

Aus der Klinik für Innere Medizin I
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
mit den Schwerpunkten
Onkologie, Hämatologie, Klinische Immunologie und Rheumatologie
Direktor: Prof. Dr. Michael Pfreundschuh

**Tm4SF2 und lysosomales TMEM9B:
Neue Zielantigene von B-Zell-Rezeptoren in
Wegener Granulomen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
Homburg/Saar 2010

vorgelegt von
Lorenz Thurner,
geboren am 10.12.1982 in Bitburg

Meiner Freundin und meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Summary/Zusammenfassung	1
2. Einleitung und Fragestellung	3
2.1. Die Wegenersche Granulomatose	3
2.2. Epidemiologie	3
2.3. Klinik	4
2.4. Diagnostik	5
2.5. Therapie	7
2.6. Pathophysiologie	8
2.6.1. Zytoplasmatische anti-Neutrophilen Antikörper (ANCA)	8
2.6.2. Pathogenität der ANCA	9
2.6.3. Proteinase 3	10
2.6.4. Bindung der ANCA an Proteinase 3	11
2.6.5. Lysosom assoziiertes Membranprotein 2 (LAMP-2)	12
2.6.6. Granulombildung in der Wegenerschen Granulomatose	12
2.6.7. Generalisierte pauci-Immun Vaskulitis	13
2.7. Ätiologie - Verlust der Selbsttoleranz gegenüber Proteinase 3	13
2.7.1. Medikamenteninduzierte ANCA	14
2.7.2. Komplementäre Proteinase 3	15
2.7.3. Ätiologische Rolle chronischer Entzündungen und Infektionen	16
2.7.4. Fehlerhafte Apoptose der Neutrophilen	19
2.8. Fragestellung	20
3. Material und Methodik	22
3.1. Laborgeräte	22
3.2. Verbrauchsmaterialien	23
3.2.1. Molekularbiologische Materialien	23
3.2.2. Materialien der Zellkultur und der Expressionssysteme	24
3.2.3. Immunologische und proteinchemische Materialien	25
3.2.4. Lösungen und Medien	26

3.3. Methodik	33
3.3.1. Vorangegangene Arbeit	33
3.3.2. Patienten	33
3.3.3. Molekularbiologische Methodik	35
3.3.3.1. DNA-Amplifizierung	35
3.3.3.2. Plasmidbasierte DNA-Klonierung	35
3.3.3.3. Herstellung rekombinanter DNA	35
3.3.3.4. Transformation	35
3.3.3.5. Selektive Vermehrung der transformierten Bakterienklone	35
3.3.3.6. Glycerolstocks	36
3.3.3.7. Plasmid-Präparation	36
3.3.3.8. Mini-Präparation mit der TENS-Methode	36
3.3.3.9. Polymerasekettenreaktion – PCR	37
3.3.3.10. TOPO-TA-Vektor: Molekularbiologisches Tool	38
3.3.3.11. DNA-Aufreinigung aus Mini-Präps und Präparationsgelbanden	39
3.3.3.12. Konzentrationsbestimmung mit dem Photometer	39
3.3.3.13. Restriktionsenzym-Verdau	39
3.3.3.14. Agarosegel-Elektrophorese	40
3.3.3.15. Präparationsgel	40
3.3.3.16. Ligation	40
3.3.3.17. Sequenzierung	40
3.3.3.18. Analyse der Immunglobulingensequenzen	41
3.3.4. Expressionssysteme	41
3.3.4.1. Baculovirus-Expressionssystem	42
3.3.4.2. Klonierung der variablen Immunglobulingensegmente (VH und Vk) in die Transfervektoren des Baculovirus- Expressionssystems	44
3.3.4.3. Klonierung des VH-Gensegmentes am Beispiel von Hm0507/10-VH	45
3.3.4.4. Klonierung des Vk-Fragments in den Vektor pGmAc 116 TL CK	47
3.3.4.5. Kotransfektion der SF9-Zellen	50

3.3.4.6.	Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Kammer	50
3.3.4.7.	Lytische Plaque-Assays	50
3.3.4.8.	Affinitätschromatographie: Antikörperaufreinigung	53
3.3.4.9.	Expression von mAbs mithilfe des 2A-Peptid-Fragments in HEK 293	54
3.3.5.	Immunologische und proteinchemische Methodik	60
3.3.5.1.	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	60
3.3.5.2.	Direkter ELISA mit rekombinanter PR3	60
3.3.5.3.	Sandwich-ELISA	61
3.3.5.4.	Sodium Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	61
3.3.5.5.	Diskontinuierliche SDS-PAGE	61
3.3.5.6.	Probenvorbereitung	61
3.3.5.7.	Elektrophorese	62
3.3.5.8.	Coomassie-Gelfärbung	62
3.3.5.9.	Semi-Dry Transfer	62
3.3.5.10.	Kontroll-Färbung mit Ponceau-S Rot	63
3.3.5.11.	Trocknen der Membran	63
3.3.5.12.	Blocken	63
3.3.5.13.	Immunologische Proteindetektion	63
3.3.5.14.	ECL - Enhanced Chemoluminescence	63
3.3.5.15.	Immuno-Blots zur Affinitätstestung auf mikrobielle Antigene	64
3.3.5.16.	Zielantigensuche mithilfe eines (hex1) human fetal brain cDNA Protein Expression-Arrays	64
3.3.5.16.1.	Anwendung des Protein Arrays	65
3.3.5.16.2.	Manuelles Auswerten des Protein Arrays	66
3.3.5.16.3.	Bestimmung der Koordinaten	67
3.3.5.16.4.	Synthese der potentiell positiven Klone	68
4.	Ergebnisse	69
4.1.	Mutationsanalyse	69
4.2.	Selektion doppeltrekombinanter Baculovirusklone	70
4.2.1.	ELISA auf Zellüberstände einzelner Baculovirusklone	70
4.2.2.	PCR zur Insertionskontrolle in das Baculovirusgenom	74

4.2.3. Affinitätschromatographie der Insektenzellüberstände	76
4.3. Weitere Charakterisierung der aufgereinigten mAbs	76
4.3.1. Coomassie-Gelfärbung	78
4.3.2. ELISA zur IgG-Subklassentypisierung	78
4.3.3. ELISA und Western-Blot zur IgG-Leichtkettenzugehörigkeit	79
4.3.4. ANCA-Immunfluoreszenz	81
4.3.5. 2A-Peptidmethode	81
4.4. Identifizierung der Zielstrukturen der synthetisierten mAbs	82
4.4.1. PR3-ANCA-ELISA	82
4.4.2. Immunoblots gegen mikrobielle Lysate	84
4.4.3. Zielantigensuche mit dem RZPD hEx1-Protein-Array	85
4.4.4. Zielantigensuche mit den Unipex1/2-Protein-Arrays	87
5. Diskussion	91
5.1. Geeignete Expressionssysteme für die Synthese von rekombinanten mAbs	92
5.2. Beurteilung der Expressionssysteme	94
5.3. Beurteilung der Zielantigensuche	94
5.4. Beurteilung der verifizierten Zielantigene	95
5.5. Beurteilung der Protein-Macroarrays zur Bestimmung von Autoantigenen	97
5.6. Zielantigensuche im mikrobiellen Spektrum	98
5.7. Perspektiven	101
5.8. Anhang	104
6. Literaturverzeichnis	117
7. Publikationen / Dank	137
8. Curriculum Vitae	141

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Mechanismen zum Bruch der Selbsttoleranz	17
Abbildung 2	Modell der Funktionsweise des TOPO-TA-Vektors	38
Abbildung 3	Baculovirusgenom	42
Abbildung 4	Kotransfektion von SF9-Zellen	43
Abbildung 5	Schema der Klonierung der VH- und Vk-Fragmente in die Transfervektoren des Baculovirusgenom	44
Abbildung 6	Lytischer Plaque-Assay	52
Abbildung 7	2A-Peptid-Klonierungsschema	55
Abbildung 8	Restriktionsenzymverdau des Scu58 Schwer- und Leichtkettengens aus dem TA-Vektor	56
Abbildung 9	Kontroll-PCR der korrekten Insertion von Scu58VH in den pEAK-Vektor und von Scu58Vk in den pcDNA-Vektor	57
Abbildung 10	Extensions-PCR zur Verlängerung des VDJ-Ch-Segments um die 2A-Sequenz	57
Abbildung 11	Vorbereitender Restriktionsverdau zur Klonierung des um die 2A-Sequenz verlängerten VDJ-Ch-Fragmentes vor das Vk-Segment im pcDNA-Vektor	58
Abbildung 12	Restriktionsverdau zur Insertionskontrolle von Scu58VH+Ch+2A in den pcDNA-Vektor	59
Abbildung 13	Übersicht: Imagenes-Makro-Proteinarray	65
Abbildung 14	Entwickelter Film des Makroarrays nach Inkubation mit mAbs	66
Abbildung 15	Manuelles Auswerten des Protein-Arrays: Bestimmung der Signalpaar-Koordinaten	67
Abbildung 16	pQE80LSN-Vektor	68
Abbildung 17	Lytischer Plaque Assay: Scu 58	71
Abbildung 18	Lytischer Plaque Assay: Scu 36	72
Abbildung 19	Lytischer Plaque Assay: St140	73
Abbildung 20	Lytischer Plaque Assay: Hm05	74
Abbildung 21	PCR-Kontrolle der Insertion von Scu 36 (VH und Vk) in das Baculovirusgenom	75
Abbildung 22	PCR-Kontrolle der Insertion von Scu 58 (VH und Vk) in	

	das Baculovirusgenom	75
Abbildung 23	St140-, Scu58- und Scu36-Schwer- und Leichtketten in einer Coomassie-Proteinfärbung	77
Abbildung 24	St140-, Scu58- und Scu36-Schwer- und Leichtketten sowie komplette IgG in einer Coomassie-Proteinfärbung	77
Abbildung 25	Coomassie-Proteinfärbung der synthetisierten mAbs und eines Kontroll-mAbs	78
Abbildung 26	ELISA der IgG-Subklassen	79
Abbildung 27	ELISA der Leichtkettenklassen	80
Abbildung 28	Western-Blot der Leichtkettenklassen	81
Abbildung 29	Nachweis der Expression des Scu58 mAbs mithilfe des 2A-Peptidsystems	82
Abbildung 30	Routine-PR3-ELISA	83
Abbildung 31	ELISA mit gecoateter rekombinant synthetisierter PR3	83
Abbildung 32	Immunoblot der gepoolten mAbs mit einem Panel mikrobieller Lysate	84
Abbildung 33	Peptide Arrays der mAbs mit <i>S. aureus</i> - und <i>Y. enterocolitica</i> -Lysaten	85
Abbildung 34	Nachweis der Expression von γ -Actin und USP34 nach Induktion mit IPTG	86
Abbildung 35	Unipex1-Proteinarrays nach Hybridisierung mit den gepoolten mAbs	88
Abbildung 36	Unipex2-Proteinarrays nach Hybridisierung mit den gepoolten mAbs	89
Abbildung 37	Bestätigungs-Immunodotblot von TMEM9B und Tm4SF2 als Zielantigene der mAbs	90

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Mikrobielle Proteinsequenzhomologien zu LAMP-2	18
Tabelle 2	Patientencharakteristika	34
Tabelle 3	Sammelgelansatz	61
Tabelle 4	Separationsgelansatz	61

Tabelle 5	Mutationsanalyse der Variablen Regionen der synthetisierten mAbs	69
Tabelle 6	Verwandte Proteasen der Proteinase 3 nach der Merops-Datenbank	100

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AcMNPV	Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus
a.dest.	destilliertes Wasser
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
ANCA	Anti-Neutrophilen Zytoplasmatische Autoantikörper
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	basic local alignment search tool
bp	Basenpaar
BPI	Bactericidal permeability increasing protein
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
° C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	Cluster of differentiation
CDR	Komplementaritätsbestimmende Region
cPR3	Komplementäre Proteinase 3
D	Aspartat
d	Tag

DC	Dendritic cells
DEI	Disease Extent Index
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D-Segment	diversity segment
E	Glutamat
ECL	enhanced chemoluminescence
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
ELK	E=Ear, Nose and Throat, L=Lung, K=Kidney
et al.	et alii
Fab	Antigen bindendes Fragment eines Antikörpers
FACS	Fluorescence activated cell sorting
Fc	fragment crystallisable
FCS	Fetal calve serum
FimH	Bacterial adhesin
fm	femtomolar
FPLC	Fast protein liquid chromatography
FR	Rahmenregion
g	Erdschwerebeschleunigung
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HD-IVIG	hoch dosierte intravenöse Immunglobuline
H-Kette	Schwerkette
HNO	Hals, Nasen, Ohren
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i. v.	intravenös
J-Segment	joining segment
kbp	Kilo Basenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LAMP-2	Lysosomal membrane protein 2

LB	Lysogeny Broth
L-Kette	Leichtkette
M	Molar
mAb	monoklonaler Antikörper
MCS	multiple cloning site
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min.	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	millimolar
MOI	multiplicity of infection
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MTX	Methotrexat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NNH	Nasennebenhöhle
N-Nukleotid	nontemplate Nukleotid
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität
Ph	Polyhedrin
PFU	plaque forming unit
PNS	peripheres Nervensystem
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PR3	Proteinase 3

PU-PH	Professeur universitaire et praticien hospitalier
RA	Rheumatoide Arthritis
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SED	Staphylococcal Enterotoxin D
sog.	so genannt
SpA	staphylococcal protein A
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered saline
TdT	Desoxynucleotidyltransferase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Temp.	Temperatur
TMEM9B	Transmembranprotein 9B
Tm4SF2	Transmembranprotein 4 der Superfamilie 2
TH-Zellen	T-Helfer-Zellen
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSPAN 7	Tetraspanin 7
U	Units
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
VH	variable heavychain
WG (gWG, IWG)	Wegenersche Granulomatose (generalisiert, lokalisiert)
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Summary

Wegener's granulomatosis is a biphasic disease starting as a localised manifestation with endonasal granuloma typically leading to a generalised ANCA-associated vasculitis. ANCAs (anti-neutrophil cytoplasmic antibodies) are pathogenetically relevant autoantibodies in systemic vasculitis. In WG ANCAs are normally directed against Wegener's auto-antigen proteinase 3, often against the lysosome associated membrane protein 2 (LAMP-2) and less frequently against Myeloperoxidase (MPO). In order to determine the role of B lymphocytes in WG, single B-cells derived from germinal-center-like structures within endonasal granulomata were isolated by laser-assisted microdissection. The individual variable heavy and light chain (VH, Vk) genes were amplified by single-cell seminested PCR and analysed for mutations and clonality. In a previous study the rearranged VH and Vk genes displayed mutational patterns that suggested affinity maturation. We synthesised recombinant human IgG1k monoclonal antibodies (mAbs) applying a baculovirus insect cell expression system. Furthermore, mAbs were expressed in HEK293 cells using a single vector and the innovative autoprotolytic Picorna-Virus derived 2A sequence. So far 4 mAbs with IgG1 subclass and k-light chain have been expressed with the insect cell system and 1 mAb has been expressed with the HEK293 cell system. Antigens were identified using protein macroarrays of cDNA expression libraries derived from human fetal brain tissue and of T-lymphocytes (RZPD). This approach led to the identification of the lysosomal transmembrane protein 9B (TMEM9B) and the transmembrane protein 4 superfamily 2 (Tm4SF2) as target antigens. TMEM9B was currently described as a key regulator of inflammatory pathways. Furthermore TMEM9B is colocalised on the lysosomal membrane to LAMP-2, which is currently regarded as the key autoantigen in the pathogenesis of ANCA associated vasculitis. Tm4SF2 (CD231), the second found target antigen, is mainly expressed in neurons and endothelium.

This novel approach of microdissection of single B cells out of Wegener granuloma, followed by the synthesis of recombinant monoclonal antibodies and finally the target antigen search, enables us to characterise the structure function relationship of antigen-selected B cells. The Wegener granuloma-derived mAbs might help to close the gap in our knowledge about the transformation from granuloma to vasculitis.

Zusammenfassung

Die Wegenersche Granulomatose ist eine biphasische Erkrankung, die lokalisiert mit endonasalen Granulomen beginnt und dann typischerweise zu einer ANCA-assoziierten Vaskulitis führt. Die ANCAs sind im Rahmen von systemischen Vaskulitiden auftretende pathogenetisch relevante Autoantikörper. In der WG sind sie meistens gegen das Wegener-Autoantigen Proteinase 3 gerichtet. Mit dem Ziel, die Rolle von B-Lymphozyten in der WG zu bestimmen, wurden einzelne B-Zellen aus keimzentrumartigen Strukturen in endonasalen Granulomen mittels Laser-assistierter-Mikrodissektion isoliert. Die individuellen variablen Regionen der Schwer- und Leichtkettengene wurden mithilfe von single-cell seminested PCRs amplifiziert. Die rearrangierten VH- und Vk-Gene zeigten in einer vorausgegangenen Studie Mutationsmuster, die eine Affinitätsreifung suggerierten. Wir synthetisierten rekombinante monoklonale humane IgG1κ Antikörper (mAbs) mithilfe eines Baculovirus-Insektenzell-Expressionssystems. Darüber hinaus exprimierten wir humane rekombinante monoklonale Antikörper in HEK293-Zellen mithilfe eines singulären Vektors und der innovativen, autoproteolytischen von Picorna-Viren abstammenden 2A-Sequenz. Bisher wurden 4 mAbs der IgG1-Subklasse und mit κ-Leichtkette mit dem Insektenzellsystem und 1 mAb mithilfe des HEK239-Zellsystems exprimiert. Antigene wurden mit Protein-Makroarrays (RZPD) von humanem fötalem Gehirngewebs- und T-Lymphozyten-cDNA-Expressionsbanken identifiziert. Mit diesem Ansatz konnten wir das lysosomale Transmembranprotein 9B (TMEM9B) und das Transmembranprotein 4 der Superfamilie 2 (Tm4SF2) als Zielantigene identifizieren. TMEM9B wurde kürzlich als Schlüsselregulator von Entzündungskaskaden beschrieben. Weiter befindet sich TMEM9B kolokalisiert auf der lysosomalen Membran zu LAMP-2, das zur Zeit als das Schlüsselautoantigen in der Pathogenese von ANCA assoziierten Vaskulitiden angesehen wird. Tm4SF2 (CD231), das zweite gefundene Zielantigen wird vor allem in Neuronen und Endothelium exprimiert. Dieser neue Ansatz der Mikrodissektion von einzelnen B-Zellen aus Wegener Granulomen, der darauffolgenden Synthese von rek. mAbs und der sich anschließenden Zielantigensuche, ermöglicht die Charakterisierung der Struktur-Funktionsbeziehung Antigen selektierter B-Zellen. Die aus Wegener Granulomen stammenden mAbs könnten dabei helfen, unsere Wissenslücke über den Übergang von Granulom zu systemischer Vaskulitis zu schließen.

2. Einleitung und Fragestellung

2.1. Die Wegenersche Granulomatose

Die Wegenersche Granulomatose (WG) ist eine Autoimmunkrankheit, also eine fehlgesteuerte Abwehrreaktion gegen körpereigene Gewebe. Sie zählt zu den primären systemischen Kleingefäßvaskulitiden. Die primären systemischen Kleingefäßvaskulitiden werden unterteilt in ANCA-assoziiert (pauci-immun) und Immunkomplex-vermittelt (ANCA-negativ). Zu den ANCA-negativen Wandentzündungen kleiner Gefäße gehören u.a. die Purpura Schönlein-Henoch, die Vaskulitis bei essenzieller Kryoglobulinämie und die kutane leukozytoklastische Angiitis. ANCA-assoziierte Kleingefäßvaskulitiden sind die mikroskopische Polyangiitis, das Churg-Strauss-Syndrom und die Wegenersche Granulomatose.

Friedrich Wegener und Heinz Klinger beschrieben als erste das Krankheitsbild einer granulomatösen Entzündung, die von einer generalisierten Vaskulitis begleitet wird, (Klinger 1931 und Wegener 1936, 1939). Ab den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts wird sie als eigenständiges Krankheitsbild nach ihren Erstbeschreibern als Wegener-Klinger-Granulomatose bezeichnet (Müller et al., 2007). Nach Bekanntwerden von Verwicklungen Dr. Friedrich Wegeners in das NS-Regime wurde die Umbenennung der Erkrankung in ANCA-assoziierte granulomatöse Vaskulitis gefordert (Woywodt et al., 2006). Obwohl die Forderung der Umbenennung plausibel erscheint, hat sich der Begriff der ANCA-assoziierten granulomatösen Vaskulitis in Fachkreisen nicht durchgesetzt. Das ist der Grund, weshalb wir in dieser Arbeit auch noch den alten Begriff verwenden.

Pathognomonisch für die WG ist der biphasische Verlauf, der lokalisiert mit einer granulomatösen Entzündung des oberen Respirationstraktes beginnt und dann in der zweiten Phase zu einer systemischen ANCA-assoziierten Kleingefäßvaskulitis generalisiert. Dieses generalisierte Stadium kann sich an jedem Organ manifestieren, hauptsächlich betroffen sind jedoch Nieren und Lungen.

2.2. Epidemiologie

Die Wegenersche Granulomatose ist eine seltene Erkrankung mit einer Prävalenz von etwa 5 pro 100000 Einwohner in europäischen Ländern. Sie hat einen

Häufigkeitsgipfel um die 4. Lebensdekade. Die Geschlechterverteilung ist ausgeglichen (Hoffman et al., 1992; Reinhold-Keller et al., 2005). Epidemiologische Studien zeigen zudem regionale Unterschiede des Erkrankungsrisikos: Eine doppelt so hohe Inzidenz in Großbritannien wie in Deutschland deuten auf einen Nord-Süd-Gradienten hin (Reinhold-Keller et al., 2005). Es existieren kontroverse Ergebnisse zu jahreszeitlichen Schwankungen der Inzidenz (Mahr et al., 2006). Nicht-Kaukasier scheinen seltener von der WG betroffen zu sein (Watts et al., 2008).

2.3. Klinik

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei der WG um eine biphasisch verlaufende Erkrankung. Die initiale Phase ist durch eine granulomatöse Entzündung des Respirationstraktes charakterisiert. Typische Symptome sind eine chronische Sinusitis und Rhinitis mit blutigem Schnupfen und Ulzerationen der Nasenschleimhaut, die bis zu einer Perforation des Nasenseptums und einer Nekrose des Nasenknorpels mit resultierender Sattelnase führen können.

Die Granulome des oberen Respirationstraktes expandieren teilweise, so dass durchaus etwa die Retroorbitalregion, das Mittelohr, einzelne Hirnnerven, die Meningen oder die Hypophyse betroffen sein können (Müller et al., 2003, und Czarnecki et al., 1995; Garovic et al., 2001 und Pamuk et al., 2003).

Die Manifestationen des unteren Respirationstraktes sind vor allem Granulome und Ulzerationen der Atemwege, die zu subglottischen Larynxstenosen oder Bronchialstenosen führen können und Symptome wie Atemnot, Stridor und Husten hervorrufen. Weiterhin treten teilweise einschmelzende Lungenrundherde, sogenannte Pseudokavernen, mit Hämoptysen auf (Hoffman et al., 1992; Schmitt et al., 1997 und Reinhold-Keller et al., 2000).

Nach einer von Fall zu Fall unterschiedlichen Zeitspanne entwickelt sich häufig, jedoch nicht in jedem Fall die WG zu einer generalisierten systemischen ANCA-assoziierten Kleingefäßvaskulitis weiter. Neben den Symptomen des Initialstadiums können als lebensbedrohendes Krankheitsbild ein pulmonales Syndrom mit alveolären Hämorrhagien, Hämoptysen und einer rapid progressiven Glomerulonephritis auftreten. Begleitend kommt es häufig zu Arthritiden, Myositiden,

Episkleritiden und einer B-Symptomatik. Läsionen des zentralen und des peripheren Nervensystems führen zu Ausfallerscheinungen wie einer Pachymeningitis und einer Mononeuritis Multiplex. Ohne eine intensive Behandlung verläuft die Erkrankung schnell letal.

2.4. Diagnostik

Die Diagnose einer WG wird heute bei klinischem Verdacht zum einen bioptisch (etwa Nasenschleimhautgranulome) und desweiteren an Hand serologischer ANCA-Tests gestellt. Die WG ist eine der wenigen entzündlich-rheumatischen Systemerkrankungen, die durch einen Seromarker, den anti-neutrophilen zytoplasmatischen Antikörper (ANCA) mit guter Sensitivität und Spezifität diagnostiziert werden kann (Hellmich, 2005). Zum Screening wird die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt. Dabei wird Patientenserum mit neutrophilen Granulozyten inkubiert, die auf Objektträgern fixiert wurden. Nach einigen Waschschritten und Inkubation mit Detektionsantikörpern können ANCA unter dem Fluoreszenzmikroskop anhand bestimmter Fluoreszenzmuster nachgewiesen werden. Es wird zwischen einem perinukleären (pANCA), einem zytoplasmatischen (cANCA) und einem atypischen Fluoreszenzmuster unterschieden. Das Zielantigen der pANCA ist die Myeloperoxidase. Das Zielantigen der cANCA ist die Proteinase 3 (Lüdemann et al., 1991).

- pANCA sind zu etwa 60 % beim Churg-Strauss-Syndrom, zu 50% bei der mikroskopischen Polyangiitis, zu 15% bei der Panarteriitis nodosa, zu etwa 65% bei der idiopathischen Glomerulonephritis und zu 70% bei der Primär Sklerosierenden Cholangitis nachweisbar.
- cANCA treten regelmäßig bei der generalisierten WG auf, kommen aber auch bei Mikroskopischer Polyangiitis und seltener beim Churg-Strauss-Syndrom vor.

Weiterhin zunehmende Bedeutung haben LAMP-2-ANCA, die eine höhere Sensitivität bei Vaskulitiden haben sollen als PR3-ANCA und MPO-ANCA (Kain et al., 2008). Serologisch können mithilfe von ELISA im Initialstadium der WG bei 50% der Patienten und im generalisierten Stadium bei 95% der Patienten Antikörper gegen PR3 nachgewiesen werden (Nölle et al., 1989; Hagen et al., 1998). Die Sensitivität des Immunoassays kann durch Capture-ELISA noch erhöht werden (Csernok et al., 2003). Die Kombination der indirekten Immunfluoreszenz mit

quantitativen Immunoassays führt zu einer stark verbesserten Spezifität. Wohlgedermt sind ca. 50% der lokalisierten (nicht-vaskulitischen) WG ANCA-seronegativ.

Die Diagnosesicherung verlangt folgende Zusatzuntersuchungen:

- Biopsien zur histopathologischen Befundung von betroffenen Geweben, typischerweise aus endonasaler Schleimhaut, Lungen und Nieren. Histologisch sind Wegener Granulome eine Ansammlung von Epitheloidzellen und Makrophagen, die zu mehrkernigen Riesenzellen fusioniert sein können. Diese Phagozyten-Agglomeration wird von T-Zellen und B-Memory-Zellen infiltriert. Treten die Granulome im Initialstadium alleine auf, sind sie im generalisierten Stadium meistens mit den Vaskulitiden vergesellschaftet (Fienberg et al., 1981). Morphologisch werden diese granulomatösen Entzündungen durch Mikroabszesse und landkartenartig angeordnete Nekrosemuster charakterisiert (Travis et al., 1991). Ein histologisches Charakteristikum der Gefäßwandentzündung der generalisierten WG ist der nekrotisierende Befall kleiner Gefäße ohne Immunkomplexablagerungen, was als pauci-immun-Vaskulitis bezeichnet wird. Die Vaskulitis der Wegenerschen Granulomatose steht damit ganz im Gegensatz zu der Sekundärvaskulitis des systemischen Lupus Erythematodes, für die Immunkomplexablagerungen charakteristisch sind. Ein weiteres pathologisches Charakteristikum der Generalisierten Vaskulitis der WG ist die schon oben erwähnte Vergesellschaftung mit Granulomen.
- Bestimmung der Nierenfunktionsparameter: Serumkreatinin, glomeruläre Filtrationsrate, zytologische Untersuchung des Urinsedimentes und der Nachweis von Urinzylindern.
- CT des Thorax sowie ggf. eine Bronchoskopie
- Komplette Neurologische Untersuchung und Angio-MRT des ZNS

Diese Untersuchungen erbringen neben der Diagnosesicherung weitere Erkenntnisse zur Krankheitsausdehnung. Zur anschließenden Einteilung in Krankheitsstadien existieren Klassifikationsschemata verschiedener Fachgesellschaften:

- ACR (American College of Rheumatology): Diagnosekriterien von 1990, die aber nur typische Fälle abdecken. Geeignet zur Erfassung des

Krankheitsverlaufs, jedoch nicht zur Diagnosestellung geeignet (Übersicht: Gross, 1999)

- CHCC (Chapel Hill Consensus Criteria): Klare Definitionen von 1994 zur Abgrenzung der einzelnen Vaskulitiden, jedoch keine offiziellen Diagnosekriterien. Die CHCC verlangt für die WG eine granulomatöse Manifestation des Respirationstraktes und eine Kleingefäßvaskulitis
- EMEA-Algorithmus: Versuch der Harmonisierung der ACR-Kriterien und der CHCC-Definitionen
- DEI (Disease Extent Index): Erfassung der Krankheitsausdehnung als Anzahl der involvierten Organe mit therapierbarer Aktivität; beruht auf der erweiterten „ELK-Klassifikation“ (de Groot et al., 2001)
- BVAS (Birmingham Vasculitis Activity Score): Erfassung der Schwere der Krankheitsaktivität in den einzelnen Organen

2.5. Therapie

Die Wegenersche Granulomatose wird stadienadaptiert immunsuppressiv behandelt. Die Anfang der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts von Fauci und Wolff zuerst eingeführte Remissionsinduktionstherapie bestand aus einer täglichen Kombinationsgabe von 2mg/kg KG Cyclophosphamid und 1mg/kg KG Prednison (Fauci et al., 1983). Bei 90% der Patienten leitete dieser Therapieansatz eine Remission ein (Langford et al., 2003). Nach dem Erreichen der Remission sah dieses Schema eine langsame Dosisreduktion vor. Um Langzeitremissionen zu erreichen und zu erhalten, musste die Kombinationstherapie aus täglichem Cyclophosphamid- und alternierenden Prednison-Dosen fortgeführt werden.

Vor Einführung dieses Schemas lag die mediane Überlebenszeit bei 5 Monaten. Einerseits wurde aufgrund starker Cyclophosphamid-Nebenwirkungen wie erhöhter Infektanfälligkeit (Choi et al., 2000), Infertilität, Knochenmarksuppression, myelodysplastisches Syndrom, hämorrhagische Zystitis und Blasenkarzinom versucht, die Cyclophosphamid-Gesamtdosis zu minimieren, ohne dabei den Therapieerfolg zu gefährden.

In der Remissionsinduktionstherapie gelang dies für mildere Verläufe ohne Nierenbeteiligung mithilfe des Ersatzes des Cyclophosphamids durch Methotrexat (NORAM-Studie Jayne et al., 2003 und Villa-Forte et al., 2007). Andererseits führten

Rezidivraten von 50% der nach Fauci-Schema behandelten Patienten innerhalb der ersten 8 Jahre zur Einführung einer Erhaltungstherapie (Langford et al., 2003), bei der Cyclophosphamid durch weniger toxische Immunsuppressiva wie Azathioprin, Methotrexat und Mycophenolatmofetil ersetzt wurden (Jayne et al., 2003 und Langford et al., 2003). Im Initialstadium kann neben Prednisolon die zusätzliche Gabe von peroralem Cotrimoxazol (2x1 Tabl. zu 160mg Trimethoprim und 800mg Sulfamethoxazol), das sich gegen die endonasale Staphylococcus-aureus-Flora richtet, in 2/3 der Fälle zur längerfristigen Remission beitragen (Reinhold-Keller et al., 1996 und Stegemann et al., 1996).

Randomisierte kontrollierte Therapiestudien testen zur Zeit den Nutzen gentechnologisch hergestellter Medikamente, den sog. Biologicals, die früher, gezielter und mit weniger Nebenwirkungen in die entscheidenden molekularen Schlüsselstellen der Pathogenese eingreifen sollen. Für die Aussagekraft dieser Studien stellt aber die geringe Fallzahl ein Problem dar (Merkel et al., 2007). Bisherige Ergebnisse zeigten, dass Patienten während einer Induktionstherapie von einer zusätzlichen B-Zell-Depletion durch Gabe des anti-CD-20 monoklonalen Maus-Chimärs Rituximab profitieren (Brihaye et al., 2007; Keogh et al., 2005 und Golbin et al., 2007). Vielversprechend sind auch die Studienergebnisse über den zusätzlichen Einsatz von hoch dosierten intravenösen Immunglobulin (HD-IVIG) (Jayne et al., 2000 und Kamali et al., 2004). Durch die zusätzlich zur Standardtherapie verabreichte Gabe des funktionellen TNF- α -Antagonisten Etanercept oder des rekombinanten monoklonalen anti-TNF- α -Antikörpers Infliximab kann die Therapie weiter optimiert werden (Aries et al., 2007). Desweiteren wurde der Nutzen einer zusätzlichen Plasmapherese beim pulmorenalen Syndrom in der MEPEX-Studie der European Vasculitis Study Group bestätigt (EVSG, 2007).

2.6. Pathophysiologie

2.6.1. Zytoplasmatische anti-Neutrophilen Antikörper (ANCA)

ANCA wurden 1982 per Zufall im Laufe eines Projektes, das den Zusammenhang der Antinukleären Antikörper (ANA) mit der nekrotisierenden Glomerulonephritis erforschte, entdeckt (Davies et al., 1982). Bis Ende der 80er Jahre gelang es, Assoziationen der ANCA zu den einzelnen Kleingefäßvaskulitiden herzustellen. Wie bereits erwähnt, wird zwischen ANCA mit perinukleären, cytoplasmatischen oder

atypischen Fluoreszenzmuster unterschieden. pANCA sind gegen die Myeloperoxidase (MPO) gerichtet und cANCA haben die Proteinase 3 (PR3) als Zielantigen (Jenne et al., 1990, Jennette et al., 1990 und Lüdemann et al., 1990). LAMP-2-ANCA gewinnen in letzter Zeit sehr an Bedeutung, da sie anscheinend sensibler sind als die gewöhnlichen ANCA und zudem eine Kreuzreaktivität der LAMP-2-ANCA gegen das bakterielle Adhesin FimH nachgewiesen wurde, was einen zugrundeliegenden „mimicry“-Mechanismus denkbar macht (Kain et al., 2008). ANCA finden sich bei einer Reihe von Erkrankungen, wie z.B. pANCA bei der primär sklerosierenden Cholangitis mit Assoziation zu entzündlichen Darmerkrankungen oder BPI-ANCA bei zystischer Fibrose mit Pseudomonas-Kolonisation. BPI-ANCA sind gegen das Bactericidal permeability increasing protein (BPI), ein antibakterielles Produkt neutrophiler Granulozyten gerichtet.

ANCAs konnten aber auch in gängigen IVIG-Präparaten nachgewiesen werden, die zur Therapie von schweren neuroimmunologischen Krankheiten verwendet werden. Seltene Nebenwirkungen dieser Präparate, die besonders bei Vorliegen einer neutrophilen Pleozytose vorkommen, werden mit diesen atypischen ANCA in Verbindung gebracht (Jarius et al., 2007).

2.6.2. Pathogenität der ANCA

Für die MPO-ANCA verdichten sich die Hinweise, dass sie direkt an der Entstehung der nekrotisierenden Kleingefäßvaskulitis beteiligt sind. In einem Tiermodell wurden MPO-/- Mäuse mit muriner MPO immunisiert. Gebildete IgG-Antikörper oder Splenozyten wurden Wildtypmäusen oder SCID-Mäusen injiziert, die daraufhin eine Vaskulitis und nekrotisierende Glomerulonephritis entwickelten (Xiao et al., 2002). Weiter beschreibt ein klinischer Fallbericht, wie ein Neugeborenes einer MPO-ANCA-positiven Mutter, die im Verlauf der Schwangerschaft ein Rezidiv der mikroskopischen Polyangiitis gehabt hatte, 2 Tage nach der Geburt ein pulmorenales Syndrom entwickelte. Im Nabelschnurblut wurde der gleiche IgG MPO-ANCA-Titer wie bei der Mutter nachgewiesen. Nach einer Plasmapherese-Therapie und Corticosteroid-Gabe entwickelte sich das pulmonalrenale Syndrom des Neugeborenen wieder zurück. Dies spricht für die Pathogenität der transplazentär in den Kreislauf des Fötus gelangten maternalen MPO-ANCA (Schlieben et al., 2005). LAMP-2-ANCA aktivieren neutrophile Granulozyten und Endothelzellen signifikant stärker als Pr3-ANCA. Die Pathogenität der LAMP-2-ANCA wurde kürzlich in einem

Tiermodell nachgewiesen. Ratten wurden mit LAMP-2-ANCA immunisiert und entwickelten eine fokal nekrotisierende pauci-immun Glomerulonephritis. Auch kam es bei der Immunisierung mit LAMP-2 und noch häufiger bei der Immunisierung mit dem dazu kreuzreagierenden bakteriellen Adhesin FimH zu einer fokal nekrotisierenden Glomerulonephritis (Kain et al., 2008).

Dagegen ist eine direkte Pathogenität der Proteinase-3-cANCA nicht erwiesen. Es wurde jedoch berichtet, dass ein PR3-ANCA-Titer-Anstieg mit einem erhöhten Rezidivrisiko und einer erhöhten Rezidivstärke assoziiert ist (Boomsma et al., 2000; Han et al., 2003), und zudem scheint die Plasmapherese erfolgreich zu sein (Iwatani et al., 2004). In einem Modell wurden PR3 -/- Mäuse mit muriner PR3 immunisiert. Bis auf eine subkutane Panniculitis wurden keine pathologischen Veränderungen festgestellt. Wildtypmäuse, denen ANCA-Serum injiziert wurde, zeigten keine signifikanten Anzeichen einer systemischen Vaskulitis im Vergleich zu Wildtypmäusen, die mit Mock-Immun-Serum behandelt wurden (Pfister et al., 2004). Somit bleibt der Mechanismus der pathogenetischen Bedeutung von PR3-ANCA in der WG-Vaskulitis weiter zu erforschen.

2.6.3. Proteinase 3

Als Zielantigen der cANCA konnte 1989 eine 29 KDa schwere Serinprotease P29 der Neutrophilen identifiziert werden (Niles et al., 1989). Ein Jahr später konnte P29 als Proteinase 3 identifiziert werden (Jenne et al., 1990, Jennette et al., 1990 und Lüdemann et al. 1990). Bei der Proteinase 3 (PR3), auch als Myeloblastin bezeichnet, handelt es sich um eine Serin-Endoprotease mit einer Molekülmasse von 29KDa (P29). Das Gen der Proteinase 3 ist 6,5 Kbp lang und besteht aus 5 Exons und 4 Introns. Es ist zusammen mit den Genen der humanen Elastase 2 und des Azurodicins in einem Gencluster an der Spitze des kurzen Armes von Chromosom 19 lokalisiert (Zimmer et al., 1992). Die PR3 wird vor allem in unreifen Leukozyten exprimiert (Surrock et al., 1992). Wie die eng verwandten Peptidasen humane Elastase 2 und Azurodicin, kommt die PR3 vor allem in azurophilen Granula der Neutrophilen vor (Campbell et al., 2000). Merops, eine Datenbank speziell für Peptidasen, die sich nach der Struktur evolutionärer Verwandtschaft und Aminosäuresequenzhomologien richtet, teilt die PR3 in die Unterfamilie der chymotrypsinartigen Serinproteasen S1A ein. Dieser Unterfamilie gehören rund 4200 Mitglieder an. Der nahestehenden Subfamilie S1B, die nach der Glutamyl-Peptidase

I des Staphylococcus aureus benannt ist, gehören weitere 1600 Mitglieder an. Sie stammen aus dem Spektrum von Bakterien, Protozoen, Archaeen, Pilzen, Viren, Pflanzen und tierischen Zellen. Gemeinsam besitzen sie die katalytische Triade His, Asp und Ser. Zudem haben viele dieser Peptidasen N-terminal ein Peptid von unterschiedlicher Größe, das bei Aktivierung abgespalten wird. Im Menschen haben Serinpeptidasen häufig die Funktion von Verdauungs- und Gerinnungsenzymen. Es wird vermutet, dass die Serinpeptidasen des Clans PA, dem die Familie S1A der Proteinase 3 angehört, evolutionär sehr alt sind und durch RNA-Viren auf die Wirte übertragen wurden. In Viren bestehen einige der Serin-Peptidase-Familien in gleicher Form weiter, in anderen wurde im katalytischen Zentrum das Serin durch Cystein ersetzt.

Die Proteinase 3 hat in den neutrophilen Granulozyten die Funktion, beim Angriff und Verdau von Bakterien mitzuwirken, indem sie die Spaltung von aliphatischen Peptidbindungen katalysiert. Daneben scheint die Proteolyse von Bestandteilen der extrazellulären Matrix wie Laminin, Kollagen Typ IV und Elastin die Gewebemigration von neutrophilen Granulozyten mit zu ermöglichen (Pezzato et al., 2003). Ein Überschuss an Proteinase 3 führte experimentell bei Hamstern zum Emphysem (Kao et al., 1988). Die Proteinase 3 wird durch den Serinpeptidase-Inhibitor (Serpin) α 1-Antitrypsin inhibiert (Dolman et al., 1992). Membrangebundene Proteinase 3 oder Proteinase 3, an die ANCA gebunden haben, werden jedoch nicht inhibiert. Auf der Zelloberfläche unstimulierter neutrophiler Granulozyten lassen sich nur geringe Mengen der Proteinase 3 nachweisen. Nach einer Zytokin- und folgender Chemoattraktanzien-Stimulation konnte eine sechsfach erhöhte Expression von Proteinase 3 auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Campbell et al., 2000)

2.6.4. Bindung der ANCA an PR3

Die Zielepitope, gegen die die F(ab')₂ Fragmente der P3-ANCA gerichtet sind, befinden sich in der Nähe des katalytischen Zentrums der PR3 (Bosch et al., 2006). Durch kompetitive Bindungsassays mit 12 etablierten ANCA-mAbs konnten 4 verschiedene Zielepitope identifiziert werden (van der Geld et al., 2001). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass die verschiedenen Zielepitope der Proteinase 3 dicht beieinander in der Nähe des katalytischen Zentrums lagen und besonders viele positiv geladene Aminosäuren aufwiesen (Peen et al., 2000).

Die Sequenzanalyse von PR3-ANCA ergab eine korrespondierende Häufung der sauren Aminosäuren Aspartat und Glutamat in den komplementaritätsbestimmenden Regionen der variablen Segmente (Voswinkel et al., 2006 und Müller et al., 2007).

2.6.5. Lysosom assoziiertes Membranprotein 2 (LAMP-2) und LAMP-2-ANCA

LAMP-2, auch als CD107b bekannt, ist ein stark glykosyliertes Protein, das zwischen der lysosomalen Membran und der Zellmembran pendelt (Gough et al., 1997) und somit für zirkulierende Antikörper zugänglich ist. Es ist das Zielantigen der sog. LAMP-2-ANCA (Kain et al., 1995). LAMP-2 kommt in verschiedenen Splicevarianten vor, die aber alle die gleiche extrazelluläre Domäne haben. Die Funktionen liegen im Bereich der zellulären Homöostase, inklusive Autophagozytose und Antigen Präsentation (Kain et al., 2008). LAMP-2 ist in die Membranen von Vesikeln integriert, die PR3 und MPO enthalten. Die den LAMP-2-ANCAs beigemessene Relevanz an der Pathogenese der ANCA assoziierten Vaskulitiden ist seit 2008 sprunghaft angestiegen, als Kain et al. eine Publikation veröffentlichten, in der eine 90%ige Seropositivität von LAMP-2-ANCAs bei Patienten mit pauci immun fokal nekrotisierenden Glomerulonephritiden nachgewiesen wurde und zudem eine Kreuzreaktivität der LAMP-2-ANCA gegen FimH, ein Adhesin gramnegativer Bakterien beschrieben wurde. So entwickelten Ratten, die mit FimH immunisiert worden waren, eine LAMP-2-ANCA positive fokal nekrotisierende Glomerulonephritis (Kain et al., 2008). Mit diesem „molecular mimicry“-Mechanismus scheint erstmals eine schlüssige pathogenetische Erklärung ANCA-assoziiierter Vaskulitiden gefunden worden zu sein.

2.6.6. Granulombildung in der Wegenerschen Granulomatose

Die Granulombildung ist ein Abwehrmechanismus des Immunsystems gegen persistierende, schwer zugängliche, beispielsweise partiell intrazelluläre Mikroorganismen wie Mycobakterien oder andere nicht zu verdauende Antigene (Janeway, Immunobiology 2008). In den Wegener Granulomen des oberen Respirationstraktes finden sich CD68⁺ Makrophagen, Riesenzellen und Monozyten, umgeben von einem Saum aus CD4⁺ Th1-Zellen, CD8⁺ T-Zellen und CD20⁺ B-Zellen. In Granulombiopsien des lokalisierten Stadiums der WG wurden vermehrt CD26⁺ und CD28⁻ Th1-Zellen nachgewiesen (Lamprecht et al., 2001). Während der

generalisierten WG überwiegt hingegen die Th2-Antwort mit Zytokinen wie IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10. Die Granulombildung könnte durch eine überschießende Th1-Antwort mit den Zytokinen IFN γ und IL-2 auf Umwelttrigger wie Silikate ausgelöst werden (Müller A et al., 2003). Die Rolle von Th17-Zellen, denen eine Schlüsselrolle in einer Vielzahl von Autoimmunerkrankungen zugeschrieben wird, ist für die WG noch weitgehend ungeklärt.

2.6.7. Generalisierte pauci-Immun Vaskulitis

In-vitro-Studien zeigten regelmäßig erhöhte Mengen von PR3 auf der Zelloberfläche stimulierter neutrophiler Granulozyten. LAMP-2 scheint physiologischerweise zwischen Lysosom- und Zellmembran zu pendeln, so dass es auch auf der Zellmembran inaktiver Zellen in beträchtlichem Ausmaß vorkommt (Gough et al., 1997). Nach Zytokinstimulation wandern vermehrt zytoplasmatische Granula zur Zelloberfläche, und ihr Inhalt wird freigesetzt, so dass auch die ansonsten zytoplasmatische PR3 den cANCA zugänglich wird. Die F(ab')₂-Fragmente der cANCA binden, wie weiter oben bereits beschrieben, an Zielepitope der PR3 und die Fc-Fragmente an Fc γ -IIa- und IIIb-Rezeptoren. Dadurch werden die neutrophilen Granulozyten zur stärkeren Degranulation und Freisetzung von endothelschädigenden Entzündungsmediatoren wie den Reactive Oxygen Species (ROS) und Granulaenzymen angeregt (Falk et al., 1992), was zu einem Circulus vitiosus führt (Savage et al., 1992). Gleichzeitig aktivieren ANCAs Monozyten zu einer vermehrten Freisetzung von Entzündungsmediatoren. Infektionen führen auch zu einer vermehrten Bildung von Adhäsionsmolekülen der Endothelzellen (Bacon et al., 2005). Kain et al. konnten zeigen, dass LAMP-2-ANCA zu einer stärkeren Neutrophilen-Aktivierung führen als Pr3-ANCA. LAMP-2-ANCA führen auch zu einer Aktivierung von Endothelzellen, erkennbar an einer vermehrten Anzahl an Zellen, die CD62E (E-selectin) exprimieren und einer gesteigerten Apoptoserate (Kain et al., 2008).

