1989, S. 339(6220):150-2.
4. **Miyajima A, Kitamura T, Harada N, Yokota T, Arai K.** Cytokine receptors and signal transduction. *Annu Rev Immunol.* 2002, S. 10: 295-331.
5. **Metcalf, D.** The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. *Nature.* May 1989, S. 339(6219):27-30.
6. **Reddy EP, Korapati A, Chaturvedi P and Rane S.** IL-3 signaling and the role of Src kinases, JAKs and STATs: a covert. *Oncogene (2000) 19, 2532 ± 2547.* May 2000, S. 19(21):2532-47.
7. **Valent P, Besemer J, Muhm M, Majdic O, Lechner K, Bettelheim P.** Interleukin 3 activates human blood ba-sophils via high-affinity binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* July 1989 , S. 86(14):5542-6.
8. **Abdul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai.** *Cellular and Molecular Immunology.* Philadelphia : Saunders Elsevier, 2010.
9. **Toyosaki-Maeda T, Takano H, Tomita T, Tsuruta Y, Maeda-Tanimura M, Shimaoka Y, Takahashi T, Itoh T, Suzuki R, Ochi T.** Differentiation of monocytes into multinucleated giant bone-resorbing cells: two-step differentiation induced by nurse-like cells and cytokines. *Arthritis Res.* . Aug 2001, S. 3(5):306-10.
10. **Buelens C, Bartholomé EJ, Amraoui Z, Boutriaux M, Salmon I, Thielemans K, Willems F, Goldman M.** Interleukin-3 and interferon beta cooperate to induce differentiation of monocytes into dendritic cells with potent helper T-cell stimulatory properties. *Blood.* 2002c1;99(3):993-8. 2002 .
11. **Ebner S, Hofer S, Nguyen VA, Fürhapter C, Herold M, Fritsch P, Heufler C, Romani N.** A novel role for IL-3: human monocytes cultured in the presence of IL-3 and IL-4 differentiate into dendritic cells that produce less IL-12 and shift Th cell responses toward a Th2 cytokine pattern. *J Immunol.* 2002 Jun 15;168(12):6199-207. Jun 2002, S. 168(12):6199-207.
12. **Frendl G, Fenton MJ, Beller DI.** Regulation of macrophage activation by IL-3. II. IL-3 and lipopolysaccharide act synergistically in the regulation of IL-1 expression. *Immunol.* 1990, S. 144:3400–10.
13. **Yoshimoto T, Yasuda K, Tanaka H, Nakahira M, Imai Y, Fujimori Y et al.** Basophils contribute to T(H)2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II com-plexes to CD4+ T cells. *Nat Immunol.* July 2009, S. 10 (7): 706-12.

