

**Charakterisierung der intrathekalen humoralen
Immunantwort bei
entzündlichen ZNS-Erkrankungen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Henrike Lisa Diel

aus Solingen

Düsseldorf, Oktober 2020

aus der Klinik für Neurologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

Univ.-Prof. Dr. Goebels
(Klinik für Neurologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)

Univ.-Prof. Dr. Willbold
(Institut für Physikalische Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)

Tag der mündlichen Prüfung: 16. April 2021

Für Jensi

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Multiple Sklerose	3
1.1.1	Epidemiologie und Verlaufsformen.....	3
1.1.2	Symptome und Therapie	4
1.1.3	Konzepte der Ätiologie	4
1.1.4	Oligoklonale Banden	5
1.2	IgM Antikörper	7
1.2.1	Eigenschaften und Rolle in der Immunantwort	7
1.2.2	Struktur: IgM Pentamere, Hexamere und die J-Kette	8
1.2.3	Rekombinante Produktion	9
1.2.4	Aufreinigungsmethoden	9
1.3	Herpes-simplex-Enzephalitis – Beispiel einer entzündlichen ZNS Erkrankung	11
1.3.1	Herpes-simplex-Enzephalitis	11
1.3.2	Aufbau und Struktur von HSV-1	11
1.4	Ziele der Arbeit	13
2	Material und Methode.....	14
2.1	Material	14
2.1.1	Laborgeräte.....	14
2.1.2	Software.....	15
2.1.3	Chemikalien	16
2.1.4	Verbrauchsmaterial	17
2.1.5	Prokaryotische und eukaryotische Zellen	18
2.1.6	Reaktions-Kits.....	19
2.1.7	Antikörper.....	19
2.1.8	Primer	19
2.2	Methode	23
2.2.1	Kryokonservierung von Patientenliquor und Liquorzellen	23
2.2.2	Färbung von CD138 ⁺ Liquorzellen für die FACS-Analyse.....	23
2.2.3	Sortierung einzelner CD138 ⁺ Liquorzellen über FACS	24
2.2.4	Vorbereitung von Polymerase-Kettenreaktionen (PCRs).....	25
2.2.5	Einzelzell Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR).....	25
2.2.6	PCR Klonierung	27

2.2.7	Agarose-Gelelektrophorese	29
2.2.8	Extraktion von DNA aus Agarosegelstücken	29
2.2.9	Rekombinatorische Klonierung.....	30
2.2.10	Plasmidamplifikation für die Antikörperproduktion	30
2.2.11	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	31
2.2.12	Isolierung von Plasmid-DNA (kleiner Maßstab)	31
2.2.13	Sequenzierung von Plasmid-DNA oder von PCR-Produkten.....	32
2.2.14	Isolation von Plasmid-DNA (großer Maßstab)	32
2.2.15	Präparation und Nutzung bakterieller Glycerolstocks	33
2.2.16	Kultur und Transfektion von HEK293-Zellen.....	33
2.2.17	Teilen von HEK293 Zellen.....	34
2.2.18	Beschichten von T175 Zellkulturflaschen mit Poly-L-Lysin (PLL).....	35
2.2.19	Kryokonservierung von HEK293 Zellen.....	35
2.2.20	Inkulturnahme von HEK293 Zellen	36
2.2.21	Transfektion von HEK293 Zellen mittels Polyethyleniminin (PEI)	36
2.2.22	Vorbereitung von Zellkulturüberstand für die Antikörperaufreinigung.....	37
2.2.23	Vorbereitung von Puffern für die Antikörperaufreinigung	37
2.2.24	Vorbereitung von Puffern für die Aufreinigung von IgG Antikörpern.....	37
2.2.25	Vorbereitung von Puffern für die Aufreinigung von IgM Antikörpern	38
2.2.26	Packen von Leersäulen für die Aufreinigung von IgM Antikörpern.....	38
2.2.27	Aufreinigung von IgM Antikörpern über Affinitätschromatographie	38
2.2.28	Aufreinigung von IgG Antikörpern über Affinitätschromatographie	39
2.2.29	Aufreinigung von IgG Antikörper über FPLC	39
2.2.30	Aufreinigung rekombinanter IgG Antikörper über magnetische Beads.....	40
2.2.31	Pufferaustausch von Antikörperlösungen nach Antikörperaufreinigung	41
2.2.32	Aufkonzentrierung von Antikörperlösungen	41
2.2.33	Proteinkonzentrationsmessung über Bicinchoninsäure-Assay (BCA).....	41
2.2.34	Proteinkonzentrationsmessung mittels IgG- oder IgM-ELISA	42
2.2.35	Native Polyakrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE)	43
2.2.36	Denaturierende Polyakrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	44
2.2.37	Färbungs- und Demyelinisierungsexperimente an organotypischen Schnittkulturen (OSCs).....	44
2.2.38	Indirekte Immunfluoreszenz	45
2.2.39	Generierung von Zelllysaten HSV infizierter Zellkulturzellen	45
2.2.40	Western Blot	46
2.2.41	Immunpräzipitation.....	46
2.2.42	Massenspektrometrie	47

3	Ergebnisse	48
3.1	Untersuchung der Rolle des Antikörper Isotyps in Demyelinisierungsprozessen	48
3.1.1	Herstellung von anti-MOG oder anti-Sulfatid mit IgG Isotyp oder IgM Isotyp	48
3.1.2	Identifikation einer geeigneten IgM Aufreinigungsmethode	56
3.1.3	Testung rekombinant hergestellter anti-MOG oder anti-Sulfatid Antikörper in einem Modell der Demyelinisierung.....	67
3.2	Nachbildung und Charakterisierung der intrathekalen humoralen Immunantwort eines Patienten mit entzündlicher ZNS-Erkrankung	72
3.2.1	Identifizierung von Antikörperprodukten expandierter Liquor-Plasmazellen.....	74
3.2.2	Rekombinante Herstellung ausgewählter Antikörper	80
3.2.3	Antigenbindeanalysen rekombinant hergestellter Antikörper	86
4	Diskussion	96
4.1	Untersuchung der Rolle des Antikörper Isotyps in Demyelinisierungsprozessen	96
4.1.1	Anti-MOG IgM in Demyelinisierungsprozessen	96
4.1.2	Anti-Sulfatid IgG und anti-Sulfatid IgM in Demyelinisierungsprozessen.....	96
4.1.3	Evaluation von IgM-Aufreinigungsmethoden	97
4.1.4	Herstellung von IgM Pentameren oder Hexameren in unserem System.....	98
4.1.5	Rolle der J-Kette bei der Bildung von IgM Oligomeren	98
4.2	Nachbildung und Charakterisierung der intrathekalen humoralen Immunantwort bei entzündlicher ZNS-Erkrankung.....	100
4.2.1	Rekombinant nachgebildete Antikörper und Analyse ihrer Antigenspezifität....	100
4.2.2	Experimenteller Ausblick für rekombinant nachgebildete Antikörper.....	101
4.2.3	Charakterisierung der intrathekalen IgM-vermittelten Immunantwort.....	102
4.2.4	Relevanz monoklonaler HSV-1-spezifischer Antikörper.....	102
4.3	Zusammenfassung und Ausblick	104
5	Literaturverzeichnis.....	106
6	Appendix	112
6.1	Abbildungsverzeichnis	112
6.2	Tabellenverzeichnis.....	114
6.3	Abkürzungen	116
7	Danksagung	119
8	Erklärung.....	120

Zusammenfassung

Liquorspezifische oligoklonale IgG Banden (OKB) sind ein diagnostisches Hauptmerkmal bei Patienten mit Multipler Sklerose (MS), für die bisher weder Antigenspezifität noch pathophysiologische Relevanz genau geklärt ist. Darüber hinaus wurden in der Vergangenheit IgM OKB, oftmals spezifisch für Lipide, mit einem klinisch ungünstigeren MS-Verlauf assoziiert. In der vorliegenden Arbeit ging ich daher folgenden Fragen nach:

1. Welche Rolle spielt der Antikörper Isotyp (IgM vs. IgG) bei Demyelinisierungsprozessen? Ich untersuchte zu diesem Zweck zwei Myelin-spezifische monoklonale Antikörper (anti-Protein oder anti-Lipid) in einem Labor-eigenen Modell der Demyelinisierung. Ein technischer Fokus lag auf der rekombinanten Herstellung monoklonaler IgM Antikörper.
2. Lässt sich der (postulierte) aggressivere Krankheitsverlauf bei MS Patienten mit IgM OKB auf einzelne Antikörper zurückführen? Hierzu untersuchte ich in Zusammenarbeit mit einem Kollegen exemplarisch die intrathekale humorale Immunantwort eines Patienten mit akuter ZNS Entzündung (Herpes-simplex-Enzephalitis) und nachgewiesener intrathekaler IgM Synthese.

Die Ergebnisse deuten für den getesteten Protein-spezifischen Antikörper an, dass der Effektormechanismus im Falle von IgM Monomeren und Dimeren über den klassischen Komplementweg verläuft. Der Lipid-spezifische Antikörper zeigt eine Bindung an Myelin-reiche Areale im organotypischen Schnitt, eine Demyelinisierung ist jedoch weder für den IgG Isotyp noch für den IgM Isotyp erkennbar. Beide Myelin-spezifischen Antikörper konnte ich rekombinant als IgM Monomere oder Dimere, bisher noch nicht als IgM Pentamere oder Hexamere herstellen. Die fünf getesteten IgM Aufreinigungsmethoden waren zur Aufreinigung intakter IgM Oligomere aus einer polyklonalen Probe in der Lage und eine Methode konnte monoklonale IgM Antikörper besonders rein aus HEK Zellkulturüberstand isolieren (Anti-IgM Agarose).

Innerhalb der Untersuchung der intrathekalen humoralen Immunantwort eines Patienten mit ZNS-Entzündung konnte ich zusammen mit einem Kollegen 228 variable Regionen in ihrer Sequenz aufklären und 79 gepaarte VH-VL-Gensequenzen (mit IgM oder IgG Isotyp) rekonstruieren. Wir stellten 13 ausgewählte Antikörper aus klonal expandierten Liquorplasmazellen rekombinant mit IgG Isotyp her. Die Analyse ihrer Antigenspezifität durch mehrere Kooperationspartner über Immunfluoreszenz, Western Blot oder Immunpräzipitation identifizierte einen HSV-1 Glykoprotein-spezifischen, wahrscheinlich Glykoprotein C (gC)-bindenden Antikörper.

Meine Untersuchungen deuten unter anderem die Relevanz der IgM Oligomerisierung für die Effektorfunktion von anti-MOG oder anti-Sulfatid an. Zukünftig wäre es wünschenswert, beide Antikörper mit intakter Pentamer- oder Hexamerstruktur herzustellen und sie erneut hinsichtlich ihrer Demyelinisierungsfähigkeit zu untersuchen. Der von uns identifizierte, wahrscheinlich HSV-1 gC-bindende Antikörper könnte möglicherweise in der Entwicklung von HSV-Impfstoffen oder alternativer HSV-Therapien genutzt werden.

Abstract

The presence of CSF-specific oligoclonal IgG bands (OCB) is a hallmark of multiple sclerosis (MS). However, neither antigen specificity nor pathophysiological relevance of these OCB have been resolved completely. Additionally, IgM OCB that are often lipid-specific have been associated with an unfavorable clinical course of MS. In the present work, I therefore address the following questions:

1. Which role does the antibody isotype (IgM vs. IgG) play in processes of demyelination? This will be examined by the analysis of two myelin-specific recombinant monoclonal antibodies (anti-protein or anti-lipid) in our *ex vivo* model of immune-mediated demyelination. The recombinant production of monoclonal IgMs is a technical focus of my work.
2. Can the (postulated) more aggressive disease course in MS patients with intrathecal IgM synthesis be attributed to single antibodies? Together with a colleague, I exemplarily investigate the intrathecal humoral immune response of a patient with acute CNS inflammation (herpes simplex encephalitis) and proven intrathecal IgM synthesis.

For the analyzed protein-specific antibody, the results suggest that, in case of IgM monomers and dimers, the effector mechanism occurs via the classical complement pathway. The lipid-specific antibody shows binding to myelin-rich areas in the organotypic slice, but demyelination is not evident, neither for the IgG isotype nor for the IgM isotype. I was able to produce both myelin-specific antibodies recombinantly as IgM monomers or dimers, but not as IgM pentamers or hexamers yet. The five IgM purification methods tested were able to purify intact IgM oligomers from a polyclonal sample and one method was able to isolate monoclonal IgM antibodies particularly pure from HEK cell culture supernatant (anti-IgM agarose).

Within the study of the intrathecal humoral immune response of a patient with CNS inflammation, a colleague and me, we were able to obtain sequences for 228 variable regions and reconstruct 79 paired VH-VL gene sequences (with IgM or IgG isotype). We produced 13 selected antibodies recombinantly (IgG isotype) from clonally expanded CSF plasma cells. The analysis of their antigen specificity by several collaborators via immunofluorescence, Western blot, or immunoprecipitation identified an HSV-1 glycoprotein-specific, probably glycoprotein C (gC)-binding antibody.

My studies suggest the relevance of IgM oligomerization to the effector function of anti-MOG or anti-sulfatide. In the future, it would be desirable to produce both antibodies as intact pentamers or hexamers and to reexamine them in the OSC-model. The identified, likely HSV-1 gC-binding, antibody could potentially be used in the development of HSV vaccines or alternative HSV therapies.

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

1.1.1 Epidemiologie und Verlaufsformen

Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch entzündliche demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Weltweit sind mehr als zwei Millionen Menschen betroffen und die durchschnittliche jährliche Inzidenz in Europa liegt bei 4,2 Fällen pro 100.000 (Dutta & Trapp, 2014; Pugliatti et al., 2006). Klinisch ist die Erkrankung durch das Auftreten von Behinderungserscheinungen gekennzeichnet. Nach dem Verlauf der Erkrankung werden drei Formen der MS unterschieden: die schubförmig remittierende MS (RRMS = *engl.* relapsing remitting MS), die sekundär-progressive MS (SPMS = *engl.* secondary progressive MS) und die primär progressive MS (PPMS = *engl.* primary progressive MS). Ungefähr 85 % der MS Patienten leiden unter der schubförmig remittierenden MS, in welcher sich Phasen klinisch akuter Zustände mit Phasen der Regenerierung abwechseln (Dutta & Trapp, 2014). Bei ca. 60 – 70 % dieser Patienten wird die RRMS innerhalb von weiteren 20 – 25 Jahren zu einer sekundär progradienten MS, welche durch eine Verschlechterung des neurologischen Zustands der Patienten gekennzeichnet ist. Eine anhaltende und fortlaufende Verschlechterung des neurologischen Zustands ab Beginn der Erkrankung und ohne Regenerierung kann bei ca. 10 % der MS Patienten gefunden werden. Diese Verlaufsform entspricht der PPMS.

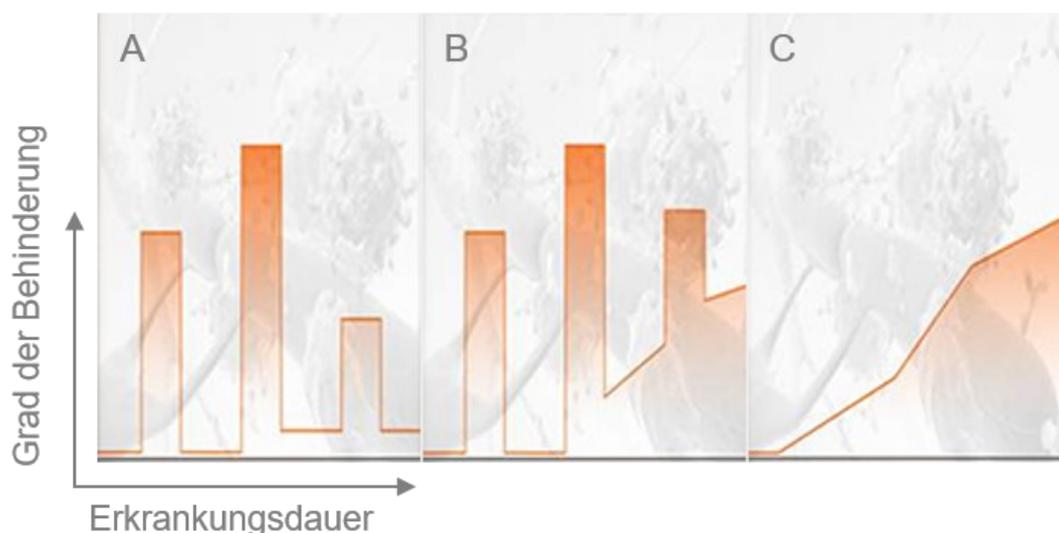


Abb. 1: Schematische Darstellung der verschiedenen Verlaufsformen der MS **A** Schubförmig remittierender Verlauf **B** Sekundär progradienter Verlauf **C** Primär progradienter Verlauf. Modifiziert aus DMSG, AMSEL e.V. - Landesverband, 2020.

1.1.2 Symptome und Therapie

Das Krankheitsbild der MS ist heterogen, jedoch sind frühe Stadien der Erkrankung häufig gekennzeichnet durch motorische Störungen z. B. Lähmungen oder Sehstörungen oder durch Sensibilitäts-Störungen der Haut meist in Form von Kribbeln, Schmerzen oder Taubheit (DMSG - *Multiple Sklerose*, 2020; Schönfelder, Kip & Bleß, 2016). Weitere Symptome sind zudem Blasenstörungen, Unsicherheiten beim Gehen und Greifen, Doppelbilder oder eine verwaschene Artikulation. Im weiteren Verlauf der Erkrankung erscheinen auftretende Lähmungen meist zusätzlich mit Spastiken. Hauptsächlich betroffen sind die Beine. Außerdem kann sich die Blasenstörung bis hin zur Inkontinenz verstärken. Neben direkten körperlichen Beschwerden können innerhalb der MS folgende Symptome auftreten: Depression, Fatigue, Einschränkungen der Aufmerksamkeit, kognitive Störungen sowie Einschränkungen der Merkfähigkeit und der Konzentration, sexuelle Funktionsstörungen, Schmerzen oder Schwindel. MS ist nicht heilbar. Die Behandlung der MS erfolgt entweder innerhalb der sogenannten Stufentherapie oder über die symptomatische Therapie (Schönfelder et al., 2016). Die Stufentherapie umfasst die verlaufsmodifizierende Therapie, welche als Schubprophylaxe dienen soll, und in die Therapie des akuten Schubes. Ziel ist es, das Fortschreiten der Erkrankung durch verschiedene immunmodulatorische Medikamente zu verhindern bzw. zu verlangsamen. Verschiedene immunmodulatorische Medikamente stehen hierbei für die verlaufsmodifizierende Therapie zur Verfügung, ein akuter Schub wird üblicherweise durch die Gabe von Kortison (Kortisonstoßtherapie) behandelt. Die symptomatische Therapie konzentriert sich auf die Linderung konkreter Beschwerden mittels medikamentöser oder nicht-medikamentöser Ansätze. Ihr Ziel ist in erster Linie die Verbesserung der Lebensqualität betroffener Patienten.

1.1.3 Konzepte der Ätiologie

MS wird primär als eine Autoimmunerkrankung verstanden, deren Ätiologie jedoch noch weitgehend ungeklärt ist (Holmøy, 2007; Korn, 2008; Kurtzke, 2005; Lutton, R. Winston & T. C. Rodman, 2004 Jan; Tselis, 2011). Es wird vermutet, dass die Erkrankung aus einem Zusammenspiel zwischen Umweltfaktoren und genetischer Prädisposition resultiert (Kurtzke, 2005), jedoch gibt es verschiedene Hypothesen zur Entstehung der MS. Einige Wissenschaftler vermuten, dass rein immunologische Mechanismen zur Entwicklung einer Autoimmunität beitragen (Lutton et al., 2004 Jan). Mechanismen wie Antigenexpression und Interaktionen zwischen Zytokinen und Leukozyten oder regulatorische T-Zellen werden hierbei in den Vordergrund gerückt. Andere Forscher argumentieren für Myelin-spezifische CD4⁺ Helferzellen als ursächlich in der Entstehung der MS (Korn, 2008). Den rein immunologischen Theorien stehen Ätiologiekonzepte entgegen, welche von der entscheidenden Rolle einer Infektion durch Erreger wie z. B. Viren ausgehen (Jeanne Billieux, Alvarez Lafuente &

Jacobson, 2014; Tselis, 2011). Verschiedene Viren wurden schon mit MS assoziiert, vor allem das Epstein-Barr-Virus (EBV) aber auch das Masernvirus, das Hundestaubevirus (*engl.* canine distemper virus), das humane Herpesvirus 6 oder humane endogene Retroviren (Tselis, 2011). Der Hypothese der Entstehung der MS durch Viren liegt unter anderem die oft gemachte Beobachtung zugrunde, dass in MS Patienten intrathekale Antikörper gefunden werden können, welche zwischen viralen Antigenen und ZNS Strukturen kreuz reagieren (Cortese, Capone, Luchetti, Cortese & Nicosia, 2001; Giuseppe Mameli, Eleonora Cocco, Jessica Frau, Maria Giovanna Marrosu & Leonardo Antonio Sechi). Es gibt die Vermutung, dass so eine Immunantwort gegen bestimmte Erreger zur Entstehung von Autoimmunität führt (Giuseppe Mameli et al.).

1.1.4 Oligoklonale Banden

1.1.4.1 Nachweismethodik

Im Liquor enthaltene oligoklonale IgG Banden (OKB) liegen bei > 90 % aller Patienten mit Multipler Sklerose vor und sind ein immunologisches Hauptmerkmal für die Diagnose von MS (Graner et al., 2020; Winger & Zamvil, 2016). OKB werden nicht nur im Rahmen einer MS gebildet, sondern können auch bei anderen entzündlichen Erkrankungen des ZNS auftreten, z. B. in paraneoplastischen Erkrankungen, ZNS Lupus, Neurosarkoidose und Morbus Behcet oder in infektiösen Erkrankungen wie Neurosyphilis, tuberkulöse Meningitis, mykotische Meningitis, tropische spastische Paraparese/HTLV-1-assoziierte Myelopathie (TSP/HAM) und subakute sklerosierende Panenzephalitis (SSPE) (Jeanne Billioux et al., 2014). Detektiert werden die OKB durch die Laboranalyse von Liquor- und Serumproben. Proteine in den Proben werden hierfür durch ein Gel mit pH Gradient isoelektrisch fokussiert und IgG Antikörper folgend spezifisch im Gel angefärbt (Uhr & Reiber, 2019). Unter physiologischen Umständen lassen sich keine Banden in Liquor oder Serum erkennen. Das Auftreten von Proteinbanden deutet auf das Vorliegen einzelner vermehrt gebildeter Antikörper hin. Identische OKB sind entweder sowohl in der Liquorprobe als auch in der Serumprobe vorhanden oder es zeigen sich im Liquor zusätzlich OKB zu den in der Serumprobe beobachteten Banden (Uhr & Reiber, 2019).

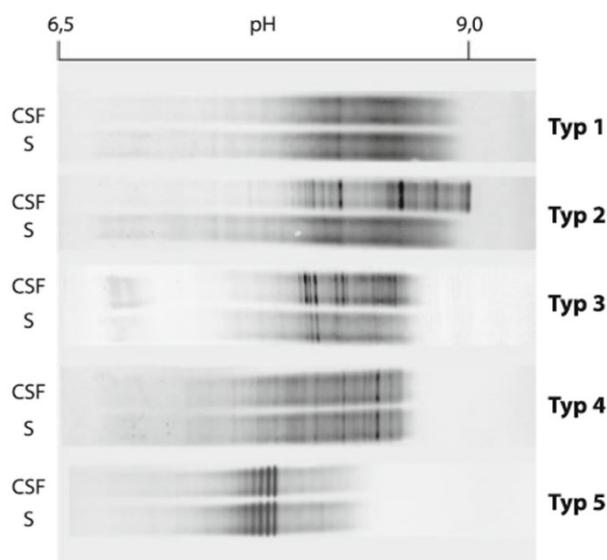


Abb. 2: Analyse von Liquor- und Serumproben hinsichtlich oligoklonaler Banden über isoelektrische Fokussierung. Die Proteine in Liquor- und Serumproben wurden im pH-Gradientengel getrennt. Proteine wandern im Gel bis zu dem pH-Wert, welcher ihrem isoelektrischen Punkt entspricht. Die Visualisierung aufgetrennter Proteine erfolgte durch eine IgG Antikörper-spezifische Gelfärbung. Modifiziert aus Uhr & Reiber, 2019.

1.1.4.2 Oligoklonalen IgG Banden

In der Vergangenheit wurde bereits ausgedehnt versucht die Spezifitäten der in der MS vorliegenden oligoklonalen IgG Banden aufzulösen. Die von den OKB erkannten Strukturen sind jedoch bis heute kontrovers und auch die pathophysiologische Relevanz dieser intrathekalen IgG Antikörper ist nicht ausreichend geklärt. (Brändle et al., 2016; Büdingen, Harrer, Kuenzle, Meier & Goebels, 2008; Büdingen et al., 2010; Hohlfeld, Dornmair, Meinl & Wekerle, 2016; Krumbholz, Derfuss, Hohlfeld & Meinl, 2012; Mayer, Hohlfeld & Meinl, 2012; Meinl, Derfuss, Krumbholz, Pröbstel & Hohlfeld, 2011). Es wurde bisher jedoch angenommen, dass die Zielantigene der OKB relevant in der Pathophysiologie der MS sind (Winger & Zamvil, 2016). Oft werden Myelin Autoantigene oder virale Antigene, die ZNS Strukturen ähneln, als Ziel der OKB angenommen. Eine Zerstörung dieser Zielstrukturen führt zu einer Schädigung des ZNS. Frühere Studien, welche das CSF Gesamt-IgG von MS Patienten untersuchten, identifizierten bereits einige Ziele der OKB, darunter verschiedene Viren wie das Masernvirus, das Varizeller-Zoster-Virus, das humane T-lymphotrope Virus 1 und das humane Hepatitis Virus 6 (HHV-6) aber auch Hauptbestandteile des Myelins wie das Myelin Basische Protein (MBP) und das Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) oder Glykolipide, Fettsäuren und Neurofilamentproteine (Winger & Zamvil, 2016). Es wurden in MS Patienten außerdem bereits OKB identifiziert, welche gegen Chlamydia pneumoniae, EBV und HHV-6 gerichtet waren (Jeanne Billioux et al., 2014). OKB in der MS könnten immunpathologisch sein und möglicherweise eine Zell-vermittelte Immunpathologie andeuten, welche durch virale Infektionen induziert wird (Jeanne Billioux et al., 2014). Darüber hinaus haben auch

Untersuchungen, welche von einzelnen CSF B-Zellen in MS Patienten ausgingen, Antikörper gegen bestimmte Viren oder Myelinproteine identifiziert (Winger & Zamvil, 2016). Auch andere Analysen z. B. die Identifizierung von Zielpeptiden der OKB über Phagendisplay einer Peptidbibliothek und Inkubation mit OKB zeigten, dass auf den Peptiden Epitope vorlagen, die Sequenzhomologien mit Proteinen viralen Ursprungs besaßen (Graner et al., 2020).

1.1.4.3 Oligoklonale IgM Banden

Neben oligoklonalen IgG Banden sind bei einem Teil der MS Patienten zusätzlich oligoklonale IgM Banden (IgM OKB) nachweisbar. Histologisch lassen sich neben IgG Antikörpern auch IgM Antikörper in MS Läsionen darstellen (Sádaba et al., 2012). Der klinische MS-Verlauf scheint in Patienten mit IgM OKB ungünstiger zu sein (Huss et al., 2018; Villar et al., 2002; Villar et al., 2003). Die Antigenspezifitäten intrathekalen IgM Antikörper bei MS-Patienten sind weitgehend ungeklärt, einige Forscher schlagen eine dominierende Spezifität für Lipide vor (Villar et al., 2005).

1.2 IgM Antikörper

1.2.1 Eigenschaften und Rolle in der Immunantwort

IgM ist einer von fünf möglichen Antikörper Schwerekettenisotypen, welche im Menschen gebildet werden. Er ist der erste Antikörper, welcher im Rahmen einer Immunantwort wirksam ist. B-Zellen, welche der V(D)J-Rekombination durchgeführt haben, exprimieren nach ihrem Erstkontakt mit Antigen und ihrer Aktivierung diesen Antikörper Isotyp. Durch von anderen Immunzellen ausgeschüttete Zytokine kann es zu einem Wechsel des Isotyps gebildeter Antikörper kommen. Man spricht vom Antikörper Klassenwechsel. Die im Rahmen der initialen Immunantwort gebildeten IgM Antikörper besitzen einige Merkmale, welche sie von anderen menschlichen Antikörpern abheben: IgM Antikörper tendieren dazu, eine geringe Affinität hinsichtlich ihres Antigens zu besitzen (Janeway, 2001). Dies resultiert daraus, dass IgM Antikörper von B-Zellen produziert werden, bevor letztere eine somatische Hypermutation durchlaufen. Auf der anderen Seite assemblieren sich *in vivo* jedoch 5 IgM Antikörper Monomere zu IgM Pentameren. Hierdurch kommt es zu einer gesteigerten Antikörperavidität und zu einer im Vergleich zu IgG 100 bis 1000 fach besseren Komplementaktivierung (Janeway, 2001; Mader, Chromikova & Kunert, 2013). IgM Antikörper werden zwar vor allem im Rahmen einer initialen Immunantwort gebildet, jedoch können sie auch in folgenden Immunantworten und nach der somatischen Hypermutation gebildet werden (Janeway, 2001). Andere Antikörperisotypen sind in diesen späteren Antworten allerdings dominanter vorhanden. Der von IgM Antikörpern vermittelte Effektormechanismus kann neben einer direkten Neutralisation oder dem klassischen Komplementweg auch über die Bindung an Fc μ

Rezeptoren erfolgen (Kubagawa et al., 2019; Liu et al., 2019). Fc μ Rezeptoren werden im Menschen von B-Zellen, T-Zellen und NK Zellen exprimiert und vermitteln die B-Zell Entwicklung, Reifung und Aktivierung sowie Vorgänge innerhalb der humoralen Immunantwort, der Wirtsabwehr und immunologischer Toleranz (Liu et al., 2019).

1.2.2 Struktur: IgM Pentamere, Hexamere und die J-Kette

IgM Antikörper liegen im menschlichen Serum vorrangig als Pentamere vor (Andreas Loos et al., 2014; Mader et al., 2013). Zu ihrer Bildung assemblieren sich 5 Monomere, bei welchen sich die C-terminalen Enden ihrer konstanten Schwerkettenregionen durch Disulfidbrücken mit den konstanten Schwerkettenregion benachbarter IgM Monomere verbinden (Mader et al., 2013). Nur zwischen zwei der fünf verbundenen IgM Molekülen, werden die Schwerketten nicht direkt über Disulfidbrücken verknüpft, sondern die Verbindung über die so genannte J-Kette (*engl.* joining chain) hergestellt. Die J-Kette ist entscheidend für die Bildung des IgM Pentamers (Azuma et al., 2007; Niles, Matsuuchi & Koshland, 1995; Randall, Brewer & Corley, 1992). Unter Abwesenheit der J-Kette werden IgM Hexamere gebildet, welche wie IgM Monomere nur geringfügig im menschlichen Serum vorliegen (Andreas Loos et al., 2014; Azuma et al., 2007; Mader et al., 2013; Randall et al., 1992). Die korrekte Bildung von IgM Pentameren oder Hexameren gilt als Voraussetzung der Funktionalität von IgM Antikörpern (Andreas Loos et al., 2014).

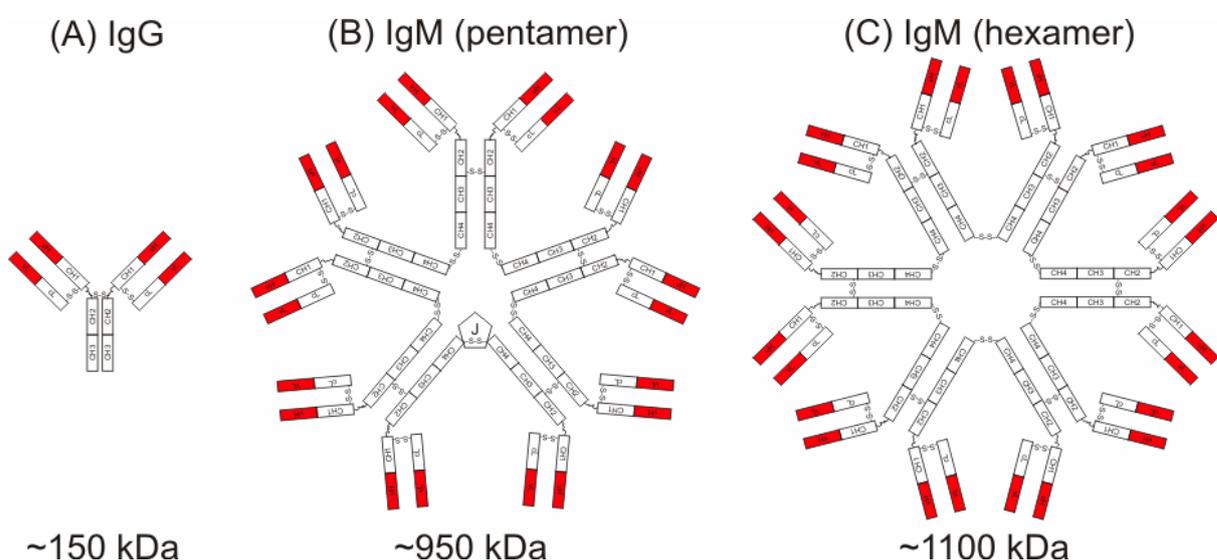


Abb. 3: Schematische Darstellung der Struktur von IgG Monomeren oder der von IgM Antikörpern gebildeten Oligomerstrukturen. **A** IgG und IgM Antikörper sind strukturell ähnlich aufgebaut. IgM weist im Gegensatz zu IgG eine vierte konstante Region auf. **B, C** Unter physiologischen Bedingungen oligomerisieren IgM Monomere zu IgM Pentameren (mit J-Kette) oder IgM Hexameren (ohne J-Kette). Modifiziert aus Mader et al., 2013.

1.2.3 Rekombinante Produktion

Heutzutage sind Säugerzellen die Systeme, welche in der Industrie am häufigsten zur Produktion rekombinanter Proteine genutzt werden (Frenzel, Hust & Schirrmann, 2013). 60 – 70 % aller rekombinanten Proteinmedikamente und 95 % aller zugelassenen Antikörper werden in diesen Systemen produziert (Frenzel et al., 2013). Die Vorteile dieser Systeme sind korrekte Proteinfaltungs- und Sekretionsmechanismen sowie die Bildung posttranslationaler Modifikation, vor allem humaner Glykosylierungsstrukturen. Die am weitesten verwendeten Säugerzellen in diesem Zusammenhang sind CHO-Zellen (*engl.* chinese hamster ovary) gefolgt von weiteren Zellen wie Per.C6 Zellen, NS0 Mausmyelom-Zellen, BHK-Zellen (*engl.* baby hamster kidney) oder HEK293-Zellen (*engl.* human embryonic kidney).

In der Vergangenheit wurden diese Systeme ebenfalls zur rekombinanten Produktion von IgM Antikörpern genutzt, jedoch scheint kein einzelnes System, weder in Forschung, noch in der Industrie, vorrangig verwendet zu werden. Einige Forscher verwendeten bereits CHO Zellen (Azuma et al., 2007; Chromikova, Mader, Steinfeldner & Kunert, 2015; Hennicke et al., 2017; Hennicke et al., 2020) oder HEK293 Zellen (Ammann, Jahnke, Dyson, Kaufman & Trowsdale, 2012; Chromikova et al., 2015; Hennicke et al., 2020) und konnten die Produktion intakter IgM Oligomere in diesen Systemen nachweisen (Andreas Loos et al., 2014; Azuma et al., 2007; Chromikova et al., 2015; Hennicke et al., 2020). Als weitere Säugerzellen zur Herstellung intakter IgM Pentamere wurden bereits auch PER.C6 Zellen genutzt (Tchoudakova et al., 2009). Die Herstellung intakter IgM Oligomere wurde ebenfalls schon für Pflanzenzellen berichtet (Andreas Loos et al., 2014). Neben der Produktion rekombinanter IgM Antikörper in Zelllinien, wurden darüber hinaus Hybridome oder immortalisierte B-Zellen genutzt (Bashokouh, Abbasiliasi & Tan, 2019; Gilmour, Pittman, Nesbitt & Scott, 2008; Mitsunaga et al., 2002; Tatzber et al., 2017).

1.2.4 Aufreinigungsmethoden

Anspruchsvoll ist einerseits die Expression intakter IgM Pentamere auf der anderen Seite ist die Aufreinigung dieser großen und strukturell empfindlichen Moleküle eine Herausforderung. In der Literatur wurden in der Vergangenheit vielfältige Methoden zur Aufreinigung von IgM Antikörpern vorgeschlagen. Jedoch gibt es auch hier keine einheitlich vorrangig verwendete Methode. Drei Parameter sind in Bezug auf eine Aufreinigung entscheidend: Die Fähigkeit der Methode IgM besonders rein in der finalen Probe zu erhalten (Reinheit), die Ausbeute sowie die Intaktheit des IgM Antikörpers bzw. die Intaktheit der IgM Antikörper Oligomere.

Die in der Vergangenheit vorgeschlagenen Aufreinigungsmethoden gliedern sich in Präzipitationstechniken oder Chromatographietechniken (Gautam & Loh, 2011). Eine Präzipitation von IgM kann durch Polyethylenglykol (PEG), Ammoniumsulfat oder durch Dialyse gegen demineralisiertes Wasser im Rahmen einer Euglobulinpräzipitation erfolgen.

Die Nachteile dieser Techniken sind Langsamkeit, geringe Reproduzierbarkeit, geringe Spezifität und Anfälligkeit gegenüber Proteinaggregation (Gautam & Loh, 2011). Bei den chromatographischen Techniken werden zumeist poröse Kügelchen zur nicht affinitätsbasierten oder affinitätsbasierten Aufreinigung verwendet. In erstem Fall stehen Methoden wie Ionenaustauschchromatographie (IEC *engl.* ion exchange chromatography), hydrophobe Interaktionschromatographie, Hydroxylapatit-Chromatographie, thiophile Adsorptionschromatographie oder Größenausschlusschromatographie (SEC *engl.* size exclusion chromatography) im Vordergrund (Luo, Zhang, Yao & Lin, 2018). Die verschiedenen Methoden nutzen zur Aufreinigung jeweils Unterschiede in Ladung, Hydrophobizität und Interaktionsfähigkeit mit Hydroxylapatit, dem thiophilen Adsorbent sowie Unterschiede in der Molekülgröße (Gautam & Loh, 2011; Luo et al., 2018). Affinitätsbasierte Chromatographie basiert dahingegen auf spezifischen Liganden von IgM. Beispiele für solche Moleküle sind Protamin, die humane sekretorische Komponente, mannose-spezifisches *Galanthus nivalis* Lektin oder Agglutinin (GNA), das Mannan-bindende Protein (MBP), Protein L oder der Komplementfaktor C1q (Gautam & Loh, 2011; Luo et al., 2018). Interessant waren bisher auch immunaffinitätschromatographische Ansätze, bei welchen IgM-bindende Antikörper oder IgM-bindende Antikörperfragmente zur Aufreinigung genutzt wurden.

Relativ jung sind die Ideen der Nutzung biomimetischer Liganden oder aber von mixed-mode-Chromatographietechniken (Bashokouh et al., 2019; Luo et al., 2018). Biomimetische Liganden sind synthetische Moleküle, welche die Erkennungsaktivität des nativen biologischen Makromoleküls nachahmen, jedoch letzteren gegenüber deutliche Vorteile aufweisen wie geringe Herstellungskosten, Einfachheit ihrer Herstellung, verbesserte Resistenz gegenüber chemischer oder biochemischer Degradation, Elution mittels milder Elutionsbedingungen oder geringere Toxizität oder Immunogenität (Gautam & Loh, 2011). Biomimetische Liganden können auch in Kombination mit Monolithen eingesetzt werden. Hierbei handelt es sich um spezielle Matrices, welche als einzelnes Stück in eine Säule gegossen werden und miteinander verbundene Durchflusssporen enthalten (Bashokouh et al., 2019). Die mixed-mode-Chromatographie ist eine Methode, in welcher die stationäre und die flüssige Phase über mehr als nur eine Interaktionsform miteinander wechselwirken z. B. über hydrophobe Interaktion zusammen mit elektrostatischer Wechselwirkung oder Wasserstoffbrückenbindungen (Luo et al., 2018).

Konkret wurden in der Literatur schon mehrere Methoden als erfolgreich in der Aufreinigung von IgM Pentameren und Hexameren beschrieben. Man findet Beschreibungen von nicht affinitätsbasierten Chromatographietechniken (Azuma et al., 2007; Gilmour et al., 2008; Tchoudakova et al., 2009), von mixed-mode-Chromatographietechniken (Luo et al., 2018) sowie von affinitätsbasierten Chromatographietechniken mittels Capture Select (Hennicke et al., 2017; Hennicke et al., 2020), Protein A (Andreas Loos et al., 2014) oder einem Sigma anti-

IgM Antikörper (Gilmour et al., 2008). Kommerziell angeboten werden u. a. HiTrap IgM Purification HP von GE Healthcare, das IgM Purification Kit von Pierce und LigaTrap Human IgM Purification Kit.

1.3 Herpes-simplex-Enzephalitis – Beispiel einer entzündlichen ZNS Erkrankung

1.3.1 Herpes-simplex-Enzephalitis

Die Herpes-simplex-Enzephalitis (HSE) ist eine akute Infektionskrankheit des ZNS als Folge einer HSV Infektion und die häufigste Ursache für sporadische tödliche virale Enzephalitis (Zuo, Tang, Chen & Huang, 2017). Insgesamt macht die HSE weltweit fast 20 % aller Fälle von Enzephalitis aus (Zuo et al., 2017). Die jährliche Inzidenz liegt bei 1 in 250 000 bis 500 000 und es gibt keine saisonalen oder geschlechtsabhängigen Variabilitäten in der Inzidenz von HSE Fällen (Tyler, 2004; Zuo et al., 2017). Die Mortalität beträgt mindestens 70 % in unbehandelten Patienten und ca. 30 % bei üblicherweise mit dem Medikament Aciclovir behandelten Individuen, wobei nur 2,5 % der überlebenden Patienten zu normaler neurologischer Funktion zurückkehrt (Whitley & Roizman, 2001; Zuo et al., 2017). Übliche schwere und permanente neurologische Folgekrankheiten sind Gedächtnisstörungen, Persönlichkeits- und Verhaltensabnormalitäten oder Krampfanfälle (Yamada, Kameyama, Nagaya, Hashizume & Yoshida, 2003; Zuo et al., 2017). Nahezu alle Fälle von HSE werden durch HSV-1 verursacht (James, Kimberlin & Whitley, 2009). HSE selbst tritt typischerweise in Frontal- und Temporallappen auf und verursacht dort hämorrhagische nekrotische Läsionen des Hirnparenchyms (Zuo et al., 2017). Zusätzlich hierzu kann HSE auch den Hirnstamm oder beide Hemisphären gleichzeitig befallen. Patienten mit HSE präsentieren sich mit unspezifischen ZNS Symptomen wie verändertem mentalem Status, Persönlichkeitsveränderungen, Krampfanfällen und fokalen neurologischen Funden (Chayavichitsilp, Buckwalter, Krakowski & Friedlander, 2009; Zuo et al., 2017). Auch generell typische Symptome einer Enzephalitis wie Fieber oder Kopfschmerzen können auftreten (Kennedy & Chaudhuri, 2002; Yamada et al., 2003). Komplikationen im weiteren Verlauf der HSE sind zumeist Atem- und Kreislaufinsuffizienz, sowie anhaltende Krampfanfälle und erhöhter intrakranieller Druck assoziiert mit Hirnödemen und Hernierung (Bradshaw & Venkatesan, 2016).

1.3.2 Aufbau und Struktur von HSV-1

HSV-1 und HSV-2 besitzen die allen Herpesviren innehaltende Virionmorphologie (Arvin, 2007). Das Virion ist sphärisch und beinhaltet 4 Komponenten: Den Kern, das Kapsid, das Tegument und die Virushülle. Der Durchmesser des Virion hängt von der viralen Spezies ab, ist jedoch ungefähr 200 nm. Der Kern besteht aus einem linearen, doppelsträngigen DNA

Molekül, welches dicht in ein ikosaedrisches Kapsid gepackt ist. Das Kapsid hat einen äußeren Durchmesser von 125 – 130 nm und besteht aus 162 Untereinheiten, den sogenannten Kapsomeren, davon 12 Pentone und 150 Hexone, welche je 5 oder 6 Kopien des Haupt-Kapsidproteins VP5 beinhalten (Adamson, McNab, Preston & Rixon, 2006). Die Kapsomere werden durch Triplexe zusammengehalten. Dies sind Heterotrimere, welche aus dem dimeren Protein VP23 und dem single-copy Protein VP19C bestehen (Adamson et al., 2006). Das sogenannte Tegument umgibt das Kapsid und ist strukturell kaum definiert. Im Tegument sind Strukturen, welche in ihrer Symmetrie der des Kapsids entsprechen, nur in der Region nahe zum Kapsid detektierbar. Mindestens 26 virus-kodierte Tegumentproteine werden in ein HSV-1 Virion rekrutiert (Guo, Shen, Wang & Deng, 2010), andere Quellen berichten von mindestens 20 oder 23 Proteinen, welche ins HSV-1 Tegument eingebaut sind (Kelly, J., Barbara, Fraefel, Cunningham & Diefenbach, 2009; Oda, Aii, Koyanagi, Kato & Kawaguchi, 2016). Die Lipidhülle umgibt das Äußere des Teguments und ist übersät mit mindestens elf viralen Glycoproteinen (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, gM).

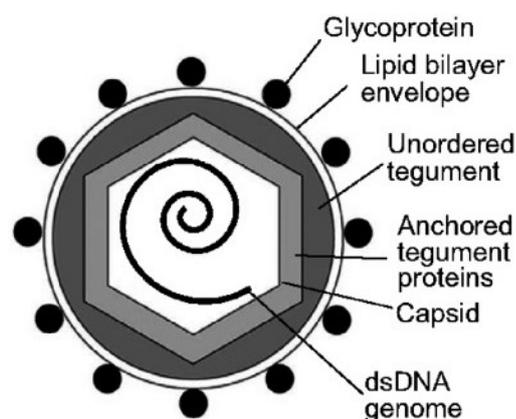


Abb. 4: Schematischer Aufbau des HSV Virions. Humane Herpesviren sind mehrschichtig aufgebaut. Sie enthalten eine doppelsträngige DNA, welche von einem Kapsid umgeben ist. Außerhalb des Kapsids liegt das Tegument, welches aus einem amorphen Layer aus Proteinen besteht. Diese Tegumentproteine sind teilweise auch im Kapsid verankert. Als äußere Hülle besitzt das Herpesvirus eine Envelope aus einem Lipidbilayer. In der Envelope finden sich auch die für die Anheftung des Virus und sein Eindringen in die Wirtszelle essenziellen Glykoproteine. Modifiziert aus Arvin, 2007.

1.4 Ziele der Arbeit

Oligoklonale IgG Banden liegen in > 90 % aller MS Patienten vor und oligoklonale IgM Banden, welche bei einem Teil der Patienten vorliegen, wurden in der Vergangenheit mit einem schlechteren Krankheitsverlauf assoziiert. Als vorrangige Antigen-spezifität oligoklonaler IgM Banden wurden in der Vergangenheit Lipide vorgeschlagen. Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren es:

1. Die Rolle des Antikörperisotyps (IgM vs. IgG) in Demyelinisierungsprozessen zu untersuchen. Hierzu sollten zwei demyelinisierende Antikörper genutzt werden, zum einen spezifisch für das Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (anti-MOG), zum anderen bindend an Sulfatid (anti-Sulfatid).

- a) Herstellung beider Antikörper jeweils mit IgG Isotyp oder mit IgM Isotyp.
- b) Aus der Herstellung rekombinanter IgM Antikörper ergab sich die technische Fragestellung nach der Identifikation einer geeigneten IgM Aufreinigungsmethode. Hierzu evaluierte ich fünf verschiedene IgM Aufreinigungsmethoden hinsichtlich ihrer Fähigkeit polyklonales oder monoklonales IgM aufzureinigen.
- c) Untersuchung der hergestellten anti-MOG oder anti-Sulfatid Antikörper in einem Modell der Demyelinisierung. Hierbei war auch die Frage nach der Antigen-spezifität Myelin-Protein vs. Myelin-Lipid interessant.

2. Die intrathekale humorale Immunantwort eines Patienten mit entzündlicher ZNS Erkrankung und nachgewiesener intrathekaler IgM Synthese rekombinant nachzubilden. Ich wollte wissen, ob sich der verschlechterte Krankheitsverlauf bei MS Patienten mit intrathekaler IgM Synthese auf einzelne Antikörper zurückführen lässt.

