

**Analyse struktureller Eigenschaften humaner
Antiphospholipidantikörper sowie Untersuchungen zu ihrer
möglichen Beteiligung am Antiphospholipidsyndrom**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Catharina Buschmann
aus Limburg/Lahn

Marburg/Lahn 2006

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen
am

Erstgutachter: Prof. Dr. Klaus Lingelbach
Zweitgutachter: Prof. Dr. Karl Lackner

Tag der mündlichen Prüfung:

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation „Analyse struktureller Eigenschaften humaner Antiphospholipidantikörper sowie Untersuchungen zu ihrer möglichen Beteiligung am Antiphospholipidsyndrom“ selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Limburg, den

(Catharina Buschmann)

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG.....	9
2	EINLEITUNG	12
2.1	Antiphospholipidsyndrom	12
2.1.1	Geschichte, Klinik, Diagnose und Klassifikation des Antiphospholipidsyndroms.....	12
2.1.2	Mögliche dem APS zugrunde liegende Pathomechanismen.....	16
2.1.2.1	Antiphospholipidantikörper und ihre Antigene und Kofaktoren.....	17
2.1.2.2	Einfluss auf die plasmatische Gerinnung und Protein C und S.....	19
2.1.2.3	Einfluss der Antiphospholipidantikörper auf Monozyten, Thrombozyten und Endothelzellen: Induktion eines prokoagulant Status im APS.....	22
2.1.2.4	Antiphospholipidantikörper und gynäkologische Symptome: Die Bedeutung des Komplementsystems im Antiphospholipidsyndrom.....	24
2.1.2.5	Infektionen und das Antiphospholipidsyndrom.....	27
2.2	Antiphospholipidantikörper	32
2.2.1	Antiphospholipidantikörper im Antiphospholipidsyndrom	32
2.2.2	Struktur und genetische Konstitution der Antiphospholipidantikörper.....	33
2.3	Ziel der Arbeit.....	37
3	MATERIALIEN UND GERÄTE.....	40
3.1	Chemikalien	40
3.2	Puffer und Lösungen	41
3.3	Kits.....	42
3.4	Antikörper und Streptavidin-Konjugate.....	42
3.5	Humane monoklonale Antikörper	43
3.6	Oligonukleotide.....	44
3.7	Zelllinien.....	44
3.8	Enzyme	45
3.9	Zellkultur-Medien und –Zusätze.....	45
3.10	Geräte	46
3.11	Sonstige Materialien	47
3.12	Protein- und DNA-Standards	47
3.13	Patienten.....	47

4	METHODEN	50
4.1	Gewinnung humaner monoklonaler Antikörper	50
4.1.1	Herstellung von humanen Hybridomzellen zur Gewinnung von monoklonalen humanen Antikörpern 50	
4.1.1.1	Herstellung von EBV-haltigem Zellkulturüberstand	52
4.1.1.2	Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut und EBV-Infektion	52
4.1.1.3	Zellfusion	53
4.1.1.3.1	Zellfusion mit Polyethylenglykol (PEG) (Brahe und Serra, 1981).....	53
4.1.1.3.2	Elektrofusion von B-Zellen mit Myelomzellen	54
4.1.1.4	Klonierung von Hybridomzellen (Limiting-Dilution-Klonierung)	55
4.1.2	Phospholipid-8S-ELISA zur Detektion von APL im Zellkulturüberstand von B-Zellen und Hybridomen.....	57
4.1.3	IgG-ELISA zur Bestimmung der IgG-Konzentration im Zellkulturüberstand von B-Zellen und Hybridomen.....	57
4.1.4	IgM-ELISA zur Bestimmung der IgM-Konzentration im Zellkulturüberstand von B-Zellen und Hybridomen.....	58
4.1.5	Kultivierung von stabilen Zelllinien	58
4.1.5.1	Kultivierung der Maus-Monozyten/Makrophagenzelllinie p388D1(IL-1).....	58
4.1.5.2	Kultivierung von CB-F7-Zellen	59
4.1.5.3	Kultivierung von SHM-D33-Zellen	59
4.1.5.4	Kultivierung von Hybridomzellen.....	59
4.1.5.4.1	Umstellung auf serumfreies Medium	61
4.1.5.4.2	„High Density“-Kultivierung von Hybridomen im CELLLine-System.....	62
4.1.5.5	Allgemeine Zellkulturtechniken.....	64
4.1.5.5.1	Zellzahlbestimmung und Vitalitätsbestimmung von Zellen	64
4.1.5.5.2	Einfrieren von Zellen.....	64
4.1.5.5.3	Auftauen von Zellen	64
4.1.5.5.4	Untersuchung der verschiedenen Zelllinien auf Kontamination mit Mykoplasmen.....	65
4.1.6	Reinigung von humanen monoklonalen Antikörpern aus Zellkulturüberstand.....	66
4.1.6.1	IgG.....	66
4.1.6.1.1	Teilreinigung von Antikörpern durch Ammoniumsulfatfällung.....	66
4.1.6.1.2	Aufreinigung von humanem IgG mittels Affinitätschromatographie	67
4.1.6.2	IgM.....	68
4.1.7	Untersuchung der Reinheit und Konzentration der gewonnen Fraktionen	68
4.1.7.1	Elektrophoretische Verfahren und Visualisierung von Proteinen	68
4.1.7.1.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970).....	68
4.1.7.1.2	Visualisierung von Proteinen mit dem kolloidalen Farbstoff Coomassie Blue	71
4.1.7.1.3	Auswertung und Dokumentation von Polyacrylamidgelen	71
4.1.7.1.4	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Bradford, 1976).....	71
4.1.8	Biotinylierung von monoklonalen humanen IgG- und IgM-Antikörpern.....	72
4.2	Strukturelle Charakterisierung monoklonaler APL	73
4.2.1	Identifizierung von Phospholipid-Bindungspartnern von humanen monoklonalen APL mittels ELISA	73
4.2.2	Charakterisierung der schweren und leichten Kette der APL	73
4.2.2.1	Westernblot und immunchemische Färbung von schweren und leichten Ketten von Immunglobulinen	73
4.2.2.1.1	Westernblot (Semi-Dry-Blot)	73
4.2.2.1.2	Färbung von Westernblots mit Ponceau Rot	74
4.2.2.1.3	Immunchemische Färbung von schweren und leichten Ketten von Immunglobulinen	75
4.2.3	Molekularbiologische Charakterisierung der variablen Region (V-Region) von Antiphospholipidimmunglobulinen.....	76
4.2.3.1.1	Etablierung einer Methode zur Charakterisierung der V-Gen-Familie von APL- Immunglobulinen.....	76
4.2.3.1.2	Isolierung der RNA aus Hybridomzellen	80
4.2.3.1.3	RT-PCR zur Amplifikation der variablen Region von APL-Immunglobulinen	81
4.2.3.1.4	OneStep-RT-PCR mit dem QIAGEN OneStep-RT-PCR Kit zur Amplifikation der variablen Region von APL-Immunglobulinen.....	82
4.2.3.1.5	„nested“ PCR.....	83

4.2.3.1.6	Familienspezifische PCR zur Identifizierung der Familienzugehörigkeit der verwendeten V-Segmente	84
4.2.3.2	Agarose-Gelelektrophorese von PCR-Ansätzen und Visualisierung von DNA-Proben	87
4.2.3.3	Sequenzierung der variablen Regionen von APL-Immunglobulinen und Sequenzvergleich mit Keimbahn-Gen-Segmenten der Immunglobulin-V-Region	87
4.2.3.3.1	Sequenzierung	88
4.2.3.3.2	Sequenzvergleich mit Keimbahn-V-Gen-Segmenten	89
4.3	Funktionelle Untersuchung von APL am Beispiel von JGG9 (IgM) und HL5B (IgG)	89
4.3.1	Bindung von APL an die humane Monozytenzelllinie Mono-Mac-6	89
4.3.1.1	Kultivierung der Zelllinie Mono-Mac-6	89
4.3.1.2	Cytospins mit Mono-Mac-6-Zellen	90
4.3.1.3	Immunfluoreszenz-Analyse der Bindung von JGG9 (IgM) und HL5B (IgG) an Mono-Mac-6	90
4.3.1.3.1	Fixierungsmethoden	91
4.3.1.3.2	Immunfluoreszenzfärbung	92
4.3.1.3.3	Mikroskopische Auswertungen	92
4.3.2	Untersuchung der Bindung von HL5B an Lysate aus stimulierten und nicht stimulierten Mono-Mac-6 mittels Westernblot-Analyse	93
4.3.2.1	Stimulation von Mono-Mac-6 mit Lipopolysaccharid (LPS)	93
4.3.2.2	Herstellung von Mono-Mac-6-Lysaten	93
4.3.2.3	SDS-PAGE, Westernblot und immunchemischer Nachweis einer möglichen Bindung von HL5B an Mono-Mac-6-Lysate	94
4.3.2.3.1	Chemilumineszenzreaktion zum Nachweis einer möglichen Bindung von HL5B an Mono-Mac-6-Lysate im Westernblot	95
4.4	Etablierung einer Methode zur Kofaktorabhängigkeit von APL	95
4.4.1	Isolierung der IgG-Fraktion aus humanem Serum	95
4.4.2	Umpuffern und Konzentrierung der IgG-Fraktion mit Vivaspin 500-Säulen mit einem MWCO von 10 kDa	96
4.4.3	Überprüfung des IgG-Gehaltes der IgG-Fractionen und der IgG-freien Fractionen im IgG-ELISA	96
4.4.4	Darstellung der IgG-Fractionen im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel	97
4.4.5	Untersuchung der IgG-Fractionen auf Kontaminationen mit den APL-Kofaktoren β 2GPI und Prothrombin	97
4.5	B-1/B-2-Zellen	97
4.5.1	Isolierung von mononukleären Zellen (PBMC) aus buffy coat	97
4.5.2	Anreicherung von B-Zellen durch Depletion von T-Zellen über magnetische Zellseparation	97
4.5.3	Färbung der B-1-Zellen durch CD19/CD5-Färbung und fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS)	99
4.5.4	Untersuchung der Abhängigkeit der CD5-Expression von der Stimulierung der B-Zellen	99
4.5.4.1	Stimulierung der B-Zellen	99
4.5.4.2	Färbung von stimulierten und nicht stimulierten B-Zellen mit Antikörpern gegen CD69, CD5 und CD19	100
4.5.5	Kultivierung der B-1-Zellen	100
5	ERGEBNISSE	101
5.1	Gewinnung humaner Antiphospholipidantikörper produzierender Hybridomzelllinien	101
5.1.1	Etablierung der Hybridomzelllinien JGG9, HVA2 und HLC9	101
5.1.2	Kultivierung von humanen Hybridomen unter serumfreien Bedingungen	102
5.1.2.1	Umstellung der Kultur von JGG9 auf serumfreie Bedingungen	106
5.1.2.2	Umstellung der Kultur von HLC9 auf serumfreie Bedingungen	107
5.1.2.3	Umstellung der Kultur von HVA2 auf serumfreie Bedingungen	109
5.1.3	„High Density“-Kultivierung von JGG9 und HLC9	109
5.1.4	Zusammenfassung	109
5.2	Strukturelle Charakterisierung monoklonaler APL	110
5.2.1	Identifizierung von Phospholipid-Bindungspartnern der humanen monoklonalen APL JGG9, HVA2 und HLC9	110
5.2.2	Identifizierung der schweren und leichten Kette von JGG9 mit Hilfe der Westernblot-Technologie	112

5.2.3	Charakterisierung der V-Region-Gen-Familien von Antiphospholipid-Immunglobulinen	116
5.2.3.1	Etablierung einer Methode zur Charakterisierung der V-Gen-Familien von Antiphospholipidimmunglobulinen.....	116
5.2.3.2	Charakterisierung der V-Gen-Familien von JGG9, Sequenzierung der variablen Region und Sequenzvergleich mit V-Regionen in Keimbahnkonfiguration.....	121
5.2.3.2.1	Charakterisierung der V-Gen-Familien der schweren und leichten Kette von JGG9	121
5.2.3.2.2	Sequenzierung der schweren Kette von JGG9 und Sequenzvergleich mit V-Regionen in Keimbahnkonfiguration	122
5.2.3.2.3	Sequenzierung der leichten Kette von JGG9 und Sequenzvergleich mit V-Regionen in Keimbahnkonfiguration	124
5.2.3.3	Charakterisierung der V-Gen-Familien von HLC9, Sequenzierung der variablen Region und Sequenzvergleich mit V-Regionen in Keimbahnkonfiguration.....	124
5.2.3.3.1	Charakterisierung der V-Gen-Familien der schweren und leichten Kette von HLC9	124
5.2.3.3.2	Sequenzierung der schweren Kette von HLC9 und Sequenzvergleich mit V-Regionen in Keimbahnkonfiguration	126
5.2.3.3.3	Sequenzierung der leichten Kette von HLC9 und Sequenzvergleich mit V-Regionen in Keimbahnkonfiguration	126
5.2.3.4	Charakterisierung der V-Gen-Familien von HVA2, Sequenzierung der variablen Region und Sequenzvergleich mit V-Regionen in Keimbahnkonfiguration.....	127
5.2.3.4.1	Charakterisierung der V-Gen-Familien der schweren und leichten Kette von HVA2.....	127
5.2.3.4.2	Sequenzierung der schweren Kette von HVA2 und Sequenzvergleich mit V-Regionen in Keimbahnkonfiguration	128
5.2.3.4.3	Sequenzierung der leichten Kette von HVA2 und Sequenzvergleich mit V-Regionen in Keimbahnkonfiguration	129
5.2.3.5	Untersuchungen der Verteilung der Mutationen in den V-Regionen der APL zur Identifizierung zugrunde liegender antigengesteuerter Prozesse.....	130
5.2.4	Zusammenfassung.....	135
5.3	Funktionelle Untersuchungen zu monoklonalen APL am Beispiel von JGG9, einem APL des IgM-Types, und HL5B, einem APL des IgG-Types.....	136
5.3.1	Untersuchung einer möglichen Bindung von HL5B an die monozytäre Zelllinie Mono-Mac-6 mittels Westernblot von Zelllysaten.....	138
5.3.1.1	Einfluss der Blockierungsmethode auf die mögliche Bindung von HL5B an Mono-Mac-6-Lysate	139
5.3.2	Untersuchung einer möglichen Bindung von HL5B und JGG9 an die monozytäre Zelllinie Mono-Mac-6 mittels Immunfluoreszenzanalyse.....	143
5.3.3	Zusammenfassung.....	144
5.4	Etablierung einer Methode zur Generierung von B-1-Zell-Hybridomen zur Gewinnung von B-1-Zell-APL	145
5.4.1	Sortierung der B-1- und B-2-Zellen.....	145
5.4.2	Infektion mit EBV, Probleme bei der Kultivierung und der Übertragbarkeit der Methode auf Patientenproben.....	148
5.4.3	Zusammenfassung.....	149
5.5	Kofaktorabhängigkeit von APL	149
5.5.1	Etablierung einer Methode zur Isolierung von IgG-Fraktionen und IgG-freien Fraktionen aus Humansenen.....	149
5.5.1.1	Isolierung von IgG aus humanen Seren durch Affinitätschromatographie mit Protein A	150
5.5.1.2	IgG-Ausbeute aus Serumproben nach Affinitätschromatographie	152
5.5.1.3	In den IgG-Fraktionen sind keine Kontaminationen mit den bekannten Proteinkofaktoren nachweisbar	153
5.5.2	Untersuchungen zur Kofaktorabhängigkeit von APL bei APS-Patienten und Patienten mit frischer EBV-Infektion als Modell für Patienten mit infektionsassoziierten APL: Kofaktorabhängigkeit von APL kann nur in serumfreien IgG-Fraktionen bestimmt werden	156
5.5.3	Zusammenfassung.....	157

6	DISKUSSION.....	159
6.1	Generierung von drei monoklonalen Hybridomzelllinien aus Patienten mit APS, die APL vom IgM-Typ produzieren	159
6.2	Strukturelle Charakterisierung der APL JGG9, HL5B und HVA2	164
6.3	Funktionelle Untersuchungen.....	170
6.4	B-1- und B-2-Zellen	175
6.5	Kofaktorabhängigkeit von APL und deren Einfluss auf laborchemische Diagnoseverfahren	180
7	LITERATURVERZEICHNIS	183
	ANHANG: SEQUENZALIGNMENTS.....	197
	ANHANG: ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	204

1 Zusammenfassung

Das Antiphospholipidsyndrom (APS) ist eine systemische Autoimmunerkrankung, die laborchemisch durch das Vorhandensein von Antiphospholipidantikörpern (APL), speziell Anti-Cardiolipin-Antikörpern (ACL), oder durch die Nachweisbarkeit des so genannten Lupus Antikoagulans (LA) und klinisch durch das Auftreten von venösen und arteriellen Thrombosen oder bei Frauen durch rezidivierende Aborte charakterisiert ist.

Obwohl der genaue dem APS zugrunde liegende Mechanismus noch nicht geklärt wurde, geht man davon aus, dass die APL eine maßgebliche Rolle in der Pathogenese des APS spielen.

APL sind eine heterogene Gruppe von Autoantikörpern, die durch Immunoassays und funktionelle Koagulationsteste nachgewiesen werden können. Sie binden negativ geladene Phospholipide, lipidbindende Proteine oder Komplexe aus beiden. APL findet man nicht nur im Kontext der Autoimmunerkrankung. Sie können transient nach akuten Infektionen nachgewiesen werden und stellen vermutlich einen Teil des polyreaktiven natürlichen Autoantikörper-Repertoires dar, für das in Gesunden eine Rolle in der angeborenen Immunabwehr postuliert wird.

Es ist bisher noch nicht eindeutig nachgewiesen, was die so genannten pathogenen APL, die im Rahmen des APS zu beobachten sind, von den nicht pathogenen natürlichen oder infekassozierten Antikörpern unterscheidet. Unklar ist ebenso, ob die verschiedenen APL gleichen Ursprungs sind und wie deren Regulation zum Pathomechanismus des APS beiträgt.

In dieser Doktorarbeit wurde deshalb versucht, APL aus APS-Patienten genauer zu charakterisieren, um Hinweise auf deren mögliche Bedeutung für die Pathogenese des APS zu erhalten.

Das zentrale Resultat der vorliegenden Arbeit war die erfolgreiche Generierung dreier monoklonaler APL produzierender humaner Hybridomzelllinien aus B-Zellen von APS-Patienten, JGG9, HLC9 und HVA2. Die zugehörigen Antikörper wurden strukturell analysiert. Zwei der APL, HLC9 und HVA2, weisen ein für polyreaktive, natürliche APL typisches Bindungsprofil auf. Sie binden unterschiedliche Phospholipide ohne Beteiligung von phospholipidbindenden Proteinen, so genannten Kofaktoren. Dennoch weisen ihre schweren Ketten Mutationen auf, die auf einen antigengesteuerten Prozess hinweisen. JGG9 hingegen ist reaktiv gegen einen Protein-Phospholipid-Komplex aus β 2-Glykoprotein I (β 2GPI) und Cardiolipin. Dieses Bindungsprofil wird häufig als typisch für pathogene APL

bezeichnet. Analysen der DNA-Sequenzen und Vergleiche mit zugrunde liegenden Keimbahnsequenzen zeigten, dass es sich bei JGG9 um den Antikörper mit der höchsten Mutationsrate in der variablen Region handelt. Interessanterweise sind diese Mutationen sowohl hinsichtlich ihrer Lokalisation als auch hinsichtlich ihrer Art sehr ungewöhnlich. Ein hoher Grad an Insertionen in den *Framework*-Regionen (FR) der variablen Region führt zu einer Verschiebung des Leserasters und damit zu einer stark veränderten Aminosäure-Sequenz. Für die variable Region typische Sequenzmuster bleiben dennoch erhalten, was dafür spricht, dass ein funktioneller Antikörper exprimiert wird. Die stark veränderte Sequenz geht nicht wie für Antikörper typisch auf somatische Hypermutation in den *complementarity determining regions* (CDR) zurück, d.h. es ist auch nicht davon auszugehen, dass die Mutationen Resultat eines antigengesteuerten Prozesses sind.

Ein Nachweis der Pathogenität der generierten APL im Tiermodell ist nicht erfolgt und wird für weitergehende Untersuchungen angestrebt. Untersuchungen von JGG9 und einem weiteren in der Arbeitsgruppe erzeugten APL, HL5B, in zellulären Bindungstests konnten keine direkte Interaktion von HL5B oder JGG9 mit Monozyten nachweisen, obwohl in vorangegangenen Arbeiten in funktionellen zellulären Tests für HL5B eine Induktion des Tissue Faktors auf Monozyten, die für pathogene APL häufig beschrieben wird, gezeigt wurde.

Weiterhin konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit erste Schritte in der Etablierung einer Methode zur Generierung von monoklonalen APL aus B-1-Zellen erzielt werden. B-1-Zellen sind die Produzenten des natürlichen Autoantikörper-Repertoires, polyreaktiver Antikörper, die ubiquitär verbreitete Antigene, u.a. Lipide erkennen. Der Zusammenhang zwischen natürlichen APL und APL im Rahmen des APS ist bisher nicht geklärt. Mit der Etablierung einer Methode zur Isolierung von B-1-Zellen aus Gesunden und auch aus APS-Patienten und zur Generierung monoklonaler Antikörper sollten vergleichende Studien zwischen pathogenen und natürlichen APL ermöglicht werden. Die Isolierung der B-1-Zellen und deren Immortalisierung weisen verschiedene Schwierigkeiten auf. B-1-Zellen aus Gesunden konnten erfolgreich isoliert und in zwei Fällen auch immortalisiert werden. Fusion und Klonierung zur Produktion monoklonaler APL waren nicht erfolgreich. In der vorliegenden Arbeit werden mögliche Gründe und mögliche alternative Lösungen diskutiert.

Abschließend konnte eine Methode entwickelt werden, mit deren Hilfe β 2GPI- und Prothrombin-freie IgG-Fractionen aus Seren von Gesunden, APS-Patienten und Patienten mit

akuter Epstein-Barr-Virus-Infektion (EBV) isoliert werden. Die Kofaktorabhängigkeit der Bindung von APL an Phospholipide wurde mehrfach als Merkmal einiger APL beschrieben – hier werden v.a. β 2GPI und Prothrombin beschrieben. Viele Gruppen gehen davon aus, dass die Kofaktorabhängigkeit mit der Pathogenität der APL einhergeht. Klinische Tests berücksichtigen bei der Untersuchung der Kofaktorabhängigkeit der APL in Seren von APS-Patienten jedoch meist das Vorhandensein der Kofaktoren im Serum, und damit deren Einflüsse auf die Testergebnisse, nicht. Die hier entwickelte Methode konnte im Rahmen einer medizinischen Doktorarbeit erfolgreich in Untersuchungen zur Kofaktorabhängigkeit der APL von APS- und EBV-Patienten eingesetzt werden. Sie wurde so entwickelt, dass sie hinsichtlich des methodischen und des zeitlichen Aufwandes ohne weiteres in der klinischen Diagnostik genutzt werden kann.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit tragen zur weiteren Aufklärung der strukturellen Eigenschaften von APL bei. Besonders mit JGG9 wurde ein Antikörper charakterisiert, der sehr ungewöhnliche Mutationen trägt. Auch wenn eine direkte Beteiligung an pathologischen Prozessen nicht nachgewiesen ist, ist dies v.a. vor dem Hintergrund interessant, dass JGG9 aus einer Patientin mit besonders schwerer APS-Symptomatik isoliert wurde.

Die ersten Untersuchungen und Überlegungen zu B-1-Zellen stellen einen Beitrag zur gerade beginnenden Diskussion über mögliche Zusammenhänge zwischen in unterschiedlichen Situationen auftretenden APL dar (natürliche, infektassoziierte und pathogene APL).

Nicht zuletzt konnte eine Methode entwickelt werden, die in einer weiteren Doktorarbeit die Unterscheidung kofaktorabhängiger und –unabhängiger APL ermöglicht hat. Da diese Methode standardisierbar und auf Routine-Tests übertragbar ist, kann sie zur signifikanten Verbesserung der diagnostischen Spezifität im Nachweis pathogener APL beitragen.

Sowohl die Definition des APS als auch die zugrunde liegenden Pathomechanismen sind nicht ganz unumstritten, besonders hinsichtlich der Abgrenzbarkeit gegenüber anderen Erkrankungen. Die im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit erzielten Ergebnisse werden in diesem Kontext diskutiert.

2 Einleitung

2.1 Antiphospholipidsyndrom

2.1.1 Geschichte, Klinik, Diagnose und Klassifikation des Antiphospholipidsyndroms

Das Antiphospholipidsyndrom ist eine systemische Autoimmunerkrankung, die laborchemisch durch Autoantikörper gegen anionische Phospholipide (APL) und klinisch durch arterielle oder venöse Thrombosen sowie bei Frauen durch rezidivierende Aborte gekennzeichnet ist. Die immunologische Reaktion von Patientenserum mit Phospholipidpräparationen wurde erstmals 1906 von Wassermann beschrieben (Wassermann et al., 1906). Die diagnostische Bedeutung dieser Reaktivität lag in der Erkennung der Syphilis. Die bei Wassermann (und ab 1946 im VDRL-Test) zu diagnostischen Zwecken herangezogenen und als „Reagine“ beschriebenen Serumbestandteile stellen eine heterogene Gruppe phospholipidreaktiver Antikörper dar. Für eine weitere, vom Vorliegen der Syphilis-Erkrankung unabhängige Gruppe lipidreaktiver (und in der Syphilis-Diagnostik als falsch-positiv reagierender) Antikörper konnte *in vitro* eine Hemmung phospholipidreaktiver Gerinnungsschritte gezeigt werden. 1980 wurde erstmals eine erhöhte Frequenz von Thrombosen bei Patienten mit solchen als Lupus-Antikoagulans beschriebenen Antikörpern festgestellt (Mueh et al., 1980). Auffallend war hier, dass die in funktionellen Tests zu verlängerten Blutgerinnungszeiten führenden Antikörper mit dem klinischen Bild der Thrombose, also einer gesteigerten Gerinnungsneigung, einhergingen. Es kristallisierte sich immer mehr ein Zusammenhang zwischen dem Lupus-Antikoagulans bzw. den APL und thrombo-embolischen Komplikationen heraus, deren unmittelbare Assoziation unterdessen gezeigt werden konnte (Mueh et al., 1980; Harris et al., 1983; Harris et al., 1986; Hughes et al., 1986). 1986 wurde diesbezüglich von Harris und Hughes der Begriff „Antiphospholipidsyndrom“ geprägt. Heute fasst man das LA und nicht mit der Syphilis in Zusammenhang stehende lipidreaktive Antikörper als APL zusammen. Bei den APL im Rahmen des APS handelt es sich häufig um Anti-Cardiolipin-Antikörper.

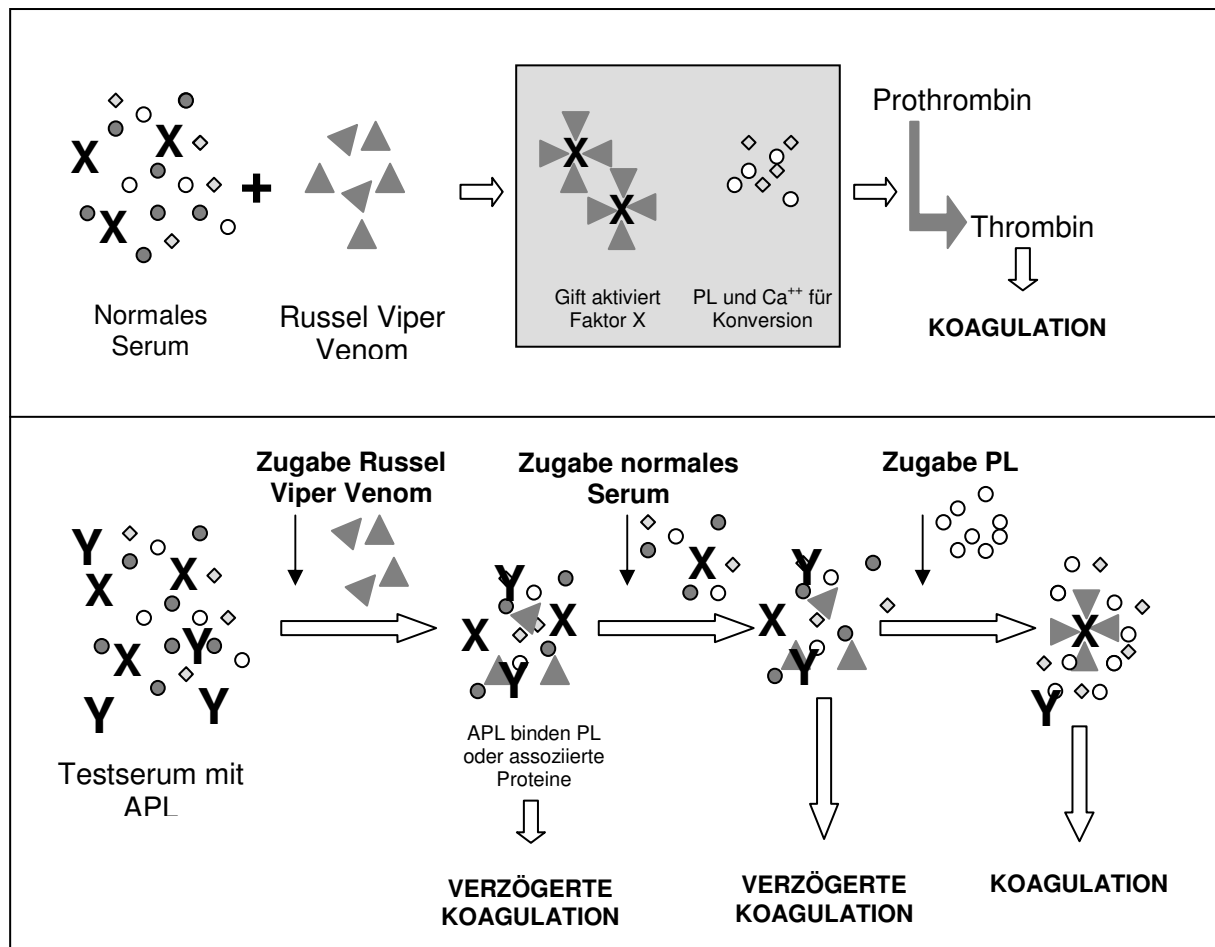


Abbildung 2-1: LA-Bestimmung (Abbildung nach Hanly, 2003)

Das APS charakterisiert Patienten, bei denen arterielle oder venöse Thrombosen oder vermehrte Fehlgeburten auftreten, und die gleichzeitig in diagnostischen Tests einen erhöhten ACL-Serumtiter oder eine positive LA-Reaktion zeigen. Als Klassifikationskriterien für das APS wurden also laborchemisch entweder das Auftreten von ACL oder von Lupus-Antikoagulans und klinisch Manifestationen von thrombo-embolischen Ereignissen oder wiederholte Aborte definiert (Tabelle 2-1) (Wilson et al., 1999; Greaves et al., 2000). Diese so genannten „Sapporo-Kriterien“ wurden kürzlich revidiert und auf der Basis neuer klinischer, laborchemischer und experimenteller Hinweise erweitert (Miyakis et al., 2006). Dieses Update der Klassifikationskriterien ist jedoch noch nicht allgemein akzeptiert und wird derzeit intensiv diskutiert.

In den Jahren nach der Beschreibung des APS wurden dem APS zunehmend weitere klinische Manifestationen zugeschrieben (Alarcon-Segovia, 1992; Shapiro, 1996). So ist das APS z.B. eine wichtige Ursache für Schlaganfälle im Alter unter 40 Jahren und besonders auch in der Pädiatrie (deVeber et al., 1998; Kilian et al., 2006). Die in letzter Zeit vermehrt verwendeten Begriffe „katastrophales APS“ und „systemisches APS“ spiegeln die schweren Konsequenzen

wieder, die das APS - zum Teil ausgelöst durch thrombotische Ereignisse in unterschiedlichsten Körperregionen – auf verschiedene Organsysteme haben kann (Asherson, 1992; Shoenfeld, 2003; Asherson, 2005; Cervera et al., 2005), bis hin zum Multiorganversagen.

Man unterscheidet das primäre APS, bei dem weitere autoimmunologische Merkmale fehlen, von dem mit anderen Autoimmunkrankheiten assoziierten sekundären APS. Das sekundäre APS findet sich v.a. im Zusammenhang mit dem systemischen Lupus erythematosus (SLE). Etwa ein Drittel der SLE-Patienten zeigt laborchemische und klinische Merkmale des APS.

Tabelle 2-1: Klassifikationskriterien des APS nach (Wilson et al., 1999).

Klinisch	Serologisch / laborchemisch
Venöse oder arterielle Thrombosen / Embolien	Mittlerer oder hoch positiver IgG-APL-Titer
Wiederholte Aborte	Positiver LA Test Mittlerer oder hoch positiver IgM-ACL-Titer und positiver LA Test
Diagnose des APS bei mindestens einem klinischen und einem serologischen Kriterium. Die serologischen Tests müssen mindestens zweimal im Abstand von mehr als zwei Monaten positiv sein. Die ursprünglich zu den Klassifikationskriterien zählende Thrombozytopenie wird seit 1999 nicht mehr als klinisches Kriterium gewertet.	

Die Frage nach der Inzidenz v.a. des primären APS ist nur schwer zu klären. Neben der Faktor V-Leiden-Mutation gilt das APS als der häufigste Grund für Thrombophilien und macht etwa 20 % der Fälle von wiederholten Thrombosen bei jüngeren Patienten aus. Ungefähr 15 % der Fälle von wiederholten Aborten werden auf das APS zurückgeführt. Der relative Anteil sowohl des APS als auch der genetischen Thrombophilien als Ursache für Thrombosen geht mit zunehmendem Alter der Patienten zurück. Bei den über 65-Jährigen werden Thrombosen hauptsächlich durch Atherosklerose oder Krebserkrankungen ausgelöst (Lockshin und Erkan, 2003). Trotz Behandlung mit Antikoagulanzen wurden bei APS-Patienten, die 10 Jahre lang beobachtet wurden, in 29 % der Fälle wieder auftretende Thrombosen und eine Mortalität von 10 % beobachtet (Shah et al., 1998).

Eine eindeutige Abgrenzung des APS ist aus mehreren Gründen schwierig. Hier ist besonders hervorzuheben, dass schon die Klassifikationskriterien für das APS klinische Manifestationen einschließen, die auch bei anderen Erkrankungen vorkommen können. So sind Thrombosen häufig unabhängig vom APS nach operativen Eingriffen, unter oraler Kontrazeption oder beeinflusst durch andere Faktoren (z.B. genetisch bedingte Thrombophilien) zu beobachten. Auch ungeklärte Aborte müssen nicht immer durch das APS verursacht sein.

Auch ACL sind nicht nur im Kontext des APS zu finden. Sie wurden schon bei Wassermann zur Diagnose der Syphilis herangezogen. Dies ist nur ein Beispiel dafür, dass bei Patienten im Verlaufe von Infektionserkrankungen APL, insbesondere auch ACL, nachgewiesen werden können – allerdings sind APL, die als Folge einer Infektion gebildet werden, meist nur transient im Serum detektierbar und verschwinden im Allgemeinen wenige Wochen nach Abklingen der Infektion. Auch im Serum von Gesunden können sich vorübergehend APL finden, ohne dass eine Ursache hierfür auszumachen ist – abhängig von der Definition des Cut-Offs des gewählten Testes und der Testkonfiguration kann dieses Phänomen in bis zu 5 % einer ansonsten gesunden Population beobachtet werden. Meist handelt es sich um niedrig titrige Antikörper (Lockshin und Erkan, 2003).

Darüber hinaus ist immer häufiger eine Ausweitung des Begriffes „Antiphospholipidsyndrom“ festzustellen. Patienten, die zwar keine Thrombosen oder rezidivierende Aborte aufweisen, bei denen aber ein erhöhter ACL-Titer nachgewiesen wird, werden von einigen Untersuchern als APS-Patienten diagnostiziert, wenn sie an Livedo reticularis, Thrombozytopenie, Herzklappen-Erkrankungen, Multiple Sklerose-ähnlichen Konditionen oder einer progressiven kognitiven Dysfunktion leiden (Lockshin und Erkan, 2003). Neben den eigentlichen Symptomen zur Klassifikation des APS sind also viele seltenere Komplikationen mit dem APS in Zusammenhang gebracht worden, die in der Revision der Sapporo-Kriterien als APL-assoziierte klinische Manifestationen bezeichnet werden, aber nicht in die Kriterien mit aufgenommen wurden (Miyakis et al., 2006).

Neben dem bisher nur geringfügig aufgeklärten Pathomechanismus stellt die beschriebene Problematik hinsichtlich der eindeutigen Diagnostizierbarkeit des APS einen wesentlichen Grund für Schwierigkeiten in der Entwicklung von rationalen Behandlungsstrategien dar. Das heterogene klinische Bild hat zu diskrepanten Empfehlungen für die Behandlung des APS geführt. Prospektive, kontrollierte klinische Studien zu den unterschiedlichen Therapieansätzen sind selten. Aktuelle Behandlungen sind hauptsächlich symptomatisch und

bekämpfen nicht die immunologischen Ursachen der Erkrankung. Hier steht im Vordergrund, das Risiko für weitere thrombo-embolische Ereignisse zu verringern und die Prognose einer Schwangerschaft bei Frauen zu verbessern. Für beides werden derzeit antikoagulatorische Behandlungsstrategien verfolgt. Es stehen Thrombozytenaggregationshemmer, hoch- und niedermolekulare Heparine und Cumarine zur Verfügung. Die Wirksamkeit dieser Agenzien ist von Patient zu Patient unterschiedlich und Therapieempfehlungen, die spezifisch sind für Subgruppen von APS-Patienten, werden noch immer kontrovers diskutiert.

Wissenschaftliche Publikationen beschreiben immer wieder Einzelerfolge mit neuen Behandlungsstrategien. So konnte bei Patienten der Verlauf des APS durch den Einsatz intravenöser Immunglobuline (IVIG) oder des monoklonalen Anti-CD20-Antikörpers Rituximab gebessert werden (Arabshahi et al., 2005; Konova, 2005; Rubenstein et al., 2006).

Unter Diskussion steht weiterhin die Frage nach dem besten Zeitpunkt für eine Therapie und der Therapiedauer: Sollten Personen, die einen stark erhöhten APL-Titer aufweisen, jedoch noch keine klinischen Symptome gezeigt haben, prophylaktisch mit Antikoagulanzen behandelt werden? Sollten alle Schwangeren auf APL getestet werden, und sollten sie bei positiven Testergebnissen behandelt werden? Und wie lange? Kann durch die antikoagulatorische Therapie die Entstehung der mit dem APS in Verbindung gebrachten weiteren Krankheitsbilder (wie Livedo reticularis, Thrombozytopenie oder kognitive Dysfunktion) verhindert werden? Welche Behandlungen sollen angewendet werden bei Patienten, die trotz intensiver Antikoagulation weitere Thrombosen entwickeln?

Die Frage nach der geeigneten Therapie ist ähnlich schwierig wie die individuelle Identifikation der Risikopatienten. Es ist zu erwarten, dass mit vermehrtem Wissen über die Mechanismen der Thrombose-Induktion und der Ursache der Aborte innovative Behandlungsmethoden entwickelt werden können.

2.1.2 Mögliche dem APS zugrunde liegende Pathomechanismen

APL sind assoziiert mit Thrombosen und Fehlgeburten bei Patienten mit APS. Die im Zusammenhang mit dem APS vorkommenden APL sind eine heterogene Gruppe von Antikörpern. Sie sind gekennzeichnet durch ihre Fähigkeit, Phospholipide, phospholipidbindende Proteine oder Komplexe aus beiden zu binden oder durch ihre Fähigkeit, phospholipidabhängige Gerinnungsreaktionen *in vitro* zu verlängern (LA).

Mehrere Untersuchungen zeigen eine direkte Involvierung von APL in thrombotische Ereignisse, auch wenn hier die Kenntnis der einzelnen zugrunde liegenden Interaktionen und

Schritte oft noch fehlt. Die Untersuchungen wurden mit Patientenserum, polyklonalen IgG-Fractionen oder monoklonalen APL durchgeführt. So konnte gezeigt werden, dass manche APL mit phospholipidabhängigen Gerinnungsschritten interferieren. Darüber hinaus konnten Einflüsse von APL auf Thrombozyten, Monozyten und Endothelzellen gezeigt werden, die zur Induktion von gerinnungsfördernden Oberflächenmolekülen führen und damit zu einer – auch in Patienten beobachteten – gesteigerten prokoagulanten Aktivität beitragen können. Erst kürzlich ist es gelungen, hieran beteiligte Signaltransduktionswege genauer aufzuklären (Lopez-Pedrerera et al., 2006b).

Die Vielfalt in der Bindungsspezifität der APL spiegelt die Heterogenität hinsichtlich ihrer Funktionen und ihrer Einflüsse auf gerinnungsfördernde Vorgänge wider.

2.1.2.1 Antiphospholipidantikörper und ihre Antigene und Kofaktoren

Als Kofaktoren, deren Beteiligung an der Bindung des Phospholipids als Voraussetzung für die Pathogenität des Antikörpers im Kontext des APS diskutiert wird, werden v.a. β 2GPI, aber auch Prothrombin, Annexin V, Protein S und Protein C genannt (Galli et al., 1990; Matsuura et al., 1990; McNeil et al., 1990; Bevers et al., 1991; Sammaritano et al., 1992; Ordi et al., 1993; Oosting et al., 1993). Wie vorher beschrieben können APL entweder direkt an Phospholipide alleine, an Komplexe aus Phospholipiden und phospholipidbindenden Kofaktoren oder an die Plasmaproteine alleine binden. Abhängig davon, welches Antigen durch den Antikörper erkannt wird, spricht man von kofaktorabhängiger oder kofaktorunabhängiger Bindung.

Von den fünf als Kofaktoren fungierenden Proteinen ist das β 2GPI hinsichtlich seiner Interaktion mit den APL und Phospholipiden auf molekularer Ebene am besten untersucht und klinisch am bedeutsamsten. Die Beteiligung von β 2GPI an der Bindung der Phospholipide durch APL wurde erstmals durch McNeil *et al.* 1990 beschrieben (McNeil et al., 1990). APL, die als polyklonales Serum im ELISA Reaktivität gegen Cardiolipin zeigten, wurden über Phospholipid-Affinitätschromatographie und nachfolgende Ionen-Austausch-Chromatographie isoliert. Das Isolat zeigte anschließend weder im ELISA (bei dem ein serumfreies Blockierungsreagenz verwendet wurde), noch an eine Phospholipid-Affinitätssäule Bindung. Nur bei Zugabe von humanem Plasma oder Serum oder von bovinem Serum konnte die Bindungsfähigkeit gegen Phospholipide wieder hergestellt

werden. Aus humanem Serum konnte ein für die Bindung notwendiger Kofaktor isoliert und als β 2GPI identifiziert werden.

β 2GPI, auch als Apolipoprotein H (ApoH) bekannt, ist ein Bestandteil des humanen Plasmas, in dem es in einer Konzentration von etwa 200 μ g/ml vorliegt. Ein Großteil des β 2GPI liegt assoziiert mit Lipoproteinen, vornehmlich mit HDL (High-Density Lipoprotein) oder Chylomikronen, vor (Polz und Kostner, 1979). Es besteht aus einer einzelnen Glykoproteinkette aus 326 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von etwa 50 kDa. Das β 2GPI weist 5 Domänen auf, wobei sich N-terminal vier so genannte „Sushi-Domänen“ befinden, denen sich C-terminal eine fünfte Domäne anschließt. Die Sushi-Domänen bestehen aus *short consensus repeats* (SCR) vom *complement control protein module*-Typ (CCP). Die fünfte Domäne beinhaltet eine Lysin-reiche Region und weist einen positiv geladenen Charakter auf. Diese Architektur ermöglicht dem β 2GPI Bindungen an negativ geladene Bindungspartner wie Heparin, DNA, Zellmembranbestandteile (v.a. bei apoptotischen Zellen, bei denen negativ geladene Phospholipide an die Zelloberfläche gelangen), Endothelzellen, Makrophagen und negativ geladene Phospholipide.

Die für die Interaktion mit den APL und Phospholipiden zuständige Region im β 2GPI wird noch immer kontrovers diskutiert, wobei hauptsächlich die Domäne V als Phospholipid-Bindungsstelle und als Epitop für APL vorgeschlagen wird (Hunt und Krilis, 1994), was durch Röntgenstrukturanalyse des kristallisierten Proteins untermauert werden konnte (Schwarzenbacher et al., 1999). Aber auch eine Beteiligung der Sushi-Domänen an der Lipid-Protein-Interaktion wurde berichtet (Hagihara et al., 1995). Studien mit domänendepletierten β 2GPI-Mutanten und APL von APS-Patienten wiesen auf Domäne IV als Epitop für APL hin (Hasunuma et al., 1997; George et al., 1998b). Hierbei ist noch immer unter Diskussion, ob APL Epitope auf dem nativen β 2GPI erkennen, oder ob das Epitop erst nach Bindung des Proteins an negativ geladene Strukturen exponiert wird (Galli et al., 1990).

β 2GPI kann die Prothrombinase-Aktivität von ADP-aktivierten Thrombozyten inhibieren und ist somit in der Lage, als Antikoagulans zu wirken (Nimpf et al., 1986; Shi et al., 1993). Außerdem bindet es oxidiertes LDL (*Low Density Lipoprotein*) (Horkko et al., 1997). Dies impliziert eine Beteiligung an atherosklerotischen Prozessen. Darüber hinaus wird die Beteiligung von β 2GPI an weiteren physiologischen Prozessen untersucht.

Die bisher beschriebenen Funktionen des β 2GPI hinsichtlich Antikoagulation und eventuell Atherosklerose weisen auf die Rolle hin, die der Kofaktor in der Pathogenese des APS haben könnte.

2.1.2.2 Einfluss auf die plasmatische Gerinnung und Protein C und S

Thrombosen stellen die häufigste klinische Manifestation des APS dar. Sie können die Gefäße sämtlicher Organe betreffen. Die *in vivo*—Mechanismen, die für die Entstehung der Thrombosen bei APS-Patienten verantwortlich sind, sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Jedoch werden unterschiedliche Wege diskutiert.

APL können direkt mit der Gerinnungskaskade interagieren, oder durch Interaktion mit Zellen einen prokoagulanten Status induzieren. Die Induktion der prokoagulanten Aktivität auf unterschiedlichen Zelltypen wird im folgenden Kapitel ausführlich dargestellt (Kapitel 2.1.2.3).

Verschiedene an der Gerinnung bzw. der Antikoagulation beteiligte Faktoren wurden als Kofaktoren für die Antigenbindung bei APL beschrieben, z.B. Prothrombin, Annexin V, Protein S und Protein C. Diese Faktoren sind an der Regulation der Koagulation beteiligt, und es liegt nahe, dass Antikörper durch ihre Bindung an diese Faktoren mit deren Rolle interferieren (Levine et al., 2002). Zum Beispiel ist bewiesen, dass die Bindung von Annexin V an prokoagulante Oberflächen durch APL inhibiert wird (Rand et al., 1997; Rand et al., 1998). Weiterhin wurde vorgeschlagen, dass die Interaktion von APL mit dem aktivierten Protein C (APC) – Antikoagulationsweg ein Hauptmechanismus des direkten Einflusses von APL auf die Gerinnungskaskade und ein Auslöser prokoagulanter Aktivität ist (Oosting et al., 1993; Bokarewa et al., 1994; Smirnov et al., 1995; Esmon et al., 1999). Das antikoagulante Protein C-System reguliert die Aktivität der Gerinnungsfaktoren VIIIa und Va (Abbildung 2-2), die an der Aktivierung von Faktor X und Prothrombin beteiligt sind. Hierbei spaltet Protein C in seiner aktivierten Form (APC) Faktor VIIIa und Faktor Va unter Beteiligung von Proteinkofaktoren (wie Protein S) auf negativ geladenen Phospholipid-Oberflächen (Dahlback und Villoutreix, 2005).

Eine Bindung von APL an Protein C und S kann zu einer Inhibition der Aktivität dieser Proteine und damit zu einer Beeinträchtigung des APC-Antikoagulationsweges führen. Hieraus resultiert dann ein prothrombotischer Status (Esmon et al., 1999). Auch ist denkbar, dass phospholipidabhängige Schritte im APC-Weg durch Bindung von APL an Phospholipide gestört werden. Die Aktivierung des Protein C ist phospholipidabhängig, ebenso die APC-vermittelte Spaltung der Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa (Abbildung 2-3).

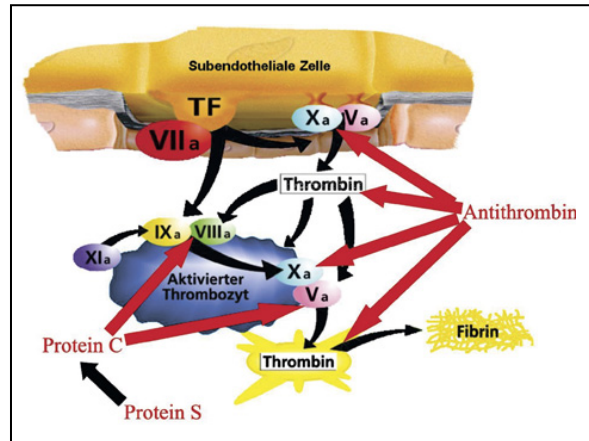


Abbildung 2-2: Antikoagulatorische Proteine zur Regulation der plasmatischen Gerinnung
(Abbildung entnommen aus www.die-thromboseeinigungen.de)

Da es jedoch auch prokoagulatorische Schritte in der Gerinnungskaskade gibt, die Phospholipidabhängigkeit aufweisen, stellt sich die Frage, wieso hier keine Einflüsse zu beobachten sind. Esmon *et al.* konnten Hinweise darauf gewinnen, dass sich die Bedürfnisse an die Membranbeschaffenheit und den Zustand der Membranen bei phospholipidabhängigen Schritten des APC-Weges und den phospholipidabhängigen Reaktionen prokoagulanter Komplexe signifikant unterscheiden, v.a. hinsichtlich des Phosphatidylethanolamin-Gehaltes (PE). Diese Unterschiede, besonders die Notwendigkeit eines hohen PE-Anteils in der Membran bei phospholipidabhängigen Schritten des APC-Weges, könnten für die unterschiedlichen Auswirkungen der APL auf pro- und antikoagulatorische Reaktionen verantwortlich sein (Esmon *et al.*, 1999).

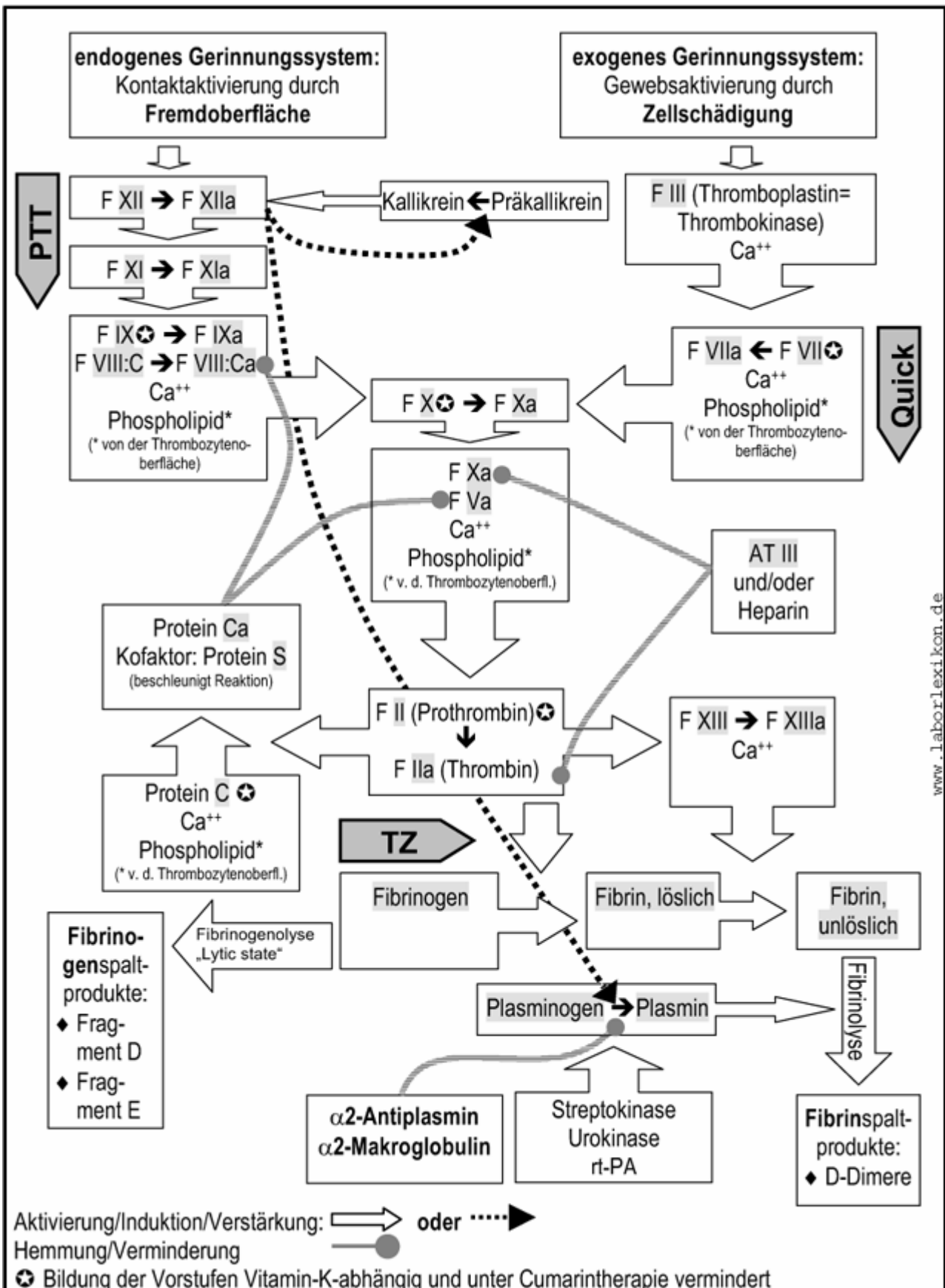


Abbildung 2-3: Gerinnung und Fibrinolyse (Abbildung entnommen aus www.laborlexikon.de)

2.1.2.3 Einfluss der Antiphospholipidantikörper auf Monozyten, Thrombozyten und Endothelzellen: Induktion eines prokoagulanten Status im APS

Als Ursache für thrombotische Ereignisse, die wiederholt bei APS-Patienten beobachtet werden, werden neben der direkten Beeinflussung der Gerinnung (z.B. durch Inaktivierung von Protein C und S) und fibrinolytischer Prozesse durch APL (Marciniak und Romond, 1989; Malia et al., 1990; Keeling et al., 1991; Ruiz-Arguelles et al., 1991; Oosting et al., 1993) Interaktionen der APL mit Zellen, die an der Thrombusformation beteiligt sein können oder eine prokoagulante Aktivität entwickeln können, diskutiert.

Verschiedene Gruppen konnten zeigen, dass APL in der Lage sind, Endothelzellen, Monozyten oder Thrombozyten zu aktivieren. Sowohl die Mechanismen, die zur Aktivierung dieser Zellen führen, als auch die genauen an der induzierten prokoagulanten Aktivität beteiligten Prozesse sind noch nicht abschließend geklärt und unterschiedliche Theorien werden hierzu diskutiert. Eine Zusammenfassung findet sich in Abbildung 2-4. Die Untersuchungen fokussieren sich hauptsächlich auf Endothelzellen und Monozyten, wobei vorgeschlagen wird, dass die Interaktion zwischen beiden Zelltypen maßgeblich an thrombotischen Prozessen beteiligt sein könnte. Die Aktivierung von Endothelzellen durch APL *in vitro* wurde erstmals von Simantov *et al.* gezeigt (Simantov et al., 1995). In HUVECs (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) konnte nachgewiesen werden, dass APL in der Lage sind, die Expression des Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) zu induzieren (Cho et al., 2002). Dieser Effekt konnte sowohl mit monoklonalen APL als auch mit polyklonalem Serum von APS-Patienten ausgelöst werden. Auch MCP-1-Serum-Level von SLE-Patienten, deren Serum LA-Aktivität aufweist, korrelierten mit den gemessenen APL-Titern bei diesen Patienten, was den direkten, *in vitro* gezeigten Zusammenhang der beiden Parameter auch für die *in vivo*-Situation unterstreicht. Die Induktion der erhöhten MCP-1-Expression scheint dabei β 2GPI-abhängig zu sein. Neben der Stimulierung der Migration hat MCP-1 weitere Auswirkungen auf Monozyten, nämlich u.a. die Induktion des Tissue Faktors (TF) und der Sekretion proinflammatorischer Cytokine. Auch andere Beobachtungen unterstreichen die Bedeutung der Interaktion zwischen Endothelzellen und Monozyten als Resultat ihrer Aktivierung durch APL. So wurde die Induktion der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin auf Endothelzellen und die darauf folgende gesteigerte Adhäsion von Monozyten gezeigt (Del Papa et al., 1995; Simantov et al., 1995; George et al., 1998a). Hier konnte sowohl ein Zusammenhang mit Thrombosen (Pierangeli et al., 1999; Pierangeli et al., 2001) als auch mit fötaler Resorption (George et al., 1998a) im Tiermodell nachgewiesen werden.

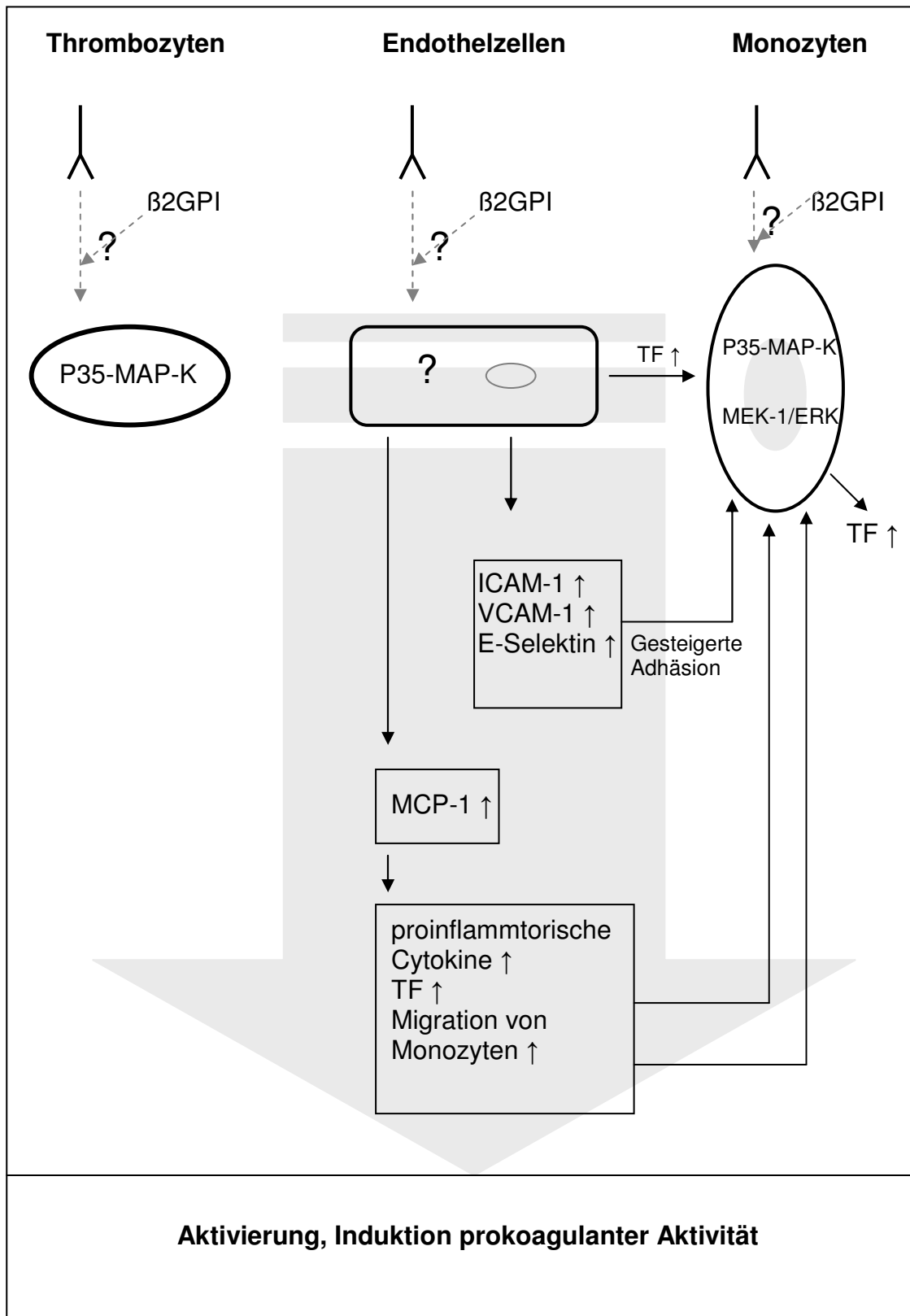


Abbildung 2-4: Pathomechanismen beim APS – zelluläre Mechanismen

Hinsichtlich der Monozyten wird eine Induktion der TF-Expression, sowohl als Resultat der Endothel-Monozyt-Interaktion als auch durch direkte Stimulierung der Monozyten durch APL, beschrieben (Kornberg et al., 1994; Cuadrado et al., 1997; Amengual et al., 1998; Lackner et al., 2000; Pierangeli et al., 2000). Dies spiegelt sich auch in einem erhöhten Level von TF-RNA in Monozyten, der bei APS-Patienten im Vergleich zu Normalprobanden gefunden wird, wider (Dobado-Berrios et al., 1999). Neuere Untersuchungen gehen davon aus, dass APL simultan und unabhängig voneinander den p38-MAP-Kinase-Signalweg und den MEK-1/ERK-Weg aktivieren und dadurch eine erhöhte TF-Expression induzieren (Lopez-Pedrerera et al., 2006b). Auch in Thrombozyten konnte eine Aktivierung des p38-MAP-Kinase-Weges durch APL nachgewiesen werden (Vega-Ostertag et al., 2004).

Es ist noch weitgehend unklar, wie die Interaktion der APL mit Endothelzellen, Monozyten und Thrombozyten aussieht, und welche zellulären Strukturen als Interaktionspartner für APL dienen. Es gibt Hinweise darauf, dass die prokoagulante Aktivität nicht durch direkte Bindung der Antikörper an Monozyten oder Endothelzellen ausgelöst wird, sondern dass phospholipidbindende Proteine wie β 2GPI eine Brückenfunktion zwischen zirkulierenden APL und zellulären Zielstrukturen einnehmen (Del Papa et al., 1995; Meroni und Riboldi, 2001). Dennoch ist nicht auszuschließen, dass auch direkte Wechselwirkungen zwischen APL und Endothelzellen und Monozyten stattfinden und sich auf den entsprechenden Zelloberflächen Antigene für phospholipidreaktive Antikörper finden. Die Identifizierung dieser möglichen Antigene ist Gegenstand intensiver Forschungen und auch ein Aspekt der vorliegenden Arbeit.

2.1.2.4 Antiphospholipidantikörper und gynäkologische Symptome: Die Bedeutung des Komplementsystems im Antiphospholipidsyndrom

Neben den thrombotischen Ereignissen stellt das Auftreten von wiederholten Aborten das zweite klinische Klassifikationskriterium für das APS dar. Ein direkter Zusammenhang zwischen den APL und den Schwangerschaftskomplikationen konnte verschiedentlich in Mausmodellen gezeigt werden, in denen Aborte, fötale Wachstumsverzögerungen und Nekrosen der Plazenta nach Injektion von mono- oder polyklonalen humanen und murinen APL beobachtet wurden (Branch et al., 1990; Blank et al., 1991; Piona et al., 1995; Ikematsu et al., 1998). Als Ursache für diese Beobachtungen wurden intrauterine Thrombosen (Piona et al., 1995) diskutiert. Eine direkte Bindung von APL an Trophoblast-Zellen konnte gezeigt werden (Di Simone et al., 2000). Beides scheint jedoch nicht ausreichend für die Induktion der Aborte, Wachstumsverzögerungen und placentaren Nekrosen zu sein. Histopathologische

Untersuchungen an Plazenten von Frauen mit APS zeigen deutliche Zeichen der Beteiligung weiterer proinflammatorischer Prozesse (Out et al., 1991; Magid et al., 1998). Untersuchungen von Holers *et al.* konnten im Tiermodell eine Beteiligung des Komplementsystems an den zum Abort führenden Prozessen im APS demonstrieren (Holers et al., 2002; Salmon et al., 2003). APL, die schwangeren Mäusen injiziert wurden, konnten im Gegensatz zu Kontroll-Antikörpern in der Dezidua angereichert gefunden werden und führten hier zu einer extensiven Komplementablagerung. Eine direkte Auswirkung dieser Komplementablagerung auf die Auslösung wachstumsretardierender Prozesse beim Fötus und auf Aborte konnte nachgewiesen werden. Da bekannt ist, dass Komplementfragmente auch Endothelzellen und Thrombozyten aktivieren können (Hattori et al., 1989; Benzaquen et al., 1994) und dadurch zur Induktion eines prokoagulanten Phänotypes führen und an der Thrombose-Entstehung beteiligt sein könnten, wurde die Auswirkung eines Komplementinhibitors (Cry-Ig, ein C3-Konvertase-Inhibitor, der den klassischen und alternativen Komplementweg inhibieren kann) auf die Thrombusformation in einem Modell zur operativ induzierten Thrombusformation in der Arbeit von Holers *et al.* getestet. Auch hier konnte eine Beteiligung des Komplements an der Thrombusentstehung gezeigt werden. Holers *et al.* schlagen zur Erklärung der pathogenen Effekte der APL auf die fötale Entwicklung einen Mechanismus vor, der als erstes von einer direkten Bindung der APL an Plazentastrukturen ausgeht, was auch in mehreren anderen Untersuchungen gezeigt werden konnte. Durch diese Bindung werde eine prokoagulante Aktivität auf Endothelzellen und Thrombozyten ausgelöst, die zur Thrombusformation beitragen können. Dies scheint jedoch noch nicht ausreichend zu sein zur Verursachung von Aborten oder Wachstumsverzögerungen. Durch die Aktivierung des Komplementsystems komme es zur weiteren Endothelzell- und Thrombozytenaktivierung, zur Gewebhypoxie und zu entzündlichen Prozessen in der Plazenta, was schließlich zum Verlust des Fötus führe. Die ersten zwei Schritte legen eine Wirkung des vorgeschlagenen Mechanismus auch bei den thrombo-embolischen Komplikationen nahe (Salmon und Girardi, 2004).

Der beschriebene Mechanismus konnte durch Untersuchungen zum Wirkmechanismus des Heparins im Tiermodell zu Aborten und fötaler Wachstumsretardierung untermauert werden (Girardi et al., 2004). Die Therapie von Frauen mit durch das APS verursachten Fehlgeburten fokussiert sich hauptsächlich auf die Prävention von Thrombosen, aber diese antikoagulatorische Strategie ist in der Verhinderung von Aborten nur teilweise erfolgreich (Levine et al., 2002; Derksen et al., 2004). Demgegenüber konnte Heparin schon in

subantikoagulanten Dosen zur Verbesserung des Outcomes einer Schwangerschaft führen (Derksen et al., 2004).

Für Heparin konnten schon 1929 inhibierende Effekte auf das Komplementsystem nachgewiesen werden (Ecker und Gross, 1929). Auch bei anderen Erkrankungen, in deren Pathogenese Komplementaktivierung eine Rolle spielt, wurden therapeutische Erfolge mit subantikoagulanten Heparindosen beschrieben, z.B. bei Erkrankungen der Koronararterien (Hirsh et al., 2001; Menon et al., 2001).

Die Untersuchungen von Girardi *et al.* zeigen deutlich, dass die protektive Wirkung von Heparin in einem Mausmodell zum APL-induzierten Abort bzw. zur Wachstumsverzögerung beim Fötus nicht auf den antikoagulatorischen Effekt zurückzuführen ist, sondern klar aus der Komplement-inhibitorischen Wirkung resultiert. *In vitro*-Experimente komplettieren hier die *in vivo*-Beobachtungen. Durch an Trophoplasten-ähnliche Zellen gebundene APL ausgelöste Komplementaktivierung konnte durch Heparin vollständig verhindert werden.

Aus den vorgestellten Untersuchungen geht jeweils der Vorschlag einer das Komplementsystem inhibierenden Strategie als mögliche Behandlungsoption hervor. Die Untersuchungen unterstreichen die Bedeutung des Komplementsystems in der Pathogenese des APS.