14. **Frendl G, Beller DI.** Regulation of macrophage activation by IL-3. I. IL-3 functions as a macrophage-activating factor with unique properties, inducing Ia and lymphocyte function-associated antigen-1 but not cytotoxicity. *J Immunol.* . May 1990, S. 144(9):3392-9.
15. **Smith WB, Guida L, Sun Q, Korpelainen EI, van den Heuvel C, Gillis D, Hawrylowicz CM, Vadas MA, Lopez AF.** Neutrophils activated by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor express receptors for interleukin-3 which mediate class II expression. *Blood.* . Nov 1995, S. 86(10):3938-44.
16. **Bacon K, Gearing A, Camp R.** Induction of in vitro human lymphocyte migration by interleukin 3, interleukin 4, and interleukin 6. *Cytokine.* . Mar 1990, S. 2(2):100-5.
17. **Kinashi T, Inaba K, Tsubata T, Tashiro K, Palacios R, Honjo T.** Differentiation of an interleukin 3-dependent precursor B-cell clone into immunoglobulin-producing cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* . Jun 1988, S. 85(12):4473-7.
18. **Srivastava RK, Tomar GB, Barhanpurkar AP, Gupta N, Pote ST, Mishra GC, Wani MR.** IL-3 attenuates collagen-induced arthritis by modulating the development of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol.* Feb 2011, S. 186(4):2262-72.
19. **Prussin C., Metcalfe D.** IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology.* Feb 2006, S. 450-456.
20. **Schäfer T, Starkl P, Allard C, Wolf RM, Schweighoffer T.** A granular variant of CD63 is a regulator of repeated human mast cell degranulation. *Allergy.* Oct 2010, S. 65(10):1242-55.
21. **Bühring HJ, Simmons PJ, Pudney M, Müller R, Jarrossay D, van Agthoven A, Willheim M, Brugger W, Valent P, Kanz L.** The monoclonal antibody 97A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors. *Blood.* Oct 1999, S. 94(7):2343-56.
22. **Kahlert H, Cromwell O, Fiebig H.** Measurement of basophil-activating capacity of grass pollen allergens, allergoids and hypoallergenic recombinant derivatives by flow cytometry using anti-CD203c. *Clin Exp Allergy.* Sep 2003, S. 33(9):1266-72.
23. **Lantz CS, Boesiger J, Song CH, Mach N, Kobayashi T, Mulligan RC, Nawa Y, Dranoff G, Galli SJ.** Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature.* Mar 1998, S. 392(6671):90-3.
24. **Didichenko SA, Spiegl N, Brunner T, Dahinden CA.** IL-3 induces a Pim1-dependent antiapoptotic pathway in primary human basophils. *Blood.* Nov 2008, S. 112(10):3949-58.
25. **Yoshimoto T, Tsutsui H, Tominaga K, Hoshino K, Okamura H, Akira S, Paul WE, Nakanishi K.** IL-18, although antiallergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine release by basophils. *Proc Natl Acad Sci USA.* Nov 1999, S. 96(24):13962-6.
26. **Brühl H, Cihak J, Niedermeier M, Denzel A, Rodriguez Gomez M, Talke Y, Goebel N, Plachý J, Stangassinger M, Mack M.** Important role of interleukin-3 in the early phase of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* . May 2009, S. 60(5):1352-61.
27. **Le Gros G, Ben-Sasson SZ, Conrad DH, Clark-Lewis I, Finkelman FD, Plaut M, Paul WE.** IL-3 promotes production of IL-4 by splenic non-B, non-T cells in response to Fc receptor cross-linkage. *J Immunol.* . Oct 1990, S. 145(8):2500-6.