2 Material und Methode

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Tab. 1: Übersicht Laborgeräte

Gerät	Hersteller
ÄKTA Protein Aufreinigungssystem	GE Healthcare, Chicago, IL, USA
ÄKTA start Protein Aufreinigungssystem	GE Healthcare, Chicago, IL, USA
Autoklav Systec V-150	Systec, Linden, Deutschland
Bacterial Inkubator	Edmund Bühler, Bodelshausen, Deutschland
Cell Sorter MoFloXDP	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
CO2 Inkubator BBD 6220	Heraeus, Hanau, Deutschland
CO2 Inkubator Hepa Class 100	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
CO2 Inkubator Heracell 150i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Dark Reader Transilluminator	Clare Chemical Research, Dolores, CO, USA
Eismaschine AF100	Scotsman, Milan, Italien
Electronischer Rührer Variomag	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Feinwaage	VWR, Radnor, PA, USA
Fluoreszenzmikroskop Wilovert S	Helmut Hund, Wetzlar, Deutschland
Flüssigstickstofftank	tec-lab, Taunusstein, Deutschland
Gefrierschrank (-80°C)	Sanyo, Moriguchi, Osaka Prefecture, Japan
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gefrierschranks (-20°C)	Liebherr, Bulle, Schweiz
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Heizblock Thriller	VWR, Radnor, PA, USA
Kühlschrank (4°C)	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kühlschrank (4°C)	Novamatic, Gumpoldskirchen, Österreich
Lichtmikroskop Leica DMIL	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mastercycler	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Microplate reader GENios Pro	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Mikrowelle	Eurotech Riga International, Lana, Italien
Nanodrop 2000 Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
PCR Thermocycler T1	Biometra, Göttingen, Deutschland
PCR Thermocycler TGradient	Biometra, Göttingen, Deutschland
pH-Meter HI221	HANNA instruments, Woonsocket, RI, USA
Pipetten	Gilson, Middleton, WI, USA
Pipetten	Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetus	BRAND, Wertheim, Deutschland
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Deutschland

Platformschüttler STR6	Bibby Scientific, Staffordshire, UK
Platformschüttler WT12	Biometra, Göttingen, Deutschland
Protein gel Bildaufzeichnungssystem	Odyssey, LI-COR, Lincoln, NE, USA
Protein Gel Electrophoresis Chamber Xcell SureLock Mini-Cell	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Protein Gelelektrophorese Kammer Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Schüttler HulaMixer	Liebherr, Bulle, Schweiz
Trockenofen Function line	Heraeus, Hanau, Deutschland
UV-cleaner box UVC/T-M-AR	Biosan, Riga, Lettland
Vacuumpumpe Laboport	KNF, Sursee, Schweiz
Vacuumpumpe Vacusafe	INTEGRA Biosciences, Biebertal, Deutschland
Versorgungseinheit 25T	Biometra, Göttingen, Deutschland
Versorgungseinheit edq 100	Leistungselektronik JENA, Jena, Deutschland
Versorgungseinheit EPS 601	Amersham, Little Chalfont, UK
Versorgungseinheit P25	Biometra, Göttingen, Deutschland
Vortex mixer	VWR, Radnor, PA, USA
Vortex mixer GENIE2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zellkultur Sterilbank	SKAN, Allschwill, Schweiz
Zellkultur Sterilbank Hera Safe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zentrifuge 4K15	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Galaxy MiniStar silverline	VWR, Radnor, PA, USA
Zentrifuge Megafuge 1.OR	Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA
Zentrifuge Minispin	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.2 Software

Tab. 2: Übersicht Software

Software	Hersteller
ExpASy Translate Tool	SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Lausanne, Schweiz
Finch VT 1.4.0	Geospiza Inc., Seattle, WA, USA
GIMP 2.10.14	The GIMP Team
IMGT/V-QUEST	IMGT, the international ImMunoGeneTics information system, Montpellier, Frankreich
Li-Cor Image Studio Software 5.2.5	Li-Cor Biotechnology, Lincoln, NE, USA
MAFFT 7	Kazutaka Katoh 2013
NEBcutter V2.0	New England Biolabs, Evry, Frankreich
Office 2016	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA

SnapGeneViewer 3.2.1	GSL Biotech LLC, Chicago, IL, USA
Summit	Beckman Coulter, Brea, CA, USA

2.1.3 Chemikalien

Tab. 3: Übersicht Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Adipinsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Agarose	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Albumin Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumsulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Anti-Human IgM-Agarose	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bis-Tris	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Coomassie Brilliant Blue G-250	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Destilliertes Wasser	Otto Fischar, Saarbrücken, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DNase/Rnase-freies Wasser	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
dNTP mix PCR Grad	Qiagen, Hilden, Deutschland
Dulbecco's PBS (1x), ohne Calcium, ohne Magnesium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Eisessig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (absolute für Analysen)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
GelCode Blue Färbereagenz	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
GelPilot DNA Loading Dye 5x	Qiagen, Hilden, Deutschland
GeneRuler DNA ladder Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
GlutaMAX	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Glycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Glyzerin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Guanidinhydrochlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
HiTrap IgM Purification HP	GE Healthcare, Chicago, IL, USA
HiTrap Protein G HP	GE Healthcare, Chicago, IL, USA
IgM from human serum	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Immune Globuline Intravenous	CSL Behring, King of Prussia, PA, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
L-Arginin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
LB agar	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
LB broth base	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Magnesiumchlorid	Honeywell, Charlotte, NC, USA
Methanol	VWR, Radnor, PA, USA
Mini-Protean TGX Precast Gels	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Molecular Bioproducts RNase AWAY	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
NativeMark Unstained Protein Standard	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
NativePAGE 3-12% Bis-Tris Protein Gels	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Natriumammoniumhydrogenphosphat-Tetrahydrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumdihydrogenphosphat	Honeywell, Charlotte, NC, USA
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid 19.1N	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumthiocyanat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Nonidet P40	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
NuPAGE Sample Reducing Agent 10x	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Nutridoma-SP	Roche, Basel, Schweiz
Opti-MEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
pH-Meter Kalibrierungspuffer	Honeywell, Charlotte, NC, USA
Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Polyethylenimin (PEI)	Polysciences, Warrington, PA, USA
Poly-L-lysine Hydrobromid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ponceau S	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
POROS Capture Select IgM Affinity Matrix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Protein loading dye 4x	Li-cor Biosciences, Lincoln, NE, USA
Recovery Cell Culture Freezing Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RNase inhibitor	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
RNaseOUT Recombinant Ribonucle-ase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RPMI-1640	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
S.O.C. Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Salzsäure 32 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
SYBR Safe Stain	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TG-SDS 10x Konzentrat	VWR, Radnor, PA, USA
Tricin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris Hydrochlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris pufferan	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA (0,25%), Phenolrot	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
UltraPure TBE Puffer, 10X	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.1.4 Verbrauchsmaterial

Tab. 4: Übersicht Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
96-Well Platte MicroAmp Optical plate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Aluminiumfolie	VWR, Radnor, PA, USA
Aluminiumfolienstreifen zum Verschließen von 96-Well Platten	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Amicon® Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheiten 15 und 30K	Millipore, Billerica, MA, USA

Bakterienröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Angeschrägte Spitzen mit Filtern (1000 µL, 200 µL, 10 µL)	Starlab, Milton Keynes, UK
Zellzählkammern für den Zellzähler	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Zellkulturflaschen 75 cm ² , 175 cm ²	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellsieb (40µm, 70 µm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Costar Stripette serologische Pipetten	Merck, Darmstadt, Deutschland
Cryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Einmallaborkittel	3M, St.Paul, MN, USA
Abfallbeutel	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Leersäulen für die Proteinisolation	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Filtropur Vacuum Filtrationseinheiten 0.2 µm (250 mL, 500 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
HiTrap IgM Säule	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
HiTrap Protein G Säule	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Injektionsnadel	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Kimtech Tücher precision wipes	Kimberley-Clark Professional, Koblenz-Rheinhafen, Deutschland
Küchenrolle	Metsä Tissue, Kreuzau, Deutschland
Low Protein Binding Mikrozentrifugenröhrchen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Medizinische Einmalhandschuhe	VWR, Radnor, PA, USA
Überschuhe	Roeser Medical, Essen, Deutschland
Papiertücher wepa prestige	WEPA Professional, Arnsberg, Deutschland
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Akron, OH, USA
PCR-Röhrchen (0.2ml)	VWR, Radnor, PA, USA
Petrischalen unbeschichtet (Ø 150 mm)	Corning, Corning, NY, USA
Petrischalen unbeschichtet (Ø 30 mm, 100 mm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
pH Papier	Merck, Darmstadt, Deutschland
Slide-A-Lyzer™ Dialyse-Kassetten	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Mund-Nasen-Maske	3M, St.Paul, MN, USA
Spritzenfilter (0.2µm, 0.4µm)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spritzen (5 mL, 10 mL, 20 mL, 50 mL)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
TipOne Pipettenspitzen (1000 µL, 200 µL, 10 µL)	Starlab, Milton Keynes, UK
Röhrchen (2 mL, 1.5 mL, 0.5 mL)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Röhrchen (15 mL, 50mL)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Röhrchen (15 mL, 50mL)	Corning, Corning, NY, USA
Wägeschalen	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Wägepapier	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Mikrotiterplatten (6, 24, 96 Wells)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

2.1.5 Prokaryotische und eukaryotische Zellen

Tab. 5: Übersicht Prokaryotische Zellen

Prokaryotische Zellen	Hersteller
stellar competent cells	Takara Bio, Kusatsu, Japan

Tab. 6: Übersicht Eukaryotische Zellen

Eukaryotische Zellen	Hersteller
FreeStyle™ 293-F-Cells (HEK-FS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.1.6 Reaktions-Kits

Tab. 7: Übersicht Kits

Kit	Hersteller
BC Assay Protein Quantification Kit	Interchim, Montlucon, Frankreich
IgG ELISA kit	Molecular Innovations, Novi, MI, USA
IgM ELISA kit	Molecular Innovations, Novi, MI, USA
In-Fusion HD Cloning Kit	Takara Bio, Kusatsu, Japan
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
PureLink HiPure Plasmid Filter Maxiprep	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Systems	Promega, Madison, WI, USA
Zymoclean Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research, Irvine, CA, USA

2.1.7 Antikörper

Tab. 8: Übersicht Antikörper

Antigen	Klon	Konjugation	Reaktivität	Spezies	Hersteller	Verdünnung
CD138	B-A38	PE	human	Maus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	1:10
IgG (H+L)	polyklonal	Alexa 647	human	Esel	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA	1:500

2.1.8 Primer

Primer wurden bei der Firma Eurofins genomics (Louisville, KY, USA) als unmodifizierte DNA oligos erworben. Die folgenden Primer wurden in der Einzelzell-RT-PCR verwendet.

Tab. 9: Primer für die Einzelzell-RT-PCR. Primer der ersten PCR-Runde

Primer der ersten PCR-Runde		
IgG-/IgM-Schwerkette Vorwärtsprimer	VH17-F	CAGGTGCAGCTGGTGAR
	VH2-F	CAGATCACCTTGAAGGAG
	VH35-F	GAGGTGCAGCTGGTGSAG

	VH3a-F	GAGGTGCAGCTGKTGGAG
	VH4-F	CAGGTGCAGCTGCAGGAG
	VH4a-F	CAGGTGCAGCTACAGCAG
	VH6-F	CAGGTACAGCTGCAGCAG
IgG-Schwerkette Rückwärtsprimer	CHG1Owens	GTTGTCCACCTTGGTGTGCTGG
IgM-Schwerkette Rückwärtsprimer	C meu CH1	GGGAATTCTCACAGGAGACGA
IgK Leichtkette Vorwärtsprimer	VK1-F	GACATCCRGDTGACCCAGTCTCC
	VK36-F	GAAATTGTRWTGACRCAGTCTCC
	VK2346-F	GATATTGTGMTGACBCAGWCTCC
	VK5-F	GAAACGACACTCACGCAGTCTCC
IgK Leichtkette Rückwärtsprimer	Ck1-Owens	ACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTT
IgL Leichtkette Vorwärtsprimer	VL1-F	GAGTCTGTSBTGACGCAGCCGCC
	VL3a-F	TCCTATGWGCTGACWCAGCCAC
	VL38-F	TCCTATGAGCTGAYRCAGCYACC
	VL1459-F	CAGCCTGTGCTGACTCARYC
	VL78-F	CAGDCTGTGGTGACYCAGGAGCC
	VL15910-F	CAGCCWKGCTGACTCAGCCMCC
	VL3B-F	TCCTCTGAGCTGASTCAGGASCC
	VL2-F	CAGTCTGCCCTGAYTCAGCCT
	VL6-F	AATTTTATGCTGACTCAGCCC
IgL Leichtkette Rückwärtsprimer	CL1-Owens	TGAACATTCTGTAGGGGCCAC

Tab. 10: Primer für die Einzelzell-RT-PCR Primer der zweiten PCR-Runde

Primer der zweiten PCR-Runde		
IgG-/IgM- Schwerkette Vorwärtsprimer	P_VH17_FWD	CCACAGGCGCGCACTCC CAGGTGCAGCTGGTGCAR
	P_VH2_FWD	CCACAGGCGCGCACTCC CAGATCACCTTGAAGGA
	P_VH35_FWD	CCACAGGCGCGCACTCC GAGGTGCAGCTGKTGSAG
	P_VH4_FWD	CCACAGGCGCGCACTCC CAGGTGCAGCTRCAGSA
	P_VH6_FWD	CCACAGGCGCGCACTCC CAGGTACAGCTGCAGCA
IgG-Schwerkette Rückwärtsprimer	P_JH1245_REV	GGGCCCTTGGTGCTAGCT TGAGGAGACGGTGACCAG
	P_JH3_REV	GGGCCCTTGGTGCTAGCT TGAAGAGACGGTGACCAT TG

	P_JH6_REV	GGGCCCTTGGTGCTAGCT TGAGGAGACGGTGACCG
IgM-Schwerkette Rückwärtsprimer	P_JH1245_IgM_R EV	GGAGCGGATGCAGATCC TGAGGAGACGGTGACCAG
	P_JH3_IgM_REV	GGAGCGGATGCAGATCC TGAAGAGACGGTGACCAT TG
	P_JH6_IgM_REV	GGAGCGGATGCAGATCC TGAGGAGACGGTGACCG
IgK Leichtkette Vorwärtsprimer	P_VK1_FWD	GTTCCAGCTAGCCGCGGT GACATCCRGDTGACCCA
	P_VK36_FWD	GTTCCAGCTAGCCGCGGT GAAATTGTRWTGACRCA G
	P_VK2346_FWD	GTTCCAGCTAGCCGCGGT GATATTGTGMTGACBCA G
	P_VK5_FWD	GTTCCAGCTAGCCGCGGT GAAACGACACTCACGCA G
IgK Leichtkette Rückwärtsprimer	P_JK124_REV	GGCGCCGCCACCGTACG TTTGATYTCCACCTTGG
	P_JK2_REV	GGCGCCGCCACCGTACG TTTGATCTCCAGCTTGG
	P_JK3_REV	GGCGCCGCCACCGTACG TTTGATATCCACTTTGG
	P_JK5_REV	GGCGCCGCCACCGTACG TTTAATCTCCAGTCGTG
IgL Leichtkette Vorwärtsprimer	P_VL1_FWD	GATCCGGAGTCGACTCT CAGTCTGTGCTGACKC
	P_VL2_FWD	GATCCGGAGTCGACTCT CAGTCTGCCCTGACTC
	P_VL3_FWD	GATCCGGAGTCGACTCT TCCTATGAGCTGACWCA
	P_VL45_FWD	GATCCGGAGTCGACTCT CAGCYTGTGCTGACTCA
	P_VL6_FWD	GATCCGGAGTCGACTCT AATTTTATGCTGACTC
	P_VL78_FWD	GATCCGGAGTCGACTCT CAGRCTGTGGTGACYCA
IgL Leichtkette Rückwärtsprimer	P_JL1_REV	GCCGCCTTGGGCTGACCT TAGgacggtgaccttg
	P_JL23_REV	GCCGCCTTGGGCTGACCT TAGgacggtcagcttg
	P_JL4_REV	GCCGCCTTGGGCTGACCT TAAaatgatcagctggg
	P_JL5_REV	GCCGCCTTGGGCTGACCT TAGgacggtcagctcSg
	P_JL6_REV	GCCGCCTTGGGCTGACCT GAGgacggtcaccttg
	P_JL7_REV	GCCGCCTTGGGCTGACCT GAGgRcggtcagctggg

Die folgenden Primer wurden zur Klonierung Antikörperfragment kodierender DNA verwendet.

Tab. 11: Primer zur Klonierung Antikörperfragment kodierender DNA

Klonierung von IgM in Standardexpressionsvektor	
Linearisierung Expressionsvektor	TGAGGAGACTGTGAGAGTGG
	TGTACAGCTAGCTGGCCAGA

Amplifizierung IgM	ACTCTCACAGTCTCCTCAGG ATCTGCATCCGCTCCA
	TGGCCAGCTAGCTGTACA TCAGTAGCAAGTGCCAGC
Sequenzierung	TTTTGAGCGGAGCTAATTCTCGGG
	AAAAAACCTCCCACACCTCC
Klonierung von O4 in Standardexpressionsvektoren mit IgG1- oder IgM-Schwerkettenisotyp	
Linearisierung Expressions-vektoren	GCTAGCACCAAGGGCCCATC
	GGAGTGCGCGCCTGTGGCGG
	GGATCTGCATCCGCTCCAAC
	CGTACGGTGGCGGCGCCATC
	ACCGCGGCTAGCTGGAA
Amplifizierung O4	GCCACAGGCGCGCACTCC AGGTGCAGCTGAGGCAG
	TGGGCCCTTGGTGCTAGC TGAGGAGACGGTGACTGA
	TGGAGCGGATGCAGATCC TGAGGAGACGGTGACTGA
	GTTCCAGCTAGCCGCGGTA ACATTGTAATGACCCAA
	TGGCGCCGCCACCGTACG TTTTATTTCAGCTTGGT
Sequenzierung	TTTTGAGCGGAGCTAATTCTCGGG
	AAAAAACCTCCCACACCTCC
	GAGGCTAATTCTCAAGCCTC
	TCTAGACCTGGAAAGACCAG
Klonierung der J-Kette in Standardexpressionsvektor mit IgM-Schwerkettenisotyp	
Linearisierung Expressionsvektor	TGTACAGCTAGCTGGCCAGA
	TCAGTAGCAAGTGCCAGCCG
Amplifizierung der J-Kette	GCTGGCACTTGCTACTGAGG ATCCCGTACGCCTAGG
	aagcaaatggttcttcat ACAGTCAGTGTATTCCATA
Sequenzierung	ACAGAGAGAACAGTGGATAA
	ACTGCATTCTAGTTGTGGTT

2.2 Methode

2.2.1 Kryokonservierung von Patientenliquor und Liquorzellen

Der Liquor wurde durch Lumbalpunktion des Patienten gewonnen und so bald wie möglich nach der Liquorentnahme konserviert. Der Liquor wurde kurz gevortext und aus dem Liquorentnahmeröhrchen in ein 15 ml Falcontube pipettiert. Das 15 ml Tube wurde 30 min lang bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen pipettiert. Das Zellpellet wurde in 500 µl Gefriermedium resuspendiert und in ein weiteres Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden für die Lagerung in Flüssigstickstoff etikettiert und bei - 80 °C eingefroren. Nach 2 Tagen wurden die Röhrchen mit Liquorzellen in den Flüssigstickstofftank überführt. Informationen über den Patienten und die verarbeiteten Proben wurden für den späteren Zugriff dokumentiert.

2.2.2 Färbung von CD138⁺ Liquorzellen für die FACS-Analyse

Bevor kryokonservierte Patientenliquorzellen aufgetaut wurden, wurde das FACS-Medium vorbereitet und auf 37 °C vorgewärmt. FACS-Puffer wurde ebenfalls hergestellt und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Das die Liquorzellen enthaltende Kryoröhrchen wurde für 8 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Röhrchen pipettiert und das Kryoröhrchen mit 1 ml FACS-Medium gewaschen, welche dann in dasselbe 15 ml Röhrchen überführt wurde. Die Zellsuspension wurde für 5 min, 300 g, bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde in ein 1,5 ml Röhrchen überführt und 10 µl FACS Antikörper sowie 5 µl DAPI hinzugefügt. Das Röhrchen wurde für 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Während dieser Inkubation wurden 96-Well-Platten für die spätere Sammlung der sortierten Einzelzellen vorbereitet. Es wurde Zellysepuffer hergestellt, und 10 µl Puffer wurden in die Vertiefungen jeder zweiten Reihe einer 96-Well-Platte pipettiert. Die Platten wurden mit klebender Aluminiumfolie verschlossen und bis zur Zellsortierung auf Eis gelagert. Nach der Inkubation der Liquorzellen mit dem FACS Antikörper und DAPI, wurden 800 µl FACS-Puffer in das Röhrchen gegeben. Die Zentrifugation wurde für 8 min bei 300 x g und 4 °C durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert. Größere Zellaggregate wurden durch Filtration der Lösung durch 100 µm Filter entfernt. Die Zellen wurden bis zur FACS-Sortierung auf Eis gelagert.

Tab. 12: Pipettierschema für FACS-Medium

1x	
500 ml	RPMI
50 ml	FBS
5 ml	Penicillin-Streptomycin (5.000 U/ml)

Tab. 13: Pipettierschema für FACS-Puffer

1x	
98 ml	PBS
2 ml	FBS

Tab. 14: Pipettierschema für Zellysepuffer

1x	
0.1 µl	RNAse OUT RRI (40 U/µl)
0.5 µl	NP40 1%
9.4 µl	Nuclease-freies Wasser
10 µl	

2.2.3 Sortierung einzelner CD138⁺ Liquorzellen über FACS

Die Sortierung gefärbter Zellen wurde in der FACS-Einrichtung des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführt. Ein Aliquot gefärbter PBMCs wurde verwendet, um Gates für die Zellsortierung zu setzen. Ein MoFloXDP-Zellsorter (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) wurde zusammen mit der Summit-Software desselben Unternehmens eingesetzt. Die Höhe der Seitwärtsstreuung (SSC-Height) wurde gegen die Höhe der Vorwärtsstreuung (FSC-Height) aufgetragen, um ein erstes Gate für lebende Lymphozyten zu setzen. Zell-Dubletten wurden durch Gating von Einzelzellen ausgeschlossen, wobei die Breite der Seitwärtsstreuung (SSC-Width) gegen die Höhe der Seitwärtsstreuung (SSC-Height) aufgetragen wurde. Ein weiteres Gate für lebende Zellen wurde für, DAPI-negative Zellen in einem Plot gesetzt, in dem die Fluoreszenzintensität von DAPI gegen die Fluoreszenzintensität FITC aufgetragen wurde. FITC war in diesem Fall nicht für die Färbung verwendet worden, sondern wurde als Dimension für das Plotten verwendet. In dem Plot, in dem die Fluoreszenzintensität von PE gegen die Fluoreszenzintensität von FITC aufgetragen wurde, wurden CD138⁺ Zellen durch ein letztes Gate auf PE-positiven Zellen erhalten. Ein Zurückgaten der sortierten Zellen auf den anfänglichen Plot (SSC-Height gegen FSC-Height) wurde als Kontrolle verwendet.

Nach der Einrichtung des Anschnittschemas wurde die Sortierung einzelner CD138⁺ Patientenplasmablasten in 96-Well-Platten durchgeführt. Hierbei wurden alle Wells, welche Zellysepuffer enthielten, mit Einzelzellen bestückt. Als Kontrolle für die spätere RT-PCR

wurden ausgewählte Wells mit zehn CD138⁺ Plasmablasten bestückt. Unmittelbar nach dem Sortieren in eine 96-Well-Platte wurde die Platte für 1 min bei 500 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Platte wurde mit Aluminiumfolie versiegelt und sofort auf Trockeneis eingefroren. Nachdem die Sortierung abgeschlossen war, wurden die 96-Well-Platten bei - 80 °C gelagert bis die Zellen in der Einzelzell-RT-PCR verarbeitet wurden.

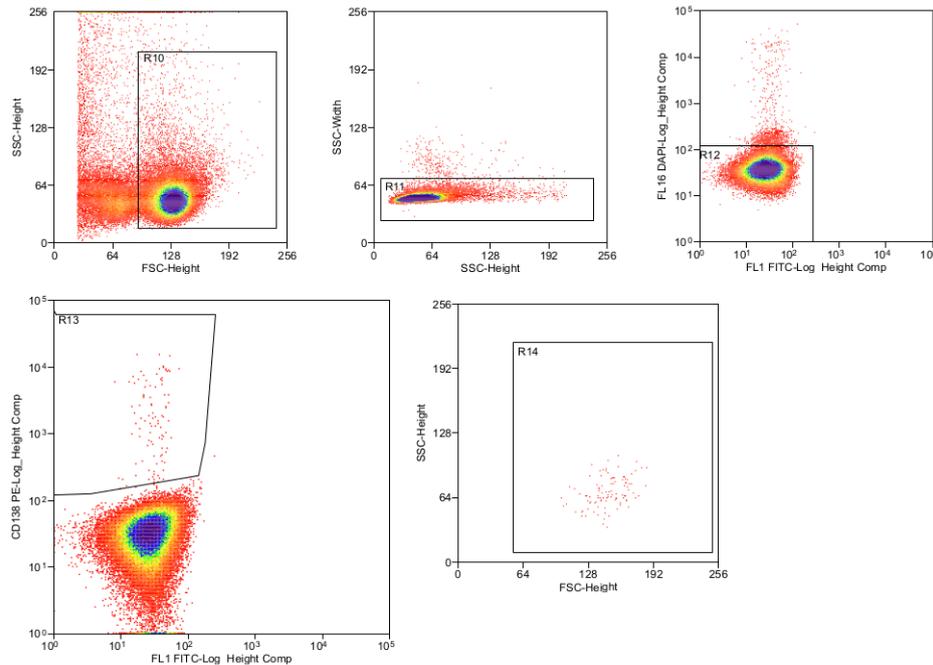


Abb. 5: Übersicht über das zur Zellsortierung genutzte Gatingschema. Es wurden 4 Gates gesetzt zur Sortierung von großen Zellen, Einzelzellen, lebenden Zellen und PE-gefärbten Zellen. Als Kontrolle der Sortierung fand ein Zurückgaten der sortierten Zellen auf den anfänglichen Plot statt.

2.2.4 Vorbereitung von Polymerase-Kettenreaktionen (PCRs)

Alle PCRs wurden unter besonders reinen Bedingungen durchgeführt. Die Reaktionen wurden in einer UV-Bank in einem separaten PCR-Raum vorbereitet. Der Pipetteur trug einen Einweg-Laborkittel, einen Einweg-Haarnetz und eine Einweg-Gesichtsmaske. Vor jeder PCR wurde die UV-Bank, einschließlich Arbeitsmaterial mit RNase away und 70 % Ethanol gereinigt. Das Innere der UV-Bank sowie das darin enthaltene Arbeitsmaterial wurden 30 min lang mit UV-Strahlung bestrahlt, bevor die PCR-Reaktionen pipettiert wurde.

2.2.5 Einzelzell Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Einzelzell-RT-PCRs wurden nach dem Pipettierschema in Tab. 15 vorbereitet. Die zelluläre mRNA in jedem Well wurde für vier verschiedene RT-PCR-Reaktionen aufgeteilt. Zwei RT-PCRs zielten darauf ab die variablen Domänen der Antikörperschwerketten IgG oder IgM zu amplifizieren und zwei weitere RT-PCRs darauf, die variablen Domänen der Antikörperleichtketten κ bzw. λ zu amplifizieren. Für jede RT-PCR-Reaktion wurde ein

spezifischer Reverse-Primer verwendet, der an die konstante Antikörperregion band. Dieser Primer diente auch zur reversen Transkription von mRNA in cDNA. Um die Amplifikation möglichst vieler variabler Antikörperregionen zu gewährleisten, wurde ein Vorwärtsprimer-Mix verwendet. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tab. 9 aufgeführt.

Generell wurden RT-PCR-Master-Mixe für die vier verschiedenen RT-PCR-Reaktionen hergestellt, wobei nur die zelluläre mRNA später hinzugegeben wurde. 5 µl des RT-PCR-Mastermix wurden in einzelne 0,2 ml Reaktionsgefäße pipettiert. Die Röhren wurden auf Eis gelagert, bis dieses Verfahren für alle vier Master-Mixe abgeschlossen war. Gewöhnlich wurden 10 – 20 Einzelzellen in einem Experiment verwendet. 10 µl kaltes Nuklease-freies Wasser wurden zu jeder Zelle pipettiert. Die Zellsuspension wurde durch Pipettieren mit einer Mehrkanalpipette gemischt und 5 µl wurden in die Röhren mit dem IgG-Mastermix, dem IgM-Mastermix, dem κ-Mastermix und dem λ-Mastermix überführt. Die Reaktionen wurden durch Pipettieren durchmischt, nachdem die zelluläre mRNA in den Mastermix pipettiert worden war. Die Röhren wurden kurz zentrifugiert und auf Eis gelagert. Die RT-PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler gemäß dem PCR-Programm in Tab. 16 durchgeführt. Nach der RT-PCR wurden die Reaktionen bis zur Vorbereitung für die Agarose-Gelelektrophorese bei 4 °C gelagert.

Tab. 15: Pipettierschema für Einzelzell-RT-PCRs

1x	Reagenz
0.1 µl	QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix
2 µl	QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer, 5 x
0.25 µl	dNTP Mix, 10mM je dNTP
0.1 µl	Vorwärtsprimer (10 µM)
0.1 µl	Rückwärtsprimer (10 µM)
0.1 µl	RNAse out RRI (40 U/µl)
5 µl	Einzelzelle in Zellysepuffer und Nuklease-freiem Wasser
2.35 µl	Nuclease-freies Wasser
10 µl	

Tab. 16: PCR-Programm für Einzelzell-RT-PCRs

50 °C	1 h	
95 °C	15 min	
94 °C	50 s	45 x
61 °C	55 s	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	
4 °C	Bis zur Beendigung	

2.2.6 PCR Klonierung

Die Subklonierung von Antikörperfragment kodierender DNA wurde mittels PCR-Klonierung durchgeführt. Der Zielvektor wurde mittels PCR amplifiziert und seine zirkuläre Struktur gleichzeitig geöffnet. Die für diese PCR verwendeten Primer waren Vektor-spezifisch und öffneten den Vektor an der Stelle der Insert-Integration. Bestimmte Vektorregionen konnten durch geeignetes Primerdesign von der Amplifizierung ausgeschlossen werden. Der Zielvektor konnte auch an mehreren Stellen geöffnet werden, wodurch die Integration mehrerer Inserts ermöglicht wurde. Die zu klonierenden Inserts wurden durch PCR amplifiziert und durch die genutzten Primer mit Vektor-spezifischen 5'-DNA-Überhängen versehen. Das 3'-Ende dieser Primer war hierbei spezifisch für das zu klonierende Insert. PCR-Amplikons konnten in einer enzymatisch vermittelten Fusions-Reaktion mit dem Vektor verbunden werden.

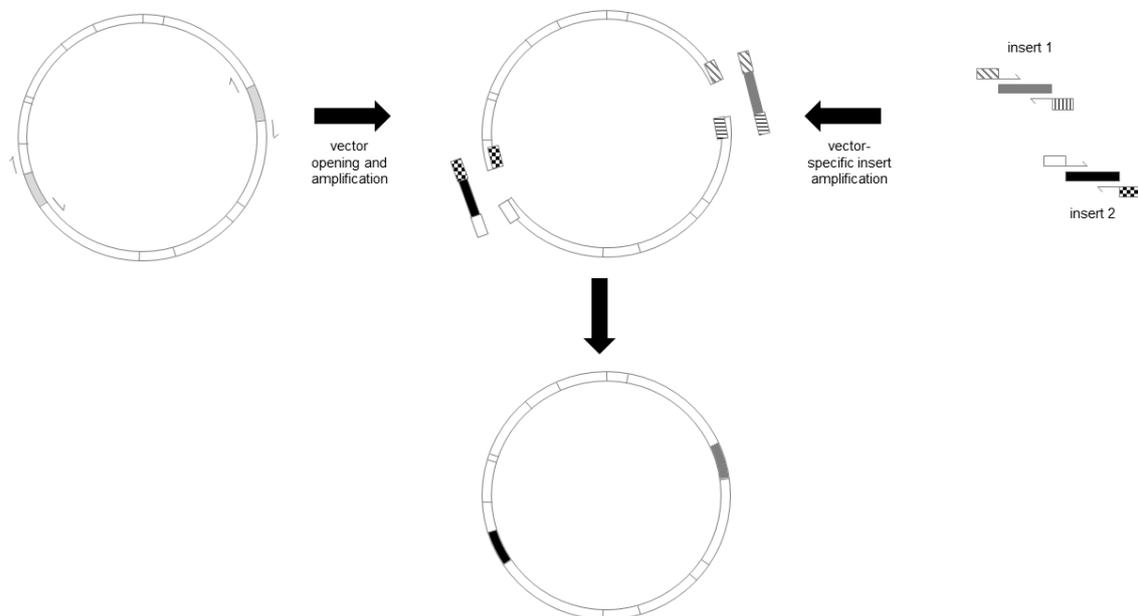


Abb. 6: Funktionsprinzip der PCR-Klonierung. Der über PCR linearisierte Zielvektor wird mit PCR-amplifizierten Inserts fusioniert. Die Fusion basiert auf homologen Regionen von Vektor und Inserts.

Typischerweise wurden PCR-Reaktionen zur Vektorlinearisierung wie in Tab. 17 dargestellt pipettiert und die PCR entsprechend dem in Tab. 19 sichtbaren PCR-Programm durchgeführt. PCR-Reaktionen zur Insert-Amplifikation wurden in gleicher Weise pipettiert und die PCR durchgeführt wie in Tab. 19 zu sehen. PCR-Amplikons wurden mittels Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht und Banden der richtigen Größe wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und aufgereinigt. Die Inserts wurden mit linearisierten Vektorfragmenten durch die auf Rekombination basierende „In-Fusion“-Klonierungsmethode verbunden und chemisch kompetente *E. coli* mit den resultierenden DNA-Konstrukten transformiert. Einzelne Bakterienkolonien wurden mittels Kolonie-PCR auf das Vorhandensein des gewünschten Vektorkonstrukts untersucht. PCR-Primer banden Vektor-spezifisch und

amplifizierten die Insert-Integrationsstelle. Die Kolonien wurden von der Agarplatte in 10 µl LB-Brühe gepickt. 2 µl aus dieser Suspension wurden für die Kolonie-PCR verwendet, der Rest wurde zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C gelagert. Ein Pipettierschema der Kolonie-PCRs ist in Tab. 18 zu sehen. Die PCRs wurden nach dem in Tab. 19 dargestellten Programm durchgeführt. Die Größe jedes PCR-Amplikons wurde durch Agarose-Gelelektrophorese sichtbar gemacht und zeigte, welche *E. coli* Kolonien einen Vektor mit Insert trugen. Typischerweise wurden die PCR-Amplikons aus dem Gel aufgereinigt und durch Sequenzierung analysiert. *E. coli* Klone, die intakte Vektor-Insert-Konstrukte enthielten, wurden in LB-Medium kultiviert und als Glycerolstock kryokonserviert.

Tab. 17: Pipettierschema für Klonierungs-PCRs. Nach diesem Schema wurden PCRs zur Linearisierung des Zielvektors bzw. PCRs zur Insertamplifikation pipettiert.

1 x	
10 µl	Phusion Flash HF PCR Master Mix (2 x)
1 µl	Vorwärtsprimer
1 µl	Rückwärtsprimer
10 - 15 ng	vector DNA / insert DNA
ad. 20 µl	Nuclease-freies Wasser
20 µl	

Tab. 18: Pipettierschema für Kolonie-PCRs

1 x	
10 µl	Phusion Flash HF PCR Master Mix (2 x)
1 µl	Vorwärtsprimer
1 µl	Rückwärtsprimer
2 µl	Bakterienkolonie in 10 µl LB-Medium
6 µl	Nuclease-freies Wasser
20 µl	

Tab. 19: PCR-Programm für Klonierungs-PCRs

98 °C	30 s	
98 °C	15 s	
X °C	30 s	35 x
72 °C	y s	
72 °C	5 min	
4 °C	Bis zur Beendigung	

x = Annealing-Temperatur spezifisch für das genutzte Primerpaar
 y = Elongationszeit; 6.1 sek / 100 bp für PCR Produkte < 3.500 bp; 2.5 sec / 100 bp für PCR Produkte > 3.500 bp

2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Üblicherweise wurden 1,5 % Agarosegele für DNA-Fragmente verwendet, die kleiner als 3.500 bp waren, und 0,8 - 1 % Agarosegele wurden für Fragmente, die größer waren als 3.500 bp. Das Agarosepulver wurde eingewogen und in 200 ml TBE-Puffer in einem Erlenmeyerkolben resuspendiert. Die Suspension wurde bei 900 W in der Mikrowelle erhitzt, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte. Die Lösung wurde in einen Glaskolben gegossen, der für die Verwendung mit SYBR safe bestimmt war. Von nun an wurde in einem Arbeitsraum gearbeitet, der speziell für die Herstellung von potenziell gesundheitsschädlichen Agarosegelen vorgesehen war. Die heiße Agarose wurde auf 60 °C abgekühlt. Der DNA-interkalierende Farbstoff SYBR safe wurde in einer Konzentration von 1:20.000 zugegeben und die Agaroselösung in das Gelgießtablett gegossen, welches in die Gießapparatur gespannt worden war. Ein Kamm wurde zur Bildung von Geltaschen eingesetzt und Luftblasen wurden mit einer Pipettenspitze entfernt. Das Gel polymerisierte für 30 min bei RT.

Die DNA-Proben wurden für die Elektrophorese durch Zugabe von DNA-Probenpuffer mit bis zur Erreichung einer final 1-fachen Konzentration mit Probenpuffer versetzt. Das polymerisierte Agarosegel wurde auf seinem Tablett in die Elektrophorese-Laufkammer gelegt und TBE-Puffer in die Kammer gefüllt, bis das komplette Agarosegel mit dem Puffer bedeckt war. DNA-Proben und DNA-Größenstandard wurden in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Die Elektrophorese wurde für 30 min bei 120 V für DNA-Fragmente kleiner als 3.500 bp durchgeführt und 60 min bei 120 V für DNA-Fragmente größer als 3.500 bp. Das Ergebnis des Gellaufs wurde durch Fotografieren der SYBR-safe Emission dokumentiert. Ein Blaulichttisch wurde verwendet, um den Farbstoff anzuregen, der zuvor in die DNA im Gel interkaliert war. Banden von Interesse wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in einzelne 1,5 ml Röhrchen zur anschließenden Reinigung der DNA aus dem Gelstück gegeben.

2.2.8 Extraktion von DNA aus Agarosegelstücken

Für die Extraktion von DNA aus Agarosegelstücken wurde das Zymoclean-Kit gemäß Herstellerangaben verwendet. Die Gelstücke wurden nach der Elektrophorese aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in 1,5 ml Röhrchen gegeben. Das Volumen der Gelschnitte in dem Röhrchen wurde durch Wiegen bestimmt, und das dreifache Gelvolumen an ADB-Puffer hinzugegeben. Die Agarose wurde durch Inkubation des Röhrchens bei 50 °C für 10 - 15 min bei 250 U/min vollständig aufgelöst. Die Lösung wurde in eine Zentrifugationssäule in einem Auffangröhrchen pipettiert und die DNA durch Zentrifugation für 1 min bei 12.000 x g und RT an die Säule gebunden. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule wurde mit 500 µl Waschpuffer gewaschen. Die Zentrifugation wurde wie zuvor durchgeführt. Der Durchfluss wurde erneut verworfen und die Säule auf die gleiche Weise mit 200 µl Waschpuffer

gewaschen. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule wurde leer für 1 min bei 12.000 x g und RT zentrifugiert. Die Säule wurde in ein frisches 1,5 ml Röhrchen gegeben. 10 - 30 µl Nuklease-freies Wasser wurden direkt auf den Filter der Zentrifugationssäule pipettiert und die Säulen für 1 - 3 min bei RT inkubiert. Die DNA wurde von der Säule durch Zentrifugation für 1 min bei 12.000 x g und RT eluiert. Die Zentrifugationssäule wurde verworfen und die DNA-Konzentration im Eluat wurde mittels Nanodrop gemessen. Die DNA wurde bei - 20°C oder bei - 80°C bis zu mehrere Monate lang gelagert.

2.2.9 Rekombinatorische Klonierung

Rekombinatorische Klonierung basiert auf der Integration eines DNA-Stranges in einen Zielvektor auf der Grundlage der Sequenzhomologie beider Fragmente. In der vorliegenden Studie wurde die Methode der rekombinatorischen „In-Fusion“-Klonierung nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die „In-Fusion“-Klonierungsreaktionen wurden wie in Tab. 20 dargestellt pipettiert. Die Reaktionen wurden auf Eis vorbereitet. Nuklease-freies Wasser, linearisierte Vektor-DNA und Insert-DNA wurden in ein 1,5 ml Röhrchen pipettiert. Der „In-Fusion“ Enzymprämix wurde hinzugefügt, und die Reaktion wurde durch Inkubation des Röhrchens in einem Heizblock bei 50 °C für 15 min durchgeführt. Das Röhrchen wurde für 2 min auf Eis gelagert. 2,5 µl der Reaktion wurden entweder direkt im Anschluss zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli* verwendet oder die Reaktion wurde bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C gelagert.

Tab. 20: Pipettierschema für die „In-Fusion“-Klonierung

1 x	
2 µl	In-Fusion HD Enzymprämix clonetech
100 ng	linearisiertes Vektorfragment 1
100 ng	linearisiertes Vektorfragment 2
50 ng	Insert 1
50 ng	Insert 2
ad. 10 µl	Nuklease-freies Wasser
10 µl	

2.2.10 Plasmidamplifikation für die Antikörperproduktion

Plasmide für die Antikörperproduktion wurden durch die Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* amplifiziert. Einzelne Bakterienkolonien wurden hinsichtlich des Zielplasmids analysiert. Positive Klone wurden über Nacht kultiviert und es wurden Glycerolstocks für die Kryokonservierung der Klone angelegt. Die Plasmid-DNA konnte jederzeit durch Animpfen von LB Medium mit Bakterien aus Glycerolstocks und bakterieller

Übernachtskultur amplifiziert werden. Die DNA-Amplifikation und anschließende Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli* konnte in kleinem oder großem Maßstab erfolgen.

2.2.11 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Chemisch kompetente *Stellar E. coli*-Zellen wurden 10 min lang auf Eis aufgetaut. 50 µl der aufgetauten Zellen wurden in ein 1,5 ml Röhrchen überführt und 2,5 µl der „In-Fusion“-Klonierungsreaktion oder 20 ng gereinigte Plasmid-DNA wurden zu den Zellen pipettiert. Die Reaktion wurde für 30 min auf Eis inkubiert, dann wurde ein Hitzeschock durchgeführt, indem das Röhrchen in einem Heizblock bei 42 °C für 60 sek. inkubiert wurde. 37 °C warmes S.O.C.-Medium wurde bis zu einem finalen Volumen von 500 µl zu den Bakterien pipetteirt und die Bakterien wurden 1 Stunde lang bei 37 °C und 240 U/min kultiviert. 100 µl der Zellsuspension wurden in einem Verdünnungsausstrich auf einer 10 cm Agarplatte mit Selektionsantibiotikum ausplattiert. Bakterienkolonien wurden über Nacht bei 37 °C kultiviert und konnten mittels Kolonie-PCR und Sequenzierung hinsichtlich des Zielplasmids analysiert werden.

2.2.12 Isolierung von Plasmid-DNA (kleiner Maßstab)

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* im Kleinmaßstab wurde das Kit "Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Systems" entsprechend der Herstelleranweisungen verwendet. In einem Bakterienröhrchen wurden 7 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum genutzt, um plasmid-enhaltende Bakterien über Nacht bei 37 °C, 240 rpm zu kultivieren. 1 ml der Übernachtskultur wurde verwendet, um Glycerolstocks zu erzeugen. 1 ml der Kultur wurde für die Isolierung von Plasmid-DNA im großen Maßstab bei 4 °C gelagert. Der Rest der Kultur wurde 5 min lang bei 21.000 x g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet wurde in 250 µl Zellresuspensionslösung resuspendiert. 250 µl Zelllyselösung wurden hinzugefügt und das Röhrchen zum Mischen viermal invertiert. 10 µl alkalische Proteaselösung wurden hinzugegeben und das Röhrchen erneut viermal invertiert. Die Lösung wurde für 5 min bei RT inkubiert. Es wurden 350 µl Neutralisationslösung zugegeben und das Röhrchen durch viermaliges Invertieren gemischt. Das Röhrchen wurde 10 min lang bei 21.000 x g und RT zentrifugiert. Danach wurde der Überstand in eine Mikrospin-Säule überführt, welches sich in einem Mikrozentrifugations-Sammelröhrchen befand. Die DNA wurde durch Zentrifugation bei 12.000 x g für 1 min und RT an die Zentrifugationssäule gebunden. Der Durchfluss wurde verworfen, und die Säule wurde wie zuvor mit 750 µl Waschlösung gewaschen und zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, und die Säule wurde erneut mit 250 µl Waschlösung gewaschen und wie zuvor zentrifugiert. Der Durchfluss wurde entsorgt und die Zentrifugationssäule im Sammelröhrchen leer für 2 min bei 12.000 x g und RT zentrifugiert. Die Zentrifugationssäule wurde in ein neues 1,5 ml Röhrchen gegeben und 30 µl 60 °C warmes Nuklease-freies Wasser direkt auf den Filter der Säule pipettiert. Die

Säule wurde 1 min bei RT inkubiert und die DNA wurde durch Zentrifugation für 1 min bei 12.000 x g und RT eluiert. Die DNA-Konzentration des Eluats wurde mittels Nanodrop bestimmt, und die DNA wurde bis zu mehrere Monate lang bei - 20 °C oder - 80 °C gelagert.

2.2.13 Sequenzierung von Plasmid-DNA oder von PCR-Produkten

Im Allgemeinen wurde die Sequenzierung von Plasmid-DNA oder PCR-Produkten extern von den Firmen GATC oder Eurofins Genomics durchgeführt. Das folgende Verfahren beschreibt die Vorbereitung der DNA-Proben für die Sequenzierung. In einem 1,5 ml Röhrchen wurden 400 - 500 ng Plasmid-DNA oder 10 - 125 ng PCR-Produkt mit 25 pmol Sequenzierprimer und nuklease-freiem Wasser zu einem Endvolumen von 10 µl vermischt. Ein Strichcodesticker wurde auf das Röhrchen aufgeklebt und die Informationen über Probe und Strichcodenummer wurden dokumentiert. Die Röhrchen wurden über einen firmeneigenen Briefkasten an die Sequenzierfirma geschickt. Das Sequenzierergebnis konnte 2 - 3 Arbeitstage später heruntergeladen werden. Die Qualität der Sequenz wurde anhand ihres Sequenzierungs-Elektropherogramms beurteilt. Qualitativ schlechte Sequenzen wurden von der späteren Analyse ausgeschlossen. Die Identität der Sequenz mit der Referenz-DNA wurde in Microsoft Word analysiert, und die Regionen von Interesse wurden auf Mutationen überprüft. Die Existenz von Frameshift-Mutationen wurde erneut überprüft, indem das Ergebnis der Nukleotid-Sequenzierung über die Onlineanwendung ExpASy Translate Tool in silico in Aminosäuren übersetzt wurde.

2.2.14 Isolation von Plasmid-DNA (großer Maßstab)

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* im großen Maßstab wurde das Kit "PureLink HiPure Plasmid Filter Maxiprep" gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet. Bakterien, die das Zielplasmid enthielten, wurden über Nacht bei 37 °C und 240 U/min in 100 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum kultiviert. Falls erforderlich, wurde aus der Übernachtskultur ein frischer Glycerolstock hergestellt. Die Bakterien wurden durch 10-minütiges Zentrifugieren der 50 ml Röhrchen bei 8.401 x g und RT pelletiert. 30 ml Äquilibriumspuffer wurden zur Equilibrierung der Aufreinigungssäule genutzt. Der Zentrifugationsüberstand wurde verworfen, das Bakterienpellet wurde in 10 ml Resuspensionspuffer resuspendiert und die Lösung in ein neues 50 ml Röhrchen überführt. Es wurden 10 ml Lysepuffer hinzugefügt und die Lösung durch 5-maliges Invertieren des Röhrchens gemischt. 10 ml Präzipitationspuffer wurden zugegeben und das Röhrchen wurde durch sofortiges Invertieren gemischt, bis die Mischung homogen war. Die Lösung wurde 10 min lang bei 8.401 x g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette auf die äquilibrierte Säule gegeben. Zum Waschen der Säule nach Probenauftrag wurden 50 ml Waschpuffer verwendet. Sobald die Lösung die Säule vollständig durchflossen hatte, wurde

ein frisches 50 ml Röhrrchen unter die Säule gestellt und 15 ml Elutionspuffer verwendet um gebundene DNA von der Säule in das frische Röhrrchen zu eluieren. 10,5 ml eiskaltes Isopropanol wurden in das 50 ml Röhrrchen pipettiert, und das Röhrrchen wurde 10 sek. lang gevortext. Das Röhrrchen wurde für 1 h bei 8.401 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 5 ml eiskaltem 70%-igem Ethanol gewaschen. Das Röhrrchen wurde für 20 min bei 8.401 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen, und das Pellet wurde durch 30-minütige Inkubation ohne Röhrrchendeckel bei RT getrocknet. Das Pellet wurde in 300 - 500 µl nuklease-freiem Wasser resuspendiert und die DNA-Konzentration am Nanodrop gemessen. Die DNA wurde bis zu mehrere Monate lang bei - 80 °C gelagert.