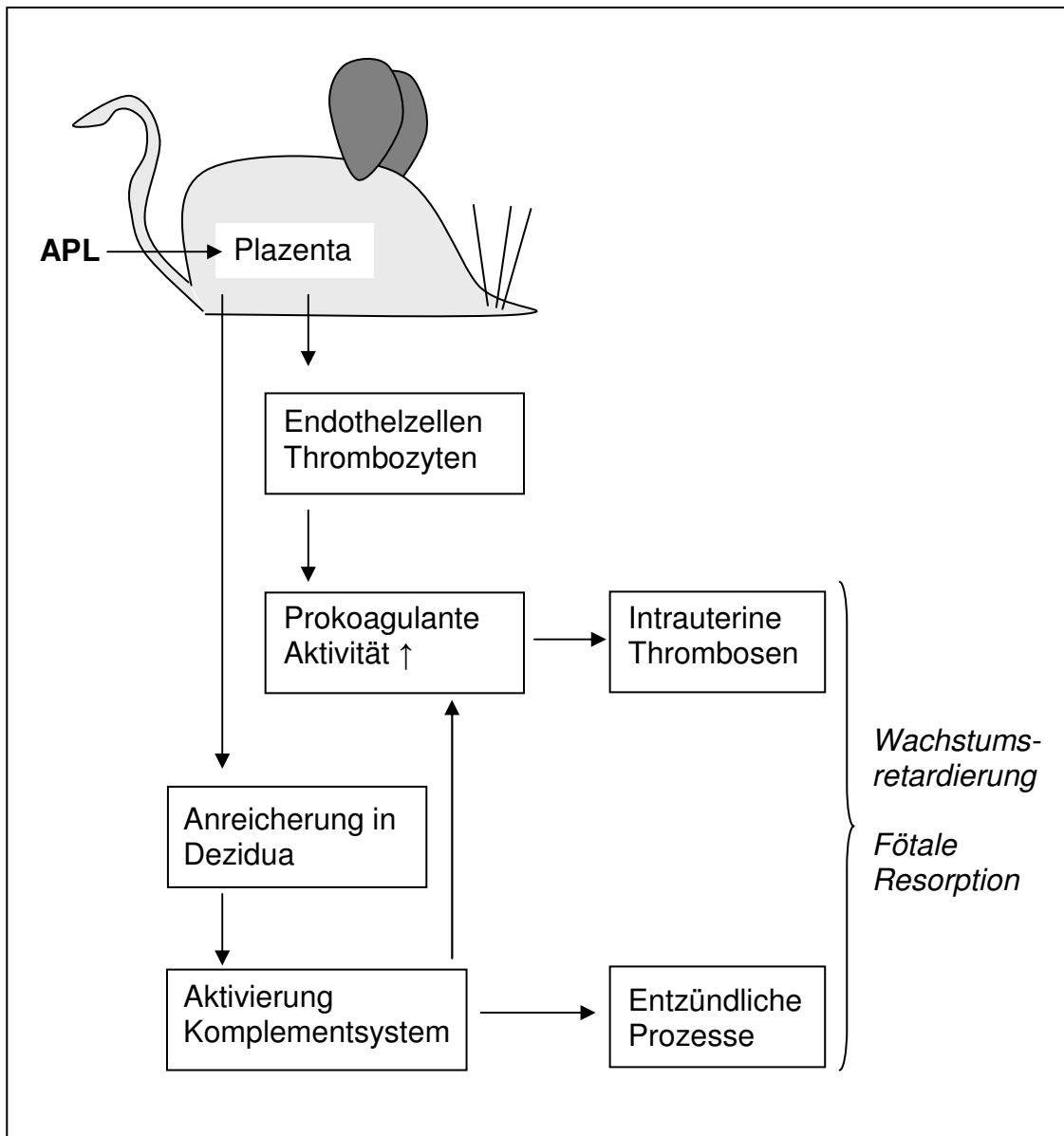


Abbildung 2-5: Pathomechanismen beim APS – Untersuchungen zur fötalen Resorption im Mausmodell

2.1.2.5 Infektionen und das Antiphospholipidsyndrom

Es ist generell akzeptiert, dass Autoimmunerkrankungen durch das Zusammenspiel vieler unterschiedlicher genetischer Faktoren und Umwelteinflüsse, z.B. Krankheitserreger, ausgelöst werden. Das gesunde Immunsystem ist normalerweise tolerant gegenüber körpereigenen Molekülen, also gegenüber Autoantigenen. Diese Toleranz wird schon während der Lymphozyten-Entwicklung durch klonale Deletion von Zellen, die Reaktivität

gegenüber ubiquitär vorhandenen Selbstantigenen zeigen, und durch klonale Inaktivierung bei der Präsentation von Gewebe-spezifischen Antigenen ohne kostimulatorische Signale erzielt. Weitere Mechanismen sind in Tabelle 2-2 und Tabelle 2-3 zusammengefasst. Es werden unterschiedliche Mechanismen diskutiert, die unter Beteiligung von Krankheitserregern zur Autoimmunität führen können, z.B. eine Zerstörung bestimmter Immunzell-Subsets durch Viren oder die übermäßige Aktivierung von bestimmten T- oder B-Zellen durch mikrobielle Superantigene, die zu einer Imbalance des Immunsystems führen und unter Umständen bleibende Veränderungen mit sich bringen. Tabelle 2-4 zeigt eine Zusammenstellung der Mechanismen, die zur Zerstörung der Selbsttoleranz durch Infektionen führen.

Tabelle 2-2: Toleranzmechanismen bei B-Zellen

	Toleranz-Mechanismus	Durchbrechung
B-Zellen	<u>Fehlende CD4-T-Zell-Hilfe</u> In der T-Zell-Zone der Lymphknoten existieren keine autoreaktiven CD4-T-Zellen, die mit Selbstantigenen beladene B-Zellen aktivieren könnten.	Autoreaktive CD4-T-Zellen Epitop-Spreading
	<u>Induktion von B-Zell-Anergie</u> Zirkulierende lösliche Antigen → keine multivalenten Komplexe → bei Bindung: IgM-Expression ↓, B-Zell-Rezeptor-Signaling ↓	Bindung löslicher Selbstantigene durch Pathogene → Komplexbildung
	<u>Apoptose aneurer B-Zellen</u> durch Fas/Fas-Ligand-Interaktion mit autoreaktiven T-Zellen.	Inhibition oder Deletion der Suppressor-T-Zellen
	<u>Elimination autoreaktiver B-Zellen in Keimzentren</u> (Nach somatischer Hypermutation)	

Daneben gehören viele bakterielle und virale Proteine sowie die anderer Krankheitserreger zu Proteinfamilien, die in unterschiedlichen Spezies konserviert sind. Diese weisen Sequenzhomologien zu humanen Proteinen auf, so dass Antigene von Krankheitserregern identisch mit Autoantigenen sein können, oder zumindest eine große Ähnlichkeit zeigen können. Diese molekulare Mimikry ist bei unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen als ein am Verlust der Selbsttoleranz beteiligter Faktor im Gespräch (Karlsen und Dyrberg, 1998; Oldstone, 1998; Albert und Inman, 1999; Regner und Lambert, 2001; Wucherpfennig, 2001). Ein erhöhter Titer von APL wird, wie schon beschrieben, im Zusammenhang mit vielen Infektionserkrankungen, so auch der Syphilis, beobachtet. Man spricht von so genannten infekassozierten Antikörpern. Es ist hier noch umstritten, ob diese Antikörper

kofaktorabhängig oder –unabhängig sind, aber die Reaktivität von Antikörpern gegen β 2GPI im Rahmen einer Infektion wurde beschrieben (Loizou et al., 1997). Im Verlauf einiger der mit einer Erhöhung des APL-Titers einhergehenden Infektionen werden klinische Manifestationen des APS beobachtet. Nach einem kürzlich veröffentlichten Review konnten frühere Hautinfektionen (18%), HIV-Infektionen (17 %), Pneumonien (14 %), Hepatitis C-Virus-Infektionen (13 %) und Harnwegs-Infektionen mit einer Manifestation des APS in

Tabelle 2-3: Toleranzmechanismen bei T-Zellen

	Toleranz-Mechanismus	Durchbrechung
T-Zellen	<u>Immunologische Ignoranz</u> MHC-Präsentation von Selbst-Antigenen auf einem Level, der ausreichend für die T-Zell-Erkennung, jedoch nicht zur Induktion von Toleranz oder zur Aktivierung von T-Zellen ist.	Aktivierung der ignoranten T-Zellen
	<u>Abwesenheit von kostimulatorischen Molekülen</u> - Antigenerkennung in Abwesenheit von Kostimulatoren führt zur T-Zell-Anergie - Kostimulatorische Moleküle (z.B. B7) sind in der Peripherie nicht konstitutiv exprimiert und sind nur durch bestimmte Auslöser, z.B. Infektionen (bakterielle Bestandteile) induzierbar. - Eine einmal ausgelöste Autoimmunantwort kann nicht aufrechterhalten werden, wenn im Gewebe keine weitere Kostimulation erfolgt.	Induktion von Kostimulatoren
	<u>Suppressor-T-Zellen</u> Spezifische Toleranz	Inhibition oder Deletion der Suppressor-T-Zellen
	<u>Immunologisch privilegierte Orte</u> Antigene verlassen immunologisch privilegierte Orte (Gehirn, Auge, Testis, Uterus) zusammen mit anti-inflammatorischen Cytokinen → Induktion einer Toleranz oder einer nicht zerstörenden T-Zell-Antwort.	Trauma des privilegierten Ortes → unkontrollierter Antigenausritt → Aktivierung nicht toleranter T-Zellen

Verbindung gebracht werden und werden daher als Auslöser für die Autoimmunerkrankung diskutiert (Cervera et al., 2004). Hierbei kann das APS noch im Laufe der akuten Infektion auftreten oder erst lange Zeit nach Abklingen der Infektion entstehen.

Die im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen diskutierte molekulare Mimikry kann sich prinzipiell auf Epitope für T-Zell-Rezeptoren oder auf Antigene für Antikörper, also für

B-Zellen, beziehen. Als B-Zell-Antigene im APS fungieren Phospholipide und lipidbindende Proteinkofaktoren.

Da es sich bei Phospholipiden um ubiquitär bei allen Spezies vorkommende Moleküle handelt, ist es nicht verwunderlich, bei APL Ähnlichkeiten zwischen Fremdanitgenen und Autoantigenen zu finden und dass gegen Krankheitserreger gerichtete APL partiell auch gegen Autoantigene, also Phospholipide des Wirts, gerichtet sein können.

In diesem Zusammenhang sind die autoreaktiven CD5-positiven B-1-Zellen interessant. In der Literatur finden sich immer wieder Hinweise auf diesen B-Zell-Typus, der für die Produktion natürlicher Autoantikörper verantwortlich ist. Die B-1-Zellen sind durch die Expression von CD5 charakterisiert. Sie zeichnen sich durch ihre Prädominanz v.a. in der humanen fötalen Milz und im Nabelschnurblut aus, wo sie mehr als 90 % der B-Zellen ausmachen (Bhat et al., 1992). CD5 findet sich auf T-Zellen und auf B-1-Zellen, wird aber auf konventionellen, unstimulierten B-2-Zellen nur sehr niedrig exprimiert. Im Laufe der Entwicklung vermindert sich der B-1-Zell-Anteil auf 25 – 35 % der gesamten B-Zell-Population, wobei die CD5⁺-B-Zellen etwa 1 – 8 % der gesamten peripheren Blutlymphozyten des adulten Individuums darstellen (Bhat et al., 1992). Bei den von den B-1-Zellen synthetisierten natürlichen Autoantikörpern handelt es sich hauptsächlich um IgM-Antikörper, die mit ubiquitären Nicht-Peptid-Antigenen wie Kohlehydraten und Lipiden reagieren. Sie dienen als erste unspezifische Immunabwehr. Diese natürlichen Autoantikörper können die Quelle für infektionsassoziierte APL darstellen und verfügen über die inhärente Eigenschaft, Autoantigene zu erkennen.

Nicht jede Infektion mündet in eine Autoimmunerkrankung. Trotz der im Falle der Lipid-Antigene ins Auge stechenden molekularen Mimikry oder der völligen Übereinstimmung zwischen Selbst- und Fremdanitgen wird die Autoreaktivität beim Gesunden langfristig verhindert. Besonders neuere Arbeiten heben hervor, dass CD5 eine Rolle in der Erhaltung der Toleranz gegenüber Autoantigenen spielt (Hippen et al., 2000). Die Anzahl der peripheren CD5⁺-B-Zellen ist bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen erhöht, wie z.B. bei rheumatoider Arthritis, beim Sjögren-Syndrom, bei Multipler Sklerose (Talal et al., 1992) und auch beim APS (Mahmoud et al., 2001).

Auch für β 2GPI wird die Ähnlichkeit zu mikrobiellen Antigenen als Ursache für die Aktivierung entsprechender Antikörper vorgeschlagen (Shoenfeld et al., 2006; Blank et al., 2002). Ein Vergleich von β 2GPI-Peptiden mit Proteindatenbanken konnte Peptide aus

Proteinen von unterschiedlichen Krankheitserregern identifizieren, die eine hohe Homologie zum β 2GPI aufweisen (Shoenfeld et al., 2006; Blank und Shoenfeld, 2004). Eine Infektion von Mäusen mit den so identifizierten Pathogenen führt zur Produktion von Antikörpern, die, isoliert und in trächtige Mäuse infundiert, zur Wachstumsretardierung und zum Verlust der Föten und zu einer verlängerten Gerinnungszeit *in vitro*, also zu APS-Symptomen führen. Zum ersten Mal konnte so gezeigt werden, dass Erreger, die Bestandteile mit struktureller Ähnlichkeit zu β 2GPI aufweisen, pathogene anti- β 2GPI-Antikörper und Manifestationen des APS induzieren können (Asherson und Shoenfeld, 2000). Auch durch Immunisierung von Mäusen mit β 2GPI-homologen Peptiden aus Pathogenen konnte die Produktion von Antikörpern induziert werden, die mit β 2GPI kreuzreagieren (Gharavi et al., 2002).

Es wird daraus deutlich, dass molekulare Mimikry zwischen Pathogenen und β 2GPI ursächlich an der Entstehung eines APS beteiligt sein könnte. Mechanismen der molekularen Mimikry können sowohl für β 2GPI als auch für Phospholipide zur Generierung von pathogenen APL führen.

Tabelle 2-4: Zerstörung der Selbsttoleranz bei Infektionen

Mechanismus	Effekt	Beispiel
Zerstörung von Zell- oder Gewebebarrieren	Austreten abgekapselter Selbstantigene \rightarrow Aktivierung nicht toleranter Zellen	Sympathische Ophthalmie
Infektion Antigen-präsentierender Zellen	Induktion kostimulatorischer Aktivität	Adjuvanz-Effekt in EAE (Experimentelle Autoimmunenzephalitis)
Bindung von Selbstantigenen durch Pathogene	Immunreaktion gegen Komplex (Selbstreaktion)	Interstitielle Nephritis?
Molekulare Mimikry	Kreuzreaktive Antikörper und T-Zellen	APS, Multiple Sklerose?
Superantigen	Polyklonale Aktivierung autoreaktiver T-Zellen	Rheumatoide Arthritis?
Zerstörung von Lymphozyten-Subsets	Imbalance des Immunsystems	Autoimmun-Thyroiditis?

Die Frage bleibt jedoch offen, wieso Infektionen und die damit verbundene molekulare Mimikry nur bei einigen Individuen zur Entwicklung eines Autoimmunsyndroms führt, während bei anderen gleiche Infektionen ohne derartige Konsequenzen bleiben. Hier werden verschiedene Mechanismen vorgeschlagen, nämlich genetische Prädisposition für Autoimmunerkrankungen oder Mängel in den Regulationswegen zur langfristigen Aufrechterhaltung der Toleranz. Auch β 2GPI-Polymorphismen wurden beschrieben und als mit der Frequenz von anti- β 2GPI-Antikörpern korrelierend beobachtet (Prieto et al., 2003;

Yasuda et al., 2005). Hierin könnte ebenso ein Zusammenhang zur Suszeptibilität für das APS zu finden sein.

2.2 Antiphospholipidantikörper

2.2.1 Antiphospholipidantikörper im Antiphospholipidsyndrom

APL zeichnen sich durch ihre Heterogenität aus. Dies spiegelt sich auch in dem klinischen Bild des APS wider. Neben den thrombo-embolischen und intrauterinen Komplikationen werden zahlreiche andere klinische Manifestationen dem APS zugeordnet. Davon ausgehend, dass APL an der Pathophysiologie der klinischen Symptome beteiligt sind, was zumindest für Thrombosen und für Schwangerschaftskomplikationen in verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen gezeigt werden konnte, könnten verschiedene APL-Subgruppen für verschiedene klinische Erscheinungsformen des APS verantwortlich sein.

Es ist bekannt, dass die Autoantigenspezifität von APL sehr breit ist und unterschiedliche anionische Phospholipide erkannt werden. Diese Komplexität wird durch die Kofaktorabhängigkeit der APL im Antiphospholipidsyndrom und durch die Tatsache, dass auch kofaktorunabhängige (eigentlich Infektionen charakterisierende) APL im Kontext des APS gefunden werden konnten (Menon et al., 1997; Lackner et al., 2000), erweitert. Die beschriebene Heterogenität konnte auch in einem einzelnen APS-Patienten dargestellt werden: Die klonale Analyse der APL dieses einzelnen Patienten mit primären APS zeigte eine extreme Heterogenität der APL hinsichtlich der Kofaktorabhängigkeit, der Funktionalität in *in vitro*-Tests und schließlich der genetischen Konstitution (Lieby et al., 2001).

Die strukturelle Heterogenität der am APS beteiligten Antikörper zeigt sich u.a. durch das Auftreten von unterschiedlichen Immunglobulin-Klassen (IgG, IgA und IgM) bei APL. Auch hinsichtlich der variablen Region wird diese Vielfalt ergänzt: Die Verwendung eines breiten Spektrums von V-Genen im Rearrangement der APL-V-Regionen zeigt, dass auch auf dieser Ebene keine einheitliche Struktur festgelegt ist (Chukwuocha et al., 2002; Giles et al., 2003). Die somatische Hypermutation scheint eine wichtige Rolle für die Antigenspezifität der APL zu spielen (Giles et al., 2003) und trägt zur Variabilität des APL-Spektrums bei.

Zur Unterscheidung von pathogenen und nicht pathogenen Antikörpern im APS existieren mehrere Theorien: Mehrere Gruppen schlagen vor, dass die LA-Aktivität zusammen mit einem hohen Titer an IgG-APL zur Vorhersage von thrombotischen Ereignissen und Aborten herangezogen werden können. Als weiterer Hinweis auf die Pathogenität der APL wird das Vorhandensein von somatischer Hypermutation in der variablen Region von APL diskutiert,

da man davon ausgeht, dass diese Antikörper im Rahmen der Affinitätsreifung Kontakt zu ihrem Antigen hatten und somit pathophysiologisch relevant sind. Die Theorie der Kofaktorabhängigkeit von pathophysiologisch bedeutsamen APL ist wohl die am weitesten verbreitete Theorie, wobei hier v.a. die β 2GPI-Abhängigkeit als wichtig für die Pathogenität angesehen wird.

Die Untersuchungen an APL finden hauptsächlich unter Verwendung von polyklonalen APL oder einzelnen monoklonalen IgG- oder IgM-APLs statt. Eine Gruppe um J.-L. Pasquali verfolgt den interessanten Ansatz, klonale Analysen von allen in einzelnen Patienten vorhandenen APL möglichst vollständig durchzuführen (Lieby et al., 2001; Lieby et al., 2003).

Hinsichtlich der Mechanismen, die zur Pathogenität führen – unabhängig davon, welche Rolle hier LA-Aktivität, die somatische Hypermutation und/oder die Kofaktorabhängigkeit spielen – und vor dem Hintergrund, dass APL bei 2 -5 % der gesunden Population transient und nicht mit APS-Symptomen in Verbindung stehend bei Infektionspatienten gefunden werden, stellen sich drei wichtige Fragen:

Welche Stimuli führen zur Induktion von pathogenen APL? Welche funktionelle Rolle spielen diese Autoantikörper? Wie wird ihre Produktion kontrolliert? Welche strukturellen Merkmale kennzeichnen pathogene APL?

V.a. zur ersten und zur dritten Frage werden erst langsam Untersuchungsansätze generiert.

2.2.2 Struktur und genetische Konstitution der Antiphospholipidantikörper

Zur Abgrenzung von pathogenen gegenüber nicht pathogenen APL wird vorgeschlagen, dass pathogene APL vom IgG-Subtyp sind, eine Spezifität für negativ geladene Phospholipide aufweisen und β 2GPI-abhängig sind, während nicht pathogene APL, die bei Gesunden und bei Patienten mit Infektionskrankheiten oder mit malignen Erkrankungen beobachtet werden, vom IgM-Typ sind und neutrale und negative Phospholipide kofaktorunabhängig binden. Es wird jedoch noch immer kontrovers diskutiert, ob diese Kriterien tatsächlich pathogene von nicht pathogenen APL unterscheiden. Es stellt sich die Frage, in welchen strukturellen Eigenschaften der Antikörper sich die Unterschiede widerspiegeln. In diesem Zusammenhang werden molekulare Strukturen auf DNA-Ebene von pathogenen APL untersucht, um gemeinsame Eigenschaften dieser APL zu identifizieren, die sie von nicht pathogenen APL unterscheiden.

Antikörper-Moleküle sind aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Ketten zusammengesetzt. Während die schweren Ketten den Antikörper-Isotyp bestimmen (μ , γ , δ , α und ϵ), können die leichten Ketten in allen Isotypen entweder vom κ - oder λ -Typ sein.

Die C-terminalen konstanten Domänen der schweren und leichten Ketten sind hoch konserviert, während die N-terminalen Regionen sich durch eine hohe Sequenzvariabilität auszeichnen (variable Regionen) und verantwortlich für die Antigenbindung sind. Die antigenbindenden variablen Regionen bestehen aus so genannten CDR- (*complementarity determining regions*) und FR- Regionen (*framework regions*). Sowohl schwere als auch leichte Ketten weisen je 3 CDRs auf, die eine extrem hohe Variabilität hinsichtlich der Sequenz und der Länge zeigen. Die die CDRs trennenden FR-Regionen sind konservierter.

MacCallum *et al.* konnten zeigen, dass bestimmte Aminosäurereste innerhalb der CDR eher am Antigen-Antikörper-Kontakt beteiligt sind als andere, und dass auch vereinzelte FR-Aminosäurereste als Kontaktstellen fungieren (MacCallum et al., 1996). Bei der Analyse von Strukturmerkmalen, die für die Bindung der APL an ihre Antigene verantwortlich und charakteristisch sind, müssen besonders die variablen Regionen und in diesen die Antigen-Kontaktstellen berücksichtigt werden.

Variable Regionen kodierende Sequenzen werden während der B-Zell-Entwicklung durch Rekombination von V_H -, D_H - und J_H -Segmenten (bei den schweren Ketten) bzw. von V_L - und J_L -Segmenten (bei den leichten Ketten) zusammengesetzt (*Rearrangement*). Von diesen Gensegmenten steht eine große Anzahl zur Rekombination zur Verfügung (Abbildung 2-6).

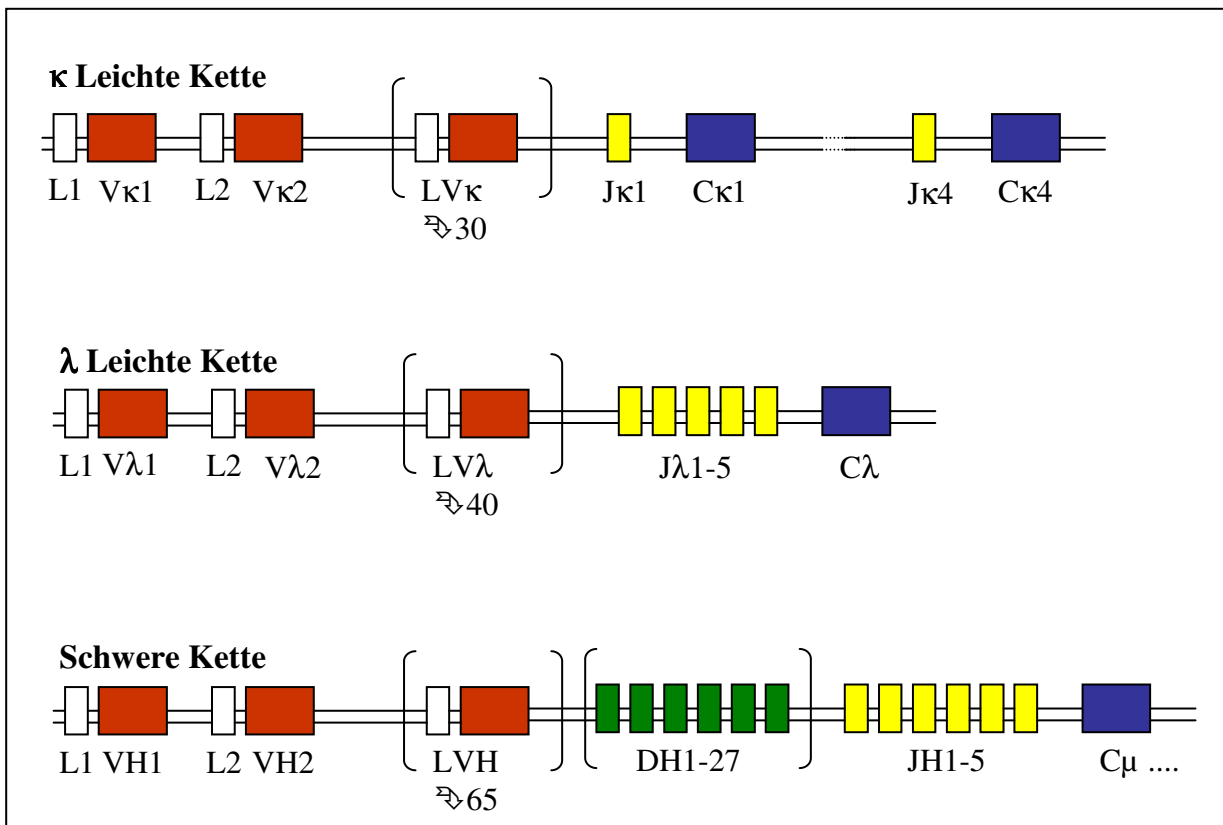


Abbildung 2-6: Genomische Organisation der V-Gen-Segmente (adaptiert nach Janeway *et al.*, Immunology)

Dies führt zu der hohen Diversität der Antikörpern und ihrer Antigen-Bindungsregionen, die durch eine Ungenauigkeit im Rearrangementprozess beim Aneinanderfügen der einzelnen Segmente und durch Deletion von Nukleotiden oder durch das Einfügen von so genannten P- und N-Nukleotiden erhöht wird. N-Nukleotide werden während des Rearrangements in die Verbindungen zwischen den einzelnen Gensegmenten eingefügt. Sie sind nicht kodiert und werden durch die Terminale Desoxynucleotidyl-Transferase inseriert. P-Nukleotide werden ebenso an den Verbindungen der einzelnen Gensegmente gefunden. Sie entstehen durch inverse Wiederholung der Sequenz am Ende des angrenzenden Gensegmentes, die aus Haarnadelstrukturen während des Rearrangement-Prozesses entstehen kann (palindrome Nukleotide).

Nach einem erfolgreichen Rearrangement beginnen die B-Zellen mit der Produktion von zunächst IgM. Die IgM tragen in ihrer variablen Region Gensegmente in Keimbahnkonfiguration. In so genannten „Keimzentren“ kommt es als Reaktion auf Antigenbindung unter T-Zell-Hilfe zum Klassenswitch und zur somatischen Hypermutation in den variablen Regionen der schweren und leichten Kette. Diese Punktmutationen können entweder stille Mutationen (*silent, S*) sein, die nicht zu einem Aminosäureaustausch führen, oder in einer Änderung der Aminosäuresequenz münden (*replacement, R*). R-Mutationen können die Affinität des Antikörpers zu seinem Antigen erhöhen, vermindern oder keine Auswirkung in diesem Zusammenhang zeigen. B-Zellen, die als Folge der somatischen Hypermutation eine höhere Affinität zu ihrem Antigen aufweisen, werden durch Bindung an dieses Antigen selektiert und zur klonalen Expansion stimuliert. Orte der somatischen Hypermutation sind die hochvariablen CDRs, die unmittelbar Kontaktstellen mit dem Antigen aufweisen.

Im Falle der autoreaktiven APL sollten im Gesunden die autoreaktiven B-Zellen inhibiert vorliegen und auch eine T-Zell-Unterstützung und damit eine somatische Hypermutation nicht möglich sein. Diese Schutzmechanismen müssen im APS, wie auch bei anderen Autoimmunerkrankungen, dereguliert sein.

Auf der Suche nach einer Möglichkeit zur Diskriminierung pathogener von nicht pathogenen APL auf Basis der strukturellen Eigenschaften stellen sich bezüglich des genetischen Hintergrundes unterschiedliche Fragen.

Verschiedene Gruppen haben die Verwendung bestimmter Gensegmente in der Rekombination lipidreaktiver Antikörper untersucht. Ein für APL typisches Vorherrschen

bestimmter V-Gen-Familien oder V-, D- und J-Segmente konnte nicht festgestellt werden. Vielmehr spiegeln die Häufigkeiten des Vorliegens bestimmter Gensegmente in untersuchten APL die ohnehin unabhängig von der Antigenpezifität beobachtete Prävalenz bestimmter Familien und Segmente wider (de Wildt et al., 2000; Giles et al., 2003).

Eine wichtige und in molekulargenetischen Untersuchungen von monoklonalen APL immer gestellte Frage ist die nach dem Vorliegen von somatischer Hypermutation. Somatische Mutationen können an unterschiedlichen Stellen in der variablen Region auftreten. Sie können zufälliger Natur sein oder Ausdruck eines durch das Antigen gesteuerten Selektionsprozesses, der Antigenreifung. Im letzteren Falle spricht man von somatischer Hypermutation, die im Laufe der B-Zell-Antwort auf ein Antigen stattfindet. Mutationen häufen sich dann in den CDRs der variablen Regionen und sind meistens R-Mutationen, führen also zu Aminosäureaustauschen. Neben der Anzahl stehen der Ort dieser Mutationen (CDR oder FR) und ihr Charakter (R oder S) also mit der Natur der Mutation (zufällig oder antigengesteuert) in Verbindung. Anhand dieser Informationen kann eine Aussage dazu ermöglicht werden, ob bei einem vorliegenden Antikörper ein bereits stattgefundenen Antigen-Kontakt wahrscheinlich ist, oder nicht. Es wurden Methoden entwickelt, um die Informationen über Mutationen in den variablen Regionen von Antikörpern auszuwerten und die Rückschlüsse auf die Wahrscheinlichkeit eines bereits stattgefundenen Antigen-Kontaktes statistisch abzusichern (Shlomchik et al., 1987; Chang und Casali, 1994; Lossos et al., 2000). Shlomchik *et al.* und Chang *et al.* wenden ein binomiales Wahrscheinlichkeitsmodell an, um zu untersuchen, ob die Anzahl der R-Mutationen in den CDRs signifikant höher als die für zufällige Mutationen erwartete Anzahl liegt. Lossos *et al.* hingegen gehen von vier Verteilungsmöglichkeiten aus: R- oder S-Mutation in CDR- oder FR-Regionen. Zur Ermittlung der Antigen-Steuerung von Mutationen wird hier ein multinomiales Verteilungsmodell herangezogen, das alle vier Variablen abdeckt. In den meisten Fällen führen Analysen mit den beiden Modellen zum gleichen Ergebnis, in einzelnen Fällen zeigen sich jedoch auch Diskrepanzen (Lossos et al., 2000; Giles et al., 2003).

Die Modelle bieten eine Hilfe bei der Untersuchung von variablen Regionen von Antikörpern hinsichtlich der somatischen Hypermutation. Im Falle der APL kann die Aussage darüber, ob ein Antigenkontakt bereits stattgefunden hat, oder nicht, zu einer Aussage über die Natur des Antikörpers beitragen. Natürliche Autoantikörper, die häufig auch Lipide binden, finden sich geringtitrig bei allen Individuen und stellen eine erste natürliche und unspezifische Immunabwehr dar. Lipidreaktive Antikörper, bei denen noch keine Antigenreifung

stattgefunden hat, können zu diesem natürlichen Repertoire gehören. Das Vorliegen von antigengesteuerter somatischer Hypermutation kann auf eine Infektion oder den deregulierten Kontakt mit einem Autoantigen zurückzuführen sein. Beides kann zu einer erhöhten Affinität gegenüber Autoantigenen führen. Aus diesem Grund ist die Untersuchung der Antigenreifung ein wichtiger Teil der strukturellen Charakterisierung von APL.

Letztlich stellt sich noch die Frage, welche Aminosäureaustausche zu beobachten sind, die zu einer erhöhten Affinität zum Autoantigen beitragen. Betrachtet man die Natur der Antigene so handelt es sich v.a. um negativ geladene Strukturen (negativ geladene Phospholipide). Untersuchungen an murinen und humanen anti-DNA-Antikörpern haben gezeigt, dass in Antigenkontaktregionen basische Reste durch somatische Hypermutationen akkumulieren, nämlich Arginin, Lysin und Asparagin (Radic und Weigert, 1994; Rahman et al., 1998). Diese basischen Aminosäuren werden für die Bindung an die negativ geladene DNA verantwortlich gemacht und ähnliche Strukturen für die ebenfalls negative Strukturen bindenden APL diskutiert (Rahman et al., 1996). Eine Analyse von 36 publizierten APL-Sequenzen konnte jedoch keine Akkumulation von Arginin, Lysin und Asparagin in APL-CDRs unterstützen (Giles et al., 2003).

Letztlich stellt sich im Zusammenhang mit den somatischen Hypermutationen in APL die Frage, ob diese Mutationen die Ursache für die Pathogenität der Antikörper sind, d.h. ob durch eine höhere Affinität zum Autoantigen pathologische Prozesse angestoßen werden. Es könnte sich jedoch auch um einen einfachen Hinweis auf Antigenkontakt handeln, der bei dysregulierten autoreaktiven B-Zellen zur Antigenreifung geführt hat, unabhängig davon, ob durch diese Affinitätsreifung pathologische Prozesse initiiert oder verstärkt werden, oder ob es sich um ein Epiphänomen handelt, das keine weiteren Konsequenzen mit sich bringt.

2.3 Ziel der Arbeit

APL werden derzeit als Hauptauslöser für die mit dem APS verbundenen funktionellen Störungen (v.a. Thrombosen und rezidivierende Aborte) gesehen. Erkenntnisse über zugrunde liegende Pathomechanismen (z.B. durch Interaktionen von APL mit Zellen) konnten bisher nur ansatzweise gewonnen werden. Noch viele Fragen bleiben offen.

Angesichts des Fehlens von rationalen Behandlungsstrategien, die nicht nur symptomatisch, sondern auch ursächlich wirken könnten, wird die Bedeutung der Aufklärung der

Pathomechanismen deutlich. Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, weitere Einblicke in den Pathomechanismus zu gewinnen.

Hierzu werden monoklonale APL (IgG und IgM) aus APS-Patienten kloniert und die produzierenden Hybridome generiert. Diese monoklonalen APL dienen weiteren Untersuchungen zum strukturellen und funktionellen Charakter der APL. Im Rahmen der strukturellen Charakterisierung sollen v.a. Erkenntnisse über die Bindungsprofile der Antikörper und über die Sequenz der variablen Regionen gewonnen werden. Ersteres ist v.a. vor dem Hintergrund der Kofaktorabhängigkeit und der Spezifität für bestimmte Phospholipide von Interesse. Hier existieren immer noch gegensätzliche Meinungen über die Bedeutung der Spezifität hinsichtlich der Pathogenität. Die diesbezügliche Charakterisierung der im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierten APL soll weitere Informationen liefern, die in den Kontext schon vorhandener Erkenntnisse über die Bindungsspezifität von APL im Allgemeinen, von aus APS-Patienten generierten APL und von nachweislich pathogenen APL eingeordnet werden sollen. Die Untersuchungen zur Sequenz der variablen Region stellen einen Beitrag zu unterschiedlichen Aspekten der APL-Forschung dar. Zum einen kann die Untersuchung der in den CDR befindlichen Aminosäuren einen Rückschluss auf den Interaktionsmechanismus der APL mit ihrem Antigen erlauben. Es ist hier interessant, welche Strukturen für die Bindung an negativ geladene Antigene zuständig sind und ob sich schon beschriebene strukturelle Merkmale auch in den im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierten APL wieder finden. Zum anderen kann die Aufklärung der im Rearrangement der variablen Region verwendeten V-Gen-Segmente Aufschluss geben über den genetischen Hintergrund phospholipidreaktiver Antikörper. Als dritter und sehr wichtiger Punkt werden die generierten APL im Promotionsprojekt auf Mutationen in den variablen Regionen untersucht. Diese Mutationen können antigengesteuert oder zufällig sein. Es soll versucht werden, aufgrund der Verteilung und der Art der Mutationen festzustellen, ob ein vorhergegangener Antigenkontakt bei den vorliegenden Antikörpern wahrscheinlich ist. Diese Information trägt wesentlich zur Rekonstruktion der Genese der vorliegenden APL bei und lässt Rückschlüsse darauf zu, ob es sich um natürliche, inaktive Autoantikörper handelt, oder ob die Antikörper schon an einer Immunreaktion im Rahmen einer Infektion oder eines Autoimmunprozesses beteiligt waren. Zur vollständigen Charakterisierung der APL soll im Rahmen der Doktorarbeit eine effiziente Methode etabliert werden. Schon in anderen Gruppen wurden monoklonale humane APL generiert und strukturell charakterisiert. Das Auffinden von strukturellen Ähnlichkeiten und allgemeingültigen Merkmalen von APL ist nur durch das Zusammentragen einer Vielzahl von Daten möglich. Hierzu sollen die aus der

Doktorarbeit erwarteten Ergebnisse einen Beitrag leisten, um das Wissen über eine bisher nur ansatzweise beschriebene Klasse von Antikörpern, die sowohl in der natürlichen Immunabwehr als auch im Kontext der schwerwiegenden Autoimmunprozesse im Antiphospholipidsyndrom eine wichtige Rolle spielen, zu erweitern. Im Rahmen der funktionellen Untersuchungen sollen anhand von schon bekannten zellulären *in vitro*-Modellsystemen für die Pathogenität von APL Hinweise gesammelt werden, ob die aus den Patienten generierten APL an Pathomechanismen des APS beteiligt sein können. Hier werden v.a. Modellsysteme zur Untersuchung der prokoagulanten Eigenschaften der APL herangezogen und Interaktionen von APL mit potentiell prokoagulante Aktivität aufweisenden Zellen (Monozyten) untersucht werden. Die Interaktion von APL mit Monozyten und die Induktion von prokoagulanter Aktivität sind mehrfach beschrieben und gelten als Hinweis auf pathogene Wirkungen.

Über das Hauptziel der Arbeit, der Generierung und Charakterisierung von monoklonalen APL aus APS-Patienten hinaus, sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit Hinweise zur Bedeutung der Kofaktorabhängigkeit von APL auch im Rahmen der APS-Diagnostik gewonnen werden. Es sollte eine Methode etabliert werden, die die Untersuchung polyklonaler Antikörper aus APS-Patienten und deren Kofaktorabhängigkeit erlaubt. Diese Methode sollte Routine-tauglich sein. Probleme bisheriger in der diagnostischen Routine verwendeten Tests auf Kofaktorabhängigkeit sind vor allem die im Testserum schon vorhandenen Kofaktoren, von denen nicht bekannt ist, ob sie in der vorliegenden Test-Verdünnung Einfluss auf die Antigenbindung der APL nehmen. Es wurde eine Methode gesucht, die dieses Problem umgeht.

Darüber hinaus sollten durch Untersuchungen an B-1- und B-2-Zellen erste Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen den poly- und auch lipidreaktiven natürlichen Autoantikörpern und den im Kontext des APS vorkommenden APL gewonnen werden. Hierzu musste zunächst eine Methode etabliert werden, um B-1- und B-2-Zellen effektiv zu trennen und nach Möglichkeit auch B-1-Zell-Hybridome zu generieren. Diese Versuche sollten als Einstieg in über die Doktorarbeit hinausgehende Untersuchungen u.a. zur Entstehung, zum Ursprung und zur Regulation unterschiedlicher APL dienen.

3 Materialien und Geräte

3.1 Chemikalien

0,4 % Trypanblau	Sigma-Aldrich
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
10 x PBS instant	Biochrom AG
20 % SDS-Lösung	Biorad
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (29:1) 40%	Biorad
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH
APDS	Biorad
BCIP/NBT-Lösung	Sigma-Aldrich
Borat	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
BSA	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich
DAPI	Sigma-Aldrich
DEPC	Sigma-Aldrich
DMSO	Sigma-Aldrich
dNTPs	Stratagene
EDTA	Sigma-Aldrich
Ethanol	Merck
Glyzerin	Sigma-Aldrich
Glycin	Carl Roth GmbH
Isopropanol	Carl Roth GmbH
Kaliumbromid	Merck
Kupfersulfat	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver	Merck
Methanol	Fisher Scientific
Mowiol 4-88	Calbiochem
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH
Natronlauge, konz.	Merck
NP-40	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
PEG-Lösung	Sigma-Aldrich
Ponceau S-Lösung	Sigma-Aldrich
Rekombinantes humanes CRP (<i>E.coli</i>)	Calbiochem
Sigma Fast™ OPD Tablets Set	Sigma-Aldrich
TEMED	Biorad
Tris	Carl Roth GmbH
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich
Veronal-Puffer	Virion-Serion

3.2 Puffer und Lösungen

IgG- und IgM-ELISA

Waschpuffer:	0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS
Blockierungspuffer:	1 % (v/v) Tween 20 in PBS
OPD-Lösung:	1 Tablette Sigma Fast Silber + 1 Tablette Sigma Fast Gold in 20 ml Aqua bidest
Stop-Lösung:	1 M HCl

Aufreinigung von humanem IgG über HiTrapTM Protein G HP-Säulen

Bindungspuffer:	20 mM Natriumphosphat, pH 7,0
Elutionspuffer:	0,1 M Glycin-HCl, pH 2,7
Neutralisationspuffer:	2 M Tris-HCl, pH 9,0

SDS-PAGE:

6 x Auftragspuffer	1 M Tris-HCl, pH 6,8; 10,28 % (w/v) SDS; 36 % (v/v) Glycerol; 5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol; 0,012 % (w/v) Bromphenolblau
--------------------	---

Elektrodenpuffer:	192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1 % (w/v) SDS
-------------------	--

Westernblot und immunchemische Färbung:

Transferpuffer:	48 mM Tris; 39 mM Glycin; 1,3 mM SDS, 20 % (v/v) Methanol → pH 9,1
TBST-Puffer:	10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,05 % (v/v) Tween 20
TBST-Blotto:	2,5 g Magermilchpulver in 50 ml TBST
AP-Puffer:	100 mM Tris-HCl, pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl ₂
Stopp-Puffer:	20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 5 mM EDTA-NaOH, pH 8,0

DNA-Gele:

6x Ladepuffer für Agarose-Gele:	0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF; 40 % (w/v) Sucrose; in Aqua bidest
---------------------------------	--

10 x TBE:	108 g/l Tris; 55 g/l Borat; 20 mM EDTA, pH 8,0
-----------	--

RNA-Methoden:

DEPC-H ₂ O:	0,1 % (v/v) DEPC in Aqua bidest; 12 h 37°C; 20 min bei 121°C autoklavieren
------------------------	--

Immunfluoreszenz-Analyse

Fixierungspuffer:	3% (w/v) Paraformaldehyd 90 ml Aqua bidest; 3 g Paraformaldehyd; 6 Tropfen NaOH; zum Lösen erhitzen auf 68°C; abkühlen auf Raumtemperatur, Zugabe von 10 ml 10 x PBS
-------------------	---

Permeabilisierungspuffer:	0,5 % (v/v) Triton X-100 in PBS
---------------------------	---------------------------------

MATERIALIEN UND GERÄTE

Mowiol: 12 ml 0,2 M Tris-HCl, pH 8,5; 2,4 g Mowiol 4-88; 6 g Glycerol; gelagert bei 4°C

Herstellung von Zelllysaten:

Solubilisierungspuffer: 140 mM NaCl; 10 mM Tris; 5 µg/ml Aprotinin; 250 µg/ml Trypsininhibitor; 0,5 % NP-40

Isolierung von IgG-Fractionen (Protein A):

Auftragspuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7,4
Neutralisationspuffer: 2 M Tris-HCl, pH 9,0
Elutionspuffer: 0,1 M Glycin-HCl, pH 3,0

Magnetische Zellseparation:

MidiMACS-Puffer: 2 mM EDTA; 0,5 % (w/v) BSA; in PBS

3.3 Kits

Aeskulisa-Phospholipid-8S-G/M:	Aesku.Diagnostics
Aeskulisa-Phospholipid-8-Pro-G/M:	Aesku.Diagnostics
MidiMACS CD3-Depletion Kit:	Miltenyi
Roche Cholesterol Reagenz:	Roche Diagnostics
RIDASCREEN Mycoplasma IFA Test:	R-Biopharm
Roti®-Quant:	Carl Roth GmbH
EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit:	Pierce
QIAGEN OneStep-RT-PCR-Kit:	QIAGEN
QIAGEN QIAquick PCR Purification Kit:	QIAGEN
QIAGEN RNeasy Mini Kit:	QIAGEN

3.4 Antikörper und Streptavidin-Konjugate

Ziege Anti-Human IgG, Fc _γ Fragment spezifisch	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.
Ziege Anti-Human IgM, Fc _{5μ} Fragment spezifisch	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.
Maus Anti-κ-Kette (human)	ICN Biomedicals, Inc.
Maus Anti-λ-Kette (human)	ICN Biomedicals, Inc.
Kaninchen Anti-Apolipoprotein H	Acris Antibodies GmbH
Schaf Anti-Prothrombin	CEDARLANE Laboratories
Anti-Human IgG F(ab)-spezifisch-HRP	Sigma Aldrich
Anti-Human IgG-AP	Sigma Aldrich
Anti-Schaf-AP	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.

Anti-Kaninchen-AP	DAKO
Anti-Human IgG-FITC	Euroclone
Anti-Human IgM-FITC	Euroclone
Anti-Ziege-AP	ICN Biomedicals, Inc.
Anti-Maus-AP	Sigma Aldrich
Anti-Human-IgM (Fc _{5μ})-HRP	Sigma Aldrich
IgM Reagent Grade (human)	Sigma Aldrich
IgG Reagent Grade (human)	Sigma Aldrich
IgG _{2λ} , polyclonal (human)	Sigma Aldrich
CD3-FITC, IOTest [®]	BeckmanCoulter
CD19-FITC, IOTest [®]	BeckmanCoulter
CD5-FITC, IOTest [®]	BeckmanCoulter
CD3-PE, IOTest [®]	BeckmanCoulter
CD5-PE, IOTest [®]	BeckmanCoulter
CD19-FITC, IOTest [®]	BeckmanCoulter
CD69-PE, IOTest [®]	BeckmanCoulter
Streptavidin-FITC	BD Pharmingen
Streptavidin-HRP	Amersham Biosciences
Streptavidin-AP	Amersham Biosciences

3.5 Humane monoklonale Antikörper

HL5B

Der humane monoklonale IgG-APL wurde von Christine von Landenberg im Rahmen ihrer Doktorarbeit generiert und teilweise charakterisiert (Lackner et al., 2000). In der vorliegenden Doktorarbeit wurde eine weiterführende Charakterisierung von HL5B vorgenommen.

HLC9

Der humane monoklonale IgM-APL wurde von Viola Ochsenhirt generiert und in der vorliegenden Arbeit strukturell charakterisiert.

A9D10

Der humane monoklonale IgG-Antikörper wurde von Philipp von Landenberg aus einem gesunden Probanden isoliert. Er ist nicht reaktiv gegen Phospholipide und wurde in der vorliegenden Arbeit als Kontroll-IgG verwendet.

D9G10

Der humane monoklonale IgM-Antikörper wurde von Philipp von Landenberg aus einem gesunden Probanden isoliert. Er ist nicht reaktiv gegen Phospholipide und wurde in der vorliegenden Arbeit als Kontroll-IgM eingesetzt.

3.6 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide (Tabelle 4-5) wurden von TIB MolBiol synthetisiert.

3.7 Zelllinien

B95-8:

Die Zelllinie B95-8 ist eine aus den peripheren Blutlymphozyten des Krallenäffchens *Saguinus oedipus* gewonnene Zelllinie (Miller und Lipman, 1973), die einen hohen Epstein-Barr-Virus-Titer produziert. EBV-haltige Überstände der B95-8-Zellen dienen der Transformation humaner B-Zellen und somit der Herstellung kontinuierlicher B-Zelllinien.

CB-F7:

Bei der Zelllinie CB-F7 handelt es sich um eine murin-humane Heteromyelomzelllinie zur Generierung von Hybridomzelllinien (Grunow et al., 1988).

Mono-Mac-6:

Bei Mono-Mac-6-Zellen handelt es sich um eine humane monozytäre Zelllinie (Ziegler-Heitbrock et al., 1988). Sie wurde aus dem Blut eines 64-jährigen Mannes mit akuter monozytärer Leukämie etabliert. Im Hinblick auf ihre Aktivierung und besonders die Tissue Factor-Expression sind Mono-Mac-6-Zellen den frisch aus peripherem Blut isolierten Monozyten sehr ähnlich. Sie wurden daher in der vorliegenden Doktorarbeit als Modellzelllinie für frisch isolierte Blutmonozyten verwendet.

p388D1(IL-1):

Die Maus-Monozyten/Makrophagen-Zelllinie p388D1(IL-1), in der vorliegenden Arbeit als p388 bezeichnet, ist eine Zelllinie, die aus dem Aszites einer DBA/2-Maus mit einem Methylcholanthren-induziertem lymphoiden Neoplastom isoliert wurde (Koren et al., 1975). In der vorliegenden Arbeit wurde sie als *Feeder*-Zelllinie in der Klonierung von humanen Hybridomen eingesetzt.

SHM-D3:

Bei der Zelllinie SHM-D3 (Teng et al., 1983) handelt es sich um eine murin-humane Heteromyelomzelllinie zur Generierung von Hybridomzelllinien.

Alle verwendeten Zelllinien wurden über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH oder die „American Type Culture Collection“ (ATCC) bezogen.

3.8 Enzyme

Aprotinin	Sigma Aldrich
Trypsininhibitor	Sigma Aldrich
Plasmin, aus humanem Plasma	Calbiochem
Cholesterin-Esterase	Roche
Superscript II Reverse Transkriptase	Invitrogen
Pfu-Turbo-Polymerase	Stratagene
RNaseOUT RNase Inhibitor	Invitrogen

3.9 Zellkultur-Medien und –Zusätze

Hybridoma Express	PAA
RPMI 1640	PAA
RPMI 1640 ohne Phenylrot	Gibco
UltraDOMA™	Cambrex
Hybridoma-Medium, serumfrei, low protein	
	Sigma Aldrich
Sea Growth	Gerbu
FCS gold	PAA
L-Glutamin	PAA
Penicillin-Streptomycin	PAA
Trypsin-EDTA	Gibco
Oxalacetat, Hybri-Max®	Sigma Aldrich
Natriumpyruvat, Hybri-Max®	Sigma Aldrich
MEM, nicht-essentielle Aminosäuren	PAA
Bovines Insulin, Hybri-Max®	Sigma Aldrich
Phythämagglutinin (Lectin)	Sigma Aldrich
Cyclosporin A	Sigma Aldrich
HAT-Zusatz, 10 x	Gibco
Ouabain	Sigma Aldrich
Hypo-osmolarer Fusionspuffer	Eppendorf
LPS	Sigma Aldrich
DPBS	PAA
Lymphozyten-Separationsmedium (Ficoll)	PAA

3.10 Geräte

Zentrifugen:

Cytospin 4 Zentrifuge	Thermo Electron
High Speed 18 Zentrifuge	MSE
Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf
Rotanta R Zentrifuge	Hettich
Universal 30 RF Zentrifuge	Hettich
Varifuge 3.OR	Heraeus
XL-90 Ultrazentrifuge	Beckman

Zellfusion:

Helix-Kammern	Eppendorf
Multiporator	Eppendorf

Fluoreszenzmikroskop:

Axioskop	Zeiss
Objektive: Plan-NEOFLUTAR 40x	
Plan-NEOFLUTAR 20x	
Plan-NEOFLUTAR 10x	
Lampe: HBO 50	
Kamera: MC 80	

FACS, Durchflusszytometrie:

EPICS XL	BeckmanCoulter
Epics [®] ALTRA [™]	BeckmanCoulter
EXPO32 Software	BeckmanCoulter

Gelelektrophorese und Westernblot:

Mini-PROTEAN 3-Elektrophoreseeinheit	Biorad
Blotapparatur für Semi-Dry Blotting	cti
Sub-Cell GT DNA Elektrophoreseeinheit	Biorad
GS800 Calibrated Densitometer	Biorad
GelDoc 800	Biorad

PCR und DNA-Sequenzierung

CEQ 800 Sequencer	BeckmanCoulter
Gene Amp PCR-System 9700	Applied Biosystem

Sonstiges:

Brutschränke	Binder
Hera Safe sterile Werkbank	Heraeus
MRX-TC Revelation ELISA-Reader	Dynex Technologies
Gammacell 2000	Molsgaard Medical
Sonorex TK30 Ultraschallbad	Bandelin electronic
KC10 Kugelkoagulometer	Heinrich Amelung GmbH
FPLC [™] System	Pharmacia
Biowave S2100 Diode Array Spectrophotometer	wpa biowave
Eppendorf Multiporator	Eppendorf

3.11 Sonstige Materialien

1,8 ml Einfrierröhrchen	Nunc
Sterile serologische Pipetten	Costar
T25-, T75-, T175-Zellkulturflaschen	Greiner bio-one
Zellkulturschalen	Nunc
Zellkulturplatten	Nunc
Zellschaber	Greiner bio-one
CELLINE 350, 1000	Integra Biosciences
Shandon Cytoträger	Thermo Electron
Filter Cytospin	Thermo Electron
Litium-Heparin-Monovetten	Sarstedt
Zitrat-Monovetten	Sarstedt
45 µm-Sterilfilter	Millipore
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences
40 ml-Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman
Vivaspure Protein A Säulen	Vivascience
Vivaspin 500-Konzentratoren (MWCO = 10 kDa)	Vivascience
MACS-Separator	Miltenyi
Vivaspin 4-Konzentratoren	Vivascience
HiTrap Protein G HP Säulen	Amersham Biosciences
PD-10-Säulen	Amersham Biosciences
Centri-Sep-Säulen	Princeton Separations
Nitrocellulose-Membran	Amersham Biosciences

3.12 Protein- und DNA-Standards

Low Range	Biorad
High Range	Biorad
Broad Range	Biorad
Roti-Mark	Carl Roth GmbH
DNA V	Roche Diagnostics
DNA VIII	Roche Diagnostics

3.13 Patienten

Zur Herstellung humaner monoklonaler Antikörper sind als Ausgangsmaterial grundsätzlich B-Lymphozyten aus Lymphorganen wie Lymphknoten, Tonsillen oder Milz am besten geeignet. Aus Gründen der Verfügbarkeit werden in den meisten Fällen, so auch in der vorliegenden Arbeit, Lymphozyten des peripheren Blutes verwendet. Ein Ziel der Arbeit war, monoklonale APL des IgG- oder IgM-Types herzustellen. Als geeignete Spender für B-Lymphozyten wurden also Patienten mit der Diagnose eines primären oder sekundärem APS bevorzugt, die in Routinetests einen erhöhten IgG- oder IgM-Serumspiegel aufwiesen. Nach diesen Kriterien wurden in Zusammenarbeit mit unterschiedlichen Kliniken der Johannes

Gutenberg-Universität Mainz und der Medizinischen Klinik III, Hämostaseologie, der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt/Main Patienten ausgewählt und deren Einverständnis zur Blutentnahme zu Forschungszwecken eingeholt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden von mehreren Patienten periphere Blutlymphozyten isoliert, transformiert und auf die Produktion von APL geprüft. Es konnten aus isolierten Zellen von drei Patienten erfolgreich monoklonale, APL produzierende Zelllinien generiert werden:

JG

Bei der Patientin JG handelt es sich um eine 49-jährige weibliche Patientin mit systemischem Lupus erythematosus und einem sekundären Antiphospholipidsyndrom. Die Erstdiagnose des SLE erfolgte 10 Jahre zuvor, die des sekundären APS 5 Monate zuvor als Ursache einer zentral neurologischen Symptomatik mit Sehstörungen und Gangunsicherheit bei Nachweis von umschriebenen ischämischen Läsionen im Bereich des Occipitallappens durch Gefäßverschlüsse. Weiterhin erlitt die Patientin unter Antikoagulation einen rechtshirnigen Mediainfarkt mit linksseitiger Hemiparese und Neglect. Zur Zeit der Blutentnahme zu Forschungszwecken befand sich die Patientin unter medikamentöser Antikoagulation.

In der Autoimmundiagnostik konnten erhöhte anti-CL-IgM und -IgG-Titer nachgewiesen werden (78 U/ml anti-CL-IgG, 86 U/ml anti-CL-IgM).

HL

Bei dem Patienten HL handelt es sich um einen 51-jährigen Mann, der sich im Alter von 49 Jahren mit einer Störung von Konzentration und Merkfähigkeit einer neurologischen Abteilung vorstellte. Er hatte sieben Jahre zuvor einen Schlaganfall mit vorübergehender linksseitiger Hemiparese erlitten. Auf NMR-Aufnahmen waren multiple kleine Gefäßläsionen zu sehen, die wiederholten zerebralen Embolien entsprachen. Eine Angiographie brachte keinen Hinweis auf signifikante Stenosen. Es wurden keine weiteren Symptome beschrieben, die auf thrombo-embolische Erkrankungen hinweisen würden. In der Autoimmundiagnostik fielen erhöhte anti-PS-IgG-Antikörper (99 U/ml) bei grenzwertigem anti-PS-IgM auf. Die anti-CL-Titer waren grenzwertig und der Nachweis von β 2-GPI-Antikörpern negativ. Ebenfalls negativ war der Lupus-Antikoagulanstest. Aufgrund von Anamnese und Laborwerten wurde ein primäres APS diagnostiziert. Der Patient wurde zur Zeit der Blutentnahme zu Forschungszwecken antikoagulatorisch behandelt.

HV

Es handelt sich um einen 58-jährigen, männlichen Patienten, der vor 26 Jahren an einem Myokardinfarkt und in den letzten 3 Jahren wiederholt an tiefen Venenthrombosen und Lungenembolien litt (fünfmal in den Jahren 2000-2003). Der Patient weist negative Titer für anti-CL- und anti- β 2-GPI-IgM- und IgG-Antikörper auf, zeigt jedoch seit Jahren ein konstant hochtitriges Lupus-Antikoagulans. Aufgrund von Anamnese und Laborwerten wurde ein primäres APS diagnostiziert.

4 Methoden

4.1 Gewinnung humaner monoklonaler Antikörper

4.1.1 Herstellung von humanen Hybridomzellen zur Gewinnung von monoklonalen humanen Antikörpern

Zur Generierung von humanen Hybridomzelllinien wurde die so genannte EBV-Hybridom-Technik eingesetzt, die die Transformation von B-Zellen mit dem Epstein-Barr-Virus mit der Fusion mit einer Myelomzelllinie kombiniert. Hierzu wurden zunächst mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) geeigneter Patienten über eine Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Da die darin enthaltenen B-Lymphozyten *in vitro* nicht proliferieren, wurden sie mit EBV transformiert. Dieser Virus aus der Gruppe der Herpes-Viren infiziert spezifisch B-Zellen über den Komplementrezeptor C3d (CD21) und transformiert etwa 1% der infizierten Zellen (Frade et al., 1985). Durch diese Transformation erhält man immortalisierte, stabil proliferierende und Antikörper produzierende Zellen. Wachsende EBV-infizierte B-Zellen können unter dem Mikroskop als typische Zellhaufen wahrgenommen werden.

Da eine große Mehrheit erwachsener Spender schon im Rahmen einer Infektion mit EBV in Berührung gekommen ist, weisen diese Spender einen Immunstatus gegen EBV auf. Frisch EBV-transformierte B-Zellen solcher Spender werden daher mit großer Wahrscheinlichkeit von EBV-spezifischen zytotoxischen T-Zellen, die in der initialen PBMC-Kultur vorhanden sind, angegriffen. Somit kann eine effektive Immortalisierung dieser B-Zellen verhindert werden. Um dieses Problem zu umgehen, wurden die Zellen unter Zusatz des Immunsuppressivums Cyclosporin A (CSA) kultiviert, das spezifisch für T-Zellen ist und deren Proliferation hemmt (Anderson und Gusella, 1984). Zugabe des B-Zell-Mitogens Phythämagglutinin (PHA) förderte das Wachstum der transformierten B-Zellen.

Die Überstände der EBV-transformierten B-Zellen wurden während der anschließenden Expansion der Zellen mittels eines β 2GPI- und phospholipidspezifischen ELISAs auf das Vorhandensein von APL überprüft. Positive Zellpools wurden nach Erreichen einer ausreichenden Zellzahl mit einer Heteromyelomzelllinie zu Hybridomen fusioniert. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Heteromyelomzelllinien zur Fusion verwendet, die selbst durch Fusion einer murinen mit einer humanen Myelomlinie generiert wurden (Grunow et al., 1988; Teng et al., 1983).

Die Vorteile einer Kombination der EBV-Transformations- und Hybridomtechnik liegen in der höheren Stabilität und der gesteigerten Antikörperproduktion der Hybridome gegenüber den EBV-transformierten Zellen. Die EBV-Transformation ermöglicht die Expansion der B-Zellen vor der Fusion (Kozbor et al., 1982).

Da sich nach einer erfolgreichen Fusion lediglich die entstandenen Hybridomzellen weiter vermehren sollen, muss eine Selektion sowohl bezüglich der nicht fusionierten Heteromyelomzellen als auch der immortalisierten B-Zellen durchgeführt werden. Um nicht fusionierte Myelomzellen abzutöten, wurde die so genannte HAT-Selektion angewandt. Die verwendeten Myelomzellen weisen einen genetischen Defekt in den Reservestoffwechselwegen der Nukleinsäuresynthese auf und können nur die Hauptstoffwechselwege nutzen. Bei der HAT-Selektion vergiftet man die Hauptstoffwechselwege des Purin- und Pyrimidinstoffwechsels mit Aminopterin und bietet der Zelle die für die Reservewege benötigten Vorstufen Hypoxanthin und Thymidin an. Da Hybridomzellen aus Myelomzellen und B-Zellen mit intakten Reservestoffwechselwegen entstanden sind, können sie diese Reservewege nutzen und die HAT-Selektion überleben. Unfusionierte Myelomzellen sterben aufgrund ihrer defekten Reservestoffwechselwege während der HAT-Behandlung.

Zur Eliminierung nicht fusionierter EBV-transformierter B-Zellen, die wegen ihrer völlig intakten Nukleinsäuresynthese unempfindlich gegenüber der HAT-Selektion sind, wird Ouabain eingesetzt. Ouabain ist ein Digitalisglykosid, das zytotoxisch wirkt. Allerdings können murine Zelllinien höhere Ouabain-Konzentrationen als humane Zellen tolerieren. Bei Ouabain-Konzentrationen von 10^{-4} bis 10^{-5} können humane EBV-transfizierte Zelllinien nicht überleben. Die Hybridome, die durch die Verwendung einer murin-humanen Heteromyelomzelllinie einen murinen Anteil aufweisen, werden durch die eingesetzten Ouabain-Konzentrationen nicht beschädigt.

Die Zellfusion wurde entweder mit Hilfe von Polyethylenglykol (PEG) oder als Elektrofusion durchgeführt. Die resultierenden Hybridome wurden erneut auf Produktion spezifischer IgG- oder IgM-Antikörper getestet. Antigen-spezifische Zellpopulationen wurden so weit vereinzelt und anschließend expandiert, dass man Zelllinien erhielt, die von einem einzigen B-Zell-Klon abstammen (Klonierung).

4.1.1.1 Herstellung von EBV-haltigem Zellkulturüberstand

Zur Herstellung eines EBV-haltigen Zellkulturüberstandes wurde die Affen-Zelllinie B95-8 verwendet, die Viruspartikel in den Zellkulturüberstand sezerniert.

Die B95-8-Zellen wurden für sieben Tage ohne Mediumwechsel kultiviert. Danach wurde durch Zentrifugation (5 min, 500 g) der virushaltige Zellkulturüberstand gewonnen. Dieser wurde zunächst in 1,8 ml-Einfrierröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bei -80°C aufbewahrt.

4.1.1.2 Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut und EBV-Infektion

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurden aus etwa 30 ml peripherem, heparinisiertem Blut über eine Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnen. Hierzu wurde das Blut 1:2 mit DPBS gemischt. In einem 50 ml-Zentrifugationsröhrchen wurden 15 ml Biocoll vorgelegt und mit maximal 30 ml Blut-DPBS-Gemisch langsam überschichtet. Verwirbelungen mussten unbedingt vermieden werden. Der Gradient wurde 30 min ohne Bremse bei 400 g zentrifugiert. Danach konnten die PBMC als direkt auf dem Biocoll liegender Ring mit einer sterilen Pipette abgenommen werden. Die Zellen wurden zweimal mit DPBS gewaschen und anschließend in 40 ml RPMI 10% FCS resuspendiert und in je zwei T75-Zellkulturflaschen liegend für sechs Stunden oder über Nacht inkubiert. Während dieses Inkubationsschrittes adhären die in dem PBMC-Gemisch vorliegenden Monozyten an der Plastikwand der Zellkulturflasche. Der Überstand mit den Suspensionszellen (hauptsächlich Lymphozyten, wenige NK-Zellen) wurde abgenommen und die Zellzahl auf 3×10^6 Zellen/ml eingestellt. Zu je 1 ml dieser Zellsuspension wurden 2 ml EBV-haltiger Überstand gegeben und für sechs Stunden oder über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 -Sättigung inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen abzentrifugiert und in frischem RPMI mit 2 $\mu\text{g/ml}$ PHA als Wachstumsstimulans für Lymphozyten sowie 1 $\mu\text{g/ml}$ CSA resuspendiert. Die Zellen wurden in einer 96-Loch-Zellkulturplatte mit einer Dichte von 10^5 Zellen/Vertiefung ausgesät. In jede Vertiefung wurde 200 μl Zellsuspension pipettiert.

Wöchentlich wurde ein Mediumwechsel mit RPMI 10 % FCS mit CSA und PHA durchgeführt. Nach etwa zwei bis drei Wochen wurden bei erfolgreicher EBV-Infektion wachsende B-Zell-Klone in Form von Zellhaufen sichtbar. Die Überstände wurden im Phospholipid-8S-ELISA nach Anleitung des Herstellers auf das Vorhandensein von APL untersucht. Beim Phospholipid-8S-ELISA ist die Mikrotiterplatte mit einem Gemisch aus $\beta 2\text{GPI}$ und 6 verschiedenen Lipiden (Cardiolipin, Phosphatidylserin, -inositol, -ethanolamin, -

cholin und Sphingomyelin) beschichtet, d.h. Antikörper gegen jedes dieser Moleküle können detektiert werden. Positive Zellkolonien wurden durch schrittweises Umsetzen in 24-, 12-, 6-Loch-Zellkulturplatten und Zellkulturflaschen vermehrt, wobei die Produktion von APL durch wiederholte Überprüfung des Zellkulturüberstandes mittels ELISA kontrolliert wurde. Bei Erreichen einer ausreichenden Zellzahl wurden die Zellen einer Zellfusion mit PEG oder einer Elektrofusion unterzogen.

4.1.1.3 Zellfusion

4.1.1.3.1 Zellfusion mit Polyethylenglykol (PEG) (Brahe und Serra, 1981)

Die EBV-transformierten B-Lymphozyten wurden mit den Heteromyelomzelllinien CB-F7 (Grunow et al., 1988) fusioniert. Dazu wurden B-Lymphozyten im Überschuss im Verhältnis 4:1 zu den Myelomzellen eingesetzt. Als Mindestzellzahl sollten 3×10^7 B-Lymphozyten mit 1×10^7 CB-F7 fusioniert werden.

Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen zweimal mit serumfreiem RPMI gewaschen. Anschließend wurden beide Zelllinien in serumfreiem RPMI resuspendiert und gemischt. Die Zellen wurden bei 270 g abzentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt. Durch Klopfen des Zentrifugationsröhrchens gegen eine feste Oberfläche wurde das Pellet aufgebrochen und gelockert. Pro 4×10^7 Zellen wurde 1 ml auf 37°C vorgewärmtes PEG innerhalb einer Minute tropfenweise den Zellen zugegeben und zwischendurch gemischt. Innerhalb von 10 Minuten wurden 10 ml serumfreies RPMI pro 4×10^7 Zellen hinzu pipettiert und gut gemischt. Die Zellsuspension wurde mit serumhaltigem RPMI (10 % FCS) versetzt, bis eine Zellzahl von 5×10^5 Zellen/ml erreicht war. Die Zellsuspension wurde in eine 96-Loch-Zellkulturplatte ausgesät (200 µl/Vertiefung) und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Hälfte des Zellkulturmediums durch zweifach konzentriertes HAT-Medium, dem 2×10^{-5} M Ouabain zugesetzt wurde, ersetzt. Anschließend wurde im wöchentlichen Rhythmus ein Mediumwechsel mit frischem, einfachem HAT-Medium mit 1×10^{-5} M Ouabain durchgeführt. Bei einer erfolgreichen Fusion waren nach zwei bis vier Wochen erste wachsende Zellklone sichtbar, deren Überstände auf APL-Produktion überprüft wurden. Positive Zellpopulationen wurden schrittweise in 24-, 12- und 6-Loch-Zellkulturplatten umgesetzt. In diesem Stadium wurde das HAT-Medium durch RPMI 10% FCS ersetzt. Aus den 6-Loch-Platten erfolgte die als „Klonierung“ bezeichnete Vereinzelung der positiven Zellen.

4.1.1.3.2 Elektrofusion von B-Zellen mit Myelomzellen

Eine Alternative zur Zellfusion mit PEG stellt die Elektrofusion dar. Für die Zellfusion mit PEG wird eine sehr hohe Lymphozytenanzahl benötigt (Mindestzellzahl: 3×10^7 Zellen). Um diese Zellzahl zu erreichen, müssen positive EBV-infizierte B-Zellkolonien mehrere Wochen wachsen. In dieser Zeit besteht die Gefahr, dass die Zellpopulationen ihre Antikörpersekretion einstellen oder von nicht sezernierenden Zellen überwachsen werden.

Für die Elektrofusion werden nur $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Fusionsansatz benötigt. Darüber hinaus weist die Elektrofusion gegenüber der PEG-Fusion eine wesentlich höhere Effizienz auf.

Während der Elektrofusion werden die Zellen zunächst durch Anlegen eines Wechselstromes perlenschnurartig aneinander gereiht. Die eigentliche Fusion erfolgt durch einen Gleichstrompuls mit hoher Intensität. Durch Verwendung eines hypoosmolaren Fusionsmediums kommt es zu einem Anschwellen der Zellen, wodurch die Permeabilität der Zellmembranen erhöht wird und die Effizienz der Fusion weiter gesteigert wird (Perkins und Fong, 1995).

Vor der Fusion wurden die verwendeten B-Zellen wie bereits beschrieben aus peripherem Blut isoliert und mit EBV transformiert. Der Fusionspartner (CB-F7 oder SHM-D3) sollte sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden und wurde 24 Stunden vor der geplanten Fusion subkultiviert. Beide Fusionspartner wurden geerntet (Zentrifugation für 5 min bei 160 g und Raumtemperatur) und in DPBS resuspendiert. Pro Fusionsansatz wurden je $2,5 \times 10^5$ B-Lymphozyten und Myelomzellen gemischt und abzentrifugiert (5 min, 160 g, Raumtemperatur). Der Zellniederschlag wurde zweimal in 5 ml hypoosmolarem Elektrofusionspuffer gewaschen und 7 min bei 70 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Hierbei wurde eine Gesamtinkubationszeit im Elektrofusionspuffer von 30 min nicht überschritten, da bei längerer Inkubation eine erfolgreiche Fusion nicht garantiert werden kann.

In der Zwischenzeit wurden 24-Loch-Klonierungsplatten vorbereitet: In jede Vertiefung wurde 1 ml Postfusionsmedium (RPMI 1640 ohne Phenylrot) pipettiert und die Platten bei 37°C vorinkubiert.

Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 200 µl Elektrofusionspuffer aufgenommen und in die Fusionskammer gefüllt.

Die Fusion erfolgte direkt im Anschluss mit dem Eppendorf-Multiporator:

Aneinanderreihung der Zellen:	Spannung	5 V
	Dauer	30 s
Pulse (eigentliche Fusion)	Spannung	30 V
	Dauer	30 μ s
	Anzahl	3
Post-Fusion	Spannung	5 V
	Dauer	30 s

Nach der Fusion wurden die Zellen für 10 min in der Fusionskammer weiter inkubiert. Anschließend wurden die Zellen entnommen, indem die Elektrode zwei- bis dreimal mit 1 ml Postfusionsmedium gespült wurde. Die fusionierten Zellen aus einer Fusionskammer wurden auf vier Kammern einer Klonierungsplatte verteilt. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde 1 ml HAT / Ouabain-Selektionsmedium (Postfusionsmedium, 20 μ M HAT, 10 μ M Ouabain) zugegeben. Die Zellen wurden ohne Mediumwechsel inkubiert, bis nach zwei bis vier Wochen erste Zellhaufen (Klone) sichtbar wurden, die mit einer gelben Pipettenspitze in 96-Loch-Zellkulturplatten überführt und weiter expandiert wurden.

Nach Gebrauch wurden die Fusionskammern gereinigt: Hüllen und Kerne der Kammern wurden gründlich mit Aqua bidest gespült. Bei starker Verschmutzung wurden die Kammern kurz im Ultraschallbad gereinigt. Beide Teile der Kammern wurden mit 70% Ethanol desinfiziert und in der sterilen Werkbank getrocknet.

4.1.1.4 Klonierung von Hybridomzellen (Limiting-Dilution-Klonierung)

Während fusionierte Hybridomzellen nach der Elektrofusion durch die Verwendung der Klonierungsplatten schon als annähernd monoklonale Zelllinien heranwachsen, müssen durch PEG-Fusion generierte Hybridome nach ihrer Expansion wieder vereinzelt werden und anschließend zu monoklonalen Zelllinien herangezogen werden.

Mit Hilfe der Limiting-Dilution-Methode wird versucht, aus Zellgemischen diejenigen Zellen zu isolieren, die den gewünschten Antikörper produzieren. Dies ist notwendig, da nicht auszuschließen ist, dass in der Primärkultur als einzelne Klone erscheinende Zellkolonien nicht doch aus verschiedenen Klonen bestehen. Zu diesem Zweck werden die den gewünschten Antikörper produzierenden Zellkolonien der Primärkultur auf frische

Zellkulturplatten ausgesät. Kommt dabei nur eine Antikörper produzierende Zelle pro Napf zu liegen, die zu einer Population heranwächst, so ist die Monoklonalität der produzierten Antikörper sicher. Da einzeln ausgesäte Zellen nach dem Umsetzen häufig Wachstum und Proliferation einstellen (McCullough et al., 1983), ist die Anzahl der angehenden Klone sehr viel geringer als die der ausgesäten Zellen. Eine Aussaatzelldichte zwischen statistisch 10 Zellen pro Vertiefung (hohe Wahrscheinlichkeit für das Anwachsen einzelner Klone) und 0,3 Zellen pro Vertiefung (hohe Wahrscheinlichkeit für Monoklonalität) hat sich bewährt.

Das Wachstum der Zellen kann durch die Verwendung so genannter Feederzellen verbessert werden. Als Feederzellen dienen meist Makrophagen. Sie erfüllen zwei wesentliche Aufgaben: Sie stellen lösliche Stoffwechselprodukte zur Verfügung, die die Kulturbedingungen der Hybridome verbessern oder sogar als Wachstumsfaktoren fungieren. Außerdem können Makrophagen durch Phagozytose tote Zellen entfernen, die bei der Selektion reichlich entstehen.

Nach erfolgreicher Expansion positiver Hybridom-Kulturen nach der PEG-Fusion wurden diese in 96-Loch-Platten kloniert. Als Feederzellen wurde die Maus-Makrophagen-Zelllinie p388 verwendet. Da es sich um eine Zelllinie, also immortalisierte Zellen, handelt, müssen die p388-Zellen vor ihrer Verwendung als Feederzellen durch Bestrahlung in ihrer weiteren Vermehrung verhindert werden. Sie produzieren auf diese Weise noch eine zeitlang lösliche Wachstumsfaktoren, vermehren sich jedoch nicht weiter.

Hierzu wurden T75-Zellkulturflaschen mit 80% konfluenten p388-Zellrasen verwendet. Die Zellen wurden einmal mit DPBS gewaschen und in sterile Zentrifugenröhrchen (15 ml oder 50 ml) überführt. Die Bestrahlung der Zellsuspension erfolgte an einer Cäsium 137-Quelle (Gammacell 2000) mit einer Dosis von 100 Gray (10.000 rad). Anschließend wurden die Zellen mit einer Dichte von 2×10^5 /ml in eine 96-Loch-Zellkulturplatte ausgesät, wobei pro Vertiefung 100 μ l Zellsuspension ausplattiert wurden. Die so bestückten Zellkulturplatten wurden für zwei bis sechs Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, damit die p388-Zellen adhären konnten. Die zu klonierenden Hybridomzellen wurden suspendiert und gezählt. Die Zellsuspension wurde verdünnt und je 100 μ l pro Vertiefung auf die mit Feederzellen beschichteten 96-Loch-Platten ausgesät. Dabei wurde die Zellkonzentration so eingestellt, dass pro Vertiefung der Zellkulturplatte statistisch 100 Zellen pipettiert wurden. Sobald wachsende Klone sichtbar wurden, wurden die Zellkulturüberstände mittels ELISA auf ihren APL-Gehalt untersucht. Positive Zellkolonien wurden mit geringer werdenden Zellkonzentrationen wiederholt der Klonierungsprozedur unterzogen (10 Zellen/Vertiefung, 1

Zelle/Vertiefung, 0,3 Zellen/Vertiefung). Nach dem letzten Klonierungsschritt (0,3 Zellen/Vertiefung) galten die Zellen als annähernd monoklonal und wurden expandiert. Annähernd monoklonale Zelllinien aus Elektrofusion und PEG-Fusion wurden dreimal rekloniert, um die Monoklonalität zu sichern.

4.1.2 Phospholipid-8S-ELISA zur Detektion von APL im Zellkulturüberstand von B-Zellen und Hybridomen

Zur Bestimmung von APL des IgM- oder IgG-Types im Zellkulturüberstand von B-Zellen oder Hybridomen wurde der *Aeskulisa Phospholipid-8S-G/M* der Firma Aesku.Diagnostics, Wendelsheim, verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Festphasen-Enzymimmunoassay zur qualitativen Bestimmung von IgG- und IgM-Antikörpern gegen Phospholipide. Jede Kavität der verwendeten Mikrotiterplatte ist mit einem Gemisch aus hochreinem humanen β 2GPI, Cardiolipin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylinositol, Phosphatidylserin und Sphingomyelin beschichtet. Antikörper gegen diese Komponenten oder Komplexe aus β 2GPI und einem Phospholipid werden mit einem Detektionsantikörper gegen humanes IgG oder alternativ IgM detektiert.

In Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurde unverdünnter Zellkulturüberstand eingesetzt. Die Durchführung des Tests erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

4.1.3 IgG-ELISA zur Bestimmung der IgG-Konzentration im Zellkulturüberstand von B-Zellen und Hybridomen

Die Bestimmung von IgG-Konzentrationen im Zellkulturüberstand von B-Zellen und Hybridomen erfolgte im IgG-ELISA.

Hierzu wurde eine Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen) mit 180 ng/ml Ziege Anti-Human IgG (Fc γ) in PBS beschichtet, wobei pro Kavität 100 μ l Antikörperverdünnung eingesetzt wurden. Die Beschichtung erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit 200 μ l/Kavität PBS 1% Tween 20 blockiert (eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C), um unspezifische Bindungen der Probe oder des Detektionsantikörpers an die Platte zu reduzieren. Die Vertiefungen wurden einmal mit 300 μ l/Vertiefung PBS 0,1 % Tween 20 gewaschen, bevor die zu untersuchenden Proben aufgetragen wurden. Zellkulturüberstände wurden in unterschiedlichen Verdünnungen (1:50 bis 1:10.000 in PBS 0,1% Tween 20) aufgetragen (100 μ l/Vertiefung) und eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Standard wurde reines humanes

IgG (IgG Reagent Grade) verwendet. In PBS 0,1 % Tween 20 wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt (100 ng/ml, 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 6,25 ng/ml, 3,125 ng/ml). Die Standardreihe wurde analog zu den zu untersuchenden Proben behandelt. Nach entsprechender Inkubationszeit wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatte dreimal mit 300 µl/Vertiefung PBS 0,1 % Tween 20 gewaschen. Als Detektionsantikörper diente ein Peroxidase-markierter F(ab)-spezifischer Anti-Human IgG-Antikörper, der 1:10.000 in PBS 0,1 % Tween 20 verdünnt wurde. 100 µl/Vertiefung wurden für eine Stunde inkubiert. Es folgten drei Waschriffe. Als Substrat wurden 100 µl/Vertiefung OPD-Lösung eingesetzt. Die Farbreaktion erfolgte bei Raumtemperatur 15 min im Dunkeln und wurde durch Zugabe von 100 µl/Kavität 1 M HCl gestoppt. Die Auswertung erfolgte photometrisch am ELISA-Reader bei 490 nm.

4.1.4 IgM-ELISA zur Bestimmung der IgM-Konzentration im Zellkulturüberstand von B-Zellen und Hybridomen

Der IgM-ELISA erfolgte analog zum IgG-ELISA. Als Fangantikörper wurde ein Fc_{5µ}-spezifischer Anti-Human IgM-Antikörper in einer Konzentration von 18 ng/ml verwendet. Als Standard wurde reines humanes IgM (IgM Reagent Grade) verwendet. Die Detektion gebundener IgM-Antikörper erfolgte mit einem Peroxidase-markierten Fc_{5µ}-spezifischen Anti-Human IgM-Antikörper in einer Konzentration von 80 ng/ml.

4.1.5 Kultivierung von stabilen Zelllinien

4.1.5.1 Kultivierung der Maus-Monozyten/Makrophagenzelllinie p388D1(IL-1)

Die Maus-Monozyten/Makrophagen-Zelllinie p388D1(IL-1), in der vorliegenden Arbeit als p388 bezeichnet, wurde bei 37°C, einer CO₂-Sättigung von 5 % und 95 % Luftfeuchtigkeit in T75-Zellkulturflaschen kultiviert. Als Nährstoffmedium diente RPMI 1640 mit 10 % FCS, 2mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Je nach Konfluenz der Zellen wurden sie alle drei bis sechs Tage 1:3 bis 1:6 umgesetzt. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Es folgte eine Behandlung mit 2 ml Trypsin-EDTA für 90 s bei 37°C. Die trypsinierten Zellen wurden in Medium aufgenommen und in entsprechender Verdünnung auf neue Kulturschalen verteilt.

4.1.5.2 Kultivierung von CB-F7-Zellen

CB-F7-Zellen wurden in RPMI 1640 mit 10 % FCS, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37°C, einer CO₂-Sättigung von 5 % und 95 % Luftfeuchtigkeit in T75-Zellkulturflaschen kultiviert. Es handelt sich um eine semi-adhären wachsende human-murine Heteromyelomzelllinie. Die Zellen wurden alle sieben Tage passagiert, indem zunächst der Überstand inklusive der Suspensionszellen abgenommen wurden. Adhären Zellen wurden mit DPBS und starkes Klopfen an den Flaschenboden abgelöst und mit den Suspensionszellen vereinigt. Die Zellen wurden 1:5 bis 1:10 verdünnt und in frischen Zellkulturflaschen weiterkultiviert.

4.1.5.3 Kultivierung von SHM-D33-Zellen

SHM-D33-Zellen wurden bei 37°C, einer CO₂-Sättigung von 5 % und 95 % Luftfeuchtigkeit in T75-Zellkulturflaschen kultiviert. Als Nährstoffmedium diente RPMI 1640 mit 10 % FCS, 2mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Die Zellen wurden alle sieben Tage subkultiviert, um eine Zellzahl von 4×10^5 /ml bis 1×10^6 /ml beizubehalten.

4.1.5.4 Kultivierung von Hybridomzellen

Seit der Entwicklung der Hybridom-Technik durch Köhler und Milstein (Kohler und Milstein, 1975) wurde viel Arbeit darauf verwandt, Methoden und Technologien zur Produktion von Antikörpern hinsichtlich der produzierten Antikörpermenge und der Reinheit der Antikörper zu verbessern. Konventionelle Zellkultur von Hybridomzellen („low density culture“) erlaubt die Produktion von monoklonalen Antikörpern. Allerdings ist die Konzentration der Antikörper im Zellkulturüberstand sehr gering. Ein weiterer Nachteil liegt in der starken Kontamination der Antikörper mit bovinen Serumproteinen, besonders bovinem IgG, das oftmals den Kulturmedien in Form von FCS zugesetzt werden muss. Letzteres kann die Isolierung von humanem IgG aus Zellkulturüberständen verkomplizieren. Reste von bovinem IgG können durch Kreuzreaktivitäten die Brauchbarkeit und Funktion der gereinigten Antikörper in verschiedenen *in vitro*-Untersuchungen stören und beeinflussen.

Für die Gewinnung von möglichst hohen Konzentrationen an reinem Antikörper ist es daher günstig, eine Kultivierungsmethode zu finden, die sowohl die Verwendung von serumfreiem Medium erlaubt, als auch eine hohe Antikörper-Produktion in geringem Volumen („high density culture“).

Nach erfolgreicher Fusion und nach Klonierung der erhaltenen Hybridome wurden diese in der vorliegenden Arbeit zunächst in FCS-haltigem RPMI-Medium expandiert und konventionell („low density“) kultiviert. Es wurde versucht, die Hybridome zunächst an serumfreie Kulturbedingungen und anschließend an ein „high density culture“-System zu gewöhnen. Verschiedene Firmen bieten Medien und Mediumzusätze zur serumfreien Kultur von Hybridomen an. Die Reaktion verschiedener Hybridom-Zelllinien auf diese Medien ist sehr unterschiedlich. Es ist also unabdingbar, das Medium individuell für die vorhandene Zelllinie auszuwählen und bei der Umstellung von serumhaltiger auf serumfreie Kultur verschiedene Methoden auszutesten.

Als „high density“-Kultursystem wurde das CELLine-System (Integra Biosciences) gewählt (Trebak et al., 1999). Es handelt sich um ein Membran-basiertes Zweikammer-System, in dem ein kleineres Zellkompartiment von einem darüberliegenden größerem Nährstoffkompartiment durch eine Membran mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa getrennt ist (Abbildung 4-1). Die CELLine-Kulturflasche ermöglicht sehr hohe Zellkonzentrationen im Zellkompartiment ($10^7/\text{ml}$ bis $10^8/\text{ml}$).

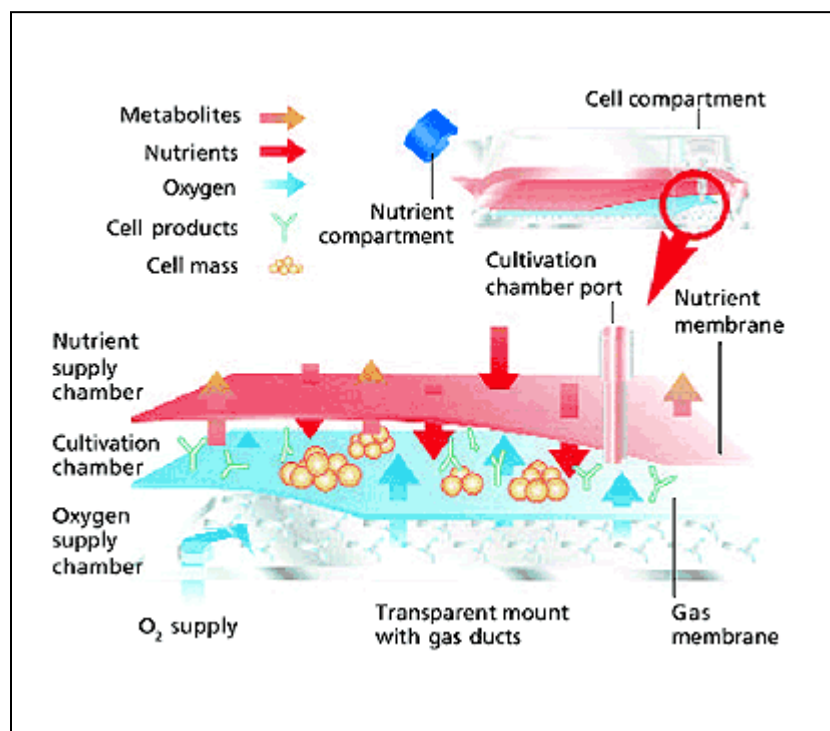


Abbildung 4-1: Kultivierung von Hybridomen im CELLine-System (Abbildung entnommen aus www.integra-biosciences.com)

Ob eine Umstellung der Kulturbedingungen auf serumfreies Medium und das CELLline-System möglich ist, musste für jede etablierte humane Hybridomzelllinie im Einzelnen getestet werden.

4.1.5.4.1 Umstellung auf serumfreies Medium

Es gibt zwei Möglichkeiten, Zellen an serumfreies Medium anzupassen: Bei der direkten Anpassung werden Zellen direkt von serumhaltigem Medium in serumfreies Medium überführt. Bei der sequenziellen Anpassung oder Entwöhnung werden die Zellen schrittweise aus serumhaltigem Medium in serumfreies Medium überführt. Letztere ist meist sanfter zu den Zellen, jedoch muss für jede Zelllinie eigens die geeignete Methode gefunden werden. Die einzelnen Zelllinien reagieren sehr unterschiedlich auf verschiedene Kultivierungsmethoden. Verschiedene serumfreie Medien und serumfreie Supplemente wurden auf ihre Verwendbarkeit in der Kultivierung der Hybridomzelllinien getestet.

Hybridoma Express Medium (PAA): Bei dem Hybridoma Express Medium von PAA handelt es sich um chemisch definiertes Komplett-Medium, das keine Komponenten humanen oder tierischen Ursprungs enthält. Es ist für die Kultur von murinen und humanen Hybridomzellen geeignet.

UltraDOMA™ (Cambrex): UltraDOMA™ ist eine serumfreie Formulierung für die Kultivierung humaner, muriner und chimärer Hybridome. Auf der Basis von RPMI 1640 ist das Medium mit bovinem Insulin, bovinem Transferrin und bovinem Albumin supplementiert.

Hybridoma-Medium, serumfrei, low protein (Sigma): Das Hybridoma-Medium von Sigma ist eine definierte Formulierung, die anorganische Salze, Natriumbicarbonat, essentielle und nicht essentielle Aminosäuren, Vitamine, rekombinantes humanes Insulin und Transferrin, BSA und Spurenelemente enthält.

Sea Growth (Gerbu): Bei Sea Growth von Gerbu handelt es sich um ein Fischserum, das anstelle von FCS als Mediumzusatz für Hybridome verwendet werden kann und frei von Säuger-Immunglobulinen ist.

In einem Vorversuch wurden die Zelllinien in jeweils 8 Ansätze unterteilt und mit unterschiedlichen Medien kultiviert:

- | | |
|---|---------------------------------|
| 1) RPMI 10% FCS (Ausgangsmedium) | Kontrolle |
| 2) RPMI 5% Sea Growth | } direkte Anpassung |
| 3) Hybridoma Express Medium | |
| 4) Hybridoma-Medium (Sigma) | |
| 5) UltraDOMA™ | |
| 6) 1 Teil RPMI 10 % FCS + 1 Teil Hybridoma Express Medium | } sequentielle Anpassung |
| 7) 1 Teil RPMI 10 % FCS + 1 Teil Hybridoma-Medium (Sigma) | |
| 8) 1 Teil RPMI 10 % FCS + 1 Teil UltraDOMA™ | |

Die Kultivierung erfolgte in T75-Flaschen. Die Zellen wurden über 2 Wochen hinweg beobachtet und viermal in diesem Zeitraum auf ihr Aussehen, ihre Vitalität, ihr Wachstum und die Produktion spezifischer Antikörper untersucht.

In einem weiteren Medienversuch wurde die direkte Umstellung auf Hybridoma Express über sechs Wochen untersucht. Die Zellen wurden alle drei Tage in frisches Medium umgesetzt und auf Aussehen, Vitalität, Wachstum und die Produktion spezifischer Antikörper untersucht.

4.1.5.4.2 „High Density“-Kultivierung von Hybridomen im CELLine-System

Im membranbasierten Zweikammer-Kultursystem CELLine liegt ein kleineres Zellkompartiment von einem darüberliegenden größeren Nährstoffkompartiment durch eine semipermeable 10 kDa-Membran getrennt vor. Nährstoffe und kleine Moleküle können diese Membran passieren. So ist eine Versorgung der Zellen im Zellkompartiment durch Nährstoffe im Medium im Nährstoffkompartiment gewährleistet. Größere Moleküle mit einem Molekulargewicht > 10 kDa werden im Zellkompartiment zurückgehalten und dadurch konzentriert, so auch von den Hybridomzellen produzierte Antikörper. Durch diese Konzentrierung der Antikörper schon während der Produktion werden aufwendige Konzentrierungsprozeduren vor der Reinigung der Antikörper überflüssig. Gerade bei humanen Hybridomzelllinien, die unter Umständen nur eine sehr niedrige Antikörper-Produktion aufweisen, führt das Zweikammersystem zu einer Arbeitserleichterung.

Neben dem Nährstoff- und dem Zellkompartiment verfügt die CELLine über einen Sauerstoffversorgungsraum, der durch eine gasdurchlässige Membran vom Zellkompartiment getrennt ist. Diese Anordnung erlaubt einen optimierten Gasaustausch durch sehr kurze Diffusionswege.

Für die Kultivierung der Hybridomzellen wurden jeweils die CELLine 350 (5 ml Zellkompartiment, 350 ml Nährstoffkompartiment) und die CELLine 1000 (15 ml Zellkompartiment, 1000 ml Nährstoffkompartiment) verwendet.

Tabelle 4-1: Kultivierung von Hybridomen in der CELLine 350 und CELLine 1000.

	CELLine 350	CELLine 1000
Vorbereitung		
Vorwärmen des Nährmediums (Hybridoma Express oder RPMI 10% FCS) auf 37°C	350 ml	1000 ml
Inokulation Zur Inokulation sollten sich die Zellen in der log-Wachstumsphase mit maximaler Vitalität befinden.		
Anfeuchtung der Membran durch Zugabe von Nährmedium in das Nährstoffkompartiment	10 ml	25 ml
Inokulation des Zellanzuchtraumes mit Zellsuspension bei gelöster Verschlusskappe des Nährstoffversorgungsraumes	8 x 10 ⁶ Zellen in 5 ml Medium	25 x 10 ⁶ Zellen in 15 ml Medium
Zugabe des Nährstoffmediums in das Nährstoffkompartiment und Verschließen aller Verschlüsse	340 ml	975 ml
Ernte des Zellkulturüberstandes		
Entfernen des Nährmediums aus dem Nährstoffkompartiment		
Resuspension und Entfernen der Zellsuspension aus dem Kultivierungsraum bei gelöster Verschlusskappe des Nährstoffkompartimentes		
Zugabe von frischem Medium zu einem Teil der geernteten Zellsuspension	2,5 ml Zellsuspension + 2,5 ml Medium	7,5 ml Zellsuspension + 7,5 ml Medium
Der restliche Ernteanteil dient der Gewinnung monoklonaler Antikörper aus dem Überstand.		
Zugabe von Nährstoffmedium und Verschließen aller Verschlusskappen	350 ml	1000 ml

4.1.5.5 Allgemeine Zellkulturtechniken

4.1.5.5.1 Zellzahlbestimmung und Vitalitätsbestimmung von Zellen

Die Bestimmung der Zellzahl in einer Zellsuspension erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Tote Zellen wurden hierbei von lebenden Zellen mittels Trypanblau-Färbung diskriminiert. Hierzu wurde die Zellsuspension 1:2 mit 4%-iger Trypanblau-Lösung versetzt. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Das Trypanblau dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Zytosol und färbt diese Zellen tiefblau. Lebende Zellen erscheinen unter dem Mikroskop leuchtend hell. Bei zu langer Einwirkzeit des Trypanblau ist ein Anstieg der Anzahl toter Zellen zu beobachten, da dieser Farbstoff zytotoxisch wirkt. Trypanblau-gefärbte Zellen müssen also unmittelbar ausgezählt werden.

4.1.5.5.2 Einfrieren von Zellen

Die Aufbewahrung von Zellen über einen längeren Zeitraum hinweg erfolgte in flüssigem Stickstoff bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die einzufrierenden Zellen wurden bei 270 g und Raumtemperatur abzentrifugiert und in kaltem Einfriermedium (90 % FCS, 10 % DMSO) in einer Konzentration von $1-2 \times 10^6$ resuspendiert. Die Verwendung des DMSO verhindert für die Zellen schädliche Kristallbildungen während des Einfriervorganges. Da DMSO im ungefrorenen Zustand toxisch für Zellen ist, müssen alle Arbeitsschritte während des Einfrierens sehr schnell durchgeführt werden. Je 1,8 ml Zellsuspension wurden in ein Einfrier Röhrchen gefüllt und dieses sofort in eine Einfrierbox gestellt. Die Einfrierbox wurde mit auf -20°C vorgekühltem Isopropanol gekühlt. Nach Einstellen der Kryoröhrchen wurde die Einfrierbox über Nacht bei -70°C aufbewahrt. Durch das Verwenden einer Isopropanol-gefüllten Einfrierbox wird ein gleichmäßiges Herunterkühlen der Zellen gewährleistet. Die Kryoröhrchen wurden anschließend in flüssigem Stickstoff deponiert.

4.1.5.5.3 Auftauen von Zellen

Auch beim Auftauen von Zellen muss schnell gearbeitet werden, da sich die Zellen in DMSO-haltigem Einfriermedium befinden. Die Kryoröhrchen wurden dem flüssigen Stickstoff entnommen und im Wasserbad bei 37°C so weit aufgetaut, dass nur noch ein kleiner Eisrest im Röhrchen verblieb. Die Zellen mit dem DMSO-haltigen Medium wurden aus dem Einfrier Röhrchen schnell in ein bereitstehendes 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt.

Langsam wurden etwa 10 – 20 ml Kulturmedium (RPMI 10 % FCS oder Hybridoma Express Medium) mit einer serologischen Pipette eingeströmt. Die Zellen wurden bei 270 g 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in Kulturmedium resuspendiert und in T25- oder T75-Zellkulturflaschen bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

4.1.5.5.4 Untersuchung der verschiedenen Zelllinien auf Kontamination mit Mykoplasmen

Mykoplasmen-kontaminierte Zellen sind morphologisch unauffällig. Dennoch verursachen Mykoplasmen eine Fülle von Effekten, die zu Artefakten und Fehlinterpretationen von zellulären Effekten führen können.

Eine häufig angewandte Methode zum Nachweis von Mykoplasmen ist die DAPI-Färbung (4',6-Diamidin-2-Phenylindol-Dihydrochlorid), bei der DNA durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI spezifisch angefärbt wird. Der Test ist schnell und einfach durchzuführen. mykoplasmenfreie Kulturen zeigen bei dieser Methode nur eine nukleäre, kontaminierte Kulturen zusätzlich noch extranukleäre Fluoreszenz. Mitochondriale DNA wird durch DAPI nicht angefärbt. Bei Suspensionszellen ist neben dem Kern oft nur wenig Zytoplasma zu finden, wodurch eine Bewertung der DAPI-Methode schwierig wird, da nicht mehr eindeutig zwischen nukleärer und extranukleärer Fluoreszenz unterschieden werden kann.

Neben der DAPI-Methode für die adhärent wachsenden p388-Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit eine alternative Methode zum Mykoplasmenachweis verwendet: der spezifische Nachweis von Mykoplasmen mittels Antikörper gegen Mykoplasmen-Antigene.

DAPI-Färbung zum Nachweis von Mykoplasmen

Adhärenz Zellen wurden auf Deckgläsern gezüchtet. Das Kulturmedium wurde von den Deckgläsern abgegossen, die Zellen wurden einmal mit DPBS gewaschen. 0,2 ml einer DAPI-Stammlösung (5 µg/ml in Aqua bidest) wurde 1:50 in Methanol verdünnt (→ 0,1 µg/ml). Die Zellen wurden mit DAPI-Methanol überschichtet und 15 min bei 37°C inkubiert. Die Färbelösung wurde verworfen und die Zellen dreimal mit DPBS gewaschen. Die Deckgläser wurden mit Glycerin umgekehrt auf Objektträger gebracht. Die Auswertung erfolgte im Fluoreszenzmikroskop mit einem 340/380 nm Anregungsfilter und einem LP 430 nm Sperrfilter.

Nachweis von Mykoplasmen mittels fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen Mykoplasmen-Antigene

Verwendet wurde der RIDASCREEN® Mycoplasma IFA Test von R-Biopharm. Dieser Test dient zum Nachweis von Kontaminationen aller relevanten Spezies von Mykoplasmen in Zellkulturen. Der RIDASCREEN® Mycoplasma IFA Test enthält einen monoklonalen Antikörper, der mit einer Reihe von Mykoplasmen-Spezies reagiert, darunter *Acholeplasma laidlawi*, *Mycoplasma hyorhinitis*, *M. arginini*, *M. orale*, *M. fermentans* und *M. salivarum*. Bei dem Test handelt es sich um eine Immunfluoreszenzanalyse. Die Durchführung erfolgte nach Anweisung des Herstellers.

Alle Zelllinien wurden periodisch in mehrmonatigem Abstand auf Mykoplasmen-Kontaminationen hin überprüft.

4.1.6 Reinigung von humanen monoklonalen Antikörpern aus Zellkulturüberstand

4.1.6.1 IgG

4.1.6.1.1 Teilreinigung von Antikörpern durch Ammoniumsulfatfällung

Die Fällung (Präzipitation) von Proteinen ist eine der ersten Techniken, die zur Reinigung von Proteinen eingesetzt wurde. Die Fällung beruht auf der Interaktion von präzipitierenden Agenzien mit den in der Lösung befindlichen Proteinen. Sie kann unspezifisch sein und alle Proteine aus einer Lösung ausfällen, oder aber so durchgeführt werden, dass eine Fraktionierung, also Teilreinigung, der Proteine möglich ist.

Zur Präzipitation von Proteinen wird neben kalten, kurzkettigen Alkoholen häufig Ammoniumsulfat verwendet, da es auch in einer Konzentration > 0,5 M die biologische Aktivität von Proteinen schützt. Darüber hinaus ist es einfach durch Dialyse oder Gelfiltration aus den erhaltenen Fraktionen wieder zu entfernen. Die Löslichkeit von Ammoniumsulfat nimmt mit sinkender Temperatur ab, was bei Ammoniumsulfatfällungen unbedingt zu beachten ist.

Der übliche Bereich, um IgG mittels Ammoniumsulfatfällung zu präzipitieren, liegt bei einer 50 %-igen Ammoniumsulfatsättigung.

IgG-haltiger Zellkulturüberstand wurde über einen Faltenfilter filtriert. Das Filtrat wurde anschließend auf Eis gekühlt und während des kompletten Präzipitationsvorganges bei 0°C

auf Eis gehalten. Ammoniumsulfat wurde fein zerrieben und unter Rühren bis zu einer Sättigung von 50 % zum Filtrat gegeben. Die Zugabe von Ammoniumsulfat erfolgte sehr langsam, um lokale Übersättigungen zu vermeiden. Die Lösung wurde weitere 10 min auf Eis gerührt. Die präzipitierten Proteine wurden abzentrifugiert (10000 g, 15 min, 4°C) und in Aqua bidest gelöst. Ausgangsproben, Präzipitate und Überstände aus der Fällung wurden im IgG-ELISA hinsichtlich ihres IgG-Gehaltes untersucht, um die Effizienz der Fällung zu überprüfen. IgG-haltige Präzipitatfraktionen wurden für weitere Aufreinigungsschritte verwendet.

4.1.6.1.2 Aufreinigung von humanem IgG mittels Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung von IgG erfolgte mittels Affinitätschromatographie über fertig gepackte HiTrapTM Protein G HP-Säulen. Bei dieser Art der Affinitätschromatographie macht man sich die spezifische Bindung des Protein G aus der Zellwand von Streptokokken an den Fc-Teil von IgG und die pH-Abhängigkeit dieser Interaktion zunutze.

Vor der Aufreinigung wurden Proben aus der Ammoniumsulfatfällung über Vivaspin 4-Konzentrator-Zentrifugaleinheiten auf den Bindungspuffer (20 mM Natriumphosphat pH 7,0) umgepuffert. Verwendet wurden Zentrifugaleinheiten, deren Membran über eine Ausschlussgrenze (*Molecular Weight Cut Off* = MWCO) von 50 kDa verfügt. Proben aus der Ammoniumsulfatfällung wurden in die Konzentratorröhrchen gegeben und bei 5000 g und Raumtemperatur so lange zentrifugiert, bis das Probenvolumen auf mindestens 500 µl reduziert war. Der Filtrat-Container wurde geleert und der Konzentrat mit Bindungspuffer aufgefüllt. Es wurde eine erneute Konzentrierung vorgenommen. Der beschriebene Vorgang wurde dreimal wiederholt, bis der ursprüngliche kontaminierende Salzgehalt ausreichend reduziert wurde. Mit Bindungspuffer wurde das letzte Konzentrat auf das Ausgangsvolumen zurückgebracht. Die Proben lagen nun in dem für die Protein-G-Reinigung benötigten Puffer vor.

Vor dem Auftrag auf die HiTrapTM Protein G-Säule wurde die Probe durch einen 0,45 µm-Filter filtriert. Bei allen IgG-Reinigungen wurde eine 1 ml-HiTrapTM Protein G-Säule mit dem Flüssigchromatographiesystem FPLCTM System betrieben. Der Proteingehalt des Durchlaufes durch die Säule wurde während des gesamten Chromatographielaufes über einen UV-Detektor bei 260 nm detektiert. Die Säule wurde zunächst mit 10 Volumen Bindungspuffer gespült. Anschließend wurde die Probe aufgetragen und die Säule wieder mit 10 Volumen Bindungspuffer gespült. Nach diesem Spülvorgang sollte kein Protein mehr im Durchlauf zu finden sein. Die Elution erfolgte mit 5 Volumen Elutionspuffer (0,1 M Glycin-

HCl, pH 2,7). Hierbei wurden 1 ml-Fraktionen aufgefangen. In den Auffanggefäßen wurden jeweils 60 µl Neutralisationspuffer (2 M Tris-HCl, pH 9,0) vorgelegt. Hierdurch wird gewährleistet, dass Säure-labile IgGs nur für sehr kurze Zeit dem sauren Milieu des Elutionspuffers ausgesetzt sind. Nach der Elution wurde die Säule mit mehreren Volumen Bindungspuffer und zwei- bis dreimal mit 20 % Ethanol gewaschen. Die Aufbewahrung der Säule erfolgte in 20 % Ethanol.

Die eluierten Fraktionen wurden umgepuffert in PBS. Der IgG-Gehalt wurde im IgG-ELISA ermittelt. Die Reinheit der IgG-Präparation wurde mittels SDS-PAGE überprüft. IgG-haltige Fraktionen wurden vereinigt und mit Hilfe von Vivaspin 4-Konzentratoren auf die gewünschte Konzentration gebracht.

4.1.6.2 IgM

IgM-haltige Zellkulturüberstände wurden mit Hilfe von Centricon-Röhrchen (Sarstedt) mit einem MWCO von 300 kDa konzentriert und auf PBS umgepuffert. Die Prozedur erfolgte analog zur Konzentrierung und Umpufferung mit Vivaspin 4-Konzentratoren.

4.1.7 Untersuchung der Reinheit und Konzentration der gewonnenen Fraktionen

4.1.7.1 Elektrophoretische Verfahren und Visualisierung von Proteinen

4.1.7.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970)

Die analytische Trennung von Proteingemischen nach der Molmasse der Proteine erfolgte durch die diskontinuierliche SDS-PAGE in einem Tris-Glycin-Puffersystem. Durch Zugabe des Detergenzes SDS, das an Proteine bindet und dabei mit seiner negativen Ladung die ursprüngliche Ladung der Proteine maskiert, bewegen sich die Proteine im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Die Größe der Proteine bestimmt die Geschwindigkeit dieser Bewegung, was eine größenabhängige Trennung der Proteine bewirkt. Durch Zugabe eines reduzierenden Agens zum Auftragspuffer können intramolekulare Disulfidbrücken aufgebrochen werden, was zur Linearisierung der Proteine und der Trennung von Untereinheiten beiträgt (reduzierende Bedingungen).

Alle Gelelektrophoresen wurden mit einer Mini-PROTEAN3-Apparatur von Biorad durchgeführt. Die Komponenten für Trenn- und Sammelgel wurden entsprechend der aufgeführten Reihenfolge zusammengegeben (für zwei Mini-Gele der Größe 8,5 cm x 6 cm):

Trenngel (10%):

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (29:1) 40 %	2,12 ml
1 M Tris-HCl, pH 8,9	3,15 ml
A. bidest	2,93 ml
20 % (w/v) SDS-Lösung	42 µl
TEMED	7 µl
10 % APDS	35 µl

Sammelgel (5%):

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (29:1) 40 %	682,5 µl
1 M Tris-HCl, pH 6,8	700 µl
A. bidest	4,080 ml
20 % (w/v) SDS-Lösung	28 µl
TEMED	7 µl
10 % APDS	35 µl

Zunächst wurde das Trenngel gegossen und für die Dauer der Polymerisation (mindestens 45 min) mit Isopropanol überschichtet. Auf das polymerisierte Trenngel wurde das Sammelgel geschichtet (Polymerisationszeit: 30 min). Die Gele wurden nach Abschluss der Polymerisationszeit entweder sofort verwendet oder maximal zwei Tage bei 4°C aufbewahrt.

Die proteinhaltigen Proben wurden 1:6 mit sechsfachem Auftragspuffer (0,35 M Tris-HCl, pH 6,8; 10,28 % (w/v) SDS; 36 % (v/v) Glycerol; 5% (v/v) 2-Mercaptoethanol, 0,012 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt und 10 min bei 95°C denaturiert.

Bei jedem Gellauf wurde auf mindestens einer Spur ein vorher nach Angaben des Herstellers behandelter Proteinmarker aufgetragen, um die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine hinsichtlich ihrer Masse abschätzen zu können. Es wurden sowohl vorgefärbte als auch ungefärbte Molekulargewichtsstandards verwendet.

Tabelle 4-2: Vorgefärbte SDS-PAGE Standards, High Range und Broad Range (Biorad, München)

Protein	MW (Da)	High Range	Broad Range
Myosin	208000	x	x
β-Galaktosidase	126000	x	x
BSA	97000	x	x
Ovalbumin	48000	x	x
Carboanhydrase	35800		x
Soja Trypsininhibitor	29000		x
Lysozym	21100		x
Aprotinin	6900		x

Tabelle 4-3: Ungefärbte SDS-PAGE Standards Roti®-Mark

Protein	MW (Da)
Myosin	200000
β-Galaktosidase	119000
BSA	66000
Ovalbumin	48000
Carboanhydrase	29000
Trypsin Inhibitor	20000
Lysozym	14500

Nach Einfüllen des Elektrodenpuffers (192 mM Glycin, 25 mM Tris-Base, 0,1 % (w/v) SDS) und Applikation der Proben wurden die Proteine bei einer konstanten Spannung von 200 V getrennt. Die getrennten Proteine wurden anschließend mittels Semi-Dry-Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen oder direkt im Gel mit dem kolloidalem Farbstoff Coomassie Blue visualisiert.

4.1.7.1.2 Visualisierung von Proteinen mit dem kolloidalen Farbstoff Coomassie Blue

Zur Visualisierung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen wurde der kolloidale Coomassie Brilliant Blue Farbstoff Roti[®]-Blue verwendet. Die kolloidalen Eigenschaften des Farbstoffs erlauben ihm, besonders gut an die im Gel befindlichen Proteine und nur minimal an die Gelmatrix zu binden. Daher sind lange Waschprozeduren zur Entfärbung des Hintergrundes unnötig. Die Sensitivität der kolloidalen Coomassie-Färbung ist vergleichbar mit der der Silberfärbung und liegt bei etwa 30 ng Protein.

Polyacrylamidgele wurden direkt nach der Elektrophorese aus der der Elektrophorese-Apparatur entfernt und in 100 ml Roti[®]-Blue-Färbelösung (20 ml Roti[®]-Blue 5x Konzentrat, 60 ml A.bidest, 20 ml Methanol) mindestens 2 Stunden oder über Nacht inkubiert. Nach der Färbung wurden die Gele in saubere Färbeschalen überführt und 5 min in 100 ml Waschlösung (25 % Methanol in A.bidest) geschüttelt. Anschließend wurden die Gele kurz in A.bidest gewaschen und für Auswertungs- und Dokumentationszwecke aufbewahrt.

4.1.7.1.3 Auswertung und Dokumentation von Polyacrylamidgelen

Nach der Färbung mit Roti[®]-Blue wurden die Gele mittels des GS800 Calibrated Densitometers (Biorad) und der Quantity One-Software (Biorad) gescannt und ausgewertet.

4.1.7.1.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Bradford, 1976)

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford wurde das Reagenz Roti[®]-Quant verwendet. Es handelt sich um den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue-G250, der an Proteine bindet und so vom kationischen in den anionischen Zustand überführt wird. Diese hierbei stattfindende Absorptionsänderung wurde als erstes von Bradford zur Proteinkonzentrationsbestimmung verwendet. Die Absorption kann bei 595 nm gemessen werden.

Durchgeführt wurde der Bradfordtest im so genannten Mikroansatz, der sich für Proteinmengen zwischen 1 und 20 µg Protein eignet. Verdünnungen von BSA dienten zur Erstellung einer Standardkurve. Je 800 µl BSA- oder Probenverdünnung wurde mit 200 µl Roti[®]-Quant versetzt und durch Invertieren gemischt. Die OD₅₉₅ der Standards und der Proben wurde nach 5 bis 30 min gegen einen Nullwert (Probenpuffer + Färbelösung) im Photometer gemessen. Die OD₅₉₅ der Standards wurde gegen die eingesetzte Proteinmenge

aufgetragen und eine Eichgerade erstellt. Die Proteinmenge in den Proben konnte anhand der Eichgerade ermittelt werden.

4.1.8 Biotinylierung von monoklonalen humanen IgG- und IgM-Antikörpern

Nach der Reinigung von Antikörpern aus Zellkulturüberständen wurde ein Teil der gewonnenen Antikörper für weitere Untersuchungen biotinyliert. Hierfür wurde der EZ Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit von Pierce verwendet. Sulfo-NHS-LC-Biotin weist ein Molekulargewicht von 556 Da auf und reagiert mit primären Aminen über die *N*-Hydroxysuccinimid-Gruppe (NHS) bei neutralem oder höherem pH-Wert über einen nukleophilen Angriff.

Direkt vor Gebrauch wurde eine 10 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin-Lösung hergestellt (5,56 mg/ml). Der Antikörper, der biotinyliert werden sollte, wurde in einer Konzentration von 2 mg/ml in PBS zur Verfügung gestellt. Die molare Menge des gelösten Proteins wurde berechnet:

$$\text{mg Protein} / \text{MW Protein} = \text{mmol des Proteins}$$

Bei je 1 ml einer 2 mg/ml-Antikörper-Lösung ergibt sich für IgGs (MW = 180.000) $1,3 \times 10^{-5}$ mmol und für IgMs (MW = 950.000) $2,1 \times 10^{-6}$ mmol. Sulfo-NHS-LC-Biotin wurde in zwanzigfachem Überschuss hinzu gegeben (für IgG $2,6 \times 10^{-4}$ mmol, für IgM $4,2 \times 10^{-5}$) und 2 h auf Eis inkubiert.

Die Abtrennung nicht gebundenen Biotins erfolgte mit PD-10-Gelfiltrationssäulen, die zunächst mit 25 ml PBS äquilibriert wurden. Die Proben wurden auf die Säulen aufgetragen und mit 5 ml PBS eluiert. Zehn Aliquots à 0,5 ml wurden aufgefangen. Die Säulen wurden mit 25 ml PBS gewaschen. Der Proteingehalt in den einzelnen Fraktionen wurde mit Hilfe des Bradford-Testes bestimmt. Der Erfolg der Biotinylierung wurde mittels Westernblot-Analyse überprüft. Hierzu wurden die einzelnen Fraktionen der SDS-PAGE unterzogen und auf eine Membran übertragen (siehe Kapitel 4.2.2.1). Der immunochemische Nachweis erfolgte durch Streptavidin, das an alkalische Phosphatase gekoppelt vorlag, und einer Farbreaktion mit BCIP/NBT.

Bei positivem Ergebnis wurden die proteinhaltigen Proben vereinigt und mit Vivaspin 4-Konzentratoren auf die gewünschte Konzentration gebracht.

4.2 Strukturelle Charakterisierung monoklonaler APL

4.2.1 Identifizierung von Phospholipid-Bindungspartnern von humanen monoklonalen APL mittels ELISA

Zur Bestimmung der Bindungsspezifität von APL des IgM- oder IgG-Types wurde der *AeskulisaPhospholipid-8Pro-G/M* der Firma Aesku.Diagnostics verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Festphasen-Enzymimmunoassay zur qualitativen Einzelbestimmung von IgG- und IgM-Antikörpern gegen Phospholipide. Der Test enthält als Antigene hoch gereinigtes β 2GPI, β 2GPI komplexiert mit Cardiolipin, Cardiolipin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylinositol, Phosphatidylserin und Sphingomyelin. Kavitäten der Mikrotiterplatte sind mit jeweils einem dieser Antigene beschichtet. Antikörper gegen die einzelnen Antigene werden mit einem Detektionsantikörper gegen humanes IgG oder alternativ IgM detektiert.

Der ELISA wurde mit Antikörperverdünnungen oder unverdünnten Zellkulturüberständen nach Anweisung des Herstellers durchgeführt.

4.2.2 Charakterisierung der schweren und leichten Kette der APL

4.2.2.1 Westernblot und immunchemische Färbung von schweren und leichten Ketten von Immunglobulinen

4.2.2.1.1 Westernblot (Semi-Dry-Blot)

Als Westernblot wird der Elektrotransfer von Proteinen aus einer Gelmatrix auf eine Membran bezeichnet. Mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine, die durch das Vorhandensein von SDS im Gel und im Laufpuffer eine negative Ladung tragen, wandern im elektrischen Feld in Richtung der Anode. Durch die Anordnung des Gels, das auf der Membran zu liegen kommt, auf der Seite der Kathode, können Proteine aus dem Gel auf eine Membran übertragen werden, wobei das Proteinmuster im Gel auf der Membran vorhanden bleibt. Die auf die Membran übertragenen Proteine können sowohl unspezifisch durch einen Proteinfarbstoff (Ponceau S) als auch spezifisch durch immunchemische Färbung visualisiert werden.

Präparationen von monoklonalen APL (konzentrierte Zellkulturüberstände oder gereinigte Antikörperpräparationen) wurden mittels der SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Sammelgel des SDS-Polyacrylamidgels entfernt und das Trenngel

auf eine Nitrocellulosemembran überführt. Die Nitrocellulosemembran wurde vorher in Transfer-Puffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 1,3 mM SDS, 20 % (w/v) Methanol, pH 9,1) getränkt. 16 Filterpapiere wurden exakt auf Trenngelgröße (8,5 cm x 6 cm) zugeschnitten und ebenfalls in Transfer-Puffer getränkt. Der Aufbau der Westernblot-Apparatur erfolgte wie in Abbildung 4-2 dargestellt. Der Proteintransfer erfolgte für 60 min bei einer konstanten Spannung von 20 V. Nach dem Transfer wurde die Membran in eine Kunststoffschale überführt, mit Aqua bidest gewaschen und anschließend mit Ponceau Rot und immunchemisch gefärbt.

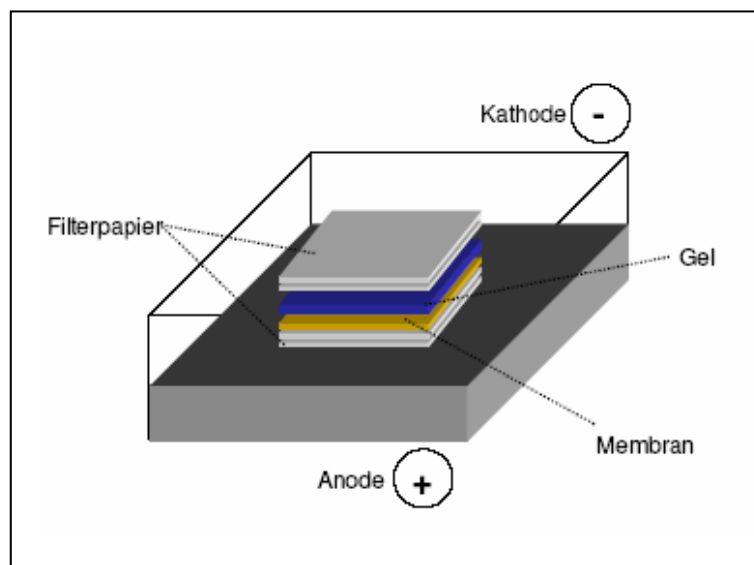


Abbildung 4-2: Aufbau des Semi-Dry-Westernblots

4.2.2.1.2 Färbung von Westernblots mit Ponceau Rot

Um den Erfolg des Proteintransfers zu überprüfen und um bei Verwendung von nicht vorgefärbten Proteinmarkern die Proteinbanden zu markieren, wurde die Membran für 1-5 min mit Ponceau S-Lösung (0,1 % (w/v) Ponceau S, 5 % (v/v) Essigsäure) angefärbt. Ponceau S bindet an Proteine. Durch kurzes Waschen mit Aqua bidest wurde der Hintergrund entfärbt und Proteinbanden sichtbar. Durch längeres Waschen in Aqua bidest wurde die Membran wieder vollständig entfärbt.

4.2.2.1.3 Immunchemische Färbung von schweren und leichten Ketten von Immunglobulinen

Bei den auf die Nitrocellulose transferierten Proteinen handelt es sich um monoklonale Antikörper. Der Nachweis der schweren und leichten Ketten erfolgte durch Primärantikörper gegen μ -, γ -, λ - und κ -Ketten, als Sekundärantikörper fungierten entsprechende, mit Alkalischer Phosphatase (AP) markierte Detektionsantikörper (Tabelle 4-4):

Tabelle 4-4: Antikörperkombinationen zur Detektion von schweren und leichten Ketten von Immunglobulinen

	1. Antikörper	2. Antikörper
μ -Kette	Ziege Anti-Human IgM, Fc _{5μ} -spezifisch 1:10000-Verdünnung	Anti-Ziege-AP 1:15000-Verdünnung
γ -Kette	Ziege Anti-Human IgG, Fc _{γ} -spezifisch 1:10000-Verdünnung	Anti-Ziege-AP 1:15000-Verdünnung
κ -Kette	Maus anti humane κ -Kette 1:10000-Verdünnung	Anti Maus-AP 1:30000-Verdünnung
λ -Kette	Maus Anti-humane λ -Kette 1:10000-Verdünnung	Anti-Maus-AP 1:30000-Verdünnung

Als Substrat für die an die Sekundärantikörper gekoppelte Alkalische Phosphatase diente BCIP/NBT-Lösung zur Sichtbarmachung der Antikörperketten.

Nach der Ponceau-Rot-Färbung wurden die entfärbten Membranen 3 x 5 min mit TBST-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH8,0, 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20) gewaschen und 1 h in TBST-Blotto (2,5 g Magermilchpulver in 50 ml TBST) blockiert. Die Membranen wurden erneut 3 x 5 min in TBST-Puffer gewaschen und 90 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper (in TBST-Puffer) inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBST-Puffer für jeweils 5 min wurden die Membranen in TBST-Puffer mit Sekundärantikörper für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert und wiederum 3 x 5 min in TBST-Puffer gewaschen. Es folgte eine Äquilibration der Membranen in AP-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) für 1 min. Für die Farbreaktion wurde die BCIP/NBT-Lösung direkt auf die Membran aufgetropft. Nach Erreichen der gewünschten

Farbintensität wurden die Membranen für 2 min in Stopp-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 5 mM EDTA-NaOH, pH 8,0) gegeben und anschließend 5 min in Aqua bidest gespült.

Die gefärbten Nitrocellulosemembranen wurden getrocknet und mittels des GS800 Calibrated Densitometers und der Quantity One-Software gescannt und ausgewertet. Die getrockneten Nitrocellulosemembranen wurden unter Lichtausschluss aufbewahrt.

4.2.3 Molekularbiologische Charakterisierung der variablen Region (V-Region) von Antiphospholipidimmunglobulinen

4.2.3.1.1 Etablierung einer Methode zur Charakterisierung der V-Gen-Familie von APL-Immunglobulinen

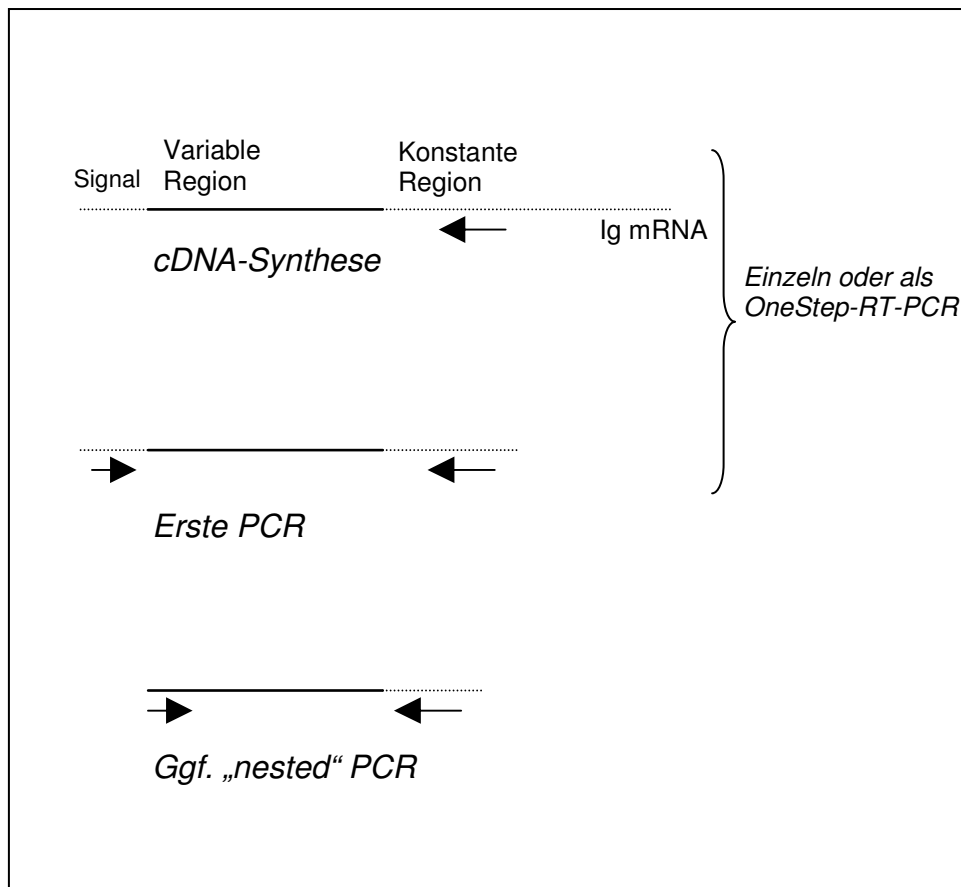


Abbildung 4-3: Schematische Übersicht über die Kombination von RT-PCR und nachfolgenden PCR-Schritten zur Detektion der V-Genfamilienzugehörigkeit von Immunglobulinen

Die Etablierung einer Methode zur Charakterisierung der V-Gen-Familie von APL-Immunglobulinen lehnte sich an die von Wang und Stollar beschriebene Methode zur Analyse

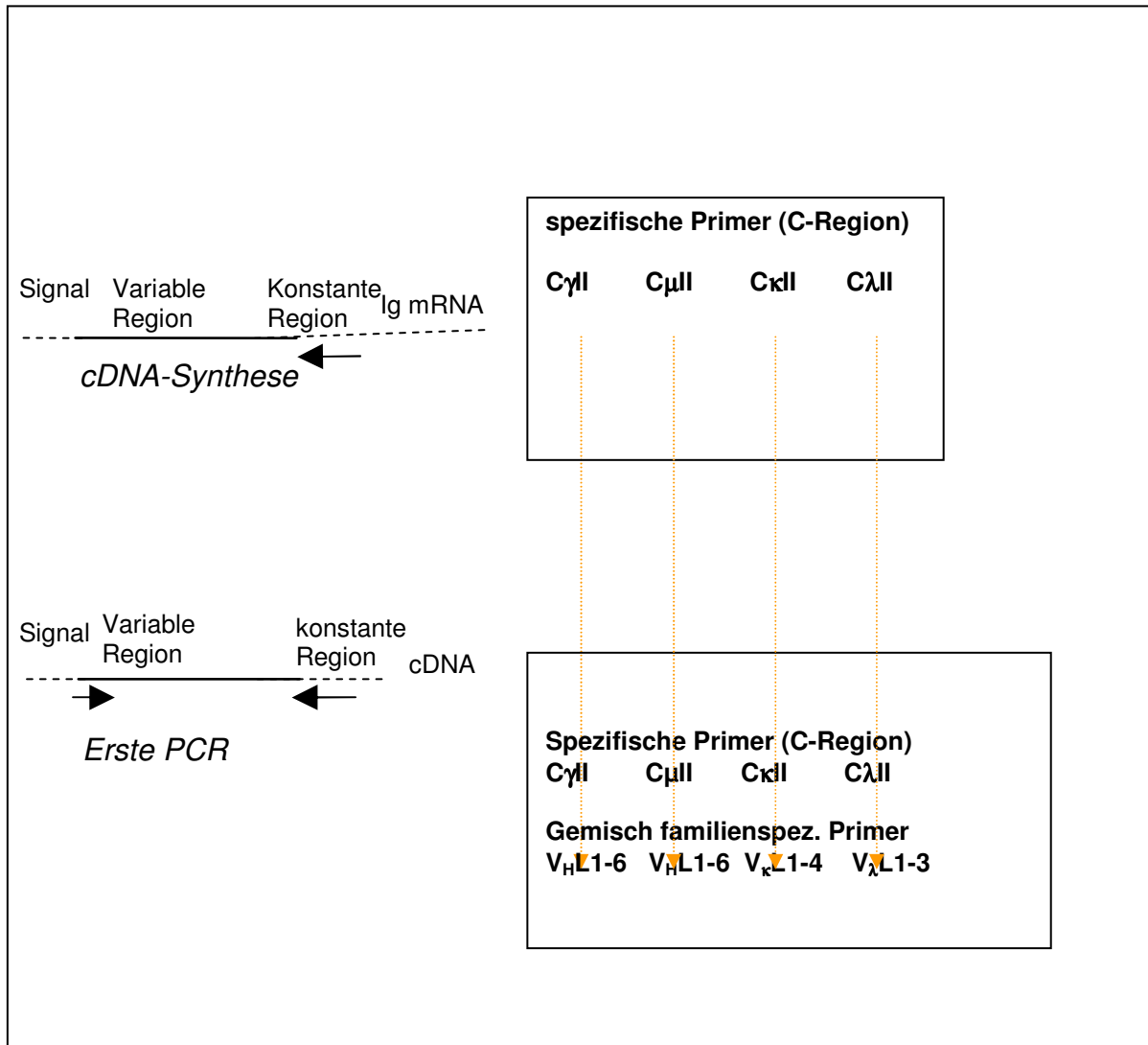


Abbildung 4-4: cDNA-Synthese und Amplifikation mit spezifischen Primern in der OneStep-RT-PCR

von Immunglobulin-V-Region-Genen an (Wang und Stollar, 2000). Prinzipiell wurde zunächst Gesamt-RNA aus Hybridomzellen isoliert. Ein RT-PCR-Schritt, bei dem die Amplifikation der cDNA mit einem Gemisch aus mehreren familienspezifischen *forward*-Primern und einem gemeinsamen *backward*-Primer erfolgte, wurde mit einem zweiten PCR-Schritt mit den einzelnen familienspezifischen *forward*-Primern kombiniert. Für die initiale RT-PCR standen zwei Methoden zur Verfügung: Bei der herkömmlichen RT-PCR finden Reverse Transkription (RT) und PCR in nacheinander stattfindenden Reaktionen in getrennten Reaktionsansätzen statt, wobei zunächst während der Reversen Transkription RNA mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben wird und in der anschließenden PCR die erhaltene cDNA durch eine DNA-Polymerase amplifiziert wird. Bei der OneStep-RT-PCR finden Reverse Transkription und DNA-Amplifikation nacheinander in

METHODEN

einem Reaktionsansatz statt (Abbildung 4-4). Enzyme für sowohl die Reverse Transkription als auch die Vervielfachung der DNA werden gleichzeitig dem Reaktionsansatz zugegeben und durch Temperaturänderungen nacheinander aktiviert bzw. deaktiviert. Die Reaktionen laufen also räumlich nicht getrennt, jedoch zeitlich voneinander getrennt ab. Der Vorteil der OneStep-RT-PCR liegt in der geringeren Anfälligkeit gegenüber Kontaminationen.

Für jede Hybridomzelllinie wurden parallel prinzipiell vier RT-PCR-Reaktionen durchgeführt mit den unterschiedlichen Primern für jeweils die μ -, γ -, κ - und λ -Kette. Auch wenn durch Westernblot-Analyse schon die Zusammensetzung der schweren und leichten Kette des Antikörpers bekannt war, diente die Durchführung einer weiteren Reaktion pro schwerer und leichter Kette als ergänzende Kontrolle.

Sowohl die Produkte aus der RT-PCR als auch die aus der zweiten, familienspezifischen PCR wurden in einer Agarose-Gelelektrophorese dargestellt und analysiert. Wenn es bei dem RT-PCR-Schritt zu einem uneindeutigem Ergebnis kam, konnte es mit Hilfe einer so genannten „nested“ PCR überprüft werden. Bei einer „nested“ PCR wird nach einer ersten PCR eine

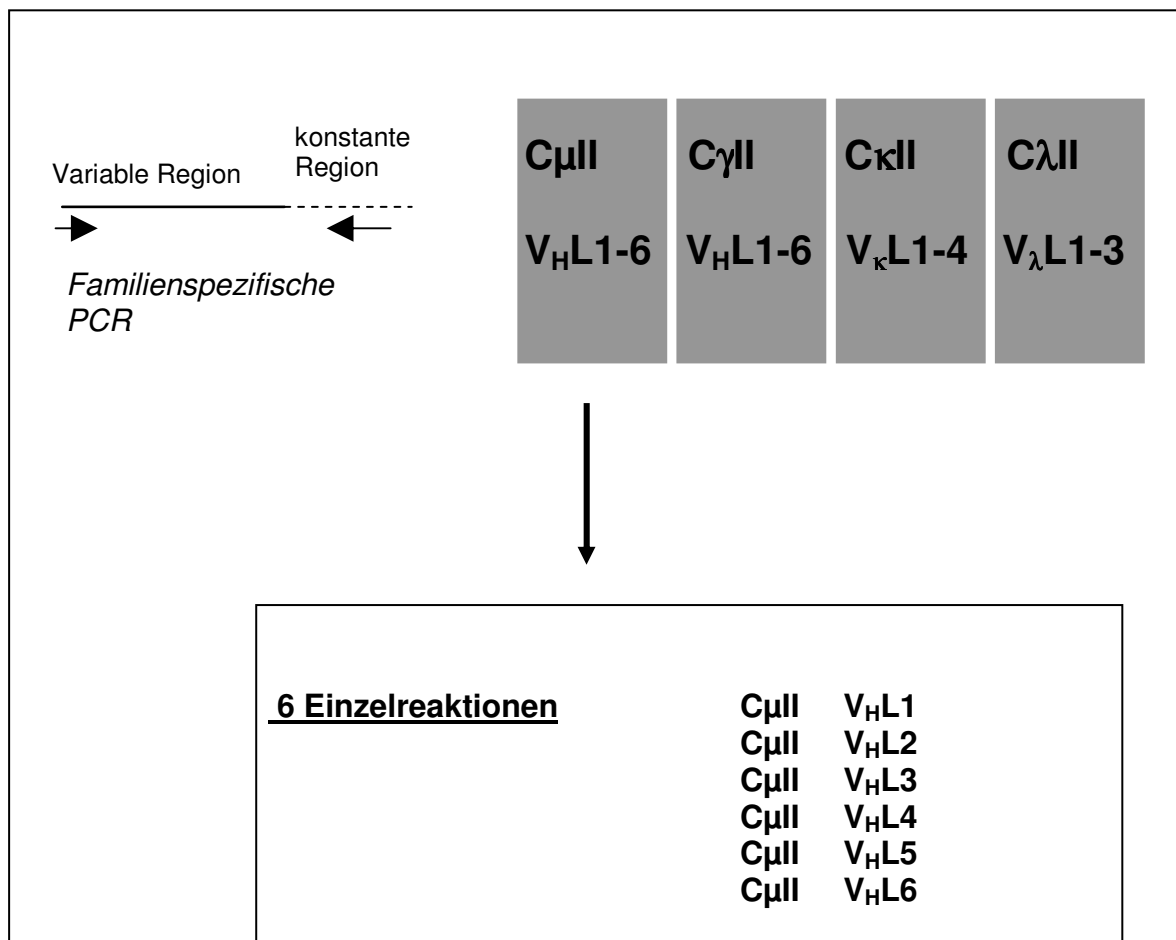


Abbildung 4-5: Familienspezifische PCR mit einzelnen V-Primern

zweite angeschlossen, bei der die Primer innerhalb der ersten bereits amplifizierten Sequenz liegen. Hierdurch wird die Amplifikation insgesamt spezifischer, da DNA-Abschnitte, die in der ersten PCR aufgrund ähnlicher Sequenzabschnitte fälschlicherweise vervielfältigt wurden, in der „nested“ PCR nicht weiter amplifiziert werden sollten (es ist sehr unwahrscheinlich, dass innerhalb des falsch amplifizierten Abschnittes weitere, dem eigentlich zu amplifizierenden DNA-Stück homologe Basenabfolgen zu finden sind).