28. **Gibbs BF, Zillikens D, Grabbe J.** Nerve growth factor influences IgE-mediated human basophil activation: functional properties and intracellular mechanisms compared with IL-3. *Int Immunopharmacol.* Apr 2005, S. 5(4):735-47.
29. **Ochensberger B, Tassera L, Bifrare D, Rihs S, Dahinden CA.** Regulation of cytokine expression and leukotriene formation in human basophils by growth factors, chemokines and chemotactic agonists. *Eur J Immunol.* . Jan 1999, S. 29(1):11-22.
30. **MacDonald SM, Schleimer RP, Kagey-Sobotka A, Gillis S, Lichtenstein LM.** Recombinant IL-3 induces histamine release from human basophils. *J Immunol.* May 1989 , S. 142(10):3527-32.
31. **Murphy JM, Young IG.** IL-3, IL-5, and GM-CSF Signaling: Crystal Structure of human beta-common Receptor. *Vitamins and Hormones.* 2006, S. 74:1-30.
32. **Lopez AF, Hercus TR, Ekert P, Littler DR, Guthridge M, Thomas D, Ramshaw HS, Stomski F, Perugini M, D'Andrea R, Grimbaldston M, Parker MW.** Molecular Basis of Cytokine Receptor Activation. *IUBMB Life.* July 2010, S. 62(7): 509–518.
33. **Dey R, Ji K, Liu Z, Chen L.** A cytokine-cytokine interaction in the assembly of higher-order structure and activation of the interleukin-3:receptor complex. *PLoS One.* 2009, S. 4(4):e5188.
34. **Barry SC, Bagley CJ, Phillips J, Dottore M, Cambareri B, Moretti P, D'Andrea R, Goodall GJ, Shannon MF, Vadas MA, et al.** Two contiguous residues in human interleukin-3, Asp21 and Glu22, selectively interact with the alpha- and beta-chains of its receptor and participate in function. *J Biol Chem.* . Mar 1994, S. 269(11):8488-92.
35. **Martinez-Moczygamba M, Huston DP.** Biology of common beta receptor-signaling cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF. *J Allergy Clin Immunol.* . Oct 2003 , S. 112(4):653-65.
36. **Hara T, Miyajima A.** Two distinct functional high affinity receptors for mouse interleukin-3 (IL-3). *EMBO J.* 1992, S. 11:1875–84.
37. **Burger H, Wagemaker G, Leunissen JA, Dorssers LC.** Molecular evolution of interleukin-3. *J Mol Evol.* Sep 1994, S. 39(3):255-67.
38. **Burger H, Mostert MC, Kok EM, Wagemaker G, Dorssers LC.** Cloning and expression of interleukin-3 genes of chimpanzee and New World monkeys. *Biochim Biophys Acta.* Mar 1994, S. 1217(2):195-8.
39. **Hettenkofer, Hans- Jürgen.** *Rheumatologie: Diagnostik, Klinik, Therapie* . Stuttgart : Thieme, 2003.
40. **Machold KP, Eberl G, Leeb BF, Nell V, Windisch B, Smolen JS.** Early arthritis therapy: rationale and current approach. *J Rheumatol Suppl.* . Jul 1998, S. 53:13-9.
41. **Silman AJ, Pearson JE.** Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2002, S. 3:S265-72.
42. **Leeb BF, Machold KP, Smolen JS.** Diagnosis and therapy of chronic polyarthritis. *Radiologe.* Aug 1996, S. 36(8):657-62.
43. **Edward Harris, Ralph Budd, Gary Firestein, Mark Genovese , John Sergent, Shaun Ruddy, Clement Sledge.** *Kelley's Textbook of Rheumatology.* Saunders : Elsevier, 2008.

44. **Keck, Elmar.** *Rheumatologie ein Basisbuch.* Stuttgart : Wissenschaftliche Verlagsges., 2002.
45. **Cooles FA, Isaacs JD.** Pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* . May 2011, S. 23(3):233-40.
46. **Yamada R, Tanaka T, Unoki M, Nagai T, Sawada T, Ohnishi Y, et al.** Association between a single-nucleotide polymorphism in the promoter of the human interleukin-3 gene and rheumatoid arthritis in Japanese patients, and maximum-likelihood estimation of combinatorial effect that two genetic loci have on susceptibility to t. *Am J Hum Genet.* 2001, S. 68:674–85.
47. **NHS.** Rheumatoid arthritis: national clinical guideline for management and treatment in adults. London : s.n., 2009.
48. **DGRh-Leitlinie.** Management der frühen rheumatoiden Arthritis. s.l. : Springer Verlag, August 2011.
49. **Brennan FM, McInnes IB.** Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* . Nov 2008, S. 118(11):3537-45.
50. **Brühl H, Cihak J, Plachý J, Kunz-Schughart L, Niedermeier M, Denzel A, Rodriguez Gomez M, Talke Y, Luckow B, Stangassinger M, Mack M.** Targeting of Gr-1+,CCR2+ monocytes in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* . Sep 2007, S. 56(9):2975-85.
51. **Denzel A, Maus UA, Gomez MR, Moll C, Niedermeier M, Winter C. et al.** Basophils enhance immunological memory responses. *Nat Immunol.* . 9 2008, S. 733–42.
52. **Yogesha SD, Khapli SM, Srivastava RK, Mangashetti LS, Pote ST, Mishra GC, Wani MR.** IL-3 inhibits TNF-alpha-induced bone resorption and prevents inflammatory arthritis. *J Immunol.* 2009, S. 182(1):361-70.
53. **Khapli SM, Tomar GB, Barhanpurkar AP, Gupta N, Yogesha SD, Pote ST, Wani MR.** Irreversible inhibition of RANK expression as a possible mechanism for IL-3 inhibition of RANKL-induced osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* . Sep 2010, S. 399(4):688-93.
54. **Oh J, Lee MS, Yeon JT, Choi SW, Kim HS, Shim H, Lee SY, Youn BS, Yokota Y, Kim JH, Kwak HB.** Inhibitory regulation of osteoclast differentiation by interleukin-3 via regulation of c-Fos and Id protein expression. *J Cell Physiol.* . May 2012, S. 227(5):1851-60.
55. **Gupta N, Barhanpurkar AP, Tomar GB, Srivastava RK, Kour S, Pote ST, Mishra GC, Wani MR.** IL-3 inhibits human osteoclastogenesis and bone resorption through downregulation of c-Fms and diverts the cells to dendritic cell lineage. *J Immunol.* . Aug 2010, S. 185(4):2261-72.
56. **Barton BE, Mayer R.** IL-3 induces differentiation of bone marrow precursor cells to osteoclast-like cells. *J Immunol.* . Nov 1989, S. 143(10):3211-6.
57. **Toyosaki-Maeda T, Takano H, Tomita T, Tsuruta Y, Maeda-Tanimura M, Shimaoka Y, Takahashi T, Itoh T, Suzuki R, Ochi T.** Differentiation of monocytes into multinucleated giant bone-resorbing cells: two-step differentiation induced by nurse-like cells and cytokines. *Arthritis Res.* . 2001, S. 3(5):306-10.
58. **Edelman, G.M.** Antibody structure and molecular immunology. *Scand J Immunol.* . Jul 1991, S. 34(1):1-22.