2.7. Ätiologie: Verlust der Selbsttoleranz gegenüber Proteinase 3

Erst im Oktober 2008, das heißt mehr als 25 Jahre nach ihrer Entdeckung, konnte ein schlüssiger Entstehungsmechanismus der ANCA von Kain et al. aufgeklärt werden, indem sie die Kreuzreaktivität und Induzierbarkeit von LAMP-2-ANCA durch FimH nachwiesen.

Diese Doktorarbeit wurde Ende 2006, also vor der Veröffentlichung von Kain et al. begonnen. Zu diesem Zeitpunkt war die Ätiopathogenese noch nicht geklärt. LAMP-2-ANCA wurden wohl in ihrem Vorkommen und ihrer pathogenetischen Bedeutung unterschätzt. Der Verlust der Selbsttoleranz gegen PR3 oder MPO aufgrund eines „molecular mimicry“-Mechanismus wurde damals von den meisten Arbeitsgruppen als Schlüsselmoment zur Entstehung der WG und der ANCA assoziierten Vaskulitis angesehen und die Forschung konzentrierte sich hierauf. Es gab aber durchaus auch andere Erklärungsansätze. So wurde wie bei vielen anderen Autoimmunkrankheiten ein Zusammenspiel genetischer Anlagen mit Umwelteinflüssen vermutet, das den Bruch der Selbsttoleranz provoziert (Hellmich et al., 2004). Als solcher Umweltrisikofaktor konnte nur eine Staub-Exposition, insbesondere zu Silikonstäuben belegt werden (Hogan et al., 2001 und Beaudreuil et al., 2005). Die Exposition mit diesen würde wahrscheinlich bei genetisch prädisponierten Patienten die Entstehung der WG triggern. Die erhöhte Suszeptibilität für eine WG wäre wahrscheinlich multigenetisch angelegt (Kallenberg et al., 2006). Zusammenhänge mit singulären Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) in Promotorregionen oder kodierenden Sequenzen von Oberflächenantigenen wie etwa CD18, der gemeinsamen β -Kette der β_2 -Integrine (Meller et al., 2001), kostimulierenden Molekülen wie CTLA-4 (Giscombe et al., 2002), Zytokinen wie IFN γ , TNF α und IL-10 (Spriewald et al., 2005), des Gens für den Retinoid-X-Rezeptor B (Szyld et al., 2006) und des PTPN22-Gens (Jaquiello et al., 2005) wurden verantwortlich gemacht. Weitere SNPs wurden bei Apoptose-assoziierten-Proteinen und Fc γ -Rezeptoren vermutet. Zudem wurde bei Patienten mit WG ein Ungleichgewicht von Proteinasen zu Proteinase-Inhibitoren, sprich ein α -1-Antitrypsin-Mangel postuliert (Elzouki et al., 1994). Assoziationen bestehen aber mit bestimmten HLA-Antigenen wie DPB1*0401, die bei WG-Patienten-Populationen überrepräsentativ häufig vorkommen (Jaquiello et al., 2004).

2.7.1. Medikamenteninduzierte ANCA

ANCA-assoziierte Vaskulitiden können durch das Thyreostatikum Propylthiouracil hervorgerufen werden. So berichten Yu et al. von 19 Propylthiouracil-assoziierten ANCA-positiven Vaskulitis-Fällen in China. In 15 der 19 Fälle konnte durch perkutane Biopsien ein histologischer Nierenbefall bestätigt werden. Alle diese 15 Patienten hatten eine eingeschränkte Nierenfunktion und zudem eine Hämaturie und eine

Proteinurie. In der indirekten Immunfluoreszenz konnten bei allen Patienten mit Nierenbeteiligung pANCA nachgewiesen werden. Die Immunoassays der Seren ergaben in allen 15 Fällen eine Spezifität gegen Myeloperoxidase, in 9 Fällen gegen Cathepsin G, in 8 Fällen gegen Elastase, in 7 Fällen gegen Lactoferrin, in 5 Fällen gegen Azurocidin, und in 4 Fällen gegen Proteinase 3 (Yu et al., 2007 und Chen et al., 2007). Die Propylthiouracil-Behandlung war über 43,0 +/- 31,2 Monate verabreicht worden. Bei 86% der beschriebenen Fälle mit Nierenbeteiligung handelte es sich um Frauen. Dies ist wohl darauf zurückzuführen, dass mehr Frauen an Hyperthyreose leiden und mit Propylthiouracil behandelt werden.

2.7.2. Komplementäre Proteinase3 (cPR3)

Die Idee zur Theorie der komplementären Proteinase 3 (cPR3) entsprang aus einem Laborzufall. Um die Zielepitope der cANCA auf PR3 genauer einzugrenzen, wurden aufeinanderfolgende cDNA-Abschnitte mit einem bakteriellen Expressionssystem exprimiert. In anschließenden Immunoassays reagierten Patientenserum überraschenderweise auch auf Bakterienklone mit komplementär und revers inserierten cDNA-Sequenzen. Die Patientenserum enthielten also neben den normalen PR3-ANCA auch Antikörper gegen die cPR3, das komplementäre Gegenstück der PR3. Der Initiation der Autoimmunreaktion gegenüber der Proteinase 3 könnte eine Immunantwort mit Antikörperbildung gegen die cPR3 oder ein homologes Peptid zugrunde liegen. Konsekutiv könnten dann im Rahmen einer Idiotype-Antiidiotype-Reaktion Antikörper gegen die cPR3-Antikörper gebildet werden. Diese würden dann wiederum PR3-ANCA entsprechen (Pendergraft et al., 2004). So konnten in einem Mausmodell nach Immunisierung mit komplementärer Proteinase, neben Antikörpern gegen dieses injizierte Antigen (cPR3) auch Antikörper gegen PR3 nachgewiesen werden, die in der Immunfluoreszenz ein zytoplasmatisches Fluoreszenzmuster zeigten. Weiter konnte gezeigt werden, dass Proteine einiger humanpathogener Mikroorganismen hohe Aminosäuresequenz-homologien zum mittleren Abschnitt der cPR3 aufweisen. Eine Infektion dieser Mikroorganismen mit anschließender Immunantwort mit Antikörperbildung und darauffolgender Idiotyp-Antiidiotyp-Interaktion könnte so theoretisch auch in der Bildung von PR3-ANCA resultieren (Pendergraft et al., 2004).

2.7.3. Ätiologische Rolle chronischer Entzündungen und Infektionen

Granulome werden generell häufig durch persistierende Mikroorganismen hervorgerufen, die vom Immunsystem nicht eliminiert werden können. Die endonasale granulomatöse Entzündungsreaktion, also die primäre Krankheitsphase der WG, wurde so auch schon früh in einen möglichen Zusammenhang mit Mikroorganismen gebracht, die die Granulombildung initiieren oder zumindest unterhalten sollten. Die entzündliche Reaktion auf eine Infektion könnte durch verschiedene Mechanismen für den Bruch der Toleranz gegenüber der Proteinase 3 verantwortlich sein:

- Die gesteigerte Freisetzung kostimulatorischer Moleküle kann zur Aktivierung von eigentlich unbeteiligten, nicht für die infektiösen Antigene spezifischen Lymphozyten, den sog. Bystander-Zellen, führen. Unter diesen Bystander-Zellen könnten auch selbst-reaktive Lymphozyten sein.
- Mikrobielle Liganden für Toll-like-Rezeptoren führen zu einer Aktivierung von Makrophagen und dendritischen Zellen, so dass große Mengen von Zytokinen ausgeschüttet werden und lokale Entzündungsreaktionen mitverursachen. Die Aktivierung autoreaktiver T- und B-Zellen würde so aufrecht erhalten. Hierdurch ließen sich die infektions-assoziierten Rezidive der WG erklären. So liegt die Rezidivrate bei chronischen Staphylococcus-aureus-Trägern acht Mal höher. Zudem werden durch die Entzündungsreaktion vermehrt Entzündungszellen zum Ort der Infektion rekrutiert.
- Die von der Entzündungsreaktion hervorgerufene Gewebeschädigung führt zu einer Aufhebung physischer Barrieren zwischen zytoplasmatischen Selbstantigenen und dem humoralen Schenkel des Immunsystems

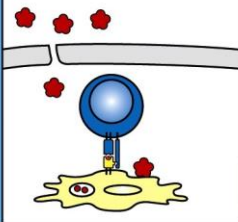
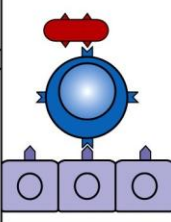
Mechanism	Disruption of cell or tissue barrier	Molecular mimicry
	Release of sequestered self antigen; activation of nontolerized cells	Production of cross-reactive antibodies or T cells
Effect	Sympathetic ophthalmia	Rheumatic fever Reactive arthritis Lyme arthritis
		

Figure 14-37 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Abb. 1: Mechanismen zum Bruch der Selbsttoleranz (Janeway, Immunbiology 2008)

Die Entstehung der Autoantikörper gegen PR3 könnte auch ähnlich wie beim Rheumatischen Fieber durch ein molekulares Mimikry mikrobieller Antigene mit Selbstantigenen hervorgerufen werden. Die Wegener Granulome mit funktionellen Keimzentren erfüllen die Voraussetzung zu einem sensibilisierenden Zusammenspiel antigenpräsentierender dendritischer Zellen (DC) mit T- und B-Zellen.

Als Mikroorganismen mit gesicherten oder wahrscheinlichen „molecular mimicry“-Antigenen gelten:

- Gramnegative Bakterien mit FimH: Kain et. al veröffentlichten 2008 den Nachweis eines „molecular mimicry“-Mechanismus von LAMP-2 und FimH. FimH ist ein bakterielles Adhesin an den Spitzen von Typ 1 Fimbrien gramnegativer Bakterien wie Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae und Proteus mirabilis. Die extrazellulären LAMP-2-Epitope P₄₁₋₄₉ und P₃₃₁₋₃₄₁ zeigen Sequenzhomologien zu Epitopen mikrobieller Antigene. Das P₄₁₋₄₉-Epitop ist zu 100% identisch zu dem Epitop der Aminosäuren 72-80 von FimH. Das LAMP-2-Epitop P₃₃₁₋₃₄₁ zeigt Sequenzhomologien zu FimH und zu Epitopen anderer bakterieller und viraler Antigene (Kain et al., 2008).

Tab. 1: Mikrobielle Proteinsequenzhomologien zu LAMP-2

Protein	Epitop	Sequenz	Organismus
LAMP-2	P41–49	G T V T Y N G S	Homo sapiens
FimH	94-101	G T V K Y N G S	E. coli O18:K1:H7, O2:MT78, LF82
Minor fimbrial subunit	94-101	G T V K Y S G S	E. coli K12, O157:H7
Fimbrial protein	26-33	G T V T F N G K	Yersinia pestis
Fimbrial adhesin	96-103	G T V K Y N G T	Klebsiella pneumoniae
FimH	185-192	Y T I S Y S G K	Salmonella typhimurium
Uroepith. adherence protein	25-32	G T I T F T G K	Proteus mirabilis
Glucosyltransferase	401-407	G T V T F N G Q	Streptococcus mutans
ORF 1	170-177	E T V S Y N G S	Staphylococcus warneri
Putative ABC transporter	63-69	G T I T Y N G	Streptomyces coelicolor
ORF	171-177	T V S Y N G S	Staphylococcus warnerii
Putative outer membrane pr.	593-598	T V T Y N G S	E. coli CFT073
Outer membrane protein	261-266	V T Y N G S	Bacteroides thetaiotaomicron
Myxobacterial hemagglutinin	183-189	G T M T Y N G	Myxococcus xanthus
Envelope glycoprotein	139-144	G T V T Y N	HIV type 1
Virion protein	6-13	H S T V S Y N G	Human herpesvirus 3
Glycoprotein I	170	G T L A Y N G S	Human herpesvirus 1

LAMP-2	P331-341	Q G K Y S T A Q D C	Homo sapiens
ORF	71-77	Y S T V Q D C	E. coli 157:H7
DMSO reductase	193-199	G S Y S T A Q	E. coli
E1 protein	163-169	Y N T A Q D C	Hepatitis C virus
Polyprotein	143-147	T A Q D C	Hepatitis C virus
Envelope protein 1	88-92	T A Q D C	Hepatitis C virus
vif protein	91-96	Q G R Y S T	HIV type 1
E7 protein	2-7	H G K Y S T	Human papillomavirus type 74

Mögliches molecular mimicry bei Sequenzhomologien von LAMP-2 mit mikrobiellen Antigenen (Kain et al., 2008): oberer Teil (blau) LAMP-2-Epitop P41–49, unterer Teil (rot) LAMP-2-Epitop P331-341

- Staphylococcus aureus: Bis zu 70% der Patienten haben eine chronische endonasale Staphylococcus-aureus-Besiedlung. WG-Patienten haben damit eine signifikant erhöhte endonasale Staphylococcus-aureus-Besiedlung im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen. Wie bereits erwähnt wurde, ist auch der Zusammenhang einer erhöhten Rezidivrate mit der endonasalen Staphylococcus-aureus-Besiedlung belegt (Popa et al., 2003). Die Staphylococcus-aureus-Superantigene scheinen entscheidend an der Entzündungsreaktion beteiligt zu sein (Reumaux et al., 2003 und Popa et al., 2003). Eine antibiotische Therapie führt zu einer verminderten Rezidivrate (Stegemann et al., 1994 und 1996).

- Ross-River-Virus: Das Ross-River-Virus ist ein in Australien und Ozeanien vorkommendes Arbovirus (Arthropode borne) der Alphavirusgattung. Es wird von Aedes-, Stegomyia- und Culex-Stechmücken übertragen und führt zu einem fieberhaften Verlauf mit Exanthem und Arthritis (Groß: Kuzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie 1.Auflage 2006, S.396). 1982 wurde ein Zusammenhang ANCA-assoziiertes segmental nekrotisierendes Glomerulonephritiden mit vorherigen Ross-River-Virus-Infektionen vermutet. In der Studie konnte bei 7 von 8 Patienten eine vorausgegangene Ross River-Virus Infektion festgestellt werden (Davies et al., 1982).
- Hepatitis-C-Virus: Das Auftreten von PR3-ANCA wurde als ein Begleitphänomen bei Hepatitis C-Infektionen beschrieben (Wu et. al. 2002).
- Parvovirus B19: Die vermutete Verbindung zu Parvovirus B19 Infektionen konnte nicht bestätigt werden (Rodriguez-Pla et .al 2006).

Wie bereits erwähnt gelten Viren und Bakterien mit hohen Aminosäuresequenzhomologien zum mittleren Abschnitt der komplementären Proteinase 3 auch als Kandidatenmikroorganismen. Die gegen die mikrobiellen cPR3-like-Proteine gebildeten Antikörper könnten über Anti-Idiotyp-Interaktion die Bildung von PR3-ANCA hervorrufen. Interessanterweise konnten auch für den Staphylococcus aureus und das Ross-River-Virus Sequenzhomologien zu dem mittleren cPR3-Abschnitt gefunden werden (Pendergraft et al., 2004).

2.7.4. Fehlerhafte Apoptose der Neutrophilen

Zirkulierende neutrophile Granulozyten haben generell nur eine kurze Halbwertszeit. Ihre Apoptose wird durch niedrige Konzentrationen von TNF α (unter 1ng/ml) hinausgezögert und durch hohe TNF α -Konzentrationen (über 10ng/ml) beschleunigt. So wird durch die Apoptose von Neutrophilen die Dauer einer lokalen Entzündungsreaktion mitgesteuert. Während der Apoptose kommt es zu einer Überexprimierung des Inhaltes der Azurgranula auf der Zelloberfläche (Reumaux et al., 2004). Überreste der in Apoptose gegangenen neutrophilen Granulozyten werden von Makrophagen und teilweise von dendritischen Zellen phagozytiert, prozessiert und präsentiert. Bruchstücke solcher prozessierter zytoplasmatischer

Proteine könnten über MHC-II zur einer Aktivierung autoreaktiver T-Zellen führen. Normalerweise kommt der humorale Schenkel des Immunsystems gar nicht mit diesen intrazellulären Antigenen in Kontakt, was als Segregation bezeichnet wird (Bosch et al., 2006). Es wird vermutet, dass die Neutrophilenapoptose oder die Beseitigung ihrer Überreste fehlerhaft verläuft.

2.8.Fragestellung

Die Ätiopathogenese der WG ist immer noch ungeklärt. Der PR3-ANCA ist für das generalisierte Krankheitsstadium pathognomonisch. Eine in-vivo-Pathogenität der cANCA konnte noch nicht nachgewiesen werden. Der chronische Entzündungszustand der endonasalen Granulome könnte eine passende Umgebung für den Bruch der Selbsttoleranz gegenüber der Proteinase 3 bilden.

Vorarbeiten zeigten ektope lymphatische Strukturen in Wegener-Granulomen mit follikulär dendritischen Zellen, stark exprimierter PR3, T- und B-Lymphozytenclustern und Plasmazellen wie in einem Keimzentrum. Die Analyse der Antikörperkodierenden VH-Gene legen eine Affinitätsreifung der B-Lymphozyten am Antigen nahe und anhand struktureller Hinweise ergab sich der Verdacht auf eine Selektion durch das WG Zielantigen PR3 (Voswinkel et al., 2006, Müller et al., 2007). Ziel dieser Arbeit war es, die Hypothese einer Initiierung der ANCA-Entstehung im endonasalen Granulom durch Korrelation der Struktur zur Funktion zu überprüfen.

Dazu wurden in Lübeck bzw. Bad Bramstedt einzelne CD20-markierte B-Lymphozyten aus keimzentrumartigen Strukturen in endonasalen Wegener-Granulomen mittels Lasermikrodissektion isoliert und die variablen Schwer- und Leichtkettengenfragmente durch eine seminested-Einzelzell-PCR amplifiziert. Vorausgegangene Sequenzanalysen unterstützten das Modell der Affinitätsreifung von Antigen-selektionierten B-Lymphozyten im Granulom (Voswinkel et al., 2008). Daraufhin wurde in einem weiteren Projekt versucht, Fabs dieser variablen Regionen zu synthetisieren, um die Spezifität der B-Zellrezeptoren zu untersuchen (Voswinkel et al., 2008). Die Synthese dieser Fabs in ausreichend großen Mengen für nachfolgende Spezifitätsuntersuchungen gestaltete sich in dieser Vorarbeit jedoch als schwierig.

Im Rahmen meiner Doktorarbeit sollte dieses Projekt um die Biosynthese von 2 rekombinanten mAbs, ausgehend von korrespondierenden variablen Regionen der

Immunglobulingene, erweitert werden. Dazu sollte im Rahmen eines halbjährigen Gastaufenthaltes an der Université Louis Pasteur in Straßburg/Frankreich im Immunopathologischen Labor des Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Équipe 737 unter Leitung von Professor Thiery Martin und Professor Jean-Louis Pasquali sowie einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Mme Cérutti des Laboratoire du Baculovirus vom Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) in Saint-Christol-Lez-Alès die Methode der Biosynthese rekombinanter mAbs mithilfe des Baculovirusexpressionssystems im eigenen Labor etabliert werden. Da das Baculovirusexpressionssystem auf Insektenzellen gestützt ist und die von diesem System synthetisierten rekombinanten Säugerproteine teilweise abweichend posttranslational modifiziert werden, verwendeten wir zum Vergleich ein Säugerzellexpressionssystem. Für dieses sollte die von Picorna-Viren stammende selbstspaltende 2A-Sequenz verwendet werden (Fang et al., 2005). Darüberhinaus sollte Zielantigenen der synthetisierten mAbs gesucht werden, um weiteren Aufschluss über die Funktion der B-Zellen in keimzentrumartigen Strukturen der Wegener Granulome zu erhalten. Sind die B-Zellen gegen mikrobielle Antigene gerichtet, wie z.B. *Staphylococcus aureus* oder sind sie autoreaktiv? Falls es sich um autoreaktive B-Zellen handelt, was wären dann die Zielantigene? Besteht eine Kreuzreaktivität und kann eventuell ein „molecular mimicry“-Mechanismus nachgewiesen werden? Könnten die B-Zellrezeptoren gegen die Proteinase 3 oder strukturell verwandte Proteine gerichtet sein und würde so die ANCA-Bildung in diesen keimzentrumartigen Strukturen initiiert? Oder sind die B-Zellen gegen Entzündungsmodulatoren gerichtet?

3. Material und Methodik

3.1. Laborgeräte

Agarose-Gelkammer	Bio-Rad, München
Autoklav Homburg	Webeco, Bad Schwartau
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Dot-Blot-Apparat, Bio-Dot	Bio-Rad, München
ELISA-Lesegerät Victor ² 1420 Multilabel Counter	Wallac, Freiburg
FLPC LKB Pump P 500	Pharmacia, Stockholm
Gefrierschrank -80° C	Nunc, Wiesbaden
Gefrierschrank -20° C	Liebher, Stuttgart
Kühlschrank 4° C	Bosch, Stuttgart
Neubauer-Zählkammer	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer	Heidolph, Schwabach
Mikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar
Pipetten 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Photometer Gene Quant Pro	Amersham, Little Chalfont (UK)
pH-Meter ino Lab	WTW, Weilheim
Sequenzierer, ABI Prism 3700	Applied Biosystems, Foster City (USA)
Schüttler KS 250 basic	IKA Labortechnik, Staufen
Thermoblock, Biometra Trio	Biometra, Göttingen
Thermocycler Homburg	Perkin-Elmer, Waltham (USA)
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge, Straßburg	Beckmann-Coulter, Paris
Ultra-Clear centrifugation tube	Beckmann-Coulter, Paris
Vortex Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Waage AT261 Delta Range	Mettler Toledo, Zürich
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Wasseraufbereiter	Millipore, Schwalbach
Westen-Blot-Gelkammer	Bio-Rad, München
Western-Blot Semi-Dry Transfer cell	Bio-Rad, München
Zellkulturbench, Heraeus safe 2	Heraeus, Hanau
Zentrifugen 5415 R	Eppendorf, Hamburg

Zentrifuge 2K15

Sigma, Steinheim

Zentrifuge Megafuge 1.0 R

Heraeus, Hanau

3.2. Verbrauchsmaterialien

3.2.1 Molekularbiologische Materialien

Natriumchlorid (NaCl)

Merck, Darmstadt

Agar

SIGMA, St. Louis (USA)

Agarose

Roth, Karlsruhe

Ammoniumacetat

Sigma, Steinheim

Baculovirus-Schwerkettenvektor p119Cy1

CNRS, Saint-lès-Alès

Baculovirus-Leichtkettenvektor pGmAc 116 TL CK

CNRS, Saint-lès-Alès

Bitek-Agar

Difco, Detroit

Chloroform

Merck, Darmstadt

DNA and Gel Purification Kit

Amersham Biosciences, Freiburg

EDTA

Sigma, Steinheim

Ethanol 100 %

Merck, Darmstadt

Ethidiumbromid

Bio-Rad, München

Gelatine

Merck, Darmstadt

Glycin

Merck, Darmstadt

Natriumchlorid

Merck, Darmstadt

Go-Taq-DNA-Polymerase

Promega, Mannheim

Taq-DNA-Polymerase

Fermentas, St. Leon-Rot

Nukleotide (dNTP-Mix)

Invitrogen, Karlsruhe

10x PCR-Puffer

Roche, Mannheim

MgCl₂ Stammlösung

Roche, Mannheim

Borsäure

Merck, Darmstadt

100 bp DNA-Ladder

Invitrogen, Karlsruhe

Glucose

Sigma-Aldrich, Steinheim

DNA-Größenleiter

Fermentas, St. Leon-Rot

Protein-Größenleiter

Fermentas, St. Leon-Rot

Bitek Agar

Becton Dickison, Heidelberg

Tryptone Peptone

Becton Dickison, Heidelberg

Ampicillin

Boehringer, Mannheim

Kanamycin

Boehringer, Mannheim

Primer M13 und M13 rev	MWG, Ebersberg
Primer	Sigma-Aldrich oder MWG
Proteinase K	Roche, Mannheim
TOPO-Kit	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Restriktionsenzyme	Fermentas, St. Leon-Rot
Trishydrochlorid (Tris HCL)	Sigma, St. Louis (USA)
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Merck, Darmstadt
Amplitaq DNA-Polymerase	Applied Biosystems, Foster City (USA)
Proofstart PCR-Kit	Quiagen, Hilden
<i>BamH</i> I	Fermentas, St. Leon Rot
<i>Sfi</i> I	Fermentas, St. Leon Rot
<i>Bcl</i> I	Fermentas, St. Leon Rot
<i>Not</i> I	Fermentas, St. Leon Rot
<i>Nhe</i> I	Fermentas, St. Leon Rot
<i>Hind</i> III	Fermentas, St. Leon Rot
<i>EcoR</i> I	Fermentas, St. Leon Rot
<i>Afl</i> II	Fermentas, St. Leon Rot
<i>Nhe</i> I	Fermentas, St. Leon Rot
<i>Pau</i> I	Fermentas, St. Leon Rot
<i>Pfl23</i> II	Fermentas, St. Leon Rot
T4-Ligase	Fermentas, St. Leon Rot
MIDI-Präparations-Kit	Machery-Nagel
TOPO-TA Cloning TOP10 Kit	Invitrogen, Karlsruhe
TOPO Zero Blunt cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Pipettenspitzen 1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Photometerquarzküvette	Eppendorf, Hamburg
Agarplattenschalen	Sarstedt, Nümbrecht

3.2.2. Materialien der Zellkultur und der Expressionssysteme

Serologische Pipetten 1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen T25, T75, T175	Sarstedt, Nümbrecht
Grobfilter (Flaschenhalsfilter)	Nalgene, Langensfeld
Protein A-Säulen	Invitrogen, Karlsruhe

SF9-Zellen	INSERM Unité 737, Strasbourg
TC 100 + L-Glutamin	Gibco by Invitrogen, Karlsruhe
FCS	Invitrogen, Karlsruhe
DOTAP	Roche, Mannheim
6-well und 12-well-Platten	Greiner Bio one, Frickenhausen
Neutralrot Sigma Ref N 4638	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agarose	Sea Plaque BMA (TEBU)
Cyprofloxacin	Boehringer, Mannheim
Gentamicin	Boehringer, Mannheim
Penicillin/ Streptomycin	Boehringer, Mannheim
Lysozym	Boehringer, Mannheim
PMSF	Boehringer, Mannheim
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Biomol, Hamburg

3.2.3. Immunologische und proteinchemische Materialien

96-Well ELISA-Platten, Maxi-Sorb	Nunc, Langensebold
Anti-CD20 mAb (L26)	Dako, Hamburg
Baculo-Anti-CD29mAb	CNRS, Saint-l��z-Al��z
ECL	Amersham Life Science, Arlington Heights, Illinois (USA)
Schaf-Anti-human-IgG1 IgG (AU006)	The Binding Site, Birmingham
Schaf-Anti-human-IgG2 IgG	The Binding Site, Birmingham
Schaf-Anti-human-IgG3 IgG	The Binding Site, Birmingham
Schaf-Anti-human-IgG4 IgG	The Binding Site, Birmingham
BSA	Roche, Mannheim
Maus-Anti-human-�� IgG(ILAMBDAPU-01MG)	Dianova, Hamburg
Maus-Anti-human-�� IgG	Dianova, Hamburg
Maus-Anti-human-�� IgG (R10-21-F3)	DAKO, Hamburg
Rabbit-Anti-human-�� IgG	DAKO, Hamburg
Polyclonal-Rabbit-Anti-m-IgG/HRP (P0260)	DAKO, Hamburg
Goat Anti-rabbit-IgG/HRP	Dianova, Hamburg
Anti-human-IgG/HRP	Dianova, Hamburg
Goat-Anti-mouse-IgG(H+L)/HRP	Bio Rad, München

Penta-His Antibody BSA free	Quiagen, Hilden
Anti-human-Fc IgG, AP-konjugiert	Dianova, Hamburg
Magermilchpulver	Hochwaldwerke, Thalfang
Mikrobielle Lysate	Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Homburg
Streptavidin-AP Conjugate	Roche, Mannheim
Streptavidin-POD Conjugate	Roche, Mannheim
Human-Maus Chimärer Mab-G250 (PDZ6L18-CA)	Centocor, Leiden
PR3-ANCA	Rheumatologisches Labor der Universität Lübeck
Rekombinante PR3	Rheumatologisches Labor der Universität Lübeck
Tween 20	Sigma, Steinheim
OPD	Sigma, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma, Steinheim
PR3-ANCA-ELISA-Kit	Varelisa, Freiburg
Grobfilter (Flaschenhalsfilter)	Nalgene, Roskilde (DK)
PVDF-Membran	Millipore, Billerica (USA)
hEx1 human fetal brain Macroarray	RZPD bzw. Imagenes, Berlin
Unipex1 fetal brain Macroarray	Imagenes, Berlin
Unipex2 T-Lymphocytes	Imagenes, Berlin
hEx1- und Unipex1/2-Klone	ImaGenes, Berlin
Western Lightning Chemiluminescence Reagent	Perkin Elmer, Waltham (USA)
Whatmann-Papier	Omnilab, Mettmenstetten

3.2.4. Lösungen und Medien

Agarosegel-Ladepuffer (10 ml)

10 mg 0,1% Bromphenolblau
20 mg 0,2% Xylencyanal
20 mg 0,2% Orange G
5 g 50% Sucrose
20 µl 1mM EDTA

SDS-Probenpuffer 5x

0,6 ml 1M Tris pH 6,8
2,5 ml 100% Glycerol
2 ml 10% SDS
0,5 ml Bromphenolblau
3,9 ml a.dest

Reduzierender SDS-Probenpuffer

50 µl Mercaptoethanol in 1 ml
5x SDS-Probenpuffer

Coating-Puffer

A. 2,12 NaCO₃ ad 100 ml
a.dest
B. 1,68 g NaHCO₃ ad 100 ml
a.dest
→ 1,7 ml A + 0,8 ml B + 7,5 ml
a.dest

Coomassie-Farbstoff

1 g Coomassie brilliant Blue250
450 ml Methanol
450 ml H₂O
100 ml Essigsäure
→ mind. 30 min Coomassie
→ 1 h Coomassie Destain

Entfärber f. große Coomassie-Gele

100 ml Methanol
100 ml Eisessig
800 ml a.dest

NaAc 3M pH 5,2

Lösen von 408,1 g von NaAc

Lämmli-Puffer 5X

144 g Glycin
30,34 g TRIS
10 g SDS
→ ad 2 l a. dest

LB-Medium

1% Bacto Tryptone
0,5% Hefe Extrakt
1,0% NaCl
pH 7.0
Autoklavieren
50 µg/ml Kanamycin
hinzufügen

LB-Agar Platten mit Kanamycin bzw. Ampicillin

LB-Medium
15 g/l Agar
Autoklavieren
50 µg/ml Kanamycin
bzw. 100 µg/ml Ampicillin
in Platten auftragen
bei 4° C lagern

Lysis-Puffer

20 mM TRIS pH 8
1 mM PMSF
1 mg/ml Lysozym
0,05% Triton X

PBS

1,14 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
0,34 g NaH_2PO_4
8,78 NaCl
→ ad 1 l a. dest

Ponceau-Färbung 10x

2 g Ponceau S
30 g Trichloressigsäure
30 g Sulfosalicylsäure
→ ad 100 ml a. dest

Protein-A/G-Puffer für FPLC

Puffer A:

20 mM P-Puffer pH 7,0
0,54 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
2,19 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$
→ ad 500 ml a. dest

Puffer B: 100 mM Glycin pH 3,0

3,75 g Glycin
2,4 ml 5 M HCl
→ ad 500 ml a. dest

b) 0,1 M Essigsäure

1,4 ml à 250 ml a. dest

c) 0,15 M Na-Citrat pH 3

11g à 250 ml a. dest

SDS 10%

100 g SDS in 900 ml a. dest auf
68° C erhitzen, um es in Lösung
zu bringen. Mit 10 M NaOH auf
pH 7,0 einstellen

SOC Medium

2% Bacto Tryptone
0,5% Hefe-Extrakt
10 mM NaCl
2,5 mM MgCl_2

10 mM MgSO₄
20 mM Glucose

Stripping Puffer

15 g Glycin
1 g SDS
10 ml Tween 20
Auf pH 2,2 einstellen
→ad 1 l a. dest

TAE 50x Stammlösung

242 g TRIS-Base
57,1 g Essigsäure,
100 ml 0.5 M EDTA,
→ad 1 l a. dest

TEK-Puffer

1 M TRIS Base	0,1 M
0,5 M EDTA	0,1 M
1 M KCl	0,2 M

→ad 1 l a. dest

TENS-Puffer

0,5 ml 1 M TRIS pH 8
0,5 ml 0,5 M EDTA
1,5 ml 10% SDS
0,5 ml 10 M NaOH
ad 50 ml a. dest

Transferpuffer für Western-Blot

0,3 g TRIS
1,44 g Glycin
20 ml Methanol
→ ad 100 ml a. dest

Transformationspuffer (CaCl₂-Lösung) / chemisches Verfahren zur Herstellung kompetenter Bakterien:

10 mM PIPES

55 mM MnCl₂

15 mM CaCl₂

250 mM KCl

Mischen und Einstellen des pH auf 6,7 mit KOH, Sterilisation mit einem 0,45 µm Filter

TRIS 1M

121,1 g TRIS-Base in 800 ml H₂O den pH durch Zufügen von HCl einstellen:

70 ml HCl → pH 7,4

60 ml HCl → pH 7,5

42 ml HCl → pH 8,0

TRIS Buffer Saline (TBS)

8,75 g NaCl

6,05 g TRIZMA Hydrochlorid

1,4 g TRIS

ad 1 l a. Dest

TRIS-Acetate 50x (TAE)

242 g TRIS Base

57,1 ml CH₃COOH

Eisessigsäure

100 ml 0,5 M EDTA (pH 8.0)

Trypanblau

0,5 g Trypanblau

100 ml 0,9% NaCl

TE-Puffer pH 7,4

10 mM TRIS-Cl pH 7.4
1 mM EDTA (pH 8,0)

2TY-Medium

16 g Bacto Tryptone
10 g Yeast Extract
5 g NaCl
→ ad 1 l a.dest
+ 2% Glucose
+ 100 µg/ml Ampicillin

Western-Blot-Puffer:

1. TBS 0,05% Tween - Waschpuffer

8,8 g NaCl
6,05 g TRIS
0,8 ml 5M HCl
0,5 ml Tween 20
→ ad 1 l a.dest

2. Blockpuffer

100 ml Waschpuffer
10 g Magermilchpulver
bzw. 3 g BSA

10X Ponceau-S-Stammlösung:

2 g Ponceau-Stammlösung
30 g Trichloressigsäure
30 g Sulfosalcylsäure
ad. 100 ml a. dest.

SF9-Medium:

500 ml TC100 Mediumflaschen
50 ml FCS
2,5 ml Penicillin/Streptomycin

Herstellung von LB-Agar und Medium:

Für die Agarplatten werden 10 g Tryptone, 5 g Yeast Extract, 10 g NaCl und 15 g Bitek-Agar mit a.dest. auf 1 l aufgefüllt. Dann wird mit NaOH ein pH 7.0 eingestellt und anschließend für 20 min. bei 120° C autoklaviert. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 55° C werden 50 µg/ml Ampicillin zugesetzt. Das LB-Medium wird nach demselben Rezept hergestellt, ohne den Bitek-Agar. Durch den Zusatz von Ampicillin können sich nur Bakterien vermehren, die ein Plasmid aufgenommen haben. Vor dem Auftragen der Bakterien auf die Platten werden diese auf 37° C vorgewärmt, mit 40 mg/ml X-Gal-Lösung (400 mg X-Gal, 10 ml Dimethylformamid) bedeckt und trocken gelassen.

3.3. Methodik

3.3.1. Vorangegangene Arbeit

Das Ausgangsmaterial dieser Arbeit in Form von VH- und Vκ-DNA-Fragmenten stellte uns freundlicherweise das Forschungslabor der Rheumatologischen Klinik und Poliklinik in Bad Bramstedt zur Verfügung.

In kryokonservierten Biospsien von WG-Patienten färbte man krankheitsspezifische granulomatöse Gewebestrukturen immunhistochemisch mit monoklonalem Maus-anti-human-CD20-AK. Dann wurden einzelne B-Zellen aus Keimzentrum-ähnlichen Formationen mithilfe einer Laser-assistierten Mikrodissektion isoliert (Fink et al., 2006) und ihre Schwer- und Leichtkettengene mittels seminested single-cell-PCR amplifiziert und anschließend analysiert (Krämer JA et al., 2007).

3.3.2. Patienten

Patient Hm:

Es handelte sich um eine neu aufgetretene, noch unbehandelte lokalisierte WG eines 28 jährigen Patienten. Der ANCA-Titer war zum Zeitpunkt der Biopsie negativ und es wurde noch keine spezifische Therapie eingeleitet.

Patientin Scu:

Die erste Biopsie wurde der Patientin Scu im Alter von 64 Jahre entnommen, als sie sich mit den Symptomen einer einjährigen blutigen Rhinitis, einer schmerzhaften Polyneuropathie mit brennenden Dysästhesien an den Waden und einer beidseitigen

Hypakusis vorstellte. Histologisch zeigten sich typische Granulome mit geographischen Nekrosen, entzündlichen Infiltraten mit Plasmazellen, Granulozyten, Histiozyten, Epitheloidzellen und einzelnen Riesenzellen. Mikrobiologisch fiel eine endonasale Staphylococcus aureus-Besiedlung auf. Es handelte sich also um eine Patientin im Stadium einer unbehandelten, sich schon länger hinziehenden, lokalisierten WG.

Patient St:

Der 48jährige Patient St klagte seit 3 Monaten über die Symptome Atemnot, Kopfschmerzen, vermehrten Harndrang und eine therapierefraktäre Konjunktivitis. Nach Krankenseinweisung konnte histologisch eine ulzerierende Konjunktivitis und eine chronisch ulzerierende Rhinitis festgestellt werden. Der ANCA-Titer lag bei 1:128 (anti-PR3 36 U/ml). Das CT-Thorax ergab einzelne teils konfluierende Rundherde in der Lunge sowie einen Pneumothorax. Biopsien des linken Oberlappens bestätigten die Diagnose einer WG. Im cMRT war ein Hypophysentumor sichtbar, welcher den Diabetes insipidus erklärte. Bei diesem Hypophysentumor handelte es sich um Wegener-Granulom. Eine Remissionsinduktionstherapie nach dem FAUCI-Schema wurde noch vor der Lungenbiopsie begonnen.

Tab. 2: Patientencharakteristika

Patient # (Alter zur Zeit der Biopsie)	WG- Manifestation	WG- Krankheits- aktivität zur Zeit der Biopsie	WG Krankheits- dauer	cANCA (anti- PR3)	Therapie vor der Biopsie
1 (68) Scu	lokalisiert (E)	Geringe Aktivität	19 Jahre	negativ	Cotrimox-azol
2 (28) Hm	lokalisiert (E)	Aktiv	3 Monate	negativ	kein
3 (49) St	generalisiert (E,L,Ey,C,B)	Aktiv	1 Jahr	1:256 (8)	Cyclophosphamid, Steroide

Klassifikation der WG-Manifestation: E - ear, nose and throat; L – lung; Ey - eye; C – central nervous system; K – kidney; B – systemic inflammation. Ergebnisse der cANCA-Immunfluoreszenz sind in Titern angegeben, anti-PR3 Antikörper (Standard ELISA) in units/ml

3.3.3. Molekularbiologische Methodik

3.3.3.1. DNA-Amplifizierung

Die DNA-Klonierung ist eine Methode zur selektiven Amplifizierung eines bestimmten DNA-Fragmentes. Generell existieren 2 verschiedene Arten der DNA-Klonierung: mithilfe der PCR oder plasmidbasiert in Bakterien (Strachan et al., 2005)

3.3.3.2. Plasmidbasierte DNA-Klonierung

Die zellbasierte DNA-Klonierung lässt sich in die Herstellung von rekombinanter Plasmid-DNA, die Transformation dieser in kompetente Wirtsbakterien, deren selektive Vermehrung und die anschließende Isolierung der rekombinanten Plasmid-DNA aus den Bakterien, unterteilen.

3.3.3.3. Herstellung rekombinanter DNA

Die zu vermehrende DNA-Sequenz wird in einen Vektor kloniert. Mögliche Vektoren sind Plasmide und Bakteriophagen.

In dieser Studie verwendeten wir u.a. die Baculovirusvektoren p119Cy1 und pGmAc 116 TL CK, die Vektoren für die 2A-Sequenz-Methode pEAK und pcDNA. Alle diese Plasmide enthielten einen eigenen Replikationsursprung, der zu einer hohen Replikationsrate der extrachromosomalen DNA führte. Daneben enthielten die Vektoren u.a. Antibiotikaresistenzgene.

3.3.3.4. Transformation

Als Transformation bezeichnet man Aufnahme von Plasmiden in Bakterien. Wir verwendeten chemisch kompetent gemachte DH-5 α -Bakterien. Pro Transformation wurden zu 80 μ l kompetenten DH-5 α -Bakterien in cap tubes je 4-10 μ l des Ligationsproduktes hinzupipettiert und anschließend auf Eis inkubiert. Nach einer Inkubationszeitspanne von 5 bis max. 30 min führten wir einen 45 sec dauernden Hitzeschock bei 42° C durch. Dann gaben wir 250 μ l SOC-Medium bei, und inkubierten für 1 h schüttelnd bei 37° C.

3.3.3.5. Selektive Vermehrung der transformierten Bakterienklone

Die transformierten DH-5 α -Bakterien plattierten wir auf Agar-Platten mit Antibiotika-Zusatz aus und inkubierten sie über Nacht bei 37° C. Die verwendeten DH 5 α -Bakterien werden ursprünglich durch Ampicillin und Kanamycin in ihrem Wachstum

gehemmt, so dass ihnen gegenüber die transformierten Bakterien mit Antibiotikaresistenzgenen einen Wachstumsvorteil haben. Wir pickten isoliert gewachsene und somit monoklonale Bakterienkolonien, und inkubierten sie in LB-Medium mit Antibiotikazusatz über Nacht bei 37° C auf dem Schüttler. Die rekombinante Plasmid-DNA hat eine vom Zellzyklus unabhängige, sehr hohe Replikationsrate, was zu großen Mengen an rekombinanter DNA führt. Anschließend folgte die Isolation der Plasmid-DNA.

3.3.3.6. Glycerolstocks

Bakterienkulturen, die für längere Zeit gelagert werden sollten, versetzten wir mit 40% Glycerol und froren sie bei -80° C ein.

3.3.3.7. Plasmid-Präparation

Die Plasmid-Präparation ist eine Methode zur Isolierung der zirkulär-geschlossenen Plasmid-DNA von chromosomaler „supercoiled“ DNA und RNA der Bakterien. Die verschiedenen Verfahren zur Plasmid-Präparation unterscheiden sich in Ausbeute und Qualität der gewonnenen Plasmid-DNA, wobei hier auch der verwendete Bakterienstamm, das Plasmid und das Kulturmedium eine Rolle spielen.

3.3.3.8. Mini-Präparation mit der TENS-Methode

Die TENS-Methode ist eine schnell durchzuführende Minipräparation. Die Plasmid-DNA-Ausbeute ist geringer als bei der Verwendung von Phenol-Chloroform. Wir zentrifugierten 1,5 ml der Bakterienkultur für 20 sec bei maximaler Drehzahl mit einer Tischzentrifuge ab. Wir verwarfen den Überstand und resuspendierten die pelletierten Bakterien in S1-Puffer. Durch die Zugabe von 300 µl TENS-Puffer, anschließendes Schwenken und 2-4 min stehen lassen, kam es zur alkalischen Lyse. Die Neutralisation erfolgte durch Zugabe von 150 µl 3 M NaOAc (pH 5, 2) und kurzes Mischen. Zelltrümmer und denaturierte DNA präzipitierten durch eine 4 min full speed Zentrifugation bei 4° C. Zur Fällung füllten wir den Überstand vorsichtig in ein frisches Eppendorfcup, pipettierten 1 ml 95% EtOH (-20° C) hinzu, mischten sorgfältig und drehten dann 5 min bei maximaler Drehzahl der Tischzentrifuge ab. Anschließend wuschen wir das DNA-Pellet erneut in 400 µl 70% EtOH (-20° C). Nach 5 min Lufttrocknen resuspendierten wir das Pellet in 25 µl molekular aufgereinigtem Wasser.

3.3.3.9. PCR-Polymerasekettenreaktion

Die PCR ist eine Technik, die zur (selektiven) Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Abschnittes bis zu einer gängigen Größenordnung von 1,5 kB einer oft weitaus größeren Gesamt-DNA dient.

Sie erfolgt durch eine zyklische Wiederholung von drei Schritten:

1. Denaturierung der DNA durch Erhitzung auf 95° C.
2. Annealing (Anlagerung) der Sense und Antisense-Primer bei etwa 50°-70° C an die nun einzelsträngigen Ausgangs-DNA-Stränge, die als Matrizen dienen. Die annealing-Temperatur ist abhängig von der gewählten übereinstimmenden Länge und dem GC-Gehalt der Primer.
3. Hiervon ausgehend beginnt eine hitzestabile DNA-Polymerase bei einer optimalen Temperatur von 72° C die DNA-Synthese durch Aneinanderreihung von Desoxyribonucleotidtriphosphaten in 5'-3'-Richtung.

Die neu synthetisierten DNA-Stränge wirken in den folgenden Zyklen als zusätzliche Matrizen. Dies führt zu einer exponentiell zunehmenden Amplifikationsrate in Abhängigkeit zur Zyklenzahl, daher der Begriff Kettenreaktion.

Die Nachteile der PCR gegenüber den auf Zellbasis basierenden DNA-Klonierungen liegen zum einen in der geringeren maximalen Größe der zu vervielfältigenden Ausgangs-DNA, die mit einer Standard-PCR amplifiziert werden kann (obwohl heute schon DNA-Sequenzen bis 42 kB mit der PCR kloniert wurden), und zum anderen in der Fehleranfälligkeit der hitzestabilen DNA-Polymerasen. Zusammenfassend handelt es sich bei der PCR um eine schnelle, robuste Methode, von der es heute zahlreiche Varianten für verschiedene Einsatzzwecke gibt. So genügte die DNA eines einzigen B-Lymphozyten als Ausgangs-DNA für die Amplifizierung der VH- und V κ -Fragmente mit einer Seminested-PCR.