Die familienspezifische PCR wurde mit dem Produkt der RT-PCR durchgeführt, das in unterschiedliche Ansätze aufgeteilt wurde. Hierbei wurden die in der RT-PCR als Gemisch verwendeten Primer einzeln mit dem Primer in der konstanten Region kombiniert, um festzustellen, welcher der familienspezifischen Primer die Amplifikation der V-Region vermittelt hat (Abbildung 4-5). Daraus konnte die Familienzugehörigkeit der variablen Regionen der entsprechenden APL ermittelt werden.

Tabelle 4-5: Primer zur Reversen Transkription und Amplifikation von Immunglobulin-V-Regionen nach Wang und Stollar.

Beschreibung	Name	Sequenz
VH Signalsequenzen (PCR)	VHL-1	5'-TCACCATGGACTGCACCTGGA
	VHL-2	5'-CCATggACACACTTTgCTCCAC
	VHL-3	5'-TCACCATGGAGTTTGGGCTGAGC
	VHL-4	5'- AGAACATGAAACACCTGTGGTTCTT
	VHL-5	5'-ATGGGGTCAACCGCCATCCT
	VHL-6	5'-ACAATGTCTGTCTCCTTCCTCAT
Vκ Signalsequenzen (PCR)	VκL-1	5'- GCTCAGCTCCTGGGGCTCCTG
	VκL-2	5'- CTGGGGCTGCTAATGCTCTGG
	VκL-3	5'- TTCCTCCTGCTACTCTGGCTC
	VκL-4	5'- CAGACCCAGGTCTTCATTTCT
Vλ Signalsequenzen (PCR)	VλL-1	5'- CCTCTCCTCCTCACCTCCT
	VλL-2	5'- CTCCTCACTCAGGGCACA
	VλL-3	5'- ATGGCCTGGACCCCTCTCC
Konstante Regionen (RT)	CμI	5'-GCAGGAGACGAGGGGGA
	CγI	5'-AGGGCGCCAGGGGAA
	CκI	5'-AACAGAGGCAGTTCCAGA
	CλI	5'-TGTGGCCTTGTTGGCTTG
Konstante Regionen (RT und PCR)	CμII	5'-CAGGAGACGAGGGGAAAAG
	CγII	5'-GCCAGGGGGAAGACGGATG
	CκII	5'-TTTCAACTGCTCATCAGATGGCGG
	CλII	5'-AGCTCCTCAGAGGAGGGCGG

Tabelle 4-6: Primer für die „nested“ PCR nach Wang und Stollar.

Beschreibung	Name	Sequenz
VH Sequenzen (nested PCR)	VH1	5'- TTGCGGCCGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTC
	VH2	5'- TTGCGGCCGCCAGATCACCTTGAAGGAGTC
	VH3	5'- TTGCGGCCGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTC
	VH4	5'- TTGCGGCCGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTC
	VH5	5'- TTGCGGCCGCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTC
	VH6	5'- TTGCGGCCGCCAGGTACAGCTGCAGCAGTC
Vκ Sequenzen (nested PCR)	Vκ1	5'-CATAAGATCTCGACATCCAGATGACCCAGT
	Vκ2	5'-CACCAGATCTCGATATTGTGATGACCCAG
	Vκ3	5'- CACCAGATCTCGAAATTGTGTTGACGCAGTCT
	Vκ4	5'- CACCAGATCTCGACATCGTGATGACCCAGT
Vλ Sequenzen (nested PCR)	Vλ1	5'-TATTAGATCTCCAGTCTGTGCTGACTCAGC
	Vλ2	5'-TATTAGATCTCCAGTCTGCCCTGACTCAGC
	Vλ3	5'-CACCAGATCTCTCCTATGAGCTGACTCAGC
Konstante Regionen (nested PCR)	CμIII	5'- AGGTCTAGAGAAAAGGGTTGGGGCGGATGC
	CγIII	5'- AGGTCTAGAGACCGATGGGCCCTTGGTGGA
	CκIII	5'-TATTCCATGGAAGATGAAGACAGATGGTGC
	CλIII	5'-CATTCCATGGGGGAACAGAGTGACCG

4.2.3.1.2 Isolierung der RNA aus Hybridomzellen

Die Isolierung der RNA aus den Hybridomzellen erfolgte mit Hilfe des QIAGEN RNeasy Mini Kits nach Anleitung des Herstellers. Die isolierte RNA wurde für OneStep-RT-PCR-Reaktionen verwendet.

4.2.3.1.3 RT-PCR zur Amplifikation der variablen Region von APL- Immunglobulinen

Für die Reverse Transkription wurden spezifische Primer verwendet, die in der konstanten Region der rearrangierten Immunglobuline binden (Tabelle 4-5). Die für die Reaktion benötigte RNA wurde nicht vorher aus den Hybridomzellen isoliert. Vielmehr wurden intakte Zellen dem Reaktionsansatz zugegeben; deren RNA wurde der Reversen Transkriptase durch die Anwesenheit des Detergenzes NP-40 zugänglich gemacht.

100 oder 1000 Zellen wurden in 10 µl RT-Puffer für die Superscript II Reverse Transkriptase resuspendiert. Es wurden 1 µl eines Gemisches aus je 5 µM CµI-, CγI-, CκI- und CλI-Primer und 3 µl 5 % (v/v) NP-40 (in DEPC-Wasser) zugefügt. Während dieser Prozedur wurden die PCR-Reaktionsröhrchen auf Eis gehalten. Zum Annealing wurden die PCR-Ansätze im Thermocycler folgendem Programm unterzogen:

3 min	65°C
3 min	25°C

Anschließend wurden die PCR-Röhrchen wieder auf Eis gehalten und eine Mischung aus je 2 µl 5 x RT-Puffer, 2 µl DTT, 1 µl 10 mM dNTPs und 0,5 µl Superscript II Reverse Transkriptase (200 U/µl) zu jedem Reaktionsansatz zupipettiert.

Die PCR-Ansätze wurden erneut in den Thermocycler gegeben. Die Synthese der cDNA erfolgte 1 h bei 37°C, anschließend wurde die Superscript II Reverse Transkriptase 10 min bei 70°C inaktiviert.

Die die cDNA enthaltenen Ansätze mit jeweils einem Volumen von fast 20 µl wurden für vier PCR-Reaktionen eingesetzt. Je 5 µl der Proben wurden eingesetzt, um die µ-, γ-, κ- oder λ-Transkripte einzeln zu amplifizieren. Zu jedem Ansatz wurden folgende Reagenzien hinzupipettiert:

	6 µl 10 x pfu-Puffer
	1,6 µl 10 mM dNTPs
	45,4 µl DEPC-Wasser
	1 µl pfu-Turbo-Polymerase (2,5 U/µl)
Alternativ	für µ: 0,5 µl VHL1-6 (20 µM)
	0,5 µl CµII (20 µM)
	für γ: 0,5 µl VHL1-6 (20 µM)
	0,5 µl CγII (20 µM)
	für κ: 0,5 µl VκL1-4 (20 µM)
	0,5 µl CκII (20 µM)

für λ : 0,5 μ l V λ L1-3 (20 μ M)
 0,5 μ l C λ II (20 μ M)

Die Ansätze wurden im Thermocycler folgendem Programm unterzogen:

3x	45 s	94°C	prä-Amplifikation
	45 s	45°C	
	1 min 45°s	72°C	
30x	45 s	94°C	Amplifikation
	45 s	50°C	
	1 min 45 s	72°C	
1x	10 min	72°C	finale Extension
	∞	4°C	

Die Produkte aus der RT-PCR wurden in einer Agarose-Gelelektrophorese visualisiert und für die familienspezifische PCR aufbewahrt.

4.2.3.1.4 OneStep-RT-PCR mit dem QIAGEN OneStep-RT-PCR Kit zur Amplifikation der variablen Region von APL-Immunglobulinen

Beim OneStep-RT-PCR Kit von QIAGEN finden Reverse Transkription und PCR nacheinander in einem Reaktionsansatz mit spezifischen Primern statt (Abbildung 4-4). Der in diesem Kit verwendete Enzymmix enthält zwei Reverse Transkriptasen (Omniscript Reverse Transkriptase, Sensiscript Reverse Transkriptase), die durch unterschiedliche Wirkungsoptima eine Reverse Transkription über ein breites Spektrum von RNA-Mengen hinweg ermöglichen, und eine DNA-Polymerase (HotStarTaq DNA-Polymerase). Durch die Verwendung der HotStarTaq-Polymerase, die bei 95°C aktiviert wird (wobei gleichzeitig die Reversen Transkriptasen inaktiviert werden) ist eine zeitliche Trennung der beiden Reaktionen in einem Reaktionsansatz gewährleistet.

RNA wurde mit Hilfe des QIAGEN RNAeasy Mini Kits aus Hybridomzellen gewonnen (siehe oben). Pro zu untersuchender Hybridomzelllinie wurden vier OneStep-RT-PCR-Ansätze durchgeführt.

Pro Ansatz wurden folgende Reagenzien pipettiert:

	10 µl RNA
	21 µl RNase-freies Wasser
	2 µl RNase-Inhibitor RNaseOUT (100 U/µl)
	10 µl 5 x Puffer
	2 µl dNTP-Mix
Alternativ	für µ: 1,5 µl VHL1-6 (20 µM)
	1,5 µl CµII (20 µM)
	für γ: 1,5 µl VHL1-6 (20 µM)
	1,5 µl CγII (20 µM)
	für κ: 1,5 µl VκL1-4 (20 µM)
	1,5 µl CκII (20 µM)
	für λ: 1,5 µl VλL1-3 (20 µM)
	1,5 µl CλII (20 µM)
	2 µl Enzym-Mix

Alle Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt.

Der Thermocycler wurde auf 50°C vorgewärmt, die Proben hinein gestellt und folgendem Programm unterzogen:

Reverse Transkription:	30 min	50°C	
Initialer PCR-Aktivierungsschritt:	15 min	95°C	
3-Schritt-Cycling:	0,5 min	94°C	Denaturierung
	0,5 min	50°C	Annealing
	1 min	72°C	Extension
Finale Extension	10 min	72°C	
	∞	4°C	

Die Produkte aus der OneStep-RT-PCR wurden in einer Agarose-Gelelektrophorese visualisiert und für die familienspezifische PCR aufbewahrt.

4.2.3.1.5 „nested“ PCR

Für die „nested“ PCR wurden je 3 µl PCR-Ansatz aus der entsprechenden RT-PCR verwendet und folgende Reagenzien hinzugefügt:

5 µl 10 x pfu-Puffer
 1,25 µl 10 mM dNTPs
 Alternativ für µ: 1 µl VH1-6 (20 µM)
 1 µl CµIII (20 µM)
 für γ: 1 µl VH1-6 (20 µM)
 1 µl CγIII (20 µM)
 für κ: 1 µl Vκ1-4 (20 µM)
 1 µl CκIII (20 µM)
 für λ: 1 µl Vλ1-3 (20 µM)
 1 µl CλIII (20 µM)
 38 µl DEPC-Wasser
 1 µl pfu-Turbo-Polymerase

Die Reaktionsansätze wurden im Thermocycler folgendem Programm unterzogen:

30 x	45 s	94°C
	45s	50°C
	1 min 45 s	72°C
1 x	10 min	72 °C
	∞	4°C

Die PCR-Produkte aus der „nested“ PCR wurden im Agarose-Gel visualisiert.

4.2.3.1.6 Familienspezifische PCR zur Identifizierung der Familienzugehörigkeit der verwendeten V-Segmente

In der familienspezifischen PCR wurden die PCR-Produkte aus der ersten Reaktion ohne weitere Reinigungsschritte direkt eingesetzt.

Für µ- und γ-Ketten wurden jeweils sechs Reaktionen durchgeführt mit den einzelnen familienspezifischen V-Primern, die in der Signalregion binden, als *forward*-Primer und den in der konstanten Region liegenden C-Primern als *backward*-Primer:

Für die κ-Kette kam es analog zu vier Reaktion, für die λ-Kette wurden drei Reaktionen durchgeführt.

Folgende Reaktionsansätze wurden pipettiert:

μ-Kette:

		3 μl RT-PCR-Ansatz (μ)
		5 μl 10 x pfu-Puffer
		1,25 μl 10 mM dNTPs
Alternativ	VH1-Familie	1 μl VHL1 (20 μM)
		1 μl CμII (20 μM)
	VH2-Familie	1 μl VH2 (20 μM)
		1 μl CμII (20 μM)
	VH3-Familie	1 μl VH3 (20 μM)
		1 μl CμII (20 μM)
	VH4-Familie	1 μl VH4 (20 μM)
		1 μl CμII (20 μM)
	VH5-Familie	1 μl VH5 (20 μM)
		1 μl CμII (20 μM)
	VH6-Familie	1 μl VH6 (20 μM)
		1 μl CμII (20 μM)
		38 μl DEPC-Wasser
		1 μl pfu-Turbo-Polymerase

γ-Kette:

		3 μl RT-PCR-Ansatz (γ)
		5 μl 10 x pfu-Puffer
		1,25 μl 10 mM dNTPs
Alternativ	VH1-Familie	1 μl VHL1 (20 μM)
		1 μl CγII (20 μM)
	VH2-Familie	1 μl VH2 (20 μM)
		1 μl CγII (20 μM)
	VH3-Familie	1 μl VH3 (20 μM)
		1 μl CγII (20 μM)
	VH4-Familie	1 μl VH4 (20 μM)
		1 μl CγII (20 μM)
	VH5-Familie	1 μl VH5 (20 μM)
		1 μl CγII (20 μM)

METHODEN

VH6-Familie	1 µl VH6 (20 µM)
	1 µl CγII (20 µM)

38 µl DEPC-Wasser
1 µl pfu-Turbo-Polymerase

κ-Kette:

3 µl RT-PCR-Ansatz (κ)	
5 µl 10 x pfu-Puffer	
1,25 µl 10 mM dNTPs	
Alternativ	Vκ1-Familie
	1 µl Vκ1 (20 µM)
	1 µl CκII (20 µM)
	Vκ2-Familie
	1 µl Vκ2 (20 µM)
	1 µl CκII (20 µM)
	Vκ3-Familie
	1 µl Vκ3 (20 µM)
	1 µl CκII (20 µM)
	Vκ4-Familie
	1 µl Vκ4 (20 µM)
	1 µl CκII (20 µM)

38 µl DEPC-Wasser
1 µl pfu-Turbo-Polymerase

λ-Kette:

3 µl RT-PCR-Ansatz (λ)	
5 µl 10 x pfu-Puffer	
1,25 µl 10 mM dNTPs	
Alternativ	Vλ1-Familie
	1 µl Vλ1 (20 µM)
	1 µl CλII (20 µM)
	Vλ2-Familie
	1 µl Vλ2 (20 µM)
	1 µl CλII (20 µM)
	Vλ3-Familie
	1 µl Vλ3 (20 µM)
	1 µl CλII (20 µM)

38 µl DEPC-Wasser
1 µl pfu-Turbo-Polymerase

Die Ansätze wurden im Thermocycler folgendem Programm unterzogen:

30 x	45 s	94°C
	45s	50°C
	1 min 45 s	72°C
1 x	10 min	72 °C
	∞	4°C

Anschließend wurden die Proben im Agarose-Gel visualisiert.

4.2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese von PCR-Ansätzen und Visualisierung von DNA-Proben

Reaktionsgemische aus RT-PCR, „nested“ PCR und familienspezifischer PCR wurden mit einem 6 x Ladepuffer (0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF, 40 % (w/v) Sucrose in Aqua bidest) versetzt und die DNA-Fragmente wurden auf einem 1 % Agarose-Gel mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid für 1 h bei 80 V mit 1 x TBE (10,8 g/l Tris, 5,5 g/l Borat, 20 mM EDTA pH 8,0) als Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandards dienten die Marker V und VIII von Roche Diagnostics. Die Visualisierung erfolgte bei 366 nm und wurde mit dem GelDoc 800-System dokumentiert.

4.2.3.3 Sequenzierung der variablen Regionen von APL-Immunglobulinen und Sequenzvergleich mit Keimbahn-Gen-Segmenten der Immunglobulin-V-Region

DNA-Fragmente aus der familienspezifischen PCR wurden für die Sequenzierung der variablen Regionen der APL-Immunglobulingene verwendet.

Die Sequenzierungen wurden mit dem automatischen Sequenzer CEQ8000 (BeckmanCoulter) nach dem Sanger-Verfahren durchgeführt. Beim Sanger-Verfahren, das auch enzymatische DNA-Sequenzierung, Didesoxy-Sequenzierung oder Kettenabbruch-Verfahren genannt wird, werden zur Sequenzierung DNA-Polymerasen eingesetzt. Als Substrat für das Enzym werden zusätzlich zu den normalen Desoxy-Nucleosid-Triphosphaten 2',3'-Didesoxy-Nucleosid-5'-Triphosphate verwendet, die bei Einbau in einen frisch synthetisierten DNA-Strang zum Abbruch der Synthese führen. Durch die enzymatische Reaktion wird eine Population von unterschiedlich langen DNA-Stücken erzeugt, die sich aus der zu sequenzierenden DNA ableiten. Diese Fragmente zeichnen sich durch ein fixes, in allen Molekülen identisches Ende

und ein variables Ende mit jeweils einer der vier möglichen Basen der DNA aus. Das den Kettenabbruch bewirkende Didesoxy-Nucleosid-Triphosphat ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Beim Einsatz von vier unterschiedlichen, für jeweils eine der vier Basen spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen können alle vier enzymatischen Reaktionen gleichzeitig in einem Reaktionsgefäß erfolgen. Durch Gelelektrophorese in hochauflösenden Sequenzgelen werden die unterschiedlich langen DNA-Fragmente voneinander getrennt. Dies geschieht im Falle des CEQ8000 in einem Kapillargel.

Prinzipiell wurden die in der familienspezifischen PCR erzeugten DNA-Abschnitte mit dem jeweiligen familienspezifischen Primer und dem Primer in der konstanten Region in *sense*- und *antisense*-Richtung sequenziert und miteinander verglichen.

Die erhaltenen Sequenzen wurden in Datenbanken mit Keimbahn-V-Gen-Segmenten verglichen, um Aussagen über die verwendeten V-, D- und J-Segmente zu erhalten, Baseninsertionen an Verbindungsstellen zwischen den unterschiedlichen Segmenten festzustellen, Mutationen zu detektieren und die schon analysierte Genfamilienzugehörigkeit zu bestätigen.

4.2.3.3.1 Sequenzierung

4.2.3.3.1.1 Reinigung der PCR-Produkte mit dem QIAGEN QIAquick PCR

Purification Kit

Die Reinigung von PCR-Produkten aus der familienspezifischen PCR von ungebundenen Oligonukleotiden und dNTPs erfolgte mit dem QIAGEN QIAquick PCR Purification Kit nach Anweisung des Herstellers.

4.2.3.3.1.2 Sequenzierreaktion und Gelelektrophorese

Pro zu sequenzierender variabler Region wurden zwei Sequenzierreaktionen angesetzt, eine mit dem familienspezifischen Primer, eine mit dem in der konstanten Region liegendem Primer. Die Sequenzierung erfolgte mit dem Quick Start Kit (BeckmanCoulter).

Pro Reaktion wurden

- 10 µl gereinigtes PCR-Produkt
- 2 µl Sequenzierprimer
- 8 µl DTCS Quick Start Master Mix

gemischt und im Thermocycler folgendem Programm unterzogen:

30 x	96°C	20 s
	50°C	20 s
	60°C	4 min
1x	4°C	∞

Überschüssige, nicht eingebaute markierte Didesoxy-Nucleosid-Triphosphate wurden mit Hilfe von Centri-Sep-Säulen (Princeton) aus der Sequenzierreaktion nach Anweisung des Herstellers entfernt.

Die Sequenzierproben wurden in eine CEQ-Proben-Platte überführt, mit Mineralöl überschichtet und die Kapillargelelektrophorese im CEQ 8000 gestartet.

Die Auswertung der erhaltenen Sequenzen und Chromatogramme, sowie ein Alignment der *sense*- und *antisense*-Sequenzen erfolgte mit der SequencherTM-Software zur Analyse von DNA-Sequenzen.

4.2.3.3.2 Sequenzvergleich mit Keimbahn-V-Gen-Segmenten

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit allen Allelen von bekannten variablen Regionen von humanen Immunglobulinen in der VBASE-Datenbank unter <http://www.mrc-cpe-cam.ac.uk> (Tomlinson, 1996) und in der Datenbank IgBLAST unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast> verglichen. Erhaltene V-, D- und J-Segmente wurden nochmals in HUSAR (http://genome.dkfz-heidelberg.de/menu/biunit/tools_db.shtml#husar) mit der Ausgangssequenz verglichen.

4.3 Funktionelle Untersuchung von APL am Beispiel von JGG9 (IgM) und HL5B (IgG)

4.3.1 Bindung von APL an die humane Monozytenzelllinie Mono-Mac-6

4.3.1.1 Kultivierung der Zelllinie Mono-Mac-6

Bei der humanen Monozytenzelllinie Mono-Mac-6 handelt es sich um eine leicht adhärent wachsende Zelllinie. Sie wurde in RPMI 1640-Medium mit speziellen Supplementen für

Mono-Mac-6 Zellen kultiviert:

RPMI 1640-Medium
10 % FCS
1 mM Oxalacetat
1 mM Natriumpyruvat
1 x MEM (nicht-essentielle Aminosäuren)
100 U/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin
10 µg/ml bovines Insulin
2 mM Glutamin

Mono-Mac-6 Zellen wurden in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen/ml ausgesät und 3 bis 4 Tage bis zu einer Zelldichte von $4 - 6 \times 10^5$ Zellen/ml in 10 ml-Zellkulturschalen kultiviert. Zum Umsetzen wurden die Zellen durch leichtes Klopfen auf den Boden der Zellkulturschale gelöst, mit Hilfe einer sterilen Pipette resuspendiert und in der oben angegebenen Dichte auf neue Zellkulturschalen verteilt.

4.3.1.2 Cytospins mit Mono-Mac-6-Zellen

Da Mono-Mac-6-Zellen nur leicht adhären wachen, mussten sie für Immunfluoreszenzanalysen per Cytospin, also durch Zentrifugation, auf die Objektträger gebracht werden. Hierzu wurde eine Zellsuspension mit 5×10^5 Zellen/ml in speziell für Mono-Mac-6-Zellen supplementiertem RPMI 1640 (s.o.) bereitet. Objektträger wurden mit speziellen Adaptoren zum Einfüllen der Zellsuspension und Filtern zum Absaugen der überschüssigen Flüssigkeit während des Zentrifugationsvorganges versehen. Je 200 µl Zellsuspension wurde in die Adaptoren gefüllt. Die Zellen wurden 10 min bei 700 Upm auf die Objektträger zentrifugiert und anschließend wenige Minuten an der Luft getrocknet. Die Zellen wurden sofort fixiert und entweder direkt weiter verwendet oder wenige Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt.

4.3.1.3 Immunfluoreszenz-Analyse der Bindung von JGG9 (IgM) und HL5B (IgG) an Mono-Mac-6

Die Fluoreszenzmikroskopie ist die derzeit wahrscheinlich effektivste Methode der Lichtmikroskopie zur Lokalisierung von Proteinen innerhalb der Zelle. Ein Antikörper, der an

eine zelluläre Struktur bindet, kann durch einen fluoreszenzmarkierten Antikörper oder – wenn er biotinkonjugiert ist - über fluoreszenzmarkiertes Streptavidin nachgewiesen werden, um z.B. die Lokalisation des erkannten Antigens in der Zelle genauer zu charakterisieren.

4.3.1.3.1 Fixierungsmethoden

Die Fixierung von Zellen vor der Immunfluoreszenzfärbung soll gewährleisten, dass

- a) das Antigen fixiert wird und damit ein Auswaschen des Antikörpers verhindert wird,
- b) der Antikörper durch Permeabilisierung der Zelle Zugang zu seinem Antigen hat,
- c) das Antigen in einer Form erhalten wird, die für den Antikörper erkennbar ist,
- d) die Zellstruktur aufrechterhalten wird.

Zur Fixierung stehen unterschiedliche Fixative zur Verfügung. Organische Lösungsmittel wie Alkohol (z.B. Methanol) und Aceton lösen hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb der Proteinstruktur auf und fällen so Proteine aus (präzipitierende Fixative). Somit können jedoch strukturelle Epitope zerstört werden. Außerdem werden zelluläre Lipidmembranen durch diese Fixative desintegriert, was besonders bei Immunfluoreszenzfärbungen mit APL Auswirkungen bezüglich der Bindung zeigen kann, da Lipide, lipidbindende Proteine und Komplexe aus beiden Antigenen darstellen können.

So genannte quervernetzende Substanzen wie Paraformaldehyd, Formaldehyd und Glutaraldehyd bilden intermolekulare Brücken zwischen den Proteinen aus. Der Gewebekontext wird in der Regel besser erhalten. Dennoch können Epitope durch Quervernetzung unzugänglich gemacht werden. Die Membran wird für den Antikörper durch die Behandlung mit quervernetzenden Substanzen nicht durchlässig gemacht, so dass eine zusätzliche Behandlung mit nichtionischen Detergenzien nötig ist.

Fixierung mit Paraformaldehyd

Mono-Mac-6-Zellen wurden durch Cytospin auf Objektträger gebracht und 2 x mit PBS gewaschen. Anschließend folgte die Fixierung mit 500 µl 3%-igem Paraformaldehyd für 10 min bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden 3 x mit PBS gewaschen und für Immunfluoreszenzfärbungen verwendet.

Fixierung mit Methanol

Mono-Mac-6-Zellen wurden durch Cytospin auf Objektträger gebracht und 2 x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie 5 min in einem Bad aus eiskaltem Methanol bei -20°C

fixiert. Die Objektträger wurden luftgetrocknet, 3 x mit PBS gewaschen und für weitere Immunfluoreszenzfärbungen verwendet.

4.3.1.3.2 Immunfluoreszenzfärbung

Fixierte Mono-Mac-6-Zellen wurden 1 x mit PBS gewaschen und im Falle einer Paraformaldehyd-Fixierung 5 min mit 0,5 % Triton X-100 permeabilisiert. Die Zellen wurden erneut 3 x mit PBS gewaschen und mit 10 % humanen Normalserum in PBS für 45 min inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen und vor allem Fc-Rezeptoren auf den Monozyten zu blockieren. Die Zellen wurden 3 x mit PBS gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit dem Primärantikörper, d.h. dem jeweiligen APL (50 µg/ml) oder der entsprechenden Kontrolle (50 mg/ml) (Tabelle 4-7) für 45 min. Die Inkubation mit den entsprechenden FITC-gekoppelten sekundären Antikörpern (Tabelle 4-7) erfolgte für 45 min nach dreimaligem Waschen mit PBS. Die Zellen wurden erneut 3 x mit PBS und 1 x mit Aqua bidest gewaschen und mit Mowiol eingedeckelt.

Alternativ erfolgte die Primärantikörper-Inkubation mit 50 µg/ml biotinylierten Primärantikörpern bzw. biotinylierten Kontrollen. Anstelle eines Sekundärantikörpers wurde FITC-gekoppeltes Streptavidin (10 µg/ml) eingesetzt.

Tabelle 4-7: Sekundär- und Kontrollantikörper zur Untersuchung einer möglichen Bindung von APL an Monozyten

Primärantikörper	Kontrolle	Sekundärantikörper
HL5B (IgG-APL) 50 µg/ml	IgG ₂ lambda, polyclonal 50 µg/ml	Anti-Human IgG-FITC, unterschiedliche Verdünnungen
	A9D2 (monoklonaler IgG-APL) 50 µg/ml	
JGG9 (IgM-APL) 50 µg/ml	D9G10 (monoklonaler IgM-APL) 50 µg/ml	Anti-Human IgM-FITC, unterschiedliche Verdünnungen

4.3.1.3.3 Mikroskopische Auswertungen

Die mikroskopischen Auswertungen wurden an einem Axioskop von Zeiss unter Verwendung von Plan-NEOFLUTAR-Objektiven (40x, 20x, 10x) ausgeführt.

4.3.2 Untersuchung der Bindung von HL5B an Lysate aus stimulierten und nicht stimulierten Mono-Mac-6 mittels Westernblot-Analyse

4.3.2.1 Stimulation von Mono-Mac-6 mit Lipopolysaccharid (LPS)

Mono-Mac-6 wurden mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen/ml in 10 ml-Zellkulturschalen ausgesät und 12 h bei 37°C und einer 5 %-igen CO₂-Sättigung im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in Stimulationsmedium (RPMI 1640 mit den für Mono-Mac-6 üblichen Zusätzen und 10 ng/ml LPS) resuspendiert und für weitere 6 h im Brutschrank inkubiert. Überprüft wurde die Stimulation durch die Bestimmung der prokoagulanten Aktivität der Monozyten im Kugelkoagulometer. Bei erfolgreicher Stimulation wird der prokoagulante Oberflächenmarker Tissue Factor (TF) auf den Monozyten induziert, was zu einer gesteigerten prokoagulanten Aktivität der Zelle führt. Inkubiert man nun diese aktivierten Mono-Mac-6 Zellen mit humanem Zitratplasma, so gerinnt dieses schneller als bei Inkubation mit nicht stimulierten Mono-Mac-6. Die Gerinnungszeit kann man mit Hilfe eines Kugelkoagulometers, das durch ein in der Probe rotierendes Metallkugelchen die Bildung von Fibringerinnseln registriert, bestimmen.

Zur Überprüfung der Stimulation wurden mit LPS versetzte Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, in kaltem PBS resuspendiert (1×10^7 Zellen/ml) und anschließend auf Eis gehalten. Zur Bestimmung der prokoagulanten Aktivität wurden 100 µl Zellsuspension mit 100 µl humanem Zitratplasma gemischt. Dieses Gemisch wurde 3 min auf 37°C erwärmt. Die Gerinnungsreaktion im Zitratplasma wurde durch Zugabe von 100 µl 50 mM CaCl₂-Lösung gestartet. Die Gerinnungszeit wurde im Kugelkoagulometer gemessen. Als Kontrolle wurden Mono-Mac-6 verwendet, die nicht in Stimulationsmedium, sondern in RPMI 1640 mit den Zusätzen für Mono-Mac-6-Zellen inkubiert wurden.

4.3.2.2 Herstellung von Mono-Mac-6-Lysaten

$2,5 \times 10^7$ Zellen (stimuliert oder unstimuliert) wurden abzentrifugiert und in 250 µl frisch angesetztem Solubilisierungspuffer (140 mM NaCl₂, 10 mM Tris, 5 µg/ml Aprotinin, 250 µg/ml Trypsininhibitor, 0,5 % NP-40) resuspendiert. Der Solubilisierungsansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min im Ultraschallbad behandelt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt in der Mikrozentrifuge für 30 min bei 4°C und 13.000 Upm. Überstand und Pellet (Membranfraktion) wurden getrennt und in weiteren Untersuchungen eingesetzt.

4.3.2.3 SDS-PAGE, Westernblot und immunochemischer Nachweis einer möglichen Bindung von HL5B an Mono-Mac-6-Lysate

Die SDS-PAGE und der Westernblot wurden wie in den Kapiteln 4.1.7.1 und 4.2.2.1 beschrieben durchgeführt.

Zur Blockierung der Membran wurden zunächst unterschiedliche Blockierungsreagenzien ausgetestet (TBST-Blotto, TBST 10 % humanes Normalserum, TBST 3% BSA); bei weiteren Versuchen wurde TBST-Blotto wie in Kapitel 4.2.2.1 beschrieben zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen eingesetzt.

Der immunochemische Nachweis einer möglichen Bindung erfolgte mit HL5B als Primärantikörper und Anti-Human IgG-AP oder Anti-Human IgG-HRP als Detektionsantikörper. Die Substratreaktion erfolgte als Farbreaktion mit BCIP/NBT (bei Verwendung des AP-markierten Sekundärantikörpers) oder als Chemilumineszenzreaktion mit dem ECL Plus Western blotting Detektionsreagenz (bei Verwendung des HRP-markierten Sekundärantikörpers).

Alternativ erfolgte die immunochemische Färbung mit biotinyliertem HL5B und Streptavidin-AP oder Streptavidin-HRP. Für die Substratreaktion wurde BCIP/NBT oder das ECL Plus Western blotting Detektionsreagenz verwendet.

Primärantikörper, Detektionsantikörper bzw. Streptavidin-Konjugate und die jeweiligen Substrate sind in Tabelle 4-8 zusammengestellt.

Tabelle 4-8: Primärantikörper, Konjugate und Substrate zur Untersuchung einer möglichen Bindung von HL5B an Monozyten im Westernblot.

APL	Detektion	Substrat
HL5B-Biotin (70 ng/ml)	Streptavidin-AP (1:3000)	BCIP/NBT
HL5B-Biotin (70 ng/ml)	Streptavidin-HRP (1:5000)	ECL
HL5B (70 ng/ml)	Anti-Human IgG-AP (1:30.000)	BCIP/NBT
HL5B (7= ng/ml)	Anti-Human IgG-HRP (1:10.000)	ECL

Als Negativkontrolle wurden die Membranen jeweils anstelle des Primärantikörpers (HL5B oder HL5B-Biotin) mit TBST alleine behandelt.

4.3.2.3.1 Chemilumineszenzreaktion zum Nachweis einer möglichen Bindung von HL5B an Mono-Mac-6-Lysate im Westernblot

Nach dem Proteintransfer auf die Membran und der Ponceau-Rot-Färbung wurde die Membran zweimal kurz und anschließend 3 x 5 min in TBST gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (siehe Tabelle 4-8) für 60 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Die Membran wurde erneut zweimal kurz und 3 x 5 min mit TBST gewaschen. Der Sekundärantikörper bzw. das Streptavidin-HRP wurde in entsprechender Verdünnung für 60 min bei Raumtemperatur hinzugefügt (siehe Tabelle 4-8). Es schlossen sich mehrere Waschschriffe in TBST an: Die Membran wurde zweimal kurz und anschließend einmal für 15 min und dreimal für 5 min in TBST gespült. Das ECL-Reagenz wurde auf Raumtemperatur gebracht und im Verhältnis 40:1 (Lösung A : Lösung B) gemischt. Überschüssiges TBST auf der Membran wurde beseitigt und die Membran mit dem gemischten ECL-Reagenz betropft und in einen Autoklavierbeutel eingeschlossen. Nach einer halben Stunde wurde die Membran erstmals für 15 s auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL) exponiert. Je nach Stärke der Belichtung wurde sofort oder nach einigen Stunden ein weiterer Röntgenfilm für eine gewünschte Belichtungszeit aufgelegt. Die Entwicklung der Röntgenfilme erfolgte durch einen Entwicklungsautomaten.

4.4 Etablierung einer Methode zur Kofaktorabhängigkeit von APL

4.4.1 Isolierung der IgG-Fraktion aus humanem Serum

Die Isolierung von IgG aus humanem Serum erfolgte mit Vivapure Protein A Mini Spin Säulen. Protein A ist eine Komponente der *Staphylococcus aureus*-Zellwand und bindet, wie Protein G, die Fc-Region unterschiedlicher IgGs (siehe Tabelle 4-9). Es liegt an eine Membran gebunden vor. Die Vivapure Protein A Mini Spin Säulen sind für die Aufarbeitung kleiner Probenvolumina unter Verwendung einer Mikrozentrifuge geeignet. In wenigen aufeinanderfolgenden Zentrifugationsschritten wird IgG aus der Probe bei neutralem bis basischem pH an die Membran gebunden und durch einen pH-Wechsel zum sauren Milieu in geringem Volumen eluiert.

Zur Isolierung der IgG-Fraktion aus humanem Serum wurden 20 µl Serum 1:20 in Auftragspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,4) verdünnt. Die Membran wurde mit 400 µl Äquilibrierungspuffer (=Auftragspuffer) durch Zentrifugation für 5 min bei 800 g äquilibriert. 400 µl Serum-Verdünnung wurden aufgetragen und 7 min bei 400 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde aufbewahrt. Die Membran wurde mit 400 µl Waschpuffer (=Auftragspuffer)

bei 800 g für 5 min gewaschen, die Waschfraktion wurde aufbewahrt. In einem Auffanggefäß wurden 20 µl Neutralisationspuffer (2 M Tris-HCl, pH 9,0) vorgelegt. Die Elution erfolgte mit 400 µl Elutionspuffer (0,1 M Glycin-HCl, pH 3,0) durch einen Zentrifugationsschritt für 5 min bei 800 g. Das Eluat wurde aufbewahrt.

Die IgG-haltigen Fraktionen wurden als IgG-Fraktion, die weiteren Fraktionen als IgG-freie Fraktion vereinigt.

Tabelle 4-9: IgG-Subklassen und deren Affinität zu Protein A

IgG-Subklasse (human)	Protein A-Affinität
IgG1	++++
IgG2	++++
IgG3	-
IgG4	++++

4.4.2 Umpuffern und Konzentrierung der IgG-Fraktion mit Vivaspin 500-Säulen mit einem MWCO von 10 kDa

Zum Umpuffern und Konzentrieren der isolierten IgG-Fraktion wurden Vivaspin 500-Säulen (Vivascience, Hannover) mit einem MWCO von 10 kDa verwendet. Die Vivaspin 500-Säule wurde mit 500 µl PBS durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 12.000 g gewaschen. Die IgG-Fraktion wurde auf die Säule gegeben und 10 min bei 12.000 g zentrifugiert. Da das Fassungsvermögen der Vivaspin 500-Zentrifugaleinheiten nur 500 µl beträgt, wurde die IgG-Fraktion (800 µl) in zwei Schritten aufgetragen. Die Probe wurde so weit als möglich konzentriert. Zum Umpuffern wurde die konzentrierte IgG-Fraktion mit 500 µl sterilfiltriertem PBS aufgefüllt und erneut 10 min bei 12.000 g zentrifugiert. Der Vorgang wurde zweimal wiederholt. Abschließend wurde die Probe so lange zentrifugiert, dass das Volumen der IgG-Fraktion ≤ 20 µl war. Das Konzentrat wurde entnommen und gegebenenfalls mit PBS auf 20 µl (Ausgangsvolumen) aufgefüllt.

4.4.3 Überprüfung des IgG-Gehaltes der IgG-Fraktionen und der IgG-freien Fraktionen im IgG-ELISA

Der IgG-Gehalt der IgG-Fraktion und der IgG-freien Fraktion wurde im IgG-ELISA (Kapitel 4.1.3) gemessen und die Effizienz der IgG-Isolierung bestimmt.

4.4.4 Darstellung der IgG-Fraktionen im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel

Mit Hilfe der SDS-PAGE und der anschließenden kolloidalen Coomassie-Färbung wurde die Reinheit der generierten IgG-Fraktion ermittelt. Die SDS-PAGE wurde wie in Kapitel 4.1.7.1.1 beschrieben durchgeführt. Die Durchführung der kolloidalen Coomassie-Färbung ist in Kapitel 4.1.7.1.2 beschrieben.

4.4.5 Untersuchung der IgG-Fraktionen auf Kontaminationen mit den APL-Kofaktoren β 2GPI und Prothrombin

Im Westernblot wurde untersucht, ob die isolierten IgG-Fraktionen frei sind von Proteinkofaktoren für APL, nämlich β 2GPI und Prothrombin. Die Durchführung des Westernblots und die anschließende immunchemische Färbung erfolgte wie im Kapitel 4.2.2.1 beschrieben. Als Primärantikörper fungierten

für β 2GPI:	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen Apolipoprotein H
für Prothrombin:	Schaf Anti-Human Prothrombin

Als Sekundärantikörper wurden mit Alkalischer Phosphatase markierte Anti-Schaf bzw. Anti-Kaninchen-Antikörper verwendet.

4.5 B-1/B-2-Zellen

4.5.1 Isolierung von mononukleären Zellen (PBMC) aus buffy coat

Die Isolierung von PBMCs aus buffy coat wurde analog zur im Kapitel 4.1.1.2 beschriebenen Methode durchgeführt.

4.5.2 Anreicherung von B-Zellen durch Depletion von T-Zellen über magnetische Zellseparation

Nach der Isolation von PBMCs wurden diese über Nacht in Zellkulturflaschen im Brutschrank inkubiert, um in der Zellsuspension enthaltenen Monozyten die Möglichkeit zur Adhäsion an den Boden der Zellkulturflasche zu geben. Am nächsten Tag wurden die

Suspensionszellen abgenommen und in einer magnetischen Zellseparation mit dem MidiMACS-System von Miltenyi eingesetzt. Durch die Verwendung von Magnetkügelchen, die mit einem Anti-CD3-Antikörper gegen den T-Zell-Oberflächenmarker CD3 beschichtet sind, können T-Zellen aus der Zellsuspension entfernt und damit B-Zellen angereichert werden.

1×10^7 Suspensionszellen wurden pelletiert und mit 80 μ l MidiMACS-Puffer (PBS, 2 mM EDTA, 0,5 % BSA) resuspendiert. 20 μ l CD3-Microbeads (Magnetkügelchen) wurden zugegeben. Der Ansatz wurde für 15 min bei 4°C inkubiert und anschließend mit dem zwanzigfachen Volumen an MidiMACS-Puffer aufgefüllt. Er wurde für 5 min bei 3000 Upm in der Mikrozentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, während der Niederschlag in 500 μ l MidiMACS-Puffer resuspendiert wurde.

Eine LS⁺-Säule wurde im Magnetfeld des MACS-Separators platziert und mit 3 ml MidiMACS-Puffer gespült. Die Zellsuspension wurde auf die Säule aufgetragen, der Durchlauf wurde aufgefangen. Die Säule wurde mit 12 ml MidiMACS-Puffer gespült, wobei der Durchlauf erneut aufgefangen und mit dem vorherigen Durchlauf vereinigt wurde. Die Durchläufe wurden abzentrifugiert, um die enthaltenen CD3-negativen Zellen zu pelletieren. Die Zellen wurden in RPMI 10 % FCS aufgenommen.

Kontrollfärbung zur Überprüfung der B-Zellanreicherung:

Die CD3-depletierten Zellen wurden einer Kontrollfärbung gegen CD5 und dem T-Zell-Oberflächenmarker CD3 oder den B-Zell-Oberflächenmarker CD19 unterzogen. Folgende Färbeansätze wurden gemacht:

- 1) CD3-FITC/CD19-PE
- 2) CD5-FITC/CD3-PE
- 3) CD5-FITC/CD19-PE

Pro Ansatz wurden 5×10^5 Zellen mit 100 μ l DPBS versetzt und je 20 μ l FITC- und PE-markierte Antikörper zugegeben. Die Bindung erfolgte bei Raumtemperatur für 15 min. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in 1 ml DPBS resuspendiert und bis zum Einsatz in der Durchflusszytometrie (wenige Minuten) auf Eis gehalten. Im Durchflusszytometer (Epics XL, BeckmanCoulter) wurden die Zellpopulationen visualisiert.

4.5.3 Färbung der B-1-Zellen durch CD19/CD5-Färbung und fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS)

Angereicherte B-Zellen oder Gesamt-Suspensionszellen aus PBMCs wurden mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD5 und CD19 gefärbt. Dazu wurden pro 5×10^5 Zellen 100 μ l DPBS und je 20 μ l CD5-FITC und CD19-PE gemischt. Alternativ wurden Färbungen mit CD5-PE und CD19-FITC durchgeführt. Die Zellen wurden 15 min bei Raumtemperatur mit den Antikörpern inkubiert. Anschließend wurde 1 ml DPBS zugegeben und die Zellen bis zur Sortierung auf Eis gehalten. Ungefärbte Zellen aus dem gleichen Ansatz (angereicherte B-Zellen oder Gesamt-Suspensionszellen) dienten als Kontrollzellen.

Die Sortierung wurde mit dem Epics® ALTRA™ (BeckmanCoulter) durchgeführt.

4.5.4 Untersuchung der Abhängigkeit der CD5-Expression von der Stimulierung der B-Zellen

Um die Auswirkung einer Stimulierung von B-Zellen auf deren CD5-Expression zu untersuchen, wurden B-Zellen mit PHA stimuliert und anschließend mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD69, einem Aktivierungsmarker für B-Zellen, CD19 (B-Zell-Marker) und dem zu untersuchenden Oberflächenmarker CD5 gefärbt.

4.5.4.1 Stimulierung der B-Zellen

Nach der Isolation von PBMCs wurden diese über Nacht in Zellkulturflaschen im Brutschrank inkubiert, um in der Zellsuspension enthaltenen Monozyten die Möglichkeit zur Adhäsion an den Boden der Zellkulturflasche zu geben. Am nächsten Tag wurden die Suspensionszellen abgenommen und für Stimulationsversuche mit PHA verwendet. Die Suspensionszellen wurden mit DPBS gewaschen, in Stimulationsmedium resuspendiert und über Nacht im Brutschrank inkubiert:

- RPMI 1640-Medium
- 10 % FCS
- 100 U/ml Penicillin
- 100 μ g/ml Streptomycin
- 2 mM Glutamin
- 2 μ g/ μ l PHA

5 Ergebnisse

5.1 Gewinnung humaner Antiphospholipidantikörper produzierender Hybridomzelllinien

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten zwei APL produzierende monoklonale Hybridomzelllinien generiert werden (JGG9 und HVA2). Eine dritte wurde im Rahmen der experimentellen Arbeiten zu einer anderen Doktorarbeit etabliert (Viola Ochsenhirt) und in der vorliegenden Arbeit auf serumfreie Kulturbedingungen umgestellt. Der zugehörige Antikörper wurde strukturell charakterisiert (HLC9).

5.1.1 Etablierung der Hybridomzelllinien JGG9, HVA2 und HLC9

Während die Zelllinie JGG9 über PEG-Fusion und „Limited-Dilution“-Klonierung aus B-Zellen der Patientin JG etabliert wurde, wurden die Zelllinien HVA2 und HLC9 durch Elektrofusion aus B-Zellen der Patienten HV bzw. HL generiert. Fusionspartner war in allen drei Fällen die Heteromyelomzelllinie CB-F7. Die Hybridomzelllinien weisen hinsichtlich ihrer Morphologie Unterschiede auf: Bei JGG9 handelt es sich um eine Suspensionszelllinie aus runden Zellklonen, die ein für viele Hybridomzellen typisches traubenförmiges klonales Wachstum aufweist. HVA2 wächst locker adhärent und lässt sich durch leichtes Klopfen gegen den Zellkulturflaschenboden ablösen. Bei HLC9 handelt es sich um adhärent wachsende Zellen, die sich nicht durch leichtes Klopfen an den Zellkulturflaschenboden lösen lassen, sondern zum Umsetzen mit Hilfe eines Zellschabers oder durch Einsatz von Trypsin-EDTA aus der Kulturflasche gelöst werden müssen.

In 17 – 24-tägigen Wachstumsversuchen wurde das Wachstumsverhalten der Hybridome genauer charakterisiert. Frisch aufgetaute Zellen wurden alle 2 – 5 Tage umgesetzt und dabei auf eine Zellzahl von 1×10^5 Zellen/ml eingestellt. Vor jeder Subkultivierung wurde die erreichte Zellzahl und, mittels Ausschlussfärbung durch Trypanblau, die Vitalität der Zellen bestimmt.

Der Wachstumsversuch zeigte, dass frisch aufgetaute JGG9-Zellen sich in durchschnittlich 3,42 Tagen etwa verdreifachen: Ausgehend von einer Zellzahl von 1×10^5 Zellen/ml konnte nach entsprechender Kultivierungszeit eine durchschnittliche Zellzahl von $3,43 \times 10^5$ Zellen/ml ermittelt werden (Abbildung 5-1 A). Die Streuung der Einzelwerte der

Zellzahlbestimmungen und auch Beobachtungen außerhalb des Wachstumsversuches zeigen hohe Variabilität der Wachstumsrate, die tendenziell mit längeren Kultivierungszeiten abnimmt.

Die durchschnittliche von JGG9 in RPMI 10% FCS innerhalb von 3 Tagen produzierte IgM-Konzentration betrug 930 ng/ml (\pm 540 ng/ml).

Bei HVA2 stieg die Zellzahl in durchschnittlich 3,29 Tagen Kultivierungszeit von 1×10^5 Zellen/ml auf durchschnittlich $5,58 \times 10^5$ Zellen/ml (Abbildung 5-1 B). Wie auch bei JGG9 findet sich eine recht breite Streuung der nach entsprechender Subkultivierung erreichten Zellzahl.

Die durchschnittliche von HVA2 produzierte IgM-Konzentration innerhalb von 3 Tagen Kultivierungszeit in RPMI 10% FCS betrug 333 ng/ml (\pm 132 ng/ml).

Für HLC9 zeigte sich ein Anstieg der Zellzahl von 1×10^5 Zellen/ml auf $3,73 \times 10^5$ Zellen/ml in durchschnittlich 3,43 Tagen (Abbildung 5-1 C).

Die von HLC9 durchschnittlich in 3 Tagen produzierte IgM-Konzentration beträgt $1,31 \mu\text{g/ml}$ (\pm $0,52 \mu\text{g/ml}$).

Bei allen Hybridomen fiel auf, dass die Wachstumsrate gegen Ende der Wachstumsversuche deutlich zurückging.

5.1.2 Kultivierung von humanen Hybridomen unter serumfreien Bedingungen

In einem Vorversuch wurden verschiedene serumfreie Medien und FCS-Ersatzmedien auf ihre Verwendbarkeit zur serumfreien Kultur von JGG9 getestet. Die Umstellung erfolgte parallel direkt und sequentiell über etwa 8 Tage hinweg (Tabelle 5-1).

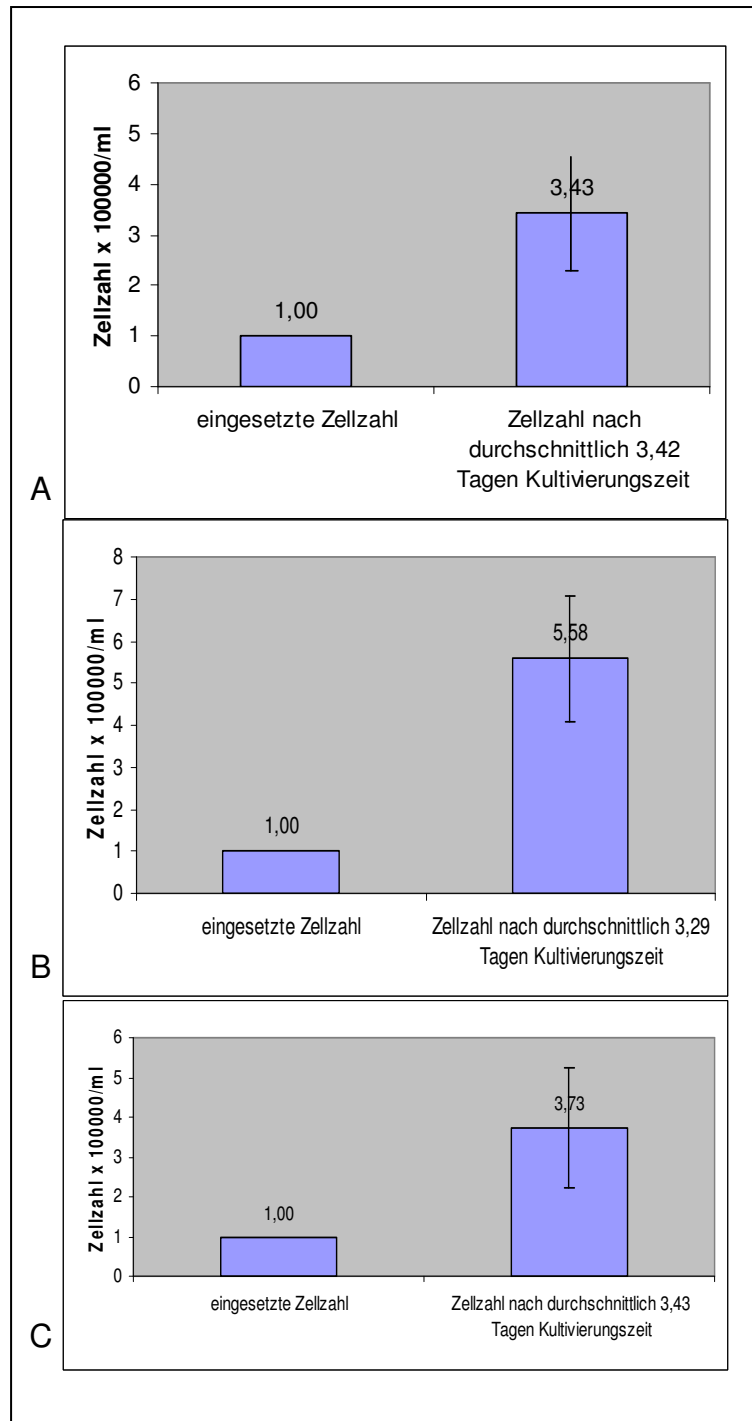


Abbildung 5-1: Kultivierung A) JGG9 - Durchschnittliche Zellzahl nach durchschnittlich 3,42 Tagen Kultivierungszeit. B) HVA2 – Durchschnittliche Zellzahl durchschnittlich 3,29 Tagen Kultivierungszeit und C) HLC9 – Durchschnittliche Kultivierungszeit nach durchschnittlich 3,43 Tagen Kultivierungszeit.

ERGEBNISSE

Medium Tag	RPMI 10 % FCS	RPMI 5% Sea Growth	1 Teil Hybridoma Express- Medium + 1 Teil RPMI 10 % FCS	Hybridoma Express- Medium	1 Teil Hybridoma- Medium (Sigma) + 1 Teil RPMI 10 % FCS	Hybridoma- Medium (Sigma)	1 Teil UltraDOMA + 1 Teil RPMI 10 % FCS	UltraDOMA
0	100	100	100	100	100	100	100	100
2	70	52	64	50	73	60	84	62
5	77	0	15	68	78	4	87	44
8	74	--	1	67	79	0	85	0
					↓ 3 Teile Hybridoma- Medium (Sigma) + 1 Teil RPMI 10% FCS		↓ 3 Teile UltraDOMA (Sigma) + 1 Teil RPMI 10% FCS	
				x	--		--	

Tabelle 5-1: Direkte und sequentielle Umstellung der Kultur von JGG9 von serumhaltigen auf serumfreie Bedingungen.

Acht verschiedene Ansätze wurden gemacht:

- 1) RPMI 10% FCS (Ausgangsmedium) → **Kontrolle**
- 2) RPMI 5% Sea Growth
- 3) 1 Teil RPMI 10% FCS + 1 Teil Hybridoma Express
- 4) Hybridoma Express
- 5) 1 Teil RPMI 10% FCS + 1 Teil Hybridoma-Medium (Sigma)
- 6) Hybridoma-Medium (Sigma)
- 7) 1 Teil RPMI 10% FCS + 1 Teil UltraDOMA™
- 8) UltraDOMA™

Am Tag 0 wurden jeweils 1×10^5 Zellen/ml von RPMI 10% FCS in das entsprechende Medium umgesetzt. An Tag 2, 5 und 8 wurde die Vitalität der Zellen bestimmt und jeweils wieder 1×10^5 Zellen/ml in frisches Medium gesetzt.

Die Vitalität der Zellen im Kontrollmedium RPMI 10% FCS lag von Tag 2 – 8 bei durchschnittlich 74 %. Durch Substitution von FCS mit Sea Growth (5%) halbierte sich die Zahl der lebenden Zellen innerhalb des ersten Kultivierungszyklus. Nach erneutem Umsetzen in RPMI 5% Sea Growth und dreitägiger Kultivierung waren keine lebenden Zellen mehr vorhanden.

Sequentielles Umsetzen von JGG9 von RPMI 10% FCS in Hybridoma Express-Medium (zunächst 50 % Hybridoma Express) führte zu einer stetigen Abnahme der Vitalität bis hin zu 1 % an Tag 8.

Direktes Umsetzen in Hybridoma Express führte zunächst zu einer Abnahme der Vitalität auf 50 %. Im weiteren Kultivierungsverlauf erholten sich die Zellen jedoch wieder und es konnte eine Vitalität von 68 % bzw. 67 % erreicht werden.

Direkte Umgewöhnung von JGG9 von Kultivierung in RPMI 10% FCS auf Kultivierung in Hybridoma-Medium von Sigma oder auf UltraDOMA™ führte zu einer zunehmenden Abnahme der Lebendzellzahl bis hin zu 0 % Vitalität an Tag 8.

Sequentielle Umstellung auf Hybridoma-Medium von Sigma und UltraDOMA™ war erfolgreich für den ersten Umsetzungsschritt (50 % Hybridoma-Medium bzw. 50% UltraDOMA™ mit RPMI): 79 % Vitalität konnte an Tag 8 für Hybridoma-Medium bestimmt werden, 75% für UltraDOMA™. Daraufhin wurden die Zellen in ein Mediumgemisch aus jeweils 3 Teilen Hybridoma-Medium (Sigma) bzw. UltraDOMA™ und je einem Teil RPMI 10% FCS umgesetzt. Nach drei Tagen Kultivierung in dem jeweiligen Mediumgemisch

konnte in dem Hybridoma-Medium/RPMI-Gemisch keine lebende Zelle mehr detektiert werden. Die Zellvitalität im UltraDOMATM-Medium ging auf 40 % zurück.

Für weitere, differenziertere Umstellungsversuche wurde das direkte Umsetzen von RPMI 10% FCS in Hybridoma Express-Medium gewählt.

5.1.2.1 Umstellung der Kultur von JGG9 auf serumfreie Bedingungen

Die Kulturbedingungen von JGG9 wurden durch direktes Umsetzen von RPMI 10% FCS in Hybridoma Express-Medium auf serumfreie Bedingungen umgestellt. Hierzu wurden JGG9-Hybridome 24 Tage lang parallel in RPMI 10% FCS und in Hybridoma Express kultiviert. Die Zellen wurden in RPMI 10% FCS aufgetaut. Nach zwei bis drei Tagen wurden sie in frisches RPMI 10% FCS umgesetzt, wobei eine Zellzahl von 1×10^5 Zellen/ml eingesetzt wurde. Die Zellen wurden weitere zwei bis drei Tage kultiviert und anschließend (Tag 0) gezählt und zu je 1×10^5 Zellen/ml alternativ in RPMI 10% FCS oder in Hybridoma Express-Medium überführt. Im Zellkulturüberstand wurde die IgM-Konzentration mittels IgM-ELISA gemessen. An Tag 3, 7, 9, 12, 17, 20 und 24 wurden die Zellen geerntet. Aus den Zellkulturüberständen wurde die IgM-Konzentration bestimmt (nicht von Tag 17 und 24). Die Zellen wurden gezählt und die Vitalität bestimmt (Trypanblau-Färbung). Je 1×10^5 Zellen/ml wurden in frisches Medium überführt und weiterkultiviert.

Die Zellzahl und Vitalität sind in beiden Medien etwa gleich, oft ist beides im serumfreien Milieu etwas geringer (Abbildung 5-2 A und B). Deutlich geringer ist die Antikörperproduktion in Hybridoma Express (Abbildung 5-2 C). Während in RPMI 10 % FCS Durchschnittswerte von 0,93 µg/ml bei etwa dreitägiger Kultivierungsdauer erreicht werden, liegt die Antikörperkonzentration im serumfreien Hybridoma Express bei gleicher Kultivierungsdauer mit 0,38 µg/ml deutlich unter diesem Wert. Die Umstellung von JGG9 von serumhaltigem auf serumfreies Medium ist also bei gleicher Vitalität und gleichem Wachstumsverhalten, aber bei deutlich geringerer Antikörperproduktion möglich.

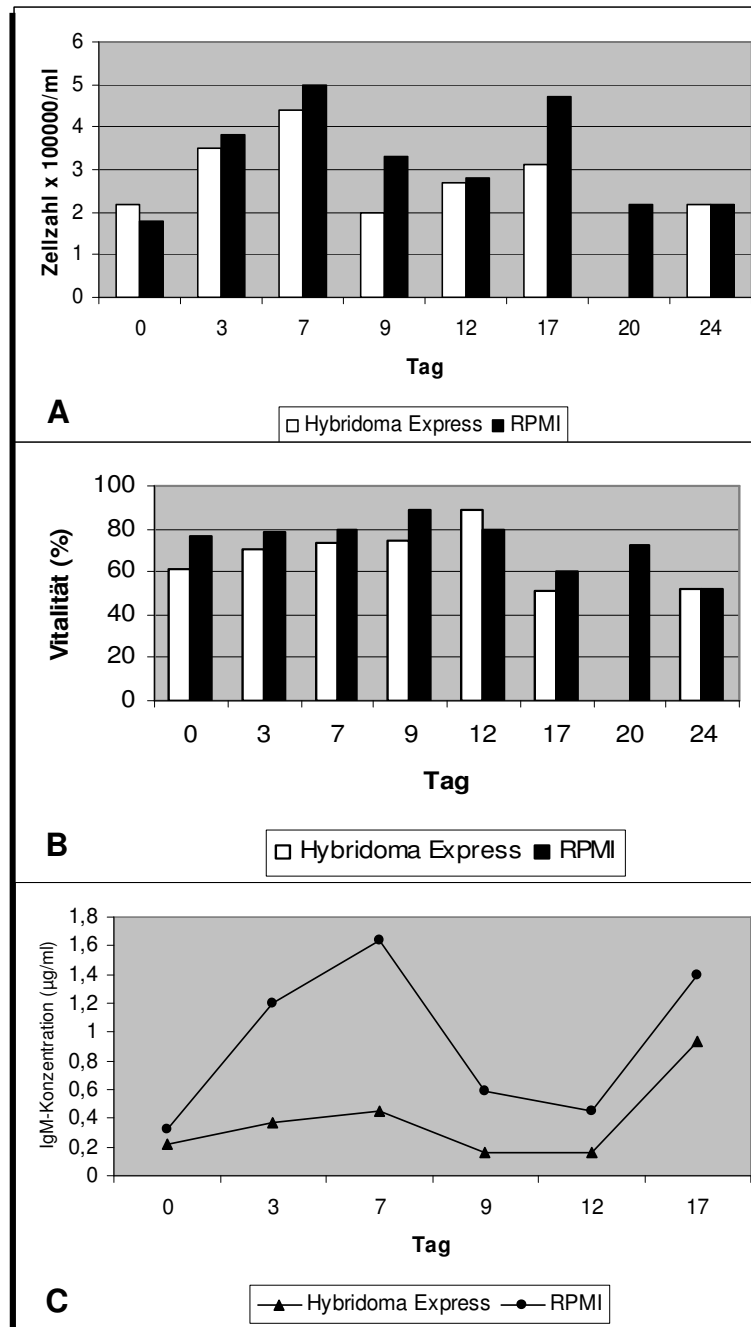


Abbildung 5-2: Umstellung der Kultur von JGG9 von serumhaltigen auf serumfreie Bedingungen. A) Zellzahl; B) Vitalität; C) IgM-Konzentration im Zellkulturüberstand nach unterschiedlichen Kultivierungszeiten

5.1.2.2 Umstellung der Kultur von HLC9 auf serumfreie Bedingungen

Wie bei JGG9 wurde HLC9 durch direktes Umsetzen von RPMI 10% FCS in Hybridoma Express-Medium von der Kultur mit serumhaltigen auf Kultur mit serumfreiem Medium umgestellt. Die Umstellung erfolgte analog zur Umstellung der Kulturbedingungen von JGG9.

ERGEBNISSE

Nach einem Einbruch sowohl in der Vermehrung der Zellen als auch in der Vitalität an Tag 7, 9 und 12 bei Verwendung von Hybridoma Express-Medium kam es im weiteren Kultivierungsverlauf zu annähernd gleichen Werten für in RPMI 10% FCS und in Hybridoma Express-Medium kultivierten HLC9-Hybridomen (Abbildung 5-3 A und B).

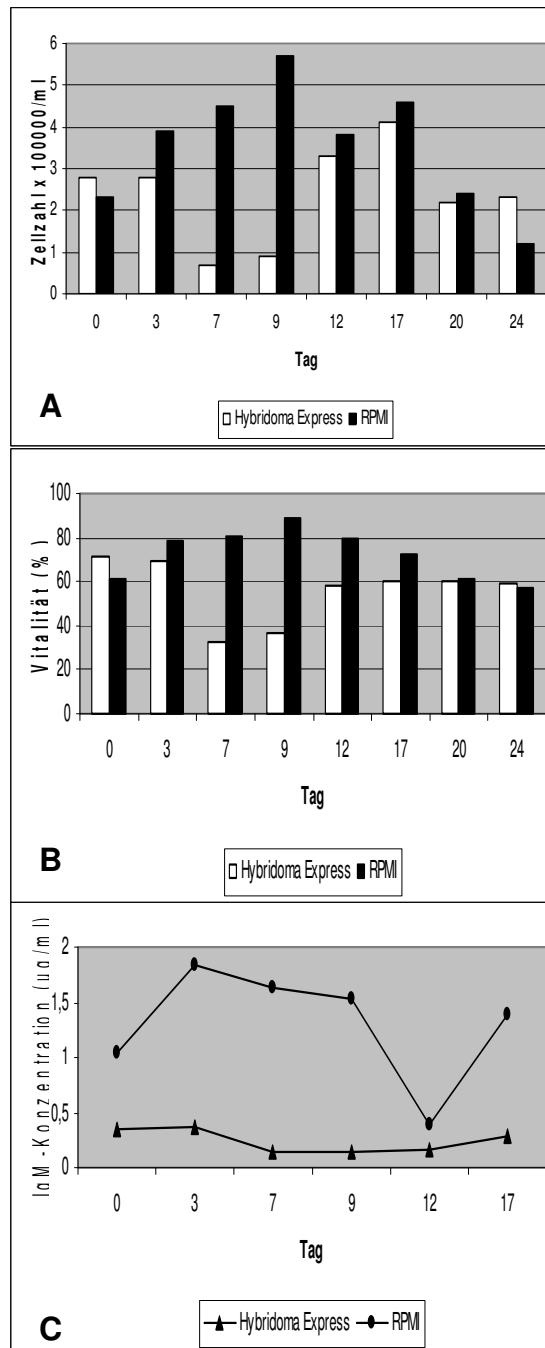


Abbildung 5-3: Umstellung der Kultur von HLC9 von serumhaltigen auf serumfreie Kulturbedingungen. A) Zellzahl; B) Vitalität; C) IgM-Konzentration im Zellkulturüberstand nach unterschiedlichen Subkultivierungszeiten

Wie auch bei JGG9 führt Verwendung des serumfreien Mediums zu einer Reduktion der Antikörperproduktion. Während HLC9 in RPMI 10% FCS durchschnittlich 1,31 µg/ml IgM produziert, sinken die Werte bei Kultivierung in serumfreiem Hybridoma Express auf durchschnittlich 0,25 µg/ml (bei jeweils gleicher Kultivierungszeit von im Mittel 3 Tagen). Wieder ist eine Umstellung auf serumfreie Kultur bei deutlich eingeschränkter Antikörperausbeute möglich.

5.1.2.3 Umstellung der Kultur von HVA2 auf serumfreie Bedingungen

Im Rahmen der Doktorarbeit konnte die Kultur von HVA2 in serumfreiem Medium nicht erreicht werden.

5.1.3 „High Density“-Kultivierung von JGG9 und HLC9

Vor dem Hintergrund der geringen Antikörperproduktion in serumfreiem Medium wurden JGG9 und HLC9 in der Integra-CELLine kultiviert. Das CELLine-System ermöglicht die Kultur von Hybridomen zur Produktion von höheren Antikörper-Konzentrationen.