59. **Harris LJ, Larson SB, Hasel KW, Day J, Greenwood A, McPherson A.** The three-dimensional structure of an intact monoclonal antibody for canine lymphoma. *Nature*. 1992, S. ;360(6402):369-72.
60. **Sesarman A, Vidarsson G, Sitaru C.** The neonatal Fc receptor as therapeutic target in IgG-mediated autoimmune diseases. *Cell Mol Life Sci*. . Aug 2010, S. 67(15):2533-50.
61. **Woof J, Burton D.** Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. *Nat Rev Immunol*. 2004, S. 4 (2): 89–99.
62. **Roux, K.** Immunoglobulin structure and function as revealed by electron microscopy. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999, S. 120 (2): 85–99.
63. **Köhler G, Milstein C.** Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *J Immunol*. Aug 1975, S. 256(5517):495-7.
64. **Köhler G, Milstein C.** Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur J Immunol*. Jul 1976, S. 6(7):511-9.
65. **Alkan, Sefik S.** Monoclonal antibodies: the story of a discovery that revolutionized science and medicine. *Nature Reviews Immunology*. Feb 2004, S. 153-156.
66. **Steinitz M, Klein G, Koskimies S, Makel O.** EB virus-induced B lymphocyte cell lines producing specific antibody. *Nature*. Sep 1977, S. 269(5627):420-2.
67. **Lanzavecchia A, Corti D, Sallusto F.** Human monoclonal antibodies by immortalization of memory B cells. *Curr Opin Biotechnol*. Dec 2007, S. 18(6):523-8.
68. **Traggiai E, Becker S, Subbarao K, Kolesnikova L, Uematsu Y, Gismondo MR, Murphy BR, Rappuoli R, Lanzavecchia A.** An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. *Nat Med*. Aug 2004, S. 10(8):871-5.
69. **Tiller T, Meffre E, Yurasov S, Tsuiji M, Nussenzweig MC, Wardemann H.** Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *J Immunol Methods*. Jan 2008, S. 329(1-2):112-24.
70. **Tiller T, Busse CE, Wardemann H.** Cloning and expression of murine Ig genes from single B cells. *J Immunol Methods*. Oct 2009, S. 350(1-2):183-93.
71. **Renner, Kerstin.** Herstellung monoklonaler Antikörper gegen das menschliche Polycystin-2-Protein. 2011.
72. **Kitamura T, Tange T, Terasawa T, Chiba S, Kuwaki T, Miyagawa K, Piao YF, Miyazono K, Urabe A, Takaku F.** Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. *J Cell Physiol*. . Aug 1989 , S. 140(2):323-34.
73. **de StGroth SF, Scheidegger D.** Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J Immunol Methods*. 1980, S. 35(1-2):1-21.
74. **Kuwaki T, Kitamura T, Tojo A, Matsuki S, Tamai Y, Miyazono K, Takaku F.** Characterization of human interleukin-3 receptors on a multi-factor-dependent cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 30. May 1989, S. 161(1):16-22.