Bei der Seminested-PCR handelt es sich um eine aus zwei Runden bestehende modifizierte PCR. In der ersten Runde wurde eine Kombination an 5'-Primern für die verschiedenen Familien der Variablen Region und an 3'-Primern für die J-Verbindungsregion eingesetzt. Auf diese Weise sollte das komplette Repertoire der V- und J-Regionen von Immunglobulinen abgedeckt werden. Die unspezifischen Primer der ersten PCR-Runde machten es wahrscheinlicher, dass es zu einer

Amplifikation kommt. Die verdünnten Produkte der ersten Amplifizierungs-PCR fungierten dann als Ausgangs-DNA für die spezifischere zweite Runde, bei der mehrere PCRs parallel mit weiter intern liegenden, jeweils für eine J-Familie spezifischen, Primer durchgeführt werden.

3.3.3.10. TOPO-TA-Vektor: Molekularbiologisches Tool

PCR-Produkte, an denen weitere molekularbiologische Arbeitsschritte durchgeführt werden sollten, wurden in den TOPO-TA-Vektor zwischenkloniert. PCR-Produkte haben an ihren 3'-Enden Adenosin-Überhänge, da die Taq-DNA-Polymerase eine vom Template unabhängige terminale Transferaseaktivität besitzt, die einzelne Desoxyadenosine an das 3'-Ende des PCR Produktes anhängt. Dies wird ausgenutzt, in dem der linearisierte TOPO-TA-Vektor-3' dazu komplementäre einzelne Deoxythymidinüberhänge besitzt. Die PCR-Produkte können so ohne vorherigen Restriktionsenzymverdau in den TOPO-TA-Vektor kloniert werden. Die dazu benötigte Energie wird von einer energiereichen Tyrosinbindung geliefert. Diese energiereiche Tyrosinbindung stammt von der Spaltung des DNA-Phosphodiester-rückgrates durch die Topoisomerase I des Vaccinia Virus (Shuman, 1994).

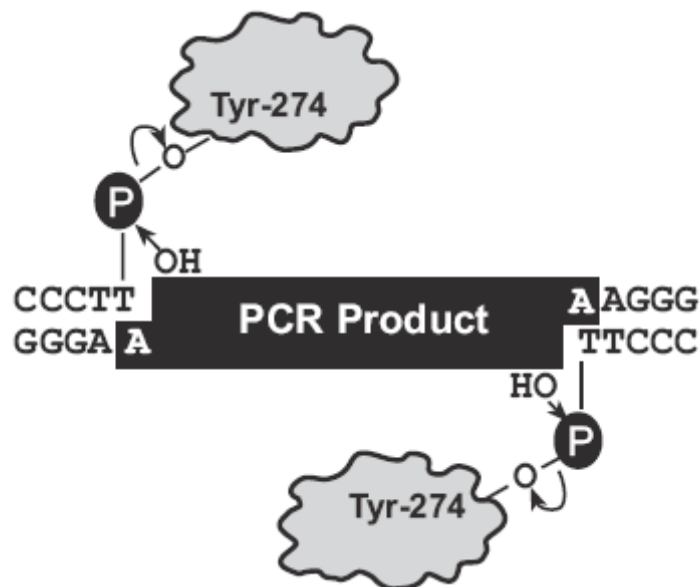


Abb.2: Modell der Funktionsweise des TOPO-TA-Vektors. PCR-Produkte haben wegen der terminalen Transferaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase an 3'-Enden Adenosin-Überhänge. Der linearisierte TOPO-TA-Vektor besitzt 3' dazu komplementäre einzelne Deoxythymidinüberhänge, so dass die PCR-Produkte ohne vorherigen Restriktionsenzymverdau in den TOPO-TA-Vektor kloniert werden können. Die dazu benötigte Energie wird von einer energiereichen Tyrosinbindung geliefert (Abb. von Invitrogen, Karlsruhe).

Das entstandene Plasmid wird in *E. coli* Bakterien transformiert, kultiviert und anschließend isoliert.

3.3.3.11. DNA-Aufreinigung aus Mini-Präps und Präparationsgelbanden

Zur Aufreinigung von Mini-Präps oder ausgeschnittener Agarosegelbanden-DNA verwendeten wir das „GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit“ von Amersham Biosciences (Freiburg, Deutschland) nach Herstellerangaben. Es dient zur Aufreinigung der DNA von Proteinen, Salzen, Primern, Restriktionsenzymen und TAE-Agarose.

3.3.3.12. Konzentrationsbestimmung mit dem Photometer

Die Konzentration der DNA wird mit dem Photometer nach dessen Kalibrierung mit a.dest. bestimmt. Dazu verdünnten wir die DNA in einem Verhältnis von 1:50 bis 1:100 mit a.dest. und maßen in einer Quarzküvette die Absorption bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm. Die Reinheit der Nukleinsäure lässt sich ungefähr am Quotienten A_{260}/A_{280} abschätzen (reine DNA: 1.8-1.9).

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen kalibrierten wir den Photometer mit PBS oder Lysispuffer und werteten die Proben dann in einer 1:50 Verdünnung aus. Durch die Messung der OD von Bakterienkulturen konnte die Wachstumsphase bestimmt werden. Bei einer bestimmten OD konnte so gezielt induziert werden.

3.3.3.13. Restriktionsenzym-Verdau

Eine der wichtigen Grundlagen der Gentechnik war die Entdeckung von Typ-II-Restriktionsendonukleasen in den 70er Jahren. Es handelt sich um Enzyme, die Bakterien Schutz vor Fremd-DNA bieten. Sie erkennen spezifisch 4-8 bp lange Palindrome, d.h. Sequenzen, die in Sense- und Antisense-Richtung gelesen die gleiche Information haben. Die erzeugten Schnittenden können entweder glatt (blunt) oder überlappend (sticky) sein. Die Restriktionsenzyme dienten uns zur Klonierung der VH- und Vk-Segmente in die Schwer- und Leichtkettenvektoren. Dafür wurden die Inserts und die Vektoren mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut und dann ligiert. Restriktionsenzyme wurden auch zu Insertionskontrollen eingesetzt. Die Länge der entstandenen Restriktionsfragmente gab Rückschlüsse über eine erfolgreiche Klonierung eines Inserts in ein Plasmid.

3.3.3.14. Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese ist eine Methode zur größenabhängigen Auftrennung von DNA-Fragmenten. Durch Zugabe des interkallierenden Ethidiumbromids wird DNA unter UV-Licht sichtbar. DNA-Fragmentgrößen können mithilfe eines mitlaufenden DNA-Längenmarkers relativ genau bestimmt werden. Abhängig von der erwarteten Größe des interessanten DNA-Fragmentes wählten wir den Agarosegehalt der Gele bei 1% bis 2%. Die Gele hatten eine Ethidiumbromid-Konzentration von 0,5 µg/ml. Nach Erkaltung und Aushärtung legten wir das Gel in eine mit TAE-Elektrophoresepuffer gefüllte Gelkammer. Die Proben nahmen wir in Ladepuffer auf, dessen Sucrose der Probe eine höhere Dichte verlieh, so dass die Probe ohne Probleme in die Ladetaschen pipettiert werden konnte. Die enthaltenen Farbstoffe ermöglichen in der Regel einen hilfreichen ersten Überblick über den Fortschritt der Elektrophorese. Zur Elektrophorese wurde eine Gleichspannung von 80 bis 120 Volt für ca. 45 min angelegt.

3.3.3.15. Präparationsgele

Sollten Gelbanden mit DNA aus Agarosegelen isoliert werden, verwendeten wir frisch gereinigte Elektrophoresekammern und frischen TAE-Elektrophoreselaufpuffer. Die relevanten Gelbanden konnten dann unter UV-Licht ausgeschnitten werden. Dabei achteten wir darauf, die relevanten Gelbanden nur so kurz wie möglich UV-Licht auszusetzen und das Gel auf eine Folie zu legen, um das Mutations- und Kontaminationsrisiko zu minimieren. Die ausgeschnittenen Gelbanden reinigten wir mit dem Gel Band Purification Kit auf.

3.3.3.16. Ligation

Nach Restriktionsenzymdigestion werden die kompatiblen „sticky ends“ der DNA-Fragmente mit einer Standard T4-Ligase für 12 h bei 16° C ligiert. Um die Bedingungen für erfolgreiche Ligationen zu optimieren, wählten wir parallel Ligationsansätze mit molaren Insert zu Vektor-Verhältnissen von 3:1, 5:1 und 10:1. Meistens setzten wir einen Ansatz mit 100 ng Vektor DNA ein.

3.3.3.17. Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte mithilfe eines automatischen Sequenzierers, basierend auf der Didesoxynukleotidmethode (Sanger et al., 1977). Didesoxynukleotide sind im

Unterschied zu Desoxynukleotiden auch an 3' desoxygeniert, so dass sie dort keine Phosphodiesterbindung mit der 5' Phosphatgruppe des nächsten Nukleotides eingehen können. Sie führen während der DNA-Synthese zu Strangabbrüchen. Die zu sequenzierende DNA dient als „template-DNA“ in einem modifizierten PCR-Ansatz, der zusätzlich zu den üblichen dNTPs ein Gemisch der vier mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Didesoxynukleotiden enthält. Nach mehreren Zyklen kommt es in jeder Position zu Strangabbrüchen. Das PCR-Produkt wird über ein Acrylamidgel aufgetrennt. Ist die zu sequenzierende Sequenz monoklonal, findet sich an jeder Position nur das Signal eines Farbstoffes. Ein automatisiertes Laserlesegerät bestimmt die Reihenfolge der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe, die stellvertretend für die Sequenz der vier Didesoxynukleotide stehen. Die Sequenzergebnisse können mit dem Auswertungsprogramm Chromas auf mögliche Lesefehler des Sequenzierers nachkontrolliert werden.

3.3.3.18. Analyse der Immunglobulin-Gensequenzen

Zur Analyse der variablen Immunglobulin-Gensegmente wurden die Datenbanken von International ImmunoGeneTics (IMGT) (<http://imgt.cines.fr>) und NCBI-BLAST angewandt.

3.3.4. Expressionssysteme

Zur Synthese eines bestimmten Proteins wird generell dessen kodierender Sequenzabschnitt in Expressionsvektoren kloniert, mit denen dann Bakterien und eukaryote Zellen transformiert bzw. transfiziert werden. Expressionssysteme können also auf prokaryoten oder auf eukaryoten Zellen basieren. Die bakteriellen Expressionssysteme haben den Vorteil, dass sich mit ihnen große Proteinmengen relativ einfach und kostengünstig synthetisieren lassen. Jedoch exprimieren Bakterien in der Natur generell eher kleine und einfache Proteine. Exprimiert man aber komplexe eukaryote Proteine mithilfe von DNA-Rekombinationstechnik in Bakterien, haben diese teilweise veränderte Eigenschaften. Dies liegt daran, dass sich die eukaryote posttranslationale Modifizierung von der in Prokaryoten stark unterscheidet. So führen unterschiedliche Glykosylierungs- und Phosphorylierungsmuster zu andersartigen Proteinfaltungen.

Diese Problematik betrifft immunologische Fragestellungen in besonderer Weise, daher wurden in dieser Studie zur Synthese von mAbs eukaryotische Expressionssysteme eingesetzt. Eukaryotische Expressionssysteme lassen sich nach verschiedenen Kriterien unterteilen: in solche, die auf Säuger- oder auf Insektenzellen als Wirtszellen basieren, in dauerhaft stabil exprimierende oder in nur kurzzeitig bestehende transiente Systeme.

3.3.4.1. Baculovirus-Expressionssystem

Das Baculovirus-Insektenzellsystem liefert relativ schnell große Mengen an löslichem Protein und besitzt gegenüber den bakteriellen Expressionssystemen den Vorteil, dass die meisten Mechanismen der posttranslationalen Modifikation, des Protein Processings und der Sekretion mit denen in Säugerzellen identisch sind. Ein weiterer Vorteil ist, dass Baculoviren nicht humanpathogen sind.

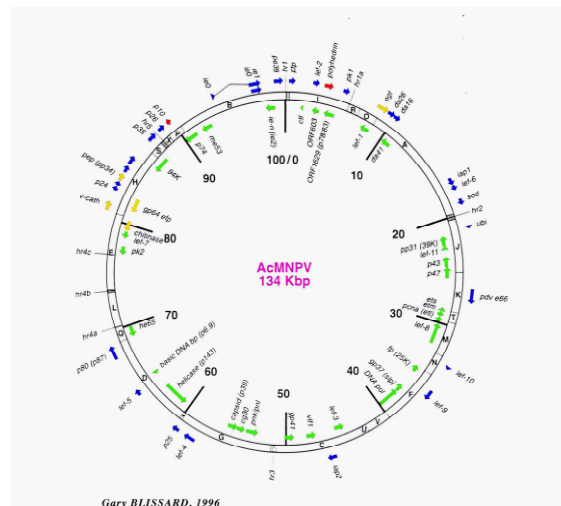


Abb. 3: Baculovirusgenom. Baculoviren sind doppelsträngige tierpathogene DNA-Viren mit einer Größe von 134 Kbp. Grundlagen der Verwendung dieses Virus für die Expression von mAbs sind die hohen Expressionsraten gegen Ende des Replikations-Zyklus der Gene für Polyhedrin und für Polypeptid P10 und dass diese Gene für die *in vitro* Virustransmission nicht benötigt werden und somit gegen die Schwer- und Leichtkettengene ausgetauscht werden können.

Baculoviren sind doppelsträngige tierpathogene DNA-Viren mit einer Größe von 134 Kbp und 154 offenen Leserahmen. Sie befallen nur die Zellen wirbelloser Spezies. Baculoviren sind u.a. die Erreger der sogenannten Welkkrankheit von Seidenraupen. Der für die Expression von rekombinanten Genen meist verwendete *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus (MNPV) wurde aus dem Nachtfalter *Autographa californica* isoliert. Das Baculovirus-Insektenzellexpressionssystem führt zu einer höheren Proteinausbeute als die meisten Säugerzell-basierten

Expressionssysteme (Devauchelle et al., 1999). Es besteht aber das Problem, dass die posttranslationale Prozessierung in Insektenzellen Unterschiede gegenüber der in Säugerzellen aufweist. Es wurden jedoch große Anstrengungen unternommen, um die posttranslationale Modifizierung des Baculovirus-Expressionssystems der von Säugerzellen immer mehr anzupassen. Somit eignet sich das Baculovirus-Insektenzellsystem u.a. zur Herstellung von rekombinanten humanen monoklonalen Antikörpern und wurde zu diesem Zweck schon öfter erfolgreich angewendet.

Grundlage dieses Expressionssystems ist, dass gegen Ende des Replikationszyklusses die Proteine Polyhedrin und Polypeptid P10 in großer Menge produziert werden. Beide sind nur in der Natur essentiell für die Virustransmission, in Zellkulturen werden sie jedoch nicht benötigt. So können die für Polyhedrin und Polypeptid P10 kodierenden Gene eleganterweise durch heterologe Gene ersetzt werden, die dann gesteuert von den aktiven viralen Polyhedrin- und Polypeptid-P10-Promotoren in großen Mengen exprimiert werden.

Zur Expression der rekombinanten mAbs wurden die korrespondierenden vervollständigten VH- und VL-Fragmente in 2 Kassettenvektoren kloniert, worauf dann in einer Kotransfektion das Schwerkettengen an den P10-Locus und das Leichtkettengen an den Polyhedrin-Locus platziert wurde (Poul et al., 2005).

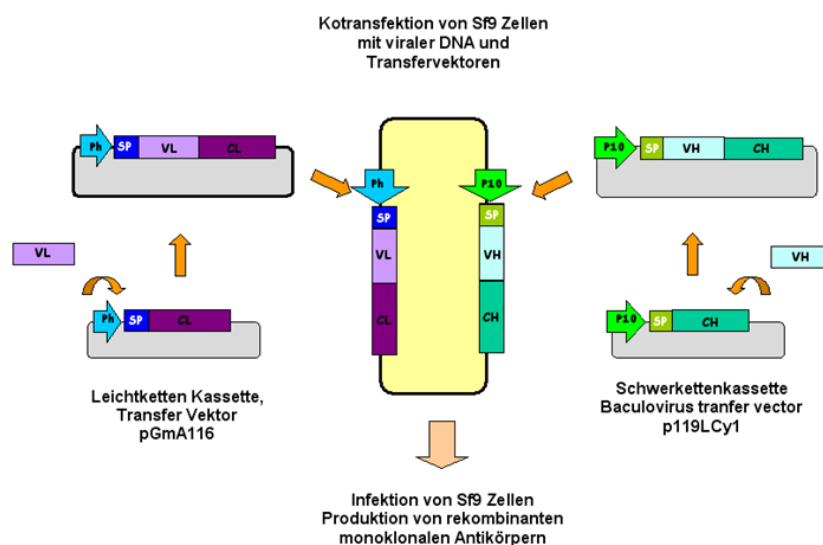


Abb. 4: BaculoMAb Technologie: Links: Insertion der variablen Leichtketteneinheit (VL) in einen Transfervektor mit Polyhedrin-Promotor, Signalpeptid und konstanter Leichtkettenregion. Rechts: Insertion der variablen Schwerketteneinheit (VH) in einen Transfervektor mit P10-Promotor, Signalpeptid und konstanter Schwerkettenregion. Mitte: Anschließende Kotransfektion des Baculovirus und Infektion von Sf9-Zellen mit doppeltrekombinanten Virus.

Für die Synthese rekombinanter Proteine, in diesem Fall mAbs, sind MOI (multiplicity of infection)-Werte zwischen 1 und 10 PFU/Zelle geeignet. Dagegen sind zur Amplifikation des Virustiters MOI-Werte zwischen 0,01 bis 0,1 PFU/Zelle günstiger.

Bei den verwendeten Insektenzellen handelt es sich um eine SF9-Zelllinie. Diese immortalisierte Zelllinie stammt aus Ovargewebe von *Spodoptera frugiperda*, einer zur Eulenfalterfamilie gehörenden Schmetterlingsart. Die Zellen sind suszeptibel für die Infektion durch Baculoviren. Morphologisch handelt es sich um runde, polymorphe, semiadhärente Zellen. Sie werden bei 27 °C ohne CO₂ inkubiert, haben eine Verdopplungszeit von ca. 50 h und sollen alle 3-5 Tage 1:2 bis 1:3 gesplittet werden (DSMZ Online Katalog und Lynn 2002). Zum Lösen dieser semiadhärenten Zellen ist eine leichte Perkussion der Zellkulturflaschen ausreichend.

3.3.4.2. Klonierung der variablen Immunglobulingensegmente (VH und Vk) in die Transfervektoren des Baculovirus-Expressionssystems

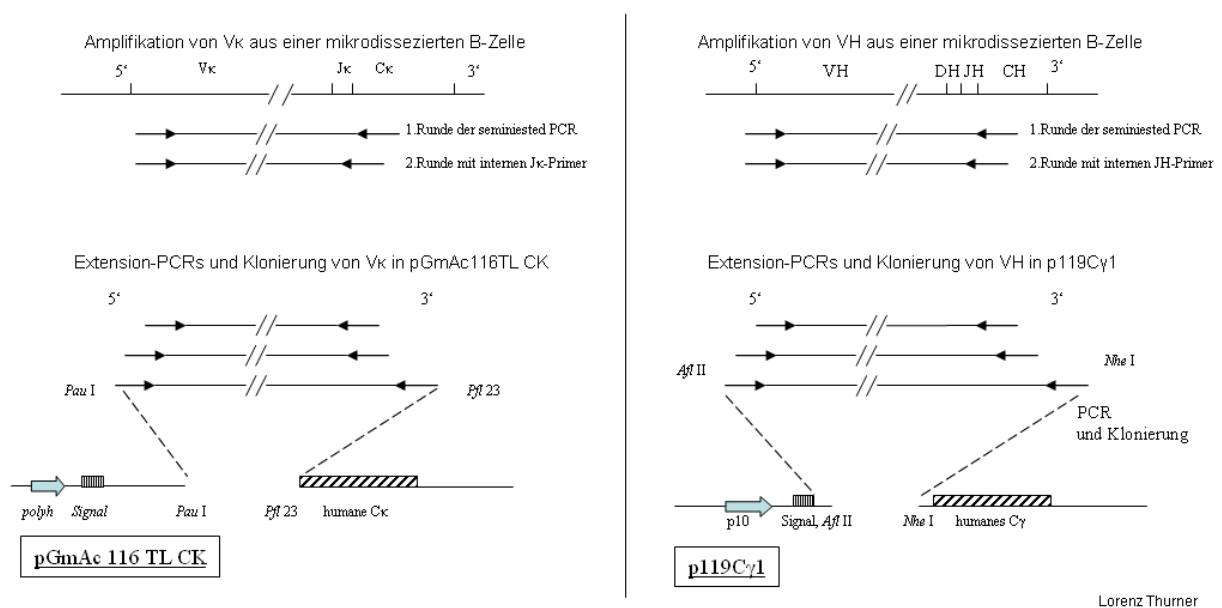


Abb. 5: Schema der Klonierung der VH- und Vk-Fragmente in die Transfervektoren des Baculovirusgenom: Links oben ist die zweiründige seminested-PCR zur Amplifizierung der Vk-Leichtketten-DNA aus der Einzel-B-Zell-DNA dargestellt. Das amplifizierte Leichtkettengen ist an den 5'- und 3'-Enden verkürzt. Links unten sind die Verlängerungs-PCRs zur Wiederherstellung eines kompletten Leichtkettengens und zum Anhängen der zur Klonierung benötigten Restriktionsschnittstellen schematisch dargestellt. Rechts analoges Vorgehen für das Schwereketten.

Den durch seminested single-Cell-PCR amplifizierten VH- und Vk-Gensegmenten


```

- FR1 ->  __ CDR1 __  <- FR2 ->  __ CDR2 __  <-- FR3 -->  __ CDR3 __  <- D ->  <- Jh
Hm0507/10-VH4      ...      ...      ...      ...      ...      ...      ...
X05715 IGHV4-39*02 ...      ...      ...      ...      ...      ...      ...
L10094 IGHV4-39*01 ...      ...      ...      ...      ...      ...      ...
X92259 IGHV4-39*03 ...      ...      ...      ...      ...      ...      ...
M95116 IGHV4-39*05 ...      ...      ...      ...      ...      ...      ...
Z14236 IGHV4-39*06 ...      ...      ...      ...      ...      ...      ...

```

```

----- Jh ----- >
Hm0507/10-VH4      attatatgactggttcgaccctggggccaaggaaccctggtcacxxxxxxxxxxxx
J00256 IGHJ5*01      ....-ca-----t-----cgctctcctcag
X86355 IGHJ5*02      ....-ca-----g-----cgctctcctcag
J00256 IGHJ4*01      .....--ac--t---ta-----cgctctcctcag
X86355 IGHJ4*02      .....--ac--t---ta-----g-----cgctctcctcag
M25625 IGHJ4*03      .....g--ac--t---ta-----g-----cgctctcctcag

```

Das gleiche VDJ-Segment nach Verlängerungs-PCRs:

```

AflIII < SP P10 ><-----FR1-----
Hm0507/10 VH4-Mini4 ctttaaggggtgtccagtggtcagctgcagctgcaggagtcggggcca...ggactggtgaa
X05715 IGHV4-39*02      -----...-----
L10094 IGHV4-39*01      -----...-----
X92259 IGHV4-39*03      -----...-----
M95116 IGHV4-39*05      -----...-----
Z14236 IGHV4-39*06      -g-----...-----

```

```

----FR1----->  __ CDR1 __  <--FR2-->  __ CDR2 __  <-FR3-
Hm0507/10 VH4-Mini4  gccttcgcagaccctgtcc...      ...      ...      ...
X05715 IGHV4-39*02  -----g-----...      ...      ...      ...
L10094 IGHV4-39*01  -----g-----...      ...      ...      ...
X92259 IGHV4-39*03  -----g-----...      ...      ...      ...
M95116 IGHV4-39*05  -----g-----c-----...      ...      ...      ...
Z14236 IGHV4-39*06  -----g-----...      ...      ...      ...

```

```

FR3->  _ CDR3 _ <-D->  < ----- Jh -----
Hm0507/10VH4-Mini4  ...      ...      aaggggaattattatatgactggttcgaccctggggccaag
J00256 IGHJ5*01      ...      ...      .....-ca-----t-----
X86355 IGHJ5*02      ...      ...      .....-ca-----g-
J00256 IGHJ4*01      ...      ...      .....--ac--t---ta-----
X86355 IGHJ4*02      ...      ...      .....--ac--t---ta-----g-
M25625 IGHJ4*03      ...      ...      .....g--ac--t---ta-----

```

```

----- Jh ----- > Nhe I
Hm0507/10 VH4-Mini4  gaaccctggtcaccgtctcctcagctagc
J00256 IGHJ5*01      -----
X86355 IGHJ5*02      -----
J00256 IGHJ4*01      -----
X86355 IGHJ4*02      -----
M25625 IGHJ4*03      -g-----

```

Die für die Extensions-PCR verwendeten Primer:

5' Primer:

Intern: 5'-gga gtc ggg ccc agg act ggt gaa gcc ttc (ag) (gc)a gac cct gtc cct cac ctg cgc-3'
Extern: 5'-ggg ctt aag ggt gtc cag tgt cag (gc)tg cag ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg -3'

3'Primer:

5'-ggg gct agc tga gga gac ggt ggt gac cag ggt tcc ttg gcc-3'

3.3.4.4. Klonierung des Vk-Fragments in den Vektor pGmAc 116 TL CK

Das Leichtkettengenfragment an 5'-Ende vor Verlängerung:

```

<-----FR1-IMGT-----
Hm050710VK2      xxxxxxxxxxxxxxxxxxxcagctctccactctccctgtccgctcaccctggagagcccgccctcc
X63397 IGKV2-28*01 gatattgtgatgact-----c-----c-----c-----c-----c-----
X12691 IGKV2D-28*01 gatattgtgatgact-----c-----c-----c-----c-----c-----
X63400 IGKV2-18*01 (P) gatattgtgatgacc---a-----c-----c-----a-----c-----
X63395 IGKV2D-18*01 (P) gatattgtgatgacc---a-----c-----c-----a-----c-----
X59311 IGKV2D-40*01 gatattgtgatgacc---a-----c-----c-----c-----c-----

      <-----FR1-->  ___CDR1___ <----FR2---->  ___CDR2___ <-FR3-> <--J1-
Hm050710VK2      ...                ...                ...                ...                ...
X63397 IGKV2-28*01 ...                ...                ...                ...                ...
X12691 IGKV2D-28*01 ...                ...                ...                ...                ...
X63400 IGKV2-18*01 (P) ...                ...                ...                ...                ...
X63395 IGKV2D-18*01 (P) ...                ...                ...                ...                ...
X59311 IGKV2D-40*01 ...                ...                ...                ...                ...

      ----- J1 ----- >
Hm050710VK2      ttggccaagggaccaaggtggaaatcaaax
J00242 IGKJ1*01  --c-----c-----c-----c-----c-----c-----
J00242 IGKJ2*01  -----g-----c-----g-----c-----c-----
Z70260 IGKJ2*02  -----g-----c-----g-----c-----c-----
U95246 IGKJ2*03  -----g-----c-----g-----c-----c-----
Z46620 IGKJ2*04  -----g-----c-----g-----c-----c-----

```

VJ-Segment nach der Verlängerungs-PCR:

```

      PauI SP<-----FR1-IMGT-----
Hm0507/10VkMini7  gcgcgctgtgatattgtgatgactcagctctccactctccctgtccgctcaccctggagag
X63397 IGKV2-28*01 -----c-----c-----c-----c-----c-----
X12691 IGKV2D-28*01 -----c-----c-----c-----c-----c-----
X63400 IGKV2-18*01 (P) -----c---a-----c-----c-----a-----c-----
X63395 IGKV2D-18*01 (P) -----c---a-----c-----c-----a-----c-----
X59311 IGKV2D-40*01 -----c---a-----c-----c-----c-----c-----

      <-----FR1-->  ___CDR1___ <----FR2---->  ___CDR2___ <-FR3-> <--J1-
Hm050710VK2      ...                ...                ...                ...                ...
X63397 IGKV2-28*01 ...                ...                ...                ...                ...
X12691 IGKV2D-28*01 ...                ...                ...                ...                ...
X63400 IGKV2-18*01 (P) ...                ...                ...                ...                ...
X63395 IGKV2D-18*01 (P) ...                ...                ...                ...                ...
X59311 IGKV2D-40*01 ...                ...                ...                ...                ...

      ----- J1 ----- >Pfl123II
Hm0507/10VkMini7  ttggccaagggaccaaggtggaaatcaaactgacg
J00242 IGKJ1*01  --c-----c-----c-----c-----c-----c-----
J00242 IGKJ2*01  -----g-----c-----g-----c-----c-----
Z70260 IGKJ2*02  -----g-----c-----g-----c-----c-----
U95246 IGKJ2*03  -----g-----c-----g-----c-----c-----
Z46620 IGKJ2*04  -----g-----c-----g-----c-----c-----

```

Die für die Extensions-PCR verwendeten Primer:

5' Primer:

5'-GGG GGC GCG CTG TGA TAT TGT GAT GAC TCA GTC TCC ACT CTC CCT GTC C-3'

3'Primer (invers und komplementär):

5'-GGG GCG TAC GTT TGA TTT CCA CCT TGG TCC CTT G-3'

Auf gleiche Weise wurden die VH- und Vk-Segmente der Zellen Scu0107/36, Scu0107/58, St245 und St140 verlängert und in die Vektoren kloniert.

Verdau

Nach der Verlängerung wurden die Sequenzen und die Vektoren mit den jeweils entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Der Restriktionsverdau fand in zwei Schritten statt, da die verwendeten Restriktionsenzyme unterschiedliche optimale Pufferkonzentrationen hatten.

Die verlängerten variablen Schwerekettensegmente und der Vektor pVT119Lcy1 wurden wie folgt verdaut:

2 µl Midi-Vektor DNA bzw. geringer konzentrierte Mini-DNA

+9 µl Yellow-Tango Puffer

+1,5 µl *NheI*

+77 µl H₂O

= 90 µl

→2h bei 37° C inkubieren, 20 min: 65° C dann

+13 µl Yellow-Tango Puffer

+2 µl *AflI*

+5 µl H₂O

= 110 µl

→3 h bei 37° C inkubieren, dann 20 min bei 65° C

Analog hierzu fand der Verdau der verlängerten Leichtkettengenfragmente an den angehängten Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme *PauI* und *Pfl23II* statt. Dieser Verdau wurde auch aufgrund unterschiedlicher optimaler Pufferbedingungen der zwei verwendeten Enzyme in zwei Schritten durchgeführt.

Die Produkte der Verdau (DNA der verdauten Leicht/Schwerkettengene und Vektoren) wurden über ein Präparationsgel und eine anschließende Säulenaufreinigung isoliert. Es war wichtig, bei der Aufreinigung der verdauten Vektoren ein 1% Agarosegel zu verwenden. Die so aufgereinigten Vektoren ließen sich besser ligieren als die über ein 2% Gel aufgereinigten.

Ligation

Nach dem Verdau mit den erwähnten Restriktionsenzymen wurden die V-Segmente in vorbestimmter Richtung in die Transfervektoren kloniert, da für jeden Vektor zwei verschiedene Restriktionsenzyme aus der Polyklonierungsstelle verwendet wurden. Ligiert wurde mit einer gängigen T4-Ligase für 12 h bei 16° C. Für jede Ligationsreaktion wurde auch eine Negativkontrolle, d.h. Vektor ohne Insert, angesetzt. Nach der Ligationsreaktion wurden mit den Ligationsprodukten kompetente DH5 α -Zellen transformiert. Dazu wurden auf Eis zu je 80 μ l Bakteriensuspensionen je 20 μ l der Ligationsprodukte für 20 min inkubiert. Dann wurde für 45 sec ein Hitzeschock bei 42° C im Wärmebad durchgeführt, anschließend wurde auf Eis je 500 μ l SOC- Medium hinzugegeben. Danach wurden die Bakterien für 1 h auf dem Schüttler bei 37° C inkubiert und auf LB-Agar-Schalen ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37° C inkubiert. Am nächsten Tag wurden Bakterienkulturen gepickt, die jeweils in 2 ml LB-Amp bei 37° C schüttelnd für 12 h kultiviert wurden. Anschließend wurde die TENS-Methode angewandt, um die Plasmide-DNA aus den Zellen zu isolieren.

Insertionskontrolle durch Probeverdau und Sequenzierung

Der Probeverdau der Minis mit den Plasmiden, die möglicherweise Schwerketten bzw. Leichtketten enthielten, wurde mit den Enzymen *Nco* I und *Nhe* I bzw. *Nco* I und *Pfl* 23 II durchgeführt. Mini-Präparationen, bei denen Insertionskontrollen positiv waren, wurden über die Säule aufgereinigt und mit den entsprechenden Primern zur Sequenzierung zum Labor für Immunologie und Genetik nach Kaiserslautern geschickt. Die Sequenzen wurden mit IMGT-V-Quest, NCBI-Blast 2 sequences und Expsy ausgewertet. So wurde die korrekte Insertion in den Vektor kontrolliert, mögliche neu entstandene Mutationen wurden aufgespürt, und die Produktivität der Sequenz überprüft.

MIDI-Präps

Mit den Bakterien mit überprüfter korrekter Insertion wurden 50 ml LB-Amp in einem Erlenmayer-Kolben angeimpft, über Nacht unter Schütteln bei 37° C kultiviert und dann MIDI-Präps angefertigt.

Linearisation der Vektoren

Die Vektoren wurden mit Not I verdaut, danach aufgereinigt und in 70% Alkohol zur Baculovirus-Kotransfektion konserviert.

3.3.4.5. Kotransfektion der SF9-Zellen

Die Virus- und Plasmid-DNA wurden mittels Lipofection in die SF9-Zellen transfiziert. Die Liposomen wurden durch die Interaktion des Transfektionsreagenz DOTAP mit der DNA des Wildtyp-Baculovirus und der DNA der rekombinanten Transfervektoren erzeugt. Zuvor wurde die Wildtyp-Baculovirus-DNA und die DNA der rekombinanten Transfervektoren in 70% Alkohol sterilisiert. Etwa eine Stunde vor der Kotransfektion wurden aus zu 80 bis 90% konfluent mit SF9-Zellen bewachsenen 25 cm²-Zellkulturflaschen der Überstand entnommen. Die Zellen wurden mit 8 ml frischen SF9-Medium ohne FCS resuspendiert. Mit je 4 ml dieser Suspension wurden frische 25 cm²-Zellkulturflaschen inokuliert und dann zur Zelladhäsion 1 h bei 28° C inkubiert. Dann wurden in einem 15-ml-Röhrchen 1,5 ml SF9-Zellmedium ohne FCS mit 40 µl DOTAP gemischt. In einem Cryotube wurden 0,5 bis 1 µg Wildtyp-Baculovirus und je 5 µg der Transfervektoren in 1,5 ml SF9-Zellmedium ohne FCS aufgenommen. Beide Lösungen wurden in 15-ml-Tubes sorgfältig miteinander gemischt.

Sobald die SF9-Zellen adhärent waren, wurde der Zellkulturüberstand entnommen, verworfen und stattdessen die Mischung aus DOTAP, Wildtyp-Baculovirus-DNA und Transfervektoren-DNA hinzugefügt und für 4 h bei 28° C inkubiert. Danach wurde das Transfektionsmedium vorsichtig entnommen und mit 4 ml SF9-Medium mit FCS ersetzt.

3.3.4.6. Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Kammer

Die Zellzahlbestimmung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer mit Trypanblau, einem Farbstoff, der spezifisch tote Zellen blau anfärbt. Hierfür wurden je 20 µl der Zellsuspensionen 1:1 mit 20 µl Trypanblaulösung (0,5%) vermischt und die lebenden Zellen unter dem Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung ausgezählt.

3.3.4.7. Lytische Plaque-Assays

Zur Isolierung einzelner rekombinanter Virusklone wurde der von Brown und Faulkner (1977) entwickelte lytische-Plaque Assay verwendet:

1. Vorbereitung der Agarose für die Kavitäten einer 6-well-Platte: In 20 ml destilliertem Wasser wurden 0,8 g Agarose gelöst und dann autoklaviert. Die Flasche mit der Agarose wurde anschließend in einem Wärmebad konstant bei 42° C gehalten. Kurz vor der Verwendung wurden 54 ml Zellkulturmedium hinzugegeben.
2. Vorbereitung der SF9-Zellen: SF9-Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase wurden 5 min bei 1500 min⁻¹ abzentrifugiert und die pelletierten Zellen mit 10 ml frischem Zellmedium resuspendiert. Nach Zählen der Zellen in der Neubauer-Kammer wurden je 5x10⁵ SF9-Zellen in einem Volumen von 2 ml TC100-Medium + 10 % FCS pro Kavität einer 6-well pipettiert und zwei Stunden bei 27° C zum Adherieren stehen gelassen.
3. Virustitration: Es wird eine geometrische Verdünnungsreihe in 10 er Schritten durchgeführt.
Dilution 10⁻¹: 1 ml des Kulturmediums + 0,1 ml der viralen Zellsuspension
Dilution 10⁻²: 4 ml des Kulturmediums + 0,4 ml der viralen Zellsuspension 10⁻¹
Dilution 10⁻³: 4 ml des Kulturmediums + 0,4 ml der viralen Zellsuspension 10⁻²
Dilution 10⁻⁴: 4 ml des Kulturmediums + 0,4 ml der viralen Zellsuspension 10⁻³
Dilution 10⁻⁵: 4 ml des Kulturmediums + 0,4 ml der viralen Zellsuspension 10⁻⁴
Dilution 10⁻⁶: 4 ml des Kulturmediums + 0,4 ml der viralen Zellsuspension 10⁻⁵
Dilution 10⁻⁷: 4 ml des Kulturmediums + 0,4 ml der viralen Zellsuspension 10⁻⁶
4. Infektion der Zellen
Nachdem die Zellen korrekt adhärirt waren, wurde der Überstand vorsichtig seitlich aspiriert und verworfen. Die Zellrasen wurden jeweils mit 0,5 ml einer der Virusverdünnungsstufen beimpft und dann zur Adsorption der Viren für 1½ h bei 27° C inkubiert.
5. Die Zellrasen wurden jeweils mit 2 ml einer auf 40° C temperierten Agarose überschichtet, ohne eine Ablösung der Zellen zu verursachen. Der Agarosebelag verhindert die Ausbreitung der Viren über das Zellmedium, so dass sich die Viren nur über Infektion von Zelle zu Zelle ausbreiten können.

Hatte sich die Agarose verfestigt, wurden die Platten mit Parafilm versiegelt und für 4 - 6 Tage bei 27° C inkubiert.

6. Färbung mit Neutralrot (Lebendfärbung)

Nach 4 - 6 Tagen wurden die Überstände abgesaugt und dafür je 0,5 ml des Lebendfarbstoffes Neutral-Rot (0,05% im Medium) hinzupipettiert. Nach 30 min Kontaktzeit wurde die Neutral-Rot-Lösung wieder entfernt, die Platten in Alufolie eingewickelt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Neutral-Rot-Lösung färbt selektiv lebende Zellen an, so dass an weißen Stellen entweder überhaupt keine Zellen oder durch einen Virusklon abgetötete Zellen waren. Daher wurden die lytischen Plaques erst unter dem Mikroskop inspiziert, bevor mit Hilfe einer Pasteur-Pipette aspiriert wurde. Das Aspirat wurde in 1 ml Medium vermischt und bei 4° C gelagert. Zusätzlich kann der lytische Plaque-Assay zur Bestimmung der Plaque Forming Units (PFU), einer Einheit, die die Anzahl an vermehrungsfähigen Viren wiedergibt, genutzt werden:

Titer der Ausgangslösung (PFU/ml) = Anzahl der Plaques in der Kavität pro Verdünnungsfaktor

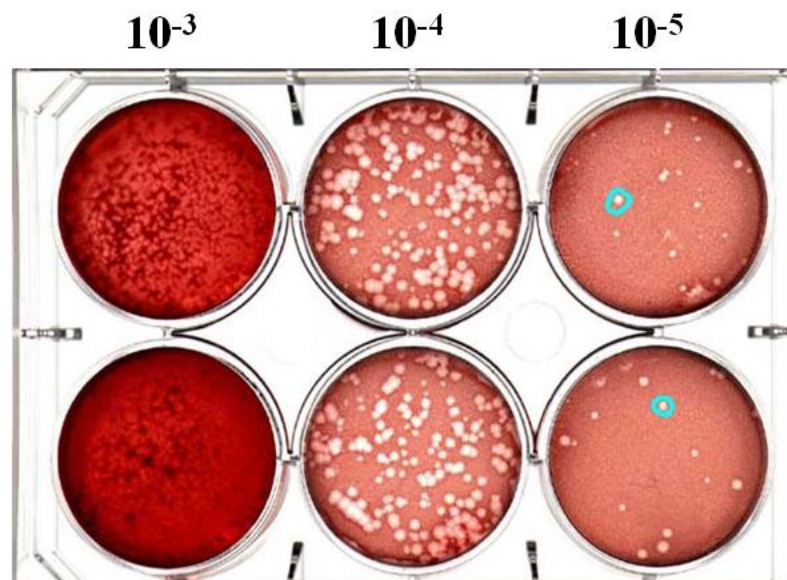


Abb. 6: Lytischer Plaque-Assay: 6-well-Platte mit SF9-Zellen nach Neutral-Rot-Färbung. 4 bis 6 Tage zuvor Infektion mit Baculoviren in Verdünnungsstufen von 10^{-3} bis 10^{-5} . Aus den Kavitäten mit höherer Verdünnungsstufe (10^{-5}) konnten aus isolierten Plaques (blau umrandet) nach mikroskopischer Kontrolle monoklonale Baculoviren isoliert werden.

7. Erste Amplifikation der isolierten Virusklone

Nachdem 10^6 Zellen in einer 25-ml-Zellkulturflasche adhärent waren, wurde das Zellmedium aspiriert und verworfen. Die Zellen wurden dann für 2 Stunden mit 0,2 ml einer Virusklonssuspension und 1 ml Zellmedium bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden weitere 4 ml Zellmedium zupipettiert und die Zellkulturflaschen in einem Brutschrank bei 27°C für 4 bis 6 Tage inkubiert. Der Zellüberstand wurde 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert und bei 4°C aufbewahrt.

8. Insertionsnachweis der VH- und Vk-Gene im Baculovirusgenom

Die korrekte Insertion der VH- und Vk-Gene korrekt in das Baculovirusgenom wurde einerseits indirekt nachgewiesen, indem der Insektenzell-Überstand mit einem quantitativen Immunoassay auf die Expressionsprodukte, d.h. die Schwer- und die Leichtketten bzw. miteinander assembliert, zu kompletten humanen IgG1 untersucht wurde (Coating: anti-human-Fc, Detektion: anti-human-kappa). Zum anderen wurde eine direkte Kontroll-PCR mit vektorständigen Primern auf die virale Baculo-DNA durchgeführt. Dazu musste die virale DNA isoliert werden, indem je 3 ml der Insektenzellüberstände für 1 h bei $35000\text{ Umdrehungen min}^{-1}$ in einer Beckmann-Ultrazentrifuge mit einem Sw60-Rotor ultrazentrifugiert wurden. Anschließend wurden die Pellets mit 300 μl TEK Puffer resuspendiert und nach Zugabe von je 6 μl Proteinase K (10 mg/ml) und 15 μl Sarcosyl über Nacht bei 50°C in einem Wasserbad inkubiert. Am nächsten Tag folgte ein 30 min dauernder RNase-Verdau bei 37°C (je 16 μl RNase A (5 mg/ml)). Darauf folgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Präzipitation in 2 Volumen absolutem Ethanol, Waschen in 1 ml 70% Ethanol, Verwerfen des Ethanols, Lufttrocknen und Resuspendieren des Pellets in 20 μl a.dest. Die Größe des PCR-Produktes zeigte, ob die Insertionen erfolgreich gewesen waren oder ob es sich um ein Wildtyp-Baculovirusgenom handelte.

3.3.4.8. Affinitätschromatographie: Antikörperaufreinigung

Die Affinitätschromatographie ist ein häufig verwendetes Verfahren zur Antikörperaufreinigung, das Reinheiten von bis zu 99% und Ausbeuten von 10 bis 50% gewährleistet. Das Prinzip beruht auf einer Ligandengelmatrix, die Antikörper spezifisch und reversibel bindet. Als Liganden werden typischerweise rekombinante

und modifizierte Formen des vom *Staphylococcus aureus* abstammenden Protein A (42 kDa) oder des von *Streptococcus* abstammenden Protein G verwendet. Protein A bindet spezifisch und reversibel am Fc-Teil menschlicher Immunglobuline der Klassen IgG1, IgG2 und IgG4. Protein G bindet zusätzlich Antikörper der Klasse IgG3.

Arbeitsschritte der Affinitätschromatographie mit der Protein-A-Säule:

1. Präparation des Überstandes

- Abgenommene Insektenzellüberstände wurden 5 min bei 1300 min^{-1} abzentrifugiert;
- Der Überstand wurde von groben Partikeln mittels eines Filters mit $0,45 \mu\text{m}$ Poren befreit;
- Das Filtrat des Überstandes wurde auf pH 8 eingestellt, dann wurde 10xPBS zugegeben und der pH wieder auf 7,8 bis 8 eingestellt.

2. Äquilibrierung der Säule

- 20mM Tris (pH 8,0)

3. Laden der Säule

- Waschen mit 6 Bettvolumen 20 mM Tris (pH 8,0)
- Waschen mit 10 Bettvolumen 20 mM Glycin (pH 5,0)

4. Eluation der Antikörper

- 3-5 Bettvolumen 0,1 M Glycin (pH 2,5)

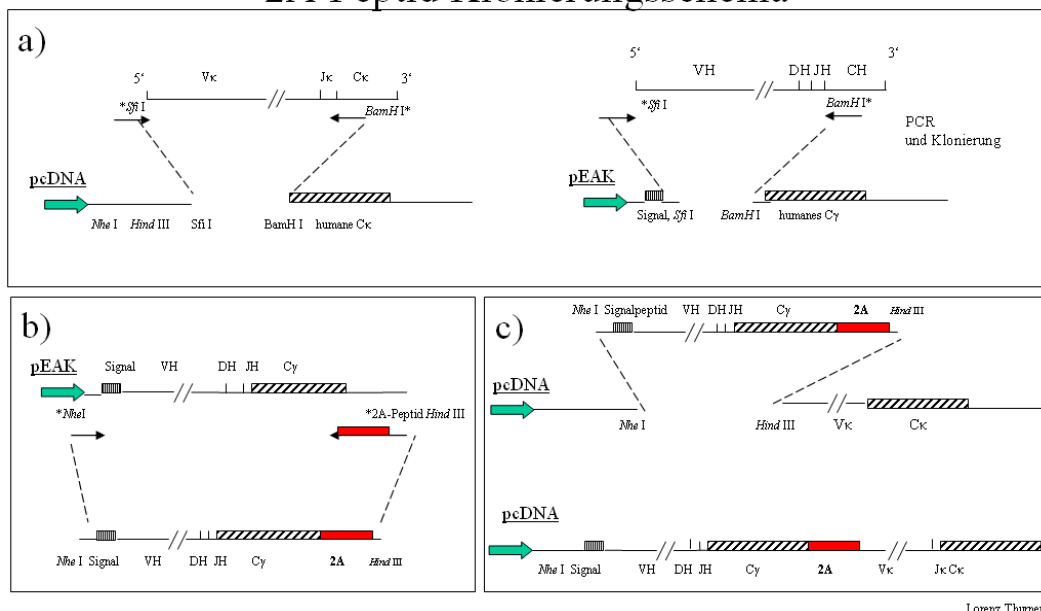
3.3.4.9. Expression von mAbs mithilfe des 2A-Peptid-Fragments in HEK 293

2A-Peptide oder 2A-artige-Peptide sind u.a. Bestandteile von Picornaviren, wie etwa dem Maul- und Klauenseuche-Virus (FMDV). Sie zeichnen sich durch eine extrem selten vorkommende, etwa 20 Aminosäuren lange Polypeptidsequenz aus. Während der Translation am ribosomalen Komplex kommt es zwischen den aufeinanderfolgenden Aminosäuren Glycin und Prolin zu einem Bruch in ein 2A- und ein 2B-Stück. Diese Eigenschaft der 2A-Sequenz wird als selbstspaltend oder autoproteolytisch beschrieben (De Felipe et al., 2004 und Radcliffe et al., 2004).