2.2.15 Präparation und Nutzung bakterieller Glycerolstocks

In einem Kryoröhrrchen wurden 500 µl Bakterienkultur zu 500 µl Glycerol hinzugefügt. Auf das Röhrrchen wurden Etiketten für die Lagerung von Flüssigstickstoff aufgetragen. Die Mischung wurde geschüttelt, bis sie homogen war, und bei - 80 °C eingefroren. Für die Kultur von Bakterien aus dem Glycerolstock wurden Röhrrchen mit LB Medium und Selektionsantibiotikum vorbereitet. Für die Isolation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab wurden 7 ml Kulturmedium in Bakterienröhrrchen genutzt. Für die Isolation von Plasmid-DNA im großen Maßstab wurde 1 ml Kulturmedium in einem 1,5 ml Röhrrchen als Vorkultur angeimpft. Mit einer Pipettenspitze wurden ca. 30 µl des bestehenden Glycerolstocks angekratzt und in das Kulturmedium gegeben. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37 °C und 240 U/min gezüchtet. Im Falle der Isolierung von Plasmid-DNA im großen Maßstab wurde die 1 ml Vorkultur 1 - 3 Stunden lang kultiviert und dann zur Inokulation von 100 ml der Übernachtskultur verwendet.

2.2.16 Kultur und Transfektion von HEK293-Zellen

HEK293 Zellen mit einer Passagezahl zwischen 5 und 40 wurden in einem Zellkultur-Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die adhärennten Zellen wuchsen in Poly-L-Lysin (PLL)-beschichteten T175-Flaschen und wurden stets mit mindestens 30 ml HEK293-Zell Komplettmedium (s. Tab. 21) versorgt. Alle Arbeitsschritte mit HEK293 Zellen wurden so steril wie möglich durch Arbeiten an Sterilbänken und durch Verwendung von sterilen Reagenzien und Arbeitsgeräten sowie sterilisierten Zellkultur-Brutschränken durchgeführt. Die Zellen wurden alle 2 - 3 Tage geteilt und passagiert und bei Bedarf zwischenzeitlich mit frischem Medium versorgt. Bei einer Konfluenz von 70 - 80 % konnten Zellen zur Transfektion verwendet werden (siehe 2.2.21). Transfizierte Zellen wurden getrennt von nicht-transfizierten Zellen kultiviert. Nach der Transfektion wurden die Zellen nicht mehr passagiert, sondern bis zu 7 Tage lang in der gleichen T175-Flasche kultiviert. In dieser Zeit sezernierten die Zellen hergestellte Antikörper in das Zellkulturmedium. Der

Expressionsvektor für die rekombinante Proteinexpression trug das Reporter-gen GFP unter dem gleichen Promotor wie das Gen für die Antikörperleichtkette. Daher war ein beobachtetes GFP-Signal ein Hinweis auf die Expression des Antikörperkonstruktes und den Erfolg der Transfektion. Das verbrauchte Zellkulturmedium wurde täglich gesammelt und bei - 20 °C eingefroren. Die Zellen wurden mit frischem Medium versorgt. Ab 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in serumfreiem Nutridomamedium kultiviert (s. Tab. 22) um eine Kreuzkontamination der rekombinant hergestellten Antikörper durch Serumproteine zu vermeiden. T175-Flaschen wurden etwa 7 Tage nach der Transfektion verworfen, wenn das Fluoreszenzsignal fehlte oder sich die Mehrheit der Zellen von der Oberfläche der T175-Flasche abgelöst hatte.

Tab. 21: Zusammensetzung von HEK293-Zell Komplettmedium

1 x	
500 ml	RPMI
50 ml	FBS
5 ml	Penicillin-Streptomycin (5.000 U/ml)
5 ml	glutaMAX Zusatzreagenz

Tab. 22: Zusammensetzung von HEK293-Zell Nutridomamedium

1 x	
500 ml	RPMI
5 ml	nutridoma
5 ml	Penicillin-Streptomycin (5.000 U/ml)
5 ml	glutaMAX Zusatzreagenz

2.2.17 Teilen von HEK293 Zellen

Das Teilen der HEK293 Zellen wurde entsprechend der Zellkonfluenz durchgeführt, jedoch in der Regel alle 2 - 3 Tage. Das Zellkulturmedium wurde verworfen und die Zellen wurden vorsichtig mit 10 ml PBS gewaschen. Das PBS wurde verworfen, und 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung wurden auf die Zellen pipettiert. Die T175-Flasche wurde 5 min im Zellkultur-Brutschrank inkubiert. Das Ablösen der Zellen von der Oberfläche der Zellkulturflasche wurde durch Abklopfen der Flasche oder kurzes Vortexen gefördert. Zur Neutralisierung der Trypsinierungsreaktion wurden 5 ml des 37 °C warmen Komplettmedium verwendet und an der Flasche haften gebliebene Zellen mit einer Stripette abgespült. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Röhrchen überführt, und die Zellen wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 250 x g und RT pelletiert. In der Zwischenzeit wurden frische T175-Flaschen mit mindestens 30 ml 37 °C warmem Komplettmedium vorbereitet. Im Allgemeinen wurden PLL-beschichtete Flaschen einmal wiederverwendet, nachdem die Rückstände aus der ersten Verwendung

durch zweimaliges Waschen des Kolbens mit jeweils 10 ml PBS entfernt worden waren. Der Zentrifugationsüberstand wurde verworfen, und das Zellpellet wurde im warmen Kompletmedium resuspendiert. Im Allgemeinen wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:4 - 1:8 geteilt, je nach vorheriger Zellkonfluenz und der Dauer bis zur nächsten Teilung oder bis zur Transfektion der Zellen. Das Röhrchen wurde 5 - 10 Sekunden lang gevortext und 1 ml Zellsuspension in jede T175-Zellkulturflasche pipettiert. Die Zellen wurden durch leichtes Schwenken der Kolben verteilt. Die Flaschen wurden in den Zellkultur-Brutschrank überführt und der Deckel der Flaschen wurde angedreht, um Gasaustausch zu gewährleisten. Die Zellen wurden täglich unter einem Mikroskop beobachtet und entsprechend ihrer Konfluenz und ihres Mediumverbrauchs behandelt.

2.2.18 Beschichten von T175 Zellkulturflaschen mit Poly-L-Lysin (PLL)

Die Kultur von adhärenenten HEK293 Zellen in T175-Flaschen erforderte eine vorherige Beschichtung der Kolben mit Poly-L-Lysin (PLL). Eine PLL-Stammlösung wurde in PBS hergestellt und die Lösung wurde durch Filtration sterilisiert, aliquotiert und bei - 20 °C eingefroren. Eine Arbeitslösung von PLL in PBS mit einer Konzentration von 1 mg/ml wurde aus der Stammlösung hergestellt. Diese Arbeitslösung wurde bis zu 5-mal für die Beschichtung von T175-Flaschen verwendet. 15 ml der PLL-Arbeitslösung wurden in jede zu beschichtende T175-Flasche pipettiert. Die Zellkulturflaschen wurden mindestens 1 Stunde im Zellkultur-Brutschrank inkubiert, dann wurde die PLL-Arbeitslösung aus den Flaschen entfernt und bis zur nächsten Verwendung bei 4 °C gelagert. Die zu beschichtenden T175-Flaschen wurden dreimal mit 15 ml PBS gewaschen. Die Flaschen konnten sofort für die HEK293-Zellkultur verwendet werden, oder es wurden 15 ml PBS mit Penicillin-Streptomycin (50 U/ml) in die Kolben pipettiert und die Flaschen bis zu 1 Woche lang bei 4 °C gelagert.

2.2.19 Kryokonservierung von HEK293 Zellen

HEK293 Zellen konnten in jeder beliebigen Passage eingefroren werden, jedoch nach mindestens zwei Passagen nach Auftauen der Zellen. Die Zellen wurden gewaschen, mit Trypsin-EDTA-Lösung behandelt und zentrifugiert, wie im Abschnitt 2.2.17 beschrieben. Der Überstand aus der Zentrifugation wurde verworfen und die Zellen wurden in Zellkultur-Gefriermedium resuspendiert. 1 ml Zellsuspension mit 1 - 5 Millionen Zellen wurde in jedes Kryoröhrchen pipettiert. Die Kryoröhrchen wurden mit einfrrierbeständigen Etiketten beschriftet und bei - 80 °C eingefroren. Nach zwei Tagen konnten die Röhrchen zur Langzeitlagerung in den Flüssigstickstofftank überführt werden.

2.2.20 Inkulturnahme von HEK293 Zellen

Kryokonservierte HEK293 Zellen wurden durch die Inkubation des Zellen-enthaltenden Kryoröhrchens bei 37 °C im Wasserbad für 8 min aufgetaut. Zu den aufgetauten Zellen wurde 1 ml 37 °C warmes Komplettmedium gegeben und die Zellsuspension in ein 15 ml Röhrchen pipettiert. Das Kryoröhrchen wurde mit 1 ml warmen Komplettmedium gewaschen und dieser 1 ml wurde in dasselbe 15 ml Röhrchen gegeben. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 250 x g und RT zentrifugiert. Jeweils 35 ml warmes Komplettmedium wurden in 2 PLL-beschichtete T175-Flaschen gegeben. Der Zentrifugationsüberstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 2 ml warmem Komplettmedium durch Pipettieren und kurzes Vortexen resuspendiert. In jede T175-Flasche wurde 1 ml Zellsuspension gegeben und die Zellen wurden durch leichtes Schwenken der Kolben verteilt. Die Zellen wuchsen im Zellkultur-Brutschrank und die Zellen wurden entsprechend ihrer Konfluenz und ihres Verbrauchs an Zellkulturmedium behandelt.

2.2.21 Transfektion von HEK293 Zellen mittels Polyethylenimin (PEI)

HEK293 Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren unter Verwendung des Transfektionsreagenzes Polyethylenimin (PEI) transfiziert. Eine 1 mg/ml konzentrierte PEI-Arbeitslösung in Nuklease-freiem Wasser wurde hergestellt, aliquotiert und bis zur Verwendung bei – 20 °C gelagert. Untransfizierte Zellen wurden in T175-Flaschen kultiviert und bei einer Konfluenz von 70 - 80 % zur Transfektion verwendet (siehe 2.2.16). Das Zellkulturmedium wurde kurz vor der Transfektion durch neues Medium ersetzt. Um die DNA für die Zellaufnahme vorzubereiten, wurde das folgende Verfahren durchgeführt: In 2 getrennten 2 ml Röhrchen wurde zum einen ein Gemisch aus DNA und OptiMEM-Medium hergestellt zum anderen ein Gemisch aus PEI und OptiMEM-Medium. Als Standard wurden 30 µg DNA für die Transfektion einer T175-Flasche genutzt und 3 µg PEI pro 1 µg DNA verwendet. Entsprechende Volumina von Plasmid-DNA-Lösung oder der PEI-Lösung wurden in die 2 verschiedenen Röhrchen pipettiert und mit OptiMEM-Medium auf jeweils 500 µl aufgefüllt. Die Lösungen wurden durch 5-maliges Invertieren der Röhrchen gemischt und die Röhrchen 5 min lang bei RT inkubiert. Das Gemisch aus PEI und OptiMEM-Medium wurde in das PEI-mix enthaltende Röhrchen pipettiert und für 30 min bei RT inkubiert. Aus jeder T175-Flasche wurden 5 ml Zellkulturmedium in dasselbe 50 ml Röhrchen überführt. Der Transfektions-Mix wurde in das Röhrchen hinzupipettiert und die Lösung vorsichtig gemischt. 5 ml der Lösung wurden in jede T175-Flasche pipettiert, welche für die Transfektion vorgesehen war. Die Flaschen wurden in einen Inkubator für transfizierte Zellen überführt. Der Deckel der Fläschchen wurde aufgedreht, um Gasaustausch zu gewährleisten. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Zellkulturmedium verworfen und die Zellen wurden mit 10 ml PBS gewaschen. Von nun an wurden die Zellen in serumfreiem Nutridomamedium kultiviert,

um eine Kreuzkontamination rekombinant produzierter Antikörper durch Serumproteine zu vermeiden. Das Zellkulturmedium wurde gesammelt und bis zu 6 Mal durch frisches Medium ersetzt. In der Regel geschah dies bei den ersten 2 - 4 Sammlungen täglich und bei den weiteren Sammlungen alle 2 Tage. Der Überstand der gesammelten Zellkultur wurde bei - 20 °C gelagert, bis der Überstand für die Antikörperreinigung vorbereitet wurde (s. 2.2.22). Flaschen, in welchen ein Großteil der Zellen kein GFP-Signal mehr zeigten, oder Flaschen, in denen sich die Mehrzahl der Zellen abgelöst hatte, wurden verworfen.

2.2.22 Vorbereitung von Zellkulturüberstand für die Antikörperaufreinigung

Gewöhnlich wurden etwa 20 T175-Zellkulturflaschen mit demselben Antikörper-Expressionsvektor transfiziert und der aus diesen Flaschen gesammelte Zellkulturüberstand zur Antikörperaufreinigung verwendet. Gefrorene Röhrchen mit Zellkulturüberstand wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die Röhrchen wurden für 10 min bei 2.000 x g und RT zentrifugiert um Zelltrümmer zu pelletieren. Der Überstand wurde durch ein 70 µm Zellsieb und ein 40 µm Zellsieb filtriert. Danach wurde der Überstand durch Filtration durch einen 0,2 µm Filter sterilisiert. Der pH-Wert des filtrierten Zellkulturüberstandes wurde auf pH 7 eingestellt. Der Zellkulturüberstand wurde bis zur Antikörperreinigung bis zu mehrere Tage lang bei 4 °C gelagert oder für spätere Aufreinigungen bei - 20 °C eingefroren.

2.2.23 Vorbereitung von Puffern für die Antikörperaufreinigung

Alle Puffer wurden direkt vor der durchgeführten Aufreinigung bei Raumtemperatur angesetzt. Erforderliche Chemikalien wurden abgewogen und in destilliertem Wasser oder PBS resuspendiert. Zur Messung des pH-Wertes der Lösungen wurde ein frisch kalibriertes pH-Meter verwendet und der pH-Wert wurde durch Zugabe von HCl oder NaOH eingestellt. Die Puffer wurden durch Filtration durch ein 0,2 µm Filter sterilisiert. Puffer mit Volumina über 100 ml wurden vor der Filtration entgast. Die Puffer wurden bis zu 2 Wochen bei 4 °C oder bei RT gelagert, und der pH-Wert der Lösungen wurde kurz vor der Verwendung erneut überprüft und bei Bedarf eingestellt.

2.2.24 Vorbereitung von Puffern für die Aufreinigung von IgG Antikörpern

Rekombinante IgG Antikörper wurden mit einem ÄKTA-Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)-System und einer vorgepackten HiTrap Protein G HP-Säule (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) oder mit losen magnetischen Protein G Beads (Promega, Madison, WI, USA) aufgereinigt. Die in Tab. 23 aufgeführten Puffer wurden für diese Aufreinigungen benötigt.

Tab. 23: Puffer für die Aufreinigung rekombinanter IgG Antikörper

	HiTrap Protein G Säule	Protein G beads
Waschen des FPLC-Systems	20 % Ethanol	
Bindepuffer	20 mM Natriumphosphat, pH 7	PBS, pH 7.0 – 7.3
Elutionspuffer	0,2 M Glycin-HCl, pH 2,3	
Neutralisationspuffer	1 M Tris-HCl, pH 9	

2.2.25 Vorbereitung von Puffern für die Aufreinigung von IgM Antikörpern

Für die Aufreinigungen von IgM Antikörpern wurden je nach Aufreinigungsmethode unterschiedliche Puffer verwendet. Für eine Übersicht genutzter Puffer s. Abschnitt 3.1.2.1. Die Puffer wurden bei Raumtemperatur angesetzt, ihr pH-Wert wurde eingestellt und sie wurden steril filtriert. Die Lagerung der Puffer erfolgte bei 4 °C. Kurz vor ihrem Gebrauch wurden die Puffer auf Raumtemperatur aufgewärmt und ihr pH-Wert wurde erneut eingestellt.

2.2.26 Packen von Leersäulen für die Aufreinigung von IgM Antikörpern

Neben vorgepackten Chromatographiesäulen wurden die beiden losen Chromatographiematerialien POROS Capture Select und anti-IgM Agarose zur IgM-Aufreinigung verwendet. Um jene Materialien zusammen mit unserem ÄKTA-FPLC-System zu nutzen, wurden die losen Materialien wie folgt in ÄKTA-kompatible Leersäulen gepackt: Ein Endstopfen wurde in das untere Gehäuse einer Leersäule eingesetzt. Der Filter des Endstopfens wurde benetzt, indem die Säule mit PBS gewaschen wurde. Ein Verschlussstopfen wurde auf das untere Ende der Leersäule geschraubt. Dann wurde ca. 1 ml aufgeschwämmtes Chromatographiematerial in die Säule eingefüllt. Das Material setzte sich durch Zentrifugation für 5 min bei 800 x g und RT im unteren Säulenbereich ab. Der Überstand in der Säule wurde verworfen und erneut 1 ml aufgeschwämmtes Chromatographiematerial in die Säule gegeben. Wieder konnte sich das Chromatographiematerial am Boden absetzen. Die Kartusche wurde bis zum oberen Ende mit PBS gefüllt. Dann wurde ein Endstopfen in das obere Gehäuse der Patrone eingeführt. Die Säule konnte durch Einsetzen eines oberen Verschlussstopfens vollständig geschlossen werden. Die Säule war nun für den Einsatz mit einem ÄKTA-FPLC-System vorbereitet.

2.2.27 Aufreinigung von IgM Antikörpern über Affinitätschromatographie

Die affinitätschromatographische Aufreinigung von IgM Antikörpern erfolgte mittels der kommerziell erworbenen Chromatographiematerialien POROS, anti-IgM Agarose, LigaTrap oder HiTrap in Verwendung mit einem ÄKTA Chromatographiesystem. Es wurden die jeweils

vom Produkthersteller empfohlenen Puffer und Reinigungsprotokolle verwendet. Generell folgte der Reinigungsprozess bei allen Materialien einem ähnlichen Ablauf: Im Falle loser Chromatographiematerialien wurden jene zunächst in Leersäulen gepackt (POROS, anti-IgM Agarose). Alle Säulen wurden mit 15 ml Waschpuffer bei einer Flussrate von 1 ml/min äquilibriert. Der Probenauftrag fand bei 1 – 2 ml/min statt. Folgend wurden die Säulen mit 20 ml Waschpuffer bei 1 ml/min gewaschen und gebundene IgM Antikörper anschließend mit 10 – 20 ml Elutionspuffer bei einer Flussrate von 0.5 ml/min eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden aufgefangen und ggf. einer pH Neutralisation, immer aber einem Pufferaustausch über Dialyse und einer Aufkonzentrierung unterzogen.

2.2.28 Aufreinigung von IgG Antikörpern über Affinitätschromatographie

Rekombinante IgG Antikörper wurden mit einem ÄKTA-FPLC-System und einer vorgepackten HiTrap Protein G HP-Säule (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) oder mit losen magnetischen Protein G Beads (Promega, Madison, WI, USA) aufgereinigt.

2.2.29 Aufreinigung von IgG Antikörper über FPLC

Für die Aufreinigung von IgG Antikörpern mittels FPLC wurde ein ÄKTA-Prime- oder ÄKTA-Start-Gerät zusammen mit einer vorgepackten HiTrap Protein G HP Säule verwendet (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Die Aufreinigungen wurden üblicherweise bei RT durchgeführt und der gesamte Aufreinigungsprozess konnte anhand der durch das System aufgenommene UV-Absorptionskurve sowie durch die aufgenommene Leitfähigkeitskurve für die durch das System fließende Probe nachverfolgt werden. Das FPLC-System wurde in 20 %-igem Ethanol gelagert und vor jedem Lauf mit 10 - 20 ml 20 %-igem Ethanol gewaschen. Die Flussrate betrug 1 ml/min und die Druckgrenze lag bei 0,5 hPa falls nicht anders angegeben. Das System wurde mit Bindepuffer gefüllt, im Falle von Reinigungen mit dem HiTrap-Protein G HP war dies 20 mM Natriumphosphat, pH 7. Eine frische HiTrap-Säule wurde eingesetzt und die Säule mit weiteren 10 - 20 ml Bindepuffer gewaschen. Die Säule wurde ferner mit 10 - 20 ml des Elutionspuffers 0,2 M Glycin-HCl, pH 2,3 äquilibriert. Zur Vorbereitung der Säule auf die Probenbindung wurden 10 - 20 ml Bindepuffer ins System gegeben und anschließend 200 – 1.000 ml Antikörper-enthaltender HEK293-Zell Kulturüberstand über Nacht durch das System geleitet. Die Säule wurde mit 20 - 40 ml Bindepuffer gewaschen, dann folgte die Elution gebundener Antikörper. Der Elutionspuffer wurde ins System geleitet und die Flussrate auf 0,5 ml/min eingestellt. Der Systemdurchfluss wurde in Fraktionen von je 1 ml Volumen aufgefangen. In der Regel wurde gebundener Antikörper mit 10 - 20 ml Elutionspuffer eluiert. Nach der Elution wurde die Fraktionierung gestoppt und 10 - 20 ml Bindepuffer bei 1 ml/min ins System eingegeben. 10 - 20 ml 20 %iger Ethanol wurden durch das System geleitet, dann wurde die Säule aus dem FPLC-System entfernt und nach Verschließen ihrer

Säulenausgänge bei 4 °C gelagert. Die Säule konnte mehrere Male für die Reinigung desselben Antikörpers wiederverwendet werden. Das FPLC-System wurde bis zu seiner nächsten Verwendung in 20 %-igem Ethanol gelagert.

2.2.30 Aufreinigung rekombinanter IgG Antikörper über magnetische Beads

Üblicherweise wurden IgG Antikörper mit magnetischen Protein G Beads aufgereinigt, wenn der Antikörper-enthaltende Zellkulturüberstand ein Volumen von bis zu 800 ml hatte. 50 ml Röhren wurden mit 45 ml vorbereitetem HEK293 Zellüberstand gefüllt. In jedes Röhren wurden 45 µl Bead-Lösung gegeben und die Röhren über Nacht bei 4 °C in einem Überkopfschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Beads mittels magnetischer Anziehung aus dem Überstand isoliert. Alle folgenden Reinigungsschritte wurden bei RT durchgeführt. Jedes Röhren wurde 5 min lang auf einem Magnetständer inkubiert und der Zellkulturüberstand wurde abgenommen. Das Röhren wurde aus dem Ständer entfernt und die magnetischen Beads wurden mit 1 ml PBS von der Röhrenwand abgewaschen. Die Suspension wurde in ein 2 ml Röhren überführt. 1 ml frisches PBS wurde verwendet, um die restlichen magnetischen Beads aus dem 50 ml Röhren zu sammeln und die Suspension wurde in dasselbe 2 ml Röhren gegeben wie die Beads zuvor. Der Vorgang wurde für alle verbleibenden 50 ml Röhren wiederholt. Anschließend wurden die 2 ml Röhren auf einem magnetischen Ständer 5 min lang inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und die Röhren wurden aus dem Ständer entfernt. Die Beads aus 2 Röhren wurden zusammen pipettiert. 1 ml PBS wurde verwendet um die Beads im ersten Röhren zu resuspendieren dann wurde die Suspension in das zweite Röhren überführt. 1 ml frisches PBS wurde verwendet, um die restlichen Beads aus dem ersten Röhren zu sammeln und diese Suspension wurde ebenfalls in das zweite Röhren überführt. Das Röhren wurde 5 min lang in einem Überkopfschüttler inkubiert. Parallel dazu wurden die Beads aus weiteren 2 Röhren zusammengeführt und der Prozess wurde wiederholt, bis ein einziges Röhren übrig blieb, das alle bei der Reinigung verwendeten magnetischen Beads enthielt. Das Röhren wurde 5 min lang in einem Überkopfschüttler geschüttelt und 5 min lang im magnetischen Ständer inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und die Antikörper wurden durch Zugabe von 500 µl Elutionspuffer von den Beads eluiert. Das Röhren wurde für 5 min in einem Überkopfschüttler und anschließend für 5 min in einem magnetischen Ständer inkubiert. Der antikörperhaltige Überstand wurde in ein 1,5 ml Röhren überführt, das mit 170 µl Neutralisationspuffer vorbeschichtet worden war. 350 µl Elutionspuffer wurden für eine zweite Elution verwendet, die so ablief wie die erste Elution. Der Überstand der zweiten Elution wurde zum Eluat der ersten Elution pipettiert. Der pH-Wert der Lösung wurde auf pH 7 eingestellt. Anschließend wurde der Puffer der Lösung durch Dialyse gegen PBS ausgetauscht.

2.2.31 Pufferaustausch von Antikörperlösungen nach Antikörperaufreinigung

Der Antikörper war nach der Aufreinigung in neutralisiertem Elutionspuffer vorhanden. Um nachteilige Auswirkungen von Pufferkomponenten in späteren Anwendungen zu vermindern, wurde der Puffer durch Dialyse gegen PBS ausgetauscht. Abhängig vom Probenvolumen wurden je nach Herstelleranweisung Dialysekassetten für Probenvolumina von 0,5 - 3 ml oder 3 - 12 ml verwendet. Leere Kassetten wurden für 10 min bei RT in PBS äquilibriert. Das verwendete PBS-Volumen betrug mindestens das 200-fache des Probenvolumens. Die Kassetten wurden aus dem PBS entfernt und die Antikörper-haltige Probe mit einer 1 - 10 ml Spritze mit Kanüle in die Kassetten überführt. Verbleibende Luft im Inneren der Kassetten wurde abgesaugt und die Kassetten in PBS schwimmend für 2 h bei RT und Schütteln inkubiert. Nach 2 Stunden wurde das PBS außerhalb der Kassette ausgetauscht und die Kassette weiter über Nacht bei RT geschüttelt. Ein zweiter Austausch von PBS wurde am nächsten Tag durchgeführt und die Dialyse wurde für eine weitere Nacht fortgesetzt. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung mit einer Spritze mit Kanüle aus den Kassetten entnommen. Das Volumen der Lösung wurde in der Regel direkt im Anschluss durch Aufkonzentrierung mit Zentrifugations-Filtereinheiten verringert.

2.2.32 Aufkonzentrierung von Antikörperlösungen

Antikörper in PBS wurden typischerweise über Amicon Zentrifugations-Filtereinheiten auf ein Volumen von 500 µl aufkonzentriert. Für IgG Antikörper wurden Filtereinheiten mit einer Molekulargewichts-Ausschlussgrenze von 10 kDa oder 30 kDa verwendet. IgM Antikörper enthaltende Lösungen wurden mit Filtereinheiten mit einer Ausschlussgrenze von 100 kDa aufkonzentriert. Im Allgemeinen wurden bis zu 15 ml Antikörperlösung auf den Filter der Zentrifugations-Filtereinheiten pipettiert. Das Röhrchen wurde mehrmals in einem Ausschwingrotor bei 3.220 x g und RT zentrifugiert, bis das Volumen oberhalb des Filters ca. 500 µl betrug. Mit einer 200 µl Pipette wurden die oberen Filtermembranen mit der aufkonzentrierten Lösung etwa 30 Mal pro Filter gewaschen. Die Lösung wurde dann in ein 1,5 ml Röhrchen mit verringerter Proteinbindungsaffinität überführt. Die Antikörperlösungen wurden bei - 20 °C bis zu mehrere Monate lang oder bei 4 °C bis zu mehrere Wochen lang gelagert.

2.2.33 Proteinkonzentrationsmessung über Bicinchoninsäure-Assay (BCA)

Die Messung der Proteinkonzentration wurde über Bicinchoninsäure-Assay (BCA) entsprechend den Anweisungen des Assay Herstellers durchgeführt. Es wurde eine BSA-Standardserie in PBS hergestellt, die Standardlösungen mit einer Konzentration zwischen 0 µg/ml und 500 µg/ml enthielt (siehe Tab. 24). Außerdem wurden von allen zu messenden Proben 85 µl einer 1:2 oder 1:3 Verdünnung hergestellt und für die Positivkontrolle wurden 85

μl einer Lösung mit einer Konzentration von $100 \mu\text{g/ml}$ hergestellt. $25 \mu\text{l}$ von jedem Standard, jeder Probe oder der Kontrolle wurden in jeweils drei Vertiefungen einer 96-Well Platte pipettiert. Die BCA-Reaktionsmischung wurde aus den Kit-Lösungen „A“ und „B“ im Verhältnis 1:50 hergestellt. $200 \mu\text{l}$ der Reaktionsmischung wurden in jede Vertiefung mit Standard, Probe oder Kontrolle pipettiert, und die Platte wurde 30 min bei $56 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Die Absorption der Lösungen bei 562 nm wurde in einem Plattenlesegerät gemessen und die Konzentration der Proben wurde in Microsoft Excel berechnet. Aus den Absorptionswerten der BSA-Standardserie und der bekannten Konzentration der Standardserie wurde eine Standardkurve erstellt. Die Gleichung der Standardkurve wurde für die Berechnung der Proteinkonzentration in den Proben verwendet.

Tab. 24: Pipettierschema für BCA-Messungen

	1	2	3	4	5	6
A	500 $\mu\text{g/ml}$ Standard			Probe 1		
B	250 $\mu\text{g/ml}$ Standard			Probe 2		
C	125 $\mu\text{g/ml}$ Standard			Probe 3		
D	50 $\mu\text{g/ml}$ Standard			Probe 4		
E	15 $\mu\text{g/ml}$ Standard			Kontrolle 100 $\mu\text{g/ml}$		
F	5 $\mu\text{g/ml}$ Standard					
G	2 $\mu\text{g/ml}$ Standard					
H	0 $\mu\text{g/ml}$ Standard					

2.2.34 Proteinkonzentrationsmessung mittels IgG- oder IgM-ELISA

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) wurde nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Für die Messung von bis zu 46 Lösungen wurden 100 ml Blockierungspuffer und 200 ml Waschpuffer vorbereitet. Die IgM- oder IgG-Standardserie wurde vorbereitet und die Proben wurden verdünnt, um eine Konzentration im Bereich der Standardserie zu erhalten. $100 \mu\text{l}$ des Standards oder der Proben wurden in Duplikaten in die Vertiefungen der ELISA-Platte pipettiert und die Platte 30 min bei RT unter Schütteln inkubiert. Der lyophilisierte Sekundärantikörper wurde in Blockierungspuffer resuspendiert. Die Wells der ELISA-Platte wurden durch Pipettieren entleert und 3 Mal mit $300 \mu\text{l}$ Waschpuffer gewaschen. In jede Vertiefung wurden $100 \mu\text{l}$ Sekundärantikörperlösung pipettiert und die Platte wurde 30 min bei RT inkubiert. Die Wells wurden 3 Mal mit $300 \mu\text{l}$ Waschpuffer gewaschen und $50 \mu\text{l}$ TMB-Substrat wurden vorsichtig in jede Vertiefung gegeben. Die Entwicklung des Assays wurde gestoppt, sobald die Absorption der Proben visuell im gleichen

Bereich lag wie die der Standardlösungen. 50 µl 1 M HCl wurden den Wells in derselben Reihenfolge zugegeben, in der das TMB-Substrat zugegeben worden war. Die Absorption bei 450 nm wurde in einem Plattenlesegerät gemessen und die unbekanntes wurden durch Analyse der Ergebnisse in Microsoft Excel bestimmt. Eine Standardkurve wurde erstellt und jene für die Konzentrationsberechnung von Proben mit unbekannter Proteinkonzentration verwendet.

Tab. 25: Pipettierschema für ELISA-Messungen

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	IgM- oder IgG-Standard											Probe 1
B	200 ng/ml	100 ng/ml	50 ng/ml	20 ng/ml	10 ng/ml	5 ng/ml	2 ng/ml	1 ng/ml	0,5 ng/ml	0,2 ng/ml	0 ng/ml	
C	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
D	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

2.2.35 Native Polyakrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE)

Die native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE) wurde nach dem Handbuch "NativePAGE Novex Bis-Tris Gel System" durchgeführt. Ladepuffer und Kathodenpuffer-Probenzusatz wurden hergestellt und für mehrere Gelläufe verwendet. Der Laufpuffer wurde vor jedem Gellauf frisch angesetzt. 1,3 L Laufpuffer wurden bei RT hergestellt, der pH-Wert eingestellt und der Puffer bis zu seiner Verwendung auf Eis gelagert. Zur Herstellung des Kathodenpuffers wurden 250 ml Laufpuffer abgenommen und 1,25 ml Kathodenpuffer-Probenzusatz zugegeben. Sowohl der Kathodenpuffer als auch die Laufapparatur des Gels wurden bis zum Lauf des Gels auf Eis gelagert. Die Proben wurden vorbereitet wie in Tab. 26 zu sehen und auf Eis gelagert. Ein erworbenes Bis-Tris-Proteingel wurde aus seiner Verpackung entnommen und kurz mit destilliertem Wasser gespült. Der Gelkamm wurde aus dem Gel entfernt, ebenso wie der Klebestreifen am unteren Ende des Gels. Die Geltaschen wurden 3 Mal mit Kathodenpuffer gewaschen. Das Gel wurde in die Gel-Laufapparatur gespannt und die innere Kathodenkammer zur Hälfte mit Kathodenpuffer gefüllt. Die Proben wurden mit einer Hamilton-Spritze in die Geltaschen geladen. Die innere Kammer wurde bis zur Oberkante mit Kathodenpuffer und die äußere Kammer mit Anodenpuffer gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte für 3 Stunden bei 150 V. Das Gel wurde aus seiner Kassette entnommen und nach dem Protokoll "NativePAGE Novex Bis-Tris Gel System" fixiert, gefärbt und entfärbt. Zur Fixierung der Proteine im Gel wurde das Gel in 100 ml Fixierlösung 45 s bei 900 W in der Mikrowelle gekocht. Das Gel wurde in der Fixierlösung für weitere 30 min bei RT geschüttelt. Das Gel wurde dann in 100 ml Färbelösung überführt und wie zuvor in der Mikrowelle erhitzt und danach bei RT inkubiert. Das Gel wurde in 100 ml Entfärbelösung überführt und wie zuvor in der Mikrowelle gekocht. Das Gel wurde bei RT geschüttelt, bis die

gewünschte Entfärbung erreicht war. Dann wurde das Gel über das Odyssey System eingescannt.

Tab. 26: Pipettierschema Probenvorbereitung für die native PAGE

	Probe [μ l]	PBS [μ l]	Ladepuffer (4 x) [μ l]
nativeMark	5	2,5	2,5
IgM Kontrolle (1 μ g/ μ l)	6	1,5	2,5
IgM Probe	18,75	0	6,25

2.2.36 Denaturierende Polyakrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden erworbene Lade- und Laufpuffer verwendet. Die Proben wurden mit Ladepuffer vorbereitet und bei 95 °C für 10 min denaturiert. Die Proben wurden kurz zentrifugiert und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Ein kommerzieller, gebrauchsfertiger Größenstandard wurde ebenfalls auf Eis gelagert. Das erworbene Gradienten Proteingel wurde mit destilliertem Wasser gespült. Der Gelkamm wurde vorsichtig entfernt, ebenso wie das Klebeband an der Unterseite des Gels. Das Gel wurde in die Laufkammer gespannt, die dann mit Laufpuffer gefüllt wurde. Die Taschen wurden dreimal mit Laufpuffer gespült. Der Proteinstandard und die Proben wurden mit einer Hamilton-Spritze in die Geltaschen geladen. Die Gelelektrophorese erfolgte 1 Stunde bei 120 V. Nach dem Lauf wurde das Gel aus der Kassette genommen und dreimal für 5 min mit destilliertem Wasser schüttelnd gewaschen. Das Gel wurde über Nacht mit Gelcodeblue-Färbelösung gefärbt. Die Entfärbung wurde in destilliertem Wasser durchgeführt. Das Gel wurde über das Odyssey-System eingescannt.

2.2.37 Färbungs- und Demyelinisierungsexperimente an organotypischen Schnittkulturen (OSCs)

Färbungsexperimente an OSCs sowie Demyelinisierungsexperimente in diesem System wurden mit freundlicher Unterstützung durch Mercedeh Farhat oder Dr. Christine Baksmeier aus unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.

Das System basiert auf organotypischen Schnitten aus dem Kleinhirn transgener Mäuse. Das Kleinhirn der Tiere wird präpariert, sagittal in 400 μ m dicke Schnitte zerteilt und die erhaltenen Schnitte werden auf einem Zellkultureinsatz ausplattiert (s. Abb. 7). Die ausplattierten Schnitte werden über Kulturmedium unterhalb des Zellkultureinsatzes mit Nährstoffen versorgt und können so weiter am Leben erhalten werden. Für eine nähere Beschreibung der Methode s. auch (Baksmeier, 2018). Im Falle von Demyelinisierungsexperimenten wird die Demyelinisierung eingeleitet durch einen Antikörper spezifisch für das Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG), Klon 8-18c5, zusammen mit Komplement. Die Demyelinisierung kann über Fluoreszenzmikroskopie nachverfolgt werden, denn die Mäuse,

aus denen die Schnitte stammen, exprimieren das Grün fluoreszierende Protein (GFP) unter dem Promoter des Myelin-Proteins Proteolipid-Protein (PLP)

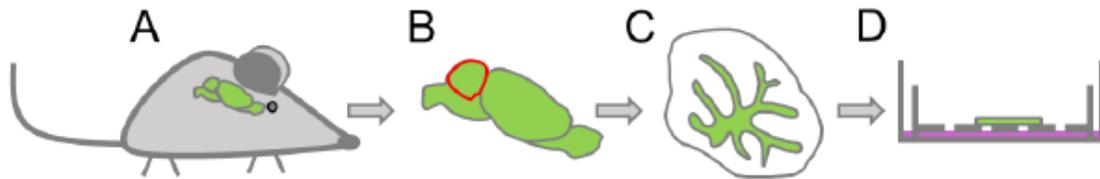


Abb. 7: Schematische Darstellung der Präparation muriner Kleinhirnschnittkulturen (OSC). **A** Transgene Mäuse werden betäubt und enthauptet. **B** Das Kleinhirn wird entfernt (roter Kreis) und in 400 µm dicke, sagittale OSCs geschnitten. **C** Danach werden die noch miteinander verbundenen OSCs unter einem binokularen Mikroskop getrennt. **D** Zellkultureinsätze werden in mit Medium gefüllte Vertiefungen gelegt und die OSCs auf die Einsätze plattiert. Modifiziert aus Baksmeier, 2018.

2.2.38 Indirekte Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz (IIFT) wurde von der Firma Euroimmun mit freundlicher Unterstützung von Swantje Mindorf und Kollegen durchgeführt. Die Proben wurden einerseits an Biochips getestet, die mit HSV-1 oder HSV-2 infizierten, menschlichen Zellen beschichtet worden waren. Auf der anderen Seite wurde die Probenbindung an ein Biochip-Mosaik analysiert, welches verschiedene Gewebe beinhaltet (Hippocampus Ratte, Kleinhirn Ratte, Kleinhirn Affe, Nervus suralis), Darm (Affe), Pankreas (Affe) oder aber Zellkulturzellen, welche rekombinant einzelne, neurologische Antigene überexprimierten (GAD, NMDAR, GABA-B-R, Aquaporin 4, LGI1, CASPR2).

Die Gewebe und Zellen wurden zunächst permeabilisierend fixiert. Liquor oder monoklonale Antikörper wurden 30 min lang bei RT auf dem jeweiligen Biochip inkubiert. Die Biochips wurden 5 min lang bei RT mit PBS-Tween gewaschen und mit einem FITC-konjugierten anti-humanen IgG-Sekundärantikörper oder einem FITC-konjugierten anti-humanen IgM-Sekundärantikörper inkubiert. Anschließend wurden die Biochips gewaschen wie zuvor. Das Gewebe und die Zellen wurden eingedeckelt und für die Mikroskopie an einem Fluoreszenzmikroskop verwendet.

2.2.39 Generierung von Zelllysaten HSV infizierter Zellkulturzellen

Die Generierung von Zelllysaten HSV-infizierter Zellkulturzellen wurde durch die Arbeitsgruppe von Dr. Anne Halenius am Institut für Virologie der Universitätsklinik Freiburg durchgeführt. Vero-Zellen in 6 Well Platten wurden mit HSV-1 oder HSV-2 unter einer Multiplizität der Infektion (*engl.* Multiplicity of infection = MOI) von 0,3 infiziert. Als Kontrolle wurden Vero-Zellen mit einer Deletionsmutante des HSV-1-Stammes infiziert. Drei bis vier Tage nach der Infektion wurden die Zellen durch Abschaben geerntet. Die Zellen wurden mit Zellkulturmedium von der 6 Well Platte abgewaschen und die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und durch

Zentrifugation pelletiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Zellpellet in 200 µl Luciferase-Lysepuffer (Roche) resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei - 80 °C gelagert.

2.2.40 Western Blot

Die in dieser Arbeit präsentierten Western Blot Analysen wurden durch die Arbeitsgruppe von Dr. Anne Halenius am Institut für Virologie der Universitätsklinik Freiburg durchgeführt. Zelllysate HSV infizierter Zellkulturzellen wurden aufgetaut und für 20 min bei 11.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden gesammelt und für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet. Genauer wurden jeweils 13,5 µl Zelllysate für 3 min bei 95 °C mit 1,5 µl Dithiothreitol (DTT)-Denaturierungspuffer inkubiert. 5 µl Western-Blot-Probenpuffer wurden hinzugefügt und die Proben wurden für 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Proben wurden auf ein 12 %-iges SDS-PAGE-Gel aufgetragen und über einen halbtrockenen Transfer auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Membranen wurden mit 1,5 µg/ml rekombinanten monoklonalen Antikörper in TBST für 1 h bei RT und unter Schütteln inkubiert. Die Membranen wurden dreimal mit TBST gewaschen und für 1 h bei RT mit Meerrettichperoxidase-konjugiertem Ziegen-anti-human-Sekundärantikörper inkubiert. Die Membranen wurden drei Mal mit TBST gewaschen. Die Entwicklung der Western Blots erfolgte über Zugabe von SignalFire Plus ECL-Detektionsreagenz. Entwickelte Western Blots wurden mit einem Li-Cor C-diGit-Gerät eingescannt.

2.2.41 Immunpräzipitation

Immunpräzipitationsexperimente wurden durch die Arbeitsgruppe von Dr. Anne Halenius am Institut für Virologie der Universitätsklinik Freiburg durchgeführt. Vero-Zellen wurden in 10 cm Petrischalen mit HSV-1 (Stamm F) bei einem MOI von 0,3 infiziert. Drei Tage nach der Infektion wurden die Zellen mit Medium von der Schale abgespült und zweimal mit PBS gewaschen und durch Zentrifugation pelletiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml NP40-Lysepuffer (140 mM NaCl; 20 mM Tris pH 7,6; 5 mM MgCl₂; 1 % NP40) resuspendiert und für 45 min bei 4 °C rotierend inkubiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 30 min bei 16.000 x g und 4 °C entfernt. 900 µl Lysat wurden jeweils mit 2 µg Antikörper inkubiert. Die Inkubation erfolgte rotierend für 2 h bei 4 °C. Immunkomplexe wurden mit Protein G-Sepharose (GE Healthcare) präzipitiert. Protein G-Sepharose-Beads wurden viermal mit einem Lysepuffer gewaschen, der 0,2 % NP40 enthielt und dessen NaCl-Konzentration von 0,15 M im ersten Waschschrift auf 0,5 M im letzten Waschschrift erhöht wurde. Die Elution der Immunkomplexe von den Beads wurde durch Inkubation der Beads mit 30 µl Glykoprotein-Denaturierungspuffer (NEB) und 16 µl DTT-enthaltendem Probenpuffer für 5 min bei 95 °C durchgeführt. Das Eluat wurde in ein frisches 1,5 ml Röhrchen überführt und bei - 20 °C gelagert. Der Versand nach

Düsseldorf erfolgte bei 4 °C. Die Proben wurden bis zu ihrer Analyse in der Massenspektrometrie bei -20 °C gelagert.

2.2.42 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse erfolgte am Molecular Proteomics Laboratory des BMFZ durch freundliche Unterstützung von Dr. Nina Overbeck. Die Eluate der Immunpräzipitation wurden zum einen über SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung hinsichtlich der Zusammensetzung der Proben analysiert (1/3 der Proben). Zum anderen wurden 2/3 der Proben auf ein präparatives SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bis zum vollständigen Einwandern der Proben ins Gel. Anschließend wurde die einzelne Proteinbande jeder Probe aus dem Gel ausgeschnitten. Es folgte eine in-Gel Reduktion und Alkylierung der Proben sowie ein tryptischer in-Gel Verdau. Die Proteine jeder Probe wurden folgend aus den Gelstücken extrahiert. Jede Probe wurde vor ihrer Analyse im Massenspektrometer 1 h über Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*engl.* High-performance liquid chromatography = HPLC) aufgetrennt und über Elektrosprayionisation (ESI) von der Flüssigphase in die Gasphase überführt. Die Probe wurde anschließend unter Aufnahme von MS1- und MS2-Spektren im Massenspektrometer (Fusion Lumos, Thermo Fisher Scientific) analysiert. Für die nachfolgende Identifizierung der Spektren wurde die Proteome Discoverer 2.3 Software (Thermo Fisher Scientific) verwendet und die SwissProt Datenbank „Viruses, taxonomy 10239, reviewed yes“ genutzt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Rolle des Antikörper Isotyps in Demyelinisierungsprozessen

Die beiden von uns in diesem Experiment untersuchten Antikörper waren zum einen der Myelin Oligodendrozyten Protein (MOG)-spezifische Antikörper, Klon 818c5 (folgend anti-MOG genannt), zum anderen handelte es sich um einen Sulfatid-spezifischen Antikörper, Klon O4 (folgend anti-Sulfatid genannt). Der genannte anti-MOG Antikörper stammt ursprünglich aus der Maus (Linnington, Webb & Woodhams, 1984), wir verwenden in unserem Labor jedoch den humanisierten Antikörper mit humanem IgG1 Schwerekettenisotyp und humanem κ Leichtkettenisotyp. Der Antikörper wird von uns selbst hergestellt und standardmäßig zur Demyelinisierung in unserem *ex vivo* Modell muriner organotypischer Kleinhirnschnittkulturen (OSC = *engl.* organotypic cerebellar slice culture) genutzt. Der beschriebene anti-Sulfatid Antikörper, welcher als Trizol-Lysat eines Hybridoms vorlag, wurde von uns bisher nicht charakterisiert. Er entstammt einer murinen Hybridomzelllinie und besitzt ursprünglich einen murinen IgM Schwerekettenisotyp (Asakura, Miller, Pogulis, Pease & Rodriguez, 1995). *In vivo* Experimente, in welchen die IgM-sezernierenden Hybridomzellen im Ratten-ZNS getestet wurden, zeigten die Demyelinisierungsfähigkeit des anti-Sulfatid Antikörpers (Reyes et al., 2014; Rosenbluth, Schiff, Liang & Dou, 2003).

3.1.1 Herstellung von anti-MOG oder anti-Sulfatid mit IgG Isotyp oder IgM Isotyp

3.1.1.1 Ausgangsvektor für die Klonierung und erzeugte Vektorkonstrukte

Der Ausgangsvektor für die in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungen war der kommerzielle Vektor pVITRO1-dV-IgG1k (Addgene plasmid # 52213). Der Vektor war im Rahmen früherer Arbeiten unserer Forschungsgruppe am Locus des Hygromycin Resistenzgens verändert worden. Das Hygromycin Resistenzgen (hph) war durch ein Fusionsprotein aus einem Blasticidin Resistenzgen und dem Reporter gen GFP ersetzt worden. Ebenfalls waren die variablen Regionen des anti-MOG Antikörpers kloniert worden. Die variable Schwerekettenregion (VH) des anti-MOG wurde hierbei zwischen dem VH Leader-Peptid (VH Leader) und der konstanten IgG Schwerekettenregion (C γ) eingefügt. Die variable Leichtkettenregion (VL) des anti-MOG wurde entsprechend zwischen VL Leader-Peptid (VL Leader) und der konstanten κ Leichtkettenregion (C κ) eingefügt. Die Klonierung erfolgte ohne Verschiebung des Leserahmens. Der entstandene Vektor wird in unserer Arbeitsgruppe standardmäßig für die Herstellung des anti-MOG IgG genutzt, welcher in unserem *ex vivo* Modell muriner organotypischer Kleinhirnschnittkulturen (OSC) zur immunmedierten Demyelinisierung eingesetzt wird. Eine schematische Darstellung des entstandenen modifizierten Ausgangsvektors ist in Abb. 8 zu sehen.