75. **Herman Burger, Rob W. van Leen, Lambert C.J. Dorssers, Niek L.M. Persoon, Patty J. Lemson, and Gerard Wagemaker.** Species Specificity of Human Interleukin-3 Demonstrated by Cloning and Expression of the Homologous Rhesus Monkey (*Macaca mulatta*) Gene. *Blood*. Dec 1990, S. 2229-2234.
76. **G Wagemaker, FC van Gils, H Burger, LC Dorssers, RW van Leen, NL Persoon, JJ Wielenga, JLHeeney and E Knol.** Highly increased production of bone marrow-derived blood cells by administration of homologous interleukin-3 to rhesus monkeys. *Blood*. 1990, S. 2235-2241.
77. **Gesner TG, Mufson RA, Norton CR, Turner KJ, Yang YC, Clark SC.** Specific binding, internalization, and degradation of human recombinant interleukin-3 by cells of the acute myelogenous, leukemia line, KG-1. *J Cell Physiol.* . Sep 1988, S. 136(3):493-9.
78. **Kurimoto Y, de Weck AL, Dahinden CA.** Interleukin 3-dependent mediator release in basophils triggered by C5a. *J Exp Med.* . Aug 1989, S. 170(2):467-79.
79. **Lee JJ, McGarry MP.** When is a mouse basophil not a basophil? *Blood.* . 1. Feb 2007, S. 109(3):859-61.
80. **Eguchi, M.** Comparative electron microscopy of basophils and mast cells, in vivo and in vitro. *Electron Microsc Rev.* 1991, S. 4(2):293-318.
81. **Rodriguez Gomez M, Talke Y, Goebel N, Hermann F, Reich B, Mack M.** Basophils support the survival of plasma cells in mice. *J Immunol.* . 15. Dec 2010, S. 185(12):7180-5.
82. **Andrea Denzel, Ulrich A Maus, Manuel Rodriguez Gomez, Cordula Moll, Marianne Niedermeier, Christine Winter, Regina Maus, Susan Hollingshead, David E Briles, Leoni A Kunz-Schughart, Yvonne Talke, Matthias Mack.** Basophils enhance immunological memory responses. *Nature Immunology.* 2008, S. 733 - 742 .
83. **Woodrick R, Ruderman EM.** Anti-interleukin-6 therapy in rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* . 2010, S. 68(3):211-7.
84. **Alonzi T, Fattori E, Lazzaro D, Costa P, Probert L, Kollias G, De Benedetti F, Poli V, Ciliberto G.** Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. *J Exp Med.* 16. Feb 1998, S. 187(4):461-8.
85. **Firestein GS, Xu WD, Townsend K, Broide D, Alvaro-Gracia J, Glasebrook A, Zvaifler NJ.** Cytokines in chronic inflammatory arthritis. I. Failure to detect T cell lymphokines (interleukin 2 and interleukin 3) and presence of macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) and a novel mast cell growth factor in rheumatoid synovitis. *J Exp Med.* . 1. Nov 1988, S. 168(5):1573-86.
86. **Arend, WP.** Physiology of cytokine pathways in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* Feb 2001, S. 45(1):101-6.
87. **Testa U, Riccioni R, Diverio D, Rossini A, Lo Coco F, Peschle C.** Interleukin-3 receptor in acute leukemia. *Leukemia.* . Feb 2004, S. 18(2):219-26.
88. **Huang M, Dorsey JF, Epling-Burnette PK, Nimmanapalli R, Landowski TH, Mora LB, Niu G, Sinibaldi D, Bai F, Kraker A, Yu H, Moscinski L, Wei S, Djeu J, Dalton WS, Bhalla K, Loughran TP, Wu J, Jove R.** Inhibition of Bcr-Abl kinase activity by PD180970 blocks constitutive activation of Stat5 and growth of CML cells. *Oncogene.* . 12. Dec 2001, S. 21(57):8804-16.