Die 2A-Peptid-Fragmente sind für den molekularbiologischen Einsatz *in vitro* und *in vivo* als Alternativen zu multicistronischen Vektoren anzusehen. Multicistronische Systeme wie Internal Ribosome Entry Sites (IRES) oder der Einsatz weiterer Promotoren können den Nachteil haben, dass die verschiedenen Produkte

unterschiedlich stark exprimiert werden. Die erfolgreiche in-vivo-Synthese des T-Zell-Rezeptor-Komplexes (TCR:CD3), bestehend aus 6 Proteinen (TCR α , und TCR β sowie CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ und CD3 ζ) mithilfe von 2 retroviralen Vektoren und 2A-artigen-Sequenzen in Knockoutmäusen zeigte eindrucksvoll die Einsetzbarkeit für immunologische Fragestellungen (Szymczak et al., 2004). Das 2A-Peptid kann auch genutzt werden, um ein Reportergen in gleichen Mengen wie das Gen von Interesse exprimieren zu lassen. Fang et al. verwendeten die 2A-Sequenz erfolgreich zur Biosynthese von mAbs. Ein Expressionsvektor mit einem zugehörigen offenen Leserahmen, in den die kompletten Schwer- und Leichtkettengene mit einer dazwischen liegenden 2A-Sequenz eingefügt worden waren, führte in einer HEK-293-Zelllinie zu einem äquimolaren Expressionsverhältnis der Schwer- zu Leichtkettengenen von 1:1 und einer stabilen Biosynthese von funktionellen mAbs (Fang et al., 2005). Die Expression funktioneller mAbs gelang auch in vivo mithilfe eines retroviralen Vektors. Ein Vorteil dieser Methode gegenüber dem Baculovirusexpressionssystem liegt in den identischen Mechanismen der posttranslationalen Modifizierung, des Protein-Processings und der Sekretion der synthetisierten rekombinanten mAbs.

2A-Peptid Klonierungsschema



Lorenz Thurner

Abb. 7: 2A-Peptid-Klonierungsschema: a) links: Anhängen der *Sfi* I und *Bam*H I-Schnittstellen an die Leichtkettenvariable und Klonierung dieser in einen pcDNA-Vektor, der bereits ein Leichtkettenkonstantengen enthält. rechts: Anhängen der *Sfi* I und *Bam*H I Restriktionsschnittstellen an V_H. Dann Klonierung in einen pEAK-Vektor, der ein Signalpeptid und eine Schwerkettenkonstante enthält. b) Der pEAK-Vektor mit eingefügten V_H dient als Ausgangs-DNA für eine Extensions-PCR. Es wurde die ca. 1,5 Kbp große Sequenz, bestehend aus Signalpeptid, V_H und CH amplifiziert. 5' wurde eine *Nhe* I site und

3' eine 2A-Sequenz sowie eine *Hind* III-site angehängen. c) Klonierung des Extensions-PCR-Produktes über *Nhe* I und *Hind* III in den pcDNA-Vektor.

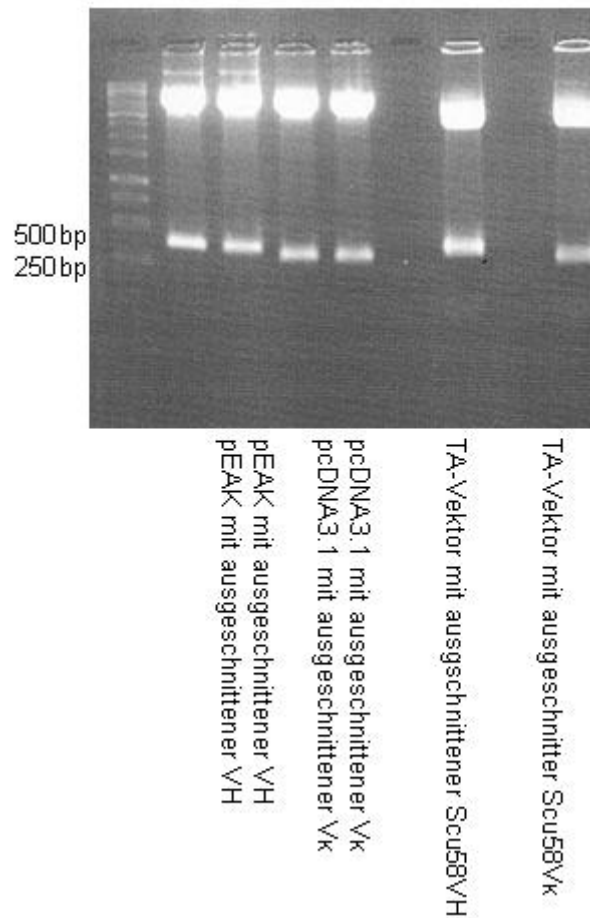


Abb.8: Restriktionsenzymverdau des Scu58 Schwer- und Leichtkettengens aus dem TA-Vektor. In der Spalte rechts außen ist die Bande der Leichtkette von Scu58 zu erkennen. Eine Spalte weiter innen ist die Bande der Schwerkette von Scu58 dargestellt. Zudem ist die Bande des TA-Vektors mit deutlich höherem Molekulargewicht identifizierbar. Links sind Banden des pEAK- und des pcDNA3.1-Vektors zu sehen, aus denen zur Vorbereitung für die weiteren Klonierungsschritte andere Schwer- und Leichtkettengene herausgeschnitten wurden.

Die *V_k*-Segmente wurden über *Sfi* I und *Bam*H I in einen modifizierten pCDNA-Vektor kloniert, der schon eine *C_k*-Sequenz enthielt. Aus diesem wurde ein anderes *V_k*-Segment herausgeschnitten. Parallel dazu wurden die *V_H*-Segmente in einen modifizierten pEAK-Vektor kloniert, der schon eine *CH*-Sequenz enthielt. Aus diesem wurde ein anderes *V_H*-Segment geschnitten. Durch Kontroll-PCRs mit spezifischen Primern wurden die Ligationsprodukte auf eine korrekte Insertion der *V_H*- bzw. *V_k*-Fragmente untersucht (Abb. 9).

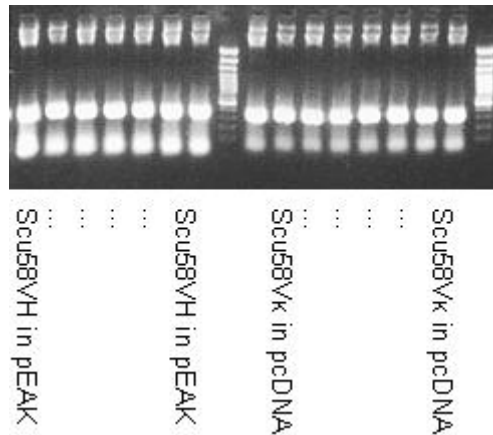


Abb.9: Kontroll-PCR der korrekten Insertion von Scu58VH in den pEAK-Vektor und von Scu58VK in den pcDNA-Vektor: PCRs auf die Ligationsprodukte mit spezifischen Primern für Scu58VH (links) und für Scu58VK (rechts) bestätigten die korrekte Insertion in den pEAK bzw. den pcDNA-Vektor.

Der pEAK-Vektor mit VH und CH diente als Template für eine Verlängerungs-PCR. Hierbei wurde an das zusammenhängende VDJ-Ch-Segment 5' eine *Nhe I*-Erkennungssequenz angehängt und an 3' eine 2A-Sequenz sowie eine *Hind III*-Schnittstelle. Diese PCR mit einer erwarteten Produktgröße von 1,5 Kbp (Abb.10) führten wir unter folgenden Bedingungen durch:

- a*. 12 min 95° C
 - a. 30 sec 95° C
 - b. 30 sec 54° C
 - c. 2 min 72° C
- } 35 Zyklen

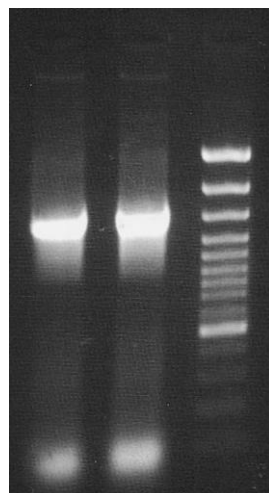


Abb. 10: Extensions-PCR zur Verlängerung des VDJ-Ch-Segments um die 2A-Sequenz. Die beiden 1,5Kbp großen Banden entsprechen dem Produkt der Extensions-PCR, also dem VDJ-Ch-Segment mit 3' angehängter 2A-Sequenz.

Da die annealing-Temperatur relativ niedrig lag und die PCR mit hoher Zyklenzahl durchgeführt worden ist, wurden die PCR-Produkte nach Zwischenklonierung in pTOPO-TA sequenziert, um Mutationen auszuschließen.

Das komplette Schwerkettengen (VDJ+Cy1) mit dem 2A-Sequenz-Anhängsel wurde nun über *Nhe* I und *Hind* III (Abb.11) vor das Leichtkettengen in den pcDNA-Vektor kloniert.

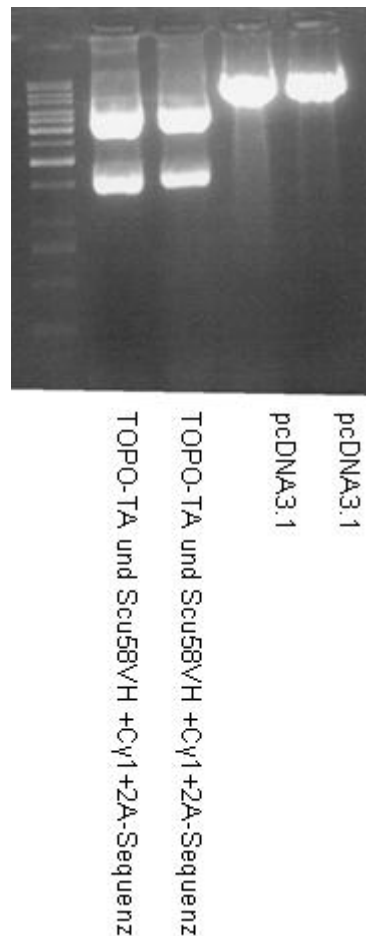


Abb. 11: Vorbereitender Restriktionsverdau zur Klonierung des um die 2A-Sequenz verlängerten VDJ-Ch-Fragmentes vor das Vk-Segment im pcDNA-Vektor. In den Spalten links sind die Banden des TOPO-TA-Vektors und des Fragmentes aus Scu58VDJ-Cy1+2A erkennbar. Die Banden in den rechten Spalten entsprechen dem pcDNA3.1-Vektor. Verwendete Restriktionsenzyme: *Nhe* I und *Hind* III

Wie Abb. 7 zeigt, wurde das resultierende PCR-Produkt vor das Leichtkettengen in den pCDNA-Vektor kloniert. Anschließend wurde eine Probedigestion mit *Nhe* I und *Hind* III durchgeführt. Der pcDNA-Vektor enthielt vor der Ligation weder eine VH-, noch eine CH- oder eine 2A-Sequenz. Der Probeverdau zeigte ein 1,5 kbp großes Restriktionsfragment, was dem VH+CH+2A-Segment entsprach. Dies bestätigte die

korrekte Insertion (Abb.12). Diese wurde weiterhin durch eine anschließende Sequenzierung bestätigt.

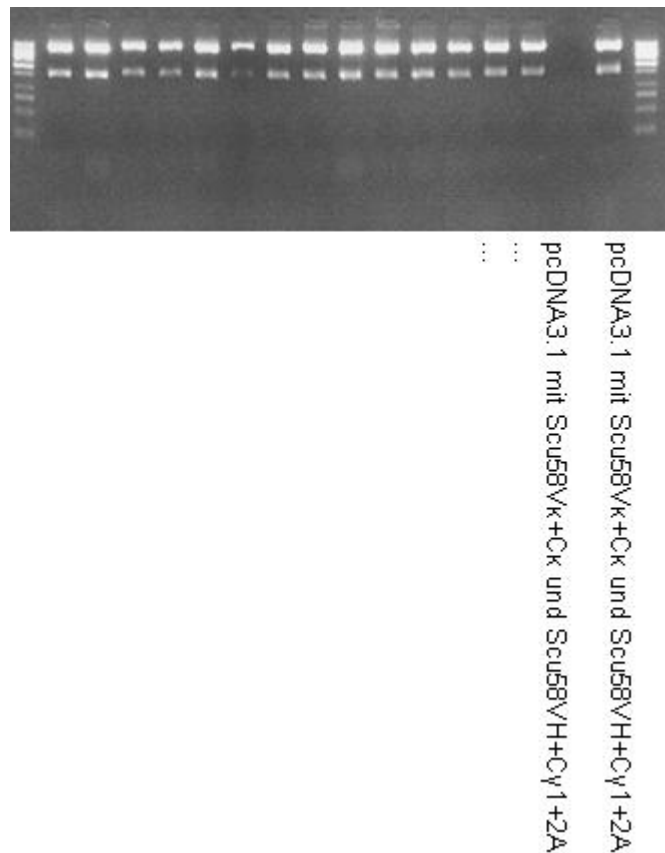


Abb. 12: Restriktionsverdau zur Insertionskontrolle von Scu58VH+Ch+2A in den pcDNA-Vektor. Banden des pcDNA-Vektors und des 1,5 Kbp großen VH+Ch+2A-Segmentes

3.3.5. Immunologische und proteinchemische Methodik

3.3.5.1. ELISA - Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Der ELISA ist der gängigste quantitative Immunoassay. Als Fänger wurden Antikörper oder synthetische Peptide in einer Konzentration von 10 µg/ml in PBS verdünnt. Je Loch der hochadsorbierenden 96-Loch-Platte wurden 100 µl hinzupipettiert. Sodann wurden sie für 1h bei 37° C inkubiert. Die freien unspezifischen Bindungsstellen wurden durch Zugabe von 200 µl 3% BSA in PBS und 30 min Inkubation bei 37° C geblockt. Die Platten wurden dreimal mit PBS 0,1% Tween 20 (pH 8) und zweimal mit einfach PBS gewaschen. Von den in PBS zu einer Konzentration von 10 µg/ml verdünnten Proben wurden je well 100 µl zupipettiert und für 1 h bei 37° C inkubiert. Der Waschschrift wurde wiederholt, und dann wurden die Platten mit den jeweiligen sekundären und tertiären Antikörpern zur Detektion inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde durch Zugabe des TMB-

Substrates die enzymatische Reaktion gestartet und nach 5 - 10 min mit Stopplösung beendet. Die Platten wurden bei 450 nm ausgewertet.

3.3.5.2. Direkter ELISA mit rekombinanter PR3

Die Proteinase3 wurde als Fängerantigen auf die Festphase gecoatet/immobilisiert. In dieser Studie wurden direkte ELISA durchgeführt, bei denen mit einer rekombinant synthetisierten Proteinase3 gecoatet wurde. Andererseits wurden auch ELISA-Festphasen der Klinischen Routine verwendet, auf denen sich schon die Proteinase3 befand (PR3-Routine-Kit, Varelista, Freiburg im Breisgau).

3.3.5.3. Sandwich-ELISA

Anstatt des Fängerantigens wird mit Fängerantikörpern an der Festphase gecoatet. Nach Blocken mit BSA, einem Waschschrift, Inkubation mit den Proben, einem weiteren Waschschrift und Inkubation mit dem enzymgekoppelten Detektionsantikörper, befindet sich die Probe bei vorhandener Affinität zwischen Fängerantikörper und Detektionsantikörper. In dieser Studie setzten wir Sandwich-ELISA ein, um die produzierten rek. mAbs näher zu untersuchen. Zur Charakterisierung der IgG-Subklassen der produzierten Antikörper coateten wir mit Schaf-anti-human-IgG1 bis IgG4. Nach Waschschriften, der Inkubation der Proben und erneuten Waschschriften setzten wir sekundär mouse-anti-human- κ und tertiär rabbit-anti-mouse-IgG/HRP ein. Zur Charakterisierung der Leichtkettenzugehörigkeit coateten wir mit rabbit-anti-human- κ oder rabbit-anti-human- λ , sekundär verwendeten wir Peroxidase gekoppelte goat-anti-human-Fc-Antikörper. Zudem untersuchten wir nach dem lytischen Plaque-Assay die neuen Insektenzellüberstände mit einem Sandwich-ELISA (Coating mit a-h-Fcdy, Detektion a-h-k/HRP) auf die Expression von kompletten mAbs.

3.3.5.4. Natrium Dodecyl Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE trennt Proteine nach ihrer Molekularmasse auf, da das hydrophobische anionische SDS die Eigenladung der Proteine überdeckt und Strukturen auflöst, die u.a. auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhen, d.h. Quartär- und Tertiärstrukturen. Acrylamidmonomere (neurotoxisch) bilden mit N,N'-Methylenbisacrylamiden ein dreidimensionales Netz. Bei angelegter Spannung migrieren die Proteine umso schneller durch die Maschen des Netzes, desto kleiner

sie sind. Auf diese Weise werden Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Polymerisation der Acrylamidmonomere wird durch Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) katalysiert.

3.3.5.5. Diskontinuierliche SDS-PAGE

Die SDS-PAGE wurde in einem diskontinuierlichen Tris-HCl/Glycin-Puffersystem nach Lämmli (1979) unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Die Proteinproben werden in dem Sammelgel (stacking gel) fokussiert, so dass sie weitgehend synchron in das Trenngel eintreten und schärfere Proteinbanden erzielt werden können.

Tab. 3: Sammelgelansatz

	stacking gel
H ₂ O	2,1 ml
30% Acrylamide	0,5 ml
1,0% M Tris (ph 6.8)	0,38 ml
10% SDS	0,03 ml
10% APS	0,03 ml
TEMED	0,003 ml

3 ml Ansatz für 2 Sammelgele (stacking gel)

Tab.4: Separationsgelansatz

	8%	10%	12%
H ₂ O	4,6 ml	4 ml	3,3 ml
30% Acrylamide	2,7 ml	3,3 ml	4 ml
1,5% M Tris (ph 8.8)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
10% APS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	0,006 ml	0,004 ml	0,004 ml

10 ml Ansatz für 2 Trenngele (resolving, separation gel)

3.3.5.6. Probenvorbereitung:

Zur Untersuchung von in bakteriellen Expressionssystemen synthetisierten Proteinen zentrifugierten wir die Bakterienkulturen für 15 min bei 4° C mit 4000 min⁻¹ (800 g).

Anschließend resuspendierten wir das Pellet in Lysispuffer und inkubierten es 30 min auf Eis. Dann zentrifugierte man die Proben zur Trennung von Membran und Kernbruchstücken 30 min bei 3000 g und nahm anschließend den Überstand ab. Die Proteinkonzentration konnte photometrisch bestimmt werden. Proben aus den Insektenzellüberständen nahmen wir mit 5 x Probenpuffer auf und denaturierten sie 5 bis 10 min bei 95° C. Dem Probenpuffer fügten wir wahlweise β -Mercaptoethanol bei, was zur weiteren Reduktion der Disulfidbrücken beiträgt.

3.3.5.7. Elektrophorese

Zur Elektrophorese wurde für etwa 45 bis 60 min eine Spannung von 100 - 200 V in einer vertikalen Elektrophoresekammer in Lämmli-Puffer angelegt. (Biometra, Göttingen).

3.3.5.8. Coomassie-Gelfärbung:

Die SDS-Gele wurden für ca. 2 h mit Coomassie-Farbstoff angefärbt. Anschließend wurde mit Entfärberlösung inkubiert, um den Hintergrund zu minimieren. Die Coomassie-Färbung ist sensitiv ab Proteinbandenstärken von etwa 500 ng.

3.3.5.9. Semi-Dry Transfer:

Der in dieser Arbeit durchgeführte Proteintransfer vom SDS-Polyacrylamidgel auf PVDF-Membranen wurde nach der semi-dry-blot-Methode (nach Kyhse-Anderson 1984) durchgeführt. Für den Blot wurde auf die Platin-Anodenseite ein mit Transferpuffer vollgesogenes Biorad-Blotpapier gelegt. Hierauf wurde dann vorsichtig eine präparierte PVDF-Membran gelegt. Dann folgte das SDS-Polyacrylamidgel. Dieses wurde wieder mit einem in Transferpuffer getränkten Biorad-Blotpapier bedeckt. Durch anschließendes gleichmäßiges Überrollen des Blotstapels mit einem Stab wurden Luftblasen entfernt. Dann wurde die Edelstahl-Kathodenplatte aufgelegt und für 30 bis 40 min eine Gleichspannung von 25 V bei 150 mA angelegt. Für den Transfer wurden die PVDF-Membranen wie folgt präpariert: 15 sec in Methanol hydrophilisiert, dann 2 min in demineralisiertem Wasser und anschließend 5 min in Transferpuffer inkubiert.

3.3.5.10. Kontroll-Färbung mit Ponceau-S Rot

Nachdem der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran abgeschlossen war, wurde mit Ponceau-Lösung angefärbt. Hierbei war die Gesichtsseite der Blots nach oben gerichtet. Die prominenten Größenmarkerbanden wurden markiert und die Membran beschriftet. Der Ponceau-S-Farbstoff wurde anschließend mit a. dest ausgewaschen.

3.3.5.11. Trocknen der Membran

PVDF-Membranen wurden zum Trocknen 15 sec in 100% Methanol gelegt und anschließend 15 min an der Luft bei Raumtemperatur trocknen gelassen.

3.3.5.12. Blocken

Zur Blockierung freier Proteinbindungsstellen wurde mit 10% Magermilch-TBS oder 3% BSA-TBS inkubiert.

3.3.5.13. Immunologische Proteindetektion

Die geblotteten Proteine wurden mit den entsprechenden Primärantikörpern in 3% BSA-TBS oder 10% Magermilch-TBS für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten peroxidasemarkierten Sekundärantikörper inkubiert und abschließend folgte ein Waschschrift.

3.3.5.14. ECL - Enhanced Chemoluminescence

Die gebundenen peroxidasemarkierten Detektionsantikörper wurden mittels der „Enhanced Chemiluminescence“ nachgewiesen. Die ECL ist eine gängige und sehr sensitive Nachweismethode. Sie basiert auf einer enzymkatalysierten Lichtreaktion, bei der es zur Emission von Licht mit einem Maximum bei einer Wellenlänge von 428 nm kommt:

$\text{Luminol} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{erregtes 3-Aminophthalat} \rightarrow \text{3-Aminophthalat} + \text{Licht}$

Die PVDF-Membran wurde mit der Gesichtsseite nach oben zwischen 2 Folien in eine Filmkassette gelegt. Nach einminütiger Inkubationszeit der ECL-Reagenzien auf der PVDF-Membran wurde ein Bio-Max-Film in einer Dunkelkammer aufgelegt. Die

Belichtungszeiten wurden zwischen 30 sec. und 30 min Belichtungszeit gewählt. Anschließend wurde der Film in Entwicklerlösung gelegt, gewässert, fixiert, wieder gewässert und dann trocknen gelassen.

3.3.5.15. Immuno-Blots zur Affinitätstestung auf mikrobielle Antigene

Bei den mikrobiellen Lysaten, die freundlicherweise von dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Homburger Universitätsklinikums zur Verfügung gestellt wurden, handelte es sich im Einzelnen um Lysate von Staphylococcus aureus, Koagulase-negativen Staphylokokken, Streptococcus pneumoniae, Moraxella catarrhalis, Salmonella Typhimurium, Yersinia enterocolitica, Escherichia coli, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa und Candida Albicans. Um eine eventuelle Affinität der synthetisierten rekombinanten mAbs gegen diese Lysate zu testen, wurden Dot Blots angefertigt. Dazu wurden mithilfe einer Schablone die Lysate in einer Konzentration von 10 µg/ml auf eine PVDF-Membran aufgetragen. Anschließend wurden die Lysate durch einen von einer Wasserpumpe erzeugten Unterdruck in die PVDF-Membran gesogen. Die so behandelten PVDF-Membranen wurden über Nacht bei 4° C in 10% Magermilch-TBS geblockt. Am Folgetag wurden die Membranen 2x10 min in TBS-T und 2x10 min in TBS gewaschen, um dann mit den rekombinanten mAbs und Kontrollantikörpern in einer Konzentration von 10 µg/ml für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert zu werden. Nach einem weiteren Waschschrift wurde für 1 h mit biotiniliertem-anti-human-Fab (1/2500) bei Raumtemperatur inkubiert, dann erneut gewaschen und 20 min mit Streptavidin/AP (1/5000) inkubiert. Vor der Entwicklung wurde erneut eingehend gewaschen.

3.3.5.16. Zielantigensuche mithilfe eines (hEx1 und Unipex1) human fetal brain cDNA- und eines (Unipex2) T-Lymphozyten cDNA-Expressions Protein Arrays

Mithilfe der Anwendung eines Protein Arrays, einer nach strenger Anordnung auf eine Membran gespottete Proteinbank, können parallel große Mengen an Protein-Protein-Interaktionen bestimmt werden. Auf der weiteren Suche nach humanen Zielantigenen der synthetisierten mAbs verwendeten wir Protein-Arrays einer human fetal brain cDNA Expressionsbank (hEx1 und Unipex1) sowie einer T-Lymphozyten cDNA Expressionsbank (Unipex2). Diese Proteinarrays stammen vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD) und werden momentan von Imagenes vertrieben. Es handelt sich jeweils um Macroproteinarrays (Büssow et al.,

2000). 27648 Expressionsklone einer human fetal brain-cDNA Bank, bzw. 16128 Expressionsklone einer T-Lymphozyten-cDNA Bank sind im Duplikat nach einem genauen Muster auf einer PVDF-Membran angeordnet, so dass eine hohe Spezifität des Arrays erreicht wird. Die Proteine stammen von kompletten und verkürzten cDNA-Klonen, die in den Vektor pQE80LSN kloniert und in dem E.coli Stamm SCS1 exprimiert wurden.

So befinden sich insgesamt auf dem hEx1-Macroarray beispielsweise 55296 Proteine in genauer Anordnung auf einer 22 cm x 22 cm großen PVDF Membran. Nach Herstellerangaben wurde dies durch den Einsatz piezoelektronischer Spotting- und Kontakt-Druck-Technologien jeweils in Kombination mit in-Situ-Protein-Expression erreicht.

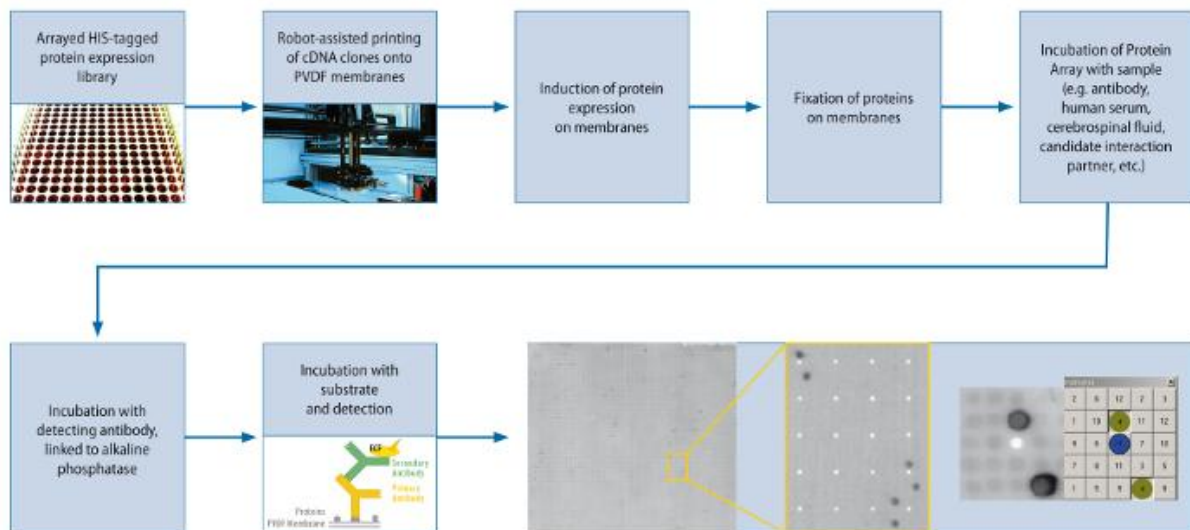


Abb. 13: Übersicht: Imagenes-Makro-Proteinarray. Übersicht über die Herstellung der Imagenes Protein Arrays und über den folgenden Prozess der Zielantigensuche (Herstellerinformationen).

3.3.5.16.1. Anwendung des Protein-Arrays

Erster Tag: Inkubation mit dem Primärantikörper

Der Protein-Array wurde bei Raumtemperatur mit 96% Ethanol angefeuchtet, dann mit ultrareinem Wasser gespült und anschließend 2x 10 min bei Raumtemperatur in TBS-T und 2x10 min in TBS gewaschen. Zum Blocken freier Proteinbindungsstellen wurde der Array über Nacht in 10% Magermilch-TBS bei 4° C inkubiert. Nach dem Blocken folgte ein Waschschrift: 2 x 10 min in TBS-T und 2 x 10 min in TBS. Dann wurden die synthetisierten rekombinanten mAbs Scu 36, Scu 58 und St 140 als Mischprobe in einer jeweiligen Konzentration von 10 µg/ml in TBS für 2 Stunden bei

Raumtemperatur auf dem Array inkubiert. Die Spezifität von einzelnen Antikörpern für vermeintliche Trefferproteinklone sollte in Folgeuntersuchungen bestimmt werden. Nach einem folgenden Waschschrift wurde sekundär mit einem biotiniliertem anti-human-Fab-Detektionsantikörper (1/2500) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurde 15 min mit Steptavidin/POX (1/15000) inkubiert. Zur Detektion setzten wir 50ml des ECL-Reagenz an, welches gleichmäßig auf die Membranoberfläche aufgetragen wurde. Die Membran wurde dann mit einer Folie bedeckt, auf die Filme aufgelegt wurden. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurden die Filme entwickelt.

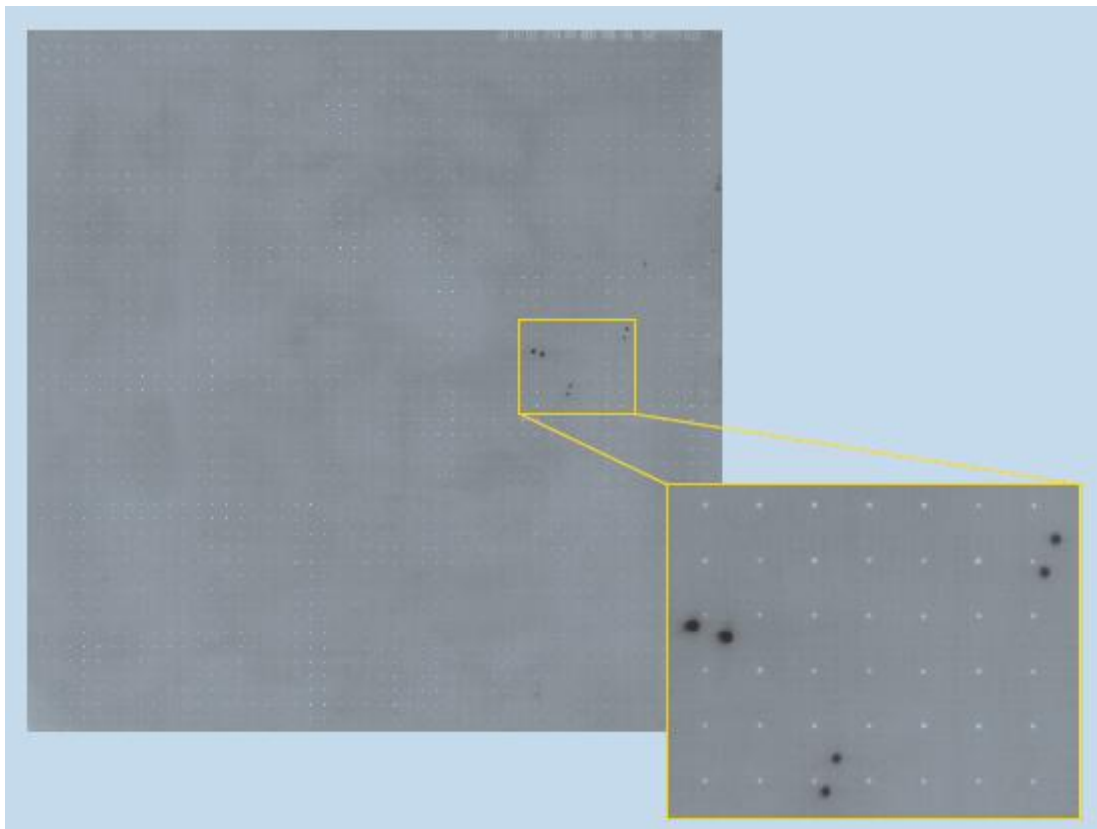


Abb. 14: Makroarray nach Inkubation mit mAbs. Im Gegensatz zur Inkubation mit Serum, fallen die seltenen Signalaare auf (Herstellerbeispiel).

3.3.5.16.2. Manuelles Auswerten des Protein-Arrays

Die Protein-Arrays wurden makroskopisch, d.h. ohne Analysesoftware ausgewertet. Die Proteine sind systematisch nach Koordinatensystemen auf die Membranen aufgetragen. Einem beliebigen Punkt auf einem entwickelten Film lassen sich so Koordinaten zuweisen, denen wiederum Proteinklone zugeordnet werden können. Das Koordinatensystem des quadratischen 22x22 cm großen hEx1-Protein Arrays hat beispielsweise auf der X- wie auf der Y-Achse jeweils 48 große Einheiten. Dadurch wird der Array in $48 \times 48 = 2304$ Quadrate unterteilt. Jedes dieser Quadrate

hat wiederum auf der X- und Y-Achse 5 Untereinheiten, die jeweils einem Punkt entsprechen. Ein Quadrat besteht also aus $5 \times 5 = 25$ Punkten. Der komplette hEx1-Array besteht somit theoretisch aus $48 \times 48 \times 5 \times 5 = 57600$ Punkten. Zentral in jedem der Quadrate befindet sich ein hell hervorgehobener Orientierungspunkt. Pro Quadrat sind in der Regel 12 Proteine im Duplikat nach 12 verschiedenen Mustern aufgetragen. Die Unipex-Makroarrays sind nach einem ähnlichen Prinzip aufgebaut, für sie gibt es jedoch nur noch vier Muster der Proteinanordnung pro Quadrat.

3.3.5.16.3. Bestimmung der Koordinaten:

Die entwickelten Filme wurden über eine Lichtquelle auf Auswertungs-Matrizen gelegt und so ausgerichtet, dass der Beginn der Koordinaten (1;1) in der linken oberen Ecke lag. Von jedem positiven Signalpaar wurden die Positionen der Punkte mit den Mustern verglichen.

Von übereinstimmenden positiven Signalpaaren wurden die (X;Y) Koordinaten des zugehörigen Quadrates bestimmt. Anschließend wurden in diesem Quadrat die Koordinaten-Untereinheiten beider Signale bestimmt ($x';y'$ für den ersten Punkt und $x'';y''$ für das Duplikat). Dann wurden die endgültigen (x;y) Koordinaten beider Signale beispielsweise für den hEx1-Array mit folgenden Gleichungen berechnet:

$$x_1 = 5(X - 1) + x' \quad x_2 = 5(X - 1) + x''$$

$$y_1 = 5(Y - 1) + y' \quad y_2 = 5(Y - 1) + y''$$

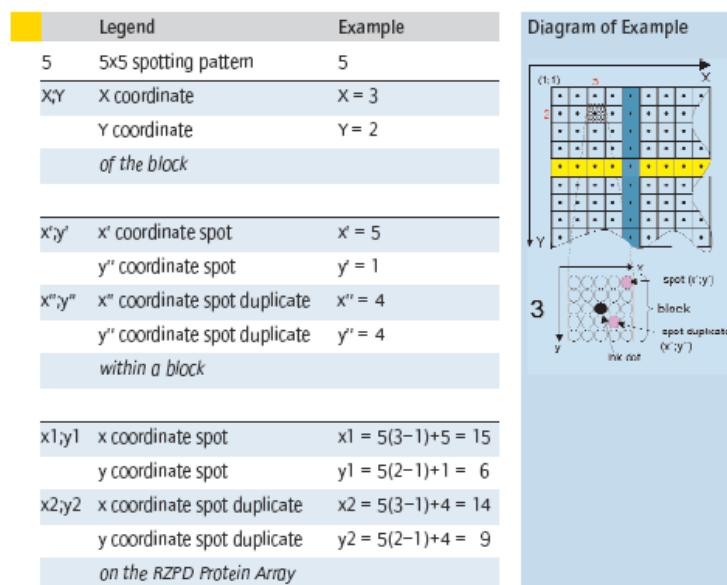


Abb. 15: Manuelles Auswerten des Protein-Arrays: Bestimmung der Signalpaar-Koordinaten. Zuerst Bestimmung der Koordinaten (X;Y) des zugehörigen Quadrates. Anschließend Bestimmung der Koordinaten-Untereinheiten ($x';y'$) ($x'';y''$) in diesem Quadrat.

3.3.5.16.4. Synthese der potentiell positiven Klone

Die errechneten Koordinaten wurden bei ImaGenes (Berlin), dem RZPD-Nachfolgeunternehmen eingereicht und den entsprechenden Proteinklonen zugeordnet.

Die cDNAs von fötalem menschlichem Gehirngewebe sind über *Not I* und *Sa II* in den pQE80LSN-Vektor kloniert. Die Klone sind N-terminal durch ein 6-His-tag markiert.

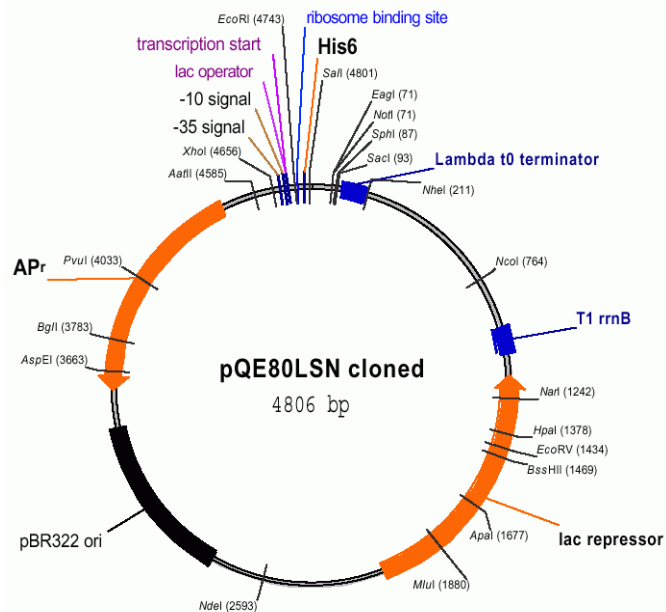


Abb. 16: pQE80LSN-Vektor. In diesem Expressionsvektor sind die cDNA-Sequenzen der auf dem Makroarray gespotteten Proteine über *Not I* und *Sa II* kloniert.

Die entsprechenden Proteinklone wurden uns von ImaGenes auf einem Agarmedium zugesandt, so dass mit Impfschlingen 2TY-Amp-Platten beimpft werden konnten, die dann über Nacht bei 37° C inkubiert wurden. Am Folgetag wurden einzelne Kolonien gepickt und kultiviert. Präparierte DNA wurde mit pQE80LSN forward und reverse-Primern sequenziert.

Zur Synthese der entsprechenden Proteine für Folgeuntersuchungen wurde 2TY-Medium mit Ampicillinzusatz 1 zu 100 mit einer frischen Übernachtskultur des Klons angeimpft und bei einer OD von 0,6 mit IPTG in einem Verhältnis von 1 zu 1000 induziert und dann für 4 h bei 37° C auf dem Schüttler inkubiert.

Anschließend wurde die Kultur für 15 min bei 4000 Umdrehungen/min zentrifugiert, und der Überstand abgegossen. Die Pellets wurden mit Lysispuffer resuspendiert, dann 20 min auf Eis inkubiert. Es folgten 30 min Zentrifugation bei 4° C und 13000 Umdrehungen/min. Der Überstand wurde abgenommen und bei -20° C gelagert.

4. Ergebnisse

4.1. Mutationsanalyse

Die zur Synthese der mAbs verwendeten Immunglobulin-VH-Vk-Genpaare wurden aus Biopsien endonasaler Wegener Granulome isoliert und stammten von drei verschiedenen WG-Manifestationen (siehe Material und Methodik). Während dieser Studie stand für das Baculovirusexpressionssystem nur ein Vektor für V_k-Leichtketten zur Verfügung, so dass alle VH-V_λ-Immunglobulingenpaare von einer mAb-Synthese ausgeschlossen werden mussten. Nach Vergleich der durch seminested PCR gewonnenen Immunglobulingene mit den Keimbahngenen dienten als weitere Auswahlkriterien zum einen der R/S-Quotient, das Verhältnis von Austausch (R) zu stillen (S) Mutationen in der CDR oder in der FR sowie zum anderen die Anzahl der Austauschmutationen in der CDR hin zu den sauren Aminosäuren Glutamat (E) und Aspartat (D).

Tab. 5: Mutationsanalyse der Variablen Regionen der synthetisierten mAbs

Sequenz	VH/VK Gen	Homologie	FR 1		CDR 1		FR2		CDR2		FR 3		Σ Mutationen in CDR	
			R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
Scu0107-36-VH4	4-31	96	1	0	0	0	0	0	1	1	6	0	1	1
Scu0107-36-VK1	1-16	97	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1
Scu0107-58-VH3	3-30	88	1	0	3	0	1	0	2	3	7	3	5	3
Scu0107-58-VK3	3-15	91					1	2	1	1	5	1	1	1
Hm0507-10-VH4	4-39	89	2	0	4	0	0	2	2	2	5	3	6	2
Hm0507-10-VK2	2-28	99,64	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
St140-VH4	4-61	89	-	-	-	-	-	-	0	0	8	5	0	0
St140-Vk1	1-12	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

In der ersten Spalte von links sind die von Wegener Granulomen stammenden Immunglobulingene aufgeführt. In der zweiten Spalte sind die Keimbahngene mit der jeweils höchsten Homologie aufgeführt. Folgend werden Mutationen der aus Wegener Granulomen stammenden VH und V_k Immunglobulingene zu den Keimbahngenen in den einzelnen Genabschnitten (FR1, CDR1, FR 2,...) aufgezählt und in replacement und silent Mutationen unterteilt. In der Spalte rechts außen werden die R- und S-Mutationen in den CDRs aufsummiert.

Tab. 5 (Fortsetzung): Mutationsanalyse der Variablen Regionen der synthetisierten mAbs

Sequenz	Σ Mutationen in FR		Σ Mutationen zu	Σ Mutationen zu	CDR 3 Länge	E und D	RHK
	R	S	E und D in CDR	RHK		in CDR 3	in CDR3
Scu0107-36-VH4	7	0	0	0	13	1	1
Scu0107-36-VK1	2	1	0	0	9	0	0
Scu0107-58-VH3	9	3	1	1	21	3	3
Scu0107-58-VK3	6	3	1	0	10	0	0
Hm0507-10-VH4	7	5	0	1	16	3	1
Hm0507-10-VK2	1	0	0	0			
St140-VH4	8	5	0	0	9	0	
St140-Vk1	0	0	0	0	10	0	

In der Fortsetzung der Tab. 5 werden in der Spalte links außen die Summen der R- und S-Mutationen in den FRs angegeben. In den weiteren Spalten wird die Anzahl der Mutationen, die zur Entstehung von Aspartat und Glutamat (D und E) führen und die Anzahl von Aspartat und Glutamat in CDR3 aufgeführt.

4.2. Selektion doppeltrekombinanter Baculovirusklone

Nach der Kotransfektion der Baculoviren mit den Transfervektoren wurden durch lytische Plaque Assays je 10 isolierte Virusklone gewonnen. Zellüberstände der mit jeweils einem Virusklon infizierten Insektenzellen wurden auf das Vorliegen kompletter IgG-Antikörper untersucht.

4.2.1. ELISA auf Zellüberstände einzelner Baculovirusklone

Zur Kontrolle der korrekten Expression kompletter humaner IgG1 wurden die Zellüberstände dieser Kulturen mit einem ELISA untersucht. Als Fängerantikörper wurde ein gegen menschliche γ -Schwerketten gerichteter Antikörper (anti-Human Fd γ 1-AK) verwendet und als Detektionsantikörper diente ein Meerrettich-Peroxidase-markierter Antikörper, der gegen menschliche κ -Leichtketten gerichtet war (anti-human- κ -AK). Nach Zugabe von OPD wurde der ELISA bei 450 nm gelesen.

Scu58

Von den 10 Überständen, die mit je einem Virusklon des B-Lymphozyten Scu58 (B8601-B8610) infiziert worden waren, konnte in 6 Überständen (B8601, B8602, B8603, B8604, B8605 und B8609) eine Expression von kompletten IgG1 mit einer κ -Leichtkette nachgewiesen werden.