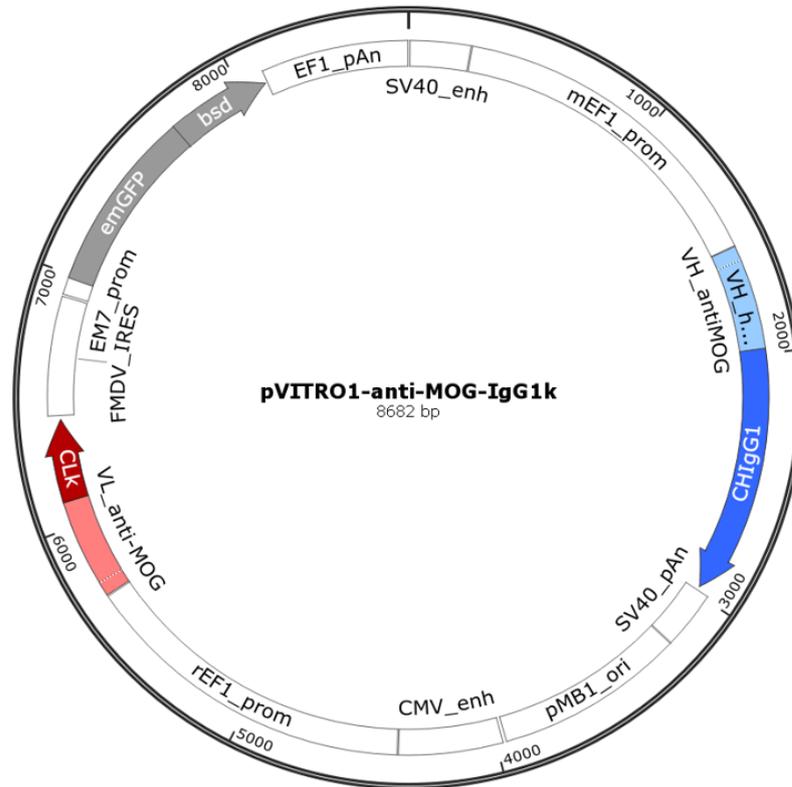


Abb. 8: Modifizierter Ausgangsvektor. Zu sehen ist der in unserem Labor für die Expression des anti-MOG IgG genutzte Expressionsvektor, welcher durch die Modifikation eines kommerziellen Ausgangsvektors erhalten wurde.

Ausgehend von diesem Vektor, habe ich in meiner Arbeit verschiedene Vektorkonstrukte (s. Abb. 9) auf folgende Weise erzeugt: Der anti-Sulfatid mit IgG Isotyp erhielt ich durch die Veränderung des anti-MOG IgG-kodierenden Expressionsvektors. Die variablen Regionen des anti-MOG wurden hierbei durch die variablen Regionen des anti-Sulfatid ersetzt. IgM-kodierende Expressionsvektoren erhielt ich durch Austausch der konstanten IgG Region durch die konstante IgM Region. Eine Expression dieser Vektoren führt voraussichtlich zur Herstellung von IgM Hexameren. Zur Generierung von IgM Pentameren klonierte ich die J-Kette zusätzlich in entsprechende Expressionsvektoren. Alle in Abb. 9 abgebildete Vektorkonstrukte wurden für die Herstellung entsprechender Antikörper über die Transfektion von HEK293 Zellen verwendet. In den folgenden Abschnitten sind die durchgeführten Klonierungen der Vektorkonstrukte detailliert beschrieben.

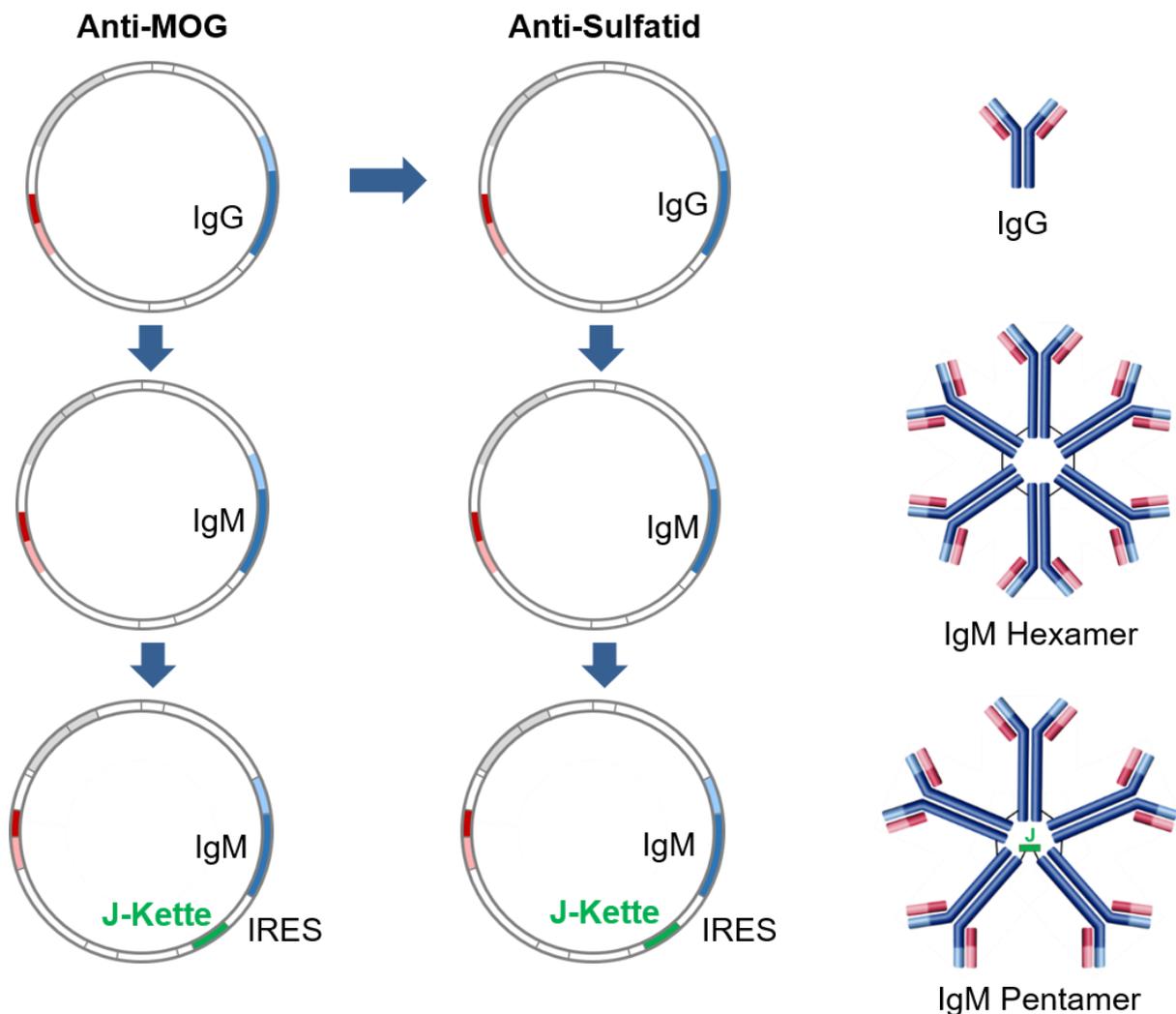


Abb. 9: Übersicht über erzeugte anti-MOG oder anti-Sulfatid kodierende Vektorkonstrukte. Der anti-Sulfatid IgG Expressionsvektor wurde durch Austausch variabler Antikörperregionen des anti-MOG IgG Expressionsvektors erzeugt. IgM kodierende Vektoren wurden durch Austausch der konstanten IgG Region durch die konstante IgM Region erhalten. Zur Herstellung intakter IgM Pentamere wurde in jene Vektoren zusätzlich die J-Kette kloniert.

3.1.1.2 Klonierung von anti-Sulfatid IgG

Die Klonierung von VH und VL des anti-Sulfatid Antikörpers wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Hierfür wurde der anti-MOG IgG Antikörper-kodierende Expressionsvektor durch Polymerase-Kettenreaktionen in zwei Fragmenten amplifiziert. Das CL-Vektorfragment umfasste den Vektorabschnitt vom 5'-Ende der C κ -Region bis zum 3'-Ende des VH Leaders, das CH-Vektorfragment beinhaltete den Vektorabschnitt vom 5'-Ende der C γ -Region bis zum 3'-Ende des CL Leaders. Die cDNA von VH und VL des anti-Sulfatid erhielt ich aus einer den entsprechenden Antikörper sekretierenden Hybridomzelllinie. Die isolierte zelluläre mRNA wurde durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und letztere über PCR amplifiziert. Die PCR Primer erzeugten bei den entstehenden Amplifikons Überhänge, welche spezifisch für die Integrationsstelle auf dem linearisierten Zielvektor waren.

Vektorfragmente und variable Antikörperregionen wurden folgend durch rekombinatorische Klonierung verbunden. Die erhaltenen Konstrukte wurden zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli* genutzt. Bakterielle Kolonien wurden auf das Vorhandensein intakter Zielplasmide hin untersucht. Positiv sequenzierte Kolonien wurden in Form eines Glycerolstocks kryokonserviert.

3.1.1.3 Klonierung von anti-MOG IgM oder anti-Sulfatid IgM

Um anti-MOG und anti-Sulfatid Antikörper jeweils mit IgM Isotyp charakterisieren zu können, erzeugte ich für beide Antikörper IgM Vektorkonstrukte. Die natürlicherweise von IgM Antikörpern gebildeten Pentamerstrukturen sind von der Gegenwart der Joining-Kette (J-Kette) abhängig. Zu diesem Zweck klonierte ich neben den IgM Vektorkonstrukten ohne J-Kette ebenfalls IgM Vektorkonstrukte mit J-Kette. Zur Erzeugung von anti-MOG oder anti-Sulfatid IgM Vektorkonstrukten wurden der anti-MOG IgGk Zielvektor oder der anti-Sulfatid IgGk Zielvektor über PCR linearisiert (s. Abb. 11 oder Abb. 12). Die konstante Region der IgM Schwereketten (C_{μ}) wurde durch eine entsprechend spezifische PCR auf einem weiteren erworbenen Expressionsvektor erhalten. Die J-Kette wurde als synthetisch erzeugter DNA-Strang erworben. Zwischen J-Kette und 3'-Ende der C_{μ} wurde eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES = *engl.* internal ribosomal entry site) eingefügt, um die Translation der J-Kette zu ermöglichen. Die IRES war hierbei identisch zu der im Expressionsvektor bereits vorhandenen IRES zwischen Antikörper Leichtkette und dem Fusionsprotein aus Blasticidin-Resistenzprotein und GFP. Das CL-Vektorfragment, C_{μ} und im Fall von IgM J-Ketten Vektorkonstrukten ebenfalls IRES und J-Kette wurden durch rekombinatorische Klonierung verbunden. Resultierende Vektorkonstrukte wurden zur Transformation von *E. coli* genutzt und bakterielle Kolonien auf das Vorhandensein intakter Zielplasmide hin untersucht. Positive Klone wurden kultiviert und als Glycerolstock kryokonserviert.

Ergebnisse

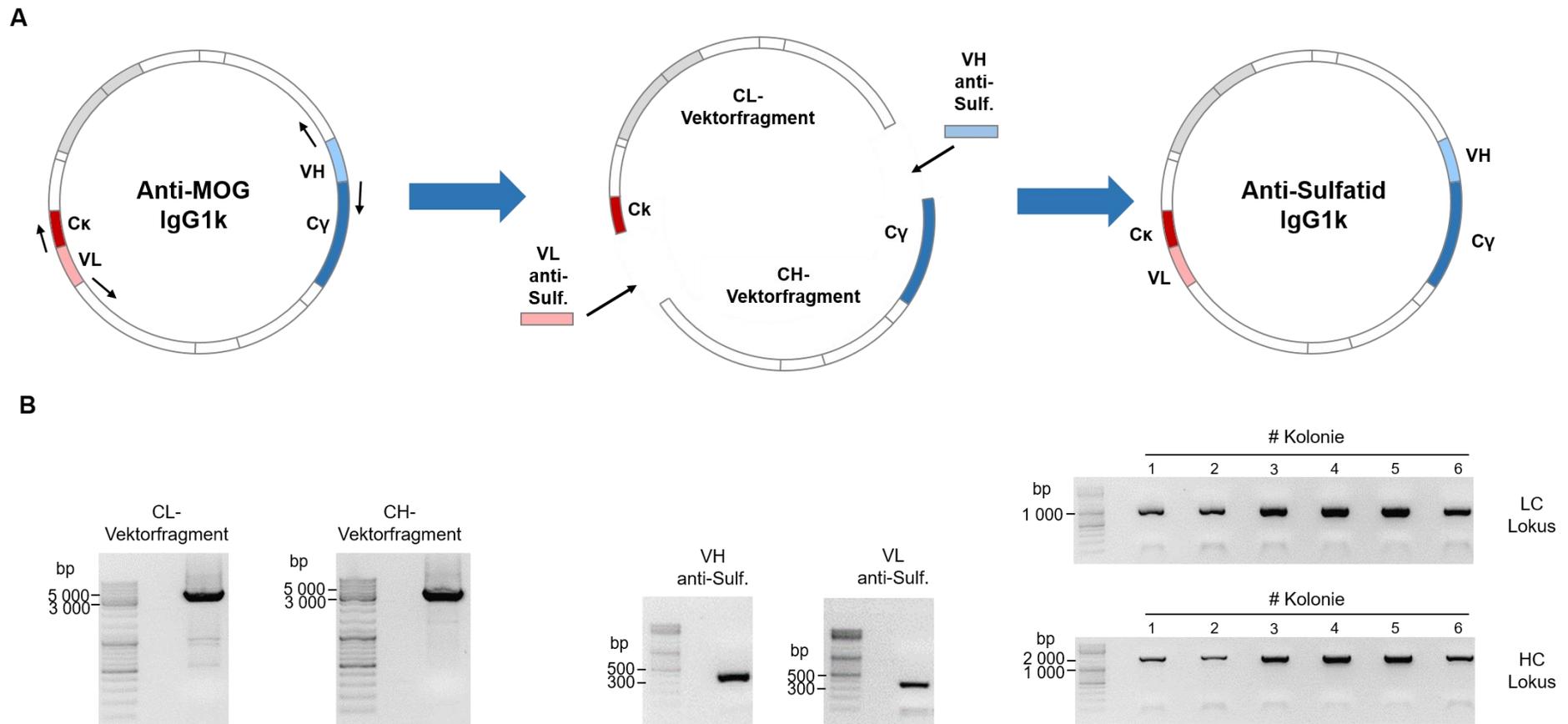


Abb. 10: Klonierungsschema zur Herstellung des anti-Sulfatid IgG Expressionsvektors. A Der anti-MOG IgG Zielvektor wurde unter Ausschluss der anti-MOG VH und VL in zwei Fragmenten linearisiert. VH und VL des anti-Sulfatid wurden durch reverse Transkription von Hybridomzell-mRNA und folgende Antikörper-spezifische PCR erhalten. Sie wurden über rekombinatorische Klonierung mit den beiden Vektorfragmenten verbunden. **B** Die Analyse der durchgeführten Klonierungsschritte über Agarose Gelelektrophorese zeigte für jeden Schritt das Vorliegen von DNA-Fragmenten erwarteter Größen. Bakterielle Klone, welche mit anti-Sulfatid IgG Vektorkonstrukt transformiert waren, wiesen die variablen Antikörperregionen im Zielvektor auf.

Ergebnisse

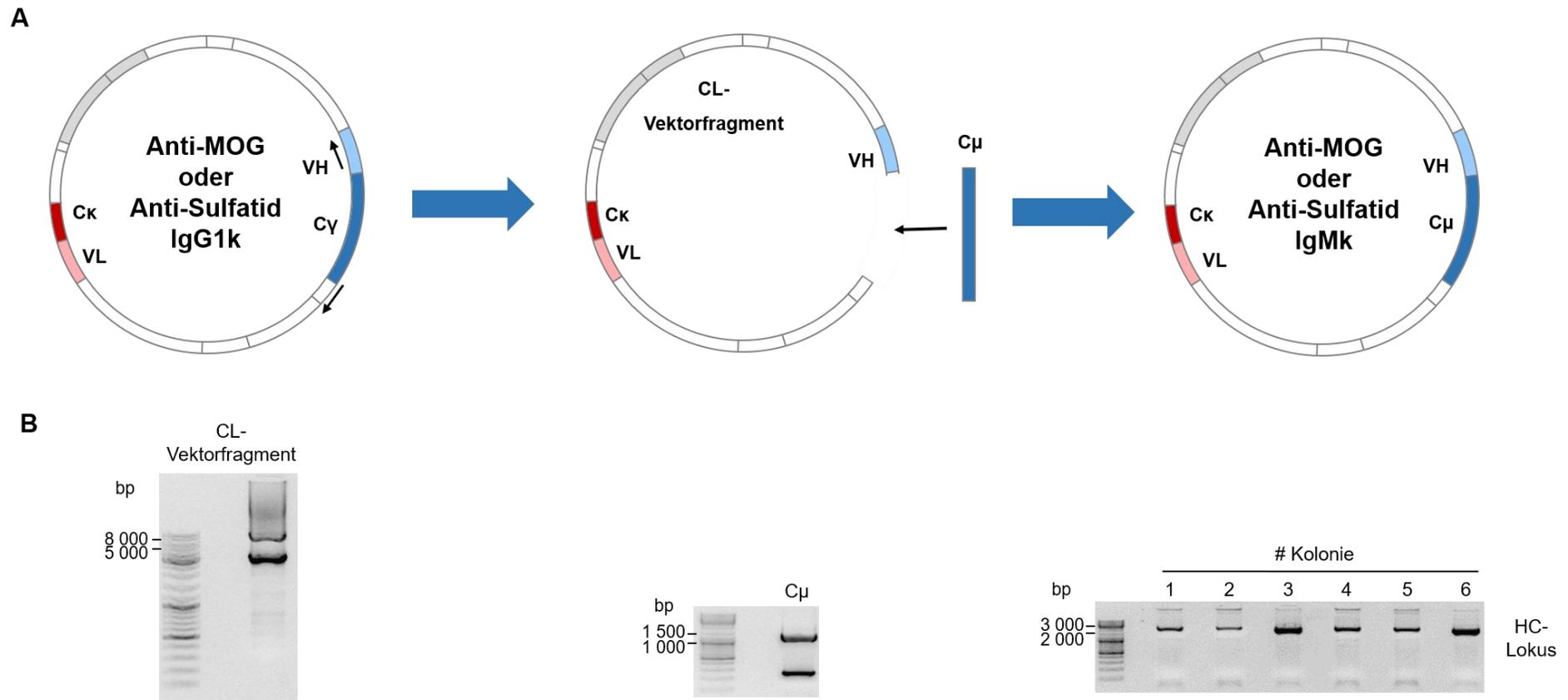


Abb. 11: Klonierungsschema zur Herstellung von anti-MOG oder anti-Sulfatid IgM Expressionsvektoren ohne J-Kette. **A** Das linearisierte CL-Vektorfragment wurde über rekombinatorische Klonierung mit der aus einem weiteren Expressionsvektor amplifizierten $C\mu$ verbunden. **B** Die Analyse der durchgeführten Klonierungsschritte über Agarose Gelelektrophorese zeigte das Vorliegen von DNA-Fragmenten erwarteter Größen. Bakterielle Klone, welche mit einem IgM Vektorkonstrukt transformiert waren, wiesen $C\mu$ im Zielvektor auf.

Ergebnisse

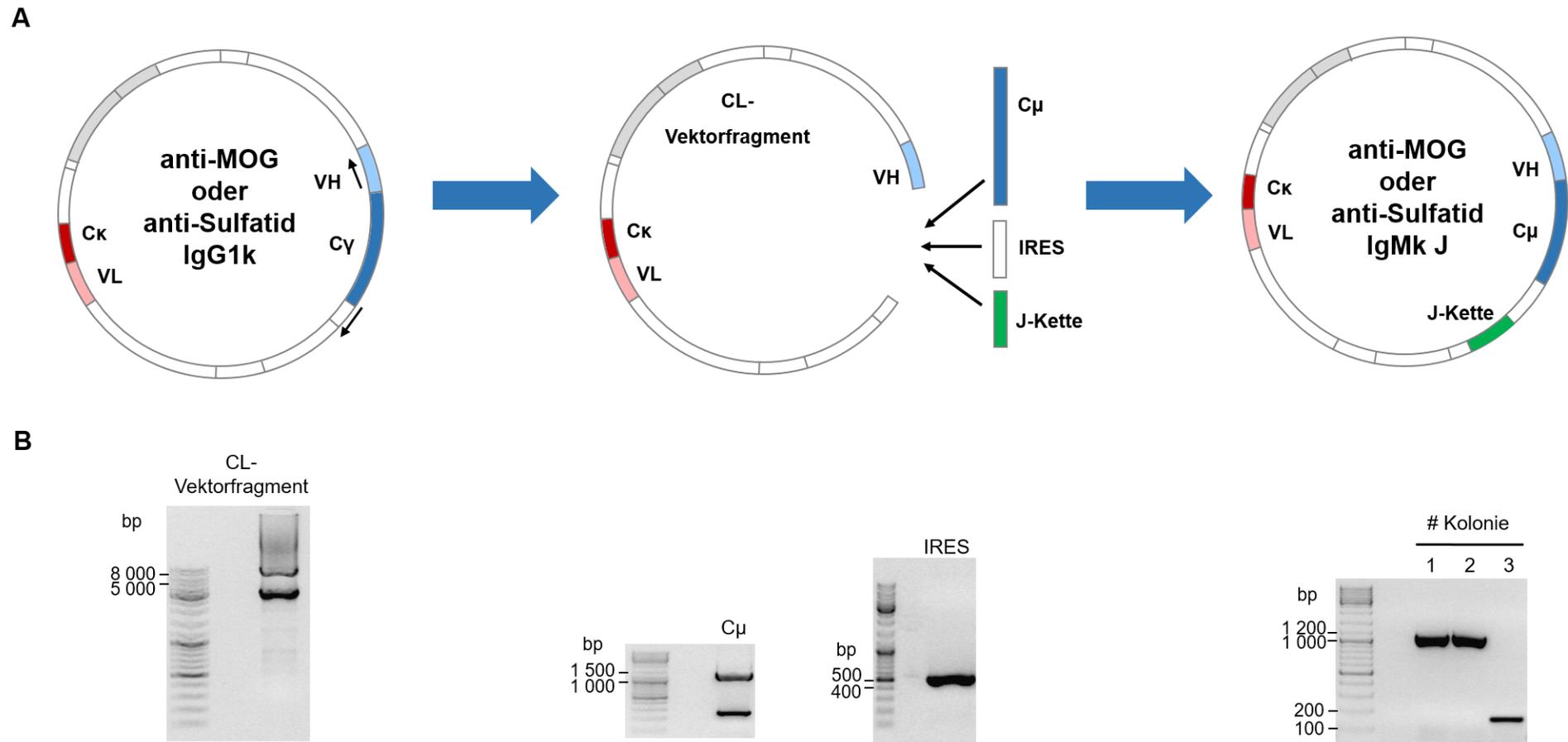


Abb. 12: Klonierungsschema zur Herstellung von anti-MOG oder anti-Sulfatid IgM Expressionsvektoren mit J-Kette. **A** Das linearisierte CL-Vektorfragment wurde über rekombinatorische Klonierung mit der aus einem weiteren Expressionsvektor amplifizierten C μ , sowie der aus ihm selbst amplifizierten IRES und der als DNA-Strang kommerziell erworbenen J-Kette verbunden. **B** Die Analyse der durchgeführten Klonierungsschritte über Agarose Gelelektrophorese zeigte für jeden Schritt das Vorliegen von DNA-Fragmenten erwarteter Größen. Bakterielle Klone, welche mit einem IgM Vektorkonstrukt mit J-Kette transformiert waren, wiesen die J-Kette im Zielvektor auf

3.1.1.4 Rekombinante Expression von anti-MOG IgG oder anti-Sulfatid IgG

Die standardmäßige rekombinante Herstellung von Antikörpern mit IgG Isotyp erfolgt in unserem Labor über die transiente Transfektion adhärenter HEK293 Zellen (Arbeitsablauf s. auch Abb. 26, untere Zeile der Abbildung). Üblicherweise werden HEK293 Zellen in ca. zwanzig T175-Zellkulturflaschen zur Transfektion mit dem Zielvektorkonstrukt genutzt und der Zellkulturüberstand für die Antikörperaufreinigung gesammelt. Antikörper mit IgG Schwerekettenisotyp werden über Protein G HP Säulen (GE Healthcare) und ein ÄKTA FPLC-System aufgereinigt. Die von der Chromatographiesäule eluierten Antikörper werden einem Pufferaustausch gegen PBS unterzogen und mittels Zentrifugations-Filtereinheiten auf ein Volumen von ca. 500 μ l aufkonzentriert. Die qualitative und quantitative Analyse erfolgt über eine SDS-PAGE sowie über eine Messung der Proteinkonzentration im Bicinchoninsäure Assay. Für anti-MOG und anti-Sulfatid IgG Antikörper erfolgte die Produktion und Aufreinigung auf dem beschriebenen Wege. Eine exemplarische SDS-PAGE Analyse der beiden Antikörper nach ihrer Produktion und Aufreinigung ist in Abb. 13 zu sehen.

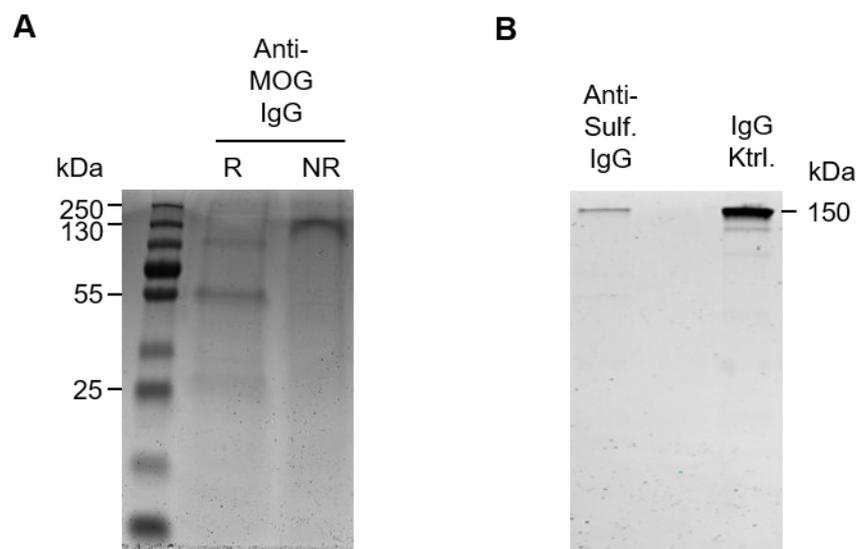


Abb. 13: Qualitative Analyse von rekombinant produziertem monoklonalem anti-MOG oder anti-Sulfatid IgG über SDS-PAGE. A 2 μ g anti-MOG IgG wurden jeweils reduziert (R) oder nicht reduziert (NR) zur Analyse genutzt. B Ca. 1 μ g anti-Sulfatid IgG bzw. 3 μ g einer IgG Kontrolle (IgG Ktrl.) wurden zur Analyse genutzt.

3.1.1.5 Rekombinante Expression von anti-MOG IgM oder anti-Sulfatid IgM

Für anti-MOG IgM oder anti-Sulfatid IgM erfolgte die Produktion analog zur rekombinanten Herstellung monoklonaler IgG Antikörper. Für jedes IgM Vektorkonstrukt wurden HEK293 Zellen in ca. zwanzig T175 Zellkulturflaschen transient mit den entsprechenden Vektorkonstrukten transfiziert. Zunächst erfolgte die Produktion von anti-MOG IgM sowie eine

Aufreinigung des Antikörpers aus dem Zellkulturüberstand mittels HiTrap Chromatographiematerial. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerprotokoll. Im Elutionschromatogramm markierte die Abnahme der Leitfähigkeit den Elutionsprozess (s. Abb. 15 **A**). Innerhalb dieses Bereiches war ein Peak in der Absorptionskurve erkennbar, welcher die Elution von Protein andeutet. Eluierte Fraktionen wurden aufgefangen und durch Pufferaustausch gegen PBS sowie Aufkonzentrierung aufbereitet. Die Analyse der Probe über SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen (s. Abb. 15 **B**) zeigt das vorrangige Vorliegen von Banden mit einer Größe von ca. 100 kDa und 110 kDa. Die erwarteten Signale für die IgM Schwereketten bei 75 kDa oder die κ Leichtkette bei 25 kDa

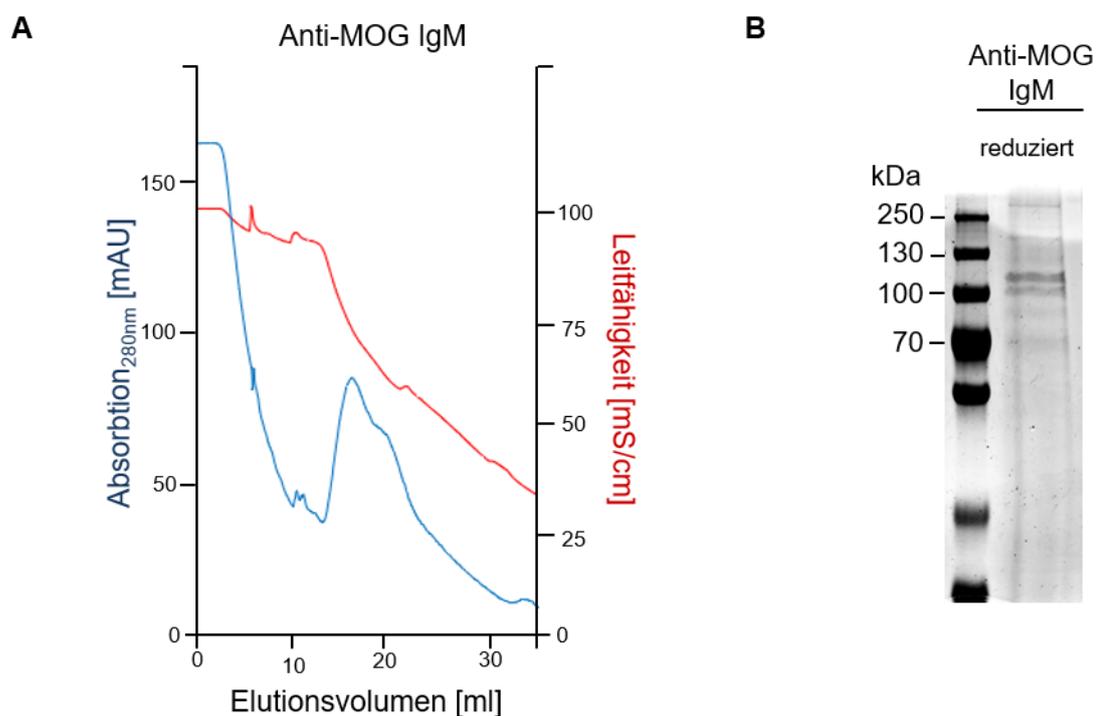


Abb. 14: Pilotaufreinigung von anti-MOG IgM mittels HiTrap Material und Analyse der aufgereinigten Probe über reduzierende SDS-PAGE. **A** Anti-MOG wurde aus dem Zellkulturüberstand von HEK293 Zellen mittels HiTrap Chromatographiematerial aufgereinigt. Die Abnahme der Leitfähigkeit (rot) markiert den Elutionsprozess. Innerhalb des Elutionsprozesses ist ein Peak in der Absorptionskurve (blau) erkennbar, der die Elution von Protein andeutet. **B** 1 μ g des aufgereinigten anti-MOG wurde im Gel analysiert. Es lassen sich keine Banden im erwarteten Größenbereich für die IgM Schwereketten (75 kDa) oder für die κ Leichtkette erkennen. Stattdessen zeigen sich Banden unerwarteter Größen im Bereich von 100 kDa und 110 kDa.

3.1.2 Identifikation einer geeigneten IgM Aufreinigungsmethode

Die Aufreinigung rekombinanter monoklonaler IgG Antikörper aus Zellkulturüberstand war in unserem Labor eine standardisierte Methode, dahingegen war die Aufreinigung von rekombinant erzeugten monoklonalen IgM Antikörpern in unserem Labor nicht etabliert. Die Austestung verschiedener Methoden zur Aufreinigung rekombinanter IgM Antikörper war ein methodischer Schwerpunkt meiner Doktorarbeit und wird im Folgenden beschrieben.

Es wurden fünf verschiedene Methoden zur Aufreinigung von IgM Antikörpern evaluiert. Zunächst wurden die Methoden hinsichtlich ihrer Fähigkeit getestet polyklonale IgM Pentamere und Hexamere in intakter Form aufzureinigen. Ich bestimmte hierbei ebenfalls die quantitative Ausbeute der verschiedenen IgM Aufreinigungsmethoden. Im nächsten Schritt testete ich die evaluierten Methoden hinsichtlich ihrer Fähigkeit die in unserem Expressionssystem produzierten monoklonalen IgM Antikörper anti-MOG IgM oder anti-Sulfatid IgM aus HEK293 Zellkulturüberstand aufzureinigen.

3.1.2.1 Evaluation von fünf Methoden in der Aufreinigung von polyklonalem IgM

Zunächst untersuchte ich, inwieweit verschiedene IgM Aufreinigungsmethoden zu einer Aufreinigung intakter IgM Pentamere in der Lage waren und wie effektiv sich die Methoden in diesem Zusammenhang zeigten. Es wurden fünf verschiedene Methoden zur Aufreinigung von kommerziellem IgM evaluiert (s. Abb. 15). Bei der kommerziellen IgM Probe handelte es sich um aufgereinigtes polyklonales IgM aus menschlichem Serum, welches ausschließlich IgM Pentamere und IgM Hexamere enthielt. Die Intaktheit der IgM Oligomere in der erworbenen Probe ist besonders gut über eine Analyse der Probe über native PAGE nachzuvollziehen (s. „IgM Kontrolle“ in Abb. 17). Bei den fünf zur IgM Aufreinigung evaluierten Methoden handelte es sich um vier affinitätschromatographische Methoden (Abb. 15 a-d) und ein Filtrationsverfahren (Abb. 15 e), bei welchem IgM Antikörper in einer Probe über eine Membran mit einer Ausschlussgrenze (MWCO = *engl.* molecular weight cutoff) von 300 kDa aufkonzentriert werden. Zur Aufreinigung wurden jeweils zwischen 0,8 – 1,1 mg IgM in Puffer verwendet.

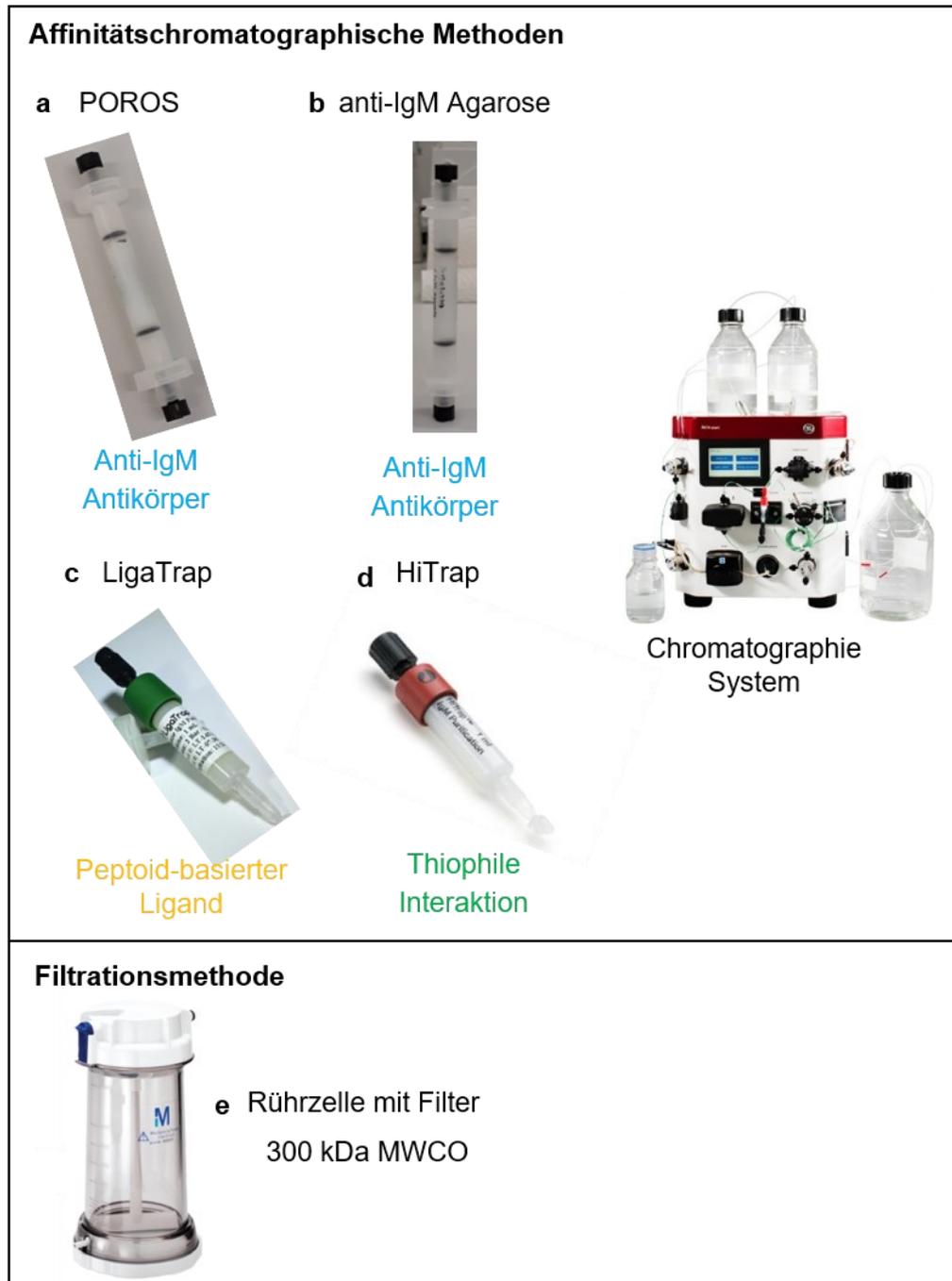


Abb. 15: Übersicht über die evaluierten IgM Aufreinigungsmethoden. Die Aufreinigungen erfolgten über Affinitätschromatographie mit losen Chromatographiemedien, welche in Leersäulen gepackt worden waren (a, b) oder über vorgepackte Affinitätschromatographiesäulen (c, d). Eine weitere Methode, welche zur Aufreinigung genutzt wurde, war die Aufkonzentrierung IgM-enhaltender Proben mittels Filtration (300 kDa MWCO) durch eine Rührzelle (e). Informationen über die verschiedenen Prinzipien der affinitätschromatographischen Methoden sind in farbig dargestellt.

Je nach Aufreinigungsmethode, sind unterschiedliche Puffer zum Waschen des Chromatographiematerials vor und nach dem Probenauftrag nötig. Entscheidend für den Erfolg und die Effektivität der Aufreinigungen sind jedoch vor allem die in der Elution verwendeten Puffer. In

Tab. 27 ist eine Übersicht über die für die jeweiligen IgM Aufreinigungsmethoden Elutionsprinzipien und den genutzten Elutionspuffern dargestellt.

Tab. 27: Übersicht über die Elutionsprinzipien für die evaluierten IgM Aufreinigungsmethoden und tatsächlich genutzte Elutionspuffer.

Aufreinigungsmethode	Elutionsprinzip	Elutionspuffer
POROS	Durch Säure, pH 3.5	1 M Arginin, 2 M MgCl ₂ , pH 3.5 (Hennicke et al., 2017)
Anti-IgM Agarose	Durch Säure, pH 2.7 Oder: Durch Veränderung der Ionenstärke	0.2 M Glycin, pH 2.7 Oder: 3 M NaSCN in PBS, pH 6.3
LigaTrap	Durch Säure, pH 4	0.1 M Natriumacetat, pH 4
HiTrap	Durch Veränderung der Ionenstärke	20 mM Natriumphosphat, pH 7.5
Rührzelle mit 300 kDa MWCO Filter		-

Die Elutionschromatogramme der mit verschiedenen Methoden durchgeführten Aufreinigungen sind in Abb. 16 zu sehen. Hierbei war für Aufreinigungen mittels LigaTrap oder HiTrap Material ein Elutionspeak erkennbar, bei Aufreinigungen mit POROS-Material oder anti-IgM Agarose ließ sich unerwarteterweise kein Elutionspeak beobachten. Nach den jeweiligen Aufreinigungen wurden die eluierten Antikörperlösungen einem Pufferaustausch gegen PBS unterzogen und die Proben auf ein Volumen von ca. 500 µl aufkonzentriert. Die Proben wurden mittels nativer Polyakrylamid-Gelelektrophorese auf das Vorliegen intakter IgM Pentamere und Hexamere untersucht (s. Abb. 17). Die Konzentrationsmessung von Gesamtprotein in den jeweiligen Proben erfolgte über BCA, die IgM Probenkonzentration wurde durch einen IgM ELISA bestimmt.

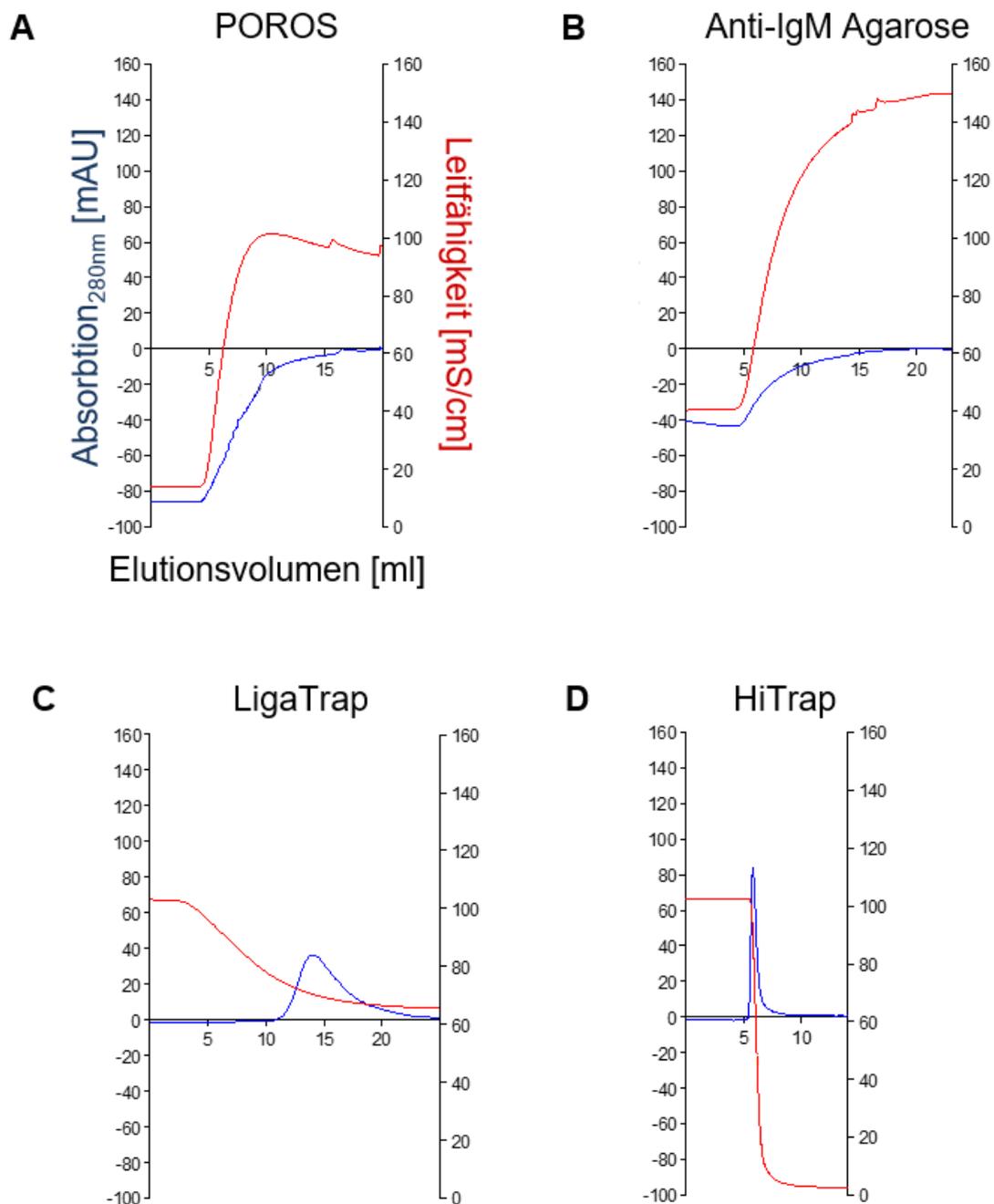


Abb. 16: Elutionschromatogramme der Aufreinigungen von polyklonalem IgM mittels vier Affinitätschromatographischer Methoden. Zu sehen sind Ausschnitte der Aufreinigungen, welche den jeweiligen Elutionsprozess abbilden. Der Anstieg (A, B) oder Abfall (C, D) der Leitfähigkeitskurve (rote Kurve) zeigte den Wechsel von Waschpuffer zu Elutionspuffer an. Die Kurve der Absorption bei 280 nm (blaue Kurve) zeigte die Detektion von eluiertem Protein an. Die Elution von Protein in Form eines Peaks war für Aufreinigungen mit LigaTrap- oder HiTrap-Material (C, D) deutlich erkennbar. Für die Elution von Protein in der Aufreinigung mit POROS-Material oder anti-IgM Agarose ließ sich kein Peak beobachten.

In der Analyse über native PAGE zeigten sich für das als Kontrolle aufgetragene polyklonale IgM (nicht aufgereinigt) zwei Banden. Die Proteinbande im Bereich von 1000 kDa entsprach dem in der Probe vorhandenen IgM Pentamer, die Bande bei ca. 1300 kDa entsprach dem in der Probe vorhandenen IgM Hexamer. Gleiche Signale ließen sich auch für die

Antikörperlösungen aller Aufreinigungsmethoden erkennen. Keine der Proben zeigte weitere Proteinbanden (66 kDa – 1000 kDa).

Um die verschiedenen IgM-Aufreinigungsmethoden quantitativ auf ihre Ausbeute hin zu untersuchen, wurde die IgM Gesamtmenge der Proben aus den gemessenen Konzentrationen für Gesamtprotein (BCA) sowie IgM (IgM ELISA) und den jeweiligen Probenvolumina errechnet. Aus dem Verhältnis von aufgereinigtem IgM zu in der jeweiligen Aufreinigung eingesetztem IgM wurden die Ausbeuten der verschiedenen Aufreinigungsmethoden bestimmt (s. Tab. 28).

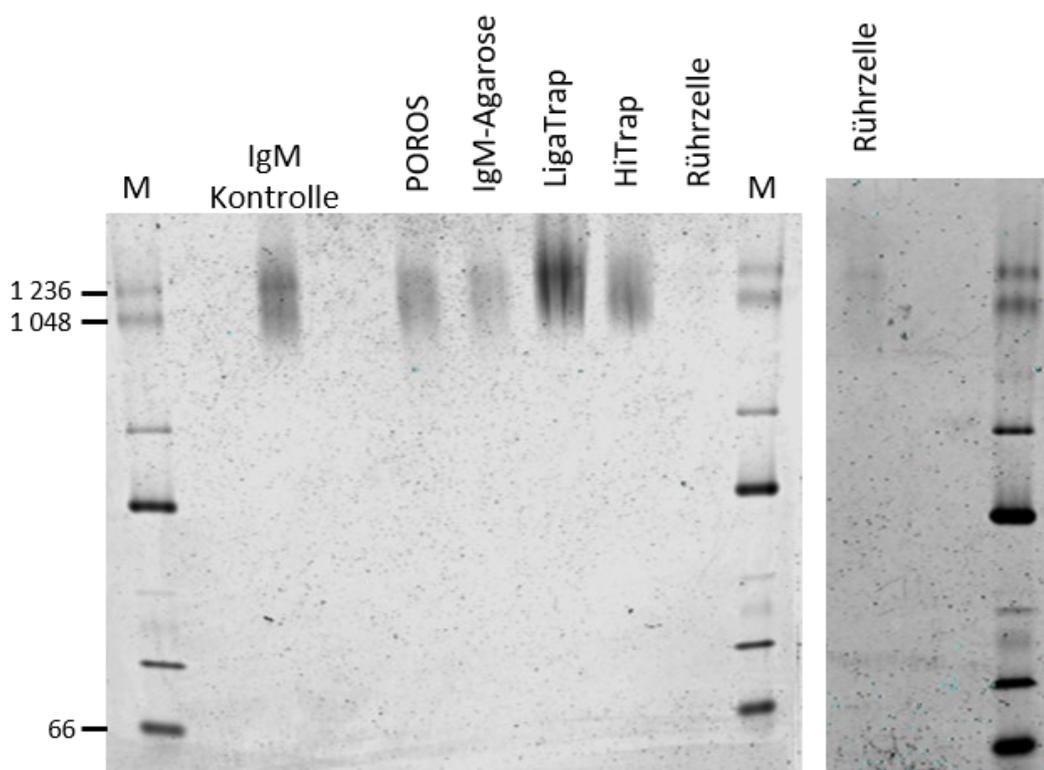


Abb. 17: Qualitative Analyse der Aufreinigungen von polyklonalem IgM mittels fünf verschiedener IgM-Aufreinigungsmethoden über native PAGE. Aufgetragen wurden die durch verschiedene Aufreinigungsmethoden erhaltenen IgM Antikörperlösungen. Die Menge an aufgetragenem IgM in den verschiedenen Proben variierte. Es wurden 6 µg von unbehandeltem polyklonalem IgM (IgM Kontrolle) aufgetragen, welches auch für die Aufreinigungsexperimente verwendet worden war.