89. **Aldinucci D, Olivo K, Lorenzon D, Poletto D, Gloghini A, Carbone A, Pinto A.** The role of interleukin-3 in classical Hodgkin's disease. *Leuk Lymphoma*. . Mar 2005, S. 46(3):303-11.

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Modell der IL-3 Rezeptor-Intraktion.....	4
Abbildung 2: Sequenzen des IL-3 Proteins.....	6
Abbildung 3: Aufbau eines Antikörpers.....	11
Abbildung 4: Hybridomtechnik zur Herstellung monoklonaler Antikörper.....	14
Abbildung 5: Schema der EBV-induzierten B-Zellimmortalisierung.....	15
Abbildung 6: Schema der Immunisierung.....	24
Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Ficoll.....	25
Abbildung 8: Schematische Darstellung eines indirekten ELISAs.....	28
Abbildung 9: Schematische Darstellung eines Sandwich-ELISAs.....	30
Abbildung 10: Screening auf positive Klone mittels ELISA.....	39
Abbildung 11: Testung der Kreuzreaktivität der Antikörper mit mIL-3, rIL-3, GM-CSF und IL-5 mittels ELISA.....	42
Abbildung 12: Kreuzreaktivität der Antikörper mit Rhesusaffen IL-3.....	43
Abbildung 13: Western Blot zur Testung auf Kreuzreaktivität mit linearem RhIL-3.....	43
Abbildung 14: Western Blot zur Testung der linearen Bindung der Antikörper.....	44
Abbildung 15: Aminosäuresequenzen der Peptide 1-6.....	45
Abbildung 16: AS-Sequenzen der Peptide 1A,1B,1Ma.....	45
Abbildung 17: Bindung der Antikörper an die Peptide 1 bis 6.....	46
Abbildung 18: Bindung der Antikörper an die Peptide 1A,1B, Ma.....	47
Abbildung 19: Vergleich der Antikörperaffinitäten.....	48
Abbildung 20: Testung der relativen Affinität der Antikörper 8 und 11 mit verschiedenen Konzentrationen an Bindungsprotein.....	49
Abbildung 21: Proliferationsversuch mit hIL-3.....	50
Abbildung 22: Proliferationsversuch mit hGM-CSF..... Fehler! Textmarke nicht definiert.	
Abbildung 23: Vergleich der TF-1 Proliferation mit hIL-3 bzw rh IL-3.....	51
Abbildung 24: Blockierung des IL-3- abhängigen Wachstums von TF1- Zellen.....	53
Abbildung 25: Blockade der Wirkung von GM-CSF durch Zugabe von IL-3 und IL-3-Antikörpern.....	54
Abbildung 26: Gatingschema für PBMCs.....	56
Abbildung 27: Blockade der IL-3-Bindung an Basophile Granulozyten durch AK 8, AK 11, AK 13 und AK R&D.....	57
Abbildung 28: Blockade der IL-3-Bindung an pDZs durch die Antikörper 8, 11, 13, R&D.....	58
Abbildung 29: Blockade der IL-3 Bindung an B-Zellen durch die Antikörper 8, 11, 13, R&D.....	59
Abbildung 30: Blockade der IL-3 Bindung an Monozyten durch die Antikörper 8, 11, 13, R&D.....	60
Abbildung 31: Analyse der von Basophilen ausgeschütteten Zytokine unter verschiedenen Stimulationsbedingungen.....	62
Abbildung 32: Analyse der von Basophilen ausgeschütteten Zytokine unter verschiedenen Stimulationsbedingungen.....	63
Abbildung 33: Stimulation humaner PBMCs über 24h mit verschiedenen Substanzen.....	64
Abbildung 34: Blockade der IL-3 induzierten Basophilenstimulation durch anti-IL-3 Antikörper.....	66
Abbildung 35: Sensitivitäten der verschiedenen Antikörperkombinationen als IL-3-ELISA.....	67
Abbildung 36: Vergleich des selbst hergestellten IL-3-ELISAs mit dem ELISA der Firma R&D in Serum, Plasma und PBS.....	68
Abbildung 37: AS-Sequenz des Peptids 6, sowie der entsprechenden RhIL-3 Sequenz.....	71