Wöchentlich wurden Zellkulturüberstände zur Antikörpergewinnung entnommen. Die produzierten IgM-Konzentrationen lagen für HLC9 wie für JGG9 bei durchschnittlich 150 µg/ml.

5.1.4 Zusammenfassung

Es konnten im Rahmen der Doktorarbeit drei monoklonale Zelllinien generiert und hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens charakterisiert werden: HVA2 und HLC9 wurden aus B-Zellen von männlichen Patienten mit primärem APS generiert, JGG9 geht auf B-Zellen von einer weiblichen Patientin mit sekundärem APS (assoziiert mit SLE) zurück.

Die generierten Zelllinien weisen unterschiedliche Morphologien und Wachstumseigenschaften auf: Während JGG9 traubenförmig in Suspension wächst, zeichnet sich HLC9 durch ein adhärentes Wachstum aus. Die Wachstumsraten aller Zelllinien zeigen eine hohe Variabilität mit einer Tendenz zu geringeren Wachstumsraten bei längeren Kultivierungszeiten.

JGG9 und HLC9 konnten durch direktes Umsetzen auf serumfreie Kulturbedingungen (Hybridoma Express) umgestellt werden. Während die Umstellung der Kulturbedingungen keine Auswirkung auf die Vitalität und das Wachstumsverhalten der Zellen zeigte, verringerte

sich die Antikörper-Produktion deutlich, bei JGG9 von 930 ng/ml auf 380 ng/ml (in drei Tagen) und bei HLC9 von 1,31 µg/ml auf 0,25 µg/ml. Serumfreie Kultur von HVA2 konnte nicht erzielt werden.

Unter Einsatz des „high density“-Kultursystems „CELLLine“ konnte die Antikörperproduktion auf durchschnittlich 150 µg/ml in 7 Tagen gesteigert werden.

5.2 Strukturelle Charakterisierung monoklonaler APL

5.2.1 Identifizierung von Phospholipid-Bindungspartnern der humanen monoklonalen APL JGG9, HVA2 und HLC9

Die Bindung von JGG9, HLC9 und HVA2 an unterschiedliche Phospholipide (Cardiolipin, Phosphatidylserin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylinositol, Phosphatidylcholin und Sphingomyelin) und β2-Glykoprotein I als phospholipidbindendes Protein wurde mit Hilfe des *Aeskulisa Phospholipid-8Pro-M-ELISAs* der Firma Aesku.Diagnostics untersucht. Acht unterschiedliche Kavitäten einer Mikrotiterplatte sind in diesem Testsystem einzeln mit den entsprechenden Phospholipiden, β2GPI oder einem Komplex aus β2GPI und Cardiolipin beschichtet. Getestet wurden jeweils unverdünnte Zellkulturüberstände aus der „low density“-Kultur (in RPMI 10% FCS). Die Antikörperkonzentrationen der jeweiligen Überstände wurden vor dem Einsatz im *Aeskulisa Phospholipid-8Pro-M-ELISA* nicht gesondert ermittelt, und entsprechen etwa den für JGG9, HLC9 und HVA2 oben beschriebenen Werten (930 ng/ml für JGG9, 333 ng/ml für HVA2 und 1,31 µg/ml für HLC9).

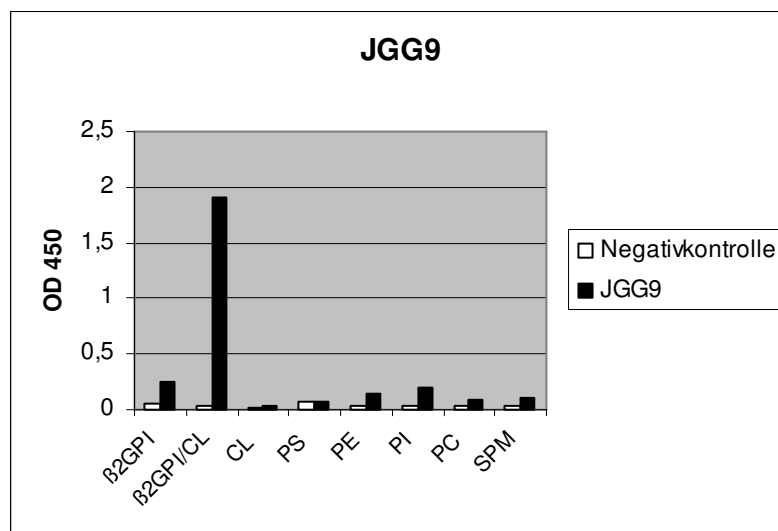


Abbildung 5-4: Bindungsprofil von JGG9

JGG9 bindet an den β 2GPI/Cardiolipin-Komplex und sehr schwach an β 2GPI alleine. Cardiolipin wird bei Fehlen des Proteinkofaktors nicht erkannt. Andere Phospholipide werden, zumindest bei Abwesenheit eines Proteinkofaktors, nicht gebunden.

JGG9 präsentiert sich daher als β 2GPI-abhängiger Cardiolipinantikörper (Abbildung 5-4).

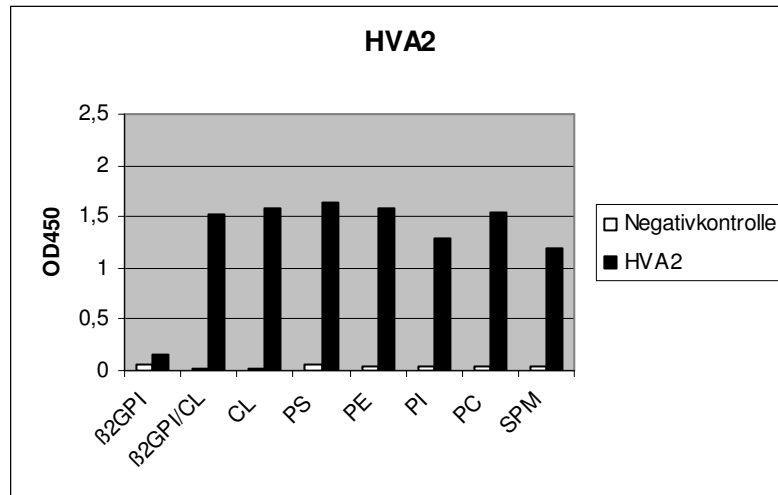


Abbildung 5-5: Bindungsprofil von HVA2

Das Bindungsprofil von HVA2 zeigt Bindung an alle getesteten Phospholipide und an den β 2GPI/Cardiolipin-Komplex. β 2GPI wird ohne Cardiolipin nicht gebunden. Für die Bindung an den β 2GPI/Cardiolipin-Komplex ist nicht eindeutig zu sagen, ob sie spezifisch für den Komplex ist, oder aber durch die Bindung des Antikörpers an Cardiolipin vermittelt wird. HVA2 zeigt ein typisches Bindungsprofil eines kofaktorunabhängigen, oder zumindest β 2GPI-unabhängigen, polyspezifischen APL (Abbildung 5-5).

Wie HVA2 weist auch HLC9 das Bindungsprofil eines kofaktorunabhängigen APL auf. Während β 2GPI alleine nicht gebunden wird, zeigt sich eine Affinität des Antikörpers zu allen untersuchten Phospholipiden und zum β 2GPI/Cardiolipin-Komplex. Bei letzterer Bindung ist wie bei HVA2 nicht eindeutig festzulegen, wodurch die Bindung vermittelt wird und ob die Bindung spezifisch für den Komplex und den damit gegebenen Konformationen der einzelnen Moleküle ist, oder ob es sich um eine von β 2GPI nicht beeinflusste Bindung an den Lipidanteil des Komplexes handelt (Abbildung 5-6).

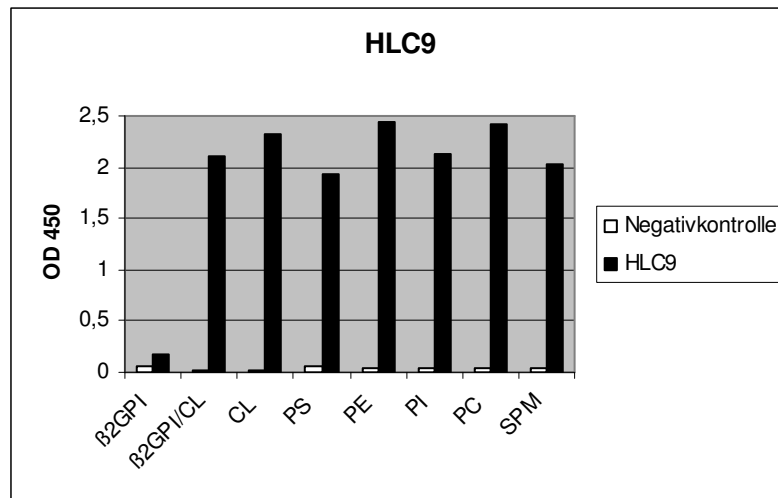


Abbildung 5-6: Bindungsprofil von HLC9

5.2.2 Identifizierung der schweren und leichten Kette von JGG9 mit Hilfe der Westernblot-Technologie

Um Informationen darüber zu erhalten, welche schweren und leichten Ketten bei JGG9 vorliegen, wurde der sezernierte Antikörper einer reduzierenden und denaturierenden SDS-Gelelektrophorese unterzogen und mittels Westernblot-Transfer-Technik auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Eine immunchemische Färbung unter Verwendung von μ -, γ -, κ - und λ -spezifischen Erstantikörpern und AP-konjugierten Zweitantikörpern schloss sich an. Die Substratreaktion erfolgte mit dem BCIP/NBT-Reagenz.

Die verwendeten Polyacrylamidgele enthielten 10 % Polyacrylamid.

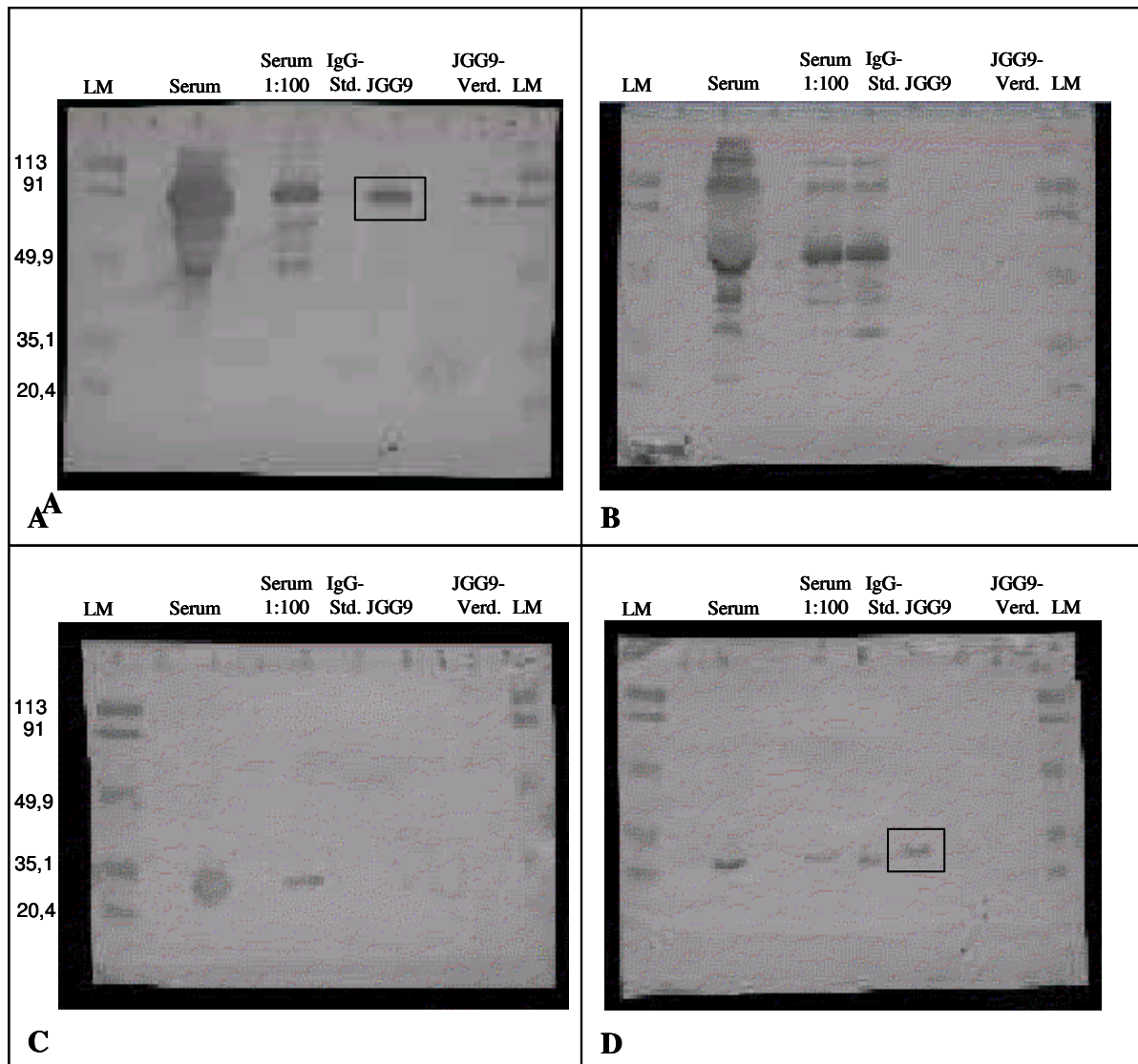


Abbildung 5-7: JGG9, Serum und IgG-Standard wurden nach SDS-PAGE auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Die Detektion erfolgte mit A) Ziege Anti-Human IgM, Fc_{5μ} Fragment spezifisch (1. Antikörper) und Anti-Ziege-AP (2. Antikörper), B) Ziege Anti-Human IgG, Fc_γ Fragment spezifisch (1. Antikörper) und Anti-Ziege-AP (2. Antikörper), C) Maus Anti-λ-Kette (1. Antikörper) und Anti-Maus-AP (2. Antikörper) und D) Maus Anti-κ-Kette (1. Antikörper) und Anti-Maus-AP (2. Antikörper). A) und D) zeigen spezifische Banden für JGG9, d.h. JGG9 verfügt über eine μ-Kette als schwere Kette und eine κ-Kette als leichte Kette.

Als Positivkontrolle diente humanes Serum, das sowohl IgM als auch IgG enthält, beides in Kombination mit κ- und λ-Ketten. Verwendet wurde Serum mit einer bekannten IgM-Konzentration (414 μg/ml). Vom unverdünnten Serum wurden 0,5 μl auf das Gel aufgetragen, also 200 ng IgM. Von der 1:100-Verdünnung des Serums wurde 10 μl pro Spur auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Dies entspricht einer IgM-Menge von 41,4 ng, also etwa ein Fünftel der IgM-Menge, die als unverdünntes Serum aufgetragen wurde. Die genaue IgG-Konzentration des verwendeten Serums war nicht bekannt, lag aber im Normbereich für humanes Serum. Die durchschnittliche IgG-Konzentration in humanem Serum beträgt 10

mg/ml, d.h. es wurden 5 µg respektive 1 µg IgG auf die entsprechenden Spuren aufgetragen. Detektion mit allen verwendeten Erstantikörpern sollte zu positiven Signalen im Westernblot führen.

Als weitere Kontrolle diente ein IgG-Standard (IgG Reagent Grade) mit bekannter IgG-Konzentration von 1 µg/µl. Hiervon wurde pro Spur 1 µl, also 1 µg verwendet. Der IgG-Standard enthält angereichertes IgG mit einer κ-Leichtkette. Durch den Einsatz des Fc_γ-spezifischen und des κ-spezifischen Erstantikörpers sollten Banden in Höhe der schweren Kette (für γ) und der leichten Kette (für κ) sichtbar werden. Verwendung des µ-Kettenspezifischen Antikörpers bzw. des λ-Ketten-spezifischen Antikörpers sollte keine Reaktion in den entsprechenden IgG-Standard enthaltenen Spuren zur Folge haben.

JGG9 wurde als Konzentrat aus serumfreien Zellkulturüberstand und als nicht konzentrierter serumfreier Zellkulturüberstand in der SDS-PAGE und dem darauf folgenden Westernblot eingesetzt. Das Konzentrat wurde mit Hilfe von Vivaspin 4-Konzentratoren erzeugt und weist eine IgM-Konzentration von 160 ng/µl auf. Pro Spur im Polyacrylamidgel wurden 320 ng JGG9 aufgetragen. Die IgM-Konzentration des nicht konzentrierten Zellkulturüberstandes lag bei 2 µg/ml. Pro Spur wurden 20 ng JGG9 in Form von nicht konzentriertem Zellkulturüberstand eingesetzt.

Humanes Serum (Kontrolle):

Einsatz von allen Detektionsantikörpern führte zu entsprechenden Banden im Westernblot. Die schwere µ-Kette zeigt sich durch Nachweis mit dem Ziege Anti-Human IgM, Fc_{5µ}-Antikörper mit einem Molekulargewicht von etwa 90 kDa. Das IgM-Pentamer weist ein Molekulargewicht von 970 kDa auf, wobei es aus 5 IgM-Monomeren und einer 15 kDa-J-Kette zusammengesetzt ist. Ein IgM-Monomer hat also ein Molekulargewicht von 191 kDa. Je 25 kDa davon beziehen sich auf die leichten Ketten, so dass jede µ-Kette rechnerisch ein Molekulargewicht von 70,5 kDa aufweist. Die unterschiedliche Größe von µ- und γ-Ketten ist auf eine C-terminale Extension von 18 Aminosäuren in der konstanten Region der µ-Ketten zurückzuführen. Während γ-Ketten jeweils nur ein N-glykosyliertes Kohlenhydrat tragen, ist die höhere Glykosylierung der µ-Ketten (5 Glykosylierungen pro Kette) für das Laufverhalten der µ-Kette in der SDS-PAGE verantwortlich, das die schwere Kette des IgM-Moleküls ungefähr auf der Höhe des 91 kDa-Marker-Proteins zeigt (Abbildung 5-7 C).

Die γ-Kette konnte mit Hilfe des Ziege Anti-Human IgG, Fc_γ-Fragment-spezifischen Antikörpers nachgewiesen werden (Abbildung 5-7 B). Die detektierten Banden laufen knapp oberhalb des 49,9 kDa-Markers in der erwarteten Höhe.

Beide leichten Ketten (κ und λ) konnten in dem verwendeten Serum mit Hilfe der entsprechenden Erstantikörper nachgewiesen werden (Abbildung 5-7 C und D). Die Position der Banden zwischen der 20,4 kDa- und der 35,1 kDa-Markierung entspricht dem erwarteten Molekulargewicht von 25 kDa für leichte Ketten.

In humanem Serum als Positivkontrolle konnte die Funktionalität der Erst- und Zweitantikörper durch spezifische Detektion der μ -, γ -, κ - und λ -Ketten nachgewiesen werden.

IgG-Standard:

Durch den Fc_{γ} -spezifischen Detektionsantikörper und den Maus Anti- κ -Antikörper konnten schwere und leichte Ketten des IgG-Standards im Westernblot nachgewiesen werden. γ - und κ -Kette wurden in der erwarteten Höhe von 50 kDa (Abbildung 5-7 B) bzw. 25 kDa (Abbildung 5-7 D) detektiert. Der Einsatz von $Fc_{5\mu}$ -spezifischen und λ -spezifischen Erstantikörpern führte zu keinem Signal, was die Spezifität dieser Antikörper für ihr Antigen unterstreicht (Abbildung 5-7 A und C).

JGG9:

Sowohl in der konzentrierten JGG9-Fraktion als auch in dem JGG9-haltigem Zellkulturüberstand konnte mit Hilfe des $Fc_{5\mu}$ -spezifischen Detektionsantikörpers ein deutliches Signal bei 90 kDa dargestellt werden (Abbildung 5-7 A). Die Zugehörigkeit von JGG9 zu den Antikörpern der IgM-Klasse, die auf Ebene der mRNA bzw. der daraus resultierenden cDNA durch OneStep-RT-PCR und Sequenzierung ermittelt wurde, konnte durch Westernblotting und den immunchemischen Nachweis des exprimierten Proteins bestätigt werden. Kein γ -spezifisches Signal wurde ermittelt (Abbildung 5-7 B).

Das Gleiche gilt für die leichte Kette, die wie in den molekularbiologischen Analysen als κ -Kette charakterisiert wurde: Während ein Nachweis einer λ -Kette in der JGG9-Fraktion nicht möglich war (Abbildung 5-7 C), konnte die leichte Kette mit Hilfe des κ -spezifischen Erstantikörpers zumindest im JGG9-Konzentrat dargestellt werden (Abbildung 5-7 D). Es zeigt sich deutlich, dass die leichten Ketten bei Nachweis sowohl durch den κ - als auch durch den λ -spezifischen Antikörper im Vergleich zu den schweren Ketten zu schwächeren Signalen führen. Dies kann zum einen in einer geringeren Signalverstärkung durch die Kombination der gewählten Erst- und Zweitantikörper begründet sein. Zum anderen weisen kleinere Proteine im elektrischen Feld eine schnellere Laufgeschwindigkeit aus dem Gel auf

die Nitrocellulosemembran auf. Ein Teil der Leichtketten kann so schon durch die Membran hindurch gewandert sein, wenn die größeren schweren Ketten die Nitrocellulose erreichen, so dass im Verhältnis eine geringere Menge von leichten Ketten tatsächlich auf die Membran transferiert wird. Beides kann eine Ursache für eine fehlende κ -Bande in der JGG9-Verdünnung sein (Abbildung 5-7 D).

Die Ergebnisse des Westernblots unterstützen die im Rahmen der molekularbiologischen Analyse von JGG9 erhobenen Daten zur Zusammensetzung der schweren und leichten Kette, d.h. die OneStep-RT-PCR als Mittel zur Identifizierung der schweren und leichten Ketten ist valide. Bei HVA2 und HLC9 wurden schwere und leichte Ketten ausschließlich über die OneStep-RT-PCR identifiziert.

5.2.3 Charakterisierung der V-Region-Gen-Familien von Antiphospholipid-Immunglobulinen

Immunglobulin-V-Regionen werden während der B-Zell-Entwicklung durch somatische Rekombination aus V_H -, D_H - und J_H -Segmenten (bei schweren Ketten) bzw. V_{κ} - und J_{κ} - oder V_{λ} - und J_{λ} -Segmenten (bei leichten Ketten) zusammengesetzt. Die humanen V-Gen-Segmente werden auf der Basis von Sequenzhomologien der DNA in unterschiedliche Genfamilien und Clans eingeteilt. Man kann feststellen, dass die V-Segmente bestimmter Genfamilien besonders häufig verwendet werden. Unterschiedliche Untersuchungen befassen sich vergleichend mit dieser Bevorzugung vor verschiedenen pathologischen und auch nicht pathologischen Hintergründen (Brezinschek et al., 1997; de Wildt et al., 2000).

5.2.3.1 Etablierung einer Methode zur Charakterisierung der V-Gen-Familien von Antiphospholipidimmunglobulinen

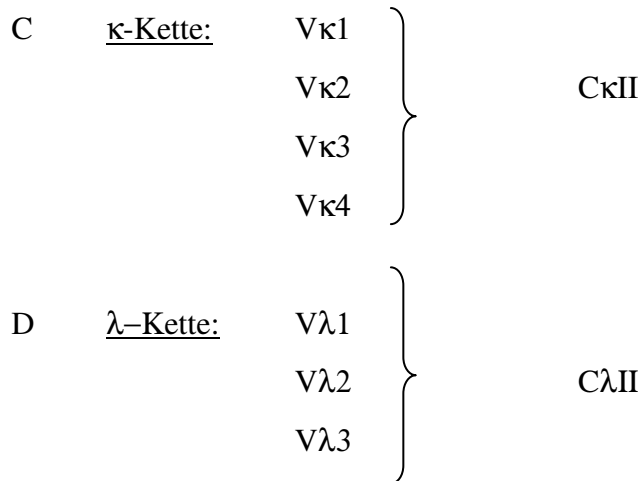
Die rearrangierten Immunglobulingene der APL JGG9, HVA2 und HLC9 wurden hinsichtlich der Familienzugehörigkeit ihrer V-Segmente untersucht. Hierfür wurden sie unterschiedlichen PCR-Reaktionen mit familienspezifischen Primern (Wang und Stollar, 2000) unterzogen. Die Identifizierung der verwendeten Genfamilien diente zunächst zum Auswählen der korrekten Primer für die anschließende Sequenzierung der kompletten Immunglobulin-V-Regionen. Für weitere Analysen bezüglich der in APL präferierten V-Segmente ist die Kenntnis der Familienzugehörigkeit darüber hinaus hilfreich.

Es wurde eine Methode in Anlehnung an ein Protokoll zur Einzelzell-RT-PCR zur Analyse von Immunglobulin-V-Regionen (Wang und Stollar, 2000) entwickelt. Nach Wang und Stollar wurden einzelne B-Zellen in einem Reaktionsansatz durch Zugabe eines Detergenzes lysiert und damit die enthaltene mRNA zugänglich gemacht. Diese wurde zunächst mit spezifischen, in der konstanten Region (C-Region) der Immunglobuline bindenden Primern in cDNA transkribiert. Hierzu wurden pro Ansatz vier Primer eingesetzt: C μ I, C γ I, C κ I und C λ I. Bei der von Wang und Stollar durchgeführten Einzelzell-PCR, die sich auf die Analyse von IgM und IgG beschränkte, konnte so aus einer isolierten, einzelnen B-Zelle die schwere und leichte Kette revers transkribiert werden, ohne dass vorher die verwendeten Ketten (μ oder γ , λ oder κ) bekannt sind.

Die Methode wurde zunächst mit Ausnahme einer höheren Zellzahl (100 – 1000 Zellen pro Ansatz) unverändert übernommen. Anschließend an die Reverse Transkription wurde eine erste PCR mit in der C-Region bindenden *backward*-Primern in (C μ II, C γ II, C κ II und C λ II), die verglichen mit den CI-Primern weiter in 5'-Richtung binden, angeschlossen. Als *forward*-Primer fungierten Gemische familienspezifischer Primer, die in der Signalregion 5' des V-Segmentes binden. Nach Reverser Transkription wurde das Reaktionsgemisch hierfür in vier Ansätze geteilt und mit den entsprechenden Primern für jeweils die μ , γ , κ oder λ -Kette und den notwendigen Reagenzien und Enzymen versetzt:

A	<u>γ-Kette:</u>	VHL1	}	C μ II
		VHL2		
		VHL3		
		VHL4		
		VHL5		
		VHL6		
B	<u>μ-Kette:</u>	VHL1	}	C γ II
		VHL2		
		VHL3		
		VHL4		
		VHL5		
		VHL6		

ERGEBNISSE



Durch Agarose-Gelelektrophorese wurde überprüft, welche Primerkombinationen zur Amplifikation eines DNA-Fragmentes mit der erwarteten Größe (400-500 Basenpaare) führten. Wenn es sich bei der eingesetzten Zellpopulation wie erwartet um eine monoklonale IgM- oder IgG-produzierende Zelllinie handelt, sollten zwei der vier PCR-Reaktionen zu einem Ergebnis führen: Es sollte entweder eine μ - oder eine γ -Kette und eine κ - oder eine λ -Kette amplifiziert werden. Auf diese Weise konnte die leichte Kette von JGG9 eindeutig als κ -Kette identifiziert werden (Abbildung 5-8).

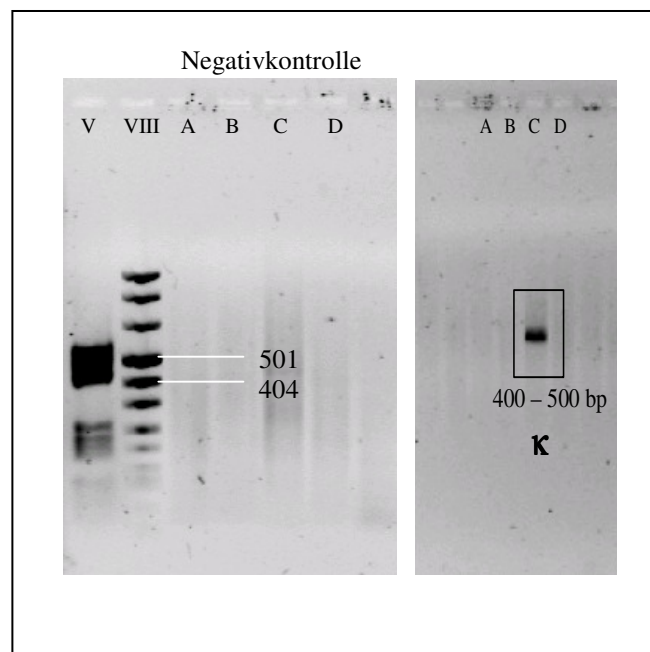


Abbildung 5-8: Agarose-Gelelektrophorese mit Proben aus der ersten PCR (JGG9). In der Negativkontrolle wurde in der Reversen Transkription die Reverse Transkriptase weggelassen, um zu kontrollieren, ob das Signal tatsächlich auf cDNA zurückzuführen ist und nicht auf Kontamination mit genomischer DNA. A, B, C und D spiegeln die oben angegebenen Primerkombinationen wider. Es konnte eine κ -Kette identifiziert werden.

Die schwere Kette konnte auch nach mehreren Versuchen mit der beschriebenen Methode nicht amplifiziert werden. Da die Durchführung von Reverser Transkription und erstem PCR-Schritt in zwei getrennten Reaktionsschritten anfällig für Kontaminationen ist und die schwere Kette von JGG9 nicht nachgewiesen werden konnte, wurden die Reverse Transkription und die erste PCR in weiteren Experimenten mittels des QIAGEN OneStep-RT-PCR-Kits in einem Reaktionsansatz, aber zeitlich voneinander getrennt, durchgeführt. Die zeitliche Trennung von Reverser Transkription und erster PCR lässt sich auf die Verwendung dreier Enzyme zurückführen, die in unterschiedlichen Temperaturbereichen aktiviert und deaktiviert werden. Durch Wahl entsprechender Reaktionstemperaturen sind zunächst die Reverse Transkriptase und anschließend die beiden DNA-Polymerasen aktiv (siehe Methodenteil). Bei der OneStep-RT-PCR wurden für die Reverse Transkription die CII-Primer (C μ II, C γ II, C κ II und C λ II) verwendet, die gleichermaßen für die im gleichen Reaktionsansatz folgende PCR als *backward*-Primer dienten. Als *forward*-Primer wurden wie in der von Wang und Stollar beschriebenen Methode Gemische aus familienspezifischen Primern verwendet. Als Ausgangsmaterial für die OneStep-RT-PCR diente mit Hilfe des QIAGEN RNeasy-Mini-Kits isolierte Hybridomzell-RNA.

Pro Hybridomzelllinie wurden vier OneStep-Reaktionen ausgeführt, je eine für die μ -, γ -, κ - und die λ -Kette. Auf einem Agarose-Gel wurde überprüft, welche Primerkombinationen zur Amplifikation eines 400-500 Basenpaare großen DNA-Fragmentes führt. Bei einer monoklonalen Hybridomzelllinie sollte wie auch bei der Methode nach Wang und Stollar je ein Fragment für die schwere und leichte Kette vervielfältigt werden, was mit Hilfe der OneStep-RT-PCR, z.B. für JGG9, gelang (Abbildung 5-9). Die leichte Kette von JGG9 konnte als κ -Kette bestätigt und die schwere Kette als μ -Kette identifiziert werden.

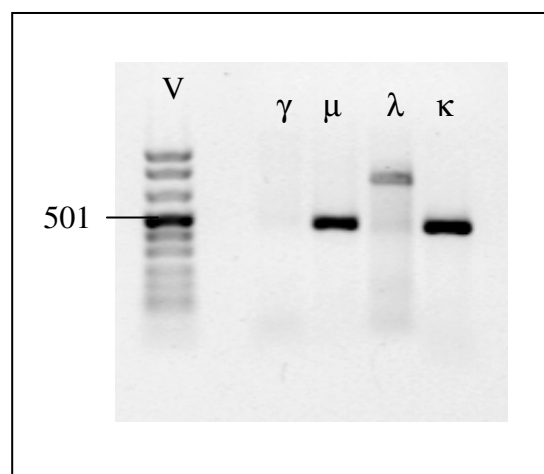


Abbildung 5-9: OneStep-RT-PCR von JGG9

Die PCR-Ansätze, die auf dem Agarose-Gel eine 400-500 Basenpaare große Bande erzeugten, wurden in einer auf die RT-PCR folgende familienspezifischen PCR eingesetzt. Die in der RT-PCR als Gemische verwendeten *forward*-Primer wurden in der familienspezifischen PCR einzeln mit dem entsprechenden *backward*-Primer kombiniert. Für die familienspezifische PCR mit der μ -Kette, die in der initialen RT-PCR unter Verwendung eines Gemisches aus sechs *forward*-Primern (VHL1-VHL6) und dem in der C-Region der μ -Kette bindenden $C_{\mu}II$ -Primer amplifiziert wurde, bedeutet dies die Durchführung von sechs familienspezifischen Einzelreaktionen mit jeweils einem der sechs Primer, die nun am 5'-Ende des im RT-PCR-Ansatzes vorhandenen V-Region-Fragmentes binden, und dem 3'-bindenden $C_{\mu}II$ -Primer.

Da der Reaktionsansatz aus der RT-PCR direkt ohne Reinigung des DNA-Fragmentes für diesen zweiten Reaktionsschritt eingesetzt wurde, zeigt die Agarose-Gelelektrophorese Banden in allen Reaktionsansätzen. Dies kann damit erklärt werden, dass DNA aus dem ursprünglichen RT-PCR-Ansatz im Gel visualisiert wird. Dieser Effekt kann durch überschüssige Primer aus den Primergemischen der RT-PCR, die stark verdünnt im PCR-Ansatz für die familienspezifische Reaktion vorhanden sein können und eine schwache spezifische Amplifikation in allen Reaktionsgefäßen hervorrufen, verstärkt werden. In dem Reaktionsansatz der familienspezifischen PCR, der die für die Genfamilie des vorhandenen V-Region-Fragmentes spezifischen Primer enthält, findet Amplifikation des DNA-Stückes in deutlich gesteigertem Maße statt, was zu einer offensichtlich kräftigeren Bande im Agarose-Gel führt (Abbildung 5-10).

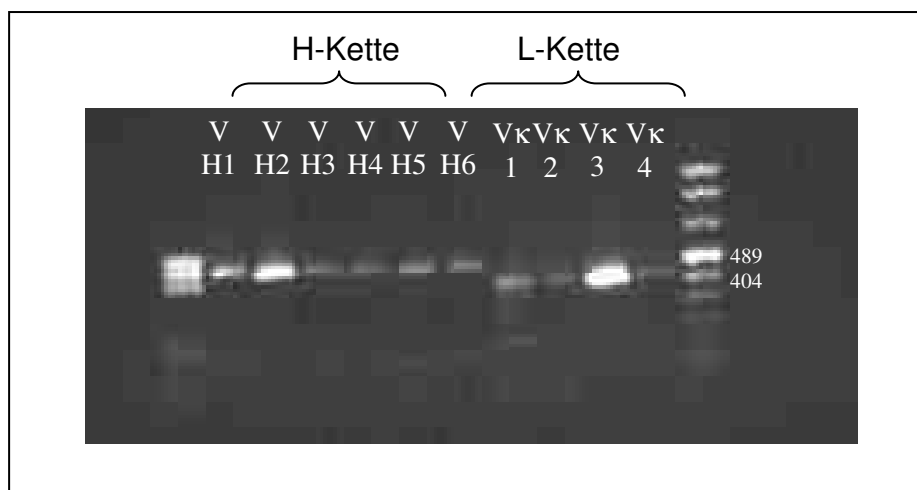


Abbildung 5-10: Familienspezifische PCR von HVA2. Die Amplifikation mit dem VH2- und dem V κ 3-Primer führt zu einem deutlich verstärkten Signal.

Durch die Kombination der OneStep-RT-PCR mit Gemischen aus familienspezifischen Primern und einem daran anschließenden zweiten PCR-Schritt mit einzelnen Primern kann auf die dem Immunglobulin zugrunde liegende Genfamilie des V-Segmentes geschlossen werden. Die nachfolgenden Sequenzierungen konnten mit den ermittelten Primern durchgeführt werden und bestätigten für die drei untersuchten Hybridomzelllinien JGG9, HLC9 und HVA2 die in der familienspezifischen PCR bestimmten Genfamilien. Durch die verwendete Methode konnte außerdem die Zusammensetzung der Antikörper hinsichtlich ihrer schweren und leichten Kette bestimmt werden.

5.2.3.2 Charakterisierung der V-Gen-Familien von JGG9, Sequenzierung der variablen Region und Sequenzvergleich mit V-Regionen in Keimbahnkonfiguration

5.2.3.2.1 Charakterisierung der V-Gen-Familien der schweren und leichten Kette von JGG9

Die variablen Regionen der leichten und schweren Kette von JGG9 wurden wie bereits beschrieben zunächst mit Hilfe einer RT-PCR-Methode in Anlehnung an Wang und Stollar amplifiziert. Erst später (nach erfolgloser Amplifikation der μ -Kette) wurde die OneStep-Methode angewandt. So konnten eine schwere Kette vom μ -Typ und eine leichte Kette vom κ -Typ identifiziert werden.

Eine familienspezifische PCR wurde für die variable Region der μ -Kette von JGG9 nicht durchgeführt. Stattdessen wurde für die nachfolgende Sequenzierung sieben Reaktionen mit unterschiedlichen Primern angesetzt. Bei den verwendeten Primern handelte es sich um die einzelnen familienspezifischen Primer VHL1, VHL2, VHL3, VHL4, VHL5 und VHL6 für die Sequenzierung in *forward*-Richtung und um den in der konstanten Region bindenden Primer C μ II für die *backward*-Sequenzierreaktion. Wie bei der familienspezifischen PCR sollte es bei der zur Sequenzierreaktion gehörenden Kettenabbruch-Reaktion nach dem Sanger-Prinzip nur in Anwesenheit des „richtigen“ familienspezifischen Primers zur Synthese des vorliegenden DNA-Stranges – und im Fall der Kettenabbruch-PCR zur Bildung unterschiedlich langer, fluoreszenzmarkierter DNA-Fragmente - kommen. Daraus folgt, dass von den sieben angesetzten Kettenabbruch-Reaktionen nur zwei zu entsprechenden DNA-Fragmenten und damit zu einem auswertbaren Signal in der anschließenden Kapillargelelektrophorese führen sollten, nämlich die unter Einsatz des C μ II-Primers und die

unter Verwendung des entsprechenden familienspezifischen V-Primers stattfindenden Reaktionen.

Ein auswertbares Ergebnis der Kapillargelelektrophorese zeigte sich bei der schweren Kette von JGG9 neben der *backward*-Sequenzierung mit dem C μ II-Primer ausschließlich bei der Sequenzierung mit VHL3 als Sequenzierprimer. Die Verwendung aller weiteren Primer führte nicht zur Generierung von DNA-Fragmenten; spezifische Signale in der Elektrophorese konnten nicht detektiert werden. Die Wiederholung der gesamten Prozedur (Reverse Transkription, PCR, Sequenzierung) bestätigte das Ergebnis.

Bei der schweren Kette von JGG9 handelt es sich also um eine Kette des μ -Types. Die variable Region verwendet ein V-Gen-Segment der VH3-Familie.

Die Analyse der in der variablen Region der L-Kette vorliegenden V-Gen-Familie erfolgte wie bei der schweren Kette durch Ansetzen mehrerer Sequenzierreaktionen mit unterschiedlichen familienspezifischen Primern und dem in der konstanten Region bindenden C κ II-Primer. Als familienspezifische Primer für die leichte Kette des κ -Types dienten die Primer V κ L-1 bis V κ L-4. Ein auswertbares Signal in der Kapillargelelektrophorese zeigte sich bei der leichten Kette von JGG9 neben der *backward*-Sequenzierung mit dem C κ II-Primer bei Verwendung von V κ L2 als Sequenzierprimer. Die variable Region der leichten Kette von JGG9 verwendet folglich ein V-Gen-Segment der V κ II-Familie. Eine Wiederholung der OneStep-RT-PCR und der Sequenzierreaktionen konnte dieses Ergebnis bestätigen.

5.2.3.2.2 Sequenzierung der schweren Kette von JGG9 und Sequenzvergleich mit V-Regionen in Keimbahnkonfiguration

Die Sequenzierung der schweren Kette von JGG9 wurde wie bereits beschrieben in *forward*- und *backward*-Richtung mit dem VHL3-Primer respektive dem C μ II-Primer durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden anhand ihrer Chromatogramme in der DNA Sequencher-Software überprüft. Ebenfalls mit Hilfe der DNA Sequencher-Software wurde ein Alignment der aus *forward*- und *backward*-Sequenzierung erhaltenen Sequenzen durchgeführt. *Forward*- und *backward*-Sequenzen der variablen Region der schweren Kette von JGG9 waren identisch. Ein Abgleich der vorliegenden V-Region-Sequenz mit homologen Variable-Regionen-Genen in Keimbahnkonfiguration erfolgte unter Verwendung der Datenbanken VBASE und Blast-Ig. Auf diese Weise konnte DP-53 als V-Segment mit der größten

Homologie zum V-Segment der schweren Kette von JGG9 identifiziert werden. Ein homologes D-Segment wurde weder durch VBASE- noch durch Blast-Ig-Suche gefunden. Das J-Segment mit der größten Homologie zur μ -Kette des JGG9-Antikörpers ist JH3. Ein Alignment der V-Gen-Segmente in Keimbahn-Konfiguration mit der vollständigen Sequenz der variablen Region der schweren JGG9-Kette mittels HUSAR (Anhang A) zeigte mehrere Nukleotid-Insertionen in der JGG9-Sequenz verglichen mit den Keimbahnsequenzen. Auf DNA-Ebene weist die variable Region der schweren Kette von JGG9 92,3 % Homologie zu den entsprechenden Keimbahnsegmenten auf. Da ein homologes D-Segment nicht gefunden wurde, ist nicht klar festzustellen, welche der zwischen dem V- und J-Segment inserierten Nukleotide ursprünglich von einem mutierten D-Segment stammen und welche auf Insertion von P- und N-Nukleotiden zurückgehen. Durch die Insertion von insgesamt 14 Nukleotiden an unterschiedlichen Stellen kommt es zu einer Verschiebung des Leserahmens, der jedoch weder zu einem Abbruch in der Aminosäuresequenz durch ein Stopp-Codon, noch zum Verlust von für variable Regionen typischen Signalmotiven - in diesem Fall von Signalen für den Beginn und das Ende der CDR3 Region – führt. Das einer CDR3-Region vorgeschaltete Motiv weist typischerweise die Aminosäuresequenz CXX auf, wobei das X für jede beliebige Aminosäure steht. Im Anschluss an die CDR3-Region folgt das Motiv WGXG. Obwohl die CDR3-typischen Motive trotz erheblicher Mutationen und Insertionen erhalten geblieben sind, lässt sich für JGG9 eine Verkürzung der FR3-Region feststellen, die üblicherweise über eine Länge von 33 Aminosäuren verfügt und bei JGG9 nur 31 Aminosäuren enthält. Während die anderen CDR- und FR-Regionen durch Vergleich mit den Keimbahnsequenzen in VBASE identifiziert wurden, war dies für die CDR3-Region bei der schweren Kette von JGG9 nicht möglich, da über VBASE kein homologes J-Segment gefunden wurde und somit kein vollständiges Alignment der variablen Region mit der Keimbahnregion möglich war. Ein homologes J-Segment wurde schließlich über Blast-Ig identifiziert und ein komplettes Alignment konnte in HUSAR durchgeführt werden. Auf Basis der Kabat-Definitionen wurde die CDR3-Region ermittelt (<http://www.rubic.rdg.ac.uk/abeng/cdrs.html>).

Durch die Leseraster-Verschiebung weist JGG9 in der variablen Region seiner schweren Kette nur 70 % Homologie auf Proteinebene zu dem korrespondierenden V- respektive J-Segment auf (Anhang B). Es fällt auf, dass sich die meisten Aminosäureaustausche auf die FR-Regionen beziehen und nur sieben von 32 Austauschen in den CDR-Regionen gefunden werden.

5.2.3.2.3 Sequenzierung der leichten Kette von JGG9 und Sequenzvergleich mit V-Regionen in Keimbahnkonfiguration

Die Sequenzierung der leichten Kette von JGG9 wurde wie bereits beschrieben in *forward*- und *backward*-Richtung durchgeführt. Für die *forward*-Sequenzierung diente VκL-2 als Sequenzierprimer. Für die Sequenzierung in *backward*-Richtung wurde CκII als Primer eingesetzt. Die erhaltenen Sequenzen wurden anhand ihrer Chromatogramme in der DNA Sequencher-Software überprüft und verglichen. *Forward*- und *backward*-Sequenzen der variablen Region der leichten Kette von JGG9 stimmten überein. Ein Abgleich der vorliegenden V-Region-Sequenz mit homologen Variable-Regionen-Genen in Keimbahnkonfiguration erfolgte unter Verwendung der Datenbank VBASE. Das V-Segment der leichten Kette von JGG9 zeigt die größte Homologie zum Keimbahn-Gen DPK13 (Anhang C). Das J-Segment ist mit dem JκII-Segment des Jκ-Locus in Keimbahnkonfiguration nahezu identisch. Verglichen mit den Keimbahnsequenzen der einzelnen Segmente der variablen Region zeigt JGG9 vier Mutationen auf DNA-Ebene: Es finden sich zwei stille Mutationen in *framework*-Regionen und zwei Mutationen in der CDR3-Region, die sich gemeinsam in einem Aminosäureaustausch von Y nach W auswirken. Es konnten keine Insertionen von P- oder N-Nukleotiden an der Verbindung von V- und J-Segment detektiert werden. Die leichte Kette ist folglich in ihrer variablen Region auf DNA-Ebene zu 98,8 % und auf Proteinebene zu 99 % homolog zu Keimbahn-Gen-Segmenten.

5.2.3.3 Charakterisierung der V-Gen-Familien von HLC9, Sequenzierung der variablen Region und Sequenzvergleich mit V-Regionen in Keimbahnkonfiguration

5.2.3.3.1 Charakterisierung der V-Gen-Familien der schweren und leichten Kette von HLC9

Die variablen Regionen der leichten und schweren Kette von HLC9 wurden mit Hilfe der OneStep-RT-PCR amplifiziert. Hierzu wurden wie bereits beschrieben vier Ansätze mit Gemischen aus familienspezifischen V-Primern für jeweils die μ-, γ-, κ- und λ-Kette und den zugehörigen C-Primern durchgeführt. Die OneStep-RT-PCR von HLC9-mRNA führte zu einer Amplifikation von variablen Regionen einer μ-Kette und einer κ-Kette, wie sich durch Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Proben visualisieren ließ (Abbildung 5-11).

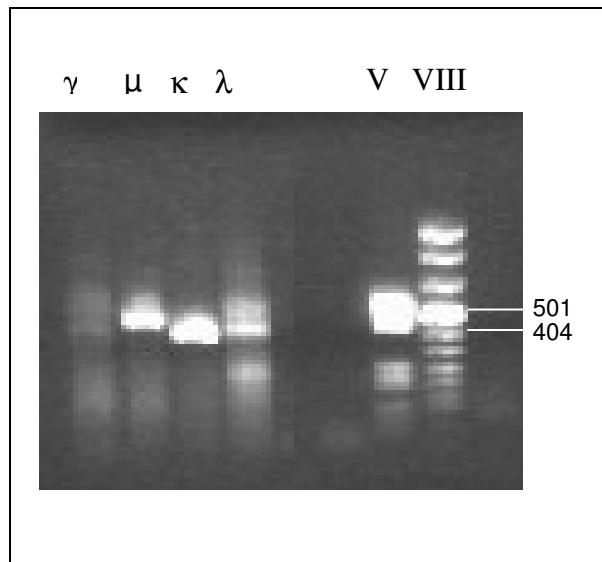


Abbildung 5-11: OneStep-RT-PCR von HLC9. Vier Ansätze zur Amplifikation der variablen Region der schweren und leichten Kette mit VHL1-6/C γ II, VHL1-6/C μ II, V κ L1-4/C κ II und V λ L1-3/C λ II. Die erfolgreiche Amplifikation im μ - und κ -Ansatz zeigt, dass HLC9 aus einer μ - und einer κ -Kette zusammengesetzt ist.

Die familienspezifische PCR, die mit den aus der OneStep-RT-PCR resultierenden DNA-Fragmenten unter Verwendung der einzelnen familienspezifischen Primer durchgeführt wurde, zeigte, dass HLC9 für die variable Region der schweren Kette ein V-Gen-Segment der VH3-Familie verwendet, während die leichte Kette eine Familienzugehörigkeit zur V κ III-Familie aufweist. Wie in der Agarose-Gelelektrophorese dargestellt werden konnte, führt die Verwendung des VH3-Primers bzw. des V κ 3-Primers zur weiteren Amplifikation der variablen Regionen von HLC9 (Abbildung 5-12).

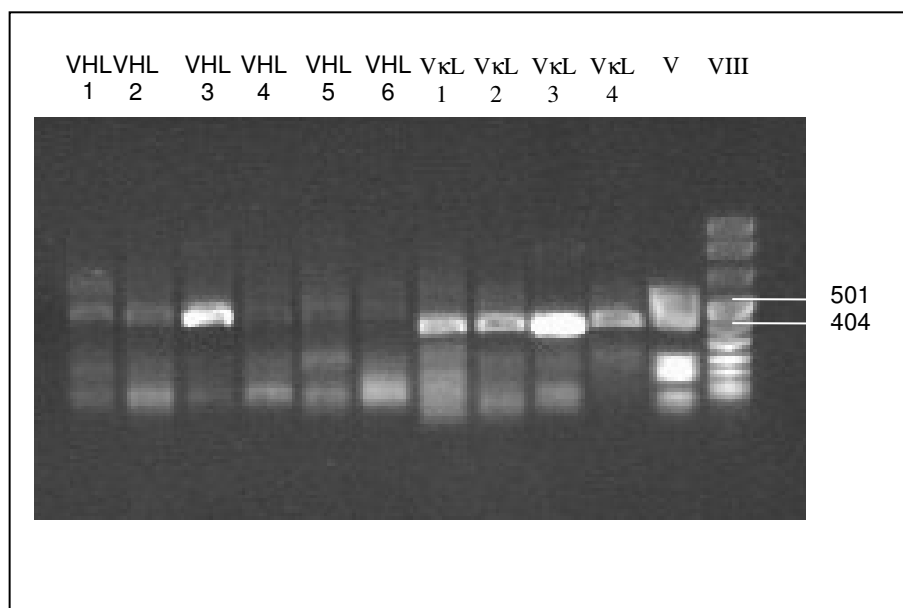


Abbildung 5-12: Familienspezifische PCR von HLC9. Amplifikation der variablen Regionen findet bei Einsatz des VHL3- bzw. V κ L3-Primers statt. Die variable Region der schweren Kette von HLC9 zeigt damit die Zugehörigkeit zur VH3-Genfamilie, die der leichten Kette zur V κ III-Familie.

5.2.3.3.2 Sequenzierung der schweren Kette von HLC9 und Sequenzvergleich mit V-Regionen in Keimbahnkonfiguration

Die variable Region der schweren Kette von HLC9 wurde in *forward*- und *backward*-Richtung sequenziert. Als Sequenzierprimer für die *forward*-Sequenzierung fungierte VHL3, die Sequenzierung in *backward*-Richtung erfolgte mit dem C μ II-Primer. Die erhaltenen Sequenzen wurden anhand ihrer Chromatogramme in der DNA Sequencher-Software überprüft und verglichen. *Forward*- und *backward*-Sequenzen der variablen Region der schweren Kette von HLC9 stimmten überein. Ein Abgleich der vorliegenden V-Region-Sequenz mit dem V-Region-Locus in Keimbahnkonfiguration erfolgte unter Verwendung der Datenbanken VBASE und Blast-Ig. HLC9 zeigt in seiner variablen Region die größte Homologie zu DP-49 (Keimbahn-V-Segment), D6-13 (Keimbahn-D-Segment) und JH4b (Keimbahn-J-Segment) (Anhang D). Während das homologe V- und J-Segment über VBASE-Suche identifiziert werden konnte, war dies für das D-Segment nicht möglich. D6-13 wurde in Blast-Ig als das D-Segment mit der größten Homologie zu HLC9 gefunden. Ein Alignment der einzelnen Segmente mit der HLC9-Sequenz wurde in HUSAR durchgeführt. Auf DNA-Ebene liegt eine Homologie von 95,6 % zwischen HLC9- und Keimbahnsequenz vor. In der DNA-Sequenz von HLC9 finden sich 16 Mutationen. Die Basenaustausche münden in 12 Aminosäureaustauschen, so dass sich auf Proteinebene eine Homologie von 90,7 % zeigt. Drei von 12 aller Aminosäureaustauschen finden sich in CDR-Regionen. Sowohl zwischen dem V- und dem D-Segment als auch zwischen dem D- und dem J-Segment sind Insertionen von Nukleotiden zu beobachten, die in beiden Fällen zur Insertion von Aminosäuren führen. Die in der familienspezifischen PCR ermittelte Zugehörigkeit zur VH3-Familie konnte durch die Sequenzanalyse der variablen Region der schweren Kette von HLC9 bestätigt werden.

5.2.3.3.3 Sequenzierung der leichten Kette von HLC9 und Sequenzvergleich mit V-Regionen in Keimbahnkonfiguration

Die variable Region der leichten Kette von HLC9 wurde in *forward*- und *backward*-Richtung sequenziert. Für die Sequenzierung in *forward*-Richtung wurde der in der familienspezifischen PCR detektierte V κ 3-Primer eingesetzt, für die *backward*-Sequenzierung der C κ II-Primer. Die erhaltenen Sequenzen wurden anhand ihrer Chromatogramme in der DNA Sequencher-Software überprüft und verglichen. *Forward*- und

backward-Sequenzen der variablen Region der leichten Kette von HLC9 stimmten überein. In VBASE fand ein Abgleich der HLC9-L-Ketten-Sequenz mit V-Region-Gen-Segmenten in Keimbahnkonfiguration statt. Das Alignment findet sich in Anhang E. Ein hoher Übereinstimmungsgrad mit dem DPK21-Keimbahn-V-Segment und dem J κ 2-Segment in Keimbahnkonfiguration wurde festgestellt. Als Konsequenz von sieben Mutationen auf DNA-Ebene zeigen sich fünf Mutationen in der Aminosäuresequenz des Antikörpers. Die Homologie auf DNA-Ebene beträgt 97,9 %, auf Proteinebene hingegen nur 95,4 %. Nur zwei von fünf der Aminosäureaustausche sind in CDR-Regionen lokalisiert, nämlich ein Austausch (Q \rightarrow R) in der CDR1-Region und ein Austausch (N \rightarrow K) in der CDR3-Region. An der Verbindungsstelle des V- und des J-Segmentes findet sich mit vier eingefügten Nukleotiden ein vergleichsweise geringes Vorkommen von Insertionen, die auf P- oder N-Nukleotide zurückgehen können.

Durch die Sequenzierung der V-Region der L-Kette von HLC9 konnte die Familienzugehörigkeit zur V κ III-Familie bestätigt werden.

5.2.3.4 Charakterisierung der V-Gen-Familien von HVA2, Sequenzierung der variablen Region und Sequenzvergleich mit V-Regionen in Keimbahnkonfiguration

5.2.3.4.1 Charakterisierung der V-Gen-Familien der schweren und leichten Kette von HVA2

Die variablen Regionen der schweren und leichten Kette von HVA2 wurden mittels der OneStep-RT-PCR amplifiziert. Die erfolgreiche Amplifikation einer μ - und einer κ -Kette konnte durch Visualisierung entsprechender Banden in der Agarose-Gelelektrophorese gezeigt werden (

Abbildung 5-13). Die familienspezifische PCR demonstriert, dass HVA2 für die variable Region der schweren Kette ein V-Gen-Segment der VH2-Familie verwendet, während die leichte Kette eine Familienzugehörigkeit zur V κ III-Familie aufweist. Die Agarose-Gelelektrophorese der Proben zeigt stärkere Banden für die PCR-Reaktionen, die mit dem VHL2-Primer bzw. dem V κ L3-Primer als V-Primer durchgeführt wurden (Abbildung 5-14).

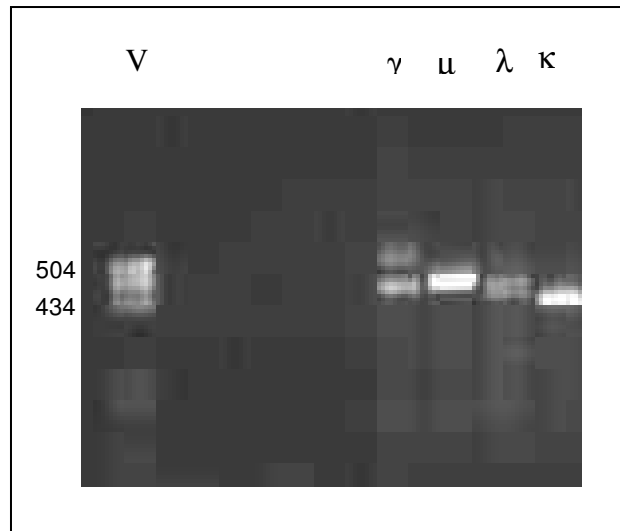


Abbildung 5-13: OneStep-RT-PCR von HVA2. Vier Ansätze zur Amplifikation der variablen Region der schweren und leichten Kette mit VHL1-6/C γ II, VHL1-6/C μ II, V λ L1-3/C λ II und V κ L1-4/C κ II. Die erfolgreiche Amplifikation im μ - und κ -Ansatz zeigt, dass HVA2 aus einer μ - und einer κ -Kette besteht.

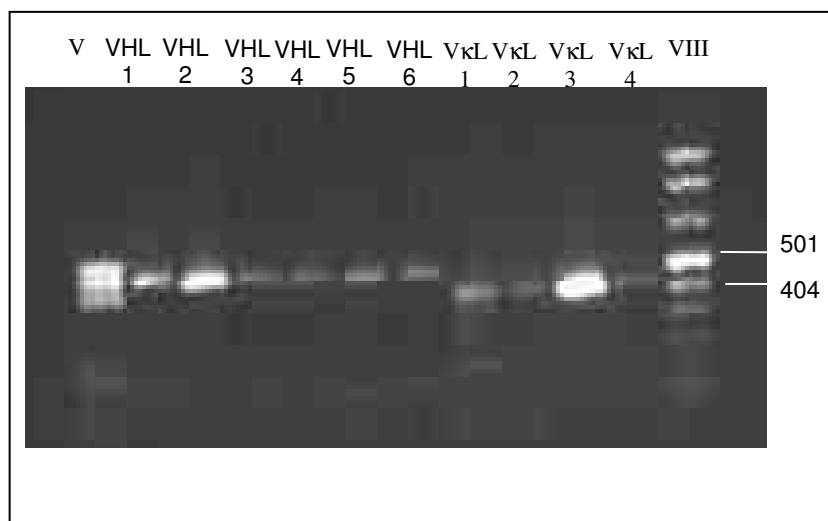


Abbildung 5-14: Familienspezifische PCR von HVA2. Weitere Amplifikation der variablen Regionen findet bei Einsatz des VHL2- bzw. V κ L3-Primers statt. Die variable Region der schweren Kette von HVA2 zeigt damit die Zugehörigkeit zur VH2-Genfamilie, die leichte Kette zur V κ III-Familie.

5.2.3.4.2 Sequenzierung der schweren Kette von HVA2 und Sequenzvergleich mit V-Regionen in Keimbahnkonfiguration

Die Sequenzierung der variablen Region der schweren Kette von HVA2 wurde mit dem VHL2-Primer in *forward*-Richtung und dem C μ II-Primer in *backward*-Richtung durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden anhand der zugehörigen Chromatogramme

mittels der DNA-Sequencher Software überprüft. Die beiden Sequenzen wurden miteinander verglichen und stimmten überein. Homologe V-, D- und J-Segmente konnten in der VBASE-Datenbank identifiziert werden, wobei das VII-5-Gen als V-Segment und JH5 als J-Segment mit der größtmöglichen Homologie ausgewiesen wurden. Weniger eindeutig war das Ergebnis für das D-Segment, dennoch konnte D3-3 als D-Segment-Gen mit der höchsten Ähnlichkeit zu HVA2 identifiziert werden. Ein Alignment der HVA2-Sequenz mit den entsprechenden Keimbahnsequenzen ist in Anhang F dargestellt. Auf DNA-Ebene finden sich 13 Mutationen, von denen einige in direkt aufeinander folgenden Basen auftreten. Somit liegen in manchen Fällen mehrere Basenaustausche in einem Triplet und führen in der Konsequenz gemeinsam zu einem Aminosäureaustausch. Insgesamt lassen sich auf Proteinebene sieben Mutationen beobachten, die hauptsächlich in der CDR3-Region lokalisiert sind. Die Homologie zu den Variable-Region-Segmenten in Keimbahnkonfiguration beträgt 96,7 % auf Ebene der Nukleotidsequenz und 94,6 % auf Protein-Level. Sechs von sieben der Aminosäureaustausche liegen in CDR-Regionen, fünf davon in der CDR3-Region. Von den Austauschen sind unterschiedliche Aminosäuren betroffen: In der CDR2 Region findet sich ein N → D-Austausch, in der FR3-Region ein M → L-Austausch. Fünf Mutationen befinden sich in der CDR3-Region: V → G, L → T, L → K, Y → G und P → A.

5.2.3.4.3 Sequenzierung der leichten Kette von HVA2 und Sequenzvergleich mit V-Regionen in Keimbahnkonfiguration

Unter Verwendung des VκL2-Primers und des CκII-Primers wurde die variable Region der leichten Kette von HVA2 in *forward*- und *backward*-Richtung sequenziert. Der Vergleich der beiden erhaltenen Sequenzen im DNA-Sequencher zeigte, dass die Sequenzierung in beide Richtungen identische Ergebnisse erbrachte. Bei einem Abgleich der HVA2-Sequenz für die variable Region der leichten Kette mit der Datenbank VBASE wurde DPK22 als zugrunde liegendes V-Segment und Jκ4 als verwendetes J-Segment identifiziert. Während das V-Segment in Keimbahnkonfiguration vorliegt, findet sich im Bereich des J-Segmentes ein Basenaustausch von T nach A, der jedoch auf die kodierte Aminosäure (R) keine Auswirkung zeigt, also konservativ ist. Es sind keine Insertionen an der Verbindung des V-Segmentes mit dem J-Segment vorhanden. Eine leichte Überlappung des V- und J-Segmentes weist eher auf die Deletion von mindestens einem Nukleotid hin (Anhang G).

Auf Ebene der Nukleotidsequenz zeigt sich eine Homologie von 99,7 % zwischen kodierter HVA2-Leichtketten-Sequenz und den Sequenzen der entsprechenden Gensegmente für die

variable Region. Auf Proteinebene liegt die variable Region der leichten Kette von HVA2 zu 100% in Keimbahnkonfiguration vor.

5.2.3.5 Untersuchungen der Verteilung der Mutationen in den V-Regionen der APL zur Identifizierung zugrunde liegender antigengesteuerter Prozesse

Die Aufklärung der Sequenz der Antikörper und der Vergleich mit der zugehörigen Keimbahnsequenz ermöglichen neben einer Aussage zur Häufigkeit von Mutationen auch eine Analyse der Lokalisation der somatischen Mutationen. Die somatischen Mutationen können zufälliger Natur sein, oder Ausdruck der Antigen-Reifung. Mutationen häufen sich dann in den CDR-Regionen. Durch statistische Analysen kann hierbei festgestellt werden, ob die beobachtete Anzahl der R-Mutationen (*Replacement*-Mutationen) in den CDR-Regionen (R_{CDR}) den Erwartungswert für zufällige R-Mutationen übersteigt bzw. sich von ihm unterscheidet (dann würde man von einem nicht zufälligen, antigengesteuerten Prozess ausgehen) und ob dies signifikant ist.

Hier stehen drei Methoden zur Verfügung (Shlomchik et al., 1987; Chang und Casali, 1994; Lossos et al., 2000). Shlomchik *et al.* und Chang und Casali legen ein binomiales Verteilungsmodell zugrunde, um zu ermitteln, ob eine gegebene Anzahl von R_{CDR} (k) signifikant höher ist als der Erwartungswert (p), bzw. eigentlich, wie hoch die Wahrscheinlichkeit $P(k)$ ist, dass eine höhere (oder niedrigere) Anzahl an R-Mutationen zufällig zustande gekommen ist.

$$P(X = k) = \binom{n}{k} p^k (1-p)^{n-k}$$

wobei: p = Erwartungswert für den Anteil der R_{CDR} -Mutationen an der Gesamtzahl der Mutationen (R_{CDR}/n)

n = Anzahl aller Mutationen, nämlich der R_{CDR} , R_{FR} (R-Mutationen in FR-Regionen), S_{CDR} und S_{FR} (S-Mutationen in CDR- bzw. FR-Regionen)

k = Anzahl R_{CDR}

Der Erwartungswert p ist hierbei das Produkt aus der der Sequenz inhärenten Suszeptibilität für einen Aminosäureaustausch und der relativen Länge der CDR-Region (L_{CDR}). Die

inhärente Suszeptibilität für einen Aminosäureaustausch kann auch als Austausch-Frequenz oder *replacement frequency* R_f bezeichnet werden:

$$p = L_{\text{CDR}} \cdot R_f$$

Tabelle 5-2: Für die Berechnungen nach Shlomchik *et al.* und mit dem exakten Binomialtest zugrunde gelegte Werte. n errechnet sich hier nach Shlomchik *et al.*: $n = R_{\text{CDR}} + S + 2 R_{\text{FR}}$

Antikörper	N	n	k	p
JGG9 κ	320	4	2	0,23
HLC9 μ	344	19	13	0,22
HCL9 κ	324	10	2	0,19
HVA2 μ	382	14	12	0,2
HVA2 κ	325	1	0	0,19

Obwohl Shlomchik *et al.* und Chang und Casali den gleichen mathematischen Ansatz wählen, gehen beide von unterschiedlichen Werten für R_f und n aus. Die dem zugrunde liegende Überlegung ist bei beiden ähnlich. Beiden fällt auf, dass auch ohne Antigenruck die Anzahl der zufälligen R-Mutationen in den FR-Regionen geringer ist, als durch ein ausschließlich auf der relativen Länge der FR-Region beruhender Erwartungswert.

Shlomchik *et al.* gehen davon aus, dass Reparaturmechanismen etwa die Hälfte aller auftretenden R_{FR} -Mutationen eliminiert, da sie zum Verlust des Antikörpers führen könnten. Um dies zu berücksichtigen, werten sie die R_{FR} -Mutationen in der Gesamtzahl der Mutationen n doppelt:

$$n = R_{\text{CDR}} + S + 2 R_{\text{FR}}$$

Für Keimbahngene, die keinem Selektionsdruck ausgesetzt waren, wurde für R_f von Jukes und King (Jukes und King, 1979) ein Wert von 0,7452 ermittelt. Dieser Wert wird von Shlomchik *et al.* gerundet übernommen ($R_f \approx 0,75$). Als relative Größe der CDR-Region L_{CDR} wird 0,25 angenommen, d.h. die CDR-Regionen machen gemeinsam ein Viertel der Gesamtlänge der variablen Region aus. Für p ergibt sich:

$$p = 0,19$$

Chang und Casali drücken die geringere Suszeptibilität der FR-Region für R-Mutationen in R_f aus. Sie verwenden einen Computer-Algorithmus, mit dessen Hilfe R_f für beliebige

Nukleotid-Sequenzen ermittelt werden kann. Auf dieser Grundlage analysieren sie jeweils für die verschiedenen FR-Regionen und CDR-Regionen unterschiedlicher V_H -Gene in Keimbahnkonfiguration die R_f -Werte. Daraus folgt, dass p für alle Keimbahnsequenzen unterschiedlich ist und sogar Unterschiede innerhalb der Sequenzen zwischen verschiedenen FR- und CDR-Regionen zu finden sind. n ergibt sich hier aus der Summe der R- und S-Mutationen (*Silent*):

$$n = R + S$$

Sowohl Chang und Casali als auch Shlomchik berechnen die Wahrscheinlichkeit, dass ein beobachtetes k zufällig auftritt. Da der Computer-Algorithmus zur R_f -Ermittlung von Chang und Casali nicht zugänglich ist und nur R_f für wenige Keimbahnsequenzen in der Publikation dargestellt werden, war eine Berechnung von $P(k)$ nur mit Hilfe der Methode von Shlomchik *et al.* möglich, die durch einen erhöhten Wert n die geringere Suszeptibilität der FR-Regionen für R-Mutationen nur angenähert berücksichtigt. Die ermittelten Werte für $P(k)$ nach Shlomchik *et al.* finden sich in Tabelle 5-4. Sowohl die Gesamtzahl N aller möglichen Mutationen, also aller Nukleotide der variablen Region, als auch L_{CDR} beziehen sich in den vorliegenden Berechnungen ausschließlich auf Nukleotide, die mit Keimbahnsequenzen verglichen werden konnten.