Es ließ sich beobachten, dass die Ausbeuten zwischen 29,5 % und 1,8 % schwankten. Am effektivsten zeigte sich das LigaTrap Material (29,5 %), gefolgt vom POROS Material (25,7 %). Das HiTrap Material zeigte eine im Vergleich dazu deutlich verringerte Ausbeute (10,2 %). Am wenigsten effektiv zeigten sich anti-IgM Agarose (2,3 %) und Rührzelle (1,8 %). Anhand der Ergebnisse der qualitativen und quantitativen Analysen der verschiedenen IgM-Aufreinigungsmethoden ließ sich erkennen, dass alle genutzten Aufreinigungsmethoden in der Lage waren, strukturell intaktes IgM Pentamer sowie IgM Hexamer aufzureinigen. Quantitativ gesehen zeigte sich das LigaTrap Material am effektivsten.

Tab. 28: Ausbeuten der verschiedenen IgM-Aufreinigungsmethoden in ihrer Testung mit polyklonalem IgM.

Aufreinigungsmethode	% Input
LigaTrap	29,5
POROS	25,7
HiTrap	10,2
anti-IgM Agarose	2,3
Rührzelle	1,8

3.1.2.2 Evaluation von POROS, LigaTrap oder HiTrap Materialien zur Aufreinigung monoklonaler IgMs aus HEK293 Zellkulturüberstand

Im vorherigen Experiment waren die Chromatographiematerialien POROS, LigaTrap und HiTrap als besonders effizient in der Aufreinigung von polyklonalem IgM identifiziert worden. Aus diesem Grund wurden jene Medien nun hinsichtlich ihrer Fähigkeit analysiert, rekombinant produziertes monoklonales IgM (anti-MOG oder anti-Sulfatid) aus HEK293 Zellkulturüberstand aufzureinigen. Zur Produktion der rekombinanten Antikörper waren IgM Vektorkonstrukte ohne J-Kette oder mit J-Kette genutzt worden.

Für die jeweiligen Aufreinigungsmethoden wurden die Bedingungen so gewählt, wie sie im Rahmen der Aufreinigung von polyklonalem IgM verwendet worden waren. Üblicherweise wurden 1-2 L HEK293 Zellkulturüberstand für die jeweiligen Aufreinigungen verwendet. Die Elutionschromatogramme der verschiedenen Aufreinigungen sind in Abb. 18 zu sehen. Für jede durchgeführte Aufreinigung zeigte sich hierbei ein Elutionspeak unterschiedlicher Höhe, wobei der Peak für die Aufreinigung mittels POROS Material eine besonders starke Intensität aufwies im Vergleich zu den beiden weiteren Elutionspeaks (LigaTrap, Hitrap). Die qualitative Analyse der aufgereinigten Antikörperlösungen erfolgte über denaturierende, reduzierende Polyakrylamid-Gelelektrophorese oder über native PAGE (s. Abb. 19 A oder B). Das Vorliegen von IgM Schwereketten oder k Leichtketten in der Probe konnte besonders gut durch erstere Methode beobachtet werden.

In den durchgeführten PAGE Analysen ließen sich für keine der getesteten Aufreinigungsmethoden Proteinbanden für das IgM Pentamer oder IgM Hexamer beobachten (s. Abb. 19 A). Die Aufreinigungsmethoden mit POROS, LigaTrap oder HiTrap Material zeigten in der nativen PAGE entweder keine distinkten Proteinbanden (POROS) oder mehrere

Proteinbanden unerwarteter Größe (LigaTrap, HiTrap in Abb. 19 A). In der reduzierenden SDS-PAGE zeigten sich für die verschiedenen Proben diverse Banden unterschiedlicher Größen (s. Abb. 19 B). Signale, welche im Größenbereich einer IgM Schwereketten oder k Leichtketten liegen, waren in diesen Proben vorhanden, ein Rückschluss auf das tatsächliche Vorliegen der Ketten war jedoch nicht möglich.

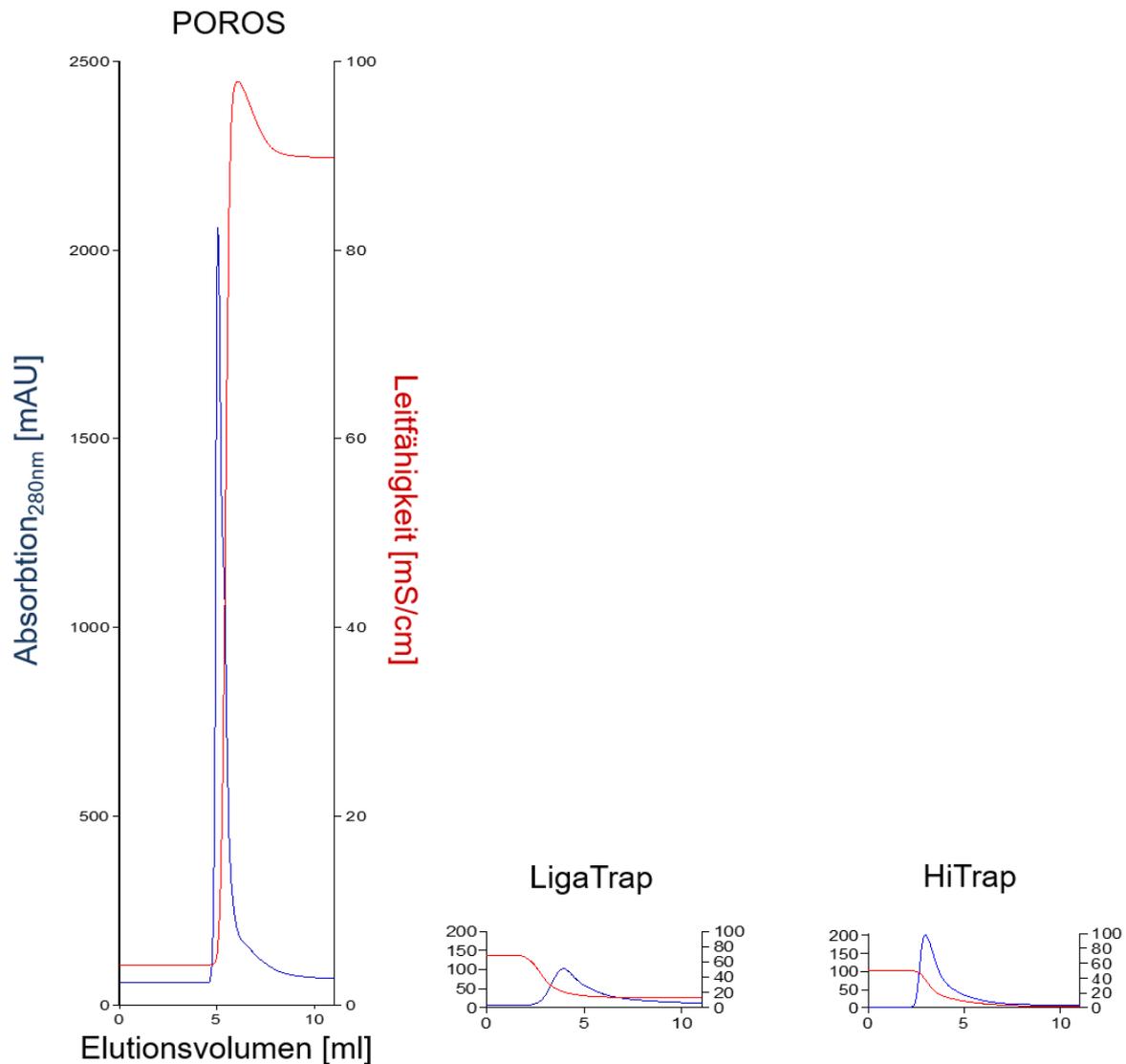


Abb. 18: Elutionschromatogramme der Aufreinigungen von anti-MOG IgM oder anti-Sulfatid IgM aus Zellkulturüberstand mittels LigaTrap, POROS oder HiTrap Material. Zu sehen sind Ausschnitte der Aufreinigungen, welche den jeweiligen Elutionsprozess abbilden. Der Anstieg (POROS) oder Abfall (LigaTrap, HiTrap) der Leitfähigkeitskurve (rote Kurve) zeigte den Wechsel von Waschpuffer zu Elutionspuffer an. Die Kurve der Absorption bei 280 nm (blaue Kurve) zeigte die Detektion von eluiertem Protein an. Die Elution von Protein in Form eines Peaks war für alle gezeigten Aufreinigungen deutlich erkennbar. Der Peak, welcher in der Aufreinigung mittels POROS Material erhalten wurde, zeigte eine im Verhältnis zu den beiden anderen Elutionspeaks besonders hohe Intensität.

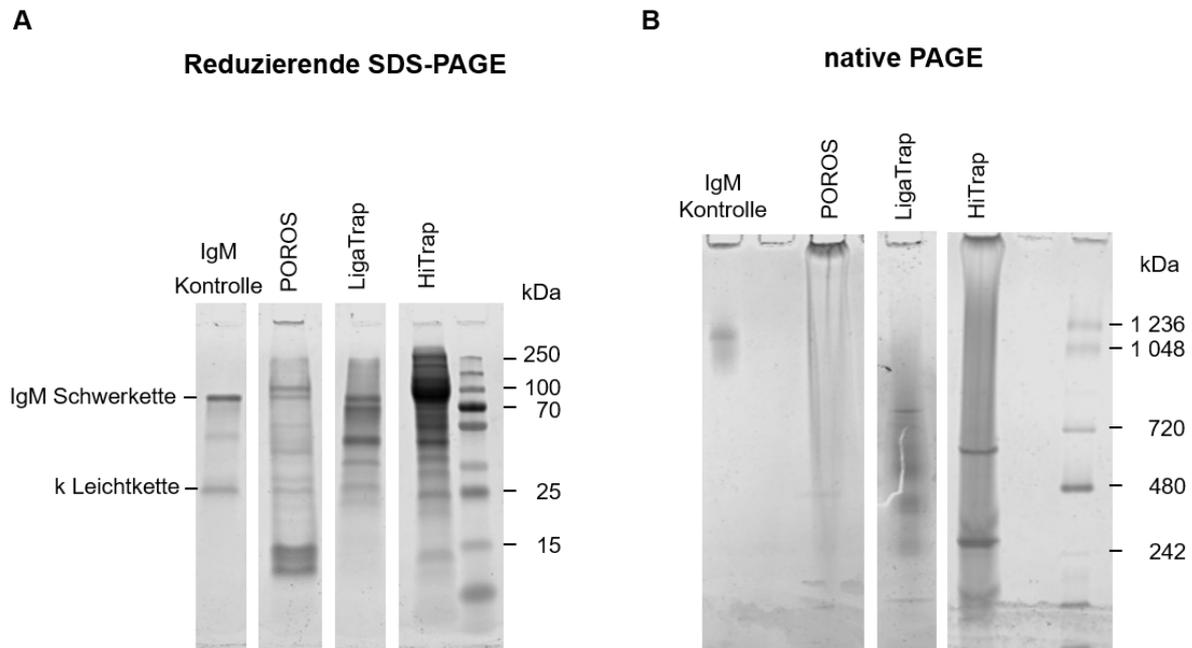


Abb. 19: Qualitative Analysen von mit POROS, Ligatrap oder HiTrap aufgereinigtem anti-MOG IgM oder anti-Sulfatid IgM über PAGE. **A** Reduzierende SDS-PAGE. Die mittels POROS, LigaTrap oder HiTrap aufgereinigten IgM Proben zeigten jeweils diverse Banden. Erwartete Banden für die IgM Schwereketten (ca. 75 kDa) sowie die k Leichtketten (ca. 25 kDa) waren in den jeweiligen Proben weder distinkt erkennbar, noch gegenüber anderen Banden in ihrer Intensität dominant. **B** Native PAGE. Aufreinigungen mit dem POROS Material zeigten keine distinkten Proteinbanden. Bei Aufreinigungen mit LigaTrap oder HiTrap Material zeigten sich verschiedene Banden, welche nicht im Größenbereich eines IgM Pentamers oder Hexamers lagen.

3.1.2.3 Aufreinigung monoklonaler IgMs mittels anti-IgM Agarose

Da die Aufreinigung rekombinant produzierter monoklonaler IgM Antikörper mittels LigaTrap, POROS und HiTrap weder intaktes IgM Pentamer oder Hexamer ergab, noch in der Lage war IgM in reiner Form aus dem Zellkulturüberstand aufzureinigen, testete ich in diesem Zusammenhang zuletzt die hinsichtlich ihrer Aufreinigungsausbeute schwächere anti-IgM Agarose. Zur Aufreinigung wurde je ca. 1,5 L anti-MOG IgM oder anti-Sulfatid IgM beinhaltender Zellkulturüberstand verwendet. Eine Besonderheit bei der Aufreinigung von anti-MOG IgM bestand hierbei darin, dass statt dem bisher verwendeten Elutionspuffer 3 M NaSCN in PBS der vom Hersteller der anti-IgM Agarose ebenfalls empfohlene Puffer 0,2 M Glycin 0,15 M NaCl pH 2,4 verwendet wurde. Aufgereinigte Antikörperlösungen wurden in denaturierender reduzierender PAGE sowie in nativer PAGE untersucht.

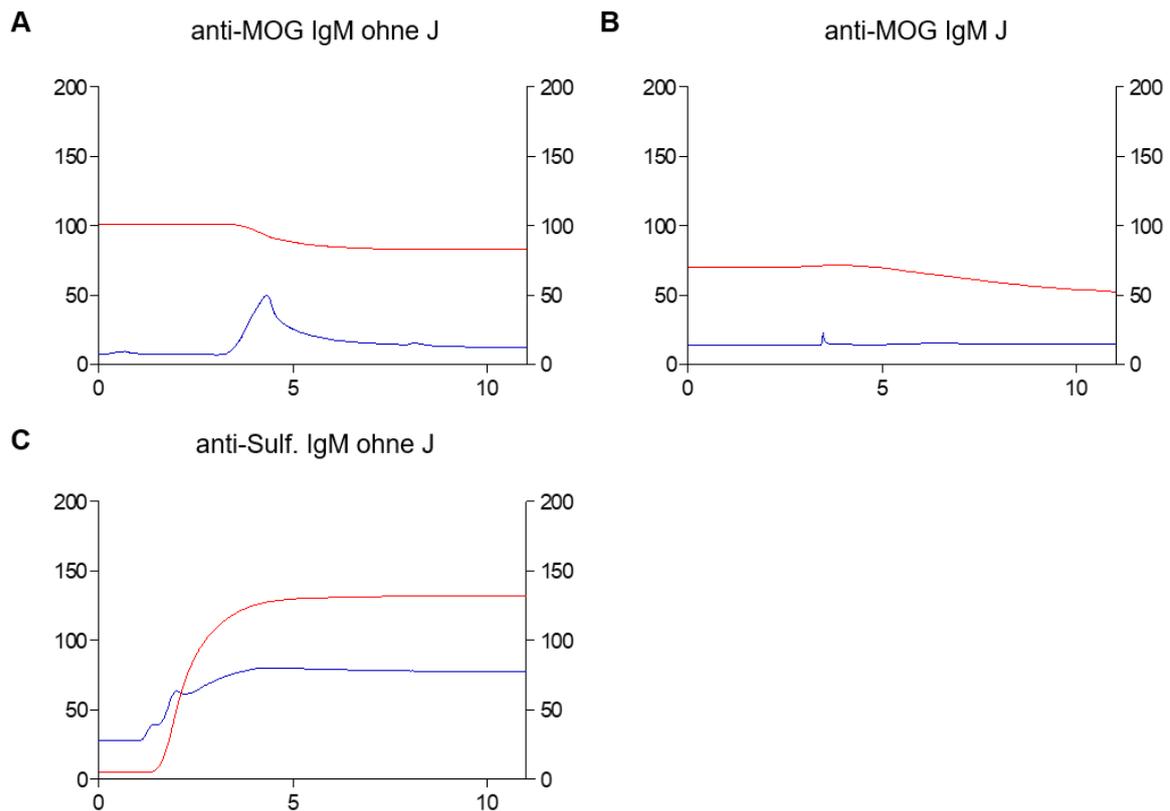


Abb. 20: Elutionschromatogramme der Aufreinigungen von anti-MOG IgM oder anti-Sulfatid IgM aus Zellkulturüberstand mittels anti-IgM Agarose. Dargestellt sind Ausschnitte der Aufreinigungen, welche den jeweiligen Elutionsprozess abbilden. Der Anstieg (C) oder Abfall (A,B) der Leitfähigkeitskurve (rote Kurve) zeigte den Wechsel von Waschpuffer zu Elutionspuffer an. Die Kurve der Absorption bei 280 nm (blaue Kurve) zeigte die Detektion von eluiertem Protein an. Die Elution von Protein in Form eines Peaks war für die Aufreinigung von anti-MOG IgM deutlich erkennbar (A). Der Peak in der Elution von anti-MOG IgM mit J-Kette zeigte eine geringe Intensität (B). Bei der Aufreinigung von anti-Sulfatid IgM zeigten sich zwei schwache Peaks innerhalb des Anstiegs der Absorptionskurve. Letzterer Anstieg war durch die unterschiedliche Absorption von Waschpuffer und Elutionspuffer bedingt.

Die Elutionschromatogramme der jeweiligen Aufreinigungen sind in Abb. 20 zu sehen. Für die Aufreinigungen des anti-MOG IgM sowie des anti-Sulfatid IgM waren Elutionspeaks erkennbar, die Elution des anti-MOG IgM mit J-Kette erzielte einen Peak von sehr schwacher Intensität. Die Analyse der aufgereinigten Antikörper über reduzierende denaturierende PAGE zeigte, dass die anti-IgM Agarose in der Lage waren die rekombinanten IgM Antikörper in reiner Form aus dem HEK293 Zellkulturüberstand aufzureinigen (Abb. 21 A). Die native PAGE Analyse zeigte dominierende Signale für Proteine mit einer Größe von 500 kDa und 250 kDa (anti-MOG IgM, Abb. 21 B oben) oder von 600 kDa und 300 kDa (anti-Sulfatid IgM, Abb. 21 B unten). Darüber hinaus ließen sich bei beiden Antikörpern auch schwache Banden im Größenbereich des erwarteten IgM Pentamer bzw. Hexamer erkennen.

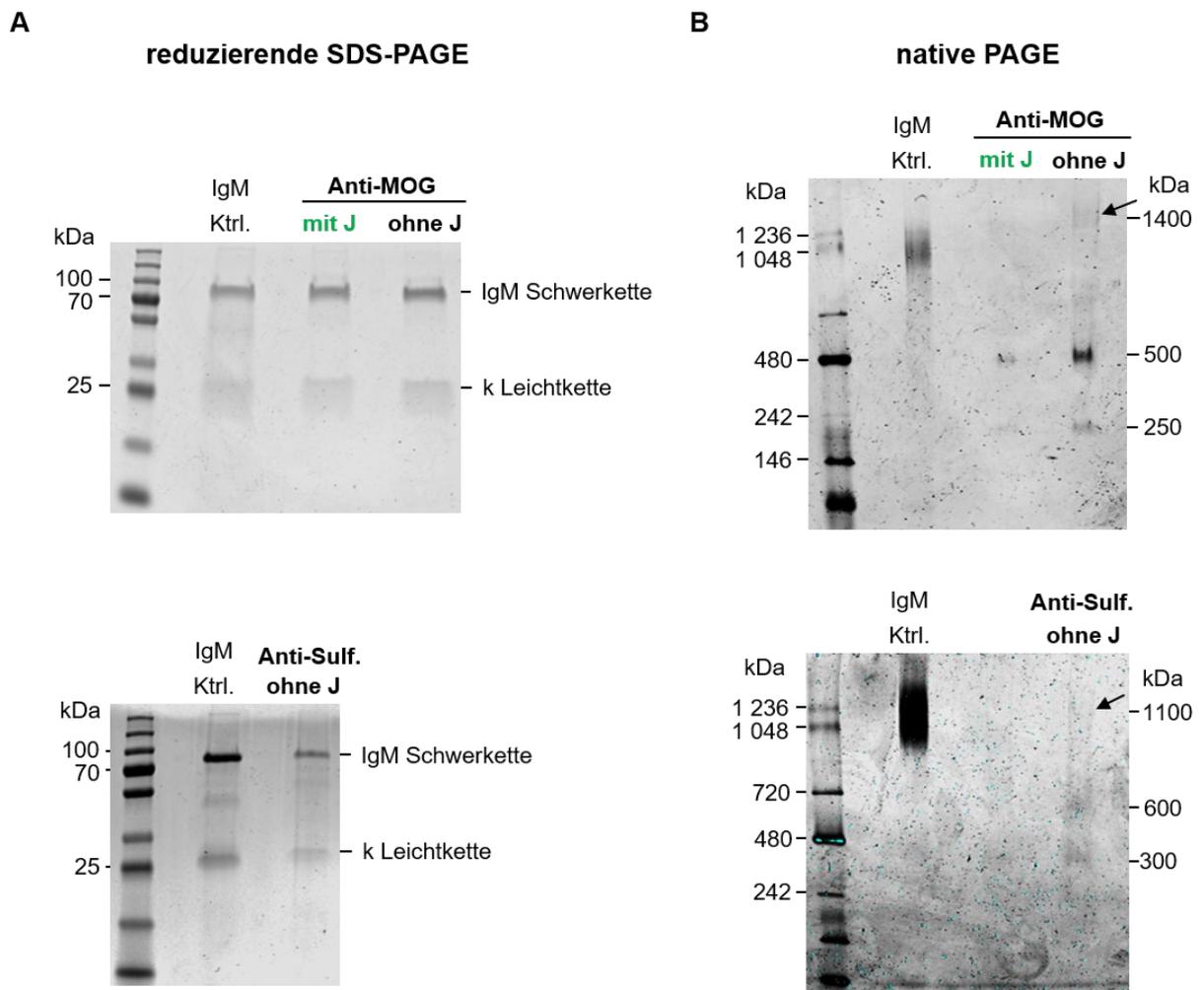


Abb. 21: Analysen von anti-MOG IgM oder anti-Sulfatid IgM aufgereinigt mit Anti-IgM Agarose über denaturierende, reduzierende PAGE (A) oder native PAGE (B). **A** Beide aufgereinigten anti-MOG Proben sowie der anti-Sulfatid zeigte Signale, die der Größe von IgM Schwereketten (ca. 75 kDa) oder der k Leichtkette (ca. 25 kDa) entsprechen könnten. Alle drei Proben zeigten keine zusätzlichen Proteinbanden. **B (oben)** anti-MOG IgM Antikörper mit J-Kette oder ohne J-Kette zeigten Proteinbanden im Bereich von 500 kDa und 250 kDa. Zusätzlich hierzu zeigte anti-MOG IgM ohne J ein schwaches Signal bei 1400 kDa. **B (unten)** Der anti-Sulfatid IgM zeigte schwache Proteinbanden bei ca. 600 kDa und 300 kDa und ein weiteres schwaches Signal bei 1100 kDa. **A, B** In denaturierenden Gelen wurden jeweils 3 µg der gleichen IgM Kontrolle aufgetragen. In nativen Gelen wurden jeweils 6 µg der IgM Kontrolle (kommerzielles polyklonales IgM) aufgetragen.

Die Evaluation von fünf verschiedenen IgM-Aufreinigungsmethoden zeigt, dass alle getesteten Methoden in der Lage waren, intakte IgM Pentamere und Hexamere aufzureinigen. Die evaluierten Aufreinigungsmethoden zeigten dabei eine unterschiedlich hohe Ausbeute. In Bezug auf die Fähigkeit rekombinante monoklonale IgM Antikörper aus HEK293 Zellkulturüberstand aufzureinigen war allein die anti-IgM Agarose in der Lage IgM rein aus dem Zellkulturüberstand aufzureinigen. Leider konnte ich in den aufgereinigten Proben nur ein schwaches Signal für Proteine im Größenbereich der IgM Pentamere oder Hexamere erkennen. Stattdessen zeigten sich Banden, die ihrer Größe nach IgM Monomere, Dimere oder Trimere darstellen könnten.

3.1.3 Testung rekombinant hergestellter anti-MOG oder anti-Sulfatid Antikörper in einem Modell der Demyelinisierung

Die rekombinant hergestellten anti-MOG oder anti-Sulfatid Antikörper wurden in Bezug auf ihre Demyelinisierungsfähigkeit im OSC-Modell, einem *ex vivo* Modell der Demyelinisierung, untersucht.

3.1.3.1 Testung von anti-MOG IgM

Der anti-MOG IgG zusammen mit Komplement wird von uns standardmäßig zur Demyelinisierung der OSCs genutzt. Um die Rolle des Isotyps des anti-MOG zu untersuchen, testete ich in Zusammenarbeit mit einer erfahrenen Kollegin den rekombinant hergestellten anti-MOG IgM unter Anwesenheit oder unter Abwesenheit von Komplement hinsichtlich seiner Demyelinisierungsfähigkeit. Es wurde in diesem Zusammenhang entweder der hergestellte anti-MOG IgM mit J-Kette untersucht oder der anti-MOG IgM ohne J-Kette. Als Demyelinisierungskontrolle diente anti-MOG IgG, jeweils mit oder ohne Komplement.

Um Veränderungen des Myelins in den jeweiligen OSCs nachvollziehen zu können, wurden von den Schnitten vor dem Start des Experimentes, sowie an jedem Tag nach Start des Experimentes Mikroskopiebilder aufgenommen. Die Bilder wurden stets unter identischen Mikroskop-Aufnahmebedingungen angefertigt. Das Ergebnis für das mit anti-MOG IgM durchgeführte Demyelinisierungsexperiment ist in Abb. 22 zu sehen.

Die durchgeführten Experimente zeigen, dass für die klonierten und produzierten anti-MOG IgM Antikörper zusammen mit Komplement eine Demyelinisierung beobachtet werden kann (s. Abb. 22). Ohne Komplement zeigte sich bei keinem der getesteten Antikörper ein demyelinisierender Effekt. Im Falle der Demyelinisierung zusammen mit Komplement war letztere für den IgM Isotyp ähnlich stark ausgeprägt wie beim üblicherweise für die Demyelinisierung genutzten anti-MOG IgG Antikörper. Die Analyse müsste zur Verifizierung dieses Ergebnisses wiederholt werden.

3.1.3.2 Testung von anti-Sulfatid IgG oder anti-Sulfatid IgM

Der rekombinant hergestellte anti-Sulfatid Antikörper ist ursprünglich ein muriner IgM Antikörper, welcher *in vivo* demyelinisieren kann z. B. im Rückenmark der Ratte. In unserem OSC-Modell wurde der Antikörper bisher nicht untersucht. Ich stellte anti-Sulfatid rekombinant mit humaner C γ oder C μ Region her, untersuchte die Bindung des anti-Sulfatid an die OSCs und testete anti-Sulfatid IgG und anti-Sulfatid IgM auf ihre Demyelinisierungsfähigkeit.

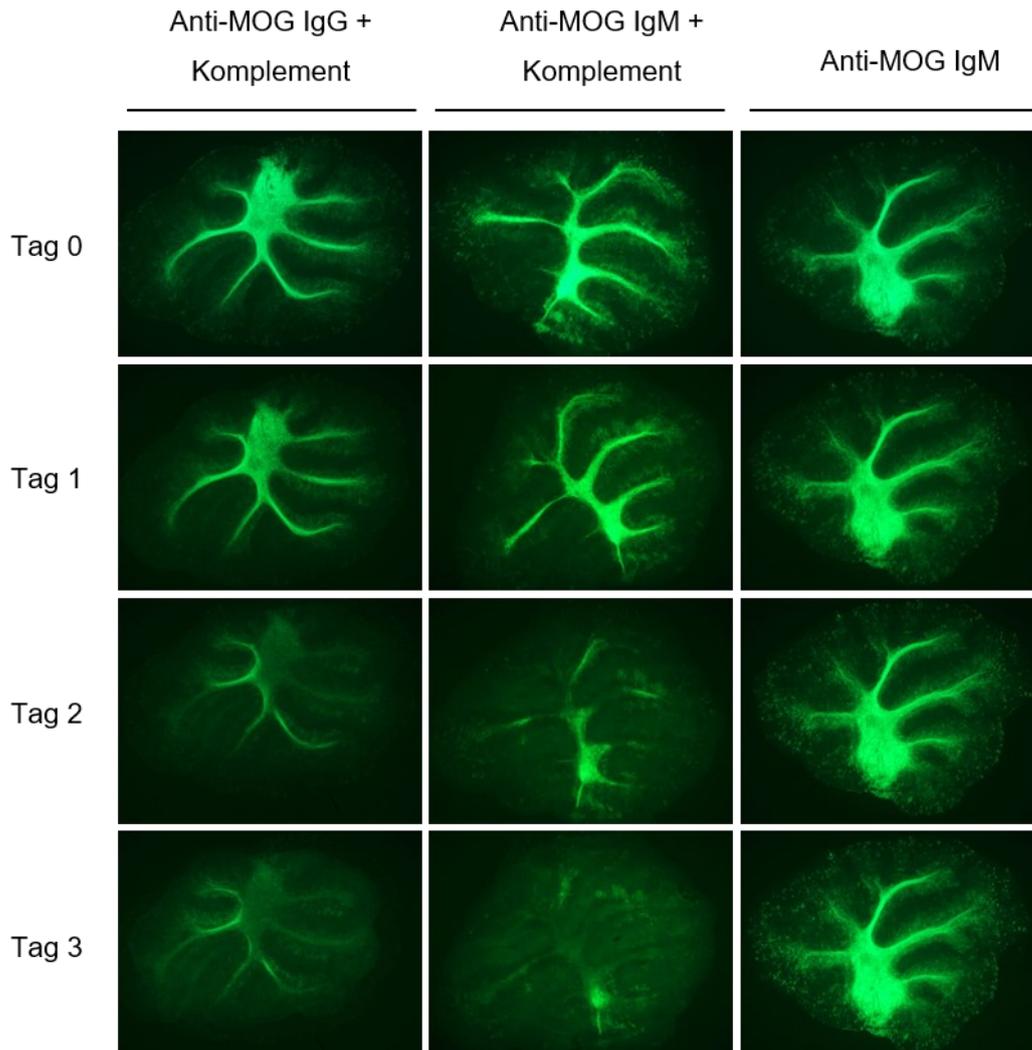


Abb. 22: Analyse der Demyelinisierungsfähigkeit von anti-MOG IgM Monomeren und Dimeren im OSC-Modell. Fluoreszenzmikroskopische Nachverfolgung des Myelin Signals in OSCs. Die von Tag 0 bis Tag 3 verlaufende Demyelinisierung mittels anti-MOG IgG zusammen mit Komplement als Positivkontrolle ist deutlich erkennbar. Anti-MOG IgM zeigte zusammen mit Komplement ebenfalls eine Demyelinisierung, ohne Komplement blieb die Demyelinisierung aus.

3.1.3.2.1 Analyse der Bindung von anti-Sulfatid IgG an organotypische Schnittkulturen

Bevor wir anti-Sulfatid auf seine Fähigkeit der Demyelinisierung von OSCs untersuchten, testete ich ihn zusammen mit einer erfahrenen Kollegin in Bezug auf seine Bindung an OSCs. Ich inkubierte präparierte OSCs hierbei für 72 h mit anti-Sulfatid IgG und Komplement und färbte die folgend fixierten Schnitte mit einem Fluorophor-gekoppelten anti-human-IgG Sekundärantikörper. Als Kontrolle dienten unbehandelte gefärbte OSCs. Die konfokale Analyse der Schnitte zeigte, dass anti-Sulfatid IgG an Myelin-reiche Regionen der Schnitte band. Eine direkte Bindung an Myelin selbst konnte hierbei nicht nachgewiesen werden.

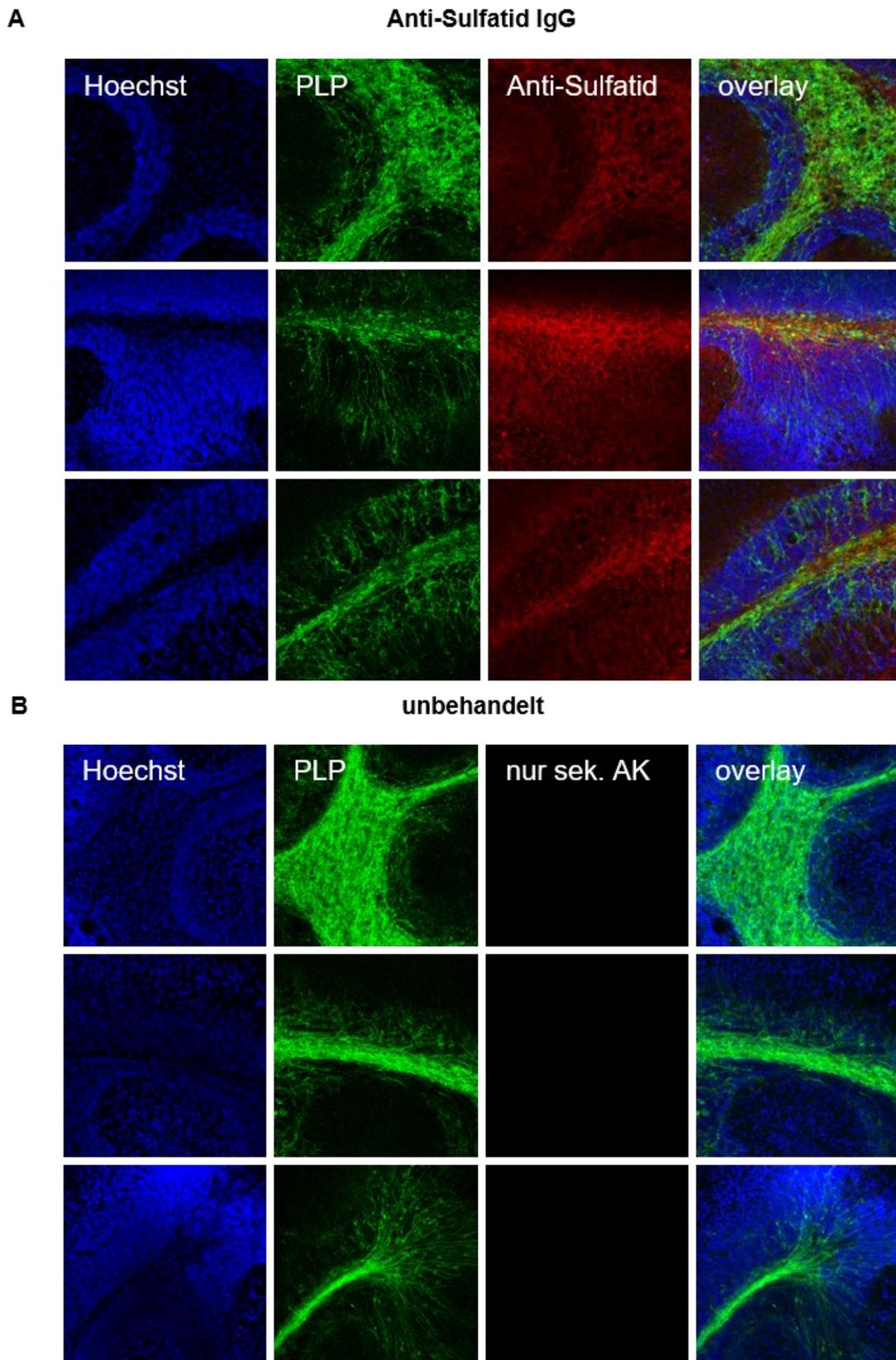


Abb. 23: Untersuchung der Bindung von anti-Sulfatid IgG an OSCs. Präparierte OSCs wurden auf Zellkulturinserts ausplattiert und entweder nach 10 Tagen anti-Sulfatid IgG und Komplement hinzugefügt und die OSCs für weitere 2 Tage kultiviert (**A**) oder 12 Tage unbehandelt im Zellkulturinkubator kultiviert (**B**). Die Schnitte wurden mit Paraformaldehyd fixiert, permeabilisiert und mit Eselserum blockiert. Die Färbung der Schnitte erfolgte mittels anti-human-IgG Alexa647-konjugiertem Sekundäntikörper. Eingedeckelte Schnitte wurden über Konfokalmikroskopie analysiert.

3.1.3.2.2 Demyelinisierungsfähigkeit von anti-Sulfatid IgG oder anti-Sulfatid IgM

Das Ergebnis der Analyse von anti-Sulfatid IgG in unserem *ex vivo* Modell der Demyelinisierung ist in Abb. 24 zu sehen. OSCs wurden 7 Tage nach ihrer Präparation mit anti-Sulfatid IgG mit oder ohne Komplement inkubiert. Als Demyelinisierungskontrolle diente die Inkubation weiterer OSCs mit anti-MOG IgG zusammen mit Komplement. Für letztere Probe war die Demyelinisierung der OSCs deutlich erkennbar. Im Fall von anti-Sulfatid IgG mit oder ohne Komplement konnte keine signifikante Demyelinisierung beobachtet werden.

Im Weiteren testeten wir den anti-Sulfatid IgM in gleicher Weise auf seine Demyelinisierungsfähigkeit. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abb. 25 zu sehen. Die mit anti-Sulfatid IgM inkubierten Proben (jeweils mit oder ohne Komplement) zeigten keine Abnahme des Myelinsignals über die Zeit. Anti-Sulfatid IgM wies also ebenfalls keine Demyelinisierungsfähigkeit in unserem Modell auf.

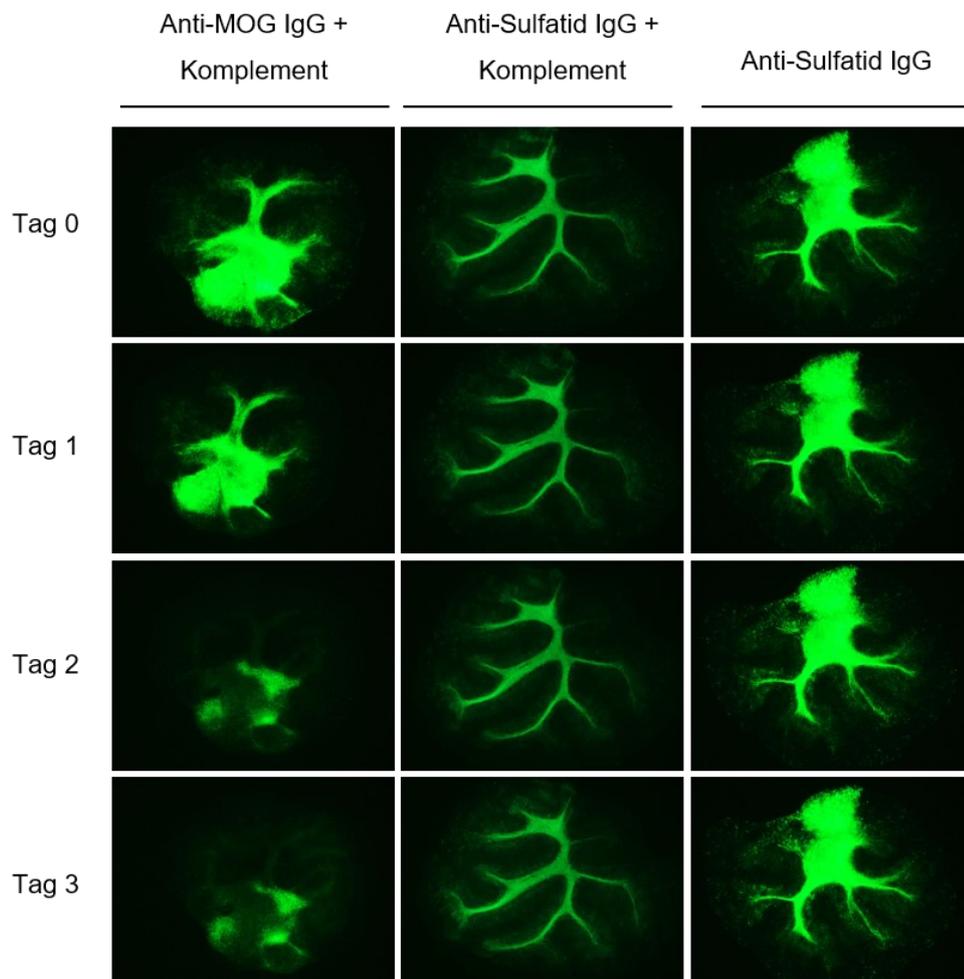


Abb. 24: Analyse von anti-Sulfatid IgG hinsichtlich seiner Demyelinisierungsfähigkeit in OSCs. Präparierte OSCs wurden auf Zellkulturinserts in mit Medium gefüllten Vertiefungen ausplattiert und 7 Tage im Zellkulturinkubator kultiviert. Tag 0 markiert den Start des Experiments. Die Inkubation mit jeweils 5 µg anti-Sulfatid IgG entweder mit Komplement oder ohne Komplement oder aber die Inkubation mit 5 µg anti-MOG IgG und Komplement als Positivkontrolle erfolgte von Tag 0 bis Tag 3.

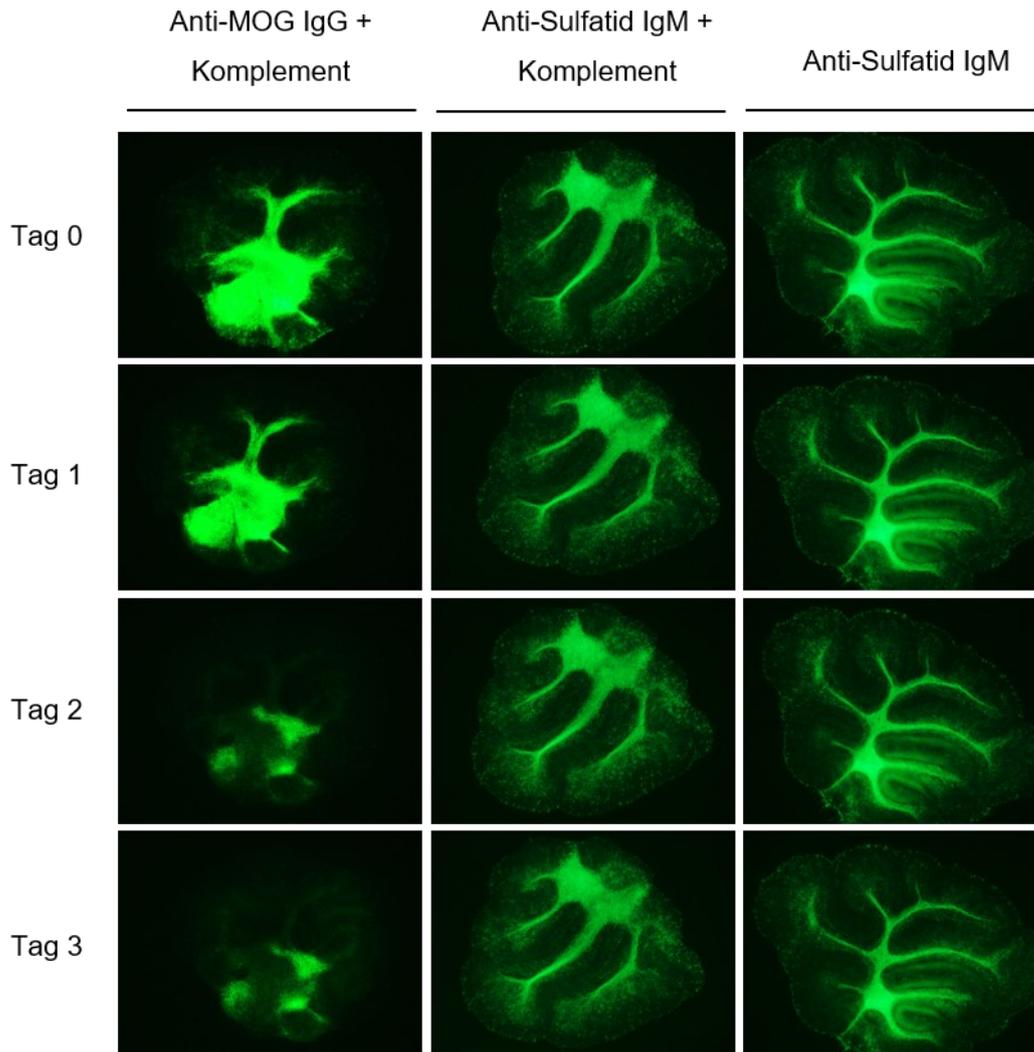


Abb. 25: Analyse von anti-Sulfatid IgM hinsichtlich seiner Demyelinisierungsfähigkeit in OSCs. Präparierte OSCs wurden auf Zellkulturinserts in mit Medium gefüllten Vertiefungen ausplattiert und 7 Tage im Zellkulturinkubator kultiviert. Tag 0 markiert den Start des Experiments. Die Inkubation mit 4 μ g anti-Sulfatid IgM mit Komplement oder ohne Komplement erfolgte von Tag 0 bis Tag 3. Die Inkubation mit 5 μ g anti-MOG IgG und Komplement als Positivkontrolle erfolgte von Tag 0 bis Tag 3.

3.2 Nachbildung und Charakterisierung der intrathekalen humoralen Immunantwort eines Patienten mit entzündlicher ZNS-Erkrankung

In diesem Abschnitt der Arbeit ich zusammen mit einem erfahrenen Kollegen die intrathekale humorale Immunantwort eines Patienten mit akuter entzündlicher ZNS-Erkrankung (Herpes-simplex-Enzephalitis) experimentell nach. Ein entsprechender schematischer Arbeitsablauf ist in Abb. 26 zu sehen. CD138⁺ Einzelzellen aus dem Liquor des Patienten wurden mittels FACS isoliert. Die Zelluläre mRNA wurde zur Amplifikation variabler Antikörperregionen (V γ , V μ , V κ , V λ) genutzt, welche im Folgenden elektrophoretisch analysiert und sequenziert wurden. Neu gegenüber vorherig durchgeführten Analysen war dabei die Vervielfältigung von IgM-Schwerketten-Sequenzen aus einzelnen Liquorplasmazellen, welche uns durch unsere Austestung verschiedener IgM-Region bindender Primer gelang. Mit den für die jeweiligen Antikörper Schwerketten oder Leichtketten erhaltenen Sequenzen wurde eine phylogenetische Analyse durchgeführt, die Antikörperprodukte klonal expandierter Plasmazellen identifizierte. Ausgewählte Antikörperprodukte klonal expandierter Liquor-Plasmazellen wurden im Folgenden jeweils in einen IgG-kodierenden Expressionsvektor kloniert. Monoklonale Antikörper wurden durch Transfektion von HEK293 Zellen mit den entstandenen Vektorkonstrukten produziert, aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt und über SDS-PAGE und Proteinkonzentrationsmessung analysiert. Um die Spezifität der rekombinanten monoklonalen Antikörper zu untersuchen, wurden mithilfe mehrerer Kooperationspartner folgend Bindeanalysen an HSV-1 Proteinen oder ZNS Strukturen durchgeführt.