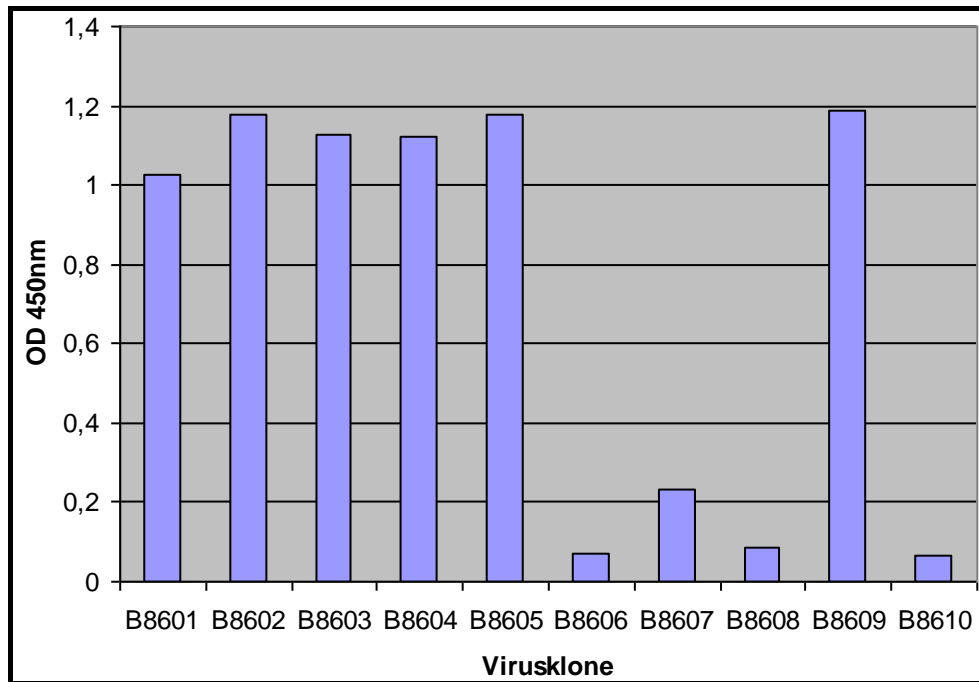


Abb. 17: Lytischer Plaque Assay: Scu58. In den Überständen der mit den Virusklonen B8601-B8605 und B8609 infizierten Insektenzellen, wurden humane IgG1 κ -Antikörper nachgewiesen.

Scu36

Der Immunoassay konnte in den Insektenzellüberständen, die je mit einem Scu 36 Virusklon (B8551-B8560) infiziert worden waren, bei 8 der 10 Virusklone die Expression von IgG-Antikörpern nachweisen. Nur die mit den Virusklonen B8553 und B8558 infizierten Überstände waren negativ. Dies zeigt, dass die Klonierung der VH- und Vk-Gensegmente in die Vektoren und die nachfolgende Kotransfektion zur Expression kompletter mAbs führte.

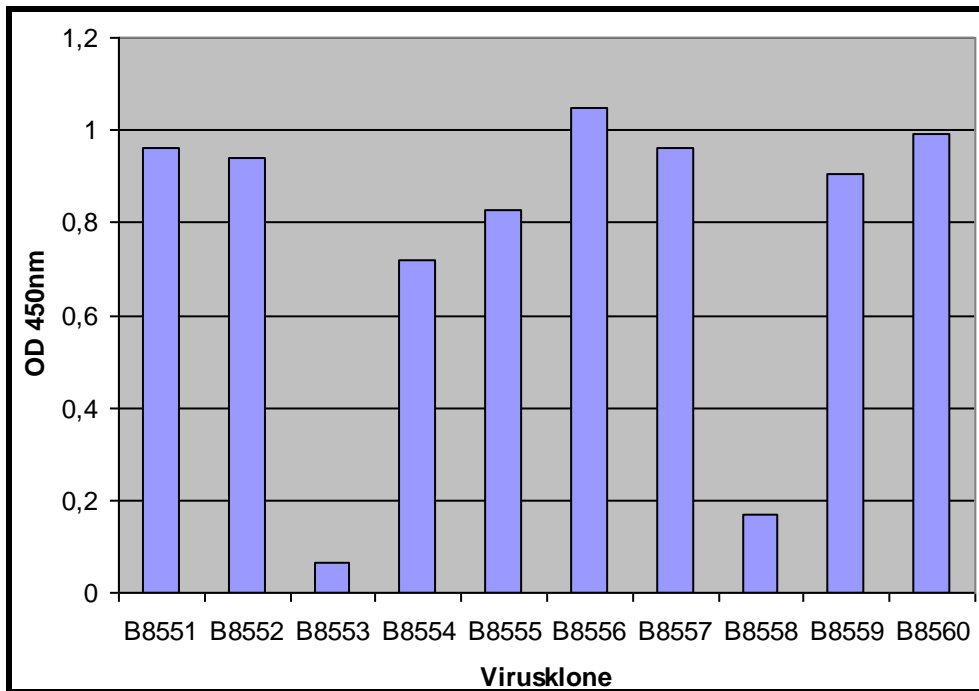


Abb. 18: Lytischer Plaque Assay: Scu36. In allen Überständen infizierter Insektenzellen bis auf die Virusklone B8553 und B8558 konnten humane IgG1 κ -Antikörper detektiert werden.

St140

In allen 10 Überständen der mit einem ST140-Virusklon (B8750-B8760) infizierten Insektenzellen konnte eine Expression von kompletten IgG1 mit κ -Leichtkette nachgewiesen werden. Die Expression war im Vergleich zu der von den positiven Klonen Scu36 und Scu58 etwas schwächer.

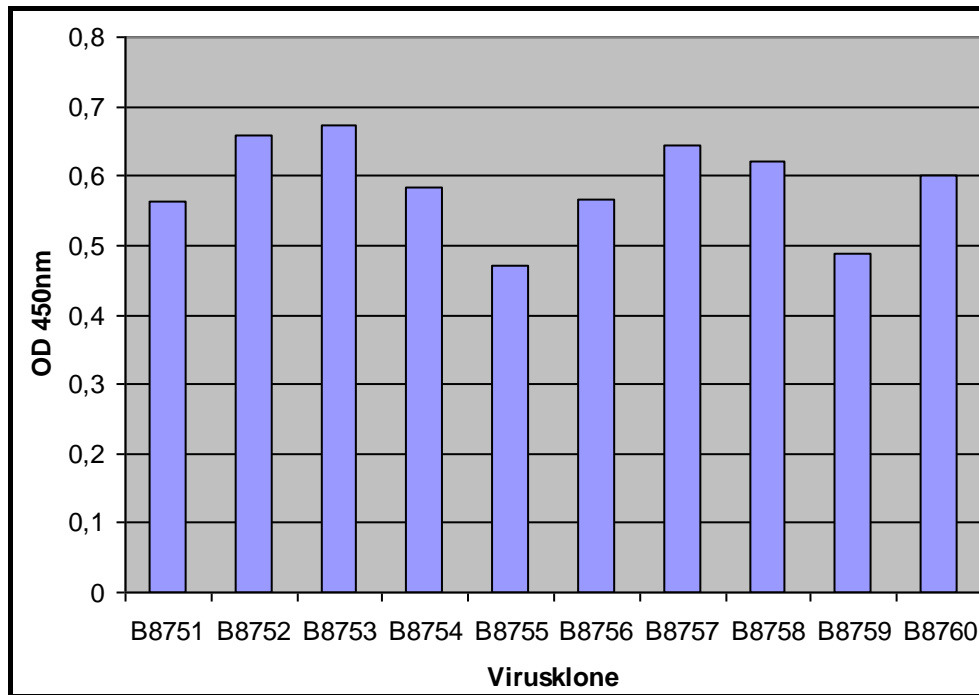


Abb. 19: Lytischer Plaque Assay: St140. Die mit den Virusklonen B8751-B8760 infizierten Insektenzellen exprimierten alle IgG1 Antikörper mit κ -Leichtkette

Hm05

Der Immunoassay ergab für alle Insektenzellüberstände, die je mit einem Hm05 Virusklon (C201-C210) infiziert worden waren, die Expression von kompletten IgG-Antikörpern. Dies belegt, dass die Klonierung der VH- und V κ -Gensegmente von Hm05 in die Transfervektoren und die nachfolgende Kotransfektion zur Expression kompletter mAbs führte.

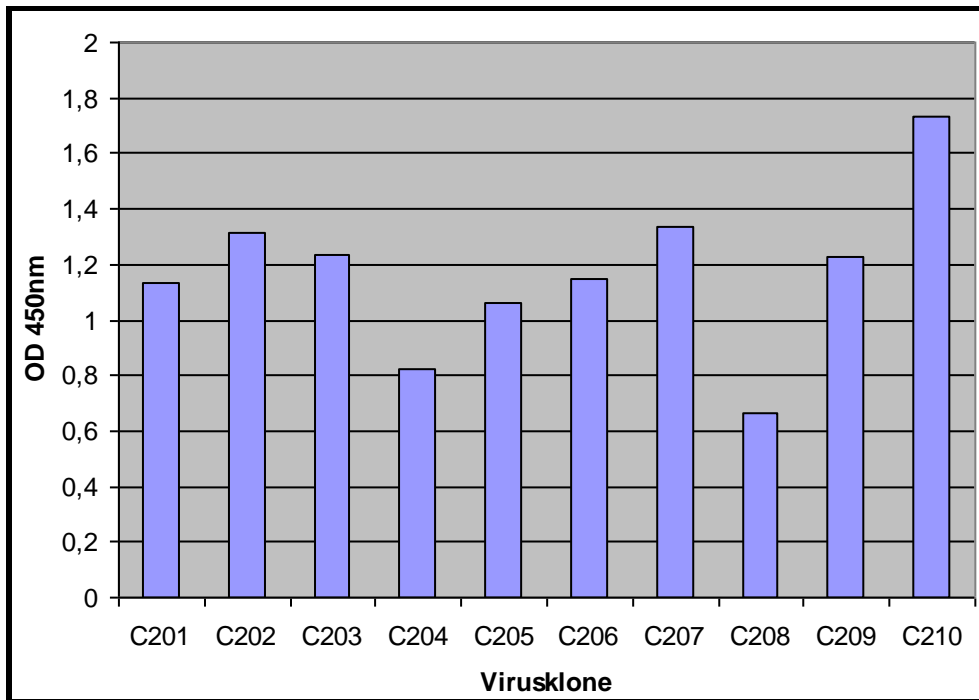


Abb. 20: Lytischer Plaque Assay: Hm05. Die mit den Virusklonen C201-C210 infizierten Insektenzellen synthetisieren alle humane IgG1 Antikörper mit κ -Leichtkette.

4.2.2. PCR zur Insertionskontrolle in das Baculovirusgenom

Aus den Überständen der infizierten Insektenzellen, für die im ELISA eine IgG Expression gezeigt werden konnte, wurde durch Ultrazentrifugation virale DNA gewonnen. Anschließend konnte durch Kontroll-PCRs bestätigt werden, dass die Schwer- und Leichtkettengene in den Virus insertiert waren, dass nur eines der Gene insertiert war oder dass es sich um noch eine Wildtypform handelte. Weiterhin war es möglich, polyklonale Klone zu identifizieren. Für die Kontroll-PCRs wurden spezifische Primer für das P10- und das Polyhedrin-Gen verwendet, da dort die Insertionsstellen der Schwer- und Leichtkettengene lokalisiert sind. Bei nicht stattgefundenener Insertion des Schwerkettengens am p10-Locus war das PCR-Produkt 1 kbp lang. Bei erfolgreicher Insertion war das PCR Produkt 2 kbp groß. Analog dazu betrug die Länge des PCR-Produktes am Polyhedrin Locus bei nicht stattgefundenener Insertion des Leichtkettengens etwa 0,6 kbp. Bei erfolgreicher Insertion hatte das PCR-Produkt eine Größe von ca. 1,8 kbp.

Scu36

Für den Virusklon B8554 konnte mit der Kontroll-PCR sowohl die Insertion des Schwerketten- als auch die Insertion des Leichtkettengens gezeigt werden.

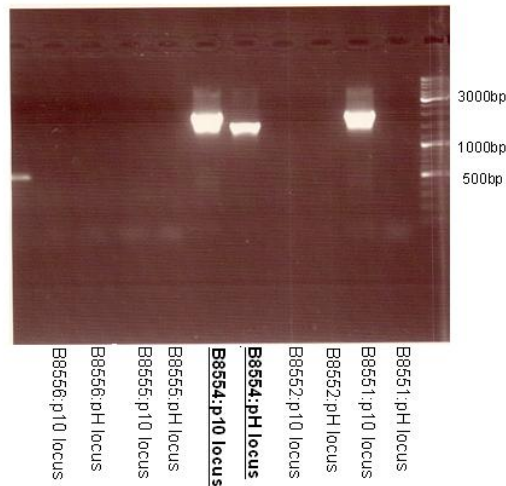


Abb. 21: PCR-Kontrolle der Insertion von Scu 36 (VH und Vk) in das Baculovirusgenom. PCR mit spezifischen Primern für das P10- und das Polyhedrin-Gen. In der Bildmitte Nachweis eines doppeltrekombinanten Baculovirus: am p10-Locus mit einem 2 kbp PCR-Produkt und rechts daneben Nachweis am Polyhedrin-Locus mit einer 1,8 kbp Bande des PCR-Produktes.

Scu 58

Mit der Kontroll-PCR konnte die Insertion der Schwer- und Leichtkette für den Klon B8603 gezeigt werden.

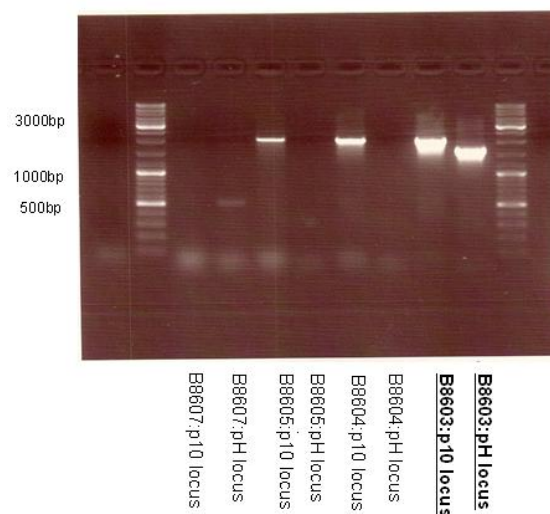


Abb. 22: PCR-Kontrolle der Insertion von Scu 58 (VH und Vk) in das Baculovirusgenom. PCR mit spezifischen Primern für das P10- und das Polyhedrin-Gen. In der dritten Spalte von rechts Nachweis einer erfolgreichen Insertion am p10-Locus mit einem 2 kbp PCR-Produkt und in der Spalte rechts daneben Nachweis einer erfolgreichen Insertion am Polyhedrin-Locus mit einer 1,8 kbp Bande des PCR-Produktes.

Für den Virusklon B8554 der B-Zelle Scu36 und den Virusklon B8603 der B-Zelle Scu58 konnte somit sowohl im ELISA die Expression von Schwer- und Leichtketten in Insektenzellüberständen als auch mit der Kontroll-PCR die korrekte Insertion der Schwer- und Leichtkettengene in das Baculovirusgenom nachgewiesen werden.

Daher wählten wir diese beiden Virusklone für die mAb-Expression aus. Für andere Virusklone konnte im ELISA eine Expression gezeigt werden, jedoch nicht die korrekte Insertion mittels PCR. Dieser Widerspruch beruht wahrscheinlich auf Schädigung der viralen DNA während der Präparation mit der Ultrazentrifuge.

4.2.3. Affinitätschromatographie der Insektenzellüberstände

Nach der Zentrifugation und Grobfiltration der Zellüberstände reinigten wir die synthetisierten mAbs mit einer FPLC-Einheit über eine Protein-A-Säule auf. Anschließend bestimmten wir die Proteinkonzentrationen photometrisch bei einer Verdünnung von 1/50 in PBS bei einer Wellenlänge von 280 nm. In einer ersten Syntheserunde wurden 500 µg des Scu36 mAbs (Virusklon B8554), 1,6 mg des Scu58 mAbs (Virusklon B8603) und 400 µg des St140 mAbs (Virusklon B8755) synthetisiert. In einer zweiten Produktionsrunde wurden weitere 600 µg des Scu36mAbs (Virusklon B8554), 1,6 mg des Scu58mAbs (Virusklon B8603) und 400 µg des St140 mAbs (Virusklon B8755) synthetisiert.

4.3. Weitere Charakterisierung der aufgereinigten mAbs

4.3.1. Coomassie-Gelfärbung

Mit Coomassie-Färbungen konnte die Reinheit der mit dem Baculovirussystem synthetisierten und dann über Protein-A-Säulen aufgereinigten mAbs überprüft werden. Die Proben wurden reduzierend behandelt. Es sind jeweils die Banden im Bereich von 50 kDa und etwas über 25 kDa zu sehen, was den Molekularmassen der Antikörperschwer- und Leichtketten entspricht (Abb. 23 und 24).

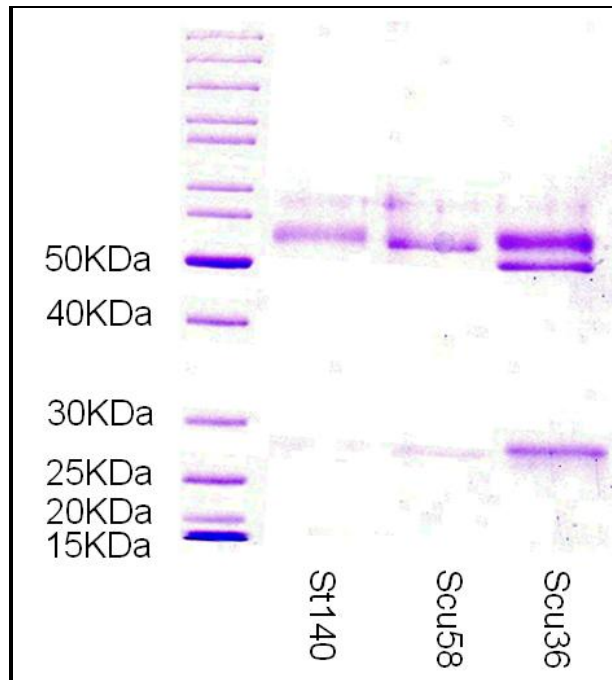


Abb. 23: St140-, Scu58- und Scu36-Schwer- und Leichtketten in einer Coomassie-Proteinfärbung. Es sind Banden im Bereich von 50 kDa und 25 kDa zu erkennen, was den kompletten Schwer- und Leichtketten entspricht. Es handelt sich um ein 12% SDS-Polyacrylamidgel mit reduzierend behandelten Proben.

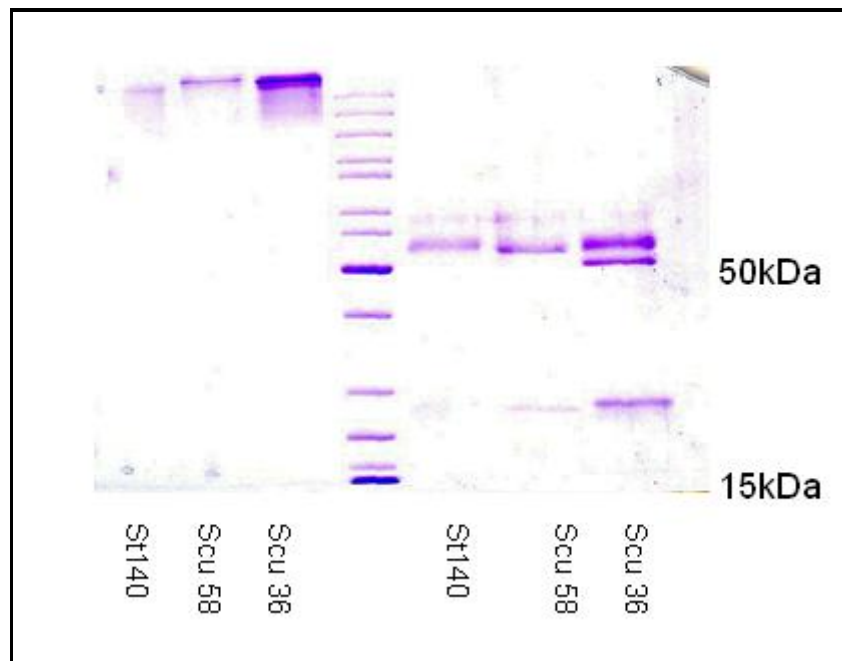


Abb. 24: St140-, Scu58- und Scu36-Schwer- und Leichtketten, sowie komplette IgG in einer Coomassie-Proteinfärbung. In den drei Spalten links sind komplette IgGs von St140, Scu58 und Scu36 zu erkennen. Diese Proben wurden nicht reduzierend vorbehandelt. In den Spalten rechts der Proteinleiter sind Banden im Bereich von 50 kDa und 25 kDa zu erkennen, was den Schwer- und Leichtketten entspricht. Auch hier handelt es sich um ein 12% SDS-Polyacrylamidgel mit nicht-reduzierend und reduzierend vorbehandelten Proben.

Die Banden, der nicht reduzierend behandelten mAbs befanden sich bei 200 kDa (Abb. 24: die Spalten links neben der Proteinleiter). Die angenommene Molekularmasse der IgGs liegt jedoch im Bereich von 150 kDa.

Um zu testen, ob ein hochprozentiges SDS-Gel die Ursache gewesen sein könnte, oder es sich vielleicht um ein generelles Phänomen bei der nicht-reduzierenden SDS-PAGE von IgG gehandelt haben könnte, wiederholten wir die Coomassie-Färbung der nicht-reduzierend behandelten rekombinanten mAbs sowie eines kommerziell erworbenen mAbs in einem 8 % SDS-Gel.

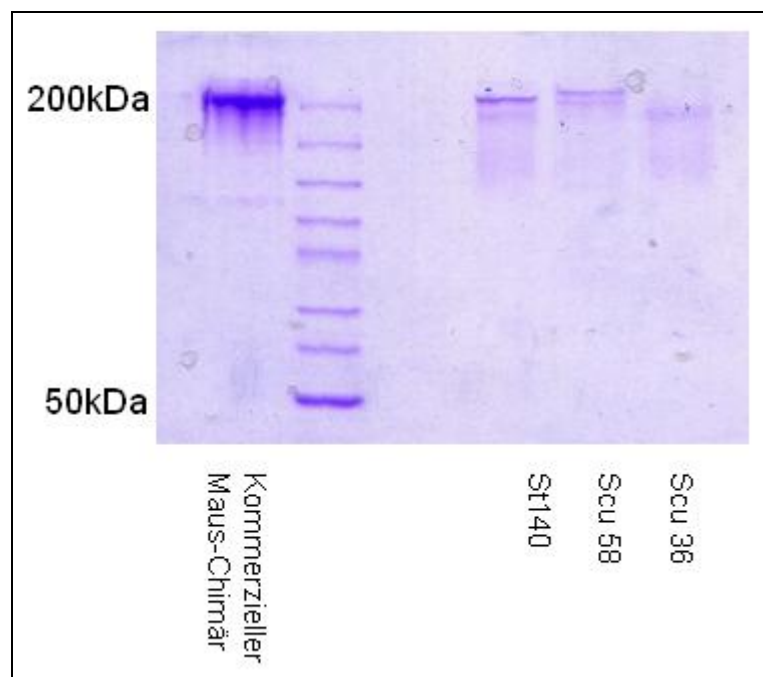


Abb. 25: Coomassie-Proteinfärbung der synthetisierten mAbs und eines Kontroll-mAbs. Die Banden der kompletten IgGs sowohl des Kontroll-mAbs als auch der von uns synthetisierten mAbs betragen 200 kDa. Verwendung nicht reduzierend behandelte Proben und eines 8% SDS-Polyacrylamidgels.

Auch in dem 8% SDS-Gel (Abb. 26) befinden sich die Banden überhalb von 200 kDa. Jedoch ist deutlich ein Schmier bis etwa zu der 150 kDa Marke zu erkennen. Auch bei dem kommerziellen Maus-Chimär-AK ist das Gleiche zu beobachten, so dass von einem allgemeinen Phänomen auszugehen war.

4.3.2. ELISA zur IgG-Subklassentypisierung

Zur Charakterisierung des IgG-Klassensubtyps dienten als Fängerantikörper vom Schaf stammende Anti-human-Antikörper jeweils gegen eine der Subklassen IgG1 bis IgG4. Die Proben wurden in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Als

Negativkontrollen bzw. Leerwerte wurden PBS, TC100-Insektenzellmedium mit 10% FCS-Zusatz, verwendet. Als Positivkontrolle für einen kompletten IgG1-Antikörper verwendeten wir den vorrätigen G250-Maus-Chimär, dessen murine Schwerekettenkonstante gegen eine humane des $\gamma 1$ -Subtyps ausgetauscht worden ist und der auch eine κ -Leichtkette besitzt. Zur Detektion wurde sekundär mit murinen Antikörpern gegen die menschliche κ - oder λ -Leichtkette inkubiert. Tertiär wurden vom Kaninchen stammende meerettichperoxidase-markierte Anti-Maus-IgG-AK eingesetzt.

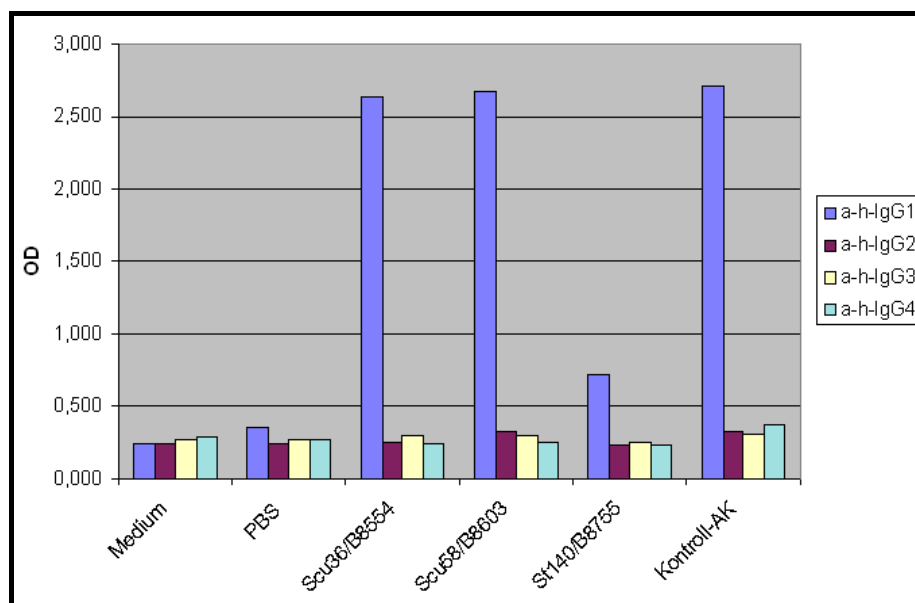


Abb. 26: ELISA der IgG-Subklassen. Nachweis der IgG1-Subklassenzugehörigkeit der synthetisierten mAbs.

Die synthetisierten mAbs gehören dem IgG1-Subtyp an. Das Insektenzellmedium zeigt trotz FCS-Zugabe keine stärkere Reaktion als einfaches PBS, d.h. im fötalen Kälberserum sind nicht mehr IgG-Antikörper vorhanden. Die Signalstärken von Scu36 und Scu58 sind annähernd so hoch wie die der Positivkontrolle. Auffallend ist, dass die Signalstärke von St140/B8755 um das Vierfache geringer ist als die des Kontrollantikörpers, aber immer noch den dreifachen Wert der Negativkontrolle aufweist.

4.3.3. ELISA und Western-Blot zur IgG-Leichtkettenzugehörigkeit

Der ELISA zur Detektion von κ - oder λ -Leichtketten ergab, dass die synthetisierten mAbs κ -Leichtketten besitzen.

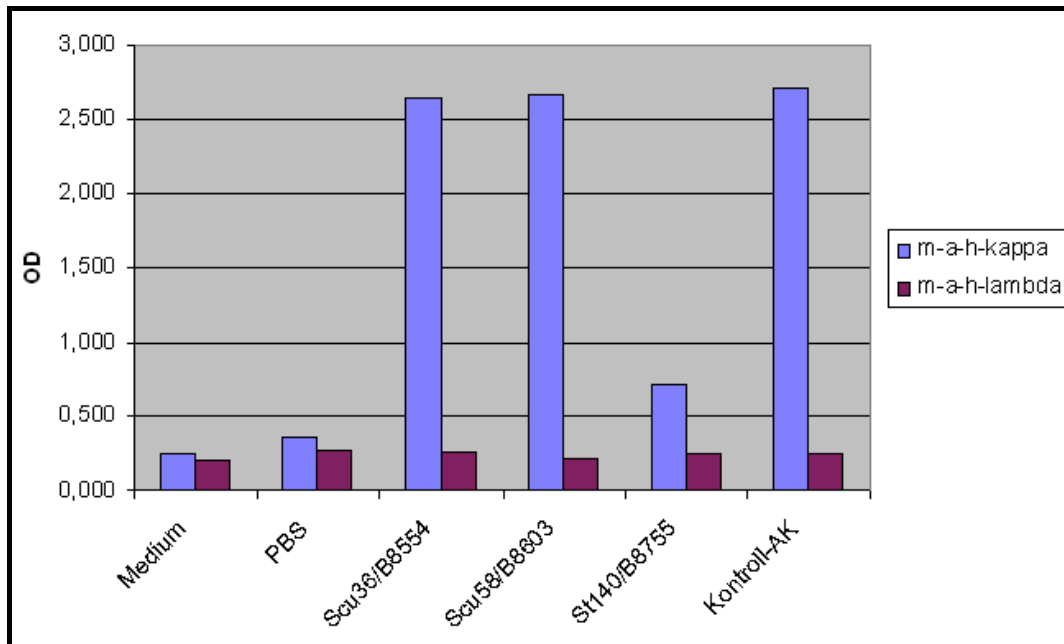


Abb. 27: ELISA der Leichtkettenklassen. Nachweis der κ -Leichtkettenzugehörigkeit der synthetisierten mAbs.

Die κ -Leichtkettenzugehörigkeit der produzierten mAbs wurde durch einen Western-Blot exemplarisch für den Scu36-mAb und den Scu58-mAb bestätigt. Als Positivkontrollen wurden ein monoklonaler Maus-Chimär-AK, ein monoklonaler anti-CD-29-Ak und ein Fab mit jeweils κ -Leichtketten eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde ein Fab mit einer λ -Leichtkette eingesetzt. In den Lanes des Scu36mabs, des Scu58mAbs und der Positivkontrollen sind im Gegensatz zur Negativkontrolle deutliche Banden im Bereich von 25 kDa erkennbar.

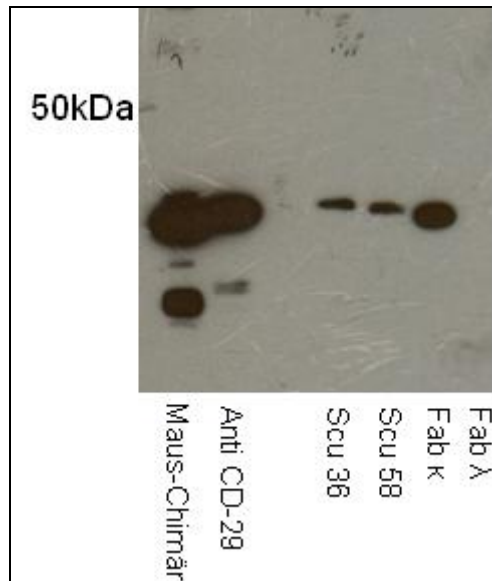


Abb. 28: Western-Blot der Leichtkettenklassen. Nachweis der κ -Leichtkettenzugehörigkeit der synthetisierten mAbs Scu36 und Scu58 im Western-Blot. Als Positivkontrolle dienten ein anti-CD29-mAb, ein Maus-Chimär sowie ein Fab mit jeweils bekannter κ -Leichtkette. Als Negativkontrolle diente ein Fab mit bekannter λ -Leichtkette

4.3.4. ANCA-Immunfluoreszenz

Die synthetisierten mAbs wurden auf neutrophilen Granulozyten, die auf Objektträgern vorfixiert waren, inkubiert und anschließend mithilfe von Detektionsantikörpern dargestellt. Die indirekte Immunfluoreszenz ergab weder zytoplasmatische, perinukleäre noch atypische Fluoreszenzmuster.

4.3.5. 2A-Peptidmethode

HEK-293-Zellen wurden mit einem pcDNA-Vektor, in den die Schwereketten, die 2A-Sequenz und die Leichtkette von Scu58 kloniert worden waren, transfiziert. Im Überstand transfizierter HEK-293-Zellen konnte mit Western-Blots die Expression des Scu58mAbs gezeigt werden. In diesem Blot waren eindeutig die Banden in Höhe der kompletten Schwer- und Leichtketten zu erkennen. Es konnten mit dem 2A-Peptid-System erfolgreich komplette mAbs des B-Lymphozyten Scu58 synthetisiert werden.

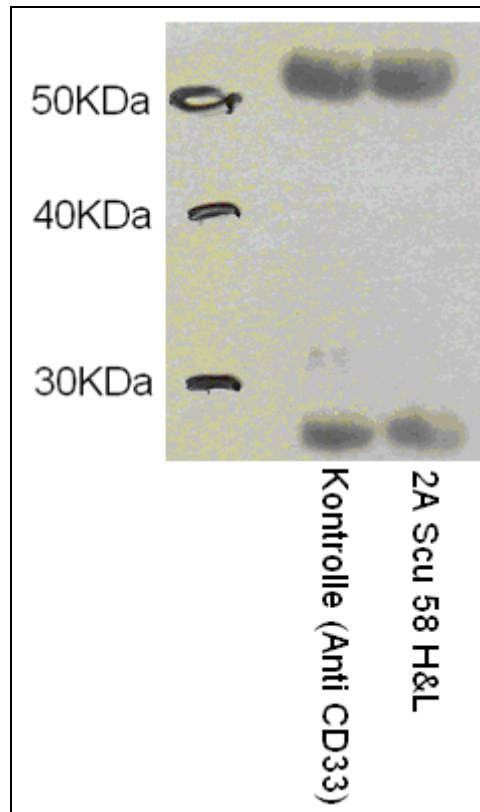


Abb. 29: Nachweis der Expression des Scu58 mAbs mithilfe des 2A-Peptidsystems. Rechte Spalte: mithilfe des Western-Blots gelingt der Nachweis von Leicht- und Schwerekettenbanden im Zellüberstand mit dem 2A-System transfizierter HEK293-Zellen. Linke Spalte: Als Positivkontrolle dient ein verifizierter anti CD33 mAB.

von HEK-293-Zellen konnte mit Western-Blots die Expression des Scu58mAbs gezeigt werden. Western Blot eines mit dem 2A-Peptid-System exprimierten mAbs. Western-Blot eines,

4.4. Identifizierung der Zielstrukturen der synthetisierten mAbs

4.4.1. PR3-ANCA-ELISA

Die quantitativen Immunoassays zur Affinitätsuntersuchung der synthetisierten mAbs gegen Antigene der PR3 ergaben folgendes:

Die Untersuchung der synthetisierten mAbs mithilfe des PR3-ANCA-Kits der klinischen Routinediagnostik (Varelisa, Freiburg im Breisgau) ergab keine relevante Affinität gegen PR3. Die Werte lagen jeweils im Bereich der Negativkontrollen.

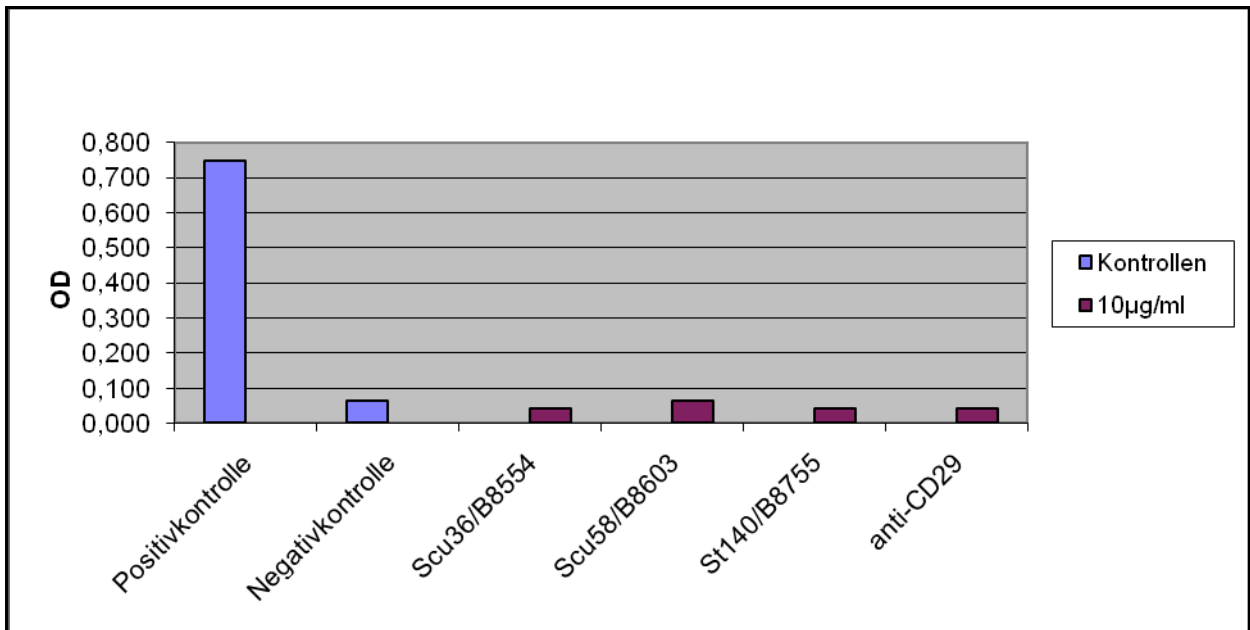


Abb. 30: Routine-PR3-ELISA. Die synthetisierten mAbs zeigen keine Affinität gegen PR3. Die mAbs wurden in einer Konzentration von 10µg/ml eingesetzt. Dieser Routine-Kit der klinischen Diagnostik enthielt bereits Platten, die mit PR3 vorgecoatet waren sowie eine Positiv- und eine Negativkontrolle. Zusätzlich wurde als weitere Negativkontrolle ein anti-CD-29-AK verwendet, der auch mithilfe desselben Baculovirussystems synthetisiert worden ist. Als Detektionsantikörper diente ein vom Hersteller mitgelieferter Meeretichperoxidase-konjugierter Anti-human-IgG-Ak.

In weiteren ELISAs wurde rekombinant synthetisierte PR3 an der Festphase gecoatet. Auch mit diesen Immunoassays konnten keine Affinitäten der von uns synthetisierten mAbs gegen PR3 gezeigt werden.

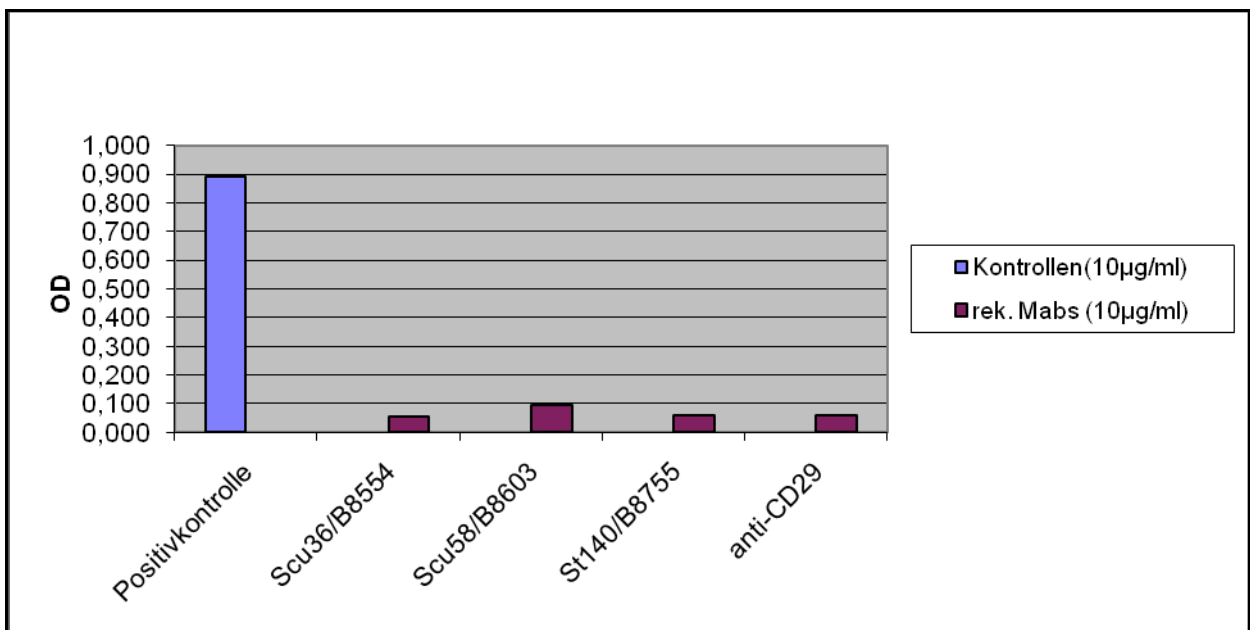


Abb. 31: ELISA mit gecoateter rekombinant synthetisierter PR3. Zur Detektion dienten primär gegen humane κ-Leichtketten gerichtete Mausantikörper und sekundär mit

Meeretiichperoxidase markierte, gegen Maus IgG gerichtete Kaninchenantikörper. Als Positivkontrolle wurde ein verifizierter PR3-ANCA eingesetzt.

4.4.2. Immunoblots gegen mikrobielle Lysate

Die Suche nach Zielantigenen wurde auf Bakterien- und Pilzantigene ausgedehnt.

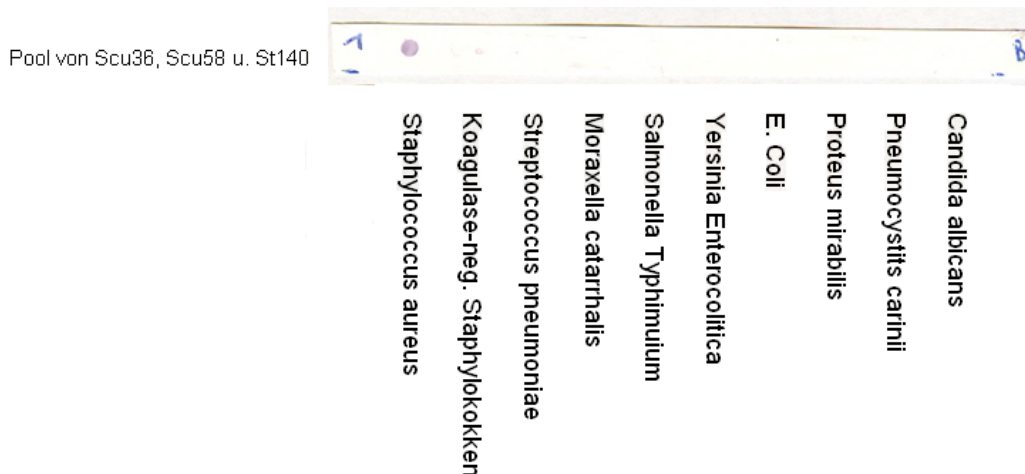


Abb. 32: Immunoblot der gepoolten mAbs mit einem Panel mikrobieller Lysate. Die entsprechenden Bakterien- und Pilzlysate wurden in einer Konzentration von 5 µg/ml auf PVDF-Membranen immobilisiert. Die von uns rekombinant synthetisierten mAbs wurden in einem ersten Schritt gemeinsam auf dem Immunoblot inkubiert. Das Detektionssystem bestand primär aus einem biotinierten, gegen humane Fab-Fragmente gerichteten Mausantikörper und sekundär aus Streptavidin, an das Alkalische Phosphatase gekoppelt war.

Es war eine deutliche Reaktion der mAbs auf das Staphylococcus aureus-Lysat sichtbar. Die mAbs reagierten nicht gegen andere mikrobielle Lysate. Um weiter eingrenzen zu können, welche der gepoolten mAbs eine Affinität gegen das Staphylococcus-Lysat besaßen, wurden die Lysate von Staphylococcus aureus und Yersinia enterocolitica in Folgeuntersuchungen auf PVDF-Membranen immobilisiert und mit den einzelnen rekombinanten mAbs inkubiert. Der Scu58mAb und der St140mAb zeigten Reaktionen auf das Staphylococcus aureus Lysat. Der KontrollmAb zeigte dagegen keine Reaktion, was gegen eine generelle Affinität der mAbs für das S. aureus-Lysat, vermittelt über Protein-A oder Protein-G, spricht.

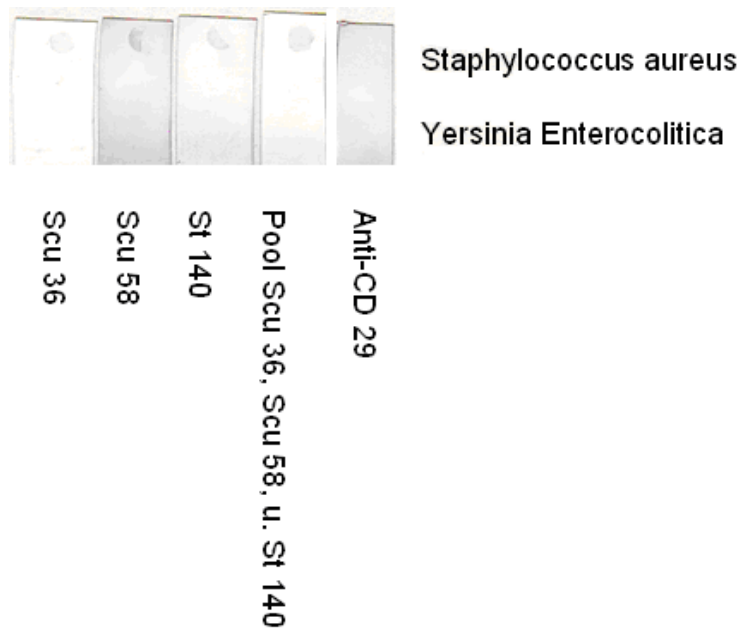


Abb. 33: Peptide-Arrays der mAbs mit *S. aureus*- und *Y. enterocolitica*-Lysaten. Vor allem der Scu58mAb und der St140mAb zeigten Reaktionen auf das *S. aureus*-Lysat. Als Negativkontrolle diente ein mit dem Baculovirus-Expressionssystem hergestellter anti-CD-29-AK. Die rekombinanten mAbs und die Kontrolle wurden in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Der Teststreifen mit dem anti-CD29-Kontrollantikörper zeigte keine Reaktion.

4.4.3. Zielantigensuche der mAbs mit dem RZPD hEx1-Protein-Array

Der Protein-Array wurde mit einem 50 ml-Pool der synthetisierten mAbs in jeweiliger Konzentration von 10 µg/ml inkubiert, so dass von jedem mAb 500 µg eingesetzt wurden. Neben den jeweiligen Waschschritten in TBS-T wurde der Array zur Detektion primär mit murinen anti-human-Fab-Antikörpern, dann sekundär mit biotiniliertem anti-Maus-IgG und anschließend tertiär mit Spreptavidin/Peroxidase inkubiert. Bei der Auswertung der entwickelten Filme wurden zwei Doppelpunkte (Treffer) gefunden, deren Anordnung jeweils einem der zwölf möglichen Mustervarianten eines Proteinklons entsprach.