Sowohl Chang und Casali als auch Slomchik *et al.* berechnen nur eine einzige binomiale Wahrscheinlichkeit. Hieraus kann nicht schlussgefolgert werden, dass eine bestimmte Abweichung von p signifikant ist. Hierzu muss der P-Wert bestimmt werden. Der P-Wert ist die Summe aller Wahrscheinlichkeiten für noch extremere Ereignisse als das beobachtete.

Zur Abschätzung, ob der beobachtete Wert $p_1 = R_{CDR}/n$ signifikant vom für R_{CDR}/n erwarteten Wert p abweicht, muss ein einseitiger beziehungsweise zweiseitiger Hypothesentest durchgeführt werden. Eine einseitige Fragestellung ist dann relevant, wenn nur die Abweichung der Anzahl der R_{CDR} -Mutationen nach oben von Interesse ist. Es wird dann die Nullhypothese H_{01}

$$H_{01}: p_1 \leq p$$

gegen die Hypothese H_{11}

$$H_{11}: p_1 > p$$

getestet.

Eine zweiseitige Fragestellung ist relevant, wenn eine Abweichung nach unten und nach oben betrachtet werden soll. Es wird dann die Nullhypothese H_{02}

$$H_{02}: p_1 = p$$

gegen die Hypothese H_{12}

$$H_{12}: p_1 \neq p$$

getestet.

Auf dieser Basis wurde in der vorliegenden Doktorarbeit ermittelt, ob beobachtete Abweichungen vom Erwartungswert signifikant sind, d.h. ob die Mutationen auf antigengesteuerte Prozesse zurückgehen. Da aufgrund der niedrigen Werte für n eine Approximation der Binomialverteilung durch die Normalverteilung nicht gerechtfertigt ist, wurde ein exakter Binomialtest zur Bestimmung der P-Werte eingesetzt. Die Berechnung der Werte erfolgte mit SAS Version 9.1.3. Rf-Werte nach Casali und Chang stehen nicht zur Verfügung. Zur Approximation der niedrigeren inhärenten Suszeptibilität für R-Mutationen in den FR-Regionen wurde der von Shlomchik *et al.* definierte Wert für n verwendet (Tabelle 5-2).

Die P- Werte für den einseitigen und zweiseitigen exakten Binomialtest finden sich in Tabelle 5-4.

Die binomialen Modelle treffen nur zu, wenn Variablen mit nur zwei Verteilungsmöglichkeiten untersucht werden. Die in der variablen Region von Immunglobulinen möglichen Mutationen weisen jedoch vier Verteilungsmöglichkeiten auf, nämlich R- und S-Mutationen in CDR- oder FR-Regionen des Genes. Deshalb schlagen Lossos *et al.* vor, ein multinomiales Verteilungsmodell zur Untersuchung anzuwenden. Hierbei wird untersucht, ob ein höherer oder niedrigerer beobachteter Wert für R_{CDR} und R_{FR} signifikant vom Erwartungswert abweicht.

Tabelle 5-3: Anzahl der R- und S-Mutationen

Antikörper	R_{CDR}	S_{CDR}	R_{FR}	S_{FR}
JGG9 κ	2	0	0	2
HLC9 μ	13	0	3	0
HCL9 κ	2	0	3	2
HVA2 μ	12	0	1	0
HVA2 κ	0	0	0	1

n setzt sich wie bei Casali und Chang aus der Summe aller beobachteten Mutationen zusammen:

$$n = R + S$$

Die Erwartungswerte für das Vorkommen von R_{CDR}-, R_{FR}-, S_{CDR}- und S_{FR}-Mutationen errechnen sich wie bei Chang und Casali als Produkt aus den relativen Längen der entsprechenden Regionen L_{CDR} und L_{FR} und den inhärenten Suszeptibilitäten für R-Mutationen, R_f_{CDR} und R_f_{FR}. Die Suszeptibilitäten für S-Mutationen sind entsprechend 1-R_f_{CDR} bzw. 1 - R_f_{FR}. Untersucht werden die Häufigkeiten der R_{FR}- und R_{CDR}-Mutationen, wobei in beiden Fällen einseitige P-Werte ermittelt werden. Lossos *et al.* stellen unter www-stat.stanford.edu/immunoglobulin ein JAVA-Applet zur Verfügung, das für importierte Keimbahnsequenzen die R_f -Werte errechnet und diese zur Kalkulation der P-Werte für beobachtete R_{CDR} und R_{FR} heranzieht. Tabelle 5-4 zeigt die so ermittelten Werte für JGG9 κ, HLC9 μ und κ und HVA2 μ und κ. JGG9 μ wurde aus allen Analysen ausgelassen, da es sich bei den Mutationen um Insertionen und aus Leserahmenverschiebungen resultierende R-Mutationen handelt, die typischerweise nicht antigengesteuert sind. Daher ist ein Nachweis der Antigensteuerung mit den vorgestellten Modellen nicht sinnvoll.

Signifikante Unterschiede ergeben sich für die Abweichungen der beobachteten Werte für R_{CDR} vom Erwartungswert bei HLC9 μ und HVA2 μ. D.h. man kann bei beiden Antikörpern davon ausgehen, dass Mutationen in der schweren Kette auf antigengesteuerte Prozesse zurückgehen.

Tabelle 5-4: Berechnung der P-Werte für R_{CDR} . Die Anzahl der beobachteten R_{CDR} -Mutationen in HLC9 μ und HVA2 μ weicht für alle Testmethoden signifikant vom Erwartungswert ab, wie durch die graue Unterlegung der signifikanten Werte verdeutlicht wird.

Antikörper	P(X=k) (Shlomchik <i>et al.</i>)	P-Wert (Exakter Binomialtest – einseitig)	P-Wert (Exakter Binomialtest- zweiseitig)	P-Wert/FR (Lossos <i>et al.</i>)	P-Wert/CDR (Lossos <i>et al.</i>)
JGG9 κ	0,8100	0,2285	0,4569	0,0287	0,1505
HLC9 μ	$1,728 \cdot 10^{-5}$	$2,479 \cdot 10^{-7}$	$3,916 \cdot 10^{-5}$	0,0007	$< 1 \cdot 10^{-6}$
HCL9 κ	0,3010	0,5932	1,0000	0,2502	0,2787
HVA2 μ	$2,386 \cdot 10^{-7}$	$1,958 \cdot 10^{-5}$	$4,985 \cdot 10^{-7}$	0,0060	$< 1 \cdot 10^{-6}$
HVA2 κ	0,1882	0,1900	0,3800	0,2188	0,5959

5.2.4 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eine Methode zur Charakterisierung der V-Genfamilien von APL etabliert werden. Durch die Kombination der (OneStep-) RT-PCR mit Gemischen aus familienspezifischen Primern und einem daran anschließenden zweiten PCR-Schritt mit einzelnen familienspezifischen Primern konnte auf die den APL JGG9, HLC9 und HVA2 zugrunde liegenden Genfamilien des V-Segmentes geschlossen werden. Diese Erkenntnisse konnten direkt für die Sequenzierung der variablen Regionen und der Identifizierung der zu verwendenden *forward*-Primer genutzt werden. Außerdem gaben sie Auskunft über die Klassen der verwendeten schweren und leichten Ketten der Antikörper und können zur Analyse des Vorkommens bzw. der Bevorzugung bestimmter Genfamilien bei APL herangezogen werden.

Die strukturellen Eigenschaften von JGG9, HLC9 und HVA2 sind in Tabelle 5-5 zusammengefasst.

Tabelle 5-5: Zusammenfassung der strukturellen Eigenschaften der APL JGG9, HLC9 und HVA2.

APL		JGG9	HLC9	HVA2
V-Gen-Familie (schwere Kette)		VH3	VH3	VH2
V-Gen-Familie (leichte Kette)		VκII	VκIII	VκII
Sequenz H	V	DP-53	DP-49	VII-5
	D	<i>Nicht identifiziert</i>	D6-13	D3-3
	J	JH3	JH4b	JH5
Sequenz L	V	DPK13	DPK21	DPK22
	J	Jκ2	Jκ2	Jκ4
Homologie H		DNA: 92,3 % Protein: 76,9 %	DNA: 95,87 % Protein: 90,7 %	DNA: 96,44 % Protein: 94,65 %
Antigengesteuerte Mutationen		Nein	Ja	Ja
Homologie L		DNA: 98,75 % Protein: 99,06 %	DNA: 97,86 % Protein: 95,41 %	DNA: 99,69 % Protein: 100 %
Antigengesteuerte Mutationen		Nein	Nein	Nein
Insertion H	V-D	<i>Nicht identifiziert</i>	ja	ja
	D-J	<i>Nicht identifiziert</i>	ja	ja
Insertion L	V-J	nein	ja	nein

Während JGG9 das typische Bindungsprofil für β2-GPI-abhängige APL zeigt, scheinen HLC9 und HVA2 mit ihrer Reaktivität gegen alle getesteten Phospholipide, nicht aber gegen β2-GPI, charakteristische Beispiele für polyreaktive Autoantikörper zu sein.

5.3 Funktionelle Untersuchungen zu monoklonalen APL am Beispiel von JGG9, einem APL des IgM-Types, und HL5B, einem APL des IgG-Types

Ein Einfluss von APL auf Monozyten und deren Aktivitätszustand ist mehrfach beschrieben (Kornberg et al., 1994; Cuadrado et al., 1997; Esmon et al., 1997; Amengual et al., 1998; Lackner et al., 2000; Cho et al., 2002), wobei schwerpunktmäßig eine durch APL induzierte Hochregulierung des Tissue Factors (TF) auf der Oberfläche von Monozyten als ein auslösender Faktor für die erhöhte prokoagulante Aktivität in Patienten mit APS diskutiert wird. Dies ist für den IgG-APL HL5B, der für funktionelle Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Verfügung stand, bereits beschrieben (Lackner et al., 2000). Ein

Einfluss von APL auf Monozyten kann über mehrere Zwischenschritte erfolgen, kann aber auch eine direkte Bindung von APL an Monozyten nahe legen.

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde vor diesem Hintergrund eine mögliche Bindung von JGG9 und HL5B an Monozyten untersucht. Um diese Versuche zu standardisieren und eine Abhängigkeit vom Aktivitätszustand der Monozyten einzelner Spender zu vermeiden, wurde die monozytäre humane Zelllinie Mono-Mac-6 als Modellzelllinie in fast allen Versuchen zur Bindung der APL an Monozyten eingesetzt. Die Wahl der Mono-Mac-6-Zellen als Modell für diese Versuche begründet sich in der Ähnlichkeit der Zelllinie mit humanen reifen Monozyten auch hinsichtlich der TF-Expression (Ziegler-Heitbrock et al., 1988; Tenno et al., 1997; Arkel et al., 2003).

Als Methoden zur Überprüfung einer möglichen Bindung von HL5B oder JGG9 an Monozyten wurden der Westernblot mit Mono-Mac-6-Lysaten inklusive immunchemischen Nachweis (HL5B) und die Immunfluoreszenzanalyse einer eventuellen Bindung der APL an fixierte Mono-Mac-6-Zellen (HL5B und JGG9) gewählt.

Für beide Ansätze ergeben sich hinsichtlich der Bindung humaner APL an humane Monozyten zwei Probleme: Eine eventuell nachweisbare Bindung an Monozyten kann zumindest bei IgGs immer auch durch Bindung des Fc-Teils der APL an Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche der Monozyten zurückzuführen sein, die zwar spezifisch für Antikörper im Allgemeinen ist, jedoch nicht Antigen-spezifisch. Eine Fc-vermittelte Bindung muss daher nicht unbedingt für eventuelle Auswirkungen der APL auf die Zellen spezifisch sein. Die Absättigung dieser Rezeptoren vor Zugabe des Antikörpers verhindert eine Bindung über Fc-Rezeptoren und lässt eine Bindung von APL an andere Strukturen der Monozyten über den F(ab)₂-Teil weiterhin zu. Bindungsversuche in humanen Zellen mit humanen Antikörpern sollten streng kontrolliert sein, um unspezifische Bindungen oder Bindungen über den Fc-Teil auszuschließen. Als Negativkontrollen für alle Immunfluoreszenz-Versuche dienten daher gereinigte humane monoklonale Antikörper, die über keine Reaktivität in den verwendeten APL-ELISAs verfügten. Zur Verfügung standen als Kontrollantikörper für IgM-Versuche D9G10 und für IgG-Versuche A9D10. Beide Antikörper wurden von Philipp von Landenberg generiert. Kommerziell sind Isotyp-Kontrollen für Experimente mit humanen monoklonalen Antikörpern nicht erhältlich. Bei A9D10 handelt es sich um einen IgG-Antikörper, der eine κ -Kette als leichte Kette trägt. HL5B verfügt über eine λ -Leichtkette. A9D10 und HL5B haben eine schwere Kette des IgG₂-Subtyps. Als weitere Kontrolle für Experimente mit dem IgG-APL HL5B diente ein kommerziell erhältlicher polyklonaler humaner IgG₂ λ -Antikörper, der

aus dem Plasma eines Myelompatienten stammt. Dieser polyklonale Antikörper ist hinsichtlich der IgG-Subklasse und der leichten Kette mit HL5B identisch.

D9G10 verfügt wie JGG9 über eine κ -Kette.

Die Kontrolle der Westernblots mit HL5B als Primärantikörper wird später beschrieben.

Das zweite Problem der Untersuchung der humanen APL in der humanen Zellkultur liegt im Fehlen von Positivkontrollen, die weder kommerziell erhältlich sind, noch aufgrund des Mangels eines validen Systems zur Überprüfung der Reaktivität gegen humane Zellen (da es ja eben an der Positivkontrolle mangelt) selbst herstellbar sind.

Die folgenden Versuche wurden also unter Verwendung einer Negativkontrolle, jedoch ohne eine Positivkontrolle durchgeführt.

5.3.1 Untersuchung einer möglichen Bindung von HL5B an die monozytäre Zelllinie Mono-Mac-6 mittels Westernblot von Zelllysaten

Zelllysate aus Mono-Mac-6-Zellen wurden hergestellt wie beschrieben. Aus der Herstellung der Zelllysate resultierten zwei Fraktionen, die Überstandfraktion, die die löslichen Zytoplasmaproteine und die unter den gewählten Bedingungen aus der Zellmembran heraus gelösten Membranproteine enthält, und die Membranfraktion, die Membranfragmente mit nicht gelösten Membranlipiden und Membranproteinen, sowie Proteine aus nicht lysierten Zellorganellen beinhaltet.

Die Überstandsfraction wurde mit 6x Auftragspuffer für die SDS-PAGE versetzt. Die Membranfraktion, die einen festen Niederschlag im Reagenzröhrchen darstellt, wurde in einfachem Auftragspuffer für die SDS-PAGE durch Auf- und Abpipettieren weitgehend homogenisiert. Die Menge des Auftragspuffers wurde so gewählt, dass das Gesamtvolumen der Überstands- und der Membranfraktion gleich waren. Beide Fraktionen wurden wie beschrieben zum Denaturieren der Proteine erhitzt und auf zehnprozentige Polyacrylamidgele aufgetragen. Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine mittels Westernblot auf Nitrocellulosemembranen transferiert und unterschiedlichen Prozeduren zum immunchemischen Nachweis einer eventuellen Bindung von HL5B an Monozytenlysate unterzogen.

5.3.1.1 Einfluss der Blockierungsmethode auf die mögliche Bindung von HL5B an Mono-Mac-6-Lysate

In einem unkontrollierten Pilotversuch wurden Überstands- und Membranfraktion aus lysierten Mono-Mac-6 auf 10 % Polyacrylamidgele aufgetragen und die enthaltenen Proteingemische mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Pro Spur wurden 10 µl Probe aufgetragen, was für beide Fraktionen der Proteinmenge aus 1×10^6 Zellen entspricht.

Die immunchemische Reaktion erfolgte im BCIP/NBT-System wie beschrieben mit TBST-Blotto als Blockierungsreagenz, HL5B als ersten Antikörper und einem AP-konjugiertem Anti-Human IgG-Antikörper als Zweitantikörper.

Sowohl in der Überstandsfraction als auch viel stärker in der Membranfraktion zeigte sich eine deutliche Bande auf der Höhe des 66 kDa-Marker-Proteins. Eine schwächere Bande zeigte sich außerdem oberhalb des 29 kDa-Marker-Proteins in der Membranfraktion (Abbildung 5-15).

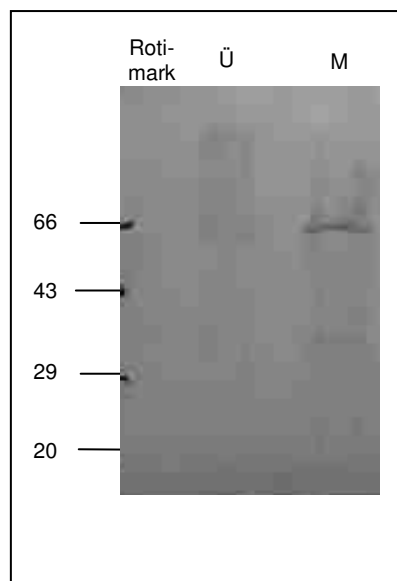


Abbildung 5-15: Überstand (U) und Membranfraktion (M) aus der Lyse von 1×10^6 Mono-Mac-6-Zellen im Westernblot bei Detektion mit HL5B als erstem Antikörper. Banden bei 66 kDa werden im Überstand und in der Membranfraktion sichtbar. In der Membranfraktion zeigt sich außerdem eine Bande oberhalb des 20 kDa-Markers.

Um zu untersuchen, ob die Banden die Bindung von HL5B über den Fc-Teil an Fc-Rezeptoren der Mono-Mac-6 repräsentieren oder einen Hinweis auf eine mögliche Bindung der F(ab)-Fragmente von HL5B an ein monozytäres Protein liefern, wurden der Einfluss unterschiedlicher Blockierungsreagenzien in der immunchemischen Entwicklung des Westernblots überprüft.

ERGEBNISSE

Als Blockierungsreagenzien dienten:

- 1) 10 % Normalserum in TBST
- 2) 3 % BSA in TBST
- 3) TBST-Blotto

SDS-PAGE, Westernblot und immunchemischer Nachweis erfolgten ansonsten wie bereits beschrieben. Pro Spur auf dem Polyacrylamidgel wurden eine der Zellzahl 1×10^6 äquivalente Menge an Überstand und Membranfraktion aufgetragen.

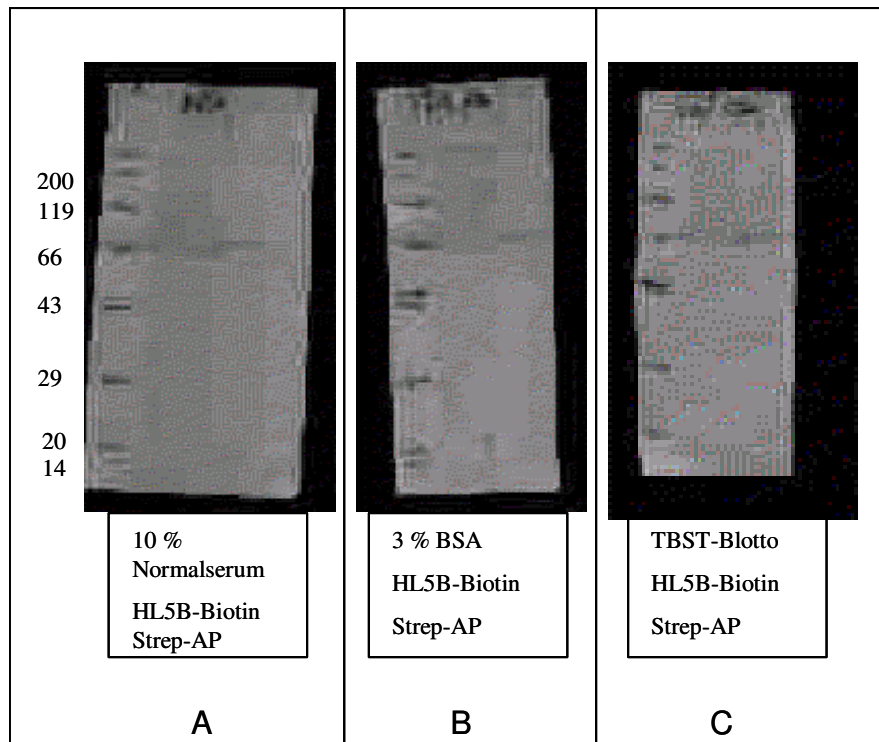


Abbildung 5-16: Untersuchung des Einflusses der Blockierungsmethode auf eine mögliche Bindung von HL5B an Mono-Mac-6-Lysate. Überstand (Ü) und Membranfraktion (M) aus der Lyse von 1×10^6 Mono-Mac-6-Zellen wurden mit HL5B als ersten Antikörper detektiert. Als Blockierungsreagenzien dienten (A) 10 % humanes Normalserum, (B) 3 % BSA und (C) TBST-Blotto. Die 66 kDa-Bande zeigte sich in allen drei Versuchsansätzen.

Die unter Verwendung von TBST-Blotto sichtbare 66 kDa-Bande (

Abbildung 5-15, Abbildung 5-16 C) zeigt sich auch unter Verwendung von 10 % humanem Normalserum (Abbildung 5-16 A) oder 3 % BSA (Abbildung 5-16 B) als Blockierungsreagenz. Der Einsatz von 10 % Normalserum führt also nicht zur Inhibition der Bindung, was einen Hinweis darauf liefert, dass wahrscheinlich nicht eine Rezeptor-Fc-Teil-Bindung für das Signal im Westernblot verantwortlich ist. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass der Fc-Rezeptor unter den gewählten Bedingungen nur inadäquat blockiert wurde oder dass Bindungen von Antikörpern aus dem Normalserum durch den Zweit-Antikörper detektiert wurden. Weitere Kontrollexperimente sollten diese Möglichkeiten überprüfen und weitere Möglichkeiten für eine unspezifische Reaktion ausschließen.

5.3.1.2 Kontrolle der möglichen Bindung von HL5B an Mono-Mac-6-Lysate durch Verwendung eines monoklonalen, humanen IgG-Antikörpers

Um zu überprüfen, ob die in

Abbildung 5-15 und Abbildung 5-16 detektierten Banden bei 66 kDa auf die Bindung von HL5B an Monozytenbestandteile zurückgehen wurden zwei Kontrollexperimente zur immunchemischen Färbung der Mono-Mac-6-Westernblots mit HL5B durchgeführt:

Zunächst wurde die immunchemische Entwicklung der Westernblots ohne den Primärantikörper HL5B durchgeführt, d.h. nach Blockierung der Nitrocellulosemembran wurde direkt mit dem Sekundärantikörper, Anti-Human IgG-AP, inkubiert. In diesen Entwicklungsansätzen sollten sich keine für HL5B spezifischen Reaktionen zeigen.

In weiteren Kontrollexperimenten wurde der Primärantikörper HL5B in biotinylierter Form verwendet. Als Konjugat diente an die Alkalische Phosphatase gekoppeltes Streptavidin (Strep-AP). Signale, die auf unspezifische Interaktionen des Sekundärantikörpers zurückgehen, können in diesem Ansatz ausgeschlossen werden. Nicht ausgeschlossen ist weiterhin die Bindung über den Fc-Teil.

Zusätzlich zum immunchemischen Nachweis über AP-konjugierte Sekundärreagenzien und BCIP/NBT wurde HRP-konjugierter Sekundärantikörper bzw. HRP-konjugiertes Streptavidin (Strep-HRP) und für die Substratreaktion ECL-Reagenz verwendet. Diese Methode stellt ein sensitiveres Verfahren zum immunchemischen Nachweis dar. Mit Hilfe von Autoradiographie-Filmen (HyperfilmTM ECL) wird durch die Substratreaktion emittiertes Licht in ein sichtbares Signal umgewandelt. Für die Westernblots wurden sowohl Lysate aus unstimulierten Mono-Mac-6-Zellen, als auch Lysate aus mit 10 ng/ml LPS stimulierten Mono-Mac-6 eingesetzt.

Genauere Angaben zu den Konzentrationen der verwendeten Reagenzien sind in Kapitel 4.3.2.3 aufgeführt.

Als deutliches Signal war ausschließlich die 66 kDa-Bande in einigen der Westernblots, die jeweils mindestens einmal zur Bestätigung der Ergebnisse wiederholt wurden, zu erkennen. Tabelle 5-6 fasst die diesbezüglichen Ergebnisse zusammen.

Bei der immunchemischen Färbung der Westernblots durch einen enzymkonjugierten Zweitantikörper zeigte sich die 66 kDa-Bande für unstimulierte Mono-Mac-6 bei Anwesenheit und Abwesenheit von HL5B, wenn der Zweitantikörper HRP-konjugiert ist und die Entwicklung im Chemilumineszenz-System erfolgt. Bei Einsatz eines AP-gekoppelten

ERGEBNISSE

Sekundärantikörpers und BCIP/NBT-Lösung als Substratreagenz waren für beide Ansätze keine Banden detektierbar.

Tabelle 5-6: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Westernblots mit Lysaten aus unstimulierten und stimulierten (LPS) Mono-Mac-6. (+) Die 66 kDa-Bande zeigt sich deutlich nach der Substratreaktion; (-) keine Banden nach Substratreaktion. Außer der Bande bei 66 kDa zeigen sich keine weiteren eindeutigen Banden in den Blots.

Mono-Mac-6	Unstimuliert		Stimuliert	
HL5B/Anti-IgG	+	-	-	-
----/Anti-IgG	+	-	-	-
HL5B-Biotin/ Strep-AP o. Strep-HRP	-	+	-	+
----/ Strep-AP o. Strep-HRP	-	+	-	+
Entwicklungs- system	ECL	BCIP	ECL	BCIP

Der Unterschied kann auf die sehr viel höhere Sensitivität des ECL Plus-Systems gegenüber dem BCIP/NBT-System zurückgeführt werden. Das Ergebnis macht jedoch deutlich, dass die 66 kDa-Bande nicht spezifisch für die Interaktion von HL5B mit einem Monozytenbestandteil ist, sondern auf eine unspezifisch Bindung des Sekundärantikörpers zurückgeht.

Bei den Lysaten aus den stimulierten Mono-Mac-6-Zellen ließ sich weder im ECL Plus-System noch im BCIP/NBT-System die entsprechende Bande visualisieren.

Im Biotin-Streptavidin-System konnte die Bande nicht mittels der ECL-Substratreaktion sichtbar gemacht werden: Weder bei stimulierten, noch bei unstimulierten Monozyten konnten überhaupt Banden detektiert werden. Durch BCIP/NBT-Reaktion wurde die 66 kDa-Bande wiederum bei Verwendung von HL5B und in der Negativkontrolle detektiert. Es konnte nicht geklärt werden, worauf die beobachteten Reaktionen zurückzuführen sind. Die Tatsache jedoch, dass sich die 66 kDa-Bande immer auch in der Negativkontrolle zeigt, stellt klar heraus, dass es sich nicht um eine für HL5B spezifische Bande handelt.

Mittels Westernblot konnte keine Bindung von HL5B an ein Mono-Mac-6-Protein nachgewiesen werden. Da keine geeignete Positivkontrolle vorlag, kann eine mögliche Bindung, die unter den gegebenen Bedingungen nicht detektiert werden konnte, jedoch dennoch nicht definitiv ausgeschlossen werden.

5.3.2 Untersuchung einer möglichen Bindung von HL5B und JGG9 an die monozytäre Zelllinie Mono-Mac-6 mittels Immunfluoreszenzanalyse

Zur Untersuchung einer möglichen Bindung von HL5B und JGG9 an Mono-Mac-6-Zellen als Modell für humane reife Monozyten wurde als weitere Methode die Immunfluoreszenzanalyse eingesetzt. Zu diesem Zweck wurden Mono-Mac-6-Zellen durch Cytospin auf Objektträger gebracht, fixiert und mit HL5B und JGG9 und dem entsprechenden Sekundärantikörper (Anti-Human IgG-FITC, Anti-Human IgM-FITC), bzw. mit den biotinylierten APL und FITC-gekoppeltem Streptavidin (Strep-FITC), inkubiert, um eine mögliche Bindung von HL5B und JGG9 über das sekundäre, fluoreszenzmarkierte Nachweisreagenz zu visualisieren. Als Negativkontrollen dienten die schon beschriebenen monoklonalen humanen Antikörper A9D2 (für IgG) und D9G10 (für IgM), sowie der polyklonale IgG₂λ (Isotyp-Kontrolle für HL5B) in biotinylierter und nicht biotinylierter Form.

Unterschiedliche Fixierungsmethoden wurden angewendet, nämlich die Fixierung mit Methanol und die Fixierung mit Paraformaldehyd. Hinsichtlich der Membranintegrität und des Erhalts der Tertiär- und Quartärstrukturen der Membranproteine unterscheiden sich die beiden Fixierungsmethoden erheblich (siehe Kapitel 4.3.1.3.1). Dies ist beim Arbeiten mit APL von besonderer Bedeutung, da mögliche Antigene Lipide, Lipidbindende Proteine und Komplexe aus beiden sein können.

Zunächst wurden die Primärantikörper auf Cytospin-Präparaten, die mit 3% Paraformaldehyd fixiert und anschließend mit 0,5 % Triton X-100 permeabilisiert wurden, titriert. Dabei wurden JGG9, HL5B und die entsprechenden Kontrollen in verschiedenen Verdünnungen bis hin zu 50 µg/ml (höchste Antikörper-Konzentration) bei konstanter Strep-FITC-Konzentration eingesetzt. Es zeigte sich bei keiner Konzentration ein Unterschied zwischen den APL und ihren Negativkontrollen. Bei allen APL und den Negativkontrollen konnte keine stärkere Fluoreszenz festgestellt werden, als in der PBS-Kontrolle (Inkubation nur mit FITC-gekoppeltem Nachweisreagenz, kein Primärantikörper).

Bei einer Primärantikörper-Konzentration von 0,05 µg/ml (nicht biotinylierte Antikörper) zeigte sich auch durch unterschiedliche Konzentrationen an fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper (Anti-Human IgG-FITC, Anti-Human IgM-FITC, jeweils 1:50, 1:100 und 1:500) kein Unterschied zwischen HL5B, JGG9, A9D2, D9G10, IgG₂λ und PBS-Kontrolle.

Die Wiederholung der Versuche mit Methanol-fixierten Zellen führte zum gleichen Ergebnis. Tabelle 5-7 fasst die Resultate der Immunfluoreszenz-Versuche zusammen.

Tabelle 5-7: Untersuchung einer möglichen Bindung von APL an Mono-Mac-6-Zellen mittels Immunfluoreszenz. Unter den gewählten Bedingungen konnte keine Bindung nachgewiesen werden.

Nachweissystem \ Fixierung	Strep-FITC	Anti-IgG/IgM-FITC
Methanol	Keine Fluoreszenz	n.d.
Paraformaldehyd	Keine Fluoreszenz	Keine Fluoreszenz

Unter den gewählten Bedingungen konnte keine Bindung der APL HL5B und JGG9 an Mono-Mac-6-Zellen als Modell für reife humane Monozyten nachgewiesen werden. Dennoch kann die Möglichkeit, dass HL5B und JGG9 in der Lage sind Mono-Mac-6 zu binden nicht ausgeschlossen werden, da besonders hinsichtlich der Notwendigkeit der Fixierung Unterschiede zwischen der *in vitro*- und *in vivo*-Situation bestehen. Außerdem ist die Validität des Testsystems aufgrund des Fehlens von Positivkontrollen letztlich nicht gesichert.

5.3.3 Zusammenfassung

Im Rahmen des APS wird bei Patienten eine Thromboseneigung festgestellt, als deren Ursprung in der Literatur unter anderem eine erhöhte prokoagulante Aktivität von Monozyten diskutiert wird. Für HL5B wurde *in vitro* gezeigt, dass der Antikörper in der Lage ist, auf humanen Monozyten eine erhöhte prokoagulante Aktivität zu induzieren, die vermutlich auf eine erhöhte Tissue Factor-Expression zurückgeht (Lackner et al., 2000). Änderungen im Aktivitätszustand von Monozyten können durch direkte Interaktion zwischen APL und den Zellen hervorgerufen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob HL5B und JGG9 an Mono-Mac-6 als Modell für humane, periphere Monozyten binden.

Im Westernblot konnte eine solche Bindung für HL5B auch mit unterschiedlichen Nachweismethoden nicht gezeigt werden. In den Westernblots mit Mono-Mac-6-Lysaten fiel eine deutliche Bande bei 66 kDa auf, die jedoch nicht spezifisch für den Nachweis einer Bindung durch HL5B war und deren Ursprung nicht geklärt werden konnte.

Auch durch Immunfluoreszenz mit fixierten Mono-Mac-6 konnte eine direkte Bindung weder für HL5B, noch für JGG9 nachgewiesen werden.

Da für alle Versuche keine geeignete Positivkontrolle vorlag, ist dennoch eine Bindung von HL5B oder JGG9 an Monozytenbestandteile nicht vollständig auszuschließen. Es besteht die

Möglichkeit, dass es *in vivo* zu einer Interaktion der Antikörper mit Monozyten kommt – unter Reaktionsbedingungen, die in den durchgeführten Versuchen nicht abgebildet wurden.

5.4 Etablierung einer Methode zur Generierung von B-1-Zell-Hybridomen zur Gewinnung von B-1-Zell-APL

B-1-Zellen sind eine Subpopulation der B-Zellen, die so genannte natürliche Autoantikörper produzieren (Bhat et al., 1992; Bhat et al., 1995; Hayakawa und Hardy, 2000). Diese natürlichen Autoantikörper weisen eine geringe Affinität zu meist mehreren Antigenen auf. Bei den Antigenen handelt es sich häufig um Nicht-Peptid-Antigene (auch Phospholipide), die bei verschiedenen Organismen ubiquitär verbreitet sind. Man geht davon aus, dass B-1-Zellen an einer ersten, unspezifischen Abwehr gegen eindringende Erreger beteiligt sind. Sie machen etwa 10 % - 30 % der gesamten B-Zell-Population aus, sind durch den stärker exprimierten CD5-Rezeptor auf ihrer Oberfläche charakterisiert und liegen im Gesunden inaktiviert vor.

Um festzustellen, ob B-1 Zell-Antikörper in ihren strukturellen Eigenschaften den im Rahmen des APS produzierten Antikörpern ähneln und gegebenenfalls gleichen Ursprungs sind bzw. wo die Unterschiede liegen, sollten B-1- und B-2-Zellen aus Patienten und Normalprobanden im Rahmen der vorliegenden Arbeit isoliert und näher charakterisiert werden.

5.4.1 Sortierung der B-1- und B-2-Zellen

B-1-Zellen stellen einen geringen Anteil der Lymphozyten im peripheren humanen Blut dar. Etwa 1 – 8 % der peripheren Lymphozyten von adulten Individuen tragen CD19 und CD5 auf ihrer Oberfläche und sind daher als B-1-Zellen zu klassifizieren (Bhat et al., 1995).

Besonders neuere Arbeiten heben hervor, dass CD5 auf allen B-Zellen induzierbar bzw. regulierbar ist. So wurde für EBV-transformierte B-Zellen eine Herabregulation der CD5-Expression beschrieben (Kaplan et al., 2001), während für die B-Zell-Aktivierung von einer Hochregulation von CD5 – auch auf B-2-Zellen – berichtet wird (Gary-Gouy et al., 2002a).

Zur Isolierung von B-1-Zellen musste daher versucht werden, eine Methode zu etablieren, bei der vor Sortierung der B-1-Zellen eine Aktivierung und die EBV-Infektion vermieden werden. Beobachtungen zeigen, dass schon durch Kultivierung in FCS-haltigem Medium eine geringe B-Zell-Stimulierung stattfindet (Viola Ochsenhirt, Wolfgang Gronau, persönliche Mitteilung).

Zunächst wurde überprüft, ob sich eine durch PHA induzierte Stimulierung von B-Zellen in einer Hochregulation von CD5 widerspiegelt, und ob diese gesteigerte CD5-Expression mit der CD69-Expression korreliert.

Hierzu wurden PBMCs aus buffy coat isoliert. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die nicht an die Plastikoberfläche der Zellkulturflasche adhärenen Zellen (Suspensionszellen) abgenommen und in RPMI 10 % FCS (geringe Stimulation) bzw. RPMI 10 % FCS mit 20 µg/µl PHA (Stimulationsmedium) wiederum über Nacht inkubiert. Pro Ansatz wurden 6 x 10⁶ Zellen in 10 ml des entsprechenden Mediums eingesetzt.

Zellen aus beiden Ansätzen wurden je zwei Färbungen unterzogen: Je 5 x 10⁵ Zellen wurden mit CD69-PE/CD19-FITC oder mit CD5-PE/CD19-FITC gefärbt und im Durchflusszytometer untersucht.

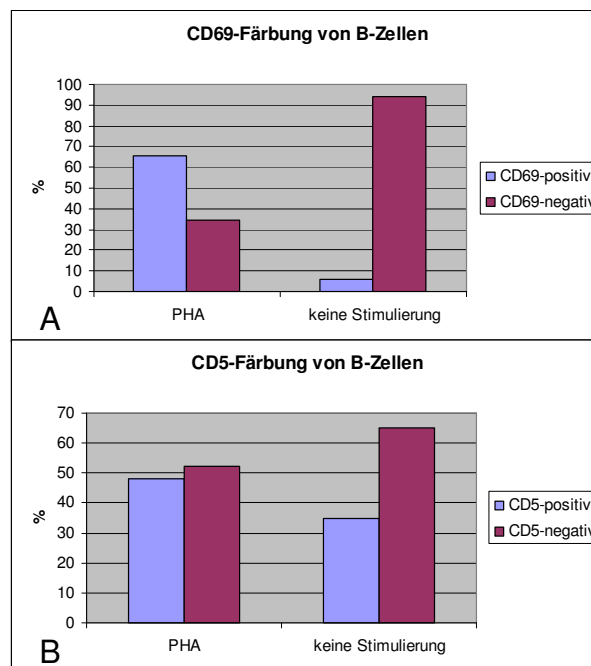


Abbildung 5-17: Stimulierung von Lymphozyten mit PHA. CD19-positiv Zellen (B-Zellen) wurden gegatet und hinsichtlich ihrer CD69-Expression (A) und CD5-Expression (B) durchflusszytometrisch untersucht. Bei PHA-Stimulierung wird sowohl die CD69-Expression als auch die CD5-Expression hochreguliert.

Die Grenze für positive und negative Populationen wurde über die Verwendung von Isotypkontrollen definiert. Abbildung 5-17 zeigt die prozentualen Anteile CD19-gateter B-Zellen, die eine Hochregulierung des Aktivierungsmarkers CD69 und des Oberflächenantigens CD5 aufweisen. Die Aktivierung der B-Zellen ist über CD69-

Färbung darstellbar (Abbildung 5-17 A). Es konnte gezeigt werden, dass bei Aktivierung der Anteil CD5-positiver B-Zellen von 34,9 % in RPMI 10% FCS auf 48 % in Stimulationsmedium steigt. Damit ist deutlich, dass die Stimulierung tatsächlich eine unmittelbare Auswirkung auf die CD5-Expression und die Anzahl CD5-positiver Zellen hat. Eine Aktivierung vor der Sortierung CD5-positiver B-1-Zellen muss deshalb soweit wie möglich vermieden werden.

Deshalb wurden bei der Etablierung der Methode zur Sortierung von B-1- und B-2-Zellen darauf geachtet, bei der Aufreinigung der Zellen Prozeduren, die zu einer erhöhten Aktivierung der Zellen führen konnten, zu vermeiden.

Zur Isolierung von getrennten B-1- und B-2-Zellpopulationen wurden zunächst PBMCs aus buffy coat von gesunden Probanden isoliert und in X-Vivo-Medium kultiviert. Kultivierung in X-Vivo-Medium führt nicht zu einer Stimulation von B-Zellen (Viola Ochsenhirt, Wolfgang Gronau, persönliche Mitteilung). Über Über-Nacht-Adhäsion wurden Suspensionszellen (Lymphozyten, NK-Zellen) von Adhäsionszellen (Monozyten) getrennt. Aus den Suspensionszellen, bestehend hauptsächlich aus B- und T-Lymphozyten und wenigen NK-Zellen, wurden über CD3-Depletion mittels magnetischer Zellsortierung B-Zellen angereichert. Diese Form der negativen Selektion wurde gewählt, um eine Aktivierung der B-Zellen durch CD19-Signaling bei Positivselektion zu vermeiden. Die so angereicherten B-Zellen wurden einer CD19/CD5-Färbung unterzogen. Bei allen Zwischenschritten bis zur Sortierung wurden die Zellen auf Eis gehalten.

Die Sortierung erfolgte mit dem Epics® ALTRA™. Zur Definition der Ausschlussgrenzen wurden ungefärbte, wie oben beschrieben angereicherte B-Zellen aus dem gleichen buffy coat verwendet. Die sortierten Zellen (B-1-Zellen, B-2-Zellen) wurden anschließend durchflusszytometrisch reanalysiert, um die Korrektheit der Trennung beider Populationen und die Reinheit der Fraktionen zu überprüfen und darzustellen.

Beide Populationen konnten isoliert werden. Die Reanalyse zeigte, dass es sich um reine Populationen handelte. Sie wurden für weitere Kultivierungsversuche eingesetzt (Abbildung 5-18).

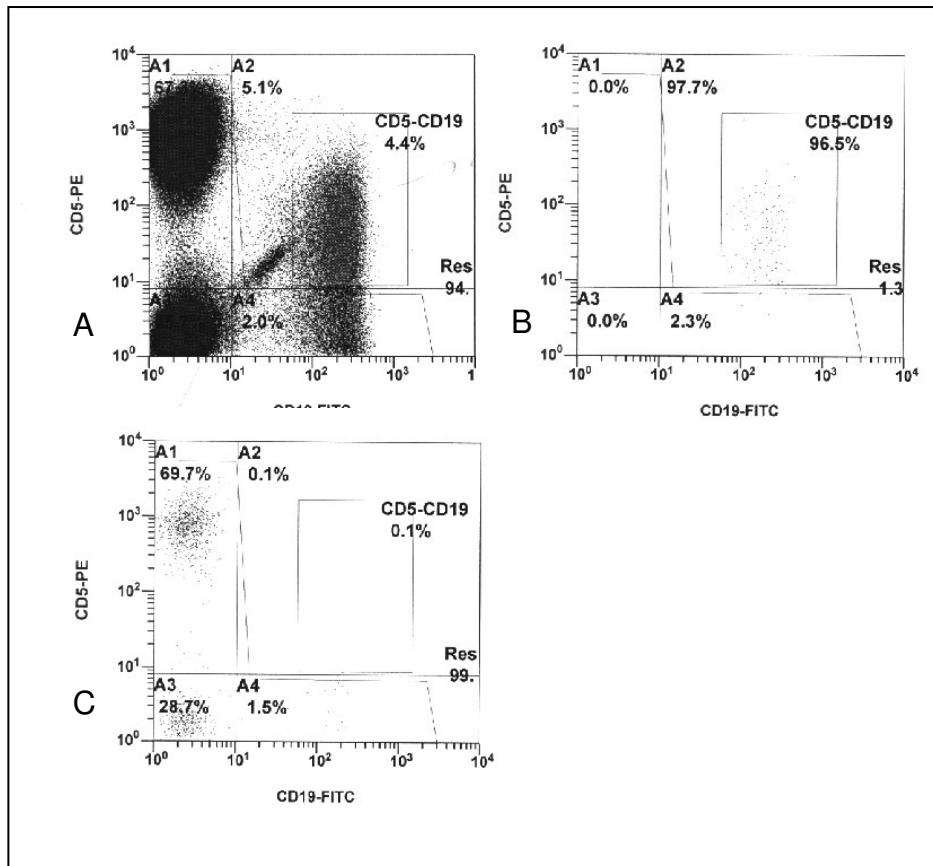


Abbildung 5-18: Sortierung von B-1-Zellen. B-1-Zellen wurden als CD19⁺/CD5⁺-Population sortiert, B-2-Zellen als CD19⁺/CD5⁻-Population (A). Reanalyse der B-1 Zellpopulation zeigt für 96,5 % CD19⁺/CD5⁺-Zellen (B). Reanalyse der B-2 Zell-Population zeigt 0,1 CD19⁺/CD5⁺-Zellen (C), d.h. die Trennung der B-1 und B-2-Zellen ist gelungen.

5.4.2 Infektion mit EBV, Probleme bei der Kultivierung und der Übertragbarkeit der Methode auf Patientenproben

Nach der Isolation von B-1- und B-2-Zellen als getrennte Populationen mittels FACS wurden beide Populationen in Kultur genommen, mit PHA stimuliert und mit EBV infiziert, um stabile, AK-produzierende Zellpopulationen zu erhalten. Die aus einem buffy coat gewonnene B-1-Zellpopulation war so klein (1×10^5 Zellen), dass eine erfolgreiche Infektion mit EBV zur Stabilisierung und späteren Expansion nicht möglich war. Die B-1-Zellpopulation wurde auf eine Zellzahl von 3×10^6 Zellen/ml in RPMI 10% FCS eingestellt. Bei 1×10^5 Zellen waren dies 166 μ l Zellsuspension, die dann mit der dreifachen Menge an EBV-haltigem Überstand versetzt wurde. Der Ansatz wurde auf zwei bis drei Vertiefungen einer 96-Loch-Zellkultur-Platte verteilt. Wachsende Klone waren auch bei mehrfacher Wiederholung des Versuches nicht zu beobachten. Da die Transformationsrate durch EBV bei B-Zellen in Zellkulturen etwa 1 % beträgt (Frade et al., 1985), ist eine Transformation maximal bei 1000 der 1×10^5 Zellen zu erwarten. Diese 1×10^5 Zellen stellen die Ausbeute

der sortierten Zellen da. Sowohl durch das durchflusszytometrische Sortieren als auch durch das In-Kultur-Nehmen sind die Zellen Stress ausgesetzt, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Anzahl der tatsächlich für die Transformation zur Verfügung stehenden Zellen noch geringer ist. Es konnten nach mehreren Versuchen zwei CD5-positive Zellkolonien expandiert werden, die jedoch die Antikörper-Produktion einstellten, bevor eine erfolgreiche Klonierung möglich war.

Auch eine Änderung der Methode, bei der die CD3-Depletion weggelassen wurde, um einen Verlust von Zellen bei diesem Schritt zu verhindern, führte nicht zu höheren Ausbeuten bei der Sortierung und nicht zu besseren Ergebnissen bei der EBV-Transformation. Eine Übertragung der Methode auf Patientenproben war aufgrund der im Vergleich zum buffy coat viel geringeren verfügbaren Ausgangszellzahl nicht möglich.

5.4.3 Zusammenfassung

Es konnte eine Methode entwickelt werden, mit deren Hilfe B-1-Zellen von B-2-Zellen durch FACS voneinander getrennt werden konnten. Hierbei musste v.a. eine Aktivierung der B-1-Zellen vor der Sortierung vermieden werden, da gezeigt werden konnte, dass sich die Aktivierung der Zellen unmittelbar auf die Expression des B-1 Zellmarkers CD5 auswirkt. Bei Aktivierung ist dieser dann auch auf B-2-Zellen induziert.

Die isolierte Zellzahl aus buffy coat war in den meisten Zellen zu gering, um eine erfolgreiche EBV-Infektion zu gewährleisten. In zwei Fällen konnten CD5-positive Zellkolonien nach EBV-Infektion expandiert werden. Eine Antikörper-Produktion konnte bei diesen Zellen jedoch nicht mehr nachgewiesen werden.

Eine Übertragung der Methode auf Blutproben von APS-Patienten war aufgrund der im Vergleich zum buffy coat viel geringeren Ausgangszellzahl nicht möglich.

5.5 Kofaktorabhängigkeit von APL

5.5.1 Etablierung einer Methode zur Isolierung von IgG-Fraktionen und IgG-freien Fraktionen aus Humanseren

Kofaktorabhängigkeit der Bindung an Phospholipidantigene ist mehrfach als Merkmal einiger APL beschrieben, wobei vor allem Prothrombin und β 2GPI als Proteinkofaktoren diskutiert werden (Galli et al., 1990; McNeil et al., 1990; Bevers et al., 1991; Hashimoto et al., 1992; Horkko et al., 1997; Schwarzenbacher et al., 1999; Subang et al., 2000). Es wurde postuliert,

dass Patienten mit APS gewöhnlich kofaktorabhängige APL aufweisen, während infektassoziierte APL kofaktorunabhängig seien (Matsuura et al., 1990; Ordi et al., 1993). Die Tests auf Kofaktorabhängigkeit oder –unabhängigkeit werden meist mit Seren von Infektions- oder APS-Patienten durchgeführt. Um zwischen kofaktorabhängigen und kofaktorunabhängigen APL unterscheiden zu können, werden als Testsysteme ELISAs verwendet, in deren Plattenbeschichtung die Kofaktoren enthalten sind oder nicht. Sowohl Prothrombin (bzw. dessen Spaltprodukte) als auch β 2GPI sind jedoch als natürliche Bestandteile in humanem Serum vorhanden. Bei Versuchen zu APL mit humanen Seren sind diese Kofaktoren also durch den Einsatz von Serum als zu untersuchendes Agens im Testansatz vorhanden – unabhängig davon, ob der Kofaktor in die Beschichtung der ELISA-Platte integriert ist oder nicht.

Vor diesem Hintergrund ist es sinnvoll, eine Methode zu entwickeln, die die kofaktorfremde, zumindest Prothrombin- und β 2GPI-freie, Isolierung von zu untersuchenden Antikörpern aus Patientenseren erlaubt. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit konnte eine solche Methode etabliert werden, die dann im Rahmen einer medizinischen Doktorarbeit (Marcel Lichy) erfolgreich in Untersuchungen zur Kofaktorabhängigkeit von APL von APS-Patienten und von EBV-Patienten (als Modell für eine Infektionskrankheit mit infektassoziierten APL) eingesetzt wurde.

Zur Etablierung einer Methode zur Generierung von Prothrombin- und β 2GPI-freien IgG-Fractionen wurden humane Normalseren verwendet. Die Übertragbarkeit der Methode auf Seren von APS- und EBV-Patienten wurde anschließend demonstriert.

5.5.1.1 Isolierung von IgG aus humanen Seren durch Affinitätschromatographie mit Protein A

Die Isolierung von IgG aus humanen Seren erfolgte durch Affinitätschromatographie mit Protein A. Da die Methode Teil eines standardisierten Verfahrens zur Untersuchung einer hohen Anzahl von Patientenseren sein sollte, war es wichtig, für den Chromatographieschritt eine unaufwendige, leicht zu standardisierende und auch bei hohen Patientenzahlen in angemessenem Zeitrahmen durchführbare Variante zu wählen. Dies konnte durch die Verwendung von Vivaspin Protein A Mini Spin Säulen als Chromatographie-Säulen erreicht werden. Mit Hilfe dieser Säulen können Immunglobuline innerhalb von 30 min durch aufeinander folgende Zentrifugationsschritte aus humanem Serum isoliert werden.

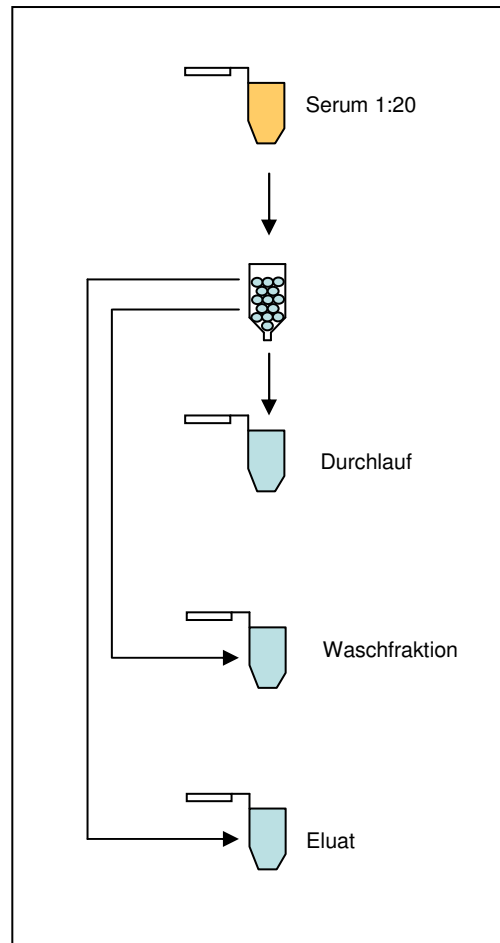


Abbildung 5-19: Isolierung von IgG mit Vivaspin Protein A Mini Spin Säulen nach Angaben des Herstellers.

Es konnte gezeigt werden, dass bei Durchführung der IgG-Isolierung mit Vivaspin Protein A Mini Spin Säulen nach Angaben des Herstellers IgG im Eluat angereichert wird. Allerdings befand sich auch in den Durchläufen und Waschfraktionen nicht isoliertes IgG. Daher wurden Durchlauf und Waschfraktion erneut auf die Protein A-Säule aufgetragen und enthaltenes IgG eluiert. Die Durchlauf- und Waschfraktionen dieses Aufreinigungsschrittes waren weitgehend IgG-frei. Dies konnte durch SDS-PAGE und Westernblot gezeigt werden (Abbildung 5-20). Das Eluat konnte anschließend mit Vivaspin 500-Säulen (10 kDa MWCO) ohne nennenswerten IgG-Verlust auf das Ausgangsvolumen des Serums ankonzentriert und auf PBS umgepuffert werden.

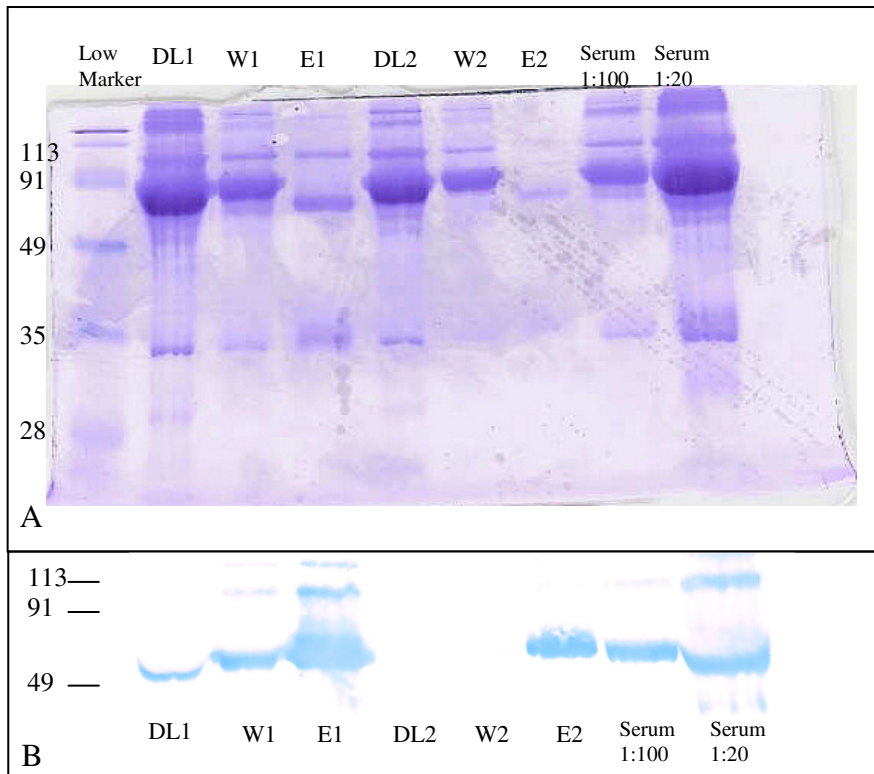


Abbildung 5-20: Isolierung von IgG aus humanem Serum mittels Vivaspin Protein A Mini Spin Säulen. DL= Durchlauf , W=Waschfraktion , E=Eluat. A) Comassie-gefärbtes SDS-Gel, B) Westernblot, Detektion der schweren Kette mit anti-human IgG (γ -chain)-AP 1:10000. Die Eluate enthalten gereinigtes IgG (schwere und leichte Kette). In der Waschfraktion und dem Durchlauf des ersten Aufreinigungszyklus ist noch IgG enthalten. Beide wurden erneut auf die Protein A-Säule aufgetragen. Mit dem resultierenden Eluat konnte weiteres IgG isoliert werden. Waschfraktion und Durchlauf des zweiten Aufreinigungszyklus sind weitgehend IgG-frei (B).

5.5.1.2 IgG-Ausbeute aus Serumproben nach Affinitätschromatographie

Die mit Hilfe der beschriebenen Methode erzielte IgG-Ausbeute aus Serumproben wurde im IgG-ELISA ermittelt und betrug durchschnittlich 90,52 % ($s = 8,07$, $n = 4$) (Tabelle 5-8). Während in den IgG-freien Fraktionen nur geringe Mengen an IgG verblieben, konnte ein Großteil des Serum-IgGs in den IgG-Fractionen wieder gefunden werden (Abbildung 5-21).

Tabelle 5-8: IgG-Konzentrationen (g/l) im Serum, der IgG-freien Fraktion und der IgG-Fraktion bei 4 Probanden (zwei gesunde Probanden und 2 APS-Patienten). Die IgG-Ausbeute beträgt in der IgG-Fraktion beträgt durchschnittlich 90,52 %.

	Serum (IgG-Konz./ g/l)	IgG-frei (IgG-Konz./ g/l)	IgG-Fraktion (IgG-Konz./ g/l)	IgG-Ausbeute (%)
Proband 1	15,21	2,28	14,99	98,55
Proband 2	8,88	1,94	7,55	85,02
Proband 3	7,56	0,41	6,22	82,28
Proband 4	9,27	0,98	8,92	96,22
Mittelwert	10,23	1,40	9,42	90,52
Standard-Abweichung (s)	3,40	0,86	3,87	8,07

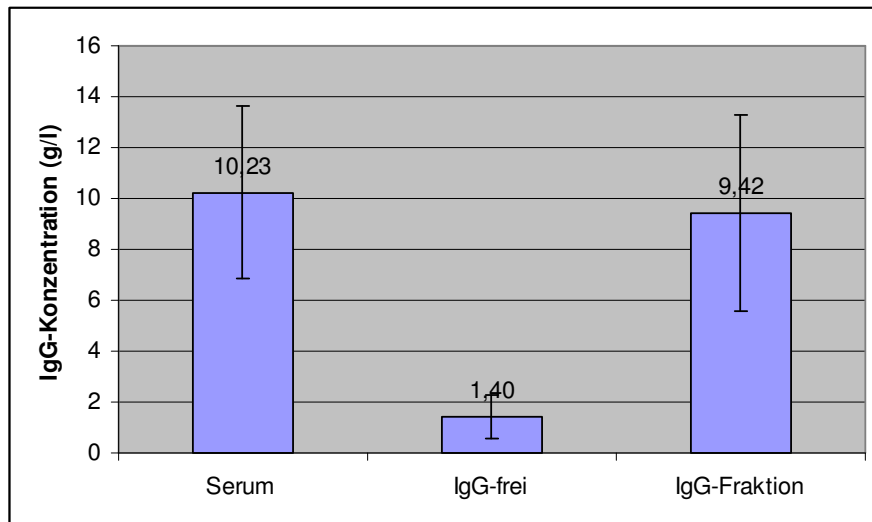


Abbildung 5-21: Durchschnittliche IgG-Konzentrationen in Serumfraktionen, IgG-freien Fraktionen und IgG-Fractionen (n=4). In den IgG-freien Fraktionen bleibt nur eine geringe IgG-Konzentration erhalten. In der IgG-Fraktion findet sich der Großteil des isolierten IgG wieder.

5.5.1.3 In den IgG-Fractionen sind keine Kontaminationen mit den bekannten Proteinkofaktoren nachweisbar

Mit der Isolierung von IgG aus Vollserum sollte ein Ausgangsmaterial zur Untersuchung der Bedeutung von im Serum vorhandenen Kofaktoren hinsichtlich ihrer Auswirkung auf das Bindungsverhalten von Antikörpern an ihr Antigen erzeugt werden. Die Antikörper mussten zu diesem Zweck also von ihrer Serumumgebung getrennt werden, um ein kontrolliertes Hinzufügen der zu untersuchenden Kofaktoren zu ermöglichen und die Abwesenheit der Kofaktoren im Ausgangsmaterial sicherzustellen.

Deshalb wurde die etablierte Methode daraufhin untersucht, ob die Abwesenheit der zu untersuchenden Kofaktoren in den IgG-Fractionen tatsächlich gewährleistet ist.

Je 10 µl einer 1:40 Serumverdünnung und entsprechend konzentrierte IgG-Fractionen wurden zu diesem Zweck einer SDS-PAGE unterzogen. Mittels Westernblot wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. In der immunchemischen Färbung unter Verwendung von anti-Prothrombin- (1:5000) und anti-β2GPI-Antikörpern (1:1000) wurde die IgG-Fraktion auf das Vorhandensein der entsprechenden Kofaktoren geprüft. Die Serumprobe diente in diesem Falle als Positivkontrolle, da sowohl β2GPI als auch Thrombin (als Spaltprodukt des Prothrombin) im Serum detektierbar sein sollten.

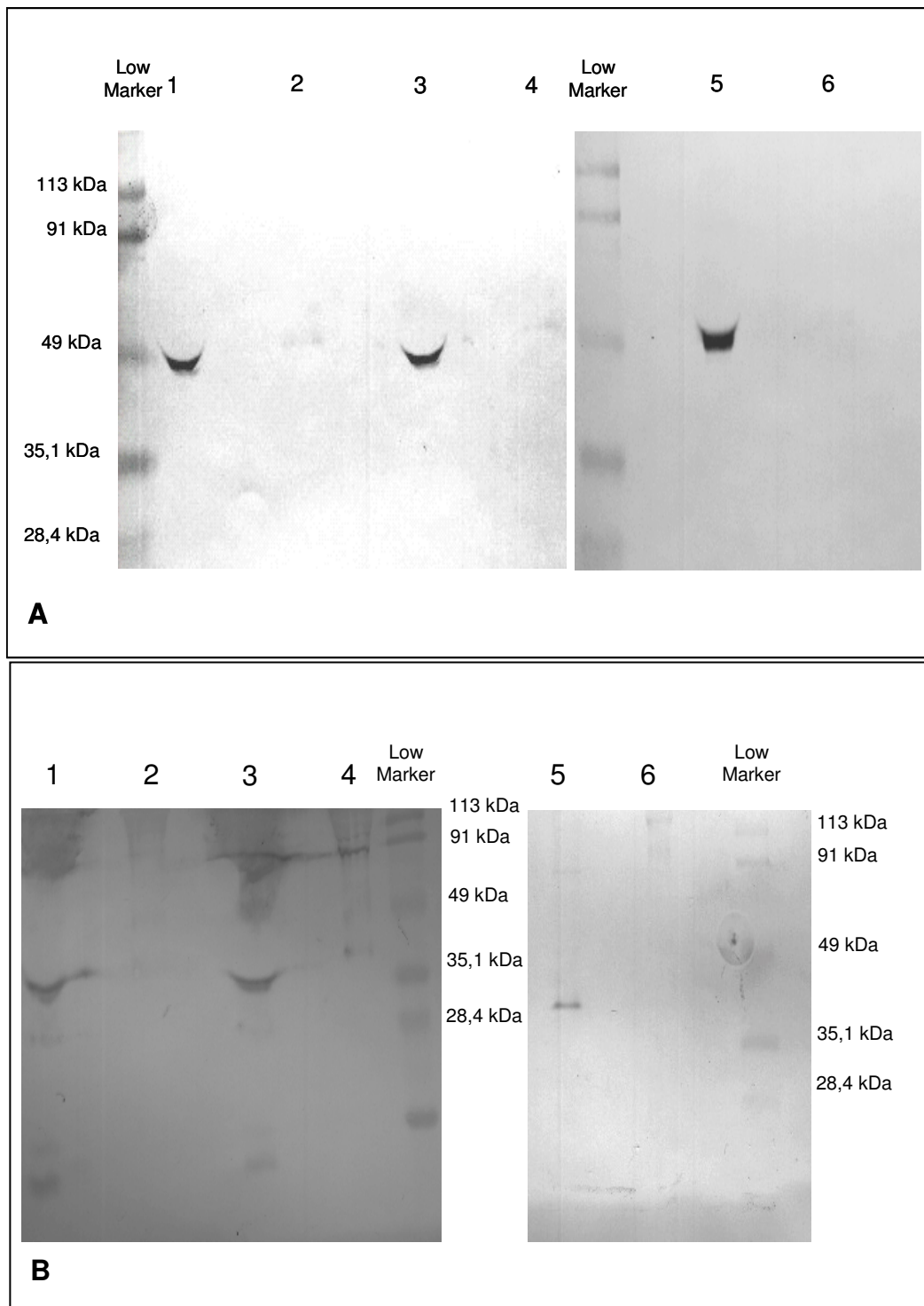


Abbildung 5-22: Untersuchung von Serum und IgG-Fractionen auf das Vorhandensein der Proteinfaktoren β 2GPI und (Pro-)Thrombin. 1= Serum (gesunder Proband), 2 = IgG-Fraktion (gesunder Proband), 3 = Serum (APS-Patient), 4 = IgG-Fraktion (APS-Patient), 5 = Serum (EBV), 6 = IgG-Fraktion (EBV). Die immunchemische Färbung erfolgte mit (A) Kaninchen Anti-Apolipoprotein H und Anti-Kaninchen-AP bzw. mit (B) Schaf Anti-Prothrombin und Anti-Schaf-AP.

(A) β 2GPI (Apolipoprotein H) ist in den Seren des gesunden Probanden, des APS-Patienten und des EBV-Patienten nachweisbar, nicht jedoch in den entsprechenden IgG-Fractionen. (B) Thrombin ist durch den polyklonalen Prothrombin-Antikörper in den Seren des gesunden Probanden, des APS-Patienten und des EBV-Patienten nachweisbar, nicht jedoch in den IgG-Fractionen.

Nachweis von β 2GPI

Im Serum von gesunden Probanden, APS-Patienten und Patienten mit frischer EBV-Infektion konnte β 2GPI im Bereich des 49kDa-Markers als deutliche Bande mit Hilfe eines Anti-ApoH-Antikörpers nachgewiesen werden (Abbildung 5-22 A). In den IgG-Fractionen ist keine spezifische Bande für β 2GPI nachweisbar. Die IgG-Fractionen sind also innerhalb der Nachweisgrenzen des Westernblots frei von β 2GPI.

Nachweis von (Pro-) Thrombin

Bei Prothrombin handelt es sich um ein 74 kDa-Protein, das im Zuge der Gerinnung durch Abspaltung eines 32 kDa-Propeptids zum aktiven Thrombin (40 kDa) umgewandelt wird. Im Serum liegen aufgrund der bereits abgelaufenen Gerinnungsreaktion ausschließlich die Spaltprodukte vor. Im Westernblot sind durch den polyklonalen Prothrombin-Antikörper, der sowohl Epitope im Präpeptid als auch im Thrombin erkennt, neben dem 32 kDa Propeptid zwei weitere Spaltprodukte erkennbar (Abbildung 5-22 B). Thrombin setzt sich aus zwei über eine Disulfidbrücke verbundenen Fragmenten von 6 kDa bzw. 34 kDa zusammen. Der für die SDS-PAGE verwendete Probenpuffer reduziert die Disulfidbrücke, so dass die Thrombinfragmente einzeln im Gel bzw. im Westernblot nachweisbar werden.

In allen Seren (gesunde Probanden, APS-Patienten und EBV-Patienten) konnte eine Bande etwas unterhalb des 35,1 kDa-Markerproteins detektiert werden. Propeptid und Thrombin sind hier nicht als distinkte Banden zu erkennen. Auch das kleinere Thrombinfragment (6 kDa) konnte (zumindest in den Seren der gesunden Probanden und der APS-Patienten) unterhalb der 14 kDa Bande sichtbar gemacht werden. In keiner der IgG-Fractionen sind spezifische Banden für Prothrombin-Spaltprodukte nachweisbar, d.h. innerhalb der Nachweisgrenzen sind die IgG-Fractionen frei von Prothrombin bzw. Thrombin.

Über die beschriebene Methode zu Isolierung von IgG aus Seren können also IgG-Fractionen erzeugt werden, die innerhalb der Nachweisgrenzen des Westernblots frei von Kontaminationen mit den für das APS beschriebenen Kofaktoren β 2GPI und Prothrombin sind. Das Vorhandensein der Kofaktoren in den Seren gesunder Probanden, APS-Patienten und EBV-Patienten konnte bestätigt werden.