Ergebnisse

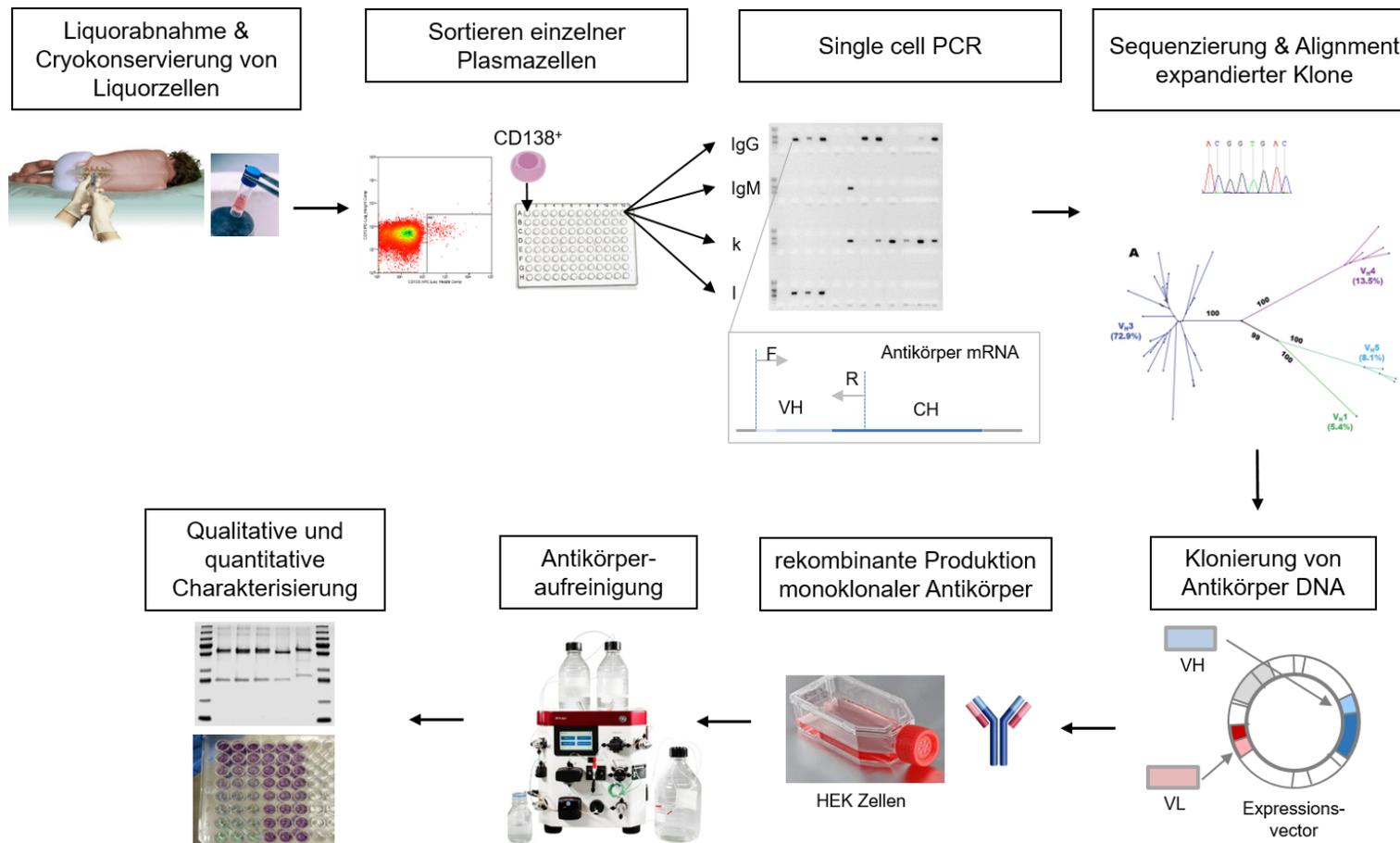


Abb. 26: Schematischer Arbeitsablauf zur Nachbildung der intrathekalen humoralen Immunantwort bei entzündlicher ZNS-Erkrankung. Einzelne CD138⁺ Plasmazellen wurden über FACS aus kryokonservierten Patienten-Liquorzellen isoliert. Die VH und VL Regionen der von diesen Einzelzellen gebildeten Antikörper wurden durch spezifische RT-PCRs amplifiziert. Erhaltene Amplikons wurden sequenziert und phylogenetisch untersucht. Ausgewählte Antikörperprodukte expandierter Plasmazellen wurden folgend kloniert und rekombinant in HEK293-Zellen exprimiert. Die produzierten Konstrukte wurden affinitätschromatographisch aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt und qualitativ und quantitativ analysiert. Die Antigenspezifität der hergestellten Antikörper wurde über Immunfluoreszenz, Western Blot oder Immunpräzipitation mit folgender massenspektrometrischer Analyse untersucht.

3.2.1 Identifizierung von Antikörperprodukten expandierter Liquor-Plasmazellen

3.2.1.1 Vorstellung des Patienten

Der Spender der in dieser Arbeit verwendeten Liquorprobe war ein Patient mit Herpes-simplex-Enzephalitis (HSE). Es handelte sich um einen männlichen Patienten im Alter von 19 Jahren. Eine schematische Übersicht über den Krankheitsverlauf des Patienten ist in Abb. 27 dargestellt. Der Patient stellte sich 1 Woche nach Auftreten erster Symptome im Krankenhaus vor und erlitt in diesem Rahmen einen Krampfanfall, woraufhin er in der Klinik betreut wurde. Der Patient wurde am Tag nach seiner Vorstellung durch den Nachweis von Herpes-simplex-Virus-Kopien in seinem Liquor mit HSE diagnostiziert. Er erhielt Aciclovir vom Tag seiner Vorstellung (Tag 7) bis zu seiner Entlassung drei Wochen später (Tag 28).

Der Zustand des Patienten verschlechterte sich bis 2 Wochen nach dem Auftreten erster Symptome (= Tag 15 bzw. Tag 8 nach Start der Aciclovirgabe). In diesem Zeitraum wurde eine Kontroll-Lumbalpunktion durchgeführt, in deren Rahmen der in vorliegender Studie verwendete Liquor erhalten wurde. Folgend besserte sich der Zustand des Patienten. Der Patient konnte drei Wochen nach seiner Vorstellung in der Klinik entlassen werden.

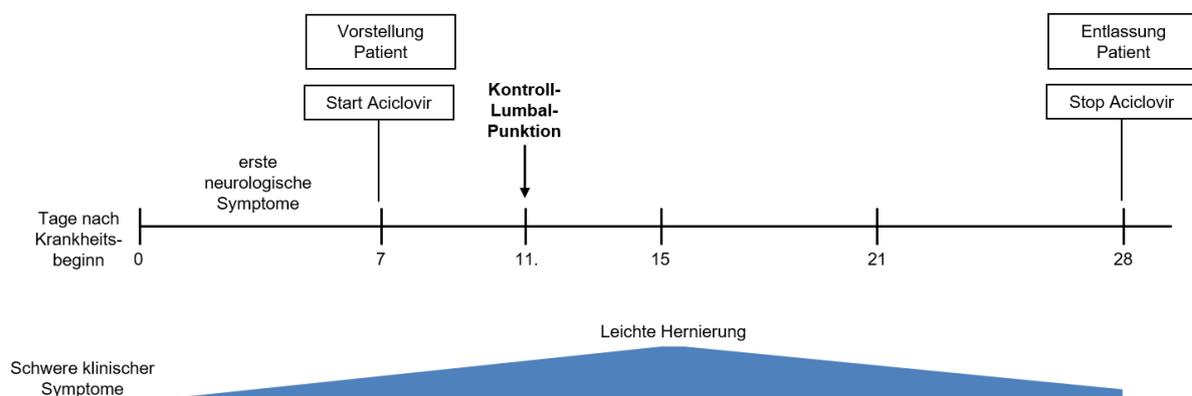


Abb. 27: Schematischer Krankheitsverlauf des HSE-Patienten. Der Patient stellte sich nach 1 Woche anhaltenden Symptomen im Krankenhaus vor. Er wurde daraufhin aufgenommen und medizinisch betreut. Ab dem Tag der Vorstellung erhielt der Patient Aciclovir. Der Zustand des Patienten verschlechterte sich bis nach Tag 15 nach ersten Symptomen. In diesem Zeitraum wurde der in der vorliegenden Studie verwendete Liquor abgenommen. Der Zustand des Patienten besserte sich folgend. 3 Wochen nach Vorstellung in der Klinik konnte der Patient entlassen werden.

Insgesamt wurden bei vorgestelltem Patienten zu drei Zeitpunkten eine Lumbalpunktion durchgeführt, nämlich am Tag seiner Vorstellung in der Klinik (Tag 7), 4 Tage darauf (Tag 11) sowie 2 Wochen nach der ersten Punktion (Tag 24). Die für diese Liquorproben erhaltenen Ergebnisse aus dem Zentrallabor zur HSV-1-Erreger- und Basisdiagnostik sind in Tab. 29. dargestellt. In Bezug auf die Anzahl an HSV-1 Viruskopien im Liquor konnte beobachtet werden, dass sich jene von Tag 7 an verringerte. In dem für diese Studie verwendeten Liquor konnte jedoch eine vermehrte Pleozytose (1118 Leukozyten / μ l) nachgewiesen werden als für

die Liquorproben anderer Tage (588 / μ l an Tag 7, 85 / μ l an Tag 24). Im an Tag 11 abgenommenen Liquor wurde eine starke intrathekale IgM-Synthese sowie eine IgA-Synthese nachgewiesen. Eine intrathekale IgG-Synthese wurde vermutet.

Tab. 29: Ergebnisse der HSV-1 Erreger- und der Basisdiagnostik für die verschiedenen Liquorproben des vorgestellten Patienten. Die analysierten Liquorproben wurden an Tag 7, Tag 11 und Tag 24 nach Krankheitsbeginn abgenommen. Referenzbereiche der entsprechenden Parameter sind aufgeführt. Pathologische Analyseergebnisse sind grau hinterlegt.

	Tag 7	Tag 11	Tag 24	Referenzbereich
HSV-1 DNA	33.700 K/ml	14.900 K/ml	<500 K/ml	<500 K/ml
Liquor	klar, farblos	gelblich mit blutigem Bodensatz	xanthochrom	
Erythrozyten	94 / μ l	> 5 / μ l	< 5 / μ l	< 5 / μ l
Leukozyten	588 / μ l	1118 / μ l	85 / μ l	< 5 / μ l
Eiweiß quantitativ	100 mg/dl	120 mg/dl	110 mg/dl	20 – 50 mg/dl
Lactat	2.8 mmol/l	normwertig	normwertig	1.1-2.4 mmol/l
Glukose	normwertig	normwertig	normwertig	
Albuminquotient	n.a.	path. erhöht	path. erhöht	
Schrankenstörung	n.a.	mittelgradig	mittelgradig	
Intrathekale Synthese:				
- IgG	n.a.	4,3 %	71,1 %	
- IgA	n.a.	11,5 %	36,2 %	
- IgM	n.a.	46,6 %	23,2 %	
Oligoklonale Banden (OCBs)	n.a.	Keine im Liquor und Serum	OCBs im Liquor und zusätzliche identische OCBs in Liquor und Serum	

3.2.1.2 Sortierung einzelner CD138⁺ Patienten-Liquorzellen über FACS

Für die vorliegende FACS-Analyse wurden Zellen aus 4 ml Liquor des Patienten verwendet. Der Liquor wurde an Tag 11 nach Erkrankung des Patienten abgenommen und die in ihm enthaltenden Zellen kryokonserviert. Der Liquor des Patienten enthielt laut Analyse des Zentrallabors 1118 Leukozyten/ μ l (s. Tab. 29). Somit wurde für die FACS Sortierung

rechnerisch eine Suspension aus 4 472 000 Leukozyten verwendet. Zur Färbung wurde ein anti-CD138 Antikörper genutzt, welcher an Phycoerythrin (PE) gekoppelt war. Das Gatingschema zur Sortierung lebender CD138⁺ Plasmazellen wurde mit gefärbten PBMCs erstellt. Einzelzellen wurden in Lysepuffer in Wells einer 96-Well-Platte sortiert

Ein Eindruck der FACS-Sortierung der CD138⁺ Zellen ist in Abb. 28 zu sehen. Es wurden mindestens 576 Einzelzellen sortiert. Laut FACS-Quantifizierung sortierter Zellen waren dies 0.11 % der gesamten Zellen in der Probe. Die 96-Well-Platten wurden nach der Sortierung kurz zentrifugiert, sofort auf Trockeneis eingefroren und langfristig bei - 80 °C gelagert.

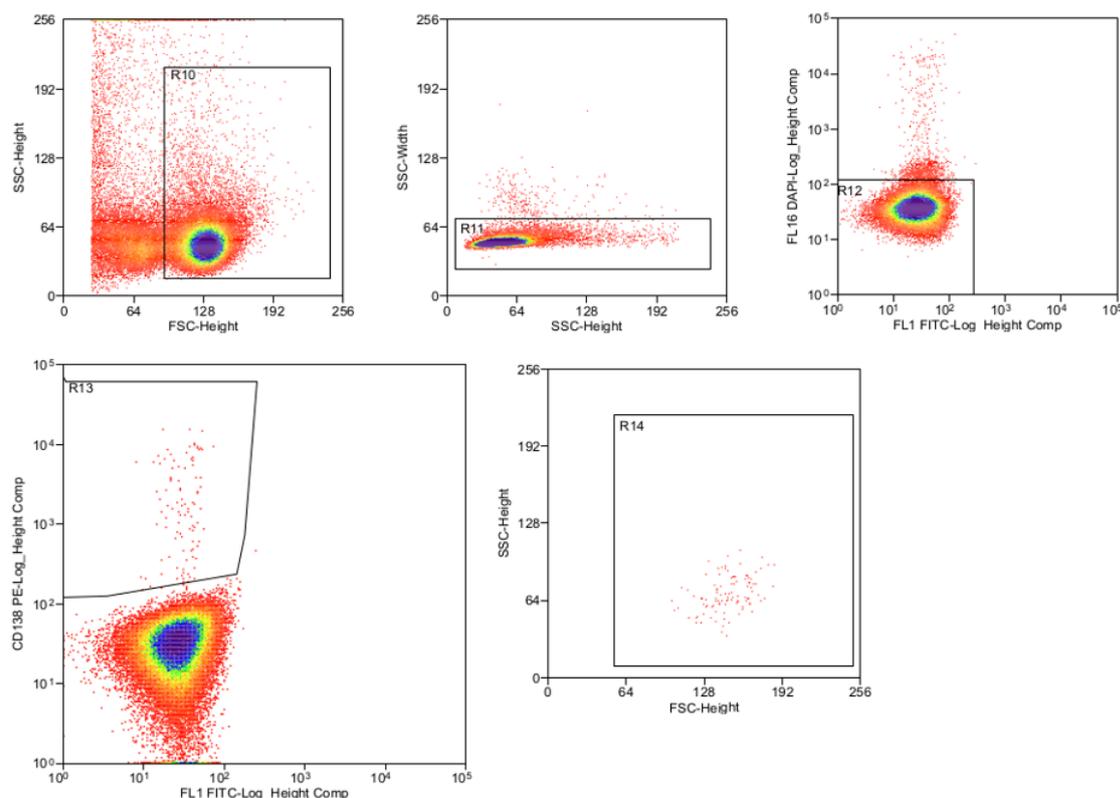


Abb. 28: Sortierung von CD138⁺ Patienten-Liquorzellen über FACS. Das in der Sortierung genutzte Gatingschema wurde mittels einer Probe gefärbter PBMCs aufgesetzt. Gefärbte Patientenzellen wurden danach analysiert und CD138⁺ Einzelzellen in Lysepuffer in Wells einer 96-Well-Platte sortiert. Die Platten wurden kurz zentrifugiert, auf Trockeneis eingefroren und bis zu ihrer Analyse bei - 80 °C gelagert.

3.2.1.3 Vervielfältigung von VH- oder VL-Regionen über Einzelzell-PCR und ihre Sequenzierung

Die durch FACS erhaltenen CD138⁺ Patienten-Einzelzellen wurden über RT-PCR hinsichtlich der VH und VL Sequenz der von ihnen produzierten Antikörper analysiert. Die zelluläre mRNA wurde hierbei in 4 Polymerase-Kettenreaktionen aufgeteilt, welche jeweils spezifisch für V_γ, V_μ, V_κ oder V_λ waren. Ein exemplarischer Eindruck einer nach einer RT-PCR durchgeführten Agarose-Gelelektrophorese ist in Abb. 29 dargestellt. Für die 12 Einzelzellen, welche für die

Einzelzell-RT-PCR genutzt worden waren, zeigten sich Signale für $V\gamma$ oder $V\mu$ Regionen bzw. Signale für $V\kappa$ oder $V\lambda$.

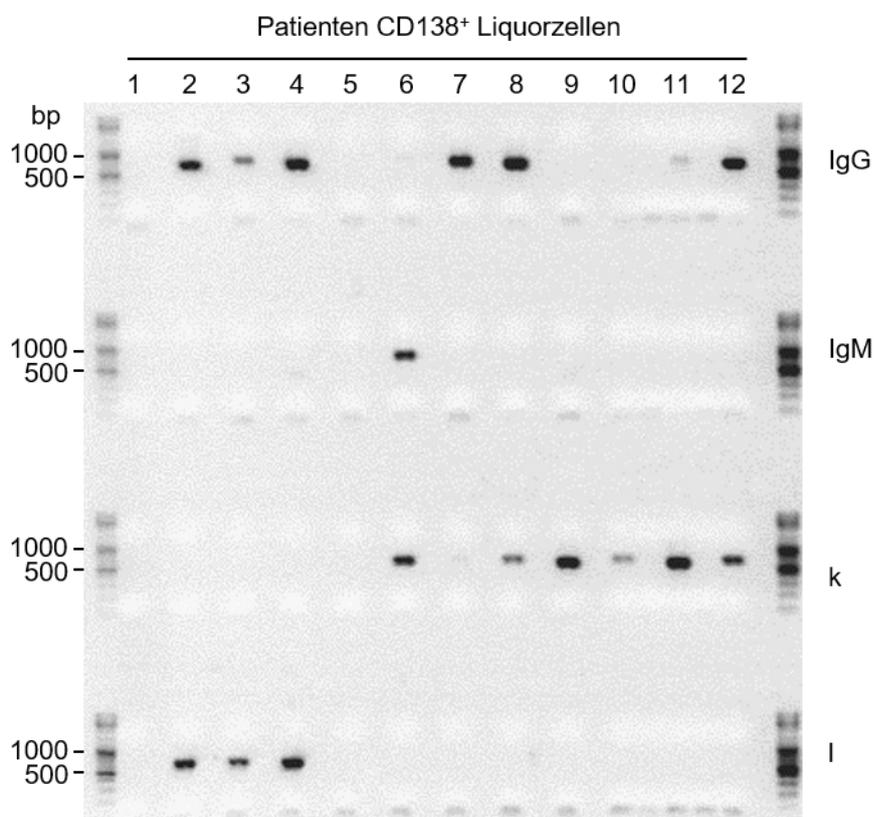


Abb. 29: Exemplarisches Agarosegel der Amplikons einer Einzelzell-RT-PCR mit 12 Patienten Liquorplasmazellen. Die mit Loading Dye versetzten RT-PCR-Amplikons und ein DNA Größenstandard wurden auf ein 1.5 %-iges Agarosegel geladen. Die Gelelektrophorese erfolgte für 30 min bei 120 V. Anschließend wurden die DNA-Banden ausgeschnitten und einzeln sequenziert.

Die PCR-Amplikons der Einzelzell-RT-PCRs wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA aus den Gelstücken extrahiert. Anschließend erfolgte die Sequenzierung der Amplikons mithilfe eines Primers spezifisch für den konstanten Antikörperbereich in den PCR-Amplikons. Die Qualität der erhaltenen Sequenzierungsergebnisse war anhand des Sequenzierchromatogramms ersichtlich. Qualitativ minderwertige Sequenzen wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen. Alle weiteren Sequenzen wurden mittels IMGT V-QUEST hinsichtlich ihrer V-Regionen (=Anfang von FR1 bis Ende von FR4) analysiert. Die Sequenzen wurden getrimmt, sodass sie mit ihrer FR1 begannen und mit ihrer FR4 endeten. Diese getrimmten Sequenzen wurden für die MAFFT-Analyse verwendet.

Insgesamt konnten 228 variable Antikörperregionen von CD138⁺ Liquorzellen des HSE-Patienten erfolgreich sequenziert werden. In Tab. 30 ist eine Übersicht der erfolgreich sequenzierten PCR-Amplikons aufgeführt. 105 der erhaltenen intakten Sequenzen entsprachen $V\gamma$ Sequenzen, 9 $V\mu$ Sequenzen, 93 $V\kappa$ Sequenzen und 21 $V\lambda$ Sequenzen. Bei

79 Klonen konnten gepaarte VH- und VL-Sequenzen nachgewiesen werden (61 x IgG1 κ , 11 x IgG1 λ , 4 x IgM κ , 3 x IgM λ). Einzelsequenzen blieben für 33 V γ , 2 V μ , 28 V κ und 7 V λ erhalten. Die phylogenetischen Analysen aus den erhaltenen Sequenzen sind in Abb. 30 und Abb. 31 dargestellt.

Tab. 30: Übersicht über die Analyse des CSF Plasmazellrepertoires hinsichtlich der VH-Familien erhaltener IgM-VH Sequenzen oder hinsichtlich der VL-Familien erhaltener Ig-V κ oder Ig-V λ Sequenzen.

	Anzahl der Seq. insgesamt	Kumulative Ig-Familien Repräsentation					
IgG-VH	105	V _H 1 33 seq. (41.4 %)	V _H 3 50 seq. (47.6 %)	V _H 4 22 seq. (21 %)			
IgM-VH	9	V _H 1 1 seq. (11.1 %)	V _H 3 5 seq. (55.6 %)	V _H 4 2 seq. (22.2 %)	V _H 6 1 seq. (11.1 %)		
Ig-V κ	93	V _{κ} 1 52 seq. (55.9 %)	V _{κ} 2 15 seq. (16.1 %)	V _{κ} 3 18 seq. (19.4 %)	V _{κ} 4 8 seq. (8.6 %)		
Ig-V λ	21	V _{λ} 1 8 seq. (38.1 %)	V _{λ} 2 8 seq. (38.1 %)	V _{λ} 3 2 seq. (9.5 %)	V _{λ} 6 1 seq. (4.8 %)	V _{λ} 7 1 seq. (4.8 %)	V _{λ} 8 1 seq. (4.8 %)

3.2.1.4 Phylogenetische Analyse von VH- oder VL-Sequenzen

Aus den erhaltenen Sequenzen für die variablen Domänen wurde für jeden Antikörperschwerkettenisotyp oder Antikörperleichtkettenisotyp ein phylogenetischer Baum erstellt. Abb. 30 zeigt die Analyse des durch Einzelzell-RT-PCRs erhaltenen IgG VH Repertoires, Abb. 31 zeigt die Analyse des erhaltenen Ig κ VL Repertoires. Für das IgG VH Repertoire clusterte der Baum in 3 Äste, welche den unterschiedlichen VH-Genfamilien entsprechen. Die Hälfte der analysierten Sequenzen zeigte eine Zugehörigkeit zur VH3-Familie (47.6 %), die andere wies eine Zugehörigkeit zu VH1-Familie (31.4 %) oder zur VH4-Familie (21 %) auf (s. Abb. 30).

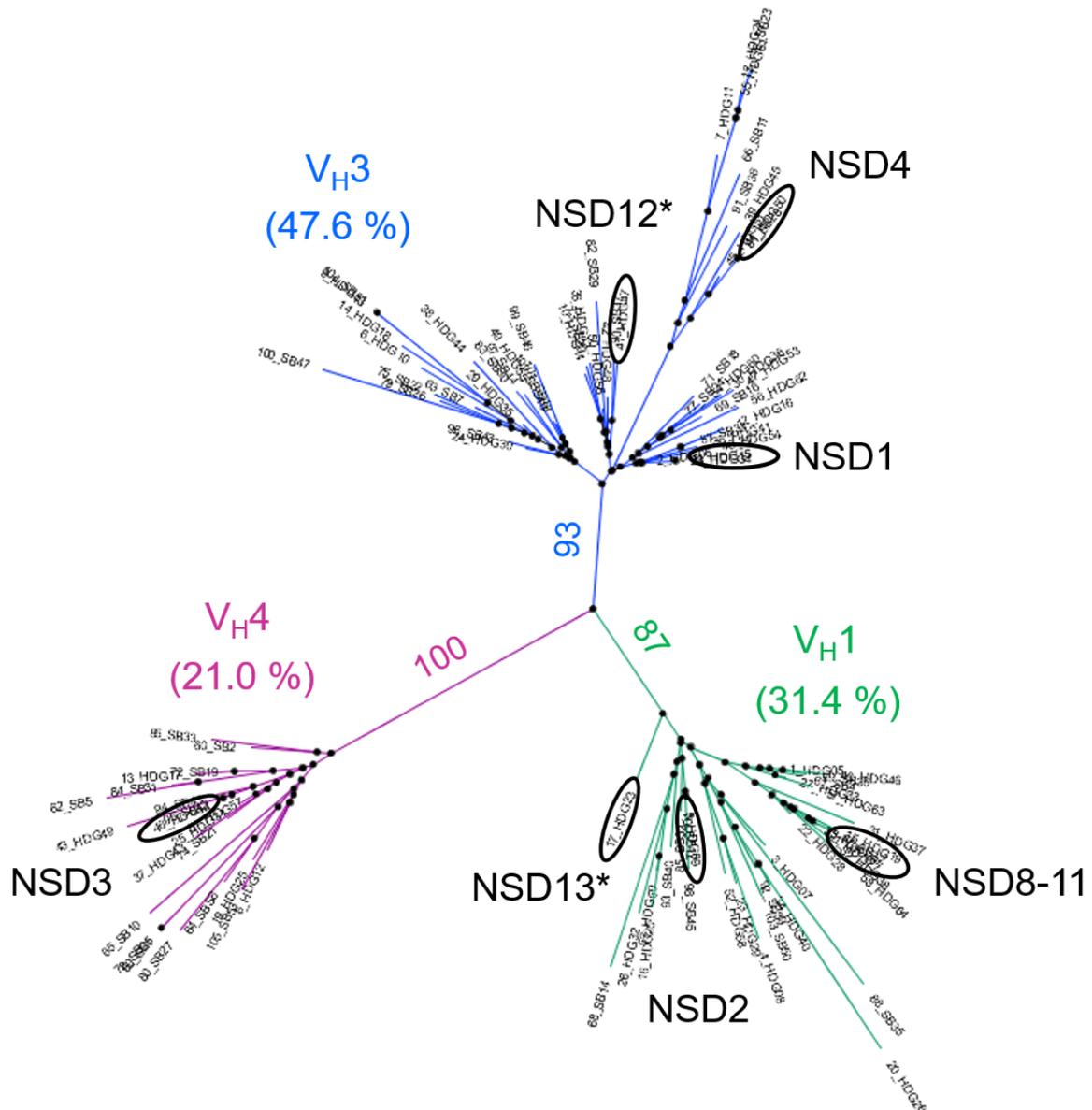


Abb. 30: Phylogenetische Analyse identifizierter variabler IgG-Schwerkettenregionen. Aus dem Liquor des vorgestellten HSE-Patienten konnten 105 variable IgG-Schwerkettensequenzen in ihrer Sequenz aufgelöst werden. Entsprechende Sequenzen wurden mittels MAFFT Alignment verglichen und aus dem Ergebnis ein phylogenetischer Baum erstellt. Die Zugehörigkeit zu V_H-Familien der entsprechenden Baumäste ist dargestellt, sowie der Anteil an in diesem Ast vorhandenen Sequenzen in Hinblick auf die Gesamtzahl der Sequenzen. Als Unterstützung für die Aussagekraft der Hauptverzweigungen sind die Bootstrap-Werte für die jeweiligen Äste angegeben.

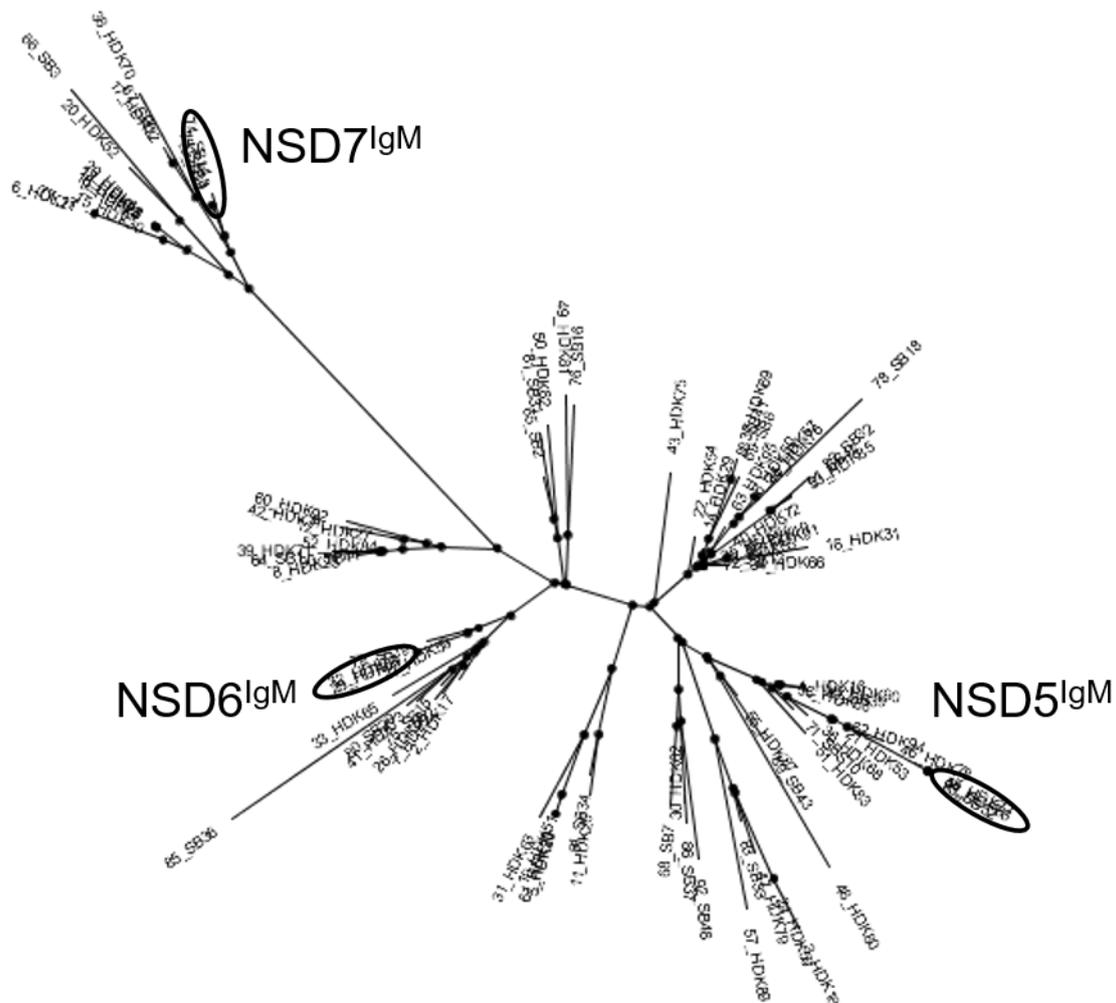


Abb. 31: Phylogenetische Analyse identifizierter V κ Regionen. Aus dem Liquor des vorgestellten HSE-Patienten konnten 105 variable IgG-Schwerkettensequenzen in ihrer Sequenz aufgelöst werden. Entsprechende Sequenzen wurden mittels MAFFT Alignment verglichen und aus dem Ergebnis ein phylogenetischer Baum erstellt. Die Zugehörigkeit zu VH-Familien der entsprechenden Baumäste ist dargestellt, sowie der Anteil an in diesem Ast vorhandenen Sequenzen in Hinblick auf die Gesamtzahl der Sequenzen. Als Unterstützung für die Aussagekraft der Hauptverzweigungen sind die Bootstrap-Werte für die jeweiligen Äste angegeben.

3.2.2 Rekombinante Herstellung ausgewählter Antikörper

3.2.2.1 Auswahl der Antikörper

Die Auswahl der Klone für deren Klonierung und rekombinante Produktion basierte auf den Ergebnissen der phylogenetischen Analysen. Die auf ihre FR1-FR4 getrimmten V γ -Nukleotidsequenzen wurden mittels MAFFT analysiert und über dieses Programm ein phylogenetischer Baum erstellt. Vier Paare, die sich in diesem Baum besonders nah zueinander gruppierten, wurden für die rekombinante Expression ausgewählt (NSD1 - NSD4). Die Klone umfassten 3 x IgG κ -Klone (NSD1, NSD2, NSD4) und einen IgG λ -Klon (NSD3). Drei weitere Klone (NSD5, NSD6, NSD7) wurden auf der Grundlage der V κ -Phylogenie ausgewählt (s. Abb. 31). Die ausgewählten Antikörper gruppierten sich ebenfalls sehr nah

zueinander. Bei NSD5, NSD6 und NSD7 handelte es sich ausschließlich um Antikörper mit C μ Region. Es wurde ebenfalls eine Gruppe von nah verwandten IgG κ -Klonen zur rekombinanten Produktion (NSD8, NSD9, NSD10, NSD11) gewählt. Zwei weitere Klone für die Klonierung und rekombinante Produktion stellten nicht-expandierte Klone dar, 1 x IgG κ , 1 x IgG λ (NSD12, NSD13).

Tab. 31: Übersicht über die ausgewählten Klone für Klonierung und rekombinante Produktion mit ihrem Schwer- und Leichtkettenisotyp.

Name	Schwerkettenisotyp	Leichtkettenisotyp
NSD1	IgG	IgK
NSD2	IgG	IgK
NSD3	IgG	IgL
NSD4	IgG	IgK
NSD5	IgM	IgK
NSD6	IgM	IgK
NSD7	IgM	IgK
NSD8	IgG	IgK
NSD9		
NSD10		
NSD11		
NSD12	IgG	IgK
NSD13	IgG	IgL

Tab. 32: Übersicht über V- und J-Familien der für Klonierung und rekombinante Produktion ausgewählten Antikörper.

Name	Isotyp	V-Familie	J-Familie
NSD1	IgG	V3-33	J4
	IgK	V2-24	J4
NSD2	IgG	V1-46	J4
	IgK	V2-24	J4
NSD3	IgG	V4-31	J4
	IgL	V1-47	J2
NSD4	IgG	V3-73	J4
	IgK	V4-1	J4
NSD5	IgM	V4-59	J3
	IgK	V1-5	J2
NSD6	IgM	V3-53	J4
	IgK	V3-20	J1
NSD7	IgM	V6-1	J6
	IgK	V2-28	J1
NSD8	IgG	V1-18	J6
NSD9			
NSD10			
NSD11	IgK	V1-39	J1
NSD12	IgG	V3-23	J4
	IgK	V1D-8	J1
NSD13	IgG	V1-46	J6
	IgL	V2-11	J1

3.2.2.2 Klonierung variabler Antikörperregionen in Expressionsvektoren

Abhängig vom ursprünglichen Leichtkettenisotyp des zu klonierenden Antikörpers wurden die ausgewählten Klone in Expressionsvektoren kodierend für die IgG1 Schwerekette und die κ - oder λ -Leichtkette kloniert. Im Falle von Antikörpern mit ursprünglichem IgM Schwerekettenisotyp fand durch die Klonierung ein Isotypwechsel zu IgG statt. Die Expressionsvektoren wurden durch PCR in ein CL-Vektorfragment und ein CH-Vektorfragment linearisiert. VH und VL Regionen der zu klonierenden Antikörper wurden mit Zielvektor-

spezifischen 5'-Überhangprimern PCR amplifiziert, um die folgende Fusion mit dem Zielvektor zu ermöglichen. Auch VH-Regionen von Original-IgM Antikörpern konnten erfolgreich mit IgG-spezifischen Überhangprimern PCR-amplifiziert werden. VH und VL DNA-Fragmente des jeweiligen Antikörpers wurden mit den Fragmenten des Zielvektors über rekombinatorische Klonierung verbunden. Resultierende Vektorkonstrukte wurden für die Transformation von *E. coli* verwendet. Bakterielle Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR auf das Vorhandensein von VH und VL untersucht und die Amplikons positiver Klone folgend sequenziert. Alle Klone, die für die rekombinante Proteinexpression ausgewählt wurden, konnten erfolgreich in Antikörper-Expressionsvektoren kloniert und als Glycerolstock konserviert werden.

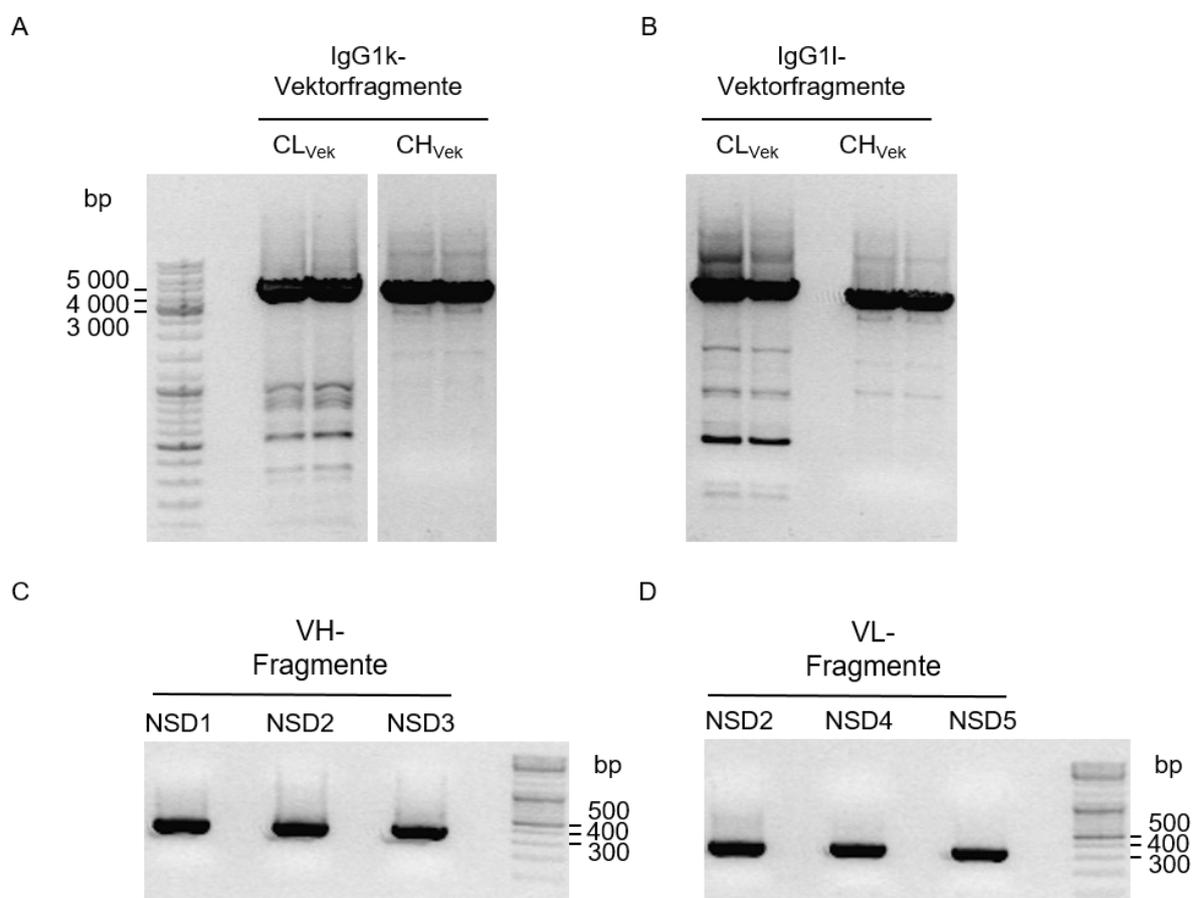


Abb. 32: Analyse und Präparation linearisierter Expressionsvektoren sowie zu klonierender Antikörperfragmente über Agarose Gelelektrophorese, Auswahl. (A) Expressionsvektoren zur Produktion von IgG1k oder IgG1l Antikörpern wurden durch PCR in ein nördliches und ein südliches Fragment linearisiert und mittels eines 0.8 %-igen Agarosegels analysiert. Fragmente, welche den erwarteten Größen von 4207 bp und 3782 bp entsprachen, wurden aus dem Gel ausgeschnitten und für die weitere Klonierung präpariert. (B) Die DNA variabler Antikörperregionen wurde aus den Amplikons der Einzelzell-RT-PCR reamplifiziert und mittels eines 1.5 %-igem Agarosegel analysiert. Banden im Bereich der erwarteten Größe von 300 – 500 bp wurden aus den Gelen ausgeschnitten und für die weitere Klonierung präpariert.

3.2.2.3 Rekombinante Expression

Für die Transfektion von HEK293 Zellen wurden Expressionsvektoren verwendet, die vom Patienten stammende Antikörper VH und VL Sequenzen enthielten. Für jedes Konstrukt wurden 2 x T175-Flaschen mit 70 - 80 % konfluenten HEK293 Zellen transfiziert. Während der Antikörperproduktion von Tag 1 bis Tag 7 nach Transfektion, wurde als Hinweis auf die Expression Vektor-kodierender Gene, die Expression des auf dem Expressionsvektor kodierten Reportergens GFP beobachtet. HEK293 Zellen, welche mit IgGk-Konstrukten transfiziert worden waren, zeigten eine GFP Expression von Tag 1 bis Tag 7 nach der Transfektion. Ein GFP-Signal in Zellen transfiziert mit IgGl-Konstrukten fehlte während des gesamten Produktionszeitraums. Das Zellkulturmedium wurde je nach Bedarf durch neues Medium ersetzt und der abgenommene Antikörper-enthaltende Überstand wurde gesammelt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

3.2.2.4 Aufreinigung und qualitative oder quantitative Analyse erhaltener Produkte

Im HEK293 Zellkulturüberstand vorhandene Antikörper wurden über HiTrap Protein G HP-Säulen mittels eines ÄKTA Proteinaufreinigungssystems aufgereinigt. Die Elutionschromatogramme einiger produzierter Antikörperkonstrukte sind in Abb. 33 dargestellt. Für jede Reinigung konnte ein Elutionspeak in der Absorptionskurve (blaue Kurve) beobachtet werden. Die Höhe des Peaks deutete auf die Menge an aufgereinigtem Antikörper hin, konnte aber nicht als quantitatives Maß verwendet werden, da das Verhältnis zwischen der Fläche unter der Kurve und dem Proteingehalt generell nicht konstant ist.

Für die rekombinant produzierten, aufgereinigten monoklonalen Patientenantikörper ergaben sich verschiedene Ausbeuten mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen und Probenvolumina (s. Tab. 33). Generell ließen sich durch die Produktion in zwei T175 Zellkulturflaschen zwischen 70 µg (NSD9) und 237 µg (NSD7) Antikörper gewinnen. Eine qualitative Analyse der aufgereinigten Antikörper erfolgte über reduzierende SDS-PAGE (s. Abb. 33 B). Hier konnten in allen Proben Banden für die jeweiligen Antikörperschwerketten bei ca. 55 kDa und Antikörperleichtketten bei ca. 25 kDa nachgewiesen werden.

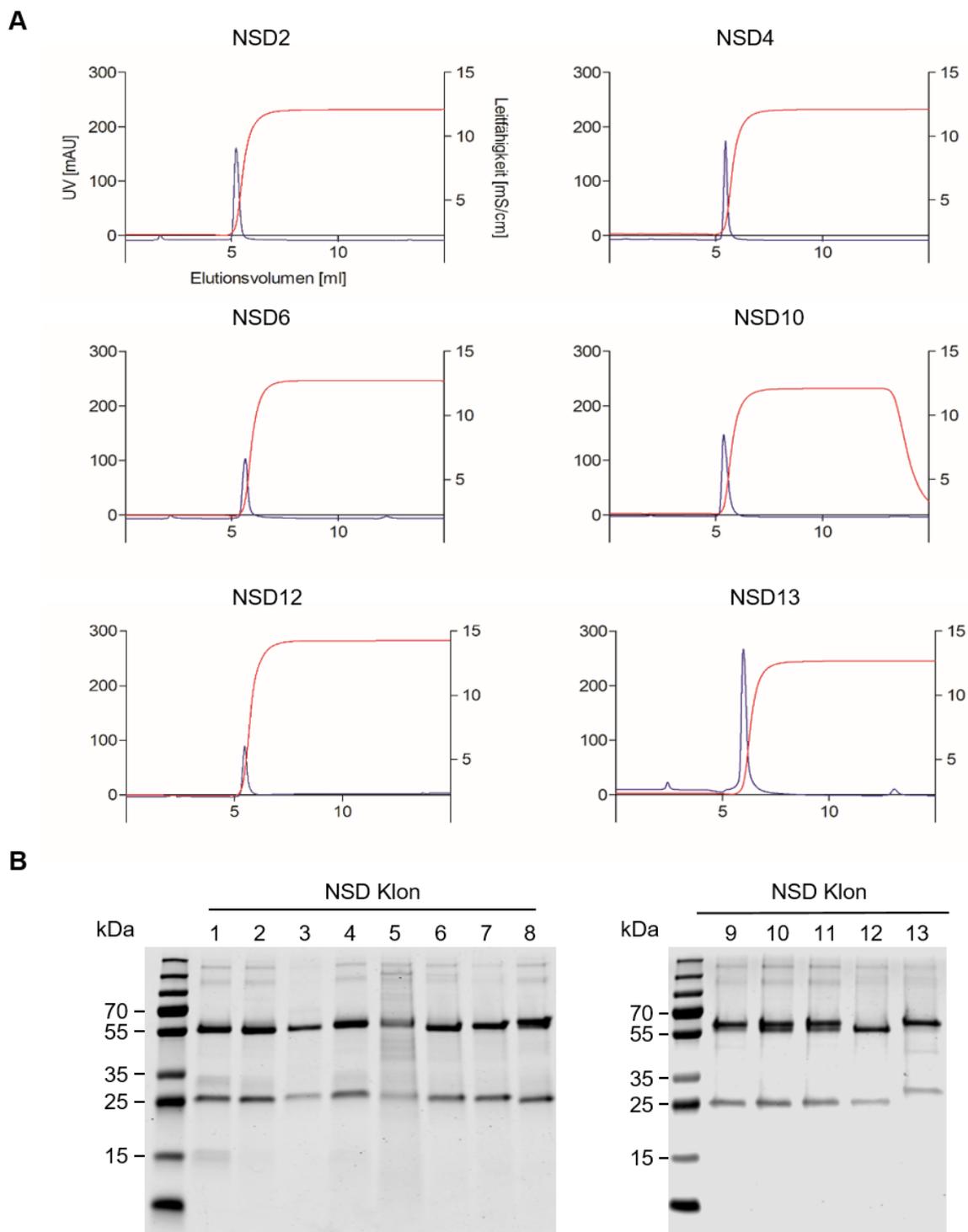


Abb. 33: Elutionschromatogramme exemplarischer Aufreinigungen rekombinanter monoklonaler Patientenantikörper und qualitative Analyse der Antikörper über SDS-PAGE. A Der Zellkulturüberstand der Transfektionen von jeweils zwei T175 Flaschen adhärenter HEK293 Zellen mit NSD-Antikörperkonstrukten wurde gesammelt und affinitätschromatographisch aufgereinigt. Dargestellt sind die Elutionschromatogramme der Aufreinigungen 6 verschiedener Patientenantikörper. Die Elutionspeaks geben Hinweise auf die Menge des aufgereinigten Antikörpers, waren jedoch kein Maß für die genaue Quantität des Antikörpers in der Probe. **B** 3 µg jedes Eluats wurden auf ein 4-20%iges Polyacrylamidgel aufgetragen und die Elektrophorese für 1 h bei 120 V und RT durchgeführt. Gele wurden anschließend mit dem GelCode Blue Färbereagenz gefärbt.

Tab. 33: Übersicht über Proteinkonzentration, Probenvolumen und Ausbeute der rekombinant produzierten monoklonalen Patientenantikörper. Die Produktion der 13 Patientenantikörper zeigten Ausbeuten zwischen 70 µg (NSD9) und 237 µg (NSD7). Proteinkonzentrationen lagen zwischen 126 µg/ml (NSD9) und 564 µg/ml (NSD7) und Probenvolumina waren üblicherweise 400 – 600 µl.

Antikörper- konstrukt	Protein- Konzentration [µg/ml]	Volumen [µl]	Ausbeute [µg]
NSD1	406	480	195
NSD2	257	470	121
NSD3	140	1040	146
NSD4	235	500	118
NSD5	177	470	83
NSD6	146	600	88
NSD7	564	420	237
NSD8	228	480	110
NSD9	126	470	70
NSD10	324	531	172
NSD11	166	470	78
NSD12	206	470	97
NSD13	343	450	154

3.2.3 Antigenbindeanalysen rekombinant hergestellter Antikörper

Produzierte Antikörperkonstrukte wurden in Hinblick auf das von ihnen erkannte Antigen mithilfe mehrerer Kooperationspartner analysiert. Hierzu erfolgte zum einen die Testung der Antikörperkonstrukte an HSV-1 oder HSV-2 infizierten Zellkulturzellen über indirekte Immunfluoreszenz in einem zertifizierten Diagnostiklabor (Labor Stöcker, Lübeck) zum anderen mittels Western Blot Analyse gegenüber dem Lysat HSV-1- oder HSV-2-infizierter Zellkulturzellen (Arbeitsgruppe Prof. Hengel, Institut für Virologie, Universität Freiburg). Auf Grundlage der erhaltenen Ergebnisse wurden im Weiteren drei ausgewählte Klone für eine Immunpräzipitation von Antigenen aus dem Lysat HSV-1 infizierter Zellkulturzellen genutzt und das Eluat der Immunpräzipitationen massenspektrometrisch analysiert (Molecular Proteomics Laboratory, Universität Düsseldorf). Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Experimente dargestellt.