Abbildung 38: Bindungsepitop der Antikörper 11, 43, 44, 45, 46.	72
Abbildung 39: Epitopbestimmung Antikörper R&D.....	73
Abbildung 40: Sequenzen der Peptide 3 und 6.....	73
Abbildung 41: Sequenzen des Peptid 3 und des Rhesus-IL-3 in Peptid 3.	74
Abbildung 42: Sequenzen der Peptide 1A,1B,1Ma, Rh IL-3 (Peptid 1).	75
Abbildung 43: Rezeptorinteraktion des von Antikörper 11 erkannten Epitops.	78
Abbildung 44: Rezeptorinteraktionen des Peptid 6.....	78

8 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Biologika mit Zulassung zur Therapie der RA.....	8
Tabelle 2: Geräte.....	17
Tabelle 3: Glas- und Plastikwaren.....	18
Tabelle 4: Chemikalien, Reagenzien Puffer und Reaktionsmedien.....	19
Tabelle 5: Gebrauchsfertige Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze.....	19
Tabelle 6: Gebrauchsfertige Kits.....	20
Tabelle 7: Zytokine, Antikörper und Enzyme.....	20
Tabelle 8: Medien, Lösungen, Puffer für den Westernblot.....	21
Tabelle 9: Medien, Lösungen, Puffer für ELISA.....	21
Tabelle 10: Medien, Lösungen, Puffer für die Zellisolation.....	22
Tabelle 11: Medien, Lösungen, Puffer für die Zellkultur.....	22
Tabelle 12: Zelllinien.....	22
Tabelle 13: Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	23
Tabelle 14: Analyse- und Bearbeitungsprogramme.....	23
Tabelle 15: Überblick über die entstandenen Klone.....	39
Tabelle 16: Überblick über Epitope, Affinitäten und Kreuzreaktivitäten der Antikörper.....	85
Tabelle 17: Überblick über die blockierenden Eigenschaften der hergestellten Antikörper und ihrer Verwendbarkeit im ELISA.....	87

9 ANHANG

Aminosäurenverzeichnis

AS	Dreibuchsta- ben-Code	Einbuchsta- ben-Code	AS	Dreibuchsta- ben-Code	Einbuchsta- ben-Code
Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutaminsäure	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

10 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt waren.

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Matthias Mack für die Aufgabenstellung und Möglichkeit diese Doktorarbeit in der Abteilung für Innere Medizin II am Uniklinikum Regensburg durchzuführen.

Ein besonderer Dank geht an Frau Dr. Kerstin Renner für die Betreuung dieser Arbeit. Sie hat mich überaus freundlich eingearbeitet und mich stets auch noch zu später Stunde mit Rat und Tat begleitet. Ihre wertvollen Anregungen und ihre Unterstützung haben diese Arbeit erst ermöglicht

Herzlichen Dank für all die großen und kleinen Hilfestellungen beim Durchführen der Versuche schulde ich auch den weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe Mack: Fabian Hermann, Nicole Göbel, Yvonne Talke, Barbara Reich und Manuel Rodriguez Gomez

Abschließend danke ich noch meiner Familie für das fleißige Korrekturlesen.

11 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, Sophia Anna Katharina Scharl, geboren am 04.04.88 in Amberg, an Eidesstatt, dass die vorliegende Arbeit

Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen humanes Interleukin-3

von mir selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden.

Diese Doktorarbeit wurde in der jetzigen oder in ähnlicher Form bei keiner anderen Universität eingereicht und hat noch keinem anderen Prüfungszweck gedient.

Regensburg, den 05.04.2013

(Sophia Scharl)