5.5.2 Untersuchungen zur Kofaktorabhängigkeit von APL bei APS-Patienten und Patienten mit frischer EBV-Infektion als Modell für Patienten mit infektionsassoziierten APL: Kofaktorabhängigkeit von APL kann nur in serumfreien IgG-Fractionen bestimmt werden

Die im Rahmen der Doktorarbeit entwickelte Methode zur Generierung von serumfreien IgG-Fractionen aus humanem Serum wurde in einer medizinischen Doktorarbeit (Marcel Lichy) erfolgreich für Untersuchungen zur Kofaktorabhängigkeit von APL eingesetzt.

Hierzu wurden APL von zwei Patientengruppen untersucht: APS-Patienten und Patienten mit frischer EBV-Infektion. In der Gruppe der APS-Patienten zeigten die IgG-Fractionen Phospholipid-8Pro-ELISA einen starken Abfall der Reaktivität gegen die Lipidantigene Cardiolipin, Phosphatidylinositol und Phosphatidylserin gegenüber den Serumfractionen. Die Reaktivität gegen β 2GPI und den β 2GPI-/Cardiolipin-Komplex war nicht signifikant reduziert. Zugabe von 1% normalen humanen Serums führte zu einer Rekonstitution der Lipidreaktivität in den IgG-Fractionen (

Abbildung 5-23).

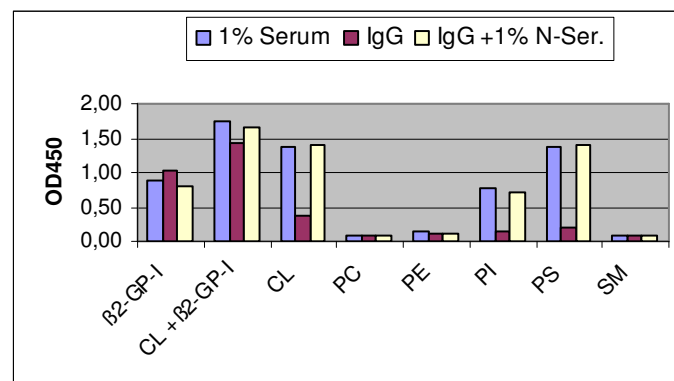


Abbildung 5-23: APS-Patienten: Die Reaktivität von Serum (1:100), IgG-Fraktion und nach Rekonstitution der IgG-Fraktion mit 1% Normalserum.

Überraschender Weise konnte auch in den IgG-Fractionen der EBV-Patienten eine Abnahme der Reaktivität gegen die Lipidantigene beobachtet werden, die durch Zugabe von 1% Normalserum nicht wieder herstellbar war (

Abbildung 5-24). Die Reaktivität scheint von einem anderen Serum-Kofaktor abhängig zu sein, der in humanem Normalserum nicht vorliegt, oder auf IgG3-Antikörper zurückzugehen, die durch Protein A-Affinitätschromatographie nicht isoliert werden.

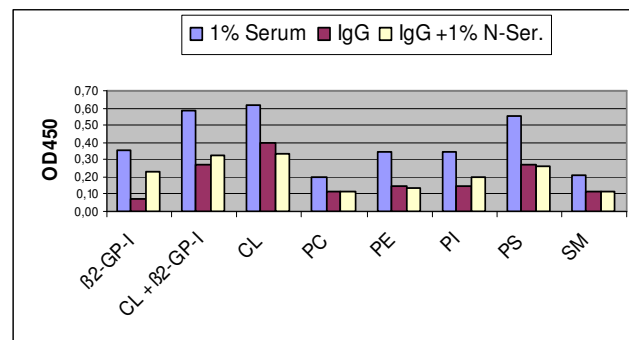


Abbildung 5-24: Patienten mit EBV-Infektion: Die Reaktivität von Serum (1:100), IgG-Fraktion und nach Rekonstitution der IgG-Fraktion mit 1% Normalserum.

Die Daten zeigen darüber hinaus, dass zur Differenzierung von Kofaktorabhängigkeit bzw. Kofaktorunabhängigkeit bei APL IgG-Fractionen als zu untersuchendes Agens eingesetzt werden müssen, da die im Serum vorhandenen Kofaktoren ausreichen, um die Bindung von kofaktorabhängigen Antikörpern an reine Lipide zu vermitteln.

5.5.3 Zusammenfassung

In der Literatur wird Kofaktorabhängigkeit bzw. –unabhängigkeit von APL als Unterscheidungskriterium zwischen pathogenen, APS-assoziierten und nicht pathogenen APL, die im Verlauf vieler Infektionskrankheiten zu beobachten sind, diskutiert.

Tests, die versuchen, kofaktorabhängige und kofaktorunabhängige APL zu diskriminieren, sind meist so strukturiert, dass die Kofaktoren in der Beschichtung der verwendeten Phospholipid-ELISAs vorhanden sind, oder eben nicht.

APL-Reaktivität, die auch bei Abwesenheit des Kofaktors nachweisbar ist, wird in diesem Zusammenhang dann als kofaktorunabhängig bezeichnet. Die im Kontext des APS diskutierten Kofaktoren (v.a. β 2GPI und Prothrombin) sind jedoch im humanen Serum, das üblicherweise in Phospholipid-ELISAs als zu untersuchendes Agens eingesetzt wird,

vorhanden. D.h. dass sie dem Reaktionsansatz – unabhängig von der Beschichtung der ELISA-Platte – zugesetzt werden und eine Unterscheidung zwischen Kofaktorabhängigkeit und –unabhängigkeit auf diese Weise nicht möglich sein sollte.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, eine schnelle, routinetaugliche Methode zur Isolierung von IgG-Fractionen aus humanem Serum zu entwickeln. Diese IgG-Fractionen sind frei von Prothrombin (und dessen Spaltprodukten) und von β 2GPI. Die Methode ist bei Serum von gesunden Probanden, von APS-Patienten und von EBV-Patienten (als Modell für Infektionspatienten mit erhöhtem APL-Titer) anwendbar. Sie konnte in einer medizinischen Doktorarbeit (Marcel Lichy) eingesetzt werden, um die Kofaktorabhängigkeit von APL bei APS-Patienten und einen Unterschied in der Kofaktorabhängigkeit zwischen APS- und EBV-Patienten zu demonstrieren.

6 Diskussion

6.1 Generierung von drei monoklonalen Hybridomzelllinien aus Patienten mit APS, die APL vom IgM-Typ produzieren

Ein Ziel der Arbeit war, monoklonale APL vom IgM- und IgG-Typ aus dem peripheren Blut von APS-Patienten zu klonieren und stabil produzierende Hybridome zu generieren. Um dieses Ziel zu erreichen wurde in der vorliegenden Arbeit die so genannte EBV-Hybridom-Technik angewandt. Hier wird die Transformation von B-Zellen mit EBV mit der Fusion der B-Zellen mit einer Myelomzelllinie kombiniert. Mit Hilfe dieses Verfahrens konnten drei monoklonale Zelllinien, die APL produzieren, etabliert werden: JGG9, HLC9 und HVA2. JGG9 wurde aus dem Blut einer Patientin mit sekundärem APS (assoziiert mit SLE) generiert, während HLC9 und HVA2 jeweils auf Patienten mit der Diagnose eines primären APS zurückgehen. Bei allen drei Antikörpern handelt es sich um Antikörper des IgM-Types. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden keine Zelllinien etabliert, die monoklonale IgG-APL produzieren.

Allgemein werden Versuche zur Funktionalität von autoreaktiven Antikörpern und APL im Speziellen entweder mit polyklonalem Patientenserum oder mit monoklonalen Antikörpern (wie oben beschrieben) durchgeführt. Während die Verwendung polyklonaler Antikörper die Untersuchung von Auswirkungen auf unterschiedliche Systeme (z.B. auf das Gerinnungssystem oder auf unterschiedliche Zelltypen) erlaubt, ist eine Korrelation der beobachteten Effekte mit bestimmten strukturellen Merkmalen der Antikörper nicht möglich, da es sich um sehr heterogene Antikörpergemische handelt. Um den Zusammenhang bestimmter funktioneller Eigenschaften der APL mit strukturellen Charakteristika zu analysieren und einen tieferen Einblick in autoimmunologische Pathomechanismen zu erhalten, werden beim APS wie auch bei anderen Autoimmunerkrankungen monoklonale Antikörper für Experimente herangezogen.

Die Generierung von humanen Zelllinien, die stabil monoklonale Antikörper produzieren, ist bis heute nicht so standardisiert und effizient, wie die Erzeugung von entsprechenden murinen Zelllinien. Probleme liegen hier in der geringen Anzahl von antigen-spezifischen Zellen im

peripheren Blut und in der limitierten Anzahl der zur Erzeugung von Hybridomen zur Verfügung stehenden Fusionspartner.

Häufig werden Methoden, die die Proliferation der B-Zellen anregen, mit der Fusion dieser Zellen mit einer Myelomzelllinie kombiniert. Die Anregung der Proliferation ist möglich durch Zugabe von B-Zell-Mitogenen, durch Stimulierung des CD40-Systems und durch Infektion der B-Zellen mit EBV. Letzteres führt per se zur Transformation und Immortalisierung der B-Zellen, die dann stabil monoklonale Antikörper produzieren. Durch die Kombination mit der Zellfusion werden jedoch die Stabilität der resultierenden Zelllinien und deren Antikörperproduktion gesteigert (Frade et al., 1985).

Die Kombination der EBV-Transformation mit der Fusion mit murin-humanen Heteromyelomzelllinien hat sich als Standardmethode zur Etablierung humaner Hybridome, auch für die Untersuchungen zur Bedeutung von funktionellen und strukturellen Eigenschaften autoreaktiver Antikörper in Autoimmunprozessen, durchgesetzt. Die Vorschaltung der EBV-Infektion führt zur Proliferation und damit zu einer erhöhten Ausgangszellzahl für die anschließende Fusion. Darüber hinaus wird durch den proliferativen Status der Zellen die Effizienz der Fusion erhöht (Johnson und Rao, 1970; Andersson und Melchers, 1978).

Im Rahmen der Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit fiel auf, dass die EBV-Hybridom-Technik Schwachstellen aufweist. Ziel der Methode ist es, möglichst pathogenetisch relevante Antikörper zu isolieren und in unbegrenzter Zahl für weitere Untersuchungen zu konservieren. Hier stößt die EBV-Hybridomtechnik an vier Grenzen, nämlich hinsichtlich der Effizienz, der Spezifität, der pathogenetischen Relevanz und der Stabilität der generierten Hybridome.

Im Verlauf der Arbeit zeigte sich sehr schnell, dass trotz einer hohen Anzahl von APS-Patienten, die eine Blutprobe zur Generierung von APL produzierenden Hybridomen zur Verfügung stellten, nur drei stabile Hybridomzelllinien etabliert werden konnten, die ausschließlich IgM-Antikörper produzieren. Diese geringe Effizienz wurde schon in anderen Arbeiten beschrieben (Niedbala und Stott, 1998; von Landenberg, 1999). Um die Effizienz der Hybridomgenerierung zu erhöhen, wurde die herkömmliche PEG-Fusion der B-Zellen mit den Heteromyelomzellen durch die Elektrofusion ersetzt. Für die Zellfusion mit PEG wird eine sehr hohe Lymphozytenanzahl benötigt. Um diese Zellzahl zu erreichen, müssen positive EBV-infizierte B-Zellkolonien mehrere Wochen wachsen. In dieser Zeit besteht die Gefahr,

dass die Zellpopulationen ihre Antikörper-Sekretion einstellen oder von nicht sezernierenden Zellen überwachsen werden. Für die Elektrofusion wird eine viel geringere Zellzahl pro Fusionsansatz benötigt, d.h. die Fusion kann vor dem möglichen Verlust von APL produzierenden Zellen durchgeführt werden. Auch hinsichtlich der Fusionsrate ist die Elektrofusion die effizientere Methode. Die Zelllinien JGG9, HLC9 und HVA2 wurden jeweils mit Hilfe der PEG-Fusion etabliert. In nachfolgenden Arbeiten konnte eine leicht gesteigerte Effizienz durch Einsatz der Elektrofusion beobachtet werden.

Eine weitere Effizienzsteigerung ist wünschenswert.

Zur Etablierung von Zelllinien, die monoklonale APL produzieren, muss eine möglichst hohe Anzahl an lipidreaktiven B-Zellen immortalisiert und erfolgreich mit einer Myelomzelllinie fusioniert werden. Als Ausgangsmaterial steht der heterogene B-Zell-Pool des peripheren Bluts zur Verfügung. Die Frequenz bestimmter Antigen-spezifischer B-Zellen im peripheren Blut, die für die Fusion zur Verfügung stehen, wurde auf 10^{-4} bis 10^{-6} geschätzt (Thompson et al., 1986; James und Bell, 1987). Diese Zahl ist abhängig vom Antigen und vom Immunstatus des Donors, aber auch während aktiver Perioden einer Autoimmunerkrankung wird die Anzahl Autoantigen-spezifischer aktivierter B-Zellen im peripheren Blut als extrem gering vermutet (Niedbala und Stott, 1998). D.h., dass nur ein sehr geringer Anteil der in die EBV-Transformation und die Fusion eingebrachten Zellen überhaupt die gewünschte Spezifität aufweist. Eine Transformation und Immortalisierung durch EBV wird bei etwa 1 % der mit dem Virus infizierten Zellen erzielt (Frade et al., 1985) und auch die Fusionsrate ist – abhängig von der Fusionsmethode - relativ gering (Perkins und Fong, 1995). Die Generierung einer Hybridomzelllinie mit der gewünschten Lipid-Spezifität gleicht vor diesem Hintergrund einer Suche nach der Nadel im Heuhaufen. Als zukünftige Alternative hierzu kann eine relativ neue Methode dienen, die sich allerdings noch nicht allgemein durchgesetzt hat. Mit Hilfe dieser Methode (Lieby et al., 2001) werden die B-Zellen mit der gewünschten Spezifität zunächst gezielt aus dem peripheren Blut isoliert und angereichert. Dazu werden lipidreaktive B-Zellen mit Liposomen markiert und durch FACS vereinzelt. In einer anschließenden Einzelzell-RT-PCR wird die variable Region des monoklonalen APL kloniert, und rekombinante Antikörper werden mittels eines Baculo-Virus-Expressionssystems in Insektenzellen exprimiert.

Die im Rahmen der experimentellen Arbeiten mangelnde Ausbeute an monoklonalen IgG-produzierenden Hybridomen kann mit der EBV-Transformation in Zusammenhang stehen. Es wurde beschrieben, dass die EBV-Transformation im Vergleich zur Stimulation des CD40-Systems zur Induktion eines proliferativen Status häufig in solchen Zelllinien resultiert, die niederaffine IgMs sezernieren (Niedbala und Stott, 1998). Man geht davon aus, dass die durch EBV immortalisierten B-Zell-Linien auf eine distinkte B-Zell-Subpopulation zurückgehen. Dem beschriebenen Charakter der zugehörigen Antikörper nach könnte es sich hier um B-1-Zellen handeln.

Die Stimulierung des CD40-Systems erfolgt über Ligation des CD40-Moleküls mit dem CD40-Ligand (CD40L) oder einem monoklonalen Antikörper gegen CD40. Der Kultur wird im beschriebenen System außerdem Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin 10 (IL-10) zugegeben (Darveau et al., 1993). Der direkte Vergleich der EBV-Transformation mit der Stimulation des CD-40-Systems als Vorbereitung zur Herstellung Antikörper produzierender Hybridome zeigt, dass die Ausbeute an IgG-sezernierenden Zellen bei Stimulation des CD40-Systems höher liegt (Niedbala und Stott, 1998). Allerdings wurde nachgewiesen, dass die Kultur von B-Zellen mit IL-4, IL-10 und CD40-Antikörpern zum Klassenswitch *in vitro* führten (Splawski et al., 1993). Der hohe Anteil an IgG-produzierenden Zellen geht also zumindest teilweise nicht auf Fusion von schon *in vivo* IgG-sezernierenden Zellen mit den Myelomzellen zurück, sondern auf Zellen, die *in vivo* IgM produziert und die Antikörperproduktion erst unter *in vitro*-Bedingungen auf IgG-Sekretion umgestellt haben.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, monoklonale autoreaktive Antikörper zu generieren und deren Eigenschaften in Zusammenhang zu ihrer möglichen Bedeutung *in vivo* zu stellen. Die Stimulierung des CD40-Systems stellt hier keine Alternative dar, da wesentliche strukturelle Veränderungen *in vitro* erfolgen und die Antikörper nicht mehr die *in vivo*-Situation widerspiegeln.

Vor dem Hintergrund, dass schon mehrfach die Isolierung von APL auch aus Gesunden beschrieben wurde, dass APL transient bei vielen Infektionen auftauchen und dass jeder Gesunde über ein natürliches Autoantikörper-Repertoire verfügt, stellt sich die Frage, ob die generierten APL überhaupt eine Rolle in der Pathogenese des APS spielen. Auch hier steht am Anfang eine rein statistische Überlegung. Wie schon beschrieben ist der Anteil der für das gesuchte Antigen spezifischen Zellen im peripheren Blut gering. Beim APS handelt es sich hier um lipidreaktive B-Zellen. Diese in ihrer Anzahl schon geringen APL setzen sich zusammen aus infektassoziierten Antikörpern (es ist nicht bekannt, ob Patienten zum

Zeitpunkt der Blutentnahme an Infektionen leiden), natürlichen Autoantikörpern und für das APS relevanten Antikörpern. Wenn also die erfolgreiche Fusion von APL produzierenden Antikörpern schon selten ist, ist die Wahrscheinlichkeit zur Generierung pathogenetisch relevanter APL noch geringer. Hinzu kommt der schon beschriebene Bias durch die EBV-Infektion, die bevorzugt für eine B-Zell-Subpopulation erfolgt. Dieser Bias ließe sich durch die Methode von Lieby *et al.* (Lieby et al., 2001) umgehen, da hier auf die Selektion der lipidreaktiven B-Zellen eine direkte Klonierung und rekombinante Expression der V-Regionen folgt, ohne eine EBV-Infektion zwischenschalten. Diese Methode konnte allerdings auch dafür verwendet werden, APL aus gesunden Probanden zu gewinnen (Pasquali et al., 2004). D.h. der durch die EBV-Infektion hervorgerufene Bias hin zu einer wohlmöglich pathogenetisch uninteressanten B-Zell-Population kann zwar überwunden werden; die Generierung von monoklonalen Antikörpern auch aus dieser Population ist jedoch nicht ausgeschlossen. Dies wird besonders deutlich in einer späteren Arbeit von Lieby *et al.* (Lieby et al., 2004), in der mit der beschriebenen Methode aus einem APS-Patienten 5 monoklonale Antikörper generiert wurden. Nur einer davon war in der Lage, in einem Tiermodell mit schwangeren Mäusen fötale Resorption zu induzieren.

Wenn also tatsächlich die Generierung von pathogenen APL erzielt werden soll, muss zu einem möglichst frühen Zeitpunkt eine Methode zum Nachweis der Pathogenität eingeschaltet werden. Hier gilt die Fähigkeit eines Antikörpers, im Tiermodell das APS zu erzeugen, als Pathogenitätsnachweis (Lieby et al., 2004). Allerdings ist auch hier zu bedenken, dass bisher noch nicht hinreichend geklärt ist, was genau für die Pathogenität der APL zuständig ist, und ob hier tatsächlich strukturelle Eigenschaften eine Rolle spielen oder ob z.B. die Dauer des hochtitrigen Vorhandenseins der Antikörper im Blut von Bedeutung ist.

Im Rahmen der Wachstumsversuche mit den drei Hybridomzelllinien fiel immer wieder auf, dass sie nach einer längeren Kultivierungszeit sowohl die Antikörper-Produktion als auch die Wachstumsrate reduzieren oder einstellen. Diese Beobachtung ist kongruent mit allgemeinen Beschreibungen von humanen Hybridomzelllinien. Es wurde beschrieben, dass humane Hybridome nach Immortalisierung und Klonierung dazu neigen, Chromosomen zu verlieren. Dadurch kann das Wachstum der Zellen beeinträchtigt werden und die Fähigkeit zur Antikörperproduktion verloren gehen (Niedbala und Stott, 1998). Aus diesem Grund müssen humane Hybridomzelllinien häufig rekloniert werden, um noch stabil produzierende und wachsende Zellen von „inaktiven“ Hybridomen zu trennen. Dies war auch für JGG9, HLC9 und HVA2 der Fall. Bezüglich der mangelnden Stabilität der humanen Hybridome ist

wiederum die Methode von Lieby *et al.* eine Alternative, da das rekombinante Expressionssystem eine stabile Antikörperproduktion ermöglicht (Lieby *et al.*, 2001).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Generierung von monoklonalen APL unterschiedlicher Genese, was mit Hilfe der EBV-Hybridomtechnik gelungen ist. Unabhängig von der pathogenetischen Relevanz und dem durch die EBV-Infektion gegebenenfalls verursachten Bias konnte für alle drei APL (JGG9, HLC9 und HVA2) in *in vitro*-Untersuchungen eine Lipidreaktivität nachgewiesen werden. Besonders neuere Entwicklungen auf dem Gebiet der Technologien zur Gewinnung von humanen monoklonalen Antikörpern zeigen jedoch, dass hinsichtlich der Methodik Verbesserungen noch möglich sind. Auf eine pathogenetische Relevanz der entwickelten Antikörper kann nicht geschlossen werden. Die entwickelten Antikörper standen für weitere strukturelle und funktionelle Untersuchungen zur Verfügung.

6.2 Strukturelle Charakterisierung der APL JGG9, HL5B und HVA2

Die im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit generierten APL wurden zunächst hinsichtlich ihrer Bindung an unterschiedliche Phospholipide und an β 2GPI, den für im Kontext des APS vorkommenden Antikörper wichtigsten Proteinkofaktor, untersucht. Dies geschah *in vitro* mit Hilfe eines Phospholipid-ELISAs.

Es zeigt sich, dass JGG9 als einziger der drei Antikörper β 2GPI-abhängig ist. JGG9 zeigt das typische Bindungsprofil, das für APS-assoziierte Antikörper häufig beschrieben wird: Er erkennt unter einer Auswahl von Phospholipiden spezifisch Cardiolipin, wenn es in Verbindung mit β 2GPI auftritt. Das β 2GPI alleine wird nicht oder nur schwach erkannt.

HVA2 und HLC9 hingegen binden schwach an alle auf der Mikrotiterplatte immobilisierten Lipide, nicht jedoch an β 2GPI. Die Reaktivität, die jeweils gegen den Komplex aus β 2GPI und Cardiolipin gerichtet ist, ist wahrscheinlich auf die weniger spezifische Bindung an das Lipid zurückzuführen. Vor dem Hintergrund der Diskussion, dass β 2GPI-abhängige APL als die Antikörper anzusehen sind, die unabhängig von ihrer pathogenetischen Relevanz die für das APS kennzeichnenden Antikörper sind, stellt sich JGG9 bezüglich seines Bindungsprofils folglich als APS-assoziiertes Antikörper da, während HVA2 und HLC9 mit ihrer unspezifischeren Bindungsfähigkeit an unterschiedliche Lipide, aber nicht an Protein-Antigene, in das Bild natürlicher, polyspezifischer Autoantikörper bzw. eines infektassoziierten APL passen.

Die molekulargenetische Analyse der zugehörigen Sequenzen der variablen Regionen der APL unterstützte dieses Bild: JGG9 zeigte eine wesentlich höhere Mutationsrate als HLC9 und HVA2.

Dies bezieht sich vornehmlich auf die schwere Kette des Antikörpers. Die variable Region der JGG9- μ -Kette gehört zur VH3-Familie, einer Familie, die bei einem Vergleich von bei Antikörpern von Gesunden und von SLE-Patienten vorkommenden V-Gen-Familien in beiden Gruppen sehr häufig gefunden wurde (de Wildt et al., 2000) und allgemein prädominiert. Als verwendete Gensegmente wurden DP-53 als homologes V-Segment und JH3 als homologes J-Segment identifiziert. Ein homologes D-Segment konnte weder über VBASE noch über Ig-Blast gefunden werden. Besonders für die Suche nach homologen V-Gen-Sequenzen mit VBASE wurde die Schwierigkeit der Zuordnung eines homologen D-Segmentes bereits beschrieben (Giles et al., 2003). Dies ist auf die der VBASE-Datenbank zugrunde liegende Software zum Sequenz-Alignment, DNAPLOT, zurückzuführen. Diese Software setzt zur sicheren Identifikation von homologen DNA-Sequenzen sehr stringente Kriterien ein. Wenigstens 10 aufeinander folgende Nukleotide müssen hier im Allgemeinen identisch sein, um ein D-Segment seiner entsprechenden Keimbahnsequenz zuzuordnen. Dies ist im Falle der D-Segmente abhängig von der Länge der hypervariablen Schleife H3, die CDR3 enthält, und der junktionalen Diversität der direkt an das unter Umständen sehr kurze D-Segment (z.B. 20 Nukleotide bei D6-13) angrenzenden Sequenzabschnitte schwierig. Ig-BLAST geht standardmäßig von einem Erwartungswert von $1 \cdot 10^{-5}$ für zufällige Nukleotidübereinstimmungen in einer Sequenz aus, d.h. auch hier werden stark mutierte D-Segmente nicht als homolog erkannt. Es besteht die Möglichkeit, den Erwartungswert zu ändern und so auch weniger ähnliche Sequenzen in die Suche mit einzubeziehen. Allerdings sinkt dann die Wahrscheinlichkeit, dass das korrekte D-Segment identifiziert wird.

Durch Alignment der JGG9-Sequenz für die variable Region der schweren Kette mit DP-53 und JH3 mit Hilfe der HUSAR-Software (HUSAR = Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources) konnten mehrere Nukleotidabweichungen von der Keimbahn-Sequenz und auch Insertionen in der JGG9-Sequenz gezeigt werden. Dies schlägt sich auf DNA-Ebene in einer Homologie von nur 92,3 % nieder. Auf Proteinebene liegt eine noch geringere Homologie von 76,9 % vor. Zwei der auf DNA-Ebene vorliegenden Mutationen (eine in CDR1 und eine in CDR2) münden sich nicht in einem Aminosäureaustausch – es handelt sich also um stille Mutationen. Auffallend viele Aminosäureaustausche finden sich in den *framework*-Regionen

FR3 und FR4 und nur 6 von 28 sind in CDR lokalisiert. Der Grund für die auf Proteinebene sehr niedrige Homologie der JGG9-Sequenz zur Keimbahnsequenz liegt v.a. in der hohen Rate an Insertionen, die eine Leserasterverschiebung auslöst. Der Vergleich der DNA-Sequenzen von JGG9 und den korrespondierenden Keimbahnsequenzen zeigt die Insertion von 14 Nukleotiden innerhalb des V- und des J-Segmentes, von denen sich 11 in *framework*-Regionen befinden. Hinzu kommen 12 zwischen V- und J-Segment inserierte Nukleotide, die auf N-Nukleotide oder das nicht identifizierte D-Segment zurückzuführen sind. Es ist nicht davon auszugehen, dass P-Nukleotide an den Verbindungsstellen zwischen den einzelnen Gensegmenten eingefügt wurden, da in diesem Fall palindrome Sequenzen der angrenzenden Gensegment-Sequenzen zu finden sein müssten, was nicht der Fall ist. Bei den sich zwischen V- und J-Segment befindenden eingefügten Nukleotiden handelt es sich also um eine auf das D-Segment zurückgehende Sequenz oder um N-Nukleotide.

Die für die Leserasterverschiebung ursächlichen Insertionen sind per se untypisch für antigengesteuerte somatische Mutationen. Unterstützt wird die Vermutung, dass die vorliegenden Mutationen nicht auf antigengesteuerte Prozesse zurückzuführen sind, dadurch, dass sich diese Mutationen hauptsächlich auf FR-Regionen beziehen und sich nicht in den primären Antigen-Kontaktstellen, den CDRs, häufen. Eine Untersuchung der Antigen-Steuerung mit Hilfe der verwendeten statistischen Methoden ist daher nicht möglich.

Die Leserasterverschiebung führt nicht zu einem Stopp-Codon, d.h. es ist davon auszugehen, dass auf Grundlage der analysierten Sequenz ein funktioneller Antikörper exprimiert wird. Obwohl die pathogenetische Relevanz von JGG9 noch nicht gezeigt ist, ist es interessant, dass es sich bei dem Antikörper mit den auffälligsten Mutationen um den aus der Patientin mit der schwerwiegendsten APS-Symptomatik handelt. Von Insertionen und Deletionen in FR-Regionen wird nur selten berichtet. Für einen funktionellen monoklonalen Autoantikörper aus einem Mausmodell zur Autoimmunität, der MRL/lpr-Maus, wurden Deletionen und ein hoher Grad an Insertionen in FR-Regionen beschrieben (Kimura et al., 1995). Abgesehen von diesen Mutationen ist der Antikörper einem weiteren monoklonalen Maus-Antikörper mit Rheumafaktor-Aktivität sehr ähnlich. Er ist in der Lage, in der IL-3-abhängigen Zelllinie FDC-P2/185-4 die Produktion von IL-3, IL-6 und TNF- α zu induzieren, was durch die Fähigkeit zur Induktion der Cytokin-Produktion auf Fc γ -Rezeptor exprimierenden Zellen erklärt wird (Kimura et al., 1995). Die Gruppe Kimura *et al.* schließt aus ihren Beobachtungen hinsichtlich der Insertionen, dass – obwohl es allgemein akzeptiert ist, dass die Spezifität und Affinität von Antikörpern hauptsächlich auf die CDR-Sequenz zurückzuführen ist – es möglich sei, dass auch die FR-Regionen von Autoantikörpern eine

kritische Rolle in der Pathogenität und der Spezifität im Rahmen von Autoimmunerkrankungen spielen. Eine Arbeit von Simon und Rajewski (Simon und Rajewsky, 1992) konnte zeigen, dass die artifizielle Insertion von vier Aminosäureresten in die FR-Region eines Antikörpers die Sekretion des Antikörpers und dessen Biosynthese nicht beeinträchtigt und dass Variationen in der Länge der variablen Region auch auf Insertionen im Bereich der FR-Regionen zurückgehen können. Dies unterstützt, dass es sich bei JGG9 um einen Antikörper handeln kann, dessen Sekretion durch strukturelle Veränderungen nicht beeinträchtigt wird. Eine Untersuchung der Pathogenität dieses so auffällig mutierten APL im Tiermodell wäre interessant. Sollte sich Pathogenität nachweisen lassen, könnte durch ortsspezifische Mutagenese (*site-directed Mutagenesis*), anschließende Expression des Antikörpers und Untersuchungen sowohl der Bindungseigenschaften als auch der Pathogenität Aufschlüsse über die Bedeutung der Insertionen gewonnen werden.

Die leichte Kette von JGG9 zeigt keinen hohen Grad an Mutationen. Auch sind keine Insertionen zwischen V- und J-Segment zu finden.

Die zwei Antikörper, die das typische Bindungsprofil eines natürlichen Autoantikörpers zeigen (Polyspezifität), HLC9 und HVA2, zeigen ausschließlich Basenaustausche als Mutationen. Die bei JGG9 beobachteten FR-Insertionen sind hier nicht zu finden. Während die leichte Kette von HVA2 nahezu identisch zur Keimbahnsequenz ist, findet sich bei HLC9 in der leichten Kette nur eine Homologie von 97,86 % auf DNA-Ebene bzw. 95,41 % auf Proteinebene. Die Verteilung der R-Mutationen lässt jedoch darauf schließen, dass es sich hier nicht um einen antigengesteuerten Prozess handelt und die Mutationen einen zufälligen Mutationsprozess widerspiegeln. Dies ergibt sich sowohl bei Zugrundelegen eines binomialen Verteilungsmodells, als auch unter Verwendung eines multinomialen Verteilungsmodells (Lossos et al., 2000). Auffallend sind sowohl bei HLC9 als auch bei HVA2 die Mutationen der schweren Ketten: Die Mutationsrate in den CDR-Regionen liegt sowohl bei Annahme einer binomialen, als auch einer multinomialen Verteilung signifikant über dem Erwartungswert. Dies spricht für einen antigengesteuerten Prozess, d.h. mit hoher Wahrscheinlichkeit haben HLC9 und HVA2 schon Kontakt mit ihrem Antigen gehabt. Die Frage liegt nahe, warum sich keine höhere Spezifität und Affinität bezüglich der Antigene zeigt, sondern beide APL niedrigaffin und polyspezifisch ihre Antigene erkennen. Hier ist der Erklärungsansatz denkbar, dass die im ELISA erkannten Antigene nicht die Hauptantigene für HLC9 und HVA2 darstellen. Es ist denkbar, dass die Antikörper ein anderes Antigen, das auf der ELISA-Platte nicht vorhanden ist, viel besser erkennen. Es

wurde schon seit den 1940ern diskutiert, dass Antikörper durch konformationale Diversität in der Lage sind, multiple Strukturen anzunehmen, dass also verschiedene Isomere eines Antikörpers unterschiedliche Antigene erkennen können oder dass von einem Antikörper verschiedene Isomere existieren, die unterschiedliche Antigene erkennen. Ersteres würde Antikörpern ermöglichen, zwischen der niedrigaffinen Bindung polyspezifischer Antigene und der hochaffinen, hochspezifischen Bindung eines anderen Antigens zu wechseln. James *et al.* haben isomere Formen eines Antikörpers beobachtet, die sich unabhängig vom Antigen gebildet haben, und dazu führten, dass ein spezifisches Antigen durch diesen Antikörper hochaffin, und mehrere weitere niedrigaffin gebunden wurden (James et al., 2003). Die Gruppe postuliert, dass zwischen zwei isomeren Formen des Antikörpers ein Äquilibrium besteht, das durch Vorhandensein des einen oder anderen Antigens zur Prädominanz des jeweils bindenden Isomers verschoben wird. Eine Rolle dieses Mechanismus in der Autoimmunität wird diskutiert. Hier geht man davon aus, dass das Gleichgewicht eines potentiell autoreaktiven Antikörpers durch die Anwesenheit eines bakteriellen Antigens vom selbstreaktiven Isomer zum Isomer, das das bakterielle Antigen erkennt, verschoben wird. Bei späterer Abwesenheit des Antigens wäre der Antikörper frei zur Autoantigenbindung und das Äquilibrium würde in diese Richtung verschoben. Betrachtet man nun HLC9 und HVA2, ist es möglich, dass das spezifische Antigen (z.B. ein bakterielles), das auch Ursache für die antigengesteuerten Prozesse sein kann, noch nicht bekannt ist und die erkannten Phospholipide durch eine weitere isomere Form der Antikörper erkannt werden. Zur Identifizierung eines möglichen hochspezifischen Bindungspartners könnte eine Antigen-Bank, die möglichst viele potentielle Antigene erhält verwendet werden. Sollte hier ein spezifisches Antigen gefunden werden, das kein Autoantigen ist, sollte die Pathogenität von HLC9 und HVA2 im Tiermodell überprüft werden. Sollte Pathogenität nachweisbar sein, können die Ergebnisse die oben beschriebene These von James *et al.* unterstützen. Während das Vorhandensein somatischer Hypermutation aufgrund antigengesteuerter Prozesse im Rahmen des APS häufig auf den Kontakt des Antikörpers mit seinem Autoantigen zurückgeführt wird, könnte es unter der noch zu zeigenden Prämisse, dass HLC9 oder HVA2 pathogenetisch relevant sind, ein Zeichen dafür sein, dass im Rahmen einer Abwehrreaktion ein Antikörper induziert wurde und gereift ist, dessen Isomer Phospholipide erkennt und somit zur Entwicklung einer Autoimmunerkrankung beiträgt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Sequenzen der generierten APL mit Hilfe unterschiedlicher statistischer Methoden auf das Vorhandensein von auf antigengesteuerte

Prozesse zurückgehenden Mutationen geprüft. Hierzu wurden Arbeiten von Shlomchik *et al.*, Chang und Casali und Lossos *et al.* herangezogen (Shlomchik *et al.*, 1987; Chang und Casali, 1994; Lossos *et al.*, 2000). Während Shlomchik *et al.* und Chang und Casali eine binomiale Verteilung zugrunde legen, wählen Lossos *et al.* ein multinomiales Verteilungsmodell. Da sowohl Shlomchik *et al.*, als auch Chang und Casali bei ihren Berechnungen nur die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines bestimmten Ereignisses berechnen ($P(k)$), nicht jedoch, ob ein beobachteter Wert an R_{CDR} -Mutationen signifikant von einem erwarteten Wert abweicht, kann mit den so vorgestellten Methoden ein antigengesteuerter Prozess nicht nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit ein exakter Binomialtest verwendet, um vorhandene Abweichungen auf ihre Signifikanz zu prüfen. Da die R_f -Werte für die vorliegenden Keimbahnsequenzen nicht zur Verfügung standen, musste auf den angenäherten Wert $R_f = 0,75$ (Jukes und King, 1979) zurückgegriffen werden. Der exakte Binomialtest wurde einseitig und zweiseitig durchgeführt. Vor dem Hintergrund, dass ein antigengesteuerter Selektionsdruck für und gegen R-Mutationen in CDR-Regionen agieren kann, wie auch Bose und Sinha beschreiben (Bose und Sinha, 2005), ist ein zweiseitiger Test zu bevorzugen, der sowohl Abweichungen vom Erwartungswert nach oben, als auch nach unten berücksichtigt.

Lossos *et al.* gehen von vier Verteilungsmöglichkeiten aus und legen dementsprechend ein Multinomialmodell zugrunde: R- und S-Mutationen in FR- oder CDR-Regionen. Abweichungen der Anzahl der beobachteten R_{CDR} -Mutationen und R_{FR} -Mutationen von den jeweiligen Erwartungswerten werden auf ihre Signifikanz geprüft. Allgemein gelten die CDR-Regionen als die Antigen-Kontaktstellen der Antikörper, die im Gegensatz zu den FR-Regionen somatischer Hypermutation unterliegen können. antigengesteuerte Prozesse sollten sich folglich hauptsächlich hier wiederfinden. Es stellt sich daher die Frage, ob es überhaupt sinnvoll ist, die R_{FR} -Mutationen in statistische Auswertungen einzubeziehen, oder ob ein binomiales Modell, das ausschließlich R_{CDR} -Mutationen in Betracht zieht, ausreichend ist. MacCallum *et al.* konnten zeigen, dass nicht nur die CDR-Regionen, sondern auch Reste innerhalb der FR-Regionen als Antigen-Kontaktstellen fungieren (MacCallum *et al.*, 1996). Vor diesem Hintergrund ist es sinnvoll, auch Mutationen in den FR-Regionen zu berücksichtigen. Allerdings ist es hier unabdingbar, die unterschiedlichen Suszeptibilitäten der FR- und CDR-Regionen in Kalkulationen mit einzubeziehen, wie es auch bei Lossos *et al.* durch Verwendung der Sequenz-inhärenten R_f -Werte gemacht wird. MacCallum *et al.* zeigen jedoch auch, dass nicht alle CDR-Reste an der Antigenbindung beteiligt sind, ebenso wie auch bei den FR-Regionen nicht alle Reste eine Rolle spielen, hier sogar nur wenige. Eine

Einbeziehung dieser Neudefinitionen zu Antigenbindungsstellen in statistische Tests wäre notwendig, um eine exaktere Aussage zur Antigen-Steuerung bestimmter Mutationen machen zu können. Auch Mutationen an Stellen ohne Antigenkontakt können sich durch sterische Änderungen und Änderungen in der Tertiärstruktur des Antikörpers auf die Antikörperbindung auswirken. Dies ist in statistischen Tests nur schwer zu berücksichtigen und macht auf eine Schwäche des Ansatzes, Antigen-Steuerung statistisch zu überprüfen, aufmerksam.

6.3 Funktionelle Untersuchungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei humane, monoklonale APL vom IgM-Typ etabliert, JGG9, HLC9 und HVA2. Sie wurden strukturell charakterisiert. Hierbei fiel JGG9 sowohl hinsichtlich seiner Bindungseigenschaften als auch hinsichtlich der Organisation der die variable Region des Antikörpers kodierenden DNA-Sequenz auf.

Die Beteiligung von APL an Autoimmunprozessen im APS wurde mehrfach untersucht, wobei bis heute nicht ganz klar ist, welche APL an den pathologischen Vorgängen beteiligt sind – IgG oder IgM, kofaktorabhängig oder kofaktorunabhängig (Giles et al., 2003)?

Ein Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war, Hinweise für die Pathogenität von aus APS-Patienten isolierten APL zu finden. Bei den gewonnenen APL muss es sich nicht zwingend um an der Pathogenese des APS beteiligte Antikörper handeln. APL tauchen wie schon beschrieben vorübergehend bei Infektionen auf und APL produzierende B-Zellen sind auch bei Gesunden vorhanden (z.B. B-1-Zellen).

Um festzustellen, ob APL tatsächlich pathogenetisch relevant sind, werden Tiermodelle als valider Pathogenitätsnachweis herangezogen (Lieby et al., 2004). Allerdings gibt es auch *in vitro*-Systeme, mit deren Hilfe erste Hinweise auf eine mögliche Pathogenität der APL gewonnen werden können, z.B. Tests zur Untersuchung der prokoagulanten Eigenschaften von APL. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten für Beispiel-Antikörper aus APS-Patienten solche ersten Hinweise gewonnen werden.

Hierfür wurden der IgM-Antikörper JGG9, der im Rahmen der Arbeit generiert wurde und ein bereits in der Arbeitsgruppe vorhandener IgG-APL, HL5B (von Landenberg et al., 1999) herangezogen. HL5B wurde über die EBV-Hybridom-Technik aus einem 51-jährigen, männlichen Patienten mit primärem APS isoliert. Er zeigt Reaktivität gegen Cardiolipin und

Phosphatidylserin, aber nicht gegen β 2GPI, d.h. es handelt sich um einen kofaktorunabhängigen Antikörper. HL5B ist vom IgG₂-Subtyp und trägt eine λ -Kette als leichte Kette. In einer vorangegangenen Doktorarbeit (von Landenberg, 1999) wurde die schwere Kette von HL5B sequenziert. Sie gehört wie JGG9 zur VH3-Familie. Das V-Segment ist homolog zu H5IGH353X (Matsuda et al., 1998), ein D-Segment konnte nicht identifiziert werden. Das Keimbahn-J-Segment mit der höchsten Homologie zur variablen Region der schweren Kette von HL5B ist JH6. HL5B ist auf DNA-Ebene 90 % und auf Protein-Ebene 84 % homolog zu den Keimbahnsequenzen. Er zeigt extensive somatische Mutationen in CDR1 und CDR2. Es wurde postuliert, dass diese Mutationen aus einem antigengesteuerten Prozess resultieren.

Vor dem Hintergrund einer möglichen Beteiligung des HLB5 an Pathomechanismen des APS ist HL5B ein interessanter Antikörper, da er zur IgG₂-Subklasse gehört, für die beschrieben ist, dass sie stark mit Thrombosen im APS korreliert (Sammaritano et al., 1997). Auch der hohe Grad der somatischen Mutationen, die sich v.a. in CDR-Regionen häufen, spricht für einen bereits vollzogenen Kontakt mit dem Antigen, der im Kontext der Autoimmunerkrankung stattgefunden haben kann. Außerdem wurde in der Arbeitsgruppe bereits gezeigt, dass HL5B in der Lage ist, prokoagulante Aktivität auf Monozyten, nicht jedoch auch Endothelzellen und Thrombozyten, zu induzieren (Lackner et al., 2000). Untypisch ist, dass HL5B β 2GPI-unabhängig ist.

Die Fähigkeit des HL5B, auf Monozyten eine prokoagulante Aktivität zu induzieren, wurde mit Hilfe eines Kugelkoagulometers (siehe 4.3.2.1) nachgewiesen. Monozyten aus buffy coat wurden analog zur Inkubation in Stimulationsmedium mit Antikörperverdünnungen inkubiert. Eine mit der LPS-Stimulierung vergleichbare Induktion prokoagulanter Aktivität konnte gezeigt werden, als deren Ursache eine gesteigerte TF-Expression vorgeschlagen wurde (Lackner et al., 2000). In den der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen wurde der Versuch mit JGG9 wiederholt – allerdings konnte hier keine prokoagulante Aktivität beobachtet werden (nicht gezeigt).

In den vorhergegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe zu HL5B konnte nicht geklärt werden, wie genau HL5B eine prokoagulante Aktivität auf Monozyten auslöst. Zelluläre Bestandteile der Monozyten als Bindungspartner des HL5B wurden nicht identifiziert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob eine direkte Interaktion von HL5B mit Monozyten nachweisbar ist und ob Monozytenbestandteile identifiziert werden können, die durch HL5B erkannt werden. Obwohl eine prokoagulante Aktivität im vorgestellten System durch JGG9 nicht induziert wurde, wurde JGG9 in einige der Interaktionsstudien einbezogen,

da Effekte von IgG- und IgM-APL auf Monozyten bereits mehrfach beschrieben sind (Kornberg et al., 1994; Cuadrado et al., 1997; Esmon et al., 1997; von Landenberg et al., 1999; Lackner et al., 2000; Meroni und Riboldi, 2001; Cho et al., 2002; Lopez-Pedrerera et al., 2006a; Lopez-Pedrerera et al., 2006b). Obwohl bereits einige Arbeiten mit unterschiedlichen Ergebnissen zur direkten Untersuchung der Bindung von APL an unterschiedliche Zellen (Endothelzellen, Plazentazellen, Zellen des ZNS, Thrombozyten) existieren (Arvieux et al., 1995; von Muhlen und Tan, 1995; Hanly et al., 1996; Caronti et al., 1998; Hill et al., 1998; Donohoe et al., 1999; Chen et al., 2004), und mehrfach funktionelle Auswirkungen der APL auf Monozyten beschrieben wurden, gibt es kaum Untersuchungen, die auf die Identifizierung der zellulären Interaktionspartner gerichtet sind.

Auch wenn HL5B als β 2GPI-unabhängiger APL beschrieben wurde, ist eine Interaktion mit einem zellulären Protein denkbar, die auf strukturelle Ähnlichkeiten zwischen den Antigenen zurückführbar sein kann (oder auf das Vorhandensein unterschiedlicher isomerer Formen des Antikörpers).

Zunächst wurde die Bindung von HL5B an Monozyten-Lysate (Mono-Mac-6 als Modell) im Westernblot untersucht. Hier konnte auch unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen weder für unstimulierte noch für stimulierte Mono-Mac-6 eine spezifische Bindung von HL5B nachgewiesen werden. Eine immer wieder auftretende Bande bei 66 kDa war nicht spezifisch für HL5B.

Ein Problem beim Arbeiten mit humanen Antikörpern und mit Monozyten ist das Vorhandensein von Fc-Rezeptoren auf den Zellen. Davon ausgehend, dass die mögliche spezifische Interaktion der APL mit den Monozyten über Bindung der Fab-Fragmente an ein spezifisches Oberflächenantigen erfolgt, kann die Untersuchung dieser Bindung immer durch die Bindung des Fc-Teils des Antikörpers an die Fc-Rezeptoren auf der Monozytenoberfläche überlagert werden. Ein positives Signal im Westernblot (und auch in anderen Systemen zur Untersuchung der Interaktion) kann also immer zwei Ursachen haben, die Bindung des Fc-Teils an den Fc-Rezeptor oder die Bindung der Fab-Fragmente an ihr spezifisches Antigen auf der Monozytenoberfläche. Daher müssen die Fc-Rezeptoren vor der Inkubation mit dem Antikörper adäquat blockiert werden. Hier bieten sich Fc-Teile eines Antikörpers oder humanes Serum an. Letzteres wurde zur Blockierung der Fc-Rezeptoren in den Bindungsstudien mit den APL eingesetzt.

Hier ist jedoch zu beachten, dass die mögliche Bindung von APL an Monozyten nicht über anti-IgG-Sekundärantikörper erfolgen darf, da durch diese Sekundärantikörper auch die für die Blockierung eingesetzten Serum-IgGs nachgewiesen würden. Aus diesem Grund wurden

die Untersuchungen im Rahmen dieser Doktorarbeit immer auch mit biotinyliertem HL5B und konjugiertem Steptavidin als Nachweisreagenz durchgeführt.

Eine Hauptursache dafür, dass im Westernblot keine Bindung von HL5B an Monozyten nachgewiesen werden konnte, obwohl für die Inkubation von Monozyten mit HL5B die Induktion der prokoagulanten Aktivität bereits gezeigt wurde und eine Interaktion daher nahe liegt, kann darin liegen, dass zelluläre Zielstrukturen durch die Lyse der Monozyten desintegriert werden. Dies ist v.a. vor dem Hintergrund wahrscheinlich, dass das zelluläre Antigen für den APL HL5B kein Protein sein muss, sondern auch ein Komplex aus Protein und Lipid (Zellmembran) oder auch ein reines Lipidantigen sein kann. Außerdem wurde die dem Westernblot vorangehende SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt – dies kann auch im Falle von reinen Proteinantigenen erheblich die Bindungseigenschaften verändern, da Epitope für den Antikörper von der Denaturierung betroffen sein können. Dennoch ist eine Interaktion von APL mit zellulären Bestandteilen im Westernblot prinzipiell denkbar und für einige aus Patientenserum isolierte APL für Plazentaproteine (Donohoe et al., 1999) und Bestandteile von HUVECs und mikrovaskulären Endothelzellen (Hill et al., 1998) auch gezeigt.

Um das Problem der Desintegration möglicher zellulärer Zielstrukturen zu minimieren, wurden auch Immunfluoreszenz-Analysen für die Bindungsstudien herangezogen. Der Nachweis der Bindung von Autoantikörpern an bestimmte zelluläre Strukturen durch Immunfluoreszenz ist in der Diagnostik der Autoimmunerkrankungen weit verbreitet (von Muhlen und Tan, 1995). Auch anti- β 2GPI-Antikörper wurden schon in Immunfluoreszenzuntersuchungen auf HUVECs eingesetzt, wodurch eine Kollokalisierung von β 2GPI-Antikörpern mit β 2GPI in späten Endosomen gefunden werden konnte (Dunoyer-Geindre et al., 2001). Prinzipiell ist jedoch davon auszugehen, dass auch bei der Immunfluoreszenz die Desintegration der potentiellen zellulären Antigene eine Rolle spielt und hier v.a. die Fixierungsmethoden von Bedeutung sind (siehe Kapitel 4.3.1.3.1). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl die Methanolfixierung als auch die Fixierung mit Paraformaldehyd angewendet. Während das organische Lösungsmittel Methanol Proteine präzipitiert und die Lipidmembran desintegriert, erfolgt die Fixierung mit Paraformaldehyd durch Quervernetzung der Proteine. Die Membran wird nicht durchlässig gemacht – um Antikörpern einen Zugang zu intrazellulären Antigenen zu schaffen, werden milde Detergenzien verwendet, die den Membrankontext aber nicht vollständig zerstören, d.h. eventuelle Lipidantigene bleiben erhalten.

In der vorliegenden Arbeit konnte im Vergleich zu den Kontrollen weder für HL5B noch für JGG9 eine Reaktivität gegen Monozyten durch Immunfluoreszenz gezeigt werden.

Noch umstritten ist, wie die Bindung von APL an zelluläre Interaktionspartner (untersucht hauptsächlich für Endothelzellen) zustande kommt, ob es sich um eine direkte Bindung handelt, oder ob β 2GPI als Brücke fungiert. Favorisiert wird letztere Position (Del Papa et al., 1995; Meroni und Riboldi, 2001; Lopez-Pedreira et al., 2006b), aber auch die Position, dass APL weder alleine noch durch Vermittlung durch β 2GPI an Endothelzellen binden, wird vertreten (Hanly et al., 1996). Sollte β 2GPI eine Rolle in einer möglichen Bindung von APL an Monozyten spielen, so war β 2GPI durch Zusatz von humanem Serum als Blockierungsreagenz sowohl in den Westernblotanalysen als auch in den Immunfluoreszenzuntersuchungen vorhanden.

Insgesamt stellte sich bei beiden Versuchsansätzen das Problem der Positivkontrollen, humanen monoklonalen Antikörpern, die nachweislich mit Oberflächenantigenen auf Monozyten interagieren. Solche Positivkontrollen sind kommerziell nicht erhältlich (ebenso wie valide humane Isotyp-Kontrollen). Es ist also nicht auszuschließen, dass HL5B und JGG9 unter anderen als den gewählten Versuchsbedingungen in der Lage sind, Monozyten zu binden.

Hinsichtlich der Möglichkeiten zur Induktion von prokoagulanter Aktivität und anderer zellulärer Effekte auf Monozyten durch APL sind verschiedene Varianten denkbar. Aktivierung des p38-MAP-Kinase-Weges und des MEK-1/ERK-Weges zur Induktion der TF-Expression wurden beschrieben (Lopez-Pedreira et al., 2006b). Unklar ist noch, wie diese Signaltransduktion ausgelöst wird. Hier ist die Bindung von APL über die Fab-Teile der Antikörper an einen Oberflächenrezeptor oder die Lipidoberfläche denkbar. Möglich ist auch, dass Rezeptoren geclustert werden müssen, um die Signaltransduktion zu induzieren.

Aber es ist auch denkbar, dass die Interaktion von APL mit Monozyten wie bei jedem Antikörper über den Fc-Teil geschieht und dass über den F(ab)₂-Teil des Antikörpers ein bestimmtes Antigen an die Monozyten gebracht wird, das für die Induktion der prokoagulanten Aktivität verantwortlich ist. Ein ähnliches System wurde schon 1995 durch Arvieux *et al.* für die Aktivierung von Neutrophilen postuliert und gezeigt. Hier konnte die Bindung von anti- β 2GPI-Antikörpern an den Fc-Rezeptor Fc γ RII und die gleichzeitige Bindung von an die Zelloberfläche assoziiertem β 2GPI durch die F(ab)₂-Fragmente und die unmittelbare Assoziation dieser Interaktionen mit der Neutrophilen-Aktivierung nachgewiesen werden (Arvieux et al., 1995). Die Überlegungen hierzu basierten auf früheren Untersuchungen mit murinen monoklonalen anti- β 2GPI-Antikörpern, die über Fc γ -

Rezeptoren Thrombozyten aktivieren konnten. Es wurde vermutet, dass die Interaktionen mit Fc-Rezeptoren und Oberflächen-gebundenem β 2GPI zu einem Clustering von Membranrezeptoren führte.

Es ist nicht auszuschließen, dass die für HL5B beschriebene Fähigkeit zur Induktion prokoagulanter Aktivität auf Monozyten auf Fc-Rezeptor-Wechselwirkungen zurückzuführen ist. In diesem Fall wäre ein negatives Ergebnis in den vorgestellten Tests, die eine Interaktion über die Fab-Fragmente untersuchten, nicht verwunderlich. Um dies genauer zu untersuchen, können Inhibitionsstudien mit Antikörpern gegen die Fc-Rezeptoren hilfreich sein, um zu prüfen, ob die beobachteten *in vitro*-Effekte (erhöhte prokoagulante Aktivität) kompetitiert werden können. In der Arbeit von Arvieux *et al.* konnte die Aktivierung der Neutrophilen durch anti-Fc γ RII-Antikörper verhindert werden.

Generell ist anzumerken, dass positive *in vitro*-Tests, wie der Nachweis der Induktion prokoagulanter Aktivität im Kugelkoagulometer, nur als Hinweis auf eine mögliche pathogene Beteiligung von APL am APS zu verstehen sind. Als Pathogenitätsnachweis gelten Tiermodelle zu thrombotischen Ereignissen oder fötaler Resorption (Lieby *et al.*, 2004). Daher ist auch die pathogenetische Relevanz von HL5B nicht gezeigt.

HL5B und JGG9 wurden darüber hinaus *in vitro* auf ihre Fähigkeit, LDL-assoziierte Komplementaktivierung zu verstärken oder abzuschwächen, getestet (nicht gezeigt). Die verstärkte Komplementaktivierung im Zusammenhang mit APL wurde als pathologischer Prozess im Kontext der gynäkologischen Symptome des APS gezeigt (Salmon *et al.*, 2003; Girardi *et al.*, 2004; Salmon und Girardi, 2004). Als Testsystem wurde ein System gewählt, bei dem Komplementaktivierung in der Lyse von Schafs-Erythrozyten resultiert (Bhakdi *et al.*, 1999). Auch hier konnte für beide Antikörper im Vergleich zu Negativkontrollen kein Effekt gezeigt werden.

Die Untersuchung im Tiermodell, ob es sich um für die Pathogenese des APS relevante Antikörper handelt, steht noch aus.

6.4 B-1- und B-2-Zellen

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit sollten monoklonale APL generiert und charakterisiert werden. Hier lag der Schwerpunkt auf APL im Kontext des APS, aber auch APL anderer Genese waren von Interesse. Da noch immer umstritten ist, was die Pathogenität von APL im Rahmen des APS kennzeichnet, sind strukturelle und funktionelle Vergleiche von APL unterschiedlicher Genese interessant. Es ist bekannt, dass APL bei

Infektionspatienten, bei APS-Patienten und bei Gesunden vorkommen. Die bei Gesunden auftretenden APL gehen zumindest teilweise auf B-1-Zellen zurück. Dieser B-Zell-Typus ist verantwortlich für die Produktion natürlicher autoreaktiver Antikörper, die polyreaktiv sind und hauptsächlich Nicht-Peptid-Antigene – u.a. Lipide – erkennen. Man geht davon aus, dass die B-1-Zellen eine Rolle in der angeborenen Immunabwehr spielen und durch die Polyreaktivität ihrer Antikörper in der Lage sind, eine Reihe von ubiquitär vorkommenden Antigenen, und damit Krankheitserregern, zu erkennen (Teng et al., 1985; Gonzales et al., 1989). Neben ihrer Rolle in der angeborenen Immunabwehr beziehen sich Hypothesen zur Funktion der natürlichen APL auf ihre Rolle an der Beseitigung apoptotischer Zellen und apoptotischen Debris.

Für die im Rahmen der Doktorarbeit etablierten Antikörper JGG9, HLC9 und HVA2 ist letztlich nicht klar, ob sie pathogenetisch für das APS relevant sind, auf infekassozierte Antikörper oder auf B-1 Zell-Antikörper zurückgehen. Es ist noch weitgehend unklar, wie die drei Arten von APL in Zusammenhang stehen, ob sie einen gemeinsamen Ursprung haben oder auf vollkommen unterschiedliche Untergruppen von Antikörpern zurückgehen.

Um mögliche Zusammenhänge zwischen physiologischen und pathologischen APL zu analysieren, ist es notwendig, auch natürliche APL zu untersuchen. Es ist von Interesse, die genauen Eigenschaften der pathologischen APL im Vergleich zu den natürlichen APL zu charakterisieren und mögliche Unterschiede zwischen beiden zu definieren. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Doktorarbeit versucht, eine Methode zu etablieren, mit deren Hilfe gezielt APL produzierende B-1-Zellen zu Hybridomen fusioniert und kloniert werden können. Hierzu wurden B-Zell-Populationen aus Gesunden (*buffy coat*) zunächst gezielt über ihre CD5-Expression nach B-1 und B-2-Zellen sortiert. Problematisch ist hier, dass die für die B-1 Zell-Population typische CD5-Expression auch in B-2-Zellen durch Aktivierung und Stimulierung dieser Zellen gesteigert werden kann (Gary-Gouy et al., 2002a). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit durchflusszytometrisch durch CD5- und CD69-Färbung bestätigt werden. Die Kultivierung der PBMCs vor Sortierung musste daher in X-Vivo-Medium ohne FCS-Zugabe erfolgen, da es unter diesen Bedingungen zu keiner Stimulation der Lymphozyten kommt. Es gelang, CD5-hochexpmierende von CD5-niedrigexpmierenden B-Zellen, also B-1 von B-2-Zellen zu trennen. Schwierigkeiten gab es bei den Versuchen, die Zellen in Kultur zu nehmen und zu fusionieren. Die Anzahl der CD5-positiven Zellen war so gering, dass eine anschließende EBV-Infektion zur Expansion vor der Zellfusion kaum möglich war. Eine Expansion der Zellen vor der Sortierung war nicht durchführbar, da eine Aktivierung der Zellen wie schon beschrieben unbedingt vermieden

werden musste und auch die EBV-Infektion die CD5-Expression beeinflusst und daher nicht vor der Sortierung zum Einsatz kommen darf (Kaplan et al., 2001). Nur in zwei Fällen konnten CD5-positive Zellen nach EBV-Infektion expandiert und auch mittels Elektrofusion mit Heteromyelomzellen fusioniert werden (nicht gezeigt). Allerdings war bei beiden Zellpopulationen im ELISA keine Antikörperproduktion nachweisbar und ihre Charakterisierung wurde aus diesem Grund nicht weiterverfolgt. CD5-Zellen liegen beim Gesunden in der Peripherie inaktiviert vor. Mehrere Untersuchungen konnten zeigen, dass CD5 an dieser Inaktivierung der B-Zellen beteiligt ist, indem es das B-Zell-Rezeptorsignaling inhibiert und damit vermutlich zur Toleranzerhaltung beiträgt (Sen et al., 1999; Hippen et al., 2000; Gary-Gouy et al., 2002b). Es ist unklar, wie sich die Oberflächenrezeptoren der B-Zellen bei Fusion mit Heteromyelomzellen verhalten und welche Auswirkung die Fusion auf die Inaktivierung der Antikörperproduktion und die damit verbundene Signaltransduktion zeigt. Die in den B-1-Zellen vorliegende CD5-gesteuerte Inaktivierung könnte für die fehlende Antikörperproduktion der resultierenden Hybridome verantwortlich sein.

Um dieses Problem zu umgehen ist es denkbar, die verwendete Methode zur Isolierung von B-1-Zellen mit der bereits beschriebenen Methode zur Gewinnung von monoklonalen antigenspezifischen Antikörpern von Lieby *et al.* (Lieby et al., 2001) zu kombinieren. Hierzu ist eine Dreifach-Markierung der Zellen mit einem anti-CD5-, einem anti-CD19-Antikörper und den Liposomen zur Identifizierung und Isolierung lipidreaktiver B-1-Zellen mittels FACS notwendig. Eine ähnliche Dreifach-Markierung ist für die Identifizierung cardiolipinreaktiver Memory-B-Zellen bereits beschrieben (Lieby et al., 2003). Entsprechende Zellen könnten so vereinzelt werden und die variable Region ihrer APL im beschriebenen Baculo-Virus-Expressionssystem in einem vollständigen Antikörper exprimiert werden. Die Expression wäre in diesem Falle unabhängig von den in der B-Zelle vorliegenden Regulationsmechanismen. Die Antikörper könnten für funktionelle Untersuchungen eingesetzt werden. Außerdem könnten die Sequenz und weitere strukturelle Merkmale identifiziert werden.

Es gibt bereits Hinweise darauf, dass pathologische APL und natürliche Autoantikörper gleichen Ursprungs sind. Lieby *et al.* konnten aus einem APS-Patienten unterschiedliche monoklonale APL gewinnen. Fünf wurden zufällig für weitere Analysen ausgewählt, von denen einer im Tiermodell Pathogenität zeigte (Lieby et al., 2004). Interessanterweise zeigte dieser Antikörper im Gegensatz zu den vier weiteren Kofaktorabhängigkeit der Cardiolipin-Reaktivität und Mutationen in einer CDR-Region der leichten Kette. Über Sequenzvergleiche wurde die zugrunde liegende Keimbahnsequenz ermittelt und der Antikörper *in vitro* zur

Keimbahnkonfiguration rückmutiert. Untersuchungen der Reaktivität zeigten, dass der rückmutierte Antikörper nicht mehr kofaktorabhängig war. Die Reaktivität gegen Cardiolipin blieb erhalten, war jedoch gegenüber dem mutierten Antikörper vermindert. Interessanterweise verfügte der rückmutierte Antikörper über ein Autoreaktivitätsprofil, das dem multireaktiven Profil der natürlichen Autoantikörper sehr ähnlich ist: Er band humanes Thyroglobin, Myoglobulin und ssDNA. Am wichtigsten ist jedoch, dass der rückmutierte Antikörper nicht mehr in der Lage war, im Tiermodell pathologische Prozesse auszulösen. Diese Untersuchungen von Lieby *et al.* legen nahe, dass pathologische APL im Rahmen des APS aus natürlichen Autoantikörpern resultieren und durch somatische Hypermutation, also durch Antigenkontakt, ihre pathologischen Eigenschaften erwerben.

In einer weiteren Arbeit konnten Lieby *et al.* aus Patienten mit frischer EBV-Infektion Anti-Cardiolipin-produzierende B-Zellen isolieren. Die durchflusszytometrische Analyse ergab, dass abhängig vom Patienten 10 – 60 % der IgM-Anti-Cardiolipin-produzierenden B-Zellen CD27 auf ihrer Oberfläche tragen, d.h., dass es sich um Memory-B-Zellen handelt. Einige dieser Zellen produzierten mutierte Varianten der Anti-Cardiolipin-Antikörper. Es ist bekannt, dass EBV bei einer frischen Infektion schon existierende Memory-B-Zellen infiziert und expandiert. Daher schlussfolgerte die Gruppe, dass normale Individuen über einen diskreten Memory-B-Zell-Pool verfügt, der in der Lage ist, mutierte lipidreaktive Antikörper zu produzieren. Dies wiederum widerlegt die Annahme, dass somatisch mutierte APL-Formen das APS charakterisieren, während bei Gesunden oder bei Patienten mit akuten Infektionen nur nicht mutierte APL zu finden sind.

Lieby *et al.* konnten also einerseits zeigen, dass somatische Mutationen zur autoimmunologischen Pathogenität beitragen können (Lieby *et al.*, 2004), andererseits aber auch, dass B-Zellen (Memory-B-Zellen), die mutierte APL kodieren, auch in Individuen ohne APS vorhanden sein können (Lieby *et al.*, 2003).

Memory-B-Zellen liegen im Gesunden weitgehend inaktiv vor und werden erst bei Antigenkontakt zur Produktion hoher Antikörper-Titer angeregt (sekundäre Immunantwort). D.h., dass auch die Antikörper der beschriebenen Memory-B-Zellen potentiell pathologisch sein können, allerdings unter normalen Umständen nicht hochtitrig im Blut vorhanden sind. In der Arbeit von Lieby *et al.* (Lieby *et al.*, 2003) wurde die Fähigkeit der mutierten Anti-Cardiolipin-Antikörper zur Induktion von APS-Symptomen im Tiermodell nicht untersucht, d.h. es wird aus der Arbeit nicht klar, ob ihnen das Potential zur Induktion autoimmunologischer Prozesse innewohnt.

Auch für infektassoziierte Antikörper rückt die Untersuchung eines möglichen mit den pathologischen APL gemeinsamen Ursprungs immer mehr ins Interesse (Asherson und Shoenfeld, 2000; Blank et al., 2002; Gharavi et al., 2002; Blank und Shoenfeld, 2004; Frauenknecht et al., 2005; Shoenfeld et al., 2006). Eine aktuelle Publikation stellt fest, dass tiefe Beinvenenthrombosen offenbar mit vorhergehenden Infekten assoziiert sind (Smeeth et al., 2006). Vor allem in den ersten zwei Wochen nach einer Infektion der Atem- oder Harnwege stieg das Risiko zur Thrombusbildung an. Dabei spielte die Art der Erreger offensichtlich keine Rolle, sondern eher die Tatsache, dass eine akute Infektion stattgefunden hatte. Auch hier liegt eine Verbindung zwischen Infektionen und Symptomen, die auch das APS kennzeichnen, nahe. Obwohl die Ursachen für die beschriebene Assoziation nicht näher beschrieben sind, sind die Ergebnisse vor dem Hintergrund der möglichen Verbindung von infektassoziierten und pathologischen Antikörpern interessant.

Bisherige Methoden zur Generierung und Produktion monoklonaler APL für strukturelle und funktionelle Untersuchungen zum APS lassen den Charakter der produzierenden B-Zellen außer Acht. Die Tatsache, dass pathologische APL durch Mutationen aus natürlichen Autoantikörpern zu resultieren scheinen und B-Zellen auch außerhalb des APS-Kontextes Mutationen in ihren die variable Region kodierenden Sequenzen tragen, ohne dass APS-Symptome zu beobachten sind, macht deutlich, dass neben den Wirkungen der APL auf zelluläre Systeme oder das Gerinnungssystem Informationen zur Genese der Antikörper und zum Aktivitätsstatus der zugehörigen B-Zellen zum Verständnis ihrer pathologischen Bedeutung unabdingbar sind. Hierfür sind differenziertere Methoden zur Generierung APL produzierender Hybridome von Nöten.

Ein erster Ansatzpunkt könnte hier die Methode von Lieby *et al.* sein (Lieby et al., 2003), indem der gezielten Expression bestimmter Antikörper eine genaue Charakterisierung der kodierenden B-Zelle zugeschaltet wird. Hier wäre der Subtyp der B-Zelle interessant, d.h. die Frage, ob es sich z.B. um B-1, B-2 oder um Memory-B-Zellen handelt.