3.2.3.1 Immunfluoreszenzanalysen

Die Immunfluoreszenzanalysen der rekombinanten monoklonalen Antikörper sowie von Patientenliquor wurde zunächst an einer mit HSV-1 oder HSV-2 infizierten humanen Zelllinie durchgeführt. Hierbei wurden jeweils zwei Verdünnungen der rekombinanten monoklonalen Antikörper oder unverdünnter Liquor verwendet, aus welchem die Antikörperproduzierenden

Zellen gewonnen worden waren. Um weitere Spezifitäten oder Kreuzreaktionen zu untersuchen, wurden alle Proben hinsichtlich ihrer Bindung an verschiedene Gewebe sowie auf ihre Bindung an ausgewählte neuronale Antigene untersucht. Alle Testungen erfolgten sowohl mit einem FITC-konjugierten anti-human IgG Sekundärantikörper als auch separat mit einem FITC-konjugierten anti-human IgM Sekundärantikörper. Die Experimente wurden von Frau Swantje Mindorf von der Firma Euroimmun (Lübeck) durchgeführt.

3.2.3.1.1 Testung an HSV-1 oder HSV-2 infizierten Zellkulturzellen

Die Untersuchungen von Patientenliquor an HSV-1 oder HSV-2 infizierten Zelllinien mit anti-human IgG Sekundärantikörper (s. Abb. 34 A) zeigten jeweils ein positives Signal. Die Intensität der Immunfluoreszenz war hierbei vergleichbar mit den genutzten Positivkontrollen und auch mit dem Bindemuster der Positivkontrollen (s. Abb. 34 A). Das Zytoplasma der Zellen erschien stark fluoreszent, wohingegen der Zellkern eine schwächere Fluoreszenzfärbung aufwies.

Tab. 34: Übersicht über die durch Immunfluoreszenzanalyse ermittelten Bindungseigenschaften der rekombinanten monoklonalen Patientenantikörper an HSV-1 oder HSV-2 infizierte Zellkulturzellen. Klone banden entweder spezifisch an HSV-1 infizierte Zellen (Gruppe 1) oder sowohl an HSV-1- als auch an HSV-2 infizierte Zellen (Gruppe 2). Zwei Klone zeigten keine Bindung gegenüber HSV-1 oder HSV-2 infizierten Zellen (Gruppe3).

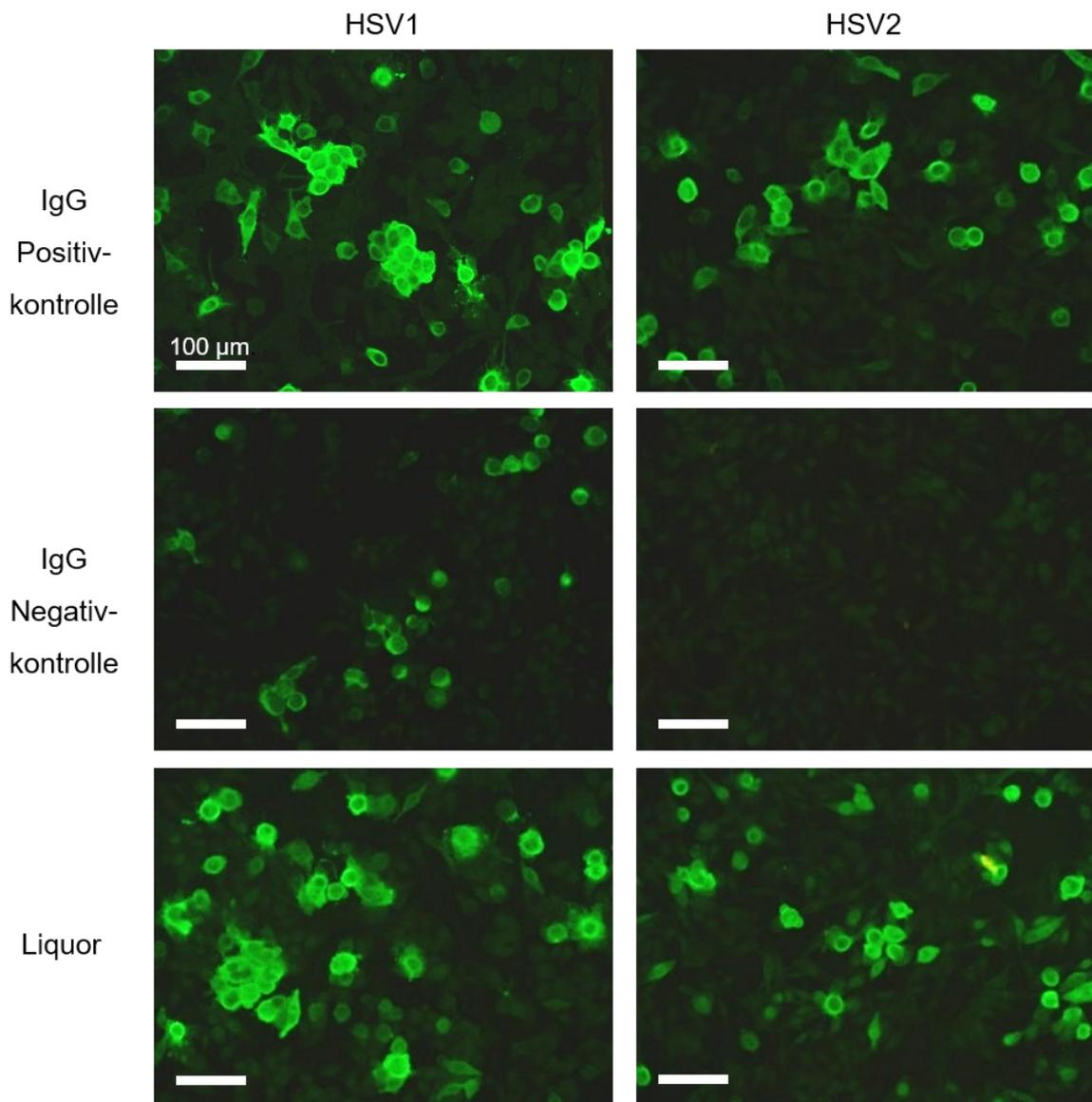
Gruppe	Spezifität	Antikörperklon	Antigenbindeort
1	HSV-1 infizierte Zellen	NSD2	Zellkern (ZK)
		NSD7	Zytoplasma (ZP)
		NSD10	ZK und ZP
		NSD11	ZK
		NSD12	ZP
		NSD13	ZK
2	Sowohl HSV-1- als auch HSV-2-infizierte Zellen	NSD1	ZK
		NSD3	ZK und ZP
		NSD4	ZK
		NSD8	ZK und ZP
		NSD9	ZK
3	Keine Reaktion	NSD5, NSD6	-

In Hinblick auf die Analyse der getesteten rekombinanten monoklonalen Patientenantikörper konnten für die untersuchten Antikörper unterschiedliche Bindungsverhalten beobachtet werden (s. Tab. 34). Sechs Antikörperklone (NSD2, NSD7, NSD10, NSD11, NSD12, NSD13)

zeigten eine spezifische Bindung nur an HSV-1 infizierte Zellen. NSD2, NSD11 und NSD13 erkannten hierbei Strukturen im Zellkern, NSD7 und NSD12 erkannten Strukturen im Zytoplasma und NSD10 schien Strukturen in Zellkern und Zytoplasma zu erkennen. Des Weiteren banden fünf Antikörperklone (NSD1, NSD3, NSD4, NSD8, NSD9) sowohl HSV-1 als auch HSV-2 infizierte Zellen. NSD1, NSD4 und NSD9 erkannten Antigene im Zellkern, NSD3 und NSD8 erkannten Zielstrukturen in Zellkern und Zytoplasma. Das Fehlen eines Fluoreszenzsignals gegenüber HSV-1 als auch in HSV-2 infizierten Zellen konnte für die Antikörper NSD5 und NSD6 beobachtet werden.

Für die Testung von Patientenliquor oder Patientenantikörper an HSV-1 oder HSV-2 infizierten Zellen mit FITC-konjugiertem anti-human IgM Sekundärantikörper konnte kein Fluoreszenzsignal beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

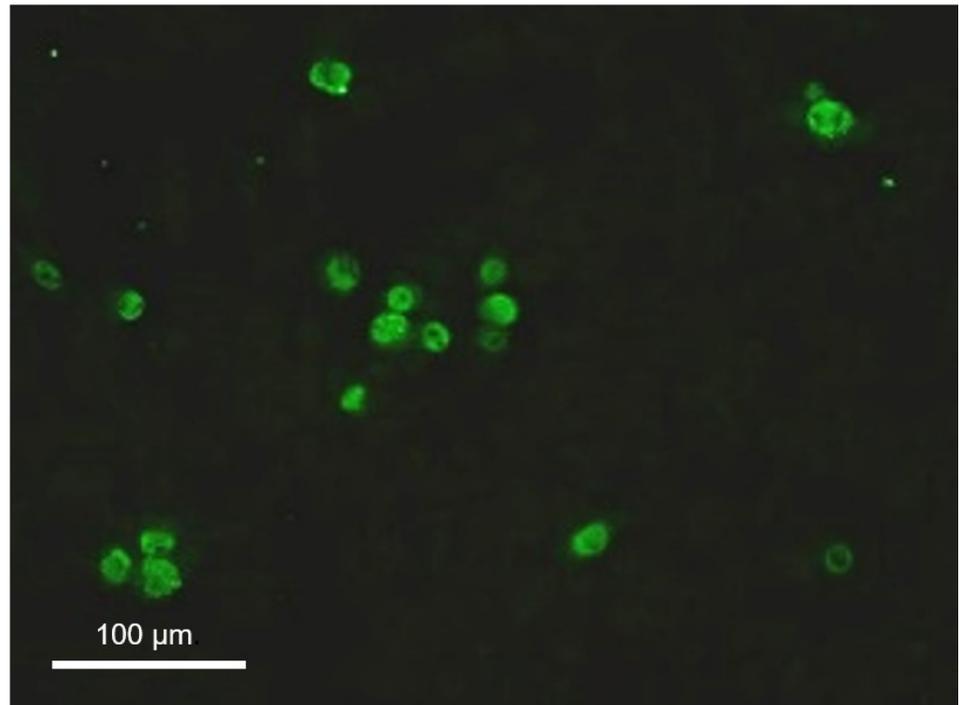
A



B

HSV1

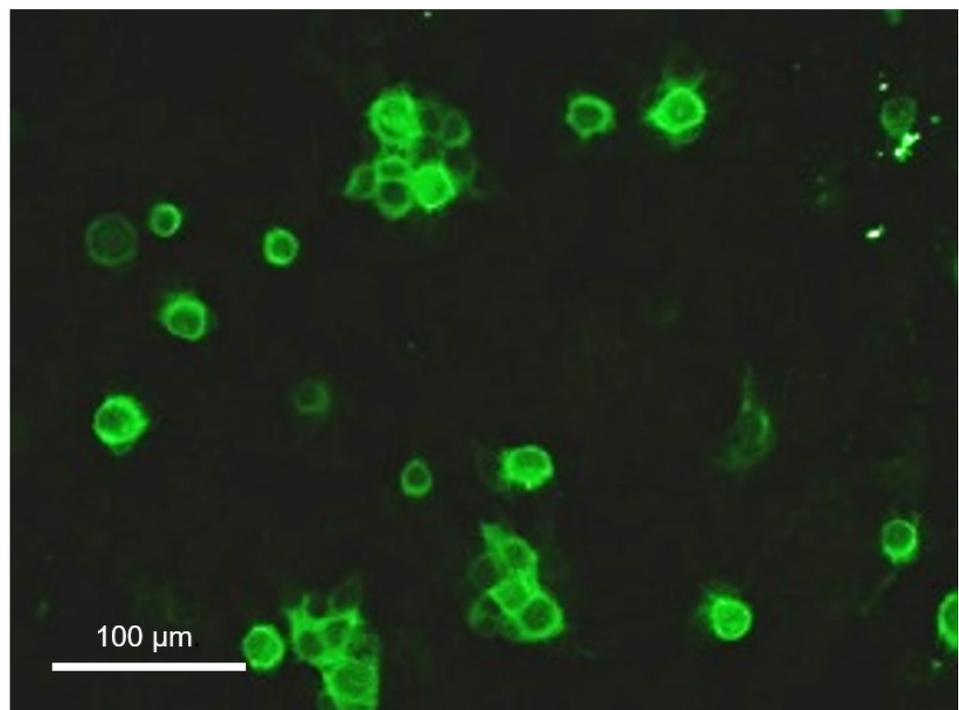
NSD1
exemplarisch
für Zellkern-
färbung



C

HSV1

NSD12
exemplarisch
für Zytoplasma-
färbung



D

HSV1

NSD8
exemplarisch
für Zellkern-
und
Zytoplasma-
färbung

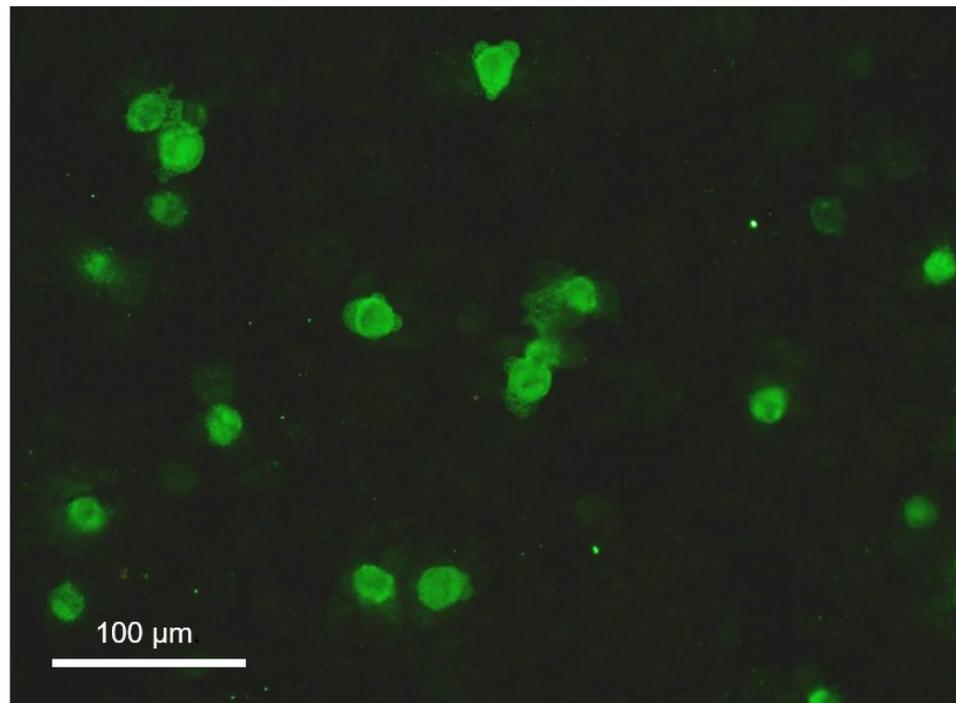


Abb. 34: Immunfluoreszenztestung rekombinanter monoklonaler Patientenantikörper oder von Patientenliquor an HSV-1 oder HSV-2 infizierten Zellkulturzellen. Jeweils zwei verschiedene Konzentrationen jeder Antikörperprobe oder aber unverdünnter Patientenliquor wurden an Biochips getestet, welche mit HSV-1 oder HSV-2 infizierten Zellkulturzellen beschichtet worden waren. Die Zellen waren zuvor fixiert und permeabilisiert worden. Der Chip wurde gewaschen und mit einem FITC-konjugierten anti-human IgG Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen eingedeckelt und über Fluoreszenzmikroskopie untersucht. IgG Positivkontrolle = biologisches humanes HSV-positives Material; IgG-Negativkontrolle = biologisches humanes HSV-negatives Material.

3.2.3.1.2 Testung an ausgewählten Geweben oder neuronalen Antigenen

Die Testung der Patientenproben erfolgte an Nervengewebe aus verschiedenen Spezies (Hippocampus Ratte, Kleinhirn Ratte, Kleinhirn Affe, Nervus suralis), Darm (Affe), Pankreas (Affe). Außerdem wurden monospezifische Tests gegenüber neuronalen Antigenen (GAD, NMDAR, GABA-B-R, Aquaporin 4, LGI1, CASPR2) durchgeführt. Die Ergebnisse der Analysen durchgeführt mit anti-human IgG Sekundärantikörper waren durchweg negativ. Genauso wenig konnten Signale unter Verwendung des anti-human IgM Sekundärantikörpers beobachtet werden.

3.2.3.2 Western Blot Analysen

3.2.3.2.1 Testung an Lysaten HSV-1-infizierter Zellkulturzellen

Für die Testung der rekombinanten monoklonalen Patientenantikörper im Western Blot wurde das Lysat von HSV-1 oder HSV-2 infizierten Zelllinien über reduzierende SDS-PAGE aufgetrennt und die aufgetrennten Proteine auf eine Membran geblottet. Als Negativkontrolle

diente das Lysat von nicht infizierten Zellen. Rekombinante monoklonale Antikörper wurden als Primärantikörper separat an den jeweiligen Membranstreifen genutzt und die Blots mithilfe eines Peroxidase-konjugierten anti-human Sekundärantikörpers und einem Peroxidasesubstrat entwickelt. Die Ergebnisse des Blots sind in Abb. 35 zu sehen. Es ließ sich erkennen, dass alle Antikörperklone spezifisch an das Lysat aus HSV-1 infizierten Zellen banden. Keiner der Klone zeigte ein Signal gegenüber nicht infizierten Zellen oder aber gegenüber HSV-2 infizierter Zellen. In Bezug auf die Bindung von HSV-1 Proteinbanden ließ sich beobachten, dass neun der getesteten Antikörperklone (NSD1, NSD2, NSD4, NSD7 – NSD11, NSD13) ein ähnliches Bandenmuster zeigten. Die Antikörper banden an eine Proteinbande mit einer Größe von ca. 40 kDa sowie an eine Bande von ca. 50 kDa. Das Ergebnis für NSD12 und NSD3 wich vom Ergebnis der anderen Antikörper ab. NSD12 zeigte im Vergleich zu allen anderen Klonen hierbei ein besonders außergewöhnliches auffälliges Bandenmuster. Der Antikörper erkannte deutlich Proteinbanden einer Größe von ca. 32 kDa, 60 kDa und 120 kDa mit einem weiteren, schwächeren Signal für eine 90 kDa Bande. Aufgrund seines auffälligen Bandenmusters wurde NSD12 im Folgenden weiter hinsichtlich seines Antigens untersucht.

3.2.3.2.2 Testung an HSV-1 Glykoproteinen

Auf Grundlage der Ergebnisse der bisher durchgeführten Antigenbindeanalysen wurden die Klone NSD12, NSD13 und NSD10 für die Testung ihrer Bindung an HSV-1 Glykoproteine ausgewählt. NSD12 hatte im Western Blot ein außergewöhnliches Bandenmuster gezeigt (Abb. 35) und zuvor in der Immunfluoreszenz ein starkes Signal im Zytoplasma HSV-1 infizierter Zellen aber nicht HSV-2 infizierter Zellen aufgewiesen (Tab. 34, Abb. 34 C). NSD13 hatte im Western Blot eine besonders intensive Bande bei 40 kDa gezeigt und band in der Immunfluoreszenz interessanterweise im Zellkern von HSV-1 aber nicht von HSV-2 infizierten Zellen (Tab. 34). NSD10 zeigte im Western Blot ein Bandenmuster wie die Mehrheit der anderen getesteten Antikörper und wurde aus Interesse an der Bedeutung dieses Bandenmusters ausgewählt. Des Weiteren zeigte NSD10 in der Immunfluoreszenz als einziger Klon eine Bindung an Zellkern und Zytoplasma HSV-1 infizierter aber nicht HSV-2 infizierter Zellen (Tab. 34).

Die Bindungsanalyse der drei ausgewählten Antikörper gegenüber HSV-1 Glykoproteinen ist in Abb. 36 zu sehen. Zum einen wurde hierbei die Bindung an jedes HSV-1 Glykoprotein untersucht (Abb. 36 A), zum anderen wurde spezifisch die Bindung an HSV-1 Glykoprotein E analysiert (Abb. 36. B).

Ergebnisse

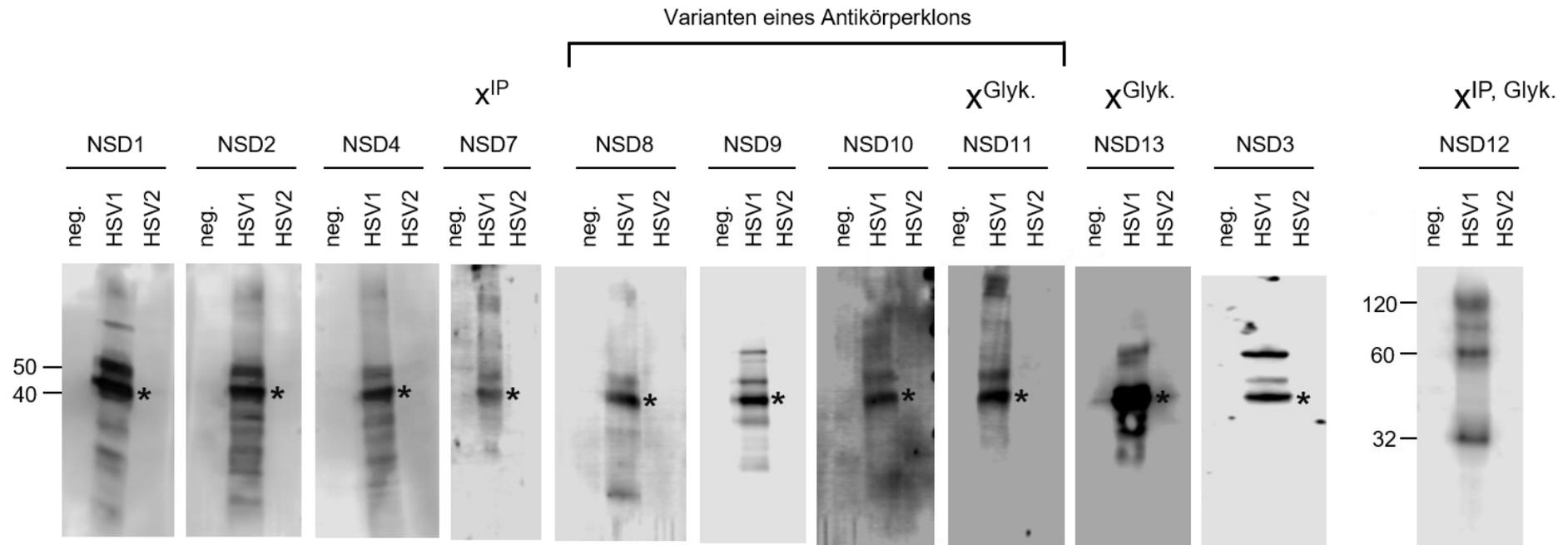


Abb. 35: Antigen-Bindeanalyse rekombinant hergestellter monoklonaler Antikörper gegenüber HSV-1 Proteinen über Western Blot. Das Lysat HSV-1 oder HSV-2 infizierter Zellen sowie das Lysat nicht infizierten Zellen (neg.) wurde über reduzierende SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran geblottet. Die Entwicklung des Western Blots erfolgte separat mit den verschiedenen Patientenantikörpern und einem Peroxidase-konjugierten anti-human Sekundärantikörper. Ausgewählte Antikörper wurden folgend zur Immunpräzipitation von HSV-1 Antigenen und anschließender massenspektrometrischer Analyse verwendet (x^{IP}) oder hinsichtlich ihrer Bindung an HSV-1 Glykoproteine untersucht (x^{Glyk})

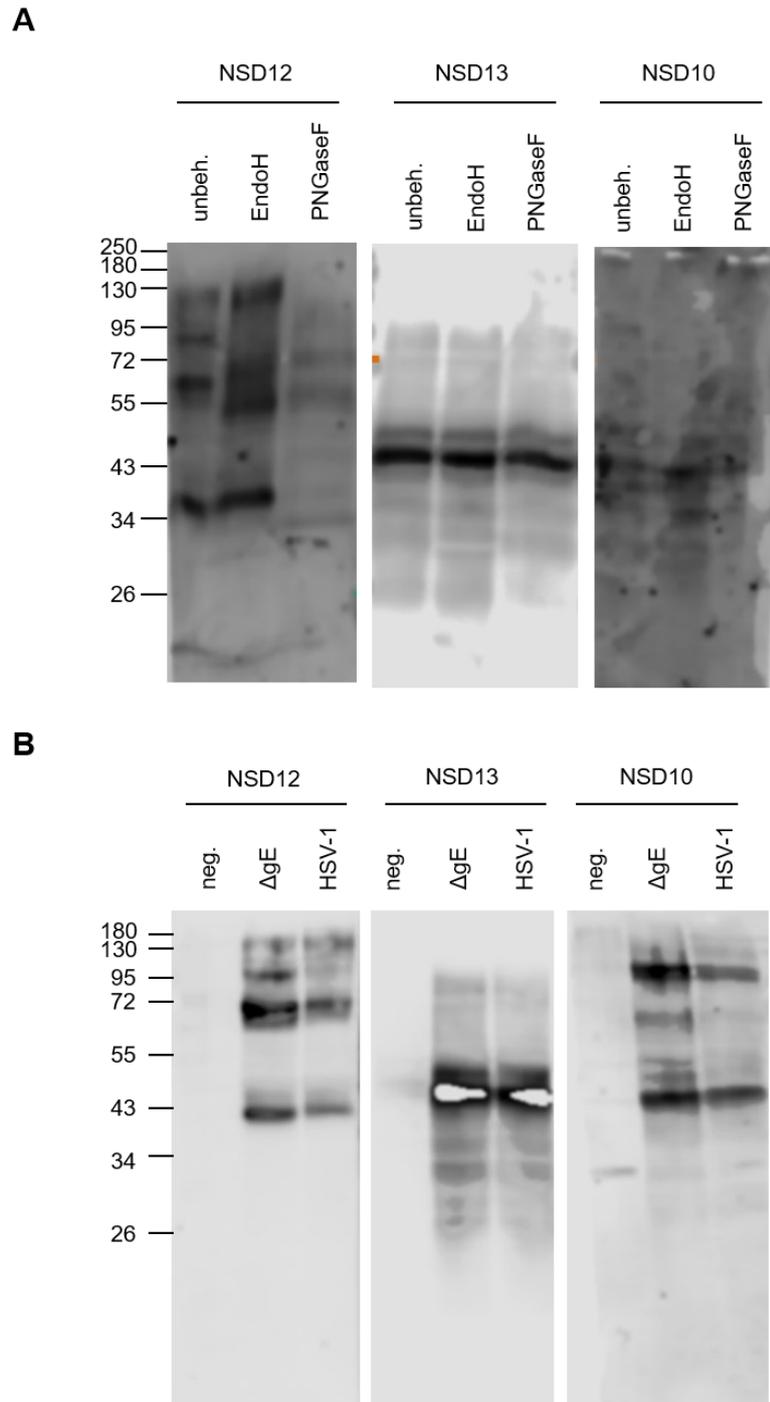


Abb. 36: Antigen-Bindeanalyse der Klone NSD12, NSD13 und NSD10 gegenüber HSV-1 Glykoproteinen oder gegenüber HSV-1 Glykoprotein E mittels Western Blot. A Es wurde Lysat aus HSV-1 infizierten Zellen entweder unbehandelt auf ein Proteingel aufgetragen (unbeh.) oder das Lysat wurde jeweils mit EndoH oder PNGaseF verdaut (EndoH, PNGaseF) und dann ebenfalls in weitere Taschen des Proteingels aufgetragen. **B** Es wurde entweder Lysat aus nicht infizierten Zellen zur Gelelektrophorese genutzt (neg.), Lysat aus HSV-1 infizierten Zellen (HSV-1) oder Lysat aus Zellen, welche mit einer HSV-1 Mutante ohne Glykoprotein E infiziert worden waren (Δ gE). **A,B** Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine auf eine Membran transferiert. Die Entwicklung des Western Blots erfolgte mittels der jeweiligen NSD Antikörper als Primärantikörper und einem anti-human Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper.

Die Ergebnisse der Antigen-Bindeanalyse gegenüber HSV-1 Glykoproteinen (Abb. 36 A) zeigten für NSD12 eine eindeutige Erkennung glykosylierter HSV-1 Strukturen. NSD12 band an das Lysat HSV-1 infizierter Zellen, jedoch band der Antikörper nicht mehr, nachdem das Lysat mit PNGase verdaut worden war. Für NSD13 ließ sich eine solche Beobachtung nicht feststellen. Der Antikörper band an das Lysat HSV-1 infizierter Zellen unabhängig vom Glykosylierungszustand enthaltener Proteine. Für NSD10 war die Analyse uneindeutig. Die Testung der drei ausgewählten Antikörper gegenüber HSV-1 Glykoprotein E deutete für keinen von ihnen eine Bindung an das spezielle Antigen an (Abb. 36 B). Im Falle einer Erkennung von gE wäre eine deutliche Bande für das Lysat HSV-1 infizierter Zellen zu erwarten gewesen, welche im Lysat von mit der Deletionsmutante infizierten Zellen nicht vorhanden ist.

3.2.3.3 Immunpräzipitation von HSV-1 Proteinen mittels NSD12 und NSD7 und anschließende massenspektrometrische Analyse der Präzipitate

Um das von NSD12 gebundene Glykoprotein näher zu charakterisieren und eventuell auch zu identifizieren wurde NSD12 zur Immunpräzipitation von HSV-1 Proteinen (Lysat HSV-1 infizierter Zellen) und anschließender massenspektrometrischer Analyse des Präzipitats genutzt. Virale Glykoproteine sind oftmals Ziel neutralisierender Antikörper. Da sich für NSD13 und NSD10 in vorherigen Analysen keine Bindung an Glykoproteine erkennen ließ, wurde statt jenen Antikörpern nun NSD7 zur Analyse seines Antigens in das Experiment mit einbezogen. NSD7 hatte im initial durchgeführten Western Blot das dem Großteil der Antikörper entsprechende Bandenmuster gezeigt. In der Immunfluoreszenz band der Antikörper ebenso wie NSD12 im Zytoplasma von HSV-1 infizierten aber nicht HSV-2 infizierten Zellen. Da dies ein Hinweis auf die Bindung eines Glykoproteins sein könnte, wurde NSD7 nun über Immunpräzipitation und Massenspektrometrie hinsichtlich der von ihm präzipitierten Proteine analysiert.

Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analysen sind in Tab. 35 zu sehen. Der Kontrollantikörper mit irrelevanter Spezifität zeigte die Präzipitation verschiedener HSV-1 Proteine („Kontrolle“). Diese Treffer ließen sich zu einem großen Teil auch für NSD12 oder NSD7 finden. Auffällig war die für NSD12 zu beobachtende, mengenmäßig dominante Präzipitation von Glykoprotein C (gC). gC wurde vom Kontrollantikörper nicht präzipitiert. Dies legte die Spezifität von NSD12 für gC nahe. NSD7 präzipitierte ähnliche Proteine wie der genutzte Kontrollantikörper. Die besonders auffällige Präzipitation eines bestimmten Proteins war nicht zu erkennen.

Ergebnisse

Tab. 35: Tabellarische Darstellung der von NSD12, NSD7 oder von einem Kontrollantikörper präzipitierten HSV-1 Proteine identifiziert über Massenspektrometrie. Präzipitierte Proteine sind geordnet nach ihrer Quantität in der jeweiligen Probe (Trefferposition 1 = Vorliegen in hoher Anzahl; Trefferposition 20 = Vorliegen in geringer Anzahl). Grau hinterlegte Proteine wurden in der Analyse mittels Kontrollantikörper gefunden.

Trefferposition	Kontrolle	Proteinbezeichnung	NSD12	NSD7
1	DBP	DNA-bindendes Hauptprotein	gC	gE
2	gE	Virushüllen-Glycoprotein E	gE	gI
3	gI	Virushüllen-Glycoprotein I	gI	UL47
4	gB	Virushüllen-Glycoprotein B	MCP	MCP
5	UL49	Tegumentprotein VP22	NEC2	gB
6	MCP	Hauptkapsidprotein	gB	UL49
7	UL47	Tegumentprotein UL47	UL47	US10
8	NEC2	Zellkernaustrittsprotein 2	UL49	NEC2
9	NEC1	Zellkernaustrittsprotein 1	NEC1	ICP4
10	UL48	Tegumentprotein VP16	RIR1	TRX1
11	RIR1	Ribonukleotidreduktase Große Untereinheit	UL48	gC
12	ICP4	Viraler Haupttranskriptionsfaktor ICP4	US10	UL48
13	UL42	DNA-Polymerase-Prozessivitätsfaktor	UL45	NEC1
14	gD	Virushüllen-Glycoprotein D	DBP	TRX2
15	US11	Zusatzfaktor US11	ICP4	US11
16	V-FGR	Tyrosinkinase-transformierendes Protein Fgr	UL42	gD
17	TRX2	Triplexkapsidprotein 2	TRX1	RIR1
18	US10	Virionprotein US10	TRX2	US2
19	gH	Virushüllen-Glycoprotein H	V-FGR	UL42
20	UL36	Großes-Tegumentprotein-Deneddylase		V-FGR

4 Diskussion

4.1 Untersuchung der Rolle des Antikörper Isotyps in Demyelinisierungsprozessen

4.1.1 Anti-MOG IgM in Demyelinisierungsprozessen

Die von mir in Zusammenarbeit mit einer erfahrenen Kollegin durchgeführten Experimente zeigten für den mit Monomer und Dimerstruktur vorliegenden anti-MOG IgM eine ähnliche Demyelinisierungsfähigkeit wie für den hierzu standardmäßig in unserem System verwendeten anti-MOG IgG. Ein deutlicher Unterschied in der Stärke der Demyelinisierung sowie in ihrem zeitlichen Verlauf ließ sich zwischen den beiden Isotypen nicht feststellen. Die Demyelinisierung mittels anti-MOG IgM ist abhängig von Komplement, damit konnte ich zeigen, dass die Demyelinisierung über den klassischen Komplementweg erfolgt genauso wie schon für den IgG Isotyp gezeigt. Unklar bleibt der Einfluss der IgM Oligomerisierung zu IgM Pentamer- oder Hexamerstrukturen auf die Demyelinisierungsfähigkeit des anti-MOG IgM. Die von mir rekombinant hergestellten anti-MOG IgM Antikörper schienen vorwiegend als Monomere und Dimere vorzuliegen (s. native PAGE-Analyse hergestellter Antikörper in Abb. 21 A) und IgM Pentamere oder Hexamere waren in den Proben nur geringfügig vorhanden. Die erhöhte Avidität dieser Strukturen sowie die gesteigerte Komplementaktivierung durch diese Strukturen konnten in meinen Experimenten also nicht zu einer gesteigerten Effektorfunktion von anti-MOG IgM im Vergleich zu anti-MOG IgG führen.

4.1.2 Anti-Sulfatid IgG und anti-Sulfatid IgM in Demyelinisierungsprozessen

In den Analysen von anti-Sulfatid IgG und anti-Sulfatid IgM in unserem OSC-Modell konnte ich keine Demyelinisierungsfähigkeit der beiden Antikörper erkennen. Für anti-Sulfatid hatte ich zuvor die Bindung an Myelin-reiche Regionen des organotypischen Schnitts gezeigt (s. Abb. 23). Da die exprimierten anti-Sulfatid Antikörper identische variable Antikörperregionen besitzen, gehe ich auch von einer Bindung von anti-Sulfatid IgM an die OSCs aus. Der von mir klonierte Antikörper ist ursprünglich ein muriner IgM Antikörper, welcher *in vivo* zur Demyelinisierung in der Lage ist. Die Testung des anti-MOG mit humanem IgM in unserem OSC-Modell zeigt, dass Antikörper mit humanem IgM Isotyp in unserem System prinzipiell zu einer Demyelinisierung in der Lage sind. Als Grund für das Fehlen der Demyelinisierungsfähigkeit für den anti-Sulfatid mit humanem IgM vermute ich das unzureichende Vorliegen des Antikörpers als Pentamer oder Hexamer.

4.1.3 Evaluation von IgM-Aufreinigungsmethoden

Meine Testung verschiedener Methoden zur Aufreinigung von polyklonalem IgM zeigten, dass prinzipiell alle genutzten Methoden in der Lage sind IgM als intakte Pentamere und Hexamere aufzureinigen. Die in den Affinitätschromatographischen Methoden genutzten teils sauren Elutionsbedingungen (pH 3.5 für das POROS Material, pH 2.7 für die anti-IgM Agarose, pH 4 für das LigaTrap Material) führten hierbei nicht zu einer Degradierung der IgM Oligomere. Quantitativ unterschieden sich die Methoden in ihrer Fähigkeit polyklonales IgM aufzureinigen und bewegten sich zwischen Ausbeuten von 2 % bis 30 %. Zur Verifizierung dieser Ausbeuten sollte eine Wiederholung der durchgeführten Aufreinigung unter identischen Bedingungen durchgeführt werden. Ebenfalls wünschenswert wäre eine Testung der verschiedenen Methoden hinsichtlich ihrer Fähigkeit polyklonales IgM aufzureinigen, welches zuvor in Zellkulturüberstand nicht transfizierter HEK293 Zellen verdünnt wurde. Auf diese Weise könnte ich die Aufreinigungsqualität bzw. -spezifität jeder Methode unter Anwesenheit diverser weiterer HEK293 Zell Proteine untersuchen.

In meinen Experimenten zur Aufreinigung monoklonaler IgM Antikörper, welche rekombinant in unserem Expressionssystem hergestellt worden waren, zeigten sich gute Ergebnisse für die Aufreinigung mittels anti-IgM Agarose. Dieses Chromatographiematerial war im Vergleich zu den weiteren getesteten Materialien (POROS, LigaTrap, Hitrap) als einziges in der Lage, reine IgM Antikörper aus HEK293 Zellkulturüberstand aufzureinigen. Diejenigen IgM Aufreinigungsmethoden, welche sich in der Aufreinigung der polyklonalen IgM Probe zuvor als quantitativ vielversprechender erwiesen hatten, zeigten in der nativen gelelektrophoretischen Analyse keine distinkten Banden (POROS), diverse Banden verschiedener Größen (LigaTrap) oder Banden, welche in ihrer Größe einem IgM Monomer und Dimer entsprechen könnten (HiTrap). Proteinbanden, welche der Größe von IgM Schwere- oder κ Leichtkette entsprechen, ließen sich für diese Methoden innerhalb der reduzierenden SDS-PAGE nicht eindeutig erkennen. Ich gehe davon aus, dass die verschiedenen Materialien neben eventuell aufgereinigten IgM Antikörpern auch unspezifisch HEK293 Zell Proteine aufreinigten.

Die native Analyse der Antikörperproben, welche mittels anti-IgM Agarose aufgereinigt worden waren, zeigte dominierende Proteinbanden, welche IgM Monomeren oder Dimeren entsprechen könnten. Ein Signal für IgM Pentamere oder Hexamere war sowohl für anti-MOG IgM als auch für anti-Sulfatid IgM vorhanden, jedoch war es im Vergleich zu Monomer- und Dimerbanden schwächer.

Eine technische Herausforderung in meiner Arbeit war die Herstellung und Aufreinigung rekombinanter monoklonaler IgM Pentamere (mit J-Kette) oder Hexamere (ohne J-Kette). Die Testung der anti-IgM Agarose zur Aufreinigung einer polyklonalen IgM Probe zeigte, dass die Methode selbst insbesondere die in der Aufreinigung verwendeten Puffer prinzipiell nicht zu

einer Degradierung von IgM Pentameren oder Hexameren führen. Die Tatsache, dass die von mir produzierten monoklonalen IgM Antikörper trotzdem nicht als Pentamere oder Hexamere aufgereinigt werden konnten, könnte einen Hinweis auf eine fehlerhafte Produktion der Oligomere in unserem Expressionssystem darstellen.

4.1.4 Herstellung von IgM Pentameren oder Hexameren in unserem System

Die Ergebnisse aus den mit anti-IgM Agarose durchgeführten Aufreinigungen deuten an, dass die Expression von IgM Pentameren in unserem Expressionssystem eventuell fehlerhaft verläuft. Ein offensichtlicher Grund hierfür ist nicht erkennbar. Die Analyse der mittels anti-IgM Agarose aufgereinigten monoklonalen IgM Antikörper zeigte, dass sowohl für anti-MOG als auch für anti-Sulfatid Antikörper IgM Schwereketten sowie κ Leichtketten exprimiert worden waren. Die Tatsache, dass Leichtketten über die Aufreinigung mittels anti-IgM Agarose ebenfalls aufgereinigt werden konnte, legt darüber hinaus eine teilweise Assemblierung der IgM Schwerekette mit der κ Leichtkette nahe. In der nativen Analyse der Proben ließen sich Signale ausmachen, die im Größenbereich von IgM Monomeren und Dimeren liegen. Für die Klonierung der IgM-Konstrukte wurde der in unserem Labor standardmäßig genutzte IgG Expressionsvektor lediglich in der Sequenz seiner konstanten Schwerekettenregion verändert. Daher gehen wir von einer korrekten Expression der IgM Schwerekette, sowie der Bildung intakter Antikörper Monomere aus. Die Abwesenheit eines intensiven Signals für IgM Pentamere oder Hexamere für die von mir rekombinant produzierten monoklonalen IgM Antikörper deutet auf eine fehlerhafte Assemblierung der IgM Oligomere in den von mir genutzten HEK293 Zellen hin. Prinzipiell sind HEK293 Zellen zur Herstellung von IgM Pentameren in der Lage (Chromikova et al., 2015; Hennicke et al., 2020), es kann allerdings von Unterschieden zwischen individuell verwendeten HEK293 Zelllinie ausgegangen werden. In der Literatur ist der Prozess der IgM Biosynthese innerhalb von B-Zellen gut beschrieben (335 Anelli 2007, 339 Anken 2009). Interessant ist der in diesem Zusammenhang ein Kontrollmechanismus, welcher die Oligomerisierung von zu sekretierenden IgM Pentameren überprüft und nicht vollständig assemblierte IgM Antikörper in der Zelle zurückhält. Neben der Nutzung anderer standardmäßig zur Expression rekombinanter Proteine verwendeten Zelllinien wie CHO Zellen wären auch Expressionswirte interessant, welche einen solchen Kontrollmechanismus innehaben.

4.1.5 Rolle der J-Kette bei der Bildung von IgM Oligomeren

In meinen Experimenten wurden zwei Myelin-spezifische Antikörper als IgM Antikörper kloniert, entweder ohne folgende J-Kette oder mit folgender J-Kette kloniert. Es ist bekannt, dass IgM Moleküle ohne J-Kette vorrangig Hexamerstrukturen bilden, mit J-Kette bilden sie vor allem Pentamerstrukturen (Randall et al., 1992). Leider konnte ich für die von mir

produzierten Antikörper nur unzureichende Mengen an gebildeten IgM Pentameren oder Hexameren erkennen. Daher konnte ich den Einfluss der J-Kette auf die IgM Oligomerisierung bisher noch nicht angemessen beschreiben. Neben der Analyse gebildeter Oligomere ohne oder mit J-Kette, wäre außerdem noch ein Nachweis der Expression der J-Kette interessant. Bisher konnte ich das Vorliegen einer J-Kette im Rahmen der Expression entsprechender IgM Konstrukte nicht beobachten. Zu erwarten wäre eine Proteinbande von 15 kDa im reduzierenden SDS-PAGE Gel. Ein solches Signal blieb jedoch z. B. bei der Analyse des mittels anti-IgM Agarose aufgereinigten anti-MOG IgM mit J-Kette aus (s. Abb. 21 B). Der Grund für das Ausbleiben des Signals könnte hierbei in der schon diskutierten möglicherweise unzureichenden Oligomerisierung von IgM zu IgM Pentameren liegen.

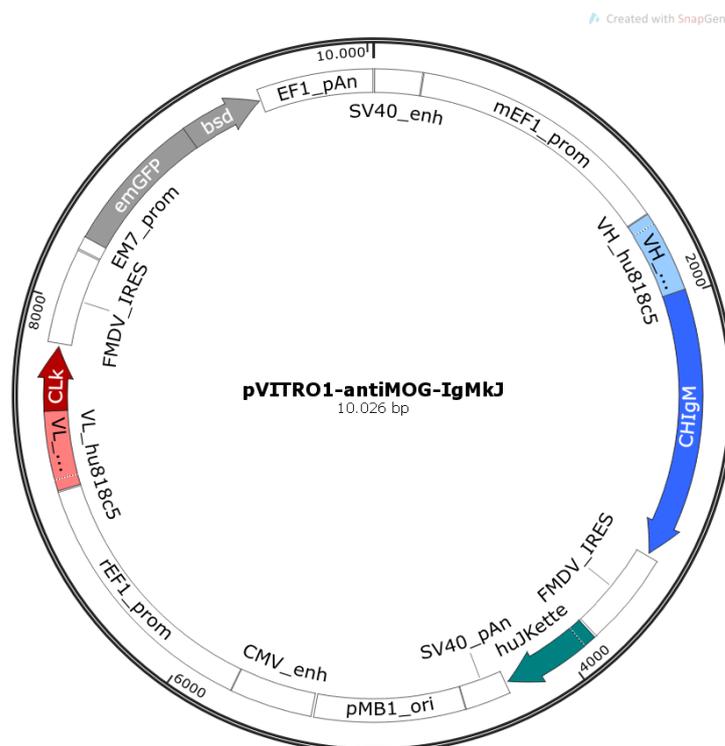


Abb. 37: Schematische Vektorkarte des anti-MOG IgM Expressionsvektors mit J-Kette. Die J-Kette wurde zusammen mit einer ihr vorgelagerten internen ribosomalen Eintrittsstelle downstream der C μ Region kloniert. Durch Transkription entsteht eine 2747 nt lange mRNA. Die Länge der mRNA wird nicht als kritisch für die Expression der J-Kette gewertet.

Rein methodisch erwarte ich die korrekte Expression der J-Kette in unserem System. Die Klonierung der J-Kette in unsere IgM Antikörper Expressionsvektoren erfolgte downstream der C μ Region und zusammen mit einer vorgelagerten internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES). Die genutzte IRES stellte eine identische Kopie der schon im Expressionsvektor vorhandenen IRES downstream der C κ Region dar. Erfahrungsgemäß führt die Transfektion von Zellen mit unserem IgG1k Standard-Expressionsvektor (z. B. anti-MOG IgG) auch zur Expression des nach der IRES kodierten Grün Fluoreszierenden Proteins (GFP). Es kann also davon

ausgegangen werden, dass auch die der J-Kette vorgelagerte IRES die erfolgreiche Translation der J-Kette ermöglicht.

Auch die Länge der RNA, welche aus der Transkription von Antikörperschwerkette und J-Kette resultiert, sollte die Expression der J-Kette nicht behindern. Ihre Länge entspricht 2747 nt und ist vergleichbar mit der Länge des Transkriptes, welches für Antikörperleichtkette und GFP-Blasticidinresistenz-Fusionsprotein kodiert (2393 nt). Zuletzt kann angemerkt werden, dass die J-Kette zusammen mit einem Signalpeptid in den Expressionsvektor kloniert wurde. Jenes Peptid dirigiert die J-Kette zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) und ermöglicht den Eintritt des Proteins in diese Zellorganelle unter Abspaltung des Signalpeptids. Im Folgenden sollte die Assemblierung von ebenfalls ins ER dirigierten Antikörper Schwerketten, Leichtketten und der J-Kette stattfinden.

4.2 Nachbildung und Charakterisierung der intrathekalen humoralen Immunantwort bei entzündlicher ZNS-Erkrankung

4.2.1 Rekombinant nachgebildete Antikörper und Analyse ihrer Antigen-spezifität

In der vorliegenden Arbeit konnte ich zusammen mit einem erfahrenen Kollegen die intrathekale humorale Immunantwort eines Patienten mit Herpes-simplex-Enzephalitis und nachgewiesener intrathekaler IgM-Synthese teilweise experimentell nachbilden. Insgesamt klärten wir die Sequenzen von 228 variablen Antikörperregionen auf (114 x VH und 114 x VL), welche durch Liquor-Plasmazellen des Patienten gebildet worden waren. Für 79 Antikörper erhielten wir gepaarte VH-VL-Gensequenzen. Durch Alignment der Sequenzen (separat für V_{γ} , V_{μ} , V_{κ} , V_{λ}) und folgende phylogenetische Analysen konnten wir darüber hinaus jene Antikörperprodukte identifizieren, welche durch klonal expandierte Plasmazellen gebildet worden waren. Acht ausgewählte Antikörperprodukte klonal expandierter Plasmazellen und 2 Antikörperprodukte nicht expandierter Plasmazellen wurden rekombinant als IgG Antikörper hergestellt und auf ihre Antigen-spezifität hin untersucht. Drei der rekombinant hergestellten Antikörper lagen hierbei im Patienten ursprünglich als IgM Antikörper vor.