Die Berechnung der Koordinaten ergab:

Für den ersten Doppelpunkt:

$$X1 = 5 (21-1) + 1 = 101 \quad Y1 = 5 (1-1) + 2 = 2$$

$$X2 = 5 (21-1) + 1 = 101 \quad Y2 = 5 (1-1) + 5 = 5$$

Für den zweiten Doppelpunkt:

$$X1 = 5 (2-1) + 5 = 10 \quad Y1 = 5 (12-1) + 4 = 59$$

$$X2 = 5 (2-1) + 2 = 7 \quad Y2 = 5 (12-1) + 5 = 60$$

Die endgültigen Koordinaten der Doppelpunkte wurden bei ImaGenes, einer Ausgründung des Deutschen Ressourcenzentrums für Genomforschung (RZPD), eingereicht und konnten dort einzelnen Proteinklonen zugeordnet werden.

Bei den vermeintlichen Treffern der Zielantigensuche handelte es sich um:

- Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin)
- Ubiquitin Specific Protease 34

Diese Proteinklone wurden bei ImaGenes bestellt und in 2 TY Ampicillin-Medium kultiviert. Die Sequenzierung präparierter Plasmid DNA dieser Klone mit pQE80 forward und reverse Primern ergab, dass die Proteinklone die komplette kodierende Sequenz des Gamma Actins und fast die komplette kodierende Sequenz der Ubiquitin spezifischen Protease 34 enthielten.

Die Bakterien wurden bei einer OD von 0,6 mit IPTG induziert (1:1000). Anschließend wurden die Lysate der induzierten Bakterien im Vergleich zu Lysaten nicht induzierter Bakterien auf die Expression der Proteinklone analysiert. Hierzu wurde der n-terminale 6 His Tag genutzt. Der durchgeführte Western Blot bestätigte die Expression der Proteinklone unter Induktion mit IPTG.

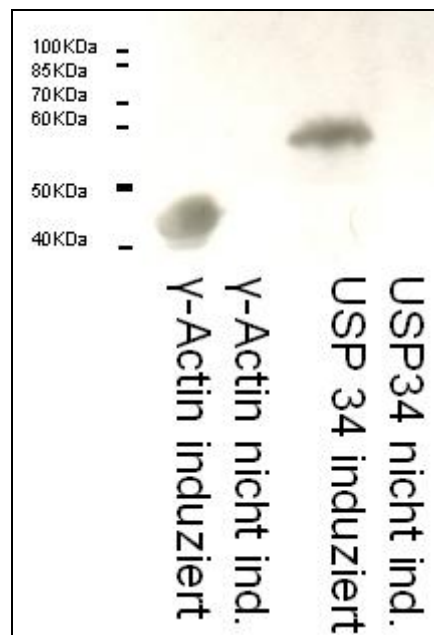


Abb. 34: Nachweis der Expression von γ -Actin und USP34 nach Induktion mit IPTG. Die Bande in der linken Spalte im Bereich von 45 kDa bestätigte die Expression des gamma Actins unter Induktion. Die Bande im Bereich knapp unter 60 kDa in der dritten Spalte von links bestätigte die Expression des USP34 unter Induktion. Ohne Induktion ließen sich die entsprechenden Proteinklone nicht nachweisen, die Vektoren waren also nicht „leaky“. Am Vortag wurden die Lysate in einer SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet, die über Nacht bei 4° C in 3% BSA-TBS geblockt wurde. Zur Detektion wurde primär mit murinem Penta-Anti-His-Antikörper inkubiert

und anschließend mit Meerrettichperoxidase-markierten anti-Maus-IgG-Detektionsantikörpern inkubiert.

In weiteren Western-Blots wurden die Lysate der induzierten Bakterienklone wieder in einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend geblottet. Die Membranen wurden über Nacht bei 4° C mit 10% Magermilch-TBS geblockt. Anschließend wurden die Membranen 2 h jeweils mit dem Scu36mAb, dem Scu58mAb oder dem St140mAb sowie Kontrollen inkubiert. Es konnte keine Bindung der synthetisierten mAbs an die Proteinklone des gamma Actins oder der Ubiquitin-spezifischen Protease 34 nachgewiesen werden, d.h. die auf dem Macroarray gefundenen Treffer konnten in späteren Dot-Blots nicht bestätigt werden. Somit war die Suche nach Zielantigenen der mAbs mithilfe des hex1-Proteinarrays erfolglos.

4.4.4. Zielantigensuche mit den Unipex1/2-Protein-Arrays

Nachdem die Suche nach Zielantigenen mithilfe des hex1-Proteinarrays erfolglos war, wurde die Suche auf den Unipex1- und Unipex2-Proteinarray ausgedehnt. Die Unipex1/2 Protein-Arrays wurden analog dem hEx1-Array mit 50 ml-Pool der synthetisierten mAbs in jeweiliger Konzentration von 10 µg/ml inkubiert, so dass auch hier von jedem mAb 500 µg eingesetzt wurden. Zur Detektion wurden auch die Unipex1 bzw. Unipex2-Arrays primär mit murinen Anti-human-Fab-Antikörpern dann sekundär mit biotiniliertem Anti-Maus-IgG und anschließend mit Spretavidin/Peroxidase inkubiert. Bei der Auswertung der Filme der Unipex-Arrays gab es im Gegensatz zu dem hEx1-Array nur noch 4 Mustervarianten. Die Bestimmung der Koordinaten erfolgte analog dem hEx1-Array.

Das Zielantigensuche der gepoolten mAbs auf dem Unipex1-human-fetal-brain-cDNA-Expressions-Proteinarray ergab als vermeintliche Treffer:

- Transmembranprotein 9B (TMEM9B)
- Pyruvatcarboxylase 3
- Alkoholdehydrogenase 5
- Transmembranprotein 4 der Superfamilie 2 (Tm4SF2)

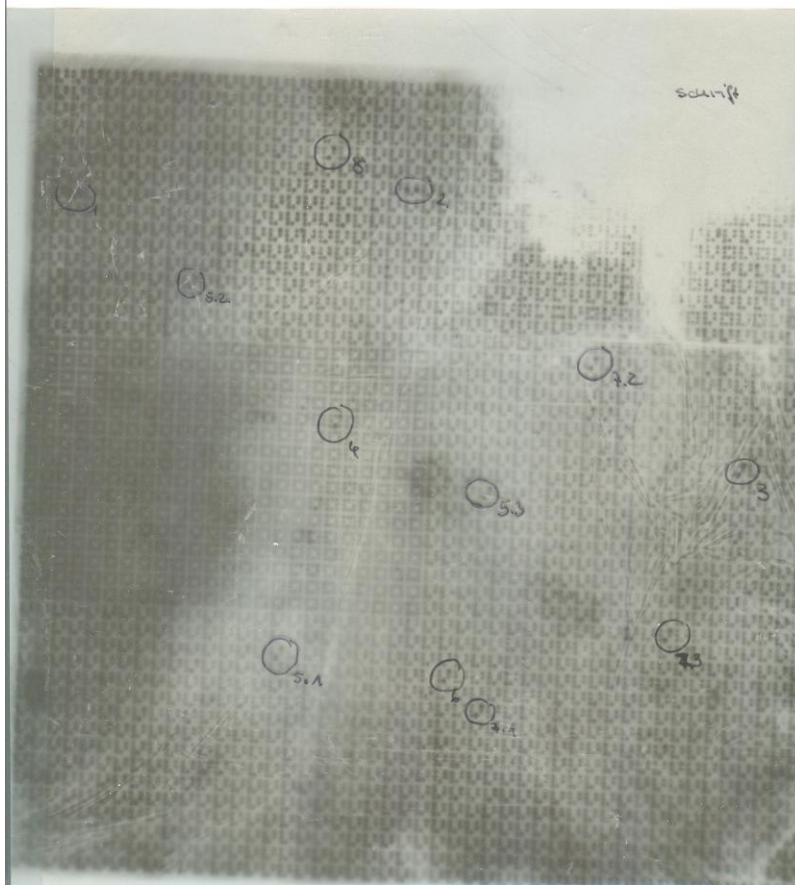


Abb. 35: Unipex1-Proteinarray nach Hybridisierung mit den gepoolten mAbs. Zur Bestimmung der vermeintlichen Trefferantigene wurden die Koordinaten der gefundenen Signalpaare mit der Anordnung der Proteinklone auf dem Array abgeglichen.

Die Zielantigensuche der gepoolten mAbs auf dem Unipex2 T-Lymphozyten-cDNA-Expressions-Proteinarray ergab als vermeintlichen Treffer:

- Kollagen Typ 6 alpha 1 (Col6A1)

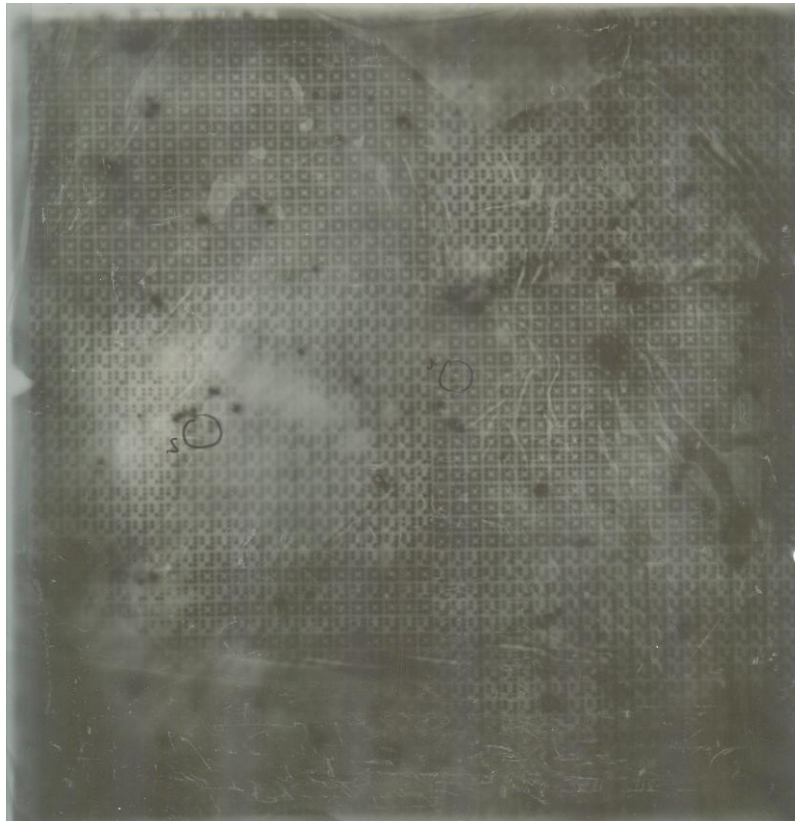


Abb. 36: Unipex2-Proteinarray nach Hybridisierung mit den gepoolten mAbs. Zur Bestimmung der vermeintlichen Trefferantigene wurden die Koordinaten der gefundenen Signalpaare mit der Anordnung der Proteinklone auf dem Array abgeglichen.

Die Expressionsklone der oben erwähnten und anhand ihres Arraymusters identifizierten Target-Proteine wurden über Imagenes bezogen. Von den vermeintlichen Zielantigenen, die mithilfe des Unipex1-Arrays gefunden worden sind, ließen sich in einem Immunodotblot TMEM9B und Tm4SF2 als wahre Zielantigene unserer mAbs bestätigen. Scu36 und Scu58, also zwei mAbs, die ausgehend von zwei verschiedenen B-Zellen eines Patienten synthetisiert wurden, sind spezifisch gegen TMEM9B gerichtet. Desweiteren ist der mAb St140 spezifisch gegen das Tetraspanin Tm4SF2. Die restlichen vermeintlichen Zielantigene des Unipex1-Arrays konnten jedoch nicht bestätigt werden. Auch das mithilfe des Unipex2-Array vermutete Zielantigen Kollagen Typ VI α 1 (Col6A1) ließ sich in Folge-Immunodotblots nicht bestätigen.

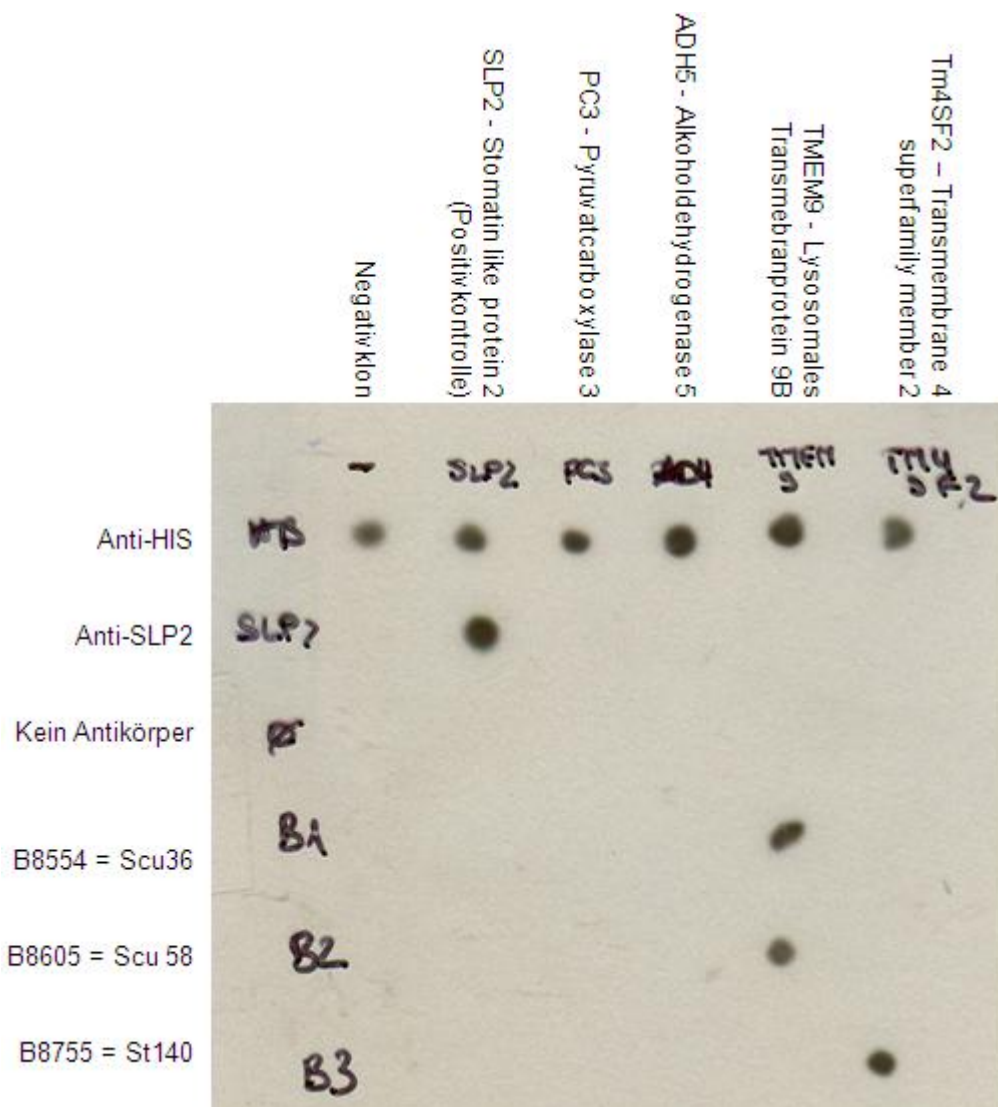


Abb.37: Bestätigungs-Immunodotblot von TMEM9B und Tm4SF2 als Zielantigene der mAbs. St140 ist gegen Tm4SF2 gerichtet. Scu36 und Scu58 sind gegen TMEM9B gerichtet. Für diesen Bestätigungs-Immunodotblot wurden je Expressionsklon 10 µg des Bakterienlysats gedotet. Als Positivkontrolle diente der Expressionsklon von SLP2. Es wurde mit 10% Magermilch-TBS über Nacht bei 4° C geblockt. Anschließend wurde mit anti-HIS 1:2000 für 1 h und dann mit anti-H-POX 1:3000 bei RT inkubiert. Dann wurde zuerst mit den rekombinanten Bacculo-mAbs bzw. mit anti-SLP2 1:10⁶ für 1 h bei RT und dann mit biotiniliertem anti-human-IgG 1:2500 erneut für 1 h bei RT inkubiert. Abschließend erfolgte für 10 min eine Inkubation mit Streptavidin-Pox 1:15000.

5. Diskussion

Die Entstehung der LAMP-2-ANCA konnte kürzlich durch einen „molecular mimicry“-Mechanismus von LAMP-2 mit dem bakteriellen Adhesin FimH erklärt werden (Kain et al., 2008). Die klinische Relevanz der LAMP-2-ANCA und des entdeckten „molecular mimicry“-Mechanismus ist jedoch noch nicht abschließend geklärt.

Relativ unklar bleibt dagegen der Ursprungsort und die Art und Weise der Initiierung der PR3-ANCA in der WG. Immunhistologische Studien veranlassten Fienberg zu der Hypothese, dass der Ursprung der generalisierten WG mit systemischer Vaskulitis in den Granulomen des primären Krankheitsstadiums liegen müsste (Fienberg et al., 1989). Der klinische Gesichtspunkt scheint diese Hypothese zu bestätigen. Zumindest sind zu Beginn der lokalisierten WG in der Regel noch keine PR3-ANCA nachweisbar. Im generalisierten Krankheitsstadium sind sie dagegen in >90% serologisch nachweisbar.

Die endonasalen Granulome als ektopes lymphatische Strukturen stellen scheinbar eine passende entzündliche Umgebung für die Initiierung der PR3-ANCA-Bildung dar (Voswinkel et al., 2006).

Einzelne abgrenzbare B-Lymphozyten-Cluster wurden in entzündlichen Läsionen verschiedener Autoimmunerkrankungen wie der Wegener Granulomatose (Müller et al., 2008) und beispielsweise dem Sjögren Syndrom, der Hashimoto Thyreoiditis, der Rheumatoiden Arthritis und dem Diabetes mellitus Typ 1 (Kendall et al., 2007) nachgewiesen. B-Zell-Cluster werden dort von T-Zell-Bereichen und dendritischen Zellen umgeben, was an andere sekundäre lymphatische Organe wie Lymphknoten, dem MALT mit den Peyer-Plaques und die weiße Pulpa der Milz erinnert (Mebius et al., 2003), so dass der Begriff des „nasal associated lymphatic tissue“ (NALT) gerechtfertigt ist.

Die ektopen lymphatischen Organe scheinen ein gemeinsames Programm der Organogenese zu besitzen (Mebius et al., 2003). In einer dieser Arbeit vorausgegangenen Studie deutete die Analyse von VH-Genen B-Lymphozytärer-Cluster aus 6 endonasalen Wegener Granulombiopsien darauf hin, dass eine Maturitätsreifung vorliegt. Dabei zeigten die Sequenzen funktioneller variabler Schwereketten Gene aus Wegener-Granulomen eine signifikant höhere Mutationsrate gegenüber VH-Segmenten gesunder Kontrollpersonen. Der Quotient von

Replacement zu Silent-Mutationen in den komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDR) der B-Zellklone war erhöht, dh. vorkommende Mutationen führten hier vermehrt zu Aminosäureaustauschen. Dies deutet auf eine somatische Hypermutation im Wegener Granulom hin (Krämer et al., 2006 und Voswinkel et al., 2006).

Weiter scheint das Granulom durch die chronische Entzündung ein prädestinierter Ort für den Bruch der Toleranz gegenüber Selbstantigenen zu sein (Janeway Immunobiology 2008, Mueller et al., 2003). Chronische Entzündungen führen durch die hervorgerufenen Gewebeschäden zu einer Aufhebung der Segregation zytoplasmatischer Proteine, so dass das lymphatische System freien Zugang zu intrazellulären Selbstantigenen erhält. Weiterhin führen die stark erhöhten Zytokinkonzentrationen zu einer Mitaktivierung unspezifischer benachbarter Lymphozyten, sog. Bystander-Zellen. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten zudem erhöhte Mengen exprimierter PR3 im Granulom.

5.1. Geeignete Expressionssysteme für die Synthese von rekombinanten mAbs

Die gängigen Methoden zur Synthese humaner monoklonaler Antikörper sind die Epstein-Barr-Virus-Transformation, Maus-Mensch-Hybridome, Mensch-Mensch-Hybridome und die Fusion von Epstein-Barr-Virus-transformierten B-Zellen mit anderen lymphoiden Zelllinien. Für diese konventionellen Methoden der mAb-Synthese eignen sich Projekte, bei denen sich das Interesse beispielsweise auf PBMCs richtet.

Wir interessierten uns dagegen speziell für gewebeständige, potentiell Antigen selektionierte B-Zellen in ektopen lymphatischen Strukturen. Diese wurden nach immunhistochemischer Anfärbung mittels Laser-Mikrodissektor isoliert. Es ist extrem schwierig aus diesem mikrodissenzierten B-Zell-Material Hybridome zu erzeugen. Jedoch ermöglichte das verwendete Verfahren der „in-cell“ single cell-PCR, die natürlich vorkommenden Kombinationen funktioneller variabler Schwer- und Leichtkettensegmente zu erhalten. Für die mAb-Synthese wurden, wie bereits erwähnt, charakteristisch mutierte Immunoglobulin-Gene ausgewählt. Diese waren jedoch inkomplett, da sie nach der Amplifikation durch seminested single-cell-PCRs sowohl an ihren 3'- wie an 5'-Enden verkürzt waren. Die fehlenden Basenpaare

wurden durch Extension-PCRs in mehreren Runden mit überlappenden Primern ergänzt. Das Primerdesign orientierte sich an den jeweiligen Keimbahngenen. Im gleichen Schritt wurden die Restriktionsschnittstellen für die Klonierung in die Vektoren der Expressionssysteme angehängt. Für diese Studie verwendeten wir die Immunglobulingene von 5 B-Lymphozyten: Scu0107/36, Scu 0107/58, Hm05/10, St140 und St245. Die Immunglobulingene der Zellen St140 und St245 wurden bereits im Rahmen einer vorherigen Studie verlängert (Voswinkel, Kerkdijk et al., 2008). Es zeigte sich, dass die Verlängerung des VH-Segmentes der B-Zelle St245 zu einer nicht funktionellen Leserahmenverschiebung führte.

Zur Expression der mAbs wählten wir zum einen das Baculovirussystem, das die Synthese relativ großer Mengen an rekombinantem Protein in Insektenzellen ermöglicht, und zum anderen ein Säugerzellsystem, das auf dem selbstspaltenden 2A-Peptid von Picorna-Viren beruht (Fang et al., 2005). Die Klonierung der VH- und Vk-Segmente der 5 B-Zellen in die beiden Transfervektoren des Baculovirussystems pGmA116TLCk und p119Cy1 war bis auf die bereits erwähnte „frame shift“-Mutation bei St245 erfolgreich. Nach der Kotransfektion und der Isolierung einzelner Virusklone mittels lytischer Plaque Assays konnten von 4 der 5 Ausgangs-B-Zellen mAbs synthetisiert werden. Nur für den B-Lymphozyt St245 konnten im Zellüberstand keine IgGs nachgewiesen werden. Die synthetisierten mAbs wurden über die Protein-A-Säule aufgereinigt. Die Reinheit konnte in der anschließenden Coomassiegelfärbung gezeigt werden. Mit Western-Blots und Immunassayuntersuchungen konnte eine IgG1-Subklassenzugehörigkeit und eine κ -Leichtkettenzugehörigkeit aller produzierten mAbs bestätigt werden. Von jedem mAb wurden mehrere mg produziert.

Das auf dem 2A-Peptid basierende Expressionssystem ist eine sehr elegante Methode zur Produktion von komplexen Proteinen. Damit stand eine Alternative zu dem Baculovirussystem bereit. An die in den pEAK-Vektor klonierten VH-Gensegmente wurde 3' durch eine PCR eine 2A-like-Sequenz angehängt. Die komplette Klonierung dieses um die 2A-Sequenz verlängerten VH-Segments und des Vk-Gensegments in den pcDNA-Expressionsvektor gelang für den B-Lymphozyten Scu58. Zur Expression wurden HEK293 Zellen transfiziert. In den

Zellüberständen konnten durch Western-Blots die entsprechenden IgG Schwer- und Leichtketten nachgewiesen werden.

5.2. Beurteilung der Expressionssysteme

Mit dem Baculovirusexpressionssystem konnten wir in relativ großen Mengen rekombinante mAbs synthetisieren. Die posttranslationale Modifizierung in Insektenzellen gleicht nicht ganz der in Säugerzellen, was für immunologische Fragestellungen von Bedeutung sein könnte. In den letzten Jahren gelang es aber, die posttranslationale Modifizierung des Baculovirusexpressionssystems immer weiter der von Säugerzellen anzupassen. Das 2A-System bot somit für unsere Fragestellung den Vorteil, dass in Säugerzellen exprimiert werden konnte. Jedoch waren die synthetisierten Proteilmengen gering. Dies war ein Nachteil für die folgenden Untersuchungen.

In der vorausgegangenen Studie (Voswinkel et al., 2008) sollten zur Zielantigensuche Fabs synthetisiert werden. Hierzu waren die Variablen von Immunglobulinen in den pCes-Vektor kloniert worden. Die Expression der Fabs bereitete jedoch Schwierigkeiten. Zudem stellen die Fabs generell eine andere Sekundär- und Tertiärstruktur als humane IgG dar. Daher scheint die Synthese von rekombinanten mAbs für diese Fragestellung zielführender zu sein.

5.3. Beurteilung der Zielantigensuche

Die synthetisierten mAbs zeigten in der indirekten Immunfluoreszenz neutrophiler Granulozyten kein ANCA-typisches Fluoreszenzmuster. Auch konnte weder mit der klinischen Routinediagnostik, einem PR3-ANCA-ELISA-Kit, noch mit einem direkten ELISA mit gecoateter rekombinanter Proteinase 3 eine nennenswerte Affinität festgestellt werden. Somit konnten anhand der angewandten Methoden die hier untersuchten mAbs aus granulomständigen Einzelzellen nicht als PR3-ANCA charakterisiert werden. Folglich ist neben der Untersuchung einer größeren Anzahl an Einzelzellen aus Wegener-Granulomen die Detektion anderer Antigene interessant, die zur Selektion und Affinitätsreifung im ektopen lymphatischen Gewebe des Wegener Granuloms führen: Sie können Rückschlüsse über die Pathogenese der Wegener Granulome bzw. die Transformation zur Vaskulitis liefern. Weiterhin könnte es sich bei den produzierten mAbs um Entwicklungsvorstufen der

ANCA handeln, die z.B. gegen ein verwandtes Protein der PR3, kreuzreagierende oder komplementäre Strukturen gerichtet sind.

Zur Ausweitung der Zielantigensuche wurde ein Epitope-Mapping der von uns synthetisierten mAbs mit hEx1- und Unipex1-human-fetal-brain-Macroarrays und einem Unipex2-T-lymphocyte-Macroarray durchgeführt. Auf den PVDF-Membranen sind etwa 27000 bzw. etwa 16000 verschiedene menschliche Proteine im Duplikat aufgetragen. Die Auswertung der Arrays und die anschließenden Spezifitätskontrollen per Dot-Blots ergaben, dass es sich bei zweien der vermeintlichen Treffer um wirkliche Zielantigene handelt: Die mAbs Scu36 und Scu58 sind spezifisch gegen TMEM9B gerichtet und der mAb St140 ist spezifisch gegen Tm4SF2 gerichtet.

5.4. Beurteilung der verifizierten Zielantigene

Humanes lysosomales Transmembranprotein 9B (TMEM9B)

Die zwei mAbs Scu36 und Scu58 zeigten bestätigte Affinität gegen TMEM9B. Diese beiden mAbs stammen aus einer granulomatösen Läsion eines Patienten mit langjähriger lokalisierter WG. Bei diesem Patienten konnten im Serum weder ANCA noch anti-TMEM9B-Ak nachgewiesen werden.

Die Aminosäuresequenzen der CDR3 dieser beiden mAbs waren nicht identisch (siehe Anhang). Das spricht gegen eine Expansion eines einzelnen B-Zell-Klons und es ist von einer B-Zell-Maturation an TMEM9B auszugehen. Im Kontext der lokalisierten WG und der Seronegativität des Patienten gegen anti-TMEM9B, vermuten wir eine auf das entzündliche Gewebe limitierte Autoimmunreaktion.

Strukturell besteht das TMEM9B-Gen aus 6 Exons und ist auf Chromosom 1q41 lokalisiert. Es wird in einem weiten Zell- und Gewebespektrum exprimiert. Das glycosylierte Transmembranprotein besteht aus 185 Aminosäuren. Nachdem ein N-terminales Signalpeptid abgespalten und TMEM9B glycosyliert wird, besitzt es ein Molekulargewicht von etwa 22 kDa (Dodeller et al., 2008). Weiterhin enthält es eine einzelne Transmembranregion, drei potentielle N-Glycosylierungs-Stellen und drei konservierte Cys-reiche-Domänen am N-Terminus (Kveine et al., 2002). Es kommt vor allem auf der Lysosomen- und Endosomenmembran vor. So ist es auf der Lysosomenmembran kolokalisiert zu LAMP-1 (Dodeller et al., 2008), was pathogenetisch von Bedeutung ist. Funktionell wird dem Transmembranprotein 9B

eine Schlüsselstellung im TNF-Signalweg zugeschrieben (Dodeller et al., 2008). Hiernach teilt es sich ein Modul mit dem IL-1-Rezeptor-Signalweg und dem TLR-Signalweg. Zur Produktion der von IL-1 und TLR-Liganden induzierten proinflammatorischen Zytokine wird TMEM9B benötigt. TMEM9B ist jedoch nicht an der durch TNF oder FAS hervorgerufenen Apoptose beteiligt. TMEM9B ist essentiell in der TNF-Aktivierung sowohl über den NF- κ B- als auch über den MAPK-Weg. Es ist RIP1 nachgeschaltet und MAP-K und den I κ B Kinasen vorgeschaltet (Dodeller et al., 2008). Theoretisch könnten anti-TMEM9B-Autoantikörper durch eine Beeinflussung des TNF-Signalweges mit einer Hochregulation der TNF- α -Produktion zur Chronifizierung der Entzündung führen. TNF- α spielt eine prominente Rolle in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen und die Blockade von TNF- α wird therapeutisch eingesetzt (Aries et al., 2007).

Die Kollokalisierung von TMEM9B zu LAMP ist von besonderem pathogenetischem Interesse. Die in dieser Arbeit untersuchten B-Zellrezeptoren aus keimzentrumartigen Strukturen in Wegener Granulomen hatten mit ihrer Spezifität gegen TMEM9B also ein Zielantigen, das auf der lysosomalen Membran direkt benachbart zu LAMP-2 liegt. Die Entstehung der LAMP-2-ANCA wird seit kurzem als Schlüsselvorgang in der Pathogenese von ANCA-assoziierten Vaskulitiden angesehen. Kain et. al konnten einerseits die hohe Pathogenität der LAMP-2-ANCA zeigen (Kain et al., 2008 und 2010) und andererseits einen „molecular mimicry“-Mechanismus des Adhäsins gramnegativer Bakterien FimH gegenüber LAMP-2 nachweisen (Kain et al., 2008). Ob es sich bei den von uns nachgewiesenen, gegen TMEM9B gerichteten B-Zellrezeptoren um Vorstufen von LAMP-2-ANCA handelt, ist nicht klar und im Patientenserum waren keine anti-TMEM9B-Antikörper detektierbar. Zu diesem Zeitpunkt ist die Beurteilung der Relevanz der Autoimmunität gegen TMEM9B für die Pathogenese der WG noch sehr schwierig. Im Zusammenhang mit dem Konzept der Eskalation einer Autoimmunreaktion erscheint es allerdings als möglich, dass es sich bei der Autoimmunität gegen TMEM9B um eine Vorstufe der anti-LAMP2 und anti-PR3-ANCA handeln könnte.

Wir konnten unabhängig von Kain et al. zeigen, dass in der WG eine Autoimmunität gegen Bestandteile der lysosomalen Membran besteht und zudem gelang in dieser Arbeit erstmalig der Nachweis, dass diese Autoimmunität in den Granulomen initiiert wird.

Transmembranprotein 4 der Superfamilie 2 (Tm4SF2) auch Tetraspanin 7

St140, ein mAb eines Patienten mit generalisierter WG zeigte im Dot Blot bestätigte Affinität gegen Tm4SF2. Das Tm4SF2-Gen gehört zur Tetraspanin-Familie und wird auch als Tetraspanin 7 bezeichnet. Weitere Bezeichnungen sind CD 231, T-cell acute lymphoblastic leukemia associated antigen 1 (TALLA 1) oder auch X chromosome surface marker 1. Die meisten Mitglieder der Tetraspaninfamilie sind Zellmembranproteine mit hydrophoben Seitenketten. Das Tm4SF2-Gen liegt auf dem X-Chromosom. Das Protein besteht aus 249 Aminosäuren und wird glycosyliert. Es wird vor allem von Neuronen im Kortex und im Hypocampus exprimiert und hat eine Funktion in neuronalen Wachstums- und Differenzierungsprozessen, u.a. durch Komplexbildung mit beta-1-Integrinen. In diesem Zusammenhang führt ein Funktionsausfall des Tm4SF2 zu einer X chromosomalen mentalen Retardation (Zemni et al., 2000). Weiterhin scheint Tm4SF2 mit neurologischen Erkrankungen wie Chorea Huntington, dem fragilen X-Syndrom oder der myotonen Dystrophie assoziiert zu sein. Ein Autoantikörper gegen Tm4SF2 ist bisher noch nicht beschrieben. Tm4SF2 hat jedoch im Gegensatz zu TMEM9B keinen erwiesenen Einfluss auf die Entzündungsaktivität.

5.5. Beurteilung der Protein-Makroarrays zur Bestimmung von Autoantigenen

Bei der Auswertung der Proteinarrays sind 7 Treffer als vermeintlich geltende Zielantigene hervorgegangen:

- für den hEx1 Array: gamma Actin, Ubiquitin-spezifische Protease 34
- für den Unipex1 Array: Pyruvatcarboxylase 3, Alkoholdehydrogenase 5, Transmembranprotein 9B, Transmembranprotein 4 der Superfamilie 2
- für den Unipex2 Array: Kollagen Typ VI α 1

Von diesen sieben vermeintlichen Treffern bestätigten sich im anschließendem Dot-Blot nur zwei: das lysosomale Transmembranprotein 9B und das Transmembranprotein 4 der Superfamilie 2. Eine mögliche Ursache für die 5 falschen Treffer könnte der erhöhte Hintergrund des verwendeten Detektionssystems sein, das auf einer Biotin-Streptavidin-Interaktion basiert.

Für den mAb Hm0507 konnte noch kein Zielantigen gefunden werden. Hier könnte es sinnvoll sein, cDNA-Expressionsbanken anderer Gewebe zu screenen und so die Zielantigen suche auszudehnen. So existieren ähnliche Arrays beispielsweise auch

für humane Testis-cDNA-Expressionsbanken. Die benötigte Menge von etwa 500 µg der jeweiligen mAbs ließe sich mit dem Baculovirusexpressionssystem schnell synthetisieren. Als Alternative zu den Proteinarrays könnte eine Zielantigenuche durch Phage Library Screening durchgeführt werden. Vorteil dieser Methode wäre, dass durch die zufällige Aminosäureanordnung $2,7 \times 10^9$ verschiedene 12-mer Peptide auf eine Affinität mit den synthetisierten mAbs getestet werden könnten, womit die Wahrscheinlichkeit, Treffer zu finden, erhöht wäre. Nachteil dieser Methode ist, dass es sich bei identifizierten Zielantigenen eventuell um künstliche Konstrukte handelt, die in der Natur nicht existieren.

5.6. Zielantigenuche im mikrobiellen Spektrum

Kain et al. erbrachten im Zeitraum der Entstehungsphase dieser Doktorarbeit den ersten Nachweis, dass „molecular mimicry“-Mechanismen bei ANCA-assoziierten Vaskulitiden eine zentrale Rolle spielen. So gibt es eine Kreuzreaktivität des bakteriellen Adhäsins FimH mit LAMP-2-ANCA. Anschließend konnten LAMP-2-ANCA mit konsekutiven fokal nekrotisierenden Glomerulonephritiden in Ratten durch Immunisierung mit FimH induziert werden. Weiter zeigten sie zudem die hohe Prävalenz und Pathogenität der LAMP-2-ANCA. LAMP-2-ANCA wurden 1995 von Kain et al. erstmals beschrieben, was vielleicht erklärt, warum gerade diese Arbeitsgruppe über LAMP-ANCA weiterforschte (Kain et al., 1995). Bis zur Veröffentlichung ihres Papers über die Kreuzreaktivität von LAMP-2 und FimH (Kain et al., 2008) konzentrierte sich die Forschung der absoluten Mehrzahl der auf dem Gebiet der ANCA-assoziierten Vaskulitiden forschenden Arbeitsgruppen auf PR3-ANCA und MPO-ANCA. Wir vermuteten ein „molecular mimicry“ eines mikrobiellen Antigens mit PR3. Dieses konnte bisher noch nicht gezeigt werden, könnte aber dennoch einen entscheidenden Anteil an der Entstehung der WG haben. Zur Eingrenzung möglicher kreuzreaktiver Antigene der PR3 im mikrobiellen oder viralen Spektrum verwendeten wir die bereits in der Einleitung erwähnte Merops-Datenbank. Sie klassifiziert Peptidasen und Peptidase-Inhibitoren hierarchisch und strukturbasiert (<http://merops.sanger.ac.uk/>). So werden Peptidasen ab einer gewissen Aminosäuresequenz- und Strukturhomologie zu einer Familie zusammengefasst und wiederum verwandte Familien bilden Clans. Die PR3 gehört demzufolge zu der Unterfamilie „S1A“ der „Chymotrypsinartigen Serinproteasen“. Dieser gehören rund 4200 Mitglieder an. Der verwandten Unterfamilie „S1B“, die

nach der Glutamyl peptidase I des *Staphylococcus aureus* benannt ist, gehören weitere 1600 Mitglieder an. Darüberhinaus wird die Familie „S1“ anhand von gleichen Proteinfaltungen oder katalytischen Überhängen dem Clan „PA“ zugeordnet. Wie in Tabelle 4 zu sehen ist, sind die annähernd 7000 Peptidasen des Clans PA in Bakterien, Protozoen, Archaeen, Pilzen, Viren, Pflanzen und tierischen Zellen vertreten. Gemeinsam besitzen sie die katalytische Triade His, Asp/Glu und Ser. Es wird vermutet, dass die Serinpeptidasen dieses Clans evolutionär sehr alt und durch RNA-Viren auf die Wirte übertragen worden sind. In Viren bestehen einige der Serinpeptidase-Familien in gleicher Form weiter, dagegen wurde bei anderen, vor allem viralen Familien im katalytischen Zentrum das Serin durch Cystein ersetzt.

Tab. 6: Verwandte Proteasen der Proteinase 3 nach der Merops-Datenbank

Familie	Sequenzen	Bakterien	Archaea	Protozoen	Pilze	Pflanzen	Tierische Zellen	Viren
C3: (picornain family)	259	-	-	-	-	-	-	+
C4: (Nla protease family)	86	-	-	-	-	-	-	+
C24: rabbit hemorrhagic disease virus 3C-like peptidase	19	-	-	-	-	-	-	+
C30: porcine transmissible gastroenteritis virus-type main peptidase	42	-	-	-	-	-	-	+
C37: calicivirin ('Southampton virus')	15	-	-	-	-	-	-	+
C62: gill-associated virus 3C-like peptidase	1	-	-	-	-	-	-	+
S1: chymotrypsin family	6009	+	+	+	+	+	+	+
S3: togavirin family	67	-	-	-	-	-	-	+
S6: IgA1-specific serine peptidase ({Neisseria}-type)	76	+	-	-	-	-	-	+
S7: flavivirin family	59	-	-	-	-	-	+	+
S29: hepacivirin ('hepatitis C virus')	16	-	-	-	-	-	-	+
S30: potyvirus P1 peptidase ('plum pox virus')	60	-	-	-	-	-	-	+
S31: pestivirus NS3 polyprotein peptidase ('bovine viral diarrhea virus 1')	17	-	-	-	-	-	-	+
S32: equine arteritis virus serine peptidase ('equine arteritis virus')	7	-	-	-	-	-	-	+
S39: sobemovirus peptidase ('cocksfoot mottle virus')	30	-	-	-	-	-	-	+
S46: dipeptidyl-peptidase 7 (Porphyromonas gingivalis)	113	+	-	-	-	-	-	-
S55: SpoIVB peptidase (Bacillus subtilis)	52	+	-	-	-	-	-	-
S64: Ssy5 peptidase (Saccharomyces cerevisiae)	8	-	-	-	+	-	-	-
Clan	6936	+	+	+	+	+	+	+

In der Tabelle sind die Angehörigen Familien des Clans PA aufgelistet, die alle die katalytische Triade His, Asp/Glu und Ser besitzen. Die PR3 gehört der Untergruppe der S1-Familien mit über 6000 weiteren Mitgliedern an.

Für unsere Studie zur Kreuzreaktivität mit mikrobiellen Lysaten stand nur ein Panel von Lysaten aus 9 Bakterien und einem Pilz zur Verfügung. Für zukünftige Studien

zur Untersuchung einer Kreuzreaktivität würde es sich anbieten, nach Affinitäten der PR3-, MPO- und LAMP-2-ANCA allgemein und speziell auch der aus mikrodisszierten Einzelzellen synthetisierten mAbs gegen Antigene dieser unter der Merops-Datenbank als verwandt klassifizierten Peptidasen zu suchen. Interessant wäre beispielsweise dass dort aufgeführte Equine arteriitis virus.

Neben einem „molecular mimicry“ könnte eine Infektion durch weitere Mechanismen zur Entstehung der WG beitragen. Eine Infektion führt zu einer lokal verstärkten Entzündungsantwort, die zu einer Aufhebung der Segregation oder möglicher Aktivierung von autoreaktiven Bystander-Zellen führen kann. Auch die PR3 induziert z.B. die Reifung dendritischer-Zellen, die dann zu einem Priming von Th1 führen (Csernok et al., 2006).

Für die Entstehung der WG gilt ein epidemiologischer Zusammenhang mit einer Staphylococcus aureus-Infektion als gesichert und allgemein akzeptiert (Popa et al., 2002 und 2003). Interessanterweise banden die von uns synthetisierten mAbs so auch an Lysate von Staphylococcus, nicht aber an die Lysate von acht anderen Bakterien und einem Pilz. Desweiteren zeigte der monoklonale Kontrollantikörper, ein ebenfalls mit demselben Baculovirussystem synthetisierter anti-CD29-Antikörper, keine Affinität zu dem Staphylococcus-Lysat. Dieses Ergebnis scheint die epidemiologisch nachgewiesene Beteiligung des Staphylococcus aureus zu untermauern.

5.7. Perspektiven

Erstmals konnten in dieser Arbeit ausgehend von einzelnen B-Lymphozyten, die in keimzentrumartigen Strukturen in Wegener Granulomen lokalisiert waren, komplette rekombinante humane mAbs hergestellt werden. Diese 4 mAbs wurden mithilfe des Baculovirus-Insektenzell-Systems synthetisiert und ein mAb konnte mithilfe eines 2A-Peptid-basierten Systems in HEK-293-Zellen exprimiert werden. Die IgGk Antikörper wurden mit Coomassiegelfärbungen, Western Blots und ELISA nachgewiesen und in ihrer funktionsfähigen Struktur bestätigt. Das Baculovirus-Insektenzellsystem erwies sich aufgrund der möglichen Synthese großer Proteinmengen als effizientes und gut geeignetes System. In Zukunft können mit dem Baculovirussystem nun auch IgG mit λ -Leichtketten synthetisiert werden.

Durch weitere charakterisierte B-Zellen aus WG-Geweben wird die bis dato geringe - und damit nur eingeschränkt repräsentative - Zahl an Immunglobulinen kontinuierlich erweitert und anhand der Zuordnung zu unterschiedlichen Krankheitsstadien und -verläufen analysiert.

Die synthetisierten mAbs zeigten keine Affinität gegen PR3. In der indirekten Immunfluoreszenz zeigten sich keine zytoplasmatischen Fluoreszenzmuster in fixierten neutrophilen Granulozyten. Mit Dot Blots mikrobieller Lysate zeigten wir, wie bereits weiter oben erwähnt, eine Bindung synthetisierter mAbs gegen das Lysat von *Staphylococcus aureus*. Dies scheint die aus klinischen Studien bekannte Assoziation der aktiven WG mit *Staphylococcus aureus* im Sinne einer assoziierten Immunreifung im Wegener Granulom zu untermauern. In Folgeprojekten müssen diese Befunde nun zunächst bestätigt werden und anschließend sollten die verantwortlichen mikrobiellen Zielantigene mithilfe genauerer Methoden, z.B. mit einem *Staphylococcus aureus*-Protein-Array näher bestimmt werden. Auch könnte die Suche nach kreuzreaktiven mikrobiellen Antigenen zur PR3 und MPO mithilfe bioinformatischer Sequenzabgleichungen ergänzt werden.

Zur Identifizierung der Zielantigene der mAbs screenen wir die Klone zweier human fetal brain und einer T-lymphocyte cDNA-Expressionsbank mithilfe von Makroarrays des Deutschen Ressourcenzentrums für Genomforschung (RZPD) bzw. Imagenes. Damit wurden die Zielantigene TMEM9B und Tm4SF2 gefunden. Die Bindung wurde in folgenden Immunodotblot-Untersuchungen bestätigt. Die Sequenzanalyse der mAbs deutet auf eine B-Zell-Maturitätsreifung an TMEM9B im Granulom hin. Ein Screening des Patientenserums ergab keinen anti-TMEM9B-Ak-Titer. Allerdings handelte es sich bei dem Patienten um ein lokalisiertes Stadium der WG. TMEM9B ist ein Protein der lysosomalen Membran. 2008 konnten Kain et al. nachweisen, dass die Autoimmunität gegen Proteine der lysosomalen Membran (LAMP-2) bei ANCA-assoziierten Vaskulitiden eine Schlüsselrolle spielt. Unsere Arbeit zeigt, dass B-Zellen keimzentrumartiger Strukturen in Wegener Granulomen spezifisch gegen ein weiteres Bestandteil der lysosomalen Membran gerichtet sind. Dies könnte auf einen Eskalationsmechanismus einer Autoimmunreaktion hindeuten. Zudem ist TMEM9B ein Schlüsselregulator von TNF- α (Dodeller et al., 2008). TNF- α nimmt pathogenetisch eine zentrale Rolle bei der Entstehung von chronischen

Entzündungen und dem Bruch der Selbsttoleranz ein. So könnten Anti-TMEM9B-Autoantikörper eine Entzündungs- und Autoimmunreaktion triggern.

Das andere gefundene Zielantigen, Tm4SF2 (CD231), wird vor allem im ZNS und Endothel exprimiert. Die Anti-Tm4SF2-Autoantikörper sind die ersten antineuronalen Antikörper, die im Rahmen der WG beschrieben worden sind. Weiter bleibt unklar, ob die Autoimmunreaktion gegen Tm4SF2 eine Endothelschädigung hervorruft und so an der Entstehung der Vaskulitis mitbeteiligt ist.