Im Falle der B-1-Zellen oder der Memory-Zellen ist eine Untersuchung der regulativen Elemente naheliegend. Wie schon beschrieben, spielt CD5 eine Rolle in der Inaktivierung der B-1-Zellen, die notwendig ist, um die Toleranz gegenüber Autoantigenen aufrecht zu erhalten. Diese Inaktivierung darf nur kurzzeitig im Falle akuter Infektionen aufgehoben werden und muss anschließend wieder hergestellt werden. Untersuchungen konnten zeigen, dass CD5 ein ITIM-Motiv trägt (ITIM = *Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) (Gary-Gouy et al., 2002b). ITIM-Motive sind Sequenzmotive, die im Immunsystem bei B-

und T-Zellen verbreitet sind. Sie finden sich im zytoplasmatischen Teil von Transmembranrezeptoren, die durch inhibitorische Signale die Aktivierung von B- und T-Zell-Rezeptoren und deren Ko-Rezeptoren durch eine Erhöhung des Thresholds für Signaltransduktion blockieren können.

Es gibt bisher noch keine Untersuchungen, die sich mit der Regulation der natürlichen APL produzierenden Zellen bei APS-Patienten und Gesunden befassen. Die Untersuchung von CD5, speziell des ITIM-Motives, bei B-1-Zellen von Gesunden und Kranken liegt hier nahe. Ebenso sollten basierend auf den Ergebnissen der Gruppe um Lieby ähnliche Regulationswege in Memory-B-Zellen untersucht werden.

6.5 Kofaktorabhängigkeit von APL und deren Einfluss auf laborchemische Diagnoseverfahren

APL sind charakteristisch für das APS. Die Tatsache, dass APL auch bei unterschiedlichen Infektionen, wie beispielsweise EBV-, Parvovirus-, Hepatitis A- oder Rubella- Infektionen gefunden werden (Misra et al., 1987; Colaco et al., 1989) und auch bei Gesunden vorkommen (Lockshin und Erkan, 2003), schränkt die diagnostische Spezifität von laborchemischen Tests ein.

In den 1990ern fand man Hinweise darauf, dass die Pathogenität von APL mit deren Kofaktorabhängigkeit assoziiert ist. β 2GPI wurde als Haupt-Kofaktor im Rahmen des APS beschrieben.

Seither wird versucht, auf unterschiedliche Weise die Kofaktorabhängigkeit diagnostisch zu nutzen. Derzeit stützen sich fast alle kommerziell erhältlichen ELISAs zur Detektion von APL und deren Kofaktorabhängigkeit auf das Vorhandensein oder das Fehlen von β 2GPI als zusätzliches Beschichtungsagens neben dem Lipidantigen Cardiolipin.

Vor dem Hintergrund, dass β 2GPI im humanen Serum vorhanden ist (200 μ g/ml), scheint dieses Unterscheidungskriterium nicht sinnvoll. Die vorhandene Serumkonzentration könnte ausreichend sein, damit β 2GPI im Testsystem als Kofaktor agieren kann – unabhängig von der Plattenbeschichtung.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit erfolgreich eine Methode etabliert, in der APL als β 2GPI-freie Isolate aus humanem Serum gewonnen wurden. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Fraktionen auch frei von Spaltprodukten des Prothrombins,

einem weiteren wichtigen Kofaktor, sind. Das Vorhandensein weiterer Kofaktoren, z.B. Annexin V oder Protein S wurde nicht überprüft. Eine Übertragung der mit Serum von gesunden Probanden etablierten Methode auf Serum von APS- und EBV-Patienten war möglich.

Diese Methode zur Generierung von serumfreien IgG-Fractionen aus humanem Serum wurde in einer medizinischen Doktorarbeit erfolgreich für Untersuchungen zur Kofaktorabhängigkeit von APL bei APS-Patienten und Patienten mit frischer EBV-Infektion eingesetzt. Es wurde deutlich, dass eine Unterscheidung der Reaktivität gegen Cardiolipin alleine und den Cardiolipin/ β 2GPI-Komplex bei APS-Patienten nicht möglich war, wenn die APL-ELISAs nach Angaben des Herstellers und wie im Routine-Gebrauch üblich durchgeführt wurden, nämlich mit einer 1% Serumverdünnung (Abbildung 5-23 – blaue Balken). Eine deutliche Abnahme der Reaktivität gegen Cardiolipin gegenüber des Cardiolipin/ β 2GPI-Komplexes wurde allerdings sichtbar bei Verwendung der generierten IgG-Fractionen (Abbildung 5-23– weiße Balken). Die Reaktivität konnte durch Zugabe von 1% Normalserum, das β 2GPI enthält, rekonstituiert werden.

Dies ist ein klarer Hinweis darauf, dass Kofaktorabhängigkeit durch Unterscheidung der Reaktivität gegen Cardiolipin oder den Cardiolipin/ β 2GPI-Komplex nur unter Verwendung kofaktorfreier, serumfreier IgG-Fractionen nachweisbar ist. Weiterhin wird durch die Möglichkeit, mit 1 % Normalserum die Reaktivität gegen Cardiolipin zu rekonstituieren, ersichtlich, dass die in der üblichen Serumverdünnung vorhandene β 2GPI-Konzentration ausreicht und β 2GPI als Kofaktor agiert.

Die Versuche, die bisher unternommen wurden, um das Problem des Vorhandenseins des Kofaktors im Serum zu umgehen, spiegeln sich in der Verwendung hoher Serumverdünnungen in ELISAs, die mit und ohne β 2GPI beschichtet sind, wider (Aoki et al., 1995; Guglielmo et al., 2001). Durch die hohe Verdünnung soll der Effekt des endogenen β 2GPI minimiert werden. Ein ähnlicher Ansatz findet sich bei Levy *et al.* (Levy et al., 2004), die mit hohen Serumverdünnungen und ELISA-Platten, die ausschließlich mit Cardiolipin – nicht mit β 2GPI – beschichtet sind, arbeiten. Zwischen Kofaktorabhängig- und –unabhängigkeit wird hier durch Zugabe von isoliertem β 2GPI zum Testansatz differenziert.

Die Möglichkeit zur sehr hohen Serumverdünnung zur Reduzierung oder Vermeidung des Effektes endogenen β 2GPI ist nur bei sehr hohen APL-Titern gegeben. Sie beeinträchtigt die Sensitivität der Testmethode.

Die im Rahmen der Doktorarbeit entwickelte Methode ermöglicht die Durchführung der APL-Tests mit standardisierten, kommerziell erhältlichen ELISA-Platten und das Arbeiten in vom Hersteller empfohlenen Verdünnungsbereichen (1 % Serum bzw. entsprechende IgG-Fraktion). Durch die Verwendung der Protein-A-Zentrifugaleinheiten ist auch eine standardisierte und einfache Möglichkeit zur Generierung der benötigten IgG-Fraktionen gegeben, die einen geringen zeitlichen Aufwand erfordert.

Die Ergebnisse der Arbeit von Marcel Lichy zu den EBV-Patienten, die mit Hilfe der hier etablierten Methode erzielt wurden, zeigte überraschenderweise, dass sich auch hier eine Reduktion der Reaktivität gegen Cardiolipin im Vergleich zum Cardiolipin/ β 2GPI-Komplex bei Verwendung der IgG-Fraktionen findet (Abbildung 5-24). Diese ist nicht rekonstituierbar durch Zugabe von 1 % Normalserum.

Hierfür sind drei Gründe vorstellbar:

1. Die beobachtete Reaktivität gegen den Cardiolipin/ β 2GPI-Komplex beruht auf der Reaktivität von Antikörpern des IgG₃-Subtyps, der durch Protein A nicht gebunden wird.
2. Bei dem als Kofaktor fungierenden Molekül handelt es sich um eine Komponente des EBV-Serums, die in normalem Serum nicht vorhanden ist.
3. Der verantwortliche Kofaktor weist ein Molekulargewicht auf, das kleiner als 10 kDa ist und geht bei den auf die Protein-A-Affinitätschromatographie folgenden Konzentrierungsschritten mit einer 10kDa-Zentrifugaleinheit verloren.

Die genaue Ursache muss noch geklärt werden.

Die etablierte Methode ist derzeit nur für β 2GPI- und prothrombinabhängige APL anwendbar. Darüber hinaus sind andere Kofaktoren beschrieben (Annexin V, Protein S). Eine Untersuchung der IgG-Fraktionen auf diese Kofaktoren ist analog zu β 2GPI und Prothrombin möglich.

7 Literaturverzeichnis

- Alarcon-Segovia, D. (1992) Clinical manifestations of the antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 19, 1778-81.
- Albert, L.J. und Inman, R.D. (1999) Molecular mimicry and autoimmunity. *N Engl J Med* 341, 2068-74.
- Amengual, O., Atsumi, T., Khamashta, M.A. und Hughes, G.R. (1998) The role of the tissue factor pathway in the hypercoagulable state in patients with the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 79, 276-81.
- Anderson, M.A. und Gusella, J.F. (1984) Use of cyclosporin A in establishing Epstein-Barr virus-transformed human lymphoblastoid cell lines. *In Vitro* 20, 856-8.
- Andersson, J. und Melchers, F. (1978) The antibody repertoire of hybrid cell lines obtained by fusion of X63-AG8 myeloma cells with mitogen-activated B-cell blasts. *Curr Top Microbiol Immunol* 81, 130-9.
- Aoki, K., Dudkiewicz, A.B., Matsuura, E., Novotny, M., Kaberlein, G. und Gleicher, N. (1995) Clinical significance of beta 2-glycoprotein I-dependent anticardiolipin antibodies in the reproductive autoimmune failure syndrome: correlation with conventional antiphospholipid antibody detection systems. *Am J Obstet Gynecol* 172, 926-31.
- Arabshahi, B., Thompson, E.D., Smergel, E.M. und Goldsmith, D.P. (2005) Long-term treatment of antiphospholipid syndrome-associated cerebral arterial thromboses with intravenous immunoglobulin: a case report. *Clin Rheumatol*, 1-3.
- Arkel, Y.S., Ku, D.H. und Thurston, A.L. (2003) The effect of thalidomide on tissue factor activity in Mono Mac 6 cells and the relationship to tumor necrosis factor (TNF)-alpha-stimulated cells. *J Thromb Haemost* 1, 2691-2.
- Arvieux, J., Jacob, M.C., Roussel, B., Bensa, J.C. und Colomb, M.G. (1995) Neutrophil activation by anti-beta 2 glycoprotein I monoclonal antibodies via Fc gamma receptor II. *J Leukoc Biol* 57, 387-94.
- Asherson, R.A. (1992) The catastrophic antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 19, 508-12.
- Asherson, R.A. (2005) Multiorgan failure and antiphospholipid antibodies: the catastrophic antiphospholipid (Asherson's) syndrome. *Immunobiology* 210, 727-33.
- Asherson, R.A. und Shoenfeld, Y. (2000) The role of infection in the pathogenesis of catastrophic antiphospholipid syndrome--molecular mimicry? *J Rheumatol* 27, 12-4.
- Benzaquen, L.R., Nicholson-Weller, A. und Halperin, J.A. (1994) Terminal complement proteins C5b-9 release basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor from endothelial cells. *J Exp Med* 179, 985-92.

Bevers, E.M., Galli, M., Barbui, T., Comfurius, P. und Zwaal, R.F. (1991) Lupus anticoagulant IgG's (LA) are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin. *Thromb Haemost* 66, 629-32.

Bhakdi, S., Torzewski, M., Klouche, M. und Hemmes, M. (1999) Complement and atherogenesis: binding of CRP to degraded, nonoxidized LDL enhances complement activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 2348-54.

Bhat, N.M., Kantor, A.B., Bieber, M.M., Stall, A.M., Herzenberg, L.A. und Teng, N.N. (1992) The ontogeny and functional characteristics of human B-1 (CD5+ B) cells. *Int Immunol* 4, 243-52.

Bhat, N.M., Mithal, A., Bieber, M.M., Herzenberg, L.A. und Teng, N.N. (1995) Human CD5+ B lymphocytes (B-1 cells) decrease in peripheral blood during pregnancy. *J Reprod Immunol* 28, 53-60.

Blank, M., Cohen, J., Toder, V. und Shoenfeld, Y. (1991) Induction of anti-phospholipid syndrome in naive mice with mouse lupus monoclonal and human polyclonal anti-cardiolipin antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3069-73.

Blank, M., Krause, I., Fridkin, M., Keller, N., Kopolovic, J., Goldberg, I., Tobar, A. und Shoenfeld, Y. (2002) Bacterial induction of autoantibodies to beta2-glycoprotein-I accounts for the infectious etiology of antiphospholipid syndrome. *J Clin Invest* 109, 797-804.

Blank, M. und Shoenfeld, Y. (2004) Beta-2-glycoprotein-I, infections, antiphospholipid syndrome and therapeutic considerations. *Clin Immunol* 112, 190-9.

Bokarewa, M.I., Blomback, M., Egberg, N. und Rosen, S. (1994) A new variant of interaction between phospholipid antibodies and the protein C system. *Blood Coagul Fibrinolysis* 5, 37-41.

Bose, B. und Sinha, S. (2005) Problems in using statistical analysis of replacement and silent mutations in antibody genes for determining antigen-driven affinity selection. *Immunology* 116, 172-83.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.

Brahe, C. und Serra, A. (1981) A simple method for fusing human lymphocytes with rodent cells in monolayer by polyethylene glycol. *Somatic Cell Genet* 7, 109-15.

Branch, D.W., Dudley, D.J., Mitchell, M.D., Creighton, K.A., Abbott, T.M., Hammond, E.H. und Daynes, R.A. (1990) Immunoglobulin G fractions from patients with antiphospholipid antibodies cause fetal death in BALB/c mice: a model for autoimmune fetal loss. *Am J Obstet Gynecol* 163, 210-6.

Brezinschek, H.P., Foster, S.J., Brezinschek, R.I., Dorner, T., Domiati-Saad, R. und Lipsky, P.E. (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, 2488-501.

- Caronti, B., Calderaro, C., Alessandri, C., Conti, F., Tinghino, R., Pini, C., Palladini, G. und Valesini, G. (1998) Serum anti-beta2-glycoprotein I antibodies from patients with antiphospholipid antibody syndrome bind central nervous system cells. *J Autoimmun* 11, 425-9.
- Cervera, R., Asherson, R.A., Acevedo, M.L., Gomez-Puerta, J.A., Espinosa, G., De La Red, G., Gil, V., Ramos-Casals, M., Garcia-Carrasco, M., Ingelmo, M. und Font, J. (2004) Antiphospholipid syndrome associated with infections: clinical and microbiological characteristics of 100 patients. *Ann Rheum Dis* 63, 1312-7.
- Cervera, R., Font, J., Gomez-Puerta, J.A., Espinosa, G., Cucho, M., Bucciarelli, S., Ramos-Casals, M., Ingelmo, M., Piette, J.C., Shoenfeld, Y. und Asherson, R.A. (2005) Validation of the preliminary criteria for the classification of catastrophic antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 64, 1205-9.
- Chang, B. und 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, 367-73.
- Chen, Q., Stone, P.R., Woon, S.T., Ching, L.M., Hung, S., McCowan, L.M. und Chamley, L.W. (2004) Antiphospholipid antibodies bind to activated but not resting endothelial cells: is an independent triggering event required to induce antiphospholipid antibody-mediated disease? *Thromb Res* 114, 101-11.
- Cho, C.S., Cho, M.L., Chen, P.P., Min, S.Y., Hwang, S.Y., Park, K.S., Kim, W.U., Min, D.J., Min, J.K., Park, S.H. und Kim, H.Y. (2002) Antiphospholipid antibodies induce monocyte chemoattractant protein-1 in endothelial cells. *J Immunol* 168, 4209-15.
- Chukwuocha, R.U., Zhu, M., Cho, C.S., Visvanathan, S., Hwang, K.K., Rahman, A. und Chen, P.P. (2002) Molecular and genetic characterizations of five pathogenic and two non-pathogenic monoclonal antiphospholipid antibodies. *Mol Immunol* 39, 299-311.
- Colaco, C.B., Mackie, I.J., Irving, W. und Machin, S.J. (1989) Anti-cardiolipin antibodies in viral infection. *Lancet* 1, 622.
- Cuadrado, M.J., Lopez-Pedrerera, C., Khamashta, M.A., Camps, M.T., Tinahones, F., Torres, A., Hughes, G.R. und Velasco, F. (1997) Thrombosis in primary antiphospholipid syndrome: a pivotal role for monocyte tissue factor expression. *Arthritis Rheum* 40, 834-41.
- Dahlback, B. und Villoutreix, B.O. (2005) The anticoagulant protein C pathway. *FEBS Lett* 579, 3310-6.
- Darveau, A., Chevrier, M.C., Neron, S., Delage, R. und Lemieux, R. (1993) Efficient preparation of human monoclonal antibody-secreting heterohybridomas using peripheral B lymphocytes cultured in the CD40 system. *J Immunol Methods* 159, 139-43.
- de Wildt, R.M., Tomlinson, I.M., van Venrooij, W.J., Winter, G. und Hoet, R.M. (2000) Comparable heavy and light chain pairings in normal and systemic lupus erythematosus IgG(+) B cells. *Eur J Immunol* 30, 254-61.

- Del Papa, N., Guidali, L., Spatola, L., Bonara, P., Borghi, M.O., Tincani, A., Balestrieri, G. und Meroni, P.L. (1995) Relationship between anti-phospholipid and anti-endothelial cell antibodies III: beta 2 glycoprotein I mediates the antibody binding to endothelial membranes and induces the expression of adhesion molecules. *Clin Exp Rheumatol* 13, 179-85.
- Derksen, R.H., Khamashta, M.A. und Branch, D.W. (2004) Management of the obstetric antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 50, 1028-39.
- deVeber, G., Monagle, P., Chan, A., MacGregor, D., Curtis, R., Lee, S., Vegh, P., Adams, M., Marzinotto, V., Leaker, M., Massicotte, M.P., Lillicrap, D. und Andrew, M. (1998) Prothrombotic disorders in infants and children with cerebral thromboembolism. *Arch Neurol* 55, 1539-43.
- Di Simone, N., Meroni, P.L., de Papa, N., Raschi, E., Caliandro, D., De Carolis, C.S., Khamashta, M.A., Atsumi, T., Hughes, G.R., Balestrieri, G., Tincani, A., Casali, P. und Caruso, A. (2000) Antiphospholipid antibodies affect trophoblast gonadotropin secretion and invasiveness by binding directly and through adhered beta2-glycoprotein I. *Arthritis Rheum* 43, 140-50.
- Dobado-Berrios, P.M., Lopez-Pedraza, C., Velasco, F., Aguirre, M.A., Torres, A. und Cuadrado, M.J. (1999) Increased levels of tissue factor mRNA in mononuclear blood cells of patients with primary antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 82, 1578-82.
- Donohoe, S., Kingdom, J.C. und Mackie, I.J. (1999) Affinity purified human antiphospholipid antibodies bind normal term placenta. *Lupus* 8, 525-31.
- Dunoyer-Geindre, S., Kruithof, E.K., Galve-de Rochemonteix, B., Rosnoblet, C., Gruenberg, J., Reber, G. und de Moerloose, P. (2001) Localization of beta2-glycoprotein 1 in late endosomes of human endothelial cells. *Thromb Haemost* 85, 903-7.
- Ecker, E. und Gross, P. (1929) Anticomplementary power of heparin. *J. Infect. Dis.* 44, 250.
- Esmon, N.L., Smirnov, M.D. und Esmon, C.T. (1997) Thrombogenic mechanisms of antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 78, 79-82.
- Esmon, N.L., Smirnov, M.D., Safa, O. und Esmon, C.T. (1999) Lupus anticoagulants, thrombosis and the protein C system. *Haematologica* 84, 446-51.
- Frade, R., Barel, M., Ehlin-Henriksson, B. und Klein, G. (1985) gp140, the C3d receptor of human B lymphocytes, is also the Epstein-Barr virus receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 1490-3.
- Frauenknecht, K., Lackner, K. und von Landenberg, P. (2005) Antiphospholipid antibodies in pediatric patients with prolonged activated partial thromboplastin time during infection. *Immunobiology* 210, 799-805.
- Galli, M., Comfurius, P., Maassen, C., Hemker, H.C., de Baets, M.H., van Breda-Vriesman, P.J., Barbui, T., Zwaal, R.F. und Bevers, E.M. (1990) Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 335, 1544-7.

- Gary-Gouy, H., Harriague, J., Bismuth, G., Platzer, C., Schmitt, C. und Dalloul, A.H. (2002a) Human CD5 promotes B-cell survival through stimulation of autocrine IL-10 production. *Blood* 100, 4537-43.
- Gary-Gouy, H., Harriague, J., Dalloul, A., Donnadieu, E. und Bismuth, G. (2002b) CD5-negative regulation of B cell receptor signaling pathways originates from tyrosine residue Y429 outside an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *J Immunol* 168, 232-9.
- George, J., Blank, M., Levy, Y., Meroni, P., Damianovich, M., Tincani, A. und Shoenfeld, Y. (1998a) Differential effects of anti-beta2-glycoprotein I antibodies on endothelial cells and on the manifestations of experimental antiphospholipid syndrome. *Circulation* 97, 900-6.
- George, J., Gilburd, B., Hojnik, M., Levy, Y., Langevitz, P., Matsuura, E., Koike, T. und Shoenfeld, Y. (1998b) Target recognition of beta2-glycoprotein I (beta2GPI)-dependent anticardiolipin antibodies: evidence for involvement of the fourth domain of beta2GPI in antibody binding. *J Immunol* 160, 3917-23.
- Gharavi, A.E., Pierangeli, S.S., Espinola, R.G., Liu, X., Colden-Stanfield, M. und Harris, E.N. (2002) Antiphospholipid antibodies induced in mice by immunization with a cytomegalovirus-derived peptide cause thrombosis and activation of endothelial cells in vivo. *Arthritis Rheum* 46, 545-52.
- Giles, I.P., Haley, J.D., Nagl, S., Isenberg, D.A., Latchman, D.S. und Rahman, A. (2003) A systematic analysis of sequences of human antiphospholipid and anti-beta2-glycoprotein I antibodies: the importance of somatic mutations and certain sequence motifs. *Semin Arthritis Rheum* 32, 246-65.
- Girardi, G., Redecha, P. und Salmon, J.E. (2004) Heparin prevents antiphospholipid antibody-induced fetal loss by inhibiting complement activation. *Nat Med* 10, 1222-6.
- Gonzales, R., Matsiota, P., C., T., De Kinkelin, P. und Avrameas, S. (1989) Natural anti-TNP antibodies from rainbow trout interfere with viral infection in vitro. *Res. Immunol.* 140, 675-684.
- Greaves, M., Cohen, H., MacHin, S.J. und Mackie, I. (2000) Guidelines on the investigation and management of the antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol* 109, 704-15.
- Grunow, R., Jahn, S., Porstmann, T., Kiessig, S.S., Steinkellner, H., Steindl, F., Mattanovich, D., Gurtler, L., Deinhardt, F., Katinger, H. und et al. (1988) The high efficiency, human B cell immortalizing heteromyeloma CB-F7. Production of human monoclonal antibodies to human immunodeficiency virus. *J Immunol Methods* 106, 257-65.
- Guglielmone, H., Vitozzi, S., Elbarcha, O. und Fernandez, E. (2001) Cofactor dependence and isotype distribution of anticardiolipin antibodies in viral infections. *Ann Rheum Dis* 60, 500-4.
- Hagihara, Y., Goto, Y., Kato, H. und Yoshimura, T. (1995) Structure and function of beta 2-glycoprotein I: with special reference to the interaction with phospholipid. *Lupus* 4 Suppl 1, S3-5.
- Hanly, J.G. (2003) Antiphospholipid syndrome: an overview. *Cmaj* 168, 1675-82.

- Hanly, J.G., Hong, C. und Issekutz, A. (1996) Beta 2-glycoprotein I and anticardiolipin antibody binding to resting and activated cultured human endothelial cells. *J Rheumatol* 23, 1543-9.
- Harris, E.N., Chan, J.K., Asherson, R.A., Aber, V.R., Gharavi, A.E. und Hughes, G.R. (1986) Thrombosis, recurrent fetal loss, and thrombocytopenia. Predictive value of the anticardiolipin antibody test. *Arch Intern Med* 146, 2153-6.
- Harris, E.N., Gharavi, A.E., Boey, M.L., Patel, B.M., Mackworth-Young, C.G., Loizou, S. und Hughes, G.R. (1983) Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 2, 1211-4.
- Hashimoto, Y., Kawamura, M., Ichikawa, K., Suzuki, T., Sumida, T., Yoshida, S., Matsuura, E., Ikehara, S. und Koike, T. (1992) Anticardiolipin antibodies in NZW x BXSB F1 mice. A model of antiphospholipid syndrome. *J Immunol* 149, 1063-8.
- Hasunuma, Y., Matsuura, E., Makita, Z., Katahira, T., Nishi, S. und Koike, T. (1997) Involvement of beta 2-glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in oxidatively modified low-density lipoprotein uptake by macrophages. *Clin Exp Immunol* 107, 569-73.
- Hattori, R., Hamilton, K.K., McEver, R.P. und Sims, P.J. (1989) Complement proteins C5b-9 induce secretion of high molecular weight multimers of endothelial von Willebrand factor and translocation of granule membrane protein GMP-140 to the cell surface. *J Biol Chem* 264, 9053-60.
- Hayakawa, K. und Hardy, R.R. (2000) Development and function of B-1 cells. *Curr Opin Immunol* 12, 346-53.
- Hill, M.B., Phipps, J.L., Hughes, P. und Greaves, M. (1998) Anti-endothelial cell antibodies in primary antiphospholipid syndrome and SLE: patterns of reactivity with membrane antigens on microvascular and umbilical venous cell membranes. *Br J Haematol* 103, 416-21.
- Hippen, K.L., Tze, L.E. und Behrens, T.W. (2000) CD5 maintains tolerance in anergic B cells. *J Exp Med* 191, 883-90.
- Hirsh, J., Warkentin, T.E., Shaughnessy, S.G., Anand, S.S., Halperin, J.L., Raschke, R., Granger, C., Ohman, E.M. und Dalen, J.E. (2001) Heparin and low-molecular-weight heparin: mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing, monitoring, efficacy, and safety. *Chest* 119, 64S-94S.
- Holers, V.M., Girardi, G., Mo, L., Guthridge, J.M., Molina, H., Pierangeli, S.S., Espinola, R., Xiaowei, L.E., Mao, D., Vialpando, C.G. und Salmon, J.E. (2002) Complement C3 activation is required for antiphospholipid antibody-induced fetal loss. *J Exp Med* 195, 211-20.
- Horkko, S., Miller, E., Branch, D.W., Palinski, W. und Witztum, J.L. (1997) The epitopes for some antiphospholipid antibodies are adducts of oxidized phospholipid and beta2 glycoprotein 1 (and other proteins). *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10356-61.
- Hughes, G.R., Harris, N.N. und Gharavi, A.E. (1986) The anticardiolipin syndrome. *J Rheumatol* 13, 486-9.

- Hunt, J. und Krilis, S. (1994) The fifth domain of beta 2-glycoprotein I contains a phospholipid binding site (Cys281-Cys288) and a region recognized by anticardiolipin antibodies. *J Immunol* 152, 653-9.
- Ikematsu, W., Luan, F.L., La Rosa, L., Beltrami, B., Nicoletti, F., Buyon, J.P., Meroni, P.L., Balestrieri, G. und Casali, P. (1998) Human anticardiolipin monoclonal autoantibodies cause placental necrosis and fetal loss in BALB/c mice. *Arthritis Rheum* 41, 1026-39.
- James, K. und Bell, G.T. (1987) Human monoclonal antibody production. Current status and future prospects. *J Immunol Methods* 100, 5-40.
- James, L.C., Roversi, P. und Tawfik, D.S. (2003) Antibody multispecificity mediated by conformational diversity. *Science* 299, 1362-7.
- Johnson, R.T. und Rao, P.N. (1970) Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature* 226, 717-22.
- Jukes, T.H. und King, J.L. (1979) Evolutionary nucleotide replacements in DNA. *Nature* 281, 605-6.
- Kaplan, D., Smith, D., Meyerson, H., Pecora, N. und Lewandowska, K. (2001) CD5 expression by B lymphocytes and its regulation upon Epstein-Barr virus transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13850-3.
- Karlsen, A.E. und Dyrberg, T. (1998) Molecular mimicry between non-self, modified self and self in autoimmunity. *Semin Immunol* 10, 25-34.
- Keeling, D.M., Campbell, S.J., Mackie, I.J., Machin, S.J. und Isenberg, D.A. (1991) The fibrinolytic response to venous occlusion and the natural anticoagulants in patients with antiphospholipid antibodies both with and without systemic lupus erythematosus. *Br J Haematol* 77, 354-9.
- Kilian, N., Wlazlowski, R. und Grabowicz, W. (2006) [Acute myocardial infarction in a young patient with a primary antiphospholipid syndrome - a case report.]. *Kardiol Pol* 64, 72-5.
- Kimura, N., Yoshikawa, H., Iwamoto, M., Sakihama, T., Akasu, F., Izui, S., Ueno, A., Nakajima, Y. und Tasaka, K. (1995) cDNA sequence analysis and characterization of a cytokine-inducing monoclonal antibody derived from autoimmune MRL/MP-lpr/lpr mouse. *Hybridoma* 14, 523-8.
- Kohler, G. und Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-7.
- Konova, E. (2005) Intravenous immunoglobulin therapy in antiphospholipid syndrome. *Clin Rev Allergy Immunol* 29, 229-36.
- Koren, H.S., Handwerger, B.S. und Wunderlich, J.R. (1975) Identification of macrophage-like characteristics in a cultured murine tumor line. *J Immunol* 114, 894-7.

Kornberg, A., Blank, M., Kaufman, S. und Shoenfeld, Y. (1994) Induction of tissue factor-like activity in monocytes by anti-cardiolipin antibodies. *J Immunol* 153, 1328-32.

Kozbor, D., Lagarde, A.E. und Roder, J.C. (1982) Human hybridomas constructed with antigen-specific Epstein-Barr virus-transformed cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 6651-5.

Lackner, K.J., von Landenberg, C., Barlage, S. und Schmitz, G. (2000) Analysis of prothrombotic effects of two human monoclonal IgG antiphospholipid antibodies of apparently similar specificity. *Thromb Haemost* 83, 583-8.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.

Levine, J.S., Branch, D.W. und Rauch, J. (2002) The antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med* 346, 752-63.

Levy, R.A., de Meis, E. und Pierangeli, S. (2004) An adapted ELISA method for differentiating pathogenic from nonpathogenic aPL by a beta 2 glycoprotein I dependency anticardiolipin assay. *Thromb Res* 114, 573-7.

Lieby, P., Poindron, V., Roussi, S., Klein, C., Knapp, A.M., Garaud, J.C., Cerutti, M., Martin, T. und Pasquali, J.L. (2004) Pathogenic antiphospholipid antibody: an antigen-selected needle in a haystack. *Blood* 104, 1711-5.

Lieby, P., Soley, A., Knapp, A.M., Cerutti, M., Freyssinet, J.M., Pasquali, J.L. und Martin, T. (2003) Memory B cells producing somatically mutated antiphospholipid antibodies are present in normal individuals. *Blood* 5, 5.

Lieby, P., Soley, A., Levallois, H., Hugel, B., Freyssinet, J.M., Cerutti, M., Pasquali, J.L. und 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.

Lockshin, M.D. und Erkan, D. (2003) Treatment of the antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med* 349, 1177-9.

Loizou, S., Cazabon, J.K., Walport, M.J., Tait, D. und So, A.K. (1997) Similarities of specificity and cofactor dependence in serum antiphospholipid antibodies from patients with human parvovirus B19 infection and from those with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 40, 103-8.

Lopez-Pedreria, C., Buendia, P., Barbarroja, N., Siendones, E., Velasco, F. und Cuadrado, M.J. (2006a) Antiphospholipid-mediated thrombosis: interplay between anticardiolipin antibodies and vascular cells. *Clin Appl Thromb Hemost* 12, 41-5.

Lopez-Pedreria, C., Buendia, P., Cuadrado, M.J., Siendones, E., Aguirre, M.A., Barbarroja, N., Montiel-Duarte, C., Torres, A., Khamashta, M. und Velasco, F. (2006b) Antiphospholipid antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome induce monocyte tissue factor expression through the simultaneous activation of NF-kappaB/Rel proteins via the p38

mitogen-activated protein kinase pathway, and of the MEK-1/ERK pathway. *Arthritis Rheum* 54, 301-11.

Lossos, I.S., Tibshirani, R., Narasimhan, B. und Levy, R. (2000) The inference of antigen selection on Ig genes. *J Immunol* 165, 5122-6.

MacCallum, R.M., Martin, A.C. und Thornton, J.M. (1996) Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography. *J Mol Biol* 262, 732-45.

Magid, M.S., Kaplan, C., Sammaritano, L.R., Peterson, M., Druzin, M.L. und Lockshin, M.D. (1998) Placental pathology in systemic lupus erythematosus: a prospective study. *Am J Obstet Gynecol* 179, 226-34.

Mahmoud, F., Abul, H., Omu, A., Al-Rayes, S., Haines, D. und Whaley, K. (2001) Pregnancy-associated changes in peripheral blood lymphocyte subpopulations in normal Kuwaiti women. *Gynecol Obstet Invest* 52, 232-6.

Malia, R.G., Kitchen, S., Greaves, M. und Preston, F.E. (1990) Inhibition of activated protein C and its cofactor protein S by antiphospholipid antibodies. *Br J Haematol* 76, 101-7.

Marciniak, E. und Romond, E.H. (1989) Impaired catalytic function of activated protein C: a new in vitro manifestation of lupus anticoagulant. *Blood* 74, 2426-32.

Matsuda, F., Ishii, K., Bourvagnet, P., Kuma, K., Hayashida, H., Miyata, T. und Honjo, T. (1998) The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus. *J Exp Med* 188, 2151-62.

Matsuura, E., Igarashi, Y., Fujimoto, M., Ichikawa, K. und Koike, T. (1990) Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet* 336, 177-8.

McCullough, K.C., Butcher, R.N. und Parkinson, D. (1983) Hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies against foot-and-mouth disease virus (FMDV). II. Cloning conditions. *J Biol Stand* 11, 183-94.

McNeil, H.P., Simpson, R.J., Chesterman, C.N. und Krilis, S.A. (1990) Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4120-4.

Menon, S., Rahman, M.A., Ravirajan, C.T., Kandiah, D., Longhurst, C.M., McNally, T., Williams, W.M., Latchman, D.S. und Isenberg, D.A. (1997) The production, binding characteristics and sequence analysis of four human IgG monoclonal antiphospholipid antibodies. *J Autoimmun* 10, 43-57.

Menon, V., Berkowitz, S.D., Antman, E.M., Fuchs, R.M. und Hochman, J.S. (2001) New heparin dosing recommendations for patients with acute coronary syndromes. *Am J Med* 110, 641-50.

Meroni, P.L. und Riboldi, P. (2001) Pathogenic mechanisms mediating antiphospholipid syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 13, 377-82.

- Miller, G. und Lipman, M. (1973) Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed marmoset leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 190-4.
- Misra, R., Venables, P.J., Watkins, R.P. und Maini, R.N. (1987) Autoimmunity to cardiolipin in infectious mononucleosis. *Lancet* 2, 629.
- Miyakis, S., Lockshin, M.D., Atsumi, T., Branch, D.W., Brey, R.L., Cervera, R., Derksen, R.H., PG, D.E.G., Koike, T., Meroni, P.L., Reber, G., Shoenfeld, Y., Tincani, A., Vlachoyiannopoulos, P.G. und Krilis, S.A. (2006) International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 4, 295-306.
- Mueh, J.R., Herbst, K.D. und Rapaport, S.I. (1980) Thrombosis in patients with the lupus anticoagulant. *Ann Intern Med* 92, 156-9.
- Niedbala, W.G. und Stott, D.I. (1998) A comparison of three methods for production of human hybridomas secreting autoantibodies. *Hybridoma* 17, 299-304.
- Nimpf, J., Bevers, E.M., Bomans, P.H., Till, U., Wurm, H., Kostner, G.M. und Zwaal, R.F. (1986) Prothrombinase activity of human platelets is inhibited by beta 2-glycoprotein-I. *Biochim Biophys Acta* 884, 142-9.
- Oldstone, M.B. (1998) Molecular mimicry and immune-mediated diseases. *Faseb J* 12, 1255-65.
- Oosting, J.D., Derksen, R.H., Bobbink, I.W., Hackeng, T.M., Bouma, B.N. und de Groot, P.G. (1993) Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C, or protein S: an explanation for their pathogenic mechanism? *Blood* 81, 2618-25.
- Ordi, J., Selva, A., Monegal, F., Porcel, J.M., Martinez-Costa, X. und Vilardell, M. (1993) Anticardiolipin antibodies and dependence of a serum cofactor. A mechanism of thrombosis. *J Rheumatol* 20, 1321-4.
- Out, H.J., Kooijman, C.D., Bruinse, H.W. und Derksen, R.H. (1991) Histopathological findings in placentae from patients with intra-uterine fetal death and anti-phospholipid antibodies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 41, 179-86.
- Pasquali, J.L., Nehme, H., Korganow, A.S. und Martin, T. (2004) Antiphospholipid antibodies: recent progresses on their origin and pathogenicity. *Joint Bone Spine* 71, 172-4.
- Perkins, S. und Foug, S.K. (1995) Stabilizing antibody secretion of human Epstein Barr virus-activated B-lymphocytes with hybridoma formation by electrofusion. *Methods Mol Biol* 48, 295-307.
- Pierangeli, S.S., Colden-Stanfield, M., Liu, X., Barker, J.H., Anderson, G.L. und Harris, E.N. (1999) Antiphospholipid antibodies from antiphospholipid syndrome patients activate endothelial cells in vitro and in vivo. *Circulation* 99, 1997-2002.

- Pierangeli, S.S., Espinola, R.G., Liu, X. und Harris, E.N. (2001) Thrombogenic effects of antiphospholipid antibodies are mediated by intercellular cell adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and P-selectin. *Circ Res* 88, 245-50.
- Pierangeli, S.S., Liu, X., Espinola, R., Olee, T., Zhu, M., Harris, N.E. und Chen, P.P. (2000) Functional analyses of patient-derived IgG monoclonal anticardiolipin antibodies using in vivo thrombosis and in vivo microcirculation models. *Thromb Haemost* 84, 388-95.
- Piona, A., La Rosa, L., Tincani, A., Faden, D., Magro, G., Grasso, S., Nicoletti, F., Balestrieri, G. und Meroni, P.L. (1995) Placental thrombosis and fetal loss after passive transfer of mouse lupus monoclonal or human polyclonal anti-cardiolipin antibodies in pregnant naive BALB/c mice. *Scand J Immunol* 41, 427-32.
- Polz, E. und Kostner, G.M. (1979) The binding of beta 2-glycoprotein-I to human serum lipoproteins: distribution among density fractions. *FEBS Lett* 102, 183-6.
- Prieto, G.A., Cabral, A.R., Zapata-Zuniga, M., Simon, A.J., Villa, A.R., Alarcon-Segovia, D. und Cabiedes, J. (2003) Valine/valine genotype at position 247 of the beta2-glycoprotein I gene in Mexican patients with primary antiphospholipid syndrome: association with anti-beta2-glycoprotein I antibodies. *Arthritis Rheum* 48, 471-4.
- Radic, M.Z. und Weigert, M. (1994) Genetic and structural evidence for antigen selection of anti-DNA antibodies. *Annu Rev Immunol* 12, 487-520.
- Rahman, A., Latchman, D.S. und Isenberg, D.A. (1998) Immunoglobulin variable region sequences of human monoclonal anti-DNA antibodies. *Semin Arthritis Rheum* 28, 141-54.
- Rahman, A., Menon, S., Latchman, D.S. und Isenberg, D.A. (1996) Sequences of monoclonal antiphospholipid antibodies: variations on an anti-DNA antibody theme. *Semin Arthritis Rheum* 26, 515-25.
- Rand, J.H., Wu, X.X., Andree, H.A., Lockwood, C.J., Guller, S., Scher, J. und Harpel, P.C. (1997) Pregnancy loss in the antiphospholipid-antibody syndrome--a possible thrombogenic mechanism. *N Engl J Med* 337, 154-60.
- Rand, J.H., Wu, X.X., Andree, H.A., Ross, J.B., Rusinova, E., Gascon-Lema, M.G., Calandri, C. und Harpel, P.C. (1998) Antiphospholipid antibodies accelerate plasma coagulation by inhibiting annexin-V binding to phospholipids: a "lupus procoagulant" phenomenon. *Blood* 92, 1652-60.
- Regner, M. und Lambert, P.H. (2001) Autoimmunity through infection or immunization? *Nat Immunol* 2, 185-8.
- Rubenstein, E., Arkfeld, D.G., Metyas, S., Shinada, S., Ehresmann, S. und Liebman, H.A. (2006) Rituximab treatment for resistant antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 33, 355-7.
- Ruiz-Arguelles, G.J., Ruiz-Arguelles, A., Lobato-Mendizabal, E., Diaz-Gomez, F., Pacheco-Pantoja, E., Drenkard, C. und Alarcon-Segovia, D. (1991) Disturbances in the tissue plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor (TPA/PAI) system in systemic lupus erythematosus. *Am J Hematol* 37, 9-13.

- Salmon, J.E. und Girardi, G. (2004) The role of complement in the antiphospholipid syndrome. *Curr Dir Autoimmun* 7, 133-48.
- Salmon, J.E., Girardi, G. und Holers, V.M. (2003) Activation of complement mediates antiphospholipid antibody-induced pregnancy loss. *Lupus* 12, 535-8.
- Sammaritano, L.R., Gharavi, A.E., Soberano, C., Levy, R.A. und Lockshin, M.D. (1992) Phospholipid binding of antiphospholipid antibodies and placental anticoagulant protein. *J Clin Immunol* 12, 27-35.
- Sammaritano, L.R., Ng, S., Sobel, R., Lo, S.K., Simantov, R., Furie, R., Kaell, A., Silverstein, R. und Salmon, J.E. (1997) Anticardiolipin IgG subclasses: association of IgG2 with arterial and/or venous thrombosis. *Arthritis Rheum* 40, 1998-2006.
- Schwarzenbacher, R., Zeth, K., Diederichs, K., Gries, A., Kostner, G.M., Laggner, P. und Prassl, R. (1999) Crystal structure of human beta2-glycoprotein I: implications for phospholipid binding and the antiphospholipid syndrome. *Embo J* 18, 6228-39.
- Sen, G., Bikah, G., Venkataraman, C. und Bondada, S. (1999) Negative regulation of antigen receptor-mediated signaling by constitutive association of CD5 with the SHP-1 protein tyrosine phosphatase in B-1 B cells. *Eur J Immunol* 29, 3319-28.
- Shah, N.M., Khamashta, M.A., Atsumi, T. und Hughes, G.R. (1998) Outcome of patients with anticardiolipin antibodies: a 10 year follow-up of 52 patients. *Lupus* 7, 3-6.
- Shapiro, S.S. (1996) The lupus anticoagulant/antiphospholipid syndrome. *Annu Rev Med* 47, 533-53.
- Shi, W., Chong, B.H., Hogg, P.J. und Chesterman, C.N. (1993) Anticardiolipin antibodies block the inhibition by beta 2-glycoprotein I of the factor Xa generating activity of platelets. *Thromb Haemost* 70, 342-5.
- Shlomchik, M.J., Aucoin, A.H., Pisetsky, D.S. und Weigert, M.G. (1987) Structure and function of anti-DNA autoantibodies derived from a single autoimmune mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 9150-4.
- Shoenfeld, Y. (2003) Systemic antiphospholipid syndrome. *Lupus* 12, 497-8.
- Shoenfeld, Y., Blank, M., Cervera, R., Font, J., Raschi, E. und Meroni, P.L. (2006) Infectious origin of the antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 65, 2-6.
- Simantov, R., LaSala, J.M., Lo, S.K., Gharavi, A.E., Sammaritano, L.R., Salmon, J.E. und Silverstein, R.L. (1995) Activation of cultured vascular endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *J Clin Invest* 96, 2211-9.
- Simon, T. und Rajewsky, K. (1992) A functional antibody mutant with an insertion in the framework region 3 loop of the VH domain: implications for antibody engineering. *Protein Eng* 5, 229-34.

- Smeeth, L., Cook, C., Thomas, S., Hall, A.J., Hubbard, R. und Vallance, P. (2006) Risk of deep vein thrombosis and pulmonary embolism after acute infection in a community setting. *Lancet* 367, 1075-9.
- Smirnov, M.D., Triplett, D.T., Comp, P.C., Esmon, N.L. und Esmon, C.T. (1995) On the role of phosphatidylethanolamine in the inhibition of activated protein C activity by antiphospholipid antibodies. *J Clin Invest* 95, 309-16.
- Splawski, J.B., Fu, S.M. und Lipsky, P.E. (1993) Immunoregulatory role of CD40 in human B cell differentiation. *J Immunol* 150, 1276-85.
- Subang, R., Levine, J.S., Janoff, A.S., Davidson, S.M., Taraschi, T.F., Koike, T., Minchey, S.R., Whiteside, M., Tannenbaum, M. und Rauch, J. (2000) Phospholipid-bound beta 2-glycoprotein I induces the production of anti-phospholipid antibodies. *J Autoimmun* 15, 21-32.
- Talal, N., Dauphinee, M. und Ahmed, S.A. (1992) CD5 B cells in autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci* 651, 551-6.
- Teng, N.N., Kaplan, H.S., Hebert, J.M., Moore, C., Douglas, H., Wunderlich, A. und Braude, A.I. (1985) Protection against gram-negative bacteremia and endotoxemia with human monoclonal IgM antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 1790-4.
- Teng, N.N., Lam, K.S., Calvo Riera, F. und Kaplan, H.S. (1983) Construction and testing of mouse-human heteromyelomas for human monoclonal antibody production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 7308-12.
- Tenno, T., Botling, J., Oberg, F., Nilsson, K. und Siegbahn, A. (1997) Tissue factor expression in human monocytic cell lines. *Thromb Res* 88, 215-28.
- Thompson, K.M., Hough, D.W., Maddison, P.J., Melamed, M.D. und Hughes-Jones, N. (1986) The efficient production of stable, human monoclonal antibody-secreting hybridomas from EBV-transformed lymphocytes using the mouse myeloma X63-Ag8.653 as a fusion partner. *J Immunol Methods* 94, 7-12.
- Tomlinson, I., Williams, SC, Corbett, SJ, Cox, JPL, Winter, G. (1996) VBASE. In: MRC centre for protein engineering, Cambridge.
- Trebak, M., Chong, J.M., Herlyn, D. und Speicher, D.W. (1999) Efficient laboratory-scale production of monoclonal antibodies using membrane-based high-density cell culture technology. *J Immunol Methods* 230, 59-70.
- Vega-Ostertag, M., Harris, E.N. und Pierangeli, S.S. (2004) Intracellular events in platelet activation induced by antiphospholipid antibodies in the presence of low doses of thrombin. *Arthritis Rheum* 50, 2911-9.
- von Landenberg, C. (1999) Herstellung, Charakterisierung und funktionelle Untersuchungen von monoklonalen Antiphospholipidantikörpern; Untersuchungen zu anti-Lipoprotein(a)-Autoantikörpern. In: Fakultät IV Chemie und Pharmazie. Universität Regensburg, Regensburg.

von Landenberg, C., Lackner, K.J., von Landenberg, P., Lang, B. und Schmitz, G. (1999) Isolation and characterization of two human monoclonal anti-phospholipid IgG from patients with autoimmune disease. *J Autoimmun* 13, 215-23.

von Muhlen, C.A. und Tan, E.M. (1995) Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 24, 323-58.

Wang, X. und Stollar, B.D. (2000) Human immunoglobulin variable region gene analysis. *J Immunol Methods* 244, 217-25.

Wassermann, A., Neisser, A. und Bruck, C. (1906) Eine serodiagnostische Reaction bei Syphilis. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 32, 745-746.

Wilson, W.A., Gharavi, A.E., Koike, T., Lockshin, M.D., Branch, D.W., Piette, J.C., Brey, R., Derksen, R., Harris, E.N., Hughes, G.R., Triplett, D.A. und Khamashta, M.A. (1999) International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 42, 1309-11.

Wucherpennig, K.W. (2001) Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents. *J Clin Invest* 108, 1097-104.

Yasuda, S., Atsumi, T., Matsuura, E., Kaihara, K., Yamamoto, D., Ichikawa, K. und Koike, T. (2005) Significance of valine/leucine247 polymorphism of beta2-glycoprotein I in antiphospholipid syndrome: increased reactivity of anti-beta2-glycoprotein I autoantibodies to the valine247 beta2-glycoprotein I variant. *Arthritis Rheum* 52, 212-8.

Ziegler-Heitbrock, H.W., Thiel, E., Futterer, A., Herzog, V., Wirtz, A. und Riethmuller, G. (1988) Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int J Cancer* 41, 456-61.

Anhang A:

DP-53
JGG9 μ GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC

TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTACTGGATGCACTGGGTCCGCCAAGCT
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTACTGGATGCACTGGGTCCGCCAAGCT

CCAGGGAAGGGGCTGGTGTGGGTCTCACCTATTAATAGTGATGGGAGTAGCACAACTAC
CCAGGGAAGGGGCTGGTGTGGGTCTCACCTATTAATAGTGATGGGAGTACCACAACTAC

GCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGTACACGCTGTAT
GCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGTACACGCTGTAT

-C-TGCA-AATG-AACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGG-CTG-TGTATTACTGTGCAAGA
GCGTGCCGAATGCAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTACTGTGCAAGG

JH3 GCTTTT-GATGT-C-TGGGGCCAAGGG-ACA-ATGGTCAG-CGT-CTC
GAGCATACTGACGGTATGAGACGTACATGGGGCCAAGGGTACCTACGGTCACCGTACTC

TT-CAG
CTACAGGGA

ANHANG SEQUENZALIGNMENTS

Anhang B:

DP-53
JGG9 μ

GAG	GTG	CAG	CTG	GTG	GAG	TCC	GGG	GGC	GGA	TTA	GTT	CAG	CCT	GGG	GGG	TCC
GAG	GTG	CAG	CTG	GTG	GAG	TCC	GGG	GGC	GGA	TTA	GTT	CAG	CCT	GGG	GGG	TCC
E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	E	P	G	G	S

CTG	AGA	CTC	TCC	TGT	GCA	GCC	TCT	GGA	TTC	ACC	TTC	AGT	AGC	TAC	TGG	ATG
CTG	AGA	CTC	TCC	TGT	GCA	GCC	TCT	GGA	TTC	ACC	TTC	AGT	AGT	TAC	TGG	ATG
L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	W	M

\$
AGC
AGT
S

CDR1

CAC	TGG	GTC	CGC	CAA	GCT	CCA	GGG	AAG	GGG	CTG	GTG	TGG	GTC	TCA	CGT	ATT
CAC	TGG	GTC	CGC	CAA	GCT	CCA	GGG	AAG	GGG	CTG	GTG	TGG	GTC	TCA	CAT	ATT
H	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	V	W	V	S	H	I

AAT	AGT	GAT	GGG	AGT	AGC	ACA	AGC	TAC	GCG	GAC	TCC	GTG	AAG	GGC	CGA	TTC
AAT	AGT	GAT	GGG	AGT	ACC	ACA	ACC	TAC	GCG	GAC	TCC	GTG	AAG	GGC	CGA	TTC
N	S	D	G	S	T	T	T	Y	A	D	S	V	K	G	R	F

CDR2

ACC	ATC	TCC	AGA	GAC	AAC	GCC	AAG	AAC	ACG	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AAC	AGT
ACC	ATC	TCC	AGA	GAC	AAC	GCC	AAG	TAC	ACG	CTG	TAT	GCG	TGC	GGA	ATG	GAA
T	I	S	R	D	N	A	K	Y	T	L	Y	A	C	G	M	G

L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R				
CTG	AGA	GCC	GAG	GAC	ACG	GCT	GTG	TAT	TAC	TGT	GCA	AGA				
CAG	TCT	GAG	AGC	CGA	CGA	CAC	GGT	CTG	ATG	TAT	TAC	TGT	GCA	AGG	GAG	CAT
Q	S	E	S	R	R	H	G	L	M	Y	Y	C	A	R	E	H

JH3

		A	F	D	V	W	G	Q	G	T	M	V	T	V	S	S
		GCT	TTT	GAT	GTC	TGG	GGC	CAA	GGG	ACA	ATG	GTC	ACC	GTC	TCT	TCA
ACT	GAC	GCT	ATG	AGA	CGT	ACA	TGG	GGC	CAA	GGG	TAC	CTA	CGG	TCA	CAC	GTA
T	D	G	M	R	R	T	W	G	Q	G	Y	L	R	S	H	V

CDR3

V			
G			
CTC	CTA	CAG	GGA
L	L	Q	G

Anhang C:

DPK13
JGG9 κ

	D	I	V	M	T	G	T													
	GAT	ATT	GTG	ATG	ACC	CAG	ACT	CCA	CTC	TCC	CTG	CCC	GTC	ACC	CCT	GGA	GAG			
								T	CCA	CTC	TCC	CTG	CCC	GTC	ACC	CCT	GGA	GAG		
									P	L	S	L	P	V	T	P	G	E		

	CCG	GCC	TCC	ATC	TCC	TGC	AGG	TCT	AGT	CAG	AGC	CTC	TTG	GAT	AGT	GAT	GAT			
	CCG	GCC	TCC	ATC	TCC	TGC	AGG	TCT	AGT	CAG	AGC	CTC	TTG	GAT	AGT	GAT	GAT			
	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	L	D	S	D	D			

CDR1

	GGA	AAC	ACC	TAT	TTG	GAC	TGG	TAC	CTG	CAG	AAG	CCA	GGG	CAG	TCT	CCA	CAG			
	GGA	AAC	ACC	TAT	TTG	GAC	TGG	TAC	CTG	CAG	AAG	CCA	GGG	CAG	TCT	CCA	CAG			
	G	N	T	Y	L	D	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	Q			

\$

	CTC	CTG	ATC	TAT	ACG	CTT	TCC	TAT	CGG	GCC	TCT	GGA	GTC	CCA	GAC	AGG	TTC			
	CTC	CTG	ATC	TAT	ACG	CTT	TCC	TAT	CGG	GCC	TCT	GGA	GTC	CCA	GAC	AGG	TTC			
	L	L	I	Y	T	L	S	Y	R	A	S	G	V	P	D	R	F			

\$

CDR 2

	AGT	GGC	AGT	GGG	TCA	GGC	ACT	GAT	TTC	ACA	CTG	AAA	ATC	AGC	AGG	GTG	GAG			
	AGT	GGC	AGT	GGG	TCA	GGC	ACT	GAT	TTC	ACA	CTG	AAA	ATC	AGC	AGG	GTG	GAG			
	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E			

jk2

	GCT	GAG	GAT	GTT	GGA	GTT	TAT	TAC	TGC	ATG	CAA	CGT	ATA	GAG	TTT	CCT	TAC			Y
	GCT	GAG	GAT	GTT	GGA	GTT	TAT	TAC	TGC	ATG	CAA	CGT	ATA	GAG	TTT	CCT	TGC			TAC
	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	M	Q	R	I	E	F	P	W			

CDR3

	ACT	TTT	GGC	CAG	GGG	ACC	AAG	CTG	GAG	ATC	AAA	C								
	ACT	TTT	GGC	CAG	GGG	ACC	AAG	CTG	GAG	ATC	AAA	CGA	ACT	GTG	GCT	GCA	C			
	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K	R	T	V	A	A				

ANHANG SEQUENZALIGNMENTS

Anhang D:

DP-49

HLC9 μ

CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG
 T GCT CTT TTA AGA GGT GTC CAG TGT CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG
 A L L R G V Q C Q V Q L V E S G

GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT
 GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT
 G G V V Q P G R S L R L S C V A S

GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC ATG CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC
 GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC ATA CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC
 G F T F S S Y G I H W V R Q A P G
 CDR1

AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TCA TAT GAT GGA AGT AAT AAA TAC
 AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TCA TAT GAT GGA AGT AAT AAA TAC
 K G L E W V A V I S F D G S S K Y
 CDR2

TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG
 TAT ACA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG
 Y T D S V K G R F T I S R D N S K

AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCT GTG
 AAC ACG CTG CAT CTG CAA ATG ACC AGC AGC CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCT GTG
 N T L H L Q M S S L R A E D T A V

D6-13

TAT TAC TGT GCG AAA GGG TAT AGC AGC AGC TGG TA
 TAT TAC TGT GCG AAA TCG GTT CGA CTC TTG TAT AGC AGC AGA GAG ACC CCG
 Y Y C A K S V R L L Y S S R E T P
 CDR3

JH4b

TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC
 AGG GGC GAC GGC CCC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC
 R G D G P F D Y W G Q G T L V T V

TCC TCA

TCC TCA GGG AGT GCA TCC GCC CCA ACC C
 S S G S A S A P T

Anhang E:

DPK21
HLC9 κ

GAA ATA GTG ATG ACG CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT GTG TCT CCA
ACT GGA GAA ATA GTG ATG ACG CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT GTG TCT CCA
T G E I V M T Q S P A T L S V S P

E Q
GGG GAA AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AAC
GGG GAC AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CCG AGT GTT AGC AGC AAC
G D R A T L S C R A S R S V S S N

CDR1

TTA GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT
TTA GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGA CTC CTC ATC TAT
L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y

GGT GCA TCC ACC AGG GCC ACT GGT ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG
GGT GCA TCC ACC AGG GCC ACT GGT ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG
G A A T R A T G I P A R F S G S G

CDR2

TCT GGG ACA GAG TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG TCT GAA GAT TTT
TCT GGG ACA GAG TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG ACT GAA GAT TTT
S G T E F T L T I S S L Q T E D F

Jk2

GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT AAT AAC TGG CCT CC TAC ACT TTT
GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT AAT AAG TGG CCT CCG AGG TAC ACT TTT
A V Y Y C Q Q Y N K W P P R Y T F

CDR3

GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA C
GGC CAG GGG ACC AAA CTG AAG ATC AAA CGA ACT GTG GCT GCA CCA TCT
G Q G T K L K I K R T V A A P S

ANHANG SEQUENZALIGNMENTS

Anhang F:

VII-5
HVA2 μ

TG CTG ACC ATC CCT TCA TGG GTC TTG TCC CAG ATC ACC TTG AAG GAG TCT
L T I P S W V L S Q I T L K E S

GGT CCT ACG CTG GTG AAA CCC ACA CAG ACC CTC ACG CTG ACC TGC ACC TTC
G P T L V K P T Q T L T L T C T F

TCT GGG TTC TCA CTC AGC ACT AGT GGA GTG GGT GTG GGC TGG ATC CGT CAG
S G F S L S T S G V G V G W I R Q

CDR1

CCC CCA GGA AAG GCC CTG GAG TGG CTT GCA CTC ATT TAT TGG AAT GAT GAT
P P G K A L E W L A L I Y W D D D

CDR2

AAG CGC TAC AGC CCA TCT CTG AAG AGC AGG CTC ACC ATC ACC AAG GAC ACC
K R Y S P S L K S R L T I T K D T

M

TCC AAA AAC CAG GTG GTC CTT ACA ATG ACC AAC ATG GAC CCT GTG GAC ACA
S K N Q V V L T L T N M D P V D T

D3-3

GCC ACA TAT TAC TGT GCA CAC AGA C GTA TTA CGC TTT TTG GAG
A T Y Y C A H R R A L G L R F L E

JH5

TGG TTA TTA TAC C C AAC TGG TTC GAC CCC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC
W T K G A N W F D P W G Q G T L V

CDR3

ACC GTC TCC TCA G
T V S S G S

Anhang G:

DPK22

HVA2 κ

GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA
 ACC GGA GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA
T G E I V L T Q S P G T L S L S P

GGG GAA AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC
 GGG GAA AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC
G E R A T L S C R A S Q S V S S S

CDR1

TAC TTA GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC
 TAC TTA GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC
Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I

TAT GGT GCA TCC AGC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT
 TAT GGT GCA TCC AGC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT
Y G A S S R A T G I P D R F S G S

CDR2

GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT
 GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT
G S G T D F T L T I S R L E P E D

Jκ4

TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG CAG TAT GGT AGC TCA C **CTC ACT TTC GGC GGA**
 TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG CAG TAT GGT AGC TCA CTC ACT TTC GGC GGA
F A V Y Y C Q Q Y G S S L T F G G

CDR3

GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA CGT A
 GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA CGA ACT ACT GTG GCT GCA CCA TCT GT
G T K V E I K R T V A A P S

Anhang: Abkürzungen

ACL	Anti-Cardiolipin-Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APC	aktiviertes Protein C
APDS	Ammoniumperoxodisulfat
APL	Antiphospholipidantikörper
APS	Antiphospholipidsyndrom
BSA	bovines Serumalbumin
CCP	<i>complement control protein module</i>
cDNA	<i>copyDNA</i>
CDR	<i>complementarity determining region</i>
CL	Cardiolipin
CSA	Cyclosporin A
d	Tage
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol-Dihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DPBS	<i>Dulbeccos phosphate buffered saline</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELISA	<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting, fluoreszenzaktivierte Zellsortierung</i>
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FR	<i>framework region</i>
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HUSAR	Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cell</i>
IL	Interleukin
ITIM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif</i>
IVIG	Intravenöses Immunglobulin
LA	Lupus Antikoagulans
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
Min	Minuten
MW	Molekulargewicht
MWCO	<i>Molecular Weight Cut-Off</i>
n.e.	nicht erfasst
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernspintomographie)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> , mononukleäre Zellen aus dem Blut
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
PEG	Polyethylenglykol
PHA	Phythämagglutinin

PI	Phosphatidylinositol
PS	Phosphatidylserin
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
s	Sekunden
SCR	<i>short consensus repeats</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLE	Systemischer Lupus erythematosus
SPM	Sphingomyelin
β2GPI	β2-Glycoprotein I
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TF	Tissue Factor
Upm	Umdrehungen pro Minute
VDRL	<i>venereal disease research test</i>

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Fischer, C., Buschmann, C., Lichy, M., Ochsenhirt, V., von Landenberg, P. und Lackner, K.J. (2003) Cofactor dependence of antiphospholipid antibodies can only be determined by serum-free IgG fractions. *Immunobiol.* 208 (1-3): N.16 (Abstract).

Buschmann, C., Fischer, C., Ochsenhirt, V., Neukirch, C., Lackner, K.J. und von Landenberg, P. (2004) Generation and characterization of three monoclonal IgM Antiphospholipid antibodies recognising different phospholipid antigens. *Autoimmun Rev.* 3 Suppl 2:85 (Abstract)

Buschmann, C., Fischer, C., Ochsenhirt, V., Neukirch, C., Lackner, K.J. und von Landenberg, P. (2005) Generation and characterization of three monoclonal IgM Antiphospholipid antibodies recognising different phospholipid antigens. *Ann N Y Acad Sci* 1051:240-254.

Lebenslauf

Catharina Buschmann

Geboren am 22.10.1976 in Limburg/Lahn

Schulbildung

1983 – 1987	Grundschule Thalheim
1987 – 1996	Fürst-Johann-Ludwig-Schule, Hadamar Gesamtschule mit gymnasialer Oberstufe
06/1996	Abitur

Studium

10/1996-08/2001	Diplom-Biologie an der Philipps-Universität Marburg Hauptstudium mit den Schwerpunktfächern Parasitologie, Zellbiologie, Medizinische Mikrobiologie / Immunologie
10/1998	Vordiplom
11/2000-08/2001	Diplomarbeit am Institut für Medizinische Virologie der Universität Zürich: <i>„Proteine mit PDZ-Domänen und ihre Wechselwirkung mit Liganden“</i>
08/2001	Diplomprüfung

Beruflicher Werdegang, Doktorarbeit

12/2001 – 10/2002	Wissenschaftliche Angestellte am Koordinierungszentrum für Klinische Studien (KKS) am Fachbereich Medizin der Johannes Gutenberg- Universität Mainz ab 15.03.2002 auf Teilzeitbasis neben einem begonnenen Promotionsstudium
03/2002 – 01/2005	Doktorarbeit am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz <i>„Analyse struktureller Eigenschaften humaner Antiphospholipidantikörper sowie Untersuchungen zu ihrer möglichen Beteiligung am Antiphospholipidsyndrom“</i>

Seit 02/2005 Wissenschaftliche Referentin / Trainee bei der Mundipharma GmbH,
Limburg / Lahn

Stipendien

02/1999-09/2001 Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes

10/2000-09/2001 „Hölderlin-Stipendium“ der Studienstiftung des deutschen Volkes für
Studienjahre im Ausland

11/2002-11/2004 Promotionsstipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes

Bedanken möchte ich mich bei ...

... allen, die mich in der Durchführung meiner Doktorarbeit unterstützt haben:

Bei Herrn Prof. Dr. Karl Lackner bedanke ich mich für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin durchführen zu dürfen, für die Bereitstellung eines interessanten und herausfordernden Themas und für die Betreuung der Arbeit.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Klaus Lingelbach, Universität Marburg, für die Übernahme der externen Betreuung der Arbeit und des Erstgutachtens und für seine Unterstützung.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Dr. Christian Fischer, der die direkte wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit übernommen hat, für die engagierte Zusammenarbeit, die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, die Diskussionsbereitschaft und das immer offene Ohr für Fragen, Anregungen und Ideen. Herrn Juniorprofessor Dr. Philipp von Landenberg danke ich für die Möglichkeit, den praktischen Teil der Doktorarbeit nach personellen Veränderungen im Institut in seiner Arbeitsgruppe fertig stellen zu können, und für die Übernahme der Betreuung.

Markus Jülch hat mir beim Sortieren der B-Lymphozyten geholfen. Dafür und für die Möglichkeit, den Epics® ALTRA™ in der Medizinischen Klinik III (Uni Mainz) nutzen zu können, möchte ich mich bedanken. Christian Ruckes danke ich für die Anregungen, Unterstützung und die Diskussionsfreude bezüglich der statistischen Methoden zur Untersuchung der Mutationen in den variablen Regionen der APL.

Bei meinen direkten Kolleginnen und Kollegen im Labor bedanke ich mich ganz besonders für die herzliche Arbeitsatmosphäre, für die gegenseitige Unterstützung in allen Höhen und Tiefen unseres Laboralltags und für die schönen und bereichernden fachlichen und persönlichen Gespräche: Viola Ochsenhirt, Dr. Heidi Rossmann, Carolin Neukirch, Nicole Esly, PD Dr. Michael Torzewski, Dr. Kai Bruns, Dana Wiese, Marcel Lichy, Wolfgang Gronau und Nicole Nitsche.

Ein herzlicher Dank geht auch an alle Mitarbeiterinnen des Chirurgie-Labors für die gute Zusammenarbeit. Ein Dankeschön ebenso an alle anderen Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des Zentrallabors und die Doktorandinnen der anderen Arbeitsgruppen innerhalb des Instituts.

Der Firma Mundipharma, besonders meiner Chefin PD Dr. Karen Reimer, danke ich für die Möglichkeit, die Doktorarbeit neben meiner Arbeit fertigzustellen.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes danke ich für die vielseitige, nicht nur finanzielle Förderung dieser Arbeit und meines Studiums. Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Vertrauensdozenten Prof. Dr. Sucharit Bhakdi für seine fachliche Unterstützung, die Möglichkeit, in seinem Labor Versuche durchzuführen und die Gesprächsbereitschaft in vielen Dingen, die die Organisation und Durchführung dieser Arbeit betrafen.

Viele andere Personen haben auf unterschiedliche Weise zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Dafür möchte ich mich bedanken, besonders bei den Mitarbeitern der unterschiedlichen Kliniken, die mich auf Patienten mit Antiphospholipidsyndrom aufmerksam gemacht haben, diese Patienten aufgeklärt und die Blutabnahme übernommen

haben, und bei den Patienten und Patientinnen, die bereit waren, Blut zu Forschungszwecken zur Verfügung zu stellen.

Meinen Freunden danke ich für ihre Geduld und ihre Unterstützung in so vielfältiger Art und Weise.

Meiner Familie danke ich für's Dasein, für die Unterstützung in allen Situationen und für ihr Interesse: Christiane, Bernhard, Lara, Bastian, Mechthild, Anne, Wolfgang und meinen Großeltern.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir mein Studium und meine Doktorarbeit ermöglicht haben, mich in meinen Interessen gefördert und auf vielfältige Weise unterstützt und mir in all meinen Entscheidungen großes Vertrauen und Interesse entgegengebracht haben. Ich bedauere sehr, dass mein Vater die Fertigstellung dieser Arbeit nicht erleben konnte. Meiner Mutter, wie auch meiner restlichen Familie, danke ich, dass sie mich vor allem in den letzten Monaten der Fertigstellung dieser Arbeit immer wieder aufgebaut, ermutigt und unterstützt haben.