Für einen der rekombinant hergestellten Antikörper (NSD12) zeigten die Experimente meiner Freiburger Kooperationspartner, dass jener ein HSV-1 Glykoprotein bindet. Das sich für NSD12 andeutende Antigen war das HSV-1 Glykoprotein C. Hiermit konnten wir zum einen eine Erregerspezifität der untersuchten intrathekalen humoralen Immunantwort nachweisen, zum anderen konnten wir einen Antikörper identifizieren, welcher in der Entwicklung von HSV-1 Impfstoffen oder alternativer HSE Therapien genutzt werden könnte.

Für die Mehrheit der weiteren rekombinant produzierten Antikörper deutete sich im Western Blot eine HSV-1-spezifische Bindung mit einem sich zwischen den verschiedenen Antikörpern stark ähnelnden Bandenmuster an. Interessant wäre die Analyse eines Antikörpers mit

irrelevanter Spezifität, welcher in gleicher Weise rekombinant produziert wurde wie alle hergestellten Antikörper, um die Relevanz der im Western Blot beobachteten Antikörperbindereaktionen besser abschätzen zu können. Ebenso wäre eine Färbung HSV-1 oder HSV-2 infizierter Zellen mit einem solchen Kontrollantikörper innerhalb der Immunfluoreszenz wünschenswert. Die Mehrheit der rekombinant hergestellten Antikörper deutete auch in diesem Experiment eine Bindung entweder nur an HSV-1 infizierte Zellen oder eine Bindung sowohl an HSV-1 infizierte Zellen als auch an HSV-2 infizierte Zellen an. Auffälligkeiten einzelner Antikörper und damit eine Andeutung ihrer möglichen Potenz der tatsächlichen Erkennung und / oder Neutralisation von HSV könnten durch die Analyse des Kontrollantikörpers einfacher ausfindig gemacht und von Artefakten oder unspezifischem Hintergrund unterschieden werden.

Lediglich zwei (NSD5 und NSD6) der zehn rekombinant produzierten Antikörper zeigten weder in Western Blot noch in Immunfluoreszenz eine Bindung. Bei diesen beiden Antikörpern handelte es sich um im Patienten ursprünglich als IgM vorliegende Antikörper. Die Abwesenheit ihrer Bindung könnte auf die generell geringere Affinität von IgM Antikörpern durch das bisherige Ausbleiben der Antikörperaffinitätsreifung im Vergleich zu IgG Antikörpern zurückzuführen sein. Interessant ist dahingegen, dass der dritte ursprünglich im Patienten als IgM vorliegende rekombinant produzierte Antikörper (NSD7) sowohl in Western Blot als auch in Immunfluoreszenz eine Bindung an HSV-1 Strukturen andeutete. Seine Analyse über Immunpräzipitation und anschließender massenspektrometrischer Analyse war nicht eindeutig, könnte jedoch eine Spezifität für gE vermuten lassen. Die zukünftige Analyse von NSD7 hinsichtlich dieser Zielstruktur planen wir. Sollte sich eine Bindung zeigen, wäre NSD7 besonders interessant, da er möglicherweise einen affinitätsgereiften IgM Antikörper des untersuchten Patienten darstellt und bei rekombinanter Herstellung als Pentamer eine besonders hohe Avidität zeigen könnte.

4.2.2 Experimenteller Ausblick für rekombinant nachgebildete Antikörper

In Zukunft planen wir für NSD12 die Verifizierung seines Glykoprotein C Antigens, welches sich in unseren bisherigen Untersuchungen für diesen Antikörper andeutete. Hierzu könnten wir z. B. eine rekombinante Überexpression von Glykoprotein C in Zellkultur nutzen und NSD12 in einer Immunfluoreszenzanalyse an diesen Zellen testen. Des Weiteren planen wir die Analyse von NSD12 hinsichtlich seiner Fähigkeit HSV-1 zu neutralisieren.

Für den Antikörper NSD7, für welchen eine Spezifität für Glykoprotein E möglich ist, planen wir seine Testung hinsichtlich dieser Spezifität. Eine Virusmutante, in welcher gE deletiert ist, könnte zur Western Blot Analyse mittels NSD7 genutzt werden.

In Bezug auf die weiteren rekombinant hergestellten Antikörper, deren Antigene bisher nur unzureichend geklärt wurden, wäre eine weitere Analyse ihrer Zielstrukturen z. B. von Lipiden

interessant. Hierbei könnte ein bereits in der Literatur beschriebener Lipid-ELISA oder Western Blot Techniken verwendet werden (Matyas, Beck, Karasavvas & Alving, 2009; Villar et al., 2005). Auch eine funktionelle Analyse der Klone in Neutralisationstestungen möchten wir durchführen.

Im Fall der rekombinant als IgG hergestellten Antikörper, welche im Patienten ursprünglich als IgM Antikörper vorlagen, ist darüber hinaus ihre rekombinante Expression als IgM Antikörper mit Pentamer oder Hexamerstruktur spannend.

4.2.3 Charakterisierung der intrathekalen IgM-vermittelten Immunantwort

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der intrathekalen IgM Antwort innerhalb einer entzündlichen ZNS-Erkrankung. Wir wählten hierzu einen Patienten mit nachgewiesener intrathekalen IgM Synthese. Innerhalb der Nachbildung dieser Immunantwort konnte jedoch nur ein geringer Anteil an $V\mu$ Sequenzen erhalten werden. In 114 aufgelösten VH Sequenzen, lagen nur neun $V\mu$ Sequenzen gegenüber 105 $V\gamma$ Sequenzen vor.

Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass IgG-produzierende Plasmazellen in dem von uns durchgeführten Arbeitsablauf gegenüber IgM-produzierenden Plasmazellen bevorzugt werden. Auf frühen B-Zellen, welche vor allem IgM Antikörper produzieren, fehlt üblicherweise das Zelloberflächenprotein CD138. Zur Sortierung einzelner Antikörper-produzierender Zellen über FACS in unserem Versuchsablauf wurde jedoch ein anti-CD138 Antikörper genutzt. Dies könnte zu einem weitgehenden Ausschluss IgM produzierender Zellen geführt haben.

Andere Gründe für das geringfügige Vorliegen IgM produzierender Plasmazellen könnten ebenfalls methodisch bedingt sein z. B. im Rahmen der PCR-Amplifikation variabler Antikörperregionen. Möglicherweise ist der für die Vervielfältigung der $V\mu$ verwendete Revers-Primer in der Polymerase Kettenreaktion deutlich weniger effektiv als der Revers-Primer, welcher zur Amplifikation der $V\gamma$ -Region verwendet wurde.

Darüber hinaus kann ein erfolgreicher Antikörperklassenwechsel der Liquor Plasmazellen des Patienten nicht ausgeschlossen werden. Die im Patientenliquor nachgewiesenen intrathekalen IgM Antikörper könnten vor der Liquorentnahme produziert worden sein und entsprechende Plasmazellen inzwischen einen Klassenwechsel hin zur Produktion höher affiner IgG Antikörper vollzogen haben.

4.2.4 Relevanz monoklonaler HSV-1-spezifischer Antikörper

HSE führt immer noch in 20 % der Fälle zum Tod der Patienten und ein Großteil der Überlebenden leidet an den Folgeerkrankungen (= signifikante Morbidität) der Erkrankung. Auf der anderen Seite sind HSV-1 und HSV-2 Infektionen sehr weit verbreitet: Millionen Menschen leiden unter den Symptomen der verschiedenen Krankheitsbilder z. B. Herpes labialis, Herpes

genitalis, uvm.. Daher wäre folgendes wünschenswert: 1. Die Verbesserung der Überlebensrate bei HSE durch den Einsatz HSV-spezifischer monoklonaler AK als alternative Therapie bzw. die Verbesserung des klinischen Zustands bei überlebenden Patienten. 2. In Bezug auf weitere durch HSV-1 oder HSV-2 hervorgerufene Krankheitsbilder: Therapie der HSV-1 Reaktivierung oder sogar die Verhinderung einer HSV Erstinfektion durch einen HSV Impfstoff.

In der Vergangenheit wurden bereits mehrere HSV-1 neutralisierende monoklonale Antikörper beschrieben. Hierbei handelt es sich zumeist um solche Antikörper, welche virale Glykoproteine erkennen z. B. gD (Highlander et al., 1987; Lausch et al., 1989; Logu et al., 1998), gH (Buckmaster, Gompels & Minson, 1984) oder gB (Krawczyk et al., 2013). Bisher zeigte sich jedoch keiner von jenen in klinischen Studien wirksam (Clementi et al., 2017). Die in den letzten Jahren als HSV Vakzine getesteten monoklonalen Antikörper zeigten leider ebenfalls keine zufriedenstellende Effizienz (Clementi et al., 2017). Trotzdem könnten die identifizierten Antikörper zur Entwicklung von Impfstoffen genutzt werden. Ein Ansatz ist die Entwicklung Epitop-basierter Impfstoffe. Hierbei wird der genaue Bindungsort neutralisierender Antikörper auf dem viralen Zielprotein identifiziert und nur Aminosäuren, welche diesen Bindungsort formen, künstlich konstruiert. Jenes Konstrukt wird dann zur Immunisierung genutzt, die Bildung von Antikörpern gegen andere möglicherweise immundominante Epitope des viralen Zielproteins wird so verhindert. Dies könnte ein vielversprechender Ansatz zur Entwicklung eines potenten Impfstoffes sein.

4.3 Zusammenfassung und Ausblick

Folgende Ergebnisse kann ich in Zusammenhang mit der von mir durchgeführten Arbeit berichten: Für den getesteten Anti-MOG IgM Antikörper mit Monomer und Dimerstruktur deutet sich an, dass der Effektormechanismus ebenso über den klassischen Komplementweg verläuft, wie bereits für den IgG Isotyp gezeigt und keine Effektorfunktion über Fc μ -Rezeptoren erfolgt. Für den rekombinant als humaner IgG hergestellten anti-Sulfatid Antikörper konnte ich eine Bindung an Myelin-reiche Areale in unseren organotypischen Schnittkulturen nachweisen. Eine Demyelinisierung in der separaten Testung von IgG oder IgM Isotyp ist nicht erkennbar. Als Grund für das Fehlen der Demyelinisierungsfähigkeit v. a. im Falle des anti-Sulfatid mit humanem IgM vermuten wir das unzureichende Vorliegen des Antikörpers als Pentamer oder Hexamer. Ebenfalls vermuten wir eine gesteigerte Demyelinisierung des anti-MOG IgM gegenüber anti-MOG IgG bei Vorliegen intakter anti-MOG IgM Oligomere.

Prinzipiell konnte ich beide Myelin-spezifischen Antikörper mit IgM Isotyp als Monomere und Dimere in HEK293 Zellen produzieren und ich identifizierte unter fünf verschiedenen Methoden zur Aufreinigung von IgM Antikörpern eine Methode (anti-IgM Agarose), welche in der Lage war IgM in hoher Reinheit aus HEK Zellkulturüberstand zu isolieren. Hinsichtlich der evaluierten IgM Aufreinigungsmethoden wäre zur weiteren Bestimmung ihrer Aufreinigungsqualität bzw. -spezifität ebenfalls die Reinigung einer definierten Menge an polyklonalem IgM interessant, welches zuvor in Zellkulturüberstand nicht transfizierter HEK293 Zellen verdünnt wurde, interessant. Die durchgeführten nativen Gelanalysen der mittels anti-IgM Agarose aufgereinigten monoklonalen Antikörper weisen für die Produktion der Antikörper mit J-Kette oder ohne J-Kette nur eine geringe Anzahl vorliegender IgM Pentamere oder Hexamere nach. Zwischen Vektorkonstrukten mit oder ohne J-Kette ist dabei kein klarer Unterschied erkennbar. Die Testungen mittels polyklonalem IgM zeigen, dass es durch die Aufreinigung mittels anti-IgM Agarose prinzipiell nicht zu einer Degradierung von IgM Oligomeren kommt. Da für anti-MOG oder anti-Sulfatid IgM Antikörper jedoch keine intakten Oligomere aufgereinigt werden können, vermuten wir, dass die Biosynthese dieser Strukturen in unserem Expressionssystem fehlerhaft verläuft. Eine Klärung dieser Frage wäre zukünftig sehr interessant sowie ggf. eine Optimierung unseres Expressionssystems, um intakte IgM Oligomere zu erhalten. Anti-MOG oder anti-Sulfatid möchten wir folgend mit Pentamer oder Hexamerstruktur herstellen und sie erneut im OSC-Modell untersuchen. Durch die Expression von Vektorkonstrukten mit J-Kette oder ohne J-Kette möchten wir die Rolle der J-Kette auf die IgM Oligomerisierung klären. Sollten sich die hergestellten IgM Pentamere oder Hexamere als entscheidend für die Ausprägung der Demyelinisierung zeigen, so würde dies die Bedeutung der IgM Oligomerisierung für die IgM Effektorfunktion unterstreichen. Die Demyelinisierung

mittels anti-MOG IgM oder anti-Sulfatid IgM könnte als modellartige Rekonstruktion des verschlechterten Krankheitsverlaufs bei MS Patienten mit IgM OKB genutzt werden.

Innerhalb unserer Untersuchung und Nachbildung der intrathekalen humoralen Immunantwort bei entzündlicher ZNS Erkrankung konnten ein Kollege und ich die Immunantwort eines Patienten mit Herpes-simplex-Enzephalitis teilweise rekombinant nachbilden. Wir konnten 228 VH- oder VL-Regionen in ihrer Sequenz aufklären und 79 gepaarte VH-VL-Gensequenzen jeweils mit IgM oder IgG Isotyp rekonstruieren. Wir identifizierten Antikörperprodukte expandierter Patientenplasmazellen über Alignments und stellten 13 ausgewählte Antikörper rekombinant mit IgG Isotyp her.

Die Analyse der rekombinant produzierten Antikörper hinsichtlich ihrer Bindung von HSV-1 Zielstrukturen erfolgte mithilfe mehrerer Kooperationspartner über Immunfluoreszenz, Western Blot oder Immunpräzipitation. Wir konnten hierbei einen HSV-1 Glykoprotein-spezifischen, wahrscheinlich Glykoprotein C (gC)-bindenden Antikörper identifizieren und damit ebenfalls einen Teil der Krankheits-spezifischen Immunantwort des Patienten rekombinant nachbilden. Der identifizierte HSV-1 Glykoprotein-bindende Antikörper könnte zukünftig in der Entwicklung von HSV-1 Impfstoffen oder alternativer HSE Therapien eingesetzt werden. Eine Verifizierung des gC-Antigens für diesen Antikörper planen wir genauso wie seine Testung hinsichtlich der Fähigkeit HSV-1 zu neutralisieren.

Mir ist es bisher nicht gelungen, den verschlechterten Krankheitsverlauf bei MS Patienten mit intrathekalen IgM Synthese auf einzelne Antikörper zurückzuführen. Eine Aufklärung der Spezifitäten weiterer rekombinant nachgebildeter Antikörper wäre hierzu nötig genauso wie ihre funktionelle Charakterisierung.

Wir möchten weiterhin versuchen Unterschiede in der im Patienten vorliegenden intrathekalen IgG vs. IgM Immunantwort zu identifizieren. Um mehr IgM produzierende Zellen aus dem Liquor untersuchter Patienten zu erhalten, sollte die Sortierung der Einzelzellen zukünftig mittels eines früheren B-Zellmarkers durchgeführt werden, da vor allem diese Zellen IgM Antikörper herstellen. Eine rekombinante Nachbildung mit IgM Isotyp wäre für identifizierte IgM Antikörper interessant um sie besser hinsichtlich ihres Antigens sowie hinsichtlich ihrer Funktionalität untersuchen zu können. Auch könnte eine Testung der nachgebildeten Antikörper hinsichtlich ihrer Bindung an Lipide über ELISA oder Western Blot erfolgen.

5 Literaturverzeichnis

- Adamson, W. E., McNab, D., Preston, V. G. & Rixon, F. J. Mutational analysis of the herpes simplex virus triplex protein VP19C. *Journal of Virology*, 80(3), 1537–1548. DOI: 10.1128/JVI.80.3.1537-1548.2006
- Ammann, J. U., Jahnke, M., Dyson, M. R., Kaufman, J. & Trowsdale, J. Detection of weak receptor–ligand interactions using IgM and J-chain-based fusion proteins. *European Journal of Immunology*, 42(5), 1354–1356. DOI: 10.1002/eji.201142151
- Andreas Loos, Clemens Gruber, Friedrich Altmann, Ulrich Mehofer, Frank Hensel, Melanie Grandits et al. Expression and glycoengineering of functionally active heteromultimeric IgM in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(17), 6263–6268. DOI: 10.1073/pnas.1320544111
- Arvin, A. M. (2007). *Human herpesviruses. Biology, therapy, and immunoprophylaxis*. Cambridge, New York: Cambridge University Press. Retrieved from <http://site.ebrary.com>.
- Asakura, K., Miller, D. J., Pogulis, R. J., Pease, L. R. & Rodriguez, M. Oligodendrocyte-reactive O1, O4, and HNK-1 monoclonal antibodies are encoded by germline immunoglobulin genes. *Molecular Brain Research*, 34(2), 283–293. DOI: 10.1016/0169-328X(95)00190-4
- Azuma, Y., Ishikawa, Y., Kawai, S., Tsunenari, T., Tsunoda, H., Igawa, T. et al. Recombinant human hexamer-dominant IgM monoclonal antibody to ganglioside GM3 for treatment of melanoma. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(9), 2745–2750. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2919
- Baksmeier, C. *Regulation of myelination in the developing and regenerating CNS*.
- Bashokouh, F., Abbasiliasi, S. & Tan, J. S. Optimization of cultivation conditions for monoclonal IgM antibody production by M1A2 hybridoma using artificial neural network. *Cytotechnology*, 849–860. DOI: 10.1007/s10616-019-00330-5
- Bradshaw, M. J. & Venkatesan, A. Herpes Simplex Virus-1 Encephalitis in Adults: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. *Neurotherapeutics : the Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 13(3), 493–508. DOI: 10.1007/s13311-016-0433-7
- Brändle, S. M., Obermeier, B., Senel, M., Bruder, J., Mentele, R., Khademi, M. et al. Distinct oligoclonal band antibodies in multiple sclerosis recognize ubiquitous self-proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(28), 7864–7869. DOI: 10.1073/pnas.1522730113
- Buckmaster, E. A., Gompels, U. & Minson, A. Characterisation and physical mapping of an HSV-1 glycoprotein of approximately 115 × 103 molecular weight. *Virology*, 139(2), 408–413. DOI: 10.1016/0042-6822(84)90387-8
- Büdinger, H.-C. von, Gulati, M., Kuenzle, S., Fischer, K., Rupprecht, T. A. & Goebels, N. Clonally expanded plasma cells in the cerebrospinal fluid of patients with central nervous system autoimmune demyelination produce "oligoclonal bands". *Journal of Neuroimmunology*, 218(1-2), 134–139. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2009.10.005
- Büdinger, H.-C. von, Harrer, M. D., Kuenzle, S., Meier, M. & Goebels, N. Clonally expanded plasma cells in the cerebrospinal fluid of MS patients produce myelin-specific antibodies. *European Journal of Immunology*, 38(7), 2014–2023. DOI: 10.1002/eji.200737784

- Chayavichitsilp, P., Buckwalter, J. V., Krakowski, A. C. & Friedlander, S. F. Herpes simplex. *Pediatrics in Review*, 30(4), 119-29; quiz 130. DOI: 10.1542/pir.30-4-119
- Chromikova, V., Mader, A., Steinfeldner, W. & Kunert, R. Evaluating the bottlenecks of recombinant IgM production in mammalian cells. *Cytotechnology*, 67(2), 343–356. DOI: 10.1007/s10616-014-9693-4
- Clementi, N., Cappelletti, F., Criscuolo, E., Castelli, M., Mancini, N., Burioni, R. et al. Role and potential therapeutic use of antibodies against herpetic infections. *Clinical Microbiology and Infection : the Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 23(6), 381–386. DOI: 10.1016/j.cmi.2016.12.023
- Cortese, I., Capone, S., Luchetti, S., Cortese, R. & Nicosia, A. Cross-reactive phage-displayed mimotopes lead to the discovery of mimicry between HSV-1 and a brain-specific protein. *Journal of neuroimmunology*, 113(1), 119–128. DOI: 10.1016/S0165-5728(00)00398-2
- DMSG - Multiple Sklerose. Zugriff am 29.07.2020. Verfügbar unter <https://www.dmsg.de>.
- DMSG, AMSEL e.V. - Landesverband. *Schubtherapie der Multiplen Sklerose*, AMSEL e.V. - Landesverband der DMSG. Zugriff am 19.10.2020.557Z. Verfügbar unter <https://www.amsel.de>.
- Dutta, R. & Trapp, B. D. Relapsing and progressive forms of multiple sclerosis: insights from pathology. *Current Opinion in Neurology*, 27(3), 271–278. DOI: 10.1097/WCO.0000000000000094
- Frenzel, A., Hust, M. & Schirrmann, T. Expression of recombinant antibodies. *Frontiers in Immunology*, 4, 217. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00217
- Gautam, S. & Loh, K.-C. Immunoglobulin-M purification — Challenges and perspectives. *Biotechnology Advances*, 29(6), 840–849. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.07.001
- Gilmour, J. E., Pittman, S., Nesbitt, R. & Scott, M. L. Effect of the presence or absence of J chain on expression of recombinant anti-Kell immunoglobulin M. *Transfusion medicine (Oxford, England)*, 18(3). DOI: 10.1111/j.1365-3148.2008.00853.x
- Giuseppe Mamelì, Eleonora Cocco, Jessica Frau, Maria Giovanna Marrosu & Leonardo Antonio Sechi. Epstein Barr Virus and Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis peptides are recognized in sera and cerebrospinal fluid of MS patients. *Scientific Reports*, 6(1), 1–10. DOI: 10.1038/srep22401
- Graner, M., Pointon, T., Manton, S., Green, M., Dennison, K., Davis, M. et al. Oligoclonal IgG antibodies in multiple sclerosis target patient-specific peptides. *PLoS One*, 15(2), e0228883. DOI: 10.1371/journal.pone.0228883
- Guo, H., Shen, S., Wang, L. & Deng, H. Role of tegument proteins in herpesvirus assembly and egress. *Protein & Cell*, 1(11), 987–998. DOI: 10.1007/s13238-010-0120-0
- Hennicke, J., Lastin, A. M., Reinhart, D., Grünwald-Gruber, C., Altmann, F. & Kunert, R. Glycan profile of CHO derived IgM purified by highly efficient single step affinity chromatography. *Analytical Biochemistry*, 539, 162–166. DOI: 10.1016/j.ab.2017.10.020
- Hennicke, J., Schwaigerlehner, L., Grünwald-Gruber, C., Bally, I., Ling, W. L., Thielens, N. et al. Transient pentameric IgM fulfill biological function-Effect of expression host and transfection on IgM properties. *PLoS One*, 15(3), e0229992. DOI: 10.1371/journal.pone.0229992

- Highlander, S. L., Sutherland, S. L., Gage, P. J., Johnson, D. C., Levine, M. & Glorioso, J. C. Neutralizing monoclonal antibodies specific for herpes simplex virus glycoprotein D inhibit virus penetration. *Journal of Virology*, 61(11), 3356–3364. DOI: 10.1128/JVI.61.11.3356-3364.1987
- Hohlfeld, R., Dornmair, K., Meinl, E. & Wekerle, H. The search for the target antigens of multiple sclerosis, part 2: CD8+ T cells, B cells, and antibodies in the focus of reverse-translational research. *The Lancet. Neurology*, 15(3), 317–331. DOI: 10.1016/S1474-4422(15)00313-0
- Holmøy, T. Immunopathogenesis of multiple sclerosis: concepts and controversies. *Acta Neurologica Scandinavica. Supplementum*, 187, 39–45. DOI: 10.1111/j.1600-0404.2007.00845.x
- Huss, A., Abdelhak, A., Halbgebauer, S., Mayer, B., Senel, M., Otto, M. et al. Intrathecal immunoglobulin M production: A promising high-risk marker in clinically isolated syndrome patients. *Annals of Neurology*, 83(5), 1032–1036. DOI: 10.1002/ana.25237
- James, S. H., Kimberlin, D. W. & Whitley, R. J. Antiviral therapy for herpesvirus central nervous system infections: neonatal herpes simplex virus infection, herpes simplex encephalitis, and congenital cytomegalovirus infection. *Antiviral Research*, 83(3), 207–213. DOI: 10.1016/j.antiviral.2009.04.010
- Janeway, C. (2001). *Immunobiology. The immune system in health and disease ; [animated CD-ROM inside* (5. ed.). New York, NY: Garland Publ. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Jeanne Billieux, B., Alvarez Lafuente, R. & Jacobson, S. HHV-6 and Multiple Sclerosis. *Human Herpesviruses HHV-6A, HHV-6B & HHV-7*, 123–142. DOI: 10.1016/B978-0-444-62703-2.00007-0
- Kelly, J., Barbara, Fraefel, C., Cunningham, A. L. & Diefenbach, R. J. Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virus Research*, (145), 173–186. DOI: 10.1016/j.virusres.2009.07.007
- Kennedy, P. G. E. & Chaudhuri, A. Herpes simplex encephalitis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 73(3), 237–238. DOI: 10.1136/jnnp.73.3.237
- Korn, T. Pathophysiology of multiple sclerosis. *Journal of Neurology*, 255 Suppl 6, 2–6. DOI: 10.1007/s00415-008-6001-2
- Krawczyk, A., Arndt, M. A. E., Grosse-Hovest, L., Weichert, W., Giebel, B., Dittmer, U. et al. Overcoming drug-resistant herpes simplex virus (HSV) infection by a humanized antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(17), 6760–6765. DOI: 10.1073/pnas.1220019110
- Krumbholz, M., Derfuss, T., Hohlfeld, R. & Meinl, E. B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy. *Nature Reviews. Neurology*, 8(11), 613–623. DOI: 10.1038/nrneuro.2012.203
- Kubagawa, H., Honjo, K., Ohkura, N., Sakaguchi, S., Radbruch, A., Melchers, F. et al. Functional Roles of the IgM Fc Receptor in the Immune System. *Frontiers in Immunology*, 10. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00945
- Kurtzke, J. F. Epidemiology and etiology of multiple sclerosis. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*, 16(2), 327–349. DOI: 10.1016/j.pmr.2005.01.013
- Lausch, R. N., Oakes, J. E., Metcalf, J. F., Scimeca, J. M., Smith, L. A. & Robertson, S. M. Quantitation of purified monoclonal antibody needed to prevent HSV-1 induced stromal keratitis in mice. *Current Eye Research*, 8(5), 499–506. DOI: 10.3109/02713688909000030
- Linnington, C., Webb, M. & Woodhams, P. L. A novel myelin-associated glycoprotein defined by a mouse monoclonal antibody. *Journal of neuroimmunology*, 6(6), 387–396. DOI: 10.1016/0165-5728(84)90064-X

- Liu, J., Wang, Y., Xiong, E., Hong, R., Lu, Q., Ohno, H. et al. Role of the IgM Fc Receptor in Immunity and Tolerance. *Frontiers in immunology*, 10, 441. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00529
- Logu, A. de, Williamson, R. A., Rozenshteyn, R., Ramiro-Ibañez, F., Simpson, C. D., Burton, D. R. et al. Characterization of a Type-Common Human Recombinant Monoclonal Antibody to Herpes Simplex Virus with High Therapeutic Potential. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(11), 3198–3204. DOI: 10.1128/JCM.36.11.3198-3204.1998
- Luo, Y.-D., Zhang, Q.-L., Yao, S.-J. & Lin, D.-Q. Evaluation of adsorption selectivity of immunoglobulins M, A and G and purification of immunoglobulin M with mixed-mode resins. *Journal of Chromatography A*, 1533, 77–86. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.12.018
- Lutton, J. D., R. Winston & and T. C. Rodman. Multiple Sclerosis: Etiological Mechanisms and Future Directions. *Exp Biol Med (Maywood)*, (229(1)), 12–20. DOI: 10.1177/153537020422900102
- Mader, A., Chromikova, V. & Kunert, R. Recombinant IgM expression in mammalian cells: A target protein challenging biotechnological production. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 04(04), 38–43. DOI: 10.4236/abb.2013.44A006
- Matyas, G. R., Beck, Z., Karasavvas, N. & Alving, C. R. Lipid binding properties of 4E10, 2F5, and WR304 monoclonal antibodies that neutralize HIV-1. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1788(3), 660–665. DOI: 10.1016/j.bbamem.2008.11.015
- Mayer, M. C., Hohlfeld, R. & Meinl, E. Viability of autoantibody-targets: how to tackle pathogenetic heterogeneity as an obstacle for treatment of multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 319(1-2), 2–7. DOI: 10.1016/j.jns.2012.05.018
- Meinl, E., Derfuss, T., Krumbholz, M., Pröbstel, A.-K. & Hohlfeld, R. Humoral autoimmunity in multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 306(1-2), 180–182. DOI: 10.1016/j.jns.2010.08.009
- Mitsunaga, Y., Ciric, B., Van, K. V., Warrington, A. E., Paz, S. M., Bieber, A. J. et al. Direct evidence that a human antibody derived from patient serum can promote myelin repair in a mouse model of chronic-progressive demyelinating disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(10). DOI: 10.1096/fj.01-0994fje
- Niles, M. J., Matsuuchi, L. & Koshland, M. E. Polymer IgM assembly and secretion in lymphoid and nonlymphoid cell lines: evidence that J chain is required for pentamer IgM synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(7), 2884–2888. DOI: 10.1073/pnas.92.7.2884
- Oda, S., Arii, J., Koyanagi, N., Kato, A. & Kawaguchi, Y. The Interaction between Herpes Simplex Virus 1 Tegument Proteins UL51 and UL14 and Its Role in Virion Morphogenesis. *Journal of Virology*, 90(19), 8754–8767. DOI: 10.1128/JVI.01258-16
- Pugliatti, M., Rosati, G., Carton, H., Riise, T., Drulovic, J., Vécsei, L. et al. The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *European Journal of Neurology*, 13(7), 700–722. DOI: 10.1111/j.1468-1331.2006.01342.x
- Randall, T. D., Brewer, J. W. & Corley, R. B. Direct evidence that J chain regulates the polymeric structure of IgM in antibody-secreting B cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(25), 18002–18007.

- Reyes, L., Tichauer, J., Acuña, E., Cárcamo, C., Sarno, P. de, Raman, C. et al. Dual activity of interferon gamma in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology*, 275(1-2), 106–107. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2014.08.286
- Rosenbluth, J., Schiff, R., Liang, W.-L. & Dou, W. Antibody-mediated CNS demyelination II. Focal spinal cord lesions induced by implantation of an IgM antisulfatide-secreting hybridoma. *Journal of Neurocytology*, 32(3), 265–276. DOI: 10.1023/B:NEUR.0000010085.91976.a6
- Sádaba, M. C., Tzartos, J., Paño, C., García-Villanueva, M., Alvarez-Cermeño, J. C., Villar, L. M. et al. Axonal and oligodendrocyte-localized IgM and IgG deposits in MS lesions. *Journal of Neuroimmunology*, 247(1-2), 86–94. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2012.03.020
- Schönfelder, r. m. T., Kip, m. M. & Bleß, H.-H. (2016). *Weißbuch Multiple Sklerose: Versorgungssituation in Deutschland*. s.l.: Springer. Verfügbar unter <http://www.doabooks.org>.
- Tatzber, F., Pursch, E., Resch, U., Pfragner, R., Holasek, S., Lindschinger, M. et al. Cultivation and immortalization of Human B-Cells Producing a Human Monoclonal IgM Antibody Binding to MDA-LDL: Further Evidence for Formation of Atherogenic MDA-LDL Adducts in Humans In Vivo. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. DOI: 10.1155/2017/6047142
- Tchoudakova, A., Hensel, F., Murillo, A., Eng, B., Foley, M., Smith, L. et al. High level expression of functional human IgMs in human PER.C6® cells. *MAbs*, 1(2), 163–171. DOI: 10.4161/mabs.1.2.7945
- Tselis, A. Evidence for viral etiology of multiple sclerosis. *Seminars in Neurology*, 31(3), 307–316. DOI: 10.1055/s-0031-1287656
- Tyler, K. L. Herpes simplex virus infections of the central nervous system: encephalitis and meningitis, including Mollaret's. *Herpes : the Journal of the IHMF*, 11 Suppl 2, 57A-64A.
- Uhr, M. & Reiber, H. (2019). Liquordiagnostik. In P. Berlit (Hrsg.), *Klinische Neurologie* (Springer Reference Medizin, Bd. 57, S. 1–32). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. DOI: 10.1007/978-3-662-44768-0_22-1
- Villar, L. M., Masjuan, J., González-Porqué, P., Plaza, J., Sádaba, M. C., Roldán, E. et al. Intrathecal IgM synthesis predicts the onset of new relapses and a worse disease course in MS. *Neurology*, 59(4). DOI: 10.1212/wnl.59.4.555
- Villar, L. M., Masjuan, J., González-Porqué, P., Plaza, J., Sádaba, M. C., Roldán, E. et al. Intrathecal IgM synthesis is a prognostic factor in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 53(2), 222–226. DOI: 10.1002/ana.10441
- Villar, L. M., Sádaba, M. C., Roldán, E., Masjuan, J., González-Porqué, P., Villarrubia, N. et al. Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(1), 187–194. DOI: 10.1172/JCI22833
- Whitley, R. J. & Roizman, B. Herpes simplex virus infections. *The Lancet*, 357(9267), 1513–1518. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)04638-9
- Winger, R. C. & Zamvil, S. S. Antibodies in multiple sclerosis oligoclonal bands target debris. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(28), 7696–7698. DOI: 10.1073/pnas.1609246113

- Yamada, S., Kameyama, T., Nagaya, S., Hashizume, Y. & Yoshida, M. Relapsing herpes simplex encephalitis: pathological confirmation of viral reactivation. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 74(2), 262–264. DOI: 10.1136/jnnp.74.2.262
- Zuo, X.-Z., Tang, W.-J., Chen, X.-Y. & Huang, W. A review with comments on herpes simplex encephalitis in adults. *Neuroimmunology and Neuroinflammation*, 4(2), 24. DOI: 10.20517/2347-8659.2016.34

6 Appendix

6.1 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Schematische Darstellung der verschiedenen Verlaufsformen der MS
- Abb. 2: Analyse von Liquor- und Serumproben hinsichtlich oligoklonaler Banden über isoelektrische Fokussierung.
- Abb. 3: Schematische Darstellung der Struktur von IgG Monomeren oder der von IgM Antikörpern gebildeten Oligomerstrukturen.
- Abb. 4: Schematischer Aufbau des HSV Virions.
- Abb. 5: Übersicht über das zur Zellsortierung genutzte Gatingschema.
- Abb. 6: Funktionsprinzip der PCR-Klonierung. Der über PCR linearisierte Zielvektor wird mit PCR-amplifizierten Inserts fusioniert. Die Fusion basiert auf homologen Regionen von Vektor und Inserts.
- Abb. 7: Schematische Darstellung der Präparation muriner Kleinhirnschnittkulturen (OSC).
- Abb. 8: Modifizierter Ausgangsvektor.
- Abb. 9: Übersicht über erzeugte anti-MOG oder anti-Sulfatid kodierende Vektorkonstrukte.
- Abb. 10: Klonierungsschema zur Herstellung des anti-Sulfatid IgG Expressionsvektors.
- Abb. 11: Klonierungsschema zur Herstellung von anti-MOG oder anti-Sulfatid IgM Expressionsvektoren ohne J-Kette.
- Abb. 12: Klonierungsschema zur Herstellung von anti-MOG oder anti-Sulfatid IgM Expressionsvektoren mit J-Kette.
- Abb. 13: Qualitative Analyse von rekombinant produziertem monoklonalem anti-MOG oder anti-Sulfatid IgG über SDS-PAGE.
- Abb. 14: Pilotaufreinigung von anti-MOG IgM mittels HiTrap Material und Analyse der aufgereinigten Probe über reduzierende SDS-PAGE.
- Abb. 15: Übersicht über die evaluierten IgM Aufreinigungsmethoden.
- Abb. 16: Elutionschromatogramme der Aufreinigungen von polyklonalem IgM mittels vier affinitätschromatographischer Methoden.
- Abb. 17: Qualitative Analyse der Aufreinigungen von polyklonalem IgM mittels fünf verschiedener IgM-Aufreinigungsmethoden über native PAGE.
- Abb. 18: Elutionschromatogramme der Aufreinigungen von anti-MOG IgM oder anti-Sulfatid IgM aus Zellkulturüberstand mittels LigaTrap, POROS oder HiTrap Material.
- Abb. 19: Qualitative Analysen von mit POROS, Ligatrap oder HiTrap aufgereinigtem anti-MOG IgM oder anti-Sulfatid IgM über PAGE.
- Abb. 20: Elutionschromatogramme der Aufreinigungen von anti-MOG IgM oder anti-Sulfatid IgM aus Zellkulturüberstand mittels anti-IgM Agarose.

- Abb. 21: Analysen von anti-MOG IgM oder anti-Sulfatid IgM aufgereinigt mit Anti-IgM Agarose über denaturierende, reduzierende PAGE (A) oder native PAGE (B).
- Abb. 22: Analyse der Demyelinisierungsfähigkeit von anti-MOG IgM Monomeren und Dimeren im OSC-Modell.
- Abb. 23: Untersuchung der Bindung von anti-Sulfatid IgG an OSCs.
- Abb. 24: Analyse von anti-Sulfatid IgG hinsichtlich seiner Demyelinisierungsfähigkeit in OSCs.
- Abb. 25: Analyse von anti-Sulfatid IgM hinsichtlich seiner Demyelinisierungsfähigkeit in OSCs.
- Abb. 26: Schematischer Arbeitsablauf zur Nachbildung der intrathekalen humoralen Immunantwort bei entzündlicher ZNS-Erkrankung.
- Abb. 27: Schematischer Krankheitsverlauf des HSE-Patienten.
- Abb. 28: Sortierung von CD138⁺ Patienten-Liquorzellen über FACS.
- Abb. 29: Exemplarisches Agarosegel der Amplikons einer Einzelzell-RT-PCR mit 12 Patienten Liquorplasmazellen.
- Abb. 30: Phylogenetische Analyse identifizierter variabler IgG-Schwerkettenregionen.
- Abb. 31: Phylogenetische Analyse identifizierter V_k Regionen.
- Abb. 32: Analyse und Präparation linearisierter Expressionsvektoren sowie zu klonierender Antikörperfragmente über Agarose Gelelektrophorese, Auswahl.
- Abb. 33: Elutionschromatogramme exemplarischer Aufreinigungen rekombinanter monoklonaler Patientenantikörper und qualitative Analyse der Antikörper über SDS-PAGE.
- Abb. 34: Immunfluoreszenztestung rekombinanter monoklonaler Patientenantikörper oder von Patientenliquor an HSV-1 oder HSV-2 infizierten Zellkulturzellen.
- Abb. 35: Antigen-Bindeanalyse rekombinant hergestellter monoklonaler Antikörper gegenüber HSV-1 Proteinen über Western Blot.
- Abb. 36: Antigen-Bindeanalyse der Klone NSD12, NSD13 und NSD10 gegenüber HSV-1 Glykoproteinen oder gegenüber HSV-1 Glykoprotein E mittels Western Blot.
- Abb. 37: Schematische Vektorkarte des anti-MOG IgM Expressionsvektors mit J-Kette.

6.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht Laborgeräte

Tab. 2: Übersicht Software

Tab. 3: Übersicht Chemikalien

Tab. 4: Übersicht Verbrauchsmaterial

Tab. 5: Übersicht Prokaryotische Zellen

Tab. 6: Übersicht Eukaryotische Zellen

Tab. 7: Übersicht Kits

Tab. 8: Übersicht Antikörper

Tab. 9: Primer für die Einzelzell-RT-PCR.

Tab. 10: Primer für die Einzelzell-RT-PCR

Tab. 11: Primer zur Klonierung Antikörperfragment kodierender DNA

Tab. 12: Pipettierschema für FACS-Medium

Tab. 13: Pipettierschema für FACS-Puffer

Tab. 14: Pipettierschema für Zelllysepuffer

Tab. 15: Pipettierschema für Einzelzell-RT-PCRs

Tab. 16: PCR-Programm für Einzelzell-RT-PCRs

Tab. 17: Pipettierschema für Klonierungs-PCRs.

Tab. 18: Pipettierschema für Kolonie-PCRs

Tab. 19: PCR-Programm für Klonierungs-PCRs

Tab. 20: Pipettierschema für die „In-Fusion“-Klonierung

Tab. 21: Zusammensetzung von HEK293-Zell Komplettmedium

Tab. 22: Zusammensetzung von HEK293-Zell Nutridomamedium

Tab. 23: Puffer für die Aufreinigung rekombinanter IgG Antikörper

Tab. 24: Pipettierschema für BCA-Messungen

Tab. 25: Pipettierschema für ELISA-Messungen

Tab. 26: Pipettierschema Probenvorbereitung für die native PAGE

Tab. 27: Übersicht über die Elutionsprinzipien für die evaluierten IgM Aufreinigungsmethoden und tatsächlich genutzte Elutionspuffer.

Tab. 28: Ausbeuten der verschiedenen IgM-Aufreinigungsmethoden in ihrer Testung mit polyklonalem IgM.

Tab. 29: Ergebnisse der HSV-1 Erreger- und der Basisdiagnostik für die verschiedenen Liquorproben des vorgestellten Patienten.

Tab. 30: Übersicht über die Analyse des CSF Plasmazellrepertoirs hinsichtlich der VH-Familien erhaltener IgM-VH Sequenzen oder hinsichtlich der VL-Familien erhaltener Ig-Vk oder Ig-Vλ Sequenzen.

- Tab. 31: Übersicht über die ausgewählten Klone für Klonierung und rekombinante Produktion mit ihrem Schwer- und Leichtkettenisotyp.
- Tab. 32: Übersicht über V- und J-Familien der für Klonierung und rekombinante Produktion ausgewählten Antikörper.
- Tab. 33: Übersicht über Proteinkonzentration, Probenvolumen und Ausbeute der rekombinant produzierten monoklonalen Patientenantikörper.
- Tab. 34: Übersicht über die durch Immunfluoreszenzanalyse ermittelten Bindungseigenschaften der rekombinanten monoklonalen Patientenantikörper an HSV-1 oder HSV-2 infizierte Zellkulturzellen.
- Tab. 35: Tabellarische Darstellung der von NSD12, NSD7 oder von einem Kontrollantikörper präzipitierten HSV-1 Proteine identifiziert über Massenspektrometrie.

6.3 Abkürzungen

ADCC	Antikörper-abhängige Zytotoxizität
Anti-MOG	Humanisierter anti-MOG Antikörper, Klon 818c5
Anti-Sulfatid	Humanisierter anti-Sulfatid Antikörper, Klon O4
BBB	Blut-Hirn-Schranke
BC	Bicinchoninsäure
BHK	<i>engl.</i> baby hamster kidney
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CDC	Komplement-abhängige Zytotoxizität
cDNA	komplementäre DNA
CH	Konstante Region der Antikörperschwerkette
CHO	<i>engl.</i> chinese hamster ovary
CL	Konstante Region der Antikörperleichtkette
CSF	Liquor
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	Meerrettichperoxidasesubstrat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>engl.</i> Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FBS	Fötales Rinderserum, <i>engl.</i> fetal bovine serum
F _c	Antikörperfragment, welches durch Spaltung von Immunglobulinen mit Papain entsteht, <i>engl.</i> fragment crystallizable
F _c R	F _c -Rezeptor
FCS	Fötales Kälberserum, <i>engl.</i> fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FPLC	Schnelle Proteinflüssigkeitschromatographie, <i>engl.</i> fast protein liquid chromatography
FSC	Forwärtsstreulicht
gC	Glykoprotein C
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GNA	<i>Galanthus nivalis</i> Lektin oder Agglutinin

HCl	Chlorwasserstoff
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSE	Herpes-simplex-Enzephalitis
HSV	Herpes-simplex-Virus
hu	Human
IEC	Ionenaustauschchromatographie, <i>engl.</i> ion exchange chromatography
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IIFT	Indirekte Immunfluoreszenz
IRES	Interne Ribosomale Eintrittsstelle
IVIG	Intravenöses Immunglobulin
J-Kette	<i>engl.</i> joining chain
kDa	Kilodalton
MBP	Myelin-basisches Protein
MBP	Mannan-bindendes Protein
MEM	Minimalessentialmedium
Mg ²⁺	Magnesiumionen
MOG	Myelin Oligodendrozyten Protein
MOI	Multiplizität der Infektion
MS	Multiple Sklerose
mu	murin
MWCO	Molekulargewichts-Ausschlussgrenze
NaCl	Natriumchlorid
NSD	Willkürliche Benennung rekombinant produzierter Patientenantikörper
nt	Nukleotide
OKB	Oligoklonale Banden
OSC	Organotypische Schnittkultur, <i>engl.</i> organotypic slice culture
PAGE	Polyakrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin

PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
Pen	Penicillin
PLL	Poly-L-Lysin
PLP	Proteolipid-Protein
PNS	Periphäres Nervensystem
POD	Meerrettichperoxidase
PPMS	Primär progrediente MS, <i>engl.</i> primary progressive MS
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RRMS	Schubförmig remittierende MS, <i>engl.</i> relapsing remitting MS
RT-PCR	Reverse-Transkriptase PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	Größenausschlusschromatographie, <i>engl.</i> size exclusion chromatography
SOB	Super Optimal Medium
SOC	SOB-Medium mit Glukose
SPMS	Sekundär progrediente MS, <i>engl.</i> secondary progressive MS
SSC	Seitwärtsstreulicht
Strep	Streptomycin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween	Polysorbat
U	Enzymeinheiten
Vero	Affennierenzelllinie
VH	Variable Region der Antikörper Schwerkette
VL	Variable Region der Antikörper Leichtkette
ZNS	Zentrales Nervensystem
γ	Gamma Antikörperschwerkette
κ	Kappa Antikörperleichtkette
λ	Lambda Antikörperleichtkette
μ	Mü Antikörperschwerkette

7 Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Prof. Dr. Norbert Goebels für die Möglichkeit meine Doktorarbeit zu einem spannenden Thema in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen. Ich danke ihm für sein starkes Interesse an meinen Projekten und seine Unterstützung.

Ebenfalls danke ich Prof. Dr. Dieter Willbold für die Betreuung meiner Arbeit als Zweitgutachter und Mentor.

Ein besonderer Dank gilt all unseren Kooperationspartnern, vor allem Frau Dr. Anne Halenius und ihren Mitarbeitern Liane Bauersfeld, Carolin Gerke und Judith Hartmann für die Durchführung diverser Experimente, das Teilen ihrer Expertise und ihren bereichernden Input. Ich danke Prof. Dr. Hartmut Hengel sowie Prof. Dr. Ortwin Adams für die Vermittlung dieser Kooperation. Als weiteres danke ich Frau Dr. Nina Overbeck herzlich für ihre kompetente Unterstützung und ihre umfassende Hilfsbereitschaft innerhalb der durchgeführten massenspektrometrischen Analysen. Ein weiterer Dank gilt Frau Dr. Swantje Mindorf und ihren Kollegen für die Durchführung wertvoller Experimente sowie ihre ausgedehnte Unterstützung bei der Auswertung der durchgeführten Analysen. Frau Lorna Hayden danke ich für ihre Hilfe in der Aufreinigung rekombinanter IgM Antikörper. Bei Sumanta Barman aus unserer Arbeitsgruppe möchte ich mich herzlich für seine Mitarbeit im Bereich der Charakterisierung intrathekaler humoraler Immunantworten bedanken. Frau Mercedeh Farhat und Frau Dr. Christine Baksmeier danke ich für ihre Unterstützung bei den erfolgten OSC Experimenten.

Zudem danke ich allen Kollegen unserer Arbeitsgruppe, besonders Sumanta Barman für meine Einarbeitung in etliche Labormethoden. Vielen Dank an Frau Dr. Christine Baksmeier und an Julia Steckel für ihre große Hilfsbereitschaft und ihren Rat in diversen Situationen. Frau Dr. Nicole Rockel danke ich für ihre wissenschaftliche Unterstützung in der Vorbereitung von Fördergeldanträgen. Ein besonderer Dank gilt außerdem Md. Nur A Alam Siddique für viele anregende fachliche Diskussionen und seine darüber hinaus bereichernde Art.

Bei Andrea Issberner und Mary Bayer möchte ich mich für Ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung durch die Übernahme diverser allgemeiner Aufgaben bedanken.

Danke Anna, dass wir unsere beiden Wege bis zur Promotion gemeinsam gegangen sind und dafür, dass ich mich immer an dich wenden durfte.

Ich möchte mich bei meiner Familie und bei meinen Freunden für ihren Zuspruch und ihre Unterstützung bedanken, besonders jedoch bei drei Menschen dafür, dass sie immer und bedingungslos für mich da sind: Bei meiner Mutter, bei dir Maike und bei Jensi, dem diese Arbeit gewidmet ist.

8 Erklärung

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Die Dissertation wurde weder in dieser noch in einer abgewandelten Form bereits einer anderen Fakultät vorgelegt. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, 03.05.2021

Ort, Datum



Unterschrift (Henrike Die)