Diese Arbeit ist durch die geringe Anzahl der mAbs, die ausgehend von B-Zellen aus Wegener Granulomen synthetisiert wurden, in ihrer Aussagekraft über allgemeine Mechanismen in der WG limitiert. So werden momentan weitere mAbs synthetisiert. Zudem wurden funktionelle Untersuchungen der Interaktion der mAbs mit TMEM9B und Tm4SF2 begonnen.

Insgesamt aber stellt die Synthese rekombinanter monoklonaler humaner Antikörper ausgehend von mikrodissezierten B-Zellen aus Wegener Granulomen mit nachfolgender Identifizierung der Zielantigene einen vielversprechenden Weg zur Erforschung der Pathogenese der WG dar.

5.8. Anhang:

Hm0507/10VH:

```
Hm0507/10-VH4
X05715 IGHV4-39*02
L10094 IGHV4-39*01
X92259 IGHV4-39*03
M95116 IGHV4-39*05
Z14236 IGHV4-39*06

<----- FR1-IMGT -----
.....gaccctgtcc
cagctgcagctgcaggagtcgggcca...ggactggtgaagccttcgga-----
cagctgcagctgcaggagtcgggcca...ggactggtgaagccttcgga-----
cagctgcagctgcaggagtcgggcca...ggactggtgaagccttcgga-----
cagctgcagctgcaggagtcgggcca...ggactggtgaagccttcgga-----c----
cggctgcagctgcaggagtcgggcca...ggactggtgaagccttcgga-----
```

```
----->_____ CDR1-IMGT _____<-----
ctcactgcgctgtcactgggttccctccatcagcagctttaattcttac.....tgggcc
-----a-----t-----gg-----ag--g--ac---.....---g-
-----a-----t-----gg-----ag--g--ac---.....---g-
-----a-----t-----gg-----ag--g--ac---.....---g-
-----a-----t-----gg-----ag--g--ac---.....---g-
-----a-----t-----gg-----ag--g--ac---.....---g-
```

```
----- FR2-IMGT ----->_____ CDR
tggatccgccagccccaggaaggactggagtgattggaagtatttattacagaggg
-----g-----g-----c-----t--t--
-----g-----g-----c-----t--t--
-----g-----g-----c-----t--t--
-----g-----g-----c-----t--t--
-----g-----g-----c-----t--t--
```

```
2-IMGT _____<-----
aacacc.....tattacaaccgctccctcaag...agtcgagctccatattccgta
-g-----c-----.....a-----
-g-----c-----.....a-----
-g-----c-----.....a-----
-g-----c-----.....a-----
-g-----c-----.....a-----a-----
```

```
----- FR3-IMGT -----
gacgctccagcaaccacttctccctgaggctaagatctgtgaccgcccagacacggct
---a-----ag-----g-----a--g--c-----
---a-----ag-----g-----a--g--c-----
---a-----ag-----g-----a--g--c-----
---a-----ag-----g-----a--g--c-----
---a-----ag-----g-----a--g--c-----g-----c
```

```
----->_____ CDR3-IMGT _____
gtgtattattgtgagacttatgtggttaggggaattattatatgactggttcgacccc
-----c-----ga
-----c-----a
-----c-----
-----c-----
-----c-----ga
```

Hm0507/10VK:

```
Hm0507/10-VK2
X63397 IGKV2-28*01
X12691 IGKV2D-28*01
X63400 IGKV2-18*01 (P)
X63395 IGKV2D-18*01 (P)
X59311 IGKV2D-40*01

<----- FR1-IMGT -----
.....cagctctccactctccctgtccgtcaccctggagagccggcctcc
gatattgtgatgact-----c-----
gatattgtgatgact-----c-----
gatattgtgatgacc---a-----c-----c-----a-----
gatattgtgatgacc---a-----c-----c-----a-----
gatattgtgatgacc---a-----c-----c-----
```

```
----->_____ CDR1-IMGT _____<-----
atctcctgcagggtctagtcagagcctcctgcatagtaatggatacaactat...ttggat
-----c-----
-----c-----
-----c-----
-----t-----t-----c-----c-----
-----a-----t-----c-----c-----
-----t-----g-----g-----atgga---acctat-----
```

```

----- FR2-IMGT ----->_____ CDR
Hm0507/10-VK2      tggtagcctgcagaagccagggcagctctccacagctcctgatctattgggttct.....
X63397 IGKV2-28*01 -----
X12691 IGKV2D-28*01 -----
X63400 IGKV2-18*01 (P) -----t--ag--t--c.....
X63395 IGKV2D-18*01 (P) -----c-----a-----t--ag--t--c.....
X59311 IGKV2D-40*01 -----ac-ct--c.....

```

```

2-IMGT _____<-----
Hm0507/10-VK2      .....aatcgggcctccggggtcct...gacaggttcagtggcagtgga
X63397 IGKV2-28*01 -----
X12691 IGKV2D-28*01 -----
X63400 IGKV2-18*01 (P) .....--atcctt--t-----a...-----t-----g
X63395 IGKV2D-18*01 (P) .....-g--tttt--t-----a...-----t-----g
X59311 IGKV2D-40*01 .....t-----t--a----a...-----g

```

```

----- FR3-IMGT -----
Hm0507/10-VK2      .....tcaggcacagattttacactgaaaatcagcagagtgaggctgaggatgttggg
X63397 IGKV2-28*01 -----
X12691 IGKV2D-28*01 -----
X63400 IGKV2-18*01 (P) .....----t-gt----c-----t-g-----
X63395 IGKV2D-18*01 (P) .....----gt----c-----t-g-----
X59311 IGKV2D-40*01 .....----t----c-----g-----a

```

```

----->_____ CDR3-IMGT _____
Hm0507/10-VK2      gtttattactgcatgcaagctctacaaactccttttggccaagggaccaaggtggaatc
X63397 IGKV2-28*01 -----cc
X12691 IGKV2D-28*01 -----cc
X63400 IGKV2-18*01 (P) -----ac--gtt----
X63395 IGKV2D-18*01 (P) -----ac--gtt----
X59311 IGKV2D-40*01 -----cg-a--g-gtt----c

```

Scu0107/58VH:

```

<----- FR1-IMGT -----
Scu0107/58 VH3      .....gggtccctgaga
L06615 IGHV3-30*04 caggtgcagctggtggagtctggggga...ggcgtggtccagcctggga-----
X92283 IGHV3-30-3*01 caggtgcagctggtggagtctggggga...ggcgtggtccagcctggga-----
M77324 IGHV3-30*14 caggtgcagctggtggagtctggggga...ggcgtggtccagcctggga-----
X92214 IGHV3-30*18 caggtgcagctggtggagtctggggga...ggcgtggtccagcctggga-----
M77302 IGHV3-30-3*02 caggtgcagctggtggagtctggggga...ggcgtggtccagcctggga-----

```

```

----->_____ CDR1-IMGT _____<-----
Scu0107/58 VH3      ctctcctgtgcagctctctggattcgccttcagagattatgct.....atgcac
L06615 IGHV3-30*04 -----c-----a-----tagc-----
X92283 IGHV3-30-3*01 -----c-----a-----tagc-----
M77324 IGHV3-30*14 -----c-----a-----tagc-----
X92214 IGHV3-30*18 -----c-----a-----tagc-----gc.....
M77302 IGHV3-30-3*02 -----cg-----a-----tagc-----

```

```

----- FR2-IMGT ----->_____ CDR
Scu0107/58 VH3      tgggtccgtcaggtccaggcaagggcgtggagtgggtggcacttatatcctatgatgca
L06615 IGHV3-30*04 -----c-----g-----a-----g-----
X92283 IGHV3-30-3*01 -----c-----g-----a-----g-----
M77324 IGHV3-30*14 -----c-----g-----a-----g-----
X92214 IGHV3-30*18 -----c-----g-----a-----g-----
M77302 IGHV3-30-3*02 -----c-----g-----a-----g-----

```

```

2-IMGT _____<-----
Scu0107/58 VH3      aggaacaag.....tactatgcagactccgtgaag...ggccgattcaccatttccaga
L06615 IGHV3-30*04 --t--t--a.....-----c-----...-----c-----
X92283 IGHV3-30-3*01 --c--t--a.....-----c-----...-----c-----
M77324 IGHV3-30*14 --t--t--a.....-----c-----...-----c-----
X92214 IGHV3-30*18 --t--t--a.....-----c-----...-----c-----
M77302 IGHV3-30-3*02 --c--t--a.....-----c-----...-----c-----

```

```

----- FR3-IMGT -----
Scu0107/58 VH3 gacaattccaagatggctctgcatctggagatggacagcctgacaattgaggacacggct
L06615 IGHV3-30*04 -----aca-g---t----c-a---a-----g-gc-----
X92283 IGHV3-30-3*01 -----aca-g---t----c-a---a-----g-gc-----
M77324 IGHV3-30*14 -----aca-g---t----tc-a---a-----g-gc-----
X92214 IGHV3-30*18 -----aca-g---t----c-a---a-----g-gc-----
M77302 IGHV3-30-3*02 -----aca-g---t----c-a---a-----g-gc-----

```

```

----->_____ CDR3-IMGT _____
Scu0107/58 A- VH3 gtctattattgtgcgagaggtcgggagtatcgtgggtcagggaatcaaaatgacgggtccc
L06615 IGHV3-30*04 --g-----c-----a
X92283 IGHV3-30-3*01 --g-----c-----
M77324 IGHV3-30*14 --g-----c-----a
X92214 IGHV3-30*18 --g-----c-----a-a
M77302 IGHV3-30-3*02 --g-----c-----a-a

```

Scu0107/58Vk:

```

<----- FR1-IMGT -----
Scu0107/58-VK3 ....ttgtgttgacacagtctccaggcaccctgtctgctcctccagggaaacagccacc
M23090 IGKV3-15*01 gaaa-a---a---g-----c-----t-----g-----
X72815 IGKV3D-15*01 gaaa-a---a---g-----c-----t-----g-----
M23091 IGKV3D-15*02 (P) gaaa-a---a---tg-----c-----t-----g-----
L37730 IGKV3-NL3*01 gaaa-----a-----tt-----g-----
L37728 IGKV3-NL1*01 gaaa-----c-----tt-----g-----

```

```

----->_____ CDR1-IMGT _____<-----
Scu0107/58-VK3 ctctcctgcagggccagtcagagtgttcgcagcaag.....ttagcc
M23090 IGKV3-15*01 -----a-----c-----
X72815 IGKV3D-15*01 -----a-----c-----
M23091 IGKV3D-15*02 (P) -----a-----c-----
L37730 IGKV3-NL3*01 -----a-----gctac.....
L37728 IGKV3-NL1*01 -----a-----t-c-----

```

```

----- FR2-IMGT ----->_____ CDR
Scu0107/58-VK3 tggtagcaaacagaaacctggcctggctcccaggctcctcatctatgatgcctcc.....
M23090 IGKV3-15*01 -----g-----a-----g---a-----
X72815 IGKV3D-15*01 -----g-----a-----g---a-----
M23091 IGKV3D-15*02 (P) -----g-----a-----g---a-----
L37730 IGKV3-NL3*01 -----g-----g-----g---a-----
L37728 IGKV3-NL1*01 -----a-----g---a-----

```

```

2-IMGT _____<-----
Scu0107/58-VK3 .....accagggccacgggtatccca...gccaggttcagtgccggtggg
M23090 IGKV3-15*01 .....-----t-----..-----a-----
X72815 IGKV3D-15*01 .....-----t-c-----..-----a-----
M23091 IGKV3D-15*02 (P) .....-----t-c-----..-----a-----
L37730 IGKV3-NL3*01 .....-----t-----..-----a-----
L37728 IGKV3-NL1*01 .....-----t-c-----..-----a-----

```

```

----- FR3-IMGT -----
Scu0107/58-VK3 .....tctgagacagacttcactctcaccatcagcagtcctgagtcctgaagattttgca
M23090 IGKV3-15*01 .....---g-----g-----c-----
X72815 IGKV3D-15*01 .....---g-----g-----c-----
M23091 IGKV3D-15*02 (P) .....---g-----g-----c-----
L37730 IGKV3-NL3*01 .....---g-----g-----a-----
L37728 IGKV3-NL1*01 .....---g-----g-----c-----

```

```

----->_____ CDR3-IMGT _____
Scu0107/58-VK3 atgtattactgtcagcagatataatcaatggcctccgatcaccttcggccaagggacacga
M23090 IGKV3-15*01 g-t-----a-c-----
X72815 IGKV3D-15*01 g-t-----a-c-----
M23091 IGKV3D-15*02 (P) g-t-----a-c-a-----
L37730 IGKV3-NL3*01 g-t-----
L37728 IGKV3-NL1*01 g-t-----

```

Scu0107/36VH:

Scu0107/36-VH4
Z14237 IGHV4-31*03
M95120 IGHV4-31*04
M99683 IGHV4-31*02
X92270 IGHV4-31*06
X92271 IGHV4-31*07

<----- FR1-IMGT -----
.....gaccctgtcc
caggtgcagctgcaggagtcgggcca...ggactggtgaagccttcaca-----
caggtgcggctgcaggagtcgggcca...ggactggtgaagccttcaca-----
caggtgcagctgcaggagtcgggcca...ggactggtgaagccttcaca-----
caggtgcagctgcaggagtcgggcca...ggactggtgaagccttcaca-----

Scu0107/36-VH4
Z14237 IGHV4-31*03
M95120 IGHV4-31*04
M99683 IGHV4-31*02
X92270 IGHV4-31*06
X92271 IGHV4-31*07

-----> CDR1-IMGT <-----
ctcacctgcgctgtctctggtggctccatcagcagtggtggttactac.....tggaac
-----a-----g-
-----a-----g-
-----ta-----g-
-----a-----a-----g-
-----a-----a-----g-

Scu0107/36-VH4
Z14237 IGHV4-31*03
M95120 IGHV4-31*04
M99683 IGHV4-31*02
X92270 IGHV4-31*06
X92271 IGHV4-31*07

----- FR2-IMGT -----> CDR
tggatccgccagcaccaggaaggcctggagtgattgggtacatttattacagtggg
-----c-----
-----c-----
-----c-----
-----c-----
-----c-----

Scu0107/36-VH4
Z14237 IGHV4-31*03
M95120 IGHV4-31*04
M99683 IGHV4-31*02
X92270 IGHV4-31*06
X92271 IGHV4-31*07

2-IMGT <-----
agcgc.....tactacagcccgtccctcaag...agtcgagtttccatatcaata
--a--.....-a-----g--
--a--.....-a-----g--
--a--.....-a-----g--
--a--.....-a-----g--
--a--.....-a-----g--

Scu0107/36-VH4
Z14237 IGHV4-31*03
M95120 IGHV4-31*04
M99683 IGHV4-31*02
X92270 IGHV4-31*06
X92271 IGHV4-31*07

----- FR3-IMGT -----
gacacgtctaagaaccagttctccctgaaggtgaggtctgagctgccgggacacggcc
-----c---c---t-----
-----c---c---t-----
-----c---c---t-----
-----c---c---t-----
-----c---c---t-----

Scu0107/36-VH4
Z14237 IGHV4-31*03
M95120 IGHV4-31*04
M99683 IGHV4-31*02
X92270 IGHV4-31*06
X92271 IGHV4-31*07

-----> CDR3-IMGT
gtgtattactgtgcgagaggggactagtggtgtatgctccattgactcctggggccaa
-----a
-----a

Scu0107/36Vk:

Scu0107/36-VK1
J00248 IGKV1-16*01
K01323 IGKV1D-16*01
V00558 IGKV1D-16*02
X72808 IGKV1-17*01
X63392 IGKV1D-17*01

<----- FR1-IMGT -----
gacatccagatgaccagtcctccatcctcactgtctgcatctgtaggagacagagtcaac
-----c-
-----c-
-----c-
-----c-
a-----tg-ca-----c-

Scu0107/36-VK1
J00248 IGKV1-16*01
K01323 IGKV1D-16*01
V00558 IGKV1D-16*02
X72808 IGKV1-17*01
X63392 IGKV1D-17*01

-----> CDR1-IMGT <-----
atcacttgtcggcgagtcagggcattagcaattac.....ttagcc
-----t-----
-----t-----gc-gg-----
-----g---t-----gc-gg-----
-----c---a-----a---g-t-----g-
-----g-----t-----

```

----- FR2-IMGT ----->_____ CDR
Scu0107/36-VK1
J00248 IGKV1-16*01
K01323 IGKV1D-16*01
V00558 IGKV1D-16*02
X72808 IGKV1-17*01
X63392 IGKV1D-17*01

```

```

2-IMGT _____<-----
Scu0107/36-VK1
J00248 IGKV1-16*01
K01323 IGKV1D-16*01
V00558 IGKV1D-16*02
X72808 IGKV1-17*01
X63392 IGKV1D-17*01

```

```

----- FR3-IMGT -----
Scu0107/36-VK1
J00248 IGKV1-16*01
K01323 IGKV1D-16*01
V00558 IGKV1D-16*02
X72808 IGKV1-17*01
X63392 IGKV1D-17*01

```

```

----->_____ CDR3-IMGT _____
Scu0107/36-VK1
J00248 IGKV1-16*01
K01323 IGKV1D-16*01
V00558 IGKV1D-16*02
X72808 IGKV1-17*01
X63392 IGKV1D-17*01

```

St140 Sequenzen*
ST140 VH:

```

<----- FR1-IMGT -----
St140 vh
X56360 IGHV4-59*07
L10088 IGHV4-59*01
M29812 IGHV4-59*02
M95114 IGHV4-59*03
M95117 IGHV4-59*04

```

```

----->_____ CDR1-IMGT _____<-----
St140 vh
X56360 IGHV4-59*07
L10088 IGHV4-59*01
M29812 IGHV4-59*02
M95114 IGHV4-59*03
M95117 IGHV4-59*04

```

```

----- FR2-IMGT ----->_____ CDR
St140 vh
X56360 IGHV4-59*07
L10088 IGHV4-59*01
M29812 IGHV4-59*02
M95114 IGHV4-59*03
M95117 IGHV4-59*04

```

```

2-IMGT _____<-----
St140 vh
X56360 IGHV4-59*07
L10088 IGHV4-59*01
M29812 IGHV4-59*02
M95114 IGHV4-59*03
M95117 IGHV4-59*04

```



```

----- FR3-IMGT -----
St140 vh
X56360 IGHV4-59*07 gacacaaccaacaaccggttctccctgaacctcagctctgtgaccgctggagacacggcc
L10088 IGHV4-59*01 -----gt---g---a-----g-g-----cg-----
M29812 IGHV4-59*02 -----gt---g---a-----g-g-----cg-----
M95114 IGHV4-59*03 -----gt---g---aa-----g-g-----cg-----
M95117 IGHV4-59*04 -----gt---g---a-----g-g-----c-c-----t

```

```

----->_____ CDR3-IMGT _____
St140 vh
X56360 IGHV4-59*07 gtgtattattgtgtgagaggaaacggcgctcctatcctggggccaaggaaccctgggtg
L10088 IGHV4-59*01 -----c---c-----
M29812 IGHV4-59*02 -----c---c-----a
M95114 IGHV4-59*03 -----c---c-----
M95117 IGHV4-59*04 -----c---c-----

```

ST140VK:

```

<----- FR1-IMGT -----
St140 m13 reverse
V01577 IGKV1-12*01 gacatccagatgaccagctctccatcttccgtgtctgcatctgtaggagacagagtcacc
V01576 IGKV1-12*02 -----
V01576 IGKV1D-12*02 -----
X17263 IGKV1D-12*01 -----t-----
K01323 IGKV1D-16*01 -----c-ac-----

```

```

----->_____ CDR1-IMGT _____<-----
St140 m13 reverse
V01577 IGKV1-12*01 atcacttgtcggcgagtcagggtatttagcagctgg.....ttagcc
V01576 IGKV1-12*02 -----
V01576 IGKV1D-12*02 -----
X17263 IGKV1D-12*01 -----
K01323 IGKV1D-16*01 -----

```

```

----- FR2-IMGT ----->_____ CDR
St140 m13 reverse
V01577 IGKV1-12*01 tggtatcagcagaaccagggaaagccctaagctcctgatctatgctgcatcc.....
V01576 IGKV1-12*02 -----
V01576 IGKV1D-12*02 -----
X17263 IGKV1D-12*01 -----
K01323 IGKV1D-16*01 -----a-----tc-----

```

```

2-IMGT _____<-----
St140 m13 reverse
V01577 IGKV1-12*01 .....agtttgcaaagtggggtccca...tcaaggttcagcggcagtgga
V01576 IGKV1-12*02 -----
V01576 IGKV1D-12*02 -----
X17263 IGKV1D-12*01 -----
K01323 IGKV1D-16*01 -----

```

```

----- FR3-IMGT -----
St140 m13 reverse
V01577 IGKV1-12*01 .....tctgggacagatttactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagattttgca
V01576 IGKV1-12*02 -----
V01576 IGKV1D-12*02 -----
X17263 IGKV1D-12*01 -----t-----
K01323 IGKV1D-16*01 -----

```

```

----->_____ CDR3-IMGT _____
St140 m13 reverse
V01577 IGKV1-12*01 acttactattgtcaacaggctaacagtttccctccaagcaccttcggccaaggacactc
V01576 IGKV1-12*02 -----t-----
V01576 IGKV1D-12*02 -----t-----
X17263 IGKV1D-12*01 -----
K01323 IGKV1D-*01 -----t-c-c-----ta--t--a-----

```

Scu0107/36VH:

Scu0107/36 VH4-Mini7
Z14237 IGHV4-31*03
M99683 IGHV4-31*02
M95120 IGHV4-31*04
X92270 IGHV4-31*06
X92271 IGHV4-31*07
<----- FR1-IMGT -----
cagctgcagctgcaggagtcgggcca...ggactggtgaagccttcggagaccctgtcc
---g-----ac-----
---g-----ac-----
---g-g-----ac-----
---g-----ac-----
---g-----ac-----

Scu0107/36 VH4-Mini7
Z14237 IGHV4-31*03
M99683 IGHV4-31*02
M95120 IGHV4-31*04
X92270 IGHV4-31*06
X92271 IGHV4-31*07
-----> CDR1-IMGT <-----
ctcacctgcgctgtctctgggtggctccatcagcagtggtggttactac.....tggaac
-----a-----g-----
-----ta-----g-----
-----a-----g-----
-----a-----a-----g-----
-----a-----a-----g-----

Scu0107/36 VH4-Mini7
Z14237 IGHV4-31*03
M99683 IGHV4-31*02
M95120 IGHV4-31*04
X92270 IGHV4-31*06
X92271 IGHV4-31*07
----- FR2-IMGT -----> CDR
tggatccgccagcaccaggaaggcctggagtgattgggtacatttattacagtggtgg
-----c-----
-----c-----
-----c-----
-----c-----
-----c-----

Scu0107/36 VH4-Mini7
Z14237 IGHV4-31*03
M99683 IGHV4-31*02
M95120 IGHV4-31*04
X92270 IGHV4-31*06
X92271 IGHV4-31*07
2-IMGT <-----
agcgcc.....tactacagcccgtccctcaag...agtcgagtttccatatcaata
---a--.....-a-----a-----g--
---a--.....-a-----a-----g--
---a--.....-a-----a-----g--
---a--.....-a-----a-----g--
---a--.....-a-----a-----g--

Scu0107/36 VH4-Mini7
Z14237 IGHV4-31*03
M99683 IGHV4-31*02
M95120 IGHV4-31*04
X92270 IGHV4-31*06
X92271 IGHV4-31*07
----- FR3-IMGT -----
gacacgtctaagaaccagttctcctgaaggtgaggtctgctgactgccgggacacggcc
-----c---c---t-----
-----c---c---t-----
-----c---c---t-----
-----c---c---t-----
-----c---c---t-----

Scu0107/36 VH4-Mini7
Z14237 IGHV4-31*03
M99683 IGHV4-31*02
M95120 IGHV4-31*04
X92270 IGHV4-31*06
X92271 IGHV4-31*07
-----> CDR3-IMGT -----
gtgtattactgtgcgagaggggactagtggtgtatgctccattgactcctggggccaa
-----a-----
-----a-----

Scu0107/36Vk:

Scu 0107/36VK-Mini4
J00248 IGKV1-16*01
K01323 IGKV1D-16*01
V00558 IGKV1D-16*02
X72808 IGKV1-17*01
X63392 IGKV1D-17*01
<----- FR1-IMGT -----
gacatccagatgaccagtcctcctcactgtctgcctctgtaggagacagagtcaac
-----a-----a-----c-
-----a-----a-----c-
-----a-----a-----c-
-----a-----c-----a-----c-
a-----a--tg-ca-----a-----c-

Scu 0107/36VK-Mini4
J00248 IGKV1-16*01
K01323 IGKV1D-16*01
V00558 IGKV1D-16*02
X72808 IGKV1-17*01
X63392 IGKV1D-17*01
-----> CDR1-IMGT <-----
atcacttgtcgggagtcaggcattagcaattac.....ttagcc
-----t-----
-----t-----gc-gg-----
-----g-----t-----gc-gg-----
-----c-----a-----a-----g-t-----g-
-----g-----t-----

```

----- FR2-IMGT ----->_____ CDR
Scu 0107/36VK-Mini4  tggtttcagcagaaaccagggaaagcccctaagtcctgatctatgctgtatcc.....
J00248 IGKV1-16*01  -----c-----.....
K01323 IGKV1D-16*01  ---a-----a-----c-----.....
V00558 IGKV1D-16*02  ---a-----a-----c-----.....
X72808 IGKV1-17*01  ---a-----cg-----c-----.....
X63392 IGKV1D-17*01  -----t-----ca-----c-----.....

```

```

2-IMGT _____<-----
Scu 0107/36VK-Mini4  .....agtttgcaaagtgggggtccca...tcaaagttcagcggcagtgga
J00248 IGKV1-16*01  .....-----g-----
K01323 IGKV1D-16*01  .....-----g-----
V00558 IGKV1D-16*02  .....-----g-----
X72808 IGKV1-17*01  .....-----g-----
X63392 IGKV1D-17*01  .....-----g-----

```

```

----- FR3-IMGT -----
Scu 0107/36VK-Mini4  .....tctgggacagatttactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagatgttgc
J00248 IGKV1-16*01  .....-----a-----
K01323 IGKV1D-16*01  .....-----a-----
V00558 IGKV1D-16*02  .....-----a-----
X72808 IGKV1-17*01  .....-----a-----a-----a-----
X63392 IGKV1D-17*01  .....-----a-----a-----a-----

```

```

----->_____ CDR3-IMGT _____
Scu 0107/36VK-Mini4  acttattactgccaacagatataataacttaccctgaccttcggccaagggacacgactg
J00248 IGKV1-16*01  -----g-----t-c
K01323 IGKV1D-16*01  -----g-----t-c
V00558 IGKV1D-16*02  -----g-----t-c
X72808 IGKV1-17*01  -----t-t---c-----g-----t-c
X63392 IGKV1D-17*01  -----t-t---c-----g-----t-c

```

Scu0107/58VH:

```

<----- FR1-IMGT -----
Scu0107/58 VH Mini 1  caggtgcagctggtggagtctggggga...ggcgtggtccagcctgggaggtccctgaga
L06615 IGHV3-30*04  -----.....
X92283 IGHV3-30-3*01  -----.....
M77324 IGHV3-30*14  -----.....
X92214 IGHV3-30*18  -----.....
M77302 IGHV3-30-3*02  -----.....

```

```

----->_____ CDR1-IMGT _____<-----
Scu0107/58 VH Mini 1  ctctcctgtgcagctctctggattcgcttcagagattatgct.....atgcac
L06615 IGHV3-30*04  -----c-----a-----tagc-----
X92283 IGHV3-30-3*01  -----c-----a-----tagc-----
M77324 IGHV3-30*14  -----c-----a-----tagc-----
X92214 IGHV3-30*18  -----c-----a-----tagc---gc-----
M77302 IGHV3-30-3*02  -----cg-----a-----tagc-----

```

```

----- FR2-IMGT ----->_____ CDR
Scu0107/58 VH Mini 1  tgggtccgtcaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcacttatatcctatgatgca
L06615 IGHV3-30*04  -----c-----g-----a-----g-
X92283 IGHV3-30-3*01  -----c-----g-----a-----g-
M77324 IGHV3-30*14  -----c-----g-----a-----g-
X92214 IGHV3-30*18  -----c-----g-----a-----g-
M77302 IGHV3-30-3*02  -----c-----g-----a-----g-

```

```

2-IMGT _____<-----
Scu0107/58 VH Mini 1  aggaacaag.....tactatgcagactccgtgaag...ggccgattcaccatttccaga
L06615 IGHV3-30*04  --t--t--a.....-----c-----.....c-----
X92283 IGHV3-30-3*01  --c--t--a.....-----c-----.....c-----
M77324 IGHV3-30*14  --t--t--a.....-----c-----.....c-----
X92214 IGHV3-30*18  --t--t--a.....-----c-----.....c-----
M77302 IGHV3-30-3*02  --c--t--a.....-----c-----.....c-----

```

```

----- FR3-IMGT -----
Scu0107/58 VH Mini 1 gacaattccaagatggctctgcatctggagatggacagcctgacaattgaggacacggct
L06615 IGHV3-30*04 -----aca-g---t----c-a---a-----g-gc-----
X92283 IGHV3-30-3*01 -----aca-g---t----c-a---a-----g-gc-----
M77324 IGHV3-30*14 -----aca-g---t----tc-a---a-----g-gc-----
X92214 IGHV3-30*18 -----aca-g---t----c-a---a-----g-gc-----
M77302 IGHV3-30-3*02 -----aca-g---t----c-a---a-----g-gc-----

```

```

----->_____ CDR3-IMGT _____
Scu0107/58 VH Mini 1 gtctattattgtgctgagaggtcgggagtatcgtgggtcagggaatcaaaatgacgggtccc
L06615 IGHV3-30*04 --g-----c-----a
X92283 IGHV3-30-3*01 --g-----c-----
M77324 IGHV3-30*14 --g-----c-----a
X92214 IGHV3-30*18 --g-----c-----a-a
M77302 IGHV3-30-3*02 --g-----c-----a-a

```

Scu0107/58Vk:

```

<----- FR1-IMGT -----
Scu0107/58 Vk Mini 3 gaaattgtgttgacacagctctccaggcaccctgtctgctcctccagggaaacagccacc
M23090 IGKV3-15*01 -----a---a---g-----c-----t-----g-----
X72815 IGKV3D-15*01 -----a---a---g-----c-----t-----g-----
M23091 IGKV3D-15*02 (P) -----a---a---tg-----c-----t-----g-----
L37728 IGKV3-NL1*01 -----a---a---g-----c-----tt-----g-----
L37730 IGKV3-NL3*01 -----a---a---g-----c-----tt-----g-----

```

```

----->_____ CDR1-IMGT _____<-----
Scu0107/58 Vk Mini 3 ctctcctgcagggccagtcagagtggtcgcagcaag.....ttagcc
M23090 IGKV3-15*01 -----a-----c-----
X72815 IGKV3D-15*01 -----a-----c-----
M23091 IGKV3D-15*02 (P) -----a-----c-----
L37728 IGKV3-NL1*01 -----a---t-c-----
L37730 IGKV3-NL3*01 -----a-----gctac-----

```

```

----- FR2-IMGT ----->_____ CDR
Scu0107/58 Vk Mini 3 tggtagcaaacagaaacctggcccggctcccaggctcctcatctatgatgcctcc.....
M23090 IGKV3-15*01 -----g-----a-----g---a-----
X72815 IGKV3D-15*01 -----g-----a-----g---a-----
M23091 IGKV3D-15*02 (P) -----g-----a-----g---a-----
L37728 IGKV3-NL1*01 -----g-----a-----g---a-----
L37730 IGKV3-NL3*01 -----g-----t---g-----g---a-----

```

```

2-IMGT _____<-----
Scu0107/58 Vk Mini 3 .....accagggccacgggtatccca...gccaggttcagtgccgggtggg
M23090 IGKV3-15*01 .....-----t-----...-----a-----
X72815 IGKV3D-15*01 .....-----t-c-----...-----a-----
M23091 IGKV3D-15*02 (P) .....-----t-c-----...-----a-----
L37728 IGKV3-NL1*01 .....-----t-c-----...-----a-----
L37730 IGKV3-NL3*01 .....-----t-----...-----a-----

```

```

----- FR3-IMGT -----
Scu0107/58 Vk Mini 3 .....tctgagacagacttcactctcaccatcagcagtcctgagtcctgaagattttgca
M23090 IGKV3-15*01 .....-----g-----g-----c-----
X72815 IGKV3D-15*01 .....-----g-----g-----c-----
M23091 IGKV3D-15*02 (P) .....-----g-----g-----c-----
L37728 IGKV3-NL1*01 .....-----g-----g-----c-----
L37730 IGKV3-NL3*01 .....-----g-----g-----a-----

```

```

----->_____ CDR3-IMGT _____
Scu0107/58 Vk Mini 3 atgtattactgtcagcagatataatcaatggcctccgatcaccttcggccaagggacacga
M23090 IGKV3-15*01 g-t-----a-c-----
X72815 IGKV3D-15*01 g-t-----a-c-----
M23091 IGKV3D-15*02 (P) g-t-----a-c-a-----
L37728 IGKV3-NL1*01 g-t-----
L37730 IGKV3-NL3*01 g-t-----

```

Hm0507/10VH:

```
<----- FR1-IMGT ----->
Hm0507/10 VH4-Mini6 caggtgcagctgcaggagtcgggcca...ggactggtgaagccttcagagaccctgtcc
X05715 IGHV4-39*02 ---c-----g-----
L10094 IGHV4-39*01 ---c-----g-----
X92259 IGHV4-39*03 ---c-----g-----
M95116 IGHV4-39*05 ---c-----g-----c---
Z12367 IGHV4-b*01 -----g-----
```

```
-----> CDR1-IMGT <----->
Hm0507/10 VH4-Mini6 ctcacctgcgctgtcactggttcctccatcagcagctcttaattcttac.....tgggcc
X05715 IGHV4-39*02 -----a---t---gg-----ag-g-ac---.....---g-
L10094 IGHV4-39*01 -----a---t---gg-----ag-g-ac---.....---g-
X92259 IGHV4-39*03 -----a---t---gg-----ag-g-ac---.....---g-
M95116 IGHV4-39*05 -----a---t---gg-----ag-g-ac---.....---g-
Z12367 IGHV4-b*01 -----t---a-----gg-t-c-ac.....---g-
```

```
----- FR2-IMGT -----> CDR
Hm0507/10 VH4-Mini6 tggatccgccagccccagggaaggactggagtgattggaagtatttattacagaggg
X05715 IGHV4-39*02 -----g-----g-----c---t---t---
L10094 IGHV4-39*01 -----g-----g-----c---t---t---
X92259 IGHV4-39*03 -----g-----g-----c---t---t---
M95116 IGHV4-39*05 -----g-----g-----c---t---t---
Z12367 IGHV4-b*01 -----g-----g-----g-----c---c-t---t---
```

```
2-IMGT <----->
Hm0507/10 VH4-Mini6 aacacc.....tattacaaccctccctcaag...agtcgagctccatattccgta
X05715 IGHV4-39*02 -g---.....-c-----a-----
L10094 IGHV4-39*01 -g---.....-c-----a-----
X92259 IGHV4-39*03 -g---.....-c-----a-----
M95116 IGHV4-39*05 -g---.....-c-----a-----
Z12367 IGHV4-b*01 -g---.....-c-----a-----a---
```

```
----- FR3-IMGT ----->
Hm0507/10 VH4-Mini6 gacgcgtccagcaaccacttctccctgaggctaagatctgtgaccgccgagacacggct
X05715 IGHV4-39*02 ---a---ag-----a---g-c-----
L10094 IGHV4-39*01 ---a---ag-----g-----a---g-c-----
X92259 IGHV4-39*03 ---a---ag-----g-----a---g-c-----c
M95116 IGHV4-39*05 ---a---ag-----g-----a---g-c-----
Z12367 IGHV4-b*01 ---a---ag-----g-----a---g-c-----c
```

```
-----> CDR3-IMGT ----->
Hm0507/10 VH4-Mini6 gtgtattattgtgcgagacttatgtggttaggggaattattatatgactggttcgacccc
X05715 IGHV4-39*02 -----c-----ga
L10094 IGHV4-39*01 -----c-----a
X92259 IGHV4-39*03 -----c---
M95116 IGHV4-39*05 -----c-----
Z12367 IGHV4-b*01 -----c-----
```

Hm0507/10Vk:

```
<----- FR1-IMGT ----->
Hm0507/10 Vk-Mini7 gatattgtgatgactcagctctccactctccctgtccctcaccctggagagccggcctcc
X63397 IGKV2-28*01 -----c-----
X12691 IGKV2D-28*01 -----c-----
X63400 IGKV2-18*01 (P) -----c---a---c---c---a-----
X63395 IGKV2D-18*01 (P) -----c---a---c---c---a-----
X59311 IGKV2D-40*01 -----c---a---c-----
```

```
-----> CDR1-IMGT <----->
Hm0507/10 Vk-Mini7 atctcctgcaggctctagtcagagcctcctgcatagtaatggatacaactat...ttggat
X63397 IGKV2-28*01 -----g-----
X12691 IGKV2D-28*01 -----g-----
X63400 IGKV2-18*01 (P) -----t-----t-c---...-c---
X63395 IGKV2D-18*01 (P) -----a-----t-c---...-c---
X59311 IGKV2D-40*01 -----t-g---g---atgga---acctat-----
```

```

----- FR2-IMGT ----->_____ CDR
Hm0507/10 Vk-Mini7  tggtagctgcagaagccagggcagctctccacagctcctgatctattgggttct.....
X63397 IGKV2-28*01  -----
X12691 IGKV2D-28*01 -----
X63400 IGKV2-18*01 (P) -----t--ag--t--c.....
X63395 IGKV2D-18*01 (P) -----c-----a-----t--ag--t--c.....
X59311 IGKV2D-40*01 -----ac-ct--c.....

```

```

2-IMGT _____<-----
Hm0507/10 Vk-Mini7  .....aatcgggcctccggggtcct...gacaggttcagtggcagtgga
X63397 IGKV2-28*01  .....
X12691 IGKV2D-28*01 -----
X63400 IGKV2-18*01 (P) .....--atcctt--t-----a...-----t-----g
X63395 IGKV2D-18*01 (P) .....-g--tttt--t-----a...-----t-----g
X59311 IGKV2D-40*01 .....t-----t--a----a...-----g

```

```

----- FR3-IMGT -----
Hm0507/10 Vk-Mini7  .....tcaggcacagattttacactgaaaatcagcagagtgaggctgaggatgttggg
X63397 IGKV2-28*01  .....
X12691 IGKV2D-28*01 -----
X63400 IGKV2-18*01 (P) .....----t-gt----c-----t-g-----
X63395 IGKV2D-18*01 (P) .....----gt----c-----t-g-----
X59311 IGKV2D-40*01 .....----t----c-----g-----a

```

```

----->_____ CDR3-IMGT _____
Hm0507/10 Vk-Mini7  gtttattactgcatgcaagctctacaaactccttttggccaagggaccaaggtgaaatc
X63397 IGKV2-28*01  -----cc
X12691 IGKV2D-28*01 -----cc
X63400 IGKV2-18*01 (P) -----ac--gtt----
X63395 IGKV2D-18*01 (P) -----ac--gtt----
X59311 IGKV2D-40*01 -----cg-a--g-gtt----c

```

St140VH:

```

<----- FR1-IMGT -----
St140VH  caggtgcaactgcaggagtcgggcca...ggactggtgaagccttcggacaccctgtcc
X56360 IGHV4-59*07  -----g-----
L10088 IGHV4-59*01  -----g-----
M29812 IGHV4-59*02  -----g-----
M95114 IGHV4-59*03  -----g-----
M95117 IGHV4-59*04  -----g-----

```

```

----->_____ CDR1-IMGT _____<-----
St140VH  ctcacctgcgctgtctctggtgactcctcggtagttactac.....tgacc
X56360 IGHV4-59*07  -----a-----g--a-a-----g-
L10088 IGHV4-59*01  -----a-----g--a-a-----g-
M29812 IGHV4-59*02  -----a-----g--g-a-----g-
M95114 IGHV4-59*03  -----a-----g--a-a-----g-
M95117 IGHV4-59*04  -----a-----g--a-a-----g-

```

```

----- FR2-IMGT ----->_____ CDR
St140VH  tggatccgacagcccccggaaggactggaatgggtgggttatctattacagtggg
X56360 IGHV4-59*07  -----g-----a-----g--a-t-g-----
L10088 IGHV4-59*01  -----g-----a-----g--a-t-g-----
M29812 IGHV4-59*02  -----g-----a-----g--a-t-g-----
M95114 IGHV4-59*03  -----g-----a-----g--a-t-g-----
M95117 IGHV4-59*04  -----g-----a-----g--a-t-g-----t-----

```

```

2-IMGT _____<-----
St140VH  agcacc.....aattataacccttcctcaag...agtcaagccgtcatatcaatc
X56360 IGHV4-59*07  -----c-c---c-----g--t-ac-----g-a
L10088 IGHV4-59*01  -----c-c---c-----g--t-ac-----g-a
M29812 IGHV4-59*02  -----c-c---c-----g--t-ac-----g-a
M95114 IGHV4-59*03  -----c-c---c-----g--t-ac-----g-a
M95117 IGHV4-59*04  -----t-c-c---g-----g--t-ac---g--g-a

```

```

----- FR3-IMGT -----
St140VH      gacacaaccaacaaccggttctccctgaacctcagctctgtgaccgctggagacacggcc
X56360 IGHV4-59*07  ----gt---g---a-----g-g-----cg-----
L10088 IGHV4-59*01  ----gt---g---a-----g-g-----cg-----
M29812 IGHV4-59*02  ----gt---g---a-----g-g-----cg-----
M95114 IGHV4-59*03  ----gt---g---aa-----g-g-----cg-----
M95117 IGHV4-59*04  ----gt---g---a-----g-g-----c-c-----t

----->----- CDR3-IMGT -----
St140VH      gtgtattattgtgtgagagaaacggcgcgctcctatcctggggccaaggaaccctggct
X56360 IGHV4-59*07  -----c-----c-----
L10088 IGHV4-59*01  -----c-----c-----a
M29812 IGHV4-59*02  -----c-----c-----a
M95114 IGHV4-59*03  -----c-----c-----
M95117 IGHV4-59*04  -----c-----c-----

```

Scu58-Sequenz der 2A-Peptid-Methode

```

CAAGCTGGCTAGCATGAACCTGGACCTGGACCGTGTTCCTGCCTGCTCGCCGTGGCTCCTGGGGCCACAGGGCCAGGTGCAGC
TGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGATTCGCCTTCAGAGAT
TATGTATGCACCTGGTCCGTCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGTGGCACTTATATCCTATGATGCAAGGAACAAGTA
CTATGCAGACTCCGTGAAGGCCGATTCACCATTTCCAGAGACAATTCGAAGATGGCTCTGCATCTGGAGATGGACAGCCTGA
CAATTGAGGACACGGCTGTCTATTATTGTGCGAGAGTCCGGGAGTATCGTGGGTGAGGGAATCAAATGACGGTCCCGTTGCT
TGTGATGTCTGGGGCCAAAGGGACAATGGTCAACCGTCTCTTCAGGTGAGTGGATCCTCTGCGCCTGGGGCCAGCTCTGTCCAC
ACCGCGGTACACATGGCACCACCTCTCTTGCAGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCA
CCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCC
CTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCTC
AAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCA
AATCTTGTGACAAAATCACACATGCCACCGTCCGACCTGACTCCTGGGGGACCGTCACTCTTCTTCCCCCA
AAACCAAGGACACCCATGATATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATCGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGT
CAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACC
GTGTGGTCAAGCTCCTCACCGTCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC
CCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGA
GGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
ATGGGCAGCCGGAGAACATAACAAGACCACGCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACC
GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCGGGAACGTTCTTCTATCGTGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCGCAGAA
GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAACCTTCGATCTCTCAAGCTCGGTGGAGATGTTGAGAGCAACCCAGGTCCAAGCTTAT
GAACTGGACCTGGACCGTGTTCCTGCTGCTCGCCGTGGCTCCTGGGGCCACAGGGCCGAAATTTGTGTTGACACAGTCTCCAG
GCACCCTGTCTGCGTCTCCAGGGGAAACAGCCACCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAAGTGTTCGAGCAAGTTAGCCTGGTAC
CAACGAAACCTGGCCCGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGCCTCCACCAGGGCCACGGGTATCCAGCCAGGTTCAAGTGG
CGGTGGGTCTGAGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAGTCTGAAGATTTTGAATGTATTACTGTGACAGTATA
ATCAATGGCCTCCGATACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAACCGTGAAGTGGATCCATCTGGGATAAGCATGCTGT
TTTTGCTGTCCCTAACATGCCCCGTGATTATCCGCAAAACAACACACCCAAAGGGCAGAACTTTGTTACTTAAACACCACTCT
GTTTGCTTCTTCTCAGGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGT
GCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGG
TAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAG
ACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGA
GAGTGTACATCACCATCACCATCACTCGAGTCTAGAGTCCCGTACCAG

```

Translatierte Scu58-Sequenz der 2A-Peptid-Methode:

```

K L A S M N W T W T V F C L L A V A P G A H R A Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L
R L S C A V S G F A F R D Y A M H W V R Q A P G K G L E W V A L I S Y D A R N K Y Y
A D S V K G R F T I S R D N S K M A L H L E M D S L T I E D T A V Y Y C A R G R E Y
R G S G N Q N D G P V A C D V W G Q G T M V T V S S G E W I L C A W A Q L C P T P R
S H G T T S L A A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P
E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S V V T V P S S L
G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S C D K T H T C P C P A P E L L
G G P S V F L F P P K P K D T L M I S W T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V V H Q D W L N G K E Y
K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N
Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S
F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P
G K N F D L L K L A G D V E S N P G P S L Stop T G P G P C F A C S P W L L G P T G
P K L C Stop H S L Q A P C L R L Q G K Q P P S P A G P V R V F A A S Stop P G T N R
N L A R L P G S S S M M P P P G P R V S Q P G S V A V G L R Q T S L S P S A V C S L
K I L Q C I T V S S I I N G L R S P S A K G H D W R L N V S G S I W D K H A V F C L
S L T C P V I I R K Q H T Q G Q N F V T Stop T P S C L L L S S G T V A A P S V F I

```

F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S
 Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L
 S S P V T K S F N R G E C H H H H H S S L E S R T S

Translatierte Scu58-Sequenz der 2A-Peptid-Methode mit Wechsel des Leserahmens nach dem 2A Fragment:

Q A G Stop H E L D L D R V L P A R R G S W G P Q G P G A A G G V W G R R G P A W E
 V P E T L L C S L W I R L Q R L C Y A L G P S G S R Q G A G V G G T Y I L Stop C K
 E Q V L C R L R E G P I H H F Q R Q F Q D G S A S G D G Q P D N Stop G H G C L L L
 C E R S G V S W V R E S K Stop R S R C L Stop C L G P R D N G H R L F R Stop V D P
 L R L G P A L S H T A V T W H H L S C S L H Q G P I G L P P G T L L Q E H L W G H S
 G P G L P G Q G L L P R T G D G V V E L R R P D Q R R A H L P G C P T V L R T L L P
 Q Q R G D R A L Q Q L G H P D L H L Q R E S Q A Q Q H Q G G Q E S Stop A Q I L Stop
 Q N S H M P T V P S T Stop T P G G T V S L P L P P K T Q G H P H D L P D P Stop G H
 M R G G G R E P R R P Stop G Q V Q L V R G R R G G A Stop C Q D K A A G G A V Q Q H
 V P C G Q R P H R R A P G L A E W Q G V Q V Q G L Q Q S P P S P H R E N H L Q S Q R
 A A P R T T G V H P A P I P G G D D Q E P G Q P D L P G Q R L L S Q R H R R G V G E
 Q W A A G E Q L Q D H A S R A G L R R L L L P L Stop Q A H R G Q E Q V A A G E R L
 L M L R D A Stop G S A Q P L H A E E P L P V S G Stop K L R S S Q A R W R C Stop E
 Q P R S K L M N W T W T V F C L L A V A P G A H R A E I V L T Q S P G T L S A S P G
 E T A T L S C R A S Q S V R S K L A W Y Q Q K P G P A P R L L I Y D A S T R A T G I
 P A R F S G G S E T D F T L T I S S L Q S E D F A M Y Y C Q Q Y N Q W P P I T F G
 Q G T R L E I K R E W I H L G Stop A C C F L S V P N M P C D Y P Q T T H P R A E L
 C Y L N T I L F A S F L R N C G C T I C L H L P A I Stop _ A V E I W N C L C C V P
 A E Stop L L S Q R G Q S T V E G G Stop R P P I G Stop L P G E C H R A G Q Q G Q H
 L Q P Q Q H P D A E Q S R L R E T Q S L R L R S H P S G P E L A R H K E L Q Q G R V
 S S P S P S L E S R V P Y Q

Aminosäuresequenz: TMEM9B

1 mkllslvavv gcllvppaea nkssedirck cicppyrnis ghiynqnvsv kdccsnclhv
 61 vepmpvpghd veaycllcec ryeersttt kviivylsv vgalllymaf lmlvdplirk
 121 pdayteqlhn eeenedarsm aaaaaslgpp rantvlerve gaqqrwklqv qeqrktvfd
 181 hkmls

Aminosäuresequenz: Tm4SF2

1 masrrmetkp vitclktlli iysfvfwitg villavgvvg kltlgtiyisl iaenstnapy
 61 vlightgttiv vfglfgcfat crgspwmlkl yamflslvfl aelvagisgf vfrheidtdf
 121 lrtytdamqt yngndersra vdhvqrslsc cgvqnytnws tspyfleghi ppsccmnetd
 181 cnpqdlhnl vaatkvnqkg cydlvtsfme tnmgiagva fgiafsqliq mllacclsr
 241 itanqyemv

6. Literaturverzeichnis

- Aries PM, Lamprecht P, Gross WL (2007) Biological therapies: new treatment options for ANCA-associated vasculitis? *Expert Opin Biol Ther* 7(4):521-33
- Bach J F (2005) Infections and autoimmune disease. *J. Autoimmunity* 25:74-80
- Bacon PA (2005) The Spectrum of Wegener's Granulomatosis and Disease Relapse. *N Engl J Med* 352(4):351-61
- Beaudreuil S, Lasfargues G, Laueriere L (2005) Occupational exposure in ANCA-positive patients: A case-control study. *Kidney Int* 67(5):1961-6
- Bosch X, Guilabert A, Font J (2006) Antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Lancet* 368:404 - 418
- Boerretzen M, Randen I, Zdarsky E, Foerre O, Natvig JB, Thompson KM (1994) Control of autoantibody affinity by selection against amino acid replacements in the complementarity-determining regions. *Proc Natl Acad Sci* 91:12917-12921
- Boomsma MM, Stegeman CA, van der Leij MJ (2000) Prediction of relapses in Wegener's granulomatosis by measurement of antineutrophil cytoplasmic antibody levels: a prospective study. *Arthritis Rheum* 43(9):2025-33
- Bosch X, Mirapeix E (2008) Vasculitis syndromes: LAMP-2 illuminates pathogenesis of ANCA glomerulonephritis. *Nat Med.* 14(10):1088-96.
- Bräuninger A, Küppers R, Speiker T (2008) Molecular analysis of single B cells from T-cell-rich B-cell lymphoma shows the derivation of the tumor cells from mutating germinal center B cells and exemplifies means by which immunoglobulin genes are modified in germinal center B cells. *Blood* 8:2679-87

- Brezinschek HP, Brezinschek RI, Lipsky PE (1995) Analysis of the heavy chain repertoire of the human peripheral B cells using single-cell polymerase chain reaction. *J Immunol* 155:190-202
- Brezinschek HP, Foster SJ, Brezinschek RI, Doerner T, Domiati Saad R, Lipsky PE (1997) Analysis of the human VH gene repertoire. Differential effects of selection and somatic hypermutation on human peripheral CD5(+)/IgM+ and CD5(-)/IgM+ B cells. *J Clin Invest* 99:2488-2501
- Brihaye C, Aouba A, Pagnoux C, Cohen P, Lacassin F, Guillevin L (2007) Adjunction of rituximab to steroids and immunosuppressants for refractory/relapsing Wegener's granulomatosis: a study on 8 patients. *Clin exp Rheumatology* 25(1;44):023-027
- Büssow K, Nordhoff E, Lübbert C, Lehrach H, Walter G (2000) A Human cDNA Library for High-Throughput Protein Expression Screening. *Genomics* 65, 1–8
- Campbell EJ, Campbell MA, Owen CA (2000) Bioactive proteinase 3 on the cell surface of human neutrophils: quantification, catalytic activity and susceptibility to inhibition. *J Immunol* 165:3366-3374
- Chang B, Casali P (1994) The CDR1 sequences of a major proportion of human germline Ig VH genes are inherently susceptible to amino acid replacement. *Immunol Today* 15:367-373
- Chapel H, Haeney M (1993) *Essentials of clinical immunology*. Blackwell Scientific Publications Oxford, London, Edinburgh, Boston, Melbourne, Paris, Berlin, Wien 3:210-215
- Chen YX, Yu HJ, Ni LY, Zhang W, Xu YW, Ren H, Chen XN, Wang XL, Li X, Pan XX, Wang WM, Chen N (2007) Propylthiouracil-associated antineutrophil cytoplasmic autoantibody-positive vasculitis: retrospective study of 19 cases. *J Rheumatol* 34(12):2451-6

- Choi HK, Lamprecht P, Niles JL, Gross WL, Merkel PA (2000) Subacute bacterial endocarditis with positive cytoplasmic antineutrophil cytoplasmic antibodies and anti-PR3 antibodies. *Arthritis Rheum* 43:226-231
- Cotch FM, Fauci AS, Hoffman GS (1995) HLA typing in patients with Wegener's granulomatosis. *Ann Intern Med* 122(8):635
- Csernok E, Ernst M, Schmitt WH (1994) Activated neutrophils express proteinase 3 on their plasma membrane in vitro and in vivo. *Clin Exp Immunol* 95:244-250
- Csernok E, Holle J, Hellmich B, Willem J, Tervaert C, Kallenberg CG, Limburg PC, Niles J, Pan G, Specks U, Westman K, Wieslander J, De Groot K, Gross WL (2003) Evaluation of capture ELISA for detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies directed against proteinase 3 in Wegener's granulomatosis: first results from a multicentre study. *Rheumatology (Oxford)* 2:174-80
- Csernok E, Ai M, Gross W, Wicklein D, Petersen A, Lindner B, Lamprecht P, Holle J U and Hellmich B (2006) Wegener autoantigen induces maturation of dendritic cells and licenses them for Th1 priming via the protease-activated receptor-2 pathway. *Blood* 107:4440-4448
- Czarnecki EJ, Spickler EM (1995) MR demonstration of Wegener's granulomatosis of the infundibulum, a cause of diabetes insipidus. *AJNR Am J Neuroradiol* 16(4):968-70
- Davies DJ, Moran JE, Niall JF, Ryan GB (1982) Segmental necrotising glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus aetiology. *Br Med J (Clin Res Ed)* 4;285(6342):606
- De Felipe P (2004) Skipping the co-expression problem: the new 2A "Chysel" technology. *Genetic Vaccines and Therapy* 13;2(1):13
- DeGroot K, Gross WL, Herlyn K, Reinhold-Keller E (2001) Development and vali-

dation of a disease extent index for Wegener's granulomatosis. Clin Nephrol 55:31-38

Devauchelle G, Cerutti M (1999) Baculovirus: an example of an insect virus of use to humans. Med Trop 59(4;2):517-21.

DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH :online Cataloge SF-9 insect - fall armyworm (Spodoptera frugiperda)

Dodeller F, Gottar M, Huesken D, Iourgenko V, Cenni B (2008) The Lysosomal Transmembrane Protein 9B regulates the Activity of Inflammatory Signaling Pathways. J Biological Chemistry 283(31): 21487–21494

Doerner T, Brezinschek HP, Brezinschek RI, Foster SJ, Domiati Saad R, Lipsky PE (1997) Analysis of the frequency and pattern of somatic mutations within nonproductively rearranged human variable heavy chain genes. J Immunol 158:2779-2789

Dolman KM (1992) Determination of proteinase 3 - alpha 1-antitrypsin complexes in inflammatory fluids. FEBS Lett 314:117-121

Domiati Saad R, Attrep JF, Brezinschek HP, Cherrie AH, Karp DR, Lipsky PE (1996) Staphylococcal enterotoxin D functions as a human B cell superantigen by rescuing VH4-expressing B cells from apoptosis. J Immunol 156:3608-3620

Elzouki AN, Segelmark M, Wieslander J, Eriksson S (1994) Strong link between the alpha 1-antitrypsin PiZ allele and Wegener's granulomatosis. J Intern Med 236(5):543-8

European Vasculitis Study Group (2007) Randomized trial of plasma exchange or high-dosage methylprednisolone as adjunctive therapy for severe renal vasculitis. J Am Soc Nephrol 18(7):2180-8

Falk RJ, Terrell RS, Charles LA, Jennette JC (1990) Anti-neutrophil cytoplasmic

autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4115-4119

Fang J, Qian J J, Salli Yi, Harding C T, Tu G H, Van Roey M, Joos K (2005) Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide. *Nature Biotechnology* 23(5):551-2

Fauci AS, Barton H, Katz P, Wolff S (1983) Wegener's granulomatosis: prospective clinical and therapeutic experience with 85 patients for 21 years. *Ann Intern Med* 98:76-85

Fienberg R (1981) The protacted superficial phenomenon in pathergic granulomatosis. *Hum Pathol* 12:458-467

Fink L, Kwapiszewska G, Wilhelm J, Bohle RM (2006) Laser-microdissection for cell type- and compartment-specific analyses on genomic and proteomic level. *Exp Toxicol Pathol* 57 Suppl 2:25-9

Fujinaga M, Chernaia M, Halenbeck R, Koths K, James M (1996) The crystal structure of PR3, a neutrophil serine proteinase antigen of Wegener's Granulomatosis antibodies. *J. Mol. Biol* 261:267-278

Garovic VD, Clarke BL, Chilson TS, Specks U (2001) Diabetes insipidus and anterior pituitary insufficiency as presenting features of Wegener's granulomatosis. *Am J Kidney Dis* 37(1):E5

Gause A, Gundlach K, Zdichavsky M, Jacobs G, Koch B, Hopf T, Pfreundschuh M (1995) The B lymphocyte in rheumatoid arthritis: analysis of rearranged V κ genes from B cells infiltrating the synovial membrane. *Eur J Immunol* 25:2775-2782

Gause A, Grundlach K, Carbon G, Daus H, Truemper L, Pfreundschuh M (1997)

- Analysis of VH gene rearrangements from synovial B cells of patients with rheumatoid arthritis reveals infiltration of the synovial membrane by memory B cells. *Rheumatol Int* 17(4):145-150
- Giscombe R, Wang X, Huang D, Lefvert AK (2002) Coding sequence 1 and promoter single nucleotide polymorphisms in the CTLA-4 gene in Wegener's granulomatosis. *J Rheumatol* 29(5):950-3
- Golbin JM, Specks U (2007) Part 2: Synopsis of B-lymphocyte targeted therapy of ANCA-associated vasculitis. *Clin exp. Rheumatology* 25(1;44):074-076
- Gough NR, Fambrough DM (1997) Different steady state subcellular distributions of the three splice variants of lysosome-associated membrane protein LAMP-2 are determined largely by the COOH-terminal amino acid residue. *J Cell Biol* 137:1161–1169
- Griffith ME, Coulthart A, Pemberton S, George AJT, Pusey CD (2001) Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) from patients with systemic vasculitis recognize restricted epitopes of proteinase 3 involving the catalytic site. *Clin Exp Immunol* 123:170-177
- Gross WL, Trabandt A, Csernok E (1998) Pathogenesis of Wegener's granulomatosis. *Ann Med Interne* 149(5):280-6
- Hagen EC, Daha MR, Hermans J, Andrassy K, Csernok E, Gaskin G (1998) Diagnostic value of standardized assays for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. *Kidney Int* 53:743-753
- Han WK, Choi HK, Roth RM (2003) Serial ANCA titers: Useful tool for prevention of relapses in ANCA-associated vasculitis. *Kidney Int* 63(3):1079-85
- Hellmich B, Epplen JT, Gross WL (2004) Are ANCA-associated vasculitides inherited? *Clin Exp Rheumatology* 22(6;36):1-2

- Hogan SL, Satterly KK, Dooley MA (2001) Silicia exposure in anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis and lupus nephritis J Am Soc Nephrol 12(1):134-42
- Huang D, Giscombe R, Zhou Y, Lefvert AK (2000) Polymorphisms in CTLA-4 but not tumor necrosis alpha factor or interleukin 1 beta genes are associated with Wegener's granulomatosis. J Rheumatol 27(2):397-401
- Iwatani H, Uzu T, Kakihara M, Nakayama Y, Kanasaki K, Yamato M, Hirai Y, Umimoto K, Yamauchi A (2004) A case of Wegener's granulomatosis with pulmonary bleeding successfully treated with double filtration plasmapheresis (DFPP). Clin Exp Nephrol 8(4):369-374
- Jagiello P, Gencik M, Arning L, Wieczorek S, Kunstmann E, Csernok E, Gross WL, Epplen JT (2004) New genomic region for Wegener's granulomatosis as revealed by an extended association screen with 202 apoptosis-related genes. Hum Genet 114(5):468-77
- Jagiello P, Aries P, Arning L, Wagenleiter SE, Csernok E, Hellmich B, Gross WL, Epplen JT (2005) The PTPN22 620W allele is a risk factor for Wegener's granulomatosis. Arthritis Rheum 52(12):4039-42
- James DG (2000) A clinicopathological classification of granulomatous disorders. Postgrad Med J 76:457-465
- Murphy K, Travers P, Walport M (2008) Janeway's Immunobiology. New York and London, 7th ed. Garland Science
- Jayne D, Chapel H, Adu D, Misbah S, O'Donoghue D, Scott D, Lockwood CM (2000) Intravenous immunoglobulin for ANCA-associated systemic vasculitis with persistent disease activity. QJM 93(7):433-9
- Jayne D, Rasmussen N, Andrassy K, Bacon P, Tervaert JWC, Dadoniene J,

- Ekstrand A, Gaskin G, Gregorini G, de Groot K, Gross W, Hagen EC (2003) A Randomized Trial of Maintenance Therapy for Vasculitis Associated with Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibodies. *N Engl J Med* 349:36-44
- Jenne DE, Tschopp J, Ludemann J, Utecht B, Gross W L (1990) Wegener's auto-antigen decoded. *Nature* 346(6284):520
- Jenette JC, Hoidal JR, Falk RJ (1990) Specificity of anti-neutrophil cytoplasmic auto-antibodies for proteinase 3. *Blood* 75(11):2263-4
- Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K, Bacon PA, Churg J, Gross WL, Hagen EC, Hoffman GS, Hunder GG, Kallenberg CGM, McCluskey RT, Sinico RA, Rees AJ, Van Es LA, Waldherr R, Wiik A (1994) Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum* 37:187-192
- Jennette JC, Falk RJ (2007) The role of pathology in the diagnosis of systemic vasculitis. *Clin Exp Rheumatology* 25(1Suppl44):52-56
- Jennette JC, Falk RJ (2008) New insight into the pathogenesis of vasculitis associated with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Current Opinion in Rheumatology* 20:55-60
- Kain R, Matsui K, Exner M, Binder S, Schaffner G, Sommer EM, Kerjaschki D (1995) A novel class of autoantigens of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in necrotizing and crescentic glomerulonephritis: the lysosomal membrane glycoprotein h-lamp-2 in neutrophil granulocytes and a related membrane protein in glomerular endothelial cells. *J Exp Med.* 1995 Feb 1;181(2):585-97.
- Kain R, Exner M, Brandes R, Ziebermayr R, Cunningham D, Alderson CA, Davidovits A, Raab I, Jahn R, Ashour O, Spitzauer S, Sunder-Plassmann G, Fukuda M, Klemm P, Rees AJ, Kerjaschki D (2008) Molecular mimicry in pauci-immune focal necrotizing glomerulonephritis. *Nat Med.* 14(10):1088-96.

- Kain R, Firmin DA, Rees AJ (2010) Pathogenesis of small vessel vasculitis associated with autoantibodies to neutrophil cytoplasmic antigens: new insights from animal models. *Curr Opin Rheumatol* 22(1):15-20.
- Kallenberg C, Heeringa P, Stegeman C (2006) Mechanisms of Disease: pathogenesis and treatment of ANCA-associated vasculitides. *Nature Clinical Practice Rheumatology* 2:661-670
- Kallenberg, Cess GM (2007) Antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated small-vessel vasculitis. *Current Opinion in Rheumatology* 19(1):17-24
- Kantari C, Pederzoli-Ribeil M, Amir-Moazami O, Gausson-Dorey V, Moura IC, Lecomte MC, Benhamou M, Witko-Sarsat V (2007) Proteinase 3, the Wegener autoantigen, is externalized during neutrophil apoptosis: evidence for a functional association with phospholipid scramblase 1 and interference with macrophage phagocytosis. *Blood* 110(12):4086-95
- Kendall PL, Yu G, Woodward EJ, Thomas JW (2007) Tertiary lymphoid structures in the pancreas promote selection of B lymphocytes in autoimmune diabetes. *J Immunol.*; 178:5643–51.
- Keogh KA, Wylam ME, Stone JH, Specks U (2005): Induction of remission by B lymphocyte depletion in eleven patients with refractory antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheum* 52:262-268
- Klinger H (1931) Grenzformen der Periarteritis nodosa. *Frankf Z Pathol* 42:455
- Krämer JA, Müller A, Herlyn K, (2007) B lymphocyte differentiation in granulomatous tissues of the lung and the nasal mucosa in Wegener's granulomatosis: origin of antineutrophil cytoplasmic antibody formation? *Z Rheumatol* 66:421-9
- Kravitz MS, Shoenfeld Y (2006) Autoimmunity to protective molecules: is it the perpetuum mobile (vicious cycle) of autoimmune rheumatic diseases? *Nature Clinical Practice Rheumatology* 2(9):481-490

- Krause I, Blank M, Shoenfeld Y (2000) The induction of experimental vascular disease by immunization with pathogenic autoantibodies. *Clin Exp Rheumatology* 18;2:257-261
- Küppers R, Zhao M, Rajewsky K, Hansmann ML (1993) Detection of clonal B cell populations in paraffin-embedded tissues by polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 143:230-239
- Küppers R (2004) Molecular single cell PCR analysis of rearranged immunoglobulin genes as a tool to determine the clonal composition of normal and malignant human B cells. *Meth. Mol. Biol.* 271:225-38
- Kveine M, Tenstad E, Døsen G, Funderud S, Rian E (2002) Characterization of the novel human transmembrane protein 9 (TMEM9) that localizes to lysosomes and late endosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 297:912-7
- Lamprecht P, Moosig F, Csernok E (2001) CD28 negative T cells are enriched in granulomatous lesions of the respiratory tract in Wegener's granulomatosis. *Thorax* 56:751-757
- Lamprecht P, Voswinkel J, Lilienthal T, Nolle B, Heller M, Gross WL, Gause A (2002) Effectiveness of TNF- α blockade with infliximab in refractory Wegener's granulomatosis. *Rheumatology* 41:1303-1307
- Lamprecht P, Kumanovics G (2002) Elevated monocytic IL-12 and TNF-alpha production in Wegener's granulomatosis is normalized by cyclophosphamide and corticosteroid therapy. *Clin Exp Immunol* 128:81-186
- Lamprecht P (2005) Off balance: T-cells in antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitides. *Clinical & Experimental Immunology* 141(2):201-210
- Lamprecht P, Gross WL (2007) Current knowledge on cellular interactions in the WG-granuloma. *Clin Exp Rheumatology* 25:049-051

- Langford CA (2003) Treatment of ANCA-Associated Vasculitis. *N Engl J Med* 349(1):3-4
- Leavitt RY, Fauci AS, Bloch DA, Michel BA, Hunder GG, Arend WP, Calabreses LH, Fries JF, Lie JT, Lightfoot RW, Masi AT, McShane DJ, Mills JA, Stevens MB, Wallace SL, Zvaifler NJ (1990) The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* 33:1101-1107
- Lieby P, Soley A, Levallois H, Hugel B, Freyssinet JM, Cerutti M, Pasquali JL, Martin T (2001) The clonal analysis of anticardiolipin antibodies in a single patient with primary antiphospholipid syndrome reveals an extreme antibody heterogeneity. *Blood* 97:3820-8
- Lieby P, Poindron V, Roussi S, Klein C, Knapp A-M, Geraud J-C, C erutti M, Martin T, Pasquali J-L (2004) Pathogenic antiphospholipid antibody: an antigen selected needle in a haystack. *Blood* 104:1711-15
- Liu YJ, Joshua DE, Williams GT, Smith CA, Gordon J, MacLennan IC (1989) Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* 342:929-931
- L udemann J, Utecht B, Gross WL (1990) Anti-neutrophil cytoplasm antibodies in Wegener's granulomatosis recognize an elastinolytic enzyme. *J Exp Med* 171:357-362
- Luqmani RA (2002) Assessing disease in systemic vasculitides. *Curr Opin Rheumatol* 14:23-28
- Luqmani RA (2007) Towards diagnostic criteria for the ANCA-associated vasculitides. *Clin Exp Rheumatology* 25(1;44):057-059
- Lynn DE (2002) Methods for maintaining insect cell cultures. *Journal of Insect Science* 2:9

MacLennan IC (1991) Immunology. The centre of hypermutation. Nature 354:352-353

Mahr AD, Neogi T, Merkel PA (2006) Epidemiology of Wegener's granulomatosis: Lessons from descriptive studies and analyses of genetic and environmental risk determinants. Clin Exp Rheumatology 24(2;41):082-091

Mahr A, Artigues N, Coste J, Aouba A, Pagnoux C, Guillevin L, French Vasculitis Study Group (2006) Seasonal variations in onset of Wegener's granulomatosis: increased in summer? J Rheumatol 33(8):1615-22

Matsuda F, Ishii K, Bourvagnet P, Kuma K, Hayashida H, Miyata T, Honjo T (1998) The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus. J Exp Med 11:2151-2162

Mebius RE (2003) Organogenesis of lymphoid tissues. Nat Rev Immunol 3:292-303
Meller S, Jagiello P, Borgmann S, Fricke H, Epplen JT, Gencik M (2001) Novel SNPs in the CD18 gene validate the association with MPO-ANCA+vasculitis. Genes Immun 2(5):269-72

P.A. Merkel (2007) Part 1: The need for novel treatment regimens for ANCA-associated vasculitis. Clin Exp Rheumatology 25(1;44):072-073

Mülhardt C (2000) Der Experimentator Molekularbiologie. 2. Auflage Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin

Müller A, Trabandt A (2000) Localized Wegener's granulomatosis: predominance of CD26 and IFN-gamma expression. J Pathol 192:113-120

Müller A, Holl-Ulrich K, Feller AC, Gross WL, Lamprecht P (2003) Immune phenomena in localized and generalized Wegener's granulomatosis. Clin Exp Rheumatol 21(32):49-54

Müller A, Voswinkel J, Gottschlich S, Csernok E (2007) Human proteinase 3 (PR3)

and its binding molecules: implications for inflammatory and PR3-related autoimmune responses. *Ann N Y Acad Sci* 1109:84-92

Müller A, Holl-Ulrich K, Lamprecht P, Gross WL (2008) Germinal centre-like structures in Wegener's granuloma: the morphological basis for autoimmunity? *Rheumatology*. 47:1111–3

Muller-Kobold AC, Kallenberg CG, Tervaert JW (1998) Leucocyte membrane expression of proteinase 3 correlates with disease activity in patients with Wegener's granulomatosis. *Br J Rheumatol* 37:901-907

Muller-Kobold AC, Kallenberg CG, Tervaert JW (1999) Monocyte activation in patients with Wegener's granulomatosis. *Ann Rheum Dis* 58:237-245

Niles JL, McCluskey RT, Ahmad MF, Arnaout MA (1989) Wegener's autoantigen is a novel neutrophil serine proteinase. *Blood* 74:1888-93

Oprea M, Perelson AS (1997) Somatic mutation leads to efficient affinity maturation when centrocytes recycle back to centroblasts. *J Immunol* 158:5155-5162

Pamuk ÖN, Dogutan H, Pamuk GE, Cakir N (2003) Unilateral phrenic nerve paralysis in a patient with Wegener's granulomatosis. *Rheumatol Int* 23(4):201-3

Pascual V, Capra JD (1992) VH4.21, a human VH gene segment overrepresented in the autoimmune repertoire. *Arthritis Rheum* 35:11-18

Pascual V, Victor K, Spellerberg M, Hamblin TJ, Stevenson FK, Capra JD (1992) VH restriction among human cold agglutinins. The VH4.21 gene segment is required to encode anti-I and anti-i specificities. *J Immunol* 149:2337-2344

Pascual V, Capra JD (1995) Immunoglobulin heavy chain variable region gene usage in human autoimmune diseases. *Adv Exp Med Biol* 386:133-139

Peen E, Williams RC (2000) What you should know about PR3-ANCA, structural

aspects of antibodies to proteinase 3. *Arthritis Res* 2:255-259

Peen E, Malone C, Myers C, Williams Jr RC, Peck AB, Csernok E, Gross WL and Staud R (2001) Amphipathic variable region heavy chain peptides derived from monoclonal human Wegener's anti-PR3 antibodies stimulate lymphocytes from patients with Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis. *Clinical & Experimental Immunology* 125(2):323-331

Pendergraft WF, Preston GA, Shah RR, Tropsha A, Carter CW, Jennette JC, Falk RJ (2004): Autoimmunity is triggered by cPR-3 (105-201), a protein complementary to human autoantigen proteinase-3. *Nature Medicine* 10(1):17-18

Pezzato E (2003) Proteinase 3 directly activates MMP-2 and degrades gelatin and Matrigel; different inhibition by (-)epigallocatechin-3-gallate. *J Leukoc Biol* 74:88-94

Pfister H, Ollert M, Froehlich LF, Quintanilla-Martinez L, Colby TV, Specks U (2004) Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies against the murine homolog of proteinase 3 (Wegener autoantigen) are pathogenic in vivo. *Blood* 104:1411-1418

Popa ER, Stegeman CA, Kallenberg CGM, Cohen Tervaert JW (2002) Staphylococcus aureus and Wegener's granulomatosis. *Arthritis Res* 4:77-79

Popa ER, Tervaert JW (2003) The relation between Staphylococcus aureus and Wegener's granulomatosis: current knowledge and future directions. *Intern Med* 42(9):771-80

Popa ER, Stegeman CA, Bos NA, Kallenberg CGM, Cohen Teravert JW (2003) Staphylococcal superantigens and T cell expansions in Wegener's granulomatosis. *Clinical & Experimental Immunology* 132(3):496-504

Poul MA, Cerutti M, Chaabihi H, Ticchioni M, Deramoudt FX, Bernard A, Devauchelle

- G, Kaczorek M, Lefranc MP (1995) Cassette baculovirus vectors for the production of chimeric, humanized, or human antibodies in insect cells. *Eur J Immunol* 25(7):2005-9
- Poul MA, Cerutti M, Chaabihi H, Devauchelle G, Kaczorek M, Lefranc MP (1995) Design of cassette baculovirus vectors for the production of therapeutic antibodies in insect cells. *Immunotechnology* 1(3-4):189-96
- Radcliffe PA and Mitrophanous KA (2004) Multiple gene products from a single vector: "self-cleaving" 2Apeptides, *Gene Therapy* 11:1673-1674
- Radford DJ, Luu NT, Hewins P, Nash GB, Savage COS (2001) Antineutrophil cytoplasmic antibodies stabilize adhesion and promote migration of flowing neutrophils on endothelial cells. *Arthritis Rheum* 44:2851-2861
- Reinhold-Keller E, de Groot K, Rudert H, Nölle B, Heller M, Gross WL (1996) Response to trimethoprim/sulfamethoxazole in Wegener's granulomatosis depends on the phase of disease. *Q J Med* 89:15-23
- Reinhold-Keller E, de Groot K, Holl-Ulrich K, Arlt AC, Heller M, Feller AC, Gross WL (2001) Severe CNS manifestations as the clinical hallmark in generalized Wegener's granulomatosis consistently negative for antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). A report of 3 cases and a review of the literature. *Clin Exp.Rheumatology* 15(5):541-549
- Reinhold-Keller E, Herlyn K, Wagner-Bastmeyer R, Gross WL (2005) Stable incidence of primary systemic vasculitides over five years: Results from the German vasculitis register. *Arthritis Rheum* 53:93-99
- Reumaux D, Duthilleul P, Roos D (2004): Pathogenesis of diseases associated with antineutrophil cytoplasm autoantibodies. *Human Immunology* 65:1-12
- Rose NR (2001) Infection, mimics and autoimmune disease. *J. Clin.Invest* 107:943-44

- Salama A D, Pusey C D (2009) Shining a LAMP on pauci-immune focal segmental glomerulonephritis. *Kidney International* 76, 15–17; doi:10.1038/ki.2009.123
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74:5463-5467
- Sarraf P, Sneller MC (2005) Pathogenesis of Wegeners granulomatosis: current concepts. *Expert Rev Mol Med* 7(8):1-19
- Savage COS, Pottinger BE, Gaskin G (1992) Autoantibodies developing to myeloperoxidase and proteinase 3 in systemic vasculitis stimulate neutrophil cytotoxicity towards cultured endothelial cells. *Am J Pathol* 141:335-342
- Schlieben DJ, Korbet SM, Kimura RE, Schwartz MM, Lewis EJ (2005) Pulmonary-renal syndrome in a newborn with placental transmission of ANCA. *Am J Kidney Dis.* 45(4):758-61
- Schmitt WH, Paulsen J, Rudert H, Gross WL (1997) ANCA-assozierte Vaskulitiden (AAV). *HNO* 45:477-491
- Schreiber A, Luft FC, Kettritz R (2004) Membrane proteinase 3 expression and ANCA-induced neutrophil activation. *Kidney Int* 65:2172-2183
- Schultz DR, Tozman EC (1995) Antineutrophil cytoplasmic antibodies: major autoantigens, pathophysiology and disease association. *Semin Arthritis Rheum* 25:143-159
- Schwartz RS (2003) Shattuck Lecture - Diversity of the Immune Repertoire and Immunoregulation. *N Engl J Med* 348:1017-1026
- Szymczak AL, Workman CJ, Vignali KM, Dilioglou S, Vanin EF, Vignali DAA (2004) Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single “ self cleaving” 2A peptide-based retroviral vector. *Nature Biotechnology* 22(5):589-94

- Segelmark M, Westman K, Wieslander J (2000) How and why should we detect ANCA. *Clin Exp Rheumatology* 18(5):629-635
- Seo P, Stone JH (2004) The antineutrophil cytoplasmic antibody-associated-vasculitides. *Am J Med* 117(1):39-50
- Sibilia J, Benlagha K, Vanhille P, Ronco P, Brouet JC, Mariette X (1997) Structural analysis of human antibodies to proteinase 3 from patients with Wegner granulomatosis. *J Immunol* 159:712-719
- Sneller MC (2002) Granuloma formation, implications for the pathogenesis of vasculitis. *Cleve Clin J Med* 69(2):40-43
- Specks U (2000) What you should know about PR3-ANCA. Conformational requirements of proteinase 3 (PR3) for enzymatic activity and recognition by PR3-ANCA. *Arthritis Res* 2(4):263-267
- Spriewald BM, Witzke O, Wasmuth R, Wenzel RR, Arnold ML, Philipp T, Kadden JR (2005) Distinct tumor necrosis factor alpha, interferon gamma, interleukin 10, and cytotoxic T cell antigen 4 gene polymorphisms in disease occurrence and end stage renal disease in Wegener's granulomatosis. *Ann Rheum Dis* 64(3):457-61
- Stegeman CA, Cohen Tervaert JW, De Jong PE, Kallenberg CG (1996) Trimethoprim-sulfamethoxazole (Co-Trimoxazole) for the prevention of relapses of Wegener's granulomatosis. *N Engl J Med* 335:16-20
- Strachan T, Read AP (2005) *Molekulare Humangenetik Elsevier Spektrum Akademischer Verlag München, 3. Auflage*
- Sugimoto T, Issiki K, Aoyama M, Sakurai H, Deji N, Sakaguchi M, Uzu T, Kashiwagi A (2007) An unusual case of Wegener's granulomatosis developing with glomerulonephritis as an initial manifestation. *Rheumatol Int* 27(7):687-688

- Szyld P, Jagiello P, Czernok E, Gross WL, Epplen JT (2006) On the Wegener granulomatosis associated region on the chromosome 6p21.3. *BMC Med Genet* 9; 7:21
- Travis WD (1991) Surgical pathology of the lung in Wegener's granulomatosis. Review of 87 open lung biopsies from 67 patients. *Am J Surg Pathol* 15:315-333
- Van der Geld YM, Limburg PC, Kallenberg CG (1999) Characterization of monoclonal antibodies to proteinase 3 (PR3) as candidate tools for epitope mapping of human anti-PR3 autoantibodies. *Clin Exp Immunol* 118:487-496
- Van der Geld YM, Limburg PC, Kallenberg CG (2001) Proteinase 3, Wegener's autoantigen: from gene to antigen. *J Leukoc Biol* 69:177-190
- Van Der Geld Y M, Huitema M G, Franssen C F M, Van Der Zee R, Limburg PC, Kallenberg CG (2000): In vitro T lymphocyte responses to proteinase 3 (PR3) and linear peptides of PR3 in patients with Wegener's granulomatosis (WG). *Clinical & Experimental Immunology* 122(3):504-513
- Villa-Forte A, Clark TM, Gomes M, Carey J, Mascha E, Karafa MT, Roberson G, Langford CA, Hoffman GS (2007) Substitution of methotrexate for cyclophosphamide in Wegener granulomatosis: a 12-year single-practice experience. *Medicine (Baltimore)* 86(5):269-77
- Voswinkel J, Müller A, Lamprecht P (2005) Is PR3-ANCA formation initiated in Wegener's granulomatosis lesions? Granulomas as potential lymphoid tissue maintaining autoantibody production. *Ann N Y Acad Sci.* 1051:12-9
- Voswinkel J, Mueller A, Kraemer JA, Lamprecht P, Herlyn K, Holl-Ulrich K, Feller AC, Pitann S, Gause A, Gross WL (2006) B lymphocyte maturation in Wegener's granulomatosis: a comparative analysis of VH genes from endonasal lesions. *Ann Rheum Dis* 65:859-864
- Voswinkel J, Assmann G, Held G, Pitann S, Gross WL, Holl-Ulrich K, Herlyn K,

- Mueller A (2008) Single cell analysis of B lymphocytes from Wegener's granulomatosis: B cell receptors display affinity maturation within the granulomatous lesions. Clin Exp Immunol Epub ahead of print
- Voswinkel J, Kerkdijk A J, Müller A, Assmann G, Pfreundschuh M, Held G (2008) A novel System To Test for Specificity of B cell Receptors from tissue of Wegener's Granulomatosis patients. Clin Exp Rheumatol 26(3;49):90-6
- Watts RA, Scott DG, Jayne DR, Ito-Ihara T, Muso E, Fujimoto S, Harabuchi Y, Kobayashi S, Suzuki K, Hashimoto H (2008): Renal vasculitits in Japan and the UK – are there differences in epidemiology and clinical phenotype? Nephrol Dial Transplant, Epub
- Wegener F (1936) Über generalisierte, septische Gefäßerkrankungen. Verh Dtsch Pathol Ges 29:202-210
- Wegener F (1939) Über eine eigenartige rhinogene Granulomatose mit besonderer Beteiligung des Arteriensystems und der Niere. Beitr Pathol Anat allg Pathol 102: 36-68
- Williams RC Jr, Staude R, Malone CC, Payabyab J, Byres L, Underwood D (1994) Epitopes on proteinase-3 recognized by antibodies from patients with Wegener's granulomatosis. J Immunol 152:4722-4737
- Wilson PC, De Bouteiller O, Liu YJ, Potter K, Banchereau J, Capra JD, Pascual V (1998) Somatic hypermutation introduces insertions and deletions into immunoglobulin V genes. J Exp Med 187:59-70
- Woywodt A, Matteson EL (2006) Wegener granulomatosis - Probing the untold past of the man behind the eponym. Rheumatology (Oxford) 45(10):1303-6.
- Wu YY, Hsu TC, Chen TY, Liu TC, Liu GY, Lee YJ, Tsay GJ (2002) Proteinase 3 and dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) are major autoantigens in hepatitis C virus (HCV) infection. Clin Exp Immunol. 128(2):347-52.

- Xiao H, Heeringa P, Hu P, Liu Z, Zhao M, Aratani Y, Maeda N, Falk RJ, Jennette JC (2002) Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *J Clin Invest* 110: 955-963
- Yu F, Chen M, Gao Y, Wang SX, Zou WZ, Zhao MH, Wang HY (2007) Clinical and pathological features of renal involvement in propylthiouracil-associated ANCA-positive vasculitis. *Am J Kidney Dis* 49:607-14
- Zhang Z, Zemlin M, Wang YH, Munfus D, Huye LE, Findley HW, Bridges SL Jr, Roth DB, Burrows PD, Cooper MD (2003) Contribution of VH gene replacement to the primary B cell repertoire. *Immunity* 19:21-31
- Zemni R, Bienvenu T, Vinet MC, Sefiani A, Carrié A, Billuart P, McDonnell N, Couvert P, Francis F, Chafey P, Fauchereau F, Friocourt G, des Portes V, Cardona A, Frints S, Meindl A, Brandau O, Ronce N, Moraine C, van Bokhoven H, Ropers HH, Sudbrak R, Kahn A, Fryns JP, Beldjord C, Chelly J (2000) A new gene involved in X-linked mental retardation identified by analysis of an X;2 balanced translocation. *Nature Genetics*. 24(2):167-70
- Zimmer M, Medcalf RL, Fink TM, Mattmann C, Lichter P, Jenne DE (1992) Three human elastase-like genes coordinately expressed in the myelomonocyte lineage are organized as a single genetic locus on 19pter. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 89:8215-8219

7. Publikationen / Dank

A. Originalarbeiten

Turner L, Müller A, Cérutti M, Thierry M, Pasquali J-L, Gross W L, Held G, Assmann G, Pfreundschuh M, Voswinkel J (2010) Wegener's granuloma harbors B cells with specificities against a proinflammatory transmembrane protein and a tetraspanin (2010) Journal of Autoimmunity (accepted)

B. Abstracts / Poster / Kongressbeiträge

Turner L, Carbon G, Bette B, Fadle N, Preuss D, Martin T, Pasquali J, Cérutti M, Pfreundschuh M, Voswinkel J: Generation of monoclonal antibodies (mAbs) from Wegener's granuloma-derived single B lymphocytes using recombinant baculoviruses. Poster bei der gemeinsamen Jahrestagung der Deutschen und Österreichischen Gesellschaften für Immunologie im AKH Wien vom 03.-06.06.2008 mit Abstract in der Wiener klinischen Wochenschrift Suppl 01/08, P324

Turner L, Carbon G, Martin T, Pasquali J, Cérutti M, Pfreundschuh M, Voswinkel J: Development of a system to characterise B-cell receptors from Wegener granulomas. Poster bei der 5th Spring school on Immunology der Deutschen Gesellschaft für Immunologie vom 01.03.09 - 06.03.09 im Kloster Ettal

Turner L, Carbon G, Martin T, Pasquali J, Cérutti M, Pfreundschuh M, Voswinkel J: Generation of recombinant mAbs from Wegener's granuloma-derived B cells employing two different expression systems. 37. Tagung mit dem Hauptthema "B-Zell-Immunologie" des Arbeitskreises Klinische Immunologie der DGfI am 06.11.2009 in Frankfurt am Main

Turner L, Müller A, Cérutti M, Martin M, Pasquali J-L, Gross WL, Preuss KL, Pfreundschuh M, Voswinkel J: Wegener's granuloma harbors B cells with specificities towards proinflammatory transmembrane proteins. Vortrag bei der TRiPR IV - Biological Agents and Emerging Treatments in the Management of Rheumatic Diseases. Vom 27.05. - 30.05.2010 in Genua, Italien.

Schüler S, Voswinkel J, Holl-Ulrich K, Brieske C, Thurner L, Laudien M, Butherus K, Gross W L, Müller A: Molecular analysis of plasma cells from endonasal tissue of Wegener's granulomatosis. 40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie vom 22. - 25.09.2010 in Leipzig.

Dank

Für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit und die Überlassung des Themas bedanke ich mich herzlich bei meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Michael Pfreundschuh, Direktor der Klinik für Onkologie, Hämatologie, klinische Immunologie und Rheumatologie des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg.

Für die Betreuung dieses Projektes bedanke ich mich ebenfalls herzlich bei Herrn Privatdozenten Dr. med. Jan Voswinkel, ehemals leitender Oberarzt Inneren I, der Klinik für Onkologie, Hämatologie, klinische Immunologie und Rheumatologie des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg und jetzt tätig als Praticien Hospitalier in der Abteilung für Hämatoonkologie und Nuklearmedizin am Hôpital Saint-Antoine der Universität Pierre et Marie Curie in Paris.

Frau Gabi Carbon, Medizinisch-Technische Assistentin im José-Carreras-Zentrum für Immun- und Gentherapie in Homburg gebührt ein ganz besonderer Dank. Sie hat mit außerordentlichem Einsatz versucht, mir die Welt der Molekularbiologie und Gentechnik näherzubringen und war ständige Ansprechpartnerin bei offenen Fragen. Ohne ihre kenntnisreiche Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Dank gebührt allen weiteren medizinisch-technischen Assistentinnen im José-Carreras-Zentrum. Insbesondere erwähnen möchte ich Frau Birgit Bette für die Hilfe in der Proteindiagnostik, Frau Evi Regitz für die Hilfe bei der 2A-Peptid-Methode und Frau Nathalie Fadle für die Unterstützung im Bereich von Zellkultur, Proteinchemie und Protein-Arrays. Dank gilt auch Herrn Dr. Klaus-Dieter Preuss, der ein ständiger Ansprechpartner für alle Doktoranden im Carreras-Zentrum ist.

Für die gute Zusammenarbeit möchte ich mich auch bei der AG Mahlke, der AG Held und der AG Römer bedanken.

Insgesamt habe ich in der Zeit im José-Carreras-Center sehr viel lernen können, was mich mit Dank zurückblicken lässt.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern des LIP (Laboratoire d' Immunopathologie, INSERM Equipe 737) an der medizinischen Fakultät der Universität Louis-Pasteur in Straßburg danken. Zu großem Dank bin ich hier insbesondere Herrn Professor Jean-Louis Pasquali, Herrn Professor Thierry Martin, Mme PhD Pauline Soulas, M. Jean-Nicolas Schickel und den medizinisch-technischen Assistentinnen Mme Elisabeth Lozay und Mme Anne-Marie Knapp verpflichtet.

Der Arbeitsgruppe von Mme PhD Martine Cérutti der Unité Baculovirus et Thérapie (CNRS UPS 3044) im südfranzösischen Saint Christol Lès Alès danke ich für die Hilfe bei der Baculovirus-Kotransfektion.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Freundin Diana Sharif, die während der Entstehungszeit dieser Arbeit regelmäßig auf mich verzichten musste, mich gleichzeitig ganz hervorragend unterstützt und nach Rückschlägen immer wieder aufgebaut hat.

Meinen Eltern, Franz und Marianne Thurner, gilt mein herzlicher Dank für die Ermöglichung eines sorgenfreien Studiums und die ausdauernde Unterstützung und Ermunterung. Für ihre intensive Anteilnahme, kenntnisreiche Hilfe und Beratung danke ich meinen Brüdern Bernhard, Christian und Andreas.

Weiterer Dank für die Unterstützung und das aufgebrachte Verständnis gilt meiner weiteren Familie und meinem gesamten Freundeskreis.

8. Curriculum Vitae

Persönliches

Name: Lorenz Thurner
Geburtsdatum: 10.12.1982
Geburtsort: Bitburg
Nationalität: Deutsch
Familienstand: Ledig

Schulische Ausbildung

1990 - 1996: St. Matthias-Grund- und Realschule, Bitburg
1996 - 2000: St. Willibrord-Gymnasium, Bitburg
2000 - 2003: Balthasar-Neumann-Gymnasium, Trier
Juli 2003: Abitur

Universitäre Ausbildung

Oktober 2003: Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes (Homburg/Saar)
2004 - 2005: Einjähriger Studienaufenthalt an der Medical School der Universität Leicester (UK)
September 2005: 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2007 - 2008: Halbjähriger Forschungs- und Studienaufenthalt an der medizinischen Fakultät der Universität Louis Pasteur in Straßburg (F) im Immunopathologischen Labor (Arbeitsgruppe INSERM 737: „B-Lymphozytäre Toleranz und Autoimmunität“ unter Leitung von Professor Jean-Louis Pasquali)
August 2008 - Juli 2009: Praktisches Jahr: Das Neurologie- und Innere Medizin-Tertial an der Universitätsklinik des Saarlandes in Homburg und das Chirurgie-Tertial am Spitalzentrum Oberwallis Visp (CH)
Herbst 2009: 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung und Approbation als Arzt

Seit Februar 2010:

Assistenzarzt in der Neurologischen
Universitätsklinik Mainz

Mitgliedschaften

Mitglied in der Deutschen Gesellschaft für
Immunologie seit 2008

Mitglied in der Deutschen Gesellschaft für
Neurologie seit